

なお、現在利用可能なケミカルゲノミクス情報の公共データベースとして、ほかに DrugBank<sup>8</sup>がある。このデータベースは、米国食品医薬品局 (FDA) で承認された薬物とその標的遺伝子に関する情報を提供している。

#### 4. CGBVSのためのアルゴリズム：サポートベクターマシンを用いた相互作用学習モデル

相互作用パターンの抽出、そしてリガンド予測の手段として、学習アルゴリズムであるサポートベクターマシン (SVM)<sup>9</sup>が利用可能である。SVM は、2クラス分類器の一種であり、与えられた2つのグループに属する特徴ベクトルを最大マージンで分離するような超平面を構築する。ここで、最大マージンとは、分離した超平面から各サンプル間までの最短距離を指す。

我々は、この SVM を用いて、化合物-タンパク質相互作用の有/無を判別する手法を開発した。その手法の流れを図1に示す。まず、収集した相互作用をベクトルとして表現するために、各化合物の化学構造、各タンパク質のアミノ酸配列について、様々な属性 (記述子と呼ぶ) を計算する。次に、正例 (相互作用する化合物-タンパク質ペア) および負例 (相互作用しない化合物-タンパク質ペア) に対応する記述子をそれぞれ組み合わせて特徴ベクトルを構成し、SVM を用いて学習モデルを構築する。このモデルが得られると、(未知の化合物-タンパク質ペアに相当する) 新しいベクトルが相互作用 有/無 のどちらのクラスに属するか、を予測することができる。

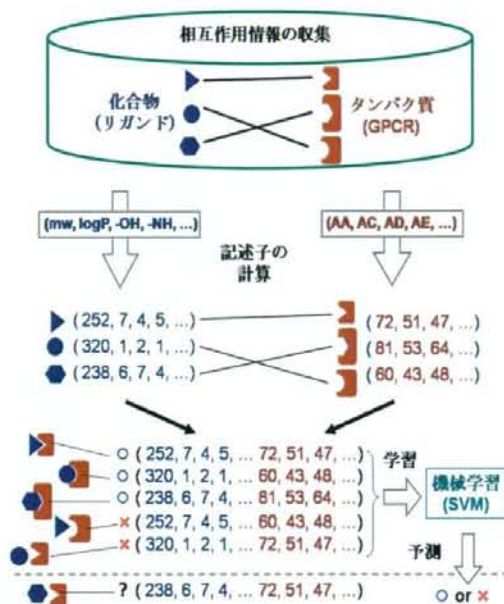


図1 CGBVS の流れ

#### 5. 交差検定法によるモデルの評価

既存の VS 手法との比較検討を行うため、今回開発した CGBVS と LBVS との予測性能を比較した。収集した化合物-GPCR 相互作用を用いて、負例を交換しながら 5 分割交差検定法 (fivefold cross-validation) を試行した。ただし、負例については、データが入手できなかったため、ここでは化合物-タンパク質ペアをランダムに組み合わせて生成した。交差検定の結果、最近傍法を用いた LBVS では  $84.4 \pm 0.3\%$ 、CGBVS では  $91.6 \pm 0.2\%$  の相互作用を正しく予測した。また、ROC 曲線からも、CGBVS の予測性能の高さが確認された (図2)。したがって、ケミカルゲノミクス情報の活用がリガンド予測性能の向上につながったといえる。なお、予測に要する計算的負荷が一般的な LBVS によるものとほとんど変わらないことから、CGBVS は大規模スクリーニングに十分適用可能と考えられる。

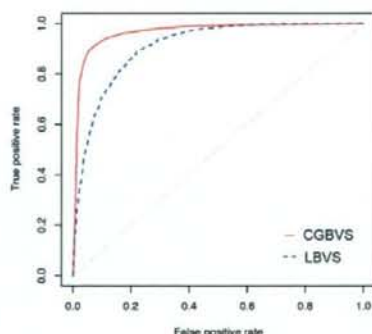


図2 ROC 曲線による相互作用予測性能の比較。赤い実線が CGBVS、青い破線が最近傍法を用いた LBVS を示す。

## 6. ヒト $\beta_2$ アドレナリン受容体リガンド予測への適用

我々が収集した化合物-GPCR 相互作用情報は、今までの研究により「強く結合する」と知られているもののみであり、その他の大部分の化合物-GPCR ペア間の相互作用の有無は不明である。我々の疑問は、CGBVS が期待に反して相互作用すると予測したペアは本当に相互作用しないのか、ということである。そこで、*in vitro*での実験により、予測された相互作用スコアと実際の相互作用の有無との関連性を確認した。

まず、ヒト $\beta_2$ アドレナリン受容体 ( $\beta_2$ AR) を標的 GPCR とし、構築した学習モデルを用いてリガンド予測を行った。リガンド予測の対象化合物は、他 GPCR のリガンドとして知られている 826 化合物とした。そして、CGBVS により予測された $\beta_2$ AR リガンド候補上位 50 の化合物のうち、文献・特許調査により 14 種の化合物について $\beta_2$ AR との相互作用に関する報告を確認した(図 3A 左)。さらに、残りの相互作用不明な化合物のうち、入手可能な 21 種類について *in vitro* 結合阻害実験を行ったところ、17 種類の化合物が相互作用 ( $10^{-5}$ M < IC<sub>50</sub> <  $10^{-3}$ M) を示した(図 3A 右)。結合阻害実験のヒット率は 81% (17/21) にのぼり、ここにおいても高い予測的中率が示された。

一方、下位 50 化合物については、 $\beta_2$ AR リガンドとして報告されているものは文献および特許調査では確認されなかった(図 3B 左)。さらに、入手可能な 9 化合物についても結合阻害実験を行ったが、2 個の化合物が同程度の強さの相互作用を示したものの、残りの 7 化合物は相互作用を示さなかった(図 3B 右)。

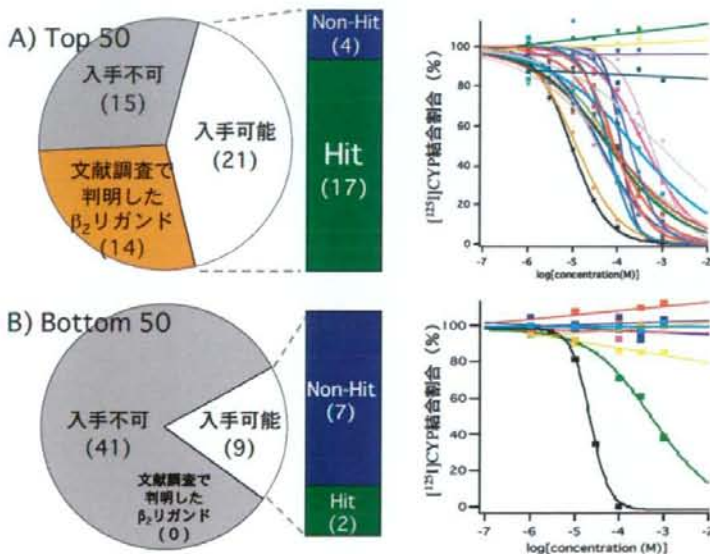


図3  $\beta_2$ AR リガンド予測結果の検証  
予測スコア上位 50 (A) と下位 50 (B) の化合物に対する調査・実験結果を示す。

左：文献調査および実験検証で判明した化合物の内訳。

右： $[^{125}\text{I}]$ -シアノピンドロールに対する結合阻害曲線。縦軸が阻害の割合、横軸が各化合物の濃度を示す。

これらの予測結果を LBVS によるものと比較したのが図 4 である。結合阻害実験で相互作用を確認した化合物の半数近くは、LBVS ではスコアが低かった。実際に、これらの化合物は、典型的な $\beta_2$ AR 作用薬の構造(カテコラミン骨格、イソプレナリン誘導体)および $\beta_2$ AR 拮抗薬の構造(アリールアルキルアミン誘導体)とは異なる多様な骨格を持っており、化合物の構造類似性に基づく従来の方法では発見が困難なリガンド群である。また、これらの化合物の中には、ニューロペプチド受容体アンタゴニストなど、従来はペプチド受容体に作用する化合物として知られていたものも含まれており、遠縁にあたる $\beta_2$ AR とも相互作用することが今回の結合阻害実験により確認



された。以上から、ケミカルゲノミクス情報が、リガンド予測精度の向上のみならず、新規骨格を持つリガンドの検出にも有用であることが示唆された。

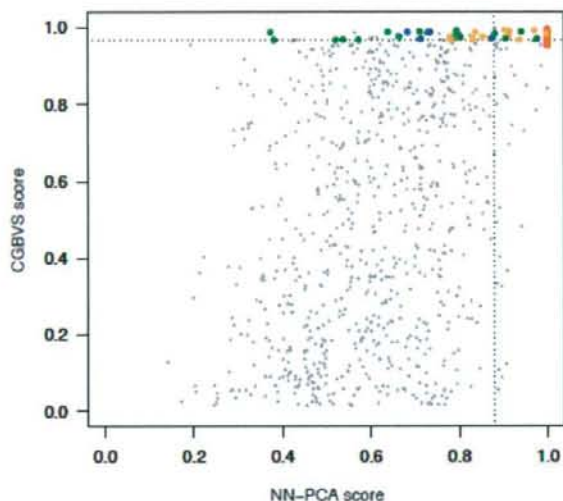


図4 CGBVSとLBVSによる $\beta_2$ ARリガンド予測結果の比較

各点が化合物であり、縦軸はCGBVS、横軸はLBVS（主成分空間における最近傍法）による相互作用予測スコアを示している。文献調査および結合阻害実験の結果を以下の色分けにて表示した。

- 既知  $\beta_2$ AR リガンド
- 文献調査  $\beta_2$ AR リガンド
- 相互作用あり（結合阻害実験）
- 相互作用なし（結合阻害実験）

なお、図中の点線は、各手法において上位50位のスコアを示す。

## 7. おわりに

従来、生物活性を示す化合物の探索には、化合物の構造類似性がその指標とされてきた。しかし、化合物の構造類似性だけでタンパク質との多種多様な相互作用を見出すには限界があり、新しい探索手法の開発が望まれていた。

我々は、「ケミカルゲノミクス情報の中から相互作用パターンを抽出する」という新しいアプローチを試み、(1)化合物-GPCR 質間相互作用データベース GLIDA を開発し、(2)学習アルゴリズムを用いた予測モデルにより、GPCR リガンドを精度よく予測できることを実証した。

なお、 $\beta_2$ AR の立体構造が昨年決定された<sup>10</sup> ことを受けて、我々は SBVS との予測性能比較も行っており、その結果、CGBVS が SBVS よりも高精度で $\beta_2$ AR リガンドを予測することを確認している。

我々が開発している CGBVS は、標的タンパク質のリガンド情報が無いケースにも適用可能であり、実際に現在、オーファン GPCR を標的としたリガンド予測を行っている。タンパク質の立体構造情報を必要としない点は、詳細な 3D 構造が不明な GPCR にとって、魅力的なりガンド予測手法といえる。将来的には、結合阻害定数 ( $K_i$  値) など定量的な活性データから回帰分析を行うことにより、相互作用の強さを反映させたリガンド予測手法への拡張を行う予定である。

最後に、ケミカルゲノミクス情報を利用するという新規なアプローチは、GPCR に限らずすべてのタンパク質に適用可能であり、化合物-タンパク質相互作用の理解、ひいては創薬プロセスの効率化に繋がることが期待される。

## 8. 参考文献

1. Dobson, C. M. Chemical space and biology. *Nature* **432**, 824–828 (2004).
2. Muegge, I. & Oloff, S. Advances in virtual screening. *Drug Discov. Today Technol.* **3**, 405–411 (2006).
3. Oprea, T. I. & Matter, H. Integrating virtual screening in lead discovery. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **8**, 49–58 (2004).

4. MacBeath, G. Chemical genomics: what will it take and who gets to play? *Genome Biol.* **2**, COMMENT2005 (2001).
5. Salemme, F. R. Chemical genomics as an emerging paradigm for postgenomic drug discovery. *Pharmacogenomics* **3**, 257–267 (2003).
6. Okuno, Y., Yang, J., Taneishi, K., Yabuuchi, H. & Tsujimoto, G. GLIDA: GPCR-ligand database for chemical genomic drug discovery. *Nucleic Acids Res.* **34**, D673–D677 (2006).
7. Okuno, Y. *et al.* GLIDA: GPCR--ligand database for chemical genomics drug discovery--database and tools update. *Nucleic Acids Res.* **36**, D907–D912 (2008).
8. Wishart, D. S. *et al.* DrugBank: a comprehensive resource for in silico drug discovery and exploration. *Nucleic Acids Res.* **34**, D668–D672 (2006).
9. Vapnik, V. N. *The Nature of Statistical Learning Theory* (Springer, New York, 1995).
10. Cerezov, V. *et al.* High-resolution crystal structure of an engineered human beta2-adrenergic G protein-coupled receptor. *Science* **318**, 1258–1265 (2007).

## 膜タンパク質の結晶化技術の新展開及び創薬バリューチェーンの紹介

井上 豪,<sup>a,b</sup> 安達宏昭,<sup>a</sup> 村上 聡,<sup>c</sup> 高野和文,<sup>a</sup> 松村浩由,<sup>a</sup>  
 森 勇介,<sup>a</sup> 福西快文,<sup>d</sup> 中村春木,<sup>b,e</sup> 木下誉富,<sup>f</sup> 仲西 功,<sup>g</sup>  
 奥野恭史,<sup>h</sup> 南方聖司,<sup>a</sup> 下条真司,<sup>b,h</sup> 坂田恒昭<sup>b,h</sup>

## New Progressing Crystallization Technology of Membrane Protein and Introduction of Pharmaceutical Innovation Value Chain

Tsuyoshi INOUE,<sup>a,b</sup> Hiroaki ADACHI,<sup>a</sup> Satoshi MURAKAMI,<sup>c</sup> Kazufumi TAKANO,<sup>a</sup>  
 Hiroyoshi MATSUMURA,<sup>a</sup> Yusuke MORI,<sup>a</sup> Yoshifumi FUKUNISHI,<sup>d</sup> Haruki NAKAMURA,<sup>b,e</sup>  
 Takayoshi KINOSHITA,<sup>f</sup> Isao NAKANISHI,<sup>g</sup> Yasushi OKUNO,<sup>g</sup> Satoshi MINAKATA,<sup>a</sup>  
 Shinji SHIMOJO,<sup>b,h</sup> and Tsuneaki SAKATA<sup>b,h</sup>

<sup>a</sup>Graduate School of Engineering Osaka University, 2-1 Yamada-Oka, Suita City 565-0871, Japan, <sup>b</sup>NPO BioGrid Center Kansai, 1-4-2 Shinsenri-higashi-Machi, Toyonaka City 560-0082, Japan, <sup>c</sup>Department of Cell Membrane Biology, Institute of Scientific and Industrial Research, Osaka University, 8-1 Mihogaoka, Ibaraki City 567-0047, Japan, <sup>d</sup>National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), 2-41-6, Aomi, Koto-ku, Tokyo 135-0064, Japan, <sup>e</sup>Research Center of Structural and Functional Proteomics, Institute for Protein Research, Osaka University, 3-2 Yamada-Oka, Suita City 565-0871, Japan, <sup>f</sup>Department of Applied Biochemistry, Graduate School of Agriculture and Life Sciences, Osaka Prefecture University, 1-1 Gakuen-cho, Sakai City 599-8531, Japan, <sup>g</sup>Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University, 46-29 Yoshidashimoadachi-cho, Sakyo-ku, Kyoto 606-8501, Japan, and <sup>h</sup>Cybermedia Center, Osaka University, 5-1 Mihogaoka, Ibaraki City 567-0047, Japan

(Received November 15, 2007)

We have recently established a Pharmaceutical Innovation Value Chain in collaboration with the SOSHO project (<http://www.so-sho.jp>) and BioGrid Project (<http://www.biogrid.jp/>) to accelerate new drug development. The SOSHO project provides novel crystallization technology with laser-irradiation and stirring growth methods, and the BioGrid Project is developing the software necessary for the *in silico* screening of promising drugs and the simulation of biological responses to proteins. In this paper, we report the recent research work on the crystallization of membrane proteins and the development of a method for *in silico* drug discovery.

**Key words**—*in silico* drug discovery; membrane protein; novel crystallization method; pharmaceutical innovation value chain

<sup>a</sup>大阪大学大学院工学研究科 (〒565-0871 吹田市山田丘 2-1), <sup>b</sup>NPO 法人バイオグリッドセンター関西 (〒560-0082 豊中市新千里東町 1-4-2), <sup>c</sup>大阪大学産業科学研究所 (〒567-0047 茨木市美穂ヶ丘 8-1), <sup>d</sup>独産総研・生物情報解析センター (〒135-0064 東京都江東区青海 2-41-6), <sup>e</sup>大阪大学蛋白質研究所 (〒565-0871 吹田市山田丘 3-2), <sup>f</sup>大阪府立大学理学系研究科 (〒599-8531 堺市中区学園町 1-1), <sup>g</sup>京都大学大学院薬学研究科 (〒606-8501 京都市左京区吉田下阿達町 46-29), <sup>h</sup>大阪大学サイバーメディアセンター (〒567-0047 茨木市美穂ヶ丘 5-1)

\*e-mail: inouet@chem.eng.osaka-u.ac.jp

本総説は、日本薬学会第 127 年会シンポジウム S30 で発表したものを中心に記述したものである。

## 1. はじめに

20 世紀における科学の 3 大発見の 1 つにペニシリンの発見がある。本格的な医薬品の開発はこれを機に始まったと言われ、今では分子設計の手法も確立され、これを加速するためのコンビナトリアルケミストリー (CC) や、ロボティックスシステムを駆使したハイスループットスクリーニング (HTS) といった革新的技術も開発されている。一方、IT 技術を駆使して、バイオインフォマティクスによる新規ターゲットタンパク質の特定、リード化合物の創製や最適化を行い、研究開発のための費用の圧



縮と期間短縮が試みられている。また、わが国でもたんばく 3000 プロジェクトなどにより、ヒトやマウスも含めた疾患関連及び病因となるタンパク質の立体構造が次々と明らかとなっており、標的病因タンパク質の 3 次元立体構造に基づいた、より高効率な薬物設計手法である Structure-Based Drug Design (SBDD) の手法開発が重要性を増している。しかし、製薬会社における薬品開発では、標的タンパク質のうち約半分は GPCR などの膜タンパク質であり、その結晶化は容易ではなく、SBDD を実施することができない場合が多いことが知られている。

われわれは、立体構造を基にした医薬品の開発を加速するため、大阪大学工学研究科を中心に「創晶プロジェクト」(<http://www.so-sho.jp/>) を立ち上げ、レーザー照射や溶液かく拌の技術を導入した革命的な結晶化手法の開発を行い、水溶性タンパク質を中心に、その結晶化にフェムト秒レーザーの照射が結晶化の確率向上と時間短縮に効果があり、溶液のかく拌が高品質化に効果があることを示した。これが、常にサンプルの安定性が問題となっている膜タンパク質の結晶化に特に有効であることが最近判明し、いくつかの成功例が挙がってきた。一方、NPO 法人関西バイオグリッドを中心として、量子力学計算を取り入れた、オリジナリティーの高い、新しい計算方法で、酵素の活性部位に結合し得る有機低分子化合物をスクリーニングする方法が開発されている (<http://www.biogrid.jp/npo/>)。最近これら 2 つのグループを中心に異分野で連携して創薬研究を推進する「創薬バリューチェーン」を構築した。これには、化合物空間という、新たな阻害剤のインシリコ探索法を開発している研究者、製薬企業で豊富に経験を積んだ大学機関の研究者、さらには、長年複素環化合物の新規合成法の開拓を行ってきた研究グループも参加し、市販品を使った探索から、薬効評価、複合体の X 線構造解析、化合物の最適化、インシリコ ADME の計算を駆使した毒性や代謝評価など、薬剤候補化合物の設計提案が可能な一連の研究グループも参加している。ここでは、創薬バリューチェーンの中で結晶化及び構造解析を担当している創晶プロジェクトの技術を中心に、実際に結晶構造を解析し、インシリコでの阻害剤候補化合物の探索を行った実際例を紹介する。

## 2. 創晶プロジェクト

インシリコ創薬における阻害剤候補化合物の探索だけでなく、サブ  $\mu\text{M}$  オーダーで効果のある化合物からの SBDD を展開する際に、酵素の Native 及び阻害剤との複合体の構造情報があれば、圧倒的に薬剤開発が速く進む。したがって、NMR や X 線構造解析などの技術はインシリコ創薬にとって必須である。標的タンパク質の構造を解析する際に、NMR 法では標的タンパク質の分子量に限界があるが、X 線構造解析法にはなく、現在のところ最も強力な実験手法であるが、標的タンパク質の結晶を得る必要がある。

一般に、タンパク質を結晶化するには、その溶液に、沈殿剤と呼ばれる、塩、高分子試薬、有機溶媒を混合し、徐々にその濃度を上げることにより溶解度をさげて結晶核を発生させ、静置条件下で結晶成長させて目的タンパク質の結晶を得ている。タンパク質によって結晶化に最適な沈殿剤の種類やその濃度は大きく異なり、過去のタンパク質の結晶化条件をデータベース化されたものを参照するなど (<http://www.bmcd.nist.gov:8080/bmcd/bmcd.html>)、類縁のタンパク質の結晶化条件を応用したり、市販のスクリーニングキット [Crystal Screen and Crystal Screen 2 (Hampton Research), Wizard Screens I and II (Emerald BioStructures), Personal Structure Screens 1 and 2 (Molecular Dimensions) など] を用いて結晶化を試みるのが一般的である。様々な結晶化の方法が開発されているが、ハンギングドロップ蒸気拡散法、シッティングドロップ蒸気拡散法、サンドイッチ蒸気拡散法、静置バッチ法 (マイクロバッチ法)、自由界面拡散法及びゲルチューブ法 (GCB 法)、透析法、種結晶化法 (マクロシーディング法とマイクロシーディング法)、不溶性の液体を用いた浮遊法などが知られている。最近では、少量化やハイスループット化が進められている。



井上 豪

大阪大学大学院工学研究科応用化学専攻・准教授、工学博士、1989 年大阪大学工学部卒業、1994 年博士課程修了、1994 年助手、1999 年講師、2002 年より現職、2001-2004 科学技術振興機構さきがけ研究員兼務、大阪バイオサイエンス研究所客員研究員、創晶技術顧問など、[専門] 構造物理化学、構造生物学

しかし、これらタンパク質の結晶化方法は、主に構造解析を専門とする研究者によって開発されてきたため、X線結晶構造解析のルーツである、有機低分子化合物の構造解析をテーマとしてきた専門家が用いた結晶化法が応用され、例えば、結晶成長中においては、溶液を静置することが重要で、装置の振動等を極力排除することが重要と考えられてきた。このため、結晶品質に悪影響を与えると考えられる、重力による浮力対流を排除するため、宇宙空間での結晶育成が行われている。このほか一般的な結晶品質の向上のための方策として、結晶化サンプルの純度や鮮度、沈殿剤濃度、pH、添加剤、蒸気拡散の速度、温度、結晶化ドロップの容量、結晶化溶液の混合方法、結晶化方法、結晶化用の容器、試薬の製造会社などが考慮されてきたが、試行錯誤する必要があった。それでも、これら様々な結晶化の条件を試す必要があることから、サンプル量の少量化、ハイスループット化が進められたが、膜タンパク質を中心に結晶化が非常に困難なものも多く、インシリコ創業のボトルネックとなっていた。

そこで、大阪大学工学研究科を中心に、フェムト秒レーザー照射による結晶核発生技術、溶液かく拌による高品質結晶育成技術を駆使した、従来とは全く異なるタンパク質結晶育成技術を開発し、その技術を基に2005年に大学発ベンチャーとして株式会社を設立し、公的なサンプルについては共同研究として結晶解析する創品プロジェクトも設けている。

### 2-1. レーザー照射による核発生制御技術の開発

大阪大学の佐々木研究室では、以前から電界センサーやテラヘルツ波発生特性が優れている有機非線形光学結晶 4-dimethylamino-N-methyl-4-stilbazolium tosylate (DAST) の高品質化技術の研究を実施している。<sup>1-3)</sup> 結晶そのものを有機材料として利用するには、大型化、高品質化が必要で、過飽和度の高い状態で核を発生させ、結晶を立てて成長させるなど工夫が施されたが、自然核発生を完全には制御できず、結晶サイズの不均一性など材料としては不向きな点が課題として残り、低過飽和溶液からの結晶核の発生が古くより検討された。しかし、核発生は、一般に物理的には2次の相転位だという以外にメカニズムが未解明で、何か刺激が必要だという以外に解決策がなかった。同研究室でレーザーアブレーションによるAlN薄膜やBCN薄膜の研究が

行われていたのが幸いし、<sup>4-7)</sup> 容器中の溶液に刺激を与えるのにはレーザーがよいという発想に至っている。ただし、1996年のPhysical Review Letters (PRL) に報告されているように、高過飽和尿素溶液にNd:YAGレーザーを照射すると電界効果で結晶が析出するという内容の論文<sup>8)</sup>が掲載されており、核発生にレーザー照射が有効だという、厳密な第一発見者ではないものの、レーザー照射を低過飽和の溶液で行い、結晶成長に利用するという初めての試みがなされた。その結果、通常は自然核発生が起こらない低過飽和度溶液からでも、Nd:YAGレーザー照射により核発生を誘起できることが判明した。

### 2-2. 溶液かく拌による高品質結晶育成: CsLiB<sub>6</sub>O<sub>10</sub>の実験

紫外レーザー光は、機械材料・構造体等のマクロ加工、電子産業分野での超微細加工、半導体リソグラフィ用光源、目の屈折矯正手術(LASIK)などの医用等、多くの分野にその応用が期待されているが、従来の紫外レーザー光源である稀ガスハライド系のエキシマーレーザーでは多くの課題が残されていた。これに対して森らは、紫外線レーザー開発を目的として1993年に組成がCsLiB<sub>6</sub>O<sub>10</sub>(CLBO)の新しい非線形光学材料の発見に成功した。<sup>9-11)</sup>しかし、高出力紫外光が発生すると、自身の発する紫外レーザーにより出力の低下やレーザー損傷が問題となった。可能な限りレーザー損傷耐性の高いCLBO結晶の育成技術の開発が必要となり、最終的には結晶育成条件の最適化が重要と考え、融液や溶液の制御を行い、結晶育成の本質に迫ることが試みられた。

1998年には、種々の検討の結果、CLBO溶液全体をかく拌しながら育成することで高品質化が試みられ、出力が通常の方法よりも最大で2.5倍向上することが分かった。その後、溶液かく拌条件の最適化を徹底的に行ってCLBO結晶の高品質化・均一化がより進み、この高レーザー耐力CLBO結晶を用いて、三菱電機㈱と共同で196Wの高繰り返しグリーンレーザー光(波長:532nm、繰り返し10kHz)から42Wという世界最高出力のNd:YAGレーザーの第4高調波(266nm光)発生に成功することができた。<sup>12)</sup>この結果は、高出力全固体紫外光源の実用化という観点から非常に意義深いものであるとともに、溶液かく拌という手法が高品質結晶



化に効果的だということを示したという点でも重要であったと思われる。最近では、三菱電機と共同で10 Wを超えるNd:YAGレーザーの5倍高調波(213 nm)光発生、ニコンと共同で1547 nm光の第8高調波(193 nm)発生にも成功している。

**2-3. 新規結晶化技術のタンパク質の結晶化への応用** タンパク質の結晶化が他の材料に比べ難しい理由の1つに、準安定領域が極めて大きく、過飽和度をかなり高くしないと自然核発生が起こらず、運よく核を得ても高過飽和溶液中での結晶成長は結晶品質が悪く、大量析出による多結晶化などの問題が生じる。したがって、より低過飽和の溶液における強制的な結晶核の発生と、低過飽和の溶液のままの持続的な結晶育成が重要である。森らは、DASTの結晶化で試みたレーザー照射の技術や、CLBOで実績を積んだ溶液かく拌による高品質結晶育成技術を、低過飽和溶液中でのタンパク質の結晶化に適用し、従来とは全く異なるタンパク質結晶育成技術を開発した。

高野、安達、森らは、まず最初にリゾチームを使って溶液かく拌技術の開発に着手し、従来法よりも早い成長速度で大きな結晶ができることを見出した。一方、レーザー照射による結晶核発生に関しては、Nd:YAGレーザーの出力を上げても、可視光や紫外レーザー光の照射を試みても駄目であったが、工学研究科応用物理学専攻の増原研究室の協力を得て、フェムト秒レーザーを照射する実験を試みたところ、照射回数に応じて発生した結晶核の数が増減することが判明した。さらに、グルコースイソメラーゼを使った実験で、従来法では結晶核が発生しない低過飽和度溶液でも、フェムト秒レーザーの照射により結晶核を強制的に発生させることに成功した。当時筆者らは、トリパノソーマ由来プロスタグランジンF<sub>2α</sub>合成酵素の結晶化に苦労していたが、フェムト秒レーザー照射により、数ヵ月掛かった結晶化がわずか2-3日で結晶核の発生に成功し、フェムト秒レーザーの照射が結晶核の発生に効果があることが実証できた。<sup>13)</sup>

アステラス製薬との共同研究で、human triosephosphate isomerase (TIM)の結晶化実験にこれらの技術を適用したところ、従来法で2.8 Åしか得られなかったが、溶液かく拌法のみでの適用で、1.2 Å分解能までX線回折が起こり (Fig. 1)、最終

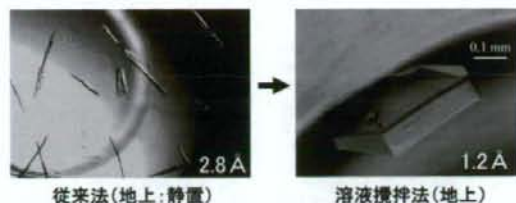


Fig. 1. Human Triosephosphate Isomerase Crystals Obtained with the Conventional (Left) and Stirring Methods (Right)

的に1.4 Åの構造解析に成功した。<sup>14)</sup>

**2-4. 膜タンパク質の結晶化等への応用** 2003年には、阪大産研の村上が創晶プロジェクトに参加し、2002年に*Nature*の表紙を飾った大腸菌由来多剤排出トランスポーター膜タンパク質AcrB<sup>15)</sup>の結晶化にフェムト秒レーザーの照射技術が試された。通常は結晶核の発生が起こらない、低過飽和度溶液に照射したところ、強制的な結晶核の発生に成功し、結晶からの回折分解能が3.5 Åから2.3 Åに、さらにレーザー照射結晶核発生後、溶液かく拌しながら育成すると2.1 Å分解能まで飛躍的に向上した (Fig. 2)。<sup>16)</sup>

また、膜タンパク質SecDFの高品質結晶育成 (従来法の5.6 Å分解能から3.74 Å分解能に向上)<sup>17)</sup>の結晶化においても、レーザー核発生と溶液かく拌の2つの技術の有効性が実証された。

一般に、膜タンパク質の結晶化を行うためには、高純度に精製し、さらに高濃度に濃縮する必要がある。水溶性タンパク質と異なり、精製の段階から界面活性剤等を使用して可溶化する必要がある。膜に埋もれた状態から可溶化されて生体中とは異なる環境下に置かれるため、大きな不安定化要因となる。少しでもサンプルの劣化を防ぐために、結晶化では高濃度の沈殿剤が用いられ、結晶育成のための時間を長く取れず、これが膜タンパク質の結晶の品質に悪影響を与えていると思われる。

レーザー照射による核発生までの時間を節約し、結晶育成中でのかく拌による高品質化に時間を掛けることができる点で、レーザーかく拌とかく拌の組み合わせは、まさに膜タンパク質に最適な結晶化技術である可能性が高い。

一方、tRNA修飾酵素であるMnmAとtRNA<sup>Glu</sup>の複合体 (Fig. 3)結晶の高品質化 (従来法では4~5 Åであった分解能が3.1 Å分解能に向上)な





Fig. 2. Typical Crystallization Results for AcrB Crystals Obtained from a Highly Supersaturated Solution (Left)

Conventional growth (without laser irradiation, top in the right panel) and laser-irradiated growth (bottom in the right panel) in a low-range supersaturated solution.



Fig. 3. Crystal Structure of an RNA Sulfuration Enzyme Mnma Thiouridylase-tRNA Complex

ど、高品質の結晶が得られ難いサンプルに対しても有効であった。<sup>18,19)</sup> 今後益々結晶化が困難なサンプルについて依頼が増えると予想され、さらなる高効率な結晶化技術の開発が望まれている。

### 3. 通常の *In Silico* での探索手法とその問題点

インシリコ創薬では、計算機上で、標的タンパク質の基質結合部位に、化合物ライブラリーに含まれる多数の薬物分子を順次結合させ、複合体構造と結合自由エネルギー ( $\Delta G$ ) を予測し、ドッキングス

コア (以下スコアと呼ぶ) のよい化合物をヒット化合物候補として採択する。ドッキング計算における  $\Delta G$  の予測誤差は約 3 kcal/mol あり、ヒット化合物の示す  $\Delta G$  値とほぼ同程度であるため、インシリコスクリーニングのヒット化合物予測精度は、ランダムスクリーニングよりはましとは言える。しかし、それでもヒット率はいまだに低い。その理由は、複合体構造の予測が困難であるからである。たとえ、タンパク質-化合物ドッキング計算を、長時間の分子動力学計算 (MD) を利用して行っても、誤った予測構造からの  $\Delta G$  の計算は実測値との差が大きく、ヒット率は低下してしまう。複合体構造予測については、実用に供するほどの精度を持った一般的な手法は成熟していないのが現状である。

**3-1. 新規なインシリコ創薬の手法の開発と創薬バリューチェーンの構築** NPO 法人バイオグリッド関西の研究グループでは、タンパク質-化合物相互作用行列を作成し、これを用いた新しいインシリコ創薬の手法である Multiple target screening (MTS) 法<sup>20)</sup> と Docking score index (DSI) 法<sup>21)</sup> を開発し、ヒット化合物予測率を飛躍的に向上させることに成功しており、新しいインシリコでの化合物探索手法の確立が進んでいる。さらに、大阪大学客員教授である坂田らを中心に、絆セルフサイエンス、創薬プロジェクト、絆プロテインクリスタルなどのベンチャーのほか、NEC や富士通九州など大手メーカーも結集して創薬バリューチェーンと呼ばれる研究グループを結成し、製薬企業との橋渡し役を担うことを目的として、公的研究機関等からの新規な標的タンパク質を用いたインシリコ創薬が可能な研究チームが編成された (Fig. 4)。まずはその特徴的なインシリコ探索の技術について簡単に述べる。

**3-2. Multiple target screening (MTS) 法<sup>20)</sup>** 通常のインシリコスクリーニング手法においては、標的タンパク質に結合する化合物を、結合の強さを示すスコアの高い順に選択するが、いまだヒット率は低い。その理由の 1 つとして、標的タンパク質に対し高いスコアを示す化合物を選択すると、その化合物は他のタンパク質に対しても高いスコアを示すことが多く、かならずしも標的タンパク質に対して選択的に強い結合性を示さないことが挙げられる。これに対し、福西、中村らが開発した MTS 法では、

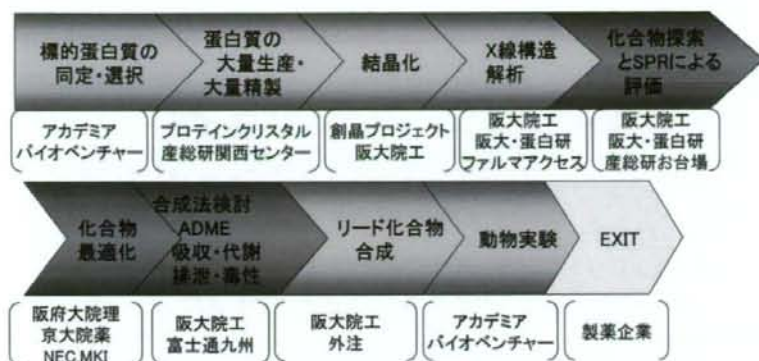
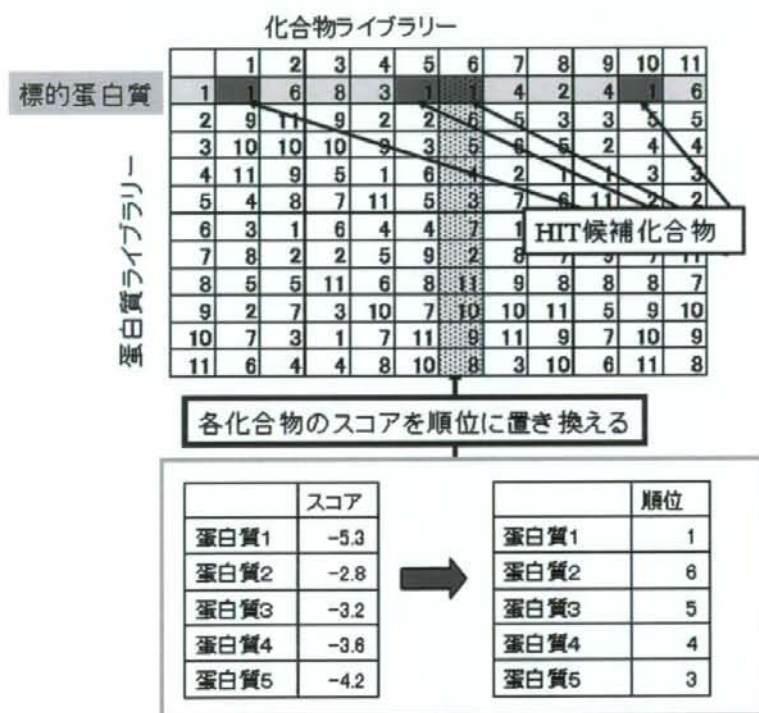
Fig. 4. The Crystal Structure of Orotidine 5'-monophosphate Decarboxylase from *Plasmodium falciparum*

Fig. 5. The Flow Chart of Pharmaceutical Innovation Value Chain

まず、化合物ライブラリーに対して、標的タンパク質以外にも多数のタンパク質を用意し、総当たり式にドッキング計算を行って、タンパク質-化合物相互作用行列を作成し、個々の化合物が多数のタンパク質に対して結合する度合いを調べ、標的タンパク質に最も強く結合する化合物をヒット化合物の候補とする手法を考案している (Fig. 5)。詳細は、福

西らの書いた総説などを参照されたいが、<sup>20)</sup> 実際には、COX-2やHIVプロテアーゼ1など5種類の標的に対して、MTS法を適用し、既知の阻害剤を探索することを行った結果、計算で予測した上位1%の化合物群の中に、ランダムスクリーニングで探索する場合と比べて、約40倍のエンリッチメントを得ることが示されている。



**3-3. Docking score index (DSI) 法<sup>21)</sup>** DSI 法は、MTS 法と同様にタンパク質—化合物相互作用行列を用い、既知の活性化化合物と類似の化合物を検索する方法として開発された。MTS 法が、ドッキング計算のため標的タンパク質の 3 次元立体構造を必要とするのに対して、DSI 法ではこれを必要とせず、MTS 法で用いたタンパク質—化合物相互作用行列を用いて、化合物の類似性検索を行う。通常、化合物の類似性は、分子量や疎水性等の分子の物理化学的性質を表す指標で示されるが、ここでは、多くのタンパク質の結合ポケットへの結合の度合いを示すスコアの集合から、統計的に類似性を抽出する。したがって、DSI 法では、標的タンパク質の立体構造の情報の代わりに阻害剤の情報が必要で、これが多いほど統計的な類似性検索の予測精度が上昇する。本方法は、G タンパク質共役型受容体 (GPCR) のように、立体構造の解析が困難な膜タンパク質に対して阻害剤検索を行う場合に特に威力を発揮すると期待されている。

実際に、マクロファージ遊走阻害因子 (macrophage migration inhibitory factor; MIF) 等の水溶性タンパク質に 4 種類の GPCR を加えた 9 種の標的タンパク質に対して、立体構造が未知という条件の下、それぞれの標的タンパク質に対する活性化化合物の情報を基に DSI 法を適用した結果、化合物ライブラリーから予測上位 1% の化合物を採択したと

き、ランダムスクリーニングに比べて平均約 70 倍のエンリッチメントを得ることが示された。

**3-4. 創薬バリューチェーンでの実施例** 創薬バリューチェーンにおける最初の研究実施例は、熱帯熱マラリア原虫 *Plasmodium falciparum* 由来 Orotidine 5'-monophosphate 脱炭酸酵素の阻害剤探索で得られた。まず創薬プロジェクトにおいて結晶化を行い、筆者らの研究室において 2.6 Å 分解能での構造解析を行った (Fig. 6).<sup>22-23)</sup>

続いて、本酵素の構造情報を利用した MTS 法、及び基質類似の阻害剤の構造情報を利用した DSI 法を適用し、新規骨格を有した阻害剤の探索に関する研究を共同で行った。

まず、化合物ライブラリーについては、あとで購入することを考慮して、ナミキ商事㈱のカatalogから提供されている化合物リストを用い、分子量等が適度な 100 万個の化合物から、MTS 法、DSI 法のそれぞれの手法を適用し、上位 5000 化合物リストアップした。共通してリストされた化合物もあったため、その和集合を取り、7622 個まで絞込んだ。続いて、NEC 社の佐久間、高田らにより、MMPB (Poisson-Boltzman) SA (surface area) 法による再ドッキング計算を行い、上位 200 個程度までを発注した。一方、京都大学の奥野らが、7622 個の化合物の構造情報を基にして、kmeans 法や kPCA 法を使って 200 種類に分類し、富士通九州の北島らが、

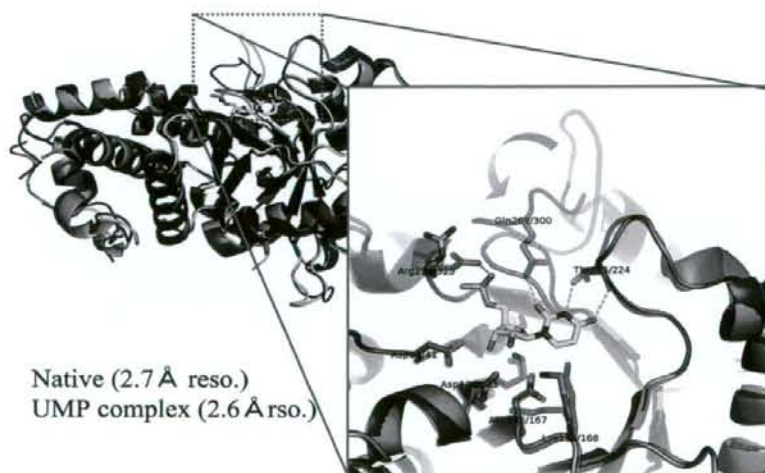


Fig. 6. The X-ray Structure Analysis of Orotidine 5'-monophosphate Decarboxylase from *Plasmodium falciparum*

その分類毎、また化合物毎に、溶解性、LogP 等々の物性情報を付加する作業を分担した。

先の、200 個発注した中で、156 個を購入し、実際に活性測定を行った。100–300  $\mu\text{M}$  の濃度における 1 次スクリーニングでは、156 化合物中 33 個の化合物が酵素活性を 100% 阻害した。続いて、濃度を段階的に下げた状態での活性測定を行い、 $\text{IC}_{50}$  値を測定することができた化合物は、156 個中 15 個存在した。10% 近い高ヒット率で阻害剤候補化合物が得られたことになる (Fig. 7)。

現在、先の 200 種類に分類した化合物群の中に、さらに強い阻害剤がないか化合物の購入と阻害率の測定を検討中である。また、15 種類得られた阻害剤候補化合物との複合体の X 線構造解析も進行中で、類似化合物の複合体構造と阻害活性の相関関係について解明し、ハイブリッド化による強力な阻害剤の開発を予定している。

なお、本手法は、別の酵素を例に、既にある製薬企業によっても実証研究が進められており、100 万化合物の中から 3229 個の候補化合物を検索し、先行して入手できた 915 個の化合物のうち、濃度 90  $\mu\text{M}$  で阻害活性 50% 以上の分子が 335 個得られた。このうち、濃度依存試験を行って  $\text{IC}_{50}$  値の測定を行ったところ、100  $\mu\text{M}$  以下を示した分子が 27 個、20  $\mu\text{M}$  以下を示したのが 8 個発見された。 $\text{IC}_{50}$  値が 100  $\mu\text{M}$  以下を示した分子は合計で 35 個となり、やはり高ヒット率が証明されている。

謝辞 本研究で各種ソフトウェアを利用した阻

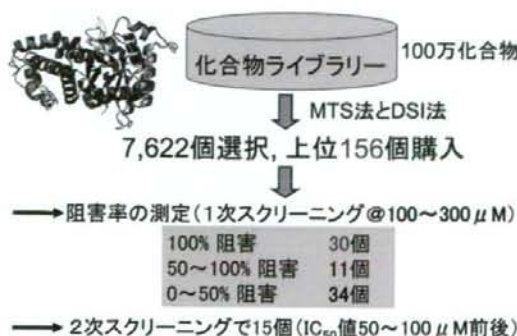


Fig. 7. Results of the *In Silico* Screening with the MTS and DSI Methods for Orotidine 5'-monophosphate Decarboxylase from Human Malaria Parasite *Plasmodium falciparum*

害剤探索における実際の計算に当たり、創薬バリューチェーンのメンバーである、日本電気株式会社・環境研究所の佐久間俊広・高田俊和両氏をはじめ、株式会社富士通九州システムエンジニアリングの北島正人・湯田浩太郎両氏、三井情報開発株式の福岡良忠・奥村利幸両氏らに大変お世話になり、この場をお借りして深謝致します。なお、創品プロジェクトに関する研究は、文部科学省の大学等発ベンチャー創出支援制度をはじめ、NEDO, JST, 大阪北部 (彩都) 地域知的クラスター創成事業「フェムト秒レーザーを用いたタンパク質結晶化と結晶加工に関する技術開発」などの支援を受けました。一方、創薬バリューチェーンに関する研究では、大阪北部 (彩都) 地域知的クラスター創成事業「インシリコでの創薬手法の確立とその実証研究」の一環として行われたものであります。この場をお借りして感謝致します。

## REFERENCES

- Adachi H., Takahashi Y., Yabuzaki J., Mori Y., Sasaki T., *J. Cryst. Growth*, **198/199**, 568 (1999).
- Mori Y., Takahashi Y., Iwai T., Yoshimura M., Yap Y. K., Sasaki T., *Jpn. J. Appl. Phys.*, **39**, L1006–L1008 (2000).
- Adachi H., Nagaoka K., Tsunesada F., Yoshimura M., Mori Y., Sasaki T., Sasaki A., Nagatsuma T., Ochiai Y., Fukasaku N., *Jpn. J. Appl. Phys.*, **41**, L1028 (2002).
- Ogawa T., Okamoto M., Yagi H., Mori Y., Hatta A., Ito T., Sasaki T., Hiraki A., *Diamond Films Technol.*, **6**, 87–94 (1996).
- Ogawa T., Okamoto M., Khin Y. Y., Mori Y., Hatta A., Ito T., Sasaki T., Hiraki A., *Diamond Related Mater.*, **6**, 1015–1018 (1997).
- Okamoto M., Mori Y., Sasaki T., *Jpn. J. Appl. Phys.*, **38**, 2114–2115 (1999).
- Yap Y. K., Kida S., Aoyama T., Mori Y., Sasaki T., *Jpn. J. Appl. Phys.*, **37**, L746–L748 (1998).
- Garetz B. A., Aber J. E., Goddard N. L., Young R. G., Mayerson A. S., *Phys. Rev. Lett.*, **77**, 3475 (1996).
- Mori Y., Kuroda I., Nakajima S., Sasaki T., Nakai S., *Appl. Phys. Lett.*, **67**, 1818 (1995).
- Sasaki T., Mori Y., Kuroda I., Nakajima S., Yamaguchi K., Watanabe S., *Acta Crystal-*



- logr*, **C51**, 2222 (1995).
- 11) Mori Y., Sasaki T., *Ouyoubutsuri*, **66**, 965 (1997).
  - 12) Nishioka M., Kawamura F., Yoshimura M., Mori Y., Sasaki T., Proceedings of the Conference on Lasers and Electro-Optics, CTuF2, 2003.
  - 13) Adachi H., Takano K., Hosokawa Y., Inoue T., Mori Y., Matsumura H., Yoshimura M., Tsunaka Y., Morikawa M., Kanaya S., Masuhara H., Kai Y., Sasaki T., *Jpn. J. Appl. Phys.*, **42**, L798-L800 (2003).
  - 14) Adachi H., Niino A., Kinoshita T., Warizaya M., Maruki R., Takano K., Matsumura H., Inoue T., Murakami S., Mori Y., Sasaki T., *J. Biosci. Bioeng.*, **101**, 83 (2006).
  - 15) Murakami S., Nakashima R., Yamashita E., Yamaguchi A., *Nature*, **419**, 587 (2002).
  - 16) Adachi H., Murakami S., Niino A., Matsumura H., Takano K., Inoue T., Mori Y., Yamaguchi A., Sasaki T., *Jpn. J. Appl. Phys.*, **43**, 10B, L1376-L1378 (2004).
  - 17) Tsukazaki T., Mori H., Fukai S., Numata T., Perederina A., Adachi H., Matsumura H., Takano K., Murakami S., Inoue T., Mori Y., Sasaki T., Vassilyev D. G., Nureki O., Ito K., *Acta Crystallogr.*, **F62**, 376 (2006).
  - 18) Numata T., Ikeuchi Y., Fukai S., Adachi H., Matsumura H., Takano K., Murakami S., Inoue T., Mori Y., Sasaki T., Suzuki T., Nureki O., *Acta Crystallogr.*, **F62**, 368 (2006).
  - 19) Numata T., Ikeuchi Y., Fukai S., Suzuki T., Nureki O., *Nature*, **442**, 419 (2006).
  - 20) Fukunishi Y., Mikami Y., Kubota S., Nakamura H., *J. Mol. Graph. Model.*, **25**, 61-70 (2005).
  - 21) Fukunishi Y., Mikami Y., Takedomi K., Yamanouchi M., Shima H., Nakamura H., *J. Med. Chem.*, **49**, 523-533 (2006).
  - 22) Krungkrai S. R., Tokuoka K., Kusakari Y., Inoue T., Adachi H., Matsumura H., Takano K., Murakami S., Mori Y., Kai Y., Krungkrai J., Horii T., *Acta Crystallogr.*, **F62**, 542-545 (2006).
  - 23) Tokuoka K., Kusakari Y., Krungkrai S. R., Matsumura H., Kai Y., Krungkrai J., Horii T., Inoue T., *J. Biochem.*, **143**(1), 67 (2008).

## ケミカルゲノミクスに基づくインシリコ創薬

新島 聡, 奥野 恭史

長年、創薬においては、副作用を抑えるべく、単一のタンパク質に選択的に作用して機能を制御する低分子化合物(リガンド)の設計が追求されてきた。しかし一方では、単一の化合物がファミリーの全く異なる複数のタンパク質と作用する例や、単一のタンパク質が多様な化合物と結合する例など、多対多の化合物-タンパク質間相互作用が数多く報告されている(1)。実際に、がん、精神疾患、感染症の治療薬としてすでに有用性が認められている医薬品の中にも、想定外のタンパク質に作用するものが少なくないことが明らかになってきた(2)。最近では、これら多分子標的作用に基づく薬理学が'Polypharmacology'(多重薬理学)と称され注目されつつある(3)。単一の標的タンパク質に作用する薬剤を開発する場合、'polypharmacology'は好ましくない性質と見なされるが、一分子対一分子の関係に着目したこれまでのアプローチでは、複合性の疾患には対処できないなどの限界があり、むしろ'polypharmacology'を利用して、複数のタンパク質を標的とするような薬剤を開発する必要性が高まっているのも現状である。

「ケミカルゲノミクス」とは、ゲノムプロジェクトによって集積された大量のバイオ情報を化合物と関連づけ、遺伝子・タンパク質と膨大な数の化合物との相互作用を包括的に明らかにすることを命題とした新興分野であり、マイクロアレイやハイスループットスクリーニングなど、近年の技術革新を背景に、膨大な化合物に関する情報収集が行われ、有用な化合物の探索が加速度的に展開されている。これらの大規模データは、多対多の化合物-タンパク質間相互作用関係を潜在的に網羅していると考えられ、'polypharmacology'を理解する上で、極めて重要な知見をもたらすことが期待される(4)。

著者らは、膨大なケミカルゲノミクスデータから、化合物群とタンパク質群との相互作用関係を効率的に抽出し、実用的なインシリコ創薬につなげることを主眼において、データベースの開発および、体系的な相互作用予測法の研究開発を進めてきた。具体的には、創薬標的として最も重要なファミリーの一つである G

タンパク質共役型受容体(GPCR)を対象として、相互作用情報を収集・整備し、データベース GLIDA(GPCR-Ligand DAtabase)として Web 上で公開している(5)。さらには、情報科学技術の一つである機械学習を用いて、化合物とタンパク質との結合情報(ケミカルゲノミクス情報)からタンパク質のリガンド認識パターンを抽出することにより、活性化化合物を効率的に探索する、'Chemical Genomics-based virtual screening(CGBVS)'という新規なバーチャル・スクリーニング(VS)手法を提唱している。VSの従来手法としては、既知リガンドとの構造類似性に基づく'ligand-based virtual screening(LBVS)'と、標的タンパク質の立体構造に基づく'structure-based virtual screening(SBVS)'(ドッキング計算)がよく知られているが、CGBVSはLBVSとは異なり、リガンド未知のタンパク質、すなわちオーファンタンパク質に対する相互作用予測をも可能にし、一方SBVSと比較して、計算効率性が非常に高いという利点を有する。また、CGBVSは必ずしもタンパク質の立体構造情報を必要としないため、結晶構造を得ることが困難な膜タンパク質に対するリガンド予測に適している。

実際に、CGBVSとLBVSの性能比較を行うために、GPCRを対象に大規模な計算機実験を行い、ケミカルゲノミクス情報の活用が、相互作用予測の性能向上につながることを実証している。さらに、X線結晶構造が最近明らかにされたヒト $\beta_2$ アドレナリン受容体に焦点をあて、CGBVSの予測スコア(活性化化合物である確率を表す)が上位50個の化合物についてin vitro結合阻害実験を行ったところ、実に全体では89%(31/35)、 $\mu\text{M}$ オーダーでは14%という驚異的なヒット率を示した(図1)。また、LBVSでは難しいとされる、新規規格を持つリガンドの検出にも有効であることが示唆された。新規化合物の探索は、新薬開発の特許戦略上において重要であることから、この結果はCGBVSの実用性の高さを示すものといえる。次に、X線結晶構造を用いたドッキング計算による予測と比較したところ、CGBVSはドッキングよりも高い予測率を示した。特に計算コストにおいては、通常のドッキン