

## 理研NMR施設利用報告書

(産学連携無償利用)

13-700-001

平成 26 年 11 月 20 日

利用機関名	大阪府立大学大学院	
実施部署名	理学系研究科生物科学専攻	
実施責任者管理職名・氏名	助教 / 藤原 大佑	
実施部署所在地	大阪府堺市中区学園町 1 - 1	
利用課題名	高額ペバシズマブを置き換える, 低額合成VEGF阻害ペプチド医薬 (マイクロ抗体) の開発	
利用目的・内容	申請者らがこれまでにスクリーニングにより得た VEGF 結合性ペプチドのうち、結合活性が高かった複数の候補ペプチドについて、結合様式を HSQC 法により明らかにすることを目的とする。	
利用実施時期及び期間	平成 26 年 3 月 24 日～平成 26 年 4 月 3 日  <div style="text-align: center;">(当初計画どおり)・当初計画変更 (変更理由)</div>	
利用施設	NMR装置 (該当部分に○)	利用装置① ・ ( ) 600MHz、( ○ ) 700MHz、( ) 800MHz、( ) 900MHz 利用期間 1 : 平成 26 年 3 月 24 日～平成 26 年 3 月 31 日
	構造決定	利用回数 1 回 (3 サンプル分の相互作用部位解析を構造解析 1 回と換算)
利用満足度 (複数選択不可)	( ○ ) 大いに満足、( ) ほぼ満足、( ) やや不満、 ( ) 大いに不満	

<p>研究チームの構成</p>	<p>VEGF 結合性ペプチドのスクリーニング、獲得したペプチドの化学合成および化学的性質の解析</p> <p>大阪府立大学大学院理学系研究科生物科学専攻 道上雅孝、叶正成、藤原大佑、藤井郁雄</p> <p>VEGF 結合性ペプチドの <i>in vivo</i>における機能の解析</p> <p>株式会社インタープロテイン 小松弘嗣</p>				
<p>成果の概要</p>	<table border="1"> <tr> <td data-bbox="403 658 549 976"> <p>実施内容</p> </td> <td data-bbox="549 658 1410 976"> <p>VEGF 結合性ペプチド（マイクロ抗体）M36、2nd001、2nd411 の結合様式を明らかにすることを目的とし、これらのマイクロ抗体と VEGF2 量体との相互作用を、<math>^1\text{H}/^{15}\text{N}</math>-HSQC 法により調べた。<math>^2\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}</math> 標識タグ付きの VEGF に、複数の濃度のペプチドを加えて HSQC スペクトルを測定した。</p> </td> </tr> <tr> <td data-bbox="403 976 549 1830"> <p>本課題により得られた成果、当初目標と結果との比較</p> </td> <td data-bbox="549 976 1410 1830"> <p>3種類のマイクロ抗体 M36、2nd001、2nd411 の全てにおいて、VEGF の slow exchange なシグナルの変化が見られた。また、結合の化学量論比が 1:1（もしくは 2:2）であることが明らかとなった。M36 については <math>^2\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}</math> 標識タグ付きの VEGF と相互作用時に沈殿が見られたため、確定的な結果は得られなかったものの、2nd001 と 2nd411 について信頼性の高い結果を得た。大変興味深いことに、マイクロ抗体 49 では VEGF の化学シフトがほとんどの領域に広がっていたのに対し、2nd001 と 2nd411 では限られた領域に集中していた。また、2nd001 と 2nd411 の化学シフトは互いに類似していた。さらに、49 とは互い異なる位置で VEGF に結合していた。当初、これらの一連のマイクロ抗体は、高い VEGF 結合活性を示したがその一方で、VEGF-VEGF 受容体相互作用の阻害活性がそれぞれ異なっていたことから、異なる結合様式であることが推定されていた。今回の測定結果はこれまでの知見と一致するだけでなく、相互作用部位が明らかとなり、結合様式を明らかにすることができた。このように、当初目標としていた実験計画の結果を得ることができた。</p> </td> </tr> </table>	<p>実施内容</p>	<p>VEGF 結合性ペプチド（マイクロ抗体）M36、2nd001、2nd411 の結合様式を明らかにすることを目的とし、これらのマイクロ抗体と VEGF2 量体との相互作用を、<math>^1\text{H}/^{15}\text{N}</math>-HSQC 法により調べた。<math>^2\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}</math> 標識タグ付きの VEGF に、複数の濃度のペプチドを加えて HSQC スペクトルを測定した。</p>	<p>本課題により得られた成果、当初目標と結果との比較</p>	<p>3種類のマイクロ抗体 M36、2nd001、2nd411 の全てにおいて、VEGF の slow exchange なシグナルの変化が見られた。また、結合の化学量論比が 1:1（もしくは 2:2）であることが明らかとなった。M36 については <math>^2\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}</math> 標識タグ付きの VEGF と相互作用時に沈殿が見られたため、確定的な結果は得られなかったものの、2nd001 と 2nd411 について信頼性の高い結果を得た。大変興味深いことに、マイクロ抗体 49 では VEGF の化学シフトがほとんどの領域に広がっていたのに対し、2nd001 と 2nd411 では限られた領域に集中していた。また、2nd001 と 2nd411 の化学シフトは互いに類似していた。さらに、49 とは互い異なる位置で VEGF に結合していた。当初、これらの一連のマイクロ抗体は、高い VEGF 結合活性を示したがその一方で、VEGF-VEGF 受容体相互作用の阻害活性がそれぞれ異なっていたことから、異なる結合様式であることが推定されていた。今回の測定結果はこれまでの知見と一致するだけでなく、相互作用部位が明らかとなり、結合様式を明らかにすることができた。このように、当初目標としていた実験計画の結果を得ることができた。</p>
<p>実施内容</p>	<p>VEGF 結合性ペプチド（マイクロ抗体）M36、2nd001、2nd411 の結合様式を明らかにすることを目的とし、これらのマイクロ抗体と VEGF2 量体との相互作用を、<math>^1\text{H}/^{15}\text{N}</math>-HSQC 法により調べた。<math>^2\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}</math> 標識タグ付きの VEGF に、複数の濃度のペプチドを加えて HSQC スペクトルを測定した。</p>				
<p>本課題により得られた成果、当初目標と結果との比較</p>	<p>3種類のマイクロ抗体 M36、2nd001、2nd411 の全てにおいて、VEGF の slow exchange なシグナルの変化が見られた。また、結合の化学量論比が 1:1（もしくは 2:2）であることが明らかとなった。M36 については <math>^2\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}</math> 標識タグ付きの VEGF と相互作用時に沈殿が見られたため、確定的な結果は得られなかったものの、2nd001 と 2nd411 について信頼性の高い結果を得た。大変興味深いことに、マイクロ抗体 49 では VEGF の化学シフトがほとんどの領域に広がっていたのに対し、2nd001 と 2nd411 では限られた領域に集中していた。また、2nd001 と 2nd411 の化学シフトは互いに類似していた。さらに、49 とは互い異なる位置で VEGF に結合していた。当初、これらの一連のマイクロ抗体は、高い VEGF 結合活性を示したがその一方で、VEGF-VEGF 受容体相互作用の阻害活性がそれぞれ異なっていたことから、異なる結合様式であることが推定されていた。今回の測定結果はこれまでの知見と一致するだけでなく、相互作用部位が明らかとなり、結合様式を明らかにすることができた。このように、当初目標としていた実験計画の結果を得ることができた。</p>				

	<p>今後の展開、課題</p>	<p>今回の解析によりマイクロ抗体 2nd001 と 2nd411 の結合様式が明らかとなった。先の解析でもちいた 49 とあわせて、異なる結合様式のリガンドを得た。今後は、これらのマイクロ抗体がどのアミノ酸側鎖を介して強く結合に寄与するか詳細に解析をし、ファーマコフォアのホットスポットを明らかにする。これによってマイクロ抗体の結合親和力の向上、VEGF-VEGF 受容体相互作用阻害活性の付与および向上、さらにこれを模した低分子化合物の分子設計が可能となる。これにより医薬品開発に向けてのリガンドの最適化研究が進展すると期待できる。</p>
<p>社会・経済への波及効果の見通し</p>	<p>VEGF と VEGF 受容体とのタンパク質間相互作用を阻害する医薬品として抗 VEGF 抗体（ベバシズマブ）があげられる。しかしながら、非常に高価なため、ごく少数の患者しか利用ができないという課題をもつ。VEGF-VEGF 受容体相互作用阻害活性をもつペプチド医薬品は、抗体医薬品よりも製造コストが安いいため、安価で提供できることができる。これにより、より多くのがん患者の方が、より小さな金銭的負担で利用できる医薬品の開発とその普及が期待できる。</p>	
<p>成果公開延期の希望の有無</p>	<p>( ) あり : ( O ) なし 「あり」の場合理由：</p>	
<p>理研 NMR 施設利用における感想</p>	<p>今回、葛西様のご助力により、複数ある VEGF 結合性マイクロ抗体と VEGF2 量体との相互作用を解析し、結合様式を明らかとして比較検討することができました。表面プラズモン共鳴法や、免疫化学的解析手法では得られない詳細な結合様式に関する成果を得ることができ、非常に満足いたしております。あらためて深謝申し上げます。</p>	
<p>利用周辺環境に関する希望</p>	<p>今回の測定のように、De Novo リガンドを獲得した時に、その結合様式を明らかにできる環境の維持をお願いいたします。 私どもの研究室では標的タンパク質に対する特異的リガンドのスクリーニングを行っています。研究成果によって得られたリガンドについて、それらの結合様式を詳細に解析することで、リガンドの最適化に関する構造情報はもとより、ペプチドを模倣した低分子阻</p>	

	<p>害剤設計のためのファーマコフォア情報が得られます。しかしながら、このような解析手法を研究室単独で実施することは、設備面でも利用者の習熟の観点からも非常に困難です。このような理由から、ひきつづき今回のように NMR 施設を利用できる環境の維持をお願いいたします。</p>
今後の利用形態の予定	<p>( )再度本事業への申請を考えている。  ( )成果の非公開を前提とした「外部利用」(有料)を考えている。  ( )その他理研との共同研究等を考えている。  具体的に：   (○)未定</p>
今後期待するその他のサービス	<p>(○)NMR 装置利用の教育(これまで NMR を使用した経験の無い方に対する教育も含む)  ( ) NMR 装置利用の技術的なサポート  ( )その他  具体的に</p>
文部科学省の共用ナビ (研究施設共用総合ナビゲーションサイト)に対する感想・改善について	<p>(<a href="http://kyoyonavi.mext.go.jp/">http://kyoyonavi.mext.go.jp/</a>)  (○)見た : ( )見ていない  感想等: 今回の NMR 施設利用に際し、はじめてこちらのサイトを知りました。広報誌やメールマガジンなどで、こちらのサイトの情報を得られるようでしたら、利用を検討したいと思います。</p>
その他	<p>(上記の項目以外でご意見等お願いします。)</p>

本報告書については、印刷または必要な編集・加工を行った上で公開します。また、別途開催予定の成果報告会・シンポジウムや委託事業報告書作成時において、本報告書の内容についての資料作成または発表をお願いする場合があります。