

平成20年度実施方針

バイオテクノロジー・医療技術開発部

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基盤技術開発
(中項目) 化合物等を活用した生物システム制御基盤技術開発

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十五条第1項第二号

3. 背景及び目的・目標

近年、創薬の研究開発コストの増大、新薬承認件数の減少等により、創薬に関わる企業負担と開発リスクが増大している。最近のゲノム研究及びポストゲノム研究の進展により、ヒトゲノム配列が解読され、さらに疾患に関連するタンパク質等が解明されていることから、現在数百ある創薬ターゲットの数は10倍以上に増加すると期待されている。このため、今後の創薬国際競争においては、創薬プロセス初期のターゲット探索段階において、いかに確実に創薬につながる新たな創薬ターゲットを確定することが極めて重要になっている。また、創薬候補の化合物についても、コンビナトリアルケミストリーの進展により化合物の種類は急速に増加したものの、創薬ターゲットにヒットする化合物の増加には必ずしも結びついていない状況である。こうした状況の中、欧米では、化合物の探索を含めた研究開発が進行しており、このため我が国においても生物機能を制御する新規骨格化合物等を探索・評価する技術開発を推進することが必要である。

本研究開発では、ポストゲノム研究の産業利用が期待される「ゲノム創薬」の加速を支援するため、我が国の強みとする完全長cDNAリソースや、世界最高レベルのタンパク質の相互作用解析技術等を最大限に活用し、創薬ターゲット候補となりうるタンパク質相互作用の解析等により創薬ターゲット候補の絞り込みを行うとともに、疾患等の生物現象を制御する新規骨格化合物等の探索・評価を行うための技術開発を行うことにより、創薬等の研究開発を加速する。これによりバイオテクノロジーの産業化において有用な知見が蓄積しバイオ産業の情報基盤を強化する。また個別化医療や画期的な新薬の創出の期待ができるとともに、我が国バイオ産業の競争力強化・新産業の創出を図り、国際的優位性を確保することを目的とする。

中間目標(平成20年度末)

タンパク質の相互作用解析技術の高速化・高感度化に目途をつけるとともに、疾患に係わるタンパク質相互作用等を解析し、創薬ターゲット候補となる新規の重要なタンパク質相互作用情報を250以上同定する。また、疾患を制御する化合物の探索・評価技術の開発に目途をつけ、産業上有用な化合物等を25以上取得する。

最終目標(平成22年度末)

超高速・高感度にタンパク質の相互作用を解析する技術を開発し、疾患に係わるタンパク質相互作用の解析等を行うことにより、創薬ターゲット候補となる新規の重要なタンパク質相互作用情報を500以上同定する。また、得られた情報を元に、創薬ターゲットや疾患メカニズムの解明を行うとともに、疾患を制御する化合物の探索・評価技術を開発し、産業上有用な化合物等を50以上取得する。

4. 実施内容及び進捗(達成)状況

平成18年度より、産業技術総合研究所生物情報解析研究センター夏目徹チーム長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ている。

4.1 平成19年度(委託)事業内容

《社団法人バイオ産業情報化コンソーシアム(JBiC)》

【タンパク質の相互作用解析等により創薬ターゲット候補・疾患メカニズムを解明する技術の開発】

①タンパク質相互作用ネットワーク解析技術の開発

サンプル測定系のロボット化などにより、タンパク質間相互作用ネットワーク解析技術の更なる高感度化・自動化・ハイスループット化を図った。特に、プルダウンロボットの開発サンプル調整全工程の自動化を中心に実施した。具体的に、本ロボットは、回収された細胞からの細胞ライゼートの調製、抗体磁気ビーズを用いたbaitタンパク質を含むタンパク質複合体の分離、そしてタンパク質の変性とプロテアーゼ処理によるペプチド化の工程を自動化するものである。本システムの特徴は、1個流しでサンプルを調製するところにある。そのため、サンプル間の条件を正確に一致させることができる。本ロボットを、既に開発している細胞回収ロボットに組み込むことにより、細胞回収からタンパク質複合体のペプチド化という一連の質量分析用サンプル調製工程の全自動化に成功した。その結果、標準サンプルを用いて検出感度を調べたところ、導入前の約20倍に上がった。この解析技術の導入により、生活習慣病・神経変性疾患・癌などの幅広い疾患領域の発症メカニズムに関連する相互作用情報を1,780個取得した。また、新規な創薬ターゲット候補となるタンパク質の相互作用情報を160個取得した。それ共に、低分子生理活性化合物のターゲットタンパク質を同定する技術開発を行った。具体的には、あらゆる化合物とそのターゲットタンパク質を高効率にプルダウンする技術である。この開発を進め、課題解決型企業連携によりターゲットタンパク質の同定を実施し、本年度は化合物25個の解析をおこない、約300個(平均12個)のタンパク質相互作用情報を得た。

(実施体制:(社)バイオ産業情報化コンソーシアム、アプライドバイオシステムズジャパン(株)、味の素(株)、アステラス製薬(株)、エムバイオテック(株)、協和発酵工業(株)、第一三共(株)、大鵬薬品工業(株)、田辺三菱製薬(株)、東レ(株)、日本化薬(株)、ナラプロ・テクノロジーズ(株)、インテック・ウェブ・アンド・ゲノム・インフォマティクス(株)、共同研究:(独)産業技術総合研究所、岐阜大学、群馬大学)

②タンパク質相互作用情報の検証技術の開発

相互作用の探索および検証のためのヒト遺伝子のリソースとして、cDNAをGateway化したヒト・エンタリークローンおよび変異エンタリークローンの作製を実施した。また、これらエンタリークローンのcDNAから発現させた組換えタンパク質を使い、創薬ターゲット候補となるタンパク質を含む複数のタンパク質の相互作用を*in vitro*で再構成する技術開発を実施した。この再構成系を利用して、部分的な欠失や置換を持たせた変異タンパク質の相互作用を解析することによって創薬ターゲット候補の相互作用部位を推定可能にした。次に、創薬ターゲット候補に特異的に結合する分子プローブを多数作製した。このとき、相互作用再構成系と*in silico*のタンパク質相互作用予測技術によって推定される相互作用部位に結合する分子プローブを主に作製した。各分子プローブを相互作用再構成系に加えて、結合によって相互作用を制御(阻害、促進、模倣など)する機能を持つ分子プローブを選抜した。この分子プローブは、創薬ターゲット候補の相互作用を制御した場合に得られる効果を化合物の開発に先だって検証可能にした。さらに、各分子プローブを改変し、相互作用の制御機能を細胞内でも果たすイントラボディーを作製し、これによって細胞内で特定の相互作用だけを特異的に制御し、これが疾患に関連した形質

に及ぼす効果を細胞レベルで解析可能にした。

(実施体制：(社)バイオ産業情報化コンソーシアム、ピアコア(株)、インビトロジェン(株)、(株)プロテイン・エクスプレス、ジーンフロンティア(株)、共同研究：(独)産業技術総合研究所、大阪府立大学、京都大学再生医科学研究所、京都大学大学院理学研究科、京都大学大学院医学研究科、東北大学大学院医学系研究科)

③タンパク質相互作用予測技術の開発

タンパク質間相互作用ネットワーク解析実験から得られる優先度の高い標的相互作用情報からタンパク質-タンパク質相互作用モデルを構築し、スクリーニング候補となる化合物約300万件をドッキングシミュレーションに基づく*in silico*スクリーニングで予測した。この予測結果である阻害候補化合物を*in vitro*評価系で生物活性評価を行い、結果を相互作用解析チーム、天然物スクリーニング、合成チームにフィードバックすることを行った。また、ヒット化合物間での相互作用の共通性を計算機で定量化し、化合物の最適化も実施した。相互作用モデル構築のシステムはH18年度でほぼ完成しているが、H19年度も引き続き実施し改良を加えた。具体的には、分子動力学シミュレーション技術の導入による高精度化を目指した改良を行った。

(実施体制：(社)バイオ産業情報化コンソーシアム、大鵬薬品工業(株)、共同研究：(独)産業技術総合研究所)

④疾患関連遺伝子探索技術の開発

液性因子/受容体相互作用に着目し、機能未知の液性因子をコードするcDNAについて、High speed knock-in(HSKI)システムによりノックインキメラマウスを作製し、表現型解析を実施した。生理活性を示した遺伝子については、疾患との関連性検討や作用メカニズム解明のための二次評価を実施した。具体的には、H19年度末までには、250種の候補遺伝子選定と分泌チェックを完了し、分泌が確認された遺伝子152種についてノックインベクター構築を完了した。ノックインベクターを用いたジーンターゲットングにより、112種の遺伝子についてノックインESクローンの取得を完了した。ノックインESクローンを用いて98種の遺伝子についてキメラマウス作製を実施した。62種の遺伝子についてノックインキメラマウスの表現型一次評価(16週齢)を完了し、生理活性を示した遺伝子については二次評価に着手した。

(実施体制：キリンファーマ(株)、共同研究：早稲田大学、大阪大学大学院医学系)

【生物機能を制御する化合物等を探索・評価する技術の開発】

⑤化合物等の探索技術の開発

メモリーダイ法、FCCS(蛍光相互相関分光法)、FRET(蛍光エネルギー共鳴移動)、 α スクリーニング系などを使って、疾患関連相互作用を指標にスクリーニング系を多種構築した。過剰発現により細胞に障害をもたらすタンパク質を伴う相互作用においては、*in vitro*でのメモリーダイ測定系を構築した。スクリーニング系に応じて、蛍光タンパク質の蛍光特性の改変改良を実施した。メモリーダイ法での発現確認を行なうために、メモリーダイ法で使用する蛍光タンパク質の断片を特異的に認識できる抗体を作製した。

タンパク質相互作用等を指標としたスクリーニング系の構築が困難な疾患関連遺伝子については、モデル生物である酵母、ショウジョウバエ、マウスを用いたハイスループットかつ高精度な表現型スクリーニングシステムを構築した。具体的には、分裂酵母・出芽酵母にヒト完全長cDNAを導入・過剰発現し、致死等の表現型変化を引き起こす遺伝子を同定し、その致死効果の回復を指標として対象の遺伝子産物の特異的阻害剤を探索した。また、ヒト疾患関連遺伝子の出芽酵母ホモログ変異株を用いた薬剤探索系を確立し、スクリーニングを実施するとともに表現型解

析を行うことにより、薬剤を評価した。ショウジョウバエの神経変性疾患モデル、糖尿病モデル、リウマチモデル等を用いて個体レベルの表現型に対する化合物の作用を高感度に検出するアッセイ系を構築し、スクリーニングを実施した。マウスを用いて、哺乳類体内時計（行動リズム）をモデル系とした転写ネットワークを制御する化合物の探索・同定方法の確立を行い、スクリーニングを実施した。

各製薬企業より供給されるサンプルも含め、多様な構造を有する天然物、特に微生物代謝産物をソースとして大規模な天然物ライブラリーを整備・構築した。これらのライブラリーを用いて、タンパク質間相互作用を指標にしたスクリーニングを中心にスクリーニングを展開した。特に癌、糖尿病に関しては、タンパク質間相互作用解析の結果明らかになった相互作用に基づき酵素活性や遺伝子発現など、疾患に関与する細胞内経路全体を狙ったアッセイ系も同時に確立しスクリーニングを行った。化合物同定を迅速に行うため、各種分析装置よりオンラインで化合物の同定が行えるデータベースの構築を進め、ヒット後の活性物質同定の効率化を促進した。スクリーニングサンプル調製に関しては、製薬企業より分譲された菌株からのスクリーニングサンプルの調製を行うと共に、NITEと各菌株の遺伝子解析や二次代謝産物の成分分析を進め、有用微生物の集積化を進めると共に、様々な培養条件を検討し多様なスクリーニングサンプル調製を行った。

(実施体制：(社)バイオ産業情報化コンソーシアム、アマルガム(有)、(株)医学生物学研究所、インビトロジェン(株)、メルシャン(株)、旭化成ファーマ(株)、味の素(株)、アステラス製薬(株)、協和発酵工業(株)、合同酒精(株)、興和(株)、第一三共(株)、(株)三和化学研究所、塩野義製薬(株)、大正製薬(株)、武田薬品工業(株)、田辺三菱製薬(株)、(株)ニムラ・ジェネティック・ソリューションズ、(財)微生物化学研究会、明治製菓(株)、共同研究：(独)産業技術総合研究所、(独)理化学研究所和光研究所・神戸研究所、(独)製品評価技術基盤機構、大阪大学微生物病研究所、京都大学、北海道大学、東京大学新領域創成科学、首都大学東京、長浜バイオ大学、慶應大学、広島大学医歯薬学総合研究科)

⑥化合物等の高機能化技術の開発

スクリーニングにより得られた生体機能を制御する化合物の活性を高めるため、天然物を母骨格にもつ誘導体を合成した高機能天然物誘導体ライブラリーを作製した。このため、誘導体を高速合成するために必要な合成ブロックの合成法の確立と自動化を図るとともに、高い多様性を有する3次元立体構造テンプレートを開発し、200種類の化合物ライブラリーを構築し活性評価を行った。具体的には、天然物を母骨格にもつ誘導体についてコンビナトリアル合成を行い、誘導体を高速合成するために必要な合成ブロックの自動化を図った。3次元的に置換基を配置できる新規なラクタム化合物のコンビナトリアル合成を行い、活性を評価することで、タンパク-タンパク結合を標的とする新規な医薬品のリード化合物の探索を目指す。天然物を基にした3次元立体構造テンプレート(3D-Scaffold)を用いてコンビナトリアル合成を行い、化合物ライブラリーのスクリーニングを実施し、ヒット化合物の探索を行い、その結果を3D-Scaffold化合物ライブラリーの設計にフィードバックし、ライブラリーの高機能化を実施した。

(実施体制：(社)バイオ産業情報化コンソーシアム、東レ(株)、旭化成ファーマ(株)、共同研究：東京工業大学、東京大学先端科学技術研究センター、東北大学大学院薬学研究科)

⑦化合物等の評価技術の開発

実験動物を用い個体レベルでの安全性及び薬効の評価システム構築のために、生体内イメージングの基盤技術の確立を目指す。本年度は、特にビジュアルスタビライゼーション技術を改良し、生体の脈動・拍動による画像のぶれを10um以下に抑えることを目標に実施した。疾患

モデル動物の病態可視化のための蛍光プローブの確立、蛍光発現遺伝子動物の作製(2-3種類)を実施した。

上記と共に、約100種類の化合物および各種薬効・毒性標準品をヒト培養細胞およびラットに曝露して細胞・組織サンプルを調製し、独自のヒトおよびラット遺伝子マイクロアレイ・システムによってそれらのサンプルの遺伝子発現プロファイルを体系的に取得・解析し、化合物等の生物学的活性(薬効と毒性)を基盤研究段階で評価する技術開発を目標としている。平成19年度は、重点対象薬剤としてスタチン系を選択し、その中から複数種類選択してラットに曝露し、可能な限り多種類のラット組織の遺伝子発現プロファイルを解析することによって、これまで報告されていない遺伝子発現レベルを指標とした毒性情報の取得を実施した。また、将来的な実験動物代替毒性試験法への応用を考慮して、化合物曝露実験にヒト胎盤あるいは正常皮膚由来の正常細胞(ケラチノサイト等)を加えた。さらに、製薬企業からの強い要望により、各種の抗癌剤に対して感受性の大きくことなる細胞株群について、各々取得した遺伝子発現プロファイルから抗癌剤感受性と相関する遺伝子群の同定を行った。

(実施体制:(社)バイオ産業情報化コンソーシアム、オリンパス(株)、(株)東レリサーチセンター、(株)ニッポンジーン、共同研究:(独)産業技術総合研究所、(独)理化学研究所筑波研究所、東京大学情報理工学系、北海道大学、福島県立医科大学)

⑧総合調査研究

タンパク質相互作用ネットワーク解析やケミカルゲノミクスの研究開発に係わる技術動向の調査・情報収集を国内外の関連学会参加等により行う。また、本プロジェクトの方針決定や推進状況の把握を行うため、研究推進委員会等を開催する。

(実施体制:(社)バイオ産業情報化コンソーシアム)

《バイオテクノロジー開発技術研究組合(バイオ組合)》

⑨マイクロサテライトマーカーを利用した疾患関連遺伝子探索技術により特定された疾患感受性遺伝子群の創薬価値抽出技術の研究開発

生活習慣病の主因子と予想される高血圧感受性遺伝子LPIN1とSMOC2を中心に質量分析システムや酵母Two Hybrid法等のタンパク質相互作用解析、発現制御解析、変異マウス個体を用いた機能解析等により感受性遺伝子を中心とした制御ネットワークを明らかにすることを目的とし検証中である。また、リウマチの原因のキーと考えられる感受性遺伝子NFKBIL1についても独自に作製したノックアウトマウスを用いてその発症メカニズムの解明を目指し検証中である。

(実施体制:ジェノダイブファーマ(株)、共同研究:東海大学医学部猪子研究室)

⑩siRNAライブラリー等を用いた生物機能制御遺伝子の探索技術及び創薬標的検証技術の研究開発

アステラス製薬では、遺伝子破壊マウスや遺伝子過剰発現マウスの表現型から抗肥満・抗糖尿病因子として知られるAGF(Angiopoietin-related growth factor)および生物機能が未解明なAGFファミリー遺伝子の機能解析等に取り組み、糖尿病治療薬創製のための創薬標的としての評価を行った。肝実質細胞がAGFの標的細胞のひとつであり糖新生抑制作用を有すること、また、AGFの糖新生抑制作用について詳細に解析し、その作用メカニズムを明らかにした。

さらに、独自の研究成果から標的候補として選択したAGFファミリー遺伝子のひとつであるX遺伝子(遺伝子名非開示)について機能解析を進めた。具体的には、まず、野生マウス及びレプチン受容体遺伝子変異マウス(db/dbマウス)と高脂肪食負荷マウスの2種類の糖尿病モデル

マウスから調製した副睪丸脂肪組織の経時サンプルを用いた包括的遺伝子発現解析を行い、これら2種類の糖尿病モデルマウスにおいてともに発現低下が認められた X 遺伝子に焦点をあてて機能解析を行った。X 遺伝子は、その発現に概日振動が認められ、遺伝子産物である蛋白質 X の血中レベルにも概日振動が認められた。一方、これら糖尿病モデルマウスの副睪丸脂肪組織における X 遺伝子の発現は低下しており、概日振動も減弱していた。野生マウスの血中レベルが高い時間帯に、蛋白質 X を3週間に渡って db/db マウスに腹腔内投与した結果、対照に比べて体重や肝重量の低下、血中インスリン濃度の低下や、インスリン抵抗性の改善等の効果が認められた。さらに前駆脂肪細胞株 3T3-L1 細胞を用いた解析の結果、遺伝子 X には、脂肪細胞分化に関わる機能やインスリン感受性に関わる機能が示唆された。また、上記研究と平行して前駆脂肪細胞 3T3-L1 に siRNA を高効率で導入可能とする技術を確立した。

東海大学では、肝細胞株 H4 IIEC3 において糖新生抑制活性を示したメフェナム酸の構造類似化合物のバーチャルスクリーニングを実施し、バーチャルスクリーニングにより選択したメフェナム酸構造類似化合物情報を北里大学に開示した。一方、北里大学では、バーチャルスクリーニングで選択したメフェナム酸の構造類似化合物のうち、購入或いは合成した32化合物及び化合物ライブラリー用として合成したベンゾジアゼピン骨格を有する4化合物の合計36化合物をアステラス製薬に送付した。アステラス製薬における活性評価により、36化合物中7化合物に糖新生抑制活性が確認されるとともに、化合物高質化に展開可能な新たな骨格を有する化合物を見出した。

(実施体制:アステラス製薬(株)、共同研究:東海大学医学部平山研究室、北里大学薬学部長瀬研究室)

⑩化合物又は相互作用を探索、評価する基盤技術の研究開発

糖尿病に関与することが示唆されているPPARAとRXRAタンパク質の相互作用を測定するにあたり、測定ターゲット以外の非特異検出が課題であったが、ブロッキング条件と緩衝液条件を適正化した結果、非特異検出率 0.28(適正化前:0.84)への向上に成功した。

また、金ナノ粒子センサの解析データ蓄積が少ないため、リード化合物探索ができるなど、アプリケーション開発が課題であったが、モデルタンパク質にアステラス製薬でもリード化合物創製アッセイ系構築に使用したPPARとRXR系を、リード化合物に 9-cis レチノイン酸を用いて、リード化合物添加によるシグナル変化の有無を検討した。その結果、0.1mM以上の 9-cis レチノイン酸で相互作用増大を示し、金ナノ粒子センサのリード化合物探索への適用の可能性を確認した。

夾雑物中測定では測定ターゲット濃度が低いためにシグナルが小さくなる場合が多い。夾雑物を含む環境下での検出技術の開発を行うにあたって、小さい測定シグナルを特異的に増幅することが課題であった。19年度研究においてはFlag-RXRA測定シグナルを抗Flag抗体で特異的に増幅することに成功した。

金ナノ粒子センサを用いた生体分子間相互作用測定装置の最大の課題は検出感度であり、現行装置の抗体検出感度は $1 \mu\text{g/ml}$ と他社製品よりも数桁低いことが課題であった。18年度に装置の検出感度向上を目的に、装置性能に与える影響が大きい分光光度計を現行装置よりも高スペックなものを用いて新装置を製作したので、19年度研究において新装置の抗体検出感度をBSAと抗BSA抗体で評価を行った。その結果、 $0.01 \mu\text{g/ml}$ 抗BSA抗体検出に成功し、現行装置(抗体検出感度: $1 \mu\text{g/ml}$)からの感度向上を確認した。

糖尿病関連のトランスポーター遺伝子のアッセイ系構築を目的とし、平成18年度にhOCT1遺伝子のクローニングとmetformin(経口糖尿病薬)の輸送活性の測定に成功し、今年度は日本人における発現頻度の高い変異体の輸送活性の測定に成功した。

卵母細胞の特長である、基質薬物の細胞内への注入を実現させるため、平成18年度に引き続き、自動化装置の試作機の作製を行った。さらに、注入する基質の分子量の違いによる細胞内への基質保持状態の解析も行った。また、平成20年度以降に計画していた質量分析計による卵母細胞からの化合物の分析に成功した。

(実施体制:(株)日立製作所)

⑫総合調査研究

本プロジェクト領域での研究状況の進展の早さに鑑み、研究開発における方向付けの最適化と問題点の迅速な処置により研究を効率的に推進する必要がある。そのため、a. 研究開発推進のための会議(二社間アステラス⇄日立、アステラス⇄東海大学、グループ間JBiC⇄バイオ組合)の開催、b. 技術調査、情報収集の実施、c. 成果報告書の作成及び成果の外部発表を実施する。

(実施体制:バイオテクノロジー開発技術研究組合)

4.2 実績推移

| | 18年度 | 19年度 | 20年度 | 21年度 | 22年度 |
|------------------|----------|-----------|-------|-------|-------|
| | JBiC | JBiC | JBiC | JBiC | JBiC |
| | バイオ組合 | バイオ組合 | バイオ組合 | バイオ組合 | バイオ組合 |
| 実績額推移 | *2,492 | **2,274 | | | |
| ①一般会計 (100万円) | 140 | 127 | | | |
| 特許出願件数(件) | 5 0 | 7 0 | | | |
| 論文発表数(報) | 96 0 | 102 12 | | | |
| フォーラム等(件) | 122 1 | 122 2 | | | |

*:232百万円を春加速として追加

** :210百万円を春加速として追加

5. 事業内容

5.1 平成20年度事業内容

産業技術総合研究所生物情報解析研究センター夏目徹チーム長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紙を参照のこと。

《社団法人バイオ産業情報化コンソーシアム(JBiC)》

【タンパク質の相互作用解析等により創薬ターゲット候補・疾患メカニズムを解明する技術の開発】

①タンパク質相互作用ネットワーク解析技術の開発

脂肪細胞・神経細胞・特殊ながん細胞など、疾患のメカニズム解明・創薬ターゲット同定に必要な多種類の細胞を使用可能とするための、baitタンパク質発現技術の開発を続けるとともに、内在性タンパク質複合体を解析する技術開発を行う。更に多くの細胞腫に適用できるように解析技術の改善を行いながら、疾患関連タンパク質ネットワーク情報を1,500個以上取得する。ま

た、創薬ターゲット候補となる新規の重要なタンパク質相互作用情報を 70 個以上同定する。中間評価までには、疾患関連タンパク質ネットワーク情報を 3,000 個以上、創薬ターゲット候補のタンパク質相互作用情報を 300 個以上取得する。

我が国が誇る世界最高水準の産業ロボット技術を応用し、人間のマニュアル操作ではもはや取扱うことの出来ない微量タンパク質複合体を細胞より抽出し、前処理する全ての過程を高精度に自動化し、解析のスループットと感度を共に向上させる。サンプル調製工程の最適化を行い、細胞回収ロボットを平成 18 年度、タンパク質プルダウンロボットを平成 19 年度に開発したので、本年度は、これらのロボットを組み合わせた全自動のサンプル調製システムを構築し、質量分析用サンプル調製の最適化を行う。中間評価までには、ロボットの最適化の後、HEK293T細胞を用いたルーチン解析の条件検討を終える。

抗体により認識される低分子のタグを化合物に付加し、タグ付けされた化合物を生きた細胞に作用させた後、抗体によって化合物-タンパク質複合体を抽出し、上述の質量分析システムによりターゲットタンパク質を同定する技術開発を行う。本テーマは課題解決型企業連携により実施する。化合物ターゲットタンパク質を高効率に同定する技術開発の改善をおこない、化合物 10 個のターゲットタンパク質の同定を行う。

(実施体制:(社)バイオ産業情報化コンソーシアム、アプライドバイオシステムズジャパン(株)、味の素(株)、アステラス製薬(株)、エムバイオテック(株)、協和発酵工業(株)、第一三共(株)、大鵬薬品工業(株)、田辺三菱製薬(株)、東レ(株)、日本化薬(株)、共同研究:(独)産業技術総合研究所、岐阜大学、群馬大学)

②タンパク質相互作用情報の検証技術の開発

相互作用の探索および検証のためのヒト遺伝子のリソースとして、cDNAをGateway化したヒト・エントリークローンおよび変異エントリークローンの作製を引き続き行い(140クローン以上、中間評価までに40クローン)、各チームにクローン供給を行う。また、既存のエントリークローンの情報整理を行い、酵母スクリーニングチーム等にスクリーニング用クローンの供給を行う。

相互作用の探索、検証、スクリーニングに用いるヒトタンパク質を200種以上(中間評価までに60種)コムギ胚芽無細胞系を中心として発現させ、各チームに供給する。特にタンパク質大量発現を行い、スクリーニングチームへのタンパク質供給を行う。これに伴って、タンパク質発現技術の改良を行い、量および質の向上を計る。

相互作用の探索、検証、スクリーニングに用いるヒトタンパク質発現用のためのベクター構築を2種類以上(中間報告までに1種)行う。細胞局在を指標としたスクリーニングは、H19年度に幾つかの成果を上げているので、Gatewayエントリークローンやベクター系を利用し、新しいスクリーニングシステムを構築しつつ、「スクリーニング技術開発」チームと協力して、生理活性物質の探索を行う。

また、本ヒト・エントリークローンは創薬スクリーニング技術開発や創薬候補化合物探索材料として有望な人工多能性幹細胞(iPS細胞)の効率的作製のためのリソースとしても活用する。

(実施体制:(社)バイオ産業情報化コンソーシアム、ピアコア(株)、インビトロジェン(株)、(株)プロテイン・エクスプレス、ジーンフロンティア(株)、共同研究:(独)産業技術総合研究所、大阪府立大学、京都大学)

③タンパク質相互作用予測技術の開発

H20 年度では、特に「標的タンパク質間相互作用様式に基づく相互作用制御化合物の*in silico*スクリーニング」について、より多くの標的について解析を行う。H19 年度に実施したいくつかの解析事例から、タンパク質-タンパク質相互作用や、タンパク質-リガンド相互作用の作用機序

の理解や化合物最適化設計指針において分子動力学計算の活用が効果的であったので H20 年度では、タンパク質-タンパク質ドッキング結果やタンパク質-リガンド構造からの分子動力学計算モジュールへのパイプラインを構築し、分子動力学計算を含んだ高精度解析のハイスループット化を目指す。化合物の分子動力学計算パラメータの自動作成システム、構造トラジェクトリー自動解析システムの構築が重要課題となる。

H19 年度に引き続き、化合物 *in silico* スクリーニングのための化合物データベース、天然化合物データベースの構築と管理を継続する。これに加え、H20 年度では、化合物構造最適化に必要な化合物のフラグメントデータの作成を行う。フラグメントデータの収集には、Astex の提唱する「Rule of 3: 分子量 300 以下、ClogP 3 以下、水素結合受容・供与対 3 以下」等を参考にする。

H18 年に引き続き、相互作用ネットワーク解析チームにおいて予測された新規標的タンパク質間の相互作用モデル情報に基づき、天然化合物チームおよびライブラリー合成チームと連携し、その相互作用を制御しうる化合物を *in silico* スクリーニングにより予測する。特に H19 年度の成果の一つである HDAC と結合する天然化合物の高活性化の実績を生かし、天然化合物の *in silico* 技術による高活性化の解析を重点的に取り組む。

平成 19 年度に引き続き、医薬品の標的となりうるタンパク質相互作用モデルと *in silico* スクリーニングデータをもとに、阻害候補化合物の *in vitro* 評価系での生物活性評価を行い、結果を相互作用解析チームにフィードバックする。この情報を加味して相互作用モデル、及び化合物の最適化を実施し、生物活性評価を行う。特に、化合物のハイスループットスクリーニングのための、評価系をミニチュア化、酵素や試薬の量、比率、インキュベーション時間などの最適化を目指す。

予測システム開発については分子動力学計算の統合化を目指す。解析では、約 10 例の標的タンパク質の相互作用予測、約 5 つのタンパク質複合体への化合物の *in silico* スクリーニング、約 3 つの天然化合物の *in silico* による高機能化を目指す。

平成 20 年度より筑波大学、臨床医学総合研究所との共同実施にて、インフルエンザウィルスの RNA ポリメラーゼ複合体をターゲットとした阻害剤の探索を *in silico* スクリーニングにて実施する。具体的には RNA ポリメラーゼ複合体の構成蛋白である PA と PB1 について結晶構造情報をもとにタンパク質立体構造を作成し、分子動力学解析により、PB1 ペプチドと PA との相互作用解析を行い、得られた知見を元にドッキングシミュレーションを行い、化合物の *in silico* スクリーニングを行う。

(実施体制: (社) バイオ産業情報化コンソーシアム、大鵬薬品工業(株)、共同研究: (独) 産業技術総合研究所、筑波大学、臨床医学総合研究所)

④ 疾患関連遺伝子探索技術の開発

HSKI システムによる一次評価については、機能未知液性因子 cDNA を高発現するノックインマウスの作製及び解析を継続して実施し、20 年度末までに計 120 種(平成 19 年度までの実績 62 種を含む)の cDNA について全表現型データの取得を完了する。また可溶化受容体ノックインシステムの有用性が実証されたことを受け、候補遺伝子選抜にあたっては可溶化受容体を積極的に取り入れて行く。

生理活性を示した遺伝子の二次評価(疾患との関連性検討やメカニズム解明のための検討を実施し、創薬ターゲットとしての有用性を明らかにする)について、特に平成 19 年度内に特許出願予定の 2 因子(#37、#74)については、当初計画(平成 20 年度以降)より早く平成 19 年度内に創薬ターゲットとしての有用性が示されたことを受け、これら因子とその受容体候補分子に関する創薬研究(下記)を最重点課題として取り組む。重点課題とは、抗腫瘍作用のメカニ

ズム解明、他の抗腫瘍剤との併用試験／血管に対する作用メカニズム解明／受容体候補分子との相互作用検討／血管系に異常をきたす他の疾患との関連性の調査・検討／低分子化合物やヒト抗体によるシグナル制御も考慮に入れたこれらツールの整備／各種改変体タンパク質の活性評価／生理活性を反映したインビトロ系構築等である。以上の取り組みの成果については、平成 20 年 12 月までに完了を予定している優先権出願に収載する。一方、上記 2 因子以外についてもノックインマウスの表現型にもとづき優先順位をつけた上で、順次二次評価に着手する。

また、上記に加え共同研究先では、それぞれマウス血中タンパク質を迅速に二次元電気泳動分離する技術確立し、それを用いてノックインマウス血中タンパク質変動に関する解析に着手し、ノックインマウスにおいて見出された表現型について、臨床の観点から、疾患との関連性やヒト由来試料を用いた研究実施の可能性について調査・検討を継続する。

平成20年度の達成目標（＊は中間評価平成20年7月までの目標）は以下の通りある。

HSKI システムによる一次評価：HSKIシステムの各ステップにおける平成20年度末到達目標（平成19年度までの達成分を含む）について以下に記す。

- ・候補遺伝子選抜（可溶性受容体を含む） : 375種
- ・ノックインベクター構築 : 227種
- ・ノックイン ES 細胞クローン取得 : 175種
- ・ノックインキメラマウス作製 : 160種
- ・ノックインキメラマウス表現型解析（データ取得完了） : 120種

生理活性を示した遺伝子の二次評価：因子ごとに以下に記載。

< 因子 # 37 >

- （＊）ヒト # 37 組換え体（現状はマウス # 37 組換え体を用いて評価）の調製と評価完了。
- （＊）膵臓癌、肺癌以外の癌種を用いた抗腫瘍試験、及び他の抗腫瘍剤との併用試験完了。
- ・血管系への作用メカニズム解明研究への着手。
- ・血管系に異常をきたす疾患との関連性調査・検討への着手。
- ・# 37 と受容体候補分子の相互作用を制御する化合物スクリーニング完了（産総研と共同）。
- ・# 37 と受容体候補分子の相互作用を制御するヒト抗体取得に着手。

< 因子 # 74 >

- （＊）ヒト # 74 組換え体の調製、及び投与による再現性／抗腫瘍効果確認完了。
- ・因子 # 37、# 74 に関する以上の研究結果について平成 20 年 12 月までに完了予定の優先権出願に収載。

< 新規因子 >

- ・因子 # 37、# 74 以外の新規生理活性因子 1 種以上について二次評価に着手。（実施体制：キリンファーマ（株）、共同研究：早稲田大学、大阪大学大学院医学系）

【生物機能を制御する化合物等を探索・評価する技術の開発】

⑤化合物等の探索技術の開発

平成 20 年度も、引き続き土壌等の天然物資源より、菌株の取得を継続する。また、製薬会社より提供された菌株については、培養を行いスクリーニングサンプル調製を進める。海洋産物からの菌株分離およびこれまでにない手法での菌株の分離を進める。菌株分離に関しては、従来の放線菌およびカビ由来のサンプルに関しては、製薬系企業より多くのスクリーニングサンプルの供給を受けているため、H20 年度は量よりも質を高めた菌株ライブラリーおよびスクリーニングサンプルを調製することを目的とする。具体的には、製薬系企業が手薄なバクテリア、地衣類、あるいは海洋由来の菌株などの充足を図る。また、土壌菌に関しては、低栄養、高塩濃度あるいはフッ化物含有培地など、様々なストレスを与えた状態で分離することを行う。従来のサンプル調製

に関しては、企業分譲株もあるため、産総研では週に160サンプルは調製を行う。NITEに関しては、生合成遺伝子が転写翻訳されているか否かを容易に判定するような技術の開発を進めると共に、特殊な培養法などを検討して行く。

スクリーニングに関しては、タンパク質相互作用を指標にしたスクリーニングに加え、重要なタンパク質相互作用に関しては、相互作用のみでなく酵素活性および遺伝子発現などを入れた総合的なpathwayを指標にアッセイ系を構築し、スクリーニングを展開する。テーマ①「タンパク質ネットワーク解析」で得られた疾患関連因子についてはタンパク質相互作用を制御する化合物を得ることを目的として実施する。「タンパク質ネットワーク解析」で得られた重要遺伝子については、その遺伝子の発現を指標にしたスクリーニング系を年に2個以上展開する。これに加えて、20年度からは、タンパク質相互作用から見出したターゲット意外についても積極的に展開する。

主にテーマ⑤-1「スクリーニング技術開発（蛍光イメージング）」で開発された蛍光タンパク質技術を指標に、メモリーダイ法およびFCCS法を用いて年に5個以上のスクリーニングを行う。本系に関しては、かなりのハイスループット化が達成できており、スクリーニング系の供給がボトルネックとなる可能性がある。また、各社からの供給サンプルをさらに効率良く処理するために、384-wellベースから1536-wellベースへの転換など積極的に系の改良を進める。タンパク質相互作用に限らず、癌に関しては、固形癌微小環境特異的に作用する化合物、スプライシング阻害剤、遺伝子修復阻害剤、細胞分裂関連タンパク質局在制御物質などをターゲットにスクリーニングを行う。その他、抗菌抗カビ物質についても積極的にスクリーニングを行う。

外部（酵母、ハエ等の表現系スクリーニング）供給に関しては、引き続きサンプル供給を行うとともに活性物質の単離生成を行う。必要に応じて、アッセイ系の導入を行い、産総研集中研にてスクリーニングを行い、スクリーニングの効率化を図る。各製薬企業等から供給されるスクリーニングサンプルに関しては、契約に従い供給可能なチームへは分注供給する。これらについても、活性物質の単離精製を担当する。また、単離天然化合物ライブラリーを作成するため、何らかの生理活性物質を生産している菌株に関しては、ある一定以上のスケールで培養し、網羅的に化合物を単離する。これに加え、より迅速に二次代謝産物中の化合物の同定を行えるように、主にUPLC-TOF-MSおよびLC-NMRを用いて、目的化合物を迅速に同定するシステムおよびデータベースの充実化を進める。さらに、これまでに得られた化合物に関して、構造活性相関やコンピューターシミュレーションを用いて、より臨床薬としての開発を目的とした化合物の誘導体合成を展開する。

一方、iPS細胞では、その作製効率の低さやその安全性等が懸念されており新たな因子の探索が望まれている。そこで、本開発では本プロジェクトで集積している天然化合物ライブラリーをその因子の候補として活用する。

更に、平成20年度より、筑波大学、臨床医学総合研究所との共同実施にて、インフルエンザウイルスのRNAポリメラーゼ複合体の構成蛋白であるPAとPB1の相互作用を阻害する抗ウイルス剤候補となる化合物を探索する。

(実施体制：(社)バイオ産業情報化コンソーシアム、アマルガム(有)、(株)医学生物学研究所、インビトロジェン(株)、メルシャン(株)、旭化成ファーマ(株)、味の素(株)、アステラス製薬(株)、協和発酵工業(株)、合同酒精(株)、興和(株)、第一三共(株)、(株)三和化学研究所、塩野義製薬(株)、大正製薬(株)、武田薬品工業(株)、田辺三菱製薬(株)、(株)ニムラ・ジェネティック・ソリューションズ、(財)微生物化学研究会、明治製菓(株)、共同研究：(独)産業技術総合研究所、(独)理化学研究所和光研究所・神戸研究所、(独)製品評価技術基盤機構、大阪大学微生物病研究所、京都大学、北海道大学、東京大学新領域創成科学、首都大学東京、長浜バイオ大学、東京医科歯科大学、慶應大学、筑波大学、臨床医学総合研究所)

⑥化合物等の高機能化技術の開発

スクリーニングにより得られた生体機能を制御する化合物の活性を高めるため、天然物を母骨格にもつ誘導体を合成した高機能天然物誘導体ライブラリーを作製する。このため、誘導体を高速合成するために必要な合成ブロックの合成法の確立と自動化を図る。高い多様性を有する3次元立体構造テンプレートを開発し、化合物ライブラリーを構築し活性評価を行う。インシリコグループとスクリーニンググループと共同体制でデザイン、合成、評価を進める。

天然物を母骨格にもつ誘導体については、コンビナトリアル合成を行い、誘導体を高速合成するために必要な合成ブロックの自動化を図る。インシリコグループとスクリーニンググループとさらに強固な共同体制でデザイン、合成、評価を進める。

3次元的に置換基を配置でき、生体分子を模倣することのできるラクタムテンプレート、あるいは新規テンプレートのデザインを検討しコンビナトリアル合成を行う。化合物の活性を評価することで、タンパク-タンパク結合を標的とする新規な医薬品のリード化合物の探索を目指す。

天然物を基にした3次元立体構造テンプレート(3D-Scaffold)を用いてコンビナトリアル合成を行う。化合物ライブラリーのスクリーニングを実施し、ヒット化合物の探索を行い、その結果を3D-Scaffold化合物ライブラリーの設計にフィードバックし、ライブラリーの高機能化を行う。

平成20年度の達成目標は、インシリコグループ、天然化合物グループと共同して有効な化合物を1つまたは2つ見出す。

(実施体制:(社)バイオ産業情報化コンソーシアム、東レ(株)、旭化成ファーマ(株)、共同研究:東京工業大学、東京大学先端科学技術研究センター、東北大学大学院薬学研究科)

⑦化合物等の評価技術の開発

本プロジェクトの実用化連携企業が開発し、臨床試験途中に毒性が判明した薬剤候補物質について、その企業の研究施設にてラットへの28日間反復投与を行う。そのラットから20種類程度の臓器・組織からtotal RNAを調製し、保存する。そのtotal RNAから、平成20年度の予算規模に応じた数のサンプルを厳選してpolyA+ RNAを抽出し、遺伝子発現プロファイルを取得・解析する。

平成20年度の到達目標としては、臨床試験中に毒性の出現した抗がん剤候補物質1種類について、28日間反復投与実験を実施し、遺伝子発現データを集積する。最終的には抗がん剤を中心とした既存の薬剤および開発段階にある薬剤候補物質が細胞・組織に与える影響と相関する遺伝子発現データセットを取得・解析し、薬剤の有効性と毒性を遺伝子発現レベルで評価するシステムを構築する。

また、創薬スクリーニングとしての産業利用が期待されるiPS細胞については、その細胞構造や機能を解析すると共にこれを活用し、毒性スクリーニング用モデルおよび疾患モデルとしての評価技術を開発する。

(実施体制:(社)バイオ産業情報化コンソーシアム、オリンパス(株)、(株)東レリサーチセンター、ニッポンジーン(株)、共同研究:(独)産業技術総合研究所、(独)理化学研究所筑波研究所、東京大学情報理工学系、北海道大学、京都大学、福島県立医科大学、慶應大学)

⑧総合調査研究

タンパク質相互作用ネットワーク解析やケミカルゲノミックスの研究開発に係わる技術動向の調査・情報収集を国内外の関連学会参加等により行う。また、本プロジェクトの方針決定や推進状況の把握を行うため、研究推進委員会等を開催する。

(実施体制:(社)バイオ産業情報化コンソーシアム)

《バイオテクノロジー開発技術研究組合(バイオ組合)》

⑨マイクロサテライトマーカーを利用した疾患関連遺伝子探索技術により特定された疾患感受性遺伝子群の創薬価値抽出技術の研究開発

化合物開発の早期の開始に向けて、平成20年度は、PKC ϵ の特異的阻害剤の開発を最重点とし、併せて、阻害剤 MG132 の最適化を進める。他の遺伝子の解析に関しては、最重点課題の進行度に応じて行う。また、基盤技術としての重要性が高い酵母two hybrid法については、独自の改良を進め、より有効・且つ汎用性の高い手法を確立する。

(実施体制:ジェノダイブファーマ(株)、共同研究:東海大学医学部猪子研究室)

⑩siRNAライブラリー等を用いた生物機能制御遺伝子の探索技術及び創薬標的検証技術の研究開発

インスリン感受性制御因子としての機能が明らかになった AGF ファミリー蛋白質 X の脂肪細胞での発現を制御する遺伝子をsiRNAライブラリースクリーニングを実施することにより探索する。さらに見出された遺伝子 X の発現制御遺伝子を創薬標的として遺伝子 X の発現誘導剤の創製を試みる。具体的には、遺伝子 X の発現産物である蛋白質 X の機能を制御する候補化合物を東海大学平山研究室においてバーチャルスクリーニングにより探索する。選択化合物の中から購入・合成可能なものを北里大学長瀬研究室において調達し、アステラス製薬がその生物活性を評価し、糖尿病治療薬創製のためのリード化合物を取得する。

2) 東海大学平山研究室において実施するバーチャルスクリーニング結果を踏まえて、PPAR γ 、PPAR δ 、PPAR α アゴニスト活性が期待される新規骨格化合物を複数種合成或いは購入し、評価する。化合物の構造情報と生物活性情報をシミュレーションモデルに反映させることで化合物の高質化を進める。

平成20年度の達成目標の目標は1)インスリン感受性制御因子である AGF ファミリー蛋白質 X の発現誘導剤(糖尿病治療薬)を創製するための標的遺伝子のひとつを明らかにする(アステラス製薬(株))。2)複数の核内受容体PPARサブタイプのアゴニストとして働く新規骨格を有する化合物を見出す(アステラス製薬(株)、東海大学、北里大学)。3)現在遂行しているpan-agonistを市販化合物データベースから探索することを続行する。更に、標的分子の立体構造情報を活用して、部分化学構造を組み合わせ、新しい化合物を創製する新しいアルゴリズムに基づき、新規骨格を有する化合物のde novo designおよび骨格交換を行い、pan-agonist活性を有する化合物を探索・創製することを目指す。また、北里大学から提案される最適化された化合物が標的分子とどのように相互作用するかをシミュレーションし、最適化研究の方向性を決定する研究をバックアップする(東海大学)。

(実施体制:アステラス製薬(株)、共同研究:東海大学医学部平山研究室、北里大学薬学部長瀬研究室)

⑪化合物又は相互作用を探索、評価する基盤技術の研究開発

金ナノセンサーに関しては装置が完成したため、開発を終了し、実用化へと進む計画である。具体的には、金ナノセンサーでは解析事例を蓄積し、さらに実際の化合物を用いた検証実験を進める。最終的には装置の高機能化とハイスループット化を目標とする。一方、トランスポーター解析では糖尿病関連の遺伝子発現系の構築を行い、さらに新規の化合物を用いた解析を化合物への標識なしで行えるアッセイ系の基盤技術を完成させることを目標とする。平成20年度からは、質量分析計での解析系に集中し、標識なしでのアッセイ系の基盤技術の技術開発に特化する計画である。

(実施体制:(株)日立製作所)

⑫総合調査研究

本プロジェクト領域での研究状況の進展の早さに鑑み、研究開発における方向付けの最適化と問題点の迅速な処置により研究を効率的に推進する必要がある。そのため、a. 研究開発推進のための会議(二社間アステラス⇄日立、アステラス⇄東海大学、グループ間JBiC⇄バイオ組合)の開催、b. 技術調査、情報収集の実施、c. 成果報告書の作成及び成果の外部発表を実施する。

(実施体制: バイオテクノロジー開発技術研究組合)

5.2 平成20年度事業規模

一般会計 1,828百万円 (継続・委託事業)

事業規模については、変動があり得る。

6. その他重要事項

(1) 評価

独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構(NEDO技術開発機構)は、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中間評価を平成20年7月に実施する。

(2) 運営・管理

①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)を厳守し研究開発を推進する。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。

②委託先において、プロジェクトリーダー、各研究開発項目に係わるチームリーダー、関連研究分野の有識者等を委員とした研究開発委員会を年2回以上開催する。

(3) 複数年度契約の実施

平成18～20年度の複数年度契約を行う。

(平成19年度に1年間の延長契約を行う。)

7. スケジュール

平成20年7月 中間評価

10月 第1回研究開発推進委員会

平成21年1月 第2回研究開発推進委員会

(別紙) 「化合物等を活用した生物システム制御基盤技術開発」プロジェクト実施体制図(変更後)

