

平成22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15条第1項第2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か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となる要素技術について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21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

疾患に関わるタンパク質相互作用解析を行い、創薬ターゲット候補となる新規タンパク質情報を約 550 個取得し、これにより、5 個以上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した。また、スクリーニング系構築のための相互作用情報を1つ提供した。

質量分析用自動サンプル調製装置を実戦投入するとともに、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た。パーキンソン病関連タンパク質の解析で得られた情報については現在検証中であるが、小胞体レドックスネットワーク関連タンパク質解析においては、酸化還元酵素間の電子伝達カスケードを明らかにした。

低分子化合物ターゲットタンパク質の解析を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行い、20 個以上の化合物ターゲットタンパク質情報を得た。

スクリーニングで得られた化合物の評価を、細胞を用いた系で本年度から行った。天然化合物の精製フラクションチェックを含め約 260 サンプルの評価を行い、その情報を提供した。

また、タンパク質ネットワーク解析技術の更なる高感度化として、非特異的結合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ビーズの開発を進めた。これまでに、市販のビーズと比較し、非特異的結合タンパク質を 1/10 以下に抑えたビーズの開発に成功した。

(実施体制:(社)バイオ産業情報化コンソーシアム、味の素(株)、アステラス製薬(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)、武田薬品工業(株)、共同実施:(独)産業技術総合研究所、東京都臨床医学総合研究所、東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科、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、理化学研究所・和光、国立長寿医療

センター研究所、東京工業大学大学院総合理工学研究科、京都大学再生医科学研究所)

② タンパク質相互作用情報の検証技術の開発

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

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成を引き続き行い(304 クローン)、各チームへのクローン供給を行った。また、スクリーニング用タンパク質の発現クローンの構築に用いた。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の供給を行った。

スクリーニング系の改良のため、新たなタンパク質フラグメント補完法として、2種類のスプリットルシフェラーゼ法をインビトロ系で構築した。また、インビトロGSTプルダウン法の構築も行った。また、可溶化タグを導入した改良型インビトロメモリーダイ法を開発し、相互作用の検証およびスクリーニング系の構築を14セット行った。また、スクリーニング系において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った。

また、SPR装置を利用したHSP47-コラーゲンの相互作用阻害物質スクリーニング系も実施し、相互作用阻害物質の精製過程における活性フラクションの評価も行った。抗癌剤排出系阻害のスクリーニングにおいては、国立がんセンターにおいては相互作用阻害物質の2次評価系を構築した。

(JBIC分室4(JBIC)、共同実施: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」のため、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 C31 法により部位特異的に導入した安定発現細胞株を作製して、プロテアソームセンサー細胞を、検証実施グループおよびスクリーニング実施グループへ供給した。また、化合物探索を行うグループからの依頼に応じ、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、コントロール細胞株およびスクリーニング細胞株を実施グループへ供給した。

また、インビボ系の相互作用検証方法として FF-ルシフェラーゼおよび CB-ルシフェラーゼについてスプリットルシフェラーゼ法を開発し、マルチ遺伝子発現系でのスクリーニング系を構築した。この方法で構築された細胞株は、化合物活性の検証、化合物スクリーニングに活用された。

(JBIC分室13(JBIC)、共同実施: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

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」を集中的に行った。

代表的な成果として、インフルエンザウィルスの複製、増殖に関する RNA ポリメラーゼ複合体を標的とした阻害剤の探索では、ターゲット複合体の一つである PA および PB1 の結晶構造をもとに、分子動力学計算により主要な相互作用を予測し、その情報を *in silico* スクリーニングのパラメータに取り入れる手法を考案した。この手法により、約 300 万件の化合物に対して 209 品目の化合物を選定し、筑波大学および臨床医学研究所によるプラークアッセイ評価の結果、プラークのサイズ、数ともに効果的に減少させる 8 品目の化合物を同定すること成功した。

その他の成果として、Calpain10 を標的とした *in silico* スクリーニングにおいて、フレキシブルな活性部位を多重モデリングにより構築し、コンセンサススクリーニングを実施した。その結果、4 品目のヒット化合物を同定すること成功し、そのうち 2 品目については、Calpain10 選択的に機能することが確認された。

立体構造ペプチド・ファージライブラリーの設計と構築(大阪府立大学と実施)では、GSCF 立体構造ペプチドの低分子化に向けた *in silico* スクリーニングを行い、そのうち 2 品目について、GSCF 立体構造ペプチドと同様に GSCF 受容体へ結合することが確認されてきている。

上記以外にも、RNA ポリメラーゼ複合体の PB1-PB2 複合体や AIDS 関連の複合体標的 *in silico* スクリーニングが終了しており、現在、アッセイ評価に進んでいる。

他チームとの連携では、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、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った。

代表的な成果として、相互用ネットワーク解析チームを中心とした評価系のチームとの連携において、mKG の立体構造解析とターゲットタンパク質の disorder 解析から、mKG とターゲットタンパク質のトポロジー制御、設計に関する支援を行った。

また、天然化合物チームおよびライブラリー合成チームとの連携において、TDP1 を標的とした天然物ヒット化合物の作用機序を分子シミュレーションで予測し、ライブラリー合成チームに対して合理的な合成展開を提案した。

大鵬薬品工業と実施している課題については、平成20年度に引き続き、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:JBIC 分室 8(JBIC)、大鵬薬品工業(株)、興和(株)、共同実施:産業技術総合研究所、筑波大学、東京都臨床医学総合研究所、大阪府立大学、名古屋市立大学)

④ 疾患関連遺伝子探索技術の開発

EXPOC システム一次評価については、機能未知液性因子を高発現する EXPOC マウスの作製及び解析を継続して実施し、計画通り計 180 種(平成20年度までの実績 120 種を含む)の候補遺伝子について全表現型データの取得をほぼ完了した。

本年度評価を実施した遺伝子 60 種のうち 32 種は、自社実施のアレイ解析により選抜した、腎障害に伴い様々な組織で発現変動する遺伝子である。これらの遺伝子については通常の一次評価に加え、腎障害を惹起した EXPOC マウスを評価する試験を行い、腎障害に対して保護あるいは増悪効果のある因子の同定を試みた。その結果、32 種のうち 9 種(保護:7 種、増悪:2 種)という非常に高い確率で変化が観察され、病態に着目した遺伝子選抜⇒病態モデルでの評価、というスキームが、有用遺伝子同定の効率向上に有効であることが示された。なお、現時点で明確な表現型が観察されているのは、解析完了した計 180 種中 42 種である。

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20年度に特許出願した、骨量を増加させる因子(#88)に関する創薬研究を、最重点課題として取り組んだ。

具体的な取り組みは、以下の通りである。#88 組換え体の調製/組換え体投与による骨量増加の表現型再現/骨そしょう症モデルに対する薬効評価/骨量増加のメカニズム解明/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。特に、#88 組換え体投与が、正常マウスのみならず、骨そしょう症(Ovx)モデルマウスにおいても骨量・骨強度増加をもたらしたことは、本因子の新規骨そしょう症治療薬としての可能性を示すものである。これらのデータは、優先権出願に記載した(平成21年9月)。

新規因子の二次評価については、#120のEXPOCマウスにおいて血清鉄低下が観察されたことから、新たに特許出願した(平成20年6月)。なお本因子については、組換え体のマウスへの単回投与により血清鉄が減少することも確認している。さらに#130-EXPOCマウスにおいて、骨量増加の表現型を見出し、平成21年度末までに特許出願予定。

また上記に加え共同実施先では、マウス血中タンパク質をLC/MS/MS分離・解析する技術の改良、及び造血系に異常をきたす4種のEXPOCマウス詳細解析を実施する(早大)と共に、#22-EXPOCマウスについて、リンパ球系に着目した解析を実施し、本因子がB細胞の初期分化を抑制していることを明らかにした(阪大)。

(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21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。

本プロジェクトを通じて、より多くの様々なスクリーニング系に対応可能な天然物ライブラリーとして、単離化合物からなる天然化合物ライブラリーの充実化を進めた。具体的には、当研究室に存在する単離化合物のデータをUPLC-TOFにて解析し、質量分析用ソフトウェア ChromaLynx を元にして独自のデータベース化を確立した。このデータベースを用いて、新たに分離した菌株の培養物中の二次代謝産物を分析解析し、未取得化合物を網羅的に分離した。

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。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、積極的にスクリーニングを展開した。

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、*in vitro*メモリーダイ法を用いて、年に8個以上のスクリーニングを行った。本系に関しては、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。

また、エネルギー代謝に関与する脱アセチル化酵素について、生理的な基質由来の蛍光ペプチドを利用したスクリーニングシステムを確立し、その活性を制御する化合物のスクリーニングを、産総研において実施した。

メモリーダイ法の補完技術としては、蛍光タンパク質 mKG の代わりに発光タンパク質 Luciferase を用いた Split Luciferase Assay 法、および、GST と蛍光タンパク質 VenusLuciferase の組み合わせによるプルダウンアッセイ法の構築を行い、有効性を確認した。二次評価として、プロテアソームセンサー細胞、Luciferase レポーターアッセイを行った。

FCCS 基盤技術開発としては、p53-mdm2 の相互作用について、細胞ライセートを用いた検出系の検討を行い、相互作用の検出および阻害剤効果について検証し、検出システムを確立した。また、細胞内での FCCS 測定を実施し、p65 と p50 の相互作用において、相互作用の強さを定量する事が可能であると考えられるデータを得た。

また、ヒト化酵母を用いた創薬ターゲット探索で見出した標的に関して、酵素レベルでのハイスクリーンアッセイ系を構築し、スクリーニングも行った。

以上のプロジェクト推進により、約 31 万天然物ライブラリーを確立し、新規化合物 26 個を見出した。また、生物活性的に興味ある 4 化合物に関しては、分室 8 および 16 と共同で *in silico* モデリング-合成展開により、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)、東レリサーチセンター(株)、(独)理化学研究所和光研究所、メルジャン、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、田辺三菱製薬、微生物化学研究会、明治製菓、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、(独)製品評価技術基盤機構、北海道大学、東京大学新領域創世科学、長浜バイオ大学、東京農工大学、東京大学農学生命科学研究科、癌研究会、筑波大学、東京都臨床医学総合研究所)

⑥ 化合物等の高機能化技術の開発

テーマ④-2「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)で得られた三次元空間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を行った。

天然化合物グループにより見出された、生体機能を制御する天然有機化合物2種について、天然物を母骨格とする類縁体合成を行い、天然物を超える*in vitro*活性をもつ化合物を見出した。また、天然有機化合物1種について、天然物の母骨格情報をもとに独自に設計した化合物ライブラリーを合成し、そのなかから天然物を超える*in vitro*活性をもつ化合物を見出した。さらに、タンパク質間相互作用を阻害する天然有機化合物1種の全合成研究およびその誘導體合成により、タンパク質間相互作用阻害に必要な化合物構造情報が、インシリコグループの解析とよく一致することを明らかにし、天然物-インシリコ解析-合成の連携が本テーマ解決において重要で、かつ有効な化合物を見出すシステムになることを明らかにした。

RAPIDSを駆使した特殊ペプチドの探索では、平成21年度にコンソーシアム参画企業2社と課題解決型プログラムを開始し、標的計2種に対して順次特殊ペプチドのセレクションを行っている。うち、一標的に対して得られた環状型特殊ペプチドは、数nM(4~10nM)の解離定数を持ち、且つ解離速度が極めて遅い化合物数種の同定に成功した。現在、化学合成したこの化合物について、細胞中での生物活性の検討を進めると同時に、他の標的についても探索を行っており継続する。

(実施体制:JBIC分室16(JBIC)、東京工業大学、東北大学大学院薬学研究科、味の素、田辺三菱製薬、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)

《バイオテクノロジー開発技術研究組合》

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

a) PKC ϵ を標的とした糖尿病治療薬開発

PKC ϵ を標的とした糖尿病治療薬開発に向け、*in silico*で設計した化合物を対象として、培養細胞系、無細胞抽出系を用いたスクリーニングを行った。戦略1では、PKC ϵ とその膜上リセプターである RACK の相互作用の阻害を狙った化合物を設計し、戦略2では、PKC ϵ 制御サブユニットの Druggable Concavity(小分子化合物の結合部位と推定される領域)への結合を狙った化合物を設計した。各々の化合物について、まず、培養細胞での PKC ϵ 活性化に対する阻害効果を指標としたスクリーニングを行い、4個の新規 PKC ϵ 阻害化合物を同定した。これらのうち、3個は戦略1より、また1個は戦略2より得られた化合物である。戦略1の化合物については、独自に開発した哺乳類タンパク過剰発現系を用いた無細胞抽出系を構築し、PKC ϵ と RACK タンパク間の相互作用に対する化合物の効果を検証した。

戦略2より得られた化合物は、驚くべきことに、一般的な糖尿病治療薬そのものであった。この治

療薬は、極めて広範に使用されてはいるものの標的分子は知られていないが、我々の結果は、PKC ϵ がその標的であることを示唆する。PKC ϵ は元来、我々が遺伝解析に基づき糖尿病関連因子として同定したものであり、このケースでは、我々の遺伝解析(或いは、それによって見出された疾患関連因子そのもの)の創薬価値が直接的に示されたと言することができる。また、PKC ϵ が糖尿病治療薬の標的であるとする我々の結果に基づき、構造に基づいたより論理的な当該治療薬派生体のデザインが可能になる。

b) 酵母 Two Hybrid (YTH) システムの再構築

独自のコンポーネントを用いて全面的に再構築した新規 YTH システムの構築を完了し、テストケースとして、10 個の哺乳類遺伝子、6 個の酵母遺伝子を用いた YTH スクリーニングを行った結果、計 1500 余の YTH 相互作用因子を同定した。これらのうち 12 遺伝子については、従来法による YTH 解析が報告されており、計 60 の YTH 相互作用因子が既知であるが、我々の方法を適用することによって、約 900 の YTH 相互作用因子を同定することができた。この結果から、我々が先に予想した通り、従来法には深刻な偽陰性(陰性と誤判定された陽性)の問題が存在することが明らかであり、新たなコンセプトに基づく独自の陽性判別法を核とする新規 YTH システムの適用によって、初めて、YTH のポテンシャルをフルに引き出すことができたものと考えられる。

新規 YTH システムは蛍光を用いた陽性・擬陽性判別法のため、陽性率に依存しないスクリーニングが可能である。例えば、従来は、Bait と Prey を逆にしたスクリーニングシステム(DNA 結合ドメインとの融合ライブラリーを Prey として用いる)は、圧倒的多数の擬陽性故に不可能とされてきたが、我々は、この逆転型 YTH システムを既に実用化した。この逆転型 YTH システムは、Bait/Prey 共にライブラリーを用いた網羅的・無作為的相互作用解析の基盤となり得るものである。ハイスループットシーケンサーを用いた大規模解析を視野に入れた、さらなる新システムの構築に向けて、部位特異的組換えによる Bait/Prey cDNA の 1 分子化の過程を組み入れ、パイロットスケールでの網羅的・無作為的相互作用解析の実現可能性を検証した。

⑧ siRNA 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、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きながら、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、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」を以下の研究スキームにより実施した。

a) 天然物ライブラリー構築、データベース整備、化合物合成法の確立:

1) siRNA ライブラリーを用いた化合物評価データベースの構築

本アプローチでは、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。

JBIC/理化学研究所と共同し、市販マウス siRNA ライブ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すでに整備されている。

本年度は、JBIC/理化学研究所 吉田 稔主任研究員と共同し、多重染色した細胞を用いた「簡易的な表現型データベース」を構築した。

まず、A549 細胞を表現型解析最適細胞として選抜し、この細胞を蛍光染色試薬により多重染色した後、In Cell Analyzer (GE Healthcare 社)を用いた画像取得と、解析ソフトウェアによる数値化を行い、この細胞を「標準細胞」として定義した。次に、標的既知の小規模化合物ライブラリーを用いて、化合物を作用させた際の「標準細胞」の表現型の変化を数値化し、簡易的な表現型データベースを構築した。

今後必要に応じ、マウス 3T3-L1 細胞に対して市販マウス siRNA ライブラリーを作用させた際の表現型変化の情報についても取得し、個々の遺伝子ノックダウン時、および化合物作用時の表現型を用いて、標的未知化合物のターゲット予測に使用可能な、表現型データベースを充実させていく予定である。

b) 天然物ライブラリーの構築と化合物活性の評価

本アプローチでは、抗糖尿病作用を有する化合物を探索し、化合物が結合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。

c) 天然物ライブラリーの構築と活性評価:

これまでに、糖尿病制御物質探索用として収集された、放線菌由来の新規単離化合物を 300 個以上、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、薬用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。

さらに、糖尿病制御物質探索用として収集された 6 種の放線菌株を、新規菌株活性化培地にて培養することにより、不活性遺伝子の活性化を行い、これまでの培養では取得することのできなかつた 86 種の新規化合物ピークを得た。

また、*S. Tsukubaensis* のゲノム解析を行い、新規生産物と生合成遺伝子の対応付けを行なった。

藍藻等の独立栄養微生物より得た 52 種の二次代謝産物サンプルについて、ラット肝実質細胞株 H4IIEc3 細胞を用いて糖産生抑制効果を調べたが、糖産生抑制活性を示すものは見つからなかった。

一方で、藍藻等の独立栄養微生物より得た比較的生産物の多い 5 つの二次代謝産物サンプルを組成分析し、35 種の新規化合物ピークを得た。

さらに、15 種の糖尿病関連症状を緩和する活性を有すると伝承されている薬用植物抽出物サンプルを糖尿病病態モデルマウスに投与し、糖負荷試験を行ったが、抗糖尿病活性を示すものは得られなかった。

これらの新規生産物を単離同定するため、兵庫医療大学に網羅的な天然物精製システムを新たに構築した。

天然物の単離は、アセトン粗抽出物から、初めに酢酸エチルで有機化合物を完全に抽出し、比較的疎水的な天然物を最初に確実に抽出した後、その疎水カラムで有機化合物を吸着させた。この時、含有アセトン等の有機溶媒系によるカラムへの吸着阻害を回避するため、サンプルを減圧下濃縮し、カラム処理を行った。当初懸念された本工程による疎水性化合物の析出は、最初の酢酸エチル抽出作業によって目的どおり回避された。カラム吸着サンプルは、カラム水洗後、MeOH 溶出によって行った。こうして得られた天然物混合物(酢酸エチル抽出液および MeOH 溶出液)を混合し、天然物を分取 HPLC を用いて単一ピークとして精製した。この方法により、放線菌由来および藍藻由来合計 121 個の化合物の単離を終了した。

今後、さらなる薬用植物抽出物からの化合物取得も行ない、必要に応じて情報の外部公開を行なっていく。また、*S. Tsukubaensis* のゲノム情報については、ペーパー等で外部公開する。

d) トリプレット化合物合成法の確立:

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ことを目的とする。(北里大学)

ケトンを有する化合物から、1,3,5-オキサ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た。その方法を用い、モルヒネ単位を有する対称トリプレット薬、キャップ構造(メチレン基)を有するツイン薬を合成した。トリプレット薬、ツイン薬とも鎮痛作用を発現し、その強さはトリプレット薬(モルヒネの16倍) > ツイン薬(モルヒネの4倍) > モルヒネとなった。また、アセトフェノンやピペリドン誘導体のような一般的なケトンにも適用できることを確認し、論文発表(*Org. Lett.* **2009**, *11*, 539)した。発表論文に含まれているものも含め、42 誘導体を合成した。

現在の合成法では、強塩基であるブチルリチウムを使用してケトンを中間体であるジチアンに変換し、その後重金属を用いて、重要中間体である α -ヒドロキシアルデヒドに変換する必要があった。また、化合物によっては、ジチアンから α -ヒドロキシアルデヒドへの変換収率が低いなどの問題点があり、合成法の改良を行った。TosMIC (tosylmethylisocyanide)を用いたところ、穏和な条件で、ケトンから α -ヒドロキシアルデヒドへの変換が可能となった。

これらトリプレット薬の中心骨格である 1,3,5-オキサアザトリキナン骨格は、キラル化合物であり、今までは全てラセミ体として合成してきた。そこで、光学活性な酸を用いて、酸付加塩(ジアステレオマー)を調製することにより、光学分割の分析条件を決定した。(北里大学)

e) 糖尿病創薬標的の探索:

1) 蛋白質相互作用解析、トランスジェニックマウスを用いた創薬標的の探索

JBIC/産総研の夏目研究室と共同でインタラクトーム解析を実施し、「AGF ファミリー蛋白質 X」の受容体の同定と、生物学的評価を行なった。

まず、インタラクトーム解析により、「AGF ファミリー蛋白質 X」と特異的に結合する蛋白質を、10 種同定した。その中には、膜蛋白質および局在不明な蛋白質である「遺伝子 Y」、および FAM115C の 2 種が含まれていた。また、「遺伝子 Y」のリガンドとして報告されている遺伝子も、「遺

伝子 Z、Z2」の 2 種含まれていた。

それらを標的とする siRNA を取得し、「AGF ファミリー蛋白質 X」の ERK1/2 リン酸化、および H₂O₂ 産生抑制作用への影響を検討したところ、FAM115C siRNA は何も影響を示さなかった一方、「遺伝子 Y」siRNA はそれらの作用を抑制し、「遺伝子 Z、Z2」siRNA は増強傾向を示した。

さらに、「遺伝子 Y」の細胞局在は、細胞に結合した「AGF ファミリー蛋白質 X」の局在と一緒にあることも明らかとなり、「遺伝子 Y」が「AGF ファミリー蛋白質 X」の受容体である可能性が濃厚となった。

また、「遺伝子 Z、Z2」siRNA が「AGF ファミリー蛋白質 X」の増強傾向を示したことから、「遺伝子 Y」を中心とした複合体の機能調節を、「AGF ファミリー蛋白質 X」が有している事も考えられた。

「AGF ファミリー蛋白質 X」が「遺伝子 Y」と関係している事はこれまでに報告されていないため、この「遺伝子 Y」の機構について、特許を取得する予定である。今後、更なる創薬標的の評価と、下流シグナルの解析を行。

さらに、「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を証明しているため、この、「遺伝子 9」の生物学的評価を行なった。

12 及び 20 週齢の、「遺伝子 9」の脂肪組織特異的トランスジェニックマウスのフェノタイプ解析を行なったところ、血糖値および血中 LDL の上昇が確認された。また、脂肪組織の遺伝子発現解析より、それらの取り込みに関わるトランスポーターの発現の減少が確認された。

これらの結果から、「遺伝子 9」が糖尿病を誘引する遺伝子の一つである事が明らかとなり、「遺伝子 9」が脂肪組織において病態時にのみ発現するという特徴も考慮すると、糖尿病の有用な創薬標的因子であることが証明された。糖尿病における「遺伝子 9」の創薬利用を、特許取得予定である。

2) 天然化合物を用いた創薬標的の探索

本事業でこれまでに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探索に用いられている。例えば天然化合物 FR177391 は、3T3L1 細胞に対する分化促進活性等、「AGF ファミリー蛋白質 X」処置により誘導される抗糖尿病作用と同様の作用を有する。本事業でも、FR177391 は PP2A を阻害する事により、単独でインスリンシグナルを活性化し、脂肪細胞の分化、糖取り込みを促進していることが確認された。

一方、「AGF ファミリー蛋白質 X」の単独処置では、インスリンシグナルを活性化し、脂肪細胞の分化、糖取り込み促進を示さず、インスリンを同時に処置した時のみ、促進作用を示した。

この違いから、「AGF ファミリー蛋白質 X」は、PP2A の活性阻害とは別の機構でインスリン感受性を増強することが考えられた。その機構を明らかにするため、遺伝子発現解析を行ったところ、「AGF ファミリー蛋白質 X」処置により、インスリンシグナルの鍵因子である Akt の活性を抑制する遺伝子の発現が減少することを明らかにした。

3) 化合物に結合する創薬標的の探索

ラット初代肝細胞を用いた糖新生評価において、明確な阻害作用が認められ、今後の抗糖尿病薬として期待される5種類の天然化合物および低分子化合物に関し、アフィニティ樹脂用固相担体 (AquaFirmus、NEDOプロジェクト成果物として筑波家田化学より販売中)を用い、ターゲット探索を行った。これらの化合物は明確な *in vivo* 糖新生抑制作用を示し、これらの天然物のターゲットが同定できれば、魅力ある創薬ターゲットとなることが期待される。

AquaFirmus を用いて、各天然物ごとにアフィニティ樹脂を作成してラット肝臓から調整したライゼーと混合し、非特異的結合蛋白を洗浄によって除去し、特異的結合蛋白質を同定した。

その結果、

LAMA-like protein 2 precursor (gi|146324958|sp|Q3TCN2|LAML2_MOUSE)、
dihydroorotate dehydrogenase (gi|2500042|sp|Q63707.1|PYRD_RAT)、
enolase 1, alpha non-neuron (gi|56757324|sp|P04764.4|ENOA_RAT)、
2,4-dienoyl CoA reductase 1, mitochondrial (2,4-dienoyl CoA reductase 1, mitochondrial)、
microsomal triglyceride transfer protein (gi|157819691|ref|NP_001101197.1|)、
Triosephosphate isomerase (gi|124056485|sp|P48500.2|TPIS_RAT)、
Trifunctional enzyme subunit alpha, mitochondrial (gi|172045972|sp|Q64428.2|ECHA_RAT)、
Peroxisomal acyl-coenzyme A oxidase 1 (gi|115565|sp|P07872.1|ACOX1_RAT)、
nicotinamide nucleotide transhydrogenase (gi|61557127|ref|NP_001013175.1|)、
Sulfated glycoprotein 1 (gi|134219|sp|P10960.1|SAP_RAT)
など、興味深い特異的結合蛋白質を多数同定した。

この中から、特に興味深い蛋白質を選択し、初代肝細胞を用いて siRNA による蛋白質の発現抑制を行い、抗糖尿病ターゲットとしての評価した結果、
microsomal triglyceride transfer protein
を創薬標的候補と決定した。

f) 活性化合物のデザインと合成:

1) 化合物のバーチャル・スクリーニングと合成

糖尿病の創薬標的となる遺伝子9産物を標的分子とし、その阻害分子のバーチャル・スクリーニングを行なった。

遺伝子9産物の立体構造が不明なため、立体構造既知の蛋白質とのアミノ酸配列の相同性を用いてその立体構造を予測した(ホモロジー・モデリング法)。次に、この予測立体構造に基づき、バーチャル・スクリーニングを行なった。立体構造中に結合可能領域が複数見いだされたため、それら全てに対してバーチャル・スクリーニングを行なった。まず、ASF (Alpha Sphere Filter) 法で大規模化合物データベース(約500万化合物)をプレ・スクリーニングし、その後ドッキング・シミュレーションで結合親和性の高い分子を選択した。(東海大学)

「遺伝子9」のモデリングと、それに基づく *in silico* スクリーニングにより抽出された80化合物のうち、入手可能であった38化合物を購入し(北里大学)、評価を実施した(アステラス製薬)。

また、天然物 FR177391 が PP2A を阻害し、抗糖尿病活性を示すという知見に基づき、PP2A を阻害標的とする医薬候補分子のバーチャル・スクリーニングを行なった。

FR177391 と PP2A の分子レベルでの相互作用様式に関しては知見がないが、FR177391 は、オカダ酸(OA)と競争的に PP2A を阻害することから、OA が結合する PP2A の活性部位に、FR177391 が結合する可能性は高く、OA-PP2A 複合体の結晶解析も行われている。そこで、OA-PP2A 複合体の結晶構造を出発構造として、分子力学法を用いたドッキング・シミュレーション(ソフトウェア ASEDock)を行い、FR177391 と PP2A の相互作用様式を解明した。

まず、OA と PP2A の結晶構造を、実験誤差内で再現できるドッキング・シミュレーションの計算条件(プロトコル)を決定し、それに基づき、FR177391 の結合様式をシミュレーションした。

次に、PP2A を阻害する低分子のバーチャル・スクリーニングにより、分子量が 750 以下の低分子化合物を探索した。FR177391 の結合様式を参考に結合部位を複数の結合領域に分割し、各結合領域に結合する低分子をバーチャル・スクリーニングした。それらの結合領域の特性に基づき、ASF 法を用いて、大規模化合物データベース(約 500 万)をプレ・スクリーニングした。ここで選択された分子と PP2A との結合性を、ドッキング・シミュレーションで実際に求め、結合性の高い分子を選択した。(東海大学)

また、PP2A と、FR177391 およびオカダ酸との相互作用様式を参考に、化合物設計を行った。両化合物に共通のカルボキシル基、PP2A の A および B サイトに相互作用する部位(脂溶性相互作用と推測)に着目し、1,3,5-オキサザトリキナン骨格をスペーサーに持つトリプレット薬(エナンチオマーを含めて、約 1600 化合物)を設計し、バーチャルスクリーニング(東海大学)を実施した。ドッキングスコアの高かった化合物の合成に着手し、数化合物の合成を完了した。(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

薬物排出トランスポーターMDR1 により排出された複数薬剤の同時解析(Digoxin と Doxorubicin の同時検出など)とともに、薬物相互作用解析(Quinidine による Digoxin の排出阻害)を行い、開発したトランスポーターアッセイ系基盤技術の適用可能な範囲を確認した。

複数薬剤の同時解析は、複数ラベル化及び検出が困難なラジオアイソトープ法では不可能であるが、質量分析法を用いると、無染色の薬剤が定量できる。簡便な前処理法にも関わらず、細胞中に含まれるイオン化抑制物質の影響を受けることなく、排出された Digoxin と Doxorubicin の量を同時定量できた。その結果、Digoxin の排出効率は約 75%、Doxorubicin の排出効率は約 10%であった。

また、基質 Digoxin の典型的な阻害剤である Quinidine を用いて、薬物相互作用解析を評価した。Quinidine が細胞の内側外側のどちらからの Digoxin 輸送を阻害しているか確認するため、内側または外側に Quinidine を導入し、Digoxin 輸送能を評価した。その結果、細胞内側にある Quinidine は、Digoxin の輸送を阻害しないことが示された。

さらに、薬物相互作用解析などを通して、培養細胞発現系と卵母細胞発現系での違いを検証した。比較に用いた培養細胞発現系として、ブタ腎上皮細胞由来の LLC-PK1 細胞を用いた。フィルターメンブレン上で LLC-PK1 細胞を培養し、方向性を持った細胞膜を人工的に作成した後、Apical 側(細胞の頂上側)または Basal 側(細胞の基底側)に阻害剤 Quinidine を導入し、基質 Digoxin 輸送能の評価を行った。その結果、卵母細胞発現系と同じ傾向が見られた。

トランスポーター解析基盤技術の事業の方向性を検討するため、ガイドラインの動向調査を進めた。2001 年 6 月に「薬物相互作用の検討方法について」(医薬審第 813 号)の通知があり、米国 FDA は、2006 年秋に薬物相互作用ガイダンス改訂版のドラフトを公開した。2008 年 10 月には米国 FDA において、Critical Path Transporter Workshop が開催された。最終的に、白書が取り纏められることになった(2010 年 1 月時点)。

さらに、ガイドライン化の動向調査を踏まえ、開発したトランスポーターアッセイ系基盤技術が様々な細胞系に適応できるよう、共通基盤である質量分析計の課題解決に取り組んだ。解析可能な薬剤の種類を拡充するため、ジオール系のイオン化しにくい薬剤の誘導體化、簡便な前処理による、イオン化抑制の原因となる妨害成分を除去する手法の開発などを行った。

(実施体制: (株)日立製作所)

5. 事業内容

5.1 平成22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テーマリーダーである、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

最終年度は、得られた化合物の評価と、課題解決型企業連携を中心に進める。

a) タンパク質ネットワーク解析並びにスクリーニングヒット化合物の評価

スクリーニング系で得られたヒット化合物を評価する。主に、細胞を使った系、およびリコンビナントタンパク質を用いた系にて解析を進める。

臨床医学総合研究所および東京大学大学院薬学系とは、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。平成22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。

臨床医学総合研究所とは、抗癌剤開発の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22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。

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。

アステラス製薬は、タンパク質ネットワーク解析システムを用いて同定された、糖尿病関連液性因子「AGFファミリー蛋白質 X」の受容体「遺伝子 Y」の抗糖尿病創薬標的としての妥当性検証と、抗糖尿病作用発現機序の解明を行なう。

(JBIC 分室1(JBIC、アステラス製薬)、共同実施:産業技術総合研究所、臨床医学総合研究所、東京大学大学院薬学系、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、兵庫医療大学)

b) 質量分析前処理の高精度化・自動化

サンプル処理技術の高度化を目指したプルダウンビーズの開発を進めながら、本開発技術の実証研究として、引き続き、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。

東京工業大学大学院情報理工学研究科とは、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22年度も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。

東京工業大学大学院総合理工学研究科とは、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科とは、タンパク質ネットワーク解析技術高度化の実証を目指した共同研究を行う。

(JBIC 分室1(JBIC)、共同実施: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情報理工学研究科、臨床医学総合研究所、京都大学再生医科学研究科)

c) 課題解決型連携

1) 味の素

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、および開発薬の作用メカニズム解明により、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。

2) 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。

3) 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。

4) 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。

5) 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。

6) 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。

7) 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解明を目指す。

8) 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。

9) 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效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22年度末までに、計 210 種 (平成18~平成21年実績⇒計 180 種) の遺伝子について、EXPOC 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

平成21年度末までに、210 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済み

のため、平成22年度は取り組みなし。

(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

ES クローン取得：平成21年度末までに、計 210 種の候補遺伝子についてジーンターゲティングによる遺伝子改変 ES クローンを取得済みのため、平成22年度は取り組みなし。

キメラ作製：10 種の候補遺伝子について、遺伝子改変 ES クローンをを用いたキメラマウス作製を実施する(計 210 種、平成18～平成21年実績⇒200 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 システム一次評価：22 年度末までに、210 種(平成18～平成21年実績⇒180 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)：本年度は、#88 に続く増骨因子(血球増加作用を伴う)として同定された、#130 の組換え体調製／マウスへの組換え体投与による再現性確認／特許出願を最重要課題として取り組む。また、腎障害に対する保護あるいは増悪作用が示唆された9 種の遺伝子については、系統化 EXPOC マウスにおける再現性を確認した後、1 種以上について、組換え体調製／投与による再現性確認／特許出願に進める。

(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

医薬品候補分子見極めの加速に強力に貢献するため、平成22年度は候補分子の二次評価に注力する。具体的には、造血系に興味深い変化を示す候補遺伝子 4 種(#126、#127、#131、#132)について、EXPOC マウスの詳細解析、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)、共同実施：早稲田大学)

e) 免疫／血液系因子の二次評価

造血系に着目した EXPOC マウスの詳細解析を実施し、一次評価では検出困難な変化の特定に繋げる。具体的には、①#22-EXPOC マウスの解析を継続し、B リンパ球分化発生における作用を明らかにすると共に、②21年度に EXPOC マウス送付済みの遺伝子 6 種(#32、#53、#166、#167、#168、#169)について解析を実施する。

(JBIC 分室 9(協和発酵キリン)、共同実施：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

テーマ①-1、①-2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(100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、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。

新たなタンパク質相互作用に関するインビトロアッセイ系の確立を行い、相互作用の検証およびスクリーニング系の構築を、2セット以上行う。また、スクリーニング系において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の実施も継続し、相互作用阻害物質の2次評価系の構築も行う。国立がんセンターにおいては、引き続き、相互作用阻害物質の2次評価を行う。

(JBIC 分室 4(JBIC)、共同実施: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

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、検証実施グループへ供給する。また、化合物探索を行うグループからの依頼に応じ、スクリーニング用遺伝子の発現クローンと安定発現細胞株の作製を行い、実施グループへ供給する。

また、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。

(JBIC 分室 13(JBIC)、共同実施: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

重点課題に対して実施している *in silico* スクリーニングの継続と、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。また、天然化合物ヒット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* 評価に取り組む。さらに、本プロジェクトで実施した複合体標的を、*in silico* 解析により体系化する(相互作用様式の分類と、それに対応した *in silico* 戦略のプロトコール提案など)。

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

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

平成21年度までに発展させた要素技術を統合化し、継続案件の標的タンパク質、複合体の *in silico* スクリーニング、化合物高機能化解析へ、最大限に活用する。特に、分子動力学計算や相互作用エネルギー計算など、より高度な技術の評価に重点を置く。

(JBIC 分室 8(JBIC)、共同実施: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の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の維持継続に取り組む。また、平成21年度の成果を踏まえ、タンパク質相互作用ネットワークおよび評価チームと連携して、mKG と標的タンパク質のトポロジー設計など、アッセイ系のインフラストラクチャ構築を支援する、新しい *in silico* 解析を確立する。

(JBIC 分室 8(JBIC)、共同実施: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

重点課題および継続案件について、*in silico* スクリーニングならびにヒット化合物の高機能化、最適化を他のチームと連携して行う。優先的な課題は、①インフルエンザ RNA ポリメラーゼ複合体 PA-B1 候補化合物 8 品目の最適化、二次アッセイに向けた解析、また、もう一つの複合体である PB1-PB2 プラークアッセイ結果のフィードバック、②プロテアソーム系標的複合体の *in silico* スクリーニング、③天然化合物チームおよびライブラリ合成チームとの連携を通じた、ヒット化合物の最適化(Calpain10 他、数標的を対象)

また、本プロジェクトで実施とした複合体標的を *in silico* 解析から体系化し、相互作用様式の分類と、それに対応した *in silico* 戦略のプロトコールを提案する。

(JBIC 分室 8(JBIC)、共同実施:産業技術総合研究所、筑波大学、臨床医学総合研究所、名古屋市立大学)

e) 特定標的疾患解析の実施

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のミニチュア化、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)。

(JBIC 分室 8(大鵬薬品工業、興和)、共同実施: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。平成21年度の成果をもとに、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継続し、この設計に基づく有機合成を行い、結合活性を評価する。さらに、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), 共同実施: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認する。また、テーマ④-2「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。*in vitro*メモリーダイアッセイ系を、分室4(五島チーム)と連携して構築し、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については、*in vitro*アッセイ系の構築が困難なため、細胞を用いたスクリーニング系を構築する。

また、重要項目のインフルエンザも含め、今までに得られた候補化合物について、蛍光偏光法などを用いたアッセイ系検証を試み、多角的に二次評価系の構築を行う。昨年度に引き続き、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目指す。

(JBIC 分室 10(JBIC)、共同実施: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う。平成22年度は、細胞ライセートを用いたタンパク質相互作用検出システムの感度向上について、検討を行う。また、疾患とかわりか深いターゲット蛋白質(相互作用)を選択し、同システムにおいて相互作用を断ち切る化合物を用いて阻害効果を定量することにより、医薬品候補化合物の評価系としての有用性を検証する。

(JBIC 分室 10(JBIC、東レリサーチセンター)、共同実施: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。

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。抗腫瘍物質探索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、平成22年度は、2 個以上のタンパク質相互作用について、制御物質スクリーニングを展開する。

また、新たな微生物生理活性物質ライブラリー確立を目的とする、新規生合成遺伝子取得、生合成遺伝子異種発現による化合物生産技術の開発を進める。

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

沖縄県を主体に、国内数カ所から土壌および海洋産物を採集し、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22年度は、NITEにて800菌株について2種類以上の培地を用いて培養し、1600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、400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UPLC-TOFにより成分分析のち未分離化合物の選抜を行い、随時大量培養を行い、網羅的に化合物の単離を進める。また、ユニークな化合物を生産する微生物に関しては、その生合成遺伝子を特定し、異種発現により物質生産させる技術の開発を進める。

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。また、化合物構造を迅速に予測決定することを目的に、SYNAPT-MSを用いて、部分構造情報のデータベース化を進める。

(JBIC分室15 (JBIC、メルシャン)、共同実施: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、平成22年度は、2～3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、2～3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合物を見出し、インシリコ、合成チームとの連携により、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)、共同実施: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

化合物ライブラリー充実化の一つとして、天然化合物が得意とする抗がん作用を示す化合物のスクリーニングを数個展開し、生理活性物質の取得を進める。平成22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は、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・スペクトロメトリーを用いて、構造決定を行う。平成22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 200 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22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)、共同実施: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21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)、共同実施:産業技術総合研究所、東京農工大学、愛知県がんセンター)

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ト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、共同実施：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調べるために、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・検証する化合物を得る。

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④-2「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)で得られた三次元空間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。平成22年度は、天然物の母骨格をもとにした高機能類縁体ライブラリー、およびインシリコと連携して設計した高機能化合物ライブラリーを計三種類作製し、個体レベルで評価・検証する化合物を得る。そのうち一つは、タンパク質間相互作用制御物質について行う。

(JBIC 分室 16(JBIC)、共同実施：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)を駆使して構築された、高多様性非天然型ペプチドライブラリーを用い、現在進行中の2社との課題解決型連携プログラムの継続、および新たに参画企業1社と連携を開始し、高親和性の環状特殊ペプチドを同定する。また、独自に進めている薬剤標的3種については、既に高活性をもった薬剤候補が絞られてきているので、それらについては細胞への膜透過性も含め、薬剤としての種々の検討を開始する。平成22年度内に、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、味の素、田辺三菱製薬)、共同実施：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))

5.2 平成22年度事業規模

委託事業

一般勘定 888百万円 (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

NEDO 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。

7. スケジュール

平成22年9月 第1回研究開発推進委員会

平成23年1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22年3月9日、制定。

(別紙)平成22年度研究体制スキーム

