

## 平成21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)

タンパク質相互作用を標的とする創薬に必要な要素技術について10個以上の相互作用情報を用いてスクリーニング等により検証し、製薬企業等で実践的に利用可能なレベルまでシステムを確立する。さらに3～4程度の創薬開発候補ターゲットに関して、臨床薬のリード化合物と成りうるタンパク質相互作用制御物質を創製する。

#### 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バイオメディシナル情報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20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

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った。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個以上取得した。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個以上同定した。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個以上取得した。

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た。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、平成20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った。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了した。

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った。本テーマは課題解決型企業連携により実施した。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い、中間評価までには、化合物35個以上のターゲットタンパク質情報を得た。

(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)、共同実施:(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った。また、既存のエンタ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った。

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、各チームに供給した。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った。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った。

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)行った。細胞局在を指標としたスクリーニングは、平成19年度

に幾つかの成果を上げているので、Gatewayエンタ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った。

また、本ヒト・エンタ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)、共同実施:(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

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った。平成19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平成20年度は、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実施した。平成20年度では、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*による高機能化を行い、中間評価では、各目標値の半数を達成した。今後は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課題となる。

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についても平成19年度に引き続き、構築と管理を継続した。これに加え、平成20年度は、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った。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」等を参考にした。

他チームとの連携では、平成19年度に引き続き、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の橋渡しの役割を行い、相互作用を制御する化合物を*in silico*スクリーニングにより予測した。特に平成19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んだ。大鵬薬品工業と実施している課題については、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した。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)、共同実施:(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

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、合計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ほぼ完了した。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

れた。なお、候補遺伝子25種のノックインマウスにおいて何らかの表現型が観察された。

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)については、平成19年度内に特許出願した2因子(#37、#74:抗腫瘍作用)のうち、特に#37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んだ。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。以上の取り組みの結果、抗腫瘍作用におけるVEGF阻害剤との併用効果について優先権出願に収載(平成20年12月)すると共に、#37の昇圧作用の発見、#37ELISA系の確立、#37が血中循環因子であることを証明などの成果を得た。

新規因子の二次評価については、同じファミリーに属する2種の可溶化受容体(#88、#103)のノックインマウスにおいて顕著な骨量増加が観察されたことから、新たに特許出願した(平成20年9月)。さらにこれら因子については骨疾患治療薬としての有用性評価のため、組換え体タンパク質の調製に着手した。

また、上記に加え共同実施先では、それぞれマウス血中タンパク質をLC/MS/MS分離・解析する技術を検討し、#21ノックインマウスについて造血系に着目した解析を実施し、本因子がリンパ球の初期発生を抑制していることを明らかにした。

(実施体制:協和発酵キリン(株)、共同実施: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、菌株の取得を継続して行った。また、海綿やホヤなどの海洋産物から新たな菌株分離法を開発し、放線菌を中心にカビ、バクテリアを含めた菌株の分離を進めた。

スクリーニングサンプルとしての、従来の放線菌、カビおよびバクテリアの培養抽出物は、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、タンパク質相互作用スクリーニングに適したスクリーニングサンプルを調製することを目的として進めた。具体的には、菌株培養抽出物を、HPLCを用いてグラジエント溶出により、10画分に分離したサンプルの調製を進めこれを継続することとした。これらの分画フラクションについては、紫外可視吸収スペクトルおよびマススペクトルの測定を行っており、ヒット後容易に活性物質の同定が行えるようにした。また、微生物の物質生産能を引き出すために、ストレス負荷を含めた様々な培養法の改良を行った。このうち、微生物の培養時に足場となるヘチマを入れ、半固形培養法は幾つかの菌株で生産性の差が観察されたため、通常のスクリーニングサンプル調製に加えた。スクリーニングサンプル調製に関しては、企業分譲サンプルが多くあるため、産総研では週に160サンプル、NITEに関しては週に200サンプルを最大数とし、特殊な培養法の検討を行った。また、生合成遺伝子解析を行い、既知の生合成遺伝子と相同性が低い生合成遺伝子を持った菌株を選抜し、新規物質の取得を試みた結果、数種の新規化合物を分離することに成功した。

スクリーニングに関して、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した。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した。「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したスクリーニング系を年に 2 個以上展開した。これに加えて、タンパク質相互作用から見出したターゲット以外についても積極的に展開した。

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った。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た。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、および選択的特殊組織癌などをターゲットにスクリーニングを行った。その他、抗菌抗カビ物質に関しては、微生物の物質生産能の指標の一つになることも目的として積極的にスクリーニングを行った。

但し、酵母スクリーニングに関しては、各企業由来のサンプルの有効利用も目的の一つとして、またさらなるハイスループット化を達成するため、産総研にて3種類のスクリーニングを実施した。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た。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した。

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しスクリーニングを実施した。

以上のプロジェクト推進により、約 22 万天然物ライブラリーを確立し、新規化合物 38 個を見出した（これらに加えて、構造未決定の新規化合物候補が 4 個単離済み）。また、生物活性的に興味ある 4 化合物に関しては、*in silico*スクリーニングを実施し、製薬系等企業が興味を持つような化合物を 2 個以上創生した。

(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)、協和発酵キリン(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)、共同実施：(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)

#### 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計り、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て、化合物ライブラリーを構築し活性評価を行った。また、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、評価を進めた。

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計り、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、評価を進めた。

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い、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を探索した。

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った。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った。

平成20年度は、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2つ見出した。

(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)、共同実施: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確立のため、ぶれ低減のために、マイクロステージと呼ぶ器具を考案し(特許出願中)、実際にこの器具と生体内蛍光顕微鏡 IV100 を使用して、肝臓、膵臓、腎臓等の内部臓器の高精細な画像の取得を行い、この画像を元にした3次元像の構築を行った。また、蛍光プローブ発現を非侵襲的に検出する蛍光分子トモグラフィー装置を用いて、関節炎のモデルを始めとした様々なモデルマウスを使用して、各種の病態評価系の確立を試みた。さらに、画像安定化の方法として、ひずみゲージを用いた接触型センサを生体臓器に接触させ、センサーに連動したアクチュエータにより生体の動きに応じてレンズを駆動させ、臓器の運動を追従し、画像を安定化させる装置の製作を行った。

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。そのため、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。

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の開発に向け、まずはヒトiPS細胞から心筋細胞への分化手法の開発を行い、また、心筋細胞ネットワークを用いた薬剤候補物質の毒性評価システムの手法を新たに考案し、この原理検討と、試作システムの構築に着手した。

(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、共同実施:(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、東京医科歯科大学)

#### 《バイオテクノロジー開発技術研究組合(バイオ組合)》

⑧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  $\epsilon$  の特異的阻害剤の開発を最重点とした。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した。

(実施体制:再委託:東海大学医学部猪子研究室)

⑨siRNA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

本研究開発は、以下の研究スキームにより遂行された。

創薬標的探索 (Screening):

1) siRNA ライブラリーからのアプローチ

本アプローチは、遺伝子ノックアウトにより直接創薬標的蛋白質を探索することを目指した。

- ・肝糖産生抑制を指標に、市販 siRNA ライブラリー5448 種類(1326 遺伝子× 4 種)を用いてスクリーニングを行なった。結果、5種類の遺伝子(Sbfl, Fbp1, Nf5e, Pak1, Prkaca)を糖産生制御因子の候補としてヒットさせた。
- ・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新規創薬標的遺伝子のスクリーニングを市販siRNAライブラリーを用いて実施した。
- ・JBiCとの連携として理化学研究所と市販 siRNA ライブラリー利用に関して共同研究を開始した。

2) 化合物ライブラリーからのアプローチ

本アプローチは、まず、抗糖尿病作用を有する化合物を探索し、それが指向する標的蛋白質を特定することにより新規創薬標的蛋白質を探索することを目指した。

- ・83 種類の市販化合物からなるライブラリーをスクリーニングし、acetoaminophen および mefenamic acid をヒットさせた。NSAIDs として知られているその他の市販の化合物について検討を行い 5 つの化合物をさらにヒットさせた。
- ・JBiCとの連携として産総研の天然物ライブラリーを対象とした上記糖産生抑制スクリーニングを行なった。産総研の微生物代謝産物サンプル約 27,500 サンプルのスクリーニングを行い、活性強度上位のサンプルについて、培養、精製を産総研で行い、有望な1化合物について構造の決定等の検討を行なった。
- ・糖尿病制御物質探索用として意図的に収集された天然資源(放線菌等の従属栄養微生物産物、藍藻等の独立栄養微生物産物、薬用情報植物産物)を中心とした小規模化合物ライブラリーの構築を開始した。

3) 病態モデル動物遺伝子発現解析からのアプローチ (時計遺伝子系)

本アプローチは、病態において発現が変動する遺伝子を解析することにより、新規創薬標的蛋白質候補を探索することを目指した。

- ・db/db マウスにおいて糖尿病が発症する、また、正常動物に高脂肪食を負荷することにより、特異的に脂肪組織において発現が異常に上昇する「遺伝子9」を発見した。

創薬標的検証 (Validation):

1) ゲノム手法を用いたアプローチ

本アプローチは、定法に基づいて validation を進めることを目指した。

- ・siRNA スクリーニングよりヒットした5種類の遺伝子(Sbfl, Fbp1, Nf5e, Pak1, Prkaca)の内、糖産生への関与が既知の Fbp1, Prkaca を除く、Sbfl, Nf5e, Pak1 の3遺伝子について異なる複数の siRNA を合成し厳格に再現性を確認した。
- ・3T3-L1 脂肪細胞において、「AGF ファミリー蛋白質 X」はインスリン作用の中心である Akt

の活性阻害因子 Trib3 の発現を抑制し、糖取り込みにおけるインスリン作用を増強することを明らかにした。

- ・「遺伝子9」は、心臓や脳において病態に関係なく発現しているが、糖尿病病態進行によって、それまで発現していなかった脂肪組織で発現が急上昇することが明らかとなり、内臓肥満と連関が示唆された。また、脂肪細胞において遺伝子9を過剰発現させると Glut4 遺伝子発現が抑制され、糖取り込みが抑制されることが明らかとなった。
- ・「遺伝子9」の糖尿病病態への関与を証明するために、トランスジェニックマウスの作製を完了した。

## 2)天然化合物を用いたアプローチ

本アプローチは、創薬標的蛋白質のシグナルネットワークが生物学的に低分子化合物による制御が可能であることを確認するために、同様な活性を有する天然物を用いて表現型の比較解析を行うことによって validation を進めることを目指した。

- ・天然物 FR137780 および天然物Aを用いて、「AGF ファミリー蛋白質 X」の validation(表現型比較)を行なった。

## 3)物理化学的手法(アフィニティー)を活用したアプローチ

本アプローチは、上記スクリーニングによって見出された、創薬標的を探索するための化合物あるいは蛋白質が作用する標的蛋白質を同定することによって新規創薬標的の validation を進めることを目指した。

- ・糖新生抑制NSAIDs 関連化合物が指向する標的蛋白質が、新規創薬標的となり得るのかを確定するために、アフィニティークロマトグラフィーの手法により標的蛋白質を同定した。
- ・抗糖尿病活性を有する4つの天然化合物の標的蛋白質を、アフィニティークロマトグラフィーの手法により同定した。
- ・JBiCとの連携として産総研のインタラクトーム解析により、「AGF ファミリー蛋白質 X」の受容体を同定した。

## 端緒化合物創出(Design) :

### 1)構造既知の創薬標的蛋白質を用いた端緒化合物のデザインと化合物合成のアプローチ

本事業において創出された新規糖尿病創薬標的蛋白質を用いた製薬企業における製品創出を加速するための端緒となる薬理活性化合物を提供するシステムの feasibility test を PPAR を題材として行った。

- ・標的分子の構造情報からのアプローチ(東海大学)

次の3項目について研究を遂行した。

#### (1)PPAR アゴニスト合成候補化合物の *in silico* 法による絞り込み

ドッキング・シミュレーションとファーマコフォア(pharmacophore)の二つの評価法により、デザインされた化合物群の序列化を行った。

#### (2) *in silico* 構造最適化

KA76 より結合親和性が有意に向上すると予測された2化合物を見出すことができた。

#### (3)induced fit を考慮したドッキング・シミュレーション法の開発

induced fit を考慮した計算プロトコルを開発に着手し、リガンドが結合したホロ蛋白質の構造を限定的ではあるが予測することに成功した。

- ・ドラッグデザインから端緒化合物の合成(北里大学)

KA53 を基に化合物の高質化を進め、KA53 と同等、またはそれ以上の活性を示す化合物を複数個取得した。

### 2)構造新規の創薬標的蛋白質を用いた端緒化合物のデザインと化合物合成のアプローチ

本事業において創出された構造新規糖尿病創薬標的蛋白質に結合し活性を確実に調節



する低分子端緒化合物をデザインし合成することを目指した。取り組み実績なし。  
 (実施体制:アステラス製薬(株)、共同実施: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

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、実用化に向け解析事例を蓄積し、さらに実際の化合物を用いた検証実験を行った。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し、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を中心に実施した。

(実施体制:(株)日立製作所)

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	*2,480	**2,277	2,141		
①一般勘定 (100万円)	140	127	128		
計	2,620	2,404	2,269		
特許出願件 数(件)	5	7	10		
	0	0	0		
計	5	7	10		
論文発表数 (報)	96	102	94		
	0	12	29		
計	96	114	123		
フォーラム 等(件)	122	122	96		
	1	2	1		
計	123	124	97		

\*: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21年度事業内容

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夏目徹チーム長をプロジェクトリーダーとするが、本PJの外部への紹介等渉外活動業務を中心に進め、以下の研究開発は各課題のチームリーダーである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主任研究員、五島直樹主任研究員、家村俊一郎主任研究員、産業技術総合研究所生命情報工学研究センター広川貴次チーム長、そして東北大学大学院薬学研究科土井隆行教授の5名による合議体制で実施する。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)》

### ①-1 タンパク質ネットワーク解析技術の開発

タンパク質ネットワーク解析技術の更なる高感度化を進めながら、疾患に関わるタンパク質相互作用解析を行うことにより、創薬ターゲット候補となる新規の重要なタンパク質情報を最終年度までに 500 個以上同定する。

また、化合物ターゲットタンパク質を高効率に同定する技術を活用し、ターゲットタンパク質の相互作用情報を課題解決型連携企業に提供する。

#### a) 疾患関連タンパク質ネットワーク解析の高度化

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ネットワーク解析技術の最適化を行う。これにより、5個の新規スクリーニング系構築に貢献する相互作用情報を提供する。また、課題解決型企業連携により共同研究を進め、1～2個のスクリーニング系構築のための相互作用情報を得る。

臨床医学総合研究所とは、抗癌剤開発のためプロテアソーム及びそのアッセンブリー因子をターゲットとした新規なスクリーニング系の構築に関する共同研究を実施する。21 年度は、スクリーニングを継続すると共に、得られたヒット化合物の生物学的な評価を行う。

東京大学大学院薬学系とは、癌・炎症・神経変性疾患を抑制する化合物を得るためのスクリーニング系の構築に関する共同研究を実施する。平成 21 年度は、アポトーシスなどのストレス応答を誘導する Apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1)をターゲットとした創薬スクリーニング系の最適化を継続し、スクリーニングを展開する。

東京工業大学とは、超高速並列計算機によるデータベース検索システムの構築に関する共同研究を実施する。平成 21 年度はシステムを運用しつつ、システムプログラムのバグの発見や修正などを含むメンテナンスおよびバージョンアップを行う。

岐阜大学、首都大学東京、理化学研究所・筑波、国立長寿医療センター研究所とは、タンパク質相互作用情報の検証と評価を行う。旭化成ファーマは理化学研究所・筑波と共同で蛍光分子トモグラフィー装置による病態評価系の構築を行う。

(JBIC 分室1(JBIC、旭化成ファーマ)、共同研究:産業技術総合研究所、臨床医学総合研究所、東京医科歯科大学大学院歯学総合研究科、東京大学大学院薬学系、東京工業大学大学院情報理工学研究科、岐阜大学、首都大学東京、理化学研究所・筑波、国立長寿医療センター研究所 )

#### b) 質量分析前処理の高精度・自動化

我が国が誇る世界最高水準の産業用ロボット技術を応用し開発した全自動質量分析用サンプル調製システムを、多種類の細胞に適用するために調製条件の最適化を行い、実戦投入する。また、本開発技術の実証研究として、パーキンソン病および小胞体レドックスネットワークという2つの疾患に関連するネットワーク解析を進め、疾患発症メカニズム解明のための相互作用情報を得る。

東京工業大学とは、非特異的タンパク質吸着を最小限に抑えた精密微粒子創製技術によるプルダウン用磁性ビーズの開発に関する共同研究を行う。臨床医学総合研究所・京都大学再生医科学研究所とは、タンパク質ネットワーク解析技術高度化の実証研究に関する共同研究を行う。

(JBIC 分室1(JBIC)、共同研究:産業技術総合研究所、理化学研究所・和光、東京工業大学大学院総合理工学研究科、臨床医学総合研究所、京都大学再生医科学研究所)

#### c) 低分子化合物ターゲットタンパクの解析技術の開発

課題解決型企業連携により開発薬・上市薬である低分子化合物ターゲットタンパク質同定を進めるとともに、自動サンプル調製システムのために調製条件を最適化する。

(JBIC 分室1(JBIC)、共同研究:産業技術総合研究所)

d)課題解決型連携

(i)味の素

分岐鎖アミノ酸の機能メカニズム解析による創薬ターゲット探索を目的とする。タンパク質ネットワーク解析システムを用いてアミノ酸の持つ多くの機能のメカニズムを明らかにすることにより、新たな創薬ターゲットを見出し、ターゲットの相互作用をベースとした創薬スクリーニングを実施する。

(ii)アステラス

タンパク質ネットワーク解析システムを用いて糖尿病関連のタンパク質を解析し、相互作用情報を得る。得られた情報をもとに、創薬ターゲットを同定する。

(iii)協和発酵キリン

タンパク質ネットワーク解析システムを用いて、抗癌剤開発薬5種類のターゲットタンパク質情報を取得し、それぞれの作用メカニズムを解明する。また、相互作用解析で得られた情報をもとに、同定されたタンパク質の機能解析や相互作用の検証等を行う。

(iv)第一三共(株)

タンパク質ネットワーク解析システムにより、免疫・アレルギー性疾患などに関わる化合物や蛋白質と相互作用するタンパク質を同定し、分子レベルにおける作用機構を推定する。

(v)大鵬薬品

疾患との関連が示唆されるタンパク質に関し、解析相互作用予測チームの相互作用機構解析技術を応用して見出された医薬品の標的となりうるタンパク質相互作用に対し、スクリーニング系を構築しその検証を行う。

(vi)田辺三菱製薬(株)

2型糖尿病原因遺伝子リウマチ等の自己免疫疾患などに関連するタンパク質や開発薬の分子レベルでの作用機構の解明を目的とする。タンパク質ネットワーク解析システムを用いて、疾患関連タンパク質の機能解明を目指す。また、開発薬の相互作用解析を行い、分子レベルの作用機構を解明する。

(vii)東レ

臨床もしくは病態モデル動物で薬効は認められるものの薬効発現メカニズムが不明な化合物、副作用・毒性面に問題のある化合物のネットワーク解析を行い、タンパク質ネットワーク情報から化合物の作用メカニズムを解明を目指す。

(viii)日本化薬株式会社

タンパク質ネットワーク解析技術を用いて、薬理活性を有する化合物と相互作用するタンパク質を同定することにより、化合物の作用機序を解明する。さらに、同定されたタンパク質およびそのタンパク質と相互作用するタンパク質群に関する情報をもとに、創薬ターゲットを探索する。

(ix)武田薬品工業株式会社

タンパク質ネットワーク解析技術を用いて、薬理活性を有する化合物と相互作用するタンパク質を同定することにより、化合物の作用機序を解明する。さらに、同定されたタンパク質およびそのタンパク質と相互作用するタンパク質群に関する情報をもとに、創薬ターゲットを探索する。

①-2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、EXPOC(Express proof of concept)システム(マウス個体をアッセイ系とする独自の高効率機能解析システム)による遺伝子機能解析を実施する。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する。平成 21 年度末までに計 180 種(平成 18～平成 20 実績⇒計 120 種)の遺伝子についてノックインマウスの表現型解析を完了する。

a) 候補遺伝子選抜／分泌チェック／ベクター構築

シグナル配列検索プログラムにより選抜された分泌蛋白質をコードする遺伝子について、構造モチーフ、発現頻度／部位(特に血液／免疫、腎／ミネラル代謝領域疾患との関連性や、胚発生期での発現に着目)等の情報にもとづいて絞り込みを行う。当初目標の計 325 種の候補遺伝子選定については平成 20 年度末までに完了済み。また候補遺伝子のマウス B 細胞からの分泌能については B リンパ腫細胞株を用いた簡易スクリーニングによるチェックを行う。平成 21 年度末までに 250 種(平成 18～平成 20 実績⇒227 種)の分泌チェックと ES 細胞遺伝子改変用ベクター構築を完了する。

(JBIC 分室 9(協和発酵キリン))

b) 遺伝子改変 ES 細胞クローン取得／キメラマウス作製

a) で作製したノックインベクターを用いて、計 225 種の候補遺伝子についてジーンターゲットングによるノックイン ES クローンを取得する(平成 18～平成 20 実績⇒計 175 種)。さらに、得られた遺伝子改変 ES クローンをを用いてキメラマウス作製を実施する(計 215 種、平成 18～平成 20 実績⇒160 種)。

(JBIC 分室 9(協和発酵キリン))

c) キメラマウス表現型解析／生理活性因子の二次評価

EXPOC システムによる一次評価:平成 21 年度末までに 180 種(平成 18～平成 20 実績⇒120 種)の候補遺伝子についてキメラマウスの表現型解析(16 週齢)を完了する。主な一次評価項目は以下の通り。(一般状態、体重、血清生化学分析、血球分析、FACS によるリンパ球サブセット解析、組織病理解析)。

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): #37 については本年度は、血中濃度測定(ELISA)によるターゲット疾患の絞込みと、KO マウスを用いた生理的機能の解明に重点的に取り組む。また新規メカニズムにもとづく骨量増加作用を有する因子として期待される #88、#103 については、組換え体による再現性確認／骨粗しょう症モデル動物を用いた薬効データ取得／優先権出願への収載を本年度の最重要課題として取り組む。さらに上記因子以外についてもキメラ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。

協和発酵キリン社においては統合のメリットを活かし、EXPOC システムで絞り込まれたターゲットについて、組換え体・抗体のみならずシグナル制御低分子化合物のスクリーニングも含め実際の創薬に繋げる研究の加速をはかる。また早稲田大は、キメラマウス血清プロテオーム解析技術を確立するのみならず、阪大とともに、表現型が検出された遺伝子の二次評価研究にも積極的に関わりその加速に貢献する。#37 シグナル制御化合物に関する産総研との共同研究は平成 20 年度内に得られた結果により以後の方針を決定するが、他の有用ターゲットに関しても引き続き共同研究の機会を探っていく。

(JBIC 分室 9(協和発酵キリン))

d) 血中液性因子変動モニタリング法の開発／生理活性因子の二次評価

平成 20 年度の成果を基盤にマウス血液タンパク質試料解析の最適化とデータ蓄積を進める。加えて今年度より標的分子の二次評価への参画を強化し、医薬品候補分子見極めの加速に強力に貢献する。具体的には興味深い表現型を示す候補遺伝子 1 種以上についてキメラマウスの詳細解析、インビトロ系を用いた解析によるターゲット組織同定等を実施する。

(JBIC 分室 9(協和発酵キリン)、共同研究:早稲田大学)

#### e) 免疫／血液系因子の二次評価

平成 20 年度に引き続き、造血系に注目したキメラマウスの詳細解析を実施し、一次評価で実施している一般的な表現型解析では検出困難な変化の特定につなげる。具体的には、①既に純系化が進みつつある #21-、及び #22-EXPOC マウスの解析を継続し、これら因子の造血系発生における役割を明らかにすると共に、②新たに #32-、#53-EXPOC マウスの解析、及び純系化を実施する。③提案した候補遺伝子のうち、3 種以上について協和発酵キリンにてキメラマウス作製に着手し一次評価に進める。

(JBIC 分室 9(協和発酵キリン)、共同研究:大阪大学大学院医学系)

#### ②タンパク質相互作用情報の検証技術の開発

①で発見されたタンパク質相互作用をインビトロ系およびインビボ系において可視化することによって検証する。これに必要な発現クローン、変異体クローン、タンパク質を供給し、相互作用検証に利用するだけでなく、スクリーニング系構築にも活用する。また、インビボ系で相互作用を検証するため、相互作用するタンパク質複合体に特異的に結合する分子プローブ等を高速に作製する技術を開発する。また、本技術を用いて、得られた相互作用タンパク質が創薬ターゲット候補として有効であるか等の検証も合わせて行う。

また、インビボ系での検証が困難な場合には、遺伝子改変酵母やショウジョウバエ突然変異体等を開発し、表現型を指標としてタンパク質相互作用情報の検証を行う。

#### a) Gateway 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と各チームへの供給、タンパク質相互作用の探索および検証

タンパク質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Gateway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行い(300クローン以上)、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、相互作用探索チーム、スクリーニングチームにクローン情報を供給する。

新たなタンパク質フラグメント補完法を用いたインビトロアッセイ系の確立とインビトロメモリーダイ法を改良し、相互作用の検証およびスクリーニング系の構築を10セット以上行う。また、この10セットのスクリーニング系において各25万サンプルに対する相互作用阻害物質の探索を実施するうえで必要となるアッセイ用タンパク質の供給を行う。また、SPR装置および蛍光イメージングなどを利用したスクリーニング系についても実施を行い、相互作用阻害物質の2次評価系の構築も行う。平成21年度より、国立がんセンターにおいては相互作用阻害物質の2次評価を行う。

(JBIC 分室 4(JBIC)、共同研究:産業技術総合研究所、国立がんセンター)

#### b) マルチ cDNA 発現クローンの作製及びスクリーニング系の構築

「化合物の検証・スクリーニング系の構築」は、得られたリード化合物等の検証に必要なターゲットタンパク質を産生するマルチ遺伝子発現クローンの構築と、これを染色体上へ部位特異的に導入した安定発現細胞株を作製して、検証実施グループへ供給する。また、引き続き化合物探索を行うグループからの依頼に応じたスクリーニング用遺伝子の発現クローンとこれを安定に保持して発現する細胞株の作製を行い、実施グループへ供給する。

また、タンパク質フラグメント補完法を用いたインビボ系の相互作用検証方法を開発し、アッセイ系の確立を行う。具体的には、インビボ系でのスプリットルシフェラーゼ系等を用いたマルチ遺伝子発現クローンによるタンパク質相互作用アッセイ系を確立し、企業等で実用可能なレベルの技術を開発する。

「染色体上の複数種遺伝子の条件誘導発現系の開発」は、先ず生細胞の染色体特定部へ・C31 法で One-step テトラサイクリン条件誘導型の複数種遺伝子カセットを安定に導入し、

この保持細胞(安定形質転換細胞)を株化して保存する。これらの遺伝子を条件誘導で発現させ、化合物活性の検証に活用する。

(JBIC 分室 13(JBIC)、共同研究:大阪大学微生物病研究所)

### ③タンパク質相互作用予測技術の開発

標的タンパク質の立体構造予測からタンパク質-タンパク質相互作用様式の予測、相互作用を制御する化合物の *in silico* スクリーニングを実現するシステムの開発と先行的な解析を実施する。平成 21 年度は引き続き、重点課題に対して「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」を集中的に実施する。また、相互作用ネットワーク解析チーム、天然化合物チーム、ライブラリー合成チームとのチーム間連携を強化するための橋渡しとなる *in silico* 解析に重点的に取り組む。具体的には、ヒット天然化合物と標的タンパク質との結合予測と作用機序のモデル化、作用機序モデルに基づくライブラリー合成展開の指針の提案、構造活性相関解析、提案化合物の結合可能性の *in silico* 評価などが中心となる。

#### a) 標的タンパク質の立体構造構築システムの開発と解析

標的タンパク質の立体構造が未知、もしくは、部分的に構造欠失が存在する場合を想定した、アミノ酸配列からの立体構造を予測するシステムの開発と先行的な解析を実施する。本システムの評価をテーマ①-1「タンパク質ネットワーク解析」で得られたターゲットタンパク質を用いて行う。

平成 21 年度は分子動力学計算技術および相互作用エネルギー計算指標の多角的な評価系を導入し、さらなる高精度化を目指していく。

(JBIC 分室 8(JBIC)、共同研究:産業技術総合研究所)

#### b) タンパク質-タンパク質ドッキング計算システムの開発と解析

標的タンパク質間の相互作用モデルを予測するためのドッキング計算システムの開発とテーマ①-1 のタンパク質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への先行的な解析を実施する。解析結果の評価は、テーマ②「タンパク質相互作用情報の検証技術」と連携し変異体実験等で検討する。

平成 21 年度は、平成 20 年度にタンパク質-タンパク質相互作用阻害を目的としたリガンドの *in silico* スクリーニングにおいてヒット率の向上に効果的であった、相互作用エネルギー計算指標の多角的な評価を継続する。

(JBIC 分室 8(JBIC)、共同研究:産業技術総合研究所)

#### c) 化合物 *in silico* スクリーニングのためインフラストラクチャ構築

化合物 *in silico* スクリーニングを合理的に実施するための化合物データベース構築と管理・検索のためのインフラストラクチャ環境を構築する。平成 21 年度は、*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、これまでの年度と同様に継続的に行うと同時に、目的に応じた化合物のライブラリー化を目指す。

(JBIC 分室 8(JBIC)、共同研究:産業技術総合研究所)

#### d) 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

テーマ①「タンパク質ネットワーク解析」において予測された標的タンパク質間の相互作用モデル情報に基づき、テーマ⑤-3「スクリーニング技術開発(天然化合物)」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。予測結果の評価は、他チームと連携し適切なアッセイ系を用いて検討する。また、これらの結果をテーマ⑥「化合物等の高機能化」に提供し、化合物の高活性化を図る。

平成21年度は平成20年度に引き続き、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。特に平成20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21年度は約4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複製(増殖)に中心的な役割を担っている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。

(JBIC分室8(JBIC)、共同研究:産業技術総合研究所、筑波大学、臨床医学総合研究所)

e) 特定標的疾患解析の実施

上記により見出された、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。平成20年度は特に、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行った。平成21年度は、平成20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(大鵬薬品工業)。

計算化学を利用して医薬品開発標的となるタンパク質とリガンドの相互作用機序を解析し、その結果を該当タンパク質の機能を抑制あるいは亢進する低分子化合物の探索に活用する(興和)。

平成21年度は引き続き、*in silico*解析結果で選別された阻害候補化合物の*in vitro*評価系での生物活性評価や細胞毒性、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課題に取り組む。

(JBIC分室8(大鵬薬品工業、興和)、共同研究:産業技術総合研究所)

f) 立体構造ペプチド・ファージライブラリーの設計と構築

*in silico*解析を基盤技術に立体構造ペプチド・ファージライブラリーの設計と構築を支援する。実施課題としては、立体構造ペプチドによる相互作用情報とバーチャルスクリーニング技術より新規な分子骨格の分子設計を行い、この設計に基づき有機合成を行い、結合活性を評価する。立体構造ペプチドを高活性化して相互作用情報を最適化し、この情報をもとに精密な分子設計を行う。また、立体構造ペプチドおよび新骨格低分子化合物を蛍光ラベル化して細胞膜透過性や生理活性を検討し、この分子設計法の有効性を検証する。

(JBIC分室8(JBIC)、共同研究:大阪府立大学)

④-1スクリーニング技術開発(蛍光イメージング)

蛍光タンパク質あるいはタンパク質フラグメント補完法を用いて、疾患関連相互作用を指標に化合物ライブラリーをスクリーニングする技術を確立する。また、テーマ④-3「スクリーニング技術開発(天然化合物)との連携により、タンパク質相互作用制御物質のスクリーニング、および二次スクリーニング評価を行う。さらに、テーマ②「タンパク質相互作用情報の検証技術の開発」との

連携により、より高度なタンパク質相互作用検出システムの確立を進める。

a) 相互作用解析プローブの作製(メモリーダイ、FCCS)

化合物ライブラリーからのリード化合物探索のための実用的アッセイ系を作製する。平成 21 年度は、10 個以上の *in vitro* メモリーダイアッセイ系を、分室4(五島チーム) と連携し構築し、分室 15 との連携によりハイスループットスクリーニングを実施する。重要項目として選抜した、プロテアソーム経路のタンパク質相互作用阻害物質の一次ドラッグスクリーニングでヒットしたサンプルについて、主にプロテアソームセンサー細胞を用いて、2 次評価を実施する。本 2 次評価系は、分室8 (広川チーム) および分室 16 (土井チーム) により合成展開された化合物にも適用し、高機能な化合物の創製を進める。

また、メモリーダイを補う手法として、ルシフェラーゼ等による新規タンパク質フラグメント補完法の開発を行い、高度かつ細胞系でのタンパク質相互作用検出系の確立を進める。

(JBIC 分室 10(JBIC)、共同研究:理化学研究所・和光、産業技術総合研究所、北海道大学)

b) FCCS 基盤技術の開発

北海道大学において、FCCS 法の基盤的な技術開発を行い、この成果を BIRC でのスクリーニング系構築に応用することを目指す。平成 21 年度は、細胞ライセートを用いてタンパク質相互作用検出システムを確立する

東レリサーチセンターは、北海道大学と共同し、細胞レベルにおける FCS, FCCS やイメージング技術から、疾患とかかわりに深いターゲット蛋白質(相互作用)を選択し、医薬品候補化合物の評価系としての有用性の検証を行う。

(JBIC 分室 10(JBIC、東レリサーチセンター)、共同研究:北海道大学、理化学研究所・和光)

④-2 スクリーニング技術開発(天然化合物)

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、タンパク質相互作用を制御する化合物を見出すことを主要な目的とする。また、これまでの個別スクリーニングで得られた活性物質について、より高機能な化合物を調製し実用化に向けた化合物の開発を進める。その他、タンパク質相互作用が関与しないような、重要な生命現象を制御する化合物を同時に得るために表現系スクリーニング系も実施し、様々な化合物を得ることを目的とする。各製薬企業より供給されるスクリーニングサンプルを適用し、国内随一のスクリーニングを展開する。これらのスクリーニングを行い、年に 5 個以上のタンパク質相互作用制御物質を見出すことを目標とする。

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。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、エピジェネティクス制御などに関しても積極的にスクリーニングを行う。これらのスクリーニングを通じて、高活性の化合物からなる天然化合物ライブラリーの拡充を進める。

a) 微生物二次代謝産物を主とした微生物収集、およびスクリーニングサンプルの調製

国内各地から土壌を採集し、様々な放線菌、バクテリアおよび糸状菌を分離する。分離した菌株について、様々な条件下で培養し、有用物質スクリーニング用のサンプルを調製する。菌株分離に関しては、平成21年度はNITEにてこれまでと同手法によるサンプル調製を、1500菌株について2種類以上の培地を用いて培養し3000サンプル以上のスクリーニングサンプルを調製する。産総研では主に、海洋生物からの菌株分離を積極的に行い、500菌株を目安に放線



菌を主体とした海洋菌株の取得を行う。これらの菌株に関して、16SrDNAや生合成遺伝子の解析を指標に、新種、新属あるいは新科に分類される新規菌株の取得を進めると共に、冗長性を排除した菌株ライブラリーの拡充を行う。

以上の菌株の培養二次代謝産物について、逆相ODSを用いたグラジエントHPLCにより10分画に分離したフラクションサンプルを調製する。またユニークな菌株については、随時大量培養を行い、網羅的に化合物の単離を進める。

以上に加え、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。

(JBIC分室15 (JBIC、メルシャン)、共同研究:製品評価技術基盤機構、産業技術総合研究所)

#### b) タンパク質相互作用を指標としたスクリーニングの展開

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の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。これまでに開発した、*in vitro* mKG法を用いて、年に10個程度のタンパク質相互作用制御物質のスクリーニングを行う。

また、2つあるいは3つのタンパク質相互作用ターゲットに関しては、メモリーダイ法以外のアッセイ系も駆使しながら、活性化化合物を見出し、インシリコ、合成チームとの連携により、より臨床応用を目指した化合物の創製を展開する。東京農工大学とは、ヒット化合物の誘導体合成の展開と低分子化合物同定法に用いる新たな低分子化合物性タグの合成に関する共同研究を実施する。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複製(増殖)に中心的な役割を担っているRNAポリメラーゼ複合体の構成蛋白であるPAとPB1をはじめとして、インフルエンザタンパク質間相互作用、およびインフルエンザ-ヒトタンパク質間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。また、スクリーニングでヒットしたサンプルについて、東京大学大学院農学生命科学研究科にて高次の生物活性評価を行う。

(JBIC分室15 (JBIC)、共同研究:産業技術総合研究所、東京農工大学、筑波大学、臨床医学総合研究所、東京大学大学院農学生命科学研究科)

#### c) タンパク質相互作用以外のスクリーニング技術開発と薬剤ターゲット同定技術の開発

化合物の生体内での作用を細胞の機能や形態の変化としてとらえることは、新しい化合物の探索技術として、あるいは作用標的分子の同定技術として重要である。特に近年の蛍光タンパク質技術の進歩や顕微鏡観察の自動化によって、細胞レベルでの生命機能解析は、高感度、ハイスループットで行うことが可能になってきた。また、siRNAなど遺伝子ノックダウン技術の適用により、細胞レベルでの表現型変化と個々の遺伝子機能を対応づけることも可能である。そこで、細胞を用いた高感度、ハイスループットな化合物の活性検出技術を確立する。具体的には、さまざまな疾患に関わるとともに、細胞の分化や多能性幹細胞の作製、制御にも応用可能と考えられるエピジェネティクス調節因子阻害剤の探索技術開発を目指し、ヘテロクロマチン形成やヒストン修飾やDNAメチル化を細胞レベルで検出・評価する系を3種類以上確立する。さらに、本年度も引き続き、上記エピジェネティクス調節因子以外にも、DNAに作用する化合物のスクリーニング系として、スプライシングや遺伝子修復などを制御する物質のアッセイ系を開発し、スクリーニングを実施することにより、分化・脱分化の制御、あるいは制癌剤の開発を進める。遺伝子あるいは遺伝子修飾タンパク質に作用する化合物については、最適化を検証しながら誘導体展開を進める。スクリーニングヒットサンプル、あるいは誘導体について、癌研究会癌化学療法センターにて高次の生物活性評価を行う。これらのスクリーニングにより、活性を指標にした天然化合物ライブラリーの拡充を図る。

また、細胞内の各種オルガネラを多重蛍光染色し、動態を解析する系を確立し、化合物投与や遺伝子ノックダウンにおける変化を明らかにし、化合物の作用評価系を確立する。この評

価系については、作用が明かになっている既知の薬剤数個と、新規化合物を織り交ぜて解析し、製薬企業等で応用可能な技術の開発を進める。さらにこれまで化合物標的の組織的解明のために検討を行ってきた酵母の破壊株、過剰発現株ライブラリーを用いたケミカルゲノミクス手法については、これを標準技術として確立するためにデータベースの整備と最適化を行う。

(JBIC分室15 (JBIC)、JBIC分室14 (JBIC)、共同研究:産業技術総合研究所、東京農工大学、理化学研究所・和光、長浜バイオ大学、東京大学新領域、癌研究会癌化学療法センター)

d) 活性物質の単離および構造同定

以上のスクリーニングを通じて得られた生理活性物質を含む試料より、各種クロマトグラフィー等を行い分画し単離精製を行う。得られた活性物質は、核磁気共鳴装置 (NMR) やマスマスペクトロメトリーを用いて構造決定を行う。平成 21 年度は、グループとしてのアクティビティを再評価し、年間 500 個以上の単離化合物を調製する。これらの結果はテーマ⑥「化合物等の高機能化」に提供し、高活性化を図る。平成 21 年度も引き続き、天然単離化合物セットの充実化を促進する。

(JBIC 分室 15 (JBIC)、共同研究:産業技術総合研究所)

e) これまでのスクリーニングで得られた化合物の高機能化

平成 20 年度までに得られた活性物質について、分室 16 および農工大との連携により、合成化合物の生物活性評価を行い、活性情報をフィードバックし合い、化合物の高機能化を進める。

(JBIC 分室 15 (JBIC)、共同研究:産業技術総合研究所、東京農工大学)

f) 課題解決型企業連携による疾患を制御する新規化合物の探索

各企業が所有している微生物等の天然物ライブラリー、或いは創薬を目的としたフォーカスド合成ライブラリーを本プロジェクトに提供し、本プロジェクトでは、これ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、或いはモデル生物を用いた表現系スクリーニングにより、生理活性物質の探索を行い、ヒット化合物の単離・同定を行う。この結果、新規天然化合物が見つかった場合は、そのライブラリーを提供した企業において新薬開発のための技術的検討を行う。

(JBIC分室15、旭化成ファーマ、味の素、アステラス製薬、協和発酵キリン、合同酒精、興和、第一三共、三和化学研究所、塩野義製薬、大正製薬、武田薬品工業、田辺三菱製薬、微生物化学研究会、明治製菓、共同研究:産業技術総合研究所)

⑤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について、化合物の誘導体化技術開発や新規骨格化合物の創製技術開発等を行うことにより生理活性等を高める高機能化技術を開発する。また、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および高機能化された化合物が真に生体制御に利用できるか、あるいは創薬開発に結びつくかを、疾患モデル動物や遺伝子改変動物等の個体レベルで、評価・検証する。

a) 天然物母骨格を有する化合物ライブラリーの合成

テーマ④-3「化合物等の探索技術の開発」(天然化合物グループ)にて得られた化合物情報とテーマ③「タンパク質相互作用予測技術の開発」(インシリコグループ)で得られた三次元的空間的予測情報を活用して、化合物の誘導体化技術開発や新規骨格化合物の創製技術開発等を行うことにより、生理活性等を高める高機能化技術を開発する。さらに、目標とする創薬開発候補ターゲットに関してタンパク質相互作用を制御する化合物合成を行う。平成 21 年度は、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、天然物の母骨格を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四種類作製する。そのうち一つは創薬開発候補ターゲットに関して、臨床薬のリード化合物となりうるタンパク質相

相互作用制御物質について行う。

(JBIC 分室 16(JBIC)、共同研究:東京工業大学、東北大学)

b) RAPIDS (RANdom Peptide Integrated Discovery System)を駆使した薬剤探索

改変遺伝暗号翻訳ペプチド合成システム(RAPIDS)を駆使して、高多様性非天然型ペプチドライブラリーを構築できる平行もしくはワンポット合成基盤技術を開発する。続いて、構築した化合物ライブラリーを薬剤標的にあて、薬剤リードの網羅探索を行う。平成 21 年度は、平成 20 年度に開始した薬剤標的に対してセレクションを完了し同定した環状特殊ペプチドの生理活性評価を終える。また、新たに標的として定め、発現を進行している蛋白質に対する環状特殊ペプチドのセレクションも開始し、高親和性薬剤候補を同定する。また、N メチル主鎖を含む環状特殊ペプチドのライブラリー構築とそのディスプレイ技術の確立を平成 21 年度内に目指す。また、最終年度までには、同定された全ての環状特殊ペプチドの評価を終え、動物実験等に進展できる薬剤候補を決定する。

(JBIC 分室 16(JBIC)、共同研究:東京大学先端科学技術研究センター)

⑥ 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。(JBIC分室21(JBIC))

《バイオテクノロジー開発技術研究組合(バイオ組合)》

⑦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

PKC  $\epsilon$  を標的とした糖尿病治療薬開発に向けて、*in silico* で設計し、培養細胞系でその効果を確認した化合物について、動物モデルや無細胞抽出系等を用いた効果の検証、化合物の最適化を進める。また、独自に改良を加えた酵母 Two Hybrid 法については、実際例への適用による有効性の実証的検証を進めるとともに、ライブラリー作成等、より広範な利用に向けたシステムの拡充を行う。

(実施体制:再委託:東海大学医学部猪子研究室)

⑧siRNA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

中間評価結果を受け、製薬企業が興味を持つレベルの「新規糖尿病創薬標的創出」をスクリーニング等の投機的な方法ではなく、企業にはないユニークで確実な基盤に基づいて今年度は「いい化合物ライブラリー」と「独自の validation 法」の基盤構築に重点をおき以下の研究スキームにより実施する。

創薬標的探索(Screening):

1) siRNA ライブラリーからのアプローチ

本アプローチは、siRNA ライブラリーを独自の方法で活かし、新規創薬標的蛋白質を選択する基盤を造ることを目指す。

・JBIC 理化学研究所と共同し、市販マウス siRNA ライブラリーの個々の遺伝子とその糖尿病モデル細胞の phenotype の連関がデータベースとして整備されている。

2) 化合物ライブラリーからのアプローチ

本アプローチは、まず、抗糖尿病作用を有する化合物を探索し、それが指向する標的蛋白質を特定することにより新規創薬標的蛋白質を探索することを目指す。

- ・天然物ライブラリー:糖尿病制御物質探索用として意図的に収集された放線菌由来の新規単離化合物を300個以上取得している。藍藻等の独立栄養微生物産物の二次代謝産物を100個以上取得している。薬用情報植物産物から抗糖尿病活性を有する新規化合物を5個以上取得している。
- ・薬理活性低分子化合物ライブラリー:アザトリキナン骨格をスペーサーに持つトリプレット薬の一般的合成法を確立し、それを用いて複数個のトリプレット薬誘導体を複数合成する。(北里大学)
- ・統合データベース:本事業において取得される天然化合物および低分子化合物の種々の情報(構造情報、生産菌情報、生産法情報、生合成遺伝子情報、標的蛋白質情報、生物活性情報、薬理指標情報等)を統合したデータベースが構築されている。

### 3) 病態モデル動物遺伝子発現解析からのアプローチ(時計遺伝子系)

本アプローチは、病態において発現が変動する遺伝子を解析することにより、新規創薬標的蛋白質候補を探索することを目指す。

- ・遺伝的糖尿病病態モデルマウス db/db と高脂肪食負荷モデルマウスから、iPS(induced pluripotent stem cell)細胞を作製し、糖尿病病態進行における各種 phenotype の変化と疾患関連臓器(肝臓、脂肪)における経時的・包括的な遺伝子発現変化とエピジェネティクスの変化の連関が解析できている。これにより、エピジェネティクスの変化誘導に関わる糖尿病新規標的蛋白質が少なくとも1つ同定できている。

### 創薬標的検証(Validation):

#### 1) ゲノム手法を用いたアプローチ

本アプローチは、定法に基づいて validation を進めることを目指す。

- ・JBIC産総研のインタラクトーム解析により同定された「AGF ファミリー蛋白質 X」の受容体の機能解析、下流のシグナルネットワーク解析およびファミリー受容体取得が行われている。これにより、関連する新規の糖尿病創薬標的候補が複数取得できている。
- ・「遺伝子9」のトランスジェニックマウスを用いて、「遺伝子9」が糖尿病の創薬標的であることが証明されている。

#### 2) 天然化合物を用いたアプローチ

本アプローチは、創薬標的蛋白質のシグナルネットワークが生物学的に低分子化合物による制御が可能であることを確認するために、同様な活性を有する天然物を用いて表現型の比較解析を行うことによって validation を進めることを目指す。

- ・新たに本事業で取得した天然化合物や低分子化合物が「遺伝子9」やその他新規創薬標的の validation に活用されている。

#### 3) 物理化学的手法(アフィニティー)を活用したアプローチ

本アプローチは、本事業において製造された或いは見出された創薬標的を探索するための化合物あるいは蛋白質が作用する標的蛋白質を同定することによって新規創薬標的の validation を進めることを目指す。

- ・本事業で構築する化合物ライブラリーの天然化合物および低分子化合物の標的蛋白質がすべて同定され、化合物ライブラリーの情報として付加されている。このなかから、少なくとも1つ糖尿病の創薬標的が見出されている。(兵庫医療大学)
- ・JBIC産総研のインタラクトーム解析により、「遺伝子9」およびその他の新規創薬標的のネットワーク解析が行われ、創薬標的の拡大がもたらされている。

### 端緒化合物創出(Design):

#### 1) 構造新規の創薬標的蛋白質を用いた端緒化合物のデザインと化合物合成のアプローチ

本事業において創出された構造新規糖尿病創薬標的蛋白質に結合し活性を確実に

調節する低分子端緒化合物をデザインし合成することを目指す。

- ・「AGFファミリー蛋白質X」受容体、「遺伝子9」およびその他の新規創薬標的蛋白質の立体構造をホモロジー・モデリング法によりバーチャル・スクリーニングを行なっている。

- ・本事業で取得される天然物の固有の立体構造をX線結晶解析で決定する。これらの構造はバーチャル・スクリーニングで活用している。

- ・創薬標的分子が明らかにできない場合、また相同性の低さによりホモロジー・モデリングが困難な場合は、本事業で取得された天然物を化学的に代替えし、かつ活性で上回る化合物の取得を目指してバーチャル・スクリーニングを行なっている。その際、上述した化合物ライブラリーに含まれる化合物からの情報が十分活用できている。(東海大学)

- ・複数のバーチャル分子について合成を試み、天然物を凌駕する活性を有し、よりドラッグ・ライクな化学構造を具えた低分子端緒化合物を少なくとも1個取得できている。(北里大学)

(実施体制:アステラス製薬(株)、共同実施:東海大学医学部平山研究室、北里大学薬学部長瀬研究室、兵庫医療大学薬学部田中研究室)

#### ⑨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

薬剤排出のトランスポーターである MDR1 に着目し、平成20年度に構築した卵母細胞発現系を利用して、既知化合物の細胞内からの排出過程の解析を質量分析計で行う。また、複数薬剤を同時に細胞内に注入し、同時分析も試みる。さらに、培養細胞発現系と卵母細胞発現系での違いも検証し、アッセイ技術の実用化へ向けた評価を試みる。なお、本プロジェクトで得られるであろう新規化合物を用いて、MDR1 発現卵母細胞系での検証も可能な限り実施する。

(実施体制:(株)日立製作所)

## 5.2 平成21年度事業規模

### 委託事業

一般勘定 1,417百万円 (継続)

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) 評価の方法

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事後評価を平成23年4月以降に実施する。

### (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20～21年度の複数年度契約を行う。

(平成20年度末に延長契約を行う。)

7. スケジュール

平成21年10月 第1回研究開発推進委員会

平成22年 2月 第2回研究開発推進委員会

8. 実施方針の改定履歴

(1)平成21年3月5日制定

(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

