

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) 創薬加速に向けたタンパク質構造解析基盤技術開発

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、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。また、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。一方、欧米における創薬研究では、タンパク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、タンパク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、細胞表面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。

本プロジェクトは、ポストゲノム研究の産業利用が期待される「ゲノム創薬」を加速するため、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面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を開発し、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。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ことができる。また、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や、それに基づく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、さらには膜タンパク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が期待できる。

そこで、本プロジェクトにおいては以下の研究開発を実施する。

[委託事業]

(1) 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 2Å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等により 50Åより高い分解能で3次元構造解析する技術を確認する。
- b) 結晶化できない膜タンパク質の立体構造を 8Åより高い分解能で解析する技術（単粒子解析等）を確認する。
- c) a)、b) を組み合わせることに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認する。
- 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、以下の技術を確認する。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認する。
 - 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) 細胞表面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、以下の技術を確認する。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認し、*in silico* スクリーニングの効率を従来法に比べ10倍程度にあげる。
 - 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

(2) 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 2Å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 10Å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に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 (NMR) 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 \sim μ M 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 倍程度にあげる。

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。

4. 実施内容及び進捗 (達成) 状況

4. 1 平成21年度事業内容

本研究開発は、京都大学大学院理学研究科 藤吉好則教授をプロジェクトリーダーとした体制の下で研究開発を実施している。平成21年度の進捗状況を以下に記す。

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の基盤技術の開発を進め、以下のように研究が進捗するとともに、問題も明らかになった。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研究を以下のように進めた。

(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た発現・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、そして、②結晶化の成果

水チャネル AQP4 の阻害剤を開発するための構造解析を目指して、昆虫細胞を用いて AQP4 の野生型と変異体などの発現を行い、アセタゾールアミド (AZA) が水チャネルの阻害剤であることを明らかにした。しかしさらに、ラット由来、マウス由来、ヒト由来の3種類の AQP4 の発現系を確立して研究した結果、アミノ酸配列が極めて似通っている (細胞外近傍のアミノ酸配列が異なるのは僅かに4箇所のみである) のに、ラットとマウス由来の AQP4 は AZA でブロックされるが、ヒト由来の AQP4 は阻害できないという興味深い結果を得た。

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 の各種変異体の発現を昆虫細胞で行って、構造解析の分解能向上に成功した。イオンチャネルの構造解析を目指して、構造を安定化するためのシステイン変異を導入したナトリウムチャネルの発現を行った。さらに、構造解析を有効に進めるために、34種

類のナトリウムチャンネルを検討して、その中から興味深いチャンネルの生理機能について、論文をまとめた。

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多くの変異体を発現し、その候補となる変異体を見出した。

(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カ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を開発した。

これを用いて、予備的な結果ではあるが、脂質2重膜をも分離して観察できるようなトモグラフィー像の解析を可能にした。

②高分解能の構造解析を可能にする電子線結晶学用プログラムの開発に成功して、AQP4のS180D変異体の構造を水分子や脂質分子を直接観察できる高分解能で解析した。

③結晶化できない分子や複合体の構造解析を8Åの分解能で解析できる単粒子解析用プログラムの開発を行ったが、実際の構造解析、例えば、P2X2の構造解析をこの技術で行った結果がX線結晶構造解析の結果と矛盾することが明らかになった。すなわち、単粒子解析はその解析の信頼性において注意が必要であるので、研究計画を再検討する。一方、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が可能な電子線トモグラフィーは有望であるので、金粒子などでのラベル法を用いないでトモグラフィー像の解析ができるコンピュータプログラムの開発を行った。

(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カ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

上記のように単粒子解析を除いて基本的に順調に技術開発が進んでおり、これらを用いた膜タンパク質、及びその複合体の構造解析を進めた。

①ラット由来のAQP4についてはアセタゾールアミドが水透過を阻害することを発見した。創薬を目指して、ヒト由来の水チャンネルAQP4への効果を確認したところ、細胞外近傍のアミノ酸配列が異なるのは僅かに4箇所のみであるのに、ラットとマウス由来のAQP4はAZAでブロックされるにも関わらずヒト由来のAQP4は阻害されないという興味深い結果を得た。それゆえ、この複合体の構造解析の前に関係する残基の同定を行う研究を進めている。

②またAQP4の変異体について、脂質分子がきちんと分離して観察できるような高分解能の構造解析に成功した。

③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M34A変異体とそのN末端側6アミノ酸残基を削った変異体の両方の構造解析を行った。

④ヒストンと相互作用する転写制御因子複合体の構造をX線結晶構造解析法により構造解析を行った。水分子が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た結果、ギャップ結合などについて脂質 2 重膜を分離して観察できた。

- ⑤また新たな創薬関連膜タンパク質の発見を目指して、膜をもつ構造体等を検索した。具体的には、ギャップ結合チャンネルと関係するベシクル等の内部構成成分の解析を試みた結果、予備的ではあるが、ATP が内包されている可能性が示唆される結果を得た。

ところで、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と単粒子解析を用いた構造解析を行って、電子線結晶学を用いた構造解析では、その後に X 線結晶学により解析された構造と基本的に同じであることが確認されただけでなく、脂質分子とチャンネル内の水分子の構造まで解析され、電子線結晶学が優れていることが明らかになった。一方、単粒子解析は高分解能の解析が出来るコンピュータプログラムの開発に成功し、実際の構造解析を進めた結果、その解析の信頼性が低い問題が明らかになった。これは、重大な結果であり、研究計画を見直すこととする。

(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 (NMR) 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) 安定同位体標識タンパク質調製系の確立

CCR5 のような可溶化状態における安定性が非常に低い GPCR を rHDL に再構成するため、以下の新規調製法を考案し、可溶化状態にある時間を短縮した。まず、CCR5 を発現させた昆虫細胞の細胞膜画分を、ショ糖密度勾配遠心にて精製した。1 % n-dodecyl- β -D-maltopyranoside (DDM) を含むバッファーにて膜画分を可溶化し、直後に rHDL への再構成を行った。その後、Ni アフィニティークロマトグラフィー、1D4 抗体アフィニティークロマトグラフィー精製により CCR5-rHDL を得た。SDS-PAGE 解析から、得られた CCR5-rHDL の純度は 80 % 以上であり、収量は昆虫細胞 1 L 培養あたり約 10 μ g と見積もられた。

調製した CCR5-rHDL が、構造認識抗体 2D7 との結合活性を保持することを SPR 法により確認した。この 2D7 抗体結合活性は、4 $^{\circ}$ C にて 24 時間静置した後も調製直後の約 85 % 保持されたことから、rHDL に再構成することにより CCR5 の安定性が飛躍的に向上することがわかった。

プルダウンアッセイから、調製した CCR5-rHDL が MIP-1 α 結合活性を保持していることを確認した。また、GDP-GTP 交換アッセイから、CCR5-rHDL が MIP-1 α 濃度依存的に G タンパク質へのシグナル伝達を誘起することを確認した。

得られた CCR5-rHDL 約 1 μ M に対して、Ile, Leu, Val のメチル基を選択的に標識した MIP-1 α を 10 μ M 混合した試料を調製し、測定温度 10 $^{\circ}$ C の条件下で TCS 実験を行った。コントロール実験として、CCR5 を含まない rHDL を用いた TCS 実験を行った。

その結果、MIP-1 α の V59 および V63 の H γ シグナルにおいて、有意な強度減少が観測され、これらの残基が CCR5 相互作用部位であることが同定された。TCS 実験にて検出された領域は、これまでに CCR5 との結合に関する変異体解析が報告されていない領域である。本研究では、Ile, Leu, Val メチルプロトンを観測対象とすることに

より、これまで変異導入の困難であった疎水性に富む領域における相互作用部位の同定に成功した。本研究により確立した手法は、他の多くの GPCR においても適用可能であると考える。

(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)

(b) 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

標的タンパク質のラジオ波照射の有無による、リガンドプロトンの縦緩和速度変化を指標とする新規エピトープマッピング手法を、創薬標的酵素-阻害剤複合体に対して適用した。その結果、複合体のX線結晶構造解析から得られた結合リガンド周囲のプロトン密度と、リガンドプロトンの縦緩和速度変化の大きさに相関がみられたことから、本手法が効果的なエピトープマッピング手法であることが示された。

血栓形成タンパク質複合体を競合的に阻害する、低分子薬物とフェージライブラリ由来ペプチドを題材とするリガンドベース相互作用解析を実施した。両者は全く異なる構造骨格を有するが、INPHARMA解析の結果、両者の共通項と考えられる構造要素を同定することができた。本手法は活性ペプチド分子を低分子化合物（薬物）に構造変換する上での重要な構造情報として活用できる。

化合物結合の迅速バリデーション法については、高分子量創薬標的タンパク質に対応する多核種同時NMR測定法を開発し、適用可能性を検討中である。

(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)

(c) 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

In-cell NMR 法の確立のためには、高濃度のタンパク質を細胞内に導入する必要があるため、まず、Streptolysin 0 (SLO) による形質膜上のポア形成とCa²⁺ 刺激による膜の再生を応用して、293 細胞に対して Tβ4 を効率よく導入するための調製条件を探索し、また、FITC により蛍光標識した Tβ4 を細胞内に導入して、細胞内 Tβ4 濃度の見積もりを行った。その結果、導入した Tβ4 は、細胞内濃度として約 50 μM と見積もられ、この細胞の懸濁液を NMR 測定に用いた場合、シグナルの取得が可能な濃度域と判断した。さらに、細胞内に導入した Tβ4 が、細胞質中に分布していることを共焦点顕微鏡により観測し、また、Tβ4 が分解されていないことを SDS-PAGE による解析から明らかにした。

次に、均一 15N 標識 Tβ4 を導入した細胞を調製し、細胞内の Tβ4 の NMR シグナルの観測を試みた。調製した細胞は、密度勾配媒体である Redigrad を含む培地に懸濁することにより、経時的な細胞の沈降を抑制する工夫を行った。これにより、細胞死の低減に加え、測定中の細胞の沈降による静磁場の不均一化の抑制が期待できた。1H-15N HSQC スペクトルの測定の結果、10 時間の測定にて十分な感度にて Tβ4 に由来するシグナルの検出に成功した。

測定後に、細胞を除いた細胞外液を同様の条件にて測定した結果、シグナルをほとんど与えなかったことから、観測されたシグナルは、細胞内の Tβ4 に由来すると判断し、哺乳動物細胞を用いた in-cell NMR 法の確立に成功したと結論した。

(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

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)

(d) 創薬標的タンパク質複合体の相互作用解析

DDR2 の認識配列 (GPRGQPGVMGFP) を含むコラーゲン模倣ペプチドを用いて、アミノ酸選択的な転移交差飽和法を適用し、コラーゲン上の Arg, Val, Met, Phe と近接する DDR2 の表面残基を同定した。また、コラーゲンペプチドに導入した常磁性緩和試薬 MTSL による緩和促進効果をもとに、複合体におけるコラーゲン結合の配向を決定した。以上の情報を総合して DDR2・コラーゲン複合体モデルの構築を行った。得られたモデル構造から、コラーゲンの Phe 残基が DDR2 表面の疎水性ポケットに収容されるなど、特異的な認識を可能にする構造基盤が明らかとなった。

リガンド非存在下において Cys 変異を導入した DDR2 を HEK293 細胞に発現させ、細胞膜上における S-S 結合の形成をウエスタンブロットにより検出した。その結果、細胞膜近傍の細胞外領域では高い S-S 結合の形成が観測され、リガンド非存在下では恒常的に近接していることが示唆された。また、コラーゲン存在下においても S-S 結合の形成は観測されたものの、DDR2 の活性化を抗リン酸化抗体で検出すると、リン酸化は S-S 結合を形成していない方の状態で主に観測された。また、膜透過処理と酸化剤を用いて、細胞内キナーゼドメイン間の S-S 結合の形成を観測した結果、コラーゲン存在下でのみ多量体が形成されることが判明した。

以上の結果より、DDR2 はコラーゲン非存在下では膜近傍ドメインを介した二量体として存在し、コラーゲン結合に伴い二量体が解離して、キナーゼドメイン同士が近接する多量体を形成し、自己リン酸化が生じる機構を提唱した。

(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

Structure-based drug screening, Ligand-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複合体構造モデリング手法などを新規に開発した。その結果、薬物探索の精度は、市販ソフトを 10 倍近く上回る精度に達し、 μ オピオイド受容体アゴニスト (48 種) や農薬のシードとなる化合物 (23 種) など 70 種を超えるヒット化合物を得た。

このうち構造上、前者では少なくとも 2 種、後者では 16 種について新規性が高く drug-likeness を有しており、産業上有用と考えられる。また、横浜市大との共同研究によるインフルエンザウイルス RNA ポリメラーゼ PA-PB1 複合体阻害剤として 15 種の化合物の発見なども加えると、将来有用となるもの、有用になりうる化合物を、総計 20 個以上を得ることができた。

(a) *in silico* ドッキング計算の高精度化

Fragment Based Drug Development (FBDD) のために Fragment Screening by Replica Generation (FSRG) 法を開発した。理論計算では、従来手法では発見できない小さな活性フラグメントも発見できることが示された。タンパク質のドッキング効率を上げるため、タンパク質構造を分子シミュレーションで多数生成する手法などをスクリーニング計算に組み合わせた。分子動力学計算に基づく結合自由エネルギー計算の新規な方法として Smooth Reaction Path Generation (SRPG) 法を開発し、文献

データでの検証では 1kcal/mol 程度の精度を得ることができた。SRPG 法は、研究開発項目①で実験された AQP4 阻害剤の実験結果を支持することができた。

今までに開発してきた Multiple Target Screening (MTS) 法の改良を行った。データベースエンリッチメント・カーブにおいて上位1%における選択的なヒット率は、ssDSM法では通常のドッキング手法の5.1倍 (45.8/8.9%)、標的タンパク質の動的モデルによるMTS法ではGOLDに比べ11.6倍 (36.1/3.1)、機械学習法とMTS & DSIを組み合わせた方法ではGlideに比べて18.0倍 (22.1/1.2) を得た。GOLDもGlideも、国際的に広く利用されている標準的なドッキング・ソフトウェアである。これらのヒット率は、通常の0.1%~1%のオーダーのヒット率に比較すると、少なくとも10倍以上のスクリーニング効率となっている。

(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

類似化合物探索手法として構造探索エンジンとMaximum volume overlap法などを組み合わせた手法(MD-MVO)法を開発したところ、代表的なソフトウェアROCSより有意に高いヒット率を示し、ペプチド・リガンドからの低分子探索が可能なことを示した。

一方、不整脈等の原因となるhERGチャネル阻害活性予測を行う新規手法の開発においては、COMBINE法をタンパク質複合体用に改良することで飛躍的に精度を高め、市販プログラムに搭載されている従来法の7.9倍の選択性を得た。MD-MVO法など上記で開発してきた手法のいくつかは、既にソフトウェアシステム“myPresto”として一般に公開し、国内外で数百回ダウンロードされている。



(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

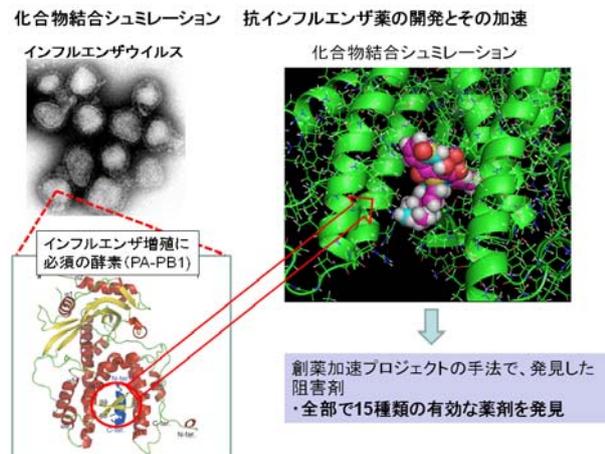
アクセラレータを用いたタンパク質-化合物ドッキングソフトの高速化を図り、一部サブルーチンを高速化し、検証した。また、スクリーニングソフトのアクセラレータによる高速化も行った。ドッキングソフトでは、計算ボトルネックがないため計算全体での高速化は行えなかったが、スクリーニングソフトでは処理速度を10倍高速化することができた。

FSRG 法用の building block による化合物データベースの開発や、メタロプロテアーゼなどに安定に結合できる化合物のデータベースなどを開発し、参加企業を中心に配布を行った。データベース開発では、化合物そのものを生成するソフトウェアから自作を行い、これらデータベース作成ソフトも、myPresto として公開されている。

創薬実証研究では、企業、大学などと連携し、複数の標的に対して実証研究を行った。開発してきた化合物データベース、改良を加えたドッキングソフト、タンパク質のモデリング技術、MTS法、MD-MVO法など新規開発・改良した薬物スクリーニング手法を全面的に採用し、市販ソフトを用いていない。 μ オピオイド受容体に対する *in-silico* スクリーニング法によって 200 万化合物から選択された 399 化合物に対して、ヒット化合物 48 種 (12%) が見出され、また膜タンパク質に対する新規阻害剤 (農薬) が 187 種の評価化合物中 23 種 (12.3%) が見出された。

加えて、横浜市大との共同研究によるインフルエンザウイルス RNA ポリメラーゼ PA-PB1 複合体阻害剤として 15 種の化合物の発見など、将来有用となるもの、有用になりうる化合物を、総計 20 個以上を得ることができた。

(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)



4. 2 実績推移

| | (19年度) | 20年度 | 21年度 |
|--------------------|--------|------|------|
| 実績額推移 一般勘定(百万円) | (980) | 838 | 886 |
| 特許出願件数(件) | (0) | 0 | 0 |
| 論文発表数(報) | (16) | 16 | 56 |
| フォーラム等(件) | (15) | 28 | 28 |

※平成19年度の実績は経済産業省事業

5. 事業内容

(1)平成22年度(委託)事業内容

京都大学大学院理学研究科 藤吉好則教授をプロジェクトリーダーとし、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。

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引き続き進める。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を複数個解析する。

(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 の阻害剤を開発したが、驚くべきことにそれ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、3種類の水チャネルにおいて阻害剤アセタゾールアミドの結合に必須のアミノ酸を探索するために、各種変異体 AQP4 を昆虫細胞で発現して、機能と構造を研究する実験を始める。
- ・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 の各種変異体の大量発現を昆虫細胞で試みると共に、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 の発現も昆虫細胞を用いて行う。
- ・イオンチャネルの構造解析を目指して、構造を安定化するためのシステイン変異を導入したナトリウムチャネルの発現を行ったがさらなる安定化のために複数の S-S 結合を形成させる変異体の発現を試みる。
- ・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を探すための実験を引き続き実施する。

②上記①で発現が成功した膜タンパク質の精製を行う 2次元結晶化

- ・水チャネル AQP4 や AQP1 のように速い水の透過機能を持つものと、AQP0 や AQP6、AQP11 のように遅い水透過のチャネルの違いがどこにあるかを解明するため、AQP4 の変異体を中心とした 2次元結晶の作製を目指す。
- ・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 の各種変異体とともに Cx32 の 2次元結晶化を試みる。
- ・イオンチャネルの構造解析を目指して、2重のシステイン変異を導入して構造安定化したナトリウムチャネル、さらに、様々なバクテリア由来のチャネルとそれらのキメラの 2次元結晶化を目指す。

(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カ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引き続き行い、最終目標として掲げる 50Å より高い分解能のトモグラフィー像の取得を目指す。

②電子線回折を撮影できる 2次元結晶の 2Å 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

- ・開発に成功したので、構造解析のシステムをさらに改良して、結晶性の良くない 2次元結晶を用いた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目指す。特に、胃の pH を 1 近くに保つ機能を担う HK-ATPase の中間体の構造解析を目指して効率の高い構造解析が出来るシステムの開発を行う。

③結晶化できない分子や複合体の構造解析を 8Å の分解能で解析できる単粒子解析用プログラムの開発

- ・解析の信頼性に問題があり、このプロジェクトは見直すこととする。すなわち、分解能を追求するより、間違いのない構造解析を目指すこととする。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できるコンピュータプログラムが開発されたが、実際の解析を試みてさらにこれに改良を加える。

(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カ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、及びその複合体の構造解析を引き続き行う。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、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効率の高い構造解析法の開発を行い、HK-ATPase 等の中間体の構造解析を目指す。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す。

具体的には、

- ①水チャネル AQP4 の変異体の高分解能の構造解析
- ②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 の各種変異体の構造解析
- ③シュワン細胞での発現が見られるギャップ結合チャネル Cx32 の構造解析を目指す。
- ④ヒストンと相互作用する転写制御因子複合体の構造を X 線結晶構造解析法により構造解析とその機能と合わせての研究
- ⑤HK-ATPase のプロトンのポンピングサイクルにおける中間体の構造解析

⑥電子線トモグラフィー法で、ギャップ結合や、バキュロウイルスに発現した膜タンパク質などの構造解析

(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（NMR）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) 安定同位体標識タンパク質調製系の確立

本項目に対しては、平成21年度までに前倒しで達成したと判断し、平成22年度以降は実施しない。

(b) 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

- ・昨年度までに開発した交差相関緩和（CCR）法を利用した受容体結合ペプチドの高精度立体構造決定手法の定式化および高度化を行い、多様なペプチド創薬標的受容体複合体系に適用可能な手法としての確立を目指す。
- ・創薬基盤研究としてのNMR解析においては、標的タンパク質と有機低分子化合物の相互作用解析が実施されることが多い。しかしながら、医薬品候補となる低分子化合物は疎水性が高いものが多いことから、実験結果に様々なアーティファクトが生じることがある。このような実験的な曖昧さを軽減するための解析手法を検討する。特に、創薬研究において有効なINPHARAMA法を効果的に利用するための検討を行う。

(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) 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

- ・X線結晶解析法やNMRを用いた従来のタンパク質の構造生物学的解析においては、高い純度のサンプルが必要とされるために、解析タンパク質を抽出・精製した再構成系にて行われている。しかし、多くの生命現象に関わる膜タンパク質やタンパク質複合体は精製の過程で失活しやすく、再構成系では解析の対象とならないため、これらのタンパク質をin situに近い状態で解析することが可能な手法が望まれている。In-cell NMR法は生きたままの細胞をNMR法により観測する手法であり、細胞内に存在する膜タンパク質や機能的タンパク質複合体を対象とした相互作用解析が期待できる。これまでにstreptolysin 0 (SLO)を用いた可逆的な膜透過処理により、安定同位体標識タンパク質を導入し、導入したタンパク質由来のNMRスペクトルの観測する手法を開発している (Ogino et al, (2009) JACS, 131, 10834-10835)。本手法を、細胞内での膜タンパク質や機能的タンパク質複合体との相互作用解析へと応用するためには、より高い効率でタンパク質が導入された細胞を調製することが課題となっている。

よって本研究では、SLOによるタンパク質導入効率を改善し、哺乳細胞内における機能的タンパク質複合体のタンパク質間相互作用様式を解明する新たな手法を

開発することを目指す。

(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)

(d) 創薬標的タンパク質複合体の相互作用解析

- CD44 は一回膜貫通型たんぱく質で、細胞外マトリックスの主成分であるヒアルロン酸 (hyaluronic acid; HA) との相互作用を介し、白血球のローリングや炎症部位への浸潤およびがん細胞の転移に関与している。現在までに、CD44 のヒアルロン酸結合ドメイン (HA Binding Domain, HABD) の HA 結合時および HA 非結合時の NMR 構造が解明された (Takeda et. al., J. Biol. Chem., 2003)。これらの構造解析から、HABD は HA 結合に伴い、HA 結合界面から遠位の C 末端が構造変化しランダムコイル化すること、即ち “0-state” から “PD-state” へ移行することが見出された (Takeda et. al., J. Biol. Chem., 2006)。さらに、HA の有無に拘らず “0-state”、“PD-state” の二状態に由来するシグナルが観測されたため、CD44 HABD は 0-state と PD-state の二状態を常に交換していることが明らかとなった。また、恒常的に PD-state を形成した CD44 HABD 変異体では野生型より HA 結合親和性が約 5 倍程度上昇することも明らかとなった。しかしながら、CD44 HABD が二状態間の構造平衡を有することの意義は明らかでない。

そこで、以上を踏まえて、CD44 HABD の構造平衡を HA 結合親和性の観点および細胞の運動の観点から明らかとすることを目指す。また、本研究において、細胞のローリングや浸潤の機構が構造レベルで解明されれば、CD44 の構造平衡を制御するような化合物、抗体をデザインすることが可能となり、自己免疫疾患に対して、有効かつ副作用の少ない薬の創出が期待できる。これらの薬は、淘汰圧のかかりにくい癌細胞の転移を抑制する抗癌剤となる可能性がある。

- 電位依存性カリウムチャンネル Kv は、膜電位の変化を感受し、脱分極の直後に K^+ を選択的かつ受動的に透過させる膜タンパク質である。Kv チャンネルは神経細胞の活動電位の制御を担う重要な分子であり、遺伝的要因などによってその機能が変調されると、不整脈や神経疾患などの重篤な疾病を引き起こすことが知られている。Kv チャンネルの K^+ 透過活性は、その立体構造が膜電位に応じて変化することによって制御されているため、その機構を解明することは、これらの疾病の治療薬を開発するために重要である。しかしながら、Kv チャンネルの結晶構造はこれまでに膜電位がない状態について報告されているのみであり、その静的な構造からでは、膜電位の変化に伴う構造変化を理解することは困難である。このような状況は、他のイオンチャンネルやトランスポーターを標的とした創薬研究においてもしばしば問題となる。したがって、条件を変化することでカリウムチャンネルの状態を制御し、測定条件に対する制約の小さい溶液 NMR 法を用いてその構造変化様式に関する情報を得ることは、このような問題点に対するアプローチのモデルケースとなると期待される。

そこで本研究では、電気生理学的性質と K^+ 透過路の構造において Kv チャンネルと類似し、そのプロトタイプと捉えられている pH 依存性カリウムチャンネル KcsA を用いて、カリウムチャンネルの動作機構を解明することを目指す。

(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

(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正しく評価するため、動的性質を抽出する手法の開発及び動的構造のデータベース構築を行い、それに基づくタンパク質の動的構造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。平成21年度に開発したFragment Based Drug Development (FBDD) のためのFragment Screening by Replica Generation (FSRG)法の改良と実証実験を行い、より合理的な創薬手法とする。また、活性化化合物の合成展開による活性化化合物情報の取得を迅速に行う方法を検討する。
- ・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行って Coupled folding and binding の問題にアプローチする。さらに、平成21年度に開発した結合エネルギー算出法である分子シミュレーション手法 (SRPG法) の改良とSRPG法が迅速に行われるシステムの開発を行う。

(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) を探索・設計する新しい手法を開発する。特に、平成21年度までに開発した、MD-MVO法を改良・応用し、非ペプチド性化合物探索を試みる。一方、COMBINE法による膜蛋白質 hERG への低分子化合物の阻害予測手法をH21年度までに開発したが、さらにその手法の応用の発展と予測精度を高める。

(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アルゴリズムとプログラムの実装法の開発を行う。特に、分子シミュレーションなどでのタンパク質—化合物相互作用の見積もり手法の高速化の実現を目指す。
- ・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。特にFBDDのためのFSRG法用などに、多数の有望なbuilding blockの分子構造データベースを構築する手法の開発継続とデータベース化を続行する。また、化合物の真空中・有機溶媒中での安定なイオン形、水中での安定なイオン形、メタロプロテアーゼに結合する場合での安定なイオン形を作成し、様々なタイプの標的蛋白質に対して *in silico*スクリーニングが適用できるようにデータベースをさらに拡張する。化合物の物性予測を基礎にした、非特異的活性が期待される分子を除外するなどの手法開発と適用を図る。
- ・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、アクアポリン4 (AQP4) ブロッカー、 μ 受容体 (GPCR) のアゴニスト、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する。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、およ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。
(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) 平成22年度事業規模

| | |
|------|-------------|
| | 委託事業 |
| 一般勘定 | 773百万円 (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

新エネルギー・産業技術総合開発機構（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）を厳守しなければならない。

委託先において、プロジェクトリーダーや各研究開発項目に係わるチームリーダー等を委員とした研究進捗報告会を年1回程度開催する。

(3) その他

本研究開発は、平成19年度は経済産業省が実施した「創薬加速に向けたタンパク質構造解析基盤技術開発」事業について、平成20年度よりNEDO技術開発機構の事業として実施するものである。

7. スケジュール

平成22年 10月 研究進捗報告会の開催

8. 実施方針の改定履歴

- (1) 平成22年3月9日、制定。
- (2) 平成22年4月1日、実施体制変更に伴う改訂。
- (3) 平成22年10月25日、加速予算増額に伴う改訂。

(別紙) 実施体制図

