

平成 23 年度実施方針

バイオテクノロジー・医療技術部

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

2. 根拠法

独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構法第 15 条第 1 項第 2 号

3. 背景及び目的・目標

3. 1 背景及び目的

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

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

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

3. 2 目標

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

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

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

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

なお、研究開発項目毎に目標を設定し、別紙に記載する。

4. 実施内容及び進捗（達成）状況

4. 1 平成 22 年度事業内容

- (1) 研究開発項目<1>「創薬加速に向けたタンパク質構造解析基盤技術開発」(平成 20～24 年度)
京都大学大学院理学研究科教授 藤吉 好則氏をプロジェクトリーダーとして、研究開発を実施した。詳細は別紙 1 を参照。
- (2) 研究開発項目<2>「有用天然化合物の安定的な生産技術開発」(平成 23～24 年度)
平成 23 年 2 月から、当該研究開発項目の実施者を決定するための公募を行った。

4. 2 実績推移

	H20 年度	H21 年度	H22 年度
	委託	委託	委託
実績額推移（百万円） 一般勘定	838	886	773
特許出願数（件）	0	0	0
論文発表数（報）	16	56	53
フォーラム等（件）	28	28	107

5. 事業の内容

5. 1 平成 23 年度事業内容

上記の目標を達成するため、以下の項目について、研究開発を実施する。

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

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

研究開発項目<2>「有用天然化合物の安定的な生産技術開発」(P11002)

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

5. 2 平成 23 年度事業規模

	委託事業	
一般勘定	1, 365 百万円	(継続)

※事業規模については、変動があり得る。

6. 事業の実施方式

(1) 公募

平成 23 年度は研究開発項目< 2 >「有用天然化合物の安定的な生産技術開発」について公募を行う。公募方法、採択方法等については別紙 2 を参照。

7. その他重要事項

(1) 評価の方法

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

(2) 運営管理

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

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

8. 改訂履歴

(1) 平成 23 年 3 月 10 日、制定

(2) 平成 23 年 8 月 23 日、研究開発項目< 2 >のプロジェクトリーダー決定のため、改訂。

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

1. 背景及び目的・目標

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

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

[委託事業]

<最終目標（平成24年度末）>

i) 電子線等による膜タンパク質及びその複合体の構造解析技術

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

- a) 2次元結晶化された膜タンパク質及びその複合体を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立する。
- 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）を確立する。
- 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立する。

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

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

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

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

高精度の *in silico* スクリーニングを実現するため、以下の技術を確立する。さらに i)、ii)

の技術と連携により、産業上有用な化合物を10個以上取得する。

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

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

<中間目標（平成21年度末）>

i) 電子線等による膜タンパク質及びその複合体の構造解析技術

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

- a) 2次元結晶化された膜タンパク質及びその複合体を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) 核磁気共鳴法等による膜タンパク質及びその複合体とリガンド分子の相互作用解析技術

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

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

2. 実施内容及び進捗（達成）状況

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

2. 1 平成 22 年度事業内容

研究開発項目①「電子線等による膜タンパク質及びその複合体の構造解析技術」

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

(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、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、げっ歯類由来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2つのアミノ酸がこの違いを作り出していることを解明した。
- ・ギャップ結合チャネルの複雑なゲーティング機構を解明するために、Cx26 の M34A 変異体の大量発現を昆虫細胞で行って、分解能を向上させることで、プラグや細胞質側の複雑な構造を解明した。
- ・イオンチャネルの構造解析を目指して、様々な電位依存性 Na⁺チャネルのクローニングを行い、それらの機能解析を行った。
- ・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索して安定化できる変異体の組み合わせを解明した。高温でも安定な変異体の作製に成功した。

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、AQPO や AQP6、AQP11 のように遅い水透過のチャネルの違いを高分解能の構造解析とホモロジーモデルなどで解明した。
- ・ギャップ結合チャネルの複雑なゲーティング機構を解明するために、Cx26 の M34A 変異体の分解能を向上させることに成功した。
- ・イオンチャネルの構造解析を目指して、様々な細菌由来の Na⁺チャネルを入手した。
(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、独立行政法人産業技術総合研究所脳神経情報研究部門、国立大学法人京都大学大学院理学研究科、学校法人慶應義塾大学大学院医学研究科)

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

①電子線トモグラフィー用極低温電子顕微鏡の開発

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

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

- ・2Å分解能を超えるような高分解能解析用のシステム開発に成功した。また、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行った。

③電子線トモグラフィー用プログラムの開発

- ・細胞に存在する自然な状態での膜タンパク質及びその複合体の解析のために、粒子ラベルなしでも高分解能の電子線トモグラフィー解析できるコンピュータプログラムを開発した。

(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、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て、複数の膜タンパク質、及びその複合体の構造解析に成功した。さらに、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、例えば、ヒト由来のCx26の野生型の構造を高分解能で解析した。

具体的には、下記の研究成果を上げることが出来た。

- ・水チャンネルAQP4の高分解能の解析によって、X線結晶学では密度図がつかなくなってしまう水チャンネル内の水分子について、8個をきれいに分離して解析することに成功した。また、S180D変異体の水透過性の変化を構造解析と機能解析の両方で行った。さらに、機能解析から、げっ歯類のAQP4の阻害剤に必須のアミノ酸を同定することに成功した。
- ・ギャップ結合チャンネルの複雑なゲーティング機構を解明するために、Cx26のM34A変異体の構造解析の分解能を向上させることに成功した。その結果、閉じたこのチャンネルが異方性を有しており、プラグが2段の構造をとっていることなどを解明した。
- ・電位感受性Na⁺チャンネルの構造を解析するための、多数のチャンネルのクローニングと発現系の確率に成功した。
- ・ヒストンと相互作用する転写制御因子複合体の構造と機能をX線結晶構造解析法などにより解明した。
- ・HK-ATPaseの中間体を固定する化合物を用いて、様々な中間体の構造解析に成功した。
- ・電子線トモグラフィー法で、立体構造解析できるシステムを構築した。 他

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

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

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

昨年度までに開発した交差相関緩和(CCR)法を利用した高分子量標的タンパク質に結合するペプチドの高精度立体構造決定手法の定式化及び高度化を行い、ファージライブラ

リー由来ペプチドリガンド/抗Fasリガンド抗体の相互作用に対して適用した結果、Fasリガンド結合阻害活性を持つ複数種のペプチドリガンドについて抗体結合状態における立体構造を決定することに成功した。またこの過程で得られる交差相関緩和速度の評価法を工夫し、より高精度な角度情報が得られるようにした。

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。特に、創薬研究において有効なINPHARAMA法においては本来生ずるはずの無い原子対間に偽INPHARAMAが生じ、解析が困難となることがある。今回、p38に対するSB203580/SKF86002のINPHARAMA測定をモデルとして、NDSB195を添加することで効果的に偽INPHARAMAを抑制できることを見出した。

(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シナル情報研究センター、国立大学法人東京大学大学院薬学系研究科)

(b) 細胞膜複合体相互作用解析のためのNMR試料調製法の開発、及び細胞膜複合体相互作用解析のためのNMR解析法の開発

細胞内にてNMR観測及び相互作用解析を行う対象として、微小管結合タンパク質であるCLIP-170の微小管結合ドメインCAP-Gly 1 (CG1) を選択し、SLO処理条件の検討、及びHeLa細胞内でのタンパク質相互作用の検出を試みた。

まず、SLOによる膜透過処理を施したHeLa細胞にCG1を導入する際に、5 mM ATP及びHeLa extractを細胞外液に添加することにより、CG1が導入された目的細胞群の割合が上昇することを示した。また、密度勾配媒体を用いた遠心分離を行うことにより、SLO処理によって生じた死細胞を除去することができることを見出した。以上の改善を施すことにより、NMRサンプル管のCG1の実効濃度が25 μ Mから100 μ Mに増加し、得られるNMRシグナルが従来の約3倍に上昇した。細胞内に導入したCG1のNMRスペクトルにおいては、CG1の構造形成領域に由来するシグナルの強度が顕著に減少しており、*in vitro* において微小管と相互作用するCG1も同様のスペクトルパターンを示したことから、細胞内CG1が微小管のような巨大分子と相互作用していることを示した。

本手法に巨大分子との相互作用解析に有用なNMR観測手法であるTCS法を組み合わせることにより、細胞内 CG1の相互作用界面の同定が可能である。また、本手法の適用により試料調製が困難である膜タンパク質や、タンパク質複合体を対象としたリガンドとの相互作用様式の解析に対する貢献が期待できる。

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

(c) 創薬標的タンパク質複合体の相互作用解析

まず、CD44 HABD の構造平衡を偏らせた変異体を作製するため、0-state にのみ観測される相互作用をS-S結合により固定した変異体(CC2)を作製した。また、0-state にのみ観測される相互作用を不安定化する10種類の変異体を作製した。得られた変異体の¹H¹⁵N HSQC スペクトルを測定し、シグナル体積比からPD-stateの存在比を算出した。次に、表面プラズモン共鳴法により各変異体のHA結合親和性を求めた。その結果、0-state に構造を固定された変異体 CC2 では、野生型と比較しHA結合親和性が低下していることが明らかとなった。さらに、横軸にPD-stateの存在比を縦軸

に野生型と比較した HA 結合親和性の上昇率とし、各変異体をプロットした結果、PD-state に平衡が偏るに従い、野生型と比較し HA 結合親和性が上昇することを明らかとした。この結果より、CD44 HABD の O-state は HA 低親和性状態を PD-state は HA 高親和性状態を反映していると結論した。

次に、CD44 HABD の構造平衡の意義を細胞のローリング活性の観点から解析した。まず、内在性の CD44 が存在しないヒト肺がん由来 VMRC-LCD 細胞に野生型 CD44、恒常的に O-state を形成した CC2 変異体、恒常的に PD-state を形成した Y161A 変異体を安定発現する細胞株を調製した。抗 CD44 抗体を用いた FCM 解析より、野生型安定発現細胞、各変異体安定発現細胞ともに、細胞上に同程度の CD44 が発現していることを確認した。調製した細胞を HA を固定化したキャピラリーに還流し、そのローリング活性を測定した。その結果、野生型安定発現細胞は安定にローリングしたのに対し、恒常的に PD-state を形成した Y161A 安定発現細胞では、HA と強く接着し、ローリング活性が顕著に低下することが明らかとなった。一方、CC2 安定発現細胞では野生型と同様にローリングが観測された。そこで、野生型と CC2 安定発現細胞の運動の様子をより詳細に比較するため、フローチャンバーを用いて、ローリング速度、ローリング移動距離を定量的に解析した。その結果、野生型発現細胞では HA と一旦接着すると 10-20 $\mu\text{m}/\text{sec}$ の速度で安定にローリングするのに対し、CC2 発現細胞では HA と接着後も接着と解離を繰り返し移動する様子が観測され、ローリングが安定的に持続しないことが明らかとなった。これらのことから、CD44 を介した細胞のローリングには、CD44 が HA 結合親和性の異なる二状態の平衡にあることが重要であると結論した。

KcsA の直接観測は、Leu, Val, Ile のメチル基を観測するメチル TROSY スペクトルによって行った。KcsA が閉状態を取る pH 6.7 と、活性化状態と不活性化状態の平衡にある pH 3.2 におけるスペクトルを 45°C, 120 mM K⁺存在下にて比較した結果、pH 依存的なスペクトル変化が観測された。pH 3.2 における解析によって、KcsA が温度に依存して存在比を変化させる 2 つのコンフォメーションを取り、その間の構造平衡にあることを明らかとした。さらに、電気生理学的性質が知られている 2 つの変異体のスペクトルと比較することによって、この 2 つのコンフォメーションが活性化状態と不活性化状態に対応することを見出した。次に、各状態間での化学シフト差を解析し、閉状態と活性化状態の間では膜貫通領域全体が、活性化状態と不活性化状態の間では K⁺の選択性を担う selectivity filter 近傍の領域が、それぞれ構造変化することを明らかとした。さらに、K⁺滴定実験及び水分子との NOE 解析によって、selectivity filter は活性化状態において K⁺結合状態、不活性化状態において K⁺非結合かつ水分子結合状態であること、中性条件下の K⁺親和性が酸性条件下と比較して 8 倍程度高いことがわかった。以上の結果から、活性化状態と不活性化状態の間の構造平衡は、K⁺親和性が低下した酸性条件下において、selectivity filter に K⁺及び水分子が結合・解離することによって起こることが明らかとなった。

以上のように本研究では、pH だけでなく、温度、K⁺濃度によって KcsA の状態が制御可能であることを見出し、結晶構造が得られない各状態に関する構造情報を得ることに成功した。本研究で得られた知見をもとに、各状態におけるカリウムチャンネルの構造の違いを特異的に認識する化合物を設計することによって、カリウムチャンネルの活性を制御する新規化合物を創製することができると期待される。

(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)

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及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。これらの手法をまとめて、myPresto version 4.2として、2010年12月に一般に公開した。myPresto version 4.2では、分子動力学シミュレーション、ドッキングソフト、薬物スクリーニングソフト、分子の力場など分子の準備ツールの改良・整備に加え、新たに、タンパク質のリガンド結合ポケット予測ソフト、薬物スクリーニング結果の信頼性評価ツール、溶解度などの物性予測ソフト、新規な類似化合物探索ソフトなどが追加された。これにより、創薬支援ツールとして、薬物スクリーニングに関する一連の機能がほぼ全て盛り込まれたことになる。



Substructure search
化合物の構造類似性に基づいてligand-based drug screeningを行うプログラムです。Ullmannの方法により、低分子リガンドの立位構造に基づいて、類似したサブ構造探索を行います。

TGS: Topological Graph Search (A Similarity Search Using Molecular Topological Graphs)
Molecular Edge マトリクスの固有値に基づき、低分子リガンドの分子の類似性を解析します。(Y. Fukunishi, H. Nakamura, "A similarity search using molecular topological graphs", Journal of Bioinformatics and Biochemistry, Volume 2009 (2009), Article ID 231768)

MD-MVO: Molecular-Dynamics Maximum-Volume Overlap
分子動力学計算により、低分子リガンド同士の間隔のずれが最も大きくなるような位置を考慮することによる、リガンド分子の類似性探索を行います。(Y. Fukunishi, H. Nakamura, "A new method for in-silico drug screening and similarity search using molecular-dynamics maximum-volume overlap (MD-MVO) method", Journal of Molecular Graphics and Modelling, 2008, 27, 629-636)

MoISite: (リガンド結合ポケット探索ツール)
低分子リガンドライブラリーを用いて、それらのリガンドを分子リガンドにドッキングさせることにより、リガンド結合ポケットの探索を行います。(Y. Fukunishi, H. Nakamura, "Prediction of ligand-binding sites of proteins by molecular docking calculation for a random ligand library", Proteo Science, in press)

UAP: Universal Active Probes
ドラッグライクな低分子リガンドライブラリーです。UAPを用いることにより、active compoundsが未知の場合においても、ensemble dockingのためのランダムなライブラリー探索が可能になります。(Y. Fukunishi, H. Otsu, H. Nakamura, "Evaluation of in-silico drug screening results by using universal active probes (UAPs)", Journal of Chemical Information and Modeling, 2010, 50, 1223-1230)

LogS_prediction: (溶解度推定ツール)
分子記述語と溶解度自由エネルギーに基づいて低分子化合物の溶解度(LogS)を推定し、アクリルアミド分子類です。(T. Masuhara, Y. Fukunishi, M. Orita, H. Nakayama, S. Fujita, H. Nakamura, "Oncostatin analysis of regression-solubility relationship by in-silico solubility prediction", International Journal of High Throughput Screening, 2010-1, 99-107)

(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した薬物スクリーニングを行うため、分子動力学シミュレーションを用いて動的性質を抽出する手法を開発した。蛋白質の構造を多数、シミュレーションで発生し、各々の構造に対して、今までに開発してきたMultiple Target Screening (MTS) 法などを適用する。この場合、多数の構造の数だけ薬物スクリーニング結果が生成され、どの結果を用いるかという問題が生じる。我々は、この問題をUniversal Active Probe (UAP) という方法で解決した。UAPは、我々が選んだdrug-likeな低分子化合物の集団である。包括的なスクリーニング試験の結果、真の活性化合物のヒット率は、UAPのヒット率と比例すること、つまり、薬物スクリーニング結果において、上位にUAPが現れる結果は信頼性が高いことを見出した。これにより、既知活性化合物の助けなしに、全く新規な標的に対してもヒット率の高い薬物スクリーニング計算を安定して行うことができるようになった。また、膜タンパク質であるGPCRに対して、半自動で、分子動力学シミュレーションを用いて動的性質を抽出するソフトを開発し、UAPと組み合わせてGPCRのスクリーニング計算を効率的に行う環境を開発した。

- タンパク質構造の発生から、薬物スクリーニングに移行するためには、リガンド結合ポケットを予測する必要がある。我々は、ランダムライブラリーの多数の化合物をタンパク質全表面にドッキングし、最も化合物が結合しやすい場所をリガンド結合ポケットとして予測するMolSite法を開発し、一般に公開した。MolSite法により、従来はポケットの予測は5～7割しか当たらない低い成績であったのが、98%の予測精度へと飛躍的に改善された。また、化合物のドッキングスコアの平均値から、予測されたポケットが創薬に適しているかどうかを、大ざっぱに判定することも可能になった。
- ドッキングのスコアの精度を高めるため、タンパク質及び低分子リガンドの動的構造、及び各種相互作用を考慮した複合体の構造予測法及び結合エネルギー算出法の開発を継続的に実施した。また、マルチカノニカル MD を用いた *ab-initio* な複合体の構造予測法の研究を行い、タンパク質 - 化合物複合体構造が、正しく再現できることを確認した。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) が迅速に行われるシステムの開発を行い、Factor-Xa を標的とし複数の化合物の活性推算に適用した。

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

(b) 構造生理学アプローチによるタンパク質間相互作用解析

- 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・設計する手法として、MD-MVO 法を改良・応用し、非ペプチド性化合物探索を試みた。MD-MVO 法では、分子動力学シミュレーションを用いた 2 分子の重ね合わせを行うが、初期座標発生などに結果が依存する。複数の配座の発生や、分子の重要な部分を重点的に重ね合わせる、スコア関数系の見直しなどの改良を行い、GPCR である μ 受容体の生理活性ペプチドに適用した。

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

(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った。特に、分子動力学シミュレーションの高速化を行い、従来の10倍以上巨大な100万原子以上の巨大な系の計算を可能にし、GPGPUの性能の理論限界に近い従来の約10倍の加速を得ることができた。
- 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できるツール (Hgene) を開発した。それにより、従来ヒット率の悪かったメタロプロテアーゼに対しても *in silico* スクリーニングが適用できるようになった。化合物の非特異的活性は、化合物の溶解度に依存することを見出し、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を開発し、一般に公開した。
- 具体的な創薬実証研究を、本研究の他のチーム、大学や公的研究所、創薬企業等と協力して実施した。具体的には、アクアポーリン4 (AQP4) ブロッカー、 μ 受容体 (GPCR) のアゴニスト、農薬、その他のGPCRなどを対象として、実証研究のためにヒット化合物探索を行った。ターゲットとする蛋白質のモデリング、既知薬物のドッキングテスト、及び本技術開発で開発してきた種々の *in silico* スクリーニングを実施し、実用的なスクリーニング

において、どのようなノウハウで手法を組み合わせれば良いかを検討した。GPCRのモデリング手法では、モデリング作業を半自動化する為の指針が得られたので、自動化ソフトを開発する目途が立った。CHK1、 μ 受容体に対するFSRG法の適用では、市販化合物の多くが、ごく少数の化合物から多数の化合物が合成され、多くの原料化合物が、そのままの形で売られていることが分かった。その為、FSRG法を広範囲で適用すると、安価に購入できるヒット化合物が限定されるなどの問題点が分かった。

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

2. 2 実績推移

	H20年度	H21年度	H22年度
	委託	委託	委託
実績額推移 (百万円) 一般勘定	838	886	773
特許出願数 (件)	0	0	0
論文発表数 (報)	16	56	53
フォーラム等 (件)	28	28	107

3. 事業内容

京都大学大学院理学研究科教授 藤吉 好則氏をプロジェクトリーダーとして、以下の研究開発を実施する。実施体制については別添を参照のこと。

3. 1 平成 23 年度事業内容

研究開発項目①「電子線等による膜タンパク質及びその複合体の構造解析技術」

細胞膜内での生体内に近い状態で膜タンパク質及びその複合体の立体構造を解析するため、以下の基盤技術の開発を引き続き進める。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、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、げっ歯類由来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2つのアミノ酸がこの違いを作り出していることを解明した。それゆえ、ヒト由来の AQP4 において、この2つのアミノ酸をげっ歯類型にする変異体を昆虫細胞で発現して、げっ歯類由来の水チャネルと同じようにアセタゾールアミドが水透過を阻害できるかという確認を行う実験を行う。
- ・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 M34A 変異体の大量発現を昆虫細胞で行って、分解能を向上させることで、プラグや細胞質側の複雑な構造を解明したので、遺伝性末梢神経障害や、慢性進行性筋脱力と筋萎縮などに関わる Cx32 や別のギャップ結合チャネルであるイネキシンなどの昆虫細胞での発現を試みる。
- ・イオンチャネルの構造解析を目指して、様々な電位依存性 Na⁺チャネルのクローニングを行い、それらの機能解析を行ったので、これらの発現を試みる。

- ・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・発現した。この探索により構造を安定化できる変異体の組み合わせを解明したので、結晶化を目指したコンストラクトの探索とそれらの発現を進める。

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 と阻害剤アセタゾールアミドとの複合体の構造解析を目指した 2次元結晶作製を開始。
- ・ギャップ結合チャネルの複雑なゲーティング機構を解明するために、Cx26、Cx32、そして別のギャップ結合チャネルイネキシンなどの結晶化を試みる。
- ・イオンチャネルの構造解析を目指して、様々なバクテリア由来の Na⁺チャネルを入手したので、それらの改変を行うと共に、それらの 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シナル情報研究センター、独立行政法人産業技術総合研究所脳神経情報研究部門、国立大学法人京都大学大学院理学研究科、学校法人慶應義塾大学大学院医学研究科)

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

①電子線トモグラフィー用極低温電子顕微鏡の開発

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

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

2Å分解能を超えるような高分解能解析用のシステム開発に成功し、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行ったので、胃薬の開発のための構造情報を得るために、HK-ATPase とその阻害剤の構造解析を目指して、より高い分解能の構造解析が出来るシステムの開発を開始した。

③電子線トモグラフィー用プログラムの開発

細胞に存在する自然な状態での膜タンパク質及びその複合体の解析のために、粒子ラベルなしでも高分解能の電子線トモグラフィー解析ができるコンピュータプログラムを開発したので、実際のデータでの解析を行うことで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シナル情報研究センター、独立行政法人産業技術総合研究所脳神経情報研究部門、国立大学法人京都大学大学院理学研究科、国立大学法人京都大学大学院農学研究科、独立行政法人理化学研究所播磨研究所)

(c) 電子顕微鏡とX線によるタンパク質構造解析

上記で開発した技術を用いた膜タンパク質、及びその複合体の構造解析を引き続き進める。X線結晶構造解析法を用いて迅速に解析できるタンパク質複合体については、引き続き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より高い分解能での構造解析法の開発を行うことを目指す。実際に、HK-ATPaseと阻害剤との複合

体等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し、具体的には以下の内容を実施する。

- ・水チャネル AQP4 の高分解能の構造解析と機能解析から、げっ歯類の AQP4 の阻害剤の結合に必須の 2 つのアミノ酸を同定することに成功した。それゆえ、AQP4 とその阻害剤との複合体の高分解能の構造解析を実施する。
- ・ギャップ結合チャネルの複雑なゲーティング機構を解明するために、Cx26 の M34A 変異体の構造解析の分解能を向上させることに成功し、閉じたこのチャネルが異方性を有しており、プラグが 2 段の構造をとっていることなどを解明したので、Cx26 や Cx32 の各種変異体やイネキシンなどの構造解析を実施する。
- ・電位感受性 Na⁺チャネルの構造を解析するための、多数のチャネルのクローニングに成功したので、これらの構造解析を試みることで、イオン選択性機構や gating 機構の解明を目指す。
- ・ヒストンと相互作用する転写制御因子複合体の構造と機能を X 線結晶構造解析法などにより解明したので、さらに引き続きこれらの研究を進める。
- ・HK-ATPase とその各種阻害剤との複合体の構造解析を行う。
- ・電子線トモグラフィー法で、立体構造解析できるシステムを構築したので、これらを用いて、イネキシンによるギャップ結合や、脳のコネキシンによるギャップ結合、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を試みる。

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

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

基盤技術開発として、リガンド・標的タンパク質ベース双方からの創薬デザインを実現するための NMR 相互作用解析手法の開発及び細胞膜複合体相互作用解析のための NMR 測定法の開発を行う。具体的には、創薬スクリーニング及びドラッグデザインに供するため、ドラッグ様性質を有した核スピン間の分子間交差緩和速度はリガンド水素とタンパク質水素群との分子間距離に依存することを利用して、生理活性を有する低分子化合物と創薬標的タンパク質の分子間距離を正しく反映する NMR 測定法を開発する。

また、標的タンパク質上のリガンドの結合サイトを迅速に同定することを目的として、無細胞タンパク質発現と部位特異的安定同位体標識を組み合わせることで時間のかかる帰属作業を回避する新規解析手法を開発する。

(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バイオメディシナル情報研究センター、国立大学法人東京大学大学院薬学系研究科)

(b) 細胞膜複合体相互作用解析のための NMR 試料調製法の開発、及び細胞膜複合体相互作用解析のための NMR 解析法の開発

昨年度までに reconstituted HDL (rHDL) を用いて、脂質二重膜中に膜タンパク質を再

構成し、膜たんぱく質の安定性を向上させる技術開発に成功した。本年度は本手法をさらにブラッシュアップすることをめざし、生物学的に重要であるケモカイン受容体を研究対象として研究開発を行う。

ケモカイン受容体CCR1及びCCR5は、Gタンパク質共役型受容体(GPCR)に属する膜タンパク質である。分子量約8 kDaの可溶性タンパク質であるケモカインをリガンドとし、リガンド結合により活性化したCCR1、CCR5は、Giタンパク質へのシグナル伝達を介して白血球の遊走反応を誘起する。CCR1、CCR5は自己免疫疾患など多くの疾病に関与する。またCCR5はHIV-1の共受容体として機能し、そのリガンドはHIV感染に競合する。

CCR1、CCR5は複数のリガンドにより活性化され、それぞれが固有のリガンド選択性を持つ。また、そのリガンドも固有の受容体選択性を持つ。この性質は、生体内において多様な免疫応答が生じる一因と考えられており、各リガンド-受容体の組み合わせが固有の免疫応答を誘起すると示唆されている。したがって、CCR1、CCR5とリガンド間との相互作用において選択性が生じる機構を原子レベルで解明することにより、CCR1、CCR5とリガンドが関与する特定の疾病を阻害する薬剤設計において有用な知見が得られる。

しかしながら、CCR1、CCR5に関する構造生物学的解析を行う上で、試料の不安定性が問題となっていた。そこで、rHDLを用い、CCR1、CCR5に共通するリガンドの一つであるケモカインCCL3を対象とし、CCL3がCCR1、CCR5を特異的に認識する機構を構造生物学的に解明し、rHDL法の高度化を行う。

膜タンパク質や細胞骨格などのタンパク質は、細胞の機能に深く関わっており、これらのタンパク質を構造生物学的に解析することは生命現象の解明にとって重要である。しかし、細胞内タンパク質を細胞から抽出及び可溶化することで、機能に重要なタンパク質の立体構造が失われてしまい、実際に細胞内で機能しているタンパク質の構造情報を得ることができない。そこで、生きた細胞内のタンパク質をそのまま観測するin-cell NMR法が近年注目されている。当研究では、streptolysin O (SLO)を用いた可逆的な膜透過処理によって、哺乳細胞内に安定同位体標識タンパク質を導入し、in-cell NMR測定を行う手法を開発した(Ogino *et al.*, (2009) JACS, 131, 10834-10835)。さらに、昨年度までは、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手法の開発にも成功した。そこで、本年度は、微小管結合蛋白質CLIP-170のCG1ドメインをHelaS3細胞内に導入し、内在性の微小管との相互作用を原子レベルで解析する手法の開発を行う。

(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、国立大学法人東京大学大学院薬学系研究科)

(c) 創薬標的タンパク質複合体の相互作用解析

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は神経細胞の活動電位の制御を担うため、遺伝的要因などによる機能変調は、不整脈や神経疾患などの重篤な疾病を引き起こす。したがって、これらに対する治療薬の開発には、Kvの動作機構の解明が重要となる。KvのK⁺透過活性は、膜電位に応じてその立体構造が変化することにより制御されている。静止電位ではK⁺を透過しない閉状態にあるが、脱分極時にはK⁺を透過させる活性化状態と透過させない不活性化状態と呼ばれる二状態の間を交換し、その交換速度が活動電位の制御に重要であることが示唆されている。しかし、Kvの結晶構造は膜電位がない状態についてしか報告されておらず、その静的な構造からは、各状態間でどの部位の構造がどのような速度で変化しているのかは不明である。このような状況は、他の膜タンパク質を標的と

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、測定条件に対する制約が小さく、時定数を含めて構造変化を解析できる溶液 NMR 法を用いて、カリウムチャネルの構造変化様式を解明することは、他の創薬研究のモデルケースにもなると期待される。昨年度までに、我々は電気生理学的性質と K⁺透過路の構造において K_v 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ネル KcsA が中性では閉状態を取り、酸性では活性化状態と不活性化状態の間の平衡にあることを示した。さらに、活性化状態と不活性化状態は、それぞれ K⁺の選択性を担う selectivity filter に K⁺が結合した状態と、K⁺が脱離し水分子が結合した状態であり、selectivity filter の構造が異なることも明らかとしているが、酸性条件下における両者の交換速度は不明であった。

そこで本研究では、KcsA を用いて、カリウムチャネルの動作機構動的観点からの解明を目的に相互作用解析を実施する。

(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バイオメディシナル情報研究センター、国立大学法人東京大学大学院薬学系研究科)

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

(a) *in silico* ドッキング計算の高精度化

- タンパク質の動的性質を反映した薬物ドッキング・スクリーニングの手法を開発する。ドッキングソフトと分子動力学 (MD) シミュレーションを組み合わせた高速でラフな化合物活性の推算法や NMR 実験情報を組み合わせた手法を開発する。また、活性化化合物の合成展開すべき部位の予測や物性予測など、リード創製を支援する手法を検討する。
- 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。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) をマルチカノニカル MD と組み合わせた複合体予測と活性予測を同時に行う手法や、これら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。MD-MVO 法をタンパク質の場の考慮や NMR 実験情報も反映できるように改良・応用し、非ペプチド性化合物探索を試みる。平成 22 年度に開発した、COMBINE 法は、実用性を高めるように使いやすいツールにまとめる。ペプチドミメティクスの実施例を収集し、このデータベースと MD-MVO 法を組み合わせ運用するシステムを検討する。

(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バイオメディシナル情報研究センター、国立大学法人大阪大学蛋白質研究所)

(c) 創薬開発への応用促進に向けた技術開発

- GPGPU などのアクセラレーターを活用した、計算の高効率化と高速性が発揮できるプログ

ラムの開発を進め、現実的な系への適用を可能にする。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。市販化合物約500万種類に加え、合成可能なバーチャルな1600万化合物のデータベース化も行う。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のデータベース開発への適用を図る。
- ・ 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、及び本技術開発で開発してきた種々の *in silico*スクリーニングを実施し、実用的なスクリーニングにおいて、どのようなノウハウで手法を組み合わせれば良いかを検討しながら手法の確立を目指す。特に、GPCRのホモロジーモデリングの自動化手法の開発を行い、GPCRを標的とした薬物スクリーニングが、容易に高い精度で行えるように環境を整備する。

(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バイオメディシナル情報研究センター、国立大学法人大阪大学蛋白質研究所)

3. 2 平成23年度事業規模

	委託事業	
一般勘定	1, 076百万円	(継続)

※事業規模については、変動があり得る。

4. その他重要事項

(1) 評価の方法

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

(2) 運営・管理

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

5. スケジュール

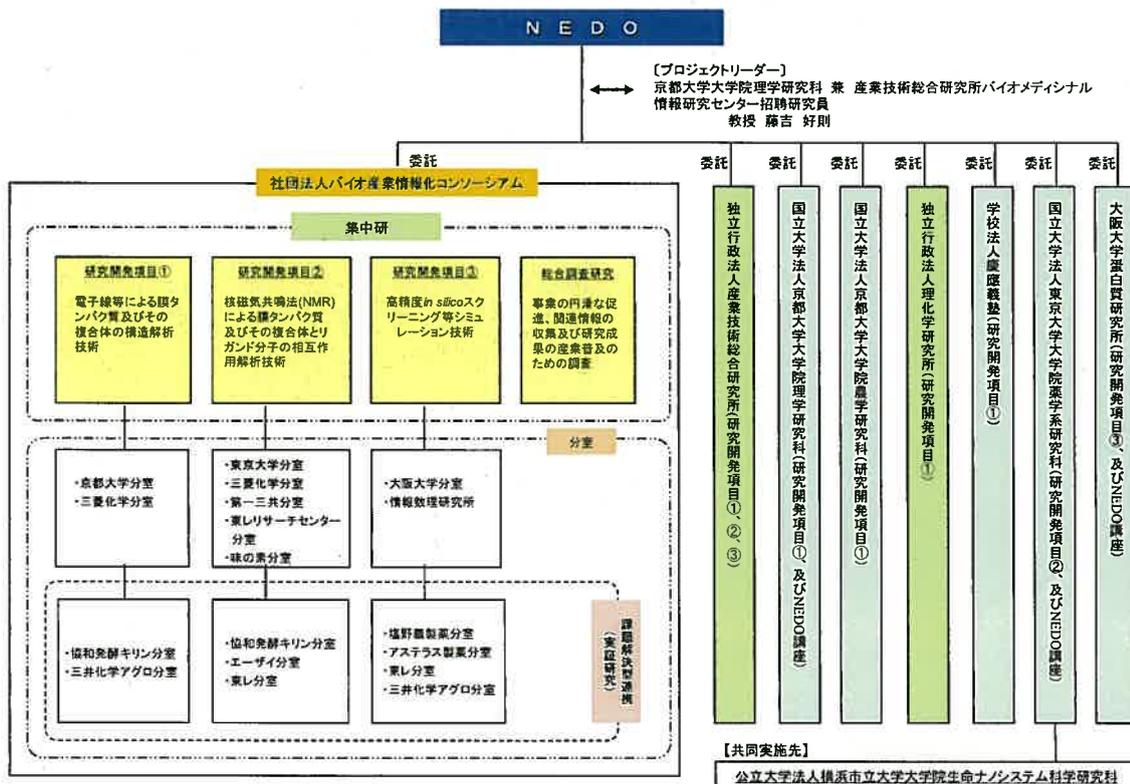
(1) 研究開発推進委員会の開催

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

(別添) 事業実施体制の全体図

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

研究開発項目<1>「創薬加速に向けたタンパク質構造解析基盤技術開発」研究開発体制図 (H23年度)



研究開発項目<2>「有用天然化合物の安定的な生産技術開発」(P11002)

1. 背景及び目的・目標

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

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

[委託事業]

<最終目標（平成 24 年度末）>

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

2. 事業内容

公募により研究開発体制を構築するとともに、公募結果を踏まえて独立行政法人産業技術総合研究所バイオメディシナル情報研究センター 新家一男氏のもと、以下の研究開発を実施する。

2. 1 平成 23 年度事業内容

(1) 生合成遺伝子クラスターライブラリーの構築

放線菌が生産する広範な天然化合物リソースから、大きく複数に分類される化合物群の代表的な化合物を選抜するとともに、製薬企業が興味を持つ構造及び活性がユニークな天然物由来の化合物候補を選抜し、これらの天然化合物の生合成遺伝子クラスター情報の取得を開始する。これらの生合成遺伝子クラスターの正確なシーケンス情報を解読すると共に、化合物と生合成遺伝子に対応づけるデータベースを構築し、類縁化合物の生合成遺伝子を探索するツールの開発につなげる。また、本情報を基に生合成遺伝子クラスターのライブラリーの作製とその技術開発を行う。

(2) 安定生産技術の開発

天然物を生産する機能に長けた放線菌株を宿主とし、これら多種多様な天然化合物の生

合成遺伝子クラスターを導入し、実際のスクリーニングに適用可能な生産性を目標に生産させる技術の開発に着手する。安定的な生産が可能な天然物と困難なものを体系的に整理し、生産が困難なものについてはその原因を解明し、生産の改善に取り組む。

2. 2 平成 23 年度事業規模

	委託事業	
一般勘定	289百万円	(新規)

※事業規模については、変動があり得る。

3. 事業の実施方式

平成 23 年度から新規に研究開発を行うため、以下により公募を行い、適切な実施者を選定の上、委託により事業を行う。

3. 1 公募

(1) 掲載する媒体

「NEDO ホームページ」及び「e-Rad ポータルサイト」で行う。

(2) 公募開始前の事前周知

公募開始の 1 ヶ月前に NEDO ホームページで行う。本事業は、e-Rad 対象事業であり、e-Rad 参加の案内も併せて行う。

(3) 公募時期

平成 23 年 2 月に実施予定。

(4) 公募期間

原則、30 日間とする。

(5) 公募説明会

公募開始後 2 週間以内に開催する。

3. 2 採択方法

(1) 審査方法

- ・ e-Rad システムへの応募基本情報の登録は必須とする。
- ・ 事業者の選定・審査は、公募要領に合致する応募を対象に NEDO が設置する審査委員会（外部有識者で構成）で行う。審査委員会（非公開）は、提案書の内容について外部専門家（学識経験者、産業界の経験者等）を活用して行う評価結果を参考とし、本事業の目的の達成に有効と認められる事業者を選定した後、NEDO はその結果を踏まえて決定する。
- ・ 申請者に対して、必要に応じてヒアリング等を実施する。
- ・ 審査委員会は非公開のため、審査経過に関する問合せには応じない。

(2) 公募締切から採択決定までの審査等の期間

45日間とする。

(3) 採択結果の通知

採択結果については、NEDO から申請者に通知する。なお不採択の場合は、その明確な理由を添えて通知する。

(4) 採択結果の公表

採択案件については、申請者の名称、研究開発テーマの名称・概要を公表する。

4. その他重要事項

(1) 評価の方法

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

(2) 運営・管理

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

5. スケジュール

(1) 公募

以下のスケジュールにより公募及び審査を行い、適切な実施者の選定を行う。

(公募スケジュール)

平成23年2月14日	・・・公募開始
2月21日	・・・公募説明会
3月15日	・・・公募締切
4月6～11日	・・・事前審査(外部有識者による審査)
4月26日	・・・契約・助成審査委員会
4月28日	・・・採択決定・公表(ホームページ掲載)

(2) 研究開発推進委員会の開催

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

(別添) 事業実施体制の全体図

研究開発項目< 2 > 「有用天然化合物の安定的な生産技術開発」

