

健康安心イノベーションプログラム  
「ゲノム創薬加速化支援バイオ産業基盤技術開発/  
創薬加速に向けたタンパク質構造解析基盤技術開発」  
(事後評価)

2008年度～2012年度 5年間

プロジェクトの概要【公開】

NEDO

バイオテクノロジー・医療技術部

2013年11月18日

1

発表内容

公開

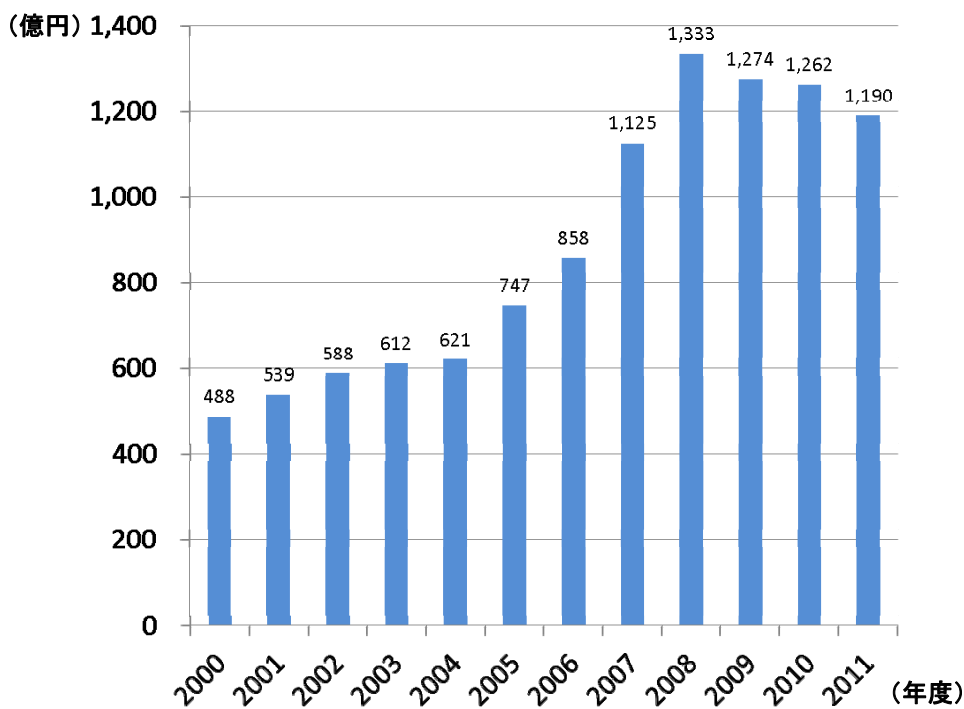
1. 事業の位置付け・必要性 (1)NEDOの事業としての妥当性  
(2)事業目的の妥当性
2. 研究開発マネジメント (1)研究開発目標の妥当性  
(2)研究開発計画の妥当性  
(3)研究開発実施の事業体制の妥当性  
(4)研究開発成果の実用化に向けたマネジメントの妥当性  
(5)情勢変化への対応等
3. 研究開発成果 (1)目標の達成度と成果の意義  
(2)知的財産権等の取得  
(3)成果の普及
4. 実用化に向けての見通し及び取組み (1)成果の実用化の見通し  
(2)実用化に向けた具体的取組み

2

## 事業の背景

- 創薬における研究開発費が増加の一途をたどる一方で、新薬承認数は伸び悩んでいる。
- 研究開発費に占める臨床試験費の急激な増加により、創薬シーズ(創薬標的、医薬品リード化合物)探索のための基礎研究に投じる予算が圧迫されていることが一因として挙げられる。

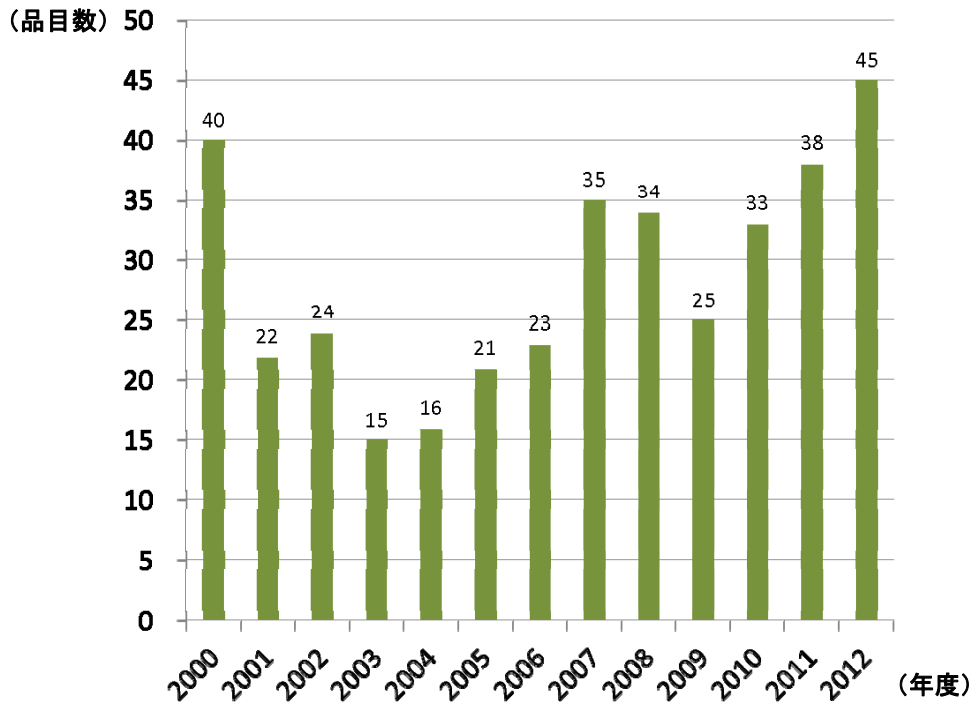
国内1社あたり研究開発費の年次推移(上位10社平均)



1. 事業の位置付け・必要性  
 (1)NEDOの事業としての妥当性

公開

国内の新規有効成分含有医薬品(NME)承認数の年次推移



事業原簿 13頁

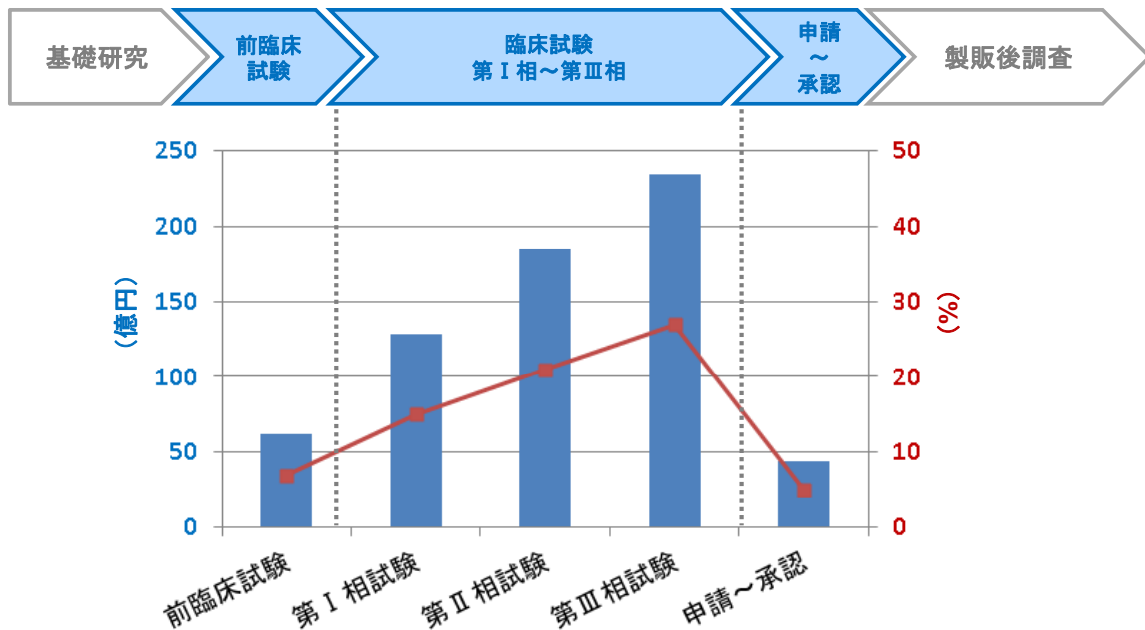
政策研ニュースをもとに作成

5

1. 事業の位置付け・必要性  
 (1)NEDOの事業としての妥当性

公開

1品目あたりの各ステージにおける研究開発費と総研究開発費に占める割合



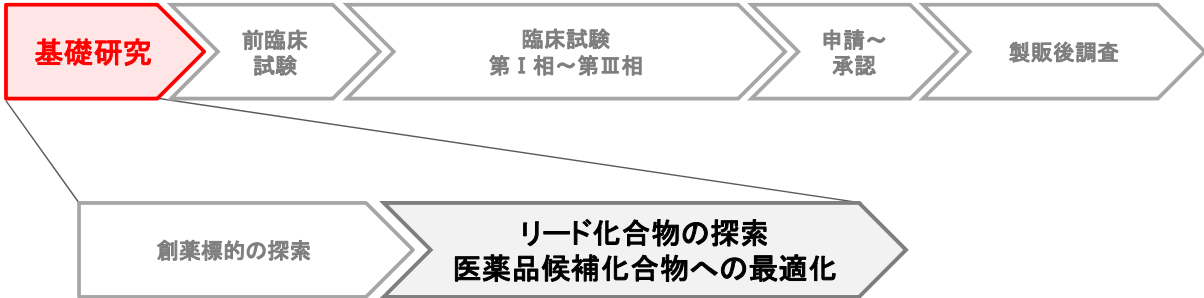
事業原簿 13頁

Nature Rev. Drug Discovery (2010)をもとに作成

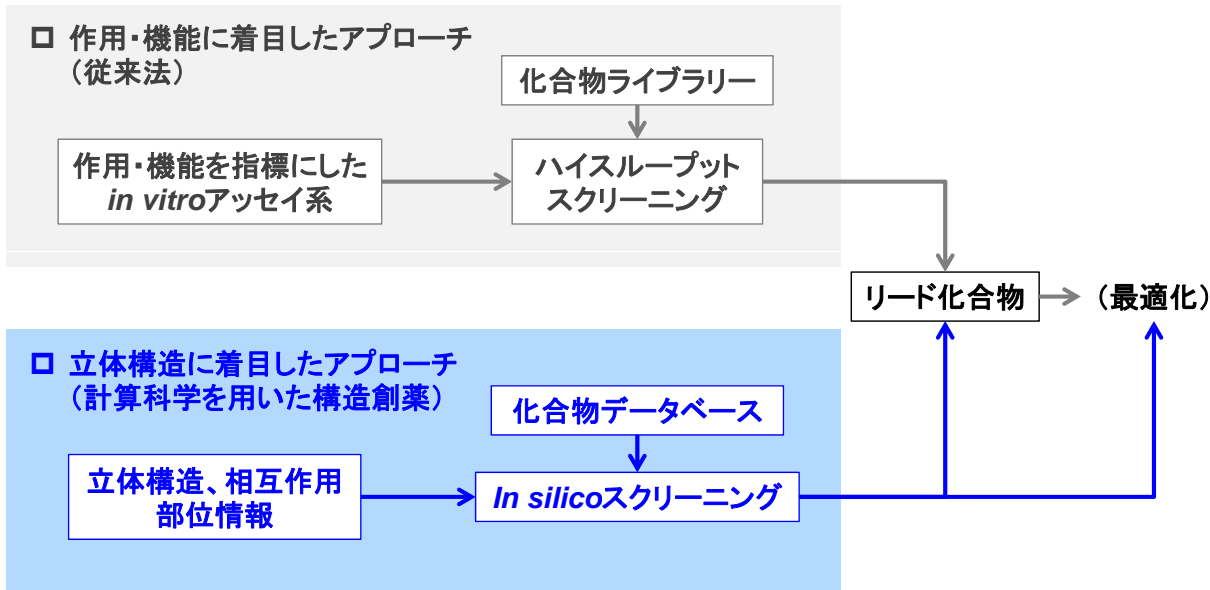
6

医薬品開発における課題

- 前臨床試験以降は、薬事承認を取得するために必須となるデータを集積するために、レギュレーションに従って実施するものなので、ここに要する費用を節約することはできない。
- 企業の限られた研究開発費を考えると、必然的に基礎研究にまわす費用が圧迫されることになる。
- 効率的な基礎研究を実現するために、産学連携は喫緊の課題と言える。



リード化合物の探索、医薬品候補化合物への最適化に至るアプローチ



## 研究開発の動向

### 計算科学を用いた構造創薬(1/3)

- 1980年代より計算科学を医薬品開発に活用する研究が進められ、2010年代に入って医薬品開発における計算科学の活用は世界的な趨勢となってきた。
- その背景には、コンピューター性能の向上もさることながら、タンパク質立体構造情報、化合物データベースの充実、シミュレーションの高度化等により、コンピューターによる医薬品設計の精度が飛躍的に高まったことが挙げられる。本年のノーベル化学賞は、コンピューターによるタンパク質分子シミュレーションに貢献があったマーティン・カープラスら3名に与えられ、計算科学の社会への貢献が認知されたと言える。
- 研究開発費、とくに臨床試験に要する費用が増大の一途をたどる状況を考えると、基礎研究段階での費用を抑えるためにも、計算科学に依存する度合いが益々大きくなることは必至と言える。

### 計算科学を用いた構造創薬(2/3)

- 米国では、産業競争力強化に向けて、米国内の大手企業が協力して計算科学による構造創薬の支援体制を作り、大手IT企業からの支援も受けて、構造創薬専用のスーパーコンピューター“ANTON”が開発されている。
- “ANTON”は、一時期、国家戦略により禁輸品に指定され、米国製薬企業の独占的な利用体制を形成していた。
- 現在禁輸措置は解除され、さらに米国Pittsburgh Supercomputing Centerに設置されたANTONの利用を国内外の研究機関に提供しているが、非営利目的の利用に制限されている。

計算科学を用いた構造創薬(3/3)

- 計算科学による創薬を支援するソフトウェアも開発されており、代表的なものとして、シュレーディンガー社製(米国)、アクセルリス社製(米国)およびCCG社製(カナダ)が挙げられるが、いずれも企業ニーズを十分に満たす性能を有しているとは言い難い。
- 計算科学の精度は創薬標的タンパク質の立体構造情報の精度に依存しているため、計算科学手法と併せて、高精度のタンパク質立体構造解析技術の確立は必須である。

## 事業の目的

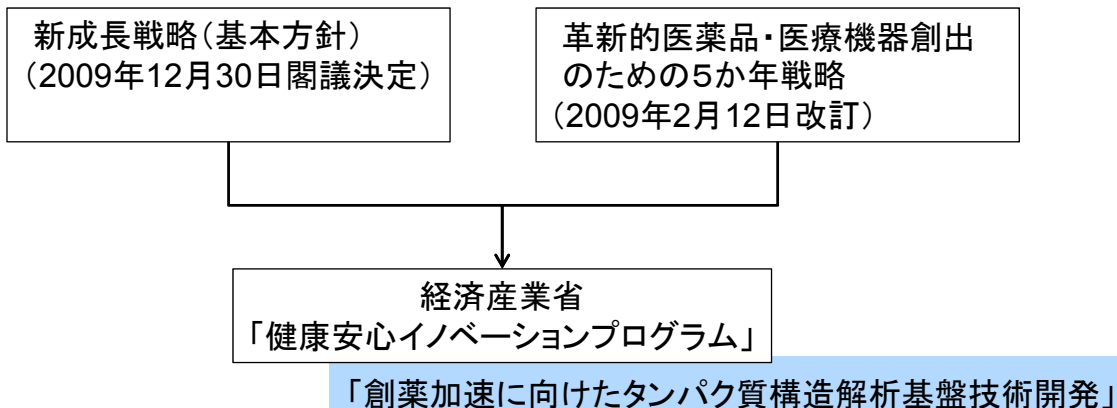
- 精緻なタンパク質立体構造情報に基づく計算科学を用いて構造創薬を行うための汎用的な基盤技術・ツールを開発し、創薬研究の効率化・リスク低減を実現することにより、我が国バイオ産業の競争力強化・国際的優位性を確保することを目的とする。

## NEDOが関与する意義

- 構造創薬のための汎用的な基盤技術・ツールの開発は、構造生物学、薬学、物理学、情報工学等の多様な分野の研究者で構成される研究体制により実現されるものである。
- このような研究開発を民間企業単独で実施することは困難であり、産学連携体制を構築して推進する必要がある。
- そのために、本事業をナショナルプロジェクトとしてNEDOが実施することには意義があると言える。

## 事業の位置付け

### 政策的位置付け



1. 事業の位置付け・必要性  
(1)NEDOの事業としての妥当性

公開

「健康安心イノベーションプログラム」における位置付け



事業原簿 13頁

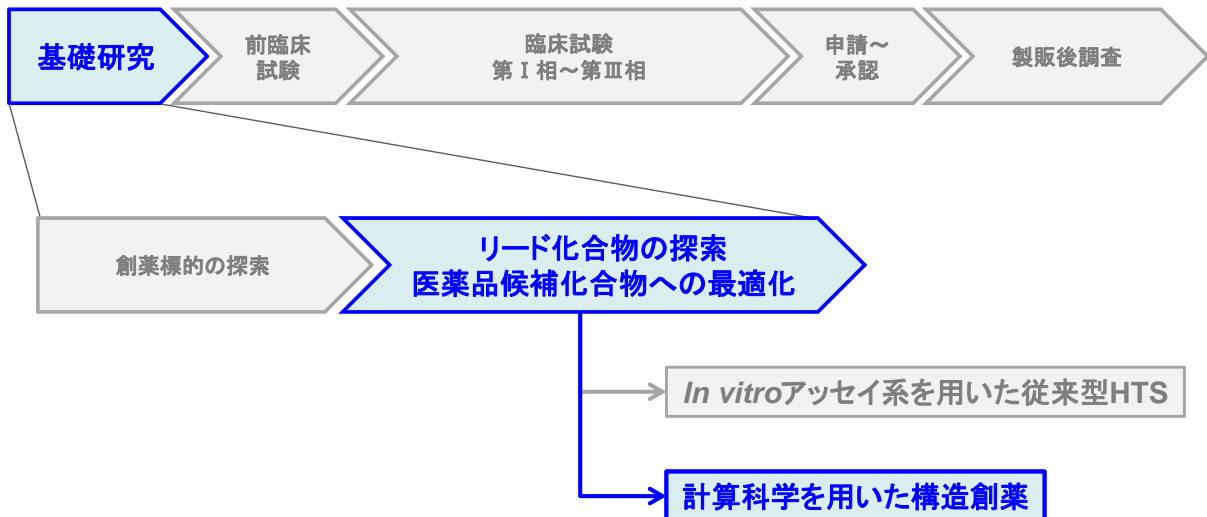
15

1. 事業の位置付け・必要性  
(2)事業目的の妥当性

公開

事業の概要

創薬プロセスにおける位置付け

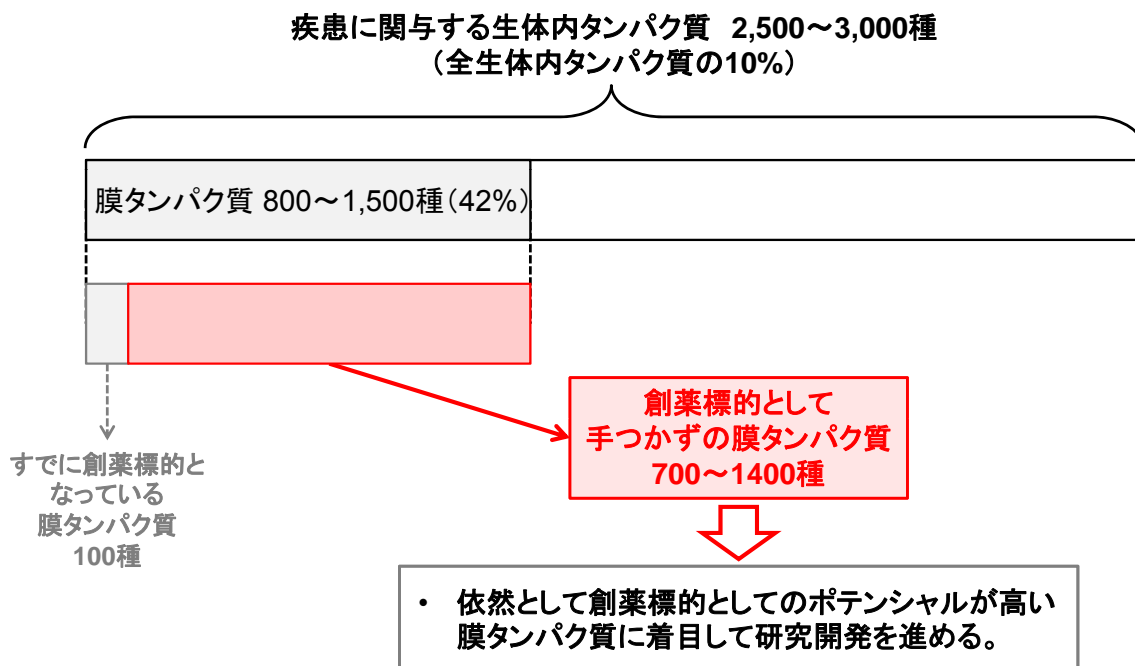


事業原簿 16頁

16



対象とする創薬標的タンパク質



事業の目標

- ・ 従来型のハイスループット型ランダムスクリーニングに取って替わるものではなく、**従来法と相補的に、もしくは従来法の適用が困難な創薬標的**にも活用できる創薬基盤技術の開発を目指す。
- ・ **創薬標的タンパク質の精緻な立体構造情報に基づいたコンピュータシミュレーション**により医薬品リード化合物を効率的に設計するための要素技術を確立する。

事業の特徴

- ・ 創薬標的としてのポテンシャルが依然として高い**細胞膜タンパク質**を中心に研究開発を進める。
- ・ スーパーコンピュータではなく、民間企業レベルで保有できるコンピュータに適用可能な**汎用性のある高精度シミュレーションソフトウェア**の開発を目指す。

## 実施の効果

### 計算科学を活用して開発された代表的な医薬品

一般名(商標)	適応症	開発元
オセルタミビル(タミフル)	インフルエンザ	ロシュ
セレコキシブ(セレコックス)	消炎・鎮痛	ファイザー
ドルゾラミド(トルソプト)	緑内障	メルク
エシタロプラム(レクサプロ)	うつ病	ルンドベック
イマチニブ(グリベック)	慢性骨髄性白血病	ノバルティスファーマ
ダサチニブ(スプリセル)	慢性骨髄性白血病	ブリistol・マイヤーズ
ニロチニブ(タシグナ)	慢性骨髄性白血病	ノバルティスファーマ
ボルテゾミブ(ベルケイド)	多発性骨髄腫	ヤンセンファーマ
ゲフィチニブ(イレッサ)	肺癌	アストラゼネカ
エルロチニブ(タルセバ)	肺癌	OSIファーマシューティカルズ
クリゾチニブ(ザコーリ)	肺癌	ファイザー
ラパチニブ(タイケルブ)	乳癌	グラクソ・スミスクライン
スニチニブ(スーテント)	消化管間質腫瘍、腎細胞癌等	ファイザー
ソラフェニブ(ネクサパール)	腎細胞癌、肝細胞癌	バイエル
パンデタニブ(ザクティマ)	甲状腺髄様癌	アストラゼネカ

事業原簿 14頁

19

## 研究開発項目の設定

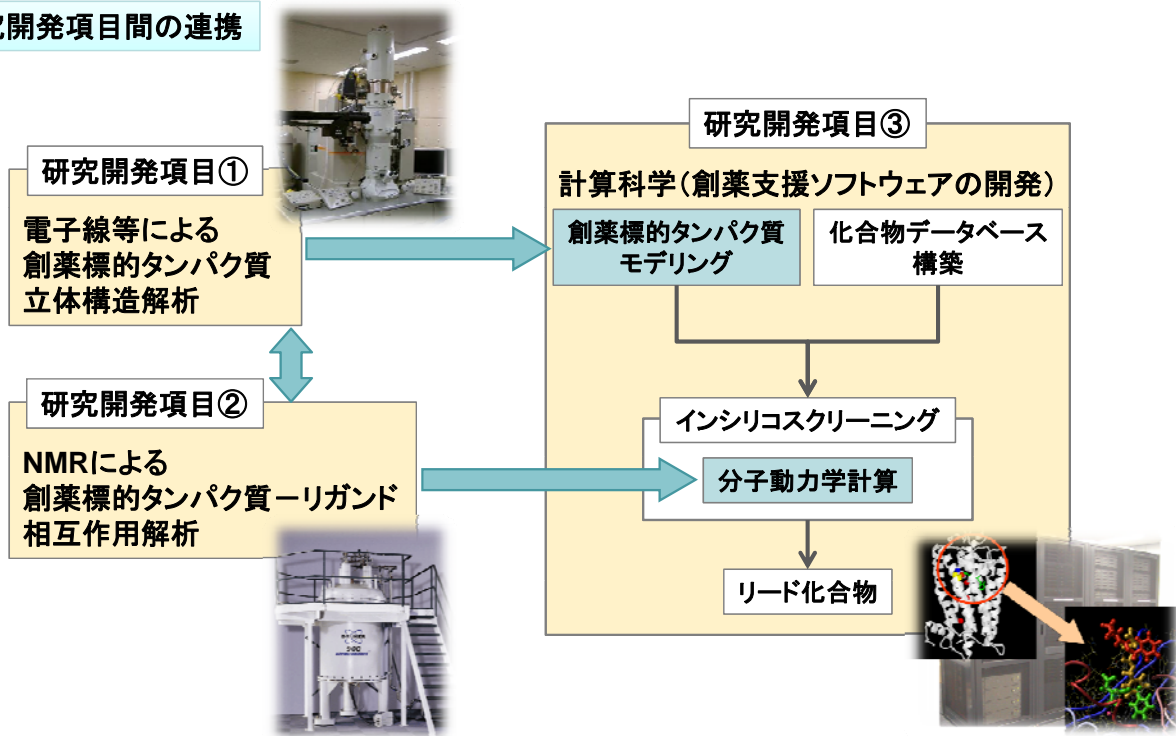
- 事業の目的を達成するために、以下の研究開発項目を設定した。

研究開発項目①	電子線等による膜タンパク質およびその複合体の構造解析技術
研究開発項目②	核磁気共鳴法(NMR)等による膜タンパク質およびその複合体とリガンド分子の相互作用解析技術
研究開発項目③	高精度 <i>in silico</i> スクリーニング等のシミュレーション技術

事業原簿 15頁

20

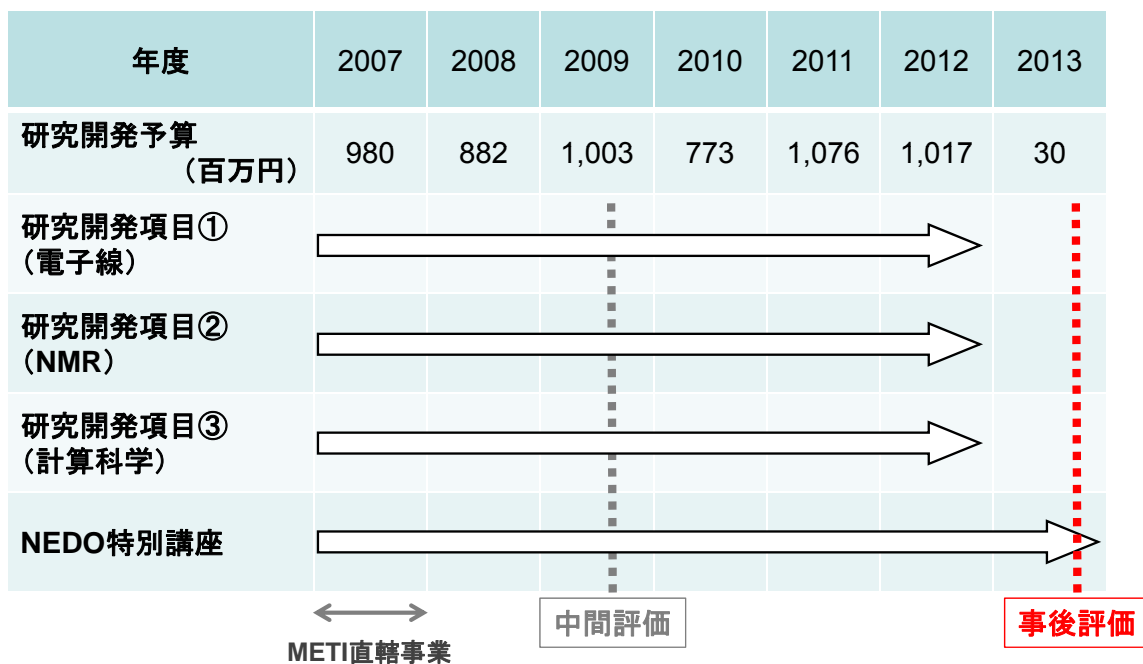
研究開発項目間の連携



研究開発項目毎の最終目標と設定根拠

	最終目標	設定根拠
研究開発項目① (電子線)	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。	創薬標的となるヒト由来膜タンパク質の構造を生体内に近い状態で解析する技術の確立が望まれる。そのためには、少数の例外を除いて、発現系の確立は必須である。開発基盤技術の有用性を確認するためには、複数個の解析例が必要である。
研究開発項目② (NMR)	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、以下の技術を構築する。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。	核磁気共鳴法によるヒット化合物探索および創薬作用点解析では、生理的条件下で行われることが特徴である。その特徴を最大限生かすためには、安定同位体標識法および精密距離測定法などの技術確立および検証が必要となる。
研究開発項目③ (計算科学)	高精度の <i>in silico</i> 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、研究開発項目①、②の技術との連携により、産業上有用な化合物を10個以上取得する。	計算機による <i>in silico</i> スクリーニングの精度の低いことがボトルネックとなっている。新たなアルゴリズムに基づくプログラムやデータベースの開発を行い、合理的なスクリーニング結果からその性能を実証するため、10個以上の取得例が必要である。

### 研究開発のスケジュールと予算



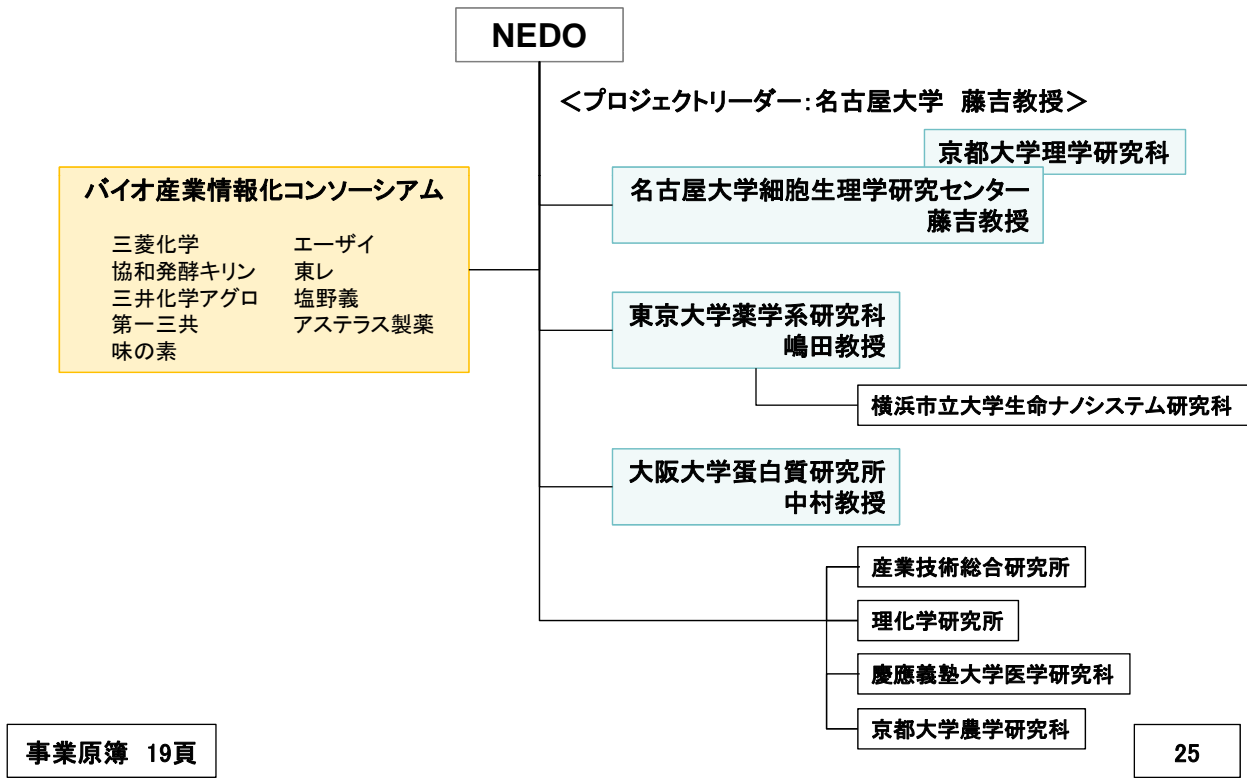
#### 研究開発予算の内訳

(単位: 百万円)

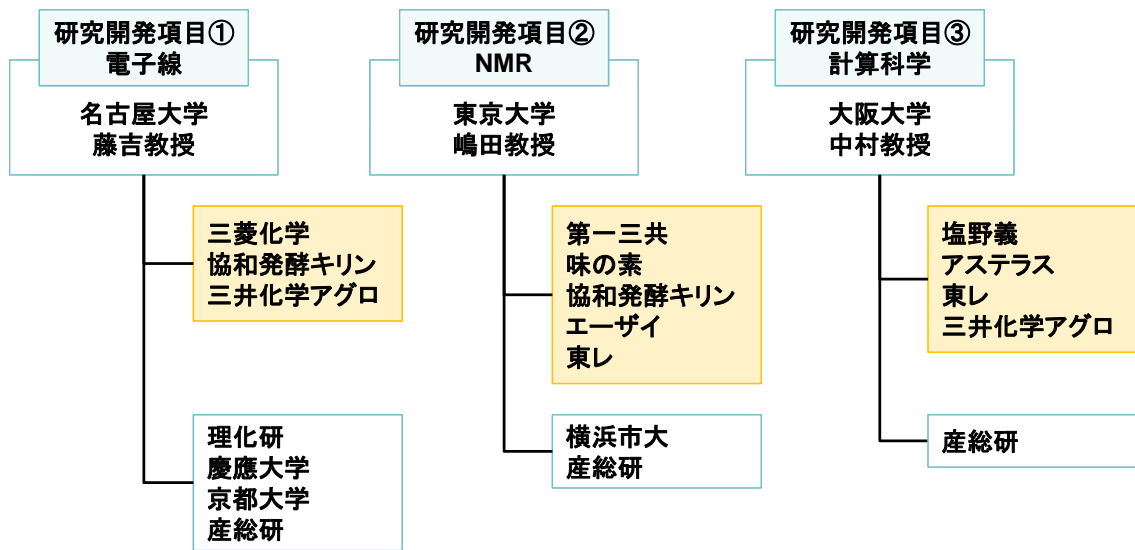
年度	2007*	2008	2009	2010	2011	2012	2013	総額
一般会計	980	882	933	603	1,076	97	0	4,571
開発成果 創出促進	0	0	70	170	0	920	30	1,190
<b>総額</b>	<b>980</b>	<b>882</b>	<b>1,003</b>	<b>773</b>	<b>1,076</b>	<b>1,017</b>	<b>30</b>	<b>5,761</b>

\* 2007年度は経済産業省直轄事業として実施。

研究開発の実施体制



研究開発項目別の実施体制

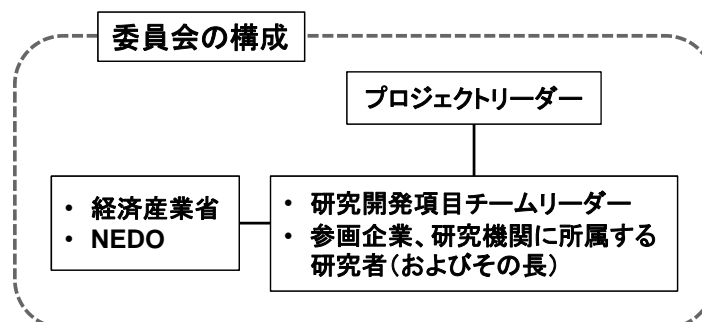


## 知財管理

- 「独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構新エネルギー・産業技術業務方法書」第25条の規定等に基づき、原則として、全て受託先に帰属させるものとする。
- 社団法人バイオ産業情報化コンソーシアムにおいては、知財に関する規約を定め、実用化に向けた戦略を踏まえて参画企業の権利範囲を明らかにした上で、参画企業とアカデミアの共同で特許出願することを原則としている。

## 研究開発の運営管理

- 研究推進委員会の設置  
プロジェクトリーダー藤吉教授を委員長とする研究推進委員会を、以下を目的に年1回開催した。
  - ・ 研究開発項目間の連携強化
  - ・ 研究開発の進捗・成果の共有
  - ・ 企業サイドの意見集約と研究内容・方針の見直し



## 開発成果創出促進財源投入実績

時期	金額 (百万円)	情勢	成果
2009年12月	70	研究開発項目①で、膜タンパク質の新たな構造体を発見し、その解析を急ぐ必要があった。	電界放出型走査電子顕微鏡の導入により、構造解析を達成した。
2010年4月	120	本プロジェクトの成果・ノウハウの普及には、継続したトレーニング・教育システムの構築が必要であった。	前年度に引き続き、大学院生、社会人を対象としたNEDO特別講座を開講した。
2010年10月	50	研究開発成果の汎用性を高めるためには、低分子リガンドも対象にした相互作用解析技術を確立する必要があった。	表面プラズモン共鳴装置の導入により、低分子リガンド-タンパク質間相互作用解析が可能になった。
2012年4月	920	当該年度の一般会計予算が大幅に削減された。	計画通りに研究開発を遂行した。
2013年4月	30	本プロジェクトの成果・ノウハウの普及のために、プロジェクト終了後もトレーニング・教育システムを継続する必要があった。	大学院生、社会人を対象としたNEDO特別講座を継続している。

## 中間評価結果への対応(2009年8月実施)

評価コメント	対応
本プロジェクトの成果を生かした創薬加速の実績をある程度示すべく、何らかの公表できる方法を検討して欲しい。	μオピオイド受容体を標的とした鎮痛・鎮静薬のリード化合物を計算科学により効率的に取得した事例をプレスリリースした。
膜タンパク質として産業界に大きな影響を与えるようなターゲットをさらに見つけ、世界に先駆ける構造解析をしてもらいたい。	癌に関わる創薬の標的となる可能性の高いGPCRの1つの構造を世界に先駆けて解析した。また、GPCRのダイナミックな機能構造を解析して、論文として世界に先駆けて発表した。
また、今後のハードウェアの動向を踏まえ、将来を見据えた並列化技術の開発に取り組んでもらいたい。	新しいアルゴリズムに基づく分子動力学計算プログラムを開発するとともに、高並列化への応用を行った。

## プロジェクトとしての達成状況

- 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、および計算科学技術を確立し、創薬標的タンパク質の立体構造に基づく医薬品リード化合物の効率的な探索を実現する創薬基盤技術を開発した。
- 創薬標的タンパク質の大量発現系、試料調製法等、従来の創薬手法にも活用できる要素技術を確立した。

## 研究開発項目毎の成果と目標達成状況



## 研究開発項目①

### 「電子線等による膜タンパク質およびその複合体の構造解析」

事業原簿 25頁

33

## 目標達成状況

公開

最終目標	成果	達成度
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。	細胞膜内での生体内に近い状態での膜タンパク質の立体構造を世界最高の分解能で解析するための技術を開発した。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3個以上解析した。	◎
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を開発する。また、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。	2次元結晶化された膜タンパク質及びその複合体を水や脂質分子が観察できる2Åより高い分解能で構造解析する技術を確立した。結晶化できない膜タンパク質の構造を8Åより高い分解能で解析する技術(単粒子解析)を開発したが、問題も存在する。	○
b) 細胞膜内において自然な構造の状態で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ー等により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。	細胞膜内において自然な構造の状態で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ー等により30Åより高い分解能で3次元構造解析する技術を確立した。	◎
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。	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10個以上を解析した。	◎

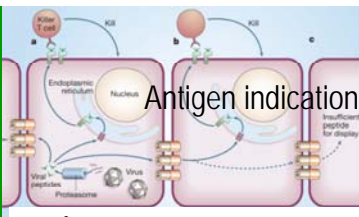
◎:目標以上、○:目標通り、△:目標以下

34

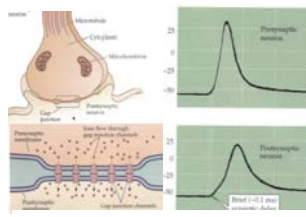
代表例: コネキシン26;; 筋萎縮、難聴などの病気と関連⇔創薬への情報提供



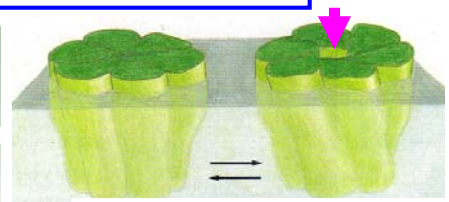
心筋細胞が同期して動く



ペプチド、ヌクレオチド、cAMP、IP3、イオン、アミノ酸



電気シナプス: 速い応答



これまでの教科書のモデル

複雑なゲーティング機構、膜電位、Ca<sup>2+</sup>、リン酸化、pH

Sf9細胞での発現系確立



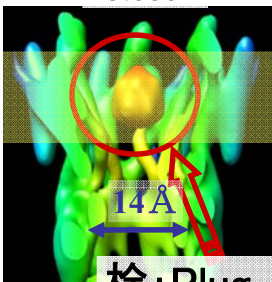
ヒト由来の膜タンパク質Cx26の  
発現系確立・精製・結晶化・解析

Plugモデル提案

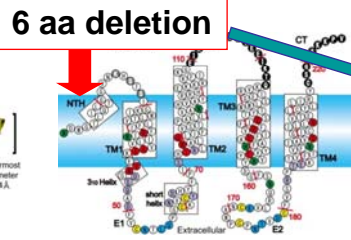
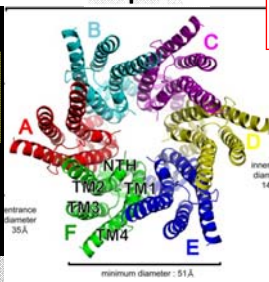
PNAS, 104, 10034-10039 (2007)  
Nature, 458, 597-602 (2009)  
J. Mol. Biol., 405, 724-35 (2011)

Close

Open

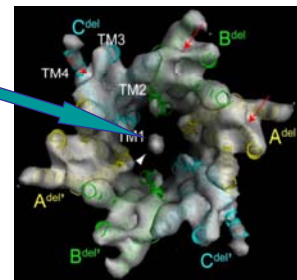


栓: Plug

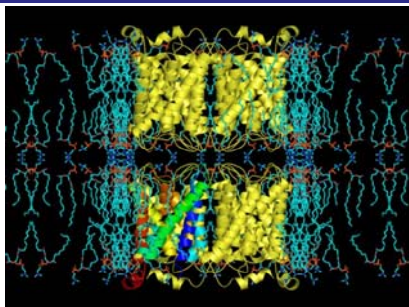


6 aa deletion

PlugはN末で形成



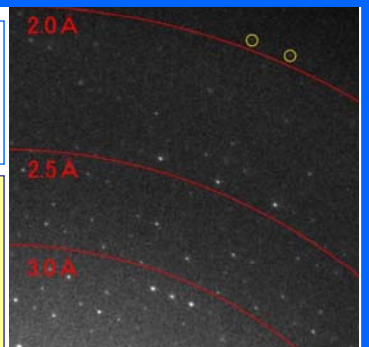
35



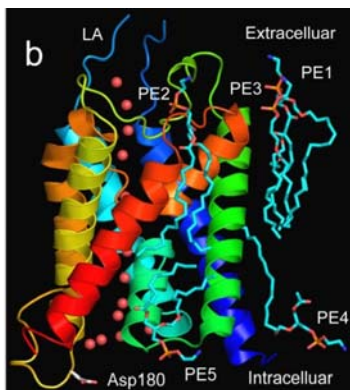
Nature, 438, 633-638 (2005)

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

AQP0のように特別良い結晶でないAQP4の2Åより高い分解能のデータ収集と解析を可能に

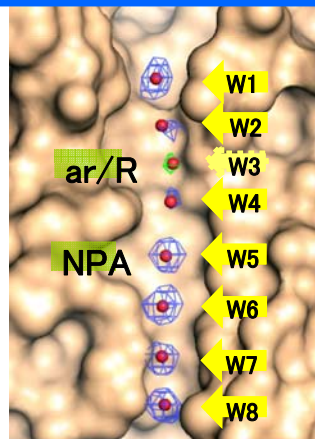


全ての脂質分子可視化

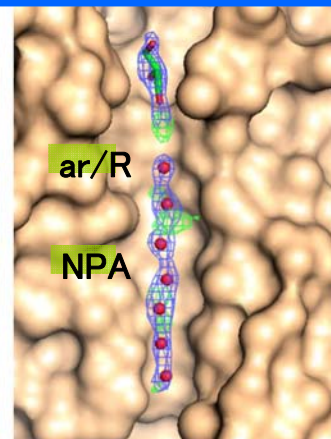


水分子も脂質分子も分離して観察

X線結晶学の1.8 Åで分離できない水分子を明瞭に分子して観察

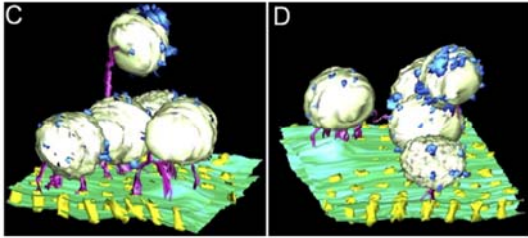


膜内で8個の水分子を分離



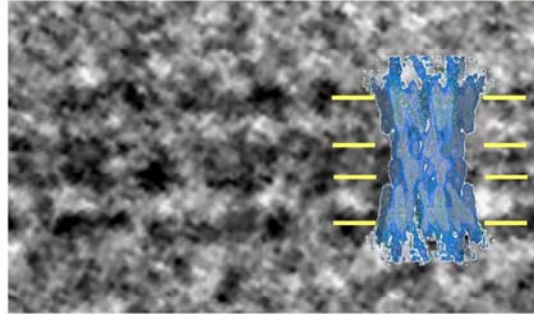
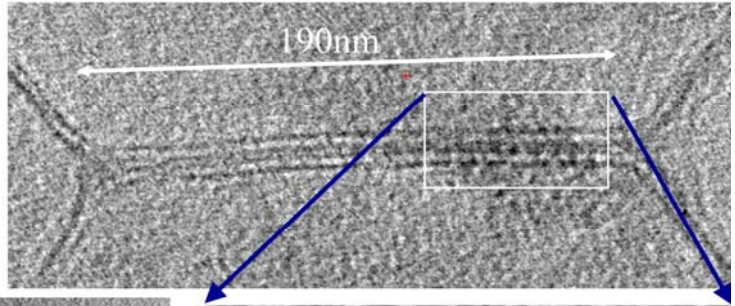
ミセル中で水分子の分離不良

J. Mol. Biol., 389, 694-706 (2009) JD Ho et al., PNAS 106, 7437-42 (2009)



ザリガニのギャップ結合

J. Struct. Biol., 175, 49-61 (2011)



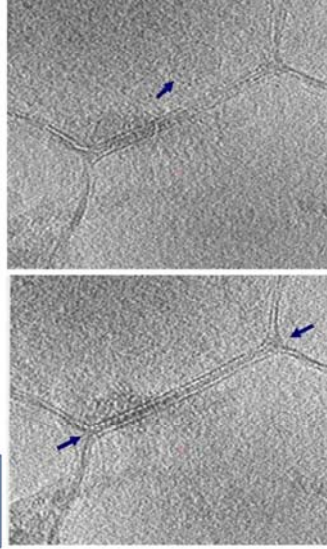
Slice image of cryo-tomography

ラットの前脳から得た  
ギャップ結合

37



Tomography by 7<sup>th</sup> G cryo-EM

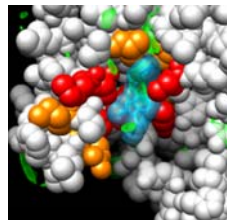


ストレスの多い社会



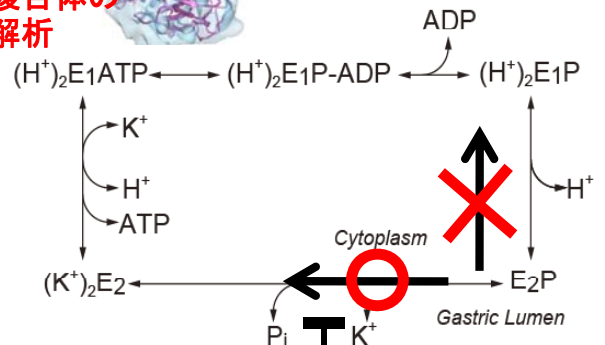
胃薬は2兆円の市場: 特許切れの時期

β-subunitのN末端が“Ratchet”として働く

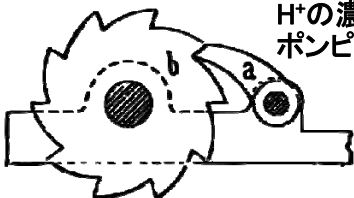


ポンプのプロッカー  
SCH28080  
Inhibitor  
複合体の  
解析

中性条件では1個のATP分解で2個のH<sup>+</sup>をポンピングできるがpH4より酸性では1個



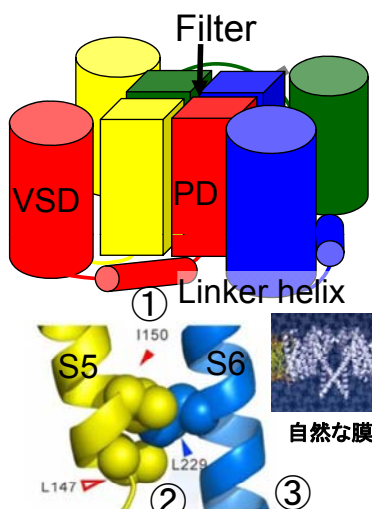
H<sup>+</sup>の濃度を100万倍の濃差にまで  
ポンピングできる機構解明



PNAS, 109, 18401-6 (2012)  
Nature Comm. 1154, 1-7 (2011)  
EMBO J 28, 1637-43 (2009)

SCH28080  
K<sup>+</sup>-competitive  
antagonist

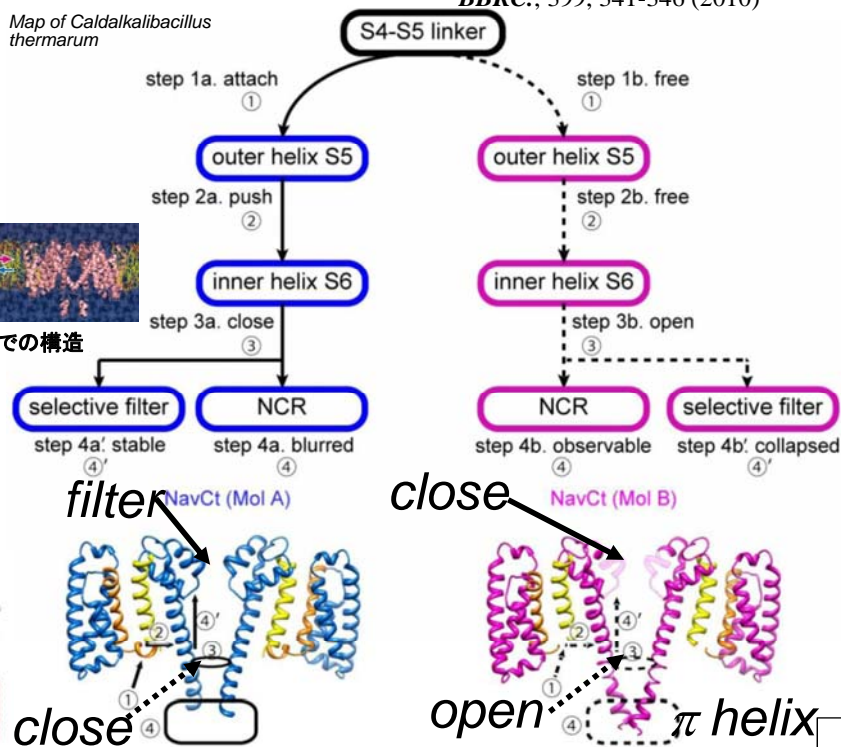
38



麻酔薬などの標的  
*J. Mol. Biol.*, 425, 4074-88 (2013)  
 Map of *Calcdalkalibacillus*  
*thermarum*

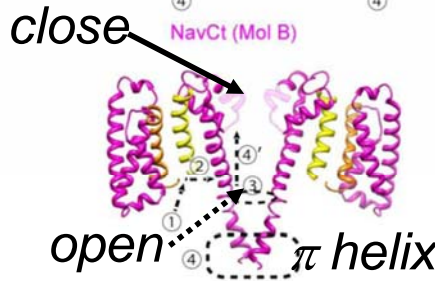
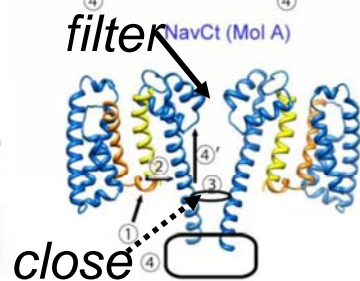
*Nature Comms.*, 3, 793 pp1-8 (2012)  
*J. Biol. Chem.*, 286, 7409-17 (2011)  
*J. Biol. Chem.*, 285, 3685-3694 (2010)  
*BBRC.*, 399, 341-346 (2010)

自然な膜内での構造



	239	240	241	242	243	244	245	246	247	248	249	250	251	252	253	254	255
NavCt	V	S	N	V	E	R	A	T	I	R	A	G	O	I	G	O	R
NavAb	V	D	N	A	I	N	G	I	L	T	I	V	Q	S			
NachBac	V	N	V	E	K	S	L	T	N	R	L	G					
NavSheP	V	N	M	T	S	L	H	A	L	T	O	K	Q				
NavBp	V	N	V	E	K	N	L	K	S	L	L	K					
NavBacL	V	N	A	Q	K	S	O	I	L	G	T	G	L				
NavRosD	V	N	M	D	A	H	Q	A	G	I	Q						
NavSuP	V	N	M	Q	D	H	H	A	T	T	R						
NavSiP	V	N	M	Q	D	H	H	A	T	T	R						
NavPz	V	N	S	M	Q	D	H	H	A	T	T	R					

Negative Charge Region  
 NCR ④



研究開発項目①の成果と実用化

電子線等による膜タンパク質およびその複合体の構造解析

ソフト部分の開発目標と結果、実用化の見通し

- <目標> 膜タンパク質及びその複合体の構造解析に必要な発現・精製技術、結晶化技術の開発
- <結果> ヒト等真核生物由来の膜タンパク質の発現・精製結晶化技術を開発
- <実用化> 本技術を製薬企業等が活用して「課題解決型」共同研究が進展

ハード部分の開発目標と結果、実用化の見通し

- <目標> 電子線トモグラフィー用極低温電顕の開発や高分解能解析用プログラム等の開発
- <結果> 第7世代の極低温電顕や高分解能解析用システムを開発
- <実用化> 第8世代の極低温電顕開発や開発技術の移転が進展

構造解析の目標と結果、実用化の見通し

- <目標> 電子顕微鏡とX線による膜タンパク質構造解析基盤技術開発と実際に複数の構造を解析
- <結果> 膜タンパク質の2桁の構造を解析 (含未発表: 発表した構造は12個)
- <実用化> 「構造に指南された創薬基盤技術」として活用が進展

## 研究開発項目②

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

事業原簿 89頁

41

## 目標達成状況

公開

最終目標	成果	達成度
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、以下の技術を構築する。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。	6個の膜タンパク質等創薬標的タンパク質を解析した。	◎
a) 解離定数がmM~ $\mu$ Mと結合力が弱いリガンド分子の結合構造の解析技術の確立を行う。	親和性が弱いリガンドと受容体間の距離を正確に見積もることができるNMR測定法を開発した。	◎
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確立する。	不均一系膜タンパク質再構成系のスペクトルが従来法と比較して6倍の高感度に達した。	◎
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。	タンパク質複合体モデル作成に役立つNMR測定法を開発した。	◎

◎: 目標以上、○: 目標通り、△: 目標以下

42

独創的基盤技術の開発

生物学的重要な系へ基盤技術の応用

独創的方法の開発とさらなる発展

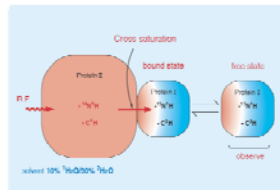
交差飽和法:高分子量蛋白質複合体の高精度相互作用解析法



Nature Struct. Biol. (2000)

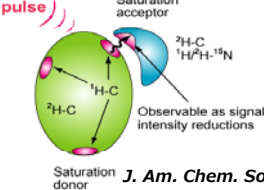
- 従来法と比較して高い精度で相互作用部位決定
- 日本初の独創的NMR測定法
- 国内外100を超える実施例
- Protein NMR Spectroscopyなど代表的なNMRの教科書に取り上げられている。

転移交差飽和法:NMRにおける分子量の壁を越えた相互作用解析法



J. Mol. Biol. (2002)

アミノ酸選択的交差飽和法:複合体モデル形成のためのNMR測定法



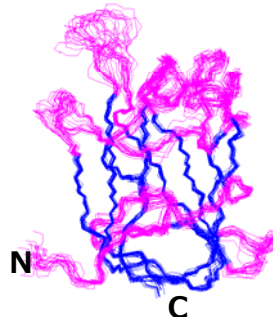
J. Am. Chem. Soc. (2008)

研究開発項目間の共同研究

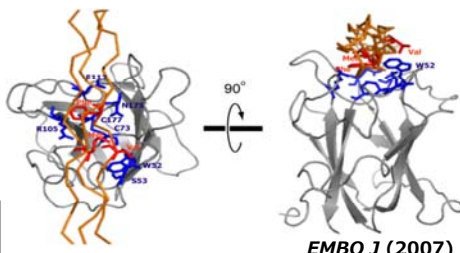
アミノ酸選択的交差飽和法および計算科学に基づくタンパク質複合体モデル構造構築法の開発 (研究項目③との共同研究)

Proteins (2010)

DDR2 : コラーゲン受容体、腫瘍細胞に多く発現 浸潤・転移に関与している。



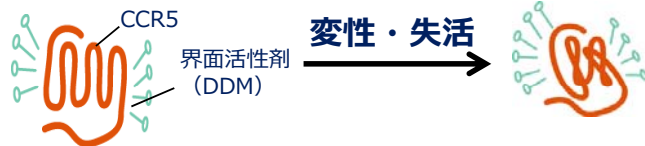
NMR法による立体構造決定



DDRのコラーゲン認識機構を解明

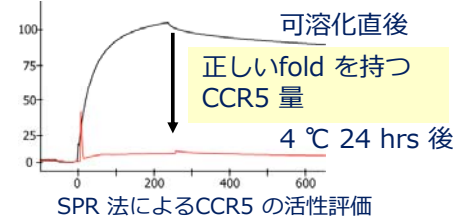
rHDL を用いた CCR5 の安定化およびMIP-1α 認識機構の解明

問題点 : CCR5 は可溶化状態では非常に不安定である。



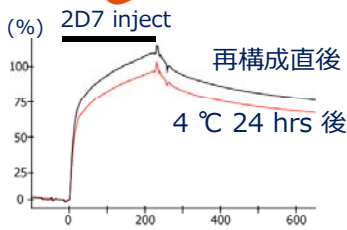
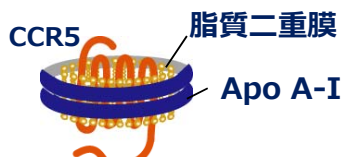
可溶化状態ではCCR5 の構造生物学的解析を行うことができない。

(%) CCR5 構造認識抗体(2D7)のinjection



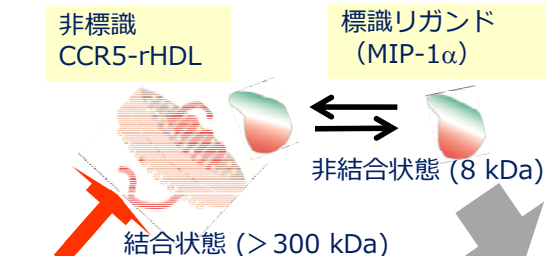
SPR 法によるCCR5 の活性評価

解決策 : rHDL への CCR5 再構成法の確立

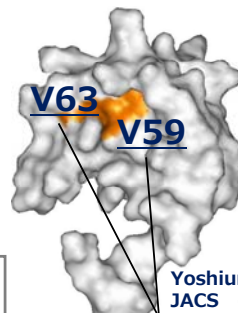


rHDL 再構成によりCCR5 の安定性が10 倍程度向上した。

転移交差飽和法による、MIP-1α上のCCR5 結合部位決定



- ラジオ波の照射による (-1H) の飽和
- 受容体結合により、リガンドに飽和が伝播
- 解離状態のリガンドを NMR観測



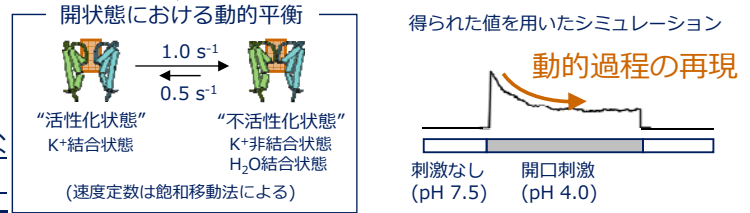
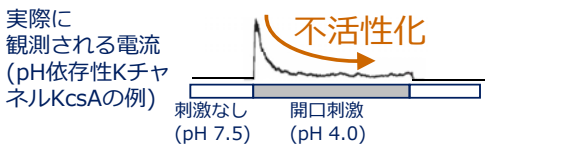
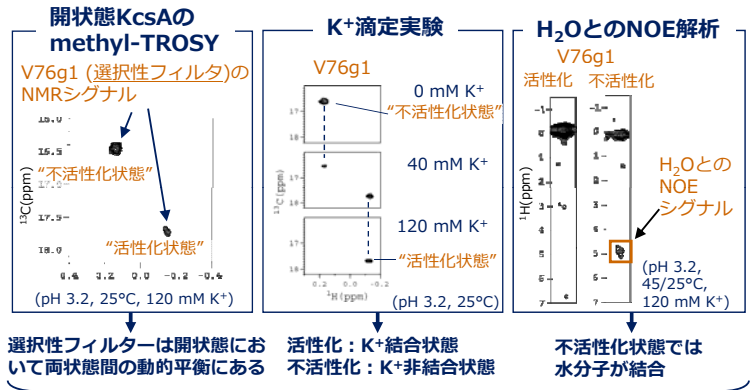
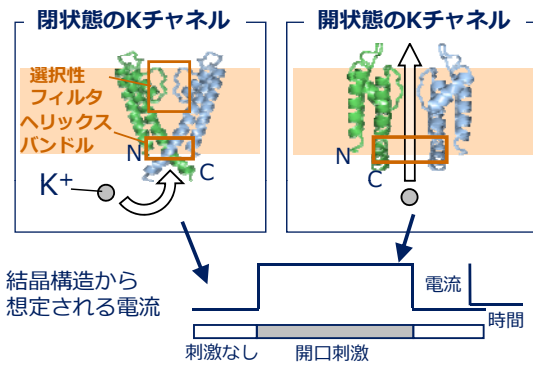
新たに決定した CCR5 結合残基

評価 : これらの成果は本年度イタリアで開催された国際会議 EUROMAR/ISMAR で、'Advance in BioNMR' として紹介された。また、現在、国内製薬メーカー3 社の研究員が本手法を学ぶために来室している。

背景: Kチャネルの結晶構造

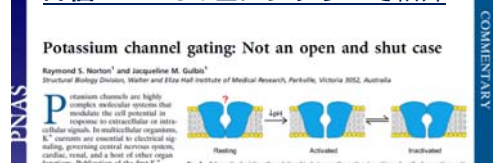
解決策: NMR法による動的構造の解析

Imai et al., PNAS (2010)



問題点: 結晶構造解析から得られる静的な構造では、チャネル機能を説明できない。

評価: PNASのコメンタリーで紹介



2状態の動的平衡を具体的かつ定量的に記述することに成功 → 各状態を標的とする低副作用薬の創製へ展開

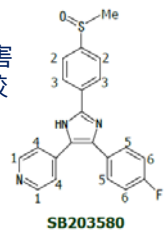
"The work makes a significant advance by providing direct NMR evidence for structural changes in the selectivity filter of KcsA"

NMRを用いた新規エピトープ解析法の開発

背景: STD (saturation transfer difference) 法は標的タンパク質・リガンド相互作用においてエピトープを決定する方法としてよく用いられている。

しかし、標的タンパク質からの緩和の影響により距離情報の定量性が乏しく、エピトープの同定精度が低い。

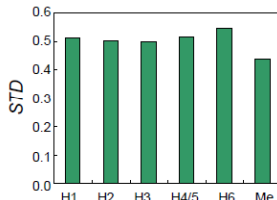
適応例: 開発した測定法をMAPKp38と阻害剤SB203580に適したところ、従来法と比較して、より高い精度で標的タンパク質・リガンド間距離情報が得られた。



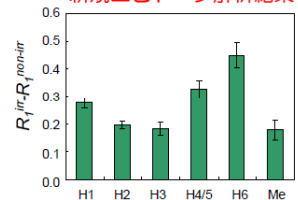
Angew. Chem. In Ed Engl. (2012)

解決策: 標的タンパク質にラジオ波を照射しスペクトル測定し、かつ非照射のものとの差を取り、標的タンパク質・リガンド間の影響を排除する。

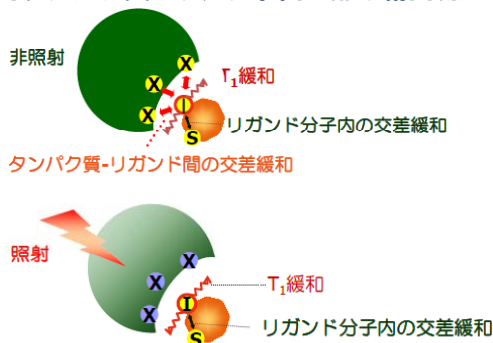
従来法 (STD)による解析結果



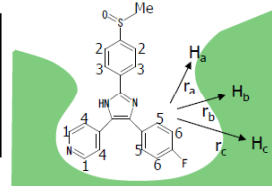
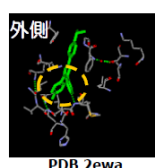
新規エピトープ解析結果



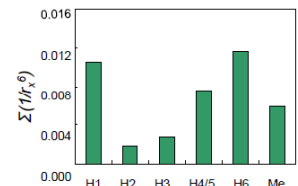
標的タンパク質・リガンド間距離の精密測定



リガンドから10Å以内のプロトンまでの距離 r の6乗分の1の総和



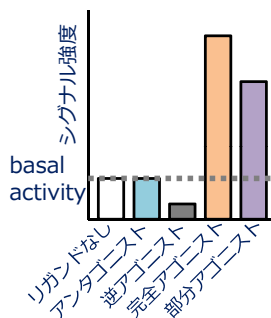
X線座標からの計算結果



中村チームにより本情報を組み入れた新規ドッキングプログラムを開発

背景:

Gタンパク質共役型受容体 (GPCR) は、一般の受容体と異なり、多段階のシグナル伝達活性を示す。



GPCR は、リガンド非結合状態でも、弱いbasal activityを持つ。また、シグナル伝達活性の異なるアゴニストが存在する。

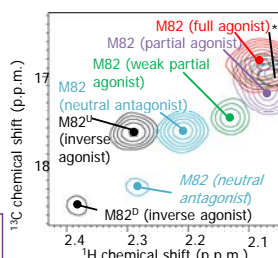
問題点:

昆虫細胞は活性を有したGPCRの発現に適しているもの、安定同位体標識が難しい。

解決策:

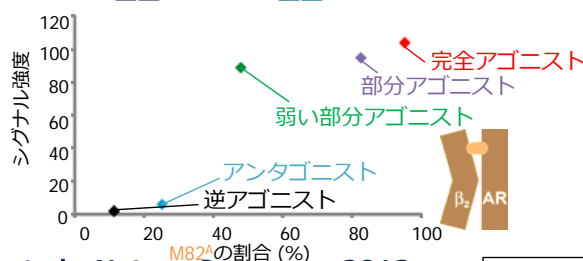
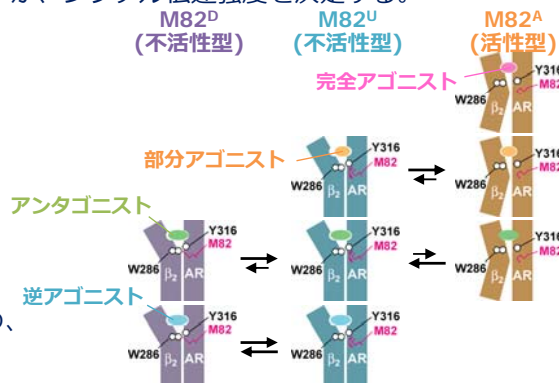
<sup>13</sup>C標識メチオニンが、代謝や他の培地成分による希釈の影響を受けず、効率良く取り込まれるような、培地組成および培養方法を確立する。

各リガンド結合状態における、GPCRのメチオニン残基選択標識体NMRスペクトル



結果:

代表的なGPCRであるβ<sub>2</sub>アドレナリン受容体は、活性型と不活性型の動的構造平衡状態にあり、結合するリガンドにより交換速度や量比が異なる。活性型の量比が、シグナル伝達強度を決定する。



Kofuku et al., Nature Commun., 2012

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」



最終目標	成果	達成度
高精度の <i>in silico</i> 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、研究開発項目①、②の技術との連携により、産業上有用な化合物を10個以上取得する。	高精度の <i>in silico</i> スクリーニング技術を開発し、業界標準であるソフトウェアに対する優位性を確認した。その手法により、 $\mu$ オピオイド受容体アゴニストや農業のシードとなる化合物、インフルエンザウイルスRNAポリメラーゼPA-PB1複合体阻害剤など、有用な化合物を総計30個以上得た。	◎
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精度で計算できる新しい計算科学手法を確立し、 <i>in silico</i> スクリーニングの効率を従来法に比べ10倍程にあげる。	アンサンブル・ドッキング法や結合自由エネルギー計算の新しい方法を開発し、新規手法でのヒット率は、通常の0.1%~1%のオーダーのヒット率に比較し10倍以上となった。	◎
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倍程度上げる。	標的タンパク質の動的モデルや機械学習法を組み合わせた18~20倍の効率を得た。hERGチャネル阻害活性予測は、従来法の7.9倍の選択性を得た。	◎
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)を得る一般的な手法を開発し、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。	タンパク質間相互作用予測法を開発し、国際blindコンテストで良い成績をおさめ、NMR実験情報を加えた高い信頼性の複合体構造予測手法を確立した。生理活性ペプチドから非ペプチド性の新規薬物を得る手法を確立し、実証実験を行って細胞レベルのアクセシにおいて新規アゴニストを多数取得できた。	◎

◎: 目標以上、○: 目標通り、△: 目標以下

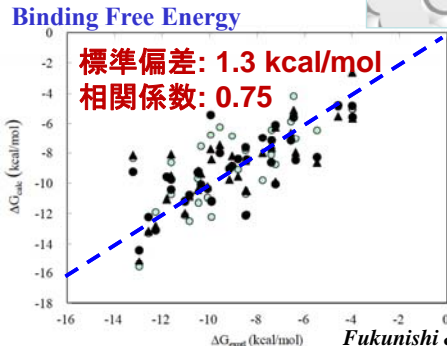
インシリコ創薬: 計算機支援による創薬

SGDD (Structure Guided Drug Development)

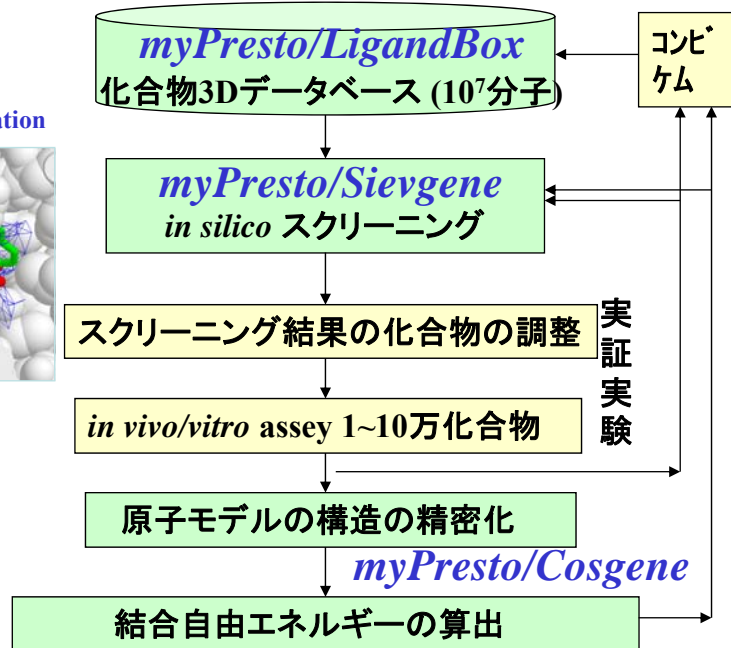
LigandBox (低分子3Dデータベース)

Kawabata et al. (2013) Biophysics 9, 113-121

The image shows the LigandBox database interface with a list of ligands and a 3D docking simulation of a ligand bound to a protein target.

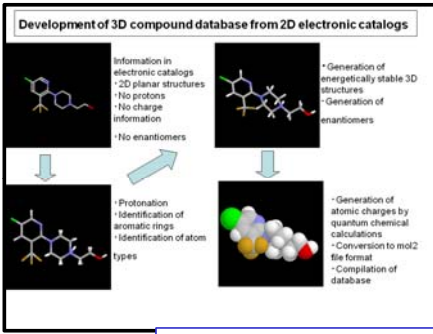


Fukunishi & Nakamura (2013) Pharmaceuticals, 6, 604-622



市販化合物のカタログから入手可能な化合物データベースを作成: 化合物数2000万件以上。

Kawabata et al. (2013) Biophysics 9, 113-121

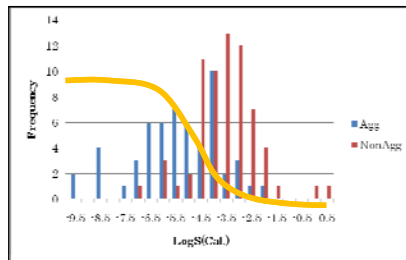
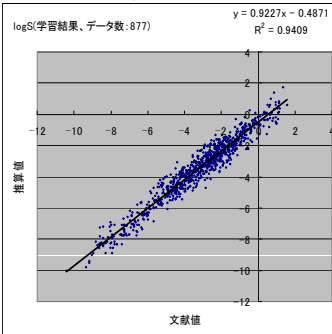


創薬で有用な、あいまいさも考慮できる強力な類似構造探索

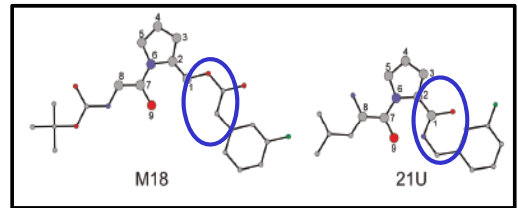
国内唯一の大規模DB作成ソフトウェアの開発・公開

Number of similar molecules in the 'Princeton' supplier library: 4

rank	molecular_name	isomote	target_mol	query_mol	supplier
19	NS-01215200	0.500			Vitar-M Princeton
20	NS-01220124	0.500			Princeton Vitar-M



高精度の溶解度予測



部分構造が多少異なっても、高速に類似構造が探索できる。

Mashimo et al. (2010) Int. J. HTP Screen., 1, 99-107

Kawabata, J. Chem. Inf. Model. (2011) 51, 1175-1187

51

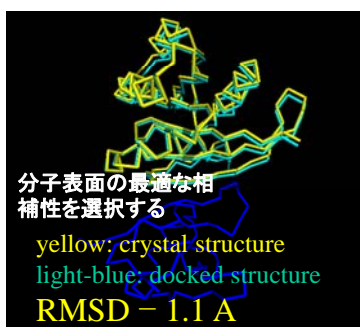
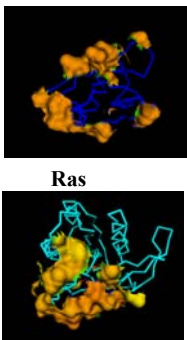
蛋白質複合体予測手法と高速MD計算手法の開発

公開

蛋白質間相互作用の新規予測手法開発

RID of RasGDS

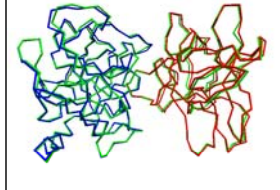
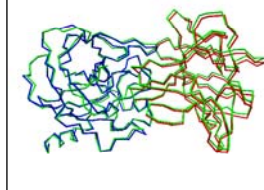
Ras / RID of RasGDS



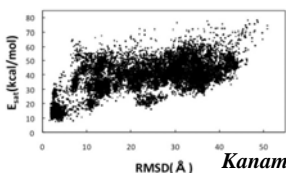
国際コンテスト(CAPRI-T40)での成功例

The best structure

The 7<sup>th</sup> best structure

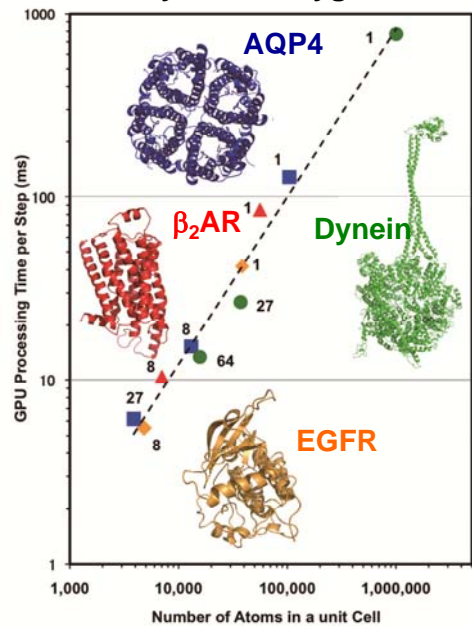


Amino-acid Selective Cross Saturation using



Kanamori et al. PROTEINS 79, 179-190 (2011)

高速分子動力学(MD)手法とGPGPU用ソフトmyPresto/Psygene-Gの開発

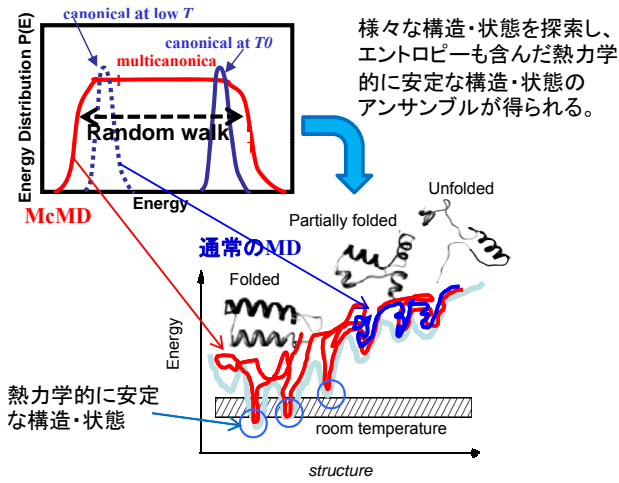


【計算を実施した系とその計算スピード】

- EGFR: 38,453 原子系 (16.3 ns/day: 8 GPU)
- $\beta_2AR$ : 56,121 原子系 (10.0 ns/day: 8 GPU)
- AQP4: 104,415 原子系 (10.0 ns/day: 27 GPU)
- Dynein: 1,004,847 原子系 (3.4 ns/day: 64 GPU)

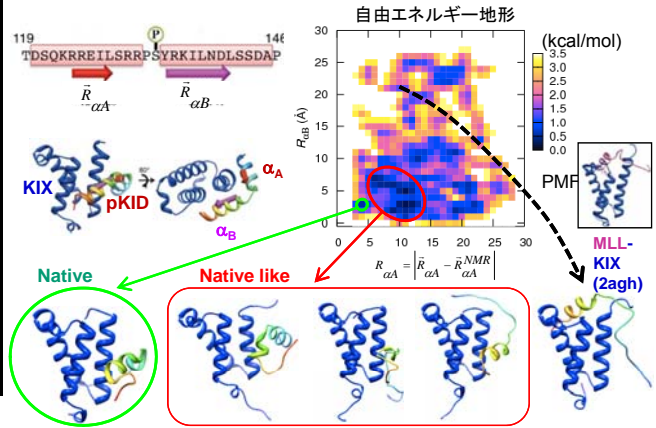
自由エネルギー地形の解析から動的構造・複合体構造を正確に理解

McMD法(マルチカノニカル分子動力学法)



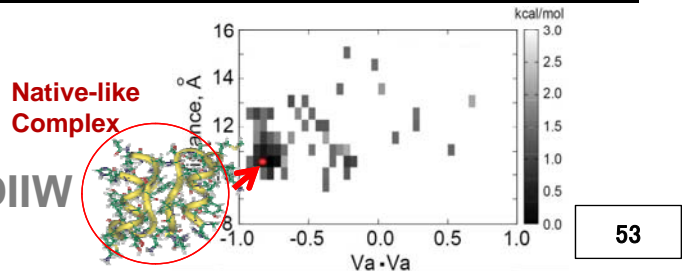
McMD法によるCoupled folding and binding pKID with KIX

(Umezawa et al. (2012) Biomolecules, 2, 104-121)



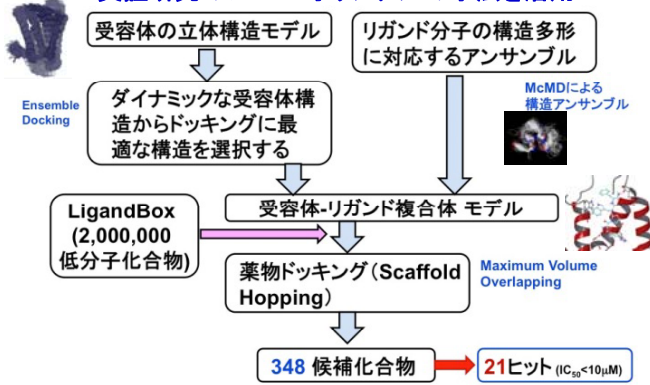
ホモダイマー形成における自由エネルギー地形の解析

Higo et al. (2013) J. Chem. Phys 138, 184106

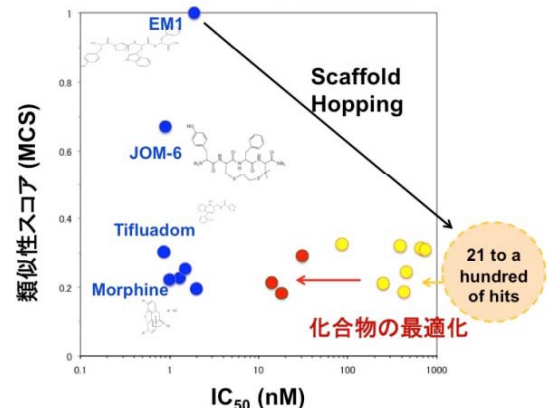
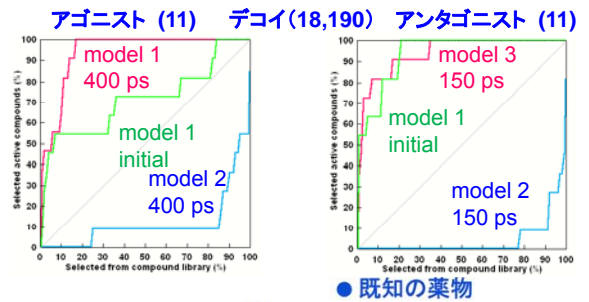


内在性ペプチドから非ペプチド化合物を取得する実証研究

内在性のペプチド化合物から非ペプチド化合物を取得する  
実証研究のフロー:オリジナルの手法を活用



アンサンブル・ドッキング法による最適モデルの選択



得られた非ペプチド性化合物の出発ペプチド構造との類似性値(MCSスコア)と受容体への結合能: 非ペプチド性のリード化合物(アゴニスト)の取得

### 3. 研究開発成果

#### (2) 知的財産権等の取得 及び (3) 成果の普及

公開

#### 年度毎の特許出願、論文および学会発表の件数

区分	特許出願			論文	学会発表
	国内	外国	PCT		
2007	0	0	0	5	2
2008	1	0	0	46	88
2009	0	0	0	54	53
2010	1	0	1	60	121
2011	0	0	0	60	112
2012	0	0	0	58	43
合計	2	0	1	283	419

事業原簿 24頁

55

### 3. 研究開発成果

#### (3) 成果の普及

公開

#### NEDOプレスリリース

- 2012年5月21日 「IT創薬」実用化へ –従来に比べ100倍以上の効果–
- 2012年9月24日 薬効を正確に予測する新手法を開発 –生体内での膜タンパク質の機能調節機構を解明–

2012年9月3日  
読売新聞(関西版)

2012年9月28日  
薬事日報

2013年6月号  
小学館『DIME』  
特集記事

2012年10月4日  
日刊工業新聞

事業原簿 332頁

56

• 本事業で開発した要素技術およびツールを用いた創薬研究がすでに参画企業により実施されており、効率的な医薬品候補化合物の絞り込みに成功した事例も報告されている。

要素技術	ツール
<ul style="list-style-type: none"> <li>構造・機能解析のための膜タンパク質大量発現・精製技術</li> <li>安定同位体標識タンパク質の安価な大量発現・調製技術</li> <li>核磁気共鳴法(NMR)を用いたタンパク質ーリガンド間相互作用解析法(アミノ酸特異的交差飽和法、DIRECTION法等)</li> <li>2重膜中への膜タンパク質再構成法</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>極低温電子顕微鏡解析により得られたGPCRを中心とする膜タンパク質の立体構造情報</li> <li>高精度 <i>in silico</i> シミュレーションソフトウェア myPresto®</li> </ul>

タンパク質立体構造解析NEDO特別講座  
 (2008年度～2013年度実施)

**構造生物学講座**  
 (名古屋大 藤吉教授)

[講義テーマ]

- 電子顕微鏡による立体構造解析基礎技術
- 膜生物学

[実習テーマ]

- 膜タンパク質発現・精製技術
- タンパク質2次元、3次元結晶化技術
- 各種電子顕微鏡技術

シンポジウム  
 講演会等による  
 人材交流

**分子認識解析講座**  
 (東京大 嶋田教授)

[講義テーマ]

- 構造生物学における核磁気共鳴法の基礎と応用
- 創薬におけるNMRの応用例

[実習テーマ]

- 生体系NMR測定試料の調製、生体系NMR測定法の実習

**タンパク質計算科学講座**  
 (大阪大 中村教授)

[講義テーマ]

- 計算科学による、分子シミュレーションと高分子系への展開

[実習テーマ]

- 分子シミュレーション、データベース演習
- In silicoスクリーニング基礎演習

4. 実用化に向けての見通し及び取組み  
 (2) 実用化に向けた具体的取組み

公開

