

平成 2 4 年度実施方針

バイオテクノロジー・医療技術部

1. 件 名：プログラム名 健康安心イノベーションプログラム
(大項目) ゲノム創薬加速化支援バイオ産業基盤技術開発

2. 根拠法

独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構法第 1 5 条第 1 項第 2 号

3. 背景及び目的・目標

3. 1 背景及び目的

近年、製薬企業の研究開発費は増大の一途であるものの、承認される薬剤の数は増えていない。研究開発費の増大分は、主として臨床開発費に充てられ、探索研究に回せるリソースは相対的に減少している状況にあることもその理由の一つであるが、創薬ヒット化合物の発見につながる新たなスクリーニング手法の技術革新と技術実証の不足により、新規医薬品候補化合物の探索効率が大幅に低下している可能性も指摘されている。

このため、最先端の知識と分析技術を組み合わせ、創薬開発のより早い段階から適切な医薬品候補物質の取得を可能とする、標的蛋白質の立体構造をベースとした *in silico* スクリーニングや探索対象となる化合物空間の拡大など、創薬の効率化に繋がる新たな技術の開発が必要である。

これにより、構造情報を基にした新しい観点からの画期的な新薬の創出、さらには膜蛋白質及びその複合体の機能、機構を説明する新しい概念の構築、天然物化学情報基盤の強化等により、ゲノム情報を活用した創薬技術の高度化による我が国バイオ産業の競争力強化、新産業の創出・育成を通じて、国際的優位性を確保することが期待できる他、個別化医療への応用とともに、健康維持・増進などを含めた幅広い分野への展開が期待できる。

3. 2 目標

- (1) 研究開発項目< 1 > 「創薬加速に向けたタンパク質構造解析基盤技術開発」(平成 2 0 ~ 2 4 年度)

最終目標 (平成 2 4 年度)

標的とする膜タンパク質の「立体構造に指南された創薬戦略 (SGDD: Structure Guided Drug Development)」を実現し、創薬研究を効率化する基盤技術を確立する。

- (2) 研究開発項目< 2 > 「有用天然化合物の安定的な生産技術開発」(平成 2 3 ~ 2 4 年度)

最終目標 (平成 2 4 年度)

放線菌を対象に、新規の医薬品開発につながる有望な天然化合物の合成に必要な生合成遺伝子クラスターを体系的に取得し、安定生産に適したホスト放線菌、導入ユニットの構築及び導入技術を確立する。

なお、研究開発項目毎に目標を設定し、別紙に記載する。

4. 実施内容及び進捗（達成）状況

4. 1 平成23年度事業内容

(1) 研究開発項目<1>「創薬加速に向けたタンパク質構造解析基盤技術開発」（平成20～24年度）

京都大学大学院理学研究科教授 藤吉 好則氏をプロジェクトリーダーとして、研究開発を実施した。詳細は別紙1を参照。

(2) 研究開発項目<2>「有用天然化合物の安定的な生産技術開発」（平成23～24年度）

独立行政法人産業技術総合研究所バイオメディシナル情報研究センター 新家一男氏をプロジェクトリーダーとして研究開発を実施した。詳細は別紙2を参照。

4. 2 実績推移

	H20年度	H21年度	H22年度	H23年度
	委託	委託	委託	委託
実績額推移（百万円） 一般勘定	838	886	687	1,365
特許出願数（件）	0	0	0	1
論文発表数（報）	16	56	53	79
フォーラム等（件）	28	28	107	87

5. 事業の内容

5. 1 平成24年度事業内容

上記の目標を達成するため、以下の項目について、研究開発を実施する。

研究開発項目<1>「創薬加速に向けたタンパク質構造解析基盤技術開発」（P08005）

我が国の強みである世界最高レベルの膜タンパク質構造解析技術、タンパク質間相互作用解析技術、高度な計算科学技術等の研究ポテンシャルを最大限活用し、膜タンパク質及びその複合体の細胞表層上における立体構造解析、相互作用解析、計算科学を用いた創薬候補化合物の効率的な探索と更に実用性の高いリード化合物への展開等の創薬基盤技術の開発を行う。詳細は別紙1を参照。

研究開発項目<2>「有用天然化合物の安定的な生産技術開発」（P11002）

我が国の強みとする微生物ライブラリーや、天然物化学に対する知識基盤等を最大限に活用し、創薬リード化合物候補となりうる広いケミカルスペースを持った天然化合物を生産する合成遺伝子とそれを応用した化合物生産を効率的に行う技術開発により、創薬の基盤技術を構築する。詳細は別紙2を参照。

5. 2 平成24年度事業規模

	委託事業	
一般勘定	<u>1, 407百万円</u>	(継続)

※事業規模については、変動があり得る。

6. 事業の実施方式

(1) 評価の方法

評価については、研究開発項目毎に実施する。評価方法・評価時期等については別紙1及び別紙2を参照。

(2) 運営管理

各研究開発項目については、必要に応じて技術検討会を実施し、外部有識者の意見を適切に反映し、着実な運営を図る。

実施にあたっては、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」(平成13年度文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第1号)等、研究開発関連の指針を厳守しなければならない。また、本研究開発成果の事業化においては、「経済産業分野のうち個人遺伝情報を用いた事業分野における個人情報保護ガイドライン」(平成16・12・24製局第1号)を厳守する。なお、関連指針等が改正されたときは、改正後の指針を適用するものとする。

7. 改訂履歴

(1) 平成24年3月1日、制定

(2) 平成24年8月15日、開発成果創出促進制度の対象事業として「有用天然化合物の安定的な生産技術開発」が決定されたことに伴う事業規模の改定。

研究開発項目< 1 > 「創薬加速に向けたタンパク質構造解析基盤技術開発」(P08005)

1. 背景及び目的・目標

創薬研究では、蛋白質の立体構造に基づいた薬剤の開発による創薬研究の効率化への取り組みが進みつつある。このため、今後の医薬品産業の国際競争力の強化に向けて、蛋白質の立体構造解析技術や計算科学による創薬候補化合物探索技術等の基盤技術の構築が重要となっている。特に市販薬剤のターゲット（作用点）として、ほぼ50%を占めている膜タンパク質は、生命現象の解明や創薬開発において重要な標的タンパク質である。また、膜タンパク質は細胞膜上における複合体形成や構造変化等により機能を発現していることから、細胞表層における膜タンパク質及びその複合体の立体構造解析技術や膜タンパク質とリガンドの相互作用解析技術、その構造情報に基づいた計算科学的解析技術を構築し、創薬ヒット候補化合物を効率よく絞り込むための基盤技術を開発することで、「タンパク質立体構造に指南された創薬戦略（SGDD: Structure Guided Drug Development）」を実現し、創薬研究を効率化することが重要である。

本事業では、我が国の強みである世界最高レベルの膜タンパク質構造解析技術、タンパク質間相互作用解析技術、高度な計算科学技術等の研究ポテンシャルを最大限活用し、膜タンパク質及びその複合体の細胞表層上における立体構造解析、相互作用解析、計算科学を用いた創薬候補化合物の効率的な探索と更に実用性の高いリード化合物への展開等の創薬基盤技術の開発を行う。

[委託事業]

<最終目標（平成24年度末）>

i) 電子線等による膜タンパク質及びその複合体の構造解析技術

細胞膜内での生体内に近い状態での膜タンパク質及びその複合体の立体構造を解析するため、以下の技術を確立する。また、これらの技術と既存の技術を活用し、ヒト由来（発現系）膜タンパク質及びその複合体の構造を複数個解析する。

- a) 2次元結晶化された膜タンパク質及びその複合体を2 Åより高い分解能で3次元構造解析する技術、細胞膜内において自然な構造の状態に固定化された膜タンパク質等の全体像を電子線トモグラフィー等により50 Åより高い分解能で3次元構造解析する技術を確立する。
- b) 結晶化できない膜タンパク質の立体構造を8 Åより高い分解能で解析する技術（単粒子解析等）を確立する。
- c) a)、b)を組み合わせることでより自然な状態の膜タンパク質及びその複合体の構造を解析する技術を確立する。

ii) 核磁気共鳴法等による膜タンパク質及びその複合体とリガンド分子の相互作用解析技術

生体内に近い状態での膜タンパク質及びその複合体とリガンド分子の相互作用を解析するため、以下の技術を確立する。また、これらの技術を基に、5個以上の膜タンパク質等創薬標的タンパク質を解析する。

- a) 解離定数がmM~ μ Mと結合力が弱いリガンド分子の結合構造の解析技術を確立する。
- b) 固体と液体が混合した不均一な系における膜タンパク質及びその複合体とリガンド分子の相互作用解析技術について従来法に比べ3倍に高感度化する。
- c) 細胞表層における生体内に近い状態での膜タンパク質及びその複合体とリガンド間相互作用

用を解析する技術を開発する。

iii) 高精度 *in silico*(※)スクリーニング等のシミュレーション技術

高精度の *in silico*スクリーニングを実現するため、以下の技術を確立する。さらに i)、ii)の技術と連携により、産業上有用な化合物を10個以上取得する。

- a) タンパク質の動的性質を正しく評価し、タンパク質受容体への基質結合能を高い精度で計算できる新しい計算科学手法を確立し、*in silico*スクリーニングの効率を従来法に比べ10倍程度に上げる。
- b) タンパク質と化合物とのドッキング計算手法の精度を高め、ターゲット選択性能を従来法に比べ10倍程度に上げる。
- c) タンパク質間相互作用及び超分子複合体の構造情報に基づく構造生理学、構造薬理学のアプローチにより、タンパク質間相互作用を阻害・制御する低分子化合物を選択・設計するため、医薬品化が困難な生理活性ペプチドから医薬品となりやすい非ペプチド性の化合物(低分子化合物等)を得る一般的手法を開発し、その技術の有効性を確認するため、最低1つの実証を行う。

(※) *in silico*: シミュレーション等の計算機科学的手法による

< 中間目標 (平成21年度末) >

i) 電子線等による膜タンパク質及びその複合体の構造解析技術

細胞膜内での生体内に近い状態での膜タンパク質及びその複合体の立体構造を解析するため、以下の技術を開発する。また、これらの技術と既存技術を活用し、ヒト由来(発現系)膜タンパク質及びその複合体の構造を最低1個解析する。

- a) 2次元結晶化された膜タンパク質及びその複合体を2 Åより高い分解能で3次元構造を解析する技術、細胞の自然な状態での膜タンパク質及びその複合体の3次元構造を解析する技術(電子線トモグラフィ等)を開発する。
- b) 結晶化できない膜タンパク質の立体構造を10 Åより高い分解能で解析する技術(単粒子解析等)を開発する。
- c) a)、b)を組み合わせることでより自然な状態の膜タンパク質及びその複合体の構造を解析する技術を開発する。

ii) 核磁気共鳴法等による膜タンパク質及びその複合体とリガンド分子の相互作用解析技術

生体内に近い状態での膜タンパク質及びその複合体とリガンド分子の相互作用を解析するため、以下の技術を開発する。また、これらの技術を基に、2個以上の膜タンパク質等創薬標的タンパク質を解析する。

- a) 解離定数がmM~µMと結合力が弱いリガンド分子の標的分子結合部位を同定する解析技術を開発する。
- b) 固体と液体が混合した不均一な系における膜タンパク質及びその複合体とリガンド分子の相互作用解析技術を従来法に比べ3倍の高感度の解析技術を開発する。

iii) 高精度 *in silico*スクリーニング等のシミュレーション技術

高精度の *in silico*スクリーニングを実現するため、以下の技術を開発する。さらに、i)、ii)の技術と連携により、産業上有用な化合物を5個以上取得する。

- a) タンパク質の動的性質を正しく評価し、タンパク質受容体への基質結合能を高い精度で計

算できる新しい計算科学手法の開発し、*in silico*スクリーニングの効率を従来法に比べ5倍程度に上げる。

- b) タンパク質と化合物とのドッキング計算手法の精度を高め、ターゲット選択性能を従来法に比べ5倍程度に上げる。
- c) タンパク質間相互作用を阻害・制御する低分子化合物の選択・設計の技術開発を行う。

2. 実施内容及び進捗（達成）状況

京都大学大学院理学研究科教授 藤吉 好則氏をプロジェクトリーダーとして、以下の研究開発を実施した。

2. 1 平成23年度事業内容

研究開発項目①「電子線等による膜タンパク質及びその複合体の構造解析技術」

細胞膜内での生体内に近い状態で膜タンパク質及びその複合体の立体構造を解析するため、以下の基盤技術の開発を進めた。また、これらの技術と既存技術を活用して、ヒト由来（発現系）などの膜タンパク質及びその複合体の構造の解析を進めた。

- (a) 解析が必要な膜タンパク質およびその複合体の構造解析を目指して、発現・精製技術、2次元結晶化技術の開発

膜タンパク質およびその複合体の大量発現・結晶化・構造解析

- ・ラットやマウス（げっ歯類）由来の水チャネルAQP4の阻害剤を開発したがヒト由来の水チャネルの阻害剤にはならない事が判明した。それゆえ、この阻害剤、アセタゾールアミドの結合において、2つのアミノ酸が、そしてこの2つのアミノ酸だけが、この違いを作り出していることを解明した。すなわち、ヒト由来のAQP4の発現系を昆虫細胞を用いて確立し、ヒトとげっ歯類で配列の異なる5つのアミノ酸をげっ歯類型にする変異体を発現・精製して、げっ歯類由来の水チャネルと同じようにアセタゾールアミドが水透過を阻害できるか否かの実験を行った。またその逆に、げっ歯類由来のAQP4をヒト型にする変異体を発現・精製して、アセタゾールアミドで阻害できなくなるか否かの実験を行った。その結果、げっ歯類の2つのアミノ酸、すなわちV53とT149がヒトではそれぞれロイシンとメチオニンに変異しており、この2つのアミノ酸を変異することによって、げっ歯類のAQP4をヒト型に、ヒトのAQP4をげっ歯類型にすることが出来ることを解明した。
- ・ギャップ結合チャネルの複雑なゲーティング機構を明らかにするために、Cx26のM34A変異体の大量発現を昆虫細胞で行って、分解能を向上させることで、プラグや細胞質側の複雑な構造を解明した。このギャップ結合の研究をさらに進めるために、遺伝性末梢神経障害や、慢性進行性筋脱力と筋萎縮などに関わるCx32や別のギャップ結合チャネルであるイネキシンなどの昆虫細胞での発現に成功した。Cx32については、さらに各種変異体を作製することにより（ギャップ結合を形成する場合には6量体の2つのヘミチャネルが互いに結合した12量体を形成するが）、ギャップ結合を形成しないヘミチャネルだけを安定に形成する変異体を発見した。なお、この変異体は2次元結晶による高分解能の解析に適すると期待される。
- ・イオンチャネルの構造解析を目指して、様々な電位依存性Na⁺チャネルのクローニングを行い、それらの機能解析を行った。さらに、これらの発現を試みるとともに2次元結晶の作製に成功した。それらの2次元結晶と極低温電子顕微鏡を用いて構造解析のためのデー

タを収集した。

- ・創薬分野において期待されているGPCR (E_TB_R)の構造解析を目指して、構造を安定化させるために400を超える全てのアミノ酸残基について変異体を作製し、発現系を構築した。この探索により構造を安定化できる変異体の組み合わせを解明したので、結晶化を目指したコンストラクトの探索とそれらの発現を進めた。さらに進めて、2次元結晶と3次元結晶化を試みて、分解能は低いながらも結晶化できるようになった。
- (実施体制：社団法人バイオ産業情報化コンソーシアム、独立行政法人産業技術総合研究所バイオメディシナル情報研究センター、独立行政法人産業技術総合研究所脳神経情報研究部門、国立大学法人京都大学大学院理学研究科、学校法人慶應義塾大学大学院医学研究科)

(b) 極低温高分解能電子顕微鏡等の開発、コンピューター解析の高速化と精密化

①電子線トモグラフィー用極低温電子顕微鏡の開発

細胞に存在する生体内に近い状態の構造を解析することを実現するために、画像記録システムを含む電子線トモグラフィー用極低温電子顕微鏡システムの改良を行うことで、50 Åより高い分解能のトモグラフィー像の取得に成功したので、このシステムを用いて、ギャップ結合構造のトモグラフィー解析を行った。

②電子線回折を撮影できる2次元結晶の2 Å分解能を超えるような高分解能の構造解析を可能にするプログラムの開発

2 Å分解能を超えるような高分解能解析用のシステム開発に成功した。また、胃薬の開発に役立つ構造情報を取得するために、HK-ATPaseとその阻害剤複合体の比較的悪い結晶を用いることで、構造解析の効率を向上させるような電子線結晶学用プログラムの開発を行った。

③電子線トモグラフィー用プログラムの開発

細胞に存在する自然な状態での膜タンパク質及びその複合体の解析のために、粒子ラベルなしでも高分解能の電子線トモグラフィー解析ができるコンピュータプログラムをこれまで開発したが、それを基にさらに使いやすいシステムへの改良を行った。

- (実施体制：社団法人バイオ産業情報化コンソーシアム、独立行政法人産業技術総合研究所バイオメディシナル情報研究センター、独立行政法人産業技術総合研究所脳神経情報研究部門、国立大学法人京都大学大学院理学研究科、国立大学法人京都大学大学院農学研究科、独立行政法人理化学研究所播磨研究所)

(c) 電子顕微鏡とX線によるタンパク質構造解析

上記で開発した技術を用いた膜タンパク質およびその複合体の構造解析を行った。X線結晶構造解析法を用いた方が迅速に解析できるタンパク質複合体についてはX線による構造解析を行った。3次元結晶化が困難な膜タンパク質の構造解析は電子線結晶学を用いた構造解析を行い、胃のHK-ATPase等のように結晶性の良くない2次元結晶についても高い分解能での構造解析に成功した (*Nature Commun.*, 2, 155 pp1-7 (2011))。細胞に存在する状態で電子線トモグラフィーの解析も行うことで、膜タンパク質やその複合体の自然な状態の構造解析を目指し、具体的には以下の内容を実施した。

- ・水チャンネルAQP4の高分解能の構造解析と機能解析から、AQP4の阻害剤の結合に必須の2つのアミノ酸を同定することに成功したので、AQP4とその阻害剤との複合体の高分解能の構造解析のためのデータを収集し、構造を解析した。
- ・ギャップ結合チャンネルの複雑なゲーティング機構を解明するために、Cx26のM23A

- 変異体の構造解析の分解能を向上させることに成功し、イネキシンの結晶化に成功した。
- 電位感受性 Na^+ チャネルの構造を解析するための2次元結晶化に成功したので、これらの構造解析を行って、細胞質側が閉じた構造と開いた構造という2つの状態の構造を解析した。
 - ヒストンと相互作用する転写制御因子複合体の構造と機能をX線結晶構造解析法により解析した。
 - HK-ATPaseと次世代の胃薬開発に有用な情報となる阻害剤SCH28080との複合体の構造解析を行った。
 - 電子線トモグラフィー法で、立体構造解析できるシステムを構築したので、これらを用いて、コネキシンによるギャップ結合とイネキシンによるギャップ結合などの電子線トモグラフィーによる構造解析を行った。
- (実施体制：社団法人バイオ産業情報化コンソーシアム、独立行政法人産業技術総合研究所生物情報解析研究センター、独立行政法人産業技術総合研究所バイオメディシナル情報研究センター、独立行政法人産業技術総合研究所脳神経情報研究部門、国立大学法人京都大学大学院理学研究科、国立大学法人京都大学大学院農学研究科、独立行政法人理化学研究所播磨研究所)

研究開発項目②「核磁気共鳴法等による膜タンパク質及びその複合体とリガンド分子の相互作用解析技術」

- (a) リガンドベース創薬デザインのためのNMR相互作用解析手法の開発・高度化
- 基盤技術開発として、リガンド・標的タンパク質ベース双方からの創薬デザインを実現するため、①リガンド中の各プロトンと創薬標的タンパク質との分子間距離をより正確に反映するリガンドベース解析手法の開発、および②創薬標的タンパク質上のリガンドの結合サイトを迅速に同定する標的タンパク質ベース解析手法の開発を行った。①については、従来法であるSaturation Transfer Difference (STD)法において定量性を損なう原因となる“自己緩和速度”を差し引くことで、リガンド水素とタンパク質水素群との分子間距離を正確に測定する新たな手法DIRECTION法を開発した。これをTMP /bovineDHFRおよびSB20458/MA PK (p38・)など複合体立体構造既知の系に適用した結果、予測値と観測データ間に高い整合性が見られた。また、本手法は結合部位におけるリガンドと標的タンパク質との間の空隙を検出することが可能であったことから、結合活性の弱いヒット化合物に本手法を適用することで、リードを創生する際の合成展開へのヒントを提示できることが示された。②については、無細胞タンパク質発現と部位特異的安定同位体標識を組み合わせることで、時間のかかる帰属作業を回避する新たな相互作用面決定法を開発した。さらに本手法で得られる情報を用い、複合体モデルを構築する手法を併せて開発した。本手法をMA PK (p38・)に適応した結果、結合サイト既知の化合物について4 Å程度の精度で複合体モデルを構築することが可能であった。
- (実施体制：社団法人バイオ産業情報化コンソーシアム、独立行政法人産業技術総合研究所バイオメディシナル情報研究センター、国立大学法人東京大学大学院薬学系研究科)
- (b) 細胞膜複合体相互作用解析のためのNMR試料調製法の開発、及び細胞膜複合体相互作用解析のためのNMR解析法の開発
- CC L 3 は大腸菌発現系により安定同位体標識したものを調製した。CC R 1、CC R 5 は昆虫細胞発現系により大量発現し、1 % n-dodecyl- β -D-maltopyranoside により

形質膜から可溶化した。可溶化したCCR1 またはCCR5 はrHDL 脂質二重膜中への再構成、精製を行った(CCR1/CCR5-rHDL)。これにより、昆虫細胞1L培養から約30 µg のCCR1、約10 µg のCCR5 を含むrHDL を約80% の純度にて調製できた。CCL3 とCCR1/CCR5-rHDL を用いてSPR 解析を行った結果、両者の結合を検出でき、算出された解離定数はCCL3 とCCR1-rHDL、CCL3 とCCR5-rHDL のいずれにおいても約5 µMであった。

TCS 実験によりCCL3 におけるCCR1/CCR5-rHDL 結合部位決定を試みた。CCL3 のアミドプロトンを解析対象とし、コントロール実験として受容体を含まない空rHDL を用いた。観測されたシグナル強度減少率について、CCR1/CCR5-rHDL を用いた実験結果からコントロール実験の結果を差し引いた値(ΔRR)を算出した。その結果、CCR1-rHDL を用いた実験では、CCL3 上のGln49Gを中心とする領域とGln34を中心とする領域、CCR5-rHDL を用いた実験ではGln49Gを中心とする領域とVal63を中心とする領域において有意な $\cdot RR$ を観測し、これらの部位が結合界面に位置することが示された。

これらの結果から、CCL3 のGln49を中心とする領域はCCR1、CCR5 結合部位として共通する一方、Gln34またはVal63 近傍の領域は、CCR1、CCR5 に対する特異的な結合部位であることがわかった。

さらに、これらの領域にはいずれも酸性残基が含まれていた。TCS 実験から同定した結合部位に含まれる酸性残基は、CCR1 またはCCR5 のリガンドとなる他のケモカインに保存されていたことから、他のケモカインにおいてもCCR1 およびCCR5 の認識に重要であることが示唆された。

一方生細胞内NMR観測に関しては、前年度までに、¹⁵N標識を施したCG1ドメイン(CG1)をHeLaS3細胞内に導入し、細胞内に内在する微小管との相互作用の観測を試みてきた。しかし、観測されたシグナルは運動性の高い末端部位と側鎖に由来するシグナルのみであり、微小管と相互作用を示す構造形成領域のシグナルは観測されなかった。細胞内で構造形成領域に由来するアミドプロトンが観測されなかった原因として、細胞内の高い粘性の影響によってCG1の運動性が低下し、NMRシグナルが顕著に広幅化してしまったためと考えた。

そこで本研究では、巨大分子のNMRシグナルを高感度に検出するメチルトROSY法を利用して、CG1のin-cell NMR観測を行った。その結果、構造形成領域を含め、¹³C標識を施したCG1のメチル基に由来するシグナルを全て観測することができた。また、細胞内CG1のスペクトルはバッファー中におけるCG1と比較して、V103に顕著な化学シフト変化が観測された。この化学シフト変化は、①同様の化学シフト変化がバッファー中のCG1に精製した微小管を加えた際にも観測されたこと、②微小管と相互作用しないCG1変異体を細胞内に導入した際にはV103に化学シフト変化は観測されなかったこと、の2点より、細胞内微小管との相互作用を反映していると結論した。

本研究では、SLOを用いた蛋白質導入法を用いることで、生きた細胞内における内在性分子との相互作用を原子レベルで観測することに初めて成功した。今後は、本手法に転移交差飽和(TCS)法を組み合わせることにより、細胞内の蛋白質間相互作用界面をより詳細に同定する方法を開発する。本研究の展開により、試料調製が困難である膜タンパク質や、タンパク質複合体を対象としたリガンドとの相互作用様式の解明が期待できる。(実施体制：社団法人バイオ産業情報化コンソーシアム、独立行政法人産業技術総合研究所バイオメディシナル情報研究センター、国立大学法人東京大学大学院薬学系研究科)

(c) 創薬標的タンパク質複合体の相互作用解析

酸性条件下における活性化状態と不活性化状態の間の交換速度を求めるため、selectivity filter に存在する V a 1 7 6 のメチルシグナルを用いて、 $^{13}\text{C}_{\text{zz}}$ exchange 解析を行った。40 °C、50 mM K^+ 存在下における測定の結果を理論式に対してフィッティングした結果、活性化状態から不活性化状態への遷移速度定数 k_{ai} は 0.46 ± 0.02 (s^{-1})、不活性化状態から活性化状態への遷移速度定数 k_{ia} は 0.94 ± 0.04 (s^{-1}) であることが明らかとなった。これらの値は、電気生理学解析における活性化状態と不活性化状態の間の交換速度と対応する。次に、K c s A の C 末端 35 残基の細胞質内領域を切除した K c s A · C を用いて、同一条件下で交換速度を解析した。まず、V a 1 7 6 メチル基の化学シフトが野生型と一致したことから、K c s A · C の活性化状態・不活性化状態の selectivity filter の構造が共に全長 K c s A と同様であることを確認した。 $^{13}\text{C}_{\text{zz}}$ exchange 解析を行った結果、K c s A · C の k_{ai} は 7.17 ± 0.13 (s^{-1})、 k_{ia} は 0.96 ± 0.02 (s^{-1}) と算出され、 k_{ia} は全長 K c s A と同程度である一方、 k_{ai} が 10 倍以上に増大することが明らかとなった。この結果は、膜貫通領域に位置する selectivity filter の運動性が、そこから離れた細胞質内領域によって制御されていることを示している。

以上のように本研究では、結晶構造が得られない酸性条件下における活性化状態と不活性化状態の構造平衡について、その交換速度を解析することにより、カリウムチャネルのアロステリックな運動性制御機構を見出すことに成功した。Selectivity filter の構造はカリウムチャネル間で保存されているため、この部位に直接結合する化合物が不整脈などの重篤な副作用を発現することがあることが知られている。これに対し、本研究で得られた知見は、保存性の低い細胞質内領域を標的として活性化状態と不活性化状態の間の交換速度を間接的に制御することによって、より選択性が高く副作用の小さい新規化合物を創製できる可能性を示すものである。

(実施体制：社団法人バイオ産業情報化コンソーシアム、独立行政法人産業技術総合研究所バイオメディシナル情報研究センター、国立大学法人東京大学大学院薬学系研究科)

研究開発項目③「高精度 *in silico* スクリーニング等のシミュレーション技術」

主に G P C R を標的とした、モデリング、動的ゆらぎを考慮したスクリーニング、Structure-based drug screening および分子シミュレーションを援用した化合物活性予測手法、NMR 情報を利用したタンパク質-化合物複合体構造モデリング手法などを新規に開発した。2010年12月に公開された myPresto version 4.2 では、分子動力学(MD)シミュレーション、ドッキングソフト、各種薬物スクリーニングソフト、タンパク質のリガンド結合ポケット予測ソフト、薬物スクリーニング結果の信頼性評価ツール、溶解度などの物性予測ソフトなどが公開されているが、これらの手法を改良し、myPresto version 4.2054 として、2011年10月に一般に公開した。

(a) *in silico* ドッキング計算の高精度化

- ・ドッキングソフトと分子動力学(MD)シミュレーションを組み合わせた手法 (sievgene-MVO) を開発した。Sievgene-MVO は、タンパク質と化合物の複合体を最低 1 つ必要とするが、予測精度は、従来開発してきた複数の活性化化合物を必要とする予測精度最高の MS-MTS 法と同等であった。NMR 実験情報とドッキング計算を組み合わせたタンパ

ク質—化合物複合体を予測する手法を開発し、p38MAPKに適用し、従来のドッキング計算の精度を上回ることを確認した。活性化化合物の合成展開すべき部位の予測や物性予測など、リード創製を支援する手法を開発した。

- ドッキングのスコアの精度を高めるため、タンパク質及び低分子リガンドの動的構造、及び各種相互作用を考慮した複合体の構造予測法及び結合エネルギー算出法の開発を行なった。GPCRに対し、動的ゆらぎを考慮したアンサンブルドッキング手法と、世界的に問題になっていた、予測結果の信頼性を評価する手法(Universal Active Probe)を開発し、適用できることを示した。また、マルチカノニカルMDを用いた *ab-initio* な複合体の構造予測法の研究を行って Coupled folding and binding の問題にアプローチし、ハンチントン舞踏病原因タンパク質を例とし、単体では決まった構造を取らず、複合体になって始めて決まった立体構造を取る天然変性タンパク質の構造形成メカニズムを明らかにした。(実施体制：社団法人バイオ産業情報化コンソーシアム、独立行政法人産業技術総合研究所バイオメディシナル情報研究センター、国立大学法人大阪大学蛋白質研究所)

(b) 構造生理学アプローチによるタンパク質間相互作用解析

- 「構造インタラクトーム」に踏み込んだ、ペプチドと同様あるいはそれ以上の強い結合性を有する非ペプチド性化合物(低分子化合物等)を、(a)sievene-MVOなどを適用し、探索した結果、分子量が350Da以下であるにも関わらず、活性が1 μ M以下の新規な低分子化合物を2つ獲得した。COMBINE法をmyPrestoに組み込んだ。(実施体制：社団法人バイオ産業情報化コンソーシアム、独立行政法人産業技術総合研究所バイオメディシナル情報研究センター、国立大学法人大阪大学蛋白質研究所)

(c) 創薬開発への応用促進に向けた技術開発

- GPGPUなどのアクセラレーターを活用した、計算の高効率化と高速性が発揮できるプログラムの開発を進め、生体膜に埋め込まれたGPCRの系(膜や溶媒分子を含んで約56,000原子からなる)へ適用し、10nsecのMD計算を従来の約30倍の速度で行うことに成功した。この手法を活用することにより、アドレナリン β 3受容体とその特異的リガンドとの信頼性の高い複合体モデルを迅速に構築した。
- リガンド・データベースや計算結果を整理したデータベースの開発・作成を継続し、市販化合物約500万種類に加え、合成可能なバーチャルな1600万化合物のデータベースを構築し、配布した。このデータベースには、溶解度や、発がん性など化合物の物性予測データを付加して、化合物情報の価値を高めた。
- 具体的な創薬実証研究を、本研究の他のチーム、大学や公的研究所、創薬企業等と協力して実施した。 μ 受容体(GPCR)のアゴニストの探索を行い、有望なアゴニスト及びアンタゴニストを合計8化合物発見した。農薬、GP-VI、その他のGPCR、CHK1などを対象として、実証研究のためにヒット化合物探索を行なった。GPCR専用の配列アラインメントソフト、ホモロジーモデリングの自動化手法を開発し、各種GPCRに適用し、薬物スクリーニングが、容易に高い精度で行えるようにした。(実施体制：社団法人バイオ産業情報化コンソーシアム、独立行政法人産業技術総合研究所バイオメディシナル情報研究センター、国立大学法人大阪大学蛋白質研究所)

2. 2 実績推移

	H 2 0 年度	H 2 1 年度	H 2 2 年度	H 2 3 年度
	委託	委託	委託	委託
実績額推移（百万円） 一般勘定	8 3 8	8 8 6	6 8 7	1, 0 7 6
特許出願数（件）	0	0	0	1
論文発表数（報）	1 6	5 6	5 3	4 2
フォーラム等（件）	2 8	2 8	1 0 7	6 9

3. 事業内容

名古屋大学細胞生理学研究センター教授 藤吉 好則氏をプロジェクトリーダーとして、以下の研究開発を実施する。実施体制については別添を参照のこと。

3. 1 平成24年度事業内容

名古屋大学細胞生理学研究センター教授 藤吉 好則氏をプロジェクトリーダーとして、以下の研究開発を実施する。実施体制については別添を参照のこと。

研究開発項目①「電子線等による膜タンパク質及びその複合体の構造解析技術」

細胞膜内での生体内に近い状態で膜タンパク質およびその複合体の立体構造を解析するため、以下の基盤技術の開発を進める。また、これらの技術を活用して、ヒト由来（発現系）などの膜タンパク質およびその複合体の構造を複数個解析し、本基盤技術の有用性を示す。

(a) 解析が必要な膜タンパク質及びその複合体の構造解析を目指して、発現・精製技術、2次元結晶化技術の開発

①膜タンパク質及びその複合体の大量発現

- ・ラットやマウス由来の水チャネルAQP4とその阻害剤、アセタゾールアミドとの複合体の構造解析から、ヒト由来水チャネルにも結合できる阻害剤候補を予測した。この化合物が、ヒト由来AQP4において水透過を阻害できるか否かを検証し、できるとすればその結合定数と阻害効率を測定するために、ヒト由来水チャネルの大量発現と精製を行う。
- ・ギャップ結合チャネルのCx26の構造と機能の解析を行ったので、遺伝性末梢神経障害や、慢性進行性筋脱力と筋萎縮などに関わるCx32、心臓や免疫の機能などに関わるCx43などのコネキシンと別のギャップ結合チャネルであるイネキシンなどの発現・精製を行う。
- ・中心的イオンチャネルである電位依存性Na⁺チャネルのクローニングを行い2つの状態の構造を解析したので、さらに高い分解能での解析を進めるために変異体を設計し、それらの発現と精製を行う。
- ・創薬分野において期待されているGPCR(ET_BR)の構造解析を目指して、構造を安定化させるために400を超える全てのアミノ酸残基について変異体を作製・発現し、構造を安定化できる変異体の組み合わせを解明したので、その構造をさらに安定化するT4リゾチームのキメラを設計し、発現と精製を行う。

②上記①で発現・精製が成功した膜タンパク質の2次元結晶化、および、3次元結晶化を行う

- ・ヒト由来水チャネルAQP4と新しい阻害剤との複合体の構造解析を目指した2次元結晶作製を試みる。
- ・ギャップ結合チャネルの複雑なゲーティング機構を解明するために、Cx26、Cx32、Cx43、そして別のギャップ結合チャネルイネキシンなどの様々な方法での結晶化を試みる。
- ・イオンチャネルのより高い分解能での構造解析を目指して、電位感受性Na⁺チャネルの変異体の2次元結晶化を目指す。
- ・GPCR (ET_BR) 変異体の2次元結晶化と3次元結晶化を行う。

(実施体制：一般社団法人バイオ産業情報化コンソーシアム、独立行政法人産業技術総合研究所バイオメディシナル情報研究センター、国立大学法人名古屋大学細胞生理学研究所、国立大学法人京都大学大学院理学研究科)

(b) 極低温高分解能電子顕微鏡等の開発、コンピューター解析の高速化と精密化

①電子線トモグラフィー用極低温電子顕微鏡の開発

細胞に存在する生体内に近い状態の構造を解析することを実現するために、画像記録システムを含む電子線トモグラフィー用極低温電子顕微鏡システムの改良を行うことで50 Åの解析を可能にしたので、さらに進めて30 Å程度のより高い分解能のトモグラフィー像の解析によって、生物学的に興味深いデータ取得を目指す。

②電子線回折を撮影できる2次元結晶を用いて2 Å分解能を超えるような高分解能の構造解析を可能にするプログラムの開発

2 Å分解能を超えるような高分解能解析用のシステム開発に成功したので、さらに、結晶性の良くない2次元結晶でも、電子顕微鏡像を用いて構造解析することで高い分解能で、効率よく構造解析が出来るシステムの開発を行う。

③電子線トモグラフィー用プログラムの開発

細胞に存在する自然な状態での膜タンパク質及びその複合体の解析のために、粒子ラベルなしでも高分解能の電子線トモグラフィー解析ができるコンピュータプログラムを開発したので、30 Å分解能という世界最高の分解能での解析を目指す。

(実施体制：一般社団法人バイオ産業情報化コンソーシアム、独立行政法人産業技術総合研究所バイオメディシナル情報研究センター、国立大学法人名古屋大学細胞生理学研究所、国立大学法人京都大学大学院理学研究科)

(c) 電子顕微鏡とX線によるタンパク質構造解析

本プロジェクトで開発してきた基盤技術を用いた膜タンパク質、及びその複合体の構造解析を引き続き進める。X線結晶構造解析法を用いて迅速に解析できるタンパク質複合体については、X線による構造解析を進める。3次元結晶化が困難な膜タンパク質の構造解析は電子線結晶学を用いた構造解析を行い、結晶性の良くない2次元結晶についてもより高い分解能での構造解析法の開発を行うことを目指す。細胞に存在する状態で電子線トモグラフィーの解析も行うことで、膜タンパク質やその複合体の自然な状態の構造解析を目指し、具体的には以下の内容を実施する。

- ・水チャネルAQP4の高分解能の構造解析と機能解析から、ヒト由来のAQP4も阻害できる化合物候補を見出したので、その阻害剤との複合体の高分解能の構造解析を実施する。
- ・ギャップ結合チャネルの複雑なゲーティング機構を含む様々なギャップ結合チャネルの構造と機能を解析し、創薬に資する情報取得のために、Cx26やCx32、Cx43など

のコネキシンやイネキシンの構造解析を実施する。

- 電位感受性 Na^+ チャンネルの2つの状態での構造を低い分解能で解析することに成功したので、これらの分解能の向上を試みることで、イオン選択性機構や gating 機構の解明を目指す。
- ヒストンと相互作用する転写制御因子複合体の構造と機能を X線結晶構造解析法などにより解明したので、さらに引き続きこれらの研究を進める。
- HK-ATPase とその各種阻害剤との複合体の構造解析を進め、次世代の胃薬開発のための情報を取得する。
- 電子線トモグラフィー法で、立体構造解析できるシステムを構築したので、これらを用いて、ギャップ結合や、脳のギャップ結合、バキュロウィルスに発現した膜タンパク質などの構造解析を試みる。

(実施体制：一般社団法人バイオ産業情報化コンソーシアム、独立行政法人産業技術総合研究所生物情報解析研究センター、独立行政法人産業技術総合研究所バイオメディシナル情報研究センター、国立大学法人名古屋大学細胞生理学研究センター、国立大学法人京都大学大学院理学研究科)

研究開発項目②「核磁気共鳴法等による膜タンパク質及びその複合体とリガンド分子の相互作用解析技術」

(a) リガンドベース創薬デザインのためのNMR相互作用解析手法の開発・高度化

基盤技術開発として、Hit-to-Leadプロセスを支援する新たなNMR解析手法の開発を行うとともに、これまでに開発したNMR解析手法の適用範囲を拡大するため、真核生物を用いた創薬標的タンパク質の発現および安定同位体標識法を開発する。Hit-to-Leadプロセス支援としては、本プロジェクトにおいて開発し、高度化に成功した“ファージペプチドライブラリからの相互作用ペプチドの配列の同定法”と標的タンパク質上での化合物間の競合情報を取得する IN PHARMA法を組み合わせた新たな手法の開発に取り組む。本手法によりファージペプチドと標的タンパク質との複数の相互作用点を、一般的に相互作用点の少ないHit化合物中に組み込むことが可能となり、化合物の結合強度を増強できると期待される。また創薬標的タンパク質の発現・安定同位体標識法としては、重水素化およびメチル選択標識法の開発により、本プロジェクトにおいて開発したアミドおよびメチル交差飽和法を酵母発現系から得られたタンパク質に対しても適用可能とする。酵母における重水素化およびメチル選択標識法の開発により、“大腸菌において発現可能な標的タンパク質”に限られていたアミドおよびメチル交差飽和法の適用範囲が、受容体細胞外ドメインをはじめとした難発現タンパク質を中心として大幅に広がることが期待される。

(実施体制：一般社団法人バイオ産業情報化コンソーシアム、独立行政法人産業技術総合研究所バイオメディシナル情報研究センター、国立大学法人東京大学大学院薬学系研究科)

(b) 創薬標的タンパク質複合体の相互作用解析

電位依存性プロトンチャンネルHv1は、膜電位依存的な H^+ 透過を担う4回膜貫通型蛋白質である。 Na^+ 、 K^+ 、および Ca^{2+} 選択的電位依存性イオンチャンネルは、選択的イオン透過を担うポアドメインと膜電位を感受する電位感受性ドメインVSDを有するが、Hv1はポアドメインを有さず、VSD単独で電位感受と選択的 H^+ 透過を担う。近年、精子細

胞の pH 調節因子として $Hv1$ が同定され、内因性カンナビノイドの一種である *N*-arachidonylethanolamine (AEA) による $Hv1$ の活性化電位の低下に伴う精子細胞内のアルカリ化が精子の受精能獲得を誘起することが提唱された。一部の男性不妊症患者では $Hv1$ の精子膜上における発現量が少ないことが報告されており、 $Hv1$ の AEA による活性制御機構の解明は、生殖メカニズムの解明のみならず、不妊症治療に対して重要な知見を与えうる。しかしながら、AEA による $Hv1$ の活性化は、AEA を内因性リガンドとするカンナビノイド受容体を介さずに起こることが示されているが、AEA と $Hv1$ が直接相互作用するかは不明である。

そこで本年度では、AEA と $Hv1$ の直接の相互作用を実験的に示すとともに、溶液 NMR 法を用いて $Hv1$ と AEA の相互作用を構造生物学的に解析することで、AEA による $Hv1$ の活性化機構を明らかにすることを目的とする。

G 蛋白質共役型内向き整流性カリウムチャネル (GIRK) は、M2 アセチルコリン受容体など特定の GPCR へのリガンド刺激時に、3 量体 G 蛋白質の $\beta\gamma$ サブユニット ($G\beta\gamma$) により開閉が制御される内向き整流性カリウムチャネル (IRK) である。GPCR 刺激に応じた GIRK の開口により細胞外に K^+ が流出することにより生体膜の興奮性を抑制し、中枢神経における神経伝達など生理的に重要な過程に関わっている。特に心臓ペースメーカー細胞においては、心拍数の抑制に重要な役割を担っているため、GIRK 開閉を制御する構造メカニズムを明らかにすることにより、低分子化合物が標的とすべき部位や蛋白質の局所構造に関する知見が得られ、抗不整脈薬を開発する上で全く新しい創薬戦略を構築することが可能となる。

GIRK は、N、C 両末端を細胞内に有する 2 回膜貫通型のサブユニットが 4 量体を形成することにより機能する。GIRK の開口は、N、C 両末端からなる細胞内領域に、GPCR 刺激に応じて 3 量体 G 蛋白質より解離した $G\beta\gamma$ が直接結合することにより構造変化が誘起され、その構造変化が膜貫通領域に存在する K^+ 透過路を阻むゲートの構造変化へと伝播し、開口に至ると考えられている。近年、GIRK の全長および細胞内領域を含む IRK の結晶構造が次々と報告され、細胞内領域の立体構造や、膜貫通領域においてイオン透過路を阻む「ゲート」を形成していることなどが明らかとなってきた。しかし、これらはすべて $G\beta\gamma$ 非存在下の構造であり、 $G\beta\gamma$ との直接の相互作用残基や構造変化様式といった GIRK 開口に至るメカニズムは不明であった。そこで本年度では、GIRK の細胞内領域と $G\beta\gamma$ をそれぞれ大量発現し、両者の相互作用を、定量的かつ構造生物学的に解析することにより、 $G\beta\gamma$ による GIRK 制御メカニズムを解明することを目的とする。

3 量体 G 蛋白質 ($G\alpha\beta\gamma$) は、細胞膜上の G 蛋白質共役型受容体 (GPCR) へのリガンド結合に共役して α サブユニット ($G\alpha$) と $\beta\gamma$ サブユニット ($G\beta\gamma$) とに解離し、各々が酵素やイオンチャネルなどのエフェクターに結合して活性を制御することにより、種々の細胞応答を引き起こす。G 蛋白質とその制御因子の遺伝子変異に起因した疾病も多く見出されており G 蛋白質シグナリングの研究は疾病の発症メカニズムの理解と創薬研究にも大きく貢献することが期待されている。 $G\beta\gamma$ のエフェクターの一つである G 蛋白質共役型内向き整流性カリウムチャネル (GIRK) は、カリウムイオン (K^+) 電流による膜電位の制御を介して、心拍数の制御や神経伝達などの生理機能を担う。この GIRK の開閉は、*i/o* ファミリーに属する三量体 G 蛋白質 ($G_{i/o}$) から解離した $G\beta\gamma$ のみに制御され、かつ、 $G\alpha_{i/o}$ 存在下でのみ迅速に起こることが知られている。この *i/o*-ファミリー特異性や迅速な GIRK 開閉は、 $G\alpha_{i/o}$ と GIRK との直接の相互作用により達成されていることが

示唆されている。このようなシグナリングの特異性や加速の機構を解明することは、それらに変調を与える低分子化合物の創出といった、全く新規の創薬戦略を提示することが可能となる。しかし、これまでに $G\alpha_{i/o}$ と G I R K との相互作用様式については、直接の相互作用の有無を含め、詳細は不明である。そこで本研究では、 $G\alpha_{i/o}$ と G I R K との相互作用様式を、溶液NMR法を用いて構造生物学的に解明することを目的とする。

(実施体制：一般社団法人バイオ産業情報化コンソーシアム、独立行政法人産業技術総合研究所バイオメディシナル情報研究センター、国立大学法人東京大学大学院薬学系研究科)

研究開発項目③「高精度 *in silico* スクリーニング等のシミュレーション技術」

(a) *in silico* ドッキング計算の高精度化

- ・タンパク質の動的性質を反映した薬物ドッキング・スクリーニングの手法を開発する。ドッキングソフトと分子動力学(MD)シミュレーションを組み合わせた高速でかつドッキングスコアを超える精度をもつ化合物活性の推算法として、Linear Interaction Energy(L I E)法を元にした新規手法の開発を行う。活性化化合物の合成展開すべき部位の予測など、リード創製を支援する手法も開発する。また、強力な類似化合物探索の手法を開発し、ドッキングソフトと組み合わせた、スクリーニングシステムの高度化を図る。
- ・ドッキングのスコアの精度を高めるため、タンパク質及び低分子リガンドの動的構造、及び各種相互作用を考慮した複合体の構造予測法及び結合自由エネルギー算出法の開発を継続的に実施する。また、マルチカノニカルMDを用いた *ab-initio* な複合体の構造予測法の研究を続行し、天然変性タンパク質における Coupled folding and binding の問題を解明するとともに、天然変性タンパク質をターゲットとした薬物開発の手法を検討する。タンパク質—化合物複合体を迅速に計算できるシステムを開発し、今までに開発してきた手法の統合的な活用を可能にする。

(実施体制：一般社団法人バイオ産業情報化コンソーシアム、独立行政法人産業技術総合研究所バイオメディシナル情報研究センター、国立大学法人大阪大学蛋白質研究所)

(b) 構造生理学アプローチによるタンパク質間相互作用解析

- ・「構造インタラクトーム」に踏み込んだ、ペプチドと同様あるいはそれ以上の強い結合性を有する非ペプチド性化合物(低分子化合物等)を探索・設計する新しい手法を開発する。MD—MVO法をドッキング計算と組み合わせた手法の改良・応用、(a)で開発した手法の適用を行い、非ペプチド性化合物の探索・リード創成を試みる。COB I N E法は、実用性を高め、公開する。

(実施体制：一般社団法人バイオ産業情報化コンソーシアム、独立行政法人産業技術総合研究所バイオメディシナル情報研究センター、国立大学法人大阪大学蛋白質研究所)

(c) 創薬開発への応用促進に向けた技術開発

- ・G P G P Uなどのアクセラレーターを活用した、計算の高効率化と高速性が発揮できるプログラムの開発を進め、分子シミュレーションなどでのタンパク質—化合物複合体モデリングの高速化を実現する。
- ・リガンド・データベースや計算結果を整理したデータベースの開発・作成を継続する。市販化合物約500万種類に加え、合成可能なバーチャルな1600万化合物のデータベース化も行うとともに、化合物の物性予測などを加える。

- ・ 具体的な創薬実証研究を、本研究の他のチーム、大学や公的研究所、創薬企業等と協力して実施する。具体的には、アクアポーリン4 (AQP4) ブロッカー、 μ 受容体 (GPCR) のアゴニスト、PARL、農薬、GP-VI、その他のGPCR、CHK1などを対象として、実証研究のためにヒット化合物探索を続行し、リード創成に向けた合成展開も行う。ターゲットとする蛋白質のモデリング、既知薬物のドッキングテスト、及び本技術開発で開発してきた種々の*in silico*スクリーニングを実施し、実用的なスクリーニングにおいて、どのようなノウハウで手法を組み合わせれば良いかを検討しながら手法の確立を目指す。GPCR専用のモデリング・薬物スクリーニング手法は、容易に行えるように開発を進め公開する。
- (実施体制：一般社団法人バイオ産業情報化コンソーシアム、独立行政法人産業技術総合研究所バイオメディシナル情報研究センター、国立大学法人大阪大学蛋白質研究所)

3. 2 平成24年度事業規模

	委託事業	
一般勘定	1017.4百万円	(継続)

※事業規模については、変動があり得る。

4. その他重要事項

(1) 評価の方法

技術的及び政策的観点から、研究開発の意義、目標達成度、成果の技術的意義並びに将来の産業への波及効果等について、外部有識者による研究開発の事後評価を平成25年度に実施する。

(2) 運営・管理

当該プロジェクトの実施にあたっては、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」(平成13年度文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第1号)等、研究開発関連の指針を厳守しなければならない。また、本研究開発成果の事業化においては、「経済産業分野のうち個人遺伝情報を用いた事業分野における個人情報保護ガイドライン」(平成16・12・24製局第1号)を厳守する。

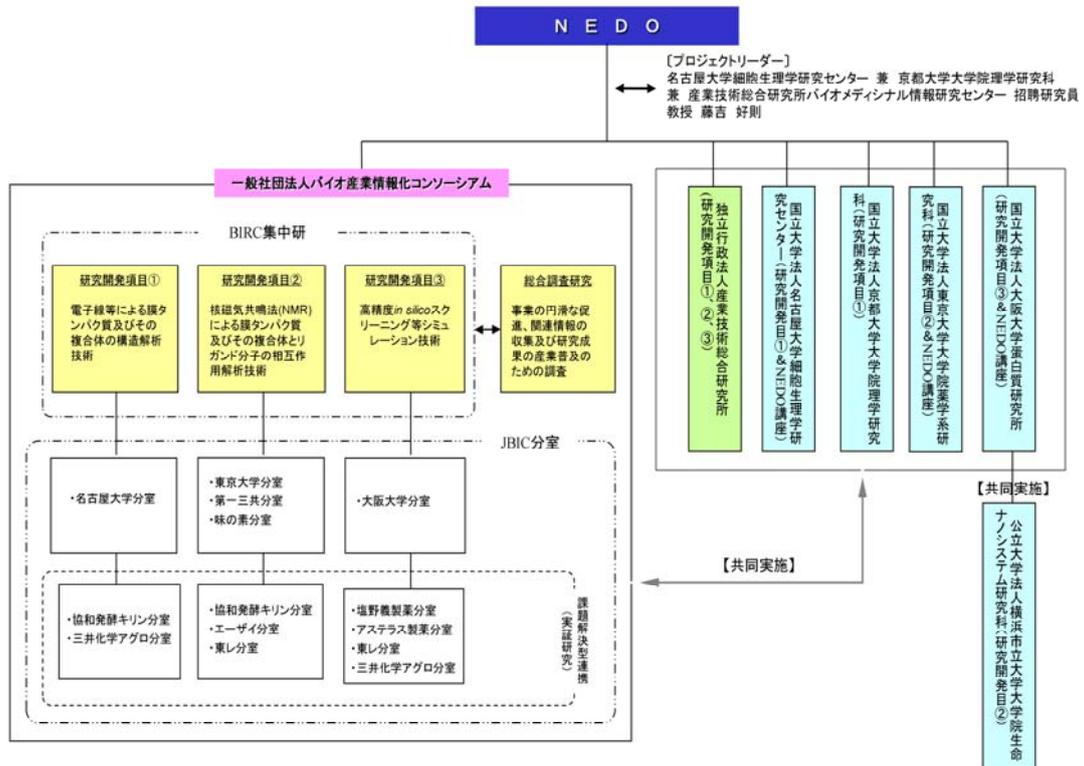
5. スケジュール

(1) 研究開発推進委員会の開催

研究開発の進捗状況を把握し、目標達成に向けた着実な進展を図るため、半期に一度の頻度で研究開発推進委員会を開催する。

(別添) 事業実施体制の全体図

研究開発項目<1>「創薬加速に向けたタンパク質構造解析基盤技術開発」実施体制図



研究開発項目< 2 > 「有用天然化合物の安定的な生産技術開発」(P 1 1 0 0 2)

1. 背景及び目的・目標

創薬ヒット化合物の探索については、近年、製薬企業を中心に、コンビナトリアルケミストリーによる化合物合成とそのライブラリーを用いたハイスループットスクリーニングが盛んに行われたが、必ずしも期待された成果が出ておらず、豊富な生物活性と大きなケミカルスペースを持った天然化合物が再注目されている。微生物は、天然化合物のリソースとして最も有望なものの一つであるが、培養抽出物として安定的かつ大量に取得できないなど、そのままではスクリーニングの効率化に様々な問題点がある。そこで、これまでに無い新しい骨格を持った化合物も含め、微生物の持つ天然化合物の生合成遺伝子を取り出して別の宿主菌株で発現させるなど、目的とする天然化合物を安定的かつ効率よく発現させる手法を開発することが重要である。

本事業では、我が国の強みとする微生物ライブラリーや、天然物化学に対する知識基盤等を最大限に活用し、創薬リード化合物候補となりうる広いケミカルスペースを持った天然化合物を生産する生合成遺伝子とそれを応用した化合物生産を効率的に行う技術開発により、創薬の基盤技術を構築する。

[委託事業]

<最終目標(平成24年度末)>

有用天然物の合成に必要な40個の生合成遺伝子クラスターを取得し、その生産物を対応づけたデータベースを構築する。これら40個の生合成遺伝子クラスター全てについて、化合物生産株となる別の宿主放線菌へ導入し、目的の天然物を2 mg/Lレベルで安定的に生産する技術を開発する。さらにこれら40個について、安定的な生産が可能な天然物と困難なものを体系的に整理し、生産が困難なものについてはその原因を解明し、生産の改善を図る。

2. 事業内容および進捗(達成)状況

独立行政法人産業技術総合研究所バイオメディシナル情報研究センター 新家一男氏のもと、以下の研究開発を実施した。なお、実施体制は別添のとおり。

2. 1 平成23年度事業内容

(1) 生合成遺伝子クラスターライブラリーの構築

① ギガシークエンサーを用いた放線菌ゲノム解析

放線菌ゲノムはGC含有率が高く、通常のシークエンス解析が困難であることが知られている。OISTでは、既にショットガン法およびメイトペア法を併せてほぼ完全に放線菌全ゲノムを解読することに成功しているが、より安価かつ効率的に放線菌ゲノムを解読するため、複数の菌株を同時に解析する手法の開発を進めた。23年度は、16菌株について解析を行い、生合成遺伝子クラスター同定に必要な十分なデータを出すことに成功した。現在、より精密なシークエンス解析を進めている。

② ゲノム情報からの生合成遺伝子クラスター同定法の開発

放線菌生合成遺伝子のうち、ポリケチド生合成経路(PKS)および非リボゾーム型ペプチド合成経路(NRPS)を構成するクラスターは、幾つかのモジュールからなり、相同性が高いことが知られている。その相同性を元に、ある程度の構造予測が可能であるが、正

確に目的生合成遺伝子クラスターを同定する技術を開発することにより、効率的に生合成遺伝子クラスターの取得が可能になる。また、ゲノムシーケンスした後のアノテーション結果が明確に視覚化されたデータベース、および解析ソフトを開発することにより、生合成遺伝子クラスター全体を効率的に推察することが可能となり、取得すべき生合成遺伝子クラスターの範囲を容易に特定可能となる。23年度は、微生物特に放線菌ゲノムに特化したアノテーションソフトを、プロジェクトメンバー間でWebを介して共有閲覧出来るようにシステムを確立した。さらに本システムに改良を加え、PKSで生合成される化合物の生合成遺伝子クラスターをより正確に予測同定するシステムを開発した。

③ コスミドベクターを用いた生合成遺伝子クラスター取得

巨大な生合成遺伝子クラスターの取得は、これまで主としてコスミドを用いて行われて来た。我々はこれまでの種々の改良により極めて効率的にコスミドクローンを作製する技術を取得しているが、本プロジェクトで用いる放線菌宿主であるSUKA株は本コスミドの導入率が、他の宿主と比較して格段に高い。そこで、40 kbp程度の生合成遺伝子クラスターに関しては、コスミドを用いてクローニングを行うことにした。本手法を用いて、これまでに23個の生合成遺伝子クラスターの取得に成功した。

④ BACベクターを用いた生合成遺伝子クラスター取得

臨床応用されている天然化合物は、erythromycin、avermectin、FK506およびrapamycinなど大きな分子量からなるものが多く存在する。それらの生合成遺伝子クラスターは、40 kbpを超えるものが多く、巨大な生合成遺伝子クラスターでは100 kbpにもなる。このような巨大な生合成遺伝子クラスターの取得には、BACベクターを用いる方法が適用されるが、我が国ではBACに関する技術のノウハウが乏しいのが現状であった。そこで、本プロジェクトでは、特に放線菌に最適化したBACクローンの作製技術の開発を行うことにした。ゲル中での菌株処理法、用いる制限酵素などを種々検討した結果、100 kbp前後までであればほぼ完全にBACクローンを作製する技術の開発に成功した。現在、本手法により、10個の生合成遺伝子クラスターを取得している。

⑤ 特殊な生合成経路を持つ化合物の探索

非リボゾーマル型ペプチド合成経路(NRPS)において、特殊なリジン輸送体(LysW)を持つ化合物が近年明らかにされ、この輸送体遺伝子を指標に新たな生合成遺伝子が発見されることが期待されている。また、C-P結合を持つ化合物は、極めて小数しか報告されていないにも拘わらず、産業応用されている化合物を含め高い生物活性を示す。そこで、これら二つの特殊な生合成経路を持つ菌株を選抜するため、LysWおよびC-P合成酵素を指標に、これら生合成遺伝子が生合成する新規化合物およびその生合成遺伝子クラスターの取得を行った。我々が持つ、一万以上の放線菌ゲノムライブラリーより、これら2つの生合成遺伝子を持つ菌株を選抜・培養を行い、二次代謝産物中から特徴を持った化合物の探索を行った。その結果、極めて高い頻度でC-P結合を有する化合物の存在を見出すことに成功した。

上記クローンに関しては、一つの化合物について複数のクローンを取得しているが、便宜上、一化合物一クローンとして計上している。

(2) 安定生産技術の開発

上記(1)にてコスミドベクターにてクローニングした生合成遺伝子クラスターに関して、クローニング後再度高精度にシーケンス確認したクローンに関して、コスミドクローンの場合は発現ベクター系へ組み換えた。BACクローンに関しては高精度シーケンスで確認後そのまま使用した。これらの発現クローンを、順次以下の宿主菌株に導入して異種発現生産を進めている。

① コスミド法で取得した生合成遺伝子クラスターの放線菌宿主株SUKA株での異種発現生産

本プロジェクトの主宿主であるSUKA(SUKA17)株を、上記(1)にてクローニングしたコスミドベクターで形質転換し、薬剤選択性を指標にヒットクローンを選抜した。これらのクローンに関して、再度PCRにて目的生合成遺伝子クラスターが組み込まれているかを確認したクローンを、主に4種類の培地を用いて異種発現生産を確認した。現在までに、10個の生合成遺伝子クラスターに関して異種発現生産を検討し、6種類の化合物に関して生産を確認した。このうちの一つに関しては、そのままでは異種発現生産が確認出来なかったが、プロモーターを変換することで、生産させることに成功した。

② BAC法で取得した生合成遺伝子クラスターの放線菌宿主株SUKA株での異種発現生産

BACベクターは、コスミドベクターと比較して空ベクター自体の導入効率が低いが、扱う遺伝子サイズが2倍以上であり、巨大生合成遺伝子クラスターを組み入れた場合、さらに導入効率が低くなることが予想されたため、ベクター量を増加するなど種々検討しながら、生合成遺伝子の導入を進めた。これまでに、上記(1)にて取得した生合成遺伝子クラスターのうち、4個の化合物に関して形質転換株の取得に成功した。これら、4つの化合物のうち、2つに関しては、目的化合物の生産に成功した。また、1つの化合物に関しては目的生合成遺伝子が組み込まれているが、そちらの生産は確認されず、代わりに別の新規物質を生産することを見出した。本化合物の生合成遺伝子クラスターサイズは84 kbpであるが、使用したBACクローンで取得した遺伝子サイズは約100 kbpであった。新規化合物の構造からこの生合成遺伝子クラスターは、後ろ部分に挿入された部分であると推定している。

③ コスミドクローンの放線菌宿主株 *Streptomyces albus* 株での異種発現生産

本プロジェクトで主宿主として用いるSUKA株は、生合成遺伝子導入等に関して、精査されている宿主であるが、全ての化合物に関して異種発現可能かを検証するため、世界中で放線菌標準宿主として汎用されている、*Streptomyces albus* をコントロールに用いて生合成遺伝子クラスター導入を進めた。我々が用いた *Streptomyces albus* G153株は、SUKAと比較すると形質転換効率が著しく低く、空のコスミドベクターを用いた導入率はSUKA株と比較して1/100~1/1000であった。現在、複数の化合物について形質転換株を作成中であるが、SUKAで高生産だった化合物についても、*Streptomyces albus* G153株では生産が確認出来なかった。

④ BACクローンの放線菌宿主株 *Streptomyces albus* 株での異種発現生産

BACクローンは、SUKAを用いても導入率はコスミドと比較して著しく低いため、コ

スミドの導入率の悪い *Streptomyces albus* 株ではさらに形質転換効率は低いと考えられた。実際に S U K A に導入した生合成遺伝子クラスターのうち、一つのクローンのみの形質転換に成功しているが、その形質転換率も S U K A と比較して 1 / 5 以下であった。この本生合成遺伝子クラスターに関しては、今後異種発現を確認する予定である。

⑤ コスミドおよび B A C クローンの放線菌ホスト株 *Streptomyces reveromyceticus* 株での異種発現生産

放線菌ホスト株 *Streptomyces reveromyceticus* 株には、内在性の休眠遺伝子の覚醒に関して確認し、その生産量は極めて高いものであったことが、本プロジェクトで用いる主な理由であるが、外来生合成遺伝子クラスターに関しては、未だ成功例は無い。今回取得した、生合成遺伝子クラスターのうち、コスミドクローンに関して2つ、B A C クローンに関して2つを導入した形質転換株を得ることに成功しており、異種発現生産に関しては今後確認予定である。

⑥ 生合成前駆体の合成

平成 2 3 年度生合成遺伝子クラスターの取得、および異種発現を行った特殊な化合物に関して、その生合成経路解明のためのスターター物質、およびスターター骨格が改変された化合物を人工生合成することを目的に、生合成スターター物質の合成を進めている。

以上の結果、S U K A 株は放線菌ホストとして極めて効率の良いホストであることを再確認した。平成 2 3 年度の目標に関して、生合成遺伝子クラスターの取得に関しては、B A C 技術をいち早く確立することに成功し、予定以上の効率で取得が出来ている。なお、放線菌ゲノムの B A C ライブラリー作製に関しては、世界的な研究成果を比較しても最高水準の技術を確立したと考えられる。本プロジェクトで培った技術およびベクターは今後、放線菌遺伝子ライブラリー作製の標準となると思われる。異種発現に関しては、クローニングした生合成遺伝子クラスターのシーケンス配列を確認したのから、順次進めており、形質転換株の取得、異種発現生産に関して予定通りに進行中である。

2. 2 実績推移

	H 2 3 年度
	委託
実績額推移 (百万円) 一般勘定	2 8 9
特許出願数 (件)	0
論文発表数 (報)	3 7
フォーラム等 (件)	1 8

受賞実績 : 1

3. 事業内容

独立行政法人産業技術総合研究所バイオメディシナル情報研究センター 新家一男氏のもと、以下の研究開発を実施する。なお、実施体制は別添のとおり。

3. 1 平成24年度事業内容

(1) 生合成遺伝子クラスターライブラリーの構築

放線菌が生産する広範な天然化合物リソースから、大きく複数に分類される化合物群の代表的な化合物を選抜するとともに、製薬企業が興味を持つ構造及び活性がユニークな天然物由来の化合物候補を選抜し、これらの天然化合物の生合成遺伝子クラスター情報の取得を開始する。これらの生合成遺伝子クラスターの正確なシーケンス情報を解読すると共に、化合物と生合成遺伝子を対応づけるデータベースを構築し、類縁化合物の生合成遺伝子を探索するツールの開発につなげる。平成24年度は、継続して生合成遺伝子クラスターの取得を行うが、150 kbpを超える大きな生合成遺伝子クラスターをターゲットに、その取得技術に関してBAC法を改良する。

(2) 安定生産技術の開発

平成24年度は、継続して取得した生合成遺伝子クラスターをホスト株に導入し、異種発現生産を確認する。異種発現で生産しなかった化合物、あるいは生産性の低かった化合物に関しては、プロモーターの変換、制御遺伝子の導入、生産培地の検討、変異リボソームのノックインなどを行い、種々の改良を行い生産の改善に取り組む。生合成遺伝子は、その前駆体あるいは生合成経路により分類されているが、本開発研究の中で、主ホスト株であるSUKA株で異種発現生産できなかった化合物を分類分けし、ある種の生合成遺伝子分類群の存在が推察された場合を想定し、他のホスト株を追加して形質転換、異種発現を進める。これらの、ホストとして異種発現を目的として内在性の二次代謝産物生合成遺伝子群の多くを欠失させた特殊な*Streptomyces lividans*株、および現在使用している*Streptomyces albus* G153株では無いオリジナル株と言われている*Streptomyces albus* J1074株の2つを追加する。また、配列解析を行った菌株から、第二のSUKA株になり得る潜在能力菌株を有しているものを選定する基礎データを得る。

3. 2 平成24年度事業規模

委託事業

一般勘定 389.6百万円 (継続)

※事業規模については、変動があり得る。

4. その他重要事項

(1) 評価の方法

技術的及び政策的観点から、研究開発の意義、目標達成度、成果の技術的意義並びに将来の産業への波及効果等について、外部有識者による研究開発の事後評価を平成25年度に実施する。

(2) 運営・管理

当該プロジェクト成果の事業化においては、「経済産業分野のうち個人遺伝情報を用いた事業分野における個人情報保護ガイドライン」(平成16・12・24製局第1号)を厳守する。

5. スケジュール

(1) 研究開発推進委員会の開催

本プロジェクトの進捗状況の把握、方針の確認、また、適正な方向性検討のため、外部識者を含めた研究開発推進委員会を年二回開催する。

(別添) 事業実施体制の全体図

研究開発項目< 2 > 「有用天然化合物の安定的な生産技術開発」実施体制図

