

Figure 4. Gel electrophoresis of multiplex-PCR products. The first amplification products for 14 species DNA were subjected to multiplex PCR using the mixture of seven species-specific primer pairs as follows. Multiplex group 1: the primer mixture for human,

mouse, rat, rabbit, cat, cow, and pig. Multiplex group 2: the primer mixture for cynomolgus monkey, African green monkey, Syrian hamster, Chinese hamster, guinea pig, dog, and chicken. The cell lines used for each animal are the same as described in Fig. 2.

to the African green monkey-specific product. This may be caused by some degree of sequence similarity between African green monkey and cynomolgus monkey in the target mitochondrial DNA. Indeed, when the mixture of primer pairs for African green monkey and cynomolgus monkey were applied to the second PCR, the nonspecific amplified product from cynomolgus monkey DNA disappeared, possibly because of competition of primer annealing to the target DNA sequences (data not shown; see also the result in the multiplex PCR section). Thus, it was confirmed that the nested PCR strategy is very useful for the identification of 14 species of DNA.

Multiplex PCR assay. For the simple and rapid identification of 14 species of animals, multiplex PCR was examined using primer mixtures in the second PCR. As a result of testing many combinations, it was favorable that the 14 kinds of species-specific primer pairs were divided into two groups as follows: Group 1 contained primer pairs for human, mouse, rat, rabbit, cat, cow, and pig, and Group 2 contained primers for cynomolgus monkey, African green

monkey, Syrian hamster, Chinese hamster, guinea pig, dog, and chicken. Figure 4 shows the result of multiplex PCR. These animal species, divided into the two groups, could be clearly detected as species-specific bands. Most of the amplification products were specific for each primer mixture, but nonspecific bands were slightly observed for cynomolgus monkey and African green monkey when multiplex group 1 was used. These nonspecific bands were readily distinguished from the specific ones according to their sizes. Thus, it was found that multiplex PCR assay is applicable to simultaneous identification of 14 species of animals by dividing into two groups. The method developed here is superior to the previous PCR methods (Naito et al. 1992; Hershfield et al. 1994; Parodi et al. 2002; Liu et al. 2003; Steube et al. 2003) in identifying many kinds of species generally used for life science studies. In particular, this method has a great advantage in distinguishing Chinese hamster from Syrian hamster, as the cell lines such as CHO and BHK derived from these two kinds of hamsters are very popular for cell cultures.

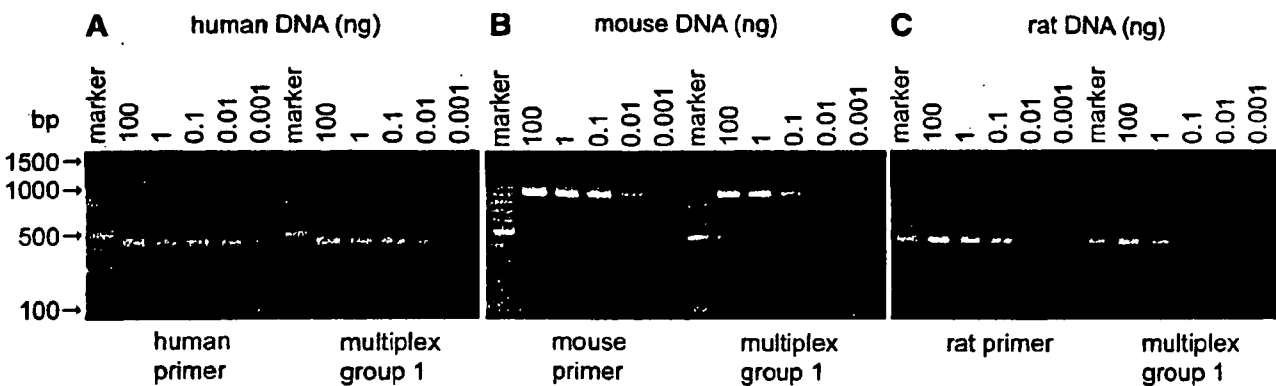


Figure 5. Gel electrophoresis of nested-PCR products for serially diluted DNA. The sample DNA was extracted from the human A549 cell line (A), mouse WEHI-3b cell line (B), and rat Py-3Y1-S2 cell line (C), and diluted serially to the nested PCR. The product bands

amplified by single species-specific primer pairs are shown on the left side and those by multiplex group 1 are on the right in each photograph.

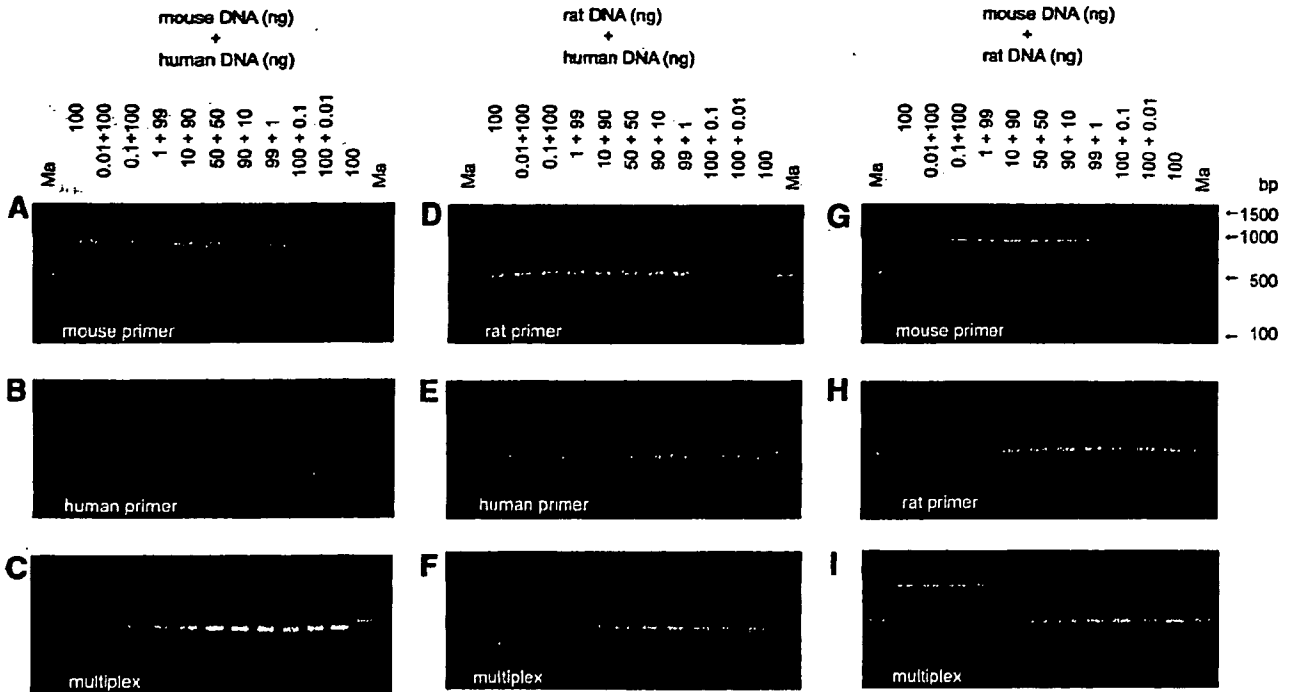


Figure 6. Gel electrophoresis of nested-PCR products for interspecies DNA mixtures. Two kinds of DNA, such as human and mouse DNA (A, B, C), human and rat DNA (D, E, F), and mouse and rat DNA (G, H, I) were mixed in various ratios for amplification with nested PCR.

The cell lines used were the same as in Fig. 5. In the second PCR, the single species-specific primer pairs (A, B, D, E, G, H) or the multiplex group 1 (C, F, I) were used.

Sensitivity of PCR assay. Serially diluted cellular DNA was amplified with the nested PCR using either the corresponding species-specific primer pair or the mixture of seven species-specific primer pairs (multiplex PCR described above) as the second PCR primer. Each of the 14 species of DNA was detectable from at least 100 pg

DNA/reaction by both PCR assays. Figure 5 shows the sensitivity of the PCR assay, as an example, using DNA prepared from human, mouse, and rat cell lines, which are commonly used for cell culture experiments. The amount of DNA required for identification of each species was 10 pg/reaction or more for the single species-specific primer pair as the second primer, and 100 pg/reaction or more for the multiplex assay. The sensitivity of the multiplex assay was somewhat low compared to the species-specific single primer.

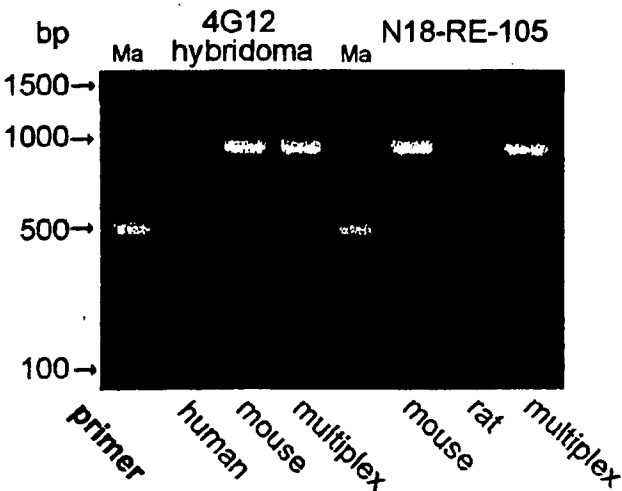


Figure 7. Gel electrophoresis of nested-PCR products for DNA derived from interspecies hybrid cell lines. DNA from 4G12 hybridoma (human × mouse) and N18-RE-105 (mouse × rat) were applied to nested PCR. Multiplex group 1 or the corresponding species-specific primer pairs were used in the second PCR.

Identification of species from interspecies DNA mixtures. The possibility of cross-contamination or replacement of cells exists during the process of cell preparation. As part of the quality control of cell lines in the cell bank, it is very important to verify the source species of each derived cell line. For that purpose, we attempted to identify the species from interspecies DNA mixtures. Two species of DNA, among human, mouse and rat, were mixed in various ratios for the nested PCR. When the single species-specific primer pair was used in the second PCR, each species of DNA was sensitively detected even when two kinds of DNA were present in the mixture. For example, when mouse-specific primers were used, a mouse-specific band was detected in the DNA mixture composed of 100 ng human or rat DNA + 10 pg mouse DNA (Fig. 6A, G). Likewise, in the case of human-specific or rat-specific primers alone, their respective species-specific band was also detected at 10 pg DNA

(Fig. 6B, E, D, H). When group 1 of the multiplex primers (seven species-specific primer pairs composed of human, mouse, rat, rabbit, cat, cow, and pig) was used at the standard concentration (10 pmol each species-specific primer/50- μ l reaction), the sensitivity apparently decreased and there was considerable difference in the sensitivity for human, mouse, and rat DNA (Fig. 6C, F, I). This may be caused by the different amplification efficiency of each species-specific primer in the simultaneous reaction. Indeed, by decreasing the ratio of human primer pairs relative to the others, the sensitivity for mouse and rat DNA clearly increased (data not shown). Thus, this method will likely become a very useful tool for quickly detecting cross-contamination, and the sensitivity in the multiplex assay will be further increased by optimizing the concentration and the ratio of species-specific primers.

Hybrid cell lines. We applied this PCR method to original-species verification of interspecies hybrid cell lines. The hybrid cell lines of 4G12 (human B lymphocytes \times mouse myeloma cell line; Saito et al. 1988) and N18-RE-105 (mouse glioma cell line \times rat neural retina cells; Malouf et al. 1984) were tested by isoenzyme analysis and nested PCR. Although the original species were confirmed by isoenzyme analysis of both hybridomas between human and mouse, and between mouse and rat, only the mouse-specific band was observed for both hybridomas by nested PCR (Fig. 7). This result is consistent with the previous reports that the mouse mitochondria dominate selectively in these hybrid cells, whereas human or rat mitochondria are ultimately excluded from the hybrid cells (Attardi and Attardi 1972; Yamaoka et al. 2001). The nested PCR method targeted to the mitochondria genome was not applicable to the parental species identification of interspecies hybrid cells.

References

- Attardi, B., Attardi, G. Fate of mitochondrial DNA in human-mouse somatic cell hybrids. *Proc Nat Acad Sci USA*. 129-133; 1972.
- Doyle, A., Morris, C., Mowles, J. M. Quality control. In: Doyle, A, Hay, R., Kirsop, B. E. eds. *Living resources for biotechnology. Animal cells*. Chapter 5. Cambridge: Cambridge University Press; 1990: 81-100.
- Hershfield, B., Chader, G., Aguirre, G. A polymerase chain reaction-based method for the identification of DNA samples from common vertebrate species. *Electrophoresis*. 15: 880-884; 1994.
- Liu, M. Y., Lin, S., Liu H., Candal, F., Vafai A. Identification and authentication of animal cell culture by polymerase chain reaction amplification and DNA sequencing. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 39: 424-427; 2003.
- Malouf, A. T., Schnaar, R. L., Coyle, J. T. Characterization of a glutamic acid neurotransmitter binding site on neuroblastoma hybrid cells. *J Biol Chem*. 259: 12756-12762; 1984.
- Masters, J. R., Thomson, J. A., Daly-Burns, B., Reid, Y. A., Dirks, W. G., Packer, P., Toji, L. H., Ohno, T., Tanabe, H., Arlett, C. F., Kelland, L. R., Harrison, M., Virmani, A., Ward, T. H., Ayres, K. L., Debenham, P. G. Short tandem repeat profiling provides an international reference standard for human cell lines. *Proc Nat Acad Sci USA*. 98: 8012-8017; 2001.
- Montes de Oca, F., Macy, M. L., Shannon, J. E. Isoenzyme characterization of animal cell culture. *Proc Soc Exp Biol Med*. 132: 462-469; 1969.
- Naito, E., Dewa, K., Yamanouchi, H., Kominami, R. Ribosomal ribonucleic acid (rRNA) gene typing for species identification. *J Forensic Sci*. 37: 396-403; 1992.
- Nelson-Rees, W. A., Daniels, D. W., Flandermeyer, R. R. Cross-contamination of cells in culture. *Science*. 212: 446-452; 1981.
- Nims, R. W. Shoemaker, A. P., Bauernschub, M. A., Rec L. J., Harbell, J. W. Sensitivity of isoenzyme analysis for the detection of interspecies cell line cross-contamination. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 34: 35-39; 1998.
- Parodi, B., Aresu, O., Bini, D., Lorenzini, R., Schena, F., Visconti, P., Cesaro, M., Ferrera, D., Andreotti, V., Ruzzon, T. Species identification and confirmation of human and animal cell lines: a PCR-based method. *BioTechniques*. 32: 432-440; 2002.
- Saito, H., Uchiyama, K., Nakamura, I., Hiraoka, H., Yamaguchi, Y., Taniguchi, M. Characterization of a human monoclonal antibody with broad reactivity to malignant tumor cells. *J Natl Cancer Inst*. 80: 728-734; 1988.
- Steube, K. G., Grunicke, D., Drexler, H. G. Isoenzyme analysis as a rapid method for the examination of the species identity of cell cultures. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 31: 115-119; 1995.
- Steube, K. G., Meyer, C., Uphoff, C. C., Drexler, H. G. A simple method using β -globin polymerase chain reaction for the species identification of animal cell lines—a progress report. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 39: 468-475; 2003.
- Stulberg, C. S. Extrinsic cell contamination of tissue culture. In: Fogh, J. ed. *Contamination in tissue culture*. New York: Academic Press; 1973:2-23.
- Tanabe, H., Takada, Y., Minegishi, D., Kurematsu, M., Masui, T., Mizusawa, H. Cell line individualization by STR multiplex system in the cell bank found cross-contamination between ECV304 and EJ-1/T24. *Tissue Culture Research Communications*. 18: 329-338; 1999.
- Yamaoka, M., Mikami, T., Ono, T., Nakada, K., Hayashi, J. Mice with only rat mtDNA are required as models of mitochondrial diseases. *Biochem Biophys Res Commun*. 282: 707-711; 2001.

JCRB 細胞バンク事業の概要

小原有弘* 水澤 博*

Point

- ①厚生労働省によって設立された JCRB 細胞バンクは生命科学研究の研究支援として高品質な細胞を研究者に提供している。
- ②研究に使用している細胞のマイコプラズマ汚染の現状は深刻で、研究への悪影響を知らずに研究利用している研究者が多い。
- ③STR-PCR 法による細胞個体識別はクロスカルチャーコンタミネーションの発見に非常に有用である。
- ④クロスカルチャーコンタミネーションの問題は生命科学研究の根底を揺るがしかねない大きな問題である。
- ⑤ウイルス汚染検査の確立、ES 細胞・体性幹細胞の供給、細胞特性解析など JCRB 細胞バンクの今後の役割は大きい。

Key Words / JCRB 細胞バンク, マイコプラズマ汚染, 細胞個体識別, STR-PCR 法, クロスカルチャーコンタミネーション

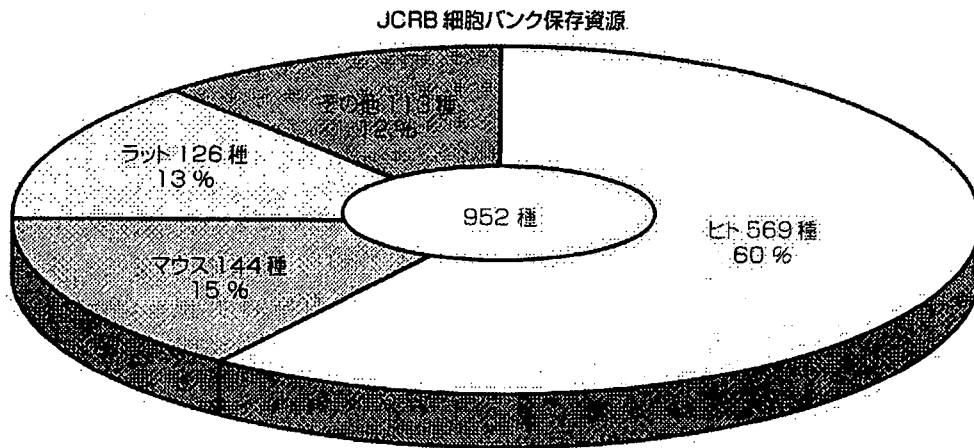
● はじめに

1985年、わが国最初の細胞バンクとして厚生労働省(当時厚生省)によって JCRB 細胞バンク (<http://cellbank.nibio.go.jp/>) が誕生した。当時すでに、ヒトに由来する培養細胞は生命科学研究に欠かせない研究材料となっており、対がん10ヵ年総合戦略(1984年～1993年)における、研究の基盤整備の一環として、日本がん研究資源バンク(Japanese Cancer Research Resources Bank: JCRB)の整備が進められた。そのなかで『培養細胞研究資源』に関するものとして、国立医薬品食品衛生研究所(当時国立衛生試験所、変異遺伝部)に設立されたのが

JCRB 細胞バンクである。

こうしてがん研究の支援をおもな目的として細胞バンクがスタートし、生命科学研究全体の発展とともに細胞バンク事業も発展してきた。現在は(財)ヒューマンサイエンス振興財団(HS財団)との協力体制をとり、JCRB細胞バンクが細胞の収集、品質管理、長期安定保存を担当し、HS財団が細胞分譲に関する業務を担い、迅速な分譲体制を維持・確立している。また、2005年4月1日、国立医薬品食品衛生研究所にあった JCRB 細胞バンクは大阪府北部の新しい街「彩都(茨木市)」の一角に建設された独立行政法人医薬基盤研究所に移転して新たなスタートを切ることになった。

*KOHARA Arihiro, MIZUSAWA Hiroshi/(独)医薬基盤研究所・生物資源研究部



分譲実績(2002年1月~2005年11月)

年	海外	国内企業	研究機関	合計
2002	-	-	-	2406
2003	222	682	2095	2999
2004	294	727	2152	3173
2005	190	684	1863	2737

図① JCRB 細胞バンクの資源保有数と分譲実績(筆者作成)

JCRB 細胞バンクが保有する細胞資源数は952種となっており、そのうち約60%がヒト由来の細胞である。分譲は年間3000アンプルを越え徐々に増加している。

① 細胞バンクの概要

JCRB 細胞バンクの事業内容は、①研究に有用な培養細胞研究資源の収集、②収集した培養細胞研究資源の品質管理、③十分な数の細胞アンプルの長期安定的保存、④培養細胞に関連する新しい研究資源の開発および資源化に関する研究開発、⑤培養細胞研究資源の品質管理手法の開発研究、⑥培養細胞研究資源に関連する情報の収集と提供、⑦分譲を担当するHS財団への新規細胞株の分譲用細胞の提供、となっている。収集・登録した細胞は毎年40株程度ずつ増加しており、現在では952種となっている。また、年間に分譲するアンプル数も3000を越えて年々増加する傾向にある(図①)。品質管理に関しては汚染検査、細胞個体識別、細胞性状確認を実施しており、後述するマイコプラズマ非汚染で、しかも細胞個体識別を確認した培養細胞を提供していることは、JCRB 細胞バンクが研究者に提供する研究資源の品質の

高さを示すものであり、研究者より好評を得ている。

② マイコプラズマ汚染は古くて新しい課題である

培養細胞を用いて研究している研究者のなかでもマイコプラズマ汚染による研究への悪影響を知らない研究者は多いようである(図②)。マイコプラズマは自己増殖能をもつ細菌の1/10ぐらいの大きさの微生物であり、培養細胞と共存して増殖するが、汚染しても培地が濁ったりしないので混入に気づきにくい。もし、自分が研究に使っている細胞がマイコプラズマ汚染されていたらどうであろうか?その意味は十分考える必要がある。マイコプラズマ汚染のためせっかくおこなった研究に再現性がなく、信頼されない研究になってしまうかもしれない。われわれ細胞バンクには培養の専門家から多くの細胞が寄託されるが、その約20%にマイコプラズマ汚染が見つかるのが現状である。専門家とよばれる研究者が使用していた細胞にマイコプラズマ汚染率が高いことを考え

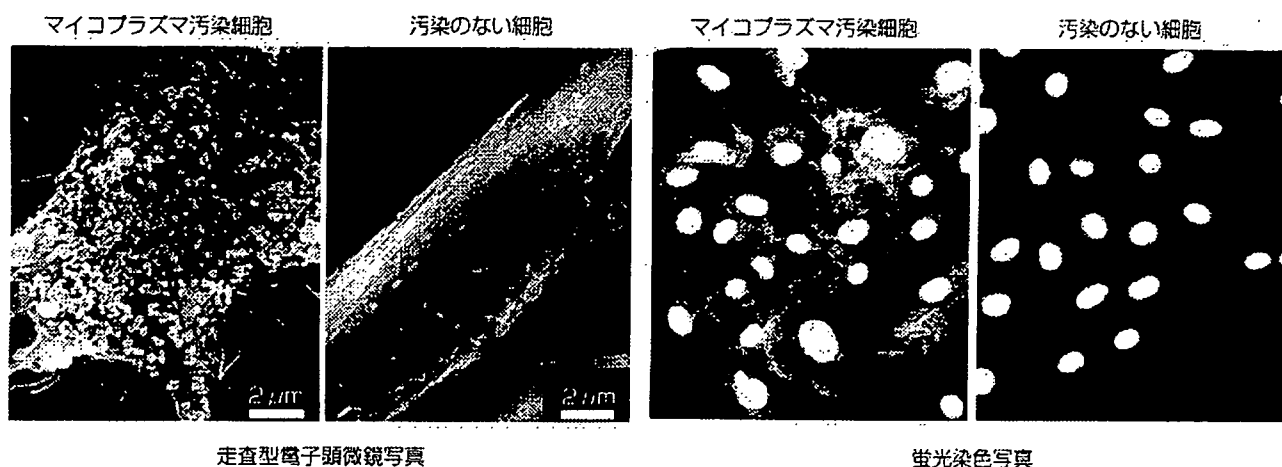


図2 マイコプラズマによる汚染

マイコプラズマ汚染された細胞の走査型電子顕微鏡像(ヒューマンサイエンス研究資源バンク：吉田東歩博士撮影)とヘキスト33258で染色される細胞の蛍光染色像。マイコプラズマにはいろいろな種類が存在するが、培養細胞では細胞表面に付着して細胞と共生する。走査型電子顕微鏡像では細胞表面の粒子状のものがマイコプラズマである。ヘキストによる核酸染色は培養細胞の核だけではなく、マイコプラズマの核酸も染色されるのでマイコプラズマ汚染が検出できる。

ると、広く普及した培養細胞の汚染率は相当高いと容易に予測できる。一度汚染した細胞は通常の培養方法で用いる抗生物質ではなかなか除去することは難しく増殖を抑える程度となってしまう。また、凍結保存しても細胞と同様にマイコプラズマも生き残ってしまう。培養細胞を研究に利用されている場合には、是非一度自分の細胞を調べてみることを勧めたい。

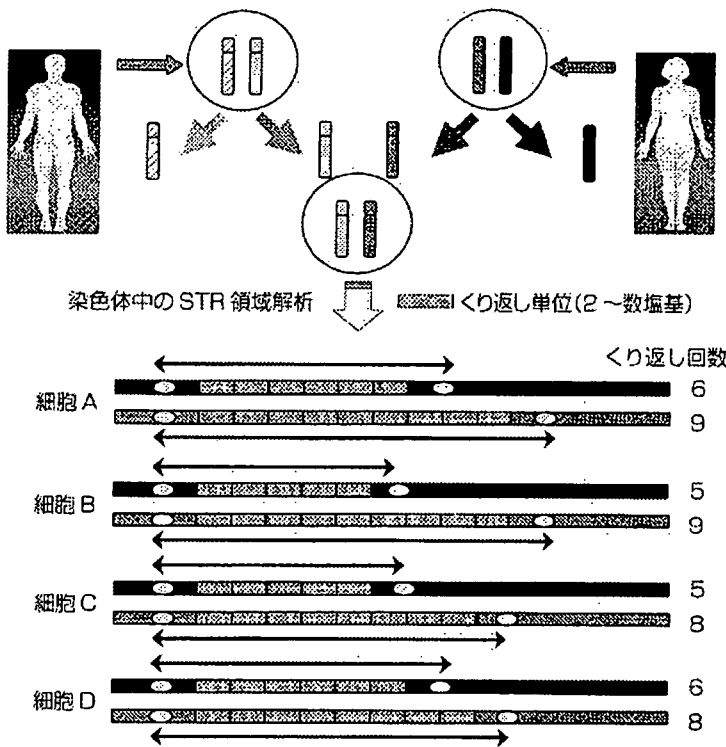
では、何が原因で汚染が広がってゆくのであろうか？その答えには三つあげられる。第一に培養実験室の環境からの汚染である。培地などをこぼしてしまったりしたとき、すぐにしっかりと拭き取らないと何らかの培養操作の過程でほかの細胞へ混入することがある。第二に培地の使い回しによる汚染があげられる。同じ培地を用いるのだから細胞が違っても大きなビンから同じ培地を使用するとか、ほかの研究者と培地を共有してしまうなどよく聞く話ではないだろうか？これが汚染の拡大に繋がっているのである。第三に人の唾液を通じての汚染が考えられる。マイコプラズマは人の上部気道や尿生殖器に常在する微生物である。培養する際のおしゃべりが汚染の原因の一つとも考えられている。これらのことから考えると汚染を拡大しないようにするには、培養環境を清潔に保つ、培地は「1培地-1細胞」、おしゃべりは厳禁(マスク着用)が原則となる。

③ STR-PCR 法はヒト由来細胞株を個体識別する

1951年にHeLa細胞が樹立されたことが刺激となり、多くの研究者が続々と新しいヒト由来の培養細胞の樹立に成功した¹⁾。そこに問題を提起したのがGartler²⁾であり、アイソザイムの分析からHeLa以降樹立されたヒト細胞の多くがHeLa細胞ではないかと疑ったのだった。1900年代の後半には英国のJeffreys³⁾らがDNAフィンガープリント法を報告し、ヒトをDNAレベルで識別することが可能だと紹介した。その後、この方法は犯罪捜査への応用という視点から急速に研究が進み、現在ではShort Tandem Repeat-Polymerase Chain Reaction (STR-PCR)法として迅速かつ精密な分析法として定着しつつある。STR-PCR法とはゲノム中に存在する2~数個の塩基からなるくり返し配列[(CAG)_n, (GC)_nなど]のくり返し回数に個人差があることから、その出現回数を分析することによって個体識別する方法である(図3)。

JCRB細胞バンクではこの方法を1999年末から培養細胞に取り入れて、収集したヒト由来の培養細胞に関する調査を実施してデータを蓄積し、「ヒト培養細胞識別データベース」を構築した。このデータベースを利用しておこなった多種類のヒト細胞の比較で明らかに

ヒト細胞を個体識別する STR-PCR 法 = DNA 個人識別
STR = Short Tandem Repeat (短鎖反復配列)



図③ STR-PCR 法の原理(筆者作成)

細胞 A から細胞 D の 4 種類の細胞に存在する STR 領域の短鎖反復配列の構造を模式的に示した。高等動物の染色体は母方と父方に由来するものがペアになっており、STR (短鎖反復配列) 領域も対になって 2 つ存在する。STR は 2 ~ 数塩基程度のきわめて短い塩基配列が反復している構造であり、この領域の外側に適当な PCR プライマーを設定して STR を挟む 100 ~ 300 塩基程度の長さの DNA 鎖を PCR 法によって増幅してその反応産物をジェネティックアナライザーによって解析する。

なったことは、ヒト培養細胞には意外と多くのクロスカルチャーコンタミネーション(細胞の入れ替わり)が発生していたということである。これまで JCRB 細胞バンクで収集したヒトに由来する培養細胞数は 560 種(全体の 60%)であるが、そのうち 32 種(約 6%弱)にクロスカルチャーコンタミネーションが見つかったのである。この結果は詳細な実験手法を含めて JCRB 細胞バンクのホームページで公開しているのので是非参考にいただきたい(<http://cellbank.nibio.go.jp/>中、『JCRB Cell Bank』の Cell ID の欄に公開している)。

最近、JCRB 細胞バンクで判明した一例を挙げてみたい。唾液腺がん由来の細胞としてわが国で樹立された細胞が歯学領域の研究者の間で広く研究利用されており、ヨーロッパの細胞バンクにも登録されていた。JCRB 細胞バンクにこの細胞の STR-PCR 解析の依頼があり、調べた結果 HeLa 細胞と同一のヒトから樹立されたもの、つまりは HeLa 細胞の入れ替わりと判定された。その後広く普及したこの細胞をヨーロッパの細胞バンクや日本国内の研究者より数種集めて再解析をおこなった

が、結果は HeLa 細胞由来であることを示した。細胞の入れ替わりがどの時点で起こったのか明らかではないが、現在その細胞を利用して研究している研究者は研究成果をどのように発表してよいのか苦悩している。このようにクロスカルチャーコンタミネーションは生命科学の根底を揺るがす深刻な問題となりかねないものである。

④ JCRB 細胞バンクの今後の役割は大きい

以上紹介したように JCRB 細胞バンクは、細胞の収集と品質管理を重視した運営をおこなってきたが、近年、ヒトゲノムの全塩基配列が決定されて個人単位の遺伝子解析が容易に実施できるようになった。その結果個人の遺伝情報が垂れ流しになるのではないかとという心配から保護をする必要性が話題になり、それに関連して生命倫理という新たな課題が浮上している。もちろんこれまでも倫理問題はなかったわけではないが国内ではあまり関心をもたれなかった。そこで、細胞バンクで重視している研究材料がヒトに由来する細胞であることを考える

と、研究倫理を研究課題として細胞バンクでも独自に調査研究する必要があるのではないだろうかと考えはじめたところである。

また、培養細胞の品質管理については、①マイコプラズマ汚染の有無、②細菌・真菌汚染の有無、③アイソザイム分析による由来動物種の確認、④STR-PCR法によるヒト細胞の個体識別を実施する体制を確立してきた一方、まだ導入していない品質管理の課題としてはウイルスによる汚染検査の問題がある。再生医療や細胞治療に向けて非常に多くの研究開発が進んでいるが、細胞を用いた医療の実現にはウイルス汚染検査が必須である。JCRB細胞バンクでもウイルス汚染検査体制の確立が急務であるとして研究開発に着手した。

収集する細胞に関しても非常に多様かつ有用な細胞が次々と樹立されている。とくに近年ではES細胞や体性幹細胞とよばれる多分化能をもった増殖性の細胞の研究利用が進んでいる。これはヒトの正常な(がんではない)状態を *in vitro* で模倣できる非常に有用な研究材料であり、これらの研究材料を供給することにJCRB細胞バンクも積極的に取り組んでいる。

研究者が研究に利用する細胞を選択するには細胞特性の情報が非常に重要であり、これまでもJCRB細胞バ

ンクではそれらの特性を解析する研究を実施している。今後も染色体の詳細な解析、遺伝子発現情報の付加、細胞増殖過程の動画記録などの情報提供に取り組み、研究者の支援に努めていきたいと考えている。

《細胞寄託、品質管理に関する問い合わせ》

JCRB細胞バンク

独立行政法人医薬基盤研究所、生物資源研究部、
細胞資源研究室

〒567-0085 大阪府茨木市彩都あさぎ7-6-8

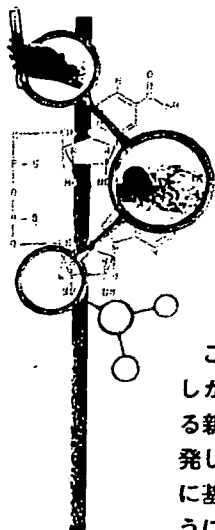
電話：072-641-9819, FAX：072-641-9851

e-mail：cell@nibio.go.jp

ホームページ：http://cellbank.nibio.go.jp/



- 1) Gey G.O *et al* : Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium. *Cancer Res* 12 : 264-265, 1951
- 2) Gartler SM *et al* : Apparent HeLa cell contamination of human heteroploid cell lines. *Nature* 217 : 750-751, 1968
- 3) Jeffreys AJ *et al* : Individual-specific 'fingerprints' of human DNA. *Nature* 316 : 76-79, 1985



論理的分子設計に基づく創薬

水谷実穂, 板井昭子

この10年、国内外の製薬企業ではできるだけ多くの化合物を保有し合成しアッセイすることに専念してきた。しかし、期待された程の成果は得られていない。生命や生体メカニズムの解明が進んでいるにも拘らず、開発される新薬は年々益々少なくなっている。筆者らは長い間、分子の三次元構造に基づく論理的医薬分子設計の方法を開発してきたが、近年はその方法を利用して自社テーマで創薬を行っている。その結果、標的タンパク質の構造情報に基づく計算シミュレーションに合成とアッセイを組み合わせることで成功率高く効率よく医薬候補を開発できるようになっている。本稿ではその基本的な考え方について述べる。

はじめに

近年、ライフサイエンスの進歩は目覚しく、生体や生命の仕組みの解明と共に、疾患の分子メカニズムの解明が急速に進んでいる。新たな創薬標的の発見は創薬パラダイムに大きな変化をもたらした。かつて創薬は標的やメカニズムが不明のまま有機合成化学中心に既存薬や生体内物質に基づいて行われてきたが、近年は創薬のスタート時に標的タンパク質を設定するのが普通である。しかし、どんなに生体の仕組みの解明が進み、有望な標的が明らかになっても、薬を創製する難しさは変わらず、上市される新薬の数は減る一方である。

タンパク質分子や抗体を医薬とする高分子医薬は別として、低分子医薬の開発には出発点とする活性化合物の構造(医薬リードまたはリードと呼ぶ)に基づいて、設計・合成・評価を繰返して最適な化合物を探索する(リード最適化)過程が必須である。医薬リードの発見・創製は有効な方法がないために長い間不可能とされてきたが、1995年頃から、市販化合物・社内化合物からなる数十万~数百万化合物のライブラリを片端からスクリーニングす

るHTS(高効率に自動的にランダムスクリーニング)システムにより、標的への結合活性や阻害活性をみることで可能になった。こうして見つけた弱い*in vitro*活性化合物を合成展開して、最適な活性・動態をもち低毒性の化合物に導くことで創薬が目指されたが、期待したほどうまくいっていない。

近年はHTSだけでなく、多種の化合物の同時自動合成を目指すコンビナトリアル合成も含め、できるだけ多くの化合物を保有し、測るものが勝つという力づく信仰に陰りが見えており、創薬の成功率の向上・効率化・迅速化を可能にする論理的なアプローチへの関心が高まっている。

分子の三次元構造

リード最適化を論理的に進める方法として、40年程前から置換基の性質や大きさと活性の相関を統計的に探る定量的構造活性相関法(QSAR)があるが、母核が同じ誘導体系列でしか成り立たず、多数の誘導体の合成後でしか使えないなど、後付けで論文作成用の便利なツールの域を出なかった。1980年以降、タンパク質結晶解析技術やコンピュー

タの性能と利用技術の進歩によって、結晶構造が解明されるタンパク質が増加するに伴い、分子の三次元構造(各構成原子の三次元座標で表される構造:立体構造ともいう)を用いた論理的分子設計の重要性が増してきた。特異的に結合すべきタンパク質分子も医薬分子も三次元的存在であることから、三次元構造によってのみ*in vitro*活性を説明でき、先行化合物の知識なしに新規医薬分子の構造を設計できるはずである。

タンパク質分子の三次元構造として信頼性と精度が高いのは結晶構造である。自社で解析する以外に、プロテインデータバンク(PDB)から三次元座標を入手して利用することができる。そのものずばりのタンパク質の三次元座標が入手できない場合には、同じファミリーのタンパク質の結晶構造を鋳型にしてコンピュータ上で構築したモデリング構造を結晶構造と同様に用いることができる。タンパク質の三次元構造は、基本的な折り畳み構造が大きく変化することは珍しいが、ゆらぎや機能に基づく動きがあり、共存分子や結晶化条件によっても変化する。そのため、標的タンパク質の結晶構造が利用できる場合でも結晶構造は1スナッ

ブショットと考えて、リガンドの設計に必要な修正を加えたり、ある程度動きを許容する手立てをしたうえで剛体として利用することが多い。

低分子（リガンド分子）の三次元構造は、原子間の結合距離と結合角と内部回転角によって定義される。これらは実験的には結晶構造解析によって最も精度良く決まるが、論理的分子設計で有用なのは結合距離と結合角である。内部回転角で定義される分子配座は分子の形状を左右することからきわめて重要であるが、問題は低分子の安定配座が置かれた環境により容易に変化しうることである。結晶中の構造と溶液中の構造は異なるし、溶媒によっても、標的タンパク質への結合によっても異なるなど、一般に1個の化学構造が数千個の三次元構造で存在しうる。そこで、医薬分子設計のための計算シミュレーションにおいては、リガンド分子が標的タンパク質と最安定な複合体を形成しうる配座（活性配座）を逃さないために、可能な三次元構造をすべて

作り出して試すことが必要になる。

自動ドッキング法による 論理的分子設計

われわれは長い間、独自のコンセプトとアルゴリズムに基づいて論理的医薬分子設計のさまざまな方法論を開発してきた。世界に先駆けて開発に成功した方法も多い。さらにそれらの方法を実際の創薬に応用することで、利用のノウハウを蓄積してきた。

標的タンパク質の三次元構造が利用できる場合に最も重要な方法が、任意の分子について標的タンパク質との最安定な複合体構造とその安定性を推定する自動ドッキング法である。ドッキング問題は、両分子の相対的な位置と方向に関する6個の自由度と配座に関する自由度（普通5～10個）によって生じる膨大な数の可能な複合体モデルのなかから、最安定なモデルを実用的な時間内で探索する問題である。複合

体モデルの安定性は、タンパク質分子とリガンド分子の原子間でファンデルワールス相互作用、水素結合相互作用、静電相互作用その他からなる力場エネルギーとして評価でき、結晶解析された1個の複合体構造について安定性を計算するだけならパソコンでも容易にできる。

しかし、どんな複合体が形成されるか全く未知の場合のドッキングステディでは、すべての可能な複合体モデルについてまともにエネルギーを計算し比較するのは数千倍数万倍の時間がかかり実質的に不可能であった。そこでわれわれは、ドッキングの初期過程において、タンパク質原子を直接用いる代わりに水素結合などの相手となる位置にダミー原子を設定し、その間の距離とリガンド分子中の水素結合原子間の距離を配座を変えながら比較することで、タンパク質分子にはめ込み、有望な複合体モデルを推定できる方法を考案した。

この考案によって世界で初めて配座

ハイパー
マスター
シリーズ

タンパク質の一生 集中マスター

細胞における成熟・輸送・品質管理

遠藤 斗志也, 森 和俊, 田口英樹 / 編

■ 定価(本体3,800円+税) ■ B5判 ■ 147頁 ■ ISBN978-4-7581-0713-6

分子シャペロンなどによるタンパク質の品質管理をはじめとする、タンパク質の制御機構を一気に理解!

特定領域研究に選ばれた注目の研究分野!

最新刊!!

発行 羊土社

3部構成で、
理解が深まる

研究の生い立ちがわかる

歴史編

基礎知識が身に付く

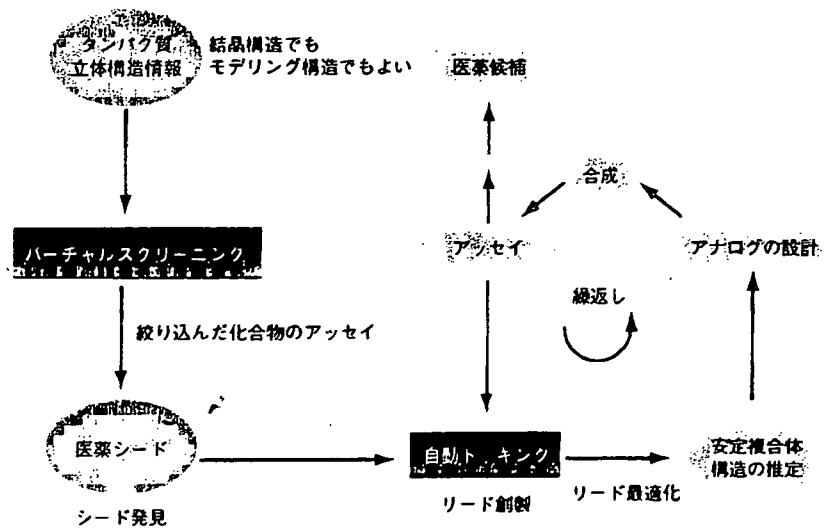
レビュー編

最先端に触れる

UP TO DATE

タンパク質の一生
集中マスター

の全自由度を考慮した最安定複合体モデルの推定 (フレキシブルドッキング) が可能になった。所要時間はペンティアムパソコン上で1分子当たり5~10秒である。安定複合体モデルは、内因性リガンドについては反応や機能が説明でき、先行化合物については構造と活性の関係を説明でき、HTSヒット化合物については結合様式に基づいてリード最適化に進むべき最適化合物の選別ができ、さらに結合様式に基づいて構造修飾の合理的な指針が得られる等々、さまざまな目的にきわめて有用である。



図●IMMDの論理的分子設計に基づく創薬

当社における創薬の流れ。バーチャルスクリーニングを用いて発見した医薬シードを、自動ドッキング法により標的タンパク質との結合様式を推定しつつ設計・合成・アッセイを繰り返すことで論理的に最適化する

バーチャルスクリーニング

既知活性化合物について、標的タンパクとの共結晶化も結晶解析もせずに標的との結合様式や活性配座がわかることも有用であるが、結合するかどうか未知だけでなくこの世に存在するかどうかすらわからない化合物について、標的タンパク質との安定な複合体を形成する可能性や安定性を推定できることから、自動ドッキング法は新規リガンドや医薬シード発見に利用できる。すなわち、化合物の三次元構造データベースを用意し、各化合物について自動ドッキングを行って最安定複合体モデルを推定し、その安定性や構造的な特徴があらかじめ設定した基準をクリアしているか否かによりリガンドとなる可能性の高い少数の有望な化合物を絞り込むバーチャルスクリーニングが可能である。それらの少数の化合物だけを入手 (購入または合成) して、目的の活性を測定することにより、新規活性化合物を発見できる。市

販化合物のデータベースを対象にすれば、選別した化合物を合成することなく、活性の有無を評価できる。われわれは普通、約30万化合物の市販化合物データベースを対象にバーチャルスクリーニングし、骨格の独立な100個前後の有望な化合物を選別して実験的に評価しているが、そのうち30~40個は新規の活性化合物である。

バーチャルスクリーニングは、①保有していない化合物も対象にできること、②有望な少数に絞り込んで実験するので、丁寧な精度の高いプロファイリングが可能なこと、③結合様式の情報から最適化のための構造修飾の指針が得られること、④低コスト、などの点でHTSより優れている。HTSより不利な点としては、①標的タンパク質の三次元構造情報が必要なこと、②リガンド結合ポケットの特徴や動的挙動に

ついて知っておく必要があること、である。われわれはこうして見つけた活性化合物から、構造の薬らしさ、合成の容易さ、結合様式の良さなどを考慮して、1個を出発点として選び、合成展開を行うことで創薬を行っている。われわれがこのアプローチで最初に創薬を行った化合物 (IKKβ阻害剤) は、現在P-2a試験に入っており、世界のほとんどの製薬企業が挑戦して失敗したといわれるなかで唯一P-1を終了している“First in the class”である。われわれの創薬の流れを以下の図に示す。

創薬の流れ

創薬は他の開発に比べて格段にお金と時間がかかるうえに、成功する確率よりドロップする確率の方がはるかに

高いハイリスクな研究である。しかし、創業の後期プロセスである臨床試験の成功が、ヒトと動物の違いや疾患モデルの限界などの容易に超えられない多くの問題に依存するのに対して、初期プロセスである分子設計は科学的な根拠に基づいて論理的に成功率高く効率的に行えるのである。しかし、論理的分子設計は、それらしいことを謳った市販ソフトウェアを買ってきて、その科学的コンセプトの妥当性も限界も考えずにただ計算することで実現できるものではない。われわれは、自ら開発した論理的分子設計法の有用性を証明すべく、いくつかの創業テーマでその方法を用い有機合成と生化学的評価を組合わせた創業を実施してきた。次号においてわれわれの創業の成果について述べる予定である。



水谷実穂 (Miho Mizutani)

株式会社医薬分子設計研究所 研究員。

1990年3月東京大学薬学部卒業。1995年3月同大学院薬学系研究科博士課程修了(薬学博士)。1995年4月日本学術振興会特別研究員(PD)。1996年4月社団法人北里研究所研究員。1997年4月より現職。



板井昭子 (Akiko Itai)

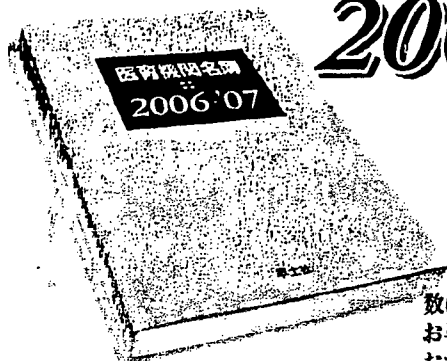
株式会社医薬分子設計研究所 代表取締役。

1964年3月東京大学薬学部卒業。1969年9月東京大学大学院薬学系研究科博士課程修了(天然物有機化学専攻)。同年10月東京大学薬学部文部教官助手(薬品物理分析学講座)。1990年4月同寄付講座医薬分子設計学講座助教授就任。1994年9月同教授就任。1995年3月株式会社医薬分子設計研究所設立。代表取締役社長として現在に至る。

収録研究者1万7千余名、創刊43年の信頼と実績

医育機関名簿

2006-'07



大好評
発売中

数に限りがございますので
お早めのご購入を
おすすめいたします

読みやすく、引きやすい、
抜群の情報量と信頼性は
医学教育者名簿の決定版!

伝統ある
「医育機関名簿」が
今年も羊土社から
発行されました!

全国の国公立大学の医学部、医科大学、
附属研究施設の教授・助教授・講師を掲載!

- 講座別の掲載により見やすく、より引きやすく
- 独自の調査による異動の最新情報
- 個々の先生方の詳しい研究テーマを掲載
- 創刊43年の実績を誇る、きわめて正確な内容

発行 羊土社

■ A4判 ■ 664頁 ■ 定価(本体14,000円+税) ■ ISBN978-4-89706-891-6

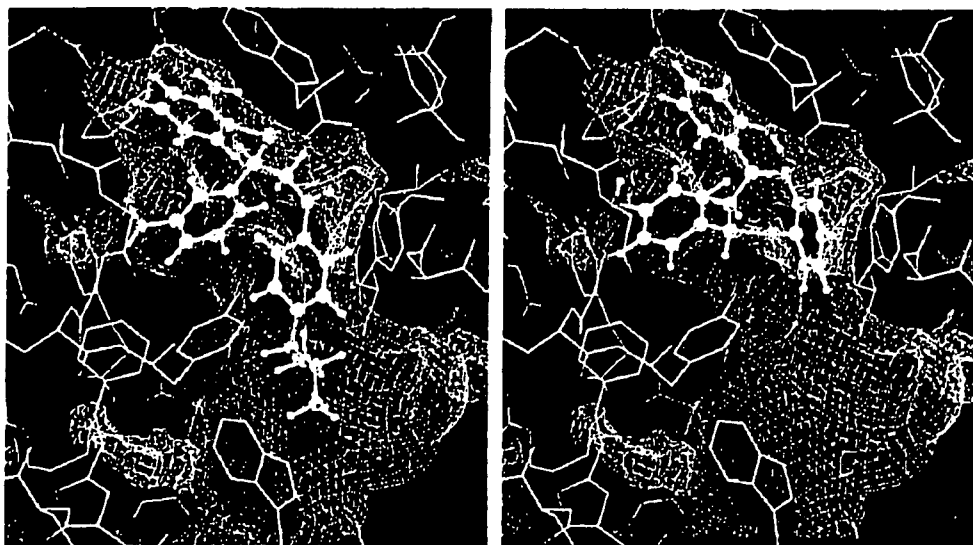
〈企画：外山 聡・新潟大学医歯学総合病院薬剤部助教授・副薬剤部長〉

論理的分子設計からの創薬

水谷 実穂*¹⁾・板井 昭子*²⁾

近年、蛋白質の大量産生・精製技術やX線結晶解析技術の進歩により、医薬のターゲットとなる蛋白質の立体構造が数多く解明されてきている。これに伴い、標的蛋白質の立体構造に基づく論理的分子設計が、スピーディーで効率的な創薬への重要なアプローチとして注目を集めている。ここでは、ドッキングスタディ、バーチャルスクリーニングを中心とした論理的分子設計のアプローチと、分子レベルでの作用機序を踏まえた医薬開発への寄与について述べる。

Key Words ▶▶ ドッキングスタディ、バーチャルスクリーニング、蛋白立体構造



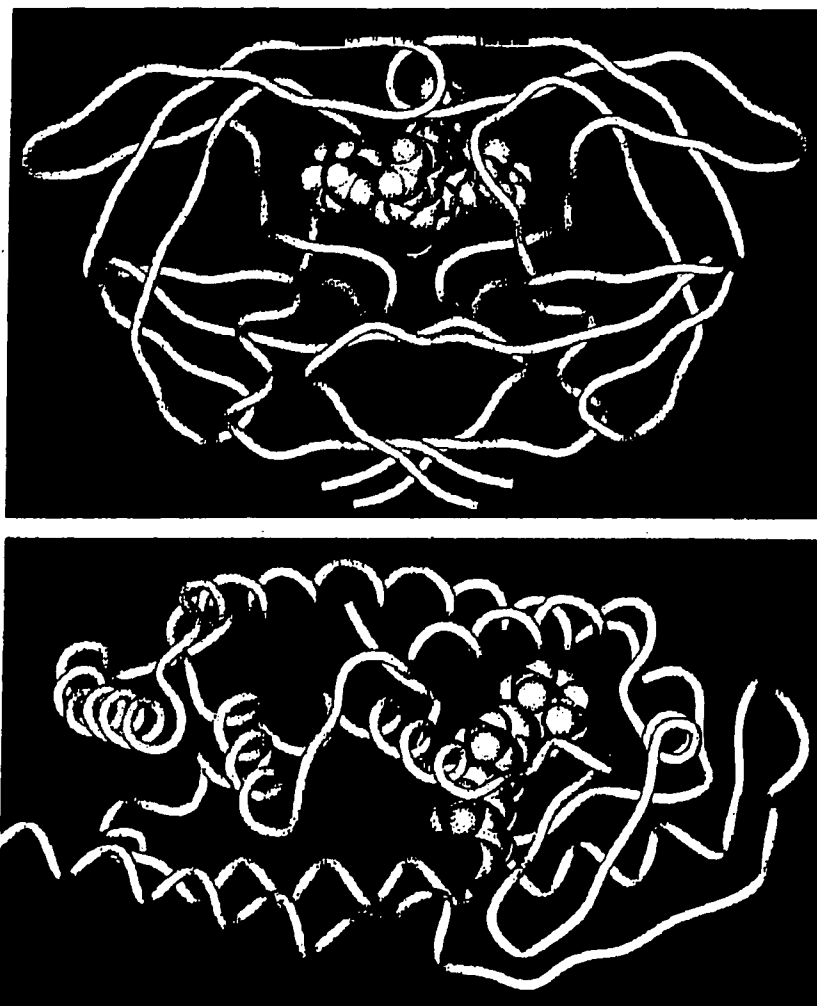
●図 標的蛋白にリガンド構造を自動ドッキングさせて得た最安定複合体モデル (本文図2より)

これらのリガンドは、抗痴呆薬の標的であるアセチルコリンエステラーゼに対し、筆者らのバーチャルスクリーニングを実施して発見された新規阻害薬である。(文献2より)

*株式会社 医薬分子設計研究所 ¹⁾(みずたに・みほ) ²⁾代表取締役社長(いたい・あきこ)

はじめに

一般に薬物分子は、生体内で標的となる蛋白質（もしくは核酸）と安定な複合体を形成することで、その作用を発現する。図1に示すように、酵素の基質結合部位に結合することにより酵素の働きを阻害したり（抗エイズ薬/HIV〔ヒト免疫不全ウイルス〕蛋白分解酵素の例）、核内受容体のリガンド結合部位に結合し、他のドメインやコファクターとの結合に影響を及ぼして転写活性を促進または抑制する（急性前骨髄球性白血病治療薬/レチノイン酸受容体の例）など、さまざまな作用機序があるが、薬物と標



●図1 薬物分子は標的蛋白と安定な複合体を形成する

上：HIV〔ヒト免疫不全ウイルス〕蛋白分解酵素を阻害し、抗エイズ活性を発現するアタザナビル。

下：レチノイン酸受容体に結合し、そのアゴニスト作用によって急性前骨髄球性白血病の治療効果をもたらす全トランス型レチノイン酸。

それぞれ、蛋白質の骨格をチューブで、薬物分子をスペースフィルモデルで示す。

的蛋白が安定な相互作用をするという基本は共通である。

筆者らは、蛋白-薬物相互作用に基づく論理的分子設計の方法論構築に取り組み、またその方法論を利用して実際の創薬にも挑んでいる。本稿では、論理的分子設計の観点から、分子レベルでの作用機序を踏まえた医薬開発について述べてみたい。

蛋白立体構造に基づく論理的分子設計

かつては、既存の薬物や天然物など何らかの薬効を示す活性化合物を、作用機序等は分からないままに出発点として、医薬開発を行ってきた。開発のスタート時に作用機序や標的蛋白を設定するようになったのは、ここ10年余りのことである。現在は、蛋白質の大量産生・精製技術やX線結晶解析技術の進歩により、医薬のターゲットとなる蛋白質の立体構造が数多く解明されてきている。論理的分子設計は、標的蛋白の立体構造を利用して、薬物などのリガンドが結合する蛋白ポケットに、形状や静電的な性質がよくフィットし、特異的な相互作用(水素結合など)を形成し得る多様な低分子構造を提示できる手法である。効率的でスピーディーな創薬の成功をもたらすアプローチとして期待を集めている。

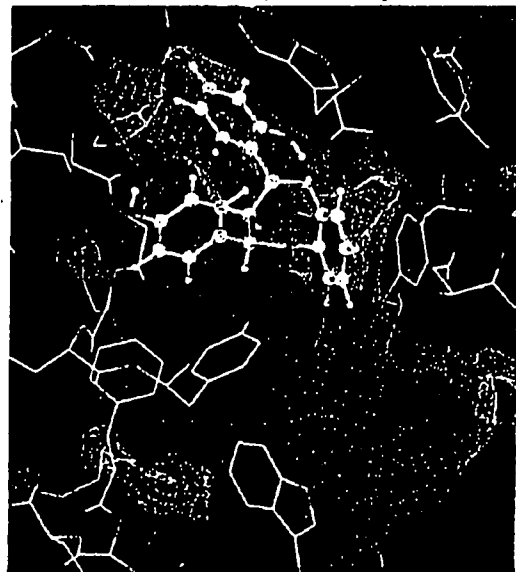
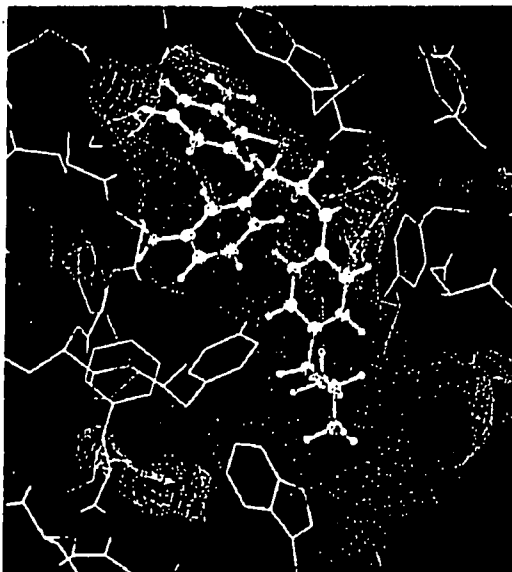
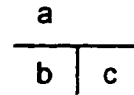
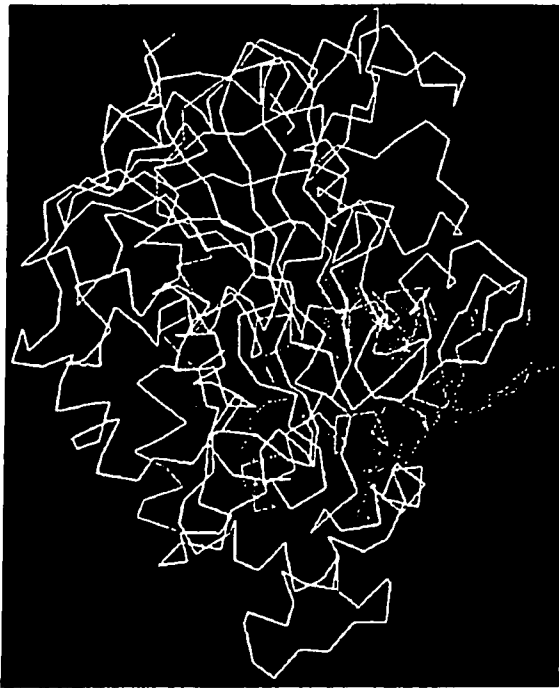
ドッキングスタディの重要性

ドッキングスタディとは、標的蛋白と任意の低分子化合物とで形成される安定な複合体構造を推定する、分子設計の手法である。標的蛋白の立体構造は、結晶構造に限らず蛋白モデリング法により構築したものでよい。ドッキングによって推定した最安定な複合体構造モデルから、蛋白に結合した時のリガンドのコンフォメーションや、分子間の水素結合など特異的な相互作用の様子を知ることができる。(図2)。最安定複合体モデルとその安定性(エネルギー値)からは、実に多くの情報や示唆が得られる。例えば、①薬物や活性化合物の分子レベルでの作用機序を推定するのに役立つ、②一連の活性化合物の結合様式や安定性を比較することで、化合物の構造と活性の相関関係(構造活性相関)を説明できる、③活性化合物を複数有している場合、そのいずれを合成展開の出発化合物とするか、選択のための重要な判断材料が得られる、④結合様式から、活性や動態、物性を向上させるための指針が得られる、などである。また、標的蛋白の類縁蛋白質への結合の様式や安定性を検討することで、リガンドの選択性を向上させたり(図3)、薬剤耐性を獲得した変異蛋白をターゲットとした薬物設計を行うことも可能である。

自動ドッキング法からバーチャルスクリーニングへ

ドッキングスタディは論理的薬物設計において中心的なアプローチであるが、これを研究者が手作業で行うのは難しい。正しい複合体構造モデルを得るためには、化合物のコンフォメーションの自由度も考慮しながら、蛋白-化合物間の相対配置の可能性を漏れなく探索する必要がある。ところが、ここで考慮すべき可能性の数は恐ろしく膨大であり、人間が網羅探索することは考えられない。そこで、筆者らはそれらの可能性について、コンピュータを用いて自動的かつ効率的に網羅探索する手法を、世界に先駆けて考案した¹⁾。

筆者らはさらに、この自動ドッキング法をバーチャルスクリーニング法へと発展させた²⁾。バーチャルスクリーニング法は、数十万~数百万分子を取めた化合物構造データベースから、標的蛋白に安定に

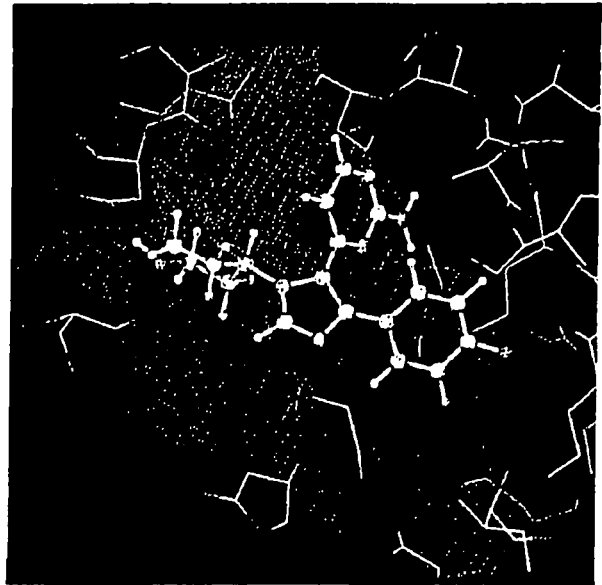
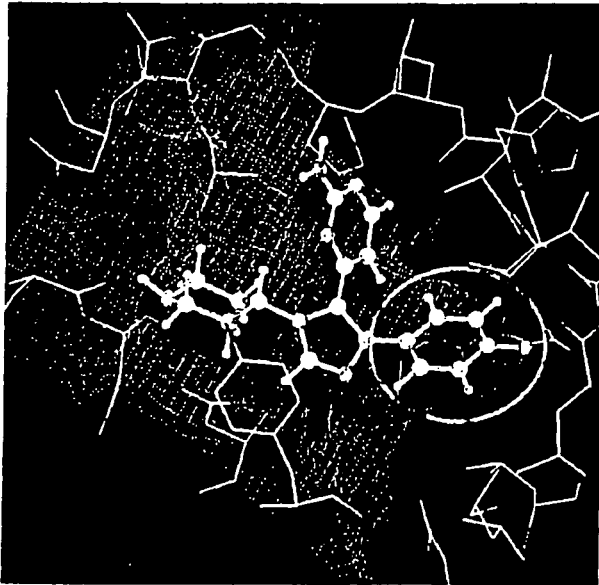


●図2 蛋白-リガンドの最安定複合体モデルから重要な多くの示唆が得られる(再掲)

a : 標的蛋白のリガンド結合キャビティ (カゴ状の領域). 蛋白構造は C α のみ表示.
 b, c : 標的蛋白にリガンド構造を自動ドッキングさせて得た最安定複合体モデル.
 これらのリガンドは、抗痴呆薬の標的であるアセチルコリンエステラーゼに対し、筆者らのバーチャルスクリーニングを実施して発見された新規阻害剤である.

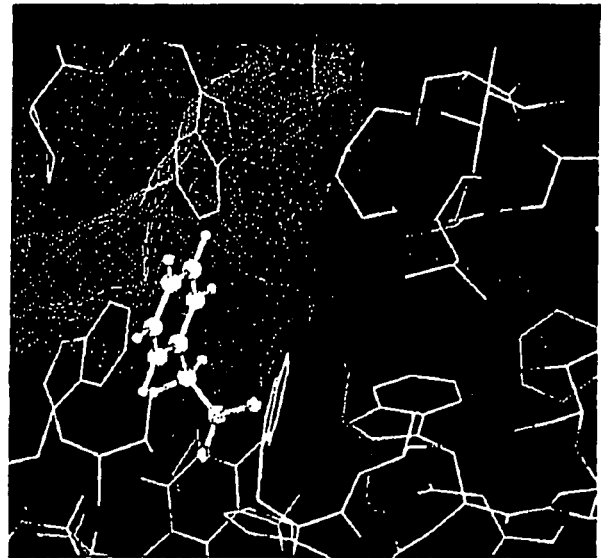
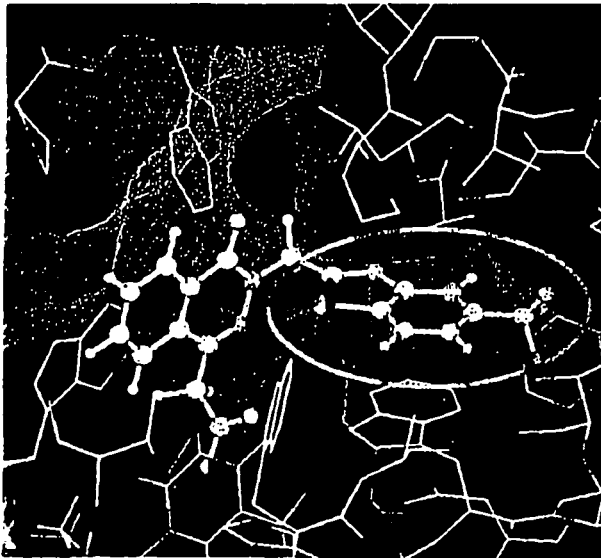
推定結合様式をもとに、合成展開の出発化合物を選択したり、展開の指針を得ることができる.

(文献2より)



●図3 標的蛋白と類縁蛋白の結合キャビティの違いから選択性向上の指針が得られる
MAP キナーゼ p38 に強い選択性を示すリガンドの、標的蛋白 p38 との結合様式 (左) と、同じ蛋白ファミリーの ERK2 との結合様式 (右) との比較。

カゴ状の表示はリガンド結合領域。p38 に特徴的な疎水性ポケット (赤線で囲んだ領域) が、ERK2 では小さくはっきりしない。リガンド結合キャビティの形状や性質の違い、それに伴うリガンドの推定結合様式の違いから、選択性向上の方向性を検討できる。



●図4 蛋白質はリガンドの有無や種類に応じて誘導適合を起こす

グルコース還元酵素で見られる誘導適合。強力な阻害剤ゾボルレスタットとの複合体結晶構造に見られる特異的サブポケット (左図、赤線で囲んだ領域) が、弱い阻害活性を示すフェニル酢酸との複合体では完全に閉じて無くなっている (右図)。蛋白構造のコンフォメーション変化によるものであるが、大きな誘導適合を理論的に予測することは難しい。

結合して活性を発現し得るリガンド候補を推定するアプローチである。ここで選別された少数の有望な候補化合物を入手し活性測定を行うことで、新規な骨格構造を持った、医薬開発の出発化合物を得ることができる。バーチャルスクリーニングでは、ごく少数の興味を持った化合物だけを扱う自動ドッキングと違って、サイズも骨格構造も物理化学的な性質も全く異なる多種多様な化合物群を、一律の条件でドッキングし、それぞれの標的蛋白への結合性を推定する必要がある。さらに、蛋白質はリガンドの有無や種類に応じて誘導適合を起こし、側鎖を中心に多かれ少なかれコンフォメーションが変化することにも注意しなければならない。(図4)。これらの困難な問題をクリアする有効な方法論の開発と、個々の標的蛋白の性質や目指す作用機序、目的、状況に応じた適切な戦略立案・条件設定を行うことが、論理的分子設計からの創薬の成功に欠かせない。

■ おわりに

筆者らは、現在までに20種類以上の酵素や受容体を標的にバーチャルスクリーニングを行い、それぞれの系で数多くの活性化合物を発見してきた²³⁾。特に、I κ Bキナーゼ β の系においては、標的蛋白のモデリングからスタートして、バーチャルスクリーニング、リード化合物の発見、合成展開、前臨床試験のステップを踏み、英国でのフェーズI試験も無事に終了した。現在は、フェーズII前期試験を実施中である。論理的分子設計の実戦的創薬における威力が実証されつつある。

作用機序や標的蛋白を設定してスタートする現代の医薬開発に、論理的合理的な方法論と戦略は必須である。論理的分子設計は、21世紀の創薬の成功をもたらす大きな柱として、ますますの進歩と有効な活用が期待される。

文 献

- 1) Mizutani MY, et al : Rational automatic search method for stable docking models of protein and ligand. *J Mol Biol* **243** : 310-326, 1994.
- 2) Mizutani MY, Itai A : Efficient method for high-throughput virtual screening based on flexible docking : Discovery of novel acetylcholinesterase inhibitors. *J Med Chem* **47** : 4818-4828, 2004.
- 3) Iwata Y, et al : Discovery of novel aldose reductase inhibitors using a protein structure-based approach : 3D-database search followed by design and synthesis. *J Med Chem* **44** : 1718-1728, 2001.



蛋白構造と論理的分子設計 に基づく創薬

Drug discovery based on protein structure and rational drug design

武藤 進・水谷実穂・板井昭子
株式会社医薬分子設計研究所



武藤 進 (むとう すすむ)
1987年静岡大学大学院理学研究科修士課程修了。専攻は有機合成化学。同年持田製薬株式会社入社。'98年株式会社医薬分子設計研究所に入社し、論理的分子設計による創薬研究に従事する。2001年創薬研究部長。'05年より、創薬研究事業部長。

Key Words:

論理的創薬, パーチャルスクリーニング, HTS, NF- κ B, I κ Bキナーゼ β (IKK β)

Abstract

株式会社医薬分子設計研究所 (IMMD) では長い間、標的蛋白の三次元構造を用いた独自の計算シミュレーションにより、論理的に医薬分子を設計する方法を研究してきた。最近の数年間この方法を用いて創薬研究を展開してきた結果、臨床第2相試験に入ったものも含め、いくつかの開発候補品を見出すことに成功しており、蛋白構造を利用した論理的創薬手法の有用性を実証できたと考えている。

はじめに

株式会社医薬分子設計研究所 (IMMD) は分子の三次元構造を用いた独自の計算シミュレーションによる論理的医薬分子設計法に基づく創薬をコア技術とする会社である。長い間、分子設計理論とソフトウェアの開発と改良を行ってきた結果、特に標的蛋白の立体構造が利用可能な場合には信頼性高く分子設計と論理的創薬が展開できるようになってきた。任意の化合物について標的蛋白質との最安定複合体構造とその安定性を推定するドッキングスタディは、蛋白立体構造に基づく論理的分子設計法の中で最重要な技術である。

当社では世界ではじめてリガンド側の配座の自由度を考慮した自動ドッキング法の開発に成功し、さらにこの方法を利用して標的蛋白に対する結合

の強さの推定に基づいて膨大な化合物の三次元構造データベースから有望な化合物を選別するパーチャルスクリーニング (*in silico*スクリーニングともいう) 法の開発に成功した。蛋白立体構造としては、そのものずばりの結晶構造がないときにはコンピュータ上で類縁蛋白の結晶構造を鋳型に構築したモデリング構造を用いることができる。当社ではここ数年、これらの方法に合成・アッセイを組合わせた論理的創薬手法により実際に創薬を行ってきた。

■パーチャルスクリーニングの優位性

当社のパーチャルスクリーニングでは、データベース中の各化合物について、自動ドッキング法で推定した標的蛋白との安定複合体構造と安定性が予め設定したヒットの条件 (安定性や水素結合の数や特定部位の水素結合の形成) をクリアする化合物をさらに構造の薬らしさ等種々の条件を考慮することで選別した少数の有望なリガンド候補のみを入手して測定することで多数の医薬リードを発見することができる。通常30万程度の化合物を含むデータベースから100ヶ程度の有望な化合物を選別し入手して測定すると、数十ヶの独立の

■Susumu Muto, Miho Mizutani, Akiko Itai
Institute of Medicinal Molecular Design Inc.

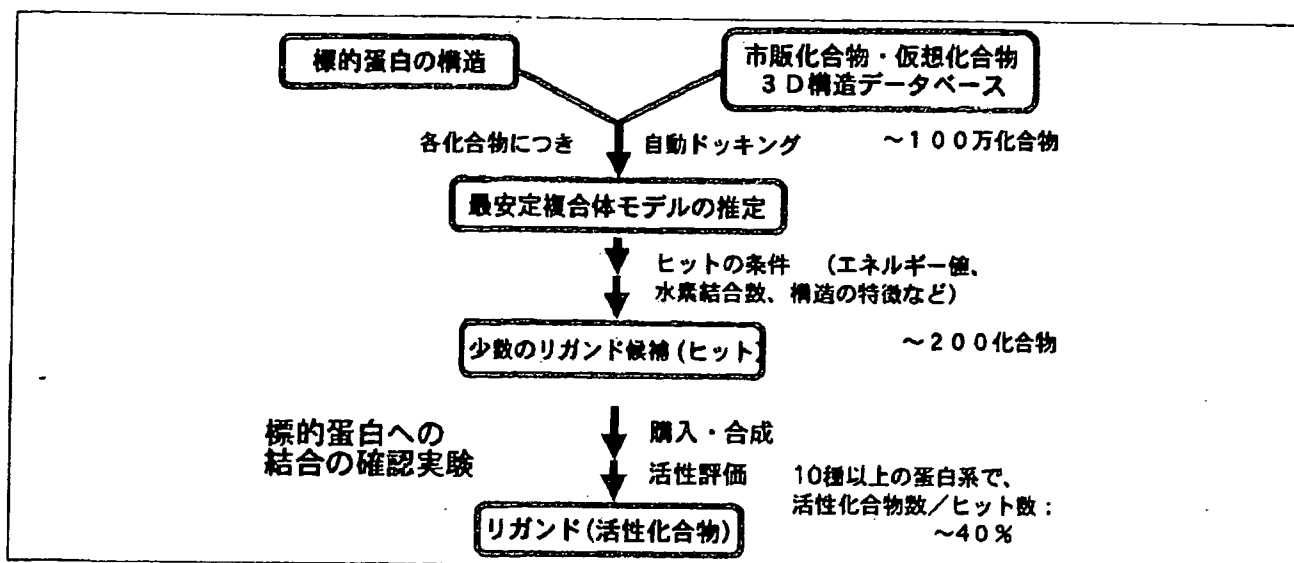


図1 IMMDの *in silico* スクリーニング

現在当社で行っている典型的なリガンド探索の戦略。バーチャルスクリーニングから100~200個の化合物を選択しアッセイを行う。通常この中から、~50個ほどのヒット化合物が得られる。

分子骨格の活性化化合物が得られる (図1)。そのうちの1ヶを選んで合成展開の出発点とし、設計・合成・アッセイの繰返しによって医薬として望ましい活性・物性をもち、毒性のない化合物を探索するという点では、HTSからのシードを出発点とする創薬と似ているように見えるが、実は以下に述べるような大きな違いがある。

近年殆どの製薬企業では、シード探索をHigh Throughput Screening (HTS) に頼っている。HTSはロボットを用いて、膨大な数の化合物を高効率に自動的にアッセイするものであり、多くの活性化化合物が見つかることが多いものの、欠点も多い。まず膨大な化合物を用意しておき片端から測るために、化合物に関わる費用やランニングコストが高い、膨大な化合物を測定するためにアッセイの精度や信頼性が低い、膨大な化合物を用意するために物性の悪いコンビ合成化合物をかなりの程度含めているのでそこから当たりが出やすいが創薬の出発点にしにくい、活性化化合物が多数あっても結合様式がわからないためにどうしても活性に引きずられてシーズを選ぶことになりその後の合成展開に失敗しがち等々である。

一方、バーチャルスクリーニングでは、安定性 (分子内・分子間エネルギー) の評価と共に標的蛋白との予想複合体構造が得られるので、アッセイ

対象のリガンド候補を選別する際にも、また活性化化合物群から最適化の対象とするシードを選ぶ際にも、結合様式、重要な相互作用や官能基、合成の容易さ、最適化における構造展開の可能性その他の有用な情報が得られる (図2)。そのため、HTSからスタートする創薬に比べて成功率が高く、効率的で、コストが安く済む。推定結合様式から合成展開の方針が示唆されるので、実用段階までの最適化が少ない合成で短期間で可能である。

このようにバーチャルスクリーニングに基づく創薬には利点が多いが、当社では独自に開発してきたソフトウェアを用いて成功しており、市販ソフトウェアを導入して形だけ真似ても決して成功しない。分子設計の問題は、2次方程式を解くのと違って、唯一解が存在するわけではなく、どんな手順によっても同じ解に行き着くということはない。例えば自動ドッキング法という同じ呼び名を冠していても、基づくコンセプトや科学的理解によって、さらにはソフトウェアへの実装法によって計算結果が大きく異なり、有用な解が得られないことが多い。

■当社における成功例

多くの炎症アレルギー性慢性疾患についてNFκBの関与が知られている。NFκBは、細胞質中に存在