

「創薬加速に向けたタンパク質構造解析基盤技術開発」  
中間評価報告書

平成21年10月

独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構  
研究評価委員会

平成21年10月

独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構  
理事長 村田 成二 殿

独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構  
研究評価委員会 委員長 西村 吉雄

NEDO技術委員・技術委員会等規程第32条の規定に基づき、別添のとおり  
評価結果について報告します。

## 目 次

はじめに	1
分科会委員名簿	2
審議経過	3
評価概要	4
研究評価委員会におけるコメント	7
研究評価委員会委員名簿	8
第1章 評価	
1. プロジェクト全体に関する評価結果	1-1
1. 1 総論	
1. 2 各論	
2. 個別テーマに関する評価結果	1-19
2. 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	
2. 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	
2. 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	
3. 評点結果	1-37
第2章 評価対象プロジェクト	
1. 事業原簿	2-1
2. 分科会における説明資料	2-2
参考資料1 評価の実施方法	参考資料 1-1

## はじめに

独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構においては、被評価プロジェクトごとに当該技術の外部専門家、有識者等によって構成される研究評価分科会を研究評価委員会によって設置し、同分科会にて被評価対象プロジェクトの研究評価を行い、評価報告書案を策定の上、研究評価委員会において確定している。

本書は、「創薬加速に向けたタンパク質構造解析基盤技術開発」の中間評価報告書であり、第18回研究評価委員会において設置された「創薬加速に向けたタンパク質構造解析基盤技術開発」（中間評価）研究評価分科会において評価報告書案を策定し、第23回研究評価委員会（平成21年10月29日）に諮り、確定されたものである。

平成21年10月  
独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構  
研究評価委員会

「創薬加速に向けたタンパク質構造解析基盤技術開発」

中間評価分科会委員名簿

(平成21年8月現在)

	氏名	所属、役職
分科会長	にしむら よしふみ 西村 善文	横浜市立大学 大学院生命ナノシステム科学研究科 生体超分子システム科学専攻 教授
分科会長 代理	あきら しずお 審良 静男*	大阪大学 免疫学フロンティア研究センター 自然免疫学分野 教授
委員	あおやま せいこ 青山 聖子	サイエンスライター 早稲田大学 政治経済学術院 客員教授
	いしぐろ まさじ 石黒 正路	新潟薬科大学 応用生命科学部 応用生命科学研究科 教授
	こうだ だいすけ 神田 大輔	九州大学 生体防御医学研究所附属感染防御研究センター 教授
	しみず けんたろう 清水 謙多郎*	東京大学 大学院農学生命科学研究科 応用生命工学専攻 教授
	にしじま かずみ 西島 和三	持田製薬株式会社 医薬開発本部 専任主事

敬称略、五十音順

注\*：実施者の一部と同一大学であるが、所属部署が異なるため（実施者：大阪大学 蛋白質研究所、東京大学大学院 薬学系研究科 機能薬学専攻）、「NEDO 技術委員・技術評価委員規程(平成21年7月15日改正)」第34条（評価における利害関係者の排除）により、利害関係はないとする。

## 審議経過

### ● 第1回 分科会（平成21年8月12日）

#### 公開セッション

1. 開会、分科会の設置、資料の確認
2. 分科会の公開について
3. 評価の実施方法及び評価報告書の構成について
4. プロジェクトの概要説明

#### 非公開セッション

5. プロジェクトの詳細説明

#### 公開セッション

6. まとめ・講評
7. 今後の予定、その他、閉会

### ● 第23回研究評価委員会（平成21年10月29日）

## 評価概要

### 1. 総論

#### 1) 総合評価

創薬の基盤となる膜タンパク質の構造解析に関して、電子顕微鏡/X線結晶構造解析、NMR、計算科学という3つの異なるアプローチによる本プロジェクトは、国際的にも極めてレベルが高い、学問的に極めて優れたものである。産学官がそれぞれ果たすべき役割分担を十分認識して、産学官連携を円滑に運用しつつ、その連携による相乗効果を上げている。中間目標は十分合格点に達しており、世界水準での当該分野の競争力の確固たる基盤を形成するものと期待できる。本プロジェクトの対象は、従来解析困難であった膜タンパク質であるが、他の疾患関連タンパク質群にも広く使える汎用性があり、波及効果が大きい。課題解決型連携企業の参加やNEDO特別講座での教育を通じて技術の普及も図られている。

膜タンパク質を解析ターゲットとしている点で課題も大きいですが、特に構造解析としての二次元および三次元結晶化技術の確立は一朝一夕にはいかないものであるので、粘り強い研究を期待したい。

#### 2) 今後に対する提言

創薬に至った具体的な実例が望まれることは言うまでもない。本事業の期間後でもよいので、本事業をきっかけとして、こうした象徴的な成果が得られれば、本事業に対する一般の評価は格段に高まることになる。膜タンパクとしても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。日本のタンパク質構造解析の基盤技術の研究レベルは非常に高いものの、実用化の面では海外企業に比して十分であるとは言い難い。今後、実用化に向けて企業の役割が重要であり、最終評価に向けて、課題解決型連携の評価方法を予め定めておくことが望ましい。研究成果の非公開かつ占有を基本とする製薬産業との連携では困難なことは理解できるが、本プロジェクトに関与した製薬企業での創薬加速の実績をある程度示すことも必要である。

### 2. 各論

#### 1) 事業の位置付け・必要性について

健康安心イノベーションプログラムの目標達成に大きく貢献する事業である。創薬の基盤となる膜タンパク質の構造解析は、社会的にも学術的にも重要な意

義をもつが、一企業、一研究機関が取り組むのは困難である。各分野で優れた研究実績をもつグループが集中して実施する本事業は大きな意義があり、NEDO の関与は必要である。本プロジェクトの対象とするタンパク質は、疾患関連の膜タンパク質が主であり、その構造情報・機能情報は生命科学の解明と共に創薬プロセスへの貢献・波及効果が期待される。国内の製薬企業は膜タンパク質の重要性を十分認識しているが、現状はその困難さから可溶性タンパク質等の構造解析に留まっているので、本プロジェクトの意義は高い。

## 2) 研究開発マネジメントについて

本プロジェクトに先行した 5 年間プロジェクトの実績および経験を踏まえつつ、非常に高い目標設定と計画的な研究の遂行が行われている。個別課題の技術開発における数値目標が明確化されていることは評価できる。各分野で国際的にリーダー的存在となっている研究者を中心として産学官の研究者が有機的に連携できる体制となっている。特に、企業関係者の人材育成・教育、および企業の個別課題解決に向けた配慮ある事業体制が運用されていることを評価したい。構造生物学と計算科学の密接な連携は、先駆的であり、先行プロジェクトからの特徴と言える。少なくとも中間評価時点では大きな情勢変化がなく、比較的順調に推移しているとの印象である。

一方で、課題解決型連携に関しては、本プロジェクトの成果を活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。

## 3) 研究開発成果について

解析対象として大変難易度の高い膜タンパク質の構造解析に関して、いずれの研究開発項目も中間目標をクリアし、非常にレベルの高い成果を上げている。世界的な水準の論文も多く、国際的に十分評価できる。論文発表、学会および公開シンポジウム等を通じての情報発信は適切であり、企業の若い研究者向けの実践的な NEDO 特別講座も高く評価できる。中間時点での実績を考慮すると最終目標への達成可能性は高く、数値目標だけではなく、今後も質の高い成果を追求することを期待する。

膜タンパク質を解析ターゲットとしている点で課題も大きいですが、特に構造解析としての二次元および三次元結晶化技術の確立は一朝一夕にはいかないものであるので、粘り強い研究を期待したい。

## 4) 実用化の見通しについて

本プロジェクトが創薬開発に将来繋がり得る基盤技術の開発であり、各要素技術は非常に高い完成度にあることから、実用化イメージに繋がる成果を得て

いると言える。一部の研究成果については、既に実用化されているものがある。課題解決型研究開発や NEDO 特別講座での教育を通じて、実用化に向けた成果普及がなされ、明日の新薬誕生に結実することが期待できる。

一方で、タンパク質の構造解析に基づく基盤技術がどのような波及効果を及ぼすかは、今後の各企業の取り組みに負う点が大である。開発技術は高度であるだけに、企業などで開発技術を利用するには、利用側のニーズに合わせてノウハウを渡し易くするための仕組み作りが必要と想定できる。実用化に繋がる創薬ターゲットの選定も戦略的に行う必要があり、ターゲットとしての膜タンパクの種類を、もう少し増加させて、結晶化の成功例を増やすようなことも考えて欲しい。創薬を出口とするなら、課題解決型連携がどこまで名目ではなく実質的なものになるかが焦点である。5 年間での創薬加速の実績をある程度示すことが必要であり、有効な方法の検討が望まれる。

## 研究評価委員会におけるコメント

第23回研究評価委員会（平成21年10月29日開催）に諮り、了承された。研究評価委員会から以下のコメントが出された。

- より生体に近い状態のタンパク質の構造解析が謳われているが、昆虫細胞で発現したタンパク質の糖鎖は動物細胞とは非常に異なる。膜タンパク質の発現に動物細胞の系も検討することが望ましい。

## 研究評価委員会

委員名簿（敬称略、五十音順）

職 位	氏 名	所 属、役 職
委員長	西村 吉雄	学校法人早稲田大学大学院 政治学研究科 (科学技術ジャーナリスト養成プログラム) 客員教授
委員長 代理	吉原 一紘	オミクロンナノテクノロジージャパン株式会社 最高顧問
委員	安宅 龍明	オリンパス株式会社 新規中核事業企画本部 ヘルスケア事業開発部 企画グループ コーディネーター
	伊東 弘一	学校法人早稲田大学 理工学術院総合研究所 客員教授（専任）
	稲葉 陽二	日本大学 法学部 教授
	大西 優	株式会社カネカ 顧問
	尾形 仁士	三菱電機エンジニアリング株式会社 取締役社長
	小林 直人	学校法人早稲田大学 研究戦略センター 教授
	小柳 光正	国立大学法人東北大学大学院 工学研究科 バイオロボティクス専攻 教授
	佐久間一郎	国立大学法人東京大学大学院 工学系研究科 精密機械工学 精密機械工学専攻 教授
	菅野 純夫	国立大学法人東京大学大学院 新領域創成科学研究科 メディカルゲノム専攻 教授
	富田 房男	放送大学 北海道学習センター 所長
	架谷 昌信	愛知工業大学 工学機械学科 教授・総合技術研究所所長
宮島 篤	国立大学法人東京大学 分子細胞生物学研究所 教授	

## 第1章 評価

この章では、分科会の総意である評価結果を枠内に掲載している。なお、枠の下の「○」「●」「・」が付された箇条書きは、評価委員のコメントを原文のまま、参考として掲載したものである。

## 1. プロジェクト全体に関する評価

### 1. 1 総論

#### 1) 総合評価

創薬の基盤となる膜タンパク質の構造解析に関して、電子顕微鏡/X線結晶構造解析、NMR、計算科学という3つの異なるアプローチによる本プロジェクトは、国際的にも極めてレベルが高い、学問的に極めて優れたものである。産学官がそれぞれ果たすべき役割分担を十分認識して、産学官連携を円滑に運用しつつ、その連携による相乗効果を上げている。中間目標は十分合格点に達しており、世界水準での当該分野の競争力の確固たる基盤を形成するものと期待できる。本プロジェクトの対象は、従来解析困難であった膜タンパク質であるが、他の疾患関連タンパク質群にも広く使える汎用性があり、波及効果が大きい。課題解決型連携企業の参加や NEDO 特別講座での教育を通じて技術の普及も図られている。

膜タンパク質を解析ターゲットとしている点で課題も大きいですが、特に構造解析としての二次元および三次元結晶化技術の確立は一朝一夕にはいかないものであるので、粘り強い研究を期待したい。

#### <肯定的意見>

- 創薬加速に向けてタンパク質の構造解析に関して、電子顕微鏡、X線結晶構造解析、NMR、計算科学を用いた基盤技術を開発し、大きな成果を上げている。
- 電子線解析、核磁気共鳴法、さらには *in silico* スクリーニング等のシミュレーション技術開発の3つの研究開発項目から、膜タンパク質の構造機能解析を行う意欲的なプロジェクトであり、国際的にも極めてレベルの高い研究者によって構成されており、成果が期待できる。実際、中間評価までの業績も、学問的に極めて優れたものであり、順調に予定通り進行している。
- 創薬の基盤となる膜タンパク質ーリガンド複合体の構造解析、相互作用解析を、電子線、NMR、計算という3つの異なるアプローチで行う本プロジェクトは、社会的にも学術的にも意義が高い。開発実施者は精力的に研究に取り組み、ハイレベルの成果を上げている。課題解決型連携企業の参加や NEDO 特別講座での教育を通じて技術の普及も図られている。
- 三つの項目において非常に高度な技術開発が行われており、その研究成果は非常に優れている。また、応用範囲も広く「創薬加速」という課題については実際に有効例も得られる期待は大きい。
- タンパク質を対象にした構造情報会得のための新規な測定手法や計算手法の開発が着実になされている。プロジェクトの対象は膜タンパク質であるが、

他の種類のタンパク質にも広く使える汎用性がある。本来、こうした新規技術開発には数値目標は馴染まないと思えるが、そうした目標も中間段階において十分クリア出来ているようである。残りの期間も同様な進展があれば、最終目標である創薬加速に繋がる成果が十分に期待できる。

- 具体的な目標が設定されており、数値目標を十分に達成している。レベルの高い研究が行われ、その成果は、世界水準での当該分野の競争力の確固たる基盤を形成するものと期待される。
- 総合評価として中間目標は十分合格点に達している。まず、本プロジェクトが創薬加速に向けた膜タンパク質等の構造解析に関わる基盤技術開発への貢献および波及効果が大きいことを高く評価したい。その要因は、本プロジェクト以前の5年間を含めて、高難度ではあるが重要な膜タンパク質等の構造・機能解析に焦点を絞ったことである。これまで製薬企業における疾患関連タンパク質の研究では、主として可溶性タンパク質（酵素等）が構造解析の対象であった。しかし、既存薬剤が標的とするタンパク質の半分以上は膜タンパク質である。重要であるが解析困難なヒト疾患関連タンパク質群（難溶性、複合体、膜内等）の構造および機能が解明されれば、創薬産業における新薬の標的となるタンパク質の探索、構造および機能解析等が進展し、合理的な創薬探索への取り組みが加速することは確実である。また、標的とする疾患タンパク質が変われば、その疾患を克服する優れた新薬が創製され、国民の健康維持への貢献も大きい。本プロジェクトにおける技術開発の目標は比較的に難易度が高いが、中間時点での学術的成果(文献、学会発表等)はそれに見合う内容である。さらに、特許等の取扱も、知的財産化と科学向上を見据えてバランス良く対処されている。また、産と学官がそれぞれ果たすべき役割分担を十分認識して、産学連携を円滑に運用しつつ、その連携による相乗効果を上げている。その点では、製薬産業あるいは機器メーカー等の業界特質を意識しながら人材育成も踏まえた組織体制を上手く構築したことに意義がある。

#### <問題点・改善すべき点>

- 実際の創薬の課題になると本プロジェクト内では対応は困難で、創薬という具体的な成果は参加企業でなされることを期待する。
- 3つの研究開発項目間では、連携研究が成果を上げているが、創薬において最大のターゲットであるGPCRに取り組むには、さらに緊密な3者の共同研究体制が望まれる。また、基盤研究とはいえ、解析対象の選定にあたっては、さまざまな観点からの意見を入れる必要があるのではないか。
- 膜タンパク質を創薬ターゲットとしている点で課題も大きいと思われるが、

特に構造解析としての二次元および三次元結晶化技術の確立は私どもの経験からしても一朝一夕にはいかないものであるので、粘り強い研究を期待したい。

- 新規な手法、要素技術が個別に開発されているところがあるが、今後、それらの有効な総合化が必要と思われる。(但し、*in silico* 技術については、限られた研究期間内で、無理な統合化を行わず、高水準のシーズを増やしていく方向で研究を進めていただければ良いと思う。) チームリーダーの周辺では、優れた成果が着実に得られているが、グループ(担当者)によって成果に若干差が見られ、その点については、チーム全体としての対応が望まれる。

#### <その他の意見>

- ・ 創薬加速に向けてタンパク質の構造解析に関して、電子顕微鏡、X線結晶構造解析、NMR、計算科学を用いた基盤技術を開発する意義は非常に大きく、本事業はその目標に着実に進んでいる。
- ・ タンパク複合体の解析技術は、創薬以外にも応用できると考えられるので、他分野への展開も図って欲しい。
- ・ 本プロジェクトは、創薬における初期段階の候補化合物の設計・選択などの段階を加速するための技術的開発が主となっていると判断される。この段階では、標的としての有用性のバリデーションが行われたものを注意深く選択することも重要であるので、研究対象となる膜タンパク質の選択も重要な課題であると考えます。
- ・ チーム間の連携(研究開発項目間の共同研究)が既に行われているが、今後、事業が進展する中で一層効果的な連携ができるものと期待される。

## 2) 今後の提言

創薬に至った具体的な実例が望まれることは言うまでもない。本事業の期間後でもよいので、本事業をきっかけとして、こうした象徴的な成果が得られれば、本事業に対する一般の評価は格段に高まることになる。膜タンパクとしても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。日本のタンパク質構造解析の基盤技術の研究レベルは非常に高いものの、実用化の面では海外企業に比して十分であるとは言い難い。今後、実用化に向けて企業の役割が重要であり、最終評価に向けて、課題解決型連携の評価方法を予め定めておくことが望ましい。研究成果の非公開かつ占有を基本とする製薬産業との連携では困難なことは理解できるが、本プロジェクトに関与した製薬企業での創薬加速の実績をある程度示すことも必要である。

### <今後に対する提言>

- 本プロジェクトで推進した創薬に向けたタンパク質構造解析の基盤技術の開発は、最先端の生命科学研究の基盤技術としても非常に重要であり、今後とも本プロジェクトを強力に推進する必要がある。創薬加速に向けてタンパク質の構造解析に関して、電子顕微鏡、X線結晶構造解析、NMR、計算科学を用いた基盤技術を開発する意義は非常に大きく、本事業はその目標に着実に進んでいる。今後これらの成果を実用化に向けていくためには、個別企業としての取り組みだけでは不十分であるかも知れない。特に製薬企業においては、共同事業的な取り組みは各企業の独自性や研究の秘密性などから困難だと思われる。その点では、今回の事業のように、最先端生命科学の研究進展への大きな寄与は、必ず健康安心イノベーションプログラムの目標達成のために必須であるが、その成果を直ぐに実用化や企業化等見える形で評価を求めるのは困難であろう。そのためには、広く健康安心イノベーションプログラムの目標達成のために寄与していくことだけを目標に掲げる事業を打ち出すか、または日本の製薬企業が集まって特定の成人病に限って創薬加速を行うプロジェクトを提案するようなことを考えたほうが良いかも知れない。しかし、個別企業の利害と日本全体の健康安心イノベーションプログラムの理解とを両立できるような事業が可能であるかどうかは今後の議論が必要なところであろう。
- NEDOによる支援であるため、膜タンパクとしても産業界に大きな影響を与えるようなターゲットを見つけ、世界に先駆ける構造解析をしてもらいたい。
- これまでの成果を武器に、「膜内にある膜タンパク質」についての研究により深く切り込んでいくことを希望する。

- 本プロジェクトが創薬加速に向けた技術開発であることから、今後も設定された研究項目の達成に邁進していただきたい。一方、これらの成果がより明確になるためにも3者において同一の具体的標的を設定したプロジェクトの遂行計画を立案し、本プロジェクトが実効あるものであることを示すことができれば本プロジェクトに対してより一層の理解が得られるものと考えられる。
- 最終評価をどのようにするかを現時点で明確にしておくべきかも知れない。基礎技術開発を評価の柱にする点は、今回の中間評価と同様であるが、課題解決型連携をどのように評価すべきかのコンセンサスを予め得ておいた方が良いように思う。
- 最終目標の設定は妥当であるが、単なる数値目標ではなく、質の高い成果を今後も追求していただきたい。大学や研究機関では個々に達成しにくいような総合的な技術の確立に期待したい。
- 研究成果の非公開かつ占有を基本とする製薬産業との連携では、本技術開発の創薬加速への貢献を客観的に評価することは難しい。一方、新薬の創製において、15年前後の開発期間、約500億円の資金投入を必要とするハイリスク・ハイリターンの産業界は理解されたとしても、やはり、5年間でどのプロセスがどの程度に加速されたか、ある程度示すことが要求される。本プロジェクトに関与した製薬企業へのアンケート調査も一案である。
- ターゲットタンパク研究プログラムの基盤技術開発がタンパク質発現、放射光高度化、低分子化合物による制御(ライブラリー構築等)等を重点化したことは、本プロジェクトの電子線、NMR、シミュレーション等との重複を避けた内容である。従って、両プロジェクトが終了する時点で、我が国のタンパク質構造解析基盤技術は一通り整備されると期待される。その先は両省の融合プロジェクトがかなり明確な目標を掲げて進むと想定される。産・学・官が相互に魅力を感じる目標設定が課題である。早い時点から協議しておくべきであろう。

#### <その他の意見>

- 日本ではタンパク質構造解析の基盤技術の研究レベルは非常に高いが、これを実用化や応用化するための企業化等は米国・英国や最近の韓国・中国に比して十分であると言いがたい。米国ではタンパク質構造解析をメインにしたベンチャー企業もある中で、日本の製薬ベンチャー創出をどのように企画していくかは大きな課題であろう。
- 創薬は生命科学におけるトップランナーとしてその目標を設定しているものと考えられるが、その波及効果は他の生命科学分野の発展に寄与できるもの

と考えられるため、今後の課題である食品や環境分野などへの適用ということも考慮していただきたい。

- 創薬に至った具体的な実例が望まれることは言うまでもない。本事業の期間後でもよいので、本事業をきっかけとして、こうした象徴的な成果が得られれば、本事業の一般の評価を格段に高めることになる。

## 1. 2 各論

### 1) 事業の位置付け・必要性について

健康安心イノベーションプログラムの目標達成に大きく貢献する事業である。創薬の基盤となる膜タンパク質の構造解析は、社会的にも学術的にも重要な意義をもつが、一企業、一研究機関が取り組むのは困難である。各分野で優れた研究実績をもつグループが集中して実施する本事業は大きな意義があり、NEDO の関与は必要である。本プロジェクトの対象とするタンパク質は、疾患関連の膜タンパク質が主であり、その構造情報・機能情報は生命科学の解明と共に創薬プロセスへの貢献・波及効果が期待される。国内の製薬企業は膜タンパク質の重要性を十分認識しているが、現状はその困難さから可溶性タンパク質等の構造解析に留まっているので、本プロジェクトの意義は高い。

#### <肯定的意見>

- 創薬に向けた基盤技術として民間会社のみでは取り組みが困難なタンパク質の構造解析に積極的に取り組み、その成果が広く民間会社に波及するための仕組みをとっている。また本事業のタンパク質の電子顕微鏡、X線結晶構造解析、NMR、計算科学を用いた構造解析の基盤技術成果は国際的な観点からも高く評価できる。
- これらの各分野の専門性は、卓越したものがあり、民間では不可能な研究であり、これを推奨することは意義がある。
- 創薬の基盤となる膜タンパク質ーリガンド複合体の構造解析、相互作用解析は、社会的にも学術的にも重要な意義をもつが、一企業、一研究機関が取り組むには困難な壮大なテーマであり、また、さまざまな分野の研究者の共同研究体制が必要なことから、NEDO 事業として実施することは妥当である。
- 本プロジェクトで開発された基盤技術は、生命科学全般において非常に重要なものであり、知能結集型プロジェクトによって開発される最も典型的なものと言える。最新の機器開発や多数の研究者の参加によって実現されている成果は十分予算に見合うものであり、学術的な面での国際競争力や国際貢献においても大きな成果が得られている。
- 膜タンパク質の取り扱いや構造決定は未だ基礎研究の段階にある。従って、国民の QOL を高めるための創薬自体を第一の目標とせず、そのための基盤技術の開発に絞った戦略は現時点において正しい。
- 健康安心イノベーションプログラムの目標達成に大きく貢献する事業である。この分野の先導的研究を推進する上で、優れた研究実績をもつグループが集中して実施する本事業は大きな意義があり、NEDO の関与は必要と思われる。事業目的も適切かつ妥当である。

- 健康安心イノベーションプログラムの目標達成のために十分寄与している。例えば、標的とするタンパク質群について注目すると、本プロジェクトの対象とするタンパク質は、疾患関連の膜タンパク質が主であり、その構造情報・機能情報は生命科学の解明と共に創薬プロセスへの貢献・波及効果が期待される。国内の製薬企業は膜タンパク質の重要性を十分認識しているが、現状はその困難さから可溶性タンパク質等の構造解析に留まっているので、本プロジェクトの意義は高い。
- 内外の技術開発動向および市場動向等を考慮して、事業の目的は妥当である。例えば、構造解析基盤技術について注目すると、本プロジェクトのタンパク質構造解析基盤技術は、各製薬企業では運用実績が殆どない電子線利用技術、NMR 利用技術である。最先端機器の保有・維持、さらに使用ノウハウ等を考慮すると、各企業が個別に対処することは難しいので、本プロジェクトを通じた NEDO 事業の関与する意義は高い。

#### <問題点・改善すべき点>

- 今の日本の製薬企業において合理的創薬に向けたタンパク質の構造解析の基盤技術の開発を行える余裕と能力を持った企業が多くはない現状をどのように変えていくかが今後の問題点であろう。
- NEDO による支援であるため、膜タンパクとしても産業界に大きな影響を与えるようなターゲットを見つけ、世界に先駆け構造解析をしてもらいたい。
- 国際競争や公益性という面に対して国益という面では開発技術の開示や使用については慎重である必要があるのではないか。特許が必ずしも公共性に反するものではなく、将来的なプロジェクトの発展性を考えて研究者の意欲を削がない明確な基準を示すことも重要だと思う。
- 基礎研究は広く行われるべきであり、文科省をはじめとする他の省庁や民間の研究と差別化を無理に図る必要はないが、NEDO としての特色があるに越したことはない。しかし、それが何であるかが必ずしも明確になっていない。

#### <その他の意見>

- ・ 創薬加速という目標から技術的な面の開発が最重要課題であることは明らかであるが、研究対象として選ぶタンパク質についても例えば一般の企業では対象にしにくいオーファンドラッグの対象となるタンパク質などを標的とした研究は公共性という点では重要だと思われる。
- ・ 予算規模に見合った成果が出ているかどうかを判断することは大変困難である。目先の小さなたくさん成果ではなく、将来花開く大きな成果がひとつ出れば成功であり、中間評価の時点でそれを判定することは大変困難である。

とは言え、中間評価の段階でそれに向けた最大限の努力が払われていると判断できる。

- 内外の技術開発動向から見ても、事業目的は妥当であり、本事業の必要性、重要性は今後もますます増大していくものとする。

## 2) 研究開発マネジメントについて

本プロジェクトに先行した5年間プロジェクトの実績および経験を踏まえつつ、非常に高い目標設定と計画的な研究の遂行が行われている。個別課題の技術開発における数値目標が明確化されていることは評価できる。各分野で国際的にリーダー的存在となっている研究者を中心として産学官の研究者が有機的に連携できる体制となっている。特に、企業関係者の人材育成・教育、および企業の個別課題解決に向けた配慮ある事業体制が運用されていることを評価したい。構造生物学と計算科学の密接な連携は、先駆的であり、先行プロジェクトからの特徴と言える。少なくとも中間評価時点では大きな情勢変化がなく、比較的順調に推移しているとの印象である。

一方で、課題解決型連携に関しては、本プロジェクトの成果を活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。

### <肯定的意見>

- 内外の技術動向、市場動向等を踏まえて、戦略的な目標が設定され、具体的かつ明確な開発目標を可能な限り定量的に設定し、且つ、目標達成度を測定・判断するための適切な指標が設定されている。また研究開発計画も妥当であり、事業体制も問題はない。
- 前プロジェクトからさらに踏み込んで目標が設定され、技術開発が行われている。基盤研究で高度な技術であることに配慮し、NEDO 特別講座の開設など、本技術の想定ユーザーへの普及に努めている。
- 非常に高い目標設定と計画的な研究の遂行が行われている。研究試料の調製は本プロジェクトの最重要課題であり、綿密な計画が立てられている。測定法の開発は実際の試料を用いることによって解決されるが、目的を十分達成できる方策を立てており、解析結果を用いた新たな研究方針も立てられる域に達している。
- 生物研究には本来馴染まない数値目標を設定し、それを中間時点でクリアしていることは、プロジェクトの成果が着実に上がっていることを示している。研究チーム間の連携も問題ない。NEDO 特別講座を通じた教育波及効果も評価できる。
- 本事業を実施者は、タンパク質構造解析において従来から十分な実績をあげており、目標を達成する上で妥当な選択がなされたと考えられる。グループ間の連携も有効に行われており、特に、構造生物学と計算科学の密接な連携は、先駆的であり、先行事業からの特徴と言える。優れた研究実績をもつ大学・研究所を中心とするグループが研究開発を推進し、企業を中心とするグループが実証研究を行うという体制が有効に機能している。

- 本プロジェクトが対象とするタンパク質は、疾患関連の膜タンパク質が主であり、かなり挑戦的である。解析した数よりも解析プロセスとその成果の質を重視した精神は尊重したい。また、個別課題の技術開発における数値目標が明確化されていることは評価される。
- 本プロジェクトに先行した5年間プロジェクトの実績および経験を踏まえつつ、研究開発計画は妥当である。
- 各分野で国際的にリーダー的存在となっている研究者を中心として産学官の研究者が有機的に連携できる体制となっている。特に、企業関係者の人材育成・教育、および企業の個別課題解決に向けた配慮ある事業体制が運用されていることを評価したい。
- 少なくとも中間評価時点では大きな情勢変化がなく、比較的順調に推移しているとの印象である。文部科学省のタンパク関連プロジェクトの事前審査、テーマ採択審査、推進体制等に本プロジェクトの関係者が積極的に関与して、両省プロジェクトの重複を避けつつ、互いに刺激する関係をバランス良く築いたことも評価される。

#### <問題点・改善すべき点>

- 実用化シナリオに関しては、幾つかの企業に対して成果を利用できる体制を作ってはいるが、十分に機能しているとは言い難い。
- 3つの開発項目の間の人的繋がりは深く、連携研究の成果も上がっているが、目標を絞ってさらに緊密な共同研究体制で取り組む部分があっても良いのではないか。
- 実用化という内容はどのようなものを指すのか中々難しい面がある。特に、直接プロジェクトに関係したメンバーのみでは見落としがちな視点をカバーできる、例えば、創薬現場に近い研究者や他の分野のメンバーなどによる継続的な検討ができる仕組みも必要であろう。
- NEDO 特別講座の開催をする上で、事務的な作業が研究者の負担になっているのなら損失と言える。そのような場合は、NEDO からの人的な支援などを考慮すべきだろう。
- チーム（研究開発項目）を跨いだ連携が今後さらに推進できると良いと思われる。また、チーム内では、グループ（実施者）間で成果に若干差が見られるので、より実質的で有効な連携がとれるような体制作りが望まれる。
- ライフサイエンス分野では設定された数値の意義を論理的に説明することが難しい場合があるが、可能な限り、目標とする値の意義を分かり易く説明することを検討して欲しい。一方、数値目標は重要であるが、その目標に対しては柔軟に取り組む姿勢も必要である。

- 文部科学省のタンパク関連プロジェクトとの連携による一端が見える形で社会に示すことも意識して欲しい。

<その他の意見>

- ・ X線結晶解析で膜タンパク質を研究している研究者との情報交換の場を設けてはどうか。
- ・ 研究開発においては当初設定された目標や計画は、遂行中の新しい発見や意図していなかった結果により変更され、新しい展開が可能になる場合がある。余りタイトな設定はこのような可能性を切り捨ててしまうものとなりがちであるため、調和のある計画が望まれる。
- ・ 課題解決型連携が数多く走っているが、それらに関する情報が少なかった。製薬業界の特殊性から、単に事実を公表することすら困難であることは十分理解できるが、何らかの方法を検討して、“成果に繋がりそうな期待感”を公表できるように出来ると良い。
- ・ 数値目標を設定することで、明確になることが多いが、生物学研究の場合は馴染まないという意見も多いと思われる。数値目標以外の中間目標や最終目標設定が項目としてあっても良いように思う。
- ・ ソフトウェアが公開されているが、事業全体を紹介する Web ページを用意して研究成果を公開するなど、プロジェクトとしての情報発信も、もう少し積極的に行ってはどうか。NEDO 技術講座は、参加していない企業との共同研究を推進し、開発したソフトウェアの利用者を増やす上で重要な役割を果たしており、今後もぜひ継続していただきたい。
- ・ 実施体制の企業参加状況を眺めると、個別 3 テーマに全て関与する企業は少なく、各社は必要な技術に絞って連携している。それは個別テーマ毎に特徴があり、個々に有益に連携されている結果と解釈される。一方、本プロジェクトにおける産学官連携体制を活かしつつ、電子線・NMR・計算科学を統合的に駆使した創薬プロセス加速の成功事例も必要との印象である。各社の思惑もあり現実の運用が難しいと思うが、検討していただきたい。

### 3) 研究開発成果について

解析対象として大変難易度の高い膜タンパク質の構造解析に関して、いずれの研究開発項目も中間目標をクリアし、非常にレベルの高い成果を上げている。世界的な水準の論文も多く、国際的に十分評価できる。論文発表、学会および公開シンポジウム等を通じての情報発信は適切であり、企業の若い研究者向けの実践的な NEDO 特別講座も高く評価できる。中間時点での実績を考慮すると最終目標への達成可能性は高く、数値目標だけではなく、今後も質の高い成果を追求することを期待する。

膜タンパク質を解析ターゲットとしている点で課題も大きいですが、特に構造解析としての二次元および三次元結晶化技術の確立は一朝一夕にはいかないものであるため、粘り強い研究を期待したい。

#### <肯定的意見>

- タンパク質の構造解析に関して、電子顕微鏡、X 線結晶構造解析、NMR、計算科学を用いた基盤技術開発は、数値的な面を含めて全て中間目標をクリアしている。
- 成果は目標値をクリアしている。
- 研究開発項目①②③とも、中間目標をクリアし、非常にレベルの高い成果を上げている。
- 目標の達成度は当初の目標以上のものになっており、また世界中で困難をきわめている GPCR の結晶化についても明確な方策と到達目標を示すなど、今後の成果に十分期待できる内容となっている。
- 中間目標の設定は妥当であり、それを十分に達成できている。成果の水準も十分に世界基準を満たしていて、着実な論文発表に結び付いている。特許はなるべく取らないという方針も本プロジェクトにおいては正しいと言える。特許は実課題解決型連携において行えば良い。
- 数値目標を達成しているだけでなく、質の高い成果を得ている。新規に開発した手法はレベルの高いものであり、世界的な水準の論文も多い。多様な要素技術を組み合わせた興味深い研究も多数見られる。最終目標に向けて着実に進展しているが、単なる数値目標ではなく、質の高い成果を今後も追求していただきたい。
- 全体として中間目標への達成度は高い。
- 成果は文献等から判断すると学術レベルとしてかなり高く、膜タンパク質に関わる本プロジェクトの成果は国内ではトップレベルである。国際的に十分評価される。
- 創薬関連の特許は参加企業各社が戦略的に知的財産化するとのことであり、

好ましい方針である。一方、技術特許については必要最小限であり、基本的に特許等の取扱は、知的財産化と科学向上を見据えてバランス良く対処されている。

- 査読論文への発表と共に学会および公開シンポジウム等を通じて一般に向けて広く情報発信をしている。さらに、企業の若い研究者向けの実践的な NEDO 特別講座を設置し、継続していることは高く評価される。
- 中間時点での実績を考慮すると最終目標への達成可能性は高い。

#### <問題点・改善すべき点>

- 市場化に向けた取り組みは、プロジェクト本来の目標からいって直接的な成果は期待できない。また知的財産に関する取組みも十分であるとは言い難い。
- 創薬という点では、膜タンパク質のうちでも GPCR が重要なターゲットになると思われるが、非常に困難な研究対象だけに、本プロジェクトでも苦戦している。構造決定への努力を続ける一方で、同じまたは類似タンパク質について、NMR による相互作用部位解析や計算による支援を行い、創薬に繋がる知見を得る努力もされてはどうかと思う。
- 研究成果がまだ個別的であることは、現状では種々の方面についての検討の結果であることから仕方ないところであるが、今後の方向としては得られつつある成果をもとに統合的成果を目指した目標と計画による成果を期待したい。
- これは既に議論されている点であるが、電子顕微鏡技術（電子線結晶学）の一般への移転が未だに困難である。試料の取り扱いの困難さや電子顕微鏡自体の特殊性に基づいていることは理解できるが、何らかの手段（NEDO などが積極的に関与してもよい）で普及を促進する手だてはないだろうか？
- チームリーダーの周辺では優れた成果が得られているが、グループ（担当者）によっては、十分な成果が得られていないところがある。新規手法の開発では、その可能性を示した段階のものも見られ、今後は、実用に向けた検討がさらに必要と思われるが、上に書いたように、in silico 技術については、ソフトウェアを公開し、高水準のシーズを増やしていく方向で研究を進めていただいた方が良いと思う。

#### <その他の意見>

- ・ 本プロジェクトは単に膜タンパク質の結晶構造の解明ではなく、その機能を強く意識したものであることが大変強みとなっている。その結果、得られた成果は応用面で広い範囲をカバーするものとなっていることが特色である。今後のさらなる成果と発展を期待したい。

- in silico 技術についても、特許の取得を考えてはどうか。

#### 4) 実用化の見通しについて

本プロジェクトが創薬開発に将来繋がり得る基盤技術の開発であり、各要素技術は非常に高い完成度にあることから、実用化イメージに繋がる成果を得ていると言える。一部の研究成果については、既に実用化されているものがある。課題解決型研究開発や NEDO 特別講座での教育を通じて、実用化に向けた成果普及がなされ、明日の新薬誕生に結実することが期待できる。

一方で、タンパク質の構造解析に基づく基盤技術がどのような波及効果を及ぼすかは、今後の各企業の取り組みに負う点が大である。開発技術は高度であるだけに、企業などで開発技術を利用するには、利用側のニーズに合わせてノウハウを渡し易くするための仕組み作りが必要と想定できる。実用化に繋がる創薬ターゲットの選定も戦略的に行う必要があり、ターゲットとしての膜タンパクの種類を、もう少し増加させて、結晶化の成功例を増やすようなことも考えて欲しい。創薬を出口とするなら、課題解決型連携がどこまで名目ではなく実質的なものになるかが焦点である。5 年間での創薬加速の実績をある程度示すことが必要であり、有効な方法の検討が望まれる。

#### <肯定的意見>

- 創薬加速に向けたタンパク質の構造解析に関して、電子顕微鏡、X 線結晶構造解析、NMR、計算科学を用いた基盤技術として十分な成果が上がっている。
- 基盤研究であり、装置、ソフト、試薬などの実用化が図られる性格のものではないが、課題解決型研究開発や NEDO 特別講座での教育を通じて、実用化への努力がなされている。
- 各要素技術は非常に高い完成度であり、これらの技術を取り込んだ測定・解析技術として個々の関連分野への応用が可能であると考えられ、多方面への波及効果に期待している。
- 実用化をどのように定義するかで評価が変わるが、本プロジェクトの目標が創薬開発に将来繋がり得る基礎技術の開発であることから、十分実用化イメージに繋がる成果となっていると考える。
- 膜タンパク質をターゲットとして選定しているが、他の類似プロジェクトが GPCR を中心とした限定的であるのと対照的である。膜タンパク質が解析対象として大変困難であることを考慮すると正しい戦略であり、プロジェクト全体の成功率を高めている。
- 一部の研究成果については、既に実用化されているものがある。非常に優れた研究成果が得られており、実用化の潜在的な価値は高いものと思われる。
- 疾患関連膜タンパク質の構造・機能に関わる本プロジェクトの実績を活かし

た次なる挑戦が本格的に我が国で動き始めるとの予感である。即ち、本プロジェクトの成果が検証されつつ産学官連携を上手く展開した体制で、合理的な創薬が実践されることを期待する。関連分野の人材育成、さらに産学の人的なネットワークの形成に本プロジェクトが貢献をしたことが、明日の新薬誕生に結実するでしょう。

#### <問題点・改善すべき点>

- タンパク質の構造解析に基づく基盤技術がどのような波及効果を及ぼすかは、今後の各企業の取り組みに負う点が大である。
- ターゲットとしての膜タンパクの種類を、もう少し増加させて、結晶化の成功例を増やすようにしていく方が良いのではないか。1つのターゲットでできない場合でも、他のターゲットを同時に行っていくことで、早期になんらかの膜タンパクの構造解析が可能にはならないか。
- 開発技術は高度であるだけに、さまざまなノウハウが伴う。企業などで利用するには、利用側のニーズに合わせてノウハウを渡し易くするための仕組み作りが必要。
- ソフトウェアの面では問題点はないが、ハードウェアの面では大型化というある意味では実用化とは逆の方向に進まざるを得ない点について、これらが共同利用施設などのような形に発展するのか、または小型化、廉価化などの方向に進むのかなどによって将来的な実用化イメージが異なるので、このような面の計画なども示していただけると良い。
- 創薬を出口とするなら、その目標達成は現時点では評価できない。実課題解決型連携がどこまで名目ではなく実質的なものになるかが焦点である。複数の製薬企業や関連企業の技術・情報交流を本プロジェクトが支点となって推進できれば理想的であるが、実現は製薬企業側の事情から難しいと思われる。
- 多くの新しい技術が開発されているが、実用に向けて、それらをどのように統合し、あるいは使い分けるか、今後、検討が必要と思われる。その際、実用化ターゲットの選定も戦略的に行う必要がある。「有用化合物を発見した」という結果については、本事業の期間内で、現実の有用性を実証した例が具体的に示せると良い。

#### <その他の意見>

- ・ 個別テーマで確立されつつある解析技術を統合的に構成したシステムとして組み立てる視野を示すことによって、本プロジェクトの有用性がより明確になると思う。
- ・ NEDO が実用一辺倒ではなく基礎的な研究を継続的に推進していることは

大変評価できる。

- 5年間でどのプロセスがどの程度に加速されたか、ある程度示すことが要求される。本プロジェクトに関与した製薬企業へのアンケート調査・ヒアリングも一案である。この中間点で、アンケート内容等を含めて検討をお願いしたい。

## 2. 個別テーマに関する評価

### 2. 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

#### 1) 研究開発成果について

膜タンパク質の発現・精製・結晶化技術の開発、電子顕微鏡のハードとソフトの高度化により、この分野で世界をリードする非常に優れた研究成果を上げている。特に、Cx26の構造解析、1.9Å分解能での解析など、特記すべき成果を上げて目標を十分にクリアしている。極低温電子顕微鏡などを使って細胞膜内での膜タンパク質について生体内に近い状態で解析する技術開発は、国内製薬企業単独では実施不可能であり、本研究開発の意義は大きい。

一方で、発現、精製、結晶化が進んでいないグループもある。また、膜タンパク質、とりわけGPCRの結晶化にはまだ多くの解決すべき点が多い。チーム内での連携及びNMRや計算科学のチームとの連携も進めることにより、創薬加速に繋がる成果を期待する。

#### <肯定的意見>

- 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として十分な成果が上がっている。
- ギャップジャンクションチャンネル Cx26 の構造解析が可能になったことは特記すべきである。
- 膜タンパク質の発現・精製・結晶化技術の開発、電子顕微鏡のハードとソフトの高度化により、X線結晶解析に匹敵する1.9Å分解能での解析を達成するなど、世界的レベルの成果を上げて目標を十分にクリアしている。
- 膜タンパク質の二次元結晶解析や単粒子解析において着実な進展が見られ、膜タンパク質の機能解明に貢献している。また、構造解析のための極低温電子顕微鏡の開発も進み、ソフトウェアの開発も順調に進んでいる。
- 非常に高い水準の膜タンパク質の構造解析が複数行われている。技術的にも最先端の水準を維持していて全く問題がない。
- 創薬を目指した膜タンパク質の構造解析を一貫して行っており、Cx26の構造解析、AQP4と水分子、脂質分子の解析、水透過阻害剤の解析など、非常に優れた研究成果を上げている。
- 細胞膜内での膜タンパク質について生体内に近い状態で解析する技術開発は、国内製薬企業単独では実施不可能であり、電子線等による膜タンパク質の構造解析技術は重要である。中間時点では最終目標への到達を予感させる実績があり、緻密な研究開発を継続してほしい。

<問題点・改善すべき点>

- GPCR に関する成果は今後に期待したい。
- 膜タンパク質の結晶化にはまだ多くの解決すべき点が多い。熱安定性を向上するミュータントの作成などから変異部位と安定性の相関について他の GPCR にも適用できる条件の確立に取り組む体制を確保していただき、良い結果を出していただくことに期待している。
- これは問題点とは言えないが、ヒトなど真核細胞由来の膜タンパク質に限定していることは、構造生物学的見地から言えば、固執することは必要ないように思える。
- 電子線トモグラフィ解析の説明がやや不十分であった。構造解析結果を評価する基準がないことが問題であるという指摘はもつともであるが、生化学的な実験（タグをつけたり、抗体でマークしたり）と組み合わせて、結果の質の評価をすべきだろう。
- グループ（担当者）によっては、発現、精製、結晶化が進んでいないところがあり、さらに成果をあげることが期待される。電子線トモグラフィのソフトウェアの開発については、独自に開発した部分をもっとアピールし、実用に供することのできる一般的な技術の確立を目指していただきたい。

<その他の意見>

- ・ 今回のプレゼンテーションでは全ての対象となるタンパク質が膜タンパク質であった。報告試料には水溶性タンパク質の結晶構造解析の例がいくつか示されている（特に BIRC での結果）が、この研究課題と膜タンパク質との関連がどのようなものであるか不明であった。
- ・ 分解能の数値目標を挙げ、特定の対象に対して達成しているが、他の対象に対しても適用できるノウハウや技術の確立が重要と思われる。

## 2) 実用化の見通しについて

本プロジェクトが関わる創薬加速は探索ステージが主たる対象であるが、生体内に近い状態での標的タンパク質の構造・機能情報が、結果的には革新的に創薬を飛躍させるとの印象である。AQP4の阻害剤が治療に使える可能性がある。本技術の構成要素はいずれも高度であり、簡単に普及できる性格のものではないので、NEDO特別講座を通じて製薬業界などへの教育・普及が図られていることも評価できる。

従来、個別に対応してきた、発現、精製、結晶化の作業を改善できるような、多くの対象に適用できる一般的な技術の確立が望まれる。GPCRなど企業が直ぐにでも興味を持つような成果が今後出てくることを期待する。

### <肯定的意見>

- 膜タンパク質の基盤的な研究を行っている。
- AQP4の阻害剤が治療に使える可能性がある。
- 本技術の構成要素はいずれも高度であり、簡単に普及できる性格のものではないと思われるので、NEDO特別講座を通じて製薬業界などへの教育・普及が図られていることは評価できる。
- 電顕の開発、解析ソフトの開発はNMRやX線結晶解析装置とは異なり、多くの需要が見込まれるものではないが、この分野での世界的リードとなるものである。
- 電子顕微鏡技術（電子線結晶学）の一般への移転が未だに困難である。しかし、肯定的に実用化への目途を考えると、最先端の生物学的意義の大きい研究を一心不乱に進めていけば、自ずと周囲がついてくるはずである。
- 優れた研究成果をあげており、創薬に対する潜在的な波及効果は大きい。
- 電子線による分解能と得られる構造情報についてはX線構造解析と幾分異なることから、水分子の役割等を含めた膜タンパク質の電子線由来構造・機能情報は、生命科学解明に大いに貢献すると再認識した。本プロジェクトが関わる創薬加速は探索ステージが主たる対象であるが、生体内に近い状態での標的タンパク質の構造・機能情報が、結果的には革新的に創薬を飛躍させるとの印象である。この点において、企業単独では実施できない電子線等による産学連携は必要であり、意義は高いと思う。

### <問題点・改善すべき点>

- GPCRなど企業が直ぐにでも興味を持つような成果が今後出てくることを期待したい。
- ユーザーのニーズの吸い上げが難しいことは理解できるが、創薬という目的

を考えると、解析対象とするタンパク質の選択基準が不明確のように感じる。選択にあたって、医学・薬学の専門家の意見を聞く機会を設け、構造上の特徴や今後の適用対象拡大の観点からみてさらに実用化に役立つと考えられるものを対象とした方が良いのではないか。(既にそういう取り組みをされているのかも知れないが)。

- 本プロジェクトで開発されている電顕はなかなか一般的な普及は困難な装置であることは明らかである。普及を図るための装置の小型化などを検討する必要はないのであろうか。
- 電子顕微鏡技術（電子線結晶学）の一般への移転が未だに困難である。しかし、この原因は電子顕微鏡技術自体にあるというよりも、膜タンパク質の調製の困難さから来るので、速効性のある解決策はないと思える。
- 従来、個別に対応してきた、発現、精製、結晶化の作業を改善できるような、多くの対象に適用できる一般的な技術の確立が望まれる。
- 数値目標は重要であるが、その目標に対しては柔軟に取り組む姿勢が必要である。従って、本プロジェクトにおいて、数値目標にあまり拘る必要はないと思うが、設定された数値の意義を創薬加速という視点で説明する必要がある。即ち、どの程度の分解能が創薬プロセスの現場で要求されているかとのニーズを踏まえた分解能向上を目指すことが望ましい。

#### <その他の意見>

- ・ 電顕などの使用についてはかなり高度の技術と経験が必要であるように思われるが、普及という面から人材育成などにも力を入れていただきたい。

### 3) 今後に対する提言

電子顕微鏡によるタンパク質の構造解析は、日本が世界をリードしている分野であり、本プロジェクトにおける産学官連携体制を活かしつつ、これまでの研究をさらに発展させ、結晶化困難と考えられている膜タンパク質の機能的構造が解明されることを期待する。成功した場合のインパクトは大きく、本プロジェクトを通して、PL を始めとするトップ研究者の発想と情熱を受け継ぐ若手を是非育てて欲しい。

#### <今後に対する提言>

- ・ これまでの研究をさらに発展させ、今研究している GPCR での成果が得られることを期待したい。
- ・ このまま進行すればよい。
- ・ 電子顕微鏡によるタンパク質の構造解析は、日本が世界をリードしている分野である。本プロジェクトを通して、PL を始めとするトップ研究者の発想と情熱を受け継ぐ若手を是非育てて欲しい。
- ・ 単粒子解析などにより結晶化困難と考えられているタンパク質の機能的構造が解明されることを期待している。
- ・ GPCR であるセロトニン受容体の構造研究は長期間継続して行っているにも拘わらず成功していないとのことであるが、成功した場合の大きなインパクトを考えると、今後も地道に続けていただくことを願います。
- ・ 本プロジェクトにおける産学官連携体制を活かしつつ、電子線・NMR・計算科学を統合的に駆使した創薬プロセス加速の成功事例は大きな波及効果がある。製薬企業各社の思惑もあり実現化は難しいと思うが、生命科学的に魅力ある膜タンパク質を対象として検討していただきたい。

#### <その他の意見>

- ・ 他の研究者との共同研究によって、対象とする GPCR の種類を広げること考えても良いのではないだろうか。

## 2. 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

### 1) 研究開発成果について

NMR を用いた創薬のためのリガンド(タンパク質)―受容体相互作用解析のための同位体標識発現系の開発、膜タンパク質系の測定法の開発から、受容体相互作用解析に至るまで創薬に重要な構造情報の獲得が可能な例が示されるなど順調な進展を示している。

一方で、測定対象に応じた NMR の試料調製法の開発は重要な課題であり、グループの成果のチームへの展開も行い、今後も積極的に取り組むべきである。

#### <肯定的意見>

- 幾つかの膜タンパク質で複合体や相互作用研究をユニークな手法を用いて開発し、十分な成果が上がっていると判断される。
- in silico のシミュレーションのチームとの連携は、上手く取れている。
- NMR 法の特質を生かし発展させた結合構造の解析法を開発する一方、創薬に繋がるタンパク質―リガンド間の動的な相互作用の詳細な解析に成功しており、十分に評価できる。NMR に欠かせない標識タンパク質の調製系など、基礎技術を確立したことも大きな成果である。
- NMR を用いた創薬のためのリガンド(タンパク質)―受容体相互作用解析のための同位体標識発現系の開発、膜タンパク質系の測定法の開発から、受容体相互作用解析に至るまで創薬に重要な構造情報の獲得が可能な例が示されるなど順調な進展を示している。今後の発展と成果に大いに期待できる。
- 本来、NMR 法は分子量の大きな系に適用するのが原理的に困難である。しかし、溶液中の情報を原子分解能で捉えることができる唯一の方法でもある。独自に開発した交差緩和法を応用することで、NMR 法の可能性を広げ、世界的にみても独自性のある研究を広く展開している。
- チームリーダーを中心とするグループで、世界的水準の研究開発が行われている。タンパク質相互作用解析に関する優れた成果は、実用的価値の高いものである。
- 製薬企業と連携して、リガンドベース創薬デザインを加速する NMR 相互作用解析手法の開発・高度化を実施したことは評価される。また、細胞膜における複合体相互作用解析を加速する NMR 試料調整法および解析法の開発は基盤技術として重要である。さらに、課題解決型を含めた企業との連携による創薬標的タンパク質複合体の相互作用解析は、今後の各社における創薬プロセスを加速すると期待される。

<問題点・改善すべき点>

- 核磁気共鳴法による膜タンパク質とリガンド分子の相互作用の研究は、国際的にも高いレベルかどうか疑問を持った。ターゲットとしている分子が必ずしも創薬企業が興味を示すものかどうか分からない。
- 交差緩和法はタンパク質-タンパク質間の相互作用を主に想定している。創薬を考えると、低分子-タンパク質の相互作用の検出や構造情報の取得も同様に重要である。可能なら、その方向へも研究を展開できると良い。
- NMR の試料調整（溶液条件の調整）の自動化、高速化、評価法の確立は重要な課題であり、個々のグループ（担当者）よりも、チーム全体で取り組むべきものと思われる。これまでに開発した技術を用いて、膜タンパク質の相互作用解析をさらに進めていただきたい。

<その他の意見>

- ・ NMR 測定によるタンパク質複合体構造構築における計算科学のチームとの共同は今後のプロジェクトの重要な成果に繋がるものであり、より密接な共同研究を期待している。
- ・ 安定同位体標識タンパク質の発現において、本プロジェクトの酵母を使用した系が大腸菌発現系と比較して有益との報告であるが、それが広く波及するような系の確立と共に膜タンパク質発現（特に量産）への検証を進めてほしい。

## 2) 実用化の見通しについて

開発した新手法について、実施に必要な情報の公開や NEDO 特別講座での教育が行われており、実用化への努力がなされている。課題解決型を含めた企業との共同研究の取り組みは評価でき、今後の各社における創薬プロセスを加速すると期待できる。酵母 *K. lactis* を用いた新規 NMR 用発現系の開発は、大腸菌以外の宿主で安定同位体標識を経済的に安価に可能にする可能性があり、実用化が期待できる。

一方で、溶液条件の調製の自動化、高速化について、一般的な手法の確立が実用上重要である。NMR 測定と構造計算に関わるソフトウェアをシステム化した実用的な創薬ソフトの構築が期待される。

### <肯定的意見>

- 幾つかの企業との共同研究が図られ、その取り組みは評価できる。
- 開発した新手法について、実施に必要な情報の公開や NEDO 特別講座での教育が行われており、実用化への努力がなされている。課題解決型研究開発が積極的に行われていることも評価できる。
- NMR 解析に用いる標識タンパク質の調製法の確立やリガンド受容体相互作用解析法は創薬への応用の実用的な方法として利用されるように整備されることを期待している。
- 酵母 *K. lactis* を用いた新規 NMR 用発現系の開発は、大腸菌以外の宿主で安定同位体標識を経済的に安価に可能にする可能性があり、十分に実用性がある。今後は、大量発現に向けた菌株の選別や譲渡体制の整備が望まれる。
- 実用化が期待できる有用な技術の開発が行われている。
- NMR は X 線構造解析と共に情報の相互利用を含めて進展すると期待されるが、本プロジェクトの NMR は X 線構造解析では挑戦できない分野の展開に特徴がある。たとえば、リガンドベース創薬デザインを加速する NMR 相互作用解析では、標的分子側の NMR 情報を直接的に得ないで実施可能である。従って、解析困難な膜タンパク質を標的とする製薬企業の研究開発には魅力的な存在である。

### <問題点・改善すべき点>

- 溶液条件の調整の自動化、高速化について、一般的な手法の確立が実用上重要である。STD シミュレータの試みは興味深いですが、実際に STD 実験を行う際に役立ったという実績が欲しいところである。

<その他の意見>

- NMR 測定と構造計算に関わるソフトウェアをシステム化した創薬ソフトの構築などに進展するとプロジェクトの成果としてより見易いものとなると思われる。

### 3) 今後に対する提言

水溶液中の系でのこれまでの研究をさらに発展させ、今後は、膜内にあるタンパク質とリガンドの相互作用を **NMR** で解析する研究を強力に進め、ユニークな成果をあげることが期待する。アミノ酸選択的交差飽和 (**ASCS**) 法を用いた複合体モデル構築手法は有効であり、検証を含めて成功例を増やし、ノウハウ、技術を蓄積していくことが望まれる。安定同位体標識を効率よく安価に行えるタンパク質発現系の探索を今後も継続し、大量発現に向けた菌株の選別や譲渡体制の整備が望まれる。創薬加速という視点では、例えば、タンパク質複合体モデル構築での成果を利用したスクリーニングでのヒット化合物が、標的タンパク質の予想位置に本当に結合しているかを迅速に評価できるかが課題であるが、大いに期待したい。

#### <今後に対する提言>

- ・ 今までの研究をさらに発展させ、**NMR** を用いた膜タンパク質関連での複合体解析や相互作用解析でユニークな成果をあげることが期待する。
- ・ 要素技術は十分に開発されており、水溶液中の系では多くの成果があがっているため、今後は、膜内にあるタンパク質とリガンドの相互作用を **NMR** で解析する研究を強力に進めてほしい。
- ・ **GPCR** などの膜タンパク質はリガンドの機能と対応して構造変化する機能が示されているが、このような機能に対応した構造変化を観測することが出来ればリガンド-受容体相互作用研究に多くの知見がもたらされるものと思われる。
- ・ 交差緩和法は **NMR** 手法としてはそれほど困難ではないが、試料作成において高度な重水素化率を達成する必要があるなどの難しさがある。従って、安定同位体標識を効率よく安価に行えるタンパク質発現系の探索を今後も継続するニーズがある。
- ・ **ASCS** 法を用いて複合体構造をモデリングする手法は、非常に興味深く、有効と思われるが、さらに成功例を増やし、ノウハウ、技術を蓄積していくことが望まれる。
- ・ 本プロジェクトでの **NMR** の貢献は、構造解析よりは機能解析である。その点は多くの実績があり、十分に成果が認知されている。さらに、創薬加速という視点では、例えば、タンパク質複合体モデル構築での成果を利用したスクリーニングでのヒット化合物が、標的タンパク質の予想位置に本当に結合しているかを迅速に評価できるかが課題であるが、大いに期待したい。

<その他の意見>

- NMR 解析を膜タンパク質へ適用した創薬活動の普及は技術的な面も含めこれからであるが、今後の重要な技術となることはこれまでの研究成果によって明らかであり、より裾野を広げられるように努力をお願いしたい。

## 2. 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

### 1) 研究開発成果について

タンパク質の動的構造を考慮した結合解析法、リガンド探索法の開発により、目標を上回る効率でヒット化合物を得ており、中間目標をクリアする世界的水準の十分な成果を上げている。本事業で開発されたシミュレーション技術は、新規性、有効性に優れており、基礎科学としての観点からも、大変意義があると同時に、今後の応用展開が期待できる。

一方で、「産業上有用な化合物」という定義がやや不透明である。例えば、in vivo での活性の目標値などを設定することにより、候補化合物としての有用性を示すことなど、定義の明確化が必要であろう。計算結果を実験と摺り合わせるようなタイプの研究をもっと数多くできるとなお良い。アクセラレータによる並列化では、未だ十分な性能発揮が得られていないが、情報系の研究者が参画しているので、今後のハードウェアの動向をふまえ、将来を見据えた並列化技術の開発に取り組んでいただけると良い。

#### <肯定的意見>

- 非常にユニークな成果が幾つか得られているので十分であると判断する。
- 順調に進んでいる。
- タンパク質の動的構造を考慮した結合解析法、リガンド探索法の開発により、目標を上回る効率でヒット化合物を得ており、十分な成果を上げている。研究開発項目①②との連携も図られている。
- 目標として設定されたバーは全てクリアされており、大きな研究開発の進展が見られる。受容体タンパク質へのドッキング手法の開発、タンパク質-タンパク質相互作用解析法そして新しい構造重ね合わせ法の開発によるペプチドから非ペプチドスクリーニング法の開発など今後の応用展開が期待される方法が確立されている。
- 多様な計算手法を総合的に開発している。創薬に計算科学が役に立つどうかは、リガンドとタンパク質の相互作用をいかに正確に見積もって  $\Delta G$  を計算できるかにかかっている。特に、新しい自由エネルギー計算法 (SRPG 法) やマルチカノニカル MD 法による Coupled binding and folding のシミュレーションは、正確な見積もりを可能にする計算法を提供する可能性がある。それに加えて、基礎科学としての観点からも、大変意義のある研究であると考えられる。
- チームリーダーを中心とするグループで、世界的水準の研究開発が行われている。本事業で開発された手法、シミュレーション技術は、新規性、有効性に優れており、公開されているソフトウェアもあり、実用化に対する期待が

大きい。

- *in silico* スクリーニングの実施は比較的容易な環境となったとの実感である。今後の課題は、タンパク質の動的性質の正しい評価と共に、受容体への基質結合能を高精度で評価する計算科学手法の確立であろう。本プロジェクトのシミュレーション技術は、それらの課題を克服して、*in silico* スクリーニングの効率を5倍程度に上げることを中間目標とした。数値目標はあくまでも一つの指標であるが、連携先の企業が効率化を実感しているとの印象である。

#### <問題点・改善すべき点>

- 得られている成果が企業にますます有効に利用されることを希望する。
- 薬物ドッキング計算システムの構築が難航している。問題点の抽出と解決のため、さらなる努力が望まれる。
- 「産業上有用な化合物」の定義が曖昧である。例えば、*in vivo* での活性の目標値などを設定することにより、候補化合物としての有用性を示すことなどが必要であろう。
- 計算結果を実験で解釈できるような数値に変換して、それを実際に実験と組み合わせるようなタイプの研究をもっと数多くできるとなると良い。
- 時間を要する MD シミュレーションがスクリーニングの現場でどの程度実際に役立つか、さらに検討が必要と思われる。*in silico* の手法の高速化は非常に重要と思われるが、実際にどの程度有効か、手法によって見極めが重要である。現状ではアクセラレータによる並列化が中心であり、十分な成果が得られていないが、情報系の研究者が参画しているなら、今後のハードウェアの動向をふまえ、将来を見据えた並列化技術の開発に取り組んでいただくと良いと思う。
- 「産業上有用な化合物」という定義がやや不透明である。産業上有用であったことは、*in silico* から選定された化合物が *in vitro* で評価され、そこから誘導された化合物が *in vivo* 開始という流れの中で評価されるべきである。各企業での評価基準をそのまま採用し公開することは困難と予想されるが、薬効の評価ステージを前提として「産業上有用な化合物」と記載することが事後評価時点では要求されるであろう。

#### <その他の意見>

- 候補化合物スクリーニングのみならず、水溶性や hERG 阻害予測など創薬に欠かせない予測への展開は非常に重要で、その有用性を示すことは大いに役立つものである。

## 2) 実用化の見通しについて

シミュレーションソフト **myPresto** が公開され、多くのユーザーがダウンロードして利用していることから、既に実用的な成果が上がっているとも言える。今後、これに新たに開発されたプログラムが追加され、**in silico** ドッキング計算を活用した実証研究も蓄積されることによって実用化の見通しは高く、創薬において強力なツールになる可能性がある。

一方で、多くの要素技術が開発され、評価も行われているが、実用化に向けて、それらの総合的利用、改善を期待する。ソフトウェアツールの開発では、開発者とユーザーの密接な交流が実用化にとって重要であり、**NEDO** 技術講座など、交流の場を今後も活用することが望まれる。数値目標を達成することだけでなく、企業の創薬探索を加速した実績を上手く提示して欲しい。

### <肯定的意見>

- **in silico** スクリーニングでは既に実用的な成果が上がっていると高く評価できる。
- 既にデータベースと各種プログラムが一体となって公開されており、多くのユーザーがダウンロードして利用していることから、これに新たに開発されたプログラムを追加していくことで、十分に実用化が図られると思う。
- 非常に魅力的な技術的開発が進められている。ドッキング法や重ね合わせなど創薬に対応した技術は、企業から見て一度は **TRY** してみたいと思うレベルである。
- タンパク質・ペプチド性リガンドから、非ペプチド性低分子化合物をデザインする手法は単純であるが、創薬において強力なツールになる可能性がある。
- 独自開発したプログラム **suite** である **myPresto** が広く使われている。
- **myPresto** は、すでに基盤技術として広く利用されている。新たに開発された技術は、まだ実験段階だが、既存の手法よりも良い性能を上げているものも多く、実用化に期待したい。
- **in silico** ドッキング計算を活用した実証研究の蓄積によって実用化の見通しは高いと言える。

### <問題点・改善すべき点>

- 独自のアルゴリズムを既存の考え方に展開するという方法をとっていると考えられる。これらの考え方からさらに飛躍した方法の展開が示されることによって更なる有用性が示されると思う。
- これは一般論であるが、無料でダウンロードできる各種プログラムの中には、マニュアルがしっかりしていないものが多い。**myPresto** においても、豊富

な情報提供を今後も継続して続けることが重要であろう。

- 多くの要素技術が開発され、評価も行われているが、実用化に向けて、それらの総合的利用、改善が期待される。例えば、類似の機能をもつ異なる手法が提案されているが、それらをどのように統合し、あるいは使い分けるのか、実用に向けて指針が欲しい。ソフトウェアツールの開発では、開発者とユーザーの密接な交流が実用化にとって重要である。
- 本シミュレーション技術での数値目標は他の 2 分野(電子線、NMR)と比較して、ある意味では達成し易いとの印象である。一方、数値目標とは異なる成果によって、創薬を確実に加速できるのも本シミュレーション技術の特徴である。企業の創薬探索を加速した実績を上手く提示して欲しい。

#### <その他の意見>

- ・ *in silico* スクリーニングの効率のよさは評価される。今後さらに個々の候補化合物と受容体との具体的な相互作用(分子認識)を解析することにより、次の段階の分子設計に有用な情報が示されることを期待している。
- ・ 実用化や統合化に余り囚われず、高水準の技術シーズを増やす方向も意味があると思われる。実用化については、将来の潜在的なユーザーとの有効な連携ができると効果的であり、NEDO 技術講座など、交流の場を今後も活用していただきたい。

### 3) 今後に対する提言

新規手法の開発では、その有用性について、可能性を示した段階のものも多く、今後は、現場のメディシナルケミストの意見なども参考にして、普遍的、一般的手法の確立と、実用に向けた検討をさらに行う必要がある。in silico の手法の高速化は非常に重要であり、将来を見据えた並列化技術の開発や次世代スパコンを意識したソフト開発と企業への利用浸透を検討して欲しい。実験で構造を決定することが難しい膜タンパク質のホモロジーモデリングとリガンドの構造や配座の探索とを上手く組み合わせることやデータベースの整備や水溶解性予測問題解決も重要であり、これらの技術の発展とメンテナンスを合わせて解決し、企業における実用化に結びつくことを期待する。

#### <今後に対する提言>

- ・ 今までのユニークな取り組みをさらに発展させ、企業における実用化に結びつくことを期待したい。
- ・ 実験で構造を決定することが難しい膜タンパク質のホモロジーモデリングとリガンドの構造や配座の探索とを上手く組み合わせることが出来ると非常に有効だと考える。困難かも知れないが、是非取り組んでほしい。
- ・ 創薬に応用できる技術が開発されているが、これらの技術の発展とメンテナンスが課題になると考えられ、将来的にベンチャーなどによる解決がなされる可能性があると思われる。
- ・ データベースの整備や水溶解性予測問題解決は、地味ではあるが、実用的には極めて重要である。こうした活動をしっかり評価できる評価基準を設定することが必要である。
- ・ 新規手法の開発では、その有用性について、可能性を示した段階のものも多く、今後は、普遍的、一般的手法の確立と、実用に向けた検討がさらに必要と思われる。
- ・ 次世代スパコンを意識したソフト開発と企業への利用浸透を目指してほしい。

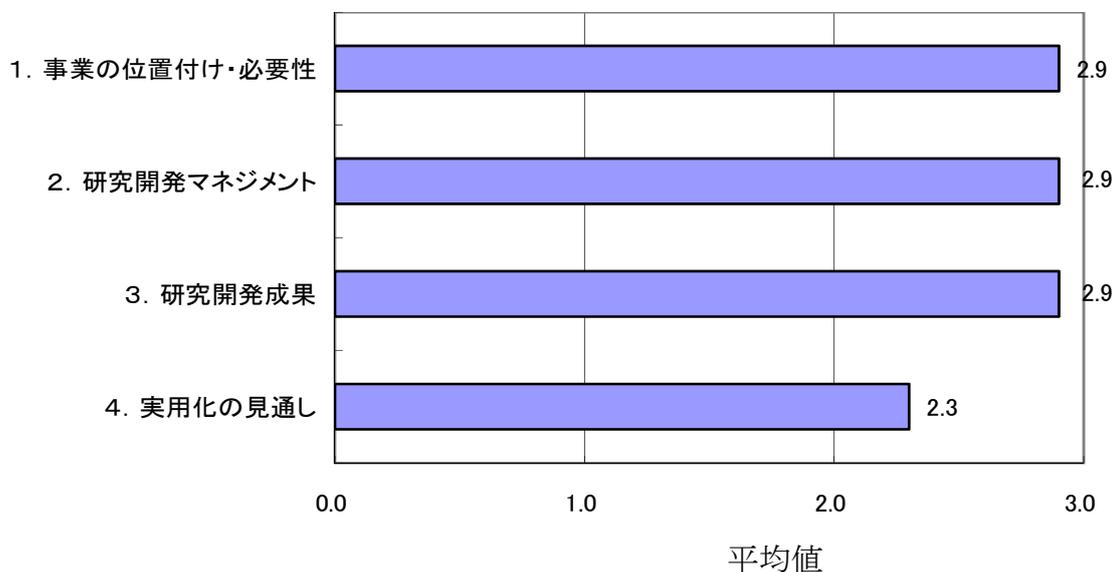
#### <その他の意見>

- ・ メディシナルケミストは今までの「経験と勘」を活かして創薬活動を行っていると言われますが、これらは決して個人的な特殊な才能ではないと思っています。現場のメディシナルケミストの意見や期待などから、一つでも可能なヒントを得ることによって、構築したソフトが充実することを期待しています。
- ・ 化合物の溶解度予測の手法は、密度、熱容量、結晶融点など、他の物性にも

適用できる一般的な手法と思われる。学習対象の選択など、今後の課題克服に期待したい。

### 3. 評点結果

#### 3. 1 プロジェクト全体



評価項目	平均値	素点 (注)							
		A	A	A	A	B	A	A	
1. 事業の位置付け・必要性について	2.9	A	A	A	A	B	A	A	
2. 研究開発マネジメントについて	2.9	A	A	A	A	A	A	B	
3. 研究開発成果について	2.9	A	B	A	A	A	A	A	
4. 実用化の見通しについて	2.3	B	B	B	B	B	A	A	

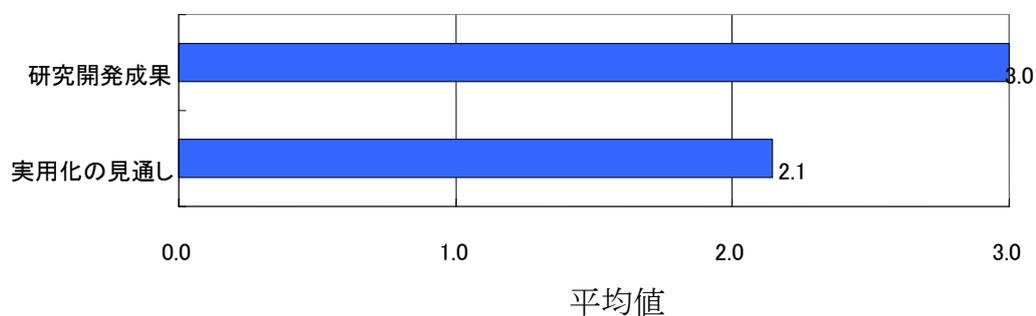
(注) A=3, B=2, C=1, D=0 として事務局が数値に換算し、平均値を算出。

#### 〈判定基準〉

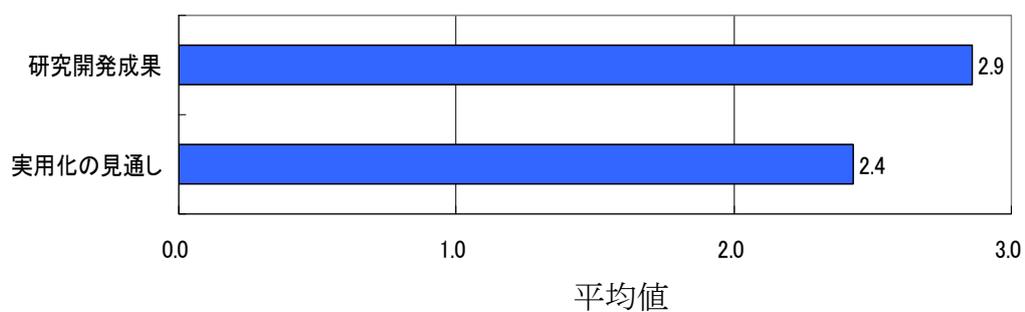
1. 事業の位置付け・必要性について	3. 研究開発成果について
・非常に重要 →A	・非常によい →A
・重要 →B	・よい →B
・概ね妥当 →C	・概ね妥当 →C
・妥当性がない、又は失われた →D	・妥当とはいえない →D
2. 研究開発マネジメントについて	4. 実用化の見通しについて
・非常によい →A	・明確 →A
・よい →B	・妥当 →B
・概ね適切 →C	・概ね妥当であるが、課題あり →C
・適切とはいえない →D	・見通しが不明 →D

3. 2 個別テーマ

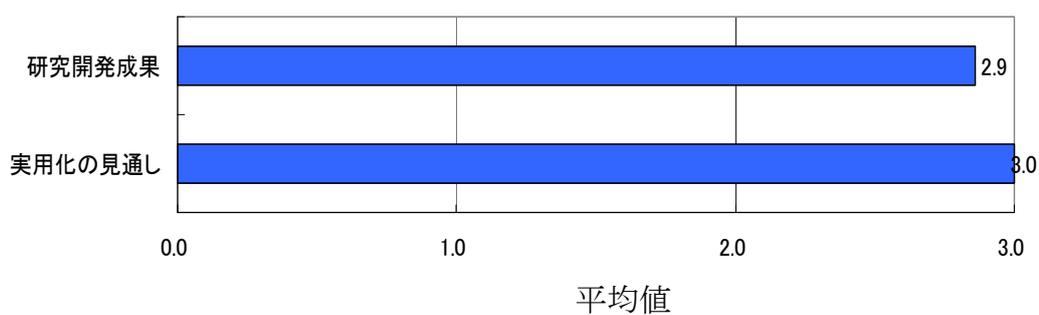
3. 2. 1 電子線等による膜タンパク質及びその複合体の構造解析技術



3. 2. 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



3. 2. 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



個別テーマ名と評価項目	平均値	素点 (注)							
(1) 透明電極向けインジウム使用量低減技術開発									
1. 研究開発成果	3.0	A	A	A	A	A	A	A	A
2. 実用化の見通し	2.1	B	B	B	B	B	B	A	B
(2) 透明電極向けインジウム代替材料開発									
1. 研究開発成果	2.9	A	B	A	A	A	A	A	A
2. 実用化の見通し	2.4	B	B	B	A	B	A	A	A
(3) 希土類磁石向けディスプレイ用インジウム使用量低減技術開発									
1. 研究開発成果	2.9	A	A	A	A	A	A	A	B
2. 実用化の見通し	3.0	A	A	A	A	A	A	A	A

(注) A=3, B=2, C=1, D=0 として事務局が数値に換算し、平均値を算出。

〈判定基準〉

1. 研究開発成果について

- ・非常によい
- ・よい
- ・概ね適切
- ・適切とはいえない

2. 実用化の見通しについて

- A ・明確 →A
- B ・妥当 →B
- C ・概ね妥当であるが、課題あり →C
- D ・見通しが不明 →D

## 第2章 評価対象プロジェクト

1. 事業原簿

次ページより、当該事業の事業原簿を示す。

## 健康安心イノベーションプログラム

「創薬加速に向けたタンパク質構造解析基盤技術開発」プロジェクト

事業原簿

【公開版】

作成者	新エネルギー・産業技術総合開発機構 バイオテクノロジー・医療技術開発部
-----	--

— 目次 —

概要	.....	i ~ v
プロジェクト用語集	.....	A-1~10
I. 事業の位置付け・必要性について	.....	1
1. NEDO の関与の必要性・制度への適合性	.....	1
1.1 NEDO が関与することの意義	.....	1
1.2 費用対効果	.....	2
2. 事業の背景・目的・位置付け	.....	2
II. 研究開発マネジメントについて	.....	4
1. 事業の目標	.....	4
1.1 事業の目標	.....	4
1.2 目標設定の理由	.....	5
2. 事業の計画内容	.....	6
2.1 研究開発の内容	.....	6
(1) 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」	.....	6
(2) 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」	.....	7
(3) 研究開発項目④「高精度 in silico スクリーニング等のシミュレーション技術」	.....	8
2.2 研究開発の実施体制	.....	9
(1) 実施体制の構造	.....	9
(2) 課題解決型連携(実証研究)の実施	.....	10
(3) 研究実施体制	.....	10
2.3 研究開発の運営管理	.....	11
3. 情勢変化への対応	.....	11
4. 中間評価への対応	.....	12
5. 評価に関する事項	.....	12
III. 研究開発成果について	.....	13
1. 事業全体の成果	.....	13
2. 研究開発項目毎の成果	.....	14
2.1 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開発	.....	14
(1) 膜タンパク質及びその複合体の構造解析に必要な膜タンパク質等の発現・精製技術、結晶化技術の開発	.....	14
(2) 極低温高分解能電子顕微鏡や自動電子顕微鏡等の電子顕微鏡の開発、コンピューター解析の高速化と精密化	.....	15
(3) 電子顕微鏡とX線によるタンパク質構造解析	.....	16

(4) 2次元結晶化できた試料の構造解析を可能にする電子結晶学用プログラム開発、単粒子解析プログラム開発	.....	31
(5) ATP感受性カリウムチャンネル制御機構解明に向けた基盤技術開発	.....	36
(6) 電子トモグラフィ技術を補完するためのソフトウェア開発	.....	39
(7) 分子動力学計算による水銀のAQP1抑制機序の解析	.....	40
(8) 亜鉛によるアクアポリン4の水透過性抑制	.....	40
2.2 核磁気共鳴法(NMR)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	.....	49
(1) 安定同位体標識タンパク質調製系の開発	.....	49
(2) タンパク質複合体モデル構築を目指したNMR測定法の開発	.....	56
(3) 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	.....	59
(4) 細胞膜複合体相互作用解析のためのNMR解析法の開発	.....	66
(5) 創薬標的タンパク質の個別解析例	.....	70
2.3 高精度 in silico スクリーニング等のシミュレーション技術	.....	81
(1) in silico ドッキング計算の高度化	.....	82
(2) 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	.....	94
(3) 創薬開発への応用促進に向けた技術開発	.....	118
IV. 実用化の見通しについて	.....	154

(添付資料)

- ・イノベーションプログラム基本計画
- ・プロジェクト基本計画
- ・技術戦略マップ(分野別ロードマップ)
- ・事前評価関連資料
- ・成果発表・論文・特許出願リスト

# 概要

		作成日	平成21年7月 23 日
プログラム名	健康安心イノベーションプログラム		
プロジェクト名	創薬加速に向けたタンパク質構造解析基盤技術開発	PJコード	P08005
担当推進部/担当者	バイオテクノロジー・医療技術開発部/主査 伊豆本 義隆		
O. 事業の概要	<p>本事業は、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、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、並びに高精度 in silico スクリーニング等のシミュレーション技術を活用し深度化して、細胞膜上で複合体を形成している生体内に近い状態の膜タンパク質およびその複合体の立体構造情報およびリガンド相互作用情報を抽出する方法論の開拓とそれに基づくヒット化合物の高効率探索技術の開発を行い、企業との課題解決型連携を通じて、これら技術を産業界に普及させるとともに創薬への有用性の実証研究を行う。また創薬上有用な膜タンパク質およびその複合体の解析と医薬リード化合物の取得を行い、タンパク質立体構造に指南された創薬戦略(SGDD: Structure-Guided Drug Development)を進展させる。</p>		
I. 事業の位置付け・必要性について	<p>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。</p> <p>現在、市販薬剤のほぼ 50%が膜タンパク質を作用点としているといわれており、膜タンパク質は、生命現象の解明においてのみならず、創薬開発の重要な標的タンパク質でもある。膜タンパク質は細胞膜上で複合体を形成し、その機能を発現している。従って、細胞表層における膜タンパク質およびその複合体の立体構造情報やリガンドとの相互作用の情報を取得し、それら情報に基づいた計算科学的解析により医薬リード化合物を効率よく絞り込んでいく「タンパク質立体構造に指南された創薬戦略(SGDD : Structure Guided Drug Development)」を進展させることは、さまざまな技術的困難さがあるものの、我が国において緊急かつ挑戦的な課題である。</p> <p>このような状況に鑑み、NEDO のプロジェクトとして「生体高分子立体構造情報解析」(平成14～18年度)プロジェクトが実施され、膜タンパク質及びその複合体を対象として電子顕微鏡による立体構造解析技術および核磁気共鳴法(NMR)などを用いた相互作用解析技術が開発され、さらに化合物結合の高速・高精度な計算科学的シミュレーション技術の開発が行われた。</p> <p>本事業では、これらの技術を活用して企業との課題解決型連携を行い、これら技術を産業界に普及させるとともに創薬への有用性の実証研究を行う。さらにこれら技術を深度化しつつ、細胞膜上で複合体を形成している状態での膜タンパク質の立体構造情報およびリガンド相互作用情報を抽出する方法論の開拓やそれに基づくヒット化合物の高効率探索技術の開発を行い、SGDD を進展させることを目的とする。</p> <p>これら一連の技術を開発し、統合的に利用することは広く国民の利益に資する基盤的研究であり、国(NEDO)の積極的な関与が必要なものと考えられる。今後、世界に類を見ない少子高齢化社会を迎える我が国において、国民が健康で安心して暮らせる社会を実現することは喫緊の課題であり、個の医療を通じて健康寿命の延伸、QOL(Quality of Life:生活の質)の向上を図る目的で行われる「健康安心イノベーションプログラム～健康で安心して暮らせる社会の実現を目指して～」プログラムの一環として本事業を実施する。</p>		
II. 研究開発マネジメントについて	<p>事業の目標</p> <p>本事業では最終的に、①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、2次元結晶解析技術、電子線トモグラフィー、および単粒子解析技術等を開発し、これらの技術と既存の技術を活用して、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。②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、結合力が弱いリガンド分子の結合構造の解析技術開発、固体と液体が混合した不均一な系における解析技術の向上、および細胞表層における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開発等を実施し、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。③高精度のin silicoスクリーニングを実現するため、in silicoスクリーニングの効率を従来法に比べ10倍程度に上げる技術およびターゲット選択性能を従来法に比べ10倍程度に上げる技術を開発し、さらに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)を得る一般的手法等を開発して、産業上有用な化合物を10個以上取得する。これらを通じてSGDDを進展させることを目標とする。</p>		



<p>III. 研究開発成果について</p>	<p>研究開発項目②「核磁気共鳴法(NMR)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」</p> <p>1分子蛍光分析法をもとにした測定条件の体系的スクリーニング法および大腸菌発現系と同様の条件下で安定同位体標識できる酵母発現系を開発した。固液界面の分子間相互作用解析に有効な高分解能マジック角回転条件下の転移交差飽和(TCS)法において、非特異的相互作用を抑制できる多孔性担体を開発し、高感度・高精度な TCS データ取得に成功した。さらにアミノ酸選択的交差飽和方法の実験データと分子動力学計算を組み合わせて、高精度なタンパク質複合体の立体構造構築方法を計算科学チーム(研究開発項目③)と共同で開発した。また創薬標的タンパク質であるケモカイン受容体、ディスコインドメイン受容体、細胞接着因子 CD44、ならびに GPVI のリガンド認識機構を解明した。</p> <p>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」</p> <p>ドッキングスコアの精度向上のため、sequence-based DSM法を開発しより高いヒット率が得られる手法とした。FP法とTI法に基づく滑らかな解離経路で結合自由エネルギーを算出するSRPG法を開発し、それを電子顕微鏡実験チーム(研究開発項目①)によって解析されたアクアポリン4の阻害剤解析に応用した。核磁気共鳴実験チーム(研究開発項目②)と共同してASCS(アミノ酸選択的交差飽和)法の観測結果から蛋白質複合体モデルを構築する方法を開発し、ディスコインドメイン受容体とコラーゲンの複合体モデル構築へ応用した。生理活性を有する非ペプチド性化合物の探索のため、新たにMD-MVO法を開発し、<math>\mu</math>オピオイド受容体に対して検証した。hERGの立体構造モデルにCOMBINE法を適用し、従来法の7.9倍の選択性をもつ阻害活性予測法を開発した。水溶解度推定のため、物理化学的特徴を分子記述子に加える新たな高精度の予測法を開発した。<math>\mu</math>オピオイド受容体アゴニスト、農薬のシードとなる化合物、およびインフルエンザ・ウィルスのPA-PB1複合体阻害剤等の70を超えるヒット化合物を得、有用な化合物を20ヶ程得た。その際、ヒット率や選択性も向上できた。</p>			
	<table border="1"> <tr> <td>投稿論文</td> <td>「論文」 86件、「総説・解説記事等」 44件</td> </tr> <tr> <td>特許</td> <td>「出願済」 13件(うち国際出願4件)</td> </tr> </table>	投稿論文	「論文」 86件、「総説・解説記事等」 44件	特許
投稿論文	「論文」 86件、「総説・解説記事等」 44件			
特許	「出願済」 13件(うち国際出願4件)			
<p>IV. 実用化の見通しについて</p>	<p>研究開発項目①「電子線による膜タンパク質及びその複合体の構造解析技術」</p> <p>生体内に近い状態の構造を細胞内において観察することが出来る電子線トモグラフィーの方法を用いて高い分解能で立体構造解析を行うために、独自に開発した極低温電子顕微鏡の開発・改良を続けてきている。その結果、第7世代の極低温電子顕微鏡として、完成しつつあり、脂質2重膜を分離して観察できるような、電子線トモグラフィー法における最高の分解能を達成するシステムの開発が進んでいる。一方、心臓や免疫系、電気シナプスを始め、生体内で重要な機能を担うことがわかっているギャップ結合チャネルの構造を解析して、これまでの教科書の記述を変えるブラグゲーティングモデルを提案した(PNASとNatureに発表)。そのギャップ結合などの立体構造について、この第7世代の極低温電子顕微鏡と新たに開発しつつある電子線トモグラフィー像解析プログラムなどによって、高分解能電子線トモグラフィー観察法の実用化への研究が進んでいる。</p> <p>水チャネル、アクアポリン-4(AQP4)をノックアウトしたマウスでは、脳への障害が与えられたときに脳浮腫による死亡率が飛躍的に減少する。それゆえ、脳での特徴的発現が見られる水チャネルAQP4の水透過を阻害することが出来る薬剤は、脳浮腫を防ぐことが出来るかと期待され、その開発が望まれている。昆虫細胞を用いたAQP4の大量発現と精製を行い、ベシクルに再構成する純粋な系を用いて、AQP4の水透過阻害剤を探索した。その結果、アセタゾールアミド(AZA)がAQP4特異的に水透過を阻害すること、しかも、その阻害は、濃度依存的で、可逆的であることを解明した。また、電子線結晶学により解析したAQP4の構造と独自に開発したSievgeneというプログラムを用いて、AZAをはじめとして、メタゾールアミド(MZA)、バルプロイクアシッド(VPA)、サルチアミンなどの化合物がAQP4へ結合する様子のドッキングモデルを計算した。さらに、このような複合体の形成の様子を実際に近い水中での分子動力学(MD)計算を用いてシミュレートした。また、NMRを用いた相互作用解析により、相互作用部位を解明すると共に、AZAとAQP4複合体の構造を電子線結晶学により解析し、その情報から、最も効率が良く、薬として用いるのに最適な化合物を発見・開発する。この様に、各グループの密接な連携を通して、膜タンパク質の構造と機能解析、相互作用解析、計算科学を用いた創薬加速のための基盤技術を具体的な例を用いて、実用化を図る見通しである。</p> <p>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」</p> <p>新規 NMR 用酵母発現系の開発: NMR による低分子およびタンパク質リガンドと標的タンパク質間相互作用解析を行う場合、標的タンパク質またはリガンドタンパク質を安定同位体標識することが要請される。したがって、なるべく多様な安定同位体標識発現系を完備しておくことで、一層の創薬研究が加速されると考える。本研究で開発された新規酵母発現系はその点でその点で有用である。</p>			

IV. 実用化の見通しについて

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に、解離定数が mM ~  $\mu$ M のように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技術を開発し、固体と液体が混在した不均一な系における膜タンパク質とリガンド分子の相互作用解析技術の高感度化を進めている。実際に、固定化担体や固定化方法スピニング条件などを検討し、感度を3倍から6倍ほどに向上させることに成功しているため、実用化の段階に入りつつある。

アミノ酸選択的交差飽和法(ASCS法)と分子動力学的計算を組み合わせることによって、受容体のNMRスペクトルの帰属を行わずに、相互作用しているタンパク質複合体のモデル構築を可能にする方法の開発を進めている。独自に開発したNMR測定法であるASCS法によりアミノ酸残基間距離情報を抽出し、先端的分子動力学計算法を用いて複合体のモデルを作製することに成功している。このような共同研究が進展しているため、タンパク質複合体モデルを作製する研究において、ここで開発しつつある手法が実用化できる見通しである。

NMR 溶液条件探索法の開発: NMR の試料測定においては、質の高いスペクトルを測定することが要求される。通常は実際にスペクトルを測定して、溶液条件の最適化を図ることが多いが、多大な測定時間、試料が必要となる。本開発で条件検討の時間の短縮化が達成された。

アミノ酸選択的交差飽和法およびモデル構築ソフト: タンパク質複合体の立体構造を求めることは、創薬開発研究において有用である。我々は、高分子量を有する標的タンパク質を複数種類のアミノ酸選択標識することにより、標的タンパク質のNMR帰属を行わずとも、標的タンパク質とリガンド間の残基距離情報を抽出することに成功した。アミノ酸選択標識可能な発現系が必要であるとの条件があるものの、有効と考える。さらに、中村チーム(研究開発項目③)は、この距離情報をもとに、精密な複合体モデルを構築するソフトの開発に成功した。我々のアミノ酸選択標識交差飽和法と中村チームの開発したソフトを組み合わせることにより、迅速に標的タンパク質・リガンド複合体モデルが作成でき、創薬研究に貢献できると考える。

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」

医薬品探索を1つの目的とした分子シミュレーションソフト「myPresto」は、既に、経済産業省のホームページ (<http://medals.jp/myPresto/index.html>) 及び、大阪大学のホームページ (<http://presto.protein.osaka-u.ac.jp/myPresto4/>) で無償ダウンロード可能となっており、公開以来、約400回ほどダウンロードされ、600回以上のユーザーの問い合わせに応じ、化合物データベースLiganBoxも10サイト以上に配布を行ってきた。英語ページも作成しているため、米国、カナダ、ドイツ、フランス、イタリア、オランダ、ポーランド、ルーマニア、ブラジル、インド、中国、台湾、韓国のアカデミアおよび企業など海外からダウンロードされた件数もこれまでに69件ある。またソフトウェア開発での技術情報は論文のみならずバイオ産業情報化コンソーシアム(JBiC)のホームページ ([http://www.jbic.or.jp/activity/st\\_pr\\_pj/mypresto/index\\_mypr.html](http://www.jbic.or.jp/activity/st_pr_pj/mypresto/index_mypr.html)) でも公開している。このmyPrestoは、国産の非商用の医薬スクリーニング・ソフトウェアとしては唯一のものであるため、各方面からその利用が期待されており、例えば、文部科学省が推進する次世代スーパーコンピュータ・プログラムにおけるフィジビリティの対象として採用され、ペタ・フロップスでの稼働性能を出せるという評価も受けている。企業においてmyPrestoがどこまで利用されているかは明らかではないが、プロジェクト参画製薬企業のみならず、日本電気(株)(NEC)などで創薬受託研究事業にも用いられ、医薬品スクリーニング特許申請(「化合物のスクリーニング方法及びそのスクリーニングシステム」特開2008-217594(P2008-217594A))、コンピューターシステム販売におけるmyPrestoのインストールサービス(NEC、ナベインターナショナル)などにも用いられている。

本創薬加速プログラムにおいて実施中の薬物探索実証研究では、塩野義製薬において48化合物、三井化学アグロにおいて23化合物、合計71化合物の活性化化合物を得ており、この中には有用な候補化合物となりうるものが20件ほど得られている。また、BIRC集中研において、大学等外部の研究機関との共同研究においては、横浜市大・朴教授との共同研究でインフルエンザウイルスPA-PB1タンパク質複合体阻害剤を、3化合物発見している。その他、いくつかの外部との共同研究においても、合計54化合物が新たに見出されており、本プロジェクトにて開発中の手法が、様々な標的タンパク質に対し、高い効率でヒット化合物を見出す手法を提供していると言える。さらに、hERGチャネルの阻害剤を選択的に同定する手法の開発においては、従来法に比べて7.9倍のパフォーマンスを発揮できており、極めて実用に近い方法と考えられる。

一方、研究開発項目①におけるAQP4阻害剤探索のように実験が難しい系にも適用することが可能なことが示唆されるデータを得たので、今後、応用を進める。また研究開発項目②における交差スピン緩和のデータを用いた複合体モデリング計算のソフト開発と応用にも目処がたっており、研究開発項目①、②で開発される新技術に対応したソフトウェアを開発・公開しつつ応用を進めていく。世界的に見てもこのような機能はユニークなものであり、研究開発項目①-②-③の連携によって初めて生まれたもので、商品として全く差別化されている。

以上のように、我々が開発を進めている in silico スクリーニングの技術は、一部は既に実用化されつつあるとも言える状況である。今後、さらにその技術が高度化すれば、国内だけでなく、海外を含めたより広い利用がなされるものと考えている。

V. 評価に関する事項	事前評価	H19年度は経済産業省の直轄事業として実施。H19年度末に事前評価を行い、H20年度からNEDO事業として実施。
	中間評価以降	平成24年度 事後評価実施予定
VI. 基本計画に関する事項	作成時期	平成20年3月制定
	変更履歴	なし

## プロジェクト用語集

### Actin (アクチン)

真核細胞の内部で、繊維状の構造を形成する細胞骨格タンパク質のひとつ。分子量5万の球状蛋白質である G-actin が螺旋状に多数重合して繊維状のアクチン (F-actin) を形成する。アクチンの重合と脱重合は、さまざまなアクチン結合蛋白質との相互作用によって制御されている。

### Affinity Chromatography (アフィニティー・クロマトグラフィー)

クロマトグラフ法の1種。固定相に極めて特定のタンパク質に対する選択性が高く、かつ結合力の高い物質を付加させ、タンパク質を精製する手法。

### APs (Accelerator Processors)

特殊な用途を高速に実施するためのチップ全体を意味し、具体的にはグラフィック表示を高速に行うためのグラフィックス・アクセレータや、GRAPE-DRのように数値演算を超高速に実施するために特殊に設計したチップが開発され、市販されている。

### Ca<sup>2+</sup>-ATPase

アデノシン三リン酸 (ATP) の分解に伴うエネルギーを利用し、カルシウムを筋小胞体に取り込む膜タンパク質。

### CAPRI

世界的な、タンパク質複合体構造の予測コンテスト。タンパク質の構造が提示され、世界中の計算チームがエントリーして、その複合体構造を計算で予測する。同時進行して複合体の構造解析が実験的に進められ、計算予測を完全なブラインドテストで評価する。

### CDR (相補性決定領域)

抗原と相互作用する可変領域の中で抗原との直接的結合を担う領域。遺伝子レベルでの変異や組み換えが多いために、他との配列相同性が低く超可変領域とも呼ばれ、抗原特異性に重要とされる。

### COMBINE法 (Comparative Binding Energy Analysis)

ドッキングソフト等を用いて作成した化合物-タンパク質複合体のポーズにおいて、両者の間の相互作用エネルギーを力場計算に基づいて算出し、それを注目するタンパク質の残基毎に振り直し、各値を記述子として定量的構造活性相関(QSAR)解析を行う方法のこと。力場計算における van der Waals エネルギーと静電エネルギーは物理化学的に算出されるが、それらの重みづけは標的タンパク質毎に調整されるため実験値に近いスコアが得られやすい。

### **Co-LET 法 (コレット法)**

Co-Localization Expression Technique の略で Homer (Group I mGlu receptors と結合するタンパク質) を用いて膜タンパク質を効率よく局所的に大量に発現させる方法。

### **Coupled folding and binding**

タンパク質の新しい分子認識メカニズム。相手と複合体を形成していない状態では特別なかたちをとらずにランダムな構造をもち、いわゆる天然変性状態となっているが、相手と遭遇するとフォールディングし (折れ畳まれ) 特別なかたちの複合体を形成し、生体信号伝達等を行うというもの。P. E. Wright が NMR によってその存在を証明したことで有名である。

### **ESI-MS(Electron Spray Ionization-Mass Spectrometer)**

エレクトロスプレー法による試料イオン化法を用いる質量分析計。質量分析器の前段に、ミクロ HPLC やキャピラリー電気泳動を設置し、混合試料から直接目的物質を分離、構造解析ができる。

### **Evolutionary Trace 法**

タンパク質複合体において、もしその複合体が生物学的に重要ならば、生物種を越えて複合体構造は保持されなければならない。従って、2つのタンパク質の界面に存在するアミノ酸配列は、同時に進化ないし保存されなければならない。この性質を用いて、配列進化・保存からタンパク質界面に存在する残基を特定する手法のこと。

### **Fed-Batch 法**

微生物の培養法。流加培養などともいわれる。微生物自身の生育や微生物が目的分子を大量発現するうえで必要な栄養素を、培養期間中常に添加し続ける方法。通常の培養に比べて、微生物の生育と目的分子の大量発現の両方を大きく増加させることができる。

### **GPCR (G タンパク質共役型受容体、G Protein-Coupled Receptor)**

膜貫通領域を 7 本持つ受容体。リガンド (タンパク質に特異的に結合する低分子物質) などの細胞外刺激により、3 量体 G タンパク質を活性化する。医薬品の 30% はアゴニスト、またはアンタゴニストといわれている。

### **GPGPU (General Purpose GPU)**

Aps の一つであるグラフィックスアクセラータとして、通常は PC で利用される画像処理を行う GPU(Graphics Processing Unit)を、より汎用に利用するもの。NVIDIA 社が主要な製品を提供しており、NVIDIA 社が提唱する CUDA (Compute Unified Device Architecture : クーダ) と呼ばれる GPU 向けの C 言語の統合開発環境が利用されることが多い。

## GRAPE-DR

東京大学情報理工学系・平木敬教授のグループが開発した演算チップで、512 ヶの要素プロセッサを集積し、1 チップで 512Gflops の計算速度を達成するもの。消費電力が少なく、高速演算を並列的に行う場合に、コスト・パフォーマンスが優れたチップである。

## hERG チャンネル

human ether-a-go-go related gene (hERG)の遺伝子発現産物として同定された 6 回膜貫通ヘリックスを持つ心筋細胞にある膜タンパク質であり、心臓の  $K^+$  イオンチャンネルの機能をもつ。一般に使用されている非循環器用薬剤を服用中に患者が失神もしくは突然死する報告が知られ、その症候は薬剤投与が引き起こす致死的な QT 延長による不整脈の惹起が原因であり、その因子が hERG チャンネルことが判明している。開発された薬剤の副作用として hERG チャンネル阻害をおこすこともあり、その場合には催不整脈作用の因果関係が明らかになり承認後に市場から撤退を余儀なくされたり、開発が中止されるケースもある。

## His-Tag(ヒスチジンタグ、ヒスタグ)

タンパク質の N 末端または C 末端に付加した 6 個のヒスチジン。発現タンパク質をこれにより対標識し、精製を容易にするために用いられる。

## In-cell NMR

生きた細胞内における蛋白質の立体構造情報を得るための NMR 手法。高分解能の NMR スペクトルを測定するために、安定同位体標識を施した蛋白質を細胞内に導入する必要がある、これまで大腸菌やアフリカツメガエル卵母細胞を用いた手法が開発されている。

## INPHARMA (Inter-ligand NOE for pharmacophore mapping)法

互いに競合阻害する 2 種類のリガンド分子とその標的分子の共存下における NOESY 測定において観測されるリガンド分子間 NOE のこと。INPHARMA は標的分子のプロトンを介したスピン拡散現象により生じると考えられ、2 種類のリガンドの結合部位における相対配向に関する情報として活用できる。

## LDL (Low Density Lipo-Protein、低密度リポタンパク質)

コレステロールの体内循環・移送に係わるキャリアー。酸化するといわれる悪玉コレステロールの酸化 LDL となる。このレセプターが LOX-1 と呼ばれる。

### **Ligand efficiency (LE)**

ヒット化合物がリード化合物、候補化合物へと伸ばしていけるかを見積もる尺度の1つである。結合自由エネルギーを化合物に含まれる重原子の数で割った値であり、有望化合物では 0.3~0.5kcal/mol 程度となる。活性が強い化合物が有望なのではなく、ligand efficiency の高い物質が有望と言える。PEI (%阻害/重原子数)と類似の概念である。

### **PACAP**

Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide の略で脳下垂体に存在するタンパク質。

### **PLS 回帰 (Partial Least Square)**

偏相関最小2乗回帰と訳され、回帰分析法の一つである。因子の多数の値とその結果が統計的に得られている場合、入力因子と結果との間に潜在変数を新たに導入し、それらの相関関係が最大となるように変数を設定することで、overfitting の危険性が少ない適切なあてはめができる手法。

### **SDS-PAGE (Sodium Dodecylsulphonate-Poly Acrylamide Gel Electrophoresis)**

タンパク質の電気泳動法として一般的な方法。SDS を用いて、試料を変性させた後、ポリアクリルアミドゲル板上で電気泳動を行う。

### **REDPRO 標識**

大腸菌を用いたタンパク質発現を重水中 (~100% D<sub>2</sub>O) で行い、炭素源としてグルコース (非重水素標識体) を使用することで、プロトン密度が軽減されたタンパク質試料が調製される。本標識の場合、□プロトン領域はほぼ完全に重水素化されるが、メチル基や芳香環についてはグルコース由来のプロトンが残るため、これらの NMR シグナルは感度良く観測される。

### **Sf9**

夜盗蛾由来の継体培養のできる昆虫細胞。膜タンパク質の発現系として、しばしば用いられる。

### **STD(Saturation Transfer Difference)法**

標的分子選択的なラジオ波照射により標的分子のプロトンを飽和させ、その飽和が結合するリガンドにのみ転移する現象を利用した NMR スクリーニング手法。標的分子からリガンドへの飽和移動は、リガンドシグナル強度の減少として検出されるが、その強度減少の程度は、リガンドプロトン-標的分子プロトン間距離にも依存することから、エピトープマッピング手法として利用された例もある。

### **TLC (Thin Layer Chromatography、薄層クロマトグラフィー)**

クロマトグラフ法の1種。シリカゲルなどの固定相を塗布したガラス板上に混合物の試料を吸着させ、これを溶媒で展開することで混合物の各成分を分離・分析する。

## アクアポリン

水の透過機能を持つ膜タンパク質の1種。ヒトでは12種類がクローニングされ、アクアポリン-4は主に脳に発現し、脳浮腫の病態生理の関与が示唆されている。

## アゴニスト

ある生体作用物質の受容体（レセプター）に結合し、同じ（あるいは似た）作用を表す物質あるいは薬剤。

## アシアロ糖タンパク質

糖タンパク質の糖鎖部分からシアル酸が除去されたもの。一般に糖鎖の非還元末端に結合するシアル酸は、やや不安定なため、血中を循環中に徐々に分解していく。通常、シアル酸の分解に伴って、糖鎖の非還元末端はGalもしくはGalNAcになる。

## アンタゴニスト

前述のアゴニストに対し、拮抗的な作用を表す物質あるいは薬剤（阻害剤など）。

## 安定同位体標識

現在の生体高分子のNMR解析においては、測定感度、選択性等の観点から、測定対象試料の構成元素である炭素(C)、窒素(N)（、場合によっては一部のプロトン(H)）を、安定同位元素<sup>13</sup>C、<sup>15</sup>N（あるいは<sup>2</sup>H）で標識することが必須となっている。一般的な安定同位体標識タンパク質試料調製は、大腸菌を利用したタンパク質大量発現の際、<sup>13</sup>C、<sup>15</sup>N、<sup>2</sup>H標識した炭素源、窒素源、アミノ酸（前駆体）、重水等を用いることで行われる。

## アレスチン

Gタンパク質共役型の情報伝達系に幅広く存在する水溶性のタンパク質。光受容体やアドレナリン受容体などGタンパク質共役型受容体のリン酸化型に特異的に結合し、情報伝達を抑制する。

## 一分子蛍光分析

試料溶液に共焦点レーザーを当て、その焦点部分をブラウン運動によって通過する蛍光標識分子の並進拡散時間を分析する手法。1フェムトリットル（1兆分の1リットル）という極めて小さな領域を観測領域とするため、試料分子の分子量や分子間相互作用などを一分子レベルで解析可能。

## *in silico*スクリーニング

計算科学的手法を用いて、創薬標的タンパク質と相互作用する低分子化合物を見出すこと。医薬品等の候補物質を探索するときに用いられる。

### ***in silico* ドッキング**

計算機上で化合物と標的タンパク質との相互作用を計算し、タンパク質-化合物複合体構造とその活性を予測すること。

### **ウエスタン・ブロティング (Western Blotting)**

抗体を用いて、無数にあるタンパク質の中から、ある特定のタンパク質だけを検出する方法。電気泳動ゲルからタンパク質をニトロセルロース紙に転写し、その後、標識化した抗体により発色させ、特定タンパク質を高感度検出する。

### **エピトープマッピング**

元来は、外来タンパク質分子の抗原性を示す部位を決定する手法の意味であったが、そこから派生してリガンド分子の標的タンパク質結合部位を同定する実験の意味で用いられる。

### **エンドサイトーシス**

細胞が小胞（エンドソーム）を介して外環境から種々の物質を細胞内に取込む機構をいう。特に細胞表面の受容体を介してリガンドを取込む機構は受容体依存性エンドサイトーシスと呼ばれる。通常取込まれたリガンドはリソソームまで運ばれ、分解される。

### **エンリッチメント**

薬物スクリーニング計算において予測化合物数に占める真のヒット化合物数の割合。通常、ランダムな実験では1万化合物に1化合物ヒットするので、もし計算で予測したヒット化合物候補100化合物中にヒットが1件あれば、ランダム実験に対するエンリッチメントは100倍となる。横軸を選択した化合物数、縦軸をヒット化合物数としたグラフをデータベースエンリッチメントカーブと呼び、この曲線の下面積を **area under curve (AUC)** という。スクリーニング手法の良し悪しは通常 AUC で判断し、AUC が 50% ならランダムスクリーニングと変わらず、100% に近いものほど良い。

### **キナーゼ、**

ATP, ホスホエノールピルビン酸などヌクレオシド三リン酸をリン酸供与体とするリン酸基転移酵素。

### **グラフティン**

グラフト=移植するという意味。ここでは抗体の CDR3 を他の抗体 (scaffold) の CDR3 へ移植し、キメラ抗体を作製している。

### 結合自由エネルギー ( $\Delta G$ )

タンパク質と化合物間の結合に伴うエネルギー変化をいい、タンパク質と化合物の結合の強さを示す。通常、5kcal/mol から 15kcal/mol 程度である。酵素阻害剤の場合、天然の基質より 2kcal/mol 程度  $\Delta G$  が強ければ、80-90%の阻害活性をし、薬効を示すことができる。

### 交差飽和法 (Cross-Saturation Method)

高分子量 (50K 以上) のタンパク質複合体の相互作用界面に存在するアミノ酸残基を高精度に決定する手法として開発された新規 NMR 測定法。

### 構造インタラクトーム

インタラクトーム(*interactome*)は有機体における分子相互作用の全体を指し、構造インタラクトームとは、相互作用する分子の複合体立体構造全体を指す。

### ゴニオメータ

試料を回転させ、電子線、X 線などの照射角度を変える装置。

### コラーゲン

細胞外マトリックスの主要成分として、体内に最も多く含まれる蛋白質である。一次配列に 3 残基ごとの Gly の繰り返しを含み、3 本のポリペプチド鎖がより合わさってトリプルヘリックス構造を形成し、さらに規則的に会合して巨大で不溶性のコラーゲン線維となる。

### 受容体型チロシンキナーゼ (RTK)

細胞表面に存在する受容体群で、主に増殖因子と結合し、二量体を形成することにより、細胞内のキナーゼが活性化し、細胞内へシグナルを伝達する。さまざまな受容体型チロシンキナーゼが腫瘍細胞において発現することが知られており、重要な創薬のターゲットとなっている。

### 生理活性ペプチド

生体物質であるか合成物質であるかを問わず、生物に対して生理作用ないしは薬理作用を発現するアミノ酸の重合体のうち、長さが短いものを指す。

### 双極子-双極子(DD)相互作用

核スピン間の磁氣的相互作用において、核スピン磁化の緩和の主な原因となる相互作用。そのハミルトニアンはスピン間距離の 3 乗に反比例するため、NOE や交差飽和法などスピン間距離を求める手法の基盤となる。原子の運動性が低いほど相互作用が大きくなるため、分子のダイナミクス解析法の基盤にもなっている。

## 代謝型グルタミン酸受容体

GPCR の 1 種。脳における神経伝達調節に重要な役割を担っていることが示唆されている。

## 縦緩和時間

静磁場中に置かれた核スピン系が非平衡の状態から熱平衡状態へと回復する過程を核スピン系の緩和といい、特に静磁場方向の磁化の緩和現象を縦緩和（スピン-格子緩和）と呼ぶ。その熱平衡状態に達するまでの時間を縦緩和時間という。

## 単粒子解析法 (Single-Particle Analysis)

タンパク質の結晶を使わずに、タンパク質の立体構造を求める手法。X 線 CT と類似した考えで、多数のタンパク質単粒子の電子顕微鏡像を使い、コンピュータにより立体像を再構築する。

## デコイセット

In-silico 薬物スクリーニングの性能テストを行うとき、標的に対する活性化合物に加えて、標的に対して活性がないであろう化合物集団を「デコイセット」として用いる。

## ドッキング

計算機科学的手法により、タンパク質とリガンド複合体の立体構造を求めること。フレキシブルドッキングとは、タンパク質とリガンドの立体構造変化を考慮し、計算する方法。

## ナノ抗体

重鎖、軽鎖の 4 本鎖から成るヒト・マウス等の通常の抗体と異なり、重鎖 2 本のみからなるラクダ抗体の VHH (variable domain of heavy chain of heavy chain antibody) を指す。同程度の抗原親和性を示す通常の抗体よりもはるかに大きさが小さいことからナノ抗体と呼ばれる。

## ヒアルロン酸

D-グルクロン酸と N-アセチルグルコサミンの 2 糖の繰り返しからなる直鎖状の高分子ポリマーである。ヒアルロン酸は、細胞外マトリックスの主成分として生体組織に広く分布し、炎症時には低分子量ヒアルロン酸が生成され、細胞運動を亢進させるなどの生理活性を有することが知られている。

## 標識アミノ酸のスクランブリング

生細胞では、他のアミノ酸を前駆体として代謝により合成されるアミノ酸も存在する。従って、同位体標識されたアミノ酸を生細胞に取り込ませてタンパク質を合成させる際、標識アミノ酸が代謝されることで、目的外の部位が標識されることがある (スクランブリング)。

### ファージ・ディスプレイ法

タンパク質の選択的生産法の一つ。大腸菌に感染する繊維状ファージの遺伝子を組替え、ファージ表面に目的のタンパク質を“ディスプレイ”させることからの命名。

### ファーマコフォア

リガンド分子が、標的分子と結合するために必要となる官能基群、およびそれらの相対的な空間配置情報を指す。ファーマコフォアを特定することで、新規のリガンドを検索、デザインすることも可能になると考えられている。

### 並進拡散時間

試料分子がブラウン運動によって溶液中を自由拡散する際に、単位距離あたりを拡散するのに要する時間。ストークス・アインシュタインの法則により、溶液中の試料分子の並進拡散時間は分子半径に比例するため、並進拡散時間から試料分子の分子量を解析できる。

### $\mu$ オピオイド受容体

主に痛みに関する受容体で、モルヒネの作用点。 $\mu$  のアゴニストは、末期がんでの鎮痛、恐怖の緩和、アトピー皮膚炎などの強度のかゆみの緩和に用いられる。オピオイド受容体のサブタイプには  $\kappa$ 、 $\delta$  があるため、 $\mu$  アゴニストには通常、呼吸抑制、便秘、麻薬性の副作用がある。

### マジック角高速回転(MAS)

静磁場に対し、約  $54.7^\circ$  傾けた軸の周りに試料を高速回転することにより、不溶性成分により生じる局所磁場の不均一性を解消するとともに DD 相互作用を減弱することにより、スペクトルの高分解能化を図る NMR 手法である。DD は MAS 回転速度にほぼ反比例して減弱することが知られている。

### マルチカノニカル法

拡張アンサンブル法などとも称される新しい統計物理学の手法で、普通の温度などの定義された状態をそのまま計算するのではなく、一度、分子が非常に運動しやすい仮想的な状態での計算を行い、その結果を現実の系に換算することで様々な構造変化を考慮した精密な計算を行う方法である。

### ミトコンドリア

細胞内にある呼吸・エネルギー生成器官。

## 無細胞（タンパク質）合成／発現系

生きた細胞を用いずに、鋳型 DNA や RNA ポリメラーゼ、ATP、アミノ酸などを共栓付きフラスコ内でタンパク質を生産する技術。細胞内では毒性のタンパク質発現での収量低下、発現タンパク質の再分解などの問題を配慮する必要が無く、細胞では生産不能のタンパク質の生産できる可能性がある。細胞培養が不要のため、HTS(ハイスループットスクリーニング)に向いている。

## メチル選択標識法

イソロイシン(□位)、ロイシン、バリンのメチル基 NMR シグナルを選択的に観測するための標識法。完全重水素化試料調製の途中段階に特定アミノ酸前駆体を添加することで容易にメチル基選択標識が達成される。

## モデリング

計算機化学に於いて、タンパク質やリガンドについてエネルギー的に安定な分子構造をコンピュータ計算により決定すること。各原子の位置は座標として表示される。

## モノアミン酸化酵素-A

モノアミン酸化酵素-A は、ミトコンドリア外膜および細胞外膜に、1本の $\alpha$ ヘリックスが膜に貫通する形でアンカリングして存在し、ドーパミンなどの神経伝達物質の分解を触媒することにより中枢神経系をコントロールするタンパク質である。このため、うつ病等の神経症治療薬の有望な標的タンパク質として知られている。

## リード化合物

医薬品の原石となる化合物。誘導体化（化学修飾）することで、特異性、活性、薬物動態などの点で磨きあげられ、完成品である医薬品となりうる。通常、化学合成と誘導体化が容易で、誘導体に構造活性相関があり、化学反応性の高い置換基がない有機化合物をいう。

## ロドプシン

眼球内にある光受容 GPCR。X線結晶構造解析により立体構造が決定されている唯一の GPCR。

## ローリング

白血球が血液中から炎症組織やリンパ管へと移行する際には、細胞が血管内皮細胞上をゆっくりと転がるように運動するローリングが最初のステップとなる。このような細胞のローリングにおいては、受容体とリガンドとの間に一過的な結合の形成と解離が繰り返し起こっており、CD44 やセレクチンなどの細胞接着因子が関与する。

## I. 事業の位置付け・必要性について

### 1. NEDOの関与の必要性・制度への適合性

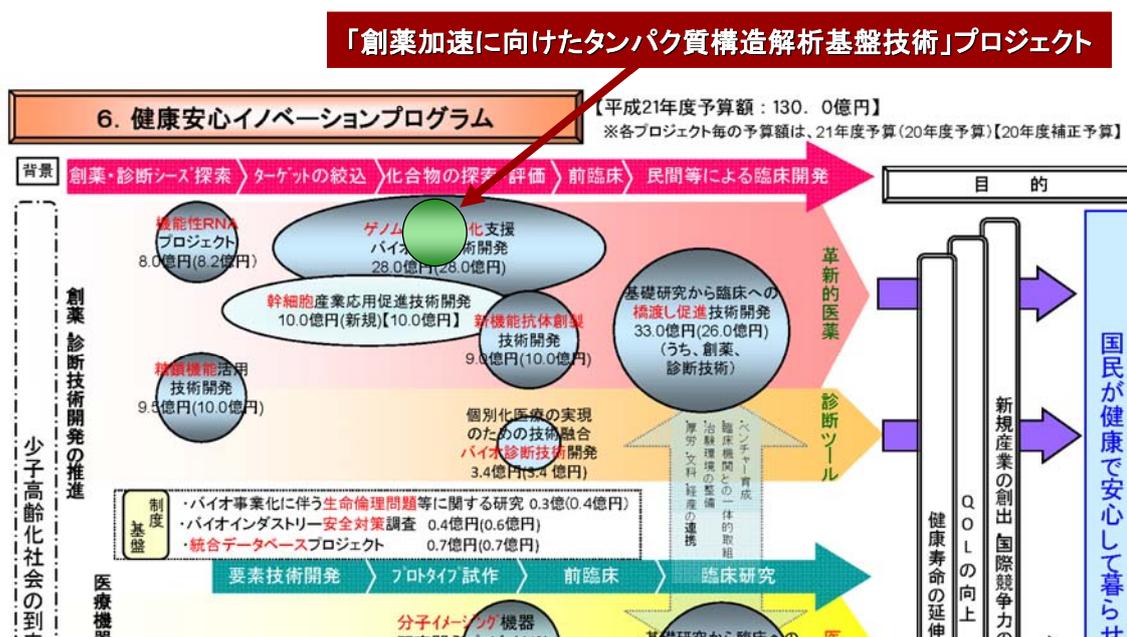
#### 1.1 NEDOが関与することの意義

(健康安心イノベーションプログラムの推進)

今後、世界に類を見ない少子高齢化が進展する我が国において、国民が健康で安心して暮らせる社会を実現することは喫緊の課題である。具体的には、個の医療を通じて健康寿命の延伸やQOL (Quality of Life: 生活の質)の向上を図ることが求められている。

本事業(プロジェクト)は、この目的を達成するため、創薬に資する基盤技術の開発、再生医療の確立、および医療機器・福祉機器の開発等の手段を適切に組み合わせることによって、健康維持増進、疾患の早期診断、及び適切な治療法の提供を実現するほか、関連産業の競争力強化・ベンチャー企業の創出を図るための「健康安心イノベーションプログラム～健康で安心して暮らせる社会の実現を目指して～」の一環として実施されるものである。本プロジェクトは「健康安心イノベーションプログラム～健康で安心して暮らせる社会の実現を目指して～」において、「創薬・診断技術開発」の推進における「革新的医薬品の創出」を目指すプロジェクトに位置づけられている。

### 健康安心イノベーションでの位置づけ



(NEDO プロジェクトとしての必要性)

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。

現在、市販薬剤のほぼ 50%が膜タンパク質を作用点としているといわれており、膜タンパク質は、生命現象の解明においてのみならず、創薬開発の重要な標的タンパク質でもある。膜タンパク質は細胞膜上で複合体を形成し、その機能を発現している。従って、細胞表層における膜タンパク質およびその複合体の立体構造情報やリガンドとの相互作用の情報を取得し、その構造情報に基づいた計算科学的解析により、医薬リード化合物を効率よく絞り込んでいく「タンパク質立体構造に指南された創薬戦略(SGDD: Structure Guided Drug Development)」を進展させることは、さまざまな技術的困難さがあるものの、我が国において緊急かつ挑戦的な課題である。

この研究開発課題を達成するには、生物の研究者のみならず、物理、計測、および情報など関連する様々な分野の研究者からなる開発体制を構築し、集中的に推進することが必要である。また、最先端の研究開発であり、現時点においては産業化に向けた基礎的段階にあること、開発段階から産学官連携型による効率的な研究開発の推進が必要であり、開発リスクが大きく多額の資金を要するため、民間企業のみで取り組むことが困難であることから、ナショナルプロジェクトとしてNEDOが実施することが必要と考えられる。

## 1.2 費用対効果

本プロジェクトは、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、タンパク質の相互作用解析技術、および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生体内に近い状態での立体構造解析技術と相互作用解析技術、および計算科学を用いた創薬候補化合物の効率的な探索技術など創薬基盤となる技術を開発する。これら技術により我が国の創薬関連産業が少ない研究開発費で効率的な創薬を達成し、国際競争力を高めていくことが可能と考えられる。また本プロジェクトで開発・取得されたリード化合物等は、参画企業との共同作業により医薬品としての実用化も想定される。さらに本プロジェクトの研究開発を通じて、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。これは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、健康維持・増進などを含めた幅広い分野への展開が期待される。と更に実用性の高いリード化合物への展開等のための技術など。

## 2. 事業の背景・目的・位置づけ

(背景)

ゲノム情報から創薬標的タンパク質を同定し、その機能や立体構造情報から新規薬物を創製する「ゲノム創薬」の概念が提出されてから久くなる。ゲノム情報は創薬標的タンパク質の同定に役に立っているものの、現時点で「ゲノム創薬」は創薬研究のメインストリームになり得ていない。これは、疾患関連遺伝子が同定されようとも、その遺伝子産物が生体内で疾病とどのような係わり合いがあるのか、すなわち、作用機序の解明が困難であること、および創薬標的タンパク質に選択的に作用する化合物を合成し、薬物とすることが困難であるためである。

このようなボトルネックを解消すべく、分子生物学的な方法および薬理的なアプローチによるタンパク質機能解析や、ハイスループットスクリーニングによるリード化合物探索などさまざまな取り組みが

精力的に行われている。タンパク質の立体構造に基づく創薬標的タンパク質の機能解析および新規薬物の探索もその中のひとつである。近年明らかになったイオンチャネルや水チャネルの立体構造から、生体膜中における物質の高効率移動の分子論的説明がされたことなどからも明らかのように、もし、創薬標的タンパク質の立体構造が説明できるならば、その構造に基づき、タンパク質の機能およびさらに疾病発症機構を説明することも可能である。さらに、リガンド分子と創薬標的タンパク質の相互作用解析に基づき低分子化合物の設計指針を提案することもできる。実際、欧米のメガファーマでは、創薬標的タンパク質チロシンキナーゼや糖分解酵素の立体構造に基づき合成された慢性骨髄性白血病治療薬であるグリベックやインフルエンザ治療薬であるタミフル等が上市され、治療に大きく貢献している。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に対して、医薬リード化合物を効率よく絞り込むための基盤技術を開発し、「タンパク質立体構造に指南された創薬戦略(SGDD: Structure-Guided Drug Development)」を進展せしめて、創薬研究を効率化することがとくに重要となってきている。

(目的)

このような状況に鑑み、NEDO のプロジェクトとして「生体高分子立体構造情報解析プロジェクト」(平成14～18年度)が実施され、膜タンパク質及びその複合体を対象として電子顕微鏡などによる立体構造解析技術および核磁気共鳴法(NMR)などを用いた相互作用解析技術が開発され、さらに化合物結合の高速・高精度な計算科学的シミュレーション技術の開発が行われた。

本事業では、これらの技術を活用して企業との課題解決型連携を行い、これら技術を産業界に普及させるとともに創薬への有用性の実証研究を行う。さらにこれら技術を深度化しつつ、細胞膜上で複合体を形成している状態での膜タンパク質の立体構造情報およびリガンド相互作用情報を抽出する方法論の開拓やそれに基づくヒット化合物の高効率探索技術の開発を行う。開発した技術により、創薬上有用な膜タンパク質およびその複合体の解析と医薬リード化合物の取得を行って、「タンパク質立体構造に指南された創薬戦略(SGDD: Structure-Guided Drug Development)」を進展させることを目的とする。

## II. 研究開発マネジメントについて

### 1. 事業の目標

#### 1.1 事業の目標

本事業は、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、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、並びに高精度 *in silico* スクリーニング等のシミュレーション技術深度化して、細胞膜上で複合体を形成している生体内に近い状態の膜タンパク質およびその複合体の立体構造情報およびリガンド相互作用情報を抽出する方法論の開拓とそれに基づくヒット化合物の高効率探索技術の開発を行い、企業との課題解決型連携を通じて、これら技術を産業界に普及させるとともに創薬への有用性の実証研究を行う。また創薬上有用な膜タンパク質およびその複合体の解析と医薬リード化合物の取得を行い、「タンパク質立体構造に指南された創薬戦略 (SGDD: Structure-Guided Drug Development)」を進展させることを目的とする。そのため以下に以下の目標を設定している。

#### 最終目標(平成23年度末)

- ①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2 Å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50 Å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8 Å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で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。
- ②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~ $\mu$  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。
- ③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、研究開発項目①、②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。

### 中間目標(平成 21年度末)

- ①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2 Å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ー等）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10 Å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。
- ②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～ $\mu$ 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の開発を行う。
- 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。
- ③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、研究開発項目①、②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。

### 1.2 目標設定の理由

世界最高レベルの解析精度・感度・速度を設定するとともに、それぞれの技術要素を統合した創薬支援システムとして機能させる点に留意した目標であり、産業上の効果が期待できる妥当な目標設定となっていると考えている。

## 2. 事業の計画内容

### 2.1 研究開発の内容

#### (1) 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」

##### 【目的】

「生体高分子構造情報解析プロジェクト」から開発してきた極低温電子顕微鏡などを用いた膜タンパク質構造解析法の先見性は、国内のみならず世界的にも認められつつある。本研究開発項目では、このような高いポテンシャルを活かし、生理的に機能を発揮している膜タンパク質及びその複合体の生体内に近い状態での構造を効率よく解析出来る基盤技術を構築する。特に、解析が困難なヒトや哺乳類由来の膜タンパク質及びその複合体の構造解析技術を更に発展させて、創薬において非常にニーズの高い膜タンパク質及びその複合体の立体構造を解析することができる技術を開発し、実際にそれらの構造解析を行う。また研究開発項目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」と研究開発項目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」という重要な2つの研究分野に情報を供与するとともに、これらと密接に協力して創薬を加速する基盤技術を開発する。さらに、電子線とX線を用いた膜タンパク質などの構造解析技術の発展により、革新的かつ生物学的に重要な発見や膜タンパク質及びその複合体の機能・機構を説明できる新しい概念構築等によるイノベーションを実現することで、我が国のバイオ産業の競争力強化や新産業の創出に貢献する。

##### 【内容】

#### (A) 膜タンパク質及びその複合体を構造解析に供するための発現・精製

創薬において非常にニーズが高くその結晶化技術の開発解析が求められている膜タンパク質等の発現・精製技術と2次元結晶化技術の開発を実施している。

##### ア) 膜タンパク質及びその複合体の大量発現

ヒト等真核生物由来の膜タンパク質及びその複合体に関して、組み換え遺伝子技術と昆虫細胞等を用いた発現系の開発を進めて、解析が求められている膜タンパク質の発現・精製法の確立を行う。特に水チャネル、イオンチャネル、GPCR など、創薬分野から解析が期待されている膜タンパク質の構造解析を目指して大量発現・精製の研究を進めている。

##### イ) 膜タンパク質及びその複合体を細胞内に局在させて発現する方法の開発

任意の膜タンパク質及びその複合体を細胞内に局在させて発現する方法など、立体構造解析を行うために必要な発現技術の開発を進めている。

##### ウ) 膜タンパク質及びその複合体の結晶化

解析が求められている膜タンパク質などの結晶化を行っている。

#### (B) 電子顕微鏡の開発、コンピューター解析の高速化と精密化

##### ア) 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、電子線トモグラフィー用極低温電子顕微鏡の開発を行い、これを用いた分解能50 Å程度の解析を行っている。

##### イ) 2次元結晶化したヒト由来(発現系)の試料について、構造解析(分解能2 Åを超える精度)

を可能にする電子線結晶学用プログラムを開発し、水分子や脂質分子を直接観察できる高分解能での解析を行っている。

ウ) 結晶化できない分子や複合体の構造解析を8Åの分解能で解析可能な単粒子解析用プログラム開発を行っている。さらに、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、高分解能の電子線トモグラフィー用コンピュータプログラムの開発を行っている。

エ) 2次元結晶化用自動電子顕微鏡の開発

2次元結晶化条件の検査を従来に比べ2倍以上の効率で行うための、2次元結晶化条件検査用自動電子顕微鏡の開発を行っている。これにより、2次元結晶を作製する速度を飛躍的に向上させ、構造解析の加速を図る。

(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行っている。X線結晶構造解析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ている。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と単粒子解析を用いた構造解析を行い、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、膜タンパク質及びその複合体の自然な状態の構造解析を目指している。

(2) 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」

【目的】

創薬標的タンパク質とリガンド分子との相互作用解析は、新規薬物の創製において重要な知見を与える。核磁気共鳴法(NMR)は生理的条件下でタンパク質など生体高分子の構造解析や相互作用解析が可能であるため、他の構造生物学的手法と比較し優位性があるものの、安定同位体を試料に取りこませ、かつ凝集のない状態で測定しなければならないなどの制約がある。そのため、必ずしも全ての標的タンパク質をNMR測定に供すことはできず、効率的な発現系の確立や変性状態からの巻き戻し法などが求められている。さらに、いくつかの膜タンパク質は、細胞表層でリガンド分子のみならず、複数分子と複合体を形成し、機能発現していることが知られている。したがって、従来の可溶化膜タンパク質を対象として解析するのみではなく、細胞膜中における膜タンパク質複合体を保持した状態でリガンド相互作用解析を行うことが可能であるならば、膜タンパク質の機能発現機構を解明でき、さらに新規作用機序に基づく創薬開発が期待される。しかしながら、このような細胞表層あるいは細胞自身など不均一超分子系における相互作用様式をNMRにより研究する場合、適切なNMR試料調製法やNMR測定法が確立されていないことにより、十分な成果を挙げることができていない。本研究開発項目では、上記課題を解決するため、以下の研究開発を実施している。

【内容】

(A) 安定同位体標識タンパク質調製系の確立

タンパク質の安定同位体標識において、試料調製法を系統化し、効率的に目的のタンパク

質に適した試料調製法を探索するシステムの構築を目指す。具体的には、ア)安定同位体標識が可能なタンパク質発現系を系統的に選別する方法の確立、イ)不溶性画分でのみ発現されるタンパク質についての系統的なタンパク質巻戻し法の探索システムの確立、ウ)得られたタンパク質(複合体)試料の溶液条件を検討し、NMR測定に最適な溶液条件を高精度でかつ従来法に比べ5倍以上迅速に選別する手法を開発することにより、効率的な安定同位体標識タンパク質調製法の確立を行っている。

**(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**

構造解析へ適応可能なリガンドライブラリスクリーニングシステムなどの開発・高度化を進めるとともに、本システムに適応するため及び結合力の弱いリガンド分子の標的タンパク質結合部位を同定するための原子レベルでの相互作用解析法の開発を行なうことにより、リガンドベースの創薬デザインを加速する情報を得るための技術開発を行っている。また、本システムを疾患関連タンパク質複合体系に適用し、低分子リガンド及びリガンドタンパク質と標的タンパク質の相互作用解析を行い、合理的創薬開発に供する構造情報を取得することとしている。

**(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**

従来の膜タンパク質の構造生物学的研究では、膜タンパク質を可溶化剤により可溶化するなど、実際に膜タンパク質が機能する場とは異なる状態での解析が主流で、細胞表層に着目した研究は立ち遅れている。そこで、実際に細胞膜中で膜タンパク質が機能している状態を保持した、あるいはその状態を再構成したNMR測定用試料作成法を開発している。

**(D)細胞膜複合体相互作用解析のためのNMR解析法の開発**

細胞表層あるいは細胞自身などをNMR研究対象として取り上げるために、ア)高分子量超分子から高感度に精密な構造情報を取り出すこと、イ)高分子量化及び液相・固相混合試料の不均一な磁化率に伴うNMR線幅の増大を抑えることの2点を克服する技術を開発している。具体的には、NMR測定装置及びNMR測定法の改良を行い、細胞表層に存在する膜タンパク質の相互作用様式が解明できるNMR解析法の開発を行うと同時に、この手法の有効性を実証することとしている。

**(3)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」**

**【目的】**

我が国で開発された世界最高レベルの電子顕微鏡技術・相互作用界面構造解析技術から得られる有用な情報を活用し、in silico スクリーニングの精度及び高速性の向上を図る新たな計算アルゴリズムとプログラムを開発し、さらに、その技術の具体的な創薬開発への応用することで、開発した計算科学手法による創薬加速の効果を検証する。また、データに基づくタンパク質の動的シミュレーション解析結果を構造解析と相互作用解析にフィードバックし、タンパク質とタンパク質、リガンド、化合物との相互作用、信号伝達におけるダイナミカルな現象に切り込み、新規知見を得て、スクリーニング及び創薬ターゲット選択にも新しい展開をもたらすことも意図している。本研究開発項目では、上記課題を解決するため、以下の研究開発を実施している。

## 【内 容】

### (A) in silicoドッキング計算の高精度化

創薬プロセスにおけるin silicoドッキング計算において、

ア)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の設計・試作を行い、

イ)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行っている。

### (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

タンパク質は、タンパク質間の相互作用とそれに基づく超分子複合体として高度な生命現象を維持しているため、タンパク質間相互作用及び超分子複合体の構造情報まで含めた詳細な解析「構造インタラクトーム」に踏み込み、タンパク質間相互作用の阻害等の創薬において有用な機能を有するものの活性の維持等の観点から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低分子化合物等へ展開するため、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の開発を行っている。

### (C) 創薬開発への応用促進に向けた技術開発

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、専用ボードの利用、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等の開発を推進している。また、本開発研究のチーム間だけでなく、創薬メーカーと研究協力を行って具体的な創薬実証研究を実施している。さらに、上記開発するプログラムやデータベースを公開し、研究開発成果を広く社会に還元するため、Web siteから最新のプログラム、データ、情報を与えられる仕組みとする。

## 2. 2 研究開発の実施体制

### (1) 実施体制の構造

本事業は、平成14年度から平成18年度までに実施された「生体高分子立体構造情報解析プロジェクト」の成果を活用し、平成19年度から平成23年までの5年間の「健康安心プログラム」の一環として経済産業省の直轄事業として開始した。平成20年度からはNEDO委託事業として実施している。

研究開発責任者(プロジェクトリーダー)である東京大学大学院薬学系研究科 嶋田一夫 教授の下で効果的な体制を敷いて平成19年度から開始した。平成20年度からはプロジェクトリーダーを京都大学大学院理学研究科 藤吉好則 教授に交代し進められている。また、研究分野及び内容が多岐に亘りかつ専門性が高いためにサブリーダーとして、平成19年度は、京都大学大学院理学研究科 藤吉好則 教授と大阪大学蛋白質研究所附属プロテオミクス総合研究センター 中村春木 教授が協力して、平成20年度からはプロジェクトリーダーの交代に伴い、嶋田教授がサブリーダーとして研究開発の推進を行っている。

さらに、実施に当たっては、効率運営を図るために研究開発項目毎にチームリーダーを配置し、運営の効率化を図っている。

研究開発項目①チームリーダー：

藤吉好則 京都大学大学院理学研究科 教授

研究開発項目②チームリーダー：

嶋田一夫 東京大学大学院薬学系研究科 教授

研究開発項目③チームリーダー：

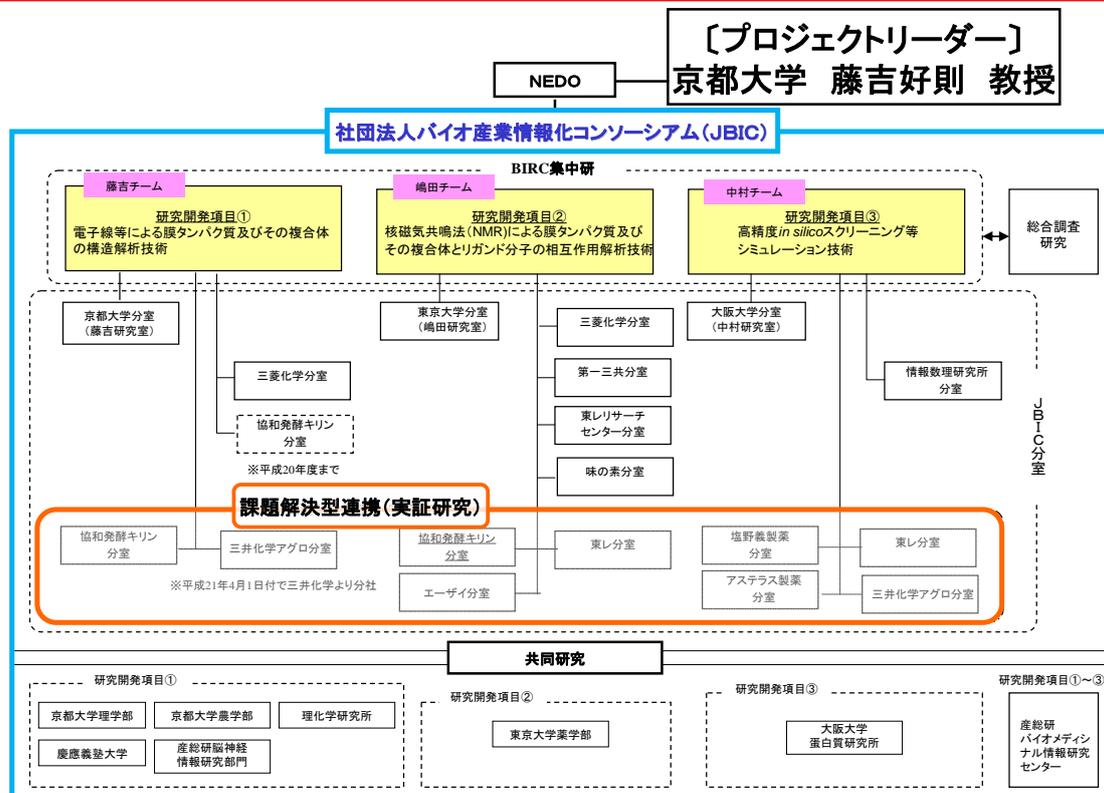
中村春木 大阪大学蛋白質研究所附属プロテオミクス総合研究センター 教授

## (2) 課題解決型連携(実証研究)の実施

本事業では、開発してきた電子顕微鏡や核磁気共鳴法(NMR)などを用いた膜タンパク質およびその複合体の構造解析法と相互作用解析法の成果、および計算科学的創薬支援システムを活用し、企業との課題解決型連携を行い、これら技術を産業界に普及させるとともに創薬への有用性の実証研究を行うことを目的のひとつとしている。そのため、上記技術を自社の創薬研究開発のために使用したい企業を公募し、課題快活型連携として各チームリーダーのもとで実施している。これにより上記技術が、実際の創薬にいかにか有効であるかを実証できるとともに、企業側からの意見・要望を直接吸い上げることができ、本事業の技術開発の方向性の決定にも参考となると期待している。

## (3) 研究実施体制

### 研究開発の実施体制



### 2.3 研究開発の運営管理

本事業は、「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」、「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」及び「高精度in silicoスクリーニング等のシミュレーション技術」の各研究開発項目を連携させながら一体的に進めることが必要である。そのため、プロジェクト全体の研究内容の把握と研究推進を目的とし、全員が会してののの全体会議(兼 推進委員会)を平成19年5月18日(金)および平成21年1月30日(金)開催し、これまでの研究成果と今後の研究計画についてディスカッションを行った。同会議にはこの項の最後に示す各委員および経済産業省担当者も出席し活発な議論を行った。また各研究開発項目の研究推進についてより細かい議論を行うために、各グループが月例のミーティングなどを定期てきに実施している。

#### 委員会における登録委員

氏名	所属・役職
藤吉 好則	京都大学大学院理学研究科生物物理学教室 教授／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 タンパク質構造解析チーム 招聘研究員(委員会委員長)
嶋田 一夫	東京大学大学院薬学系研究科生命物理化学教室 教授／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 研究センター長
中村 春木	大阪大学蛋白質研究所附属プロテオミクス総合研究センター 蛋白質情報科学研究系 教授／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 タンパク質構造解析チーム 招聘研究員
佐藤 主税	産業技術総合研究所脳神経情報研究部門構造生理研究グループ グループリーダー
安井 正人	慶應義塾大学大学院医学研究科 教授
木村 泰久	京都大学大学院農学研究科 助教
平井 照久	理化学研究所播磨研究所構造生理学研究グループ 三次元顕微鏡法研究チーム チームリーダー

### 3. 情勢変化への対応

本事業並びに先行した「生体高分子立体構造情報解析プロジェクト」は、「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」、「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」、および「高精度in silicoスクリーニング等のシミュレーション技術」の3つの重要な技術開発を同時に行うというユニークさを持ち、その先見性と先進性は、

国内のみならず世界的にも認められつつある。今後もこのような高いポテンシャルをさらに活かして、解析が困難なヒトや哺乳類由来の膜タンパク質及びその複合体の構造解析研究を引き続き堅持して進めていく。

各研究開発項目では、企業を含むプロジェクト参加グループとの共同研究を含めて、それぞれ順調に進捗している。しかし、3つのそれぞれの研究開発項目内の研究を進める必要性と重要性から、ややもすると開発項目間の協力による研究テーマ推進が弱くなるおそれがある。この問題を解決するために、意識的に3つの研究開発項目間の連携を強化・発展させる努力を行っている。具体的には阻害剤開発およびタンパク質複合体モデル構築を可能とする新規手法の開発などを連携して実施している。

#### 4. 中間評価への対応

該当せず。

#### 5. 評価に関する事項

中間評価を平成 21 年度、事後評価を平成 24 年度に実施する。

### Ⅲ. 研究開発成果について

#### 1. 事業全体の成果

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開発においては、水チャンネル AQP4 の変異体を2次元結晶化して電子線結晶構造解析することにより、X 線結晶学の 1.8 Å 分解能の解析 (J.D. Ho et al., PNAS, 106, 7437-7442 (2009)) より高い精度でチャンネル内の水分子を可視化することに成功した。また、脂質分子の構造解析にも成功した。その結果、水チャンネルの速い水透過と高い選択性の分子機構を説明する H-bond isolation 機構を実証した。また、AQP4 が脳浮腫の原因となるので、AQP4 の水透過を阻害するための分子 AZA を同定した。ギャップジャンクションチャンネル Cx26 の M34A 変異体の2次元結晶の電子線解析により、プラグ構造を解明し、野生型 Cx26 の構造決定と併せて、チャンネルのゲーティングモデルを提案した。多層膜2次元結晶の解析用プログラムを改良し、上記 AQP4 や Cx26 等の解析を可能にした。また単粒子解析用プログラムを開発し、基質含有シャペロン GroEL/ES の構造解析に成功し、非対称変形による基質フォールディングモデルを提案した。さらに、ヒストンシャペロン CIA/Asf1 とヒストン H3/H4 複合体の構造と機能解析を行って、ヒストン(H3/H4)<sub>2</sub>4量体を解離させる新しい概念となる CIA の機能を解明した。

核磁気共鳴法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開発においては、1分子蛍光分析法をもとに測定条件の体系的スクリーニング法および大腸菌発現系と同様の条件で、安定同位体標識できる酵母発現系を開発した。固液界面の分子間相互作用解析に有効な高分解能マジック角回転条件下の転移交差飽和 (TCS) 法において、非特異的相互作用を抑制できる多孔性担体を開発し、高感度・高精度な TCS データ取得に成功した。さらにアミノ酸選択的交差飽和方法の実験データと分子動力学計算を組み合わせ、高精度なタンパク質複合体の立体構造構築方法を計算科学チームと共同で開発した。また創薬標的タンパク質であるケモカイン受容体、ディスコインドメイン受容体、細胞接着因子 CD44、GPVI のリガンド認識機構を解明した。

高精度 *in silico* スクリーニング等のシミュレーション技術開発においては、ドッキングスコアの精度向上のため、sequence-based DSM法を開発しより高いヒット率が得られる手法とした。FP法とTI法に基づく滑らかな解離経路で結合自由エネルギーを算出するSRPG法を開発し、それを電子顕微鏡実験チームによって解析されたアクアポリン4の阻害剤解析に応用した。核磁気共鳴実験チームと共同してASCS (アミノ酸選択的交差飽和) 法の観測結果から蛋白質複合体モデルを構築する方法を開発し、ディスコインドメイン受容体とコラーゲンの複合体モデル構築へ応用した。生理活性を有する非ペプチド性化合物の探索のため、新たにMD-MVO法を開発し、 $\mu$ オピオイド受容体に対して検証した。hERGの立体構造モデルにCOMBINE法を適用し、従来法の7.9倍の選択性をもつ阻害活性予測法を開発した。水溶解度推定のため、物理化学的特徴を分子記述子に加える新たな高精度の予測法を開発した。 $\mu$ オピオイド受容体アゴニストや農薬のシードとなる化合物、インフルエンザ・ウィルスのPA-PB1複合体阻害剤等70を超えるヒット化合物を得、有用な化合物を20ヶ程得た。その際、ヒット率や選択性も向上できた。

## 2. 研究開発項目毎の成果

### 2.1 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」

集中研究: 社団法人バイオ産業情報化コンソーシアム[バイオメディシナル情報研究センター(BIRC)、京都大学分室、三菱化学分室、協和発酵キリン分室、三井化学アグロ分室]

共同研究先: 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、学校法人慶應義塾大学大学院医学研究科

#### (1) 膜タンパク質及びその複合体の構造解析に必要な膜タンパク質等の発現・精製技術、結晶化技術の開発

[バイオメディシナル情報研究センター／京都大学分室／京都大学大学院理学研究科]

(1-1) 組み換え遺伝子技術と昆虫細胞等による発現系を用いて、解析が求められているヒト等真核生物由来の膜タンパク質の発現・精製法の開発を行ってきた。特に水チャネル、イオンチャネル、GPCRなど、創薬分野から期待されている膜タンパク質の構造解析を目指して大量発現・精製の研究を進めた。具体的には、脳に発現する水チャネル、AQP4とその変異体、ギャップ結合チャネルCx26とその変異体、エンドセリン受容体、特にET<sub>B</sub>Rとそのキメラや変異体の昆虫細胞を用いた発現と精製が図1に示す様に安定に行えるような技術を確認した。また、GPCRとHomerを用いて界面活性剤による可溶化なしに発現・精製できる技術の開発を進めた。

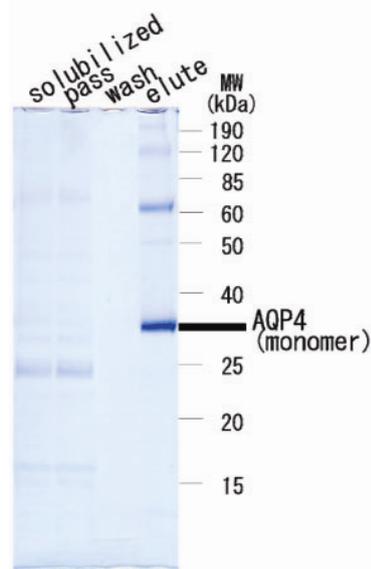


図1 ヒスチジンタグ配列を付加した AQP4 を昆虫細胞 SF9 を用いて発現し、界面活性剤オクチルグルコシド (OG) を用いて可溶化し、ヒスチジンのアフィニティー精製した結果、3 リッターカルチャーにより 10mg 以上の AQP4 が精製できる。モノマーの位置以外にもバンドは観察されるが、これは水チャネルが本来 4 量体で機能していることを反映している。他に顕著なバンドが見られないことからわかるように、昆虫細胞の発現系を用いて、高い精製度で、構造と機能研究に必要な量の AQP4 が安定に発現・精製できている。

(1-2)解析が必要な膜タンパク質、具体的には、AQP4とその変異体、Cx26とその変異体、H,K-ATPase、液胞型ATPase(V-ATPase)、ミクソソーム型プロスタグランジンE合成酵素1(MPGES1)等を用いて、2次元結晶化技術の開発を進めて、1例として図2に示すように、実際にこれらの膜タンパク質の2次元結晶化に成功した。

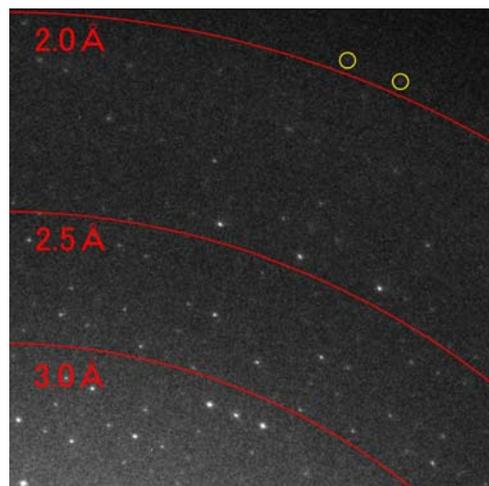


図2 AQP4の2次元結晶からの電子線回折像。丸で示すように、2 Å分解能以上の回折点が観察される。

**(2) 極低温高分解能電子顕微鏡や自動電子顕微鏡等の電子顕微鏡の開発、コンピューター解析の高速化と精密化**

(2-1)細胞に存在する生体内に近い状態の構造解析を実現するために、電子線トモグラフィー用極低温電子顕微鏡の開発を行った。その結果、トップエントリー式高分解能極低温電子顕微鏡に適した傾斜機構つき極低温電子顕微鏡が開発された。これを用いて、細胞に存在する生体内に近い状態のギャップ結合の構造を解析するための傾斜シリーズの撮影を行った。これらのデータから、50 Åより高い分解能の解析を行っている。

(2-2)2次元結晶化したヒト由来(発現系)の試料について、構造解析(分解能2 Åを超える精度)を可能にする電子線結晶学用プログラムを開発し、図3で示すように、水分子や、図4で示すように脂質分子を直接観察できる高分解能での解析を行うことが出来るようになった(JMB, 2009に発表)。

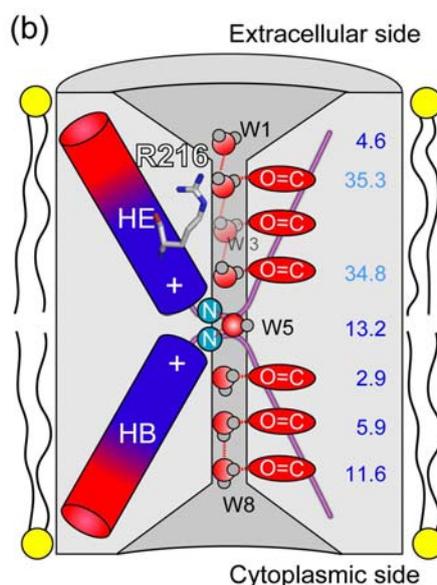
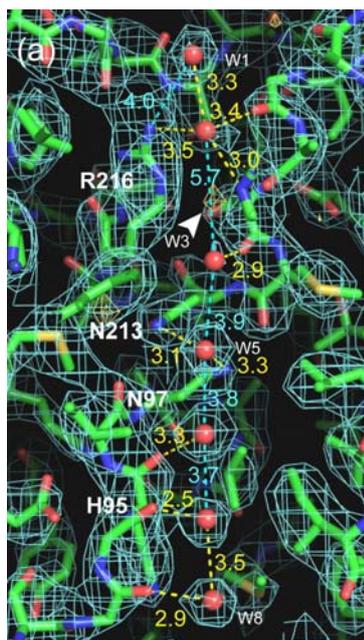


図3 AQP4のドーパミンシグナルによるリン酸化をミミックする変異体の高分解能の構造解析から、チャンネル内の全ての水分子、8個をきれいに分離して観察するのに成功した。この解析によって、P. Agre氏のノーベル賞の理由となったH-bond Isolation機構は、当時はモデルとして提案したのであるが、これを完全に実証できた。

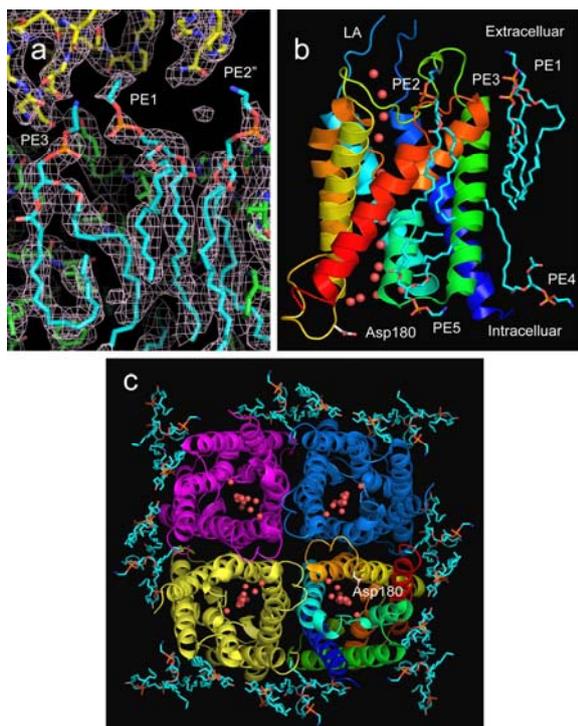


図4 AQP4 の高分解能の構造解析により解析された、結晶内の脂質分子の構造。高分解能の解析によって、水分子と共に、脂質分子の構造もきちんと分離して観察された。この解析から、AQP4 がアレイ構造を安定にとる場合の脂質分子との相互作用機構が解明されただけでなく、AQP4 分子が細胞外側で、反対の膜に存在するホスファチジルエタノールアミン (PE) と直接結合している構造も解明された。

(2-3) 結晶化できない分子や複合体の構造解析を8 Åの分解能で解析可能な単粒子解析用プログラム開発を産総研の佐藤グループの力で行った。さらに、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、高分解能の電子線トモグラフィー用コンピュータプログラムの開発を理化学研究所と日本電子との協力で行った。

(2-4) 2次元結晶化条件の検査を従来に比べ2倍以上の効率で行うための、2次元結晶化条件検査用自動電子顕微鏡の開発を行った。特に高性能CCDとそれを制御するコンピュータプログラムを開発することにより、2次元結晶を作製する速度を飛躍的に向上させると共に、実際に極低温電子顕微鏡を用いてデータ収集するシステムとしての効率も向上した。これらのシステムを活用して、図3や図4のような構造解析の効率とその質が飛躍的に向上した。

### (3) 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膜タンパク質及びその複合体の構造解析を行った。以下に具体的な例で示すように、生理的に近い状態での構造解析を電子線結晶学を用いて行い、X線結晶構造解析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た。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い、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、膜タンパク質及びその複合体の自然な状態の構造解析も行った。

#### (3-1) 京都大学分室の成果

特筆すべき成果を以下に示す。まず、中間目標で達成すべき目標として掲げた“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。”に関しては、ヒト由来ギャップ結合チャンネルコネキシン26(Cx26)の例を代表例としてあげることが出来る。

(3-1-1) Cx26のチャンネルを閉じる構造を安定化する変異体M34Aの2次元結晶を作

製し、電子線結晶学によってその構造を解析した。その結果、これまで教科書で説明されるギャップ結合チャネルのゲーティング機構とは異なり、このチャネルは、プラグと命名したゲーティングに関わると思われる（図5の白い矢頭で示す）構造をとっていることが明らかになった（PNAS, 2007に発表）。

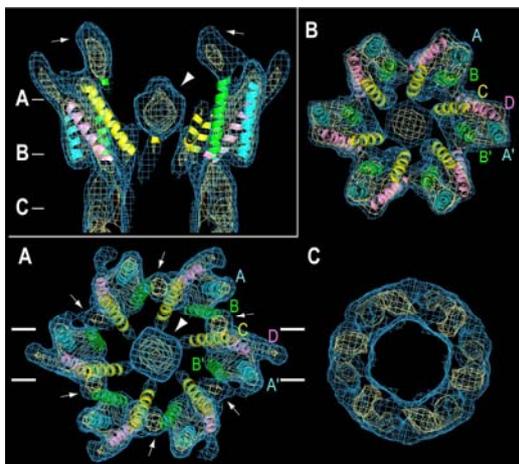


図5 昆虫細胞で発現し、精製、結晶化して、電子線結晶学で解析されたCx26の構造。白い矢頭で示した部分に、プラグと命名した密度が見られる。

このプラグが何によって形成されているかを確認するために、アミノ末端側を除いた変異体について、これらを昆虫細胞Sf9の発現系を用いて発現と精製法を確立した。また、それらの2次元結晶を作製し解析した結果、アミノ末端によって形成されることを確認した。

さらに、X線結晶学による構造解析により、図6のように原子モデルを解析し、コネクシン構造に関して混乱した状況に終止符をうつ歴史的成果を得た(Nature, 2009に発表)。

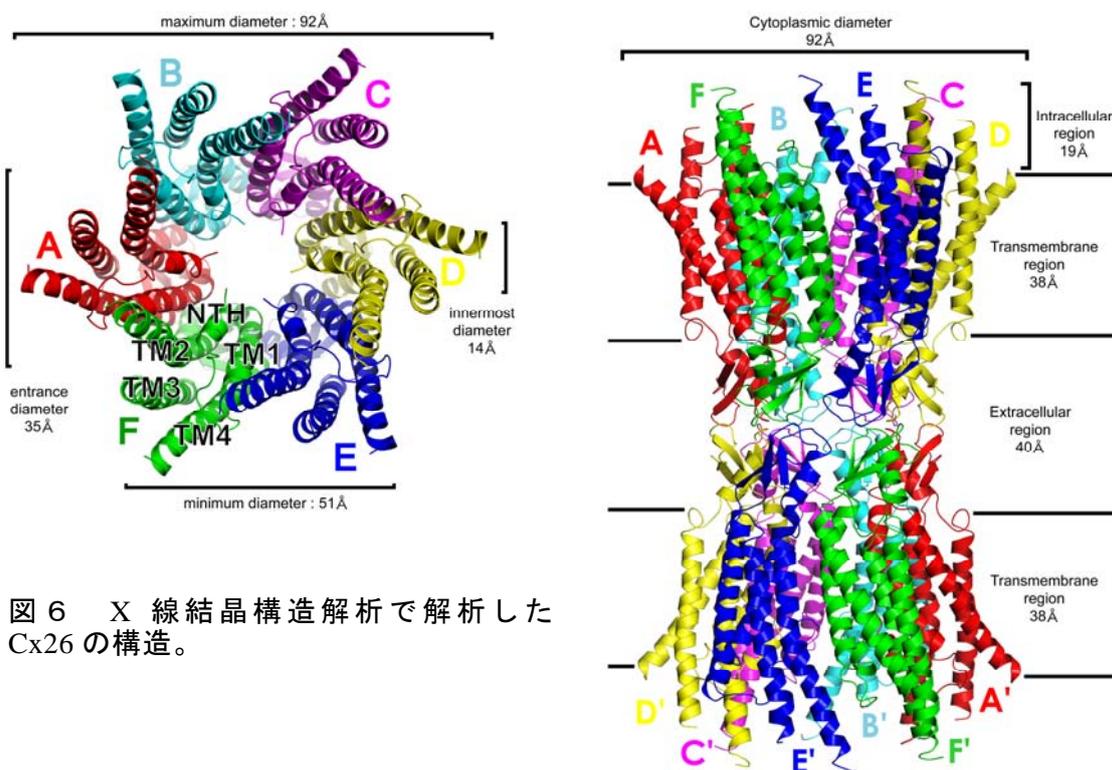


図6 X線結晶構造解析で解析したCx26の構造。

(3-1-2) 胃の内部はpHが1近くの酸性条件になっている、このような酸性の条件にするには強力なプロトンポンプの働きが必要である。豚の胃から精製したHK-ATPaseの2次元結晶を作製して、電子線結晶学による構造解析を行った結果、細胞膜内外のプロトンの濃度を100万倍という驚異の濃度勾配までポンピングして達成できるプロトンポンプの特徴的な分子機構を解明した。この機構をラチェットモデルと名づけた。図7に示す様にポンピングの機能を担う $\alpha$ サブユニットが逆回転しないように $\beta$ サブユニットのアミノ(N)末端が、 $\alpha$ サブユニットのPDドメインに接触して、これがラチェットの働きをするようにポンプの逆回転を防ぐ構造を解明した。また、図7bに示す様にN末端を除いた変異体により、その機構を確認した。

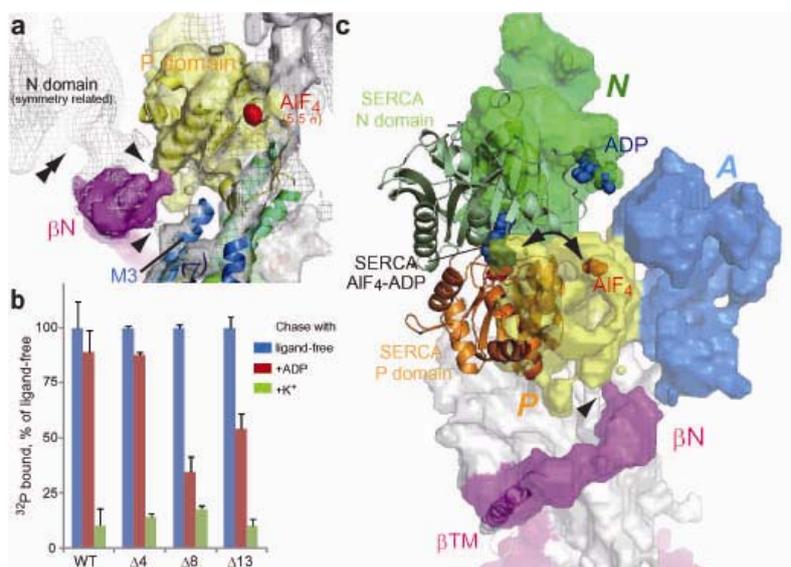


図7 HK-ATPaseの2次元結晶を作製して、電子線結晶学によって構造解析を行った結果。紫色の $\beta$ サブユニットが $\alpha$ サブユニットのPDドメインに黒い矢印の部分で、接触して、プロトンポンプの逆回転を防ぐことによって、細胞膜内外のプロトンの濃度勾配を100万倍にもすることが出来る驚異の分子機構が解明された。

(3-1-3) 水チャネルAQP4のドーパミンカスケードによるゲーティング機構を解明するためにS180D変異体の構造を高分解能で解析した。そのために、発現・精製・結晶化条件を最適にすると共に、極低温電子顕微鏡用試料作製条件の最適化を行った。さらに、高分解能の電子線回折像を記録できるようにCCDカメラとそのプログラムシステム、解析用プログラムなどの開発を行った。その結果、1.9Å分解能のデータが収集できるようになった。高い傾斜角

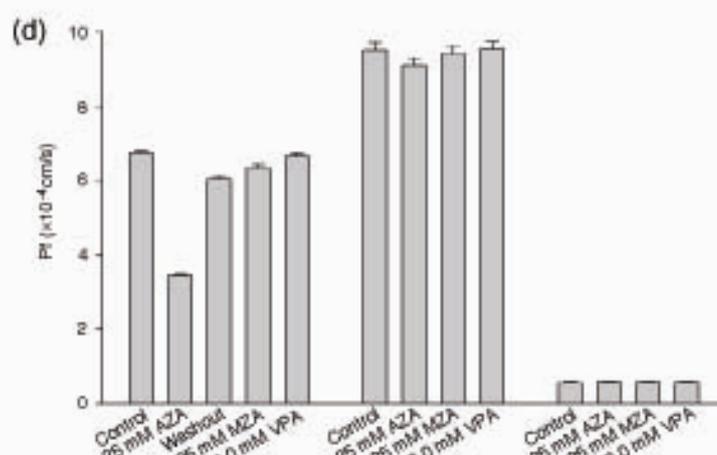


図8 AZAがAQP4特異的に、しかも可逆的に水透過を阻害することを解明した。AZAに構造が極めて似ているMZAが阻害を示さないことも確認した。

度のデータまで等方的に計算するために、分解能を2.8 Åに制限したが、2 Åを超える分解能での解析が可能になった。その結果、図3と図4に示す様にチャンネル内の水分子のみならず、脂質分子も可視化できるようになった。さらに、脳浮腫を軽減するなどの目的で、AQP4の水透過阻害剤の開発が望まれている。それゆえ、AQP4の水透過阻害剤として、図8に示す様にAQP4特異的に可逆的に水透過を阻害するアセタゾールアミド (AZA) を発見した。また、電子線結晶学により解析したAQP4の構造と計算科学グループが独自に開発したSievgeneというプログラムを用いて、AZAをはじめとして、メタゾールアミド (MZA)、バルプロイクアシッド (VPA)、サルチアミンなどの化合物がAQP4へ結合する様子のドッキングモデルを計算した。さらに、このような複合体の形成の様子を実際に近い水中での分子動力学 (MD) 計算を用いて結合の様子をシミュレートした。

### (3-2) BIRCの電子顕微鏡グループの研究内容と研究成果

極低温高分解能電子顕微鏡や自動電子顕微鏡等の電子顕微鏡の開発、コンピューター解析の高速化と精密化を目指して研究を進め以下の様な成果を得た。

#### (3-2-1) ミクロソーム型プロスタグランジンE合成酵素1の高分解能構造解析のための電子顕微鏡法開発・改良

我々は以前、カロリンスカ研究所のHans Hebert博士のグループと共同で、ミクロソーム型グルタチオン転移酵素1 (MGST1) の電子線結晶構造解析を行い、その原子モデルを発表した。そのMGST1は、主にグルタチオンを利用した酵素活性を持つ膜タンパク質のグループである、Membrane Associated Proteins in Eicosanoid and Glutathione Metabolism (MAPEG)ファミリーの一員であり、他のメンバーとして、ミクロソーム型プロスタグランジンE合成酵素1 (MPGES1) が知られていた。今回、このMPGES1の二次元結晶がカロリンスカ研究所で得られていたので、その高分解能の電子線結晶構造解析の共同研究を行った。MPGES1は、炎症などを引き起こすメディエーターであるプロスタグランジンの生合成カスケードで、発現が誘導される終端酵素であるので、医薬的に特に重要と考えられている。

この結晶は、当初、非傾斜の結晶から、明らかに構造が異なると考えられる電子回折が得られたが、低温電子顕微鏡用の試料作製法を

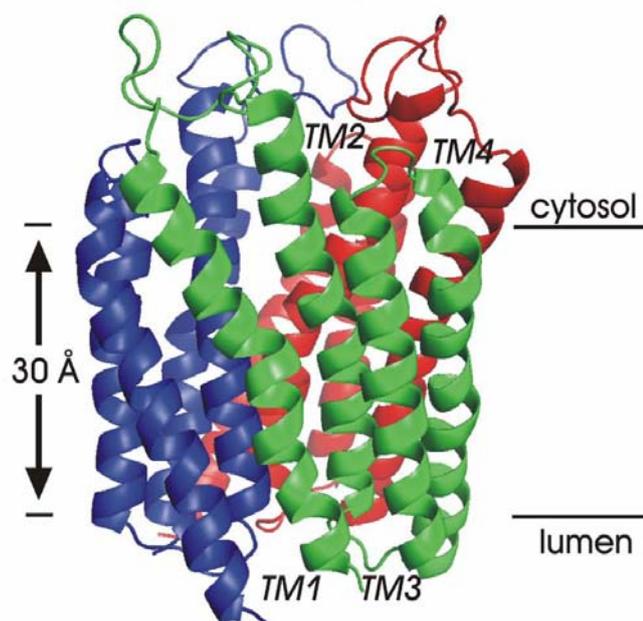


図9 電子線結晶学により解析された MPGES1 の構造

最適化することで、半分くらいの結晶について、同じ構造と考えられる電子回折図形が得られるようになった。しかし、これ以上、試料調製法を向上することができなかったため、傾斜と非傾斜の電子回折図形をペアで撮影することで、同じ構造を持つ結晶からの電子回折図形を選択して解析した。このようなデータ収集条件の改良により、図9のようなMPGES1の原子モデルを報告することができた。また、膜タンパク質が傾いて二次元結晶中に存在しているという特殊な結晶であることが明らかになり、試料調製が困難だった理由と考えられた。

このMPGES1の結晶構造と、以前に得られたMGST1の結晶構造を比較することで、いろいろな基質を受け入れて、それを可溶性に変換することで解毒を行うMGST1に対して、プロスタグランジン特異的なMPGES1の酵素機構が、基質のinduced fitに起因しているというモデルを提唱できた。このような構造変化を伴った基質認識機構は、その阻害薬の開発にも応用できる可能性がある。

### (3-2-2) 膜タンパク質複合体V-ATPaseの電子線結晶構造解析のための結晶化法開発・改良

液胞型ATPase(V-ATPase)はF-type ATPaseと同様、回転型のナノモーターであり、イオン輸送を行う膜内部分( $V_0$ )とATPase活性を持つ水溶性部分( $V_1$ )に大きく分けることができる。そのため、そのイオン輸送の機構は両者で共通していると考えられるが、V-ATPaseは細胞内のコンパートメントの内部を酸性にする役割を担っており、その生理的な役割は重要であり、特に酵素活性の制御に関しては、水溶性部分の可逆的な解離結合などV-ATPase特有の性質が多い。そこで、哺乳類のV-ATPaseに近い、古細菌由来のV-ATPaseの立体構造を明らかにすることは、哺乳類V-ATPaseの制御機構の解明につながると考えられる。また、V-ATPaseは膜タンパク質複合体であり、それを用いて膜タンパク質複合体の結晶化法と電子線結晶構造解析の開発・改良を行うことができる。

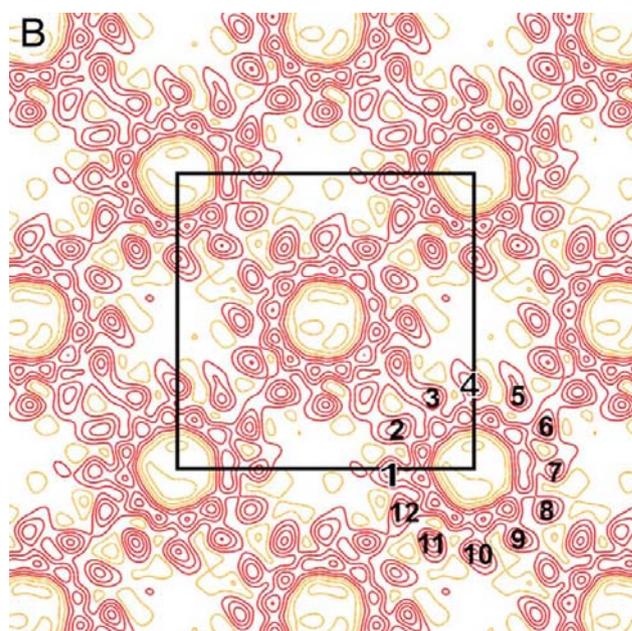


図10 電子線結晶学で解析された  $V_1$ -ATPaseの投影構造

我々は以前、V-ATPase全体のホロ酵素の結晶化を行ったが、高分解能の構造が得られる結晶を得ることができなかつたので、今回はその膜貫通部分 $V_0$ のみを用いて二次元結晶化を行った。その結果、図10に示したような投影像を得ることができた。この投影像は7Å分解能で、ヘリックスを明瞭に観察することができ、それからサブユニット数が12と決定することができた。興味深いことに、そのサブユニット数は種により異なっており、そのタンパク質が存在する環境のpHにより、数が最適化されていることが示唆された。また、水溶性の $V_1$ -ATPase部分は三量体であるが、膜貫通部分はその倍数であっても、その活性

に問題がないことを、東工大との共同研究により明らかにし、対称性のミスマッチが機能に重要でないことを示した。現在、その立体構造を得る解析を進めている。

### (3-2-3) 結晶によらない複合体構造解析のための極低温電子顕微鏡法開発・改良とそのシャペロニン複合体への応用

我々は、結晶を作ること無しに、比較的高分解能の構造解析を行うことができる単粒子解析に適した極低温電子顕微鏡を開発した。今回、その顕微鏡をシャペロニン複合体に応用して、実際の立体構造解析を行い、その構造を報告した。シャペロニンはタンパク質のfoldingを助ける分子シャペロンの一つで、複合体を構成するGroELとGroESが作る内孔に基質を取り込むことで、その折りたたみを助けると考えられている。我々が用いたシャペロニン複合体は、天然の *Thermus thermophilus* から得たので、折りたたみ途中の基質を結合していると考えられる。

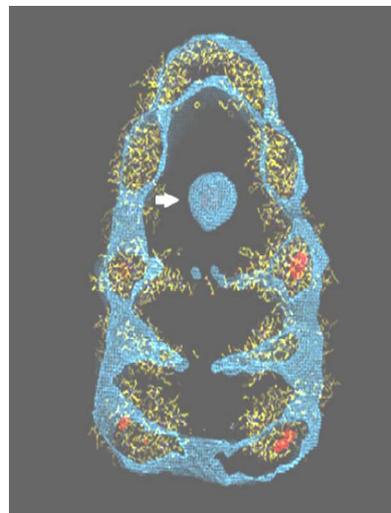


図 11 単粒子解析法で解析されたシャペロニン複合体の構造。

そのような試料を用いて得られた立体構造を図 11 に示す。これは多くの基質の平均像ではあるが、明らかに内部に基質に相当すると考えられる電位が観察される立体構造を得ることができた。このように観察された基質は、内孔のほぼ中央に位置していたので、内孔中の基質はシャペロニンから斥力を受けていることが示唆された。これは、基質の解離に重要であると考えられるとともに、基質の効率的な折りたたみにも寄与している可能性がある。タンパク質の誤った重合によると考えるアルツハイマー病などが問題となっており、このようなタンパク質の折りたたみの研究は、そのような病気の治療にも貢献できる可能性がある。また現在、この解析で得られた知見をもとに、極低温電子顕微鏡を用いた単粒子解析に適した撮影条件を検討しており、より高分解能の構造解析を目指している。

### (3-3) BIRC の X 線グループの研究内容と研究成果

#### (3-3-1) クロマチン関連複合体に関する研究

##### (3-3-1-1) ヒストンシャペロン CIA/ASF1-CCG1 プロモドメイン複合体の構造と機能

真核生物のゲノム DNA は、ヒストンに DNA が巻き付いたヌクレオソームを形成することで、わずか数ミクロンの核内に収納されている。ヌクレオソームは DNA 上で起こる転写・複製・修復・組み替えなどの反応に抑制的に作用するため、これらの反応が DNA 上で進行するには、ゲノム DNA 中の特定の領域のヌクレオソームが、破壊・再形成される分子機構が必須である。これまでに、細胞内外のシグナルに依存してヒストンに化学修飾が施され、特定の領域のヌクレオソームの構造変換が選択的に起こることが明らかにされてきた。しかしながら、ヒストンの化学修飾からヌクレオソーム構造変換に至る具体的な分子機構については未だ解明されていない。

ヒストンのアセチル化修飾は、特定の領域のヌクレオソームを特定の時期に破壊する目印となることが明らかにされている。ヒストンシャペロンCIA/ASF1は、この目印となるアセチル化を特異的に認識するTFIIDの最大サブユニットCCG1の高保存領域であるダブルプロモドメイン(以下、DBD(CCG1)と略す)と機能的に相互作用することで、転写活性化領域にリクルートされると考えられている。ヌクレオソーム構造変換因子とアセチル化ヒストン認識ドメインとの複合体(CIA/ASF1-DBD(CCG1)複合体)を解析することは、生体内のシグナルによるヌクレオソーム構造変換制御の分子機構を理解する上で、有用な知見を与えられられる。更に、この過程は真核生物の遺伝子発現の根幹に関わるため、その分子機構の解明は新しい概念に基づいた創薬のターゲットとなりうる。そこで本研究では、この分子機構モデルを構造学的に明らかにするため、X線結晶構造解析の手法を用いてCIA/ASF1-DBD(CCG1)複合体の立体構造を決定した。更に、生体内でのCIA/ASF1-DBD(CCG1)複合体の働きを解明するため、決定した結晶構造に基づき生化学および生物学的解析を行い、アセチル化からヌクレオソーム破壊に至るまでの分子機構モデルを提出した。

#### CIA/ASF1(155)-DBD(CCG1)複合体の X 線結晶構造解析

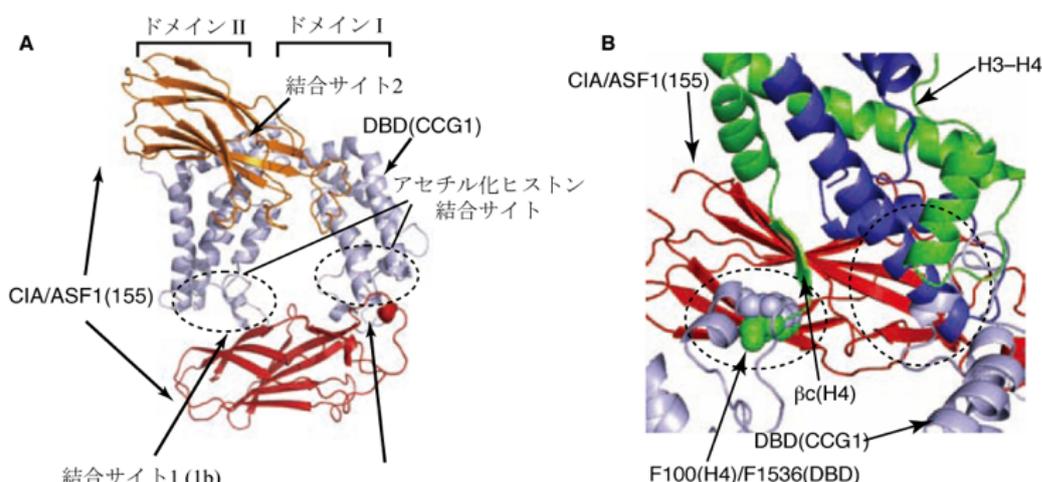
CIA/ASF1(155)-DBD(CCG1)複合体溶液はモル比 1:1 で混合することにより調製し、15-20 mg/ml まで濃縮して結晶化に用いた。結晶化を行った結果、 $0.4 \times 0.25 \times 0.2 \text{ mm}^3$  の複合体結晶を得ることに成功した。シンクロトン放射光施設にて回折データ収集を行った結果、最大分解能  $3.0 \text{ \AA}$  の回折データを収集することに成功した。分子置換法により結晶構造の決定を行い、 $3.3 \text{ \AA}$  分解能で結晶学的精密化を行った。精密化においては、分解能が  $3.0 \text{ \AA}$  より低いことから個々の原子の温度因子は精密化を行わず、TLS パラメーターのみ精密化を行った。 $R_{\text{work}} = 0.237$ 、 $R_{\text{free}} = 0.293$  となったところで精密化を終了した。

#### CIA/ASF1(155)-DBD(CCG1)複合体の全体構造

結晶構造解析の結果、1 分子の DBD(CCG1)に対して 2 分子の CIA/ASF1(155)が結合することが明らかになった(図 1-1 A)。CIA/ASF1(155)と DBD(CCG1)の接触面積は  $818 \text{ \AA}^2$  (結合サイト 1)、 $719 \text{ \AA}^2$  (結合サイト 2)であり、両者の相互作用は比較的弱いことが示唆された。CIA/ASF1(155)-DBD(CCG1)複合体の特徴的な点は、ヒストン H3-H4 やアセチル化ヒストン結合サイトと結合部位が重複していることである。結合サイト 1 では、DBD(CCG1)の Phe1536 が CIA/ASF1 分子の側面に位置する疎水ポケットを塞ぐ形で相互作用している(図 1-1 B)。この疎水ポケットは CIA/ASF1 とヒストン H4 Phe100 の相互作用に利用される領域でもある(図 1-1 B)。また、DBD(CCG1)の結合サイト 1 にはアセチル化ヒストン H4 との相互作用に関わる疎水ポケットが存在し、CIA/ASF1(155)は DBD(CCG1)の 2 つの疎水ポケットに近接した領域で相互作用している(図 1-1 A)。CIA/ASF1 は進化上高度に保存されたタンパク質でその相互作用因子も多いことから、共通表面を多数の相互作用に利用していることが示唆される。

## CIA/ASF1(155)-DBD(CCG1)複合体の定量的相互作用解析

CIA/ASF1(155)とDBD(CCG1)の相互作用を溶液中で評価するため、点変異体を用いた GST プ



**図 1-1** A) CIA/ASF1(155)-DBD(CCG1)の全体構造。DBD(CCG1)のアセチル化ヒストン結合サイトとCIA/ASF1(155)の結合サイトが近接している。B) CIA/ASF1(155)-ヒストン H3-H4 複合体とCIA/ASF1(155)-DBD(CCG1)複合体のCIA/ASF分子での重ね合わせ。点線で示している領域で立体障害となるため、CIA/ASF1(155)、DBD(CCG1)、ヒストン H3-H4 による3者複合体は形成できないことが推察される。

ルダウンアッセイ、分析超遠心、等温滴定カロリーメトリー(ITC)による解析を行った。DBD(CCG1)変異体を用いた GST プルダウンアッセイの結果、結合サイト 1 および 2 における両者の相互作用が減少したことから、溶液中でも 2 つの異なる分子表面を用いて複合体を形成していると考えられた。次に、ITC を行った結果、2 つの独立した結合サイトを持つモデルによるフィッティングで最良の結果が得られ、2 つの結合サイトはそれぞれ  $8.6 \mu\text{M}$  と  $173 \mu\text{M}$  の解離定数を有することが示唆された。さらに、CIA/ASF1(155)の高親和性結合サイトを決定するため、DBD(CCG1)点変異体を用いて沈降速度法による解析を行った。その結果、Phe1536Ala (結合サイト 1)点変異体では複合体が形成されないことから、CIA/ASF1(155)-DBD(CCG1)複合体の高親和性結合サイトは結合サイト 1 であること結論された。以上の結果から、結合サイト 1 の  $K_d$  は  $8.6 \mu\text{M}$ 、結合サイト 2 の  $K_d$  は  $173 \mu\text{M}$  であると考えられた。

### CIA/ASF1(155)、DBD(CCG1)、ヒストン(H3-H4)<sub>2</sub>による競合的相互作用

DBD(CCG1)との相互作用を介してプロモーター上にリクルートされた CIA/ASF1 は次にヒストン(H3-H4)<sub>2</sub> と相互作用し、ヌクレオソーム構造を破壊すると考えられる。CIA/ASF1(155)-DBD(CCG1)複合体と CIA/ASF1-ヒストン H3-H4 複合体の CIA/ASF1 分子で構造重ね合わせを行うと、立体障害のため DBD(CCG1)とヒストン H3-H4 が CIA/ASF1 に対して競合的に相互作用することが予想される(図 1-1 B)。そこで、3 者の相互作用の関連性を明らかにするため、

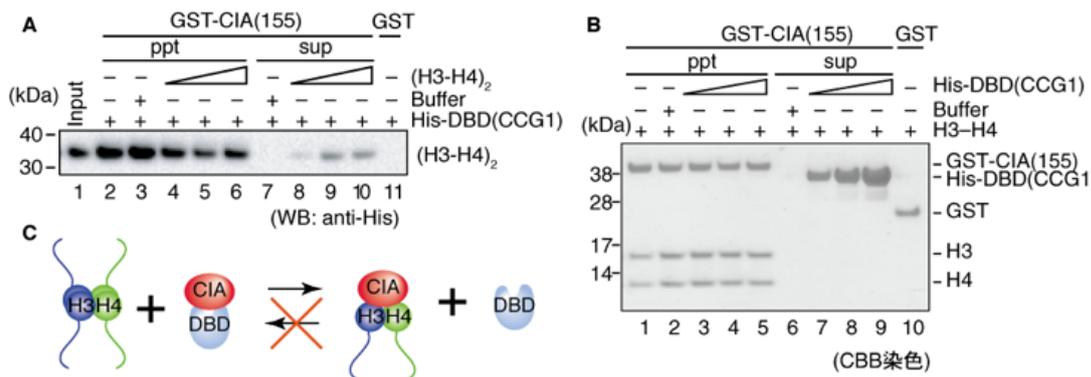


図 2 CIA/ASF1(155)と DBD(CCG1)の相互作用に与えるヒストン(H3-H4)<sub>2</sub>の影響。A) CIA/ASF1(155)-DBD(CCG1)にヒストン H3-H4 を添加する競合実験。B) CIA/ASF1(155)-ヒストン H3-H4 に DBD(CCG1)を添加する競合実験。C) 競合実験の概略図。この過程は不可逆的に進行することがわかった。

CIA/ASF1(155)、DBD(CCG1)、ヒストン(H3-H4)<sub>2</sub>を用いた競合的相互作用実験を行った。競合実験の結果、CIA/ASF1(155)-DBD(CCG1)複合体にヒストン(H3-H4)<sub>2</sub>添加することでDBD(CCG1)がCIA/ASF1(155)から解離し、CIA/ASF1(155)はヒストン H3-H4 と複合体を形成することが示された(図 2A)。しかしその一方で、その逆過程は進行しないことが示された(図 2B)。以上のように、DBD(CCG1)とヒストン H3-H4 は CIA/ASF1(155)に対して競合的に相互作用し、CIA/ASF1(155)の DBD(CCG1)からヒストン H3-H4 への変化は不可逆的に進行することが明らかになった(図 2C)。これらの結果は、DBD(CCG1)との相互作用を介してプロモーター上にリクルートされた CIA/ASF1 が DBD(CCG1)からヒストン H3-H4 へと受け渡され、ヌクレオソームを破壊するという分子機構モデルを支持している。

### DBD(CCG1)による CIA/ASF1 のプロモーター上へのリクルート

以上の結晶構造と生化学的実験の結果を踏まえて、CIA/ASF1 と DBD(CCG1)の相互作用の生体内における役割を明らかにするために、出芽酵母野生株と DBD(CCG1)ホモログの点変異株を用いて、クロマチン免疫沈降法(ChIP)による機能解析実験を行った。その結果、野生株では CIA/ASF1 と DBD(CCG1)は、転写が活性化されている遺伝子のプロモーター上にリクルートされていた。また、両者の相互作用が減少するような点変異を導入した株では、DBD(CCG1)はプロモーター上に局在しつつも、CIA/ASF1 のプロモーター上へのリクルートが減少し、同時にヒストンの除去と転写活性化も抑制されることが明らかになった。

## まとめ

本研究では、ヌクレオソーム構造変換因子-アセチル化ヒストン認識ドメイン複合体で最初の例となる CIA/ASF1(155)-DBD(CCG1)複合体の結晶構造を明らかにした。さらに、クロマチン免疫沈降を用いた局在解析の結果、CIA/ASF1 が DBD(CCG1)との相互作用を介して特定のプロモーター上に局在することを明らかにした。以上の結果から、細胞内でも「CIA/ASF1 が DBD(CCG1)との相互作用を介してプロモーター上にリクルートされた後、CIA/ASF1 が DBD(CCG1)からヒストン H3-H4 へと受け渡される」という分子機構モデルが示唆された。現在、これらの結果を国際誌に投稿中である。

### (3-3-1-2)ヒストン蛋白質の大量調製技術の確立

真核生物の核内で起こるヌクレオソーム構造の変換反応は、転写・複製・修復に必須であると同時に、これらの反応の制御メカニズムとしても働いている。このため、ヌクレオソーム構造変換の分子機構は、創薬のターゲットとして魅力的なものであるが、その詳細な分子メカニズムが不明なため、合理的な薬剤分子設計が困難である。ヌクレオソーム構造変換の分子機構の理解が進まない一つの理由としては、ヒストンを始めとするクロマチン因子群には大量調製が困難なものが多く物理化学的な手法による解析が立ち後れている点あげられる。遺伝子組換え型ヒストンの調製法には、以前から知られているものがあるが、数100mgレベルの大量調製には向かず、簡便なヒストン大量調製法の確立が待ち望まれていた。そこで我々は遺伝子組換え型ヒストン複合体の新規大量精製法を開発した。

本方法の特色は、尿素を必要とするカラムクロマトグラフィーを用いず、各タンパク質の溶解度の違いを利用して不溶性画分から各ヒストンサブユニットを精製する点にある。この方法では、タンパク質の可溶化能が異なる数種類の溶液を用いて不溶性画分中のタンパク質を段階的に可溶化させ、遠心によって各ヒストンサブユニットと他の混在タンパク質との分離を行なう。尿素を用いずに精製を行なう

ため試料のカルバモイル化を防ぐ処理も必要ない。単純化した精製操作の確立によりスケールアップが容易になり、グラム単位で各ヒストンサブユニットを精製できるようになった(図3)。本方法には、試料中に混在する核酸成分を取り除くことが難しいという弱点があったが、その弱点も、ヒストン複合体の再構成後に行なう精製方法の確立によって克服できた。グラム単位で比較的容易に各ヒストンサブユニットを精製し、核酸成分を除去する精製方法も確立したため、高純度なヒストン複合体試料を一度に数百ミリグラム単位で精製することが可能になった。本方法は、ヒスト

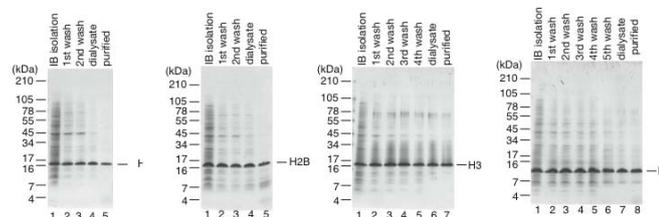


図 3. 今回開発した方法により精製した各ヒストン

ンシャペロン等のヌクレオソーム構造変換因子の構造機能相関解析を推し進めるための、有力なツールとなるだろう(投稿準備中)。

(3-3-1-3)部位特異的変異を利用した、X線結晶構造解析用結晶の改良に関する研究蛋白質のX線結晶構造解析は、創薬における基盤技術とであるものの、得られた蛋白質結晶の質が構造解析を行うために十分でないことはしばしば起こる。良質の結晶を得る事は、創薬の現場に限らず、X線結晶構造解析における長年の課題である。近年、得られた結晶の質を改善するために、結晶凍結法の工夫をはじめとして様々な手法が考えられてきたが、決まった手順はなく試行錯誤により結晶の質を改善していくしかない。本研究では、ヒストンシャペロン TAF-1 $\beta$  を例にとり、結晶の質の改善方法の検討を行なった。TAF-1 $\beta$  の場合、野生型(WT)結晶からは 5.5Å 分解能のデータしか得られなかったため、そのままでは構造解析を進めるのが困難であった。そこで、「変異体結晶の利用」、「クライオ条件の最適化」を組み合わせる事で結晶の質を改善する事を試みた。

TAF-1 $\beta$  の野生型(WT)結晶についてクライオ条件の検討を行った結果、クライオプロテクトANTとしてトレハロースを

用いアニーリングを行った場合に、分解能が改善されることが分かった。しかし、結晶の異方性が高く、 $a^*$ 軸方向には 3.5Å の回折が生じたものの、 $c^*$ 軸方向には 6.0Å 分解能の回折しか生じなかった。そのため WT 結晶による構造決定を断念し、変異体結晶を利用して構造解析を進めることにした。具体的には、全部で 14 個あるロイシン(Leu)のうちの幾つかをメチオニン(Met)に変異さ

せて結晶の質を改善する事を試みた。多くの変異体結晶を一度に作成し、その質を評価しながら構造解析を進めるのは効率が悪いと考えたため、結晶の質を確認しつつ2段階で多重変異体を作成するという方法で結晶の質を改善した。まず、14 個あるロイシンから3つを選択し3種類の点変異体を作成した。この3種類の変異体を結晶化し、結晶の質の比較を行った。この中から最も結晶の質が良かった変異体を選び(図4参照)、その変異体に更に変異を導入して3つの三重点変異体を作成した。これら変異体の結晶の質を比較した結果、作成した3重点変異体の1つにお

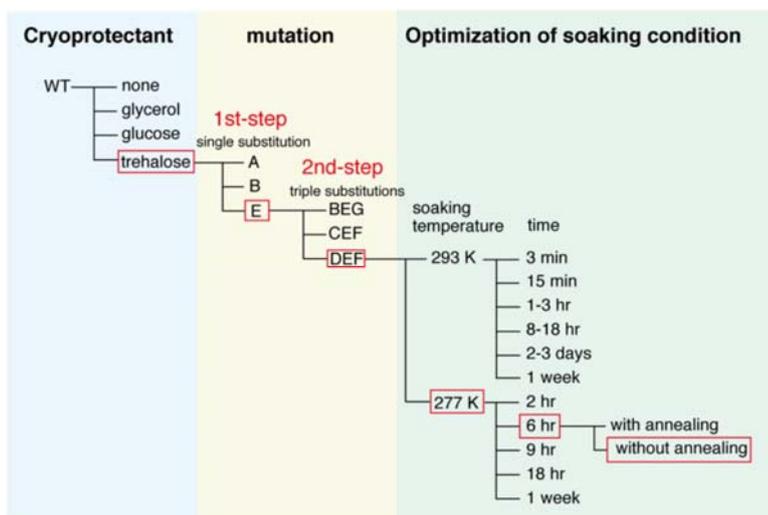


図4 TAF-1 $\beta$  結晶の質の改善

結晶凍結溶液の選択、2段階の変異導入、結晶凍結法の最適化の3つの段階をへて、最初は 5.5Å 分解能程度の回折像しか与えなかった TAF-1 $\beta$  の結晶を 2.3 分解能まで改善して、多波長異常分散法による結晶構造解析を成功させた。

いて、結晶の凍結法を最適化した場合に顕著に分解能が改善することを見いだした(図4)。この結晶は、2.3Å以上の回折を示し、多波長異常分散法によりTAF-1βの結晶構造を決定する事ができた。

以上結果より、多重変異体の利用と結晶の凍結法の最適化を組み合わせる事で、全く構造解析に適さないような結晶でも、結晶の質を向上させる事が可能であることを示す事ができた。この結果は、*Acta Crystallographica* に発表済みである (Senda, M. *et al. Acta Crystallogr.* **64**, 960-965.)。

#### (3-3-1-4)古細菌由来 TATA ボックス結合因子(TBP)の X 線結晶構造解析

古細菌の転写反応系は、真核生物型の転写装置と真正細菌型の転写調節因子から構成されている。異なる起源に由来する古細菌の転写装置と転写調節因子は、機能的に相互作用するために、真核生物とも真正細菌とも異なった分子表面を進化的に獲得していることが予想される。従って、古細菌の転写装置と転写調節因子の分子間相互作用を研究することで、転写反応の進化的変遷を解明できると考えられる。とりわけ、真核生物と古細菌において転写開始反応に必須な TATA ボックス結合因子 (TBP) は転写反応における中心因子であり、1 次構造上の特徴から真核生物型・古細菌 I 型・古細菌 II 型の 3 種類のグループに分けられるため、3 グループの TBP の比較研究は、転写装置と転写調節因子の分子間相互作用を研究する上で極めて重要である。しかし、これまでに古細菌 II 型 TBP の立体構造は解析されていなかった。

今回我々は、*Methanococcus jannaschii*由来 TBP の立体構造の解析に成功した。アミノ酸配列の保存性を立体構造にあわせて調べたところ、3 つのグループを通じて高度に保存された分子表面のアミノ酸は DNA との相互作用に重要なアミノ酸であった。次に、グループ特異的に保存された表面は TFIIB との相互作用に重要なアミノ酸であった。その一方で、各グループに特異的な分子表面は、真核生物型 TBP(塩基性)・古細菌 I 型 TBP(塩基性と酸性が混在)・古細菌 II 型 TBP(酸性)とで大きく異なっていた(図5)。この結果は、TBP が DNA 結合蛋白質であることを考えると大変興味深く、古細菌 II 型 TBP は DNA に結合するのか?という疑問を抱かせた。等温滴定カロリーメトリー(ITC)による測定の結果、古細菌 II 型 TBP(MjTBP)は、酸性に富む分子表面を持つことと一致して、TATA box DNA と弱く相互作用することがわかった( $K_d = 0.94 \mu M$ )。以上のように、グループを通じて保存されたアミノ酸は TBP の有する共通の機能を担っており、それとは逆に、グループごとに異なる分子表面は TBP の有する転写制御能の多様性を担っていることが示唆された。また、進化系統樹から、TBP と TFIIB と RNA ポリメラーゼ II のサブユニットの一部(Rpb2, 3, 11)が共進化している可能性が示唆された。この結果は、*Genes to Cells* 誌に発表された(Adachi, N. *et al. Genes Cells*, **13**, 1127-1140)。

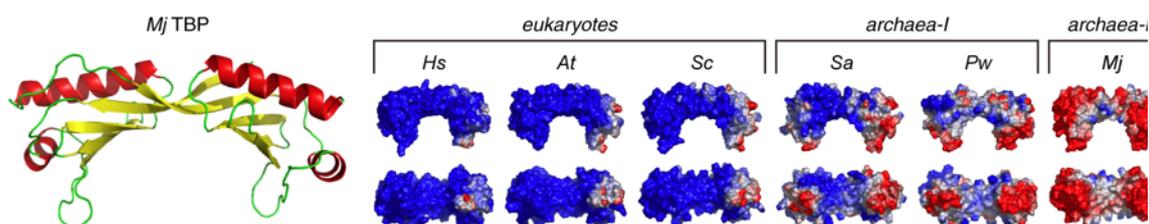


図5 MjTBPの結晶構造と各TBPの表面電荷の比較

### (3-3-2) 電子伝達複合体に関する研究

タンパク質分子間のシグナリングは、細胞膜上の受容体から核内へのシグナル伝達に必須の過程で、この分子メカニズムを理解する事は創薬の基盤技術として欠く事ができない。特に、近年は強固な複合体形成によるシグナルを伝達だけでなく、弱い相互作用によるシグナル伝達に注目が集まっている。また相互作用は弱いものの、相互作用する分子間には親和性の調節が見られるものも多い。このような弱い相互作用に基づく蛋白質分子間のシグナリングには多くのものが知られているが、古くから研究されてきたものに電子伝達反応がある。生化学的な解析が容易である事から、弱い相互作用に基づいた蛋白質間シグナリングを研究するには最適な系である。そこで我々は、微生物に存在する電子伝達蛋白質を例にとり、弱い相互作用に基づいた蛋白質間シグナリングの解析を行なった。

蛋白質間の電子伝達反応は、光合成系、呼吸鎖、各種分解代謝系など生体内の多くの反応系に存在しており、生物の生存に必須な反応である。複数の電子伝達タンパク質から形成される電子伝達タンパク質間の結合は弱く一過性であること、この結合の親和性は電子伝達複合体を構成するタンパク質の酸化還元状態に依存して調節されることなどが知られており、これらの特徴は電子伝達が効率良く行われるために重要であると考えられてきた。しかし、電子伝達反応で生じる一連の反応中間体構造を原子のレベルで明らかにし、その構造変化から親和性の調節機構を示した例はない。その理由は反応中間体構造の決定に必須な嫌気条件下での結晶化等に技術的な困難があるためである。そこで我々は、嫌気条件下での結晶化等の技術的課題を解決することで、電子伝達タンパク質間の酸化還元状態に依存的した親和性調節機構を立体構造に基づき解明することを目的とし研究を進めてきた。具体的には、*Acidovorax* sp. strain KKS102 由来の芳香環水酸化ジオキシゲナーゼ(BphA)の電子伝達系を用いて X 線結晶構造解析と生化学実験を組み合わせた研究を行った。BphA の電子伝達系は、NADH 依存的フェレドキシン還元酵素(BphA4)とフェレドキシン(BphA3)から構成される。BphA4 は補酵素として FAD を含むフラビンタンパク質で、3つのドメイン(FAD 結合ドメイン、NADH 結合ドメイン、C 末端ドメイン)から成る。BphA4 は FAD が NADH から 2 個の電子を受け取ると二電子還元型になり、電子を 1 個ずつ、計 2 分子の BphA3 に伝達することができる。

本研究では、まず BphA4 の速度論解析データに基づいて、二電子還元型／一電子還元型の BphA4 が酸化型の BphA3 と強く相互作用する反応モデルを仮定した。その親和性の違いを証明するために嫌気条件下でのプルダウンアッセイによる相互作用解析を行い、BphA4 の BphA3 に対する親和性が、BphA4 の還元により上昇することを示した(図6)。

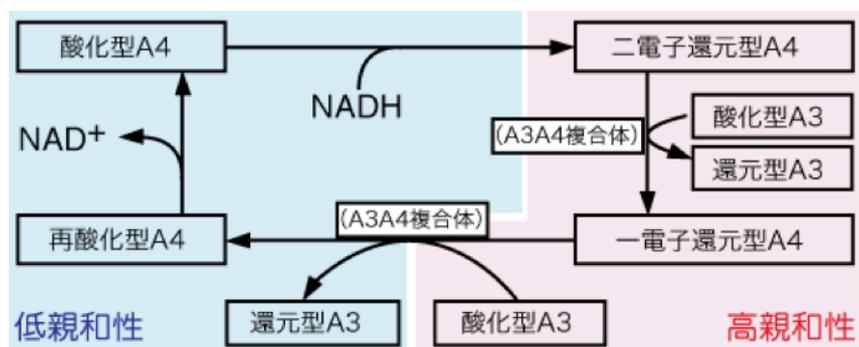


図 6. BphA4 と BphA3 の反応サイクルモデル

次に、BphA3 と BphA4 の間に存在する親和性調節機構を立体構造に基づき明らかにするために、BphA3-BphA4 複合体の立体構造(図7)に加え、BphA4 については 4 種類(酸化型、二電子還元型、一電子還元型、再酸化型)、BphA3 については 2 種類(酸化型、還元型)の反応中間体の結晶構造を、嫌気条件下での結晶化技術を用いることで決定した。これらは BphA3-BphA4 の電子伝達反応サイクルに存在するほぼ全ての反応中間体に相当する。

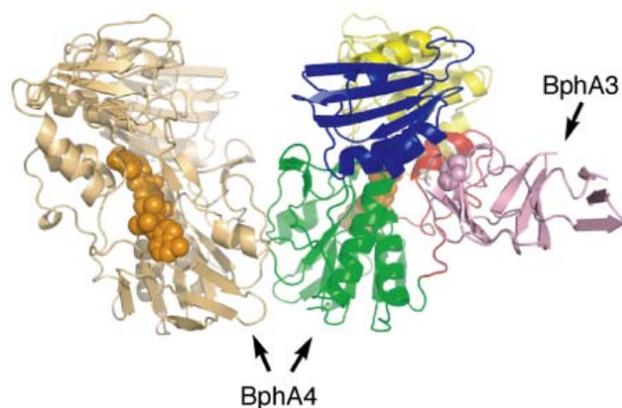


図 7. BphA3-BphA4 複合体の立体構造

BphA3-BphA4 複合体の X 線結晶構造解析の結果から、BphA4 の BphA3 結合部位は、FAD 結合ドメインと C 末端ドメインから構成されることが明らかになった。また、BphA3-BphA4 複合体、BphA4 の二電子還元型、一電子還元型の構造から BphA4 が還元されることにより NADH 結合ドメイン/C 末端ドメインが FAD 結合ドメインに対して回転すること、その回転に伴って生じる FAD 結合ドメインと C 末端ドメインの相対位置が変化することで BphA3 結合部位の構造が変わり BphA3 との親和性が高くなることが示された(図8)。

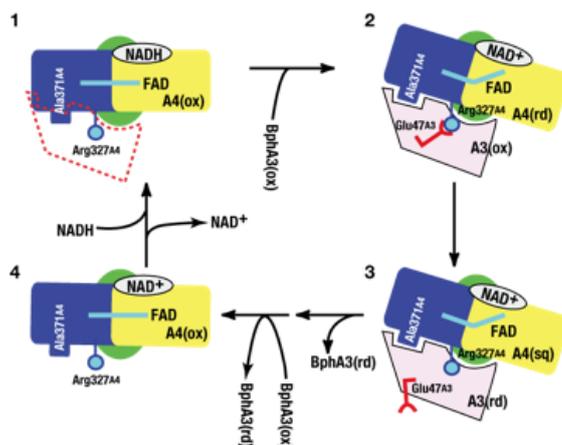


図 8. BphA4 の BphA3 に対する親和性調節の模式図

今回の解析により、電子伝達タンパク質の構造が各タンパク質の状態の変化とともに変化し、それにより分子間相互作用が調節される様子を原子レベルの立体構造に基づき世界に先がけて明らかにすることができた。この結果は、*J. Mol. Biol.*誌に発表された (Senda, M. *et al.* JMB, **373**, 382–400)。

また本研究に関連して、フラビン蛋白質の酸化還元状態の変化に伴うフラビン周辺の微細な立体構造変化が、どのように蛋白質構造に影響を与え、蛋白質間シグナリングに影響するかを調べ上げ、*Antioxidants & Redox Signaling* 誌へ発表した (Senda T. *et al.* ARS, **11**, 1741–1766)。

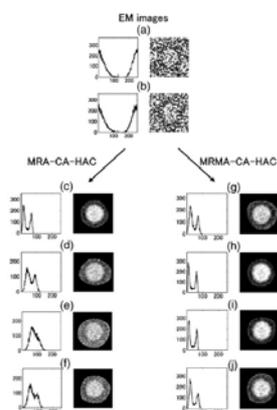
#### (4) 2次元結晶化できた試料の構造解析を可能にする電子結晶学用プログラム開発、単粒子解析プログラム開発

〔産業技術総合研究所脳神経情報研究部門〕

##### 【研究成果】

単粒子解析法は、個々の蛋白質を電子顕微鏡で撮影して、それらの画像を重ね合わせてS/N比を向上させ、そこで得られた2次元平均画像群から3次元密度を計算してゆく方法である。そのため2次元平均画像の質(位置の精度と枚数)が、3次元再構成後の解像度に大きく影響する。その2次元平均画像生成過程においては、用いる個々の電子顕微鏡画像データのSN比が非常に小さく、位置あわせのための計算負荷が大きい。そのため、現在広く使われている方法やソフトウェアでは最適な位置あわせを行うのは困難な状況である。その結果、生成される2次元平均画像の分解能は低中程度に留まり、それらを用いた3次元解像度向上には限界があった。

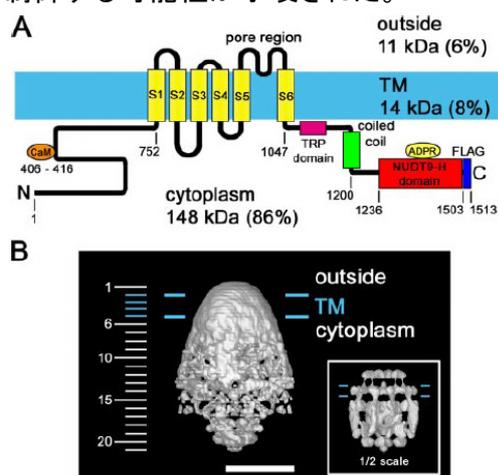
我々はこれらの限界を突破するために、多参照位置あわせ法と画像分類法を統計的に組み合わせた方法(multi-reference multiple alignment法: MRMA法)を開発した。この方法は、多参照位置あわせから得られる相同ピークを統計処理し最尤ピーク群を抽出した後、その各群に属する位置あわせ画像を用いて平均画像生成を行う。このことにより、ノイズの影響などで偶発的に誤った位置あわせが起こる確率を減少させる事ができる。また、高効率な分散並列処理による高速化と組み合わせる事により、高い耐ノイズ性を持った画像解析が、従来と同程度の計算資源で可能になる。MRMA法の有効性の検証には、さまざまなSN比を持ったモデル画像群、さらにはTRPC3とナトリウムチャンネルの電子顕微鏡画像を用い、その精度および処理速度を評価した。その結果、MRMA法は全ての評価データにおいて、耐ノイズ性・処理速度・生成される2次元平均画像精度の全ての点で既存の方法に比べ明らかな優位性を示した。よって多参照位置あわせ法と画像分類法を統計的に組み合わせたMRMA法は、単粒子解析における解像度向上に大きく寄与する。本新開発法とこれまでに小椋らと共に開発してきたSimulated annealing法やNeural Network法を用いて、以下のような生理的に重要な膜タンパク質の構造が判明した。



*J. Electron Microscopy.* **56**, 83–92 (2007)

TRP(transient receptor potential) チャンネルはごく近年発見されたイオンチャンネルである。しかしながら我々の体で極めて重要な役割を担うセンサーであることが判明してきた。細胞膜に存

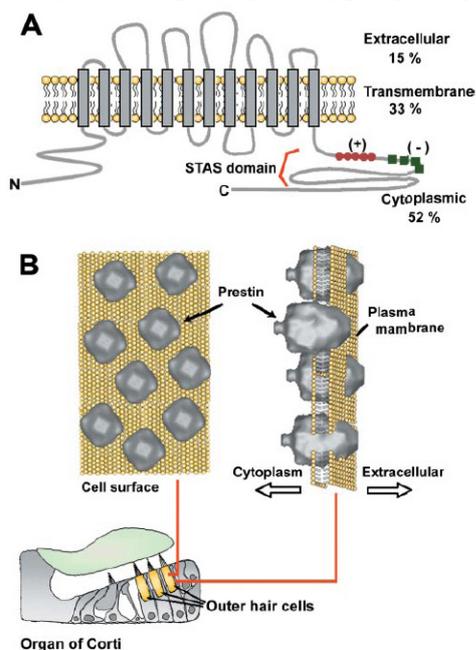
在し、情報伝達物質と結合することにより開く陽イオンチャンネルであり、細胞内部へと情報を伝達する。この TRP ファミリーに属するタンパク質は我々の体内でも30種類に及び、温度感受や酸化ストレス、浸透圧、味覚等々、様々な刺激に対するセンサー的な役割を担っている。これら TRP チャンネルの中で、TRPM2 は活性酸素種を感受するチャンネルである。TRPM2 は ADPRase 酵素活性ドメイン(NUDT9-H ドメイン)を分子内に有し、このドメインへのリガンド結合によってチャンネルの開閉が制御される、極めてユニークなタンパク質である。生体物質の酸化は、癌化や糖尿病等における最も重要な病因と考えられており、酸化の感知機構の解明は病理学的に極めて重要である。TRPM2 は同時に温度感受性も有する。しかし、これらの重要な役割にも関わらず、本チャンネルは構造がわからなかった。その一番大きな理由は精製の難しさである。温度をその柔らかな構造の振動により感知するため、壊れやすいと推測される。我々はこの TRPM2 タンパク質の精製法の開発に成功した。その鍵は、抗体カラムによる Affinity 精製にあった。精製されたタンパク質を用いて負染色電子顕微鏡画像を用いた単粒子解析法よりその三次元構造を解析した。TRPM2 分子全体はベル形構造をしており、大きく膨れた細胞内ドメインが特徴的であった。この膨らんだ構造は、TRPC3 チャンネルでも保存されているので、多種類の刺激のセンサーとして働く TRP チャンネル全体に共通なのかもしれない。また TRPM2 チャンネルの制御部位である NUDT9-H ドメインは、膜貫通領域のイオンゲートとは離れていた。そのため大掛りな立体構造の変化が開閉を制御する可能性が示唆された。



*J. Biol. Chem.* **282**(51), 36961–36970 (2007)

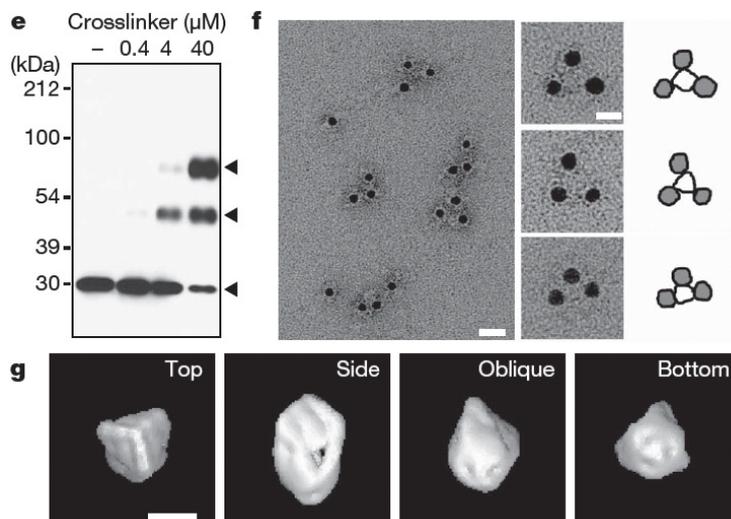
また我々哺乳類の耳は極めて優秀な音の増幅機構を有し、かすかな音をタンパク質分子の機構によって強力に増幅する。それは、内耳蝸牛に存在する外有毛細胞 (outer hair cells: OHC) が細胞膜電位の変化に応じてその細胞長を変化させ、基底膜の振動増幅を通じて音シグナルをおよそ 100 倍に増強させる機構である。その振動速度はマイクロセカンドレベル( $\approx 20$ kHz)であり、これまで知られているモータータンパクの中でも最も早い動きである。その分子実体は長い間不明であったが、2000 年に Zheng らが電圧変化に不感応な内有毛細胞 (IHC) との遺伝子差し引き法によりプレスティンが同定された (Zheng, J. et al., 2000, *Nature*)。これは陰イオントランスポーター SLC26 ファミリーに属する、12 回膜貫通型の膜タンパク質であった。これらのタンパク質が外有毛細胞の側壁にあたる細胞膜にびっしりと並び、分子直径を周期的に変化させることで高周波振動を実現しているのである。実際、本遺伝子の変異による難聴患者や、ノックアウトマウスにおけ

る聴覚障害が確認されている。本研究ではFLAGタグをつけたプレスチンを Sf9 細胞に発現させ、そこから精製したタンパク質を用いて負染色電子顕微鏡観察と単粒子構造解析を行った。約 2nm の分解能で示された立体構造から、プレスチンは  $77 \times 77 \times 115 \text{ \AA}$  の大きさを持つ弾丸型の構造であることが分かった。また電圧変化に応じて Cl<sup>-</sup> イオンが行き来すると思われる空隙を分子内部に確認することができた。本研究を聴覚の分子レベルでの理解に役立てたい。またアスピリンを我々の体内に頻繁に服用すると、難聴になる。ターゲットはプレスチンであることが知られており、その機構もこれらの研究から解明していきたい。



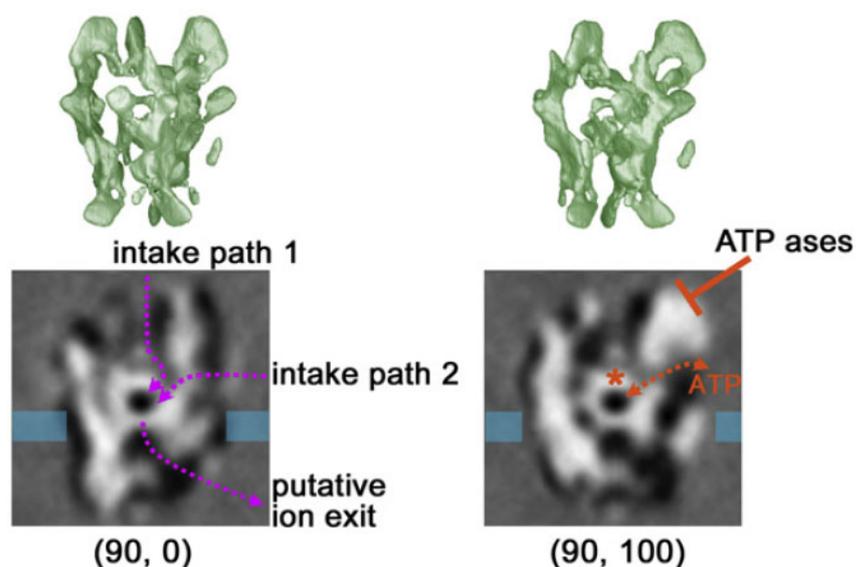
*J. Biol. Chem.* **283**(2), 1137-1145 (2007)

細胞内膜からイオンチャンネルを通して  $\text{Ca}^{2+}$  が放出されると小胞内はマイナスに電化を帯びるはずである。これが続くと  $\text{Ca}^{2+}$  放出は抑制されるはずで、それを助けるために反対向きにイオンを流して中和するチャンネルが必要である。この役割を果たすチャンネルは長年謎であった。それは  $\text{K}^+$  を通す TRICK channel であり、京大の竹島教授と共同でこのサイズわずか 90 kDa の小さいチャンネルの構造解明に成功した。本システム開発によって、この様なサイズの膜蛋白質の単粒子解析も可能になった。

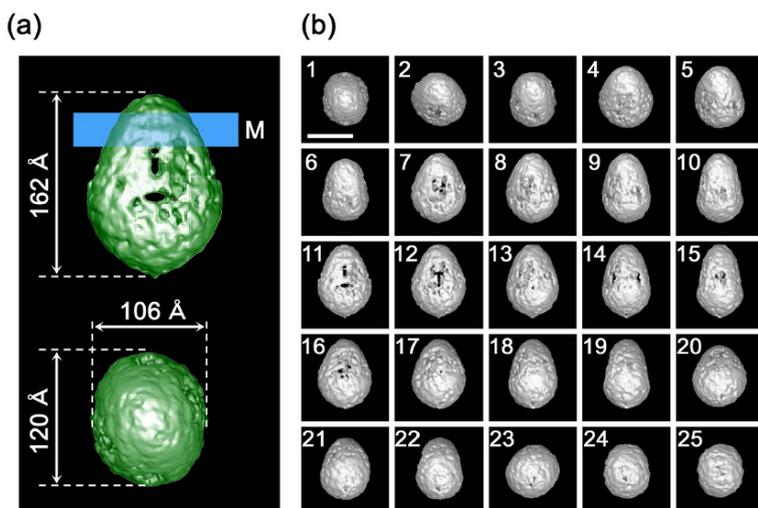


*Nature* **448**, 78-82 (2007)

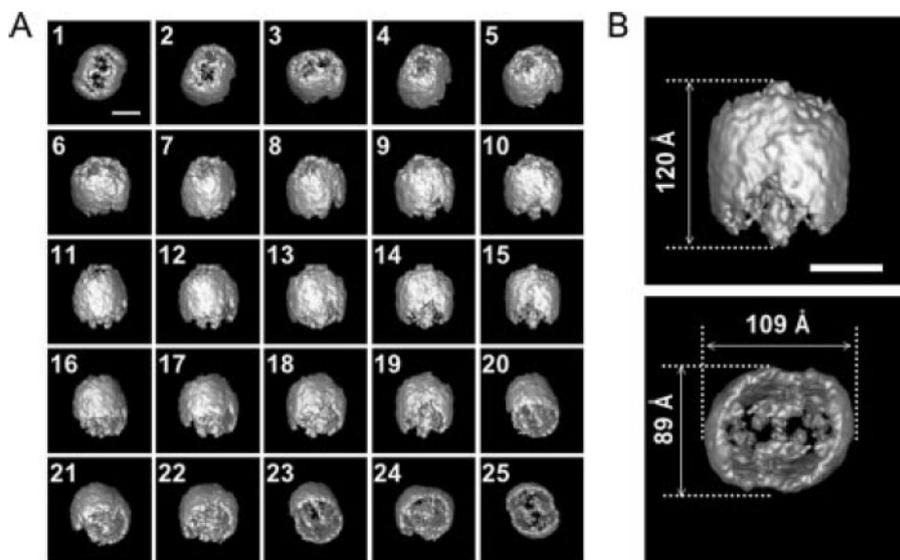
ATP の役割は、唯のエネルギー源ではない。細胞外に放出されたATPは、皮膚から中枢神経系まで広く存在するP2XおよびP2Y型ATP受容体を介して、痛覚等に関する細胞間情報伝達物質としても働く。我々は以前、負染色電顕画像を用いてP2X<sub>2</sub>受容体の2次元平均化による可視化に成功し、全体として花瓶の様な形であること、また上部平均画像の三回対称性から3量体構造であることを直接的に証明した(2005 BBRC)。本研究では約9万枚のクライオ電子顕微鏡粒子画像と単粒子解析法を用いて、ATP非存在下でのP2X<sub>2</sub>の3次元構造を再構築した。その結果、P2X<sub>2</sub>受容体は細胞膜を挟んだ上下に隙間の多い緩やかなサブユニット構造を持ち、イオンやATP分子の取り込み、排出等に役立つことが想定された。さらに本構造はATP刺激の強度に応じてイオン透過性が変化する、P2X<sub>2</sub>受容体の特異なチャネル特性を反映しているもの思われた。また細胞膜を貫通するポアと推定される部分には部分的狭窄が認められ、電気生理学的研究から推定される構造と一致した。軽い接触が激しい痛覚として感じられる異痛症(アロデニア)や、通常の暖かさを暑さと感じてしまう遺伝病等の解明へも役立つことが期待される。



嚢胞性線維症(CF: cystic fibrosis)は体中のあらゆる組織で粘膜分泌障害が引き起こされる重篤な遺伝病であり、特に白人幼児1000-3000人強に一人の割合で発症し、白人幼児死亡原因の第一位を占める。これはABCトランスポーターに属するクロライドチャネル、CFTR(cystic fibrosis transmembrane regulator)の遺伝子変化に基づく機能失調で発症する。我々は正常ヒトCFTRタンパク質をHEK293細胞に発現させ、界面活性剤で可溶化した後、抗体カラム・WGAカラム・ゲルろ過カラムを用いて精製した。負染色電子顕微鏡画像を用いて単粒子構造解析を行い、その3次元構造を明らかにした。その結果CFTRは120 × 106 × 162 Åの楕円形の構造を持ち、細胞膜直下に分子内外をつなぐ開口部を持つことが示された。本研究で明らかにされたCFTRの3次元詳細構造は、CFの疾病原因解明のみならず、正常な組織におけるCFTRの機能解明にも役立つことが期待される。



癌細胞が転移するときには、細胞間の結合組織であるファイブロネクチンなどの細胞外基質たんぱく質を切断しながら進んでゆく。RECK (Reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs)は細胞膜結合型のプロテアーゼインヒビターで、特にMMP(matrix protease)ファミリーの阻害を通じて哺乳類の形態形成や癌化等を制御する。実際、RECK欠損マウスでは胎生致死を引き起こし、また多くの癌でRECKタンパク質の量が低下していること、その発現量が癌の悪性度と相関が高いこと等が知られている。本研究ではMMP2とMMP7で切断を受けることによりRECKの活性化が起こり、細胞機能制御に重要な働きを持つファイブロネクチンのMMP7による分解を抑制することを示した。さらに遺伝子導入細胞を用いてRECKタンパク質の発現・精製を行い、負染色電顕画像からの3次元再構成により大きな空隙と突起状構造を持つカウベル型構造が示された。その開いた領域でプロテアーゼと結合し、機能制御することで癌の転移等を抑える機構が推定された。



## (5) ATP感受性カリウムチャンネル制御機構解明に向けた基盤技術開発

[京都大学大学院農学研究科]

### 【研究成果】

#### 概要

ATP感受性カリウムチャンネル( $K_{ATP}$ チャンネル)はスルフォニル尿素剤受容体(SUR)とチャンネルサブユニット(Kir6.2)が4分子ずつ会合した細胞膜上のカリウムチャンネルであり、様々な組織で代謝レベルのセンサーとして機能している。このため $K_{ATP}$ チャンネルは糖尿病や虚血性心疾患等に関与することから重要な創薬ターゲットとなっている。本研究は電子線単粒子解析による $K_{ATP}$ チャンネルの立体構造決定を最終目的とするものであり、平成19,20年度は $K_{ATP}$ チャンネル複合体の発現の手法構築と精製の技術開発を行なった。また、得られた標品による単粒子解析を開始した。本研究で開発したヒトの培養細胞による大量発現技術は複合体形成など、高次の品質管理機構を必要とする哺乳類の膜タンパク質の発現に有効である。また精製手法の開発では膜タンパク質複合体の物性評価手法を開発することで迅速な精製条件の決定に成功した。本評価手法は膜タンパク質複合体の精製に用いる界面活性剤の選定に特に有効であり、短時間での実施が可能であることから、今後スクリーニング手法としての応用が期待できる。

#### 研究開発項目

##### ・ヒト培養細胞を用いた $K_{ATP}$ チャンネル複合体の発現系における技術開発

$K_{ATP}$ チャンネル複合体は高度な翻訳後修飾及び品質管理機構を必要とするため動物細胞を用いた発現系の構築が必須である。しかし、現在までのところ有効な発現システムは構築されていない。本研究ではまず浮遊培養が可能なヒト培養細胞であるHEK293FS細胞を用いて大量発現系の開発を行った。またバイオリアクターによる発現系の大規模化を行った(図1)。

動物細胞を用いてタンパク質の一過性発現を行う場合、遺伝子導入に必要な試薬が高価であることが、汎用性を限られたものになっている。本研究で行った遺伝子導入化合物探索の結果、polyethyleneimine(PEI)によって市販薬と同等の遺伝子導入効率を得られることが明らかとなった。また、発現させた $K_{ATP}$ チャンネルの細胞内局在、糖鎖修飾、複合体形成状況の解析から、PEIによって遺伝子導入した細胞においても高度な品質管理機構が維持されていることが確認できた。また遺伝子導入にかかる費用は市販薬に対して千分の一程度ときわめて廉価であり、高い汎用性が期待できる。本発現系によって既にABCA1等重要な生理機能を持つ膜タンパク質の精製に成功しており、順次解析を進めていく予定である。

・ $K_{ATP}$ チャンネル複合体精製の条件のスクリーニングの技術開発。

$K_{ATP}$ チャンネル複合体の精製ではサブユニットの解離させずに脂質二重膜から抽出する界面活



図1 バイオリアクターを用いたヒト培養細胞による大量発現系異なる機構のバイオリアクター2種を用い、発現系を構築した。左:WAVEバイオリアクター 右:セルマスター

性剤の選定が必要である。本研究ではまずサイズ排除クロマトグラフィーとGFP融合タンパク質を用いて $K_{ATP}$ チャネル複合体の可溶化状態やサブユニットの会合状態を分析可能な検出系を構築した。これにより、未精製の状態で8量体の形成状態の把握が可能となり、界面活性剤など広範囲のスクリーニングが可能となった。その結果、安定に8量体を抽出する界面活性剤として $C_{12}E_8$ が最も適していることが明らかとなった。本手法は膜タンパク質複合体のサブユニットの会合状態や単分散性等の物性を未精製の段階でかつ短期間に決定可能であることから他の膜タンパク質複合体についても幅広い応用が期待できる。

#### ・単粒子解析ターゲットの選定

$K_{ATP}$ チャネルにはインスリンの分泌に関与する膵・細胞型(SUR1-Kir6.2複合体)と虚血性心疾患に関与する心筋細胞型(SUR2A-Kir6.2複合体)が存在し、共に重要な創薬ターゲットとなっている。本研究では上記スクリーニング手法を用いていずれのチャネルが単粒子解析に適しているかの検討を行なった。その結果、心筋型のチャネルは膵・細胞型に比べて界面活性剤溶液中で著しく不安定であり、単粒子解析による構造決定は困難であることが明らかとなった。以上の結果により、本研究では膵・細胞型のチャネルを用いて単粒子解析実験を行うこととした。

#### ・ $K_{ATP}$ チャネル複合体の精製手法の確立

界面活性剤のスクリーニングでヒットした $C_{12}E_8$ によって複合体を可溶化し、精製を行った。精製標品は8量体構造を保持していたが純度は80%程度と低いものであった。さらにスクリーニング時に得られた知見を精製手法にフィードバックさせ、手法の最適化を行った結果、精製に必要な時間を大幅に短縮によって精製タンパク質の安定化を達成すると共に精製純度を90%程度に上昇させた(図2)。また精製タンパク質のATP結合能を評価する手法を確立し、解析に用いている精製標品が活性化3次元構造を保持していることを確認した(図3)。

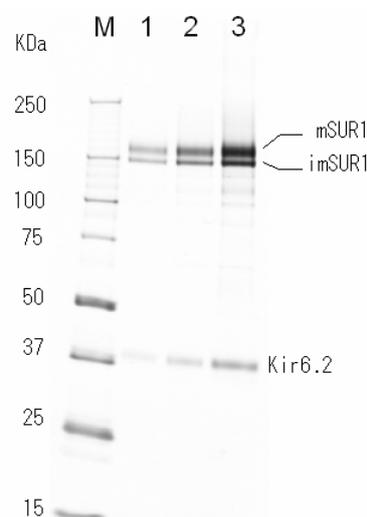


図2  $K_{ATP}$ チャネル複合体の精製  $K_{ATP}$ チャネル複合体を精製後、銀染色により純度検定を行った。レーン1から3にはそれぞれ0.1 $\mu$ g, 0.2 $\mu$ g, 0.5 $\mu$ gの標品を泳動した。mSUR1:糖鎖付加型SUR1, imSUR1:非糖鎖付加型SUR1

#### ・単粒子解析実験の実施

上記手法により得られた精製標品を用いて極低温電子顕微鏡によりタンパク質像の観察を行なった。現在25 Å分解能程度での初期構造モデルを得ている(図4)。現時点では分解能の向上が困難であることから、化学的な架橋や糖鎖修飾の制御などにより、解析対象の質的向上を検討中である。

#### ・ヒト薬物排出トランスポーター(MDR1)の機能解析

本研究に先行する研究として行なっていたヒトMDR1の精製・機能解析研究によりヒトMDR1の活性がコレステロールによって制御されていることを突き止めた。これまでに我々が明らかにしたヒトABCタンパク質の結果との比較からヒトのABCタンパク質はコレステロールを共通して認識す

ることが示唆された。またリンカー領域の機能を明らかにした。

・HDL 形成に関与するヒト ABCA1 の機能解析

ヒト ABCA1 の細胞学的、生化学的解析により ABCA1 には細胞外ドメインに 2 つの重要な S-S 結合を有しており、これらが機能に必須であることを突き止めた。また ABCA1 は ApoA-1 以外に胆汁酸にもコレステロールを排出できることを明らかにした。これらの知見はヒト HDL の形成機構解明や高脂血症の治療薬開発において重要な知見となる。

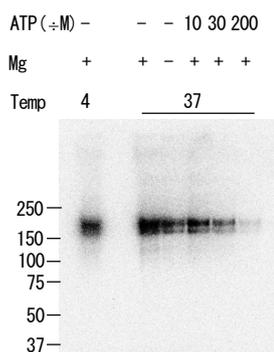


図3 精製チャネル複合体の活性評価 精製標品を10μMの8-azido- $\gamma$ -<sup>32</sup>PATPで標識した。ATP結合はMgイオンに依存せず、非標識性のATPの濃度依存的に減少した。このことから精製チャネル複合体は活性な3次元構造を保持していることが明らかとなった。

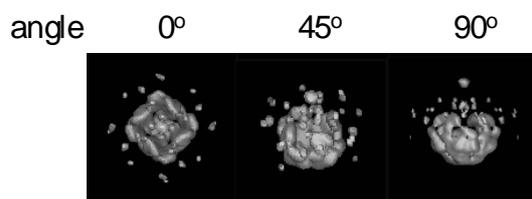


図4. 極低温顕微鏡による単粒子解析実験 現在1万個程度の像から25 Å程度の分解能で構造が得られている

## (6) 電子線トモグラフィー技術を補完するためのソフトウェア開発

上記ソフトウェア開発を含めJBIC京都分室藤吉チームと共同研究を密接にして研究推進を行う。

[理化学研究所播磨研究所]

### 【研究成果】

#### 1. 電子線トモグラフィー関連ソフトウェアの開発と実際の適用

JBIC京都分室藤吉チームが取得した電気シナプス結合部位を含むマーカーなしのクライオ・シングル傾斜トモグラフィーデータおよびマーカーなしの負染色ダブル傾斜トモグラフィーデータを依頼に応じて理研播磨研究所において順次処理し、解析結果をフィードバックした。マーカーなしのトモグラフィーデータの解析にはフロリダ州立大学で開発されたPROTOMOパッケージ (<http://www.electrontomography.org/>) を使用し、ダブル傾斜データのマージにはコロラド州立大学で開発されたIMODパッケージ (<http://bio3d.colorado.edu/imod/>) を使用した。マーカー情報が存在しない2つのトモグラムをアライメントするために、各々の投影像からおおまかなアライメントを得、最終的に3次元のアライメントを行うための独自のスクリプトを開発し使用した。

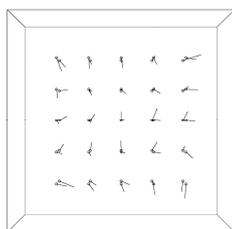


図1. ダブル傾斜データの3次元アライメント用変位図例

2つのトモグラムをいくつかのセグメントに分割しそれぞれのセグメントを3次元アライメントした時の位置のずれをベクトルで表示した図(変位を100倍に誇張)。この情報から2つのトモグラムをマージした。IMOD使用。

#### 2. 電子線による電荷観察のシミュレーション

電子線で見えてくる構造はX線と異なり電荷の影響を大きく受けると言われている(Kimura Y. et al., *Nature* 1997, Mitsuoka et al., *JMB* 1999)。これは電子線の散乱因子が電荷により特に低角領域(20 Å以上)において大きく変化することによる。電子線による高分解能の構造解析が進めば例えば残基の電荷状態を確認できることになる。電子線における電荷の影響をシミュレーションし、論文(Hirai et al., *J. Electron Microsc.*, 2007)として発表した。

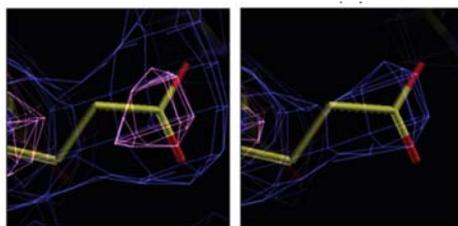


図2. 電荷の有無と残基の見え方

グルタミン酸残基の密度図のシミュレーション結果。左は中性、右は負に(2つの酸素原子に均等に)荷電していると仮定。計算には50 から3 Åのデータを使用。