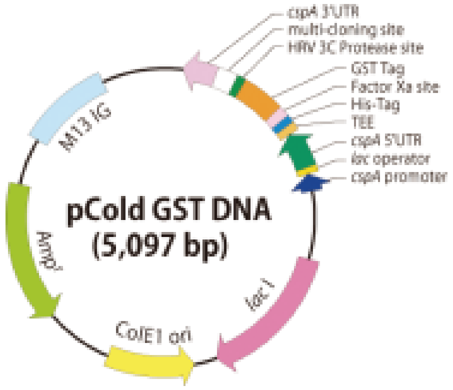
NMR試料調製・安定同位体標識・NMR測定

[技術の概要]

発現ベクターの構築・発現

・pCold-GSTシステム（大腸菌）
　児嶋らによって開発
　タカラバイオより市販
　大腸菌で最も効率の良い発現系

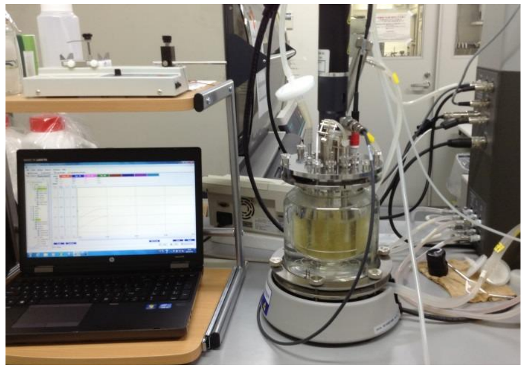


・蛋白質発現の確認

NMR用安定同位体標識

・培養、発現条件の最適化

・アミノ酸、部位選択的な
　安定同位体標識試料の調製


高性能ジャーファーメンター

NMR装置群

・世界最高クラスの超高感度測定
　400、500、600、800、950 MHz

・目的、標識に応じた多様な測定法
　$^{1}H/^{13}C/^{15}N$ 多次元NMR測定
　^{19}F-NMR、スクリーニング

950 MHz + 高感度極低温プローブ

[技術の利用例]

・キナーゼなど、大腸菌での発現が困難な蛋白質の発現と安定同位体標識

・各種NMR測定に必要な安定同位体標識

・安定同位体標識蛋白質のNMR測定、小さな蛋白質（分子量2万以下）の全自動構造解析

・高分子量蛋白質など、信号の重なりを解消するアミノ酸選択的^{13}C、^{15}N標識、リジン残基の^{13}Cメチル化、グルタミン残基の^{19}F標識

・^{19}F化合物ライブラリを用いたNMRスクリーニング、リガンド結合部位の同定、複合体の構造解析

連絡先

[所属] 大阪大学蛋白質研究所

[名前] 児嶋長次郎

[E-mail] kojima@protein.osaka-u.ac.jp

in−cell・in situ NMR

[技術の概要]

in−cell NMR用の試料調製

大腸菌
昆虫細胞
哺乳動物細胞（HeLa等）
} 安定同位体標識蛋白質の発現、導入

・安定同位体標識蛋白質の発現、導入条件の最適化

蛋白質細胞導入装置

in−cell NMR 測定

・標識、目的に応じた多様なNMR装置、測定法
400、500、600、800、950MHz（溶液）
500、600(DNO)、700(DNP)（固体）

500 MHz + 高感度極低温プローブ（多核対応）

700 MHz + DNP超高感度プローブ

[技術の利用例]

・大量発現による細胞内蛋白質の安定同位体標識、安定同位体標識蛋白質の細胞内導入

・大腸菌および動物細胞内の特定蛋白質のNMR計測（in−cell NMR）

・超高感度固体NMRによるインタクト細胞のNMR（in situ NMR）

・細胞内異核種のNMR検出（リン、ナトリウム、セシウム、水銀、フッ素など）

・細胞内で蛋白質の構造情報を得るための還元耐性スピンラベル標識、ランタニドキレート導入

連絡先

[所属] 大阪大学蛋白質研究所

[名前] 児嶋長次郎

[E−mail] kojima@protein.osaka−u.ac.jp

相関構造解析法のためのNMR相互作用による創薬基盤技術の開発
エピゲノム関連タンパク質と低分子化合物のスクリーニング法の開発と支援

[技術の概要]

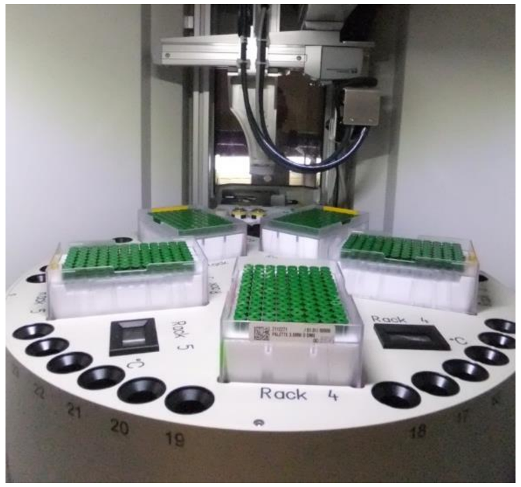
支援メニュー

- エピゲノム関連タンパク質のように柔らかくて結晶化が困難な天然変性タンパク質の相互作用部位の同定と認識構造の解明
- 自動測定による標的タンパク質結合化合物の大量スクリーニング
- 世界最高感度950MHzLC-NMRによる代謝化合物の同定
- 900MHz固体NMRによるタンパク質の測定

支援に供する設備

フロー型TCI
クライオ
プローブ付
950MHz
LC-NMR、
700MHz
LC-NMR

自動測定：10cm
の試料管が480本

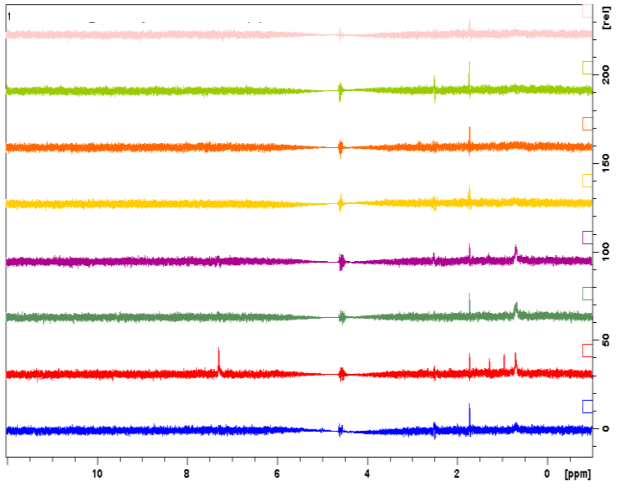


[技術の利用例]

LC-MSで同定できなかった化合物のLC-NMR装置の利用による分子構造の同定

標的タンパク質結合化合物のスクリーニング

Sample Jet(480本)と自動測定ソフトを用いて3,328化合物の標的タンパク質との結合の有無を23日でNMR測定により判定



連絡先

[所属] 横浜市立大学大学院
生命医科学研究科

[名前] 西村善文

[E-mail] nisimura@tsurumi.yokohama-cu.ac.jp

相関構造解析法のためのNMR相互作用による創薬基盤技術の開発
創薬標的膜タンパク質等を対象としたNMRによる相互作用解析アプローチ

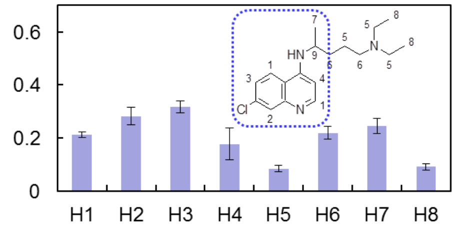
[技術の概要]

結晶構造解析が容易ではない、膜タンパク質などの創薬標的タンパク質を対象として、これまで開発に携わってきた独自のNMR測定法を含む、各種NMR相互作用解析手法を駆使した支援を行います。

- 高精度な相互作用界面同定法である各種交差飽和法を活用した、結晶構造解析が困難な標的タンパク質複合体の相互作用解析の支援。
- 汎用性の高いリガンド観測NMR手法による、化合物バリデーション、ファーマコフォア同定などの支援。
- NMR構造解析・相互作用解析を指向した創薬標的膜タンパク質等の試料調製に関する支援についても応相談。
- 950MHz NMRをはじめとする、最先端NMR装置群を使用。

[技術の利用例]

最新型NMR装置を活用した高精度NMR相互作用解析



DIRECTION法によるリガンドエピトープ同定

酵母発現系を活用したNMR測定用膜タンパク質試料調製

連絡先

[所属] 横浜市立大学大学院
生命医科学研究科

[名前] 高橋栄夫

[E-mail] hid@tsurumi.yokohama-cu.ac.jp

光を使った化合物スクリーニング技術

[技術の概要]

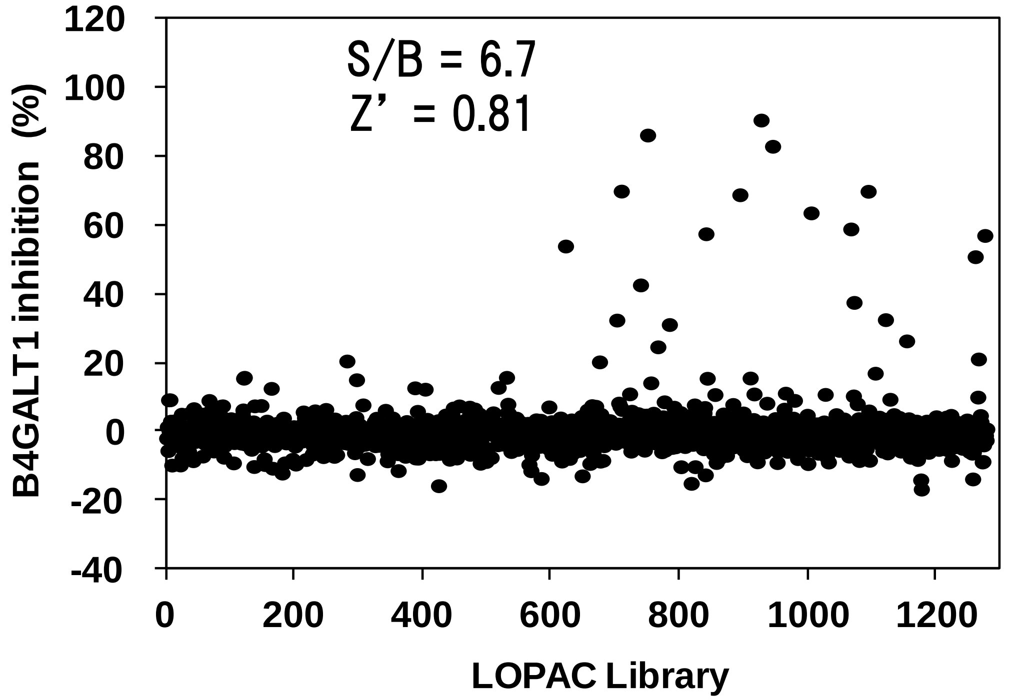
当機構では様々なアッセイ方法の支援を行っているが、特に吸光、蛍光、発光などの光を利用する多検体高速アッセイ法の支援に実績がある。
各種酵素による基質の変化やルシフェラーゼを用いるレポーター遺伝子アッセイ、タンパク質間相互作用検出、細胞内カルシウム濃度変化測定など用途は多岐にわたる。
特に、糖転移酵素やキナーゼに関し、低コストで行えるアッセイ方法を開発※し、技術提供可能である。

※熊谷ら 和光純薬時報、83(2)、14-17 (2015)

利用機器の例:
プレートスタッカー付のプレートリーダー
プレートイメージャー(FDSS7000)
細胞イメージャー(ArrayScan VTI)
LabChipシステム(EZ Reader II)

[技術の利用例]

既知薬理活性化合物ライブラリー(LOPAC)を用いた糖転移酵素B4GALT1の蛍光HTS



連絡先

[所属] 東京大学創薬機構

[名前] 小島宏建

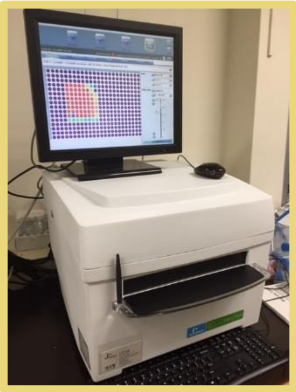
化合物ライブラリー 検索

http://www.ddi.u-tokyo.ac.jp/ をご参照下さい

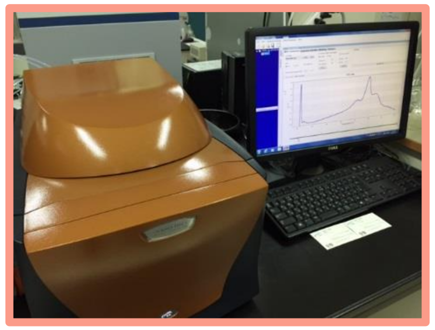
物理化学的アプローチによる低分子スクリーニング

[技術の概要]

標的とする分子（タンパク質、核酸など）に対するin vitroでのダイレクトな結合を基にした低分子スクリーニングの技術支援を致します。さらに、物理化学的な指標に基づくヒットバリデーションを実施し、ヒット化合物選抜のための低分子化合物の“質”に関する評価をサポートいたします。

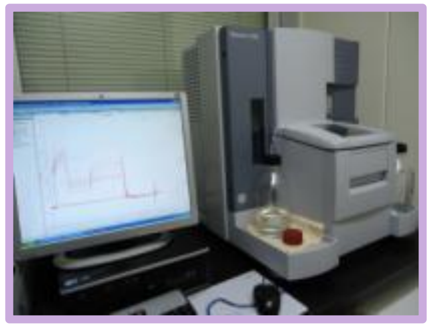


RWG



DSC

ITC



SPR

[技術の利用例]

- フラグメントスクリーニング
- PPIスクリーニング
- ITC、SPRを活用したヒットバリデーション

連絡先

[所属] 東京大学創薬機構

[名前] 津本浩平

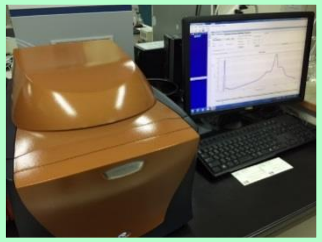
[E-mail] tsumoto@bioeng.t.u-tokyo.ac.jp

標的分子と低分子薬剤の物理化学的な結合評価

[技術の概要]

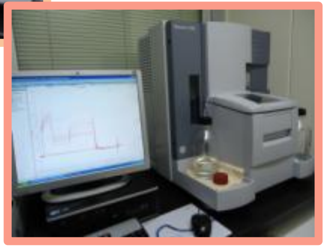
スクリーニングより得られてきたヒット候補化合物、メドケムで最適化中のリード候補化合物などに関して、標的とする分子（タンパク質、核酸など）との物理化学的（ITC、DSCによる熱力学的、SPR、BLIによる速度論的）な結合解析を実施できる技術支援を致します。これより、構造活性相関（SAR)を熱力学的・速度論的な観点から評価することができ、構造情報と組み合わせることにより精密な分子設計の評価と、さらなる親和性向上へつながる提案をサポート致します。

ITC



DSC

BLI



SPR

[技術の利用例]

- 低分子薬剤のITCによる熱力学的な相互作用評価
- 低分子薬剤のDSCによる熱力学的な熱安定性評価
- 低分子薬剤のSPR、BLIによる速度論的な相互作用評価

連絡先

[所属] 東京大学創薬機構

[名前] 津本浩平

[E-mail] tsumoto@bioeng.t.u-tokyo.ac.jp

創薬コンサルティング

[技術の概要]

専門家との創薬ブレインストーミング

最初から出口を踏まえて創薬開発を行うため、北大病院臨床開発研究センターとの連携による製薬企業OB等の専門家が加わったディスカッション、Brain storming (BS)ミーティング、創薬シーズ発掘を進めている。

·創薬標的とその競合状況等に関するアドバイス
·ハイスループット化に関するアドバイス

シーズ探索・創薬BSミーティング

標的タンパク質発現系と結晶化の相談

発現系

糖鎖修飾が不要な場合

大腸菌

糖鎖修飾が必要な場合

HEK293S GnTI⁻細胞

カイコ
バキュロウイルス

結晶化

細胞表面受容体・高等動物由来標的タンパク質・化合物複合体の結晶構造解析の実績あり

発現系構築・結晶化技術指導

[技術の利用例]

➢ スクリーニングへの展開

2015年3月までに38件の相談会を実施し、12件がスクリーニングを実施。3件は評価系構築中。
このうち、北大病院との連携による事前評価を受けた4件について、全てスクリーニングを展開している。

➢ タンパク質発現と結晶化

- 大腸菌封入体発現およびリフォールディング、ヒト培養細胞、カイコバキュロウイルス発現系など複数の技術を使い、標的タンパク質を調製した。
- 基質・細胞表面受容体の共結晶解析から、その阻害剤化合物合成の方針を決定した。

連絡先

[所属] 北海道大学薬学研究院
創薬科学研究教育センター

[名前] 前仲勝実

[E-mail] machine_info@pharm.hokudai.ac.jp

アッセイ系構築・調整によるスクリーニング支援

[技術の概要]

アッセイ系の構築支援 HORNET、Mosquito 等

1. 創薬支援自動化スクリーニング装置HORNET-HTSでは、96穴・384穴プレートについて、複雑なプレート操作やハイコンテンツ測定等の全自動化が可能である。
2. ナノリッター分注システムMosquitoでは、50nl～1.2μlの範囲内で正確に吸引、分注が可能である。タンパク質の結晶化にも利用できる。
3. PersonalPipettor230は直観的に操作ができる分注機で、他分注機では難しい滅菌操作が可能である。
4. プレートウォッシャーおよびマルチディスペンサーで、96穴及び384穴プレートを用いた様々なプレートハンドリングが可能である。

HTS screening
HORNET-HTS

High contents image Operetta

ナノリットル分注器
Mosquito LCP

**スクリーニング系構築の手びき
および結晶化の支援**

[技術の利用例]

- **21万化合物スクリーニングの実施**

  HORNETとOperettaを使用し、21万化合物に対するハイコンテントスクリーニングを支援した。

- **反応系の最小化、測定法の変更による最適化**
  - 偽陽性を生じやすい化合物評価系の最適化(使用機器:マルチディスペンサー)を行うことで新規評価系を構築した。
  - 低コストかつハイスループットな実験系を構築し(使用機器:PersonalPipettor230、プレートウォッシャー、マルチディスペンサー)、約1万化合物を1ヶ月未満でアッセイした。

1万化合物スクリーニングを5件実施

連絡先

[所属] 北海道大学薬学研究院
創薬科学研究教育センター

[名前] 前仲勝実

[E-mail] screening@pharm.hokudai.ac.jp

物理化学測定によるスクリーニング支援

[技術の概要]

物理化学測定　SPR、ITC、DSC、DSF

1. 表面プラズモン共鳴(SPR)法は、分子間相互作用をリアルタイムに検出する方法であり化合物と標的タンパク質の結合親和性、結合速度定数、解離速度定数を算出することが可能である

表面プラズモン共鳴
Biacore T200

2. 等温滴定型熱量測定(ITC)は、結合定数に加えて結合に伴う熱力学パラメータを得ることができるため、化合物の結合能の複合的な解析・比較・設計を可能とする。

等温滴定型熱量測定
Auto iTC T200

3. 示差走査型熱量測定(DSC)では、化合物存在下における標的タンパク質との親和性の有無を変性温度のシフトを基準として判断することが可能である。

示差走査型熱量測定
VE-Capillary DSC

4. 示差走査型蛍光定量法(DSF)は、DSCと同様にタンパク質の変性温度を指標に化合物の親和性を解析するが、より短時間・低サンプル量で可能であるミディアムスループット解析に利用可能である。

測定系構築に関する技術補助

[技術の利用例]

- **化合物ライブラリースクリーニング支援**

  SPRをin silicoスクリーニングと組み合わせ、効率良くスクリーニングを行った。

  DSFを1次スクリーニングに用いて、1万化合物の結合能解析を行うと共に、SPRを用いて特異性解析を行った。

- **相互作用タンパク質間結合能解析支援**

  ITCにて誘導体化合物との相互作用解析を行い、親和性、ΔS/ΔHの変化を解析した。

- **抗体のキャラクタリゼーション支援**

その他、各種アッセイ系の構築支援

連絡先

[所属] 北海道大学薬学研究院
創薬科学研究教育センター

[名前] 前仲勝実

[E-mail] machine_info@pharm.hokudai.ac.jp

東北大学化合物ライブラリー

[技術の概要]

- 東北大学薬学研究科有機化学系6分野が保有する独自の化合物群（約6,000化合物）
- ヘテロ環化合物、アルカロイド、環状ペプチド、フラボン、ジヒドロピリジン、複素環含有化合物、天然物、およびその合成中間体を含む多様な化合物ライブラリー
- DMSO溶液でスクリーニングに提供（96ウェル、384ウェルに分注）
- ヒット化合物発見後の合成展開を促進

内訳

・含ヘテロ環化合物	47%
・天然物、その類縁体	6%
・橋かけ構造	13%
・スピロ環	3%

[技術の利用例]

- GPCR拮抗薬の探索
- 転写因子阻害剤の探索
- 特定細胞の増殖抑制剤の探索
- 特定酵素の発現抑制剤の探索
- 変異タンパク質の安定化剤の探索

連絡先

[所属] 東北大学大学院薬学研究科
分子細胞生化学分野

[名前] 青木淳賢

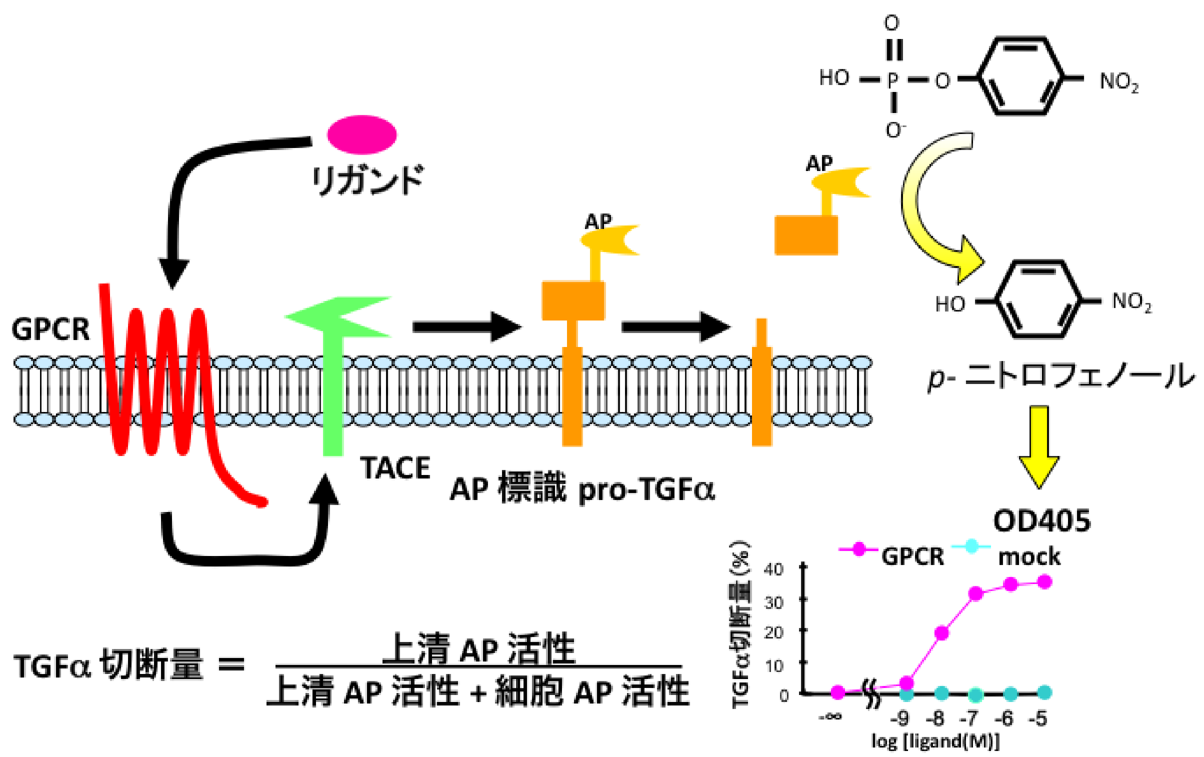
[E-mail] jaoki@m.tohoku.ac.jp

GPCRスクリーニング法（TGFα切断assay）

[技術の概要]

TGF α（トランスフォーミング増殖因子 α）
切断活性を指標に広範囲なGPCR活性を評価

① リガンド既知GPCRのうち約90%の活性化を検出可能
② 一般的なGPCRアッセイでは検出が困難な、
$G\alpha_{12/13}$シグナルを高感度・高精度で検出できる
③ 汎用機器(プレート対応吸光度測定機)と
安価な検出試薬の利用（約90円／96ウェルプレート）
④ HTSに応用可能（384ウェル、自動化アッセイ）
⑤ 一般的な発現ベクター使用可能



[技術の利用例]

GPCR のアゴニスト・アンタゴニスト探索

目的受容体発現細胞
↓
化合物ライブラリーのスクリーニング
受容体特異性について同一のアッセイ系で評価
容量反応曲線から既存薬との活性を比較

GPCR のデオーファニング

リガンド未知（オーファン）GPCR発現細胞
↓
生体抽出物、受容体未知リガンド
生理活性物質ライブラリーなどをテスト

連絡先

[所属] 東北大学大学院薬学研究科
分子細胞生化学分野

[名前] 青木淳賢

[E-mail] jaoki@m.tohoku.ac.jp

化合物ライブラリ規模に応じたHTS技術支援

[技術の概要]

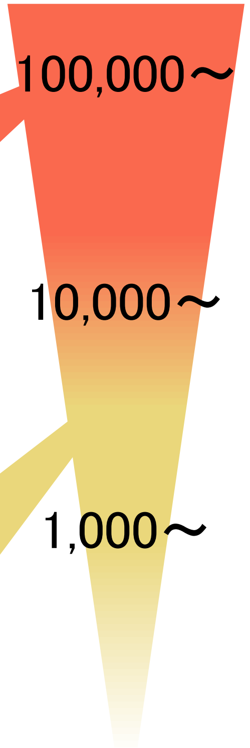
① 大規模HTS支援システム

★Motomanアームロボットを核とした全自動HTSシステム。10万化合物以上の化合物ライブラリーのHTSも実施可能(～16,128サンプル/ラン)。アッセイの自動化に係るプログラム作成も支援いたします。

＜搭載機器＞

・Biomek NXP
・ELx405
・Vspin
・FLIPR TETRA
・Cytomat2C
・Plate hotel
・Multidrop combi
・SpectraMax Paradigm

化合物数



② 中規模HTS支援システム

★ヒット・リード化合物の最適化、及び、小～中規模スクリーニングに特化したHTS支援システム。

＜搭載機器＞

・Biomek FX
・PHERAStar-FS
・Multidrop combi
・Mosquito
・CO_2インキュベーター

③ その他；低酸素細胞培養解析プラットフォーム

★Ruskinn社製の低酸素グローブボックスがご利用頂けます。低酸素環境下（1%又は5%O_2)での化合物処理等に最適です。

[技術の利用例]

＜ルシフェラーゼレポーター細胞を用いた実施例＞

1. 384ウェルプレートへの細胞播種

↓

2. 化合物添加前の前培養

↓

3. 含化合物培地への培地交換

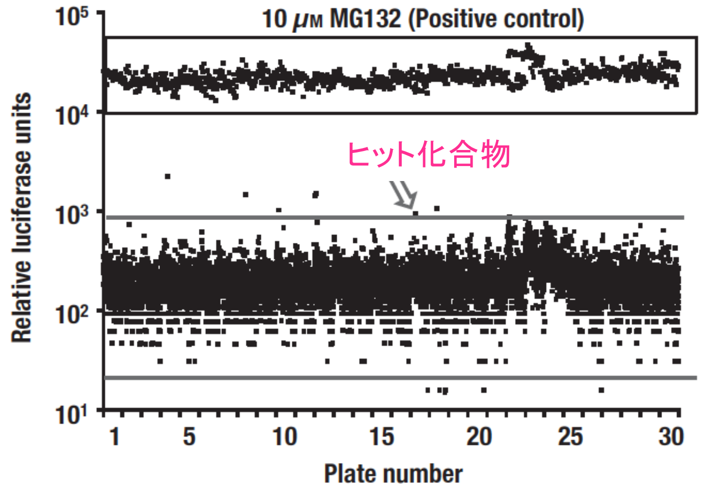
↓

4. 化合物暴露

↓

5. レポーター活性の測定

化合物数；9,600
ヒット化合物数；6



Tsujita et al., Genes. Cells., 2015.

連絡先

[所属] 東北大学大学院医学系研究科
医化学分野

[名前] 山本雅之

[E-mail] pford@med.tohoku.ac.jp

実践的な創薬研究支援
－ヒット化合物の周辺化合物の検索と提案－

[技術の概要]

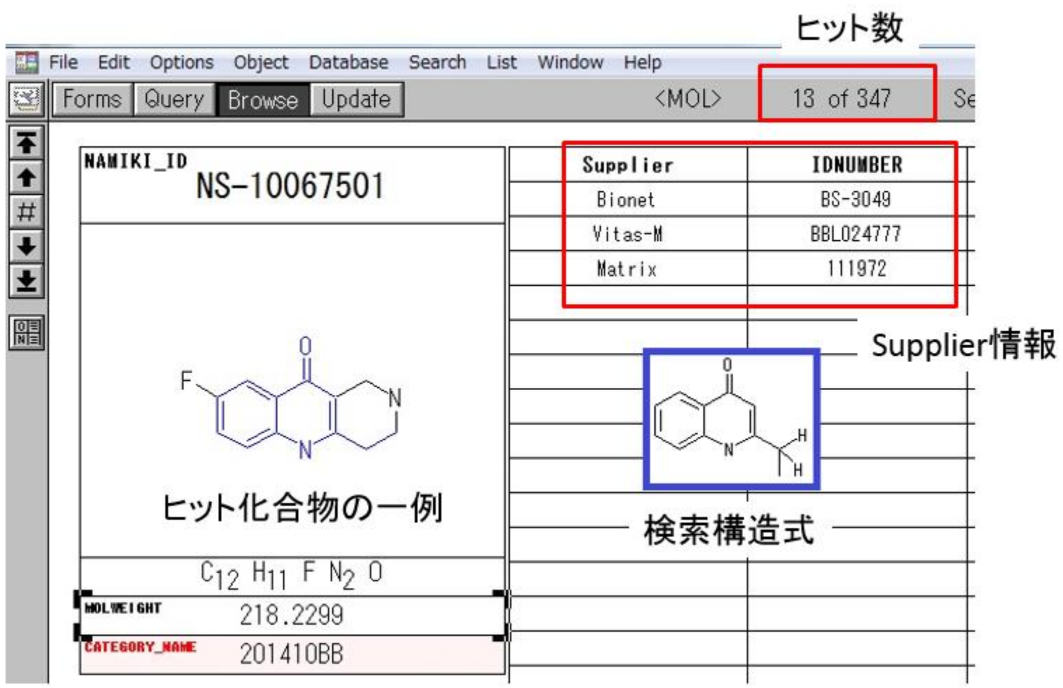
◆ 支援メニュー
- 約570万化合物データベース活用
- ヒット化合物の周辺化合物をサーチ

■迅速な構造検索とフィードバック。

■drug-likenessを考慮して購入候補化合物を提案し、合成研究に活用中。

■アカデミアやベンチャー等での非常に限られた合成戦力を補完し、合成研究を加速。

支援に供する設備名等:ISIS database



[技術の利用例]

◆ 合成研究課題等での活用
- 学内S3研究課題
- 本学HTS機器活用した学外の創薬研究

■他大学のスクリーニング課題

■企業のスクリーニング課題

□ 数検体～数十検体を提案し、予算に応じて購入し、ヒット化合物のSAR(構造活性相関)展開に活用(予定)。

連絡先

[所属] 大阪大学薬学研究科

[名前] 辻川和丈、寺下善一

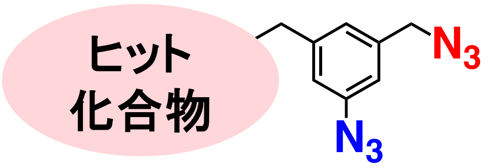
[E-mail] pf-project@phs.osaka-u.ac.jp

ヒット化合物の標的分子同定技術

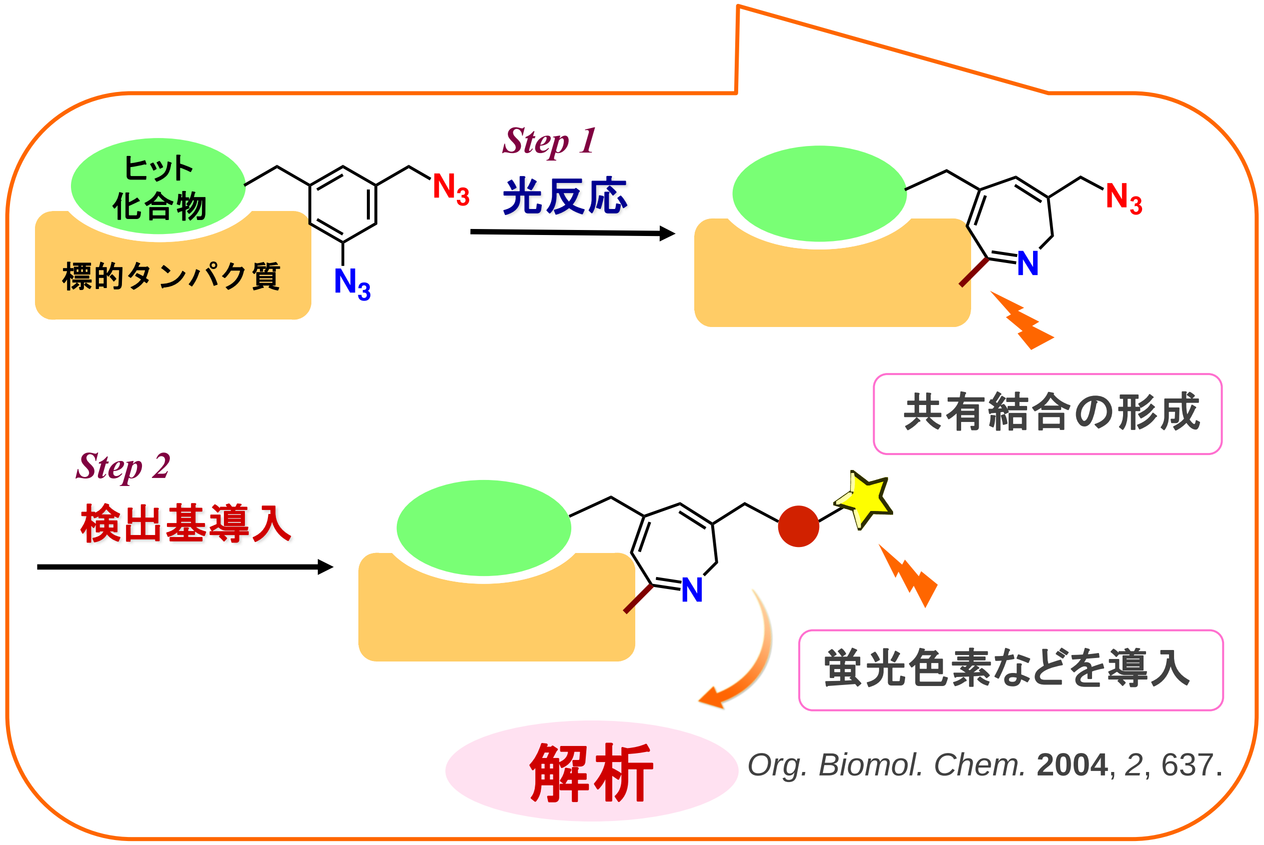
[技術の概要]

- ヒット化合物の構造最適化
- 標的未知ヒット化合物の標的同定用プローブ化

ジアジドプローブを用いる光親和性標識法

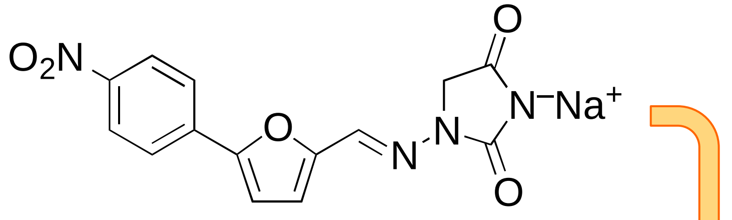


non-RI
生物活性を維持しやすい

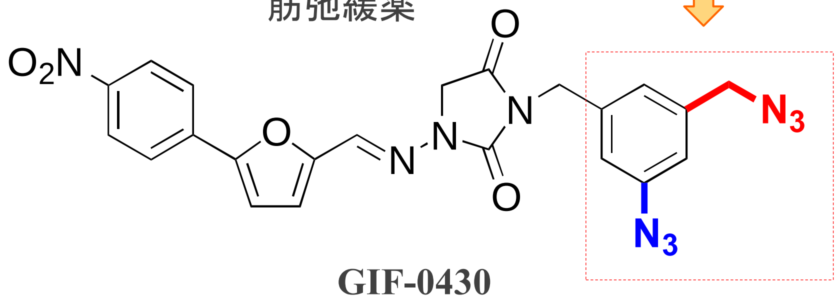


[技術の利用例]

標的タンパク質同定に成功した例



Dantrolene
筋弛緩薬



GIF-0430

標的タンパク質として sk-NSPl1 (RTN-2C/reticulon) を同定

Bioorg. Med. Chem. Lett. **2005**

Diabetes **2009**

連絡先

[所属] 東京医科歯科大学生体材料工学研究所

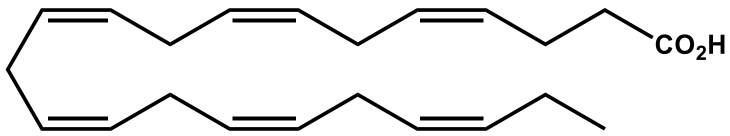
[名前] 細谷孝充

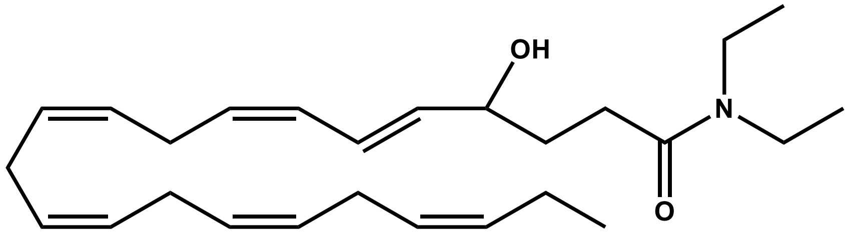
[E-mail] thosoya.cb@tmd.ac.jp

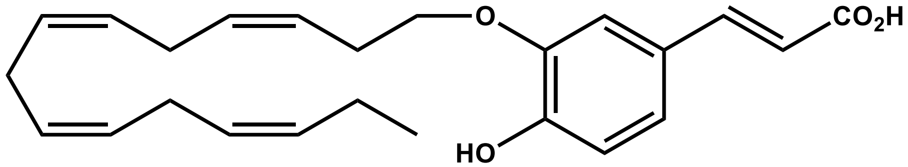
ω-3脂肪酸ライブラリー(提供と合成支援)

[技術の概要]

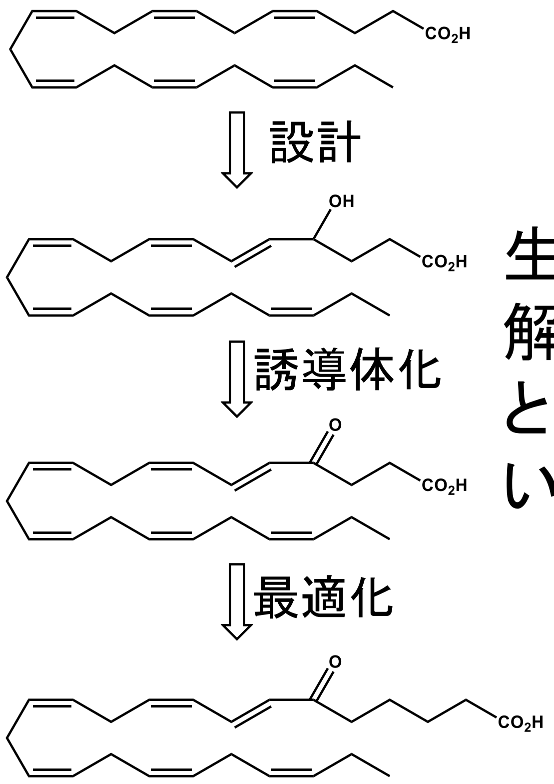
当研究室で合成したω-3脂肪酸誘導体をライブラリーとして保存しています。
生物活性評価の目的で提供可能な脂肪酸誘導体は100種類以上あります。
活性が判明した化合物に関して、さらに2つの支援が行えます。
・グラムスケールの合成
・誘導体の設計と合成







[技術の利用例]



生物活性試験や結晶構造解析で得られたデータをもとに誘導体化と最適化を行いました。

連絡先

[所属] 昭和薬科大学

[名前] 山本恵子

[E-mail] yamamoto@ac.shoyaku.ac.jp