

「化合物等を活用した生物システム制御基盤技術開発」  
事後評価分科会資料  
資料5-1

# 「化合物等を活用した生物システム制御 基盤技術開発」

事業原簿（公開版）

担当部	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・医療技術部
-----	--------------------------------------

— 目次 —

概要	.....	概要1
プロジェクト用語集		
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 の関与することの意義	.....	1
1.2 実施の効果(費用対効果)	.....	2
2. 事業の背景・目的・位置付け	.....	2
II. 研究開発マネージメントについて	.....	3
1. 事業の目標	.....	3
2. 事業の計画内容	.....	4
2.1 研究開発の内容	.....	4
2.2 研究開発の実施体制	.....	30
2.3 研究の運営管理	.....	33
3. 情勢変化への対応	.....	36
4. 評価に関する事項	.....	38
III. 研究開発の成果について	.....	40
1. 一般社団法人バイオ産業情報化コンソーシアム委託分	.....	40
2. バイオテクノロジー開発技術研究組合委託分	.....	134
IV. 実用化の見通しについて	.....	145
 (添付資料)		
・プログラム基本計画		
健康安心イノベーションプログラム		
・プロジェクト基本計画		
・技術戦略マップ(分野別技術ロードマップ)		
・事前評価関連資料(事前評価書、パブリックコメント募集の結果)		
・特許論文リスト		

概要

作成日 平成 23 年 6 月 27 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	化合物等を活用した生物システム制御基盤技術開発	プロジェクト番号	P06008			
担当推進部/担当者	バイオテクノロジー・医療技術部/主査 吉羽 洋周(平成 18 年 4 月～平成 21 年 7 月) 主査 宮川 知也(平成 21 年 8 月～平成 23 年 3 月)					
0. 事業の概要	<p>本プロジェクトでは、ポストゲノム研究の産業利用が期待される「ゲノム創薬」の加速を支援するため、我が国の強みとする完全長 cDNA リソースや、世界最高レベルのタンパク質の相互作用解析技術を最大限に活用し、創薬ターゲット候補となりうるタンパク質ネットワーク相互作用の解析等により創薬ターゲット候補の絞り込みを行うと共に、疾患等の生物現象を制御する新規骨格化合物等の探索・評価のための技術開発を進めることにより、創薬等の研究開発を加速する。</p>					
I. 事業の位置付け・必要性について	<p>近年、創薬の研究開発費が増加しているにも関わらず、新薬の承認件数が低迷している。その一因として、創薬ターゲットの特定が不十分であり、疾患メカニズムが十分解明されていないことが指摘されている。また、創薬ターゲットを特定し疾患メカニズムを解明する、新たな技術が切望されている。このことから、我が国の強みとする世界最高レベルのタンパク質の相互作用解析技術等を最大限に活用し、創薬ターゲット候補となるタンパク質の相互作用ネットワーク解析を行うことにより、ターゲットを絞り込む技術を開発する必要がある。更に、タンパク質相互作用解析によりリストアップされたタンパク質相互作用が創薬ターゲット候補として真に有効であるのかを、細胞レベル等で正確に検証する技術等を開発することも必要である。</p> <p>一方、コンビナトリアルケミストリーの進展により化合物の種類は急速に増加したものの、創薬ターゲットにヒットする化合物は必ずしも増えてはならず、生物機能を制御する新規骨格化合物を探索・評価する技術の開発が望まれている。このため、創薬ターゲット候補となりうるタンパク質相互作用ネットワークを対象に、これを制御する化合物等を高速・高感度に検出・スクリーニングできる技術を開発する必要がある。また、発見されたヒット化合物について、機能や類縁体等のバリエーションを向上させる技術開発が必要であると共に、発見された化合物が真に生体機能の制御に利用できるか、あるいは産業上有用かを、疾患モデル動物等で検証する必要がある。</p> <p>よって本研究は、低迷している国内外の創薬業界の活性化とこれにより期待されるバイオ・医療産業の発展に資する重要な課題であるため、NEDOが関与し「健康安心プログラム」の一環として本プロジェクトを実施する。</p>					
II. 研究開発マネージメントについて						
事業の目標	<p>本プロジェクトでは、ポストゲノム研究の産業利用が期待される「ゲノム創薬」の加速を支援するため、我が国の強みとする完全長 cDNA リソースや、世界最高レベルのタンパク質の相互作用解析技術等を最大限に活用し、創薬ターゲット候補となりうるタンパク質相互作用の解析等により創薬ターゲット候補の絞り込みを行うとともに、疾患等の生物現象を制御する新規骨格化合物等の探索・評価を行うための技術開発を行うことにより、創薬等の研究開発を加速する。これにより画期的な新薬の創出が期待できるとともに、我が国バイオ産業の競争力強化・新産業の創出を図り、国際的優位性を確保する。</p>					
事業の計画内容	主な実施事項	H18fy	H19fy	H20fy	H21fy	H22fy
	<b>一般社団法人バイオ産業情報化コンソーシアム</b>					
	研究開発項目①「タンパク質の相互作用解析等により創薬ターゲット候補・疾患メカニズムを解明する技術の開発」					
	①遺伝子及びタンパク質相互作用ネットワーク解析技術の開発	←				→
	②タンパク質相互作用情報の検証技術の開発	←				→
	③タンパク質相互作用予測技術の開発	←				→
	④疾患関連遺伝子探索技術の開発	←		→		
	研究開発項目②「生物機能を制御する化合物等を探索・評価する技術の開発」					

	⑤化合物等の探索技術の開発	←				→
	⑥化合物等の高機能化技術の開発	←				→
	⑦化合物等の評価技術の開発	←		→		
	総合調査研究	←				→
<b>バイオテクノロジー開発技術研究組合</b>						
	マイクロサテライトマーカーを利用した疾患関連遺伝子探索技術により特定された疾患感受性遺伝子群の創薬価値の抽出技術の研究開発	←				→
	siRNA ライブラリー等を用いた生物機能制御遺伝子の探索及び創薬標的検証技術の研究開発	←				→
	化合物又は相互作用を探索、評価する基盤技術の研究開発	←				→
	総合調査研究	←				→
開発予算 (会計・勘定別に 事業費の実績 額を記載) (単位:百万円)	会計・勘定	H18fy	H19fy	H20fy	H21fy	H22fy
	一般会計(バイオ組合分)	2,616	2,402	2,267	1,416	888
	特別会計 (電多・高度化・石油の別)					
	総予算額	2,616	2,402	2,267	1,416	888
	総合計	9,589				
開発体制	経産省担当原課	産業技術環境局研究開発課及び製造産業局生物化学産業課				
	プロジェクトリーダー	独立行政法人産業技術総合研究所 バイオメディシナル情報研究センター 夏目 徹 チーム長				
	委託先(*委託先が管理法人の場合は参加企業数も記載)	<p>○一般社団法人バイオ産業情報化コンソーシアム(JBiC) 課題解決型連携企業 19 社 アステラス製薬(株)、協和発酵キリン(株)、第一三共(株)、田辺三菱製薬(株)、武田薬品工業(株)、塩野義製薬(株)、大正製薬(株)、日本化薬(株)、大鵬薬品工業(株)、(株)三和化学研究所、興和(株)、味の素(株)、明治製菓(株)、東レ(株)、旭化成ファーマ(株)、メルシャン(株)、合同酒精(株)、(株)ニムラ・ジェネティック・ソリューションズ、(財)微生物化学研究会</p> <p>技術開発系企業 13 社 アフライトバイオシステムスジャパン(株)、アマルガム(有)、(株)医学微生物学研究所、インテック W&amp;G(株)、インビトロジェン(株)、オリンパス(株)、(株)ナラプロテクノロジーズ、協和発酵キリン(株)、ジーンフロンティア(株)、(株)東レリサーチセンター、(株)ニッポンジーン、ピアコア(株)、(株)プロテイン・エクスプレス</p> <p>共同研究機関 20 機関 産業技術総合研究所、理化学研究所、製品評価技術基盤機構、東京大学、東京工業大学、東京医科歯科大学、北海道大学、群馬大学、岐阜大学、大阪大学、京都大学、東京農工大学、首都大学東京、大阪府立大学、早稲田大学、長浜バイオ大学、東京都臨床医学総合研究所、慶應義塾大学、東北大学、愛知県がんセンター</p> <p>○バイオテクノロジー開発技術研究組合(バイオ組合) 参画企業 3 社 ジェノタイプファーマ(株)(平成 20 年 2 月 20 日をもって会社の都合により撤退)、アステラス製薬(株)、(株)日立製作所 共同研究機関 3 機関</p>				



	東海大学、北里大学、兵庫医療大学
情勢変化への対応	<p><b>○平成 18 年 6 月 30 日、本事業の委託先である JBiC およびパイオ組合と契約を締結</b> また、部分採択した協和発酵キリン(株)と東京大学先端科学技術研究センターは、技術的な連携によるシナジー効果の期待とプロジェクトを効率的に推進するため JBiC に統合した。</p> <p><b>○平成 18 年 11 月 7 日、加速資金(232 百万円)を投入</b> これまで門外不出とされてきた各製薬企業の有する天然物ライブラリの本プロジェクトへの拠出が決定し、現在 4~6,000 株/年の菌株ライブラリーが 20,000 株/年以上に、天然物代謝産物ライブラリーが 8,000 サンプル/年からその数倍へと大幅に増加されることとなり、世界最大天然物ライブラリーの構築が可能となった。 これを効果的に活用するため、スクリーニングサンプル精製用の振とう培養装置の追加、スクリーニングシステム自動化ロボットの導入を行うとともに、サンプル中の物質の精製・分析装置の追加を行うことにより、ライブラリー化・プロファイル化能力を抜本的に引き上げる。 これらにより、創薬スクリーニングで重要な医薬品の卵となる初期化合物のヒット率を飛躍的に高めることが可能となるほか、新しい薬の種となる薬剤候補化合物に関する重要な特許の取得が期待できる。</p> <p><b>○平成 20 年 1 月 21 日、加速資金(210 百万円)を投入</b> 平成 19 年 11 月に論文発表された京都大学山中教授による「ヒトの表皮細胞から多能性幹細胞(iPS 細胞)を誘導する技術」は、再生医療への利用が期待されている胚性幹細胞(ES 細胞)で問題とされている免疫反応や倫理面での問題が回避、軽減されることから、有用な細胞源として期待が高く、我が国発の画期的成果であり、今後の産業競争力を確保する上で重要な新たな発見である。 しかしながら、iPS 細胞研究については、産業応用を睨んで重要な基盤特許の確保を目的に、新規 iPS 誘導因子に関する熾烈な開発競争が世界的に展開されている状況にある。我が国においては、日本発のこの技術を世界に先立って確立し産業応用を進めるため、内閣府/総合科学技術会議に WG を設置し、各省連携のもとで支援策を講じ、迅速に展開していくことが決定された。そこでその取組の一環として、NEDO としては、当機構が保有する技術・リソースをベースに、①緊急に対応すべき課題である iPS 細胞の効率的作製技術基盤の強化と知財化、②製薬企業ニーズに基づく iPS 細胞のいち早い産業応用、を行うべく、新規 iPS 誘導因子の知財化と iPS 細胞の創薬スクリーニングへの応用を進めるべく加速資金を投入した。 iPS 細胞研究については、その後、平成 21 年 3 月 27 日に、平成 20 年度補正予算を活用した NEDO 新規プロジェクト「iPS 細胞等幹細胞産業応用促進基盤技術開発」がスタートしたため、研究開発テーマごと本 iPS 細胞プロジェクトへ移行し、継続することになった。移行までの研究開発状況や成果については、iPS 細胞プロジェクトの成果と合わせて報告し、平成 23 年 7 月 20 日の中間評価を受けることとする。</p> <p><b>○中間評価の実施と、基本計画および実施体制の変更</b> NEDO は、技術的及び政策的観点から、研究開発の意義、目標達成度、成果の技術的意義並びに将来の産業への波及効果について、外部有識者による研究開発の中間評価を平成 20 年 7 月 24 日に実施した。 【中間評価における総合評価】 「ゲノム創薬の中でも蛋白相互作用を標的とする試みは極めて挑戦的であり、基礎生命科学の蛋白間相互作用データベースの構築には極めて有効である。世界最大級の天然物ライブラリーの構築や高精度かつ効率的な世界最高水準の技術をいくつも開発するなど、設定目標に向けて概ね順調に成果が蓄積されてきている。創薬ターゲットや創薬リード化合物を生み出す基盤技術として期待したい。しかしながら、各個別研究の中に光るものがある一方、全体の有機的連携と個別テーマ間の連携が希薄であり、総花的である。本プロジェクトの存在意義は、企業では実施困難な基盤研究であり、実施する化合物スクリーニング等はタンパク質ネットワークの機能解析の一環として実施される範疇である。新薬の種探しは深入りすることは避けるべきである。残された期間にこれまでの成果の集約と真の実用化に向けて絞り込み、明確な出口に不要な個別研究は早急に辞めて、成果の明確なものだけに集中すべきと考える。」</p> <p>上記の評価を踏まえ、平成 21 年 3 月に、以下の 3 点にわたる、基本計画および実施体制の変更を行った。</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>プロジェクト内の情報共有徹底と連携強化のため、主要テーマ毎にサブ・プロジェクトリーダーを配置したマネジメント体制への刷新 夏目プロジェクトリーダーのもと、主要 5 テーマ(①タンパク質相互作用ネットワーク解析、②タンパク質相互作用検証、③タンパク質相互作用予測、④化合物探索、⑤化合物高機能化)へ研究</li> </ol>

	<p>開発テーマを絞り込み、各研究開発テーマを統括するサブ・プロジェクトリーダーを設定し、月 1～2 回、定期的に進捗ミーティングを開催するマネジメント体制へ刷新した。</p> <p>さらに、主要 5 テーマのより一層の連携を図った。タンパク質相互作用ネットワーク解析から創薬標的を選抜し、選抜した創薬標的の相互作用を検証するアッセイ系を構築して天然物ライブラリーを中心としたハイスループットスクリーニングを実施し、見出したヒット化合物と標的となるタンパク質相互作用のシミュレーション解析などを通じてヒット化合物の高機能化をデザインし、ヒット化合物の誘導体を効率よく合成するコンビナトリアルライブラリーなどを開発しより高活性な化合物を見出す、プロジェクト全体を一体化した統合的な研究開発を実施することとした。</p> <p>2. 選択と集中による実施テーマの統廃合</p> <p>中間評価結果を受け、平成 20 年度末をもって、</p> <p>JBIC 分室 2「文献からの化合物および遺伝子/タンパク質の相互作用情報の自動収集」  JBIC 分室 3「タンパク質相互作用情報の解析支援機能の開発」  JBIC 分室 5「タンパク質相互作用の探索および検証のためのタンパク質発現および解析」  JBIC 分室 6「抗体様分子プローブの作製と評価技術の開発」  JBIC 分室 7「抗体様分子プローブの作製と評価技術の開発」  JBIC 分室 11「ドラッグスクリーニング用蛍光タンパク質の改変・改良」  JBIC 分室 12「in vitro および生細胞内相互作用高速検出装置の開発」  JBIC 分室 17「生体内イメージング基盤技術の開発」  JBIC 分室 18「生体内イメージング機器の高度化に関する技術開発」  JBIC 分室 19「イメージング基盤技術の適用研究」  JBIC 分室 20「マイクロアレイによる化合物評価」</p> <p>を終了した。</p> <p>これに伴い、基本計画において、平成 18～20 年度の研究テーマ⑦「化合物等の評価技術の開発」を削除し、研究テーマ④「疾患関連遺伝子探索技術の開発」を研究テーマ①「遺伝子及びタンパク質相互作用ネットワーク解析技術の開発」に統合した。</p> <p>また、平成 21 年度末をもって、バイオ組合委託分、</p> <p>研究テーマ⑧「マイクロサテライトマーカーを利用した疾患関連遺伝子探索技術により特定された疾患感受性遺伝子群の創薬価値の抽出技術の研究開発」  研究テーマ⑨「siRNA ライブラリー等を用いた生物機能制御遺伝子の探索及び創薬標的検証技術の研究開発」  研究テーマ⑩「化合物又は相互作用を検索、評価する基盤技術の研究開発」</p> <p>を終了した。</p> <p>このうち研究テーマ⑨については、平成 22 年度にその一部「糖尿病関連液性因子 AGF ファミリー蛋白質 X の受容体遺伝子 Y の抗糖尿病創薬標的としての妥当性検証」を、JBIC 分室 1 の研究テーマに統合し、研究を継続した。</p> <p>3. 基本計画の最終目標を、より高次の目標へ変更</p> <p>「相互作用情報の同定数を 500 以上取得する」  「産業上有用な化合物等を 50 以上取得する」</p> <p>という単なる数値目標から、</p> <p>「10 個以上の相互作用情報を対象に制御物質のスクリーニング等を行うことにより、開発技術の有用性検証を通じて創薬基盤として確立する」  「3～4 個程度の創薬開発候補ターゲットに対して、臨床薬のリード化合物となりうるタンパク質相互作用制御物質を創製する」</p> <p>へと、より高次の目標へ変更した。</p>
--	---

<p>Ⅲ. 研究開発成果について</p>	<p>本プロジェクトでは、以下の研究開発項目について推進し、それぞれ目覚ましい成果を導いた。概要は以下の通りである。</p> <p><b>一般社団法人バイオ産業情報化コンソーシアム</b></p> <p>研究開発項目①「タンパク質の相互作用解析等により創薬ターゲット候補・疾患メカニズムを解明する技術の開発」</p> <p>①遺伝子及びタンパク質ネットワーク解析技術の開発</p> <p>クリーンルーム対応の質量分析用サンプル自動調製システムを開発した。素早い処理が要求されるタンパク質複合体分離・精製までの工程が、約半分の時間にまで短縮され、微量タンパク質の変性・分解を最小限に抑えることが可能になり、実質的解析感度および再現性の向上に成功した。システムの検証として、高感度質量分析システムと組み合わせて、タンパク質ネットワーク解析を行った。共同研究で bait タンパク質の機能解明につながった情報については 51 報の論文(インパクトファクター:450)として発表した。また、その中から創薬スクリーニングターゲット情報として、21 個をスクリーニングチームへ提供した。</p> <p>課題解決型連携企業11社との共同研究を行い、タンパク質相互作用解析として 133bait(8 社)を約 4,000 解析、開発薬・上市薬のターゲットタンパク質解析として 81 化合物(11 社)を 10,000 解析おこなった。このうち2化合物について、ターゲットタンパク質の同定とその検証が終了し、そのうちの1化合物については、ターゲットタンパク質の機能を阻害することが証明され、臨床研究へと進んでいる。</p> <p>②タンパク質相互作用情報の検証技術の開発</p> <p>大規模スクリーニングに最適と思われるメモリーダイアッセイを選択し、薬剤探索アッセイ系の構築を行った。既知のタンパク質間相互作用をモデルに発現系構築を構築し、必要に応じてタンパク質のドメイン化、局在化、リンカー検討、シグナル配列削除等を行い、34 種を構築し 30 種で蛍光シグナルを検出した。膨大な天然物をスクリーニングするためにアッセイ系の高効率化を行い、結果として、40 種の <i>in vitro</i> メモリーダイアッセイ系を構築、検討して、15 種、延べ 3,264,576 アッセイを実施した。インビトロメモリーダイアッセイ法を補う系としてインビトロ・スプリットルシフェラーゼ法を開発した。</p> <p>タンパク質相互作用の探索および検証のためのクローンは、NEDO プロジェクトで構築してきた世界最大規模のヒト完全長 cDNA ライブラリーを活用し、あらゆる遺伝子に対して迅速に供給した。これまでに各チームに作製、供給したヒト遺伝子リソースは、約 1,600 クローンに達した。また、ヒトタンパク質の N 末または C 末に蛍光タンパク質を融合させて細胞内で発現させ、タンパク質の局在をハイスループットに測定するシステムを用いてタンパク質の細胞内局在を指標にした創薬スクリーニング系を構築した。</p> <p>③タンパク質相互作用予測技術の開発</p> <p>ケモバイオインフォマティクス技術の効率化と基盤技術の応用・評価研究を目的として、「標的タンパク質の立体構造構築システムの開発と解析」、「タンパク質-タンパク質ドッキング計算システムの開発と解析」、「化合物 <i>in silico</i> スクリーニングのためインフラストラクチャ構築」、「標的タンパク質間相互作用様式に基づく相互作用制御化合物のインシリコスクリーニング」、「特定標的疾患解析の実施(企業解決型)」を実施した。</p> <p>解析事例の一つとして、癌に関するタンパク質相互作用情報に基づいて複合体のモデル構造を予測し、化合物との相互作用を制御する戦略でインシリコスクリーニングを実施した。約 300 万品目の中で結合エネルギーが強いと予想された 89 品目を実際に購入し、アッセイ系(<math>\alpha</math>スクリーニング、IP-Western)による評価を行った結果、複合体阻害活性を持つ 5 品目が同定された。これはインシリコスクリーニングのヒット率が 5.6%(5/89)であることを示している。</p> <p>④疾患関連遺伝子探索技術の開発(平成 20 年度まで)</p> <p>新たに見出した膵島高発現の 3 個の分泌タンパクのうち、血清 secreton-1 がインスリン分泌のサロゲートマーカーとなる可能性が示唆された。また、2 型糖尿病感受性遺伝子カルパイン 10 の関連分子を 6 種類獲得し、このうち 1 種類の過剰発現が糖尿病治療に繋がる可能性を明らかにした。この標的に対し、約 3 倍活性を上げる化合物を 1 個獲得した。</p> <p>研究開発項目②「生物機能を制御する化合物等を探索・評価する技術の開発」</p> <p>⑤化合物等の探索技術の開発</p> <p>産総研および NITE によるインハウスイブラリー (147,019 サンプル) に加え、製薬系企業等(13 社+1 社団法人) 提供のライブラリーを含んだ合計 345,293 サンプルからなる、天然物ライブラリーの構築に成功した。これは、実際に運用している天然物ライブラリーとしては、世界最大級のライブラリーである。また、海綿をはじめとする海洋生物からの菌株の分離を進め、167 株の放線</p>
----------------------	---

菌を分離し、合計 33 個の新規化合物を単離した。さらに、UPLC-TOF-MS を用いた化合物解析によりデータベースを構築するとともに、120 個以上の新規化合物を見出した。データベース解析の結果、天然化合物ライブラリーは、合成ライブラリーと比較して広いケミカルスペースを保有していることがわかった。

30 万ライブラリーを数ヶ月でスクリーニングできるハイスループットスクリーニング系として *in vitro* mKG 法を開発し、これらのライブラリーを用いてタンパク質相互作用阻害物質のスクリーニングを展開し、15 個のタンパク質相互作用阻害物質を単離した。

一方、モデル生物(酵母、ショウジョウバエ)の表現型変化を指標に、致死、生育阻害、運動障害や形態異常などにつながるヒト疾患関連遺伝子の制御物質を探索する様々なアッセイ系を構築し、それぞれ数個の新規化合物を得た。さらに、マウスの体内時計の周期・振幅・位相を制御する化合物を探索する系を開発し、短周期化化合物 7 個、周期延長化化合物 10 個、振幅制御化合物 12 個を新たに見出した。

#### ⑥化合物等の高機能化技術の開発

天然物を合成ブロックに分割し、それらを組み合わせて多様な天然物誘導体を合成するというコンビナトリアル合成法の開発研究を行った。また、特異な三次元構造をもつテンプレートを設計し、それらをもとにコンビナトリアル合成により天然物様のケミカルスペースをカバーしうる化合物ライブラリー合成法の開発研究を行った。さらに、タンパク質ネットワーク解析グループと連携して生物活性化合物をもつ分子プローブを迅速に合成する手法を確立し、標的タンパク質複合体を明らかにするという創薬基盤技術の開発を進めた。

具体例として、デオキシ糖の直接的かつ立体選択的グリコシル化反応を基盤とするという新規糖鎖導入技術の開発に世界で初めて成功した。本技術を用いて、新規抗癌剤のリード化合物として注目されているデオキシオリゴ糖配糖体 versipelostatin (VST)の誘導体合成を行った。また、LC3/p62 相互作用のインシリコ解析により、重要な七残基ペプチドフラグメントが見出されたため、81 種のペプチドライブラリーを固相法によりコンビナトリアル合成し、スクリーニング結果との構造活性相関をとったところ、重要な三つの残基の組み合わせが明らかになった。

#### ⑦化合物等の評価技術の開発(平成 20 年度まで)

化合物の薬効・毒性を評価するため、個体レベルの蛍光イメージングとマイクロアレイを利用した基盤技術の開発を行った。具体的には、イメージスタビライザや蛍光分子トモグラフィー装置を用いて、個体を「生きたまま」生体蛍光イメージングを行う基盤技術を確立した。また、ヒト遺伝子およびラット遺伝子を搭載する独自のマイクロアレイシステムを用いて医薬品・化学物質の持つ生物学的活性・毒性を遺伝子発現レベルから比較・評価できる基盤技術の開発を行い、化合物評価のための 800 種類以上の発現プロファイルの取得を完了した。

#### <研究チーム相互連携による成果>

##### 1) プロテアソームアッセンブル因子 PAC3 相互作用阻害化合物の創製

PAC3 はホモダイマー形成する分子である PAC3 について、*in vitro* メモリーダイ法を用いたアッセイ系を構築し、151,498 サンプルを対象に天然物スクリーニングを展開したところ、16 員環マクロライドと極めて近い類縁化合物 Thielocin B1(TB1)をヒット化合物として得た。この TB1 により、癌細胞中のプロテアソーム形成が阻害され、プロテアソーム活性も減弱することが示された。

TB1 の PAC3 へのドッキングシミュレーションによる構造活性相関を検証するため、まず TB1 を全合成し、さらにそのコア部を替えた誘導体を合成したところ、コア部の部分構造が選択的阻害に非常に重要であることがわかった。タンパク質の活性部位が鍵穴構造を持たない場合でも、多様な立体構造を持つ天然物は結合を可能にすることが示唆され、タンパク質間相互作用阻害で問題となる、相互作用面を狙った化合物探索へ新しい可能性を見出した。

##### 2) HSP47-コラーゲン相互作用阻害化合物の創製

肝硬変や動脈硬化などの繊維化疾患の治療薬に繋がる化合物の取得を目的とした。コラーゲンは難溶であるため、HSP47 との相互作用を SPR 装置で検出するとともにリサイクル系を導入し、ハイスループットスクリーニング系を確立した。天然化合物抽出物 42,320 個、市販の合成化合物 10,240 個に対して 1 次スクリーニングを実施し、コラーゲン分泌阻害を評価する細胞系を用いた 2 次スクリーニングにより絞り込み、天然物から 25 個、合成化合物から 4 個のヒット化合物を得た。

このうち最も阻害活性の高い合成化合物 AK-778 は水溶液中では非常に不安定で、Col-002 と Col-003 に分解することが判明した。そこでこれらの分解産物を合成し相互作用阻害活性を調べたところ、Col-003 に阻害活性があった。そこで Col-003 の活性基の特定と更に活性の高い化合物の取得のため 8 種類の誘導体の合成展開を行い、その阻害活性を調べたところ、Col-009 にも阻害活性が検出された。

### 3) TDP1 阻害剤のインシリコ解析に則した高度化

遺伝子修復に関わる抗腫瘍剤の標的と期待されるチロシル DNA ホスホジエステラーゼ(TDP1) に対するスクリーニングにより、ナフタレン骨格を有する既知天然物 SP001(活性新規)を得た。しかし、極めて特異的な構造を持ちその有機合成は困難であるため、構造活性相関情報をもとに、天然物とは全く異なる構造をもつ阻害剤を創製する目的で、ファーマコフォア構造を持つコンビナトリアルライブラリー、及び核酸ミメティクスとなるフォーカストライブラリーを構築し、TDP1 阻害活性の評価を行ったところ、天然物を超える TDP1 阻害活性をもつ化合物 15 個を見出した。

これらの細胞毒性を調べたところ、SP055 が天然物の 10 倍以上強い細胞毒性を示した。さらに、がん細胞パネル評価を行った結果、十分に低い有効濃度で増殖阻害作用が認められ、動物モデルを用いた抗腫瘍活性評価でも強い抗腫瘍活性を示すことが明らかとなった。

### 4) Spiruchostatin をモチーフとする HDAC 阻害剤の創製

インシリコ解析にてヒストンデアセチラーゼ HDAC1 の立体構造を構築し、強い抗腫瘍作用を持つ HDAC 阻害活性天然物 spiruchostatin A 等の化合物とのドッキングシミュレーションによりその結合様式を予測した。3 カ所の活性増強ポケットにフィットする誘導体を合成する目的で、Spiruchostatin A を四つの合成ブロックに分割し、自動合成装置を活用したコンビナトリアル合成に適した固相合成法を確立した。

誘導体展開において、20 個のコンビナトリアルフォーカストライブラリーを含む 24 個の化合物を全合成し、細胞レベルでの阻害活性を評価したところ、天然物より活性の高い化合物を 4 つ見出した。特に AM-07-005 は天然物より 50 倍活性が強かった。さらに、既存の HDAC 阻害剤 (SAHA) は中皮腫細胞に対しては弱い効果しか示さなかったが、AM-07-005 は spiruchostatin A と比較してもより強力な抗腫瘍活性を示した。

### 5) 新規テロメラーゼ阻害剤の開発

テロメラーゼ阻害剤 telomestatin は、癌細胞のテロメアを不安定化させ癌細胞死を誘導するが、溶解性等の問題で動物への投与が困難であるため、その誘導体を合成した。6つ、または7つのオキサゾールを有する大環状テロメスタチン誘導体 6OTD、7OTD 類の合成を行ったところ、S2T1-6OTD 化合物は弱い作用しか示さなかったが、c-myc プロモーターに対して強い結合活性を示した。また、7-OTD 系化合物が強力なテロメラーゼ阻害活性を示した。

Telomestatin がテロメアを安定化させるモデル構造をもとに、インシリコ解析により理想的な長さの架橋構造をシミュレーションし合成展開したところ、3種類の化合物のうち化合物 B は、一本鎖のテロメア鎖を強く安定化させた。また、合成ブロック H、J、K を組み合わせる Telomestatin 誘導体合成法を確立するとともに、チアゾリン環の合成に成功し、(R)-telomestatin の世界初の全合成を達成した。この手法をもとに (S)-telomestatin を合成したところ、(S) 体が天然体の (R) 体より 4 倍高活性であることを見出した。

### 6) タンパク質間相互作用を低分子化合物で制御する新戦略

タンパク質相互作用組にはホモ複合体・ヘテロ複合体があり、相互作用状態も、定常的・過渡的相互作用がある。相互作用表面は平面的なものから凹面を持つもの、相互作用力も疎水性や”疎水性+極性混在型”など、非常に多様に富んでいる。タンパク質相互作用表面が Medium サイズでその形状が平面的なもの (Medium & Flat) と、Large サイズで明確な凹面で相互作用しているタイプ (Large & Concavity) では、それぞれのタンパク質間相互作用の様式に応じてインシリコスクリーニングの戦術を変えることで、効果的な化合物探索につながる。

また、本 PJ で単離、構造決定された 922 の天然物およびランダムに選定された 922 の合成化合物、14 の共結晶の化合物によるケミカルスペースを作成し、分類との関係を解析した。ケミカルスペース作成には、Feher らの論文に基づいた記述子を利用し、主成分分析法により寄与率の高い 2 主成分軸 (化合物の環構造部分と非環構造部分の原子構成比率パラメータ、化合物構造に含まれる環構造部分の融合度合いを示すパラメータ) で分布を表現した。天然物は、合成化合物に比べ広いケミカルスペースを有しており、共結晶が存在するタンパク質複合体阻害剤は、天然物分布と合成化合物部分の境界領域を中心に分布していた。

### < 個別研究開発 >

#### 1) 遺伝子レベルでの創薬ターゲット決定の効率化 (EXPOC<sup>®</sup> マウス開発)

液性因子/受容体相互作用に着目し、EXPOC<sup>®</sup> システム (液性因子を過剰発現する Tg マウス作製のハイスループット化を可能にした画期的技術) を用いて、5 年間に 201 種の遺伝子について EXPOC<sup>®</sup> マウスの表現型解析 (一次評価) を実施した。このうち、特に顕著で且つ創薬候補として興味深い表現型を示した 6 種の二次評価を実施したところ、複数のヒト腫瘍細胞株に対して有意な抗腫瘍活性を有する因子、骨粗しょう症等の骨疾患の治療に有効となりうる因子、鉄過剰症

	<p>治療に有効となりうる因子などを、新たに見出した。</p> <p>2) 翻訳リプログラミングに基づく統一的なスクリーニング系の構築 (RAPID システム開発) 従来の化学合成と異なる、改変遺伝暗号翻訳環状ペプチド合成システム (RAPID) の構築に成功した。本システムにより、これまで合成困難であった、非天然型・大環状化ペプチドのような特殊ペプチドを、容易かつ迅速に合成し、標的に極めて強力に結合する環状ペプチドを探索することが可能になった。3 社との課題解決型企業連携などの実証研究により、数 nM レベル以下の解離定数を持つ特殊環状ペプチドを複数見出し、その生理活性も確認された。さらに、従来の抗体ではその大きさにより蛍光染色が不可能であった細胞接触部位でも、この環状ペプチドを用いて染色が可能であることを明らかにした。</p> <p><b>バイオテクノロジー開発技術研究組合</b></p> <p>⑧マイクロサテライトマーカーを利用した疾患関連遺伝子探索技術により特定された疾患感受性遺伝子群の創薬価値抽出技術の開発 マイクロサテライトマーカーを用いたゲノムワイドの遺伝的相関解析より見出された疾患感受性遺伝子群を基盤とし、糖尿病、及び、糖尿病と関連の深い生活習慣病である高血圧、さらに、関節リウマチを対象として、創薬ターゲットの抽出から低分子化合物の創出へと至る戦略を構築した。テキストマイニングや in silico ネットワーク解析、独自に開発した新規酵母ツーハイブリッド法などの相互作用解析を駆使し、対象となる疾患感受性遺伝子の機能やそれが関わるネットワークを明らかにした。また、糖尿病感受性遺伝子 PKX については、阻害化合物の in silico スクリーニングと培養細胞系での効果の検証を行った。</p> <p>⑨siRNA ライブラリー等を用いた生物機能制御遺伝子の探索技術及び創薬標的検証技術の研究開発 創薬標的基盤技術開発では、siRNA、低分子化合物及び微生物サンプル、天然物、網羅的遺伝子発現、計算化学、マルチインディケーター細胞、アフィニティークロマトグラフィーを用いる方法などを駆使して、創薬に必要な化合物ライブラリーからスクリーニング系及び評価まで、必要十分なシステムを構築した。 糖尿病創薬標的探索では、構築した創薬標的基盤技術を活用し、AGF, PPAR, Anbpt1X, 遺伝子 9, PP2A など、具体的かつ明確な創薬標的を複数取得した。</p> <p>⑩化合物又は相互作用を探索、評価する基盤技術の研究開発 タンパク質の相互作用を簡便かつ迅速に行うことを目的として、金ナノ粒子センサーを用いた新たな分子間相互作用解析システムを開発した。開発した新装置で、抗 BSA の検出感度が従来比の 100 倍に向上した。 また、アフリカツメガエル卵母細胞発現系を用いて、トランスポーターを創薬標的とした化合物のスクリーニング、薬物動態試験を行うための基盤技術も開発した。質量分析計で定量可能な薬剤種の拡充と、他の細胞系にも適応可能な定量系の開発などにより、汎用性の高いシステムとなった。</p>
投稿論文	<p>一般社団法人バイオ産業情報化コンソーシアム 「査読付き」390 件、「その他」88 件 バイオテクノロジー開発技術研究組合 「査読付き」52 件</p>
特許	<p>一般社団法人バイオ産業情報化コンソーシアム 「出願済」48 件、「登録」0 件、「実施」4 件 (うち国際出願 2 件) バイオテクノロジー開発技術研究組合 「出願済」6 件、「登録」0 件、「実施」0 件 (うち国際出願 0 件)</p>
IV. 実用化の見通しについて	<p><b>一般社団法人バイオ産業情報化コンソーシアム</b> 課題解決型企業連携という新しい枠組みを設けて製薬関連企業の本プロジェクトへの参画を募ることにより、従来型の技術開発系企業 6 社に加えて、国内の製薬関連企業 19 社の参画が実現した。課題解決型企業連携とは、製薬企業が現在当面している研究課題 (臨床開発薬のターゲットタンパク質決定、薬理メカニズムの解明、創薬候補化合物の探索など) について、本プロジェクトにて開発したタンパク質相互作用解析技術等の新規技術、各種のスクリーニング系、cDNA 等のリソースを活用して、各製薬企業が抱える創薬ボトルネックの解消に貢献することにある。 また、企業向け成果報告会を定期的に開催し、技術開発途中の早い段階でその成果を参画企業に開示した。企業の意見を取り入れることにより、企業のニーズにあった技術開発へフィードバックするとともに、企業への円滑な技術移転を図った。</p>

研究開発項目①「タンパク質の相互作用解析等により創薬ターゲット候補・疾患メカニズムを解明する技術の開発」

①タンパク質ネットワーク解析技術の開発

課題解決型企業連携として、各企業が抱えている個別課題に関連する解析を実施した。企業から提供された創薬ターゲット候補となっているタンパク質などのサンプルに対して疾患関連タンパク質ネットワーク解析を行い、その bait タンパク質の機能情報および創薬ターゲット候補情報を得た(8社 133 サンプル)。また、企業から提供された開発薬、或いは上市薬化合物のターゲットタンパク質解析を行い、化合物の作用メカニズムに関する情報を得た(11社 81 化合物)。これらの企業由来の標的や化合物にかかわる相互作用の解析は、それ自体が各社の創薬に密接にかかわるものであり、すでに実用化されている。現時点で、1化合物については、解析結果によりそのターゲットタンパク質を明らかにし、臨床研究へ進んでいる。

②タンパク質相互作用情報の検証技術の開発

Amalgaam(有)では、メモリーダイ蛍光タンパク質 Kusabira-Green (mKG)を改良したタンパク質間相互作用解析キット Fluo-Chase Kit を製品化し、2007年6月、(株)医学微生物学研究所から販売を開始した。(株)医学微生物学研究所では、mKG-N 末端側断片、mKG-C 末端側断片を検出するモノクローナル抗体を開発し、両抗体とも2007年11月、販売を開始した。Amalgaam(有)では、FRET ドナー用蛍光タンパク質単量体 Umikinoko-Green (mUkG)の販売を、2008年に開始した。

Multisite Gateway 法によるマルチ遺伝子発現クローンを染色体特定部位へ導入する技術は、再生医療・遺伝子治療分野の企業や研究機関、製薬企業や関連研究分野への貢献が期待できるため、インビトロジェン社との協力においてこの技術の提供を検討している。

ヒト完全長 cDNA ライブラリーは、製薬企業や大学等の研究機関における基礎的なバイオ研究から創薬開発まで広く活用できる。Human Gene & Protein Database (HGPD)の公開を開始し、製品評価技術基盤機構より、これらのヒトタンパク質発現リソースクローンを一般配布しているが、新たに開発したクローンも、公開・配布する予定である。

③タンパク質相互作用予測技術の開発

タンパク質間相互作用制御化合物のインシリコスクリーニングに特化した、タンパク質立体構造予測やタンパク質-タンパク質ドッキングシミュレーション、インシリコスクリーニング等の成熟した要素技術の効率的な統合化のノウハウそのものが実用化として期待できる。今後、より多くの民間企業との実施例を充実させることで、技術移転やインシリコ解析技術者の育成に貢献できると考えている。

④疾患関連遺伝子探索技術の開発(平成20年度で終了)

糖尿病関連遺伝子探索の成果である糖尿病感受性遺伝子に係る相互作用分子の同定結果については、参画している製薬企業が興味を持ち、実用化に向けた検討を始める予定である。

研究開発項目②「生物機能を制御する化合物等を探索・評価する技術の開発」

⑤化合物等の探索技術の開発

産総研および NITE によるインハウスライブラリー(157,019 サンプル)に加え、製薬系企業等(188,274 サンプル、13社+1社団法人)提供のライブラリーを含んだ合計345,293 サンプルからなる世界最大級の天然物ライブラリーは、平成23年5月に設立した次世代天然物化学技術研究組合で管理されるようになり、アカデミアおよび民間企業を対象とした相互利用および普及利用を目的として、広く国内の様々なスクリーニングに適用可能となった。これにより、我が国の創薬が推進されることが期待される。

また、このプロジェクトで独自に得られた新規化合物については、化合物高機能化チームにおける誘導体展開も含め、詳細な生物活性を検討中である。産業上有用と期待される化合物については、動態、毒性などを考慮しながら改良を行い、参画している製薬企業への導出を検討する。

⑥化合物等の高機能化技術の開発

これまで合成が困難であったデオキシオリゴ糖連結法を開発し、アグリコンに直接デオキシ糖を導入するという高度な技術を開発した。非天然型アミノ酸、およびヒドロキシカルボン酸を含む環状デプシペプチドのライブラリー合成法を確立した。また、天然物をモチーフとした新規骨格化合物ライブラリー合成法を開発した。これらの化合物は化合物ライブラリーに登録し、様々なスクリーニングに利用されており、ヒットがあればフォーカストライブラリーを合成できる体制にある。また、分子プローブの作製技術についてはほぼ実用レベルにあり、課題解決型企業連携におけるタンパク質ネットワーク解析の成果に繋がっている。

#### ⑦化合物等の評価技術の開発(平成20年度で終了)

臓器固定用3次元マイクロステージ及び画像安定化技術は、生体内イメージングにおいて重要な技術であり、将来事業化される可能性は高い。マイクロアレイによる化合物評価では、参画している製薬企業にて開発中の抗がん剤の効く・効かないを区別する遺伝子セットを同定し、その成果を企業に開示した。感受性評価によって治験対象者を絞り込むことが可能となり、大幅な治験コストの削減が期待できる。

#### <研究チーム相互連携による成果>

##### 2)HSP47-コラーゲン相互作用阻害化合物の創製

HSP47は、肝硬変・肺繊維症やケロイド治療のターゲットとして、米国ではRNA干渉剤が臨床研究のPhase III試験にステップアップしている。一方、当研究開発で得られたHSP47とコラーゲンとの相互作用を阻害する天然由来の化合物は分子量500を切る低分子であり、このよう低分子化合物がタンパク質の相互作用界面を制御できる可能性を示せた意義は大きく、今後ドラッグライクな化合物に構造最適化できれば、極めて有望な創薬リード化合物となる可能性がある。

##### 3)TDP1阻害剤のインシリコ解析に則した高度化

天然物の10倍以上強い細胞毒性を示したSP055は、がん細胞パネル評価において十分に低い有効濃度で既存薬とは異なる増殖阻害作用を示す核酸ミメティクスとして、製薬企業の開発薬としてステップアップの検討を行っている。ベースとなる天然化合物の全合成が達成できれば、本プロジェクトの解析モデルを用いた天然化合物からの誘導体への展開を通じて、より強力な抗腫瘍活性を持つ化合物の創製が期待される。

##### 4)SpiruchostatinをモチーフとするHDAC阻害剤の創製

天然化合物に関しては、既に前臨床試験が終了し、今後、製薬企業での開発が進む予定である。本プロジェクトで創製した化合物は、臨床試験を行う化合物のバックアップとして、また、確立した合成法は、天然化合物の低コストな合成手段としての活用が期待される。

##### 5)新規テロメラーゼ阻害剤の開発

テロメア選択的、非選択的(mycプロモーターに作用)の2種類の化合物を得ているが、現在、国内をはじめ、フランス、アメリカ、スイス、シンガポールで詳細な活性試験を行っている。また、天然化合物telomestatinが悪性グリオーマ由来のがん幹細胞に対して極めて有効であることが示され、アメリカのオハイオ大学で今後の開発を検討中である。天然化合物と逆立体を有する新たな合成誘導体には、より強力な抗がん幹細胞効果が期待されている。

##### 6)タンパク質間相互作用を低分子化合物で制御する新戦略

従来までの「鍵と鍵穴」モデルに指南されるインシリコ戦略では、多様なタンパク質相互作用結合部を持つタンパク質間相互作用を制御する低分子ヒット化合物を同定することは難しい。本プロジェクトで開発したタンパク質相互作用様式分類に則したインシリコスクリーニング戦略そのものが、民間企業における実用化プロトコルとなりうる。さらに、標的となるタンパク質間相互作用様式に基づいて低分子化合物群を選定できれば、これはタンパク質間相互作用制御化合物のフォーカスライブラリーとなるため、新規かつ実用的な手法として民間企業等での活用が期待できる。

#### <個別研究開発>

##### 1) 遺伝子レベルでの創薬ターゲット決定の効率化(EXPOC®マウス開発)

EXPOC®マウスによる疾患関連遺伝子探索では、EXPOC®マウスの表現型解析において特に顕著な表現型を呈した6つの因子を発見し、創薬ターゲットとしての有用性を評価する二次評価試験を実施。今後は、創薬研究⇒非臨床試験⇒臨床試験⇒新規メカニズムにもとづく医薬品開発に向けた取り組みを行う計画である。

##### 2) 翻訳プログラミングに基づく統一的なスクリーニング系の構築(RAPIDシステム開発)

さらに、改変遺伝暗号翻訳環状ペプチド合成システム(RaPID)については、新規特殊ペプチド薬剤候補を迅速且つ確実に探索する技術として、PeptiDream社(2006年設立)に東大TLOを通して排他的ライセンスが行われ、25人の研究者を抱えるベンチャー企業に成長した。同社は本システムの改良を進め、RaPID-PDシステムを確立した。課題解決型研究の参画企業3社の薬剤標的ではいずれも高活性の特殊ペプチドが見出され、そのうち1社とは既に継続研究契約が成立し、他の標的も含めた特殊ペプチド薬剤探索がスタートしている。また、同社は独自に国内大手製薬企業2社および海外大手製薬企業4社と契約を結び、特殊ペプチド薬剤探索を進めている。



	<p><b>バイオテクノロジー開発技術研究組合</b></p> <p>○マイクロサテライトマーカーを利用した疾患関連遺伝子探索技術により特定された疾患感受性遺伝子群の創薬価値抽出技術の開発</p> <p>新たなアプローチを取り入れた(独自の遺伝解析により見出した疾患感受性遺伝子群を基盤とした)、創薬ターゲットの抽出、ゲノム創薬手法の実用化をほぼ達成した。</p> <p>○siRNA ライブラリー等を用いた生物機能制御遺伝子の探索技術及び創薬標的検証技術の研究開発</p> <p>開発した「創薬標的探索の基本技術」は、アステラス、東海大学、北里大学、兵庫医療大学等にて、独自に或いは共同して各機関で事業化し活用する。発見された2つの「糖尿病標的蛋白質」に関しては、アステラスにて疾患構造や指向領域変化等も勘案しつつ、可能な限り自社テーマとして継続事業化検討を行う。</p> <p>○化合物又は相互作用を探索、評価する基盤技術の研究開発</p> <p>新規薬剤の効率的な開発に有効な装置ビジネス、受託解析ビジネスの展開を検討している。</p>	
V. 評価に関する事項	事前評価	
VI. 基本計画に関する事項	中間評価以降	平成 20 年 7 月 24 日 中間評価実施
	作成時期	平成 18 年 1 月制定
	変更履歴	平成 20 年 1 月、プロジェクトリーダー名を記載し改訂
		平成 20 年 7 月、イノベーションプログラム基本計画の制定により「(1)研究開発の目的」の記載を改訂
		平成 21 年 3 月、平成 20 年度中間評価を踏まえ、①情報共有徹底と連携強化のための主要テーマ毎にサブプロジェクトリーダーを配置したマネジメント体制の刷新、②集中と選択による実施テーマの統廃合及び③最終目標をより高次の目標へ変更により改訂。

プロジェクト用語集

用語	用語の解説
創薬ターゲット	薬が効果を現すための作用点がターゲット(標的)であり、新しい薬を創り出す(創薬)には新しいターゲットの発見が非常に重要になる。創薬ターゲットのほとんどはタンパク質であり、タンパク質相互作用を創薬ターゲットとするのは新しい試み。
化合物ライブラリー	生理活性のある化合物を発見するには構造や物理的性質、或いは過去の経験から計画的に探索する方法もあるが、多数の化合物を集めた化合物ライブラリーをランダムに探索することで新しい化合物が発見されることは多い。しかし効率が悪いことから、目的に応じて選抜したフォーカスライブラリーが使われることも多くなっている。
タンパク質ネットワーク	生体内のタンパク質は単独では機能せず、相互作用(結合)によるネットワークを形成して働いている。疾患関連遺伝子のタンパク質ネットワークを知ることにより、多くの疾患に関わる遺伝子の機能解析やその発症メカニズムを解明し、新しい創薬ターゲットを発見することもできる。
イントラボディ	細胞内で機能する抗体もしくは抗体様分子の総称。一本鎖抗体(scFv)を細胞内で発現させる方法がより一般的である。
リード化合物	薬理活性のプロファイルが明らかであり、これを化学的に修飾することで活性の向上、毒性の減弱が期待できる新規化合物。スクリーニングにより発見されたヒット(シード)化合物から、化学修飾による活性改善を見込める化合物がリード化合物として選定される。
モデル生物	生命現象の解明を目的とした研究に使用される生物種。生命現象の観察がしやすい、遺伝学的、分子生物学的解析をはじめとする多様な解析が可能なツールが揃っている、飼育・培養が容易で安価である、短時間で増殖可能である等、研究を進めていく上で重要な多くの利点をもつ。本プロジェクトではモデル生物として酵母(出芽酵母、分裂酵母)、ハエ、マウスを用いて研究を進めている。
天然物化学	生物が産生する物質(天然化合物と呼ばれる)を扱う有機化学の一分野である。主に天然物の単離、構造決定、合成を扱う。
<i>in silico</i> スクリーニング	シリコンチップ即ちコンピュータの中で行う仮想スクリーニングのこと。創薬における化合物のスクリーニングを、標的分子と化合物の立体構造に基づいたドッキング(結合)シミュレーションにより行うもの。膨大な数の化合物に対するスクリーニングにおいて、候補化合物の絞り込みや優先順位付けにも用いられる。
bait タンパク質	タンパク質ネットワーク解析において、FLAG タグ融合タンパク質として細胞に発現させるタンパク質のことで、「bait」とは「餌」という意味である。タンパ

	<p>ク質複合体の取得を釣りに見立ててこの用語を使う。ちなみに bait (餌) タンパク質に結合して(食らいついて)くるタンパク質を「prey (餌食)」タンパク質という。</p>
開発薬・上市薬	<p>開発薬とは製薬会社が医薬品として市場に出すために様々な試験を行っている状態にある薬であり、上市薬とは開発に成功して医薬品として認可された薬である。市場に出た後も有効性や毒性の試験は行われ、稀な副作用などで認可が取り消されることもある。</p>
分子プローブ	<p>生命現象や生物機能の解析において、対象となる物質や反応の検出を容易にする探索分子。</p>
メモリーダイ	<p>相互作用する二つのターゲットタンパク質のそれぞれに二つに割った蛍光タンパク質の断片を遺伝子的に融合し、ターゲットタンパク質間の相互作用依存的に蛍光タンパク質のベータ樽構造が再構成することを利用する系。相互作用により再構築された蛍光タンパク質は乖離することがないとされているため、相互作用をメモリーとして残す蛍光色素という意味からメモリーダイといわれる。</p>
立体構造ペプチド	<p>タンパク質のような立体構造(3次元構造)を持つようにデザインされたペプチド。一般にペプチド(30-50 アミノ酸以下の長さ)は、一定な立体構造を持つことができない。<math>\alpha</math>-ヘリックスなどの2次構造の形成に必要なアミノ酸を適切な位置に導入することにより、ペプチドに一定な立体構造を持たせることが可能になる。</p>
ファーマコフォア (Pharmacophore)	<p>医薬品が薬理作用を示すために必要な分子の形や官能基などの構造上の特徴。医薬品がターゲットと相互作用(結合)するために必要な共通の部分構造や立体的位置関係をモデル化することにより、薬理作用を示す化合物候補をDB検索したり新規化合物をデザインすることができる。</p>
iPS細胞	<p>iPS細胞(induced pluripotent stem cells、人工多能性幹細胞、誘導多能性幹細胞)とは、体細胞へ数種類の遺伝子の導入や化合物を投与することにより、ES細胞(胚性幹細胞)に似た分化万能性(pluripotency)を持たせた細胞のこと。</p>
エントリークローン	<p>Gateway システム(インビトロ部位特異的組み換えを利用したクローニングシステム)で使用されるタンパク質発現のためのリソースクローン。ORF配列の両端に部位特異的組み換え配列が付加されており、種々の発現ベクターにORF配列を容易に挿入でき、タンパク質発現用クローンをハイスループットに作製するために利用する。</p>

<p>腓島特異的遺伝子</p>	<p>膵臓に高発現している遺伝子で、全身臓器でユビキタスな発現パターンを示さない遺伝子。腓島だけに発現している遺伝子という意味ではない。</p>
<p>EXPOC®システム</p>	<p>EXPOC®(Express Proof of Concept)システム:成体期における液性因子の機能探索に特化した新たなトランスジェニック(Tg)マウス作製法。抗体のコンポーネントである免疫グロブリン軽鎖遺伝子と同じ様式で発現させることにより、循環血液中に高濃度の外来分泌蛋白質を産生するマウス個体を得ることができる。魅力的な創薬ターゲットである液性因子(サイトカイン/増殖因子/ホルモン等)や可溶化受容体を過剰発現する Tg マウスの表現型は、同因子の生理活性同定において極めて有用な情報となる。標的遺伝子の全長 cDNA 入手から 4 ヶ月で Tg マウスの解析に着手可能であり、従来の Tg マウス作製法と比較して 20 倍以上のスループット向上がはかられている。</p>
<p>キメラマウス</p>	<p>2 種以上の遺伝形質の異なる細胞で構成された動物個体をキメラと呼ぶ。語源はギリシャ神話の怪物(ライオンの頭、ヒツジの胴、ヘビの尾を持つ)。近年盛んになったノックアウトマウス作製においては、遺伝子改変したマウス胚性幹細胞(ES 細胞)をマウス初期胚に注入し、注入胚を代理母の子宮に移植することによりキメラマウスが作製される。通常、ES 細胞と宿主胚は異なる毛色のマウス由来のものが使用されるため、キメラマウス体表の毛色は 2 色が様々に入り混じった状態となる。また毛色の分布によりおおまかなキメラ率(ES 細胞由来の体細胞の割合)の判断が可能である。</p>
<p>FRET</p>	<p>励起状態にある蛍光分子(ドナー:エネルギー供与体)からごく近傍の蛍光分子(アクセプター:エネルギー受容体)へ励起エネルギーが移動する現象。ドナー、アクセプターの近接を相互作用シグナルとして検出するのに用いられる。</p>
<p>ストークスシフト</p>	<p>励起極大と蛍光極大の差。多くの蛍光分子はその差が小さい。</p>
<p>蛍光相関分光法(FCS)</p>	<p>レーザー励起光を絞り込んだ微小焦点領域を作り、その中の蛍光シグナルのゆらぎから、ブラウン運動を行う蛍光分子の大きさや分子数を計測する方法。蛍光標識されたタンパク質のタンパク相互作用による結合を観察することができる。</p>
<p>蛍光相互相関分光法(FCCS)</p>	<p>FCS が一波長検出であるのに比較し、FCCS は発光波長の異なる2つの蛍光分子を用いて、2つの蛍光シグナルのゆらぎにみられる時空間的同時性から、2つの蛍光分子の間の相互作用を解析する手法。</p>

Multisite Gateway 法	Gateway システムを用いて複数のエントリークローンを一つのベクターに挿入する方法。通常の Gateway システムは 2 種の組み換え配列を利用するが、MultisiteGateway では 3 種以上の組み換え配列を利用し、複数のエントリークローンを発現ベクターに組み込んでハイスルプットに発現クローンを作製できる。
過剰発現	細胞内での遺伝子発現に対して、本来のプロモーターを強制発現する強力なプロモーターに変えて、通常の細胞内での遺伝子発現レベルよりも過剰に発現させること。
ハプロ不全破壊株	二倍体菌株で2コピーある遺伝子のうち一方のみが破壊されている株
ポリグルタミン病	脊髄小脳失調症やハンチントン舞踏病など、少なくとも9種の遺伝性神経変性疾患において原因遺伝子の翻訳領域内にポリグルタミン鎖をコードする CAG リピートの伸長がおこることが見出されている。核内に蓄積したポリグルタミンリピートが転写機構を阻害して、神経変性を おこすというモデルが考えられている。
体内時計	睡眠・覚醒のような行動リズムや、ホルモン分泌を始めとする様々な生理的な24時間周期のリズムを生み出し、調節する生体内に備わっている機構。体内時計の異常は不眠症だけでなく、認知症における徘徊や引きこもりへの関与も示唆されている。
レポーターアッセイ	特定の遺伝子の発現を定量する方法。遺伝子の発現を制御するプロモーターやエンハンサー下流に、発現量を定量しやすいルシフェラーゼなどのレポーター遺伝子をつなげて細胞や動物に導入し、遺伝子発現をレポータータンパク質の活性として測定する。レポーター遺伝子として、蛍光タンパクや分泌型ルシフェラーゼなどを用いると、生きた状態での観察も可能である。
フレキシザイム	tRNA やアミノ酸基質に対してフレキシブルな認識を持つ人工リボザイムであり、非天然型アミノ酸を含むペプチドの無細胞系での合成を可能にする。
RAPIDS	RANdom Peptide Integrated Discovery System: 改変遺伝暗号翻訳ペプチド合成システム。人工 RNA 触媒フレキシザイムを駆使して、遺伝暗号表をリプログラミングし、翻訳系で複数の特殊アミノ酸を含む特殊ペプチドを合成する新技術。
蛍光分子トモグラフィー (FMT)	FMT:Fluorescence Molecular Tomography。近赤外蛍光試薬等により、非侵襲でマウス生体内の蛍光発現部位を検出し、定量的な3次元イメージングを可能とする技術。炎症部位の可視化など病態解析に用いることができる。
マイクロサテライトマーカー	通常 2-7 塩基程度の単純な繰り返し配列をマイクロサテライトと呼ぶ。繰り返し

	返し数等が異なる遺伝的多型が存在する 경우가多く、連鎖解析や相関解析における遺伝マーカーとして有用である。猪子らによってヒト全ゲノム領域に渡り約3万個のマイクロサテライト遺伝多型が設定された。一塩基多型 (SNP) に比較して、アリル数の多さや、多型出現時期の新しさに特徴があり、ゲノムワイド遺伝的相関解析等において、SNP とは異なる情報を齎すことも期待される。
ユビキチン	ヒトの場合 76 アミノ酸からなるタンパク質で、ユビキチン活性化酵素、結合酵素、連結酵素等の作用により、標的タンパク質に共有結合により付加され、主に、プロテアソームによるタンパク分解の爲の標識として作用する。
破骨細胞	骨形成において、骨芽細胞とともに重要な細胞種で、骨吸収を行う。骨髄系の単球/マクロファージより分化するが、その過程にNF- $\kappa$ B 非古典的経路の誘導が必須であることが知られている。
プロテアソーム	典型的には 20Sコア複合体と、19S(または 11S)の制御複合体から構成される。一般的には、ユビキチンが付加されたタンパク質の短ペプチドへの分解を行うが、NFKB1 タンパクの場合のように、タンパク質の特定の領域を特異的に切断する例も知られている。細胞周期や、遺伝子発現、ストレス応答等、多様な生物現象に必須である。阻害剤の、癌や自己免疫疾患への効果が注目されている。
酵母ツーハイブリッド法	DNA 結合ドメインに融合したタンパク(ベイト“餌”)と、転写活性化ドメインにタンパク(プレイ“獲物”)が相互作用する場合、結果として DNA 結合ドメインと転写活性化ドメインの双方を有する機能的な転写活性化複合体が形成される。これを利用して、この複合体に対する結合排列 DNA を持つプロモーター活性の上昇によって、ベイト-プレイ間のタンパク質間相互作用を検出する。相互作用パートナー同定に広く使用されているが、実際のスクリーニングに際しては、相互作用に依らない偽陽性、即ち、ベイト-プレイ双方への両依存性を示さない偽陽性を如何に排除するかが鍵となる。
siRNA ( small interfering RNA)	人工的に二本鎖 RNA を細胞内に導入することにより、任意の遺伝子の発現を抑制することができる。この現象を RNAi (RNA 干渉) といい、RNase III の一種である Dicer によって、長い二本鎖 RNA が、siRNA (small interfering RNA) と呼ばれる 21-23 nt の短い 3' 突出型二本鎖 RNA に切断されること、siRNA といくつかの蛋白質から成る RNA 蛋白質複合体である RISC 複合体が再利用されながら相補的な配列を持つ mRNA を分解することが知られている。現在では、siRNA を細胞内に導入することで任意の遺伝子の発現を抑制することによりその遺伝子機能を解析する手段として汎用されている。
メフェナム酸	非ステロイド性抗炎症薬(NSAIDs)のひとつで、解熱鎮痛消炎剤として、炎症や発熱を引き起こすプロスタグランジン(PG)の生合成酵素「シクロオキシゲ

	ナーゼ(COX)」を阻害することによりプロスタグランジンの産生を抑制します。
アセトアミノフェン	非ピリン系解熱鎮痛薬のひとつ。シクロオキシゲナーゼ3 (COX3)を阻害するといわれている。
骨芽細胞	骨芽細胞(こつがさいぼう、osteoblast)は骨組織において骨形成を行う細胞であり、細胞質は好塩基性を示し、アルカリホスファターゼ活性を有している。
骨形成因子(BMP-2)	形成因子(BMP)は骨を誘導する蛋白性因子であり、単独で異所性骨形成シグナルとしての作用を有する唯一のサイトカインです。BMPは骨格形成、骨折治癒などのあらゆる生理的骨形成に必須の役割を担うことが明らかになっており、BMP-2についてはその強い骨誘導能から特に研究が進んでいます。
PPARs	peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)。核内受容体スーパーファミリーのメンバーの一つ。現在までに $\alpha$ 、 $\gamma$ 、 $\delta$ ( $\beta$ )の三つのサブタイプが報告されている。最初に発見された $\alpha$ サブタイプ(PPAR $\alpha$ )がペルオキシソーム増殖剤であるフィブラート系薬剤により活性化されたことからその名が付いた。PPAR $\alpha$ のアゴニストは、高脂血症の治療薬として、PPAR $\gamma$ のアゴニストは、糖尿病の治療薬として使用されている。また、PPAR $\delta$ のアゴニストは、メタボリックシンドロームの治療薬となる可能性が期待されている。
GPCR(G 蛋白質共役型受容体)	G 蛋白質共役型受容体(G-protein coupled receptor、GPCR):ホルモンなどの生理活性物質の多くは、受容体に結合することにより細胞に情報を伝達している。中でもG蛋白質と共役して情報伝達する受容体群が G 蛋白質共役型受容体(GPCR)である。これらの受容体は細胞膜を 7 回繰り返して貫通するという特徴的な共通構造をもっている。
律速酵素	律速酵素。複数の反応が繋がる経路のうち、最も反応速度の遅い反応を触媒する酵素を律速酵素といい、律速酵素が全体の反応がどれだけかかるかを決定している。
AGF (Angiopoietin-Related Growth Factor)	アンジオポエチン様増殖因子(AGF):AGF 遺伝子破壊マウスが、肥満・糖尿病の病態を示し、一方、AGF の過剰発現トランスジェニックマウスが、インスリン感受性亢進や高脂肪食による体重増加が抑制されていたことから抗肥満・抗糖尿病因子として知られている。
Akt	AKT(またはPKB)シグナル伝達経路は、細胞増殖や生存、細胞サイズや栄養素利用への応答性、グルコース代謝、組織浸潤および血管新生など多くの細胞プロセスを調節している。AKT は細胞外(成長因子およびインスリン)および細胞内(受容体チロシンキナーゼ、Ras および Src)シグナルの伝達経路において主要な節点として働きます。AKT 経路は至るところに存在して

	いる分子で、細胞内において基本的な細胞プロセスを調節しています。
Foxo1	Foxo1 は、糖新生の律速酵素である G-6-P (glucose-6-phosphatase), PEPCK (phosphoenolpyruvate carboxykinase) の発現を活性化する転写因子で、空腹時における基底レベルの血糖値維持に重要な役割を果たしている。また糖尿病の発症に、この糖新生の亢進が関係していると考えられており、Foxo1 を介した糖新生の制御メカニズムの研究が、糖尿病の発症メカニズムの解明へとつながることが期待されている。
IRE (インスリン応答配列)	インスリン刺激に応答して転写レベルで変化が見られる遺伝子のプロモーター・エンハンサー領域におけるインスリン応答性の転写制御配列をいう。
GSK3 (GSK3 $\beta$ ) (グリコーゲン合成酵素リン酸化酵素 3)	GSK-3 はグリコーゲン合成酵素をリン酸化する酵素として 1980 年に蛋白質として精製され、1990 年にはその遺伝子配列が決定された。GSK-3 は糖質代謝を制御するリン酸化酵素として同定されたが、現在は多彩な細胞機能を制御することが明らかになっている。また、酵母からヒトに至るまで、進化的に保存されていることから、GSK-3 は生物学的に非常に重要な酵素であると考えられている。
レプチン受容体遺伝子変異マウス (db/db マウス)	レプチンは、脂肪細胞から分泌されるホルモンで、血液中のレプチンが増えると満腹中枢が刺激され、摂食中枢は抑制されて食欲が落ちる。交感神経系にも働きかけ、脂肪の蓄積を抑制し、エネルギー消費を亢進する。通常、細胞の表面にあるレプチン受容体に結合して作用するが、この受容体に異常があり、レプチン作用障害が起こると肥満・糖尿病になる。このレプチン受容体の遺伝子変異により肥満・糖尿病を呈するマウスの系統が維持されており、治療薬の創製研究等に活用されている。
DRF 法	一群の類似した活性を有する分子に共通の特徴は、それらの分子を表現する二次元構造記述子の値の分布で表現することができる。この分布は当該活性を持つ分子に要求される化学的特徴を示すものであり、それら一群の分子の活性らしさを決めるルール (drug-likeness rule) と考えることができる。DRF (drug-likeness rule finder) 法は、このルールを一群の活性分子について求め、さらにそのルールに基づき活性未知の大規模な分子群の活性を予測する方法である。(K.Horio, H.Muta, J.Goto, N.Hirayama, A Simple Method to Improve the Odds in Finding 'Lead-like' Compounds from a Chemical Library. Chem.Pharm.Bull. 2007, 55, 980)
シミュラリティー検索(構造類似性検索)	分子の平面構造の特徴を表す方法には種々あるが、大別すると、二つの方法がある。第一は部分化学構造の組み合わせで分子を表現する方法であり、第二は分子全体の性質に相当する構造記述子で分子を表現する方法である。これらの方法により定義できる分子の類似性(シミュラリティー)指数



	に基づき、特定の分子と構造上類似した分子を分子データベースから探索することができる。
シクロオキシゲナーゼ	<p>プロスタグランジンの合成酵素。炭素数 20 の多価不飽和脂肪酸と 2 個の分子状酸素との反応を触媒し、特徴的な 5 員環構造とヒドロペルオキシ基をもつプロスタグランジンGを合成し、プロスタグランジンヒドロペルオキシダーゼ活性によりプロスタグランジンHを産生する。本酵素のヘム鉄がこれらの反応に関与している。本酵素にはCOX-1 とCOX-2 の二つのアイソザイムが存在する。COX-1 は動物細胞に幅広く分布し、体内局所での状況変化に速やかに対応する生理的応答に関与するため細胞内小胞体に発現している構成(常在)型酵素である。COX-2 は誘導型酵素であり炎症や腫瘍形成などの病態に関係し、細胞内では核膜に主として存在する。COX-2 の誘導因子としては、発がんプロモーター、エンドトキシン、サイトカインや増殖因子が、誘導抑制因子としては抗炎症性グルココルチコイドであるデキサメタゾンがある。種々の非ステロイド性抗炎症薬はCOX-1 とCOX-2 をどちらも抑制するものが多い。COX-1 阻害薬による副作用として胃腸管障害がおこる。COX-2 選択性阻害薬はこの副作用の無い鎮痛薬として汎用されているが、心血管系副作用が問題となっている。</p>
PPARA	Peroxisome Proliferative Activated Peceptor Alpha の略で、脂質代謝にかかわる遺伝子。
RXRA	Retinoid X Peceptor Alpha の略号で、核内ホルモン受容体スーパーファミリーに属するレチノイン酸受容体。
BSA	Bovine Serum Albumin の略号で、ウシ血清アルブミン
hOCT	Human Organic Cation Transporter の略号で、カチオン系の薬剤を輸送するトランスポーター
cRNA	Complimentary RNA の略号で、相補的な RNA
metformin	ビグアナイド系の糖尿病治療薬の名称

## I. 事業性の位置づけ・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

1990年代以降、ライフサイエンス分野の先端科学技術の進歩に伴い、より革新的な新薬創出への期待と同時にハイスループットスクリーニングやコンビナトリアルケミストリーの出現によって一段と効率的な研究開発プロセスの確立への期待が高まった。しかしながら、10数余年が経過しその期待は必ずしも現実のものとはなっていないのが実状である。最大の医薬創出国である米国においても同様な状況である。その背景には、研究開発費の大幅な伸び(15年で約4倍)にも関わらず新薬数は頭打ちとなっている。全世界を対象とした調査研究においても同様の結果が報告されており、研究開発費が増加する反面、新薬創出数が減少するという傾向は今後もしばらく続くと予想されている。

新薬の開発期間、成功確率、費用などの生産性に関する指標は年々悪化する傾向にある。日本で承認された新薬について臨床開発期間を見ると10年前に比べて約10ヶ月長期化しており約70ヶ月に及んでいる。前臨床段階の開発候補の選定にもかなり時間を要しているため、かつては1新薬の全研究開発期間がおおよそ10年と言われたものが、現在では15年ほどに長期化している。開発経費の増加の主な要因は、開発中止時期が初期から後期段階に変化してきたことにある。1990年代初期には、薬物動態や経口吸収性といった問題でフェーズI段階でドロップアウトしていたものが、現在では有効性が確認できないあるいは副作用などの安全性の問題でフェーズIIIに入って開発中止になるものが増えてきたこと(全体の50%)が特に開発経費を増加させている主要な原因と言える。開発中止が後期になればなるだけ、それに投入したより多くの費用が無駄になるということである。

このことから、医薬品開発期間の長期化、成功確率の低下、費用の増大といった問題を打ち破る生産性の向上は、程度の差はあるが世界の製薬業界が現在望んでいる最大の課題と言えよう。

この生産性を高めて行くには、創薬プロセスにおける4つのボトルネックを解消していくことが必要である。1つは、探索研究段階での疾患標的分子の同定である。2つ目は、探索研究から前臨床への開発候補の最適化と製造である。3つ目は、前臨床から臨床への橋渡しである。4つ目は、治験・臨床研究の推進である。1つ目の疾患標的分子の同定では、医薬品開発において相手(ターゲットタンパク質)の素性がはっきりしているほど心強いことはない。例えば、あるレセプターに対するアンタゴニストを作りたい場合、レセプターの構造や相互作用情報が分かれば構造とその活性相関解析により迅速に候補物質のスクリーニングができる。これまでの網羅的なスクリーニングや経験と勘に頼ったスクリーニングとは桁違いに効率が良くなり、その後の臨床研究に向けたプロセスにおいても確度の高い情報が提供でき効率よく推進できるものと期待できる。従って、公的資金を投入することで、疾患に関係するターゲット分子を効率よく同定できる技術開発やヒット化合物のスクリーニング技術や同定技術の開発を推進することで創薬プロセスを短縮し、製薬業界が望んでいる生産性の向上を大幅に推進することが期待できる。

そこで、NEDO技術開発機構では「化合物等を活用した生物システム制御基盤技術開発」プロジェクトを立ち上げた。NEDO技術開発機構は、これまでに完全長cDNAプロジェクトにより得られたその膨大なリソースとタンパク質機能解析プロジェクトにより開発した世界最高レベルのナノフローLC/MSを用いたタンパク質相互作用解析技術等を最大限に活用して創薬ターゲット候補となり得るタンパク質の相互作用の絞込みを行うと共に、疾患等の生物現象を制御する新規骨格化合物等の探索・評価技術の開発を適

じて創薬研究開発を支援することを決めた。これにより、バイオテクノロジーの産業化において有用な知見が蓄積され個別化医療や画期的な新薬が創出されることが期待できます。また、我が国のバイオ産業の競争力強化、新産業の創出と国際的にも先導的な役割を担うものと期待できる。このように、本プロジェクトは、その重要な役割故、民間活動のみでは実施が困難なため、国が支援し主体的に推進する必要がある。

## 1. 2 実施効果(費用対効果)

本プロジェクトでは、ポストゲノム研究の産業利用が期待される「ゲノム創薬」の加速を支援するため、我が国の強みとする完全長 cDNA リソースや、世界最高レベルのタンパク質の相互作用解析技術等を最大限に活用し、創薬ターゲット候補となりうるタンパク質相互作用の解析等により創薬ターゲット候補の絞り込みを行う。それと共に、疾患等の生物現象を制御する新規骨格化合物等の探索・評価を行うための技術開発を行うことにより、創薬等の研究開発を加速する。これによりバイオテクノロジーの産業化において有用な知見が蓄積しバイオ産業の情報基盤を強化する。また個別化医療や画期的な新薬の創出が期待でき、我が国バイオ産業の競争力強化・新産業の創出を図り、国際的優位性を確保することを目的としている。

具体的に、本プロジェクトの最終年度(平成22年度末)には、タンパク質相互作用を標的とする創薬に必要な要素技術について10個以上の相互作用情報を対象に制御物質のスクリーニング等を行うことにより検証し、製薬企業等で実践的に利用可能なレベルまでシステムを確立する。さらに3~4程度の創薬開発候補ターゲットに関して、臨床薬のリード化合物と成りうるタンパク質相互作用制御物質を創製する。

新薬開発に向けた開発技術やプロセスの短縮など、将来的に創薬分野において、その実施効果は大いに期待できる。

## 2. 事業の背景・目的・位置付け

近年、新薬開発コストが増加する一方、上市薬の数は減少傾向にある。これは臨床研究の厳密化など、様々な要因があるが、停滞している創薬開発の活性化を図るため、新たな創薬ターゲットや創薬リード化合物を生み出す技術が求められている。

本プロジェクトは、日本独自に開発された世界最高感度の質量分析技術を活用した大規模なタンパク質ネットワーク解析システムを開発し、これまでにないユニークな且つ統一的なスクリーニング系を構築するとともに、日本の強みである天然物化学を活かした多様性に富み冗長性のない次世代の天然物ライブラリーを構築する。そしてこれらの開発成果を活用し、がんや生活習慣病などの疾患を対象とした創薬ターゲット候補となり得るタンパク質相互作用を取得し、これらの相互作用をターゲットとした新規の創薬候補化合物を探索することにより、国内の製薬企業における創薬開発を加速することを目的としている。これにより、上市までの創薬プロセスを短縮し、新薬創出に貢献すると共に我が国バイオ産業の競争力強化・新産業の創出を図る。

## II. 研究開発マネージメントについて

### 1. 事業の目標

## 1.1 事業全体の目標

本プロジェクトでは、ポストゲノム研究の産業利用が期待される「ゲノム創薬」の加速を支援するため、我が国の強みとする完全長 cDNA リソースや、世界最高レベルのタンパク質の相互作用解析技術等を最大限に活用し、創薬ターゲット候補となりうるタンパク質相互作用の解析等により創薬ターゲット候補の絞り込みを行うとともに、がんや糖尿病などの疾患に係わる生物現象を制御する新規骨格化合物等の探索・評価を行うための技術開発を行うことにより、創薬等の研究開発を加速する。これによりバイオテクノロジーの産業化において有用な知見が蓄積しバイオ産業の情報基盤を強化する。また個別化医療や画期的な新薬の創出の期待ができるとともに、我が国バイオ産業の競争力強化・新産業の創出を目指し、積極的に推進するために以下の数値目標を設定した。

### ・最終目標(平成 22 年度末)

タンパク質相互作用を標的とする創薬に必要な要素技術について 10 個以上の相互作用情報を対象に制御物質のスクリーニング等を行うことにより検証し、製薬企業等で実践的に利用可能なレベルまでシステムを確立する。さらに3~4程度の創薬開発候補ターゲットに関して、臨床薬のリード化合物と成りうるタンパク質相互作用制御物質を創製する。

### ・中間目標(平成20年度末)

タンパク質の相互作用解析技術の高速化・高感度化に目途をつけるとともに、疾患に係わるタンパク質相互作用等を解析し、創薬ターゲット候補となる新規の重要なタンパク質相互作用情報を 250 以上同定する。また、疾患を制御する化合物の探索・評価技術の開発に目途をつけ、産業上有用な化合物等を 25 以上取得する。

## 1.2 目標設定の理由

本プロジェクトでは、公募採択により2つの委託先(社団法人バイオ産業情報化コンソーシアム{JBIC}、バイオテクノロジー・開発技術研究組合{バイオ組合})を決定した。JBIC において大きくは2つの開発項目について目標を設定し実施している。1 つは、「タンパク質の相互作用解析等により創薬ターゲット候補・疾患メカニズムを解明する技術の開発」であり、これには4つのサブテーマ、1)タンパク質ネットワーク解析技術の開発、2)タンパク質相互作用情報の検証技術の開発、3)タンパク質相互作用予測技術の開発、4)疾患関連遺伝子探索技術により実施している。2つ目は、「生物機能を制御する化合物等を探索・評価する技術の開発」であり、これには3つのサブテーマ、1)化合物等の探索技術の開発、2)化合物等の高機能化技術の開発、3)化合物等の評価技術の開発により実施した。バイオ組合においては、採択の条件から糖尿病を中心に進めた。具体的には、現在多くの予備軍、並びに患者を抱える糖尿病、睡眠疾患等の慢性疾患を中心に、ジェノダイブファーマの開発するマイクロサテライトマーカールを利用した疾患感受性遺伝子探索技術とアステラス製薬が開発する siRNA ライブラリー等を用いた生物機能制御遺伝子探索技術という二つのアプローチによる成果を、日立製作所が開発する膜タンパク質機能解析及びタンパク質相互作用解析技術を加味して、ゲノム創薬を加速するための技術開発を実施した。

これらの開発項目は、これまで蓄積してきた完全長cDNAの膨大なリソースと世界最高レベルのタンパク質相互作用解析技術、多型解析技術等を最大限に活用し、創薬ターゲット候補となり得るタンパク質の相互作用の絞り込みを行うことで、疾患等の生物現象を制御する新規骨格化合物(天然化合物を中心)等の探索・評価技術の開発を通じて、停滞している創薬産業に対して創薬研究開発を支援することにある。

これにより、バイオテクノロジーにおいて有用な知見が蓄積され、個別化医療や画期的な新薬創出に向け、我が国のバイオ産業の競争力強化、新産業創出に向け産業応用を目指した目標設定とした。

## 2. 事業の計画内容

### 2.1 研究開発の内容

#### 1) 研究開発の概要

##### 1) - 1 社団法人バイオ産業情報化コンソーシアム

上記目標を達成するために、下記の各研究開発項目「タンパク質の相互作用解析等により創薬ターゲット候補・疾患メカニズムを解明する技術の開発」(①～④)、「生物機能を制御する化合物等を探索・評価する技術の開発」(⑤～⑦)、及び「総合調査研究」について実施した。

研究開発項目①「タンパク質の相互作用解析等により創薬ターゲット候補・疾患メカニズムを解明する技術の開発」

- ① 遺伝子及びタンパク質相互作用ネットワーク解析技術の開発
- ② タンパク質相互作用情報の検証技術の開発
- ③ タンパク質相互作用予測技術の開発
- ④ 疾患関連遺伝子探索技術の開発

研究開発項目②「生物機能を制御する化合物等を探索・評価する技術の開発」

- ⑤ 化合物等の探索技術の開発
- ⑥ 化合物等の高機能化技術の開発
- ⑦ 化合物等の評価技術の開発

総合調査研究

#### ① 遺伝子及びタンパク質相互作用ネットワーク解析技術の開発

疾患に係わるタンパク質ネットワークの解析に用いるナノ LC 質量分析システムについての自動化と高感度化を行い、重要なタンパク質相互作用情報を取得する。また、低分子生理活性物質キメラ化合物を用いた相互作用解析をおこない、相互作用タンパク質を同定する。

#### ② タンパク質相互作用情報の検証技術の開発

タンパク質相互作用の探索および検証のためのヒト・エントリークローン、変異エントリークローンの作製を行い、各チームにクローン供給を行う。また、蛍光タンパク質融合タンパク質の発現を行い、スクリーニングチームと共同でタンパク質相互作用解析を行う。相互作用評価ツールとして有用な抗体の作製については、分子プローブ作製のスループット向上を図り、重要度の高い相互作用に係わるタンパク質に絞り込み実施すると共に、抗体による相互作用評価技術を開発する。立体構造モチーフ・ペプチドのファージライブラリーを構築し、疾患制御タンパク質に対してスクリーニングして標的タンパク質結合性ペプチドを獲得し、相互作用を特異的に阻害することを確認する。また、立体構造ペプチドから得られる3次元情

報をもとに、低分子化合物を分子設計する。

### ③タンパク質相互作用予測技術の開発

タンパク質-タンパク質相互作用と、その相互作用を制御する低分子化合物を予測する*in silico*スクリーニングシステムの開発と標的タンパク質の解析を実施する。タンパク質間相互作用ネットワーク解析実験から得られる優先度の高い標的相互作用情報を選定し、そのタンパク質-タンパク質相互作用モデルからスクリーニング候補となる低分子化合物を予測する。

### ④疾患関連遺伝子探索技術の開発

液性因子/受容体相互作用に着目し、機能未知の液性因子をコードするcDNAについて、(Express Proof of Concept: EXPOC®システム(マウス個体をアッセイ系とする独自の高効率機能解析システム)による網羅的遺伝子機能解析を実施する。生理活性を示した遺伝子については、疾患との関連性検討や作用メカニズム解明のための二次評価を実施する。

タンパク質ネットワーク解析の結果から明らかとなった新規疾患候補遺伝子に絞り込んで患者群のゲノム解析を詳細に施行することにより、糖尿病をモデルとしてローコストで効率的な疾患遺伝子の同定を行う(新規糖尿病候補分子の同定、新規糖尿病候補遺伝子多型の同定、新規疾患候補遺伝子の個体での検証)。そして同定された疾患候補分子を逐一超高感度質量分析システムに供することにより疾患相互作用ネットワーク構成分子を網羅すると共に真の疾患感受性遺伝子ならびに疾患相互作用遺伝子を同定する。さらに、細胞株或いはマウス・ラットを用いて、これらの疾患感受性遺伝子の疾患に対する影響を検討する。

### ⑤化合物等の探索技術の開発

蛍光タンパク質を用いて、疾患関連相互作用を指標に化合物ライブラリーをスクリーニングする技術を確立する。具体的には、FCCS(蛍光相互相関分光法)を使って、試験管内あるいは生細胞で新規アッセイ系を構築する。さらに complementation 法を使って、生細胞で新規アッセイ系を構築する。

モデル生物である酵母、ショウジョウバエ、マウスを用いて独自の表現型スクリーニング系を構築し、探索研究を実施する。具体的には、分裂酵母、出芽酵母において酵母遺伝子、ヒト遺伝子を導入し、過剰発現によって致死、形態変化等の表現型が現れる遺伝子を同定する。ショウジョウバエについては、ハイスループットかつ定量的な表現型スクリーニングシステムを構築し、野生型および神経疾患、炎症、糖尿病モデル等の変異体を用いた探索研究を行い、致死性、成長、行動の表現型によって評価する。一方、マウスにおいては個体レベルの行動リズムを制御できる化合物を取得することを目的として、ハイスループットかつ定量的な測定系を構築し、分子レベル・細胞レベル・組織レベルでの探索研究を行う。

多様な構造を有する天然物、特に微生物代謝産物をソースとして、タンパク質相互作用を制御する化合物を見出すことを目的とし、微生物二次代謝産物を主としたスクリーニングサンプルの調製を行う。具体的には、国内、およびアジア諸外国から土壌を採集し、様々な放線菌、バクテリアおよび糸状菌を分離する。分離した菌株について、様々な条件下で培養し、有用物質スクリーニング用のサンプルを調製する。製薬企業などが保有する微生物等の天然物ライブラリー、或いは創薬を目的としたフォーカスド合成ライブラリーを集積し、共通のスクリーニング資源として活用する。共通インフラとしてのサンプル供給システ

ムの構築と冗長性を排除した高品質なサンプル調製を図る。スクリーニングに関しては、タンパク質相互作用情報を指標にしたスクリーニングに加え、重要なタンパク質相互作用に関しては、相互作用情報のみでなく酵素活性や遺伝子発現情報なども取り入れたアッセイ系を構築し、スクリーニングを展開する。

#### ⑥化合物等の高機能化技術の開発

高活性が見込まれている天然物を母骨格とするコンビナトリアル合成を行うため 活性部分構造ユニットに分割し、それらの合成法を確立する。単純作業となるユニットの合成についての数工程を自動化し、人の作業の軽減と大規模合成の実現を図る。高い多様性を有する3次元立体構造テンプレートを開発し、化合物ライブラリーを構築し活性評価を行う。本プロジェクトのインシリコグループとスクリーニンググループと共同で高機能な新規化合物の設計・合成・評価を進める。

また、非天然型ペプチドを用いた多様でかつ迅速高機能化対応型化合物ライブラリーの技術開発と薬剤探索は、より密接なスクリーニングチームおよび *in silico* スクリーニングチームとの連携により進める。更に、高機能化特殊ペプチドのスクリーニングを行うと同時に、RAPID システムを駆使した既存ペプチド薬剤の特殊ペプチド化も行う。

#### ⑦化合物等の評価技術の開発

スクリーニング系で同定された化合物等が真に生体機能の制御に利用できるかを評価するために、実験動物を用い個体レベルでの化合物の薬効・安全性の評価を高精度かつ迅速に行うための新技術を開発する。具体的には、生体内での蛍光発現の非侵襲、低侵襲的観察・計測を可能とするための機器・基盤技術の開発を行なう。さらに、創薬ターゲット分子を可視化・モニターするための遺伝子操作マウスを作成し、これを疾患モデル動物と組み合わせ、分子動態の観察を行なうとともに、化合物等が創薬ターゲットを制御し得るかの検討を行う。

ヒト遺伝子およびラット遺伝子を搭載するマイクロアレイシステムを用いて、各種ヒト細胞培養系およびラット個体系に薬効と毒性等が明らかになっている各種物質を体系的に暴露したサンプルの遺伝子発現頻度情報を取得する。将来的な実験動物代替毒性試験法への応用を考慮して、化合物曝露実験にヒト胎盤あるいは正常皮膚由来の正常細胞を加える。集積した情報から、いかなるサンプルおよび遺伝子の組合せでも相互比較解析が可能なデータ集合体(薬効・毒性参照データベース)を構築する。また、本プロジェクトの課題解決型連携企業が開発し、臨床試験途中で毒性が判明した薬剤候補物質について、遺伝子発現プロファイルを取得・解析する。

#### 総合調査研究

本プロジェクトに関連する技術動向等の調査やプロジェクト内外との迅速な情報交換等を行うために総合調査研究を実施し、本プロジェクトの円滑で効率的な推進を図る。

#### 1)ー2 バイオテクノロジー開発技術研究組合

現在多くの予備軍並びに患者を抱える糖尿病を中心に、ジェノダイブファーマと東海大学の開発するマイクロサテライトマーカーを利用した疾患感受性遺伝子探索技術と、アステラス製薬が開発する siRNA ライブラリー等を用いた生物機能制御遺伝子探索技術という二つのアプローチによる成果を、日立製作所

が開発する膜タンパク質機能解析及びタンパク質相互作用解析技術を加味して、ゲノム創薬を加速するための技術開発を実施する。

⑧マイクロサテライトマーカ―を利用した疾患関連遺伝子探索技術により特定された疾患感受性遺伝子群の創薬価値抽出技術の開発

⑨siRNA ライブラリー等を用いた生物機能制御遺伝子の探索技術及び創薬標的検証技術の研究開発

⑩化合物又は相互作用を探索、評価する基盤技術の研究開発

⑧マイクロサテライトマーカ―を利用した疾患関連遺伝子探索技術により特定された疾患感受性遺伝子群の創薬価値抽出技術の開発

3 万個のマイクロサテライトマーカ―によるゲノムワイドな相関解析手法を用いて、生活習慣病に関連が深い糖尿病等に関連する遺伝子の特定し、創薬アプローチを可能にする。タンパク質-タンパク質相互作用から疾患に迫る手法と並行、補完して提供される疾患関連遺伝子探索技術を利用し、新たに見出された具体的な疾患感受性遺伝子の機能解析を行い、創薬ターゲットを提供する。

⑨siRNA ライブラリー等を用いた生物機能制御遺伝子の探索技術及び創薬標的検証技術の研究開発

糖尿病治療薬などの標的分子の探索を目的に、以下の項目を実施し、大学等の研究機関においてもリード候補化合物創出を可能とする効率的な新たなゲノム創薬技術を開発する。

・数千個の siRNA からなる siRNA ライブラリー等を用いた生物システム制御遺伝子の探索

・生物システム(細胞機能)の観察・評価が可能な細胞株を用いた制御物質スクリーニング系の構築とスクリーニングの実施

・生物システム制御遺伝子産物の立体構造情報等に基づく、創薬標的候補絞り込み技術と活性制御化合物設計技術の開発

・ヒット化合物の構造と類似構造を有する化合物の評価を通じた、活性化合物の数量拡大と活性向上及び高機能化のための技術開発

⑩化合物又は相互作用を探索、評価する基盤技術の研究開発

従来評価の困難であった創薬ターゲットとしては極めて重要な膜タンパク質類について、有用化合物を探索する新規技術及び疾患関連タンパク質と有用化合物との相互作用を高感度かつハイスループットに評価する技術を開発する。そのことにより、上記2種の技術より獲得された疾患関連タンパク質について、有用な創薬手法を提供する。

## 総合調査研究

本プロジェクトに関連する技術動向等の調査やプロジェクト内外との迅速な情報交換等を行うために総合調査研究を実施し、本プロジェクトの円滑で効率的な推進を図る。

## 2) 研究開発の詳細

### 2) - 1 社団法人バイオ産業情報化コンソーシアム



研究開発項目①「タンパク質の相互作用解析等により創薬ターゲット候補・疾患メカニズムを解明する技術の開発」

① 遺伝子及びタンパク質ネットワーク解析技術の開発

質量分析システム等により遺伝子やタンパク質相互作用のネットワークを超高感度・高速で解析する技術を開発・確立する。ただ単に相互作用のネットワークを検出するのみならず、薬剤等外部の刺激によって変化する細胞の状態を、遺伝子やタンパク質相互作用ネットワークの変化等を分子レベルで捉えることで、新たな創薬ターゲット候補の同定、疾患メカニズムの解明を行う。また、薬剤候補化合物のタンパク質ターゲット解析を行い、作用メカニズムを分子レベルで明らかにする。

これらの中で、生命現象または疾患発症メカニズムの解明に重要であると考えられる相互作用情報は、スクリーニング対象情報として提供し、新規スクリーニング系構築に貢献する。また、課題解決型企業連携を進め、疾患関連タンパク質ネットワーク情報とともに、開発薬・上市薬ターゲットタンパク質情報など製薬企業等で実践的に利用可能な情報を提供する。

a) タンパク質ネットワーク解析並びにスクリーニングヒット化合物の評価

(JBIC 分室 1 (JBIC、アステラス製薬) 共同研究:産業技術総合研究所、東京都臨床医学総合研究所、東京大学大学院薬学系研究科、岐阜大学大学院医学系研究科、首都大学東京大学院理工学研究科、理化学研究所・筑波研究所、国立長寿医療センター研究所)

スクリーニング系で得られたヒット化合物の評価を進める。評価法としては、主にリコンビナントタンパク質を用いた系や細胞を使った系により解析を行う。

臨床医学総合研究所とは、抗癌剤開発のためプロテアソーム及びそのアッセンブリー因子をターゲットとした新規なスクリーニング系構築のための共同研究を実施する。22 年度も、スクリーニングを継続すると共に、得られたヒット化合物の生物学的な評価を行う。東京大学大学院薬学系、岐阜大学、首都大学東京、理化学研究所・筑波、国立長寿医療センター研究所、とは、タンパク質相互作用情報の検証と評価を行う。

アステラス製薬は、タンパク質ネットワーク解析システムを用いて同定された、糖尿病関連液性因子「AGF ファミリー蛋白質 X」の受容体「遺伝子 Y」の抗糖尿病創薬標的としての妥当性検証と、抗糖尿病作用発現機序の解明を行なう。

b) 質量分析前処理の高精度・自動化

(JBIC 分室 1 (JBIC)、共同研究:産業技術総合研究所、理化学研究所・和光研究所、東京工業大学大学院総合理工学研究科、東京工業大学大学院情報理工学研究科、東京都臨床医学総合研究所、京都産業大学総合生命科学部)

サンプル処理技術の高度化を目指しプルダウンビーズの開発を進める。また、開発された本技術の実証研究として、引き続きパーキンソン病および小胞体レドックスネットワークという 2 つの疾患に関連するネットワーク解析を進め、疾患発症メカニズム解明のための相互作用情報を得る。

東京工業大学とは、非特異的タンパク質吸着を最小限に抑えた精密微粒子創製技術によるプルダウン用磁性ビーズの開発に関する共同研究を行う。臨床医学総合研究所、京都産業大学とは、タンパク質ネットワーク解析技術高度化の実証研究に関する共同研究を行う。

c) 課題解決型連携

(i) 味の素

タンパク質ネットワーク解析システムを用いてアミノ酸の持つ多くの機能のメカニズムを明らかにすることおよび開発薬の作用メカニズム解明により、新たな創薬ターゲットを見出し、ターゲットの相互作用をベースとした創薬スクリーニングを実施する。

(ii) アステラス製薬

タンパク質ネットワーク解析システムを用いて糖尿病関連のタンパク質を解析し、相互作用情報を得る。得られた情報をもとに、創薬ターゲットを同定する。

(iii) 協和発酵キリン

タンパク質ネットワーク解析システムを用いて、抗癌剤開発薬5種類のターゲットタンパク質情報を取得し、それぞれの作用メカニズムを解明する。また、相互作用解析で得られた情報をもとに、同定されたタンパク質の機能解析や相互作用の検証等を行う。

(iv) 第一三共

タンパク質ネットワーク解析システムにより、免疫・アレルギー性疾患などに関わる化合物や蛋白質と相互作用するタンパク質を同定し、分子レベルにおける作用機構を推定する。

(v) 大鵬薬品

疾患との関連が示唆されるタンパク質に関し、解析相互作用予測チームの相互作用機構解析技術を応用して見出された医薬品の標的となりうるタンパク質相互作用に対し、スクリーニング系を構築しその検証を行う。

(vi) 田辺三菱製薬

2型糖尿病原因遺伝子、リウマチ等の自己免疫疾患などに関連するタンパク質や開発薬の分子レベルでの作用機構の解明を目的とする。タンパク質ネットワーク解析システムを用いて、疾患関連タンパク質の機能解明を目指す。また、開発薬の相互作用解析を行い、分子レベルの作用機構を解明する。

(vii) 東レ

臨床もしくは病態モデル動物で薬効は認められるものの薬効発現メカニズムが不明な化合物、副作用・毒性面に問題のある化合物のネットワーク解析を行い、タンパク質ネットワーク情報から化合物の作用メカニズムの解明を目指す。

(viii) 日本化薬

タンパク質ネットワーク解析技術を用いて、薬理活性を有する化合物と相互作用するタンパク質を同定することにより、化合物の作用機序を解明する。さらに、同定されたタンパク質およびそのタンパク質と相

相互作用するタンパク質群に関する情報をもとに、創薬ターゲットを探索する。

(ix) 武田薬品工業

タンパク質ネットワーク解析技術を用いて、薬理活性を有する化合物と相互作用するタンパク質を同定することにより、化合物の作用機序を解明する。さらに、同定されたタンパク質およびそのタンパク質と相互作用するタンパク質群に関する情報をもとに、創薬ターゲットを探索する。

(iii) エムバイオテック

脂質代謝関連酵素を発現し結合分子を解析する。これらの酵素は、関節リウマチなどの炎症にも深くかかわっており、遺伝性疾患とも関連があることが分かっている。この酵素の結合分子による調節システムに焦点を当てて解析し制御機構を明らかにすることにより、リウマチ性疾患の医薬品スクリーニングシステムを構築する。

d) 文献からの化合物および遺伝子／タンパク質の相互作用情報の自動収集

(JBIC 分室2(ナラプロ・テクノロジーズ)、共同研究:産業技術総合研究所)

ライフサイエンス系文献データから、遺伝子・タンパク質、化合物などの生物学・化学、疾患に関するさまざまな情報を自動的に取得するシステムを開発する。特に、フルテキストや特許公報など、構造を持つ文献データからの情報抽出・管理プログラムの開発に注力する。平成19年度は文献データそのものを整理・分類するシステムの開発を完了させて、本プロジェクトの研究者の文献データ検索の効率化等を支援する。(平成18-19年度)

e) タンパク質相互作用情報の解析支援機能の開発

(JBIC 分室3(インテック W&G)、共同研究:産業技術総合研究所)

タンパク質相互作用ネットワーク解析支援システムの一環として、実験データと関連情報のデータベース化及び、文献抽出結果、関連情報、ターゲットの絞込み等を効率良く参照、解析支援出来る機能を開発する。平成19年度は、さらにターゲットタンパク質の分子機能、オルソログ分類、作用メカニズムなどの高次概念での解析支援機能について検討を行い一部その試行を試みる。(平成18-19年度)

②タンパク質相互作用情報の検証技術の開発

①で発見されたタンパク質相互作用をインビトロ系およびインビボ系において可視化することによって検証する。これに必要な発現クローン、変異体クローン、タンパク質を供給し、相互作用検証に利用するだけでなく、スクリーニング系構築にも活用する。また、インビボ系で相互作用を検証するため、相互作用するタンパク質複合体に特異的に結合する分子プローブ等を高速に作製する技術を開発する。また、本技術を用いて、得られた相互作用タンパク質が創薬ターゲット候補として有効であるか等の検証も合わせて行う。

a) Gateway エントリークローンおよび変異エントリークローンの作製と各チームへの供給、タンパク質相互作用の探索および検証

(JBIC 分室 4 (JBIC)、共同研究:産業技術総合研究所、国立がんセンター)

タンパク質相互作用の探索および検証のためのヒト遺伝子のリソースとして、cDNAをGateway化したヒトGatewayエントリークローンおよび変異エントリークローンを100クローン作製し、各チームにクローン供給を行う。また、既存のエントリークローンの情報整理を行い、相互作用探索チーム、スクリーニングチームにクローン情報を提供する。

また、2セット以上のスクリーニング系を構築する。更に、それぞれのスクリーニング系において、25万サンプルの中から相互作用阻害物質を探索する際に必要となるアッセイ用タンパク質の供給を行う。

SPR装置および蛍光イメージングなどを利用したスクリーニング系についても引き続き実施し、相互作用阻害物質の2次評価系の構築を行う。国立がんセンターとは引き続き相互作用阻害物質の2次評価のための共同研究を行う。

#### b) マルチ cDNA 発現クローンの作製及びスクリーニング系の構築

(JBIC 分室 13 (大阪大学微生物病研究所、ライフテクノロジーズジャパン)、共同研究:大阪大学微生物病研究所)

得られたリード化合物の検証に必要なターゲットタンパク質を産生するマルチ遺伝子発現クローンの構築と、これを染色体上へ部位特異的に導入した安定発現細胞株を作製し、検証実施グループへ供給する。また、引き続き、化合物探索を行うグループからの依頼に応じたスクリーニング用遺伝子の発現クローンと、これを安定に保持して発現する細胞株の作製を行い実施グループへ供給する。

また、インビボ系でのスプリットシフェラーゼ系等を用いたマルチ遺伝子発現クローンによるタンパク質相互作用アッセイ系を確立し、企業等で実用可能なレベルのスクリーニング技術を開発する。

#### c) 抗体様分子プローブの作製と評価技術の開発

(JBIC 分室6(JBIC)、JBIC 分室7(ジーンフロンティア)、共同研究:産業技術総合研究所)

相互作用評価ツールとしての抗体様分子プローブを 20 種類以上作製する。また、無人化とスループット向上を目的とした分子プローブ作製用ロボットの開発を行い、ロボットの高度化・高速化と分子プローブのスクリーニングの自動化を行う。また、相互作用再構成系を利用し、タンパク質相互作用に対する分子プローブの効果を *in vitro* で解析する技術の開発を行う。細胞内在性のタンパク質相互作用の分析を可能にする技術開発を行う。(平成18-19年度)

### ③タンパク質相互作用予測技術の開発

重点課題に対して実施している *in silico* スクリーニングの継続と相互作用ネットワーク解析チーム、天然化合物チーム、ライブラリー合成チームとのチーム間連携を強化するための橋渡しとなるような *in silico* 解析に重点的に取り組む。天然化合物ヒットと標的タンパク質との結合予測と作用機序のモデル化、作用機序モデルに基づくライブラリー合成展開の指針の提案、構造活性相関解析、提案化合物の結合可能性の *in silico* 評価に取り組む。また本プロジェクトで実施した複合体標的の *in silico* 解析を行い、相互作用様式の分類や、それに対応した *in silico* 戦略のプロトコール提案など体系化を行う。

#### a) 標的タンパク質の立体構造構築システムの開発と解析

b) タンパク質-タンパク質ドッキング計算システムの開発と解析

(JBIC 分室 8 (JBIC)、共同研究:産業技術総合研究所)

開発した要素技術を統合化し、標的タンパク質同定や複合体の *in silico* スクリーニング、また化合物高機能化解析などに最大限の活用を図る。特に分子動力学計算や相互作用エネルギー計算などの、より高度な技術の活用に重点を置く。

c) 化合物 *in silico* スクリーニングのためインフラストラクチャ構築

(JBIC 分室 8 (JBIC)、共同研究:産業技術総合研究所)

化合物 *in silico* スクリーニングを合理的に実施するための化合物データベース構築と管理・検索のためのインフラストラクチャ環境の整備を継続する。また、タンパク質相互作用ネットワークチームおよび評価チームと連携して、mKGと標的タンパク質のトポロジー設計など、アッセイ系のインフラストラクチャ構築を支援する新しい *in silico* 解析技術を確立する。

d) 標的タンパク質間相互作用様式に基づく相互作用制御化合物の *in silico* スクリーニング

(JBIC 分室 8 (JBIC)、共同研究:産業技術総合研究所、筑波大学大学院人間総合科学研究科、東京都臨床医学総合研究所、名古屋市立大学医学研究科)

重点課題および継続テーマにおいて、他のチームと連携して *in silico* スクリーニング並びにヒット化合物の高機能化や最適化を行う。

優先課題としては、インフルエンザ RNA ポリメラーゼ複合体「PA-B1」阻害化合物 8 品目の最適化と二次アッセイに向けた解析と、もう一つの複合体形成である「PB1-PB2」のプラークアッセイ結果のフィードバック、プロテアソーム系標的複合体の *in silico* スクリーニング、天然化合物チームおよびライブラリー合成チームとの連携によるヒット化合物の最適化 (Galpain10 他、数標的を対象) などがあり、これらの研究の進展に注力する。

また、本プロジェクトで実施とした複合体標的を *in silico* 解析から体系化し、相互作用様式の分類とそれに対応した *in silico* 戦略のプロトコールを提案する。

e) 特定標的疾患解析の実施

(JBIC 分室 8 (大鵬薬品工業、興和)、共同研究:産業技術総合研究所)

医薬品の標的となりうるタンパク質相互作用モデルと *in silico* スクリーニングデータをもとに、阻害候補化合物の *in vitro* 評価系での生物活性評価を行い、結果を相互作用解析チームにフィードバックする。この情報を加味して相互作用モデル、及び化合物の最適化を実施し、生物活性評価を行う。特に、化合物のハイスループットスクリーニングのための、評価系をミニチュア化、酵素や試薬の量、比率、インキュベーション時間などの最適化を目指す (大鵬薬品工業)。

また、計算化学を利用して医薬品開発標的となるタンパク質とリガンドの相互作用機序を解析し、その結果を該当タンパク質の機能を抑制あるいは亢進する低分子化合物の探索に活用する (興和)。

f) 立体構造ペプチド・ファージライブラリーの設計と構築

(JBIC 分室 8 (JBIC)、共同研究:大阪府立大学大学院理学系研究科)

*in silico* 解析を基盤技術に、立体構造ペプチド・ファージライブラリーの設計と構築を支援する。立体構造ペプチドによる相互作用情報とバーチャルスクリーニング技術より新規な分子骨格の分子設計を継続し、この設計に基づく有機合成、結合活性を評価する。さらに立体構造ペプチドおよび新骨格低分子化合物を蛍光ラベル化して、細胞膜透過性や生理活性を検討し、この分子設計法の有効性を検証する。

#### ④疾患関連遺伝子探索技術の開発

##### ④-1 疾患関連遺伝子探索技術の開発

(JBIC 分室 1 (JBIC)、共同研究: 岐阜大学、群馬大学)

遺伝子はタンパク質に翻訳され、他の生体構成分子と相互作用することにより機能するという観点に注目し、疾患候補遺伝子をタンパク質相互作用ネットワーク解析に繋げることにより、高効率に疾患の発症メカニズムの解明に結びつける。(平成 18~20 年度)

##### a) 新規糖尿病関連分子群の同定

インスリン分泌に関係する遺伝子を網羅すべく、ヒト、マウス、ラットの膵島から発現遺伝子 (EST) を獲得する。これらの EST のうち膵島特異的に発現する遺伝子を獲得すべくラットの膵臓切片を用いて大規模 *in situ* ハイブリダイゼーションを展開する。

##### b) 新規糖尿病候補遺伝子多型の同定

データベースサーチにより上記で得られた各々の遺伝子のヒト対応遺伝子を獲得し、全エクソン、プロモーター部位をシークエンスするとともにゲノム上に最も高頻度で存在する単一塩基多型 (SNPs) スクリーニングを先ず開始する。単一塩基多型 (SNPs) を各々の候補遺伝子にゲノム上約 1~2kb ごとに 1 つ (1 つの遺伝子を約 100kb と見込むなら 50 個相当) 同定する。

##### c) 糖尿病相互作用ネットワーク構成分子を網羅

「多遺伝子型疾患」の病態機構解析には相互作用分子を包括的に網羅し、総合的に解析する研究基盤を確立する必要があるため、これらの糖尿病候補分子をテーマ①「タンパク質ネットワーク解析」の超高度質量分析システムに供することにより糖尿病相互作用ネットワーク構成分子を獲得する。

##### d) 新規疾患候補遺伝子多型の同定

データベースサーチにより得られた各々の相互作用分子のヒト対応遺伝子を獲得し、全エクソン、プロモーター部位をシークエンスするとともに SNPs 解析を行う。高脂血症、高血圧、アルツハイマー病、慢性関節リウマチなどに関しても、幾つかの有望な疾患候補分子を同様のゲノム解析に供し、真の疾患感受性遺伝子ならびに疾患相互作用遺伝子を同定する。

##### e) 新規疾患候補遺伝子の個体での検証

疾患感受性・疾患相互作用遺伝子 (タンパク質) をインスリン産生細胞株 (MIN6)、分化型脂肪細胞株 (3T3L1)、血管内皮細胞株 (HAECs) などの各種細胞株に強制発現させ、各々の疾患に対応した表現系やシグナル伝達系への影響を解析する。また、マウスあるいはラット個体レベルで発現させて、運動負荷、

種々のストレス負荷、食餌の変化など異なる環境因子の条件下で飼育し、上記の過程で得られた表現型の環境因子に対する応答性の関連を検討する。

f) 新規腓島特異的遺伝子を用いたタンパク質ネットワーク解析

新規腓島特異的遺伝子、及び腓臓切片等を用いた大規模 *in situ* ハイブリダイゼーションにより絞り込んだ候補遺伝子のタンパク質ネットワーク解析を実施し、スクリーニング系の構築を目指すとともに、各々の相互作用分子のヒト対応遺伝子を獲得し、全エクソン、プロモーター部位をシーケンスするとともに SNPs 解析を行うことにより、真の疾患感受性遺伝子ならびに疾患相互作用遺伝子を同定する。

④-2 疾患関連遺伝子探索技術の開発

(JBIC 分室 9 (協和発酵キリン)、共同研究: 早稲田大学教育・総合科学学術院、大阪大学大学院医学系)

液性因子/受容体相互作用に着目し、機能未知の液性因子をコードする cDNA について、EXPOC® (Express proof of concept) システム(マウス個体をアッセイ系とする独自の高効率機能解析システム)による遺伝子機能解析を実施する。生理活性を示した遺伝子については、疾患との関連性検討や作用メカニズム解明のための二次評価を実施する。

a) 候補遺伝子選抜/分泌チェック/ベクター構築

シグナル配列検索プログラムにより選抜された分泌蛋白質をコードする遺伝子について、構造モチーフ、発現頻度/部位(特に血液/免疫、腎/ミネラル代謝領域疾患との関連性や、胚発生期での発現に着目)等の情報にもとづいて絞り込みを行う。候補遺伝子のマウスB細胞からの分泌能についてはBリンパ腫細胞株を用いた簡易スクリーニングによるチェックを行う。

b) 遺伝子改変 ES 細胞クローン取得/キメラマウス作製

a) で作製したノックインベクターを用いて、ジーンターゲティングによるノックイン ES クローンを取得する。さらに、得られたノックイン ES クローンをを用いてキメラマウスを作製する。

c) キメラマウス表現型解析/生理活性因子の二次評価

EXPOC® システム一次評価: 一般状態、体重、血清生化学分析、血球分析、FACS によるリンパ球サブセット解析、組織病理解析を実施する。

生理活性を示した遺伝子の二次評価(疾患との関連性検討やメカニズム解明のための検討を実施し、創薬ターゲットとしての有用性を明らかにする): 増骨因子(血球増加作用を伴う)として同定された組換え体調製/マウスへの組換え体投与による再現性確認/特許出願を最重要課題として取り組む。また腎障害に対する保護あるいは増悪作用が示唆された遺伝子については、系統化 EXPOC® マウスにおける再現性を確認した後、組換え体調製/投与による再現性確認/特許出願に進める。

d) 血中液性因子変動モニタリング法の開発/生理活性因子の二次評価

ノックインマウス血液中の蛋白質を対象とし、存在量が少ない生体タンパク質を濃縮し、検出するため

の手法を検討する。具体的には、抗マウス汎血液タンパク質抗体等を利用して存在量の多い蛋白質を除去し、微量蛋白質の二次元電気泳動による分離について検討する。造血系に興味深い変化を示す候補遺伝子について、EXPOC®マウスの詳細解析やターゲット組織同定等を実施する。

#### e) 免疫／血液系因子の二次評価

免疫／血液系に関連する液性因子/受容体/シグナル伝達系について調査/検討を行い、EXPOC®システム候補遺伝子選抜及びノックインマウスの表現型解析を検討する。また、造血系の発生との関連が示唆されている因子(2種以上)のノックインマウスについて、造血系に着目した解析を実施する。

### 研究開発項目②「生物機能を制御する化合物等を探索・評価する技術の開発」

#### ⑤化合物等の探索技術の開発

タンパク質相互作用を、ハイスループットかつ高度なレベルで検出可能なアッセイ系を構築し、世界最大の天然物ライブラリーを用いて、広くタンパク質相互作用制御物質のスクリーニングを展開する。その他、天然物の持つ豊富な生物活性を有効活用すべく、様々なスクリーニング系を展開し、多くの天然化合物の取得を行う。

##### ⑤-1 スクリーニング技術開発(蛍光イメージング)

蛍光タンパク質あるいはタンパク質フラグメント補完法を用いて、疾患関連相互作用を指標に化合物ライブラリーをスクリーニングする技術を確立する。また、タンパク質相互作用制御物質のスクリーニング、および二次スクリーニング評価を行い、より高度なタンパク質相互作用検出システムの確立を進める。

#### a) 相互作用解析プローブの作製(メモリーダイ、FCGS)

(JBIC 分室 10(JBIC、アマルガム)、共同研究:理化学研究所・和光研究所、産業技術総合研究所、北海道大学大学院先端生命科学研究院)

化合物ライブラリーからのリード化合物探索のための実用的アッセイ系を作製する。癌、糖尿病などの代謝性疾患、免疫・アレルギー疾患、神経変性疾患、循環器の疾患などで関連すると思われる分子間相互作用に注目し、それらを容易に検出できるアッセイ系を構築する。具体的には、*in vitro*メモリーダイアッセイ系を構築するとともに、合成展開された化合物を含めたハイスループットスクリーニングを実施し、高機能な化合物の創製を進める。

#### b) 相互作用解析プローブの開発(共局在観察)

(JBIC 分室 10(JBIC)、共同研究:理化学研究所・和光、京都大学、産業技術総合研究所)

分子間相互作用を高精度に検出する蛍光イメージング・測光技術として FRET およびマルチカラーイメージングによる共局在観察 (colocalization)を研究開発する。国産蛍光タンパク質を用いた実用的な FRET 指示薬の開発を行なう。(平成 18~19 年度)

#### c) ドラッグスクリーニング用蛍光タンパク質の改変・改良

(JBIC 分室 10(JBIC/Aマルガム)、11(医学生物学研究所)共同研究:理化学研究所・和光、産業技術



総合研究所)

ドラッグスクリーニングシステムに適する蛍光タンパク質の改変・改良を行う。また、それらを検出するためのモノクローナル抗体を作製する。3種の蛍光蛋白質; AzamiGreen、KusabiraOrange、MidoriishiCyanのC末端フラグメントに対する良好なウエスタンブロット用モノクローナル抗体を作製する。FCCSにより適した蛍光タンパク質を開発する。(平成18~19年度)

d) *in vitro* および生細胞内分子間相互作用高速検出装置の開発

(JBIC 分室12(JBIC)、共同研究:北海道大学、産業技術総合研究所)

1波長でFCCSを行う技術、または2波長で相互相関のシグナル・ノイズ比を高めるような光学系技術を用いて、細胞内外の分子間相互作用を高速に検出する装置を開発し、ハイスループット化をも目指す。特に、本装置のソフトウェアを完成させ解析アルゴリズム等開発とともにハイスループット化を進める。新たなアプリケーション開発を行う。(平成18~19年度)

e) 蛍光識別標識系マルチcDNA発現クローンの作製及びスクリーニング系の構築

(JBIC 分室13(JBIC)、共同研究:大阪大学微生物病研究所)

Multisite Gateway法を用いて、一分子ベクター上に2~3種cDNAを並べて構築し、この組換えDNA分子を細胞の核質や染色体特定部位へ導入して、これらcDNAの共導入による複数種の蛍光標識タンパク質同時産生系の利用技術を開発する。また、リード化合物の影響を生細胞の動態で把握できるようなスクリーニング系を開発する。具体的には、複数種のプローブを同時に用いる事によって多くの情報を同時に得られるスクリーニング系の構築を目指す。また、ウイルスベクターを使用しない安全な再生医療や遺伝子治療への遺伝子利用を目指して、生細胞の染色体特定部位への即効的で安定な遺伝子導入系の開発を行う。

f) FCCS基盤技術の開発

(JBIC 分室10(JBIC、東レリサーチセンター)、共同研究:北海道大学大学院先端生命科学研究院、理化学研究所・和光研究所)

北海道大学とは、FCCS法の基盤的な技術開発のための共同研究を行う。また、疾患との関わりが深いターゲット蛋白質相互作用を選択し、構築したシステムにおいて相互作用阻害物質の効果の定量法を検討し、医薬品候補化合物の評価系としての有用性を検証する。

⑤-2スクリーニング技術開発(モデル生物)

多様なポストゲノムツールボックスが整備されたモデル生物は、疾患関連遺伝子の変異や過剰発現によって引き起こされる細胞レベル、個体レベルの表現型変化をモニターするための格好のシステムであり、新たな制御物質の探索系として大変優れている。表現型変化を指標にすることで、タンパク質相互作用の観察が困難な疾患関連遺伝子についてもその阻害剤探索が可能になり、致死や形態異常といった共通の表現型を用いて機能の異なる複数の遺伝子産物の制御物質を同時に探索できる。モデル生物である酵母、ショウジョウバエ、マウスを用いて独自の表現型スクリーニング系を構築し、微生物培養サンプルを用いて探索研究を実施する。その結果明らかになった制御物質について、薬効・毒性等の評価を行

う。(平成 18~20 年度)

a) 酵母を用いたヒト疾患関連遺伝子産物制御法の開発

(JBIC分室14(JBIC)、共同研究:理化学研究所・和光、長浜バイオ大学、東京大学新領域、産業技術総合研究所)

分裂酵母、出芽酵母において酵母遺伝子、ヒト遺伝子を導入し、過剰発現によって致死、形態変化等の表現型が現れる遺伝子を同定する。この情報をもとに過剰発現や遺伝子破壊を利用した探索系を確立し、それぞれの系に対し微生物培養サンプルの活性を評価する。出芽酵母の必須遺伝子破壊による探索系では、同時並行的にスクリーニングを行い、微生物培養サンプル等の活性を評価する。DNA の抽出、形質転換、細胞および微生物培養サンプルの分注等はオートメーションシステムによりハイスループット化して実施する。また、新たにリバース2-ハイブリッド法を用いたタンパク質間相互作用の阻害剤探索系を構築する。これらの探索系を用いて化合物スクリーニングを継続して実施し、微生物抽出サンプル及び化合物ライブラリーを用いるスクリーニングを行い、活性を評価する。それらの中から活性物質の同定を目指す。

b) ショウジョウバエを用いた疾患関連遺伝子産物制御法の開発

(JBIC分室14(JBIC)、共同研究:首都大学東京)

化合物の作用を個体レベルで高感度に検出することを目標として、ショウジョウバエを用いたハイスループットなアッセイ系を構築する。野生型ショウジョウバエに加えて、ヒト疾患モデルとなる変異体を利用する(ポリグルタミン病、パーキンソン病などの神経変性疾患モデル、肥満モデル、および糖尿病モデル等)。化合物としては、培養菌株抽出物について、致死性、成長、行動の表現型に対する化合物ソースの効果を測定、評価する。疾患モデルの表現型への効果を組織学的に評価するために、レーザー顕微鏡用蛍光分光測定装置を用いる。また、行動機能検定装置、および形態情報解析システムを用いた定量的な表現型スクリーニングシステムを開発し、本システムを用いたポリグルタミン疾患モデルを用いたアッセイを実施する。また、過栄養による肥満モデルを用いて、肥満障害抑制機能をもつ化合物のスクリーニングを実施する。さらに、過栄養短命モデルと神経変性疾患モデルの二つを重点的に実施する。過栄養短命モデルでは、成虫、幼虫を対象として、培養菌体抽出物をスクリーニングする。神経変性疾患モデルでは、ポリグルタミン病モデルを利用して、培養菌体抽出物をスクリーニングする。

c) 体系的な転写ネットワーク同定を利用した行動リズム制御法の開発

(JBIC分室14(JBIC)、共同研究:理化学研究所・神戸)

マウスにおいて個体レベルの行動リズムを制御できる化合物を取得することを目的として、複数の階層で定量的でハイスループットなアッセイ系を構築する。分子レベル、細胞レベル、組織レベルの合計3つの階層でスクリーニング系を構築する。分子レベル・細胞レベルの培養サンプルを調製し、体内リズムの表現型に対する化合物ソースの効果を測定、評価する。細胞レベルおよび組織レベルのリズムをハイスループットかつ定量的に測定するために極微弱発光測定関連機器および微弱発光リアルタイム自動測定装置を用いる。また、睡眠障害は行動リズム障害の主訴であるため、これを解析するための実験系を構築し、化合物評価系の充実を図る。また、*in silico* スクリーニングを推進し、予測された化合物につ

いて分子レベルの評価を行う。分子レベルでの評価によって得られた活性化合物に関しては、順次、細胞・組織・個体レベルにおいても定量的に評価する。個体レベルでは、老齡化モデル動物を導入し、活動リズムの振幅を指標とした体内リズム制御物質の作用評価系を確立する。

### ⑤-3 スクリーニング技術開発(天然化合物)

多様な構造を有する天然物、特に微生物代謝産物をソースとして、タンパク質相互作用を制御する化合物を見出すことを主目的とする。また、これまでの個別スクリーニングで得られた活性物質について、より高機能な化合物を調製し実用化に向けた化合物の開発を進める。その他、タンパク質相互作用が関与しないような、重要な生命現象を制御する化合物を得るための表現系スクリーニングも実施し、様々な化合物を得ることを目的とする。各製薬企業から提供されたサンプルをスクリーニングに供し、国内随一の天然物スクリーニングシステムを構築する。

スクリーニングに関しては、タンパク質相互作用を指標にしたスクリーニングに加え、重要なタンパク質相互作用に関しては、相互作用のみでなく酵素活性および遺伝子発現などを入れた総合的なpathwayを指標にアッセイ系を構築し、スクリーニングを展開する。タンパク質相互作用に限らず、抗腫瘍物質探索などについても積極的にスクリーニングを行う。これらのスクリーニングを通じて、高活性の化合物からなる天然化合物ライブラリーの拡充を進める。

また、新たな微生物生理活性物質ライブラリーの確立を目的として、新規生合成遺伝子の取得や生合成遺伝子異種発現による化合物生産技術の開発を進める。

#### a) 微生物二次代謝産物を主とした微生物収集、およびスクリーニングサンプルの調製

(JBIC分室15 (JBIC、メルシャン)、共同研究:製品評価技術基盤機構、産業技術総合研究所)

沖縄県を主体に国内数カ所から土壌および海洋産物を採集し、様々な放線菌、バクテリアおよび糸状菌を分離する。分離した菌株について、様々な条件下で培養し、有用物質スクリーニング用のサンプルを調製する。産総研では主に、海洋生物からの菌株分離を積極的に行い放線菌を主体とした海洋菌株の取得を行う。これらの菌株に関して、16SrDNAや生合成遺伝子の解析を指標に、新種、新属あるいは新科に分類される新規菌株の取得を進めると共に、冗長性を排除した菌株ライブラリーの拡充を行う。

以上の菌株の培養二次代謝産物について、逆相ODSを用いたグラジエントUPLC-TOFにより成分分析を行い、未分離化合物の選抜を行い、随時大量培養を行い網羅的に化合物の単離を進める。また、ユニークな化合物を生産する微生物に関しては、その生合成遺伝子を特定し、異種発現による物質生産させる技術の開発を進める。

さらに、より迅速に二次代謝産物中の化合物の同定を行えるように、主にUPLC-TOF-MSおよびLC-NMRを用いて、目的化合物を迅速に同定するシステムおよびデータベースの充実化を進める。また、化合物構造を迅速に予測決定することを目的に、SYNAPT-MSを用いて、部分構造情報データベース化を進める。

#### b) 表現系スクリーニング系へのサンプル供給

(JBIC 分室 15 (JBIC)、共同研究:産業技術総合研究所)

酵母、ショウジョウバエおよび主に生物時計に関するシステムバイオロジーを対象に、それぞれのスクリーニング系のスループットに応じて、スクリーニングサンプルを送付し、ヒット株については大量培養し

活性物質の単離同定を行う。必要に応じて、プロジェクト内から上がってきたアッセイ系の導入を行い、産総研集中研にてスクリーニングを行い、スクリーニングの効率化を図る。(平成18~20年度)

#### b) タンパク質相互作用を指標としたスクリーニングの展開

(JBIC 分室 15 (JBIC)、共同研究:産業技術総合研究所、東京農工大学大学院共生科学技術研究院、筑波大学大学院人間総合科学研究科、東京都臨床医学総合研究所、東京大学大学院農学生命科学研究科)「タンパク質ネットワーク解析」で得られた疾患関連因子についてのタンパク質相互作用を制御する化合物を得ることを目的として実施する。*in vitro* mKG法を用いて、タンパク質相互作用制御物質のスクリーニングを行う。

また、タンパク質相互作用ターゲットに関しては、メモリーダイ法以外のアッセイ系も駆使しながら、活性化合物を見出し、インシリコ、合成チームとの連携により、より臨床応用を目指した化合物の創製を展開する。東京農工大学とは、ヒット化合物の誘導体合成の展開に関する共同研究を実施する。筑波大学、臨床医学総合研究所との共同実施にて、インフルエンザウィルスの複製(増殖)に中心的な役割を担っているRNAポリメラーゼ複合体の構成蛋白であるPAとPB1をはじめとして、インフルエンザタンパク質間相互作用、およびインフルエンザヒトタンパク質間相互作用を阻害する抗ウィルス剤候補となる化合物を探索する。また、スクリーニングでヒットしたサンプルについて、東京大学大学院農学生命科学研究科にて高次の生物活性評価を行う。

#### c) タンパク質相互作用以外のスクリーニング技術開発と薬剤ターゲット同定技術の開発

(JBIC 分室 14 (JBIC)、JBIC 分室 15 (JBIC)、共同研究:産業技術総合研究所、東京農工大学大学院共生科学技術研究院、理化学研究所・和光研究所、長浜バイオ大学バイオサイエンス学部、東京大学新領域創成科学研究科、癌研究会癌化学療法センター)

化合物ライブラリー充実化の一つとして、天然化合物が得意とする抗がん作用を示す化合物のスクリーニングを数個展開し、生理活性物質の取得を進める。エピジェネティクス調節因子以外にも、DNAに作用する化合物のスクリーニング系として、スプライシングや遺伝子修復などを制御する物質のアッセイ系を開発し、スクリーニングを実施することにより、分化・脱分化の制御、あるいは制癌剤の開発を進める。遺伝子あるいは遺伝子修飾タンパク質に作用する化合物については、最適化を検証しながら誘導体展開を進める。スクリーニングヒットサンプル、あるいは誘導体について、癌研究会癌化学療法センターにて高次の生物活性評価を行う。これらのスクリーニングにより、活性を指標にした天然化合物ライブラリーの拡充を図る。

#### d) 活性物質の単離および構造同定

(JBIC分室15 (JBIC)、共同研究:産業技術総合研究所)

新たに得られた生理活性物質を含む試料より、各種クロマトグラフィー等を行い分画し単離精製を行う。得られた活性物質は、核磁気共鳴装置 (NMR) やマススペクトロメトリーを用いて構造決定を行うとともに、高活性化を図る。また、天然単離化合物セットの充実化を促進する。

#### e) これまでのスクリーニングで得られた化合物の高機能化と動物モデルでの活性評価

(JBIC 分室 15 (JBIC)、共同研究:産業技術総合研究所、東京農工大学大学院共生科学技術研究院、愛知県がんセンター、東京大学大学院農学生命科学研究科)

新たに得られた活性物質について、東京農工大学との連携により、合成化合物の誘導体展開を行い、東京大学大学院農学生命科学研究科とも協力して生物活性評価を行って活性情報をフィードバックし合い、化合物の高機能化を進める。愛知県がんセンターとは、抗がん剤のスクリーニングを共同で実施する。

#### f) 遺伝子発現を指標にしたスクリーニング系の展開

(JBIC分室15 (JBIC)、共同研究:産業技術総合研究所)

「タンパク質ネットワーク解析」で得られた重要遺伝子について、その遺伝子の発現を指標にしたスクリーニング系を展開する。重要遺伝子については、酵素活性なども入れた総合的なpathwayを指標にアッセイ系を構築し、スクリーニングを展開する。さらに、タンパク質相互作用から見出したターゲット以外についても積極的に展開する。(平成18~20年度)

#### g) 課題解決型企業連携による疾患を制御する新規化合物の探索

(JBIC 分室 15、味の素、アステラス製薬、協和発酵キリン、合同酒精、興和、第一三共、三和化学研究所、塩野義製薬、武田薬品工業、田辺三菱製薬、微生物化学研究会、明治製菓、共同研究:産業技術総合研究所)

各企業が所有している微生物等の天然物ライブラリー、或いは創薬を目的としたフォーカスド合成ライブラリーを本プロジェクトに提供し、本プロジェクトでは、これを用いてタンパク質間相互作用を指標にしたスクリーニング、或いはモデル生物を用いた表現系スクリーニングにより、生理活性物質の探索を行い、ヒット化合物の単離・同定を行う。この結果、新規天然化合物が見つかった場合は、そのライブラリーを提供した企業において新薬開発のための技術的検討を行う。

### ⑥化合物等の高機能化技術の開発

*in silico* 情報を活用して、高活性が見込まれている天然物を母骨格として、コンビナトリアル合成を行うため活性部分構造ユニットに分割し、それらの合成法を確立する。単純作業となるユニットの合成についての数工程を自動化し、人の作業の軽減と大規模合成の実現を図る。高い多様性を有する3次元立体構造テンプレートをおよび化合物ライブラリーを構築し、活性評価を行う。

スクリーニングにより得られた生体機能を制御する化合物について、化合物の誘導体化技術開発や新規骨格化合物の創製技術開発等を行うことにより生理活性等を高める高機能化技術を開発する。また、スクリーニングにより得られた生体機能を制御する化合物および高機能化された化合物が真に生体制御に利用できるか調べるために、疾患モデル動物や遺伝子改変動物等の個体レベルで評価・検証する化合物を得る。

#### a) 天然物母骨格を有する化合物ライブラリーの合成

(JBIC 分室 16 (JBIC)、共同研究:東京工業大学大学院理工学研究科、東北大学大学院薬学系研究科)

天然物を母骨格にもつ誘導体についてコンビナトリアル合成に適した合成法を開発する。誘導体を高速

合成するために必要な合成ブロックの合成法を確立し、自動化を図る。そして、高機能天然物誘導体のライブラリー合成を行う。

スクリーニングにより得られた化合物情報と *in silico* 情報で得られた三次元的空間的予測情報を活用して、化合物の誘導体化技術開発や新規骨格化合物の創製技術開発等を行うことにより、生理活性等を高める高機能化技術を開発する。天然物の母骨格をもとにした高機能化類縁体ライブラリー、およびインシリコと連携して設計した高機能化合物ライブラリーを作製し、個体レベルで評価・検証する化合物を得る。

#### b) 新規ラクタム・テンプレートの創出と創薬リードの探索

(JBIC 分室 16(旭化成ファーマ)、共同研究:東京工業大学)

3次元的に置換基を配置できる新規なラクタム化合物のコンビナトリアル合成方法を構築する。この化合物のライブラリーを合成し、活性を評価することで、タンパク-タンパク結合を標的とする新規な医薬品のリード化合物の探索を目指す。化合物の活性を評価し、タンパク-タンパク結合を標的とする新規な医薬品のリード化合物の創出を目指す。

#### c) 3D-Scaffold 化合物ライブラリーの合成と高機能化

(JBIC 分室 16(東レ)、共同研究:東京工業大学)

天然物のケミカルスペースを網羅する 3次元立体構造テンプレート(3D-Scaffold) を設計・開発し、コンビナトリアル合成に用いる。化合物ライブラリーのスクリーニングを実施し、ヒット化合物の探索を行い、その結果を 3D-Scaffold 化合物ライブラリーの設計にフィードバックし、ライブラリーの高機能化を行う。

#### b) RAPIDS (RANdom Peptide Integrated Discovery System)を駆使した薬剤探索

(JBIC 分室 16 (JBIC、味の素、田辺三菱製薬)、共同研究:東京大学先端科学技術研究センター)

改変遺伝暗号翻訳ペプチド合成システム(RAPIDS)を駆使して構築された高多様性非天然型ペプチドライブラリーを用い、製薬企業 2 社との課題解決型連携プログラム実施し、高親和性の環状特殊ペプチドを同定する。また、独自に進めている薬剤標的については、既に高活性をもった薬剤候補が絞られてきているので、それらについては細胞への膜透過性も含め、薬剤としての種々の検討を開始する。同定された全ての環状特殊ペプチドの評価を終え、動物実験等に進展できる薬剤候補を決定する。

### ⑦化合物等の評価技術の開発

#### ⑦-1 モデル動物での化合物評価

「スクリーニング技術開発(モデル生物及び天然化合物)」にて同定された化合物等が真に生体機能の制御に利用できるかを評価するために、実験動物を用い個体レベルでの化合物の薬効・安全性の評価を高精度かつ迅速に行うための技術を確立する。生体内での蛍光発現の非侵襲、低侵襲的観察・計測を可能とするための機器・visual stabilization を含めた観察・計測技術の高度化を行なう。さらに、創薬ターゲット分子を可視化・モニターするための遺伝子操作マウスを作製し、これを疾患モデル動物と組み合わせ、分子動態の観察を行なう。また、臓器レベルで蛍光相関分光技術等を用いた生理応答検出の確立を目指す。(平成 18~20 年度)

a) 生体内イメージング基盤技術の開発と遺伝子標識マウス系統の確立

(JBIC 分室 17(JBIC)、共同研究:理化学研究所・筑波)

個体レベルでの安全性及び薬効の評価システム構築のために、生体内イメージングの基盤技術の確立を試みる。同時に、細胞レベルの蛍光計測アッセイ等で用いられている蛍光プローブを発現する遺伝子操作マウスの作製を行っていく。遺伝子の蛍光標識には GFP 等の既存の蛍光タンパク質を利用してきたが、今年度は本プロジェクト内で開発される国産蛍光タンパク質を利用した導入遺伝子作製を進める。

b) 生体内イメージングにおける visual stabilization 技術の開発

(JBIC 分室 17(JBIC)、共同研究:東京大学情報理工学系)

小動物の呼吸、拍動などによる蛍光顕微鏡画像のぶれを最小にするために、画像計測結果に基づいて対物レンズを能動的に駆動することによる画像安定化技術を開発する。このため、1)濃淡の明確な画像の高速画像処理によって主に対物レンズの運動制御技術を確立する。2)画像の特徴的なパターンをターゲットとして、運動情報を取得する方法を開発する。3)上述の方法でも残留する運動がある場合、画像系列の情報を用いて事後により安定化された画像を復元する方法を検討する。

c) 臓器灌流法を用いた臓器レベルの蛍光イメージング

(JBIC 分室 17(JBIC)、共同研究:北海道大学)

生体丸ごとにおける分子間相互作用を高感度に検出するための高感度蛍光測定法を中心に技術開発を行う。現在、細胞レベルで行っている蛍光相関分光解析等の高感度検出手法を臓器レベルまで対象としていくため、臓器灌流技術を利用した分子間相互作用検出技術の開発を進める。

d) 生体内イメージング機器の高度化に関する技術開発

(JBIC 分室 18(オリンパス)、共同研究:理化学研究所・筑波)

小動物用ファイバー内視鏡の高度化の検討を開始する。生体内では、蛍光強度の定量化や蛍光シグナルの場所の特定が問題となる。これは、生体の自家蛍光が一因であるので、自家蛍光とマーカーの蛍光帯域の分離を行い、蛍光マーカーからの蛍光のみの定量化技術の検討を行う。このため、液晶チューナブルフィルターを用いて広帯域で自家蛍光の分布を調べることを検討することにより、上記の課題の解決を試みる。

e) イメージング基盤技術の適用研究

(JBIC 分室 19(東レリサーチ)、共同研究:理化学研究所・筑波、北海道大学)

細胞や動物レベルにおける FCS, FCCS やイメージング技術、また薬物濃度測定法から、疾患とかわりに深いターゲット蛋白質(相互作用)を選択し、医薬品候補化合物の評価を行う。各評価法については、代表的な化合物を用いてバリデーションを行い、妥当性を確認する。

⑦-2 マイクロアレイによる化合物評価

(JBIC 分室 20(ニッポンジーン)、共同研究:東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科、産業技術総合

研究所)

ヒト遺伝子 30,000 種類およびラット遺伝子 11,000 種類を搭載するマイクロアレイシステムを用いて、各種ヒト細胞培養系およびラット個体系に薬効・毒性等が明らかになっている各種化学物質を体系的に暴露したサンプルの遺伝子発現頻度情報を取得する。集積した情報から、いかなるサンプルおよび遺伝子の組合せでも相互比較解析が可能なデータ集合体(薬効・毒性参照データベース)を構築し、「スクリーニング技術開発(モデル生物及び天然化合物)」にて同定された化合物の評価に備える。(平成 18~20 年度)

a) 合成 DNA マイクロアレイの作製

合成 DNA 供給自動化体制のもと、マイクロアレイ化するヒトおよびラットの合成 DNA(capture DNA)の調製・管理・分注を行う。産総研と共同で、厳密な条件管理下で、高品質の合成 DNA マイクロアレイを安定的に作製・供給する。

b) 化学物質暴露によるサンプルの調製

各種株化細胞等の培養系に、既存薬を中心とした薬効・毒性の明らかな化学物質等を複数濃度で添加し、経時的に細胞を回収して mRNA を取得する。同様の化学物質等をラット個体に種々の経路にて暴露し、一定期間の飼育の後、各種臓器・組織を摘出して mRNA を抽出する。

c) 遺伝子発現プロファイルの取得と解析

ヒトおよびラットについてそれぞれに大量に準備した共通レファレンス RNA と並行して上記 2) のサンプルを標識し、両者の標識物を混合する。それらを上記 1) で供給される合成 DNA マイクロアレイ上で競合的にハイブリダイズさせ、ヒト転写産物およびラット転写産物の発現頻度情報を取得・解析する。

d) 薬効・毒性参照データベースの構築

上記 c) で取得した遺伝子発現情報をすべて統合(データ行列の構築)する。クラスター分析等を行って、薬効・毒性に関与する重要な生物学的情報を抽出する。

e) 毒性が出現した薬剤候補物質の遺伝子発現データの取得・解析

本プロジェクトの課題解決型連携企業が開発し、臨床試験途中で毒性が判明した薬剤候補物質1種類について、その企業の研究施設にてラットへの 28 日間反復投与を行う。それらのラットから約 180 種類の臓器・組織を採取し、total RNA を調製する。それらの total RNA から、約 90 サンプルを厳選して polyA+ RNA を抽出し、遺伝子発現プロファイルを取得・解析する。

f) プロジェクト内連携で依頼される薬剤および薬剤候補物質を対象とする遺伝子発現データの取得・解析・評価

本プロジェクトの「スクリーニング技術開発(モデル生物及び天然化合物)」テーマから依頼されるサンプルをプロジェクト内連携として解析する。



## 総合調査研究

(JBIC 分室 21(JBIC))

タンパク質相互作用ネットワーク解析やケミカルゲノミクスの研究開発に係わる技術動向の調査・情報収集を国内外の関連学会参加等により行う。また、本プロジェクトの方針決定や推進状況の把握を行うため、研究推進委員会等を開催する。

### 2)ー2 バイオテクノロジー開発技術研究組合

⑧マイクロサテライトマーカーを利用した疾患関連遺伝子探索技術により特定された疾患感受性遺伝子群の創薬価値の抽出技術の研究開発

(ジェノダイブファーマ株式会社(平成19年度まで)、共同研究:東海大学医学部猪子研究室(平成19年度まで) 再委託 東海大学猪子研究室(平成20年度~))

#### 1)相互作用解析/リガンド解析用マイクロサテライトマーカーの再設定

3万個の多型マイクロサテライトマーカーによるゲノムワイドな相関解析は、1疾患について40個レベルの遺伝子同定が可能な高い分解能と検出力を有する、独創的な遺伝子同定法である。独立な集団を用いて個々の疾患感受性領域に存在する多型SNPを検索し、これらについて遺伝統計学的疾患相関解析を行う。必要に応じて相関解析を効率的に進めるために、遺伝的距離の長さ、すなわち連鎖不平衡(ハプロタイプブロック)の長さに基づき、高度解析用マイクロサテライトマーカーの再設定を行う。相互作用解析/リガンド解析用マイクロサテライトマーカー及びSNPマーカーの再設定を完了するとともに、一次ターゲット候補のSNP解析プライマー設計を追加する。

#### 2) *in silico* ネットワーク解析や相互作用解析/リガンド解析による疾患関連タンパク質の特定とその機能解析

リウマチのシグナル伝達に関係する IkBL、糖尿病を含むナルコレプシー(睡眠病)、関節リウマチ、高血圧症、尋常性乾癬の感受性遺伝子を優先対象としつつ、遺伝子産物である膜タンパク質や細胞内タンパク質の機能解析を行う。

一次ターゲットを対象として、*in silico* ネットワーク解析、分子生物学的手法及び金ナノ粒子センサー(日立製作所)を利用したタンパク質相互作用解析、卵母細胞を利用した膜タンパク質のリガンド解析(日立製作所)を行い、疾患に関わるファンクショナルネットワークを同定する。追加ターゲットについては、SNP 解析を実施し、カスケードメンバー候補を選定する。マウス変異体を用いた解析を行い、感受性遺伝子の変異の効果を個体レベルで示すと共に、変異体マウスの病態モデルとしての有用性を検討する。

高血圧感受性遺伝子を対象として分子疫学的解析を行い、感受性遺伝子型、遺伝子発現と表現型の関係を明らかにする。また、糖尿病感受性遺伝子 PKX について、感受性遺伝子多型と表現型(遺伝子発現量等)との関係を明らかにする。

さらに、無細胞抽出系、培養細胞系、マウス個体での PKC  $\epsilon$  機能・活性解析系を整備する。ペプチドや化合物阻害剤の PKC  $\epsilon$  活性への効果を検討すると共に、糖・エネルギー代謝系への影響を精査することによって、PKC  $\epsilon$  の創薬ターゲットとしての有効性を検証する。

ネットワーク解析のための基盤技術の開発として、酵母 two hybrid 法による相互作用蛋白質同定法の

全面的再検討・再構築を行い、精度、感度の飛躍的な向上を実現する。新たに構築した酵母 two hybrid システムについて、その有用性検証のために、約 20 個のペイトを用いたパイロット two hybrid スクリーニングを行うとともに、糖尿病感受性遺伝子を中心に、疾患感受性遺伝子の相互作用因子解析を遂行する。さらに、開発した新酵母 two hybrid 法、及びハイスループットシーケンス解析を適用することによって初めて可能になる「ランダムcDNA同士の網羅的 two hybrid 相互作用解析」のためのシステムを確立する。

### 3) 二次ターゲットタンパク質の SNP 疾患相関解析

*in silico* ネットワーク解析や相互作用解析／リガンド解析により見出された疾患関連蛋白候補遺伝子について、その遺伝子が属する疾患感受性領域の高度解析用の再設計マイクロサテライトマーカーを利用し、また連鎖不平衡ブロック内のあらゆる多型 (SNP 挿入/欠失、マイクロサテライト、コピー数など) について相関解析を行い、疾患関連多型を同定する。

糖尿病を含む対象疾患の感受性遺伝子の中からタンパク質の相互作用／リガンド複合体を特定し、相手方タンパク質の SNP 疾患相関解析を行うことにより遺伝学的疾患相関性を求め、これらの機能関連データを疾患カスケードとして展開構築する。

### 4) 疾患カスケードによる創薬ターゲット評価と実証

二次ターゲットの疾患関連遺伝多型が疾患発症に及ぼす影響を、タンパク質の機能的変化と関連させて解析する。また、一次及び二次ターゲットの対象タンパク質の発現情報、組織分布情報を解析し、創薬ターゲットとしての Proof of Concept を提供する。

さらに、相互作用蛋白質の検出技術を用いた機能解析により創薬ターゲットとして抽出されたタンパク質についてX線解析情報等による低分子化合物設計が可能な場合には、*in silico* による低分子化合物設計を外注等により実施する。

また、既存化合物を用いた創薬ターゲット評価も行う。糖尿病感受性遺伝子 PKX を最優先に、低分子化合物設計、評価する。構造に基づいて設計した PKX 阻害化合物候補について、無細胞抽出系、細胞培養系等を用いての評価を行い、医薬品シーズとして確立する。

## ⑨ siRNA ライブラリー等を用いた生物機能制御遺伝子の探索技術及び創薬標的検証技術の研究開発 (アステラス製薬株式会社、共同研究: 東海大学医学部、北里大学薬学部、兵庫医療大学薬学部)

### 1) 生物システム制御物質探索のためのスクリーニング・システムの開発

ラット肝臓由来 H4 II EC3 細胞を用いて、糖新生活性を指標とする肝細胞機能制御物質探索のアッセイ系を構築する。次いで、糖尿病制御物質探索用天然資源 (放線菌等の従属栄養微生物産物、藍藻等の独立栄養微生物産物、薬用情報植物産物) を中心とした小規模化合物ライブラリーを用いたスクリーニングと、siRNA ライブラリーを用いたスクリーニングを実施する。天然物資源に加え、薬理活性低分子化合物ライブラリーとして、アザトリキナン骨格をスペーサーに持つトリプレット誘導体を、有用性検証可能な妥当な数、合成する。

マウスの脂肪由来 3T3-L1 細胞を用いて、インスリン感受性を指標とする脂肪細胞機能制御物質探索のアッセイ系を構築する。次いで、siRNA ライブラリー或いは小規模化合物ライブラリーを用いたスクリー

ニングを実施する。

マウスの頭蓋冠由来 MC3T3-E1 細胞を用いて、骨芽細胞分化制御物質探索のアッセイ系を構築する。次いで、siRNA ライブラリー或いは小規模化合物ライブラリーを用いたスクリーニングを実施する。

新たに取得される天然物化合物および低分子化合物の種々の情報(構造情報、生産菌情報、整合性遺伝子情報、標的タンパク質情報、生物活性情報、薬理指標情報等)を統合したデータベースを構築する。

## 2) siRNA ライブラリーを用いた細胞機能制御遺伝子のスクリーニング・システムの開発

骨芽細胞分化を制御する siRNA を探索するため、アルカリホスファターゼ活性を指標として活性を亢進する siRNA のスクリーニング等を実施する。

インスリン感受性制御 siRNA を探索するため、インスリン感受性制御遺伝子の発現を亢進する siRNA のスクリーニングを実施する。

siRNA ライブラリーが効果的に活用できるマウス(3T3-L1 細胞等)細胞、ヒト細胞を用いて、形質変化の特徴と siRNA クローンの対応をつけた創薬データベースを構築する。

市販マウス siRNA ライブラリーの個々の遺伝子と、その糖尿病モデル細胞 phenotype の関連を、データベースとして網羅的に整備する。これにより、細胞種、細胞のステージ(細胞周期、分化段階等)の「標準化」を目指す。

## 3) 創薬標的遺伝子候補の評価技術の開発

siRNA ライブラリースクリーニング等により見出される細胞分化制御遺伝子の機能解析を行い、創薬標的としての妥当性を検証する。

「AGF ファミリータンパク質 X」の受容体の機能解析、下流のシグナルネットワーク解析およびファミリー受容体取得を行い、関連する新規の糖尿病創薬標的候補を複数取得する。

「遺伝子 9」のトランスジェニックマウスを用いて、「遺伝子 9」が糖尿病の創薬標的であることを証明する。

アフィニティークロマトグラフィー法と siRNA を中心とした生物学的標的評価法(蛍光・発光を利用した phenotype)を組み合わせ、創薬標的の妥当性を検証する。

天然化合物および低分子化合物ライブラリーの標的タンパク質を同定し、化合物ライブラリー情報として構築するとともに、「遺伝子 9」やその他新規創薬標的の validation に活用する。

AGF および AGF ファミリー遺伝子等或いは肥満・糖尿病に伴い発現変動する遺伝子等の機能解析を行い、創薬標的としての妥当性を検証する。

遺伝的糖尿病病態モデルマウス db/db と高脂肪食負荷モデルマウス、及び iPS(induced pluripotent stem cell)細胞等を利用し、糖尿病病態進行における各種 phenotype の変化、疾患関連臓器(肝臓、脂肪)における経時的・包括的な遺伝子発現変化と、エピジェネティクス変化の関連を解析する。これにより、エピジェネティクスの変化誘導に関わる糖尿病新規標的タンパク質を同定する。

## 4) 生物システム制御化合物及びその標的分子の構造情報に基づく新規活性分子設計(ドッキング・デザイン)技術の開発

核内受容体 PPARs などの転写因子のタンパク質構造情報に基づき、転写活性を亢進する新規活性化化合物を創製する。

生理活性化化合物の化学構造情報を活用して新規活性化化合物を創製するとともに、糖新生抑制化合物の化学構造に基づいた類似構造化合物検索により、活性化化合物を探索する。

「遺伝子 9」およびその他の天然化合物由来の新規創薬標的蛋白質の立体構造をホモロジー・モデリング法により構築して低分子の結合部位および結合様式を予測し、予測された結合部位に特異的かつ強力に結合する低分子化合物をバーチャル・スクリーニングする。

本事業で取得される天然物の固有の立体構造を X 線結晶解析で決定する。また結晶化が困難な分子に関しては、分子軌道法を用いて、もっとも妥当な立体構造を解析する。

天然物の構造に類似する部分化学構造を市販化合物および市販医薬分子から探索し、それら薬理活性発現に必要な原子団を組み合わせることで、端緒化合物合成に向けて複数のバーチャル分子を設計する。

#### 5) リード候補化合物創製のための化合物高質化技術の開発

活性化化合物群の構造活性相関、および標的蛋白質の構造情報に基づき、活性化化合物の高質化を行い、新規構造を有する活性化化合物を創製する。

最重要構造、およびドラッグライクネスを基にした高質化化合物を創製する。

#### ⑩ 化合物又は相互作用を検索、評価する基盤技術の研究開発

(株式会社日立製作所)

##### 1) タンパク質の相互作用検証

金ナノ粒子センサーによる相互作用解析技術を疾病関連タンパク質に適用するにあたり、センサーの化学修飾や固定方法、測定プロトコルの最適化などの適用技術が課題となる。そこで、これらの手法について調査・検討を行う。また、比較的容易にかつ大量に入手できるタンパク質を選別し、それをモデルタンパク質として選びこれらの手法の検証を行い、適用技術の拡大蓄積を行う。

##### 2) 解析事例の蓄積及び検証

金ナノ粒子センサーを用いた相互作用計測については、現時点では解析事例が少ない。しかし、本センサーを用いた新たな分子間相互作用開発システムの開発を行うにあたっては、データの蓄積が課題となる。そこで、アステラス製薬、ジェノダイブファーマの研究により絞り込まれた疾患関連タンパク質の相互作用検証によりデータの蓄積を行う。データ取得にあたっては、まず各測定ターゲットのタンパク質性質を調査し、1) で選定した固定化法から、ターゲットに最適な固定化法を選定する。そして、実際に相互作用を測定し、解析事例を蓄積する。

##### 3) 夾雑物を含む環境下での検出技術開発

金ナノ粒子センサの適用範囲拡大を目的として、夾雑物を含む環境下での検出技術の開発を行う。夾雑物環境下での検出では、測定ターゲット以外の非特異シグナルが多くなること、その事によって測定ターゲット由来のシグナルが減少することが課題となる。そこで、非特異吸着の軽減を目的にセンサ表面のブロッキング、緩衝液条件などを行う。また、測定ターゲット由来のシグナル増幅法を検討する。

#### 4) トランスポーター遺伝子の選別と解析

本開発の重要なテーマである糖尿病に関連するトランスポーター遺伝子を選別し、その遺伝子の機能解析を行う。特に、アステラス製薬、ジェノダイブファーマの研究により絞り込まれた疾患関連タンパク質を中心に選別する。具体的には、消化管では\*MDR1、PEPT1、OATP 類、\*BCRP、肝臓では OATP1B1、OATP1B3、OCT1、\*MRP2、\*MDR1、\*BCRP、腎臓では OAT3、OAT1、OCT2、\*MRP4、\*OCTN1、血管脳関門では\*MDR1、\*MRP4、OAT3、OATP 類、血液脳脊髄液関門においては OAT3、OATP 類、\*MRP4 を中心に検討する(\*:ABCタイプ)。なお、候補タンパク質がなかった場合は、新規の遺伝子の探索も検討する。

#### 5) 卵母細胞への基質導入試作装置の検討、および質量分析系による分析予備検討

卵母細胞発現系での糖尿病関連の遺伝子を解析するために必要な遺伝子および基質導入装置の設計と仕様の検討、さらには装置の試作を行う。また、LC-MS/MS での分析に最適な化合物(薬剤)の抽出条件などの検討を含め、実際の LC-MS/MS 装置での化合物分析の予備検討を行う。

#### 6) 質量分析系による薬剤分析システム構築の検討

薬剤化合物(含、代謝物)をアイソトープ標識せずに計測するために、質量分析系(LC/MS)での測定に最適な化合物(薬剤)抽出条件などの検討を行い、複数の化合物同時計測を行う。また、試料調製のための前処理自動化装置の仕様を作製し、試作装置の設計も検討する。

#### 7) 排出系トランスポーターでの基盤技術構築の検討

薬剤排出のトランスポーターであるMDR1に着目し、既知薬剤化合物の細胞内からの排出過程の解析を、質量分析法を用いて行う。また、複数薬剤を同時に細胞内に注入し、同時分析も試みる。さらに、卵母細胞発現系以外の系との違いを検証する。

#### 8) 事業化へ向けた技術およびガイドラインの動向調査

トランスポーター解析基盤技術の事業の方向性を検討するために、薬物動態の関連する学会、研究会、ワークショップ等に積極的に参加し、技術および FDA ガイドラインの動向の調査を行う。

### 総合調査研究

(バイオテクノロジー開発技術研究組合)

#### 1) 研究開発委員会の開催

研究計画および研究実施方針等の調整ならびに、研究成果、取得した技術情報等の検討を行う。(年2回程度予定)

#### 2) 技術調査および情報収集の実施

研究開発を補完するための技術調査、国内外への学会等への参加、他の研究機関(JBiC グループを含む)との交流を実施する。(必要に応じ随時実施)

3) 参加企業間の連携、相乗効果を計るために東海大学とアステラス製薬、アステラス製薬と日立製作所の組み合わせによる分科会の開催を企画する。(必要に応じ随時実施)

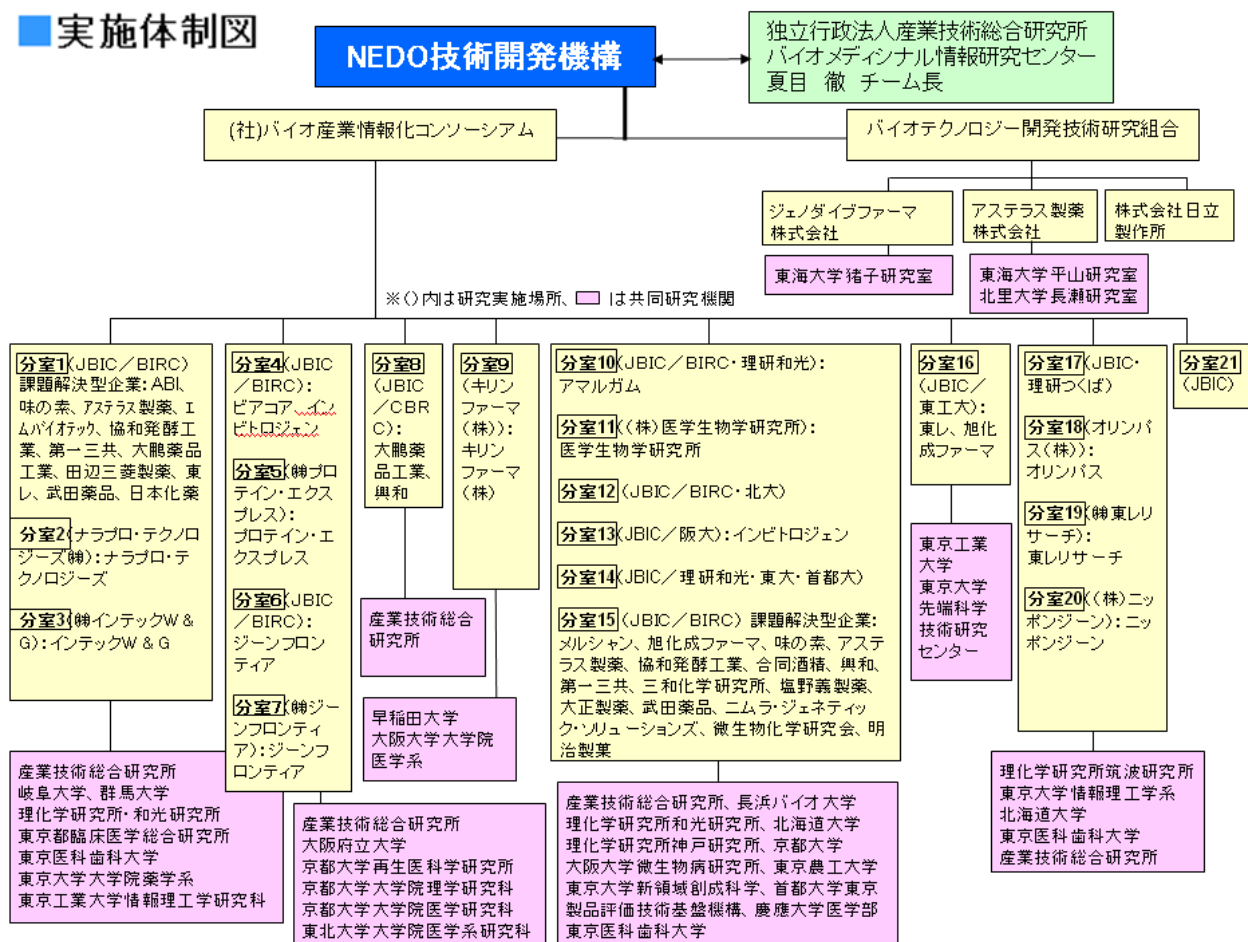
## 2.2 研究開発の実施体制

本研究開発は、NEDO技術開発機構が公募によりバイオ産業情報化コンソーシアムおよびバイオテクノロジー開発技術研究組合を研究開発実施者として選定した。

産業技術総合研究所のタンパク質ネットワーク解析チームの夏目徹チーム長を研究開発責任者(プロジェクトリーダー)とし、その下に研究者を可能な限り結集して効果的な研究開発を実施した。また、部分採択したキリンファーマ(株)と東京大学先端科学技術研究センターは、技術的な連携によるシナジー効果の期待とプロジェクトを効率的に推進するため、バイオ産業情報化コンソーシアムに統合した。

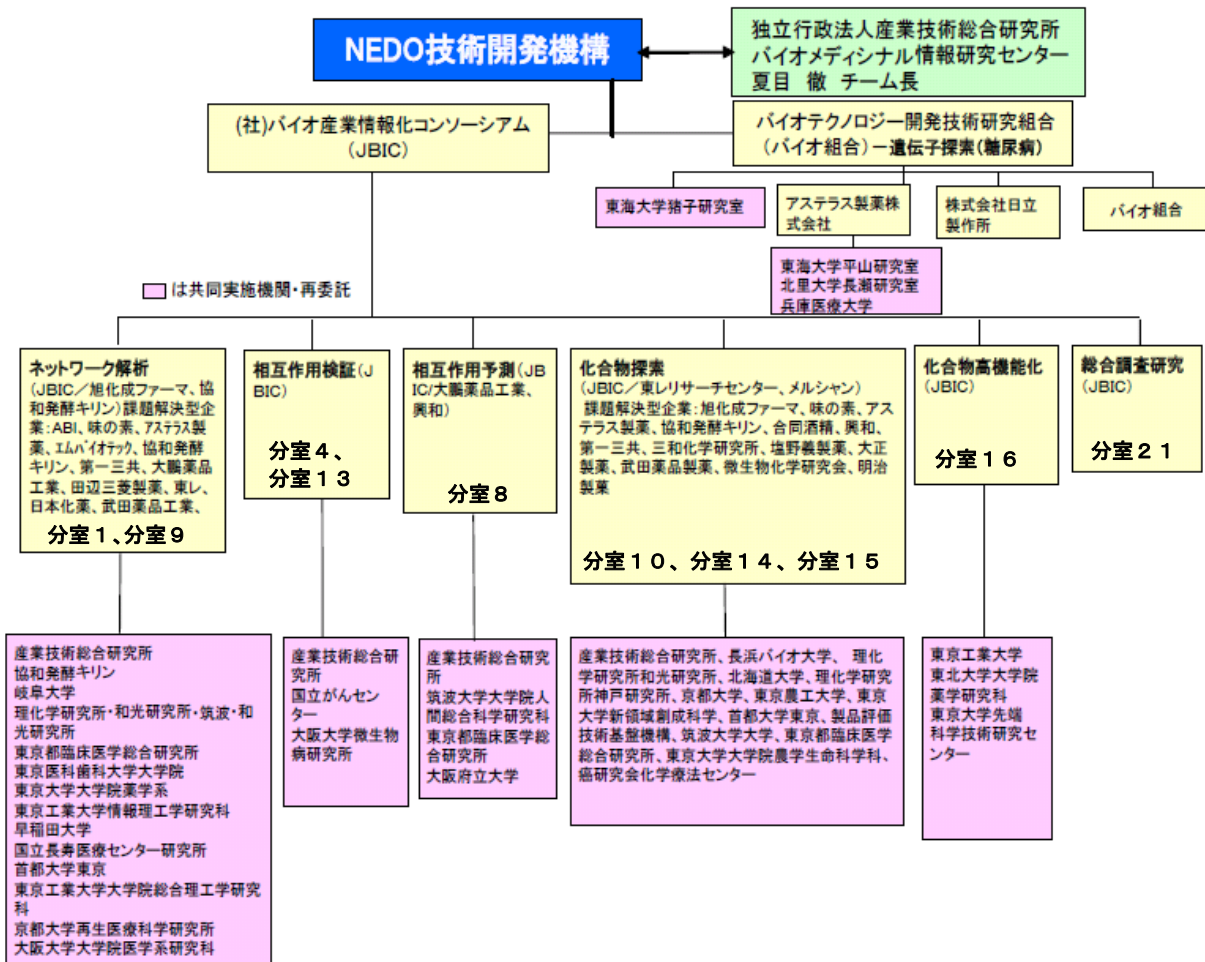
### 平成 18~20 年度の実施体制

#### ■ 実施体制図



## 平成 21 年度の実施体制

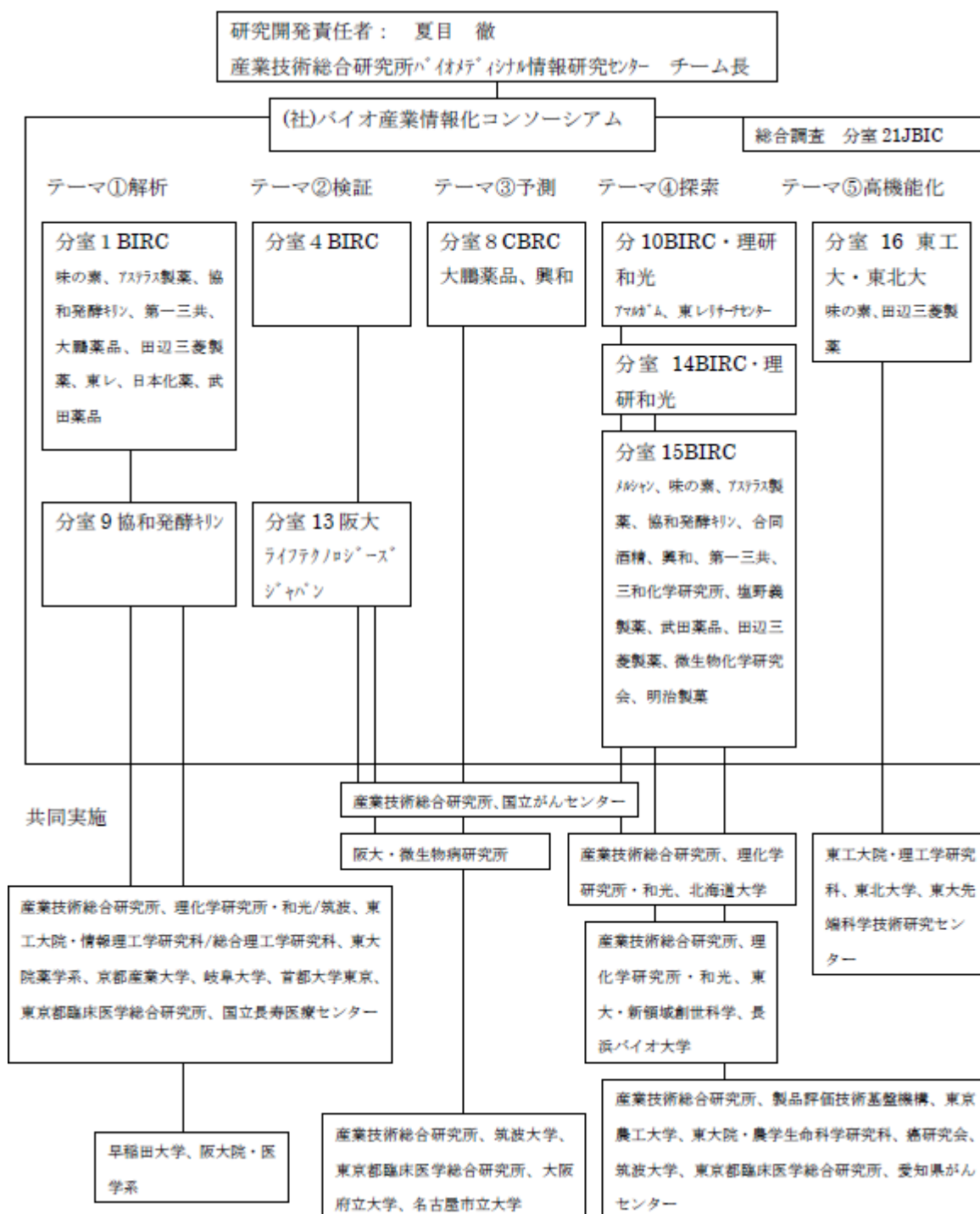
平成 21 年 3 月、平成 20 年度中間評価を踏まえ、JBIC 委託部分の選択と集中による実施テーマの統廃合を行い、平成 20 年度をもって、分室 2、分室 3、分室 5、分室 6、分室 7、分室 11、分室 12、分室 17、分室 18、分室 19、分室 20 を終了し、5 つの主要研究テーマに従い、再編成をおこなった。





## 平成 22 年度の実施体制

バイオ組合委託業務分については、平成 21 年度までに当初の目的を達成したため、平成 21 年度をもって終了した。



### 2.3 研究の運営管理

本研究開発を推進するにあたり、各責任分担の連携及び推進をより確実にを行う事を目的として研究推進委員会をバイオ産業情報化コンソーシアム及びバイオテクノロジー開発技術研究組合において定期的(1回/半年)に開催している。研究推進委員は本開発事業の関連技術に詳しい外部有識者に委嘱している。また、研究推進委員会にはNEDO 担当官及び経済産業省担当官が参画して、適切な運営管理を実施する。その他、成果発表会などを適時開催して成果の公表を行っている。

#### 研究推進委員会における登録委員

氏名		所属・役職
委員長	杉本 八郎	京都大学大学院 薬学研究科 教授
委員	磯辺 俊明	首都大学東京大学院 理工学研究科 教授
委員	関谷 剛男	三菱化学生命科学研究所 所長
委員	伊藤 隆司	東京大学大学院 新領域創成科学研究科 教授
委員	瀬戸 治男	東京農業大学応用生物科学部 生物応用化学科 教授

## プロジェクト関連会議 開催一覧

### バイオ産業情報化コンソーシアム(JBIC)

#### 平成18年

5月1～2日 第一回テーマリーダー会議

6月12日 平成18年度 第一回研究推進委員会(バイオ組合 合同開催)

11月 1日 JBIC2006 プロジェクト研究成果報告会(東京コンファレンスセンター・品川)

#### 平成19年

2月 1日 第二回テーマリーダー会議

2月15日 平成18年度 第二回研究推進委員会(バイオ組合 合同開催)

10月 1日 平成19年度 第一回研究推進委員会

11月 1日 JBIC2007 プロジェクト研究成果報告会(東京コンファレンスセンター・品川)

#### 平成20年

1月21日 平成19年度 第二回研究推進委員会

4月28日 参加企業向け第一回ケモバイオPJ成果報告会

5月12日 参加企業向け第二回ケモバイオPJ成果報告会

6月 2日 参加企業向け第三回ケモバイオPJ成果報告会

10月31日 JBIC2008 プロジェクト研究成果報告会(東京コンファレンスセンター・品川)

12月 2日 平成20年度 第一回研究推進委員会

#### 平成21年

2月20日 平成20年度 第二回研究推進委員会

9月 9日 平成21年度 第一回研究推進委員会

10月30日 JBIC2009 プロジェクト研究成果報告会(東京コンファレンスセンター・品川)

#### 平成22年

2月18日 平成21年度 第二回研究推進委員会

7月 8日 平成22年度 第一回研究推進委員会

10月29日 JBIC2010 プロジェクト研究成果報告会(東京コンファレンスセンター・品川)

12月14日 平成22年度 第二回研究推進委員会

バイオテクノロジー開発技術研究組合(バイオ組合)

平成18年

- 6月6日 バイオ組合グループ スタート会(於:バイオ組合)
- 6月12日 第1回「化合物」全体研究推進委員会(於:JBIC)
- 10月11日 バイオ組合グループ 第1回研究推進委員会(於:砂防会館)
- 11月21日 第24回バイオテクノロジーシンポジウムでプロジェクト概要発表  
(於:虎ノ門パストラル)

平成19年

- 1月11日 バイオ組合グループ 第2回研究推進委員会(於:バイオ組合)
- 2月15日 第2回「化合物」全体研究推進委員会(於:JBIC)
- 3月 6日 バイオ組合グループ勉強会(於:虎ノ門パストラル)
- 8月29日 バイオ組合グループ 第3回研究推進委員会(於:虎ノ門パストラル)
- 11月 6日 第25回バイオテクノロジーシンポジウムでプロジェクト日立製作所成果発表  
(於:虎ノ門パストラル)

平成20年

- 1月31日 バイオ組合グループ第4回研究推進委員会(於:虎ノ門パストラル)
- 4月17日 JBIC共同研究打ち合わせ(於:JBIC)
- 7月24日 中間評価文科会 (於:朝日生命ビル大手町)
- 10月 7日 バイオ組合グループ第5回研究推進委員会(於:虎ノ門パストラル)
- 11月 6日 第26回バイオテクノロジーシンポジウムにてアステラス製薬成果発表  
(於:虎ノ門パストラル)
- 12月 2日 JBICとの連携打ち合わせ(於:JBIC)

平成21年

- 2月16日 バイオ組合グループ第6回研究推進委員会(於:虎ノ門パストラル)
- 9月 9日 化合物 PJ 合同研究推進委員会(バイオ組合グループ第7回研究推進委員会)  
(於:JBIC)

平成22年

- 3月 8日 バイオ組合グループ第8回研究推進委員会(於: IVY HALL)

### 3. 情勢変化への対応

#### 【加速資金の投入 第1回】

テーマ⑤-3天然物化合物では天然物ライブラリーの構築を行っていたが、これまで門外不出とされてきた各製薬企業の有する天然物ライブラリーの本プロジェクトへの拠出が決定された。これまで4~6,000株/年の菌株ライブラリーが20,000株/年以上に、天然物代謝産物ライブラリーが8,000サンプル/年からその数倍へと大幅に増加されることとなり、世界最大天然物ライブラリーの構築が可能となった。このライブラリーを効果的に活用するためには、スクリーニングサンプル精製用の振とう培養装置の追加、スクリーニングシステム自動化ロボットの導入を行うとともに、サンプル中の物質の精製・分析装置の追加を行うことにより、ライブラリー化・プロファイル化能力を抜本的に引き上げる必要がある。このため、「加速財源制度」により平成18年11月7日に加速資金(232百万円)を投入した。これらにより、創薬スクリーニングで重要な医薬品の卵となる初期化合物のヒット率を飛躍的に高めることが可能となるほか、新しい薬の種となる薬剤候補化合物に関する重要な特許の取得が期待できる。

#### 【加速資金の投入 第2回】

平成19年11月に論文発表された京都大学山中教授による「ヒトの表皮細胞から多能性幹細胞(iPS細胞)を誘導する技術」は、再生医療への利用が期待されている胚性幹細胞(ES細胞)で問題とされている免疫反応や倫理面での問題が回避、軽減されることから、有用な細胞源として期待が高く、我が国発の画期的成果であり、今後の産業競争力を確保する上で重要な新たな発見である。しかしながら、iPS細胞研究については、産業応用を睨んで重要な基盤特許の確保を目的に、新規iPS誘導因子に関する熾烈な開発競争が世界的に展開されている状況にある。我が国においては、日本発のこの技術を世界に先立って確立し産業応用を進めるため、内閣府/総合科学技術会議にWGを設置し、各省連携のもとで支援策を講じ、迅速に展開していくことが決定された(12/25総合科学技術会議決定)。そこでその取組の一環として、NEDO技術開発機構としては、①緊急に対応すべき課題であるiPS細胞の効率的作製技術基盤の強化と知財化、②製薬企業ニーズに基づくiPS細胞のいち早い産業応用、を行うべく、関連技術とリソースを精査した結果、本プロジェクトの化合物やヒト完全長cDNAクローンの活用が最適と判断し、平成20年1月21日、加速資金(210百万円)を投入して、新規iPS誘導因子の知財化とiPS細胞の創薬スクリーニングへの応用を推進した。

iPS細胞研究については、その後、平成21年3月27日に、平成20年度補正予算を活用したNEDO新規プロジェクト「iPS細胞等幹細胞産業応用促進基盤技術開発」がスタートしたため、研究開発テーマごと本iPS細胞プロジェクトへ移行し、継続することになった。移行までの約1年間の研究開発状況や成果については、iPS細胞プロジェクトの成果と合わせて報告し、平成23年7月20日の中間評価を受けることとする。

具体的成果の1例として、京都大学iPS細胞研究所の山中伸弥教授と産業技術総合研究所の五島直樹主任研究員との共同研究により、iPS細胞の作製に必要な4因子のうち、腫瘍発生が懸念される癌遺伝子c-Mycの代わりに卵細胞で強く発現する転写因子Glis1を用いると、従来の方法に比較して非常に効率よくiPS細胞を誘導できることを発見したことが挙げられる(Nature, vol.474 (2011) p.225-229)。



## 4. 評価に関する事項

### 【中間評価の実施】

NEDO技術開発機構は、技術的及び政策的観点から、研究開発の意義、目標達成度、成果の技術的意義並びに将来の産業への波及効果について、外部有識者による研究開発の中間評価を平成20年7月24日に実施した。

### 平成20年7月24日中間評価における総合評価

「ゲノム創薬の中でも蛋白相互作用を標的とする試みは極めて挑戦的であり、基礎生命科学の蛋白間相互作用データベースの構築には極めて有効である。世界最大級の天然物ライブラリーの構築や高精度かつ効率的な世界最高水準の技術をいくつも開発するなど、設定目標に向けて概ね順調に成果が蓄積されてきている。創薬ターゲットや創薬リード化合物を生み出す基盤技術として期待したい。しかしながら、各個別研究の中に光るものがある一方、全体の有機的連携と個別テーマ間の連携が希薄であり、総花的である。本プロジェクトの存在意義は、企業では実施困難な基盤研究であり、実施する化合物スクリーニング等はタンパク質ネットワークの機能解析の一環として実施される範疇である。新薬の種別は深入りすることは避けるべきである。残された期間にこれまでの成果の集約と真の実用化に向けて絞り込み、明確な出口に不要な個別研究は早急に辞めて、成果の明確なものだけに集中すべきと考える。」

上記の評価を踏まえ、平成21年3月に、以下の3点にわたる、基本計画および実施体制の変更を行った。

### 1. プロジェクト内の情報共有徹底と連携強化のため、主要テーマ毎にサブプロジェクトリーダーを配置したマネジメント体制への刷新

夏目プロジェクトリーダーのもと、主要5テーマ(①タンパク質相互作用ネットワーク解析、②タンパク質相互作用検証、③タンパク質相互作用予測、④化合物探索、⑤化合物高機能化)へ研究開発テーマを絞り込み、各研究開発テーマを統括するサブ・プロジェクトリーダーを設定し、月1~2回、定期的に進捗ミーティングを開催するマネジメント体制へ刷新した。

さらに、主要5テーマのより一層の連携を図った。タンパク質相互作用ネットワーク解析から創薬標的を選抜し、選抜した創薬標的の相互作用を検証するアッセイ系を構築して天然物ライブラリーを中心としたハイスループットスクリーニングを実施し、見出したヒット化合物と標的となるタンパク質相互作用のシミュレーション解析などを通じてヒット化合物の高機能化をデザインし、ヒット化合物の誘導体を効率よく合成するコンビナトリアルライブラリーなどを開発しより高活性な化合物を見出す、プロジェクト全体を一体化した統合的な研究開発を実施することとした。

### 2. 選択と集中による実施テーマの統廃合

中間評価結果を受け、平成20年度末をもって、

JBIC 分室 2「文献からの化合物および遺伝子/タンパク質の相互作用情報の自動収集」(ナラプロ・テクノロジーズ)

JBIC 分室 3「タンパク質相互作用情報の解析支援機能の開発」(インテック W&G)

JBIC 分室 5「タンパク質相互作用の探索および検証のためのタンパク質発現および解析」(プロテイン・エクスプレス)

JBIC 分室 6「抗体様分子プローブの作製と評価技術の開発」(ジーン・フロンティア)

JBIC 分室 7「抗体様分子プローブの作製と評価技術の開発」(ジーン・フロンティア)

JBIC 分室 11「ドラッグスクリーニング用蛍光タンパク質の改変・改良」(MBL)  
JBIC 分室 12「in vitro および生細胞内相互作用高速検出装置の開発」(JBIC/北海道大学)  
JBIC 分室 17「生体内イメージング基盤技術の開発」(JBIC/理化学研究所/東京大学)  
JBIC 分室 18「生体内イメージング機器の高度化に関する技術開発」(オリンパス)  
JBIC 分室 19「イメージング基盤技術の適用研究」(東レリサーチ)  
JBIC 分室 20「マイクロアレイによる化合物評価」(ニッポンジーン)  
を終了した。

これに伴い、基本計画において、平成 18~20 年度の研究テーマ⑦「化合物等の評価技術の開発」を削除し、研究テーマ④「疾患関連遺伝子探索技術の開発」を研究テーマ①「遺伝子及びタンパク質相互作用ネットワーク解析技術の開発」に統合した。

また、平成 21 年度末をもって、バイオ組合委託分  
研究テーマ⑧「マイクロサテライトマーカーを利用した疾患関連遺伝子探索技術により特定された疾患感受性遺伝子群の創薬価値の抽出技術の研究開発」  
研究テーマ⑨「siRNA ライブラリー等を用いた生物機能制御遺伝子の探索及び創薬標的検証技術の研究開発」  
研究テーマ⑩「化合物又は相互作用を検索、評価する基盤技術の研究開発」  
を終了した。

このうち研究テーマ⑨については、平成 22 年度にその一部「糖尿病関連液性因子 AGF ファミリー蛋白質 X の受容体遺伝子 Y の抗糖尿病創薬標的としての妥当性検証」を、JBIC 分室 1 の研究テーマに統合し、研究を継続した。

### 3. 基本計画の最終目標を、より高次の目標へ変更

「相互作用情報の同定数を 500 以上取得する」

「産業上有用な化合物等を 50 以上取得する」

という単なる数値目標から、

「10 個以上の相互作用情報を対象に制御物質のスクリーニング等を行うことにより、開発技術の有用性検証を通じて創薬基盤として確立する」

「3~4 個程度の創薬開発候補ターゲットに対して、臨床薬のリード化合物となりうるタンパク質相互作用制御物質を創製する」

へと、より高次の目標へ変更した。



### Ⅲ. 研究開発成果について

#### 1. 一般社団法人バイオ産業情報化コンソーシアム委託分研究開発成果

##### 1.1 目次

<序>

#### 第1章 基盤技術開発

1. タンパク質レベルでの創薬ターゲット決定の効率化  
<①遺伝子及びタンパク質相互作用ネットワーク解析技術の開発>
2. タンパク質間相互作用の可視化から統一的なスクリーニング系の構築  
<②タンパク質相互作用情報の検証技術の開発>
3. 多様な標的に対応するためのケミカルスペースの拡大  
<⑤化合物等の探索技術の開発>
4. 活性天然化合物の新世代高度化技術の開発  
<⑥化合物等の高機能化技術の開発>
5. ケモ-バイオインフォマティクス技術の効率化  
<③タンパク質相互作用予測技術の開発>
6. 創薬開発を加速するタンパク質発現リソースとタンパク質発現の活用  
<②タンパク質相互作用情報の検証技術の開発>

#### 第2章 基盤技術の応用と評価研究

<研究チーム相互連携による基盤技術の応用・評価研究>

1. タンパク質間相互作用を阻害する化合物の創製
  - 1.1 プロテアソームアッセンブル因子 PAC3 相互作用阻害化合物の創製
  - 1.2 HSP47-コラーゲン相互作用阻害化合物の創製
2. 活性天然化合物の新世代高度化技術の開発と実証 (In silico-guided activity-oriented combi-chem synthesis)
  - 2.1 TDP1 阻害剤のインシリコ解析に即した高度化
  - 2.2 Spiruchostatin をモチーフとする HDAC 阻害剤の創製
  - 2.3 新規テロメラーゼ阻害剤の開発
  - 2.4 産業化に向けて
3. タンパク質間相互作用を低分子化合物で制御する新戦略

#### 第3章 個別研究開発

1. 遺伝子レベルでの創薬ターゲット決定の効率化 (EXPOC®マウス開発)  
<④疾患関連遺伝子探索技術の開発>
2. 翻訳リプログラミングに基づく統一的なスクリーニング系の構築 (RAPID システム開発)  
<⑥化合物等の高機能化技術の開発>

## 第4章 中間評価実施年度(平成20年度)までに終了した研究開発

### 1. 疾患関連遺伝子探索技術の開発

<④疾患関連遺伝子探索技術の開発>

### 2. *in vitro* および生細胞内分子間相互作用高速検出装置の開発

<⑤化合物等の探索技術の開発>

### 3.1 スクリーニング技術開発(モデル生物)

<⑤化合物等の探索技術の開発>

### 3.2 ショウジョウバエを用いた疾患関連遺伝子産物制御法の開発

<⑤化合物等の探索技術の開発>

### 3.3 体系的な転写ネットワーク同定を利用した行動リズム制御法の開発

<⑤化合物等の探索技術の開発>

### 4.1 モデル動物での化合物評価

<⑦化合物等の評価技術の開発>

### 4.2 マイクロアレイによる化合物評価

<⑦化合物等の評価技術の開発>

## 1.2 各テーマの研究開発成果

### <序>

近年、ケミカルジェノミクスあるいはケミカルバイオロジー推進の重要性が広く認識されつつある。その結果、各国で、基礎から応用まで様々なレベルで研究が展開しよりシステムティックな研究手法が求められている。しかし、現状は、個別的な研究手法からの脱却は依然困難であり、必要な化合物をシステムティックに網羅的に創出して行くというレベルには遠い。

また、産業界に目を向けると、欧米の大手製薬企業(メガファーマ)によって過去5~6年間に上市された新薬は年々減少傾向にあり、膨大な研究開発費を投入しているにも係らず頭打ちの状態が続いている。その結果、国内の大手製薬企業は合併等による効率化を進めるとともに、自社開発主義を捨てる傾向が強まり、バイオベンチャーやアカデミアからの導入が開発品の大半を占めるようになりつつある。バイオ産業の成長戦略には大きな変革が求められている。

研究技術の面から見ると、①創薬ターゲットの発見技術、②薬の基となる創薬候補化合物を高効率に探索(スクリーニング)する技術、③より良いスクリーニングソース(化合物ライブラリ)の構築という、創薬上の重要な3点に革新的な技術革新が少ないという指摘がなされている。

そこで本研究開発のバイオ産業情報化コンソーシアム(JBIC)委託部分では、これらの3つの技術的要因を克服することを研究の課題とし、日本の強みを活かした独自の戦略で取り組んだ。

先ず、①については、日本独自に開発された世界最高感度の質量分析技術を活用した大規模なタンパク質ネットワーク解析システムを行い、創薬ターゲット候補となり得るタンパク質相互作用を発見する技術開発を推進した。なぜなら、生体を構成する全てのタンパク質は、単独で機能するのではなく、常にグループ・組織を形成し、タンパク質間相互作用ネットワークを構成している。このようなネットワークを俯瞰し、細胞全体の生体応答のさなかに、個々のタンパク質がどのように働いているのかを知ることが出来れば、疾患発症メカニズムの解明のみならず、創薬ターゲットの発見にも役立つ。また、殆どの化合物は何らかのタンパク質に作用しその薬効を顕すわけであり、タンパク質相互作用ネットワークを知ることこそが、化合物のターゲット同定、あるいは新規な化合物ターゲット発見の近道である。従って、盤石な創薬基盤を構築するために、タンパク質の機能複合体がどのようなコンポーネントにより構成されているかを決定し、且つそのダイナミックな変化を知ることが必須といえる。

また②として、①の情報を基に、タンパク質間相互作用を指標とする、ハイスループットで統一的なスクリーニングプラットフォームを構築する技術開発を行った。これにより従来のような個別的時間と人件費のかかるプラットフォーム構築という創薬研究のボトルネックを除去し、個別研究からの脱却を目指した。

これまでの化合物スクリーニングは、酵素活性や細胞死など、所謂生物活性を指標にした特定の表現型アッセイを構築しなければならず、スループットの高い優れたアッセイ系を構築するために多大な労力と時間が、各ターゲット毎に必要であり、これまでの化合物スクリーニングのボトルネックであった。しかし、発見した相互作用を可視化し、これを指標とするならば、相互作用の組み合わせ変えるだけで(具体的には、発現させる cDNA を変えるだけで)共通のプラットフォームでのスクリーニングが可能であるため、個別のスクリーニング系を立ち上げる必要はない。

しかし、創薬業界では、これまでタンパク質間相互作用をターゲットとするスクリーニングは積極的には行われてこなかった。事実、これまで上市された医薬品の大半は何らかの酵素阻害剤であり、タンパク質相互作用を指標として医薬品が作れたと言う耳目は殆どない。その理由は、大き

なタンパク質相互作用界面を低分子化合物で制御するのは難しいという考え方が支配的だったからである。しかし、「難しいと」忌避しては、創薬ターゲットは先細る一方である。

従って、本研究開発を通して、タンパク質間相互作用を低分子化合物で制御する戦略と可能性を示すことが出来たことは、大きな成果であると言える(研究開発項目:タンパク質間相互作用を低分子化合物で制御する新戦略)。また、タンパク質間相互作用を制御するための優れたヒット化合物をえるためには、広大で多様性を有する天然物が有利であることも示された。

これを実証するために、独自の天然物サンプルに加え、製薬企業の保有するこれまで門外不出の天然物を中心とした化合物ライブラリが集結し、世界最大級の天然化合物ライブラリを構築することが出来た。それとともに、さらなるケミカルスペースの拡大を目指し、従来製薬業界が行ってこなかった、新たな天然物の収集法が試され、特に海洋生物から新たな化合物ソースを獲得する基盤技術が確立された。今後、これらのソースを、遺伝子解析、化合物プロファイルを行い、天然物を単独の化合物として単離ライブラリ化することが、更に望まれる。

その一方で、一般に天然物がそのまま医薬品になることは稀であり、周辺の各種誘導体を合成し最適化しなければならないが、構造が複雑であることから誘導体展開が不可能か、出来たとしても膨大な時間とコストがかかることが常である。そこで、天然物よりのヒット化合物を元に、インシリコのドッキングシミュレーションを行い、活性が見込まれる活性母格を推定し、さらに最適化シミュレーションも行いながら、活性が見込まれる最低限の化合物のみを合成展開する実証研究を展開した。その結果、オリジナルの天然化合物よりも低分子化し、且つ、20~100倍ほど高活性化することに成功する事例を示すことが出来た(研究開発項目:活性天然化合物の新世代高度化技術の開発と実証)。これは多様性・高生理活性という天然物の長所を活かし、その欠点を合成化学で補うという本研究独自の融合技術である。

本研究開発のもう一つの特徴は、国内の製薬関連企業15社が様々な形でプロジェクトに参画したことである。これによって、本研究開発の成果を参画企業が直ちに持ち帰り、実証研究を行うことが可能であった。その一つが、製薬企業からの天然化合物ライブラリの提供であり、これらを活用し本研究開発独自のスクリーニングが多数行われた。そしてこのスクリーニングにより得られたヒット化合物はライブラリを提供した企業が持ち帰り、臨床開発薬の可能性が検討されている。その他に、各企業の個別の課題を解決するために、本研究開発の技術が積極的に提供されている。それらはタンパク質ネットワーク解析システムを用いた創薬ターゲットの絞り込み、薬理メカニズムの特定、臨床開発薬のターゲットタンパク質決定、副作用のメカニズム解明まで及んでいる。このような様々な形態での連携を通して、基盤技術開発の産業化への実証研究が常に同時進行した。

## 研究開発体制と各チーム連携と成果

本研究開発では、6つのチーム(ネットワークチーム、イメージングチーム、天然物チーム、合成チーム、インシリコチーム、cDNA リソースチーム)が、それぞれ各チームのテーマである基盤技術開発をおこなうとともに(成果:第1章)、チームの基盤技術を連携融合し、基盤技術の応用と評価研究を行った(成果:第2章)。また、「企業課題解決型共同研究」として、要望のある参画企業に、これらの基盤技術を提供することにより、産業化へのニーズを図るとともに、製薬企業との実証研究を同時進行させた。

このような、研究開発体制とチーム連携と成果の概要を述べる。

## ネットワークチーム

タンパク質間相互作用ネットワーク解析を高度化することにより、新規な創薬ターゲットを効率よく発見するための基盤技術開発を行った。ここで見つかった新たなターゲットは、イメージングチームにおいて、タンパク質間相互作用を指標とするスクリーニング系構築へと連動した。また、この技術は、「企業課題解決型共同研究」として、参画製薬企業全社に提供した。それとともに、製薬企業からのニーズが非常に高かった、化合物をプローブとして用いた、低分子化合物とタンパク質とのネットワーク解析（低分子化合物ターゲットタンパク質解析）を効率化する基盤技術開発を行った。

## イメージングチーム

本研究のメインテーマであるタンパク質相互作用を制御する創薬スクリーニングを行うため、本チームは、タンパク質間相互作用を効率よく可視化し、さらにハイスループットなスクリーニングプラットフォーム構築のための基盤技術開発を行った。構築したプラットフォームは、天然物チームと連携し、実際にスクリーニングに用い、有益なヒット化合物が得られるかという検証研究を行った。また、プラットフォーム構築を効率化するための基礎情報を得るために、インシリコチームとの連携も行った。

## 天然物チーム

より良いスクリーニングソースを構築するため、国内大手中堅製薬企業が保有していた、天然物を中心とした化合物ソースを一局集中させるとともに、それらをハイスループットなスクリーニングに適した形に整備し、イメージングチームと連携しタンパク質間相互作用を指標としたスクリーニングを行った。それとともに、独自の方法により、新たな天然物取得のための基盤技術開発を行い、多様なニーズに応えられる化合物ライブラリの構築を行った。

## 合成チーム

天然物化学の欠点を克服するため、天然物由来のヒット化合物を、インシリコチームと連携しドッキング最適化シミュレーションを基に、コンビナトリアル合成展開を行い、天然物化学の「次世代高度化」を目指した基盤研究を行った。

## インシリコチーム

本チームは、ケモバイオインフォマティクスの効率化を図るための基盤技術開発を行わない、天然物のヒット化合物のドッキング最適化シミュレーションを行い、理論的な合成展開の支援を行うという、天然物と合成チーム間の糊付と橋渡しの役割を果たした。また、参画企業のニーズに応え、企業課題解決型共同研究も積極的に行った。

## cDNA リソースチーム

cDNA を駆使した、網羅的なタンパク質発現システムは、創薬研究とケミカルバイオロジー推進のための必須なインフラである。本研究開発ではプロテオームワイドな cDNA を整備するとともに、ハイスループットにこれらをタンパク質として発現するための基盤技術開発を行い、ネットワーク解析チーム、イメージングチームに提供した。特に、イメージングチームと強固に連携し、ハイスループットで大規模なスクリーニング系を構築・運用に必要なタンパク質を、迅速且つ安定に供給する基盤技術の確立を目指した。また、インシリコチームのシミュレーションを実証するため、各種変異体を含むタンパク質をも供給した。

## 中間評価に対する対応

平成18年度、本研究開発発足当時、はゲノム解析から毒性評価までと、創薬開発の全体にわたって、技術開発を行う構想であった。しかし、中間評価を経て、大胆な研究テーマの選択と集中を行った。その結果終了した研究テーマは4章にまとめた。

## 第1章 基盤技術開発

### 1. タンパク質レベルでの創薬ターゲット決定の効率化(ネットワークチーム)

＜①遺伝子及びタンパク質相互作用ネットワーク解析技術の開発＞

実施体制: JBIC 分室1 (JBIC) JBIC 分室2(ナラプロ・テクノロジーズ)、JBIC 分室3(インテック W&G)、課題解決型連携企業

共同研究: 産業技術総合研究所、理化学研究所・和光、臨床医学総合研究所、東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科、東京大学大学院薬学系、東京工業大学

タンパク質は、他のタンパク質と相互作用することでその機能を発揮し、様々な生命現象に関わっている。したがって、タンパク質ネットワークを明らかにすることは、生命現象の解明といった基礎研究はもちろん、創薬ターゲットの解明・新たな診断・治療法の開発などの応用研究にも重要である。

本研究開発においては、まず、質量分析計を用いた高感度タンパク質ネットワーク解析技術を開発・確立する。次いで、本システムを用いて解析を進め、タンパク質の機能を明らかにし、疾患メカニズム解明のための情報や創薬ターゲットの情報取得を行う。また、タンパク質ネットワーク解析技術の応用として、創薬候補低分子化合物のターゲットタンパク質解析を課題解決型企業連携として行う。

#### 1.1 質量分析用サンプル自動調製システムの開発

細胞の可溶性から複合体精製までのサンプル調製工程は、どうしても人間による作業にならざるを得ないため、調製者によって品質に差が生じてしまう。高い品質のサンプルが安定して供給され続けなければ大規模データの信頼性は失われてしまうため、タンパク質ネットワーク大規模解析の最大のボトルネックとなっている。

この問題を解決する目的で、クリーンルーム対応の質量分析用サンプル自動調製システムを開発した。動作自由度6軸・位置繰り返し精度 $\pm 0.05\text{mm}$ の高性能多軸ロボット(川崎重工製)4台を中心に、直交ロボット(IAI)1台・低速および高速遠心分離器それぞれ1台・ $\text{CO}_2$ インキュベーター1台などから構成される。

本システム導入による改善点を以下に示す。

(厳密な条件管理)

高性能多軸ロボットにより1枚ずつ処理をしていく1個流し方式を採用したので、温度・時間など同一条件で調製を行うことができる。

(時間短縮)

素早い処理が要求されるタンパク質複合体分離・精製までの工程が、約半分の時間にまで短縮することに成功した。細胞の掻き取り操作では、ヒトの操作では不可能なワンストロークでの回収を行うこと、プルダウン時に使用するビーズをアガロースビーズから磁性ビーズに変更することで、ライゼートとビーズとのインキュベーション時間が短縮された。

以上により、人間よりも短時間で、かつマイルドなサンプル調製が可能になった。その結果、微量タンパク質の変性・分解を最小限に抑えることが可能になり、実質的解析感度および再現性の向

上に成功した。

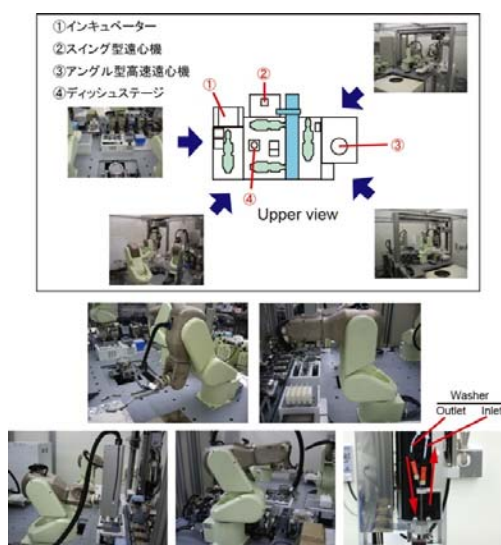


図 1.1-1 質量分析用サンプル調製システム

### 1.2 開発技術の検証(タンパク質ネットワーク解析)

サンプル自動調製システムの検証として、高感度質量分析システムと組み合わせて、タンパク質ネットワーク解析を行った。共同研究で bait タンパク質の機能解明につながった情報については 51 報の論文(インパクトファクター:450)として発表した。また、その中から創薬スクリーニングターゲット情報として、21 個をスクリーニングチームへ提供した。対象疾患の内訳は表 1.2-1 に示す。

疾患	創薬ターゲット数
アレルギー性疾患・自己免疫疾患	3
ガン	10
筋萎縮症	1
神経再生	1
糖尿病	3
リウマチ	3
計	21

表 1.2-1 対象疾患別スクリーニング系の内訳

### 1.3 課題解決型企業連携

課題解決型連携企業11社との共同研究を行い、タンパク質相互作用解析として 133bait(8社)を約 4,000 解析、開発薬・上市薬のターゲットタンパク質解析として 81 化合物(10社)を 10,000 解析おこなった。結果はすべて提供し、その後の検証研究は各企業で進めた。

現在検証中の相互作用情報が多いが、これまでに2化合物についてターゲットタンパク質の同定とその検証が終了した。そして、そのうちの1化合物については、ターゲットタンパク質の機能を阻



害することが証明され、臨床研究へと進んでいる。

## 2. タンパク質間相互作用の可視化から統一的なスクリーニング系の構築 (イメージングチーム)

＜②タンパク質相互作用情報の検証技術の開発＞

実施体制:JBIC 分室 4(JBIC)、JBIC 分室 10(JBIC、アマルガム)、JBIC 分室 11(医学生物学研究所)

共同研究:産業技術総合研究所、理化学研究所、京都大学、大阪大学

### 2.1 統一的なスクリーニング系の構築

タンパク質相互作用スクリーニングは、酵素活性や細胞毒性など明確な生物活性を指標とする必要のない、新しい概念からなる薬剤開発において興味あるターゲットであるが、その制御は高分子同士の大きな相互作用ポケットを、低分子化合物で制御しなければならないため、ハードルの高いスクリーニングであり製薬企業では手を出しにくいスクリーニングターゲットであった。本開発項目では、このチャレンジングなスクリーニングターゲットに対して、蛍光タンパク質技術を応用した汎用性の高いスクリーニング系を構築し、生物活性が高く、ケミカルスペースの大きな天然物を用いて、タンパク質制御物質のスクリーニングを開発する。

蛋白質間相互作用を解析する技術としては多様な系が存在する。代表的な例として、Yeast two-hybrid 法、Alpha スクリーン、BIACORE、蛍光偏光解析法、メモリーダイアッセイ (complementation 法) 等がある。本プロジェクトでは、これらの中から、スループット・コストや汎用性を考慮し、蛍光イメージング技術を中心に(メモリーダイ法)、タンパク質相互作用指標としたスクリーニング系を効率よく構築するための基盤技術を中心に研究開発を行った。アッセイ系の構築からスクリーニングまでの概要を図 2.1-1 に示す。

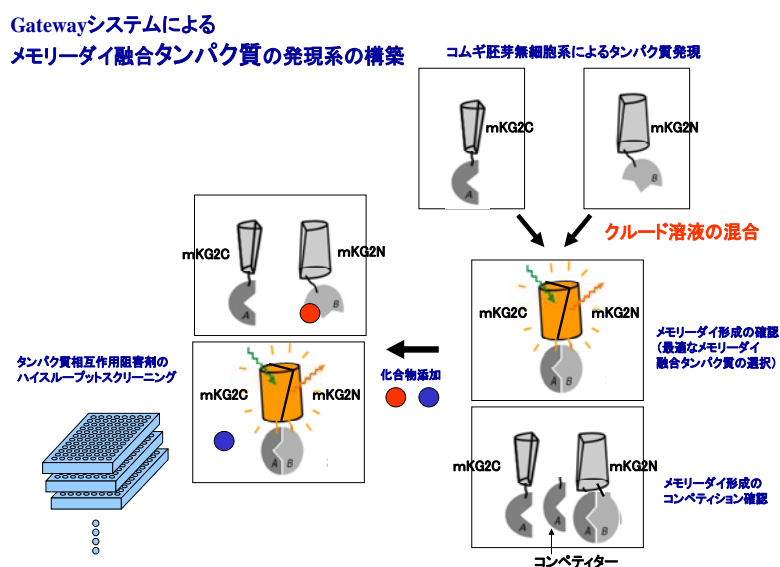


図 2.1-1 メモリーダイアッセイ構築とハイスループットスクリーニング

### 2.2 メモリーダイの技術開発

本プロジェクトでは大規模スクリーニングに最適と思われるメモリーダイアッセイを選択し、薬剤探索アッセイ系の構築を行った。まずは既知のタンパク質間相互作用をモデルに発現系構築を

構築し、必要に応じてタンパク質のドメイン化、局在化、リンカー検討、シグナル配列削除等を行い、34 種を構築し 30 種で蛍光シグナルを検出した。この結果から、様々なタンパク質間相互作用において検出率が良いことを確認した。

*in vitro* メモリーダイ薬剤探索アッセイで膨大な天然物をスクリーニングするために、更なるアッセイ系の高効率化を行なった。384 ウェルプレートから 1536 ウェルプレートにスケールアップしスループットをあげると共に、アッセイに使用するコムギリコンビナントタンパク質量を 1 種あたり 10  $\mu$ l から 3  $\mu$ l にスケールダウンして経済性を向上させた。この作業は、単にウェル数を増やしてリコンビナントタンパク質を減らせば達成できることではない。リコンビナントタンパク質を減らすことによって蛍光シグナルも減少するため、機器等に由来するノイズ、およびサンプル溶液の自家蛍光に由来するノイズに較べて十分な蛍光シグナルを確保しなければならない。コムギリコンビナントタンパク質の可溶性や純度、タンパク質 A とタンパク質 B の混合比を詳細に検討することで 1536 ウェルプレートでのアッセイが可能となった。アッセイ系の精度をあらゆる指標の一つである Z-factor はハイスループットスクリーニングにおいて 0.5 以上が必要とされている (Z-factor は 1 以下の値をとり、1 に近いほど良い)。本アッセイ系は Z-factor=0.77 と算出された。前述の蛍光タンパク質 mKG、および測定用光学フィルター・ミラーの開発、作製もこの点に大きく寄与している。

### 2.3 スクリーニング系構築をサポートするための基盤技術

タンパク質相互作用検証技術の開発からスクリーニング系の構築にまで発展させるには現実的な問題点の解決が重要になってくる。

- 1) 反応系の安定性 (測定値の誤差が小さい)
- 2) 数十万のスクリーニング反応に必要なタンパク質の供給
- 3) ハイスループット測定が可能
- 4) 個々に異なるタンパク質に対応したタンパク質発現、スクリーニング系の構築

上記のような、地味ではあるが確実に解決しないと実際のスクリーニング系は動かない。こうした問題解決が、実際のスクリーニングを遂行する上で必要であり、それらを解決した。

### 2.4 光タンパク質に対するモノクローナル抗体の開発

メモリーダイアッセイに使用している蛍光タンパク質 mKG の N 末端断片 (168 アミノ酸) と C 末端断片 (51 アミノ酸) 特異的なモノクローナル抗体の開発を行なった。結果として 3 種 (mKG 全長、N 末端断片、C 末端断片)、9 クローンのモノクローナル抗体が得られた。

### 2.5 メモリーダイ以外の開発

インビトロメモリーダイ法を補う系としてインビトロ・スプリットルシフェラーゼ法を開発した。タンパク質相互作用のスクリーニング系として産業応用可能な高度化を図る場合、一つのアッセイ系ではなく、ケースバイケースで幾つかのアッセイ系を選択できることが重要である。インビトロ・スプリットルシフェラーゼ法の開発はこうしたアッセイ系の一つとして重要である。その他に、蛍光偏光法、マルチカラーイメージングによる共局在解析、FRET 指示薬の開発を行ない、それらに使用する蛍光タンパク質の改変、改良を行なった。

### 2.6 アッセイ系構築実績

*in vitro* メモリーダイ薬剤探索アッセイにおいては更なる膨大な天然物をスクリーニングするためにアッセイ系の高効率化を行い、結果として、40種の *in vitro* メモリーダイ薬剤探索アッセイ系を構築、検討して、15種、延べ 3,264,576 アッセイを実施した。

### 3. 多様な標的に対応するためのケミカルスペースの拡大(天然物チーム)

#### <⑤化合物等の探索技術の開発>

実施体制:JBIC 分室 15 (JBIC、メルシャン)、課題解決型連携企業

共同研究:産業技術総合研究所、製品評価技術基盤機構、東京農工大学、京都大学、東京医科歯科大学、慶應義塾大学、癌研究会、愛知県がんセンター

天然物は広いケミカルスペースを持ち、例えば医薬品にならなくてもファーストヒットを得るためのソースとしては理想的なライブラリーである。タンパク質相互作用制御物質のスクリーニングでは、分子量の大きい因子同士の相互作用を制御すると言う点で、なるべく大きな分子量を持った低分子化合物が含まれるライブラリーが望まれる。また、タンパク質相互作用制御スクリーニングでのヒット率は極めて低いと考えられる。そこで、ライブラリーに関してはサンプル数の拡充とこれまでに無いライブラリーの収集との、2つの戦略により、より大きなケミカルスペースを持ったライブラリーの構築を行った。

産総研および NITE によるインハウスライブラリー (147,019 サンプル) に加え、製薬系企業等 (13社+1社団法人) 提供のライブラリーを含んだ合計 345,293 サンプルからなる、天然物ライブラリーの構築に成功した。これは、実際に運用している天然物ライブラリーとしては、世界最大級のライブラリーであり、かつこれまで長い間蓄積されてきた各社のノウハウが詰まったライブラリーであることから、門外不出となっていたライブラリーを集中化することに成功した世界初の例である。

上記のライブラリーを確立する上で、これまで主に土壌をはじめ植物堆積物など地上由来の試料が菌株分離のリソースとして用いられて来たが、近年海洋由来の化合物が臨床開発に上がっている (承認されている物も有り) ことから、海洋資源が再注目されている。海綿などの生物から化合物が単離されているが、それらの化合物はその海洋生物中に存在する微生物によって生産されていると考えられている。そこで、海綿をはじめとする海洋生物からの菌株の分離を進め、167株の放線菌を分離し、合計33個の新規化合物を単離した (他に、カビなど数十株程度分離し、16個の新規化合物を見出している)。また、海洋菌株分離において、従来の土壌風乾操作が不可能なため、二次代謝産物生産能が高いと言われている増殖が遅い菌株の分離が困難であったため、様々な菌株分離法の開発・改良を行った。その結果、抗生物質等を使用することなく、長期培養下での菌株分離を行える手法の開発に成功した。

また、ライブラリーに関しては、誰もがどのようなスクリーニングに対しても適用できるように、単離天然化合物ライブラリーの構築を進めた。その中で、UPLC-TOF-MS を用いた化合物解析を行い、データベースの構築を行った。本データベースを使用することにより、10分程度の短時間で、また生産量 10  $\mu$ g/L 以下の高感度で、微生物培養サンプル中の二次代謝産物の解析が可能である。以上の手法を用いて約4年間で120個以上の新規化合物を見出した。本プロジェクトにおいて単離した化合物のうち、915化合物を選抜して、購入可能な合成ライブラリーと比較しながら、ケミカルスペースの解析を行った。その結果、我々の構築した天然化合物ライブラリーは、合成ライブラリーと比較して広いケミカルスペースを保有していることを明らかにした。また、これらのライブラリーを用いてタンパク質相互作用阻害物質のスクリーニングを展開し、15個のタンパク質相互作用阻害物質を単離したが、それらの化合物をインプットした結果、合成ライブラリーの周辺から離れたケミカルスペースを持つ位置にアサインされることが判明し、タンパク質相互作用スクリーニングでは、天然物ライブラリーを用いなければヒットを得るのは難しかったと考えられた。また、

これらのライブラリーに関しては、現在企業間相互利用をはじめ、ベンチャー企業および大学等公的機関のスクリーニング系に対して、広く使用出来るシステムを構築中であり、今後我が国の創薬開発に大きく貢献できるものと考えられる。

### 我々の保有する単離天然化合物ライブラリーのケミカルスペース

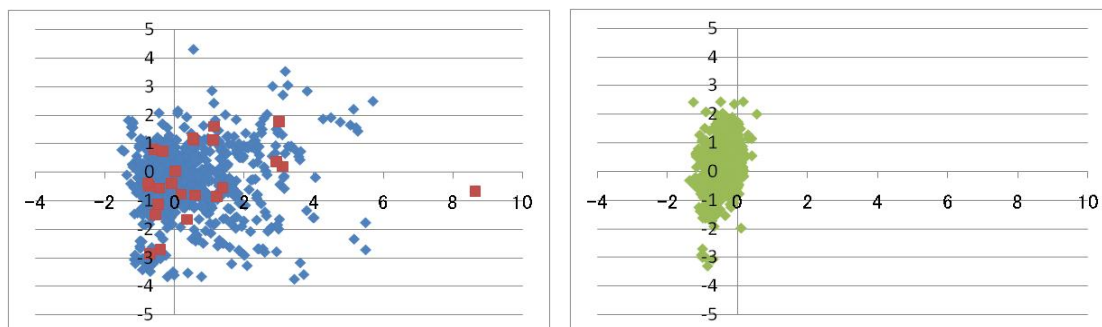


図 3-1 天然化合物ケミカルスペース(左)、合成化合物ライブラリーケミカルスペース(右)

タンパク質相互作用スクリーニングに関しては、一つのターゲットあたり、約 30 万ライブラリーを数ヶ月以内でスクリーニングを終了させなければならなかったことから、ハイスループットスクリーニング系である *in vitro* mKG 法を開発した。スプリットした蛍光タンパク質 mKG を、標的とするタンパク質と繋ぎ合わせ、それらタンパク質が結合した際に蛍光を発するアッセイ系であるが、我々は 1536-well ベースのスクリーニングの実施が可能であり、週に 100,000 サンプル以上のアッセイが可能である。スクリーニング結果は、全てデータベース化されており、タンパク質相互作用スクリーニングを含め、本プロジェクトで遂行したスクリーニングは全て登録しており、選択性の高い化合物の抽出などが効率的に行える。

本システムを用いて、様々なスクリーニングを実施し、多くの生物活性を有する化合物を発見した。これらの化合物のうち、動物レベルでの抗腫瘍活性を発現する化合物の発見にも成功している。このような化合物に関しては、インシリコチームおよび合成チームとの連携により、合成困難な天然化合物についても、インシリコ解析を行うことにより、異なる骨格を持つ化合物から合成誘導体展開が可能なシステムを確立した。本プロジェクトにおいて、天然物の持つ魅力を十分に引き出し、またその問題点を克服する新たな展開を示すことができ、今後この「次世代天然物」の企業での応用が期待される。

#### 4. 活性天然化合物の新世代高度化技術の開発(合成チーム)

##### <⑥化合物等の高機能化技術の開発>

実施体制:JBIC 分室 16(JBIC、旭化成ファーマ、東レ)

共同研究:東京工業大学、東北大学

天然から単離・構造決定されている化合物には新規な骨格をもち、かつ特異な生理活性を有するものがある。これらを基に誘導体を数多く合成し、さらに高活性な化合物あるいは作用ターゲット探索のための分子プローブを合成することは、創薬の基盤技術として非常に重要である。しかし、天然物そのものを誘導化するためには官能基変換が限られており、構造の多様化は非常に難しい。そこで本研究では天然物を合成ブロックに分割し、それらを組み合わせて多様な天然物誘導体を合成するというコンビナトリアル合成法の開発研究を行った。また、特異な三次元構造をもつテンプレートを設計し、それらをもとにコンビナトリアル合成により天然物様のケミカルスペースをカバーしうる化合物ライブラリー合成法の開発研究を行った。さらに、タンパク質ネットワーク解析グループと連携して生物活性化合物をもつ分子プローブを迅速に合成する手法を確立し、標的タンパク質複合体を明らかにするという創薬基盤技術の開発を進めた。

デオキシオリゴ配糖体は、多くの生物活性天然物みられるモチーフである。そのためデオキシオリゴ配糖体構造は、機能性分子開発のテンプレートとして期待されている。本研究では、デオキシ糖ユニットをアグリコンに順次結合する逐次合成法とデオキシオリゴ糖ユニットをアグリコンに一挙に導入するブロック合成法によるデオキシオリゴ配糖体合成技術の開発を行った。その結果、デオキシ糖の直接的かつ立体選択的グリコシル化反応を基盤とするという新規糖鎖導入技術の開発に世界で初めて成功した。本技術を用いて、分子シャペロン GRP78 の誘導阻害を示すことにより新規抗癌剤のリード化合物として注目されているデオキシオリゴ糖配糖体 versipelostatin (VST)の誘導体合成を行った。その結果、本技術は、VST の有する大員環アグリコンへの糖鎖導入にも適応可能であり、逐次合成法および、ブロック合成法のどちらにおいても配糖体合成が可能であることを明らかにした。また、種々の誘導体合成を行った結果、VST の糖鎖部は提唱されている D-オレアンドロースではなく L-オレアンドロースを含むことを明らかにした。そして、その L-オレアンドロースを含む二糖部が高活性発現に重要であることを見出した[Chem. Asian J. 2009, 4, 1114]。

Destruxin E は *Metarhizium anisopliae* から単離・構造決定された 19 員環の環状デプシペプチドであり、 $\beta$ -アラニンと二つの *N*-メチルアミノ酸を含む五残基アミノ酸および末端エポキシドを有する  $\alpha$ -ヒドロキシカルボン酸から構成されており、新しいがん化学療法分子標的として注目されている V-ATPase 阻害活性を有する。V-ATPase は様々ながん細胞で顕著に増大していることが知られており、がん細胞の薬剤耐性、アポトーシス抵抗性、転移のプロセスに重要な役割を担っていると考えられている。現在、V-ATPase 阻害剤は選択性の高い抗癌剤として期待されていることから、全合成を行い、未決定であるエポキシドの立体化学を決定した。トリチルクロリドランタンに  $\beta$ -アラニン( $\beta$ -Ala)を固相に担持させた後、メチルアラニン(MeAla)、メチルバリン(MeVal)、イソロイシン(Ile)を順次縮合することで四残基ペプチドを合成した。続いて、( $\alpha$ -hydroxyacyl)proline と縮合させた後、固相からの切り出しを行うことで、望む環化前駆体を 8 工程総収率 48% で得た。DMAPO 存在下 MNBA を作用させることでマクロラクトン化を行った後、エポキシドを構築することで destruxin E およびエポキシドのエピマーをそれぞれ全合成することに成功した。それらの

V-ATPase 阻害活性を評価した結果、destruxin E はエポキシドのエピマーに比べ四倍強い活性を示したことから、エポキシドの立体化学が活性に重要な役割をしており、エポキシドの立体化学が (S)である天然物の方が高い活性をもつことを明らかにした。また、固相合成を利用していることから誘導体のライブラリー構築も容易な合成手法を確立した[Org. Lett. 2010, 12, 3792]。

天然物チームで、抗インフルエンザ活性をもつ新規構造天然物として同定された JBIR68 および JBIR56 の化学合成を行い、その構造を決定した。これまでにない大変ユニークな化学構造であり、これらの新規骨格構造から新たな化合物群を合成することが可能である。

インフルエンザウィルスの RNA ポリメラーゼ PA/PB1 複合体の相互作用阻害剤として提唱された化合物について、cDNA チーム、蛍光チーム、天然物チーム、インシリコチームが協力して mKG、蛍光偏向法、PA 凝集アッセイ、および GST プルダウンアッセイが行われた。その結果、二つの有力な化合物が見出された。そこで、両者で重要な置換基  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$  を併せもつ新規化合物 FC を設計した。計六段階で三つの異なる置換基を導入できる FC 誘導体の合成法を確立した。まず八個の化合物 FC01-FC08 を合成し、蛍光偏向法による評価を行ったところ、FC05 においてこれまでの化合物を上回る阻害活性( $IC_{50}$ , 20  $\mu$ M)を示す結果が得られた。現在、抗インフルエンザ薬として重要となるブランクアッセイの評価結果を待っている。それらの結果をもとに FC が抗インフルエンザ薬のリード化合物として適しているかどうかを判断した後、コンビナトリアルライブラリーの構築による構造最適化を図ることが可能である。

ネットワークチームにより見出された LC3/p62 の相互作用について、インシリコチームで解析した結果、重要とされる七残基ペプチドフラグメントが見出された。そこで構造活性相関を明らかにするため 81 種のペプチドライブラリーを固相法を用いてコンビナトリアル合成した。mKG 法による評価(天然物チーム)を指標に構造活性相関をとった(インシリコチーム)。その結果、重要な三つの残基の組み合わせが明らかになり、この結果はインシリコのドッキングモデルともよく一致した。一方、細胞レベルの評価では、本化合物添加時に有意な差がみられないとの結果が得られた(ネットワークチーム)ので、これ以上の構造最適化は行っていない。

さらに、天然物チームおよびネットワークチームと共同で、未知の標的タンパク質に作用する生物活性化合物について分子プローブを合成して、相互作用するタンパク質複合体のネットワーク解析を行う技術を確立した。まず標的タンパク質が既知の HDAC 阻害剤を数種類用いて HDAC 関連タンパク質が同定できることを明らかにした。次に、標的タンパク質が未知で強い抗腫瘍活性をもつ apratoxin A について 59 種類の関連タンパク質のプルダウンに成功し、これまで他の研究者により提唱されている機構とは全く異なる作用機構を見出した。分子プローブを自在に合成してタンパク質複合体のネットワーク解析を高速に行えるのは世界でもこの研究チーム体制のみである。本技術を用いて課題解決型参画グループにおいて独自の生物活性分子についても分子プローブ合成を経た標的タンパク質の解析を多数行っており、本手法が実践的なレベルに達していることを示している。



## 5. ケモバイオインフォマティクス技術の効率化(インシリコチーム)

### <③タンパク質相互作用予測技術の開発>

実施体制:JBIC 分室 8(JBIC、大鵬薬品工業、興和)

共同研究:産業技術総合研究所、大阪府立大学

バイオインフォマティクスやケモインフォマティクス技術による実験の効率化、モデル化は、創薬研究において不可欠なものとなっている。本テーマは、ネットワーク解析から得られたタンパク質相互作用ペアの情報を受け、立体構造予測技術による、より高次の相互作用様式を予測し、相互作用情報の検証チームへのフィードバックや疾患メカニズムの解明への支援を行うことを目的としている(インシリコチーム)。さらに高次の相互作用様式の情報、探索された天然化合物の結合様式のモデル化や合成過程の合理化、インシリコスクリーニングとの組み合わせによる探索化合物ライブラリの絞り込みへ提供するなど、化合物探索チームと高機能化チーム間の橋渡しの役割も担っている(図 5-1)。このように本テーマで開発される予測技術やタンパク質相互作用を標的とした化合物探索のプロトコルは、チーム間また研究課題間で横断的に支援するものとなっており、そのための大規模な計算は、超並列計算機環境によって行われている。

インシリコチームでは、大きく、「ケモバイオインフォマティクス技術の効率化」(第 1 章)と「基盤技術の応用と評価研究」(第 2 章)における個々の研究課題を支援している。我々は、前者について、技術開発項目として①標的タンパク質の立体構造構築システムの開発と解析、②タンパク質-タンパク質ドッキング計算システムの開発と解析、③化合物 in silico スクリーニングのためインフラストラクチャ構築、また効率化の検証として、①標的タンパク質間相互作用様式に基づく相互作用制御化合物のインシリコスクリーニング、②特定標的疾患解析の実施(企業解決型)を実施した。

タンパク質立体構造構築やタンパク質-タンパク質ドッキングシミュレーション、インシリコスクリーニングは、個々の技術はある程度成熟しているものの、従来の技術を単に統合するだけでは、タンパク質間相互作用制御化合物のインシリコスクリーニングを効率化にすることは困難である。本課題では、並列化や実験情報の活用を考慮することにより、タンパク質間相互作用制御化合物のインシリコスクリーニングを目的とした、ケモバイオインフォマティクス技術の効率化を行った。また、いくつかの解析事例や企業解決型研究において実際にヒット化合物を同定されたことから、化合物探索過程において本取り組みが十分に活用できたことが検証された。

解析事例の一つとして、タンパク質ネットワーク解析チームより同定された癌に関するタンパク質相互作用情報に基づいて複合体のモデル構造を予測し、化合物を ERK に結合させ DHPS との相互作用を制御する戦略でインシリコスクリーニングを実施した。インシリコスクリーニングした化合物は、約 300 万品目で、その中で結合エネルギーが強いと予想された 89 品目を実際に購入し相互作用ネットワークチームおよび天然物スクリーニングチームと連携してアッセイ系( $\alpha$ スクリーニング、IP-Western)による評価を行った。その結果、複合体阻害活性を持つ 5 品目が同定された。これはインシリコスクリーニングのヒット率が 5.6%(5/89)であることを示すもので、一般のインシリコスクリーニングのヒット率が 1%であることから十分な成果が得られたといえる。さらに計算機による解析からタンパク質に対する 5 化合物の結合様式には共通性があることがわかり、共通性を生かしたりード化合物への発展性が示唆された。また本成果では、相互作用表面情報に加え、その周辺の化合物結合可能なポケットに注目してインシリコスクリーニングを実施したことも特徴の一つである(図 5-2)。実際に、化合物 NI00456869 は、構造の一部を利用して「いかり」を下ろすよう

にポケット領域に結合し、それ以外の構造で広く相互作用表面を覆う上体の結合様式であることが予測された。このような解析事例を通じたタンパク質-タンパク質相互作用様式と化合物結合の作用機序に関する知見の蓄積は、今後のタンパク質間相互作用制御化合物探索の戦略として非常に有用である(第2章5参照)。

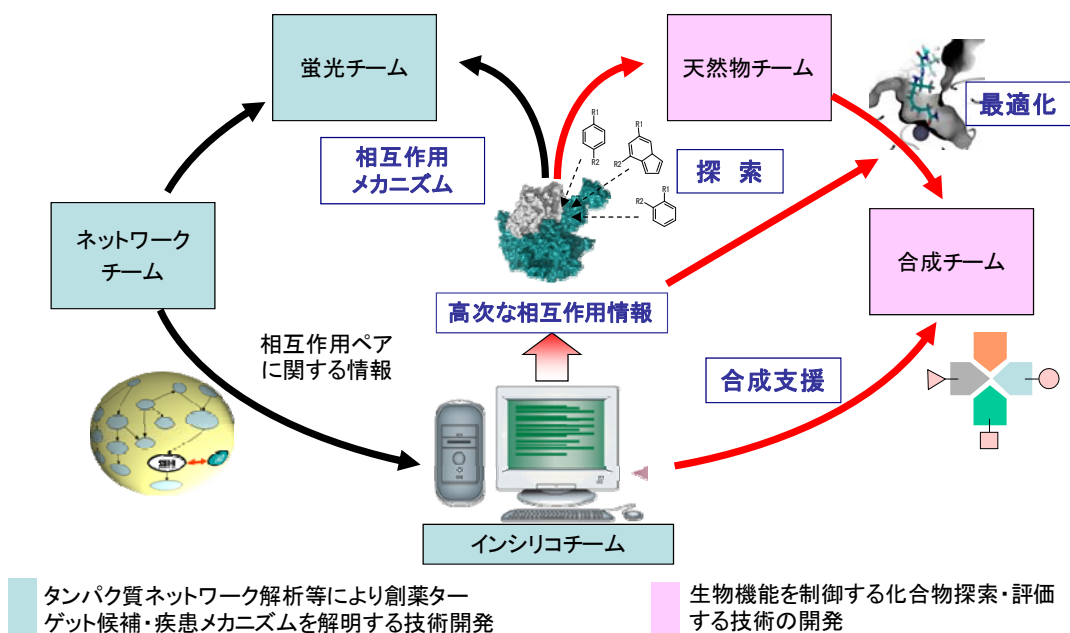


図 5-1 プロジェクトにおけるインシリコチームの役割

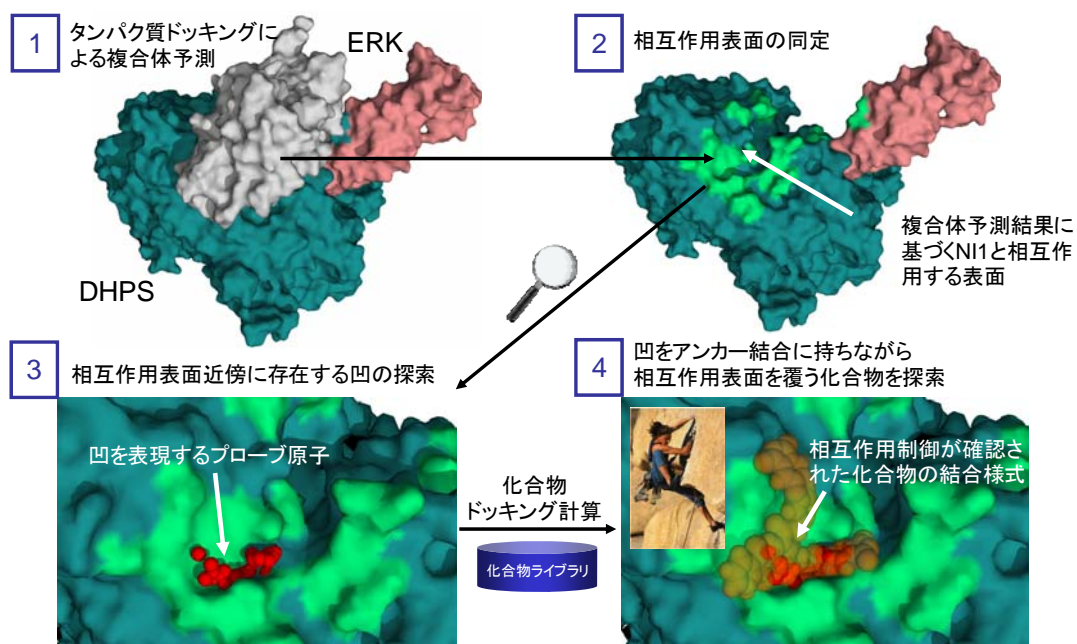


図 5-2 タンパク質間(DHPS-ERK)相互作用予測とスクリーニングの手順

## 6. 創薬開発を加速するタンパク質発現リソースとタンパク質発現の活用(cDNA リソースチーム) ＜②タンパク質相互作用情報の検証技術の開発＞

実施体制:JBIC 分室 4(JBIC)、JBIC 分室5(プロテイン・エクスプレス)、JBIC 分室6(JBIC)、JBIC 分室7(ジーンフロンティア)、JBIC 分室 13(JBIC)

共同研究:産業技術総合研究所、大阪大学微生物病研究所

### 6.1 はじめに

創薬開発においてターゲットタンパク質の特定、検証を迅速に行う上でヒトタンパク質発現リソースの供給は極めて重要である。また、スクリーニング系を構築するためにも、様々なタグを融合したタンパク質の供給は創薬開発を加速させる重要な基盤技術である。

例えば、「タンパク質ネットワーク解析」で創薬ターゲットとなる新規タンパク質相互作用を発見する場合、ベイトタンパク質の発現系は勿論のこと、相互作用タンパク質の検証のために様々なタンパク質発現系を迅速に用意する必要がある。このターゲットをもとにタンパク質相互作用阻害物質をスクリーニングする際に、スクリーニング系構築のためのインビトロメモリーダイ系等のタンパク質供給を行い、実際に大規模スクリーニングを行なう場合には大量のスクリーニング用タンパク質を安定に供給することが重要である。また、タンパク質の細胞内局在を可視化し、タンパク質局在を指標にしてスクリーニング系を構築する場合、蛍光タンパク質等を融合させたタンパク質発現系の構築を行わなければならない。こうしたことを可能にするため、ヒトタンパク質発現リソースの充実化、維持困難クローンのクローニング技術の確立、発現タンパク質の質的向上、相互作用トポロジーを考慮した発現クローンの作製を行わなければならない。これまでのプロジェクトで構築した世界最大規模のヒト完全長 cDNA ライブラリー(Gateway エントリークローン)を活用し、こうした問題を解決するために以下の項で述べる技術開発を行い、実用レベルの基盤構築を行った。

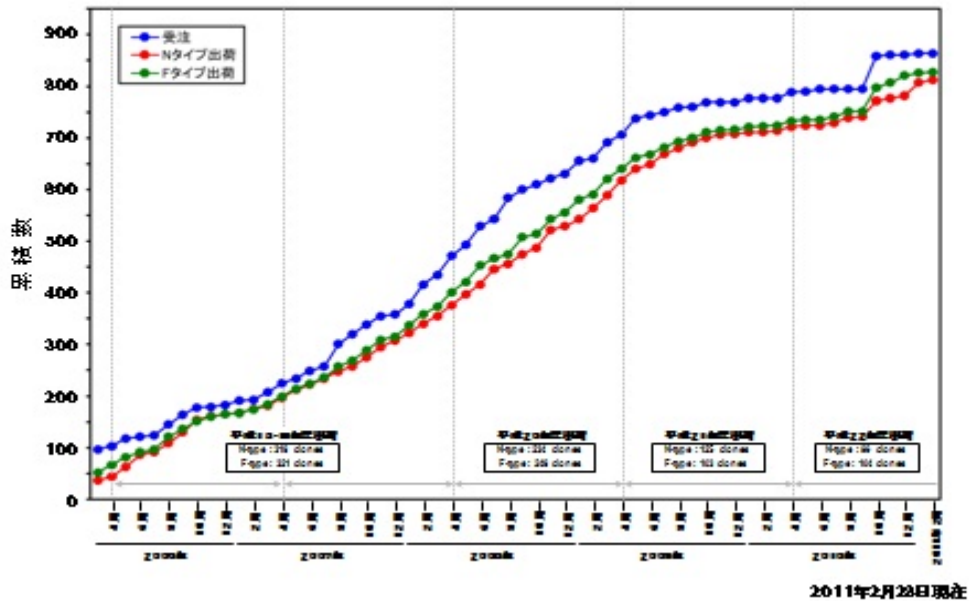
#### 6.2.1 Gateway エントリークローンおよび発現タンパク質の供給

##### 1) Gateway エントリークローンおよび変異エントリークローンの作製

タンパク質相互作用の探索および検証のためのクローン供給はcDNAリソースチームがNEDOプロジェクトで構築してきた世界最大規模のヒト完全長 cDNA ライブラリーを活用し、ネイティブクローンだけではなく、相互作用トポロジーの決定(タンパク質のどの部分とどの部分が結合するか)、ターゲット部位(相互作用機能部位)の特定のための変異クローン、ドメイン化クローンも必要とし、このようなヒトタンパク質発現リソースの供給をあらゆる遺伝子に対して迅速に行った(供給目標クローン数(880):H18:200 クローン、H19:140 クローン、H20:140 クローン以上、H21:300 クローン、H22:100 クローン)。これまでに各チームに作製、供給したヒト遺伝子リソースは、NタイプとFタイプを合わせて約 1,600 クローンに達しており、目標クローン数を大幅に上まっている(図 6.2.1-1)。

図 6. 2. 1-1

エントリークローン出荷状況



クローン供給の内訳は以下のとおりである。

- ネットワークチーム: 1,640 クローン
- 東京大学・菅チーム: 35 クローン
- スクリーニングチーム: 6 クローン
- スクリーニングチーム(酵母・吉田チーム): 10,000 クローン
- スクリーニングチーム(酵母・水上チーム): 10,000 クローン

また、第1章2.「タンパク質間相互作用の可視化と統一的なスクリーニング系の構築」で記述している *in vitro* メモリーダイ法によるタンパク質相互作用検証のハイスループットタンパク質合成、スクリーニングに用いる大量タンパク質供給を行なった。

*in vitro* メモリーダイ法によるタンパク質相互作用検証のために、436 種の *in vitro* メモリーダイタンパク質をイメージングチームに供給した。

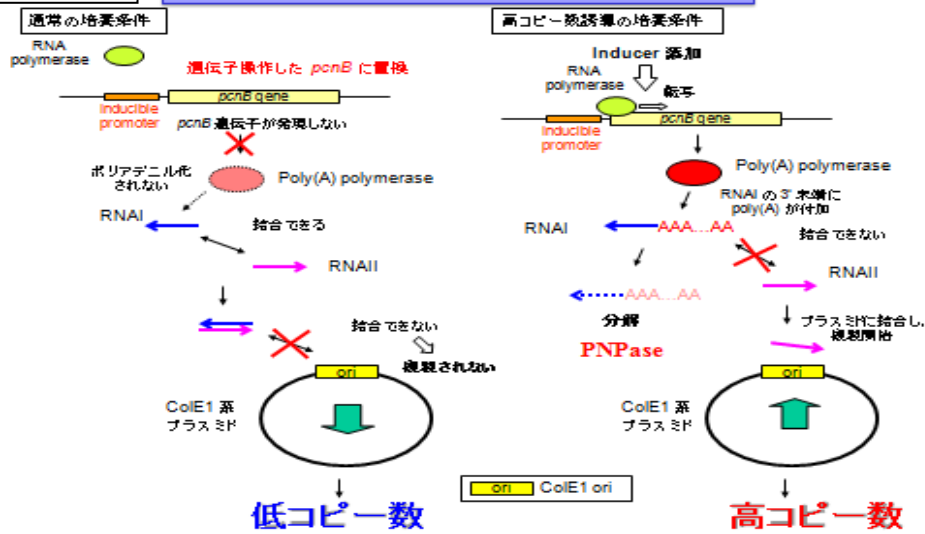
タンパク質相互作用検証によって、相互作用が可視化可能であり、大規模スクリーニング系が可能になった 15 系統のスクリーニング系に対して、30 種類の大量 *in vitro* メモリーダイタンパク質の供給を行ない、約 10 万~30 万化合物スクリーニングを成功させた。

## 6.2.2 クローンの安定保持技術の開発

タンパク質相互作用を検証する上で必要なエントリークローンが、大腸菌クローンとして維持困難なクローンに対しては、プラスミドコピー数をコントロール可能な宿主大腸菌を使用することで対応する技術開発を行った。

図 6.2.2-1

大腸菌株での ColE1 系プラスミドのコピー数の調節



本研究では、大腸菌内のプラスミドコピー数に着目し、プラスミド低コピー数大腸菌株を用いたエントリークローン化の有効性を検討した(図 1.6.2.2-1)。従来、エントリークローン作製が困難であった遺伝子について、プラスミド低コピー数大腸菌株に BP 反応産物を導入したところ、目的のエントリークローンを取得することができた。また、グリセロールストックでは安定に維持することが困難であった遺伝子についても、プラスミド低コピー数大腸菌株の効果が確認された(表 6.2.2-1)。

プラスミド低コピー数大腸菌株を用いて取得したエントリークローン

表 6.2.2-1

Native type: 8  
Fusion type: 9  
(シーケンス解析の結果、採用になったもの)

\* プラスミド低コピー数大腸菌株  
CopyCutter™ EPI400™ Chemically Competent *E. coli*  
(EPICENTRE® Biotechnologies)

作製の際に振った通し番号	#	FLJ No.	Gene name	Native type	Fusion type
	851	FLJ04022	drosha, ribonuclease type III	-	○
	853	FLJ04024 (S)*	nuclear receptor binding SET domain protein 1	○**	×
	1042	FLJ04064 (A)	ubiquitin specific peptidase 9, X-linked	×	○
	1118	FLJ60364	elongation protein 2 homolog (S. cerevisiae)	○	○
	1241	FLJ39837	zinc finger protein 614	○**	○
	1379	FLJ04139	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3	○	○
	1430	FLJ78424	ubiquitination factor E4B (UFD2 homolog, yeast)	-	○
	1468	FLJ61100	mitochondrial ribosomal protein L45	○	○
	1530	FLJ04174	drosha, ribonuclease type III	○	○
	1543	FLJ83644	myosin XVIIIa	○	-
	1597	FLJ75855	ClpX caseinolytic peptidase X homolog (E. coli)	○	○
	Total (○)			8	9

○: CopyCutter™ 株で取得できたもの  
×: CopyCutter™ 株でも取得できていないもの  
-: 通常作製 (DH5α 株) で取得できているもの

\* FLJ04024(A) の Native type は通常作製 (DH5α 株) で取得 (Fusion type は未取得)  
\*\* SD-less にすると DH5α 株で取得可能

プロモーターを含んでいないエントリークローンでも attL1 配列がプロモーターとして機能することで、タンパク質が発現していた。また、このタンパク質発現は大腸菌内のプラスミドコピー数と相関関係にあることも示された。

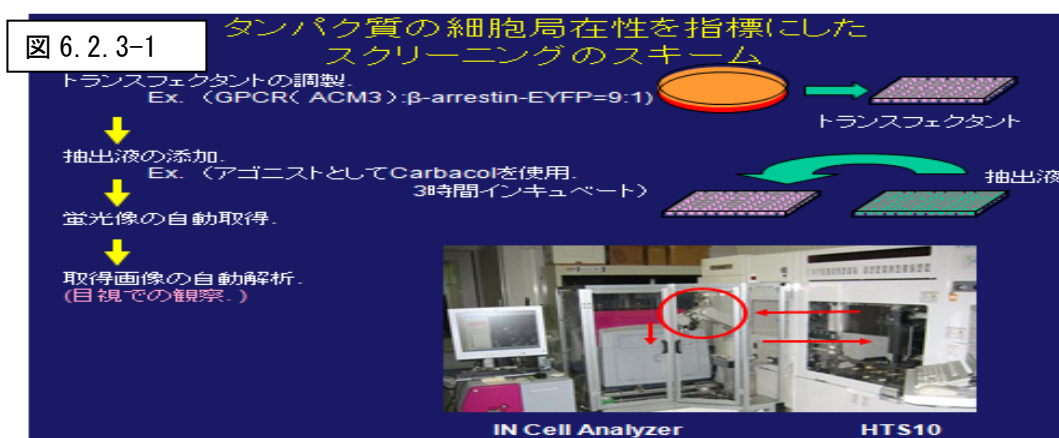
プラスミド低コピー数大腸菌株を用いることで、これまでエントリークローン化やその維持が困難であった遺伝子をエントリークローンとして安定に維持することが可能となった。

これらの結果から、attL1 配列がプロモーターとして機能し発現したタンパク質が原因となって、エントリークローン化を困難にしており、プラスミド低コピー数大腸菌株で発現するタンパク質を低下させることによって、安定的な取得・維持が可能であることが示された。

プラスミド低コピー数大腸菌株の利用はベクターの種類を変えることなくクローニングすることが可能であり、これにより不安定クローンは既已取得しているクローンと同質の遺伝子資源として取り扱うことができることから、非常に有効な方法であることが示唆された。

### 6.2.3 タンパク質細胞内局在を指標にしたスクリーニング系

ヒトタンパク質のN末またはC末に蛍光タンパク質を融合させて細胞内で発現させ、タンパク質の局在を 96 ウェルプレートを用いてハイスループットに測定するシステムを構築している(図 6.2.3-1)。このシステムを用いてタンパク質の細胞内局在を指標にして、創薬スクリーニングを構築した。



$\beta$ -arrestin は細胞膜に会合して受容体の脱感作およびエンドサイトーシスを促進することにより GPCR シグナル伝達を終結させる機能を有するタンパク質としてよく知られているが、さまざまな細胞シグナル伝達経路における足場タンパク質としての機能を持つことも明らかになっている。特に、 $\beta$ -arrestin2 の核-細胞質間のシャトルは、Mdm2 や JNK3 などの細胞質への Relocalization に密接に関連していることが報告されている。そこで、我々は放線菌やカビの抽出液を用いて、 $\beta$ -arrestin2 の核-細胞質間のシャトルを阻害する化合物の探索をおこなった。最初に、 $\beta$ -arrestin2 の核外移行阻害をモニターするために  $\beta$ -arrestin2 をコードする配列の 3' 端に蛍光タンパク質である EYFP を連結し、融合タンパク質として発現するベクターを構築した。次に、このベクターを HeLa 細胞に導入し、 $\beta$ -arrestin2-EYFP タンパク質を一過性に発現させ、 $\beta$ -arrestin2 の核外移行阻害を示す化合物を約 1 万種類の菌体抽出液を用いてスクリーニングをおこなった。その結果、放線菌由来の抽出液から  $\beta$ -arrestin2 の核外移行を阻害する新規化合物 (JBIR-02、新規 piericidin)を得ることができた。本研究では、新規化合物およびその類似構造体を用いた  $\beta$ -arrestin2 の核外移行阻害活性の比較を行なった。

天然化合物(約 11000 種の放線菌およびカビ抽出液)のスクリーニングを行い、タンパク質の核外移行阻害活性物質を 2 種類(新規化合物 1 種を含む)、ミトコンドリア特異的結合をする蛍光物質 2 種、細胞の形態変化を誘発する物質 1 種をスクリーニングし、構造を決定した(J. Antibiot., 60(7), 459, 2007)。GPCR のアンタゴニスト、アゴニストのスクリーニング、抗癌剤によって生じる DNA 損傷由来の foci 形成を指標にした生理活性物質のスクリーニング、DNA 相同組み換え阻害剤のスクリーニング、染色体分配の M 期停止を誘導する化合物、2 核化を引き起こす化合物などのスクリーニングも行った。

(平成 18-19 年度実施)



## 第2章 基盤技術の応用と評価研究

本研究開発においては、各チームが目標とした基盤技術を個別に検証するだけでなく、チーム間の連携を通して、プロジェクトのメインテーマである、「低分子化合物でタンパク質間相互作用を制御する」こと、と「天然物の新世代高度化」という戦略について取り組み、基盤技術の応用と評価研究とした。

### 1. タンパク質間相互作用を阻害する化合物の創製

タンパク質間相互作用界面を制御する化合物を見いだすため、より広いケミカルスペースを有する天然物ライブラリからヒットを得て、インシリコのシミュレーションを橋渡しとし、ヒット化合物の合成展開から高度化するという戦略の可能性を示すことが本研究の目的である。具体的には、プロテアソームのアッセンブル因子である PAC3 の相互作用と、コラーゲン特異的シャペロン HSP47 の相互作用を制御する化合物の創製を目指した。

## 1.1 プロテアソームアッセンブル因子 PAC3 相互作用阻害化合物の創製

実施体制: JBIC 分室 1 (JBIC)、JBIC 分室 4 (JBIC)、JBIC 分室 15 (JBIC)、JBIC 分室 16 (JBIC)

共同研究: 産業技術総合研究所、臨床医学総合研究所、東北大学

### 1.1.1 背景

プロテアソームは、60 以上のサブユニットからなる巨大なタンパク質複合体である。ユビキチン化されたタンパク質を分解することにより、細胞機能において様々な重要な機能を有する。当プロジェクトのネットワークチームにより、複合体形成に必須な、プロテアソームアッセンブリー因子を発見した。また、癌細胞はプロテアソームに対する依存度が高いため、これらのアッセンブリー因子の機能阻害が細胞死を引き起こすが、正常細胞では観察されない。そのため、これらの因子群は新規な癌創薬ターゲットと判断される。また、これまでターゲットとして盛んにスクリーニングが行われてきた、タンパク質リン酸化酵素等と異なり、「タンパク質間相互作用」のみしかスクリーニングの指標にならない。したがって、本プロジェクトの「化合物でタンパク質相互作用界面を制御する」というコンセプトの上からも、好適な評価研究対象であると考えられた。そこで、イメージングチームと cDNA リソースチームの共同で、プロテアソームアッセンブリー因子の一つである PAC3 の相互作用阻害剤の創出を目指すことにした。

### 1.1.2 PAC3/PAC3 相互作用阻害を指標とした天然物スクリーニング

PAC3 はホモダイマー形成する分子であり (PAC3/PAC3 相互作用)、これを *in vitro* メモリーダイ法で可視化し、スクリーニング系を構築した。

ヒトタンパク質発現リソース FLJ81734 (PAC3) を用い、PAC3 全長タンパク質の N 末端および C 末端に mKG2N および mKG2C を融合させた PAC3 メモリーダイタンパク質をコムギ無細胞系によって合成した結果、C-PAC3 と N-PAC3 の組み合わせが最も強い蛍光を検出し PAC3 ホモダイマー形成の可視化が可能であった。

*in vitro* メモリーダイ法ではターゲットタンパク質に結合させる mKG2N および mKG2C のタグ位置と融合タンパク質の組み合わせの最適化、タンパク質相互作用特異性のコンペティションアッセイによる検証が重要であることがわかる。本プロジェクトでは、あらゆるメモリーダイタンパク質をハイスループット合成し、すべての組み合わせを同時に比較検討するシステムが構築されており、様々なタンパク質相互作用の可視化に適応可能である。

*in vitro* メモリーダイ薬剤探索アッセイで膨大な天然物をスクリーニングするために、更なるアッセイ系の高効率化を行なった。384 ウェルプレートから 1536 ウェルプレートにスケールアップしスループットをあげると共に、アッセイに使用するコムギリコンビナントタンパク質量を 1 種あたり 10  $\mu$ l から 3  $\mu$ l にスケールダウンして経済性を向上させた。

構築したスクリーニング系に対して、天然物チームにより、151,498 サンプルを対象に天然物スクリーニングを展開した。

その結果、16 員環マクロライドと極めて近い類縁化合物 Thielocin B1 (TB1) をヒット化合物して得た (図 1.1.2-1)。



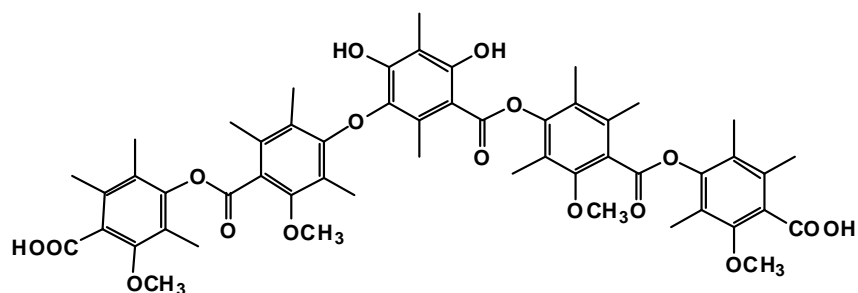


図1.1.2-1 Thielocin B1(TB1)

次に本化合物の細胞レベルでの活性を検討したところ、TB1により癌細胞中のプロテアソーム形成が阻害され、プロテアソーム活性も現弱することが示された。

### 1.1.3 PAC3/PAC3 相互作用阻害天然物チエロシン B1(TB1)全合成

本プロジェクトの目的である、タンパク質間相互作用界面を制御するメカニズムの解明とインシリコによるドッキングシミュレーションの検証や、構造活性相関の解析のためには、十分量の化合物が必要である。しかし、天然からの供給量は少なく、合成化学による供給が求められる。本化合物は、分子内に六置換ベンゼンの繰り返し構造を有しており、各芳香環はエステル結合あるいはエーテル結合によって連結されている。特に、エーテル結合部分は一般にその構築が困難とされる 2,2',6,6'-四置換ビアリールエーテル構造を有し、その特異かつ複雑な構造から全合成の報告例はない。

文献既知のレゾルシノール 2 に対し 18 工程を経て構築困難な 2,2',6,6'-四置換ビアリールエーテル構造を含む 3 の合成に成功した。続いて 2 から誘導した 4 と縮合した後に、立体的に混み入った位置にカルボキシル基を導入することで 6 を合成した。この合成は難関の一つであり、従来のホルミル化で用いられる Vilsmeier-Haack 反応などではホルミル化は進行しなかった。種々条件検討することにより新しいホルミル化条件を見だし、この問題を解決することができた。最後に、6 と 7 の縮合、続いてフェノールの脱保護を行い、TB1 (1) の世界初の全合成を達成した(図 1.1.3-1)。本手法により TB1 を数十 mg 合成し手にしている。合成した TB1 (1) を用いて PAC3/PAC3 阻害活性を評価したところ IC<sub>50</sub> 40 nM であり、天然物と同等の活性が認められた。

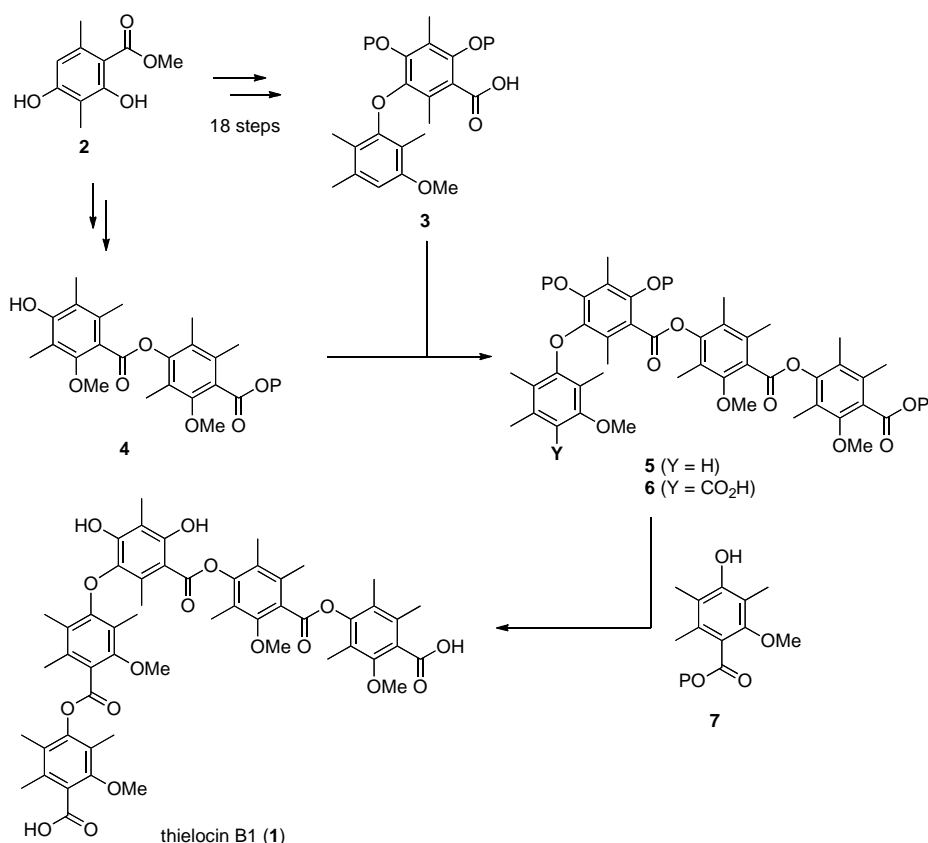


図 1.1.3-1 Thielocin B1 の全合成

#### 1.1.4 PAC3/PAC3 相互作用阻害化合物 TB1 の作用機序解析

##### a) インシリコシミュレーションによる構造活性相関の推測

今回、PAC3/PAC3 相互作用阻として得た TB1 に類似した、多置換ベンゼン骨格が縮合した構造からなる誘導体化合物 thielocin A1 (TA1) が知られている (図 1.1.4-1)。TA1 の PAC3/PAC3 相互作用阻害活性を評価したところ、250・M でもまったく活性を示さなかった。

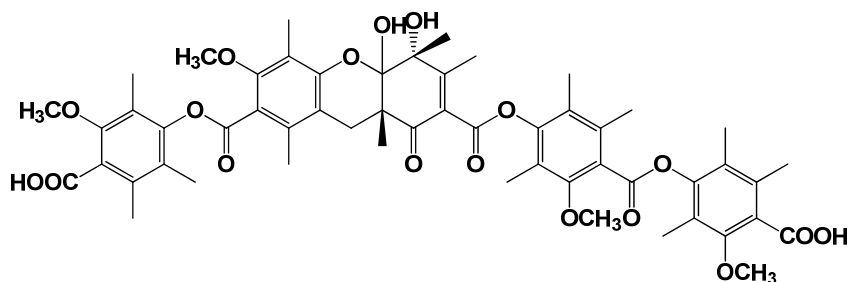


図1.1.4-1 Thielocin A1

そこで、まず、PAC3 は X 線構造が明らかになっているため、インシリコチームにより、TB1 の PAC3 への結合状態と TB1 活性構造を推定し、構造活性相関を検証するための、論理的な合成展開を支援することを目指し、ドッキングシミュレーションを行うとともに、活性を持たない TA1 との比較を行った。その結果、これまででない新しい化合物タンパク質相互作用のモデルと、詳細な阻害メカニズムが明らかとなった。これらの知見を検証するため、合成チームによる誘導体展開を行った。

## b) 誘導体合成展開

以上の結果から、タンパク質間相互作用を阻害する化合物を効率よく見つけるためには天然物の広いケミカルスペースとインシリコシミュレーションを効率よく組み合わせることが重要と考えられる。そこでインシリコチームのシミュレーションで得られた知見を検証するため、天然物の構造をモチーフにコア部を替えた誘導体を合成した(図 1.1.4-2)。誘導体において両末端のカルボン酸は活性発現に必須であり、TB007 のような小さいユニットでは活性がないことがわかった。この結果はインシリコチームのシミュレーション解析結果とよく一致する。コア部位の構造を替えると弱いながら阻害活性はあるものの、PAC3/PAC3 以外のタンパク質相互作用にも阻害作用もあることがわかった。例えば TB014 について顕著であり、TB1 のエーテル連結部をエステルに替えただけで阻害活性が 10 分の1以下になり、選択性も劣ることがわかった。またメチル基の効果も大きく、コア部位のメチル基を無くすと PAC3/PAC3 の阻害活性は十分にありますが、選択性は大きく低下した。これらの結果から、天然物 TB1 の分子の形がまさに PAC3/PAC3 の相互作用阻害にぴったりフィットすることを示している。現在、岡崎統合バイオサイエンスセンター、加藤晃一教授と共同で NMR による PAC3 と TB1 (1) の相互作用解析を行っており、タンパク質間相互作用の阻害剤開発のモデルとして有益な情報を得ている。

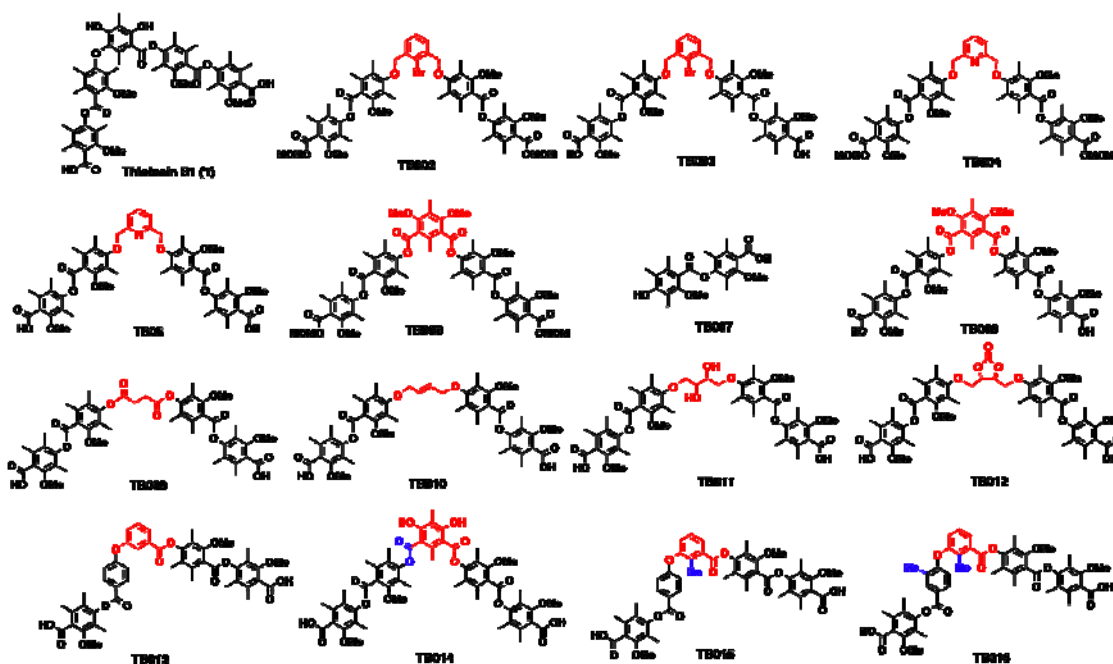


図 1.1.4-2 TB1 の誘導体合成

## 1.1.5 結論

PAC3/PAC3 のタンパク質相互作用を特異的に阻害する thielocin B1 (TB1, 1) の全合成を達成した。TB1 の誘導体を合成し、構造活性相関を明らかにしたところ、コア部のビフェニルエーテル結合が分子の形を決めており、また多くのメチル基も疎水性相互作用により、PAC3/PAC3 相互作用の選択的阻害に非常に重要な役割を果たしており、天然物 TB1 の分子の形がまさにぴったりフィットするという結果を得た。NMR による PAC3 と TB1 (1) の相互作用解析により、PAC3/PAC3 が結合した二量体に直接 TB1 が働きかけて、その結合を阻害するという極めて珍しい相互作用阻

害モデルを提唱し、タンパク質間相互作用の阻害剤の分子設計において新たな知見を見出している。

曲率構造をもたない TB1 との類似化合物は、実際に PAC3 の阻害効果を持たないことが実験により確認された。従来のタンパク質と化合物の結合は、「鍵と鍵穴」モデルに基づくものがほとんどであったが、今回の事例のように、タンパク質の活性部位が鍵穴構造を持たない場合でも、多様な立体構造を持つ天然物は、結合を可能にすることが示唆され、タンパク質間相互作用阻害で問題となる、相互作用面を狙った化合物探索へ新しい可能性を見出した。

## 1.2 HSP47-コラーゲン相互作用阻害化合物の創製

実施体制: JBIC 分室 4 (JBIC)、JBIC 分室 15 (JBIC)、JBIC 分室 16 (JBIC)

共同研究: 産業技術総合研究所、京都大学

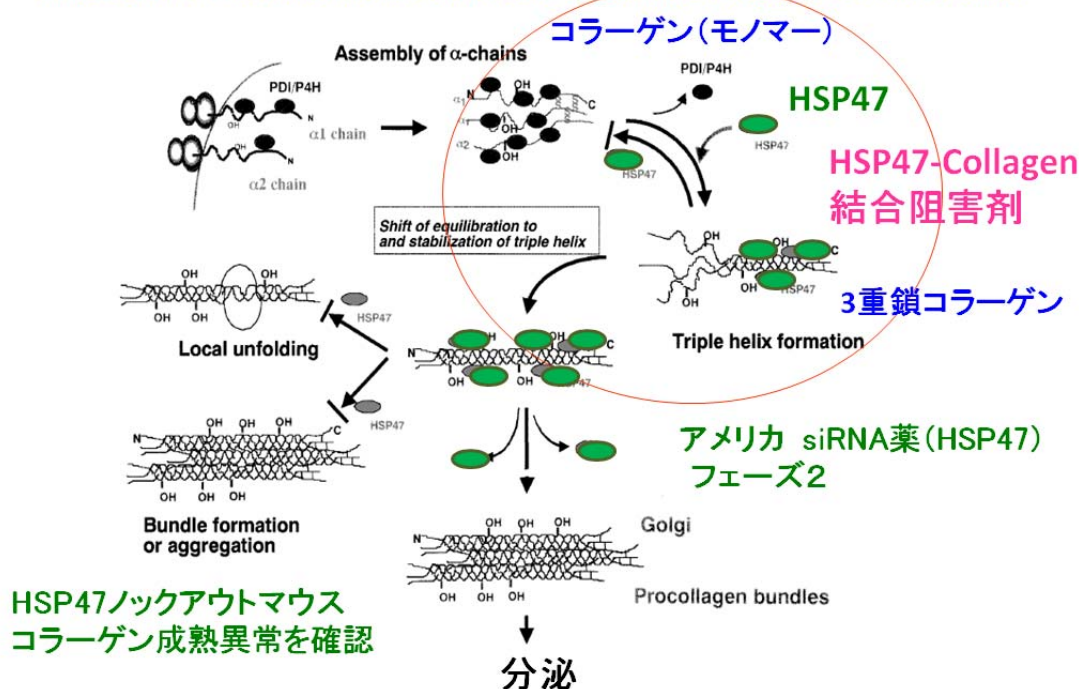
### 1.2.1 背景

肝硬変、肺や腎の繊維化、動脈硬化、ケロイドなど、繊維化疾患の治療薬の開発は、極めて社会的ニーズが高く、その開発は重要な課題である。繊維化疾患は、過度のコラーゲンの細胞外分泌、沈着によって引き起こされる。このコラーゲンの産生は、細胞内で $\alpha$ 鎖コラーゲン(モノマー)のプロリンのヒドロキシル化がおこり、続いてHSP47がコラーゲンの三重鎖構造を形成し、細胞外に分泌される経路をとる(図 1.2.1-1)。本経路は HSP47 ノックアウトマウスによる解析により、コラーゲン成熟異常が認められていることから支持されている。創薬では、アメリカで HSP47 の siRNA 薬がフェーズ2まで進んでいるが、化合物開発の成功例は無い。本研究開発では、コラーゲンと HSP47 の結合阻害剤スクリーニングを行ない、繊維化疾患の治療薬に繋がる化合物の取得を目的とする。

図 1.2.1-1

## コラーゲン特異的シャペロンHSP47 と繊維化疾患治療薬の開発

肝硬変、肺や腎の繊維化疾患、動脈硬化、ケロイドなどの治療薬として需要は高い

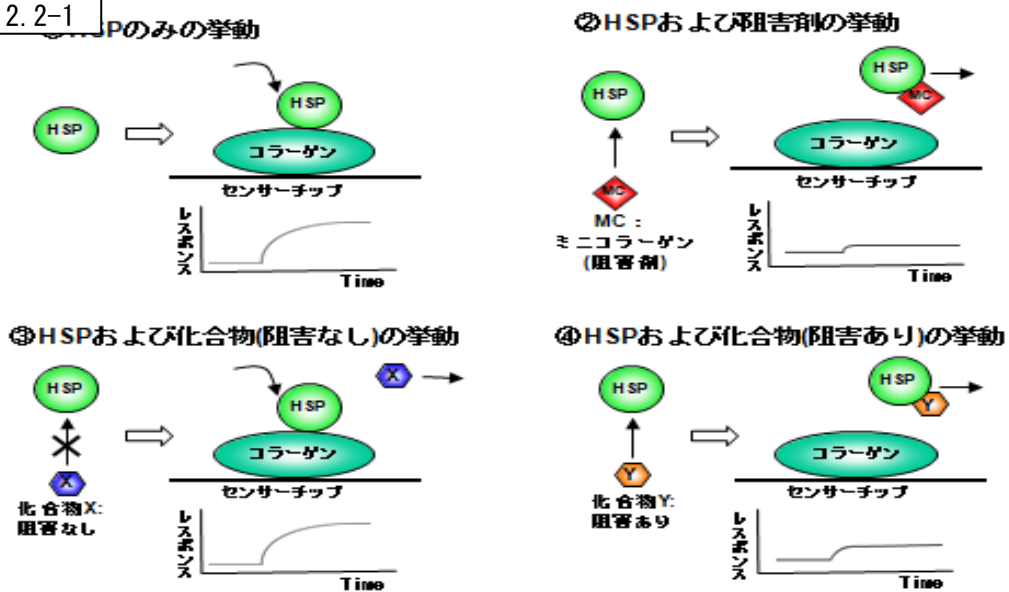


### 1.2.2 1次スクリーニング

コラーゲンは水溶液系では難溶であるため in vitro メモリーダイ法等によるスクリーニング系の開発が困難である。そこでコラーゲンとHSP47の相互作用をSPR装置(ピアコア A100)で検出し、リサイクル系を導入することでハイスループットスクリーニング系を確立した。SPR センサーチップ上にアミンカップリング法で固定化したコラーゲンに対して、化合物とプレインキュベーションしたHSP47を流し、コラーゲンへの結合量を測定し、HSP47-コラーゲン相互作用阻害率を計算し、こ

れを指標に化合物スクリーニングを行った(図 1.2.2-1)。

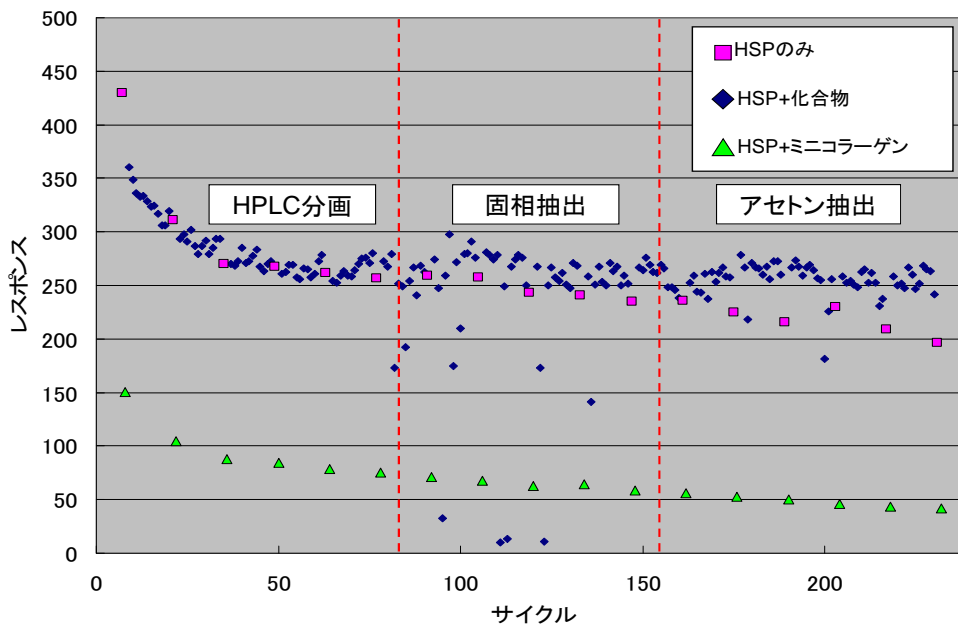
図 1.2.2-1



1回目の相互作用を測定した後、10mM 塩酸溶液を短時間流してセンサーチップを再生し、繰り返し測定を可能にした。本スクリーニング系のスループットは、1000 アッセイ/日であった。

図 1.2.2-2

### HPS47 - Collagen結合阻害剤のスクリーニング



一定のインターバルでポジティブコントロールとして HSP47 のみ、ネガティブコントロールとして HSP47+ミニコラーゲンを流し、センサーチップの感度チェックを行いながら、サイクル系を組んで化合物スクリーニングを行った(図 1.2.2-2)。「HSP のみ」の測定スポットよりも下に位置する「HSP+化合物」のスポットは、化合物が阻害活性を有すると考えられる。

HSP47-コラーゲン相互作用阻害物質の1次スクリーニングは、表 1.2.2-1 に示すように天然化合

物抽出物 42,320 種類(天然物チームより供給)、合成化合物 10,240 種類(市販)に対して実施した。1次スクリーニングでのヒット率は、天然化合物で 0.36%、合成化合物で 0.22%であった。

表 1.2.2-1

・HSP47⇔Collagen相互作用 阻害物質 一次スクリーニング結果

		1次スクリーニング 実施数	一次スクリーニング ヒット数(京大へ)	1次スクリーニング ヒット率
天然化合物	放線菌由来 固相抽出物	4,800	24	0.50%
	放線菌・細菌由来 アセトン抽出物	28,640	72	0.25%
	カビ由来 固相・アセトン抽出物	8,240	53	0.64%
	単離化合物	640	4	0.63%
	合計	42,320	153	0.36%
合成化合物		10,240	23	0.22%
総合計		52,560	176	0.33%

1.2.3 2次スクリーニング

SPR 装置(ピアコア A100)によって1次スクリーニングを行ない、活性のあった天然化合物および合成化合物を細胞系を用いた2次スクリーニングによって更に絞り込んだ。培養細胞から分泌、沈着したコラーゲンの分泌量を Serius Red 染色法によって定量化し、化合物によるコラーゲン分泌阻害を評価した(表 1.2.3-1)。同時に細胞毒性も合わせて測定し、化合物評価を行なった。2次スクリーニングのヒット率は、1次スクリーニングのヒット化合物数に対して天然化合物では 16.34%、合成化合物では 17.39%であった。

表 1.2.3-1

・HSP47⇔Collagen相互作用 阻害物質 二次スクリーニング結果

		2次スクリーニング 実施数	2次スクリーニング ヒット数	2次スクリーニング ヒット率
天然化合物	放線菌由来 固相抽出物	24	2	8.33%
	放線菌・細菌由来 アセトン抽出物	72	11	15.28%
	カビ由来 固相・アセトン抽出物	53	10	18.87%
	単離化合物	4	2	50.00%
	合計	153	25	16.34%
合成化合物		23	4	17.39%
総合計		176	29	16.48%

天然化合物は再現培養、HPLC 分画精製等を経て活性画分の特定、構造決定を行なっている途中である。天然化合物のヒット化合物は比較的高分子で、同定が難航している。一方、合成化合物の中で2次スクリーニング(細胞アッセイ系)で阻害活性が認められた 4 種の化合物の中で、阻害活性が最も高かった化合物 AK-778 について詳細な解析をおこなった。AK-778 の物性を調べたところ水溶液中では非常に不安定で、Col-002 と Col-003 に分解することが判明した。これまで AK-778 が HSP47-コラーゲン相互作用阻害活性を持つと考えていたが、実際に活性を示すのは分解産物である可能性が出てきた。そこで Col-002 と Col-003 を合成チームで合成し、それぞれの化合物の相互作用阻害活性を調べた。

まず、1次スクリーニングで用いた SPR 法(ピアコア A100)による HSP47-コラーゲン相互作用阻

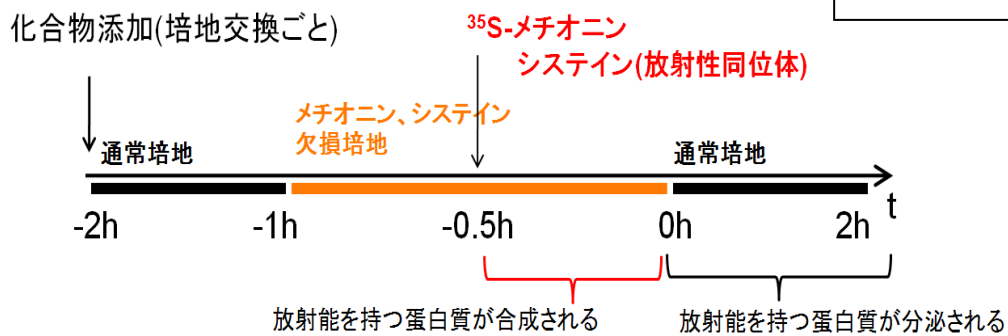


害アッセイ(インビトロ系)で解析を行なった。その結果、AK-778 で認められた HSP47-コラーゲン相互作用阻害活性は AK-778 分解産物の Col-003 であることが明らかになった。

また、細胞アッセイ系でも AK-778 分解産物の HSP47-コラーゲン相互作用阻害活性を調べた。細胞アッセイ系は(1)パルスチェイス法を用いたコラーゲン合成と分泌コラーゲンを測定する方法と(2)パルスチェイス後の培地中に正常な 3 重鎖コラーゲンが分泌されているかをトリプシン消化で調べる方法である。パルスチェイス法は <sup>35</sup>S ラベルしたメチオニンとシステインを培地中に添加し、コラーゲンに取り込まれる放射能を SDS-PAGE で分離後、オートラジオグラムで測定した(図 1.2.3-3)。

### ●コラーゲン分泌アッセイ(パルスチェイス法)

図 1.2.3-3

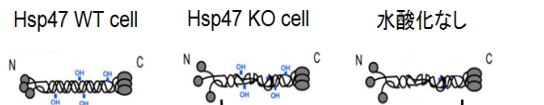


### ●トリプシン消化法

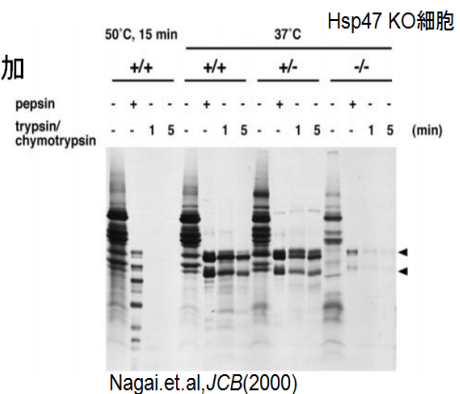
#### SDS-PAGEによるコラーゲンの分析

コラーゲンが正常な三重らせん構造を形成しているかを検出する方法

- パルスチェイス後の培地  
(分泌された<sup>35</sup>Sでラベルされたコラーゲンを含む)
- ・100 ug/ml trypsin and 250 ug/ml chymotrypsin を添加
  - ・インキュベート 1-5 min at 37 °C.
  - ・PMSFで反応を止め、TCA沈殿
  - ・SDS-PAGEした後、ゲルを乾燥させIPプレートで検出



正常な三重らせん構造を形成していないため  
トリプシンにより速やかに分解される



その結果、パルスチェイス2時間後の検出で、AK-778 (778、001)と Col-003 (003)を添加した細胞では細胞内コラーゲンの蓄積が認められ、コラーゲン分泌を阻害していることが確認された。一方、培地中には正常な 3 重鎖コラーゲンの分泌が認められなかった。このことから細胞アッセイ系でも Col-003 が HSP47-コラーゲン相互作用を阻害していることが予想された。この細胞アッセイ系の結果とピアコアによるインビトロ系の結果は完全に一致していた。

#### 1.2.4 化合物の合成展開と阻害活性

これまでの結果から、AK-778 の分解産物である Col-003 に HSP47-コラーゲン相互作用阻害



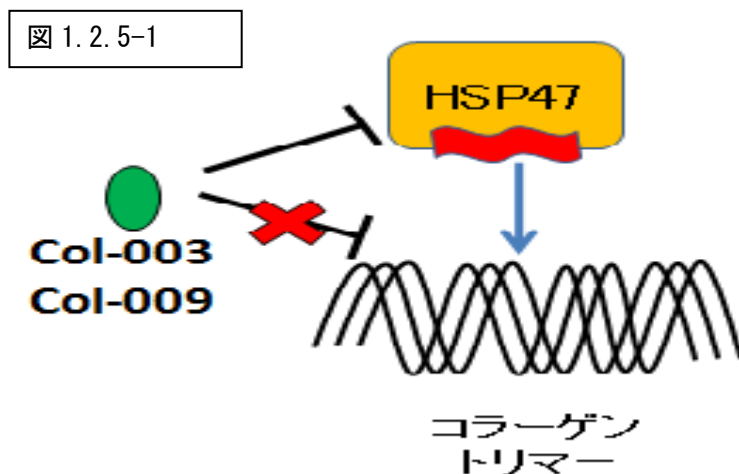
活性があることが明らかになった。そこで Col-003 の活性基の特定と更に活性の高い化合物の取得のために、合成チームによる Col-003 誘導体の合成展開を行った。Col-004 から Col-011 の 8 種類の誘導体を合成し、それぞれの化合物に対して HSP47-コラーゲン相互作用阻害活性を調べた。

ヒアコアでのインビトロ系アッセイの結果、8種類の誘導体の中で Col-003 以外に Col-009 に阻害活性が認められた。さらに、細胞を用いたインビボアッセイ系にを用いて、Col-004 から Col-011 の 8 種類の誘導体にたいして HSP47-コラーゲン相互作用阻害によって生じるコラーゲンの細胞内蓄積と細胞から培地へのコラーゲン分泌の阻害を調べた。その結果、Col-003 の他に Col-009 にも阻害活性が検出された。培養細胞におけるコラーゲン分泌を指標にした HSP47-コラーゲン複合体形成阻害活性は、ヒアコアで測定したインビトロの HSP47-コラーゲン相互作用阻害活性と完全に一致した結果となった。

### 1.2.5 HSP47-コラーゲン相互作用阻害化合物の作用メカニズムの解析

Col-003 および Col-009 は、HSP47 またはコラーゲンのいずれかに結合して、その相互作用を阻害するかを調べ、化合物の作用メカニズムの解明を行った。

Col-003 は濃度依存的に HSP47 に結合する結果が得られた。一方、Col-003 はコラーゲンに対しては全く結合しなかった(図 1.2.5-1)。同様の結果が Col-009 についても得られ、HSP47 にのみ結合し、コラーゲンには結合しなかった。



HSP47 と Col-003 および Col-009 の結合特性を評価する別のアプローチとして、コンペティション実験を行った。Col-003 及び Col-009 と HSP47 をプレインキュベーションする際に、コンペティターとして BSA および  $\beta$ -Gal ( $\beta$ -ガラクトシダーゼ)を添加して、各化合物と HSP47 の結合特性を調べた。Col-003 と HSP47 との結合は、コンペティターとして BSA を添加した場合、HSP47 の 10 倍量の BSA がコンペティターとして存在していても、HSP47 とコラーゲンは特異的に結合し、約 70%は結合阻害が検出された。BSA は比較的到低分子化合物と結合しやすい性質があるが、それでも HSP47 と Col-003 は高い特異性を示した。Col-009 についても同様の結果が得られた。コンペティターを  $\beta$ -ガラクトシダーゼ ( $\beta$ -Gal)とした場合には、HSP47 と Col-003 および Col-009 の

結合特異性は高く、HSP47に対してコンペティターが約100倍量存在していても80%以上の結合阻害が検出された。

さらに、Col-003 および Col-009 を細胞に添加した際、細胞からのコラーゲン分泌速度の定量的解析を行った。<sup>35</sup>S パルスチェイスした細胞ライセート中のコラーゲン量の経時的変化から、Col-003 と Col-009 はコラーゲンの細胞外分泌量を低下させていることが分かった。一方、細胞から培地中に分泌されるコラーゲン量を経時的に調べると、Mock に比べて Col-003 または Col-009 を細胞に添加した場合、コラーゲンの細胞外分泌量が低下していることが明らかになった。

さらに注目すべき点は、SDS-PAGE によるコラーゲンの分析で明らかのように、 $\alpha, \alpha$ -Dipyridyl、Col-003 および Col-009 を細胞に添加した場合、コラーゲンは Mock のコラーゲンの分子量よりも低分子側に遅れて電気泳動された。この現象は、 $\alpha, \alpha$ -Dipyridyl が典型例であるが、コラーゲンの水酸化が阻害された場合に観察される。このことから Col-003 と Col-009 は HSP47-コラーゲン相互作用阻害剤だけでなく、PDI/P4H によるコラーゲンの水酸化反応を阻害している可能性を示唆している。この現象は、PDI/P4H の酵素活性阻害あるいは PDI/P4H とコラーゲンモノマーとの相互作用阻害剤としても働いている可能性が示唆された。

## 2. 活性天然化合物の新世代高度化技術の開発と実証 (In silico-guided activity-oriented combi-chem synthesis)

### 2.1 TDP1阻害剤のインシリコ解析に則した高度化

実施体制: JBIC 分室 16(JBIC)、JBIC 分室 1(JBIC)、JBIC 分室 4(JBIC)、JBIC 分室 8(JBIC)、JBIC 分室 15(JBIC)、JBIC 分室 8(JBIC)

共同研究: 産業技術総合研究所、東京工業大学、東北大学

チロシルDNAホスホジエステラーゼ(以下、TDP1と略す)は、トポイソメラーゼ(DNA)I(Top1)が関与するDNAダメージを修復する酵素である。本酵素の阻害は、癌細胞選択的に細胞死を誘導するが、正常細胞には細胞死を誘導することがない。したがって、本酵素の阻害剤は遺伝子修復をターゲットにした新しいタイプの抗腫瘍剤になると期待した。cDNAチームおよび天然物チームが共同で、ハイスループットスクリーニング系を確立し、スクリーニングを行った結果、ナフタレン骨格を有する既知天然物SP001(活性新規)を得た。これまでに報告されているTDP1阻害剤は全てIC<sub>50</sub>値は何れもmMオーダー以上であるが、本化合物のIC<sub>50</sub>値は1.9 mMと優れた値を示した。

しかし、本化合物は極めて特異的な構造を有しており、誘導體展開のみならず、本化合物そのものの有機合成は困難である。そこで、活性天然化合物の新世代高度化技術の検証を目的とし、本化合物で得られた構造活性相関情報をもとに、活性発現に必要な部分構造を抽出し、インシリコチーム、天然物チーム、合成チームが共同で天然物とは全く異なる構造をもつTDP1の阻害剤創製を行った。

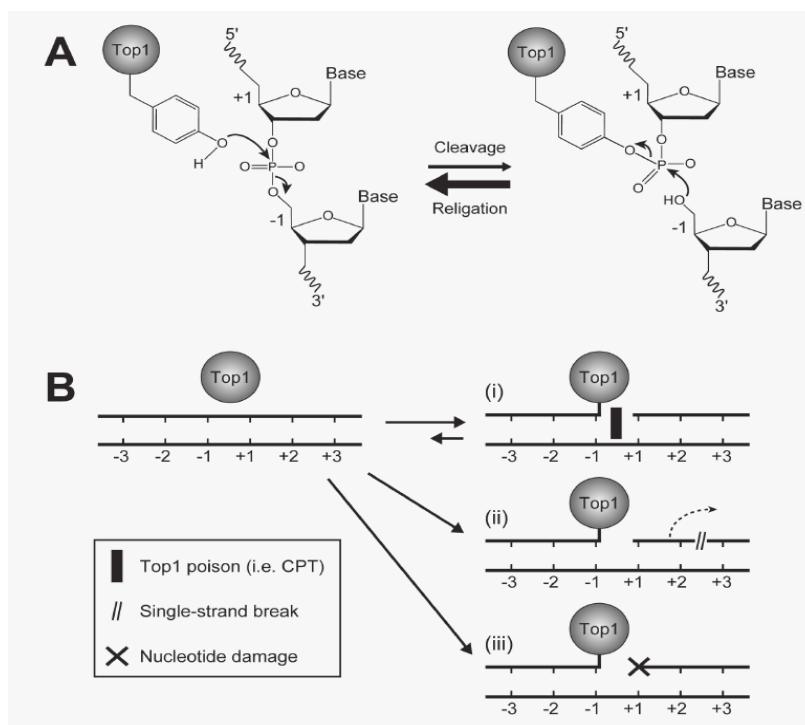


図2.1-1 Top1-DNAの役割

### 2.1.1 ファルマコフォアの抽出

数少ない市販の類似化合物による構造活性相関から、シクロヘキサノン環上に芳香環含有アセタール構造をもつ化合物がいずれも TDP1 阻害活性を有しているのに対し、これらの官能基のいずれかを欠くと活性を示さないことがわかり、これをもとに **A** の構造をファーマコフォアと考えた (図 2.1.1-1)。

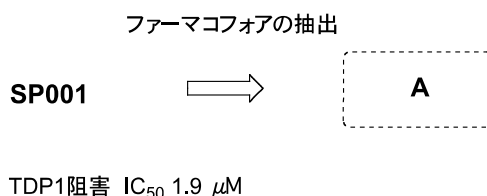


図 2.1.1-1 天然物からファーマコフォアの抽出

### 2.1.2 インシリコシミュレーションによるドッキングモデルの創製

TDP1はチミジン残基の異常を修復する酵素であり、バナジウム酸を阻害剤として使用した複合体のX線結晶解析が報告されている(図2.1.2-1)。そこで、本モデルを用いて、インシリコチームによりSP001のこれらタンパク質複合体とのドッキングシミュレーションを行った。その結果、SP001は本モデルにおいて、チミジン残基と極めて良く重ねあう形でタンパク質複合に嵌り込む核酸のミメティクスとして働いていることが推察された。このモデルを用いて、周囲のポケットと相互作用するような化合物を上述のファーマコフォアAを用いて創製することにした。

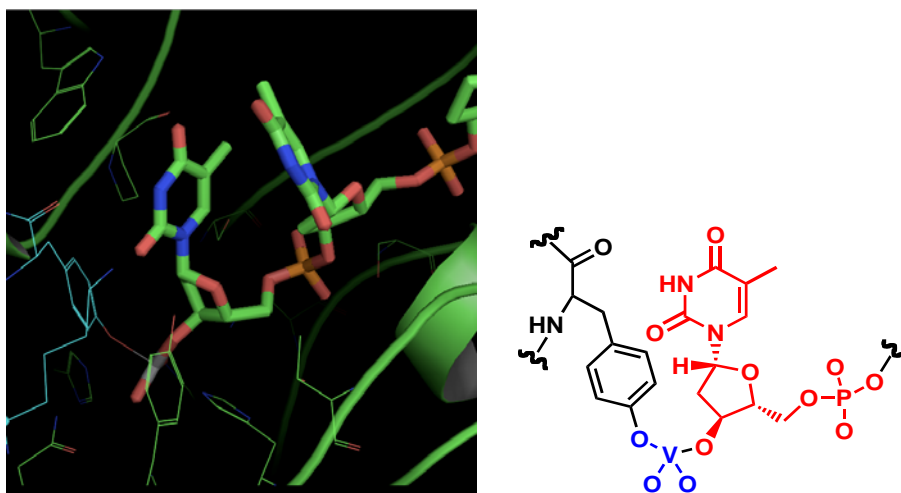


図 2.1.2-1 Top1-DNA(バナジウムエステル)と TDP1 の複合体の X線結晶構造(左)とその模式図(右)

### 2.1.3 コンビナトリアルライブラリーの構築

構造 **A** を有し、様々な化学修飾のし易さを考慮した上で、化合物 **SP** を実際の標的合成化合物として設定した実際に、9 種類の多置換フェノールと 17 種類のジオールからなるコンビナトリアルライブラリーを合成し、TDP1 阻害活性を評価した。その結果、合成した類縁体の中から、天然物に匹敵する阻害活性をもつ化合物を見い出した。また、環上のカルボニル基を還元してアルコールにすると活性が消失することも判明した。これら事実は、提案しているファーマコフォア構造 **A** が

有用であることを示している。また、インシリコチームにより構造活性相関が明らかにされ、重要な知見として、1)環上の置換基を変えると TDP1 阻害活性が著しく低下する。2)アセタール環にアリール基やシクロヘキセン環等が直結していないと活性が消失することがわかった。

#### 2.1.4 フォーカストライブラリーの構築

これらの知見をもとに、核酸ミメティクスとして SP 構造を基盤とするフォーカストライブラリーを構築した。すなわち、前述の合成反応に続いてヨウ化アリールを足掛かりとしてボロン化合物との鈴木カップリング反応を行うことにより、多種類の類縁体の構築を計画した。この際、用いる合成ブロックは、インシリコチームによる TDP1 と SP 構造のドッキングシミュレーションの結果を加味して、活性向上に寄与すると考えられるものを中心に選定した。前述の合成化合物と合わせて延べ 293 化合物からなる化合物ライブラリーを合成し、TDP1 阻害活性の評価を行った。その結果、天然物を超える TDP1 阻害活性をもつ化合物 15 個を見出した。これらの化合物に関して Hela 細胞に対する細胞毒性を調べたところ、天然物よりも強い活性を有するものが 9 個見つかった。とりわけ SP055 は天然物の 10 倍以上強い細胞毒性を示した。また、二量体 SP199 についても、同様に強い活性を有することを見出した。

#### 2.1.5 SP055 の立体異性体の活性評価

SP055 はラセミ体で合成しており、その立体化学は未決定であった。そこで、両エナンチオマーおよびジアステレオマーの計四種を合成し、各々の TDP1 阻害活性を評価した。その結果、SP055A とそのエナンチオマー *ent*-SP055A が強い TDP1 阻害活性を有する一方で、ジアステレオマー SP055B とそのエナンチオマー *ent*-SP055B の阻害活性は半減することがわかった。興味深いことにエナンチオマー間での TDP1 阻害活性の差はほとんどなく、置換基の相対立体配置が活性発現に大変重要であることが分かった。

#### 2.1.6 SP055 の作用機序モデルの提案

分子動力学計算を用いて SP055 と Top1-DNA 複合体のドッキングシミュレーションを行った。その結果、SP055 は SP001 を用いたときのシミュレーション結果と同様に Top1-DNA 複合体の核酸部分構造をミミックしていることが示唆される結果を得た(図 2.1.6-1)。本化合物は、核酸ミメティクスとしては、非常にユニークな構造をもつことから高い新規性を有する。

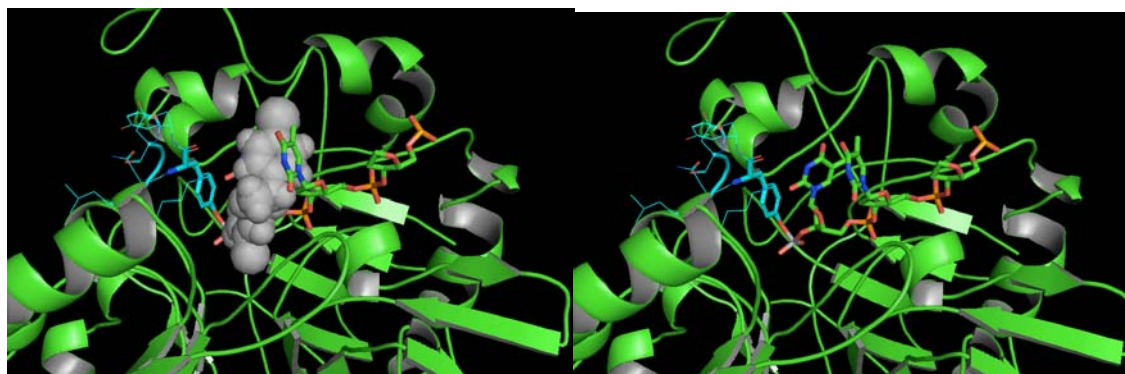


図 2.1.6-1 SP055 と TDP1 のドッキングモデル

Top1-DNA(バナジウムエステル)と TDP1 の複合体のX線結晶構造(左)、

SP055 と TDP1 のドッキングシミュレーションモデル(右)、CPK 表示は SP055

### 2.1.7 SP055 を分子プローブとするタンパク質複合体ネットワーク解析

本化合物が標的タンパク質 TDP1 に関与しているかどうか、あるいは他のタンパク質に作用するかどうかを同定するため、SP055 誘導体である含アジド化合物 SP293 を合成した。SP293 は SP001 に比べ 1/2 の TDP1 阻害活性を示したので、基盤技術として開発した分子プローブ用ペプチドタグである B とアジドとアセチレンを用いる化学選択的[3+2]反応を行い、分子プローブ C を合成した(図 2.1.7-1)。C を用いてネットワークチームがタンパク質複合体ネットワーク解析を行ったところ、DNA 修復に関連するタンパク質群が同定された。今後、これらの詳細な解析を行い、新規作用機序の機構を明らかにすることが可能であると考えている。

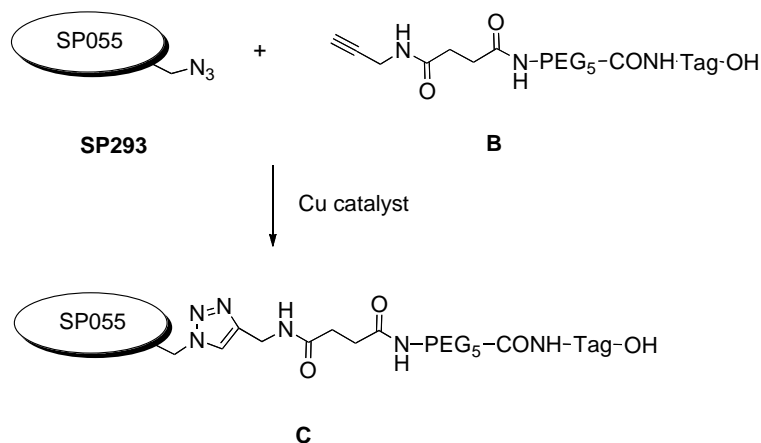


図 2.1.7-1 SP055 の分子プローブ合成

### 2.1.8 SP001 および SP055 の活性評価

天然物 SP001 および天然物の 10 倍以上強い細胞毒性を示す SP055 について、がん細胞パネル評価を行った結果、十分に低い有効濃度でがん細胞株ごとに既存薬とは異なる増殖阻害作用が認められ、新規作用機序をもつ核酸ミメティクスとして期待されるとの評価を得た。さらに動物モデルを用いた抗腫瘍活性評価では SP001 と SP055 は SP199 に比べ、強い抗腫瘍活性を示すことが明らかとなった。また、ネットワークチームによる複合体タンパク質のネットワーク解析の結果も、SP 類縁体群は DNA の修復に関係する核酸ミメティクスであることが示唆されており、新規作用機序をもつ創薬シードとして企業への導出を考えている。

### 2.1.9 まとめ

以上、TDP1 酵素阻害剤として発見した天然物を基に、インシリコ解析に則した合成誘導体展開を行い、天然化合物とは異なる構造を有し、かつ同じ活性相関をもつ化合物の創製を効率的に行えるモデル研究を示すことが出来た。天然化合物は有機合成が困難な化合物が多く存在するが、このようなインシリコとの相互補助により、効率的な合成誘導体展開の可能性を示したことから、今後企業での応用展開が期待される。



## 2.2 SpiruchostatinをモチーフとするHDAC阻害剤の創製

実施体制:JBIC 分室 16(JBIC) JBIC 分室 15(JBIC)、JBIC 分室 8(JBIC)

共同研究:産業技術総合研究所、東京工業大学、東北大学

ヒストンデアセチラーゼ (HDAC) は、ヒストンのリジン残基のアセチル基を脱離させる酵素であり、様々な遺伝子の発現を抑制する。ヒストン脱アセチル化酵素(以下HDACと略す)阻害剤は、逆に、ヒストンのアセチル化を促進させ、様々な遺伝子の発現を誘導することが知られている。発現誘導される遺伝子群に癌抑制因子が多く含まれることから、HDAC阻害剤は、強い抗腫瘍活性を示すことが知られており、アポトーシスを誘起し、増殖を抑制作用を持つ。従って、近年、新規な抗がん剤ターゲットとして注目されている。天然物チームにより単離・構造決定された世界最強のHDAC阻害活性を示す天然物spiruchostatin A および Bを、天然物化学の高機能化技術の検証評価研究のテーマの一つとし、インシリコ解析に則した合成誘導體展開による強力な活性を有するHDAC阻害剤の創製を目指した。

### 2.2.1 インシリコシミュレーションによる既知阻害剤のファルマコフォア解析

Spiruchostatin A をはじめとする高活性阻害剤のHDAC1との結合様式を理解し、阻害剤として必要なファルマコフォアを推定することは、合理的な合成誘導體展開に有用な手掛かりとなる。HDAC1の結晶構造は、未だ明らかにされていないが、インシリコシミュレーションにより結晶構造既知のHDACファミリーを参照してHDAC1の立体構造を構築し、ドッキングシミュレーションによりspiruchostatin A等の活性化化合物との結合様式を予測した。

図2.2.1-1は、trichostatin A (TSA)、テトラペプチド系HDAC阻害剤chlamydocin、および我々が見出していたHDAC阻害剤spiruchostatinと、HDAC1とのドッキングモデルである。

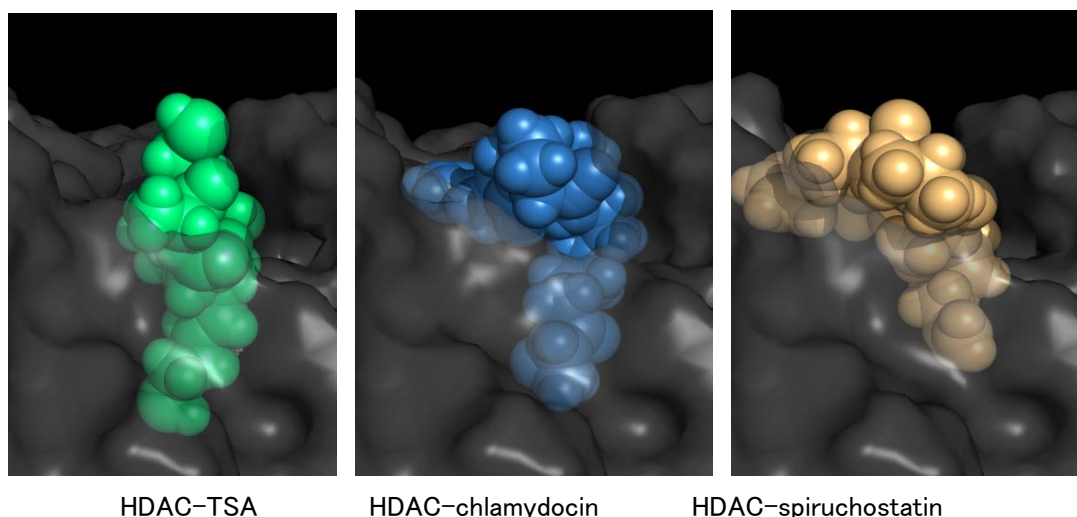


図 2.2.1-1 HDAC1 と阻害剤のドッキングモデル

上記のドッキングモデル構築の際には、化合物の構造に合わせて、タンパク質の動態変化すなわちInduced Fitを加味した手法を用いているため、TSAのような分子からspiruchostatinのような比較的分子量の大きい阻害剤まで、結合分子に対応したモデルとなっている。これらの阻害剤と

のドッキングシミュレーションの結果、spiruchostatinの誘導体展開において、化合物との結合力を増加させる3箇所のポケットが存在することを明らかにした。Spiruchostatinはペプチド系化合物であり、天然化合物ではこれらの活性増強ポケットに合致するアミノ酸ユニットは存在し得ない。そこで、これらの活性増強ポケットに親和性高く嵌り込む骨格を持ったアミノ酸ユニットに置き換えた、一連の誘導体化合物を合成する戦略を考案した。

## 2.2.2 コンビナトリアル合成によるspiruchostatin A誘導体のフォーカストライブラリー構築

Spiruchostatin A を四つの合成ブロック D~G に分割し、それらを固相法を用いてカップリング、固相からの切断、液相での環化という短工程でコンビナトリアル合成に適した固相合成法を確立した(図 2.2.2-1)[Tetrahedron Lett. 2009, 50, 2970]。また、非天然型の合成ブロックの合成については自動合成装置を活用し、六工程すべての合成を自動合成装置により行い、その反応の詳細な条件をデータベースとして保存した[Org. & Biomol. Chem. 2011,9,3825]。

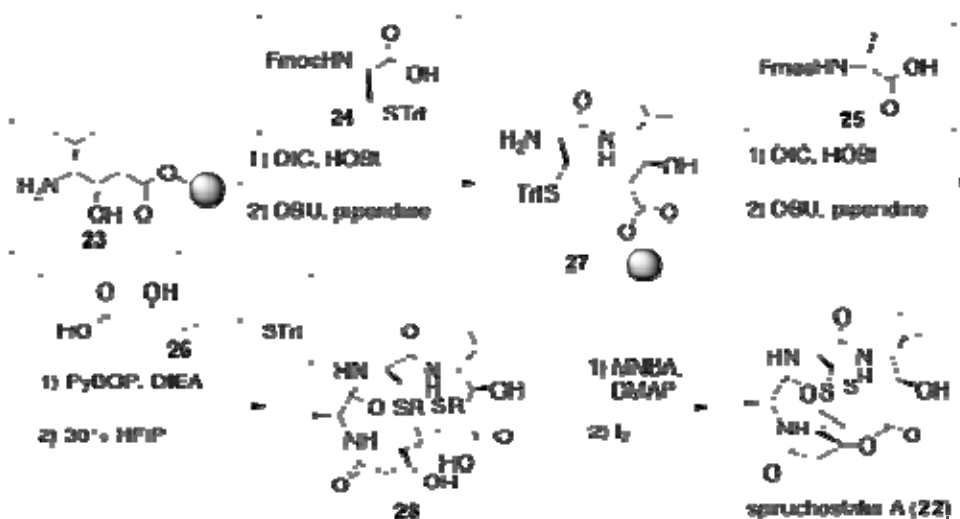


図 2.2.2-1 Spiruchostatin A の固相合成

インシリコチームが作製したHDAC1の三次元構造モデルとHDAC阻害剤とのドッキングモデルをもとに、天然物チームと共同でフォーカストライブラリーの設計を行った。ドッキングモデルから特に重要と推測された疎水性ポケット3箇所について非天然型の置換基(R<sup>1</sup>,R<sup>2</sup>,R<sup>3</sup>)をもつ、4x5=20化合物のコンビナトリアル合成を行い、すべての化合物の合成に成功した。

## 2.2.3 Spiruchostatin A 誘導体の構造活性相関

上記で構築した3箇所の活性増強ポケットに則したspiruchostatin A誘導体展開において、20個のコンビナトリアルフォーカストライブラリーを含む24個の化合物を全合成し、細胞レベルでの阻害活性を評価した。その結果、天然物より活性の高い化合物を4つ見出した。なかでもAM-07-005は天然物より50倍活性が強く、有効活性濃度の範囲が広い。従来の天然物合成では一つの天然物の合成に1年は必要であるが一挙に誘導体を合成するという独自の手法を確立し、天然物そのものから誘導化する方法では得られない化合物ライブラリーを迅速に構築し、高



活性化化合物を的確に見出すことに成功した。また洗練されたインシリコ設計に基づくコンビナトリアル合成によるアプローチが迅速な活性化化合物の探索に有意義であることを示す結果を得た。

#### 2.2.4 高活性化化合物のin vivo評価

天然物の50倍の阻害活性を示したAM-07-005について液相法を用いて100 mgスケールでの合成を行い、in vivo試験に提供した。Spiruchostatinは強力な抗腫瘍活性を示す化合物であるが、本高活性誘導体AM-07-005に関して、元化合物と比較しながら抗腫瘍活性を検討した。抗腫瘍試験には、中皮腫細胞NCI-H290細胞を用いた。既存のHDAC阻害剤(SAHA)は中皮腫細胞に対しては弱い効果しか示さなかったが、AM-07-005はspiruchostatin Aと比較して、より強力な抗腫瘍活性を示した。現在、より感受性の高い癌細胞を用いて再試験を行っている。

#### 2.2.5 まとめ

標的タンパク質でありながら、立体構造未知であるヒストンデアセラーゼ(HDAC1)について、インシリコシミュレーションによりHDAC1の立体構造を構築し、HDAC1の機能を阻害する天然物spiruchostatin Aについて、結合様式をドッキング計算で推定した。ドッキング計算では、天然物の構造の自由度とHDACの活性部位周辺残基の自由度の両方を加味したInduced Fit Docking計算法を適用した。また天然物spiruchostatin Aおよび他の2つの活性化化合物についても同様にInduced Fit Docking計算を実施し、3種の天然物間でHDACに対する結合様式を比較し、構造活性相関を検討した。この構造活性相関モデルを基にライブラリー合成チームとの天然物spiruchostatin Aを母核とする新規化合物展開を実施した。その結果、合成した化合物の中から、天然物spiruchostatin Aの阻害活性を超える新規化合物を見出した。最も強い阻害活性を持つ化合物AM-07-005は、spiruchostatin Aに比べ50倍高い阻害活性を有している。

このことから、インシリコ解析に則した誘導体展開が従来のランダムに誘導体展開するのと比較して、より効率的に高活性化化合物の創製を可能にすることを証明することが出来た。本技術は、製薬企業において、臨床薬開発の強力なサポートツールとなると考えられる。

## 2.3 新規テロメラーゼ阻害剤の開発

実施体制: JBIC 分室 16(JBIC) JBIC 分室 15(JBIC)、JBIC 分室 8(JBIC)

共同研究: 産業技術総合研究所、東京農工大、東京工業大学、東北大学、

テロメラーゼ阻害剤telomestatinは、ほ乳類細胞のテロメア末端配列であるTTAGGGを特異的に認識し結合する。テロメアは、その繰り返し配列中に豊富に存在するグアニン残基同士が水素結合することにより、G-quadruplexと呼ばれる特殊な3次元構造を形成するが、telomestatinはこのG-quadruplexを安定化させる。この作用機序により、癌細胞のテロメアを不安定化させ癌細胞死を誘導する、新しい活性発現メカニズムを持った化合物である。本化合物は、現在存在するテロメラーゼ阻害剤の中で最も強力かつ特異的な化合物であり、世界中でテロメラーゼ阻害剤のメルクマールとなっている。本化合物はマウス担癌モデルで抗腫瘍活性を示すが、溶解性などの物性が悪く、動物への投与が困難である。そこで、telomestatinの活性発現機序とコンピューターシミュレーションから類推した、誘導体の合成を進めた。

### 2.3.1 テロメスタチン誘導体6OTD、7OTD類の合成と活性評価

図 2.3.1-1 に示すような、telomestatin をリードとし、6 つ、または 7 つのオキサゾールを有する大環状テロメスタチン誘導体 6OTD、7OTD 類の合成を行った。前述の G-quadruplex 構造は、テロメア以外にも c-myc や PDGF のような癌遺伝子のプロモーター配列中でも形成されるため、各誘導体の選択性についても同時に検討した。これらの誘導体のうち、S2T1-6OTD 化合物はテロメア配列 (TTAGGG)<sub>4</sub> に対しては弱い作用しか示さなかったが、c-myc プロモーターに対して強い結合活性を示した。

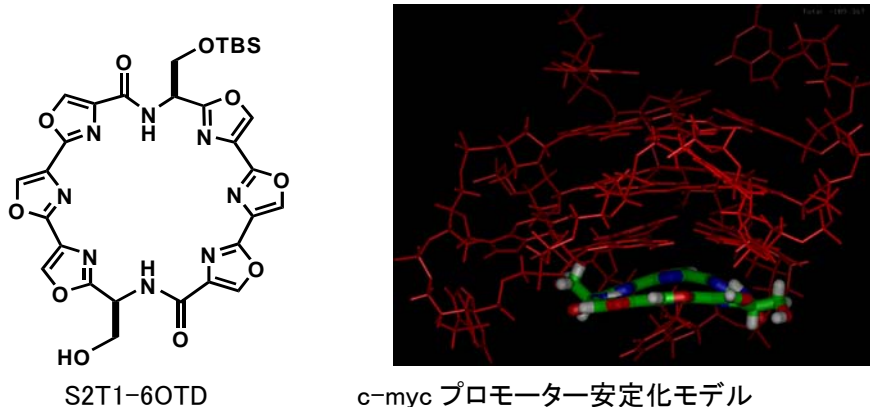


図 2.3.1-1 6OTD telomestatin 誘導体

図 2.3.1-2 は、本化合物を癌細胞に作用させた際の c-myc の発現を観察したものであるが、G-quadruplex 構造を形成する通常の c-myc プロモーターのコア配列である NHEIII1 を持った RAMOS 細胞では、c-myc の発現が強く阻害されていた。これに対し、NHEIII1 配列によって制御されていない c-myc の発現 (CA46 細胞) には、本物質は全く影響を与えなかった。以上の結果から、S2T1-6OTD 化合物は c-myc プロモーターの G-quadruplex 構造を安定化させ、c-myc の発現を抑制していることを明らかにした。

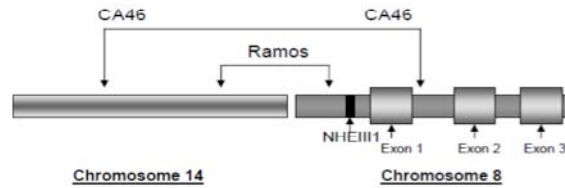
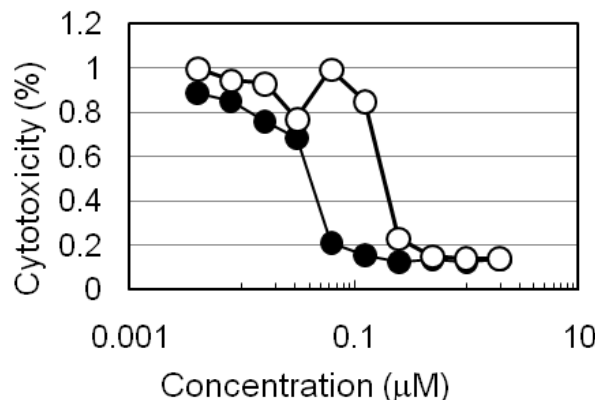
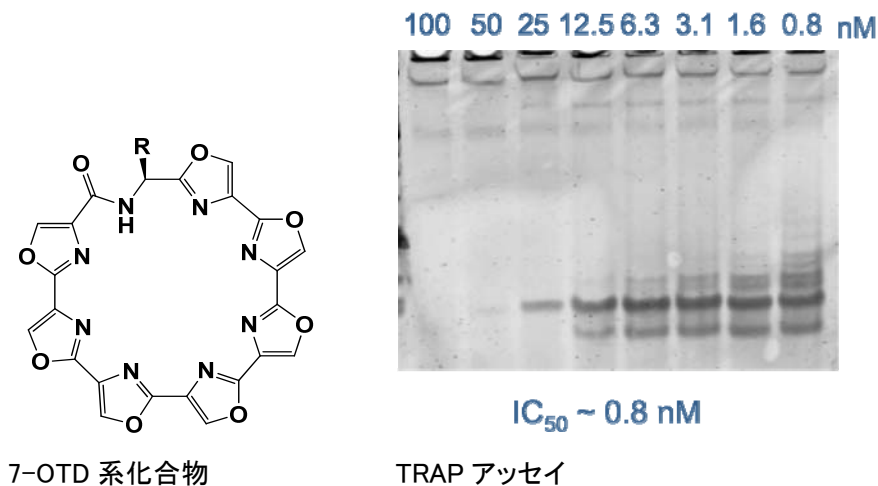


図 2.3.1-2 60TD を癌細胞に作用させた際の c-myc 発現の様子

さらに、強力な誘導体を調製すべく合成を続けた結果、7つのオキサゾール環を有する化合物 7-OTD 系化合物が強力なテロメラーゼ阻害活性を示すことを見出した。図 2.3.1-3 は、7-OTD 系化合物の一つの化合物を示すが、telomestatin の TRAP アッセイにおける  $IC_{50}$  値は約 5 nM であり、7-OTD 化合物は telomestatin より強力なテロメラーゼ阻害活性を示すことが判明した。さらに、HeLa 細胞における細胞毒性も 7-OTD 化合物の方が強力な物であった。これらの生物活性に加え、7-OTD 化合物は良好な物性であり、DMSO などの溶媒に容易に溶解する。現在、フランス、スイス、アメリカおよびシンガポールで、様々な生物活性評価を検討中であり、マウス担癌モデルにおける抗腫瘍効果を検討予定である。



HeLa 細胞における  $IC_{50}$  値 (●: 7-OTD、○: telomestatin, 6 days)

図 2.3.1-3 7OTD telomestatin 誘導体の活性評価

### 2.3.2 インシリコ解析に則した Telomestatin 二量化誘導体の設計、合成、評価

Telomestatin は図 2.3.2-1 に示すように、二分子の化合物が G-quadruplex 構造を挟み込むように嵌り込み、G-quadruplex を安定化しているモデルが提唱されている。そこで、インシリコチームの解析により、2 分子の telomestatin 誘導体を架橋し、効率良く G-quadruplex を安定化させる化合物の合成を進めた。

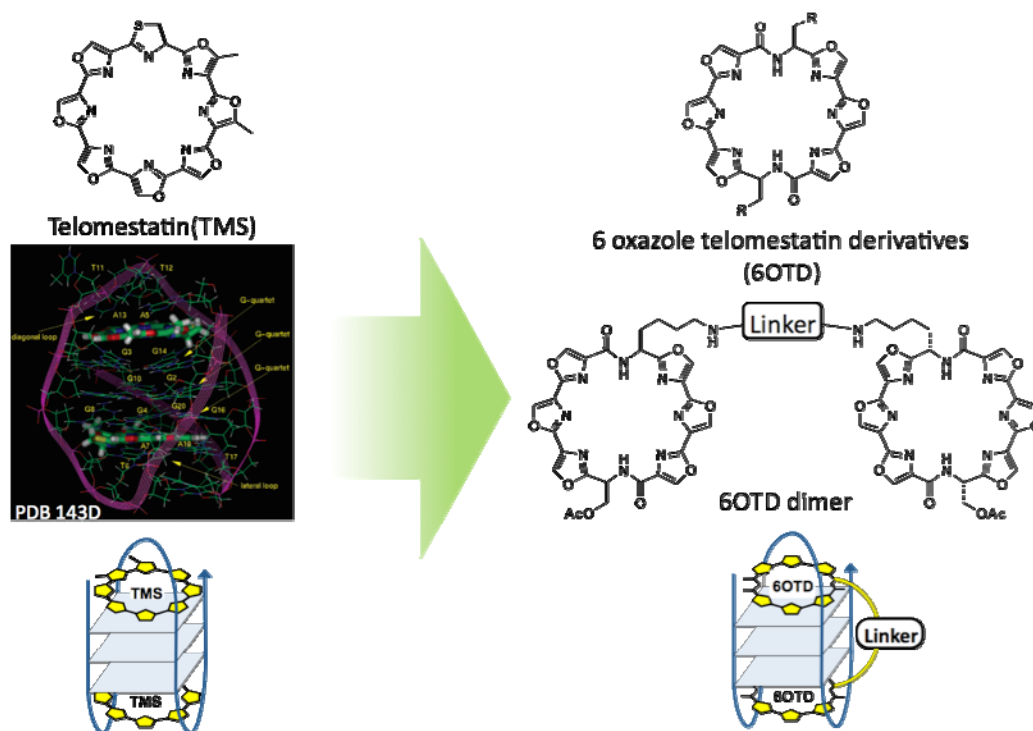


図 2.3.2-1 架橋型 telomestatin 誘導体

インシリコ解析により、Linker B が最も理想的な長さの架橋構造であることが示唆され、本解析にしたがい、合成展開した。

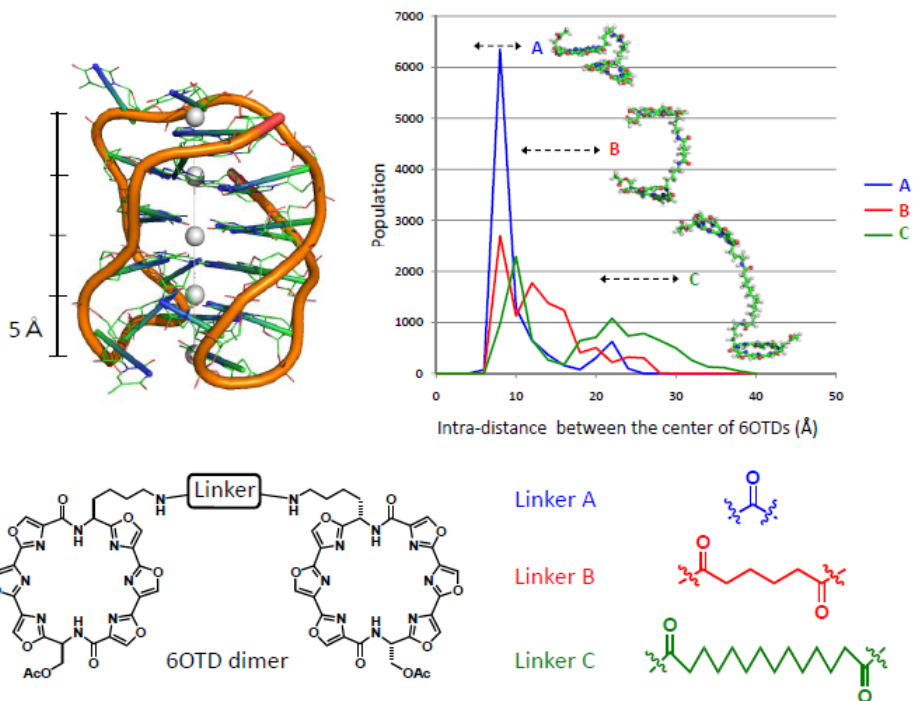
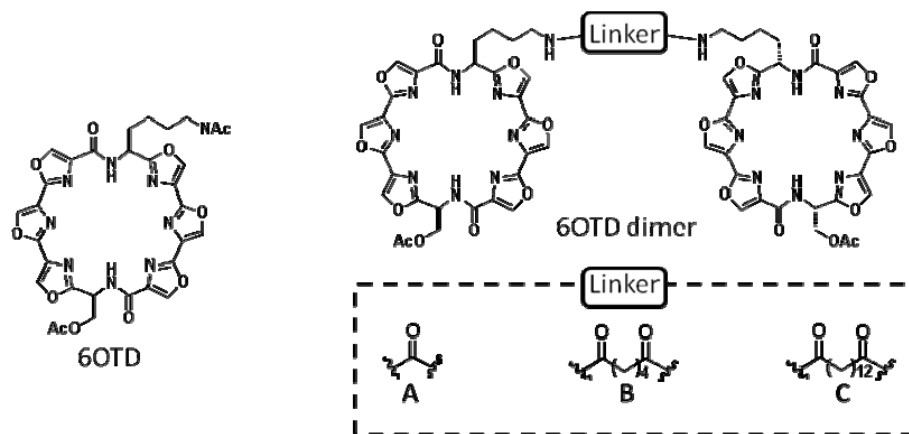


図 2.3.2-2 インシリコモデルによるリンカーの最適化

3種類の長さのリンカーで架橋した化合物のうち、インシリコ解析により提唱された化合物 B は、一本鎖のテロメア鎖を他の化合物と比較して強く安定化させることが明らかになり、インシリコ解析により、ランダムな化合物誘導体展開を行わない、次世代型誘導体展開を提唱する例として示すことができた。



融解温度 ( $\Delta T_m$ ) の変化 (FRET Melting)

DNA	60TD	dimer A	dimer B	dimer C
テロメア一本鎖	25.0	17.2	25.1	8.5
二本鎖	-0.9	-0.1	-0.8	-0.2

$IC_{50}$  ( $\mu M$ )<sup>a</sup> (PCR stop assays)

DNA	60TD	dimer A	dimer B	dimer C
テロメア一本鎖	2.9 $\pm$ 0.5	23.3 $\pm$ 3.7	3.0 $\pm$ 1.2	35.1 $\pm$ 3.8
ランダム一本鎖	243 $\pm$ 13	1150 $\pm$ 36	>2500	1000 $\pm$ 41

<sup>a</sup> Values represent the means  $\pm$  SD of triplicate assays. Primer concentration was 0.3  $\mu M$

図 2.3.2-3 架橋型 telomestatin 誘導体のテロメア鎖安定効果の評価

### 2.3.3 溶解性の問題を克服する telomestatin 誘導体の迅速合成法の開発

Telomestatin は、極めて予後の悪い癌であるグリオブラストーマに由来する、がん幹細胞に対して、これまで多くのスクリーニングを実施した中で最も強力な抗がん幹細胞効果を示すことが、ごく最近見出され、臨床開発が再注目されている。Telomestatin は、従来の化合物とは全く異なる理化学的性状を示す化合物であり、溶解性の問題を克服することが重要である。そこで種々の誘導体を迅速に合成するため、合成ブロック H, J, K を組み合わせる合成法を確立した。合成ブロック H と合成ブロック J から合成ブロック L を得、二分子の合成ブロック K から合成ブロック M を得た。これらを実験的にアミド化、続くマクロラクタム化により6つのオキサゾールをもつ大環状アミド N を得た。続いて歪みが大きく構築困難であった7つめのオキサゾール環の構築に成功し P を得た。さらにチアゾリン環の合成に成功し、(R)-telomestatin の世界初の全合成を達成した[Org. Lett. 2006, 8, 4165]。この手法をもとに(S)-telomestatin を合成し活性を評価したところ、(S)体が天然体の(R)体より4倍高活性であることを見出した[Org. Biomol. Chem. 2011, 9, 387]。また、チアゾリン部位を変換した誘導体、およびメチル基の位置ならびに数が異なる誘導体、ブromoオキサゾールをもつ誘導体の合成を行った。このうち溶解性の優れた誘導体を見出し、テロメアとの作用機構を検討中であり、新しい作用機構をもつ抗がん剤のリード化合物として研究を進めている。

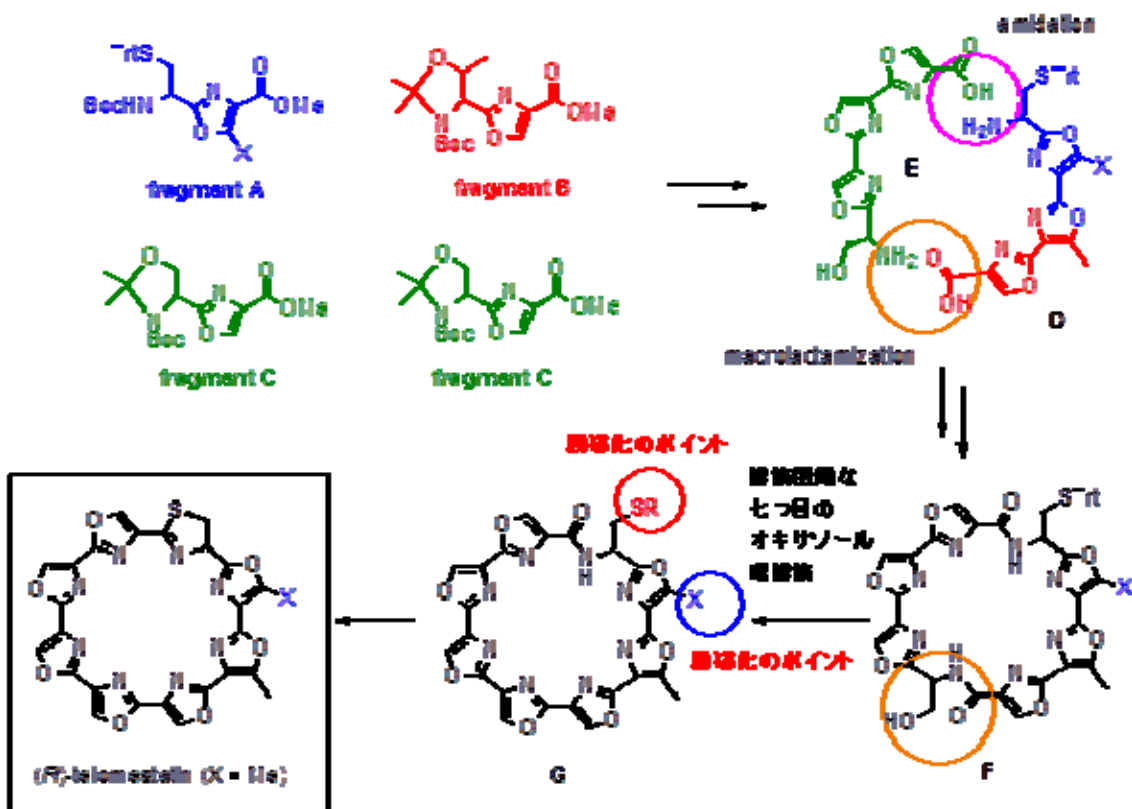


図 2.3.3-1 迅速な誘導体合成を指向した (R)-telomestatin の全合成

### 2.3.4 まとめ

これまで知られているテロメラーゼ阻害化合物の中で最も強い活性をもつ telomestatin についてインシリコ解析に則した合成展開を試み、さらに強い活性を有する誘導体を合成し、その作用機序を明らかにしている。合成の難解な telomestatin の全合成を達成した唯一のチームであり、すでに類縁体の迅速合成法も確立していることから世界を大きくリードしている。今後、このようなインシリコ解析を行い、活性を維持しながら物性の良い化合物の創製を行うことで抗がん剤のリード化合物に導くことができると考えている。

## 2.4 産業化へ向けて

### 2.4.1 TDP1 阻害剤

今回開発された、天然物の10倍以上強い細胞毒性を示したSP055について、がん細胞パネル評価を行った結果、十分に低い有効濃度でがん細胞株ごとに既存薬とは異なる増殖阻害作用が認められ、新規作用機序をもつ核酸ミメティクスとして期待されるとの評価を得たため、製薬企業での開発薬としてステージアップの検討を行っている最中である。

### 2.4.2 HDAC 阻害物質

現在天然化合物に関しては前臨床試験が終了し、今後、製薬企業において開発が進んで行く予定である。

### 2.4.3 テロメラーゼ阻害剤

現在、テロメア選択的、非選択的（myc プロモーターに作用）の2種類の化合物を合成しているが、これらは国内はもとより、フランス、アメリカ、スイス、シンガポールで詳細な活性試験を行っている。

また、天然化合物 telomestatin が悪性グリオーマ由来のがん幹細胞に対して極めて有効であることが示され、アメリカのオハイオ大学で今後の開発を検討中である。本検証研究で作製した、天然化合物と逆立体を有する合成誘導体は、天然化合物より強力な活性を示すことから、より強力な抗がん幹細胞効果が期待されている。



### 3. タンパク質間相互作用を低分子化合物で制御する新戦略

実施体制: JBIC 分室 8 (JBIC、大鵬薬品工業、興和)

共同研究: 産業技術総合研究所、大阪府立大学

タンパク質の多くは、平均 5~10 程度のタンパク質と相互作用していると推定されており<sup>1)</sup>、相互作用組み合わせは、ホモ複合体、ヘテロ複合体、また相互作用状態も定常的、過渡的相互作用に分類される。タンパク質相互作用結合部位は、タンパク質対間で共有するものもあれば、独立のものもある。相互作用表面も、平面的なものから凹面を持つもの、相互作用力は疎水性から”疎水性+極性混在型”までと多様である。このようにタンパク質間相互作用は非常に多様性に富んでいる。

本 PJ におけるインシリコスクリーニングでは、タンパク質タンパク質ドッキング計算から相互作用部位を予測し、リガンドドッキング計算や分子動力学計算を用いて化合物をスクリーニングする戦略を基本に、様々なタンパク質間相互作用標的と制御化合物の探索に取り組んできた。複合体タンパク質の結晶構造を用いた統計解析によれば、タンパク質-タンパク質間相互作用表面は、800 Å<sup>2</sup> を 1 区間とした複数のパッチ構造で形成されていることが知られている。

PJ を通じて実施した複合体タンパク質標的をこの基本構造に照らし合わせ、天然物ヒットからの高機能化やケミカルスペース解析を加味した結果、ケモ-バイオインフォマティクス技術の効率化のまとめとして、図 3-1 のような分類を提案する。タンパク質相互作用表面が Medium サイズでその形状が平面的なもの (Medium & Flat) と、一方で、Large サイズで明確な凹面で相互作用しているタイプ (Large & Concavity) では、それぞれのタンパク質間相互作用の様式に応じてインシリコスクリーニングの戦術を変えることで、効果的な化合物探索に繋がっている。Medium & Flat 型の場合は、結合に適した化学構造として、環構造の含有率や分岐の特徴が重要であることが DHPS-ERK 相互作用標的で示唆されており、また、Large & Concavity 型の場合は、広い相互作用面の中から分子動力学計算より本質的な相互作用を分析し、そのファルマコフォアを知見として効果的なりガンドドッキングによるインシリコスクリーニングが有効であることが PA-PB1 相互作用標的で実証されている。また、タンパク質相互作用表面が Large サイズでその形状が緩やかな凸的である Large & Hill 型 (実施例として PAC3 複合体表面) において、実験による天然物スクリーニングと連携してインシリコスクリーニングを活用することで良好な結果を得ている。抗体ペプチドで代替できるような、タンパク質間相互作用表面が、ヘリックス構造など土台となる構造支持領域である場合は、ペプチドのファルマコフォアから低分子構造を導き出す戦略が有効である。上記の分類の評価と一般化に向けて、今後も複合体形成の作用機序別に効率よく実験と計算機を連携したインシリコスクリーニングの実施例を積みかさねることが重要である。

更に、主に本 PJ で単離、構造決定された 922 の天然物およびランダムに選定された 922 の合成化合物、14 の共結晶の化合物によるケミカルスペースを作成し、分類との関係を解析した。ケミカルスペース作成には、Feher らの論文 (J. Chem. Inf. Comput. Sci. 2003) に基づいた記述子を利用し、主成分分析法により寄与率の高い 2 主成分軸で分布を表現した (図 3-2)。第一主軸 (横軸) は、化合物の環構造部分と非環構造部分の原子構成比率パラメータ、第 2 主軸 (縦軸) は化合物構造に含まれる環構造部分の融合度合いを示すパラメータがそれぞれ寄与していた。天然物は、合成化合物に比べ広いケミカルスペースを有しており、共結晶が存在するタンパク質複合体阻害剤は、全体的には、天然物分布と合成化合物部分の境界領域を中心に分布していることがわか

る。分類毎に着目してみると Large & Hill 型は、境界領域に分布していることがわかる。一方、Large & Concavity 型は合成化合物の分布に属しており、ケミカルスペース上では、酵素阻害剤や GPCR 阻害剤等の分布に近いことがわかる。標的とするタンパク質間相互作用が Large & Concavity の場合は、天然物よりはむしろ合成化合物のようなケモタイプが望ましいことを示唆している Medium & flat 型では、Large & Hill 型に近い分布であるが、合成化合物の部分からより離れた領域に属していることがわかる。

結合様式が明らかになっているタンパク質間相互作用を阻害剤の標本数が少ないため、相互作用分類とケミカルスペースの関連性については、今後も継続的な解析が必要であるが、このような試みでタンパク質間相互作用の分類に着手した先行研究は無く、天然物やタンパク質ネットワーク解析、合成化学など幅広いチームが連携している本 PJ ならではの独自性の高い結果といえる。

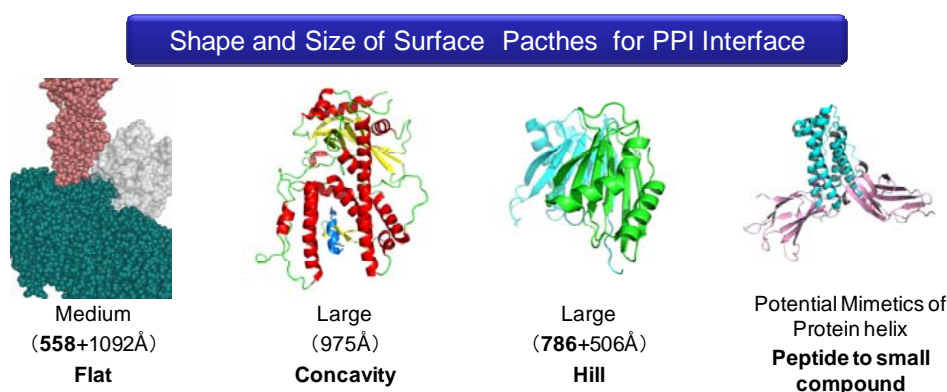


図 3-1 インシリコスクリーニングに向けた複合体タンパク質の分類

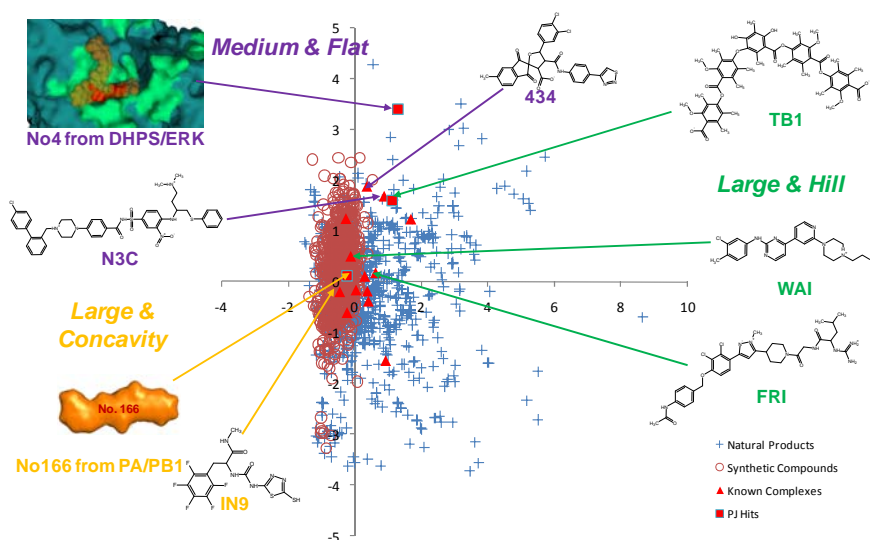


図 3-2 天然物(+)、合成化合物(O)ケミカルスペース解析および、タンパク質複合体阻害剤(本 PJ 同定化合物(■)および共結晶公知化合物(▲))のマッピング



### 第3章 個別研究開発

本研究開発には、JBIC 提案分とは別に、単独で採択された二つの研究開発項目がある（「遺伝子レベルでの創薬ターゲット決定の効率化」と「翻訳リプログラミングに基づく統一的なスクリーニング系の構築」）。これらの項目は、JBIC 提案分と連携を図ることにより、相乗効果が得られる判断し、JBIC 委託研究の分室として組み込まれた。プロジェクト期間内には相乗効果を見るまでには至らなかったものの、それぞれ極めて独創的な研究成果が得られたので、第3章にまとめて記載する。今後、JBIC 提案分の成果と組み合わせることにより、相乗効果が期待される。

#### 1. 遺伝子レベルでの創薬ターゲット決定の効率化(EXPOC®マウス開発)

##### (疾患関連遺伝子探索技術の開発)

###### <④疾患関連遺伝子探索技術の開発>

実施体制: JBIC 分室 9(協和発酵キリン)

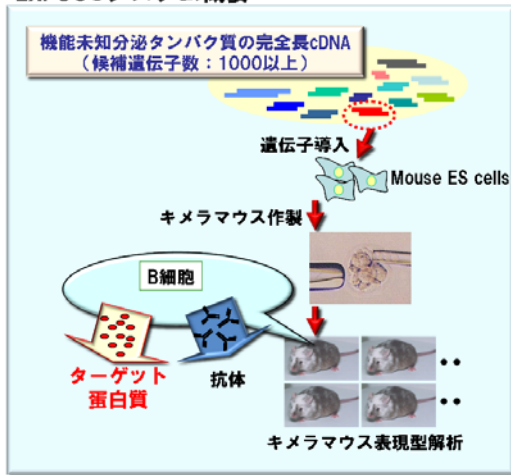
共同研究: 大阪大学、早稲田大学

#### 1.1 はじめに

近年のゲノム関連情報の加速度的な蓄積と比較して、個々の遺伝子/タンパク質の機能を特定し、生命現象や疾患との関連を明らかにする研究の進展は十分でなく、更なる加速をはかるための新規技術開発は創薬研究における喫緊の課題である。ある分子の創薬ターゲットとしての有用性を判断する際に極めて重要な、「in vivo」での機能を追求する上で「動物個体」は理想的なアッセイ系といえる。特に特定の遺伝子の過剰発現の効果を評価できるトランスジェニック(Tg)マウスは、生体の様々な高次機能の維持・調節に関わっており、極めて魅力的な創薬ターゲットである液性因子(サイトカイン/増殖因子/ホルモン等)の生理活性同定に適した手法である。一方、導入遺伝子発現の不確実性や、実施に多大な労力と時間を要することから、従来の Tg マウス作製法を機能未知遺伝子の網羅的な機能解析に適用することは困難と考えられてきた。

我々が考案した独自の高効率生体内遺伝子機能解析システム(Express Proof of Concept: EXPOC®システムと命名。2009 年から 2010 年にかけて日米欧と中国で商標登録。)は様々な工夫により従来法の問題をほぼ全て解決し、液性因子を過剰発現する Tg マウス作製のハイスループット化を可能にした画期的技術である(Kakitani, et al. Nucleic Acids Res., 2005)。その有用性はモデル遺伝子のみならず、新規な腸管上皮成長因子 R-spondin1 の発見(Kim, et al. Science, 2005)により機能未知 cDNA ライブラリーからの生理活性スクリーニングにおいても実証されている。本テーマは EXPOC®システムを核に「EXPOC®マウスの表現型(病態)と生理活性というエビデンスに裏付けられた、オリジナルかつ価値の高い創薬ターゲット同定」を目指すという、世界にも類例をみない試みを柱に据えた。具体的には、液性因子/受容体相互作用に着目し、機能未知の液性因子をコードする cDNA について、EXPOC®システムによる遺伝子機能スクリーニングを実施した。生理活性を示した遺伝子については、疾患との関連性検討や作用メカニズム解明のための二次評価を実施し、創薬ターゲットとしての有用性を判断した。創薬ターゲットとして有用な液性因子/受容体相互作用、あるいは液性因子を起点としたシグナル伝達系を5種以上同定することを目標とし平成 22 年度末までの5年間に 201 種の遺伝子について EXPOC®マウスの表現型解析(一次評価)を実施した。以下に成果を記す。

## EXPOC®システム概要



### 1.2 成果の概要

構造モチーフ、発現頻度・部位等による絞り込みで 320 種(101 種の可溶化受容体を含む)の候補遺伝子を選定。さらに細胞株での分泌チェックを 258 種において行い分泌が確認された 240 種のうち、230 種についてベクターを構築した。更に遺伝子導入 ES 細胞クローンを 201 種取得し、同クローンから 201 種の EXPOC®マウス作製を完了した。作製された EXPOC®マウス 201 種全ての表現型解析(16 週齢まで)を完了した。主な一次評価項目は一般状態、体重、血清生化学分析、血球分析、FACSによるリンパ球サブセット解析、剖検所見、臓器重量測定及び組織病理解析。EXPOC®マウスにおいて特徴的な表現型が見出された候補遺伝子は 59 種あり、その表現型には血管障害/白内障/消化管障害/腸絨毛伸長/T 細胞数増加・減少/B 細胞数増加・減少/抗体濃度低下/赤血球数増加/血清鉄濃度低下と貧血/血小板数増加/血清電解質濃度増加・低下 /骨過形成/骨形成障害/体重低下と血清中性脂肪濃度低下、などヒト疾患との関連が示唆され、かつ文献(論文、特許)に記載のないものが多く含まれていた。

これら候補遺伝子の中から特に顕著で且つ創薬候補として興味深い表現型を示した因子 6 種を選択し、二次評価の最重点課題として取り組んだ。以下二次評価で得られた結果を記す。

因子#37,#74:#37 XPOC マウスの表現型解析で血性腹水・胸水貯留が見出され、血管異常の可能性が示された。ヒト疾患との関連を調べる二次評価試験を行うため、#37 組換え体蛋白質を調製しヒト腫瘍移植モデルでの検討を行ったところ、#37 が複数のヒト腫瘍細胞株に対して有意な抗腫瘍活性を有することを見出した。興味深いことに、同じファミリーに属する因子#74 を発現する EXPOC®マウスも#37 と類似の表現型を示したことから、これらのデータにもとづき因子#37、#74 について抗腫瘍剤としての用途に関する特許を出願(07 年 12 月)した。

次いで、#37 組換え蛋白質を血管内皮細胞株に添加すると血管内皮障害マーカーや炎症性サイトカインの発現亢進、抗酸化作用・抗炎症作用に関与する因子の発現抑制及び、高血圧症・腎疾患・糖尿病・脂質異常症・動脈硬化性疾患・血栓症と関連する因子が上記疾患の悪化を誘発する方向に発現変動することを見出した。またラットに#37 組換え体蛋白質を投与することによって血圧が有意に増加すること、マウスに#37 組換え体蛋白質を投与することによって LDL コレステロールを有意に増加させ、隣りパーゼと血清アルブミンを有意に低下させる事を見出した。さらに#37 中和抗体をマウスに投与することによって、中和抗体は血栓症・動脈硬化性疾患・腎疾患・高

血圧症・血管障害性疾患・アレルギー性疾患・炎症性疾患・心疾患・がん・糖尿病性網膜症・レイノー症候群・クローン病などに関係することが知られている因子の発現変動を上記疾患の緩和・抑制方向に変動させることが見出された。また更に細胞株を用いたレポーターアッセイ系の評価試験により、#128 組換え体蛋白質は#37 の機能を抑制する活性を有することを見出した。以上の結果から#37 の機能を抑制する中和抗体及び#128(可溶化受容体)について上記疾患治療剤としての用途に関する特許出願(09 年 4 月)を行った。

更に、#37 と受容体候補分子との相互作用を制御する化合物取得のため、産総研新家・広川両チームと共同で、幾つかの化合物ソース及び#37 と受容体候補分子との結晶構造モデリングを利用した *in silico* バーチャルスクリーニングより選別された化合物ソースに対して、#37 と受容体候補分子との結合アッセイ系、および#37 の細胞内シグナルを検出可能なレポーター細胞を用いたバイオアッセイ系を用いて、化合物スクリーニングを実施したがヒット化合物を得ることはできなかった。

#74 についてはその後組換え蛋白質の投与実験を追加実施し#37 と同様ヒト腫瘍細胞株に対して有意な抗腫瘍活性を有することを見出すことに成功したため、優先権出願(08 年 9 月)を行った。

因子#88,#103,#155: 大変興味深いことに#88(可溶化受容体), #103(可溶化受容体),#155(可溶化受容体)発現 EXPOC®マウス表現型解析の結果、3 種共にほぼ特異的に骨量増加の表現型が顕著に観察された。二次評価を行うため#88 及び#103 組換え体蛋白質の調製、正常マウスへの投与を実施した結果、EXPOC®マウスと類似の表現型が再現され、骨疾患(骨粗しょう症、変形関節症、関節リウマチ、悪性腫瘍に伴う骨疾患)治療剤としての用途に関する特許出願(08 年 9 月、09 年 5 月、09 年 9 月の計 3 回)を行った。特異性が高いため長期間の治療が必要とされる骨粗しょう症などの治療薬として今後開発が期待される。

因子#120:#120EXPOC®マウス表現型解析の結果、腎機能や肝機能に副作用を及ぼすことなく血清鉄濃度及び鉄飽和度が低下する事が見出された事から、遺伝性ヘモクロマトーシス、輸血による鉄過剰症、C 型慢性肝炎、糖尿病性腎症、腎不全、腎障害、抗生物質抵抗性感染症など鉄濃度低下が治療に有効と考えられる疾患の治療剤としての用途に関する特許出願(09 年 7 月)を行った。

以上のように、疾患治療ターゲットとなりうる標的因子を 5 種以上同定するという本プロジェクトの目標を達成した。今後は、創薬研究⇒非臨床試験⇒臨床試験⇒新規メカニズムにもとづく医薬品開発に向けた取り組みを行う計画である。(以上、JBIC 分室 9:協和発酵キリン)。

EXPOC®マウス表現型として重要な血中液性因子変動を、当初二次元電気泳動によりモニタリングするシステムの確立に向けた検討・最適化を試み、#37EXPOC®マウス血漿の二次元電気泳動においては、複数のスポット変動検出に成功した。次いでマウス由来血漿を用い、血漿主要蛋白をアフィニティーカラム(アルブミン、トランスフェリン、IgG を吸着)及び限外ろ過法で除去したサンプルを調製した後、二次元電気泳動法及び LC-MS/MS 法にて蛋白質の同定を行った。その結果、LC-MS/M 法において約 0.5  $\mu$ g 程度の総蛋白量で 200 種類程度の蛋白質を同定することに成功した。この同定数は 2D-PAGE で 100-150  $\mu$ g サンプル(LC-MS/MS の約 200 倍量)を用いて同定された数の 10 倍程度に相当することから、LC-MS/M 法の有用性が示された。現在、#126,#127,#131,#132EXPOC®マウス由来血漿サンプルを用いたプロテオーム解析を実施してい

る。

更に、#126,#127,#131,#132EXPOC®マウスを用いた二次評価に注力した。上記4種EXPOC®マウスはそれぞれ以下【#126(赤血球・白血球増加、血性胸水、大腿骨:海綿骨増加)、#127(赤血球・白血球増加、血性胸水、大腿骨:海綿骨増加)、#131(赤血球増加、血小板減少、白血球増加、血性胸水)、#132(T細胞減少)】のような興味深い表現型を示した。#126,#127,#131において造血亢進が認められたことからそのメカニズム解明のため大腿骨及び脾臓組織を用いたFACS解析を実施した。上記3種のEXPOC®マウス全てにおいて大腿骨の海綿骨増加が観察されたため大腿骨骨髓中の赤血球数およびその分化段階にどのような影響が生じているか興味を持たれたが、そのいずれにおいても大きな変化は認められなかった。これに対し3種全てのEXPOC®マウス由来の脾臓において髓外造血の亢進が観察されていることから脾臓組織のFACS解析を行った。その結果、脾臓における赤芽球の割合がコントロールに比べ3因子共にほぼ倍増し、赤血球の割合も#131♀を除き増加傾向にあることが見出された。このことから末梢血で観察された赤血球増加要因の一つとして脾臓の髓外造血亢進が考えられた。また#132末梢血でT細胞数の減少が観察されたことからT細胞減少のメカニズムを解明するため胸腺組織のFACS解析を行った。胸腺組織萎縮のためT細胞数は全ての分化段階でコントロールに比べ少なかったが、細胞総数における割合で比較すると、#132胸腺におけるDP細胞からCD4SP及びCD8SP細胞への分化がコントロールに比べ促進傾向にあることを見出した。今後はこれらの知見と血漿プロテオーム解析で得られる結果を比較・検討することでメカニズム解明を更に進めて行きたい。(JBIC分室9、早稲田大)。

造血系の発生との関連が示唆されている候補遺伝子13種を選抜。うち5種(#21、#22、#166、#167、#168)のEXPOC®マウスについて造血系に着目した解析を実施した。上記EXPOC®マウスは#167を除きそれぞれ以下【#21(白血球増加、T細胞増加)、#22(B細胞減少、脾臓重量減少)、#166(大腿骨:骨端軟骨減少)、#167(顕著な変化無し)、#168(B細胞減少)】のような興味深い変化を示した。

#21、#22についてはC57B6/Jと6回以上戻し交配を行った後、再度末梢血FACS解析を実施した。その結果、特に#22においてB細胞の顕著な減少を観察した。#22の脾臓は野生型に比べ明らかに萎縮していることから脾臓細胞成分の解析を行ったところ、B細胞の顕減が確認された。次に骨髓中の細胞についてFACS解析を行ったところ、造血幹細胞維持の障害とリンパ球前駆細胞の分化異常が観察された。今後Wntシグナル系の変動を中心に解析を進めてゆきたい。

骨髓ストローマ細胞はリンパ造血細胞の増殖・分化を制御する因子を多く提供することが報告されている。免疫状態を人為的にコントロールすることを目的に、骨髓ストローマ細胞株MS-5が産生する分泌・膜蛋白質をSignal trap法で網羅的に解析し、ストローマ細胞特異的な発現遺伝子#166、#167、#168を選出しEXPOC®マウスを作製・評価した(一次評価結果は上記記載)。各EXPOC®マウスの骨髓・脾臓・胸腺・末梢血のリンパ球・造血前駆細胞を解析した結果、大変興味深いことに#166では骨髓において造血幹細胞に対し自己複製への関与が示唆されているSca-1の発現増加傾向が観察され、#168では骨髓においてproB細胞からpreB細胞への分化段階の抑制が観察された。今後、Bリンパ球前駆細胞に対する#168の作用機序解明を進めて行きたい。(JBIC分室9、大阪大学大学院医学系)。

#### 疾患関連遺伝子探索技術の開発における主な成果

ベクター構築	230
ES クローン取得	201
EXPOC®マウス作製	201
EXPOC®マウス表現型解析(一次評価)完了	201
表現型を観察した遺伝子	59
創薬研究への展開	6



## 論文、特許、報道、講演

年度別論文、特許、報道、講演の件数一覧

年度	論文	総説、解説、著書	特許	報道	講演
平成18年度			0		3
平成19年度			2		5
平成20年度	1		4		2
平成21年度			4	2	1
平成22年度			2		1
計	1	0	12	2	12

### 1. 論文

#### (1) 査読のある原著論文

<平成20年度>

1. Tomizuka K, *et al.* R-spondin1 plays an essential role in ovarian development through positively regulating Wnt-4 signaling. *Hum. Mol. Genet.* **17**:1278-1291, 2008

#### (2) 総説、解説、著書

なし。

### 2. 特許

<平成19年度>

1. 特願2007-341080 (H19/12/28)、タンパク質を用いた癌を治療するための方法及び医薬組成物、出願人: キリンファーマ株式会社
2. 特願2007-341096 (H19/12/28)、タンパク質を用いた癌を治療するための方法及び医薬組成物、出願人: キリンファーマ株式会社

<平成20年度>

1. 特願2008-244975 (H20/9/24)、タンパク質を用いた癌を治療するための方法及び医薬組成物、出願人: キリンファーマ株式会社
2. 特願2008-255804 (H20/9/30)、骨疾患治療用医薬組成物、出願人: キリンファーマ株式会社
  - \* PCT/JP2008/073980 (H20/12/26)、平成19年度の特願2007-341096のPCT出願、出願人: 協和発酵キリン株式会社
  - \* PCT/JP2008/073981 (H20/12/26)、平成19年度の特願2007-341080のPCT出願、出願人: 協和発酵キリン株式会社

<平成21年度>

1. 米国(仮出願)61174037 (H21/4/30)、血管障害を抑制するための医薬組成物、出願人: 協和発酵キリン株式会社
2. 特願2009-131449 (H21/5/29)、骨疾患治療用医薬組成物、出願人: 協和発酵キリン株式会社
3. 米国(仮出願)61222665 (H21/7/2)、鉄過剰疾患または鉄濃度を低下させることが有効な疾患に対する治療用医薬組成物、出願人: 協和発酵キリン株式会社
  - \* PCT/JP2009/066996 (H21/9/30)、平成20年度の特願2008-255804のPCT出願、出願人: 協和発酵キリン株式会社

<平成22年度>

- \* PCT/JP2010/057924 (H22/4/28)、平成21年度の米国(仮出願)61174037のPCT出願、

出願人:協和発酵キリン株式会社

\* PCT/JP2010/061286 (H22/7/1)、平成 21 年度の米国(仮出願)61222665 の PCT 出願、

出願人:協和発酵キリン株式会社

### 3. 報道

<平成21年度>

2009 年 10 月 15 日 「協和発酵キリン、抗体医薬の開発加速」 化学工業日報

2009 年 10 月 29 日 「協和キリン、抗原探索を効率化、遺伝子改変新型マウス、抗体  
薬開発に一役」 日経産業新聞

### 4. 講演・学会発表

<平成18年度>

1. 富塚一磨、大島 毅、柿谷 誠、Walter D. Funk、新規成長因子 R-spondin1 の腸管上皮増殖促進作用、第 4 回 幹細胞シンポジウム、2006 年 5 月 19 日～20 日
2. 柿谷 誠、大島 毅、富塚 一磨、トランスジェニックキメラマウスによる分泌性蛋白質の迅速な新規インビボ機能解析システム、第 10 回がん分子標的治療研究会総会、2006 年 6 月 15 日～16 日
3. 柿谷誠、富塚一磨、液性因子の高効率生体内機能解析システム『HSKI システム』を用いた創薬ターゲット同定、JBIC 2006 プロジェクト成果報告会、2006 年 11 月 1 日

<平成19年度>

1. 柿谷誠、富塚一磨、液性因子の高効率生体内機能解析システム『HSKI システム』を用いた創薬ターゲット同定、JBIC 2007 プロジェクト成果報告会、2007 年 11 月 1 日
2. 富塚一磨、High-speed knock-in(HSKI)システムによる創薬ターゲット探索、第 10 回ヒューマンサイエンス総合研究ワークショップ『抗体医薬の現状と課題』、2007 年 11 月 6 日
3. 柿谷誠、堀越かおり、梶川美和、射場優美、大曾根佳尚、牧野詩子、秦敏宏、高木宏晃、来田里奈、池田祥久、太田宇海、加納さやか、小林大祐、河裾明石、石原俊江、大下美雪、内田圭亮、須永由香、菅原ゆり子、佐伽羅純一、生方菜緒里、藤倉綾子、山脇健吾、天貝樹子、西田怜奈、米屋隆、掛田実、池田宗弘、大島毅、岡田勉、富塚一磨、High-Speed Knock-In(HSKI)システムによる分泌蛋白質の機能解析 I:分泌蛋白質の効率的なインビボ機能解析を可能にする HSKI システムの開発、BMB2007、2007 年 12 月 13 日
4. 堀越かおり、青木亜矢子、上田明子、梶川美和、射場優美、大曾根佳尚、牧野詩子、来田里奈、池田祥久、石原俊江、菅原ゆり子、佐伽羅純一、生方菜緒里、藤倉綾子、天貝樹子、大島毅、岡田勉、柿谷誠、富塚一磨、High-Speed Knock-In(HSKI)システムによる分泌蛋白質の機能解析 II:R-spondin ファミリー蛋白質の腸管上皮増殖促進活性、BMB2007、2007 年 12 月 13 日
5. 大島毅、天貝樹子、池田宗弘、堀越かおり、池田祥久、来田里奈、井上あやの、佐伽羅純一、菅原ゆり子、石原俊江、高木宏晃、秦敏宏、藤倉綾子、牧野詩子、射場優美、大下美雪、大曾根佳尚、太田宇海、梶川美和、加納さやか、河裾明石、小林大祐、柿谷誠、富塚一磨、High-Speed Knock-In(HSKI)システムによる分泌蛋白質の機能解析 III:Dkk-1 発現マウスの表現型解析、BMB2007、2007 年 12 月 13 日

<平成20年度>

1. 富塚一磨、「抗体医薬の現状と未来、EXPOC™システムによるターゲット探索」、BTJプロフェッショナルセミナー、2008年10月3日
2. 柿谷誠、富塚一磨、「分泌蛋白質の高効率インビボ機能解析システムを用いたターゲット探索」、JBIC 2008 プロジェクト成果報告会、2008年10月31日

<平成21年度>

1. 柿谷誠、富塚一磨、「液性因子の高効率生体内機能解析システム『EXPOC システム』を用いた創薬ターゲット同定」、JBIC 2009 プロジェクト成果報告会、2009年10月30日

<平成22年度>

1. 柿谷誠、富塚一磨、「液性因子の高効率生体内機能解析システム『EXPOC システム』を用いた創薬ターゲット同定」、JBIC2010 プロジェクト研究成果報告会、2010年10月29日

## 5. その他

1. 液性因子の高効率生体内機能解析システムを「EXPOC」として日米欧及び中国において商標登録した。

- 1.出願国:EU、登録番号:007288939、登録日:2009/6/25
- 2.出願国:日本、登録番号:第 5246609 号、登録日:2009/7/10
- 3.出願国:アメリカ、登録番号:3836546、登録日:2010/8/2
- 4.出願国:中国、登録番号:6987310、登録日:2010/10/7

## 2. 翻訳プログラミングに基づく統一的なスクリーニング系の構築(RAPID システム開発)

### <⑥化合物等の高機能化技術の開発>

研究体制:JBIC 分室 16(JBIC)味の素、田辺三菱製薬

共同研究:東京大学先端科学技術研究センター

### 2.1 はじめに

19世紀以降、医薬品開発の中心は有機合成化学に支えられた有機小分子薬剤であった(図1)。長年の経験によって小分子のメディシナルケミストリーの技術・知見が確立していること、開発コストが比較的安価であることや、低分子であるため細胞膜を透過でき経口投与も可能、また免疫原性も持たないことなどが、その理由と言えよう。しかしながら、化合物ライブラリーからリード化合物の探索を行った後、構造活性相関解析を重ね、目的の活性や選択性を持つ化合物を得るという従来の開発手法は多くの問題点も抱えている。その一例としては、化合物ライブラリーの多様性を大きくするのが難しい( $\sim 10^7$ )、スクリーニングや構造活性相関に多くの時間を費やす、標的との結合表面積が小さいため特異性を得るのが困難(つまり副作用が出やすい)、などが挙げられる。コンビナトリアルケミストリーを用いた大規模ライブラリーの構築や、標的タンパク質の結晶構造を基にリード化合物を論理的に設計するアプローチも近年では行われているが、いずれも限界や問題点を抱えている。

近年、抗体やタンパク質を薬剤として利用するバイオ医薬品が増えてきている。これらバイオ医薬品は一般的に標的タンパク質に高い特異性で作用し、副作用を抑えつつ強力な薬効をしめすことができ、また遺伝子工学を用いることで大規模なライブラリーから目的分子の探索を行えるという長所を持つ。しかしながら、高コスト生産、タンパク質によっては免疫原性をもつ等の問題に加え、本質的な欠点として細胞膜を透過できないという課題がある。小分子医薬とバイオ医薬の中間的な性質を医薬品として、ペプチド医薬品もかなり以前から期待はされていたが、通常の30残基程度の短鎖ペプチドでは十分な生体安定性が獲得できず、医薬品としてはそれほど魅力的な化合物とは考えられていなかった。こういった背景の中、近年、「特殊ペプチド医薬品」が新たな医薬品開発の潮流として注目を集めている。ここでいう「特殊ペプチド」とは、タンパク質合成に使われる20種類のアミノ酸をはじめとする「ありふれた」L体の $\alpha$ アミノ酸だけで構成されておらず、D体アミノ酸・N-メチルアミノ酸・N末端脂肪鎖修飾・大環状骨格などといった「特殊」骨格を含むペプチド一般を指す。上に例を挙げた特殊骨格は、ペプチダーゼなどに対する生体内安定性の向上・膜透過性の上昇に寄与し、通常のペプチド医薬の欠点を補うことができるため、特殊ペプチドは医薬品として高いポテンシャルを持つと期待される。しかし、これまでに実用化された特殊ペプチド医薬品は、ほぼ全て天然物由来のものであり、十分な構造・配列多様性を持ったライブラリーからの新規化合物の探索は実質上不可能であった。

我々は、この問題を解決する手法として、RAPIDS (RANdom Peptide Integrated Discovery System) システムを本事業の中で開発し、それを信頼できる技術として成熟させた。RAPIDS では、タンパク質生合成系である翻訳反応と進化分子工学的手法を活用し、特殊ペプチドの大規模ライブラリーの構築と、そこからの生理活性ペプチドの探索とを同時並行で行うことで、迅速な新規生理活性特殊ペプチドの探索を可能にする技術である。本技術の最大の特徴は、当該研究室で独自に開発された人工アミノアシル tRNA 合成触媒である「フレキシザイム」を翻訳合成系と組み合

わせることで、通常の翻訳合成系ではタンパク質性アミノ酸に限定されていた遺伝暗号を、特殊アミノ酸を含む遺伝暗号へとリプログラミングし、さらに 翻訳合成系の鋳型依存性を活用することで大きな多様性を持つ特殊ペプチドライブラリーを迅速に且つ安価に構築することが可能である。すなわち、ランダム配列を持つ mRNA ライブラリーを翻訳反応系に加えるだけで、100  $\mu$ L のスケールで翻訳反応を行うだけで免疫系がもつ抗体の多様性をゆうに越える多様性 ( $>10^{13}$ ) を持つライブラリーが一挙に構築できる。さらには、mRNA は逆転写反応とそれに続く PCR により増幅ができ、クローニング・シーケンシングによる塩基配列の決定が可能であるため、化合物の再合成やデコンボリューションも容易であるという長所も併せ持つ。この基盤技術に対し、進化分子工学的手法、すなわち無細胞ディスプレイ系を組み合わせることによる活性ペプチドのスクリーニングを用意に行えるという大きなメリットもある。当該研究プロジェクト前半年度(平成 18~20 年年度)においてこの RAPIDS の開発を進め、プロジェクト後半年度(平成 20~22 年度)では技術の有用性・汎用性を実証すべく、東大研究室内の in-house 開発研究だけでなく、当該研究プロジェクト参画企業との「課題解決型」開発研究をスタートさせた。

## 2.2 成果1:チオエーテル結合環状特殊ペプチドライブラリーの RAPID 合成(平成 18 年度)

天然物として単離される特殊ペプチドのほとんどは、環状構造をもっている。ペプチド鎖が環状構造になることで、構造が固くなり単一の3次元構造を保てるため標的蛋白質への結合能が上昇する。また、環状化することでプロテアーゼ耐性も獲得できる。したがって、創薬の観点から、環状型特殊ペプチドを容易に合成する技術を開発する事は不可欠である。そこで、我々は、非還元型(ジスルフィド架橋ではない)結合で環状化できる種々の技術の開発を行った。その中でも、ライブラリー合成の視点から、翻訳後自発的に環状化することができるチオエーテル結合を介した環状化技術は、成果2で述べる末端環状化技術と共に特に有用である。また、GPCR の一つであるウロテンシンレセプターに結合するアゴニストペプチドのジスルフィド結合をチオエーテル結合に置き換えても、その活性が保持し、さらに実際にペプチダーゼ耐性が生まれる事も証明することに成功した(Sako *et al.* ACS Chemical Biology, 2008)。また、本技術が実際に環状化特殊ペプチドライブラリーの合成を可能にしてくれるかを実証するために、ペプチド鎖に2カ所ランダム残基を有するペプチド鎖を合成できる鋳型 DNA ライブラリー160 種類を作製し、特殊ペプチドのコンビナトリアル合成を行った。無作為に翻訳産物をサンプリングして MALDI-TOF 解析した結果、いずれのペプチドにおいても予測される環状化ペプチドが合成できている事が判明した。この技術の確立により、**成果3**で述べるディスプレイとの融合へ道筋をつけた。

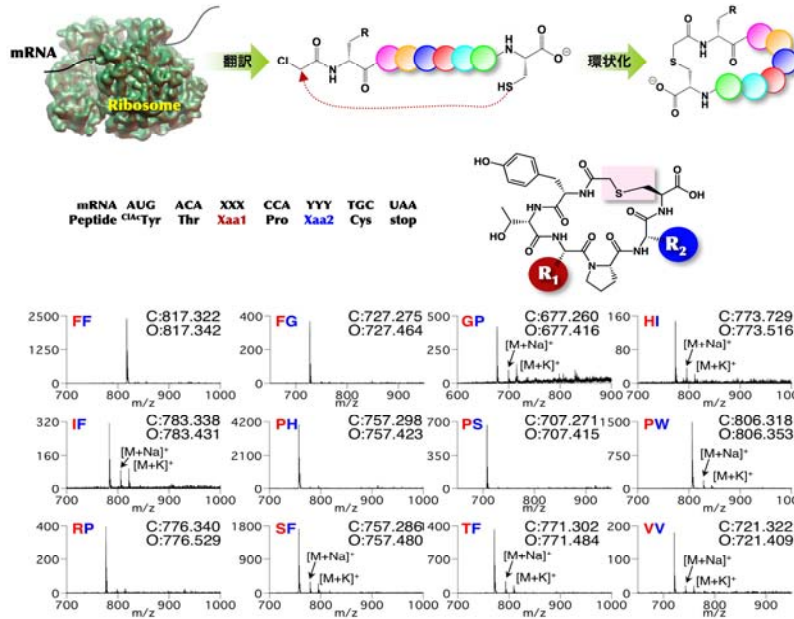


図 2.2-1 チオエーテル結合環状特殊ペプチドとそのコンビナトリアル合成、および無作為サンプリングによる翻訳生成物(特殊ペプチド)の MALDI-TOF 解析

## 成果2: $\theta$ -defensin ライクなペプチドの RAPID 合成(平成 19 年度)

$\theta$ -defensin は、defensin ペプチドファミリーの最も低分子量の天然ペプチドとして単離された末端主鎖環状型ペプチドで、内部に3つのジスルフィド架橋結合を有する。このペプチドは、多彩な機能を発揮し、抗ウイルス剤として、また抗菌剤として作用する。そのメカニズムは明らかではないが、ウイルスに対してはヒト細胞へのエントリーを阻害している可能性が示唆されており、また細菌に対しては膜形成を破壊している可能性が示唆されている。いずれにせよ、 $\theta$ -defensin の末端主鎖環状内部架橋型構造が機能発現に重要な役割を果たしている事は明らかで、類似の構造をもち様々な配列をもった末端環状化できるペプチドを合成できる技術を開発する事は、標的に特化した機能をもつ末端環状型特殊ペプチドを探索する上で非常に有用である。また、同様の構造で、内部に1つのジスルフィド架橋結合をもつ末端主鎖環状ペプチド、シクロタイドも天然物として発見されている。このペプチドは幅広いトリプシン類プロテアーゼ阻害活性をもっており、この種のペプチドをライブラリー化するのも非常に興味深い。そこで、我々はこれら一連のペプチド向けのランダム特殊ペプチド翻訳合成技術の開発に着手し、平成 19 年度内に達成した。

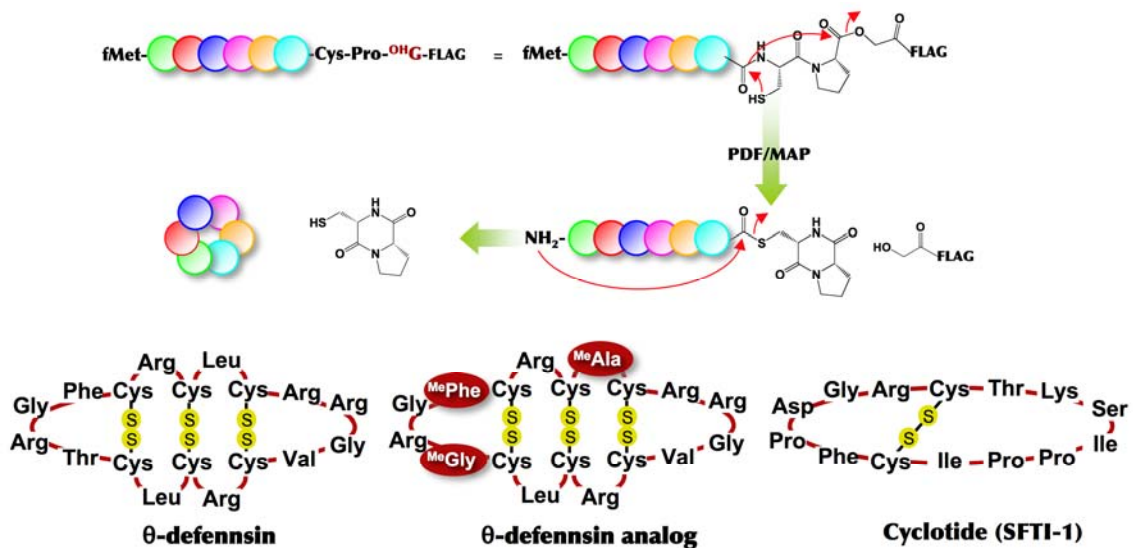


図 2.2-2 末端主鎖環状型特殊ペプチドの翻訳合成法、および翻訳合成に成功した  $\theta$  defensin、その N-methyl 化アナログ、シクロタイド骨格をもつペプチド

鍵となった技術は以下の2つである。(1) 翻訳系内に 翻訳系内にペプチド脱ホルミル酵素 (PDF) とメチオニンアミノペプチダーゼ (MAP) を共存させることで N 末端の fMet を切除し、N 末端アミンをもった残基を形成させる。特に、上記の環状ペプチドにおいては、Cys 残基を使う事で、続くチオエステル C 末端形成技術が生きる。(2) C 末端には Cys-Pro-<sup>OHG</sup> (<sup>OHG</sup> は Glycolic acid で、遺伝暗号リプログラミングを用いたセンスサプレッションを導入) を導入する事で、<sup>OHG</sup> の脱離を伴った N→S 転位が起き、この脱離により平衡をトラップさせることで、チオエステルを C 末端に生成させる。これら2つの方法論を組み合わせる事で、N 末端 Cys 残基の側鎖が自発的に C 末端チオエステルとチオエステル交換反応を起こし、さらに近傍の N 末端アミノ基が S→N 転位反応を起こす事で、自発的に末端の閉環が起きる画期的な技術の開発に成功した。この技術で、 $\theta$ -defensin および SFTI-1 の翻訳合成に成功している。さらに、翻訳合成された前者は炭疽致死因子プロテアーゼの阻害活性を有し、また後者はトリプシンの阻害活性を有している事が確認された。

さらに SFTI-1 の部分配列をランダム化したライブラリーを構築、96 穴プレートの各穴に 100 種類混ざった状態のペプチドライブラリーから、活性種を含む穴を決定し、さらにそれを限界希釈・増幅によりデコンボリューションすることを2回繰り返すことで、SFTI-1 と同等の変異体を同定した。この技術の確立により、RAPIDS は並行スクリーニングにも応用が可能であることを示した。

### 成果3: RAPID ディスプレイ技術の構築(平成 20 年度)

mRNA ディスプレイとは、ファージディスプレイの in vitro 版、すなわち genotype と phenotype を繋げる事で phenotype を genotype 上に提示、標的蛋白質への活性種選択後、その配列情報を genotype から取得し増幅させる技術である。具体的には、3'末端にピューロマイシンで修飾した mRNA を用いる事で、翻訳されたペプチドを翻訳終止の代わりにピューロマイシンで捕獲、ペプチドと mRNA の共役体を創る。本研究プロジェクトが開始して以来、この技術に我々の RAPIDS を融合させる事で mRNA 上に特殊ペプチドを提示させる新技術の開発に取り組み、既存の mRNA ディスプレイに様々な改良と条件検討を行う事で、その技術の確立に成功した。この技術を「RAPID デ



ディスプレイ」と呼ぶ。この技術の開発により、 $10^{12}$  に及ぶ高多様性特殊ペプチドライブラリーを1本のチューブで、安価に探索できるようになった。特に本技術では、**成果1**で述べたチオエーテル環状化特殊ペプチドライブラリーを用いる。このチオエーテル環状化特殊ペプチドは、**成果1**で述べたように高いペプチダーゼ耐性を有する事が、我々の様々な研究で既に明らかになっており、この種のペプチドをライブラリー化することは特殊ペプチド薬剤の開発に有用であることが示唆されている。したがって、このRAPIDディスプレイの確立は、今後様々な標的蛋白質に対する特殊ペプチドの探索に非常に有効であり、続く**成果4**でその革新さが実証された。

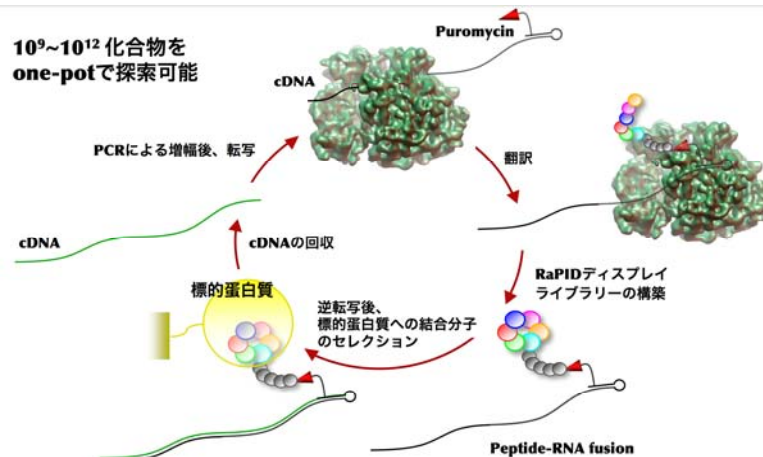


図 2.2-3 RAPID ディスプレイ技術の概要

#### 成果4: RAPID ディスプレイを用いた in-house 開発研究(平成 21 年度・平成 22 年度)

当該開発研究では、平成 20 年度までに完成した RAPID システムを駆使して、細胞膜外あるいは膜内タンパク質を標的に選び、特殊ペプチド薬剤の探索セレクションをおこなった。細胞膜外タンパク質の標的としては、EpCAM(Epithelial cell adhesion molecule)を選び、特殊ペプチドのセレクションを行った結果、6種の環状特殊ペプチドの同定に成功した。そのうち、2種の特殊ペプチドに関しては配列の化学合成により十分量を獲得、SPR 機器を用いてそれらの解離定数(Kd)を決定した結果、両化合物ともに2nM の解離定数を有していた。そのうち、1種については FITC 蛍光標識を行い、EpCAM 発現細胞であるヒト乳がん細胞 MCF7 を染色したところ、細胞外壁を染めることに成功した。EpCAM 非発現細胞では、全く染色が確認できないことから、この特殊ペプチドは抗体並みの選択性をもつことが示唆された。特筆すべき点は、癌細胞を密に培養した場合は、抗 EpCAM 抗体での染色においては細胞層の培養液に暴露している上部しか染色できないのに対し、特殊ペプチドは全ての層の細胞において染色が可能であったことである。これは特殊ペプチド(2,000Da 程度)の分子サイズが抗体(150,000Da)に比べて小さいため、重なり合った細胞の接触部位にすら入り込み染色できるからだと考えられ、患部の癌組織を完全に染色できる新規診断薬としての今後の開発の可能性が拓けたと考えている。

細胞内標的については、子宮頸癌の標的として期待される E6AP とエピゲノムに関連し種々の癌細胞増殖に関与しているといわれる Sirt2 を標的に選び、2つの異なるデザインの特特殊ペプチドライブラリー(N-メチル主骨格もつ特殊環状ペプチド、ならびに Warhead 低分子をもつ特殊環状ペプチドライブラリー)をあてることで、技術の実証検討をおこなった。その結果、両標的に対し、解離定数において 0.5~2.0nM をもち、且つ標的酵素の機能阻害を示す特殊ペプチド(E6AP に対し



ては4種、Sirt2 に関しては3種)が同定できた。これらのペプチドについては、研究室内及び外部共同研究者と共に生理活性評価がなされ、その生理活性が確認された。

#### 成果5: RAPID ディスプレイを用いた「課題解決型開発研究」(平成 22 年度・平成 23 年度)

当該研究プロジェクトに参加している3社の企業から、それぞれ1種の標的蛋白質、計3種に対し特殊ペプチドのセレクション探索をおこなった。詳細については、秘密保持の関連から記載できないが、いずれの標的に関しても、標的に高い親和性を有する特殊環状ペプチドの獲得に成功した。特に、そのうち2種の標的に対して獲得できた特殊環状ペプチドについては、解離定数において数 nM レベルであり、既にその生理活性機能も確認できている。これにより、本技術の有用性が実証された。他の標的に対して得られた特殊環状ペプチドについても、現在生理活性機能、動物での検証を各社で進めているところである。

#### 【論文】

平成 22 年度

Y. Ohshiro, E. Nakajima, Y. Goto, S. Fuse, T. Takahashi, T. Doi, H. Suga\* “Ribosomal synthesis of backbone-macrocylic peptides containing  $\gamma$ -amino acids”, **ChemBioChem** in press (2011)

Y. Goto, T. Katoh, H. Suga\* “Flexizymes for genetic code reprogramming” **Nature Protocols** in press (2011)

T.-J. Kang, Y. Hayashi, H. Suga\* “Synthesis of a Backbone-cyclic Peptide SFTI-1 Promoted by the Induced Peptidyl-tRNA Drop-off” **Angewandte Chemie International Edition** 50, 2159-2161 (2011).

G. Hayashi, Y. Goto, H. Suga\* “Ribosome evolution for two artificial amino acids in *E. coli*” **Chemistry&Biology** 17, 320-321 (2010).

平成 21 年度

T. Kawakami, A. Ohta, M. Ohuchi, H. Ashigai, H. Murakami, H. Suga\* “Diverse backbone-cyclized peptides via codon reprogramming” **Nature Chemical Biology** 5, 888-890 (2009)

N. Niwa, Y. Yamagishi, H. Murakami, H. Suga\* “A flexizyme that selectively charges amino acids activated by a water-friendly leaving group” **Bioorganic Medicinal Chemistry Letter** 19, 3892-3894 (2009).

Y. Goto, K. Iwasaki, K. Torikai, H. Murakami, H. Suga\* “Ribosomal synthesis of dehydrobutyrine- and methyllanthionine-containing peptides” **Chemical Communication** 3419-3421 (2009).

Y. Yamagishi, H. Ashigai, Y. Goto, H. Murakami, H. Suga\* “Ribosomal synthesis of cyclic

peptides with a fluorogenic oxidative coupling reaction” **ChemBioChem** *10*, 1469–1472 (2009).

E. Nakajima, Y. Goto, Y. Sako, H. Murakami, H. Suga\* “Ribosomal synthesis of peptides with C-terminal lactams, thiolactones, and alkylamides” **ChemBioChem** *10*, 1186–1192 (2009).

Y. Goto, H. Suga\* “Translation initiation with initiator tRNA charged with exotic peptides” **Journal of the American Chemical Society**, *131*, 5040–5041 (2009).

H. Murakami, A. Ohta, H. Suga\* “Bases in the anticodon loop of tRNA(GGC)(Ala) prevent misreading” **Nature Structural & Molecular Biology**, *16*, 353–358 (2009).

#### 平成20年度

T. Kawakami, H. Murakami, H. Suga\* “Ribosomal synthesis of polypeptoids and peptoid-peptide hybrids” **Journal of American Chemical Society** *130*, 16861–16863 (2008).

T.-J. Kang, S. Yuzawa, H. Suga\* “Expression of histone H3 tails with combinatorial lysine modifications under the reprogrammed genetic code for the investigation on epigenetic markers” **Chemistry & Biology** *15*, 1166–1174 (2008).

A. Ohta, H. Murakami, H. Suga\* “Polymerization of  $\alpha$ -hydroxy acids by ribosomes” **ChemBioChem** *9*, 2773–2778 (2008).

H. Xiao, H. Murakami, H. Suga, A. R. Ferre-D’Amare “Structural basis of specific tRNA aminoacylation by a small in vitro selected ribozyme” **Nature** *454*, 358–361 (2008).

Y. Goto, H. Murakami, H. Suga\* “Initiating translation with D-amino acids” **RNA** *14*, 1399–1410 (2008).

Y. Sako, Y. Goto, H. Murakami, H. Suga\* “Ribosomal synthesis of peptidase-resistant peptides closed by a non-reducible inter-sidechain bond” **ACS Chemical Biology** *3*, 241–249 (2008).

Y. Goto, A. Ohta, Y. Sako, Y. Yamagishi, H. Murakami, H. Suga\* “Reprogramming the initiation event in translation for the synthesis of physiologically stable cyclic peptides” **ACS Chemical Biology** *3*, 120–129 (2008).

T. Kawakami, H. Murakami, H. Suga\* “Messenger RNA-directed incorporation of multiple N-methyl-amino acids into linear and cyclic peptides” **Chemistry & Biology** *15*, 32–42 (2008).

#### 【講演・学会】

下記の発表者は全て、菅裕明単独。

#### 平成22年度

- ・ 1.29.2010      The 75<sup>th</sup> Israel Chemical Society Meeting, Israel
- ・ 3.1.2010      2010 Chemistry & Biology of Peptides Gordon Research Conference, Ventura/California, USA
- ・ 3.10.2010     Stanford University, Departmental Seminar in Chemistry and Biochemistry, California,

## USA

- 3.27.2010 Annual Meeting of Japanese Chemical Society, Tokyo, Japan
- 4.23. 2010 University of California Irvine, Biochemistry Departmental Seminar, USA
- 4.27. 2010 The 2010 Annual Meeting of the American Society for Biochemistry and Molecular Biology, USA
- 4.30. 2010 Stanford University, Chemical and Systems Biology Departmental Seminar, California, USA
- 5.14. 2010 Yale University, Symposium of Chemical Biology, Connecticut, USA
- 6.5. 2010 Sendai Banyu Symposium, Sendai, Japan
- 7.7. 2010 Annual Meeting of the Japanese RNA Society, Tokyo, Japan
- 9.18. 2010 Symposium of the Strategic Japanese–Swedish Cooperative Program on “Multidisciplinary BIO”, Kyoto, Japan
- 9.20. 2010 Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan, Sendai, Japan
- 10.1. 2010 Structural Epigenetics Symposium, Yokohama RIKEN, Japan
- 10.27. 2010 RIKEN Chemical Biology Symposium, Wako, Japan
- 11.18. 2010 29<sup>th</sup> Medicinal Chemistry Symposium, Kyoto, Japan
- 12.8. 2010 5<sup>th</sup> International Peptide Symposium, Kyoto, Japan
- 12.18. 2010 PacifiChem 2010, Honolulu, USA
- 1.4. 2011 22<sup>nd</sup> Enzyme Mechanisms Conference, St. Pete beach FL, USA
- 1.21. 2011 Royal Society discussion meeting: Chemical Origins and Early Evolution, London, UK

## 平成21年度

- 9.8.2009 Naito Foundation Conference in Chemical Biology, Sapporo, Japan
- 9.12.2009 Swiss–Japan Biomolecular Chemistry Symposium, Tokyo, Japan (as an organizing chair)
- 9.15.2009 Vanderbilt University Medical Center, Departmental Seminar, Nashville, USA
- 9.18.2009 University of Illinois Urbana–Champaign, Departmental Seminar in Biochemistry, Urbana, USA
- 9.23.2009 Harvard Medical School, Departmental Seminar in Genomics, Boston, USA
- 9.29.2009 JSPS 2<sup>nd</sup> HOPE Meeting, Hakone, Japan
- 10.16.2009 The 1<sup>st</sup> International Conference for Circular Protein, Heron Island, Australia
- 10.26.2009 Peptide Engineering: Therapeutic Peptide” Fifth Peptide Engineering Meeting, Barcelona, Spain
- 11.1.2009 Institute for Research in Biomedicine, Barcelona, Spain
- 11.4.2009 Nottingham ‘New Horizons’ meeting 2009, Nottingham, UK
- 11.6.2009 University of Oxford, Departmental Seminar in Chemistry, Oxford, UK
- 11.9.2009 The 3<sup>rd</sup> Asia–Pacific International Peptide Symposium, Jeju Island, Korea
- 1.29.2010 The 75<sup>th</sup> Israel Chemical Society Meeting, Israel
- 3.1.2010 2010 Chemistry & Biology of Peptides Gordon Research Conference

· 3.10.2010 Stanford University, Departmental Seminar in Chemistry and Biochemistry, USA

平成20年度

· 6.26.2008 Nanyang Technological University, Singapore

· 8.28.2008 The 17th International Meeting of Methods in Protein Structural Analysis, Sapporo, Japan

· 9.11.2008 Aminoacyl-tRNA Synthetase Meeting 2008, Veyrier du Lac, France

· 9.16.2008 International Symposium on Molecular Recognition of DNA: Biological Applications, Tokyo, Japan

· 10.30.2008 Japanese-German Frontier of Science, Heidelberg, Germany

· 11.12.2008 RIKEN International Conference in Chemical Biology, Narita, Japan

· 1.8.2009 ETH Zurich, Departmental Seminar in Organic Chemistry, Zurich, Switzerland

· 2.3.2009 Montana State University, Biofilm Engineering Conference, Montana, USA

## 第4章 中間評価実施年度(平成20年度)までに終了した研究開発

### 1. 疾患関連遺伝子探索技術の開発

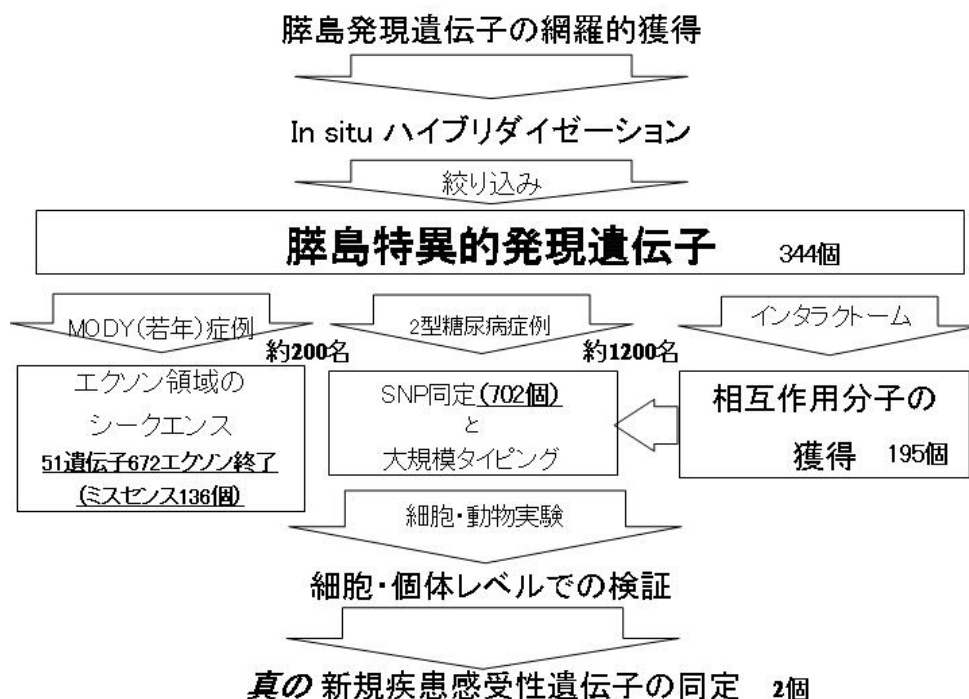
#### <④疾患関連遺伝子探索技術の開発>

実施体制: JBIC 分室 1 (JBIC)

共同研究: 岐阜大学、群馬大学

糖尿病、高脂血症、高血圧などの生活習慣病は「ありふれた疾患」であり「多遺伝子型疾患」である。これらの疾患は生活習慣(環境因子)と体質(遺伝因子)が複雑に絡まり合い表現型のクリアな分類ができないため遺伝学的解剖が非常に困難であり、「遺伝学者の悪夢」と呼ばれているが、ゲノム上に高密度に存在している SNPs(単純塩基多型)を用いて何とか原因遺伝子同定は可能となってきた。しかし遺伝子多型解析に偏った方法論では原因となる「多遺伝子型疾患」を構成する全ての原因遺伝子を網羅することは極めて困難である。その上莫大な研究資金がかかるし、現在まで数多く施行されたにも係らず、結果ははかばかしくない。そこで、すべからず遺伝子はタンパク質に翻訳され、他の生体構成分子と相互作用することにより機能するという観点に注目し、疾患候補遺伝子をタンパク質相互作用ネットワーク解析に繋げることにより、高効率に疾患の発症メカニズムの解明に結びつけるという新規戦略を展開した。本研究項目では現在までに獲得している糖尿病ゲノム資源をもとに、新規糖尿病候補分子を同定し、それらをタンパク質ネットワーク解析に供する。その結果新たに得られた新規相互作用から新規糖尿病候補遺伝子群を同定するとともに、真の疾患発症メカニズムを解明することを目的とする。

ラットの膵島から獲得した発現遺伝子(EST)をプローブとして膵島特異的に発現する遺伝子を獲得すべく膵臓切片を用いて大規模 *in situ* ハイブリダイゼーションを合計 6,948 個展開し 344 個の膵島高発現遺伝子を獲得した。内訳はインスリン分泌能のある正常膵島から 135 個、インスリン分泌能のない RINm5F と共通に発現しているものが 188 個、RINm5F のみで発現しているものが 21 個である。組織発現をチェックしユビキタスなものを除いて、現在まで約 14 個の膵島特異的遺伝子を確保した。また既知の全ゲノム関連解析の日本人での検証により 6 個の感受性遺伝子を同定した。上記のプロセスで得られた 20 個の新規糖尿病候補遺伝子のうち 11 個を相互作用タンパクの網羅的獲得のためタンパク質ネットワーク解析システムに供した結果、新規糖尿病相互作用分子 195 個を同定した。



疾患関連遺伝子探索技術の開発における主な成果

新規舘島高発現遺伝子の同定	344
新規糖尿病候補遺伝子の同定	20
新規糖尿病相互作用分子の同定	195
新規糖尿病候補多型	702
新規糖尿病相互作用分子の個体での検証から創薬への展開	1

### 舘島高発現の液性因子同定

ラットの舘島を用いて大規模 *in situ* hybridization を施行しながら、Signal P などのコンピュータプログラムや遺伝子オントロジーを用いて、前年度までに、最終的に膜タンパクなどを除いた 84 個の舘島分泌タンパクをラット既知遺伝子群より獲得した。その内からトランスクリプトーム解析により舘島高発現の 3 個の分泌タンパク secretin-1, secretin-2, secretin-3 を獲得した。secretin-1 は舘 b 細胞や肝臓、脂肪細胞、網膜、血管および腎で発現しており、肥満マウスの脂肪組織での発現増加や、インスリン刺激や高脂肪食の摂取による脂肪組織で発現が増加する。secretin-2 の発現は主として胃や顎下腺、下垂体といった臓器で、作用としては血圧降下作用が最も知られているが、食物排泄を遅らせたり食欲を抑制することも知られている。secretin-3 は Wnt シグナル関連分子であり  $\beta$  細胞の増殖との関連が考えられる。このうち secretin-1 の血中濃度と動脈硬化指数を始めとした糖尿病関連量的形質との関連を検討した。分泌タンパクは病態への有効性が判明した場合、すぐに投与可能でありそのものが臨床応用に直決するため実用性が極めて高いのが魅力である。

対象は、当院に入院中の 2 型糖尿病患者男性 65 人、女性 36 人、計 101 人とした。血中

secretin-1 濃度は、男女別では空腹時男性 10.3±8.4ng/ml、女性 8.8±4.5ng/ml、食後 2 時間で男性 9.5±7.4ng/ml、女性 8.4±4.6ng/ml であり、男女間で有意差を認めなかった。また年齢、BMI、罹病年数、eGFR、血糖値、C ペプチド、HbA1c、動脈硬化マーカーである baPWV や平均 IMT と空腹時および食後 2 時間血中 secretin-1 値に相関は見られなかった。

次に対象症例のうちスルフォニルウレア薬とインスリンを使用していなかった 28 人(男性 15 人、女性 13 人)のみについて、同様の解析を行ったところ、少ないサンプル数ではあるが、食後 2 時間での血中 secretin-1 値と血中 C ペプチド濃度の間に正の相関を認めた( $p=0.0046$ 、 $r=0.513$ )。

以上より、血清 secretin-1 濃度がインスリン分泌のサロゲートマーカーとなる可能性が示唆され、もしインスリン分泌低下に先行するならインスリン分泌予備能の予知的マーカーとなりうると考えられた。

### 新規糖尿病関連分子の個体での検証

2 型糖尿病感受性遺伝子カルパイン 10 の関連分子を、6 種類(ID 0514,1312, 1337, 1345, 3424, 7705)を獲得した後、先ずもっとも頻度高く相互作用が認められた ID3424 に注目した。先ず ID3424 のノックアウトマウスでは、高インスリン血症が認められ、肝、筋肉でのインスリン抵抗性が主たる糖尿病病態要因であることを明らかにした。反対に、カルパイン 10 或いは ID3424 のアデノ過剰発現したマウスを作成したところ、空腹時あるいは随時血糖低下を認め、ID3424 の過剰発現が糖尿病治療に繋がる事を明らかにした。

そして糖尿病肥満モデル動物 ob/ob マウスに ID3424 を過剰発現させ、高インスリン血症や耐糖能が改善することを実証した。既にカルパイン発現調節薬が糖尿病治療において有効である可能性を細胞レベルで示していたが、ID3424 の高発現が、糖尿病治療に繋がる可能性も明らかになったため、さらにこのレポーターシステムを放線菌ケミカルライブラリースクリーニング系に供して、約 3 倍程度活性を上げる 2 型糖尿病の新規予防剤・治療剤の候補化合物を最終的に 1 個獲得した。

その後さらに、10 世代 C57BL/6J と交配を繰り返しバックグラウンドを均一にして、引き続き耐糖能について検討したところ、ノックアウトマウスでは同週齢で野生型に比べて、小さいながらも耐糖能は悪く、さらに培養肝細胞では糖新生の亢進が認められ、同マウスの耐糖能障害の 1 部は、糖新生能の亢進によることも再認識された。

### 獲得化合物の糖尿病モデルマウスでの評価

#### 抗がん剤 Versipelostatin(VST)の糖尿病治療薬としての可能性

Versipelostatin は、グルコース飢餓状態による GRP78 の誘導を阻害することでアポトーシスを誘導し、抗がん剤として作用する。糖尿病治療薬としてよく使用されるメトホルミンにも VST と同様の GRP78 発現阻害作用がみられることから、今回我々は糖尿病治療薬としての可能性について検討した。メトホルミンは肥満合併糖尿病に特に有効な糖尿病治療薬であるので、2 種類の異なる肥満糖尿病モデルマウスを用いて VST の糖尿病改善効果を検討した。しかし高脂肪食負荷肥満マウス、ob/ob マウスとも VST 投与による血糖改善作用はみられなかった。最近の報告では、GRP78 の過剰発現は、脂肪肝の改善やインスリン抵抗性の改善につながることや、 $\beta$  細胞の小胞体ストレスの解除につながるとされている。したがって、VST

の投与により GRP78 の発現抑制が生じることにより、耐糖能が悪化する場合も考えられ、がん患者の治療で VST を投与する際には、高血糖惹起の可能性に留意し、血糖測定が必要であることが示唆された。

#### **既知の糖尿病薬の相互作用タンパクの獲得と薬効機構の解明**

また薬剤の分別化のため既知の各種高脂血症、糖尿病治療剤の相互作用タンパクの獲得も進めており、糖代謝関連の多面的作用が認められる薬剤を順に LS/MS/MS の系に供して化合物関連タンパクの網羅を進め、GLP-1 関連製剤(DPPIV 阻害剤)に関して解析を終了した。



## 2. *in vitro* および生細胞内分子間相互作用高速検出装置の開発

### <⑤化合物等の探索技術の開発>

実施体制:JBIC 分室 12(JBIC)

共同研究:北海道大学、産業技術総合研究所

蛍光タンパク質を利用したタンパク質間相互作用解析技術の高感度を達成するためにストークスシフトの大きな Keima タンパク質等を利用して、1 波長励起 2 波長蛍光検出システムの簡便なシステムを構築し試験管内または生細胞内に化合物スクリーニング法を確立する。(平成 18-19 年度)

ひとつのレーザー発振波長で FCCS を行う技術、または 2 つのレーザー発振波長で相互相関のシグナル・ノイズ比を高めるような光学系技術を用いて、細胞内外の分子間相互作用を高速に検出する装置を開発し、ハイスループット化をも目指した。

蛍光相互相関分光装置 (FCCS) は 2 種類の蛍光色素標識の蛍光強度の同時検出を行うことで高感度に分子間相互作用を検出する方法である。しかし一方で、FCCS 測定においてはこれまで 2 種類の蛍光色素をそれぞれ励起する場合別々に二つの励起光源(レーザー光)が必要とされた。しかし、光学的に波長の異なる 2 種類のレーザー光を光の回折限界まで絞り、サブミクロンオーダーで 3 次元的に一致させることは簡単なことではない。波長が異なることに由来する水、ガラス、細胞質の屈折率の違いや色素間の波長のオーバーラップなどによるシグナルの分離の不完全(クロストーク)など、さまざまな要因が測定に影響を及ぼす。このような複雑な要因を調整していくことが産業化の大きな負担となっていた。そこで近年の蛍光蛋白テクノロジーを利用することで一つの励起波長で様々な蛍光発光を可能とするような組み合わせを検討し、実際に装置の改良と合わせて、CFP または MiCy と Keima を 1 波長で同時に励起することで、より簡便に、より高感度に分子間相互作用を検出する装置の開発と実際のスクリーニング系の構築が課題である。

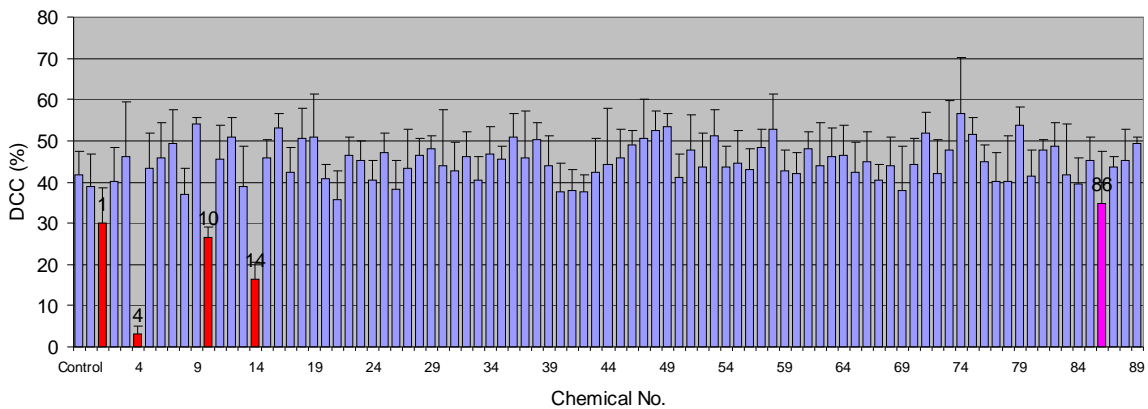
### 成果1:装置の改良

これまで 1 波長励起 1 波長検出装置である蛍光相関装置(FCS)に検出器を 1 台増設することで装置の改良を行った。具体的には光軸の調整とフィルターの調整を行い、MiCy の蛍光が 0.9 から 2.5、Keima が 2.0 から 4.2 へ増加した。それぞれの検出効率を 2.7 倍、2.1 倍に増加させた。このことは総合的には 30 倍の検出感度の増強となった。検出感度の増加により、1 分子検出感度の増強と測定時間の短縮が可能となった。しかしながら、一次スクリーニングを行なうだけの膨大なサンプル数をこなせるスピードアップには至らなかった。

### 成果2:*in vitro* および細胞でのスクリーニング系の確立

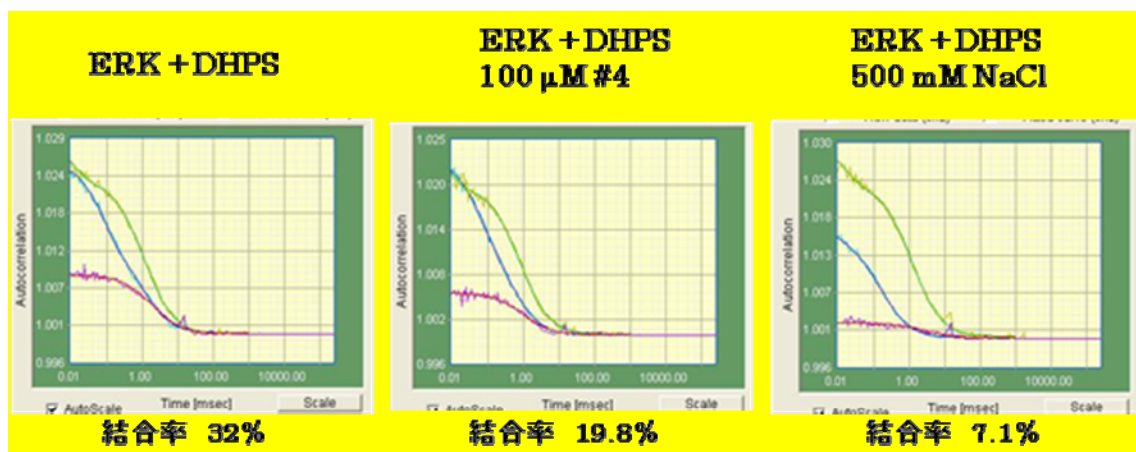
DHPS-REK の相互作用系において検討し、混合比や反応時間、精製方法(上記)を検討して結合率 40%程度に引き上げることができた。この条件においてコンピュータ上で ERK/DHPS 結合を阻害する可能性があると考えられた化合物を 100  $\mu$ M で添加し、FCCS で測定した結果を示す(図 2.1-1)。89種の化合物のうち4つで有意に結合率が低下しており、すなわち ERK/DHPS の結合を阻害する可能性が見出された。なお、異なる測定系である  $\alpha$ -スクリーニングでは図中 No.4, 10, 13, 14, 35 および 86 の化合物添加において ERK/DHPS 結合低下が検出されており、FCCS 測定とは一部結果に相違があった。しかし、詳細な FCCS 測定の結果から No. 4 だけが相互作用に影響を与えているものと考えられた。

図 2.1-1 各化合物 100 mM 添加による ERK/DHPS 結合に対する影響。結合率に有意に変化があったものを赤色で示す。ピンクは未確定



上記のように DHPS-ERK をターゲットとしてスクリーニングを開始するにあたり、タンパク質の供給が問題となることが予想されたために、大腸菌発現系の構築を行った。また、そのサンプルを用いて、DHPS-ERK 相互作用の検出系を確立した。目的タンパクが最も回収された画分を用い、両者を混合して FCCS 測定を行ったところ明らかな結合が検出され、この結合は 500 mM NaCl の添加により解消された。更にケミカル#4を 100 μM の存在下で以前より弱いながらも結合率の低下が観察された。

図 2.1-2 改良型 FCCS 装置 (MF20) による FCCS 測定、グラフ中赤線カーブの高さ (y 切片) が結合粒子の割合を表す。グラフから明確なように相互作用の検出が可能である。



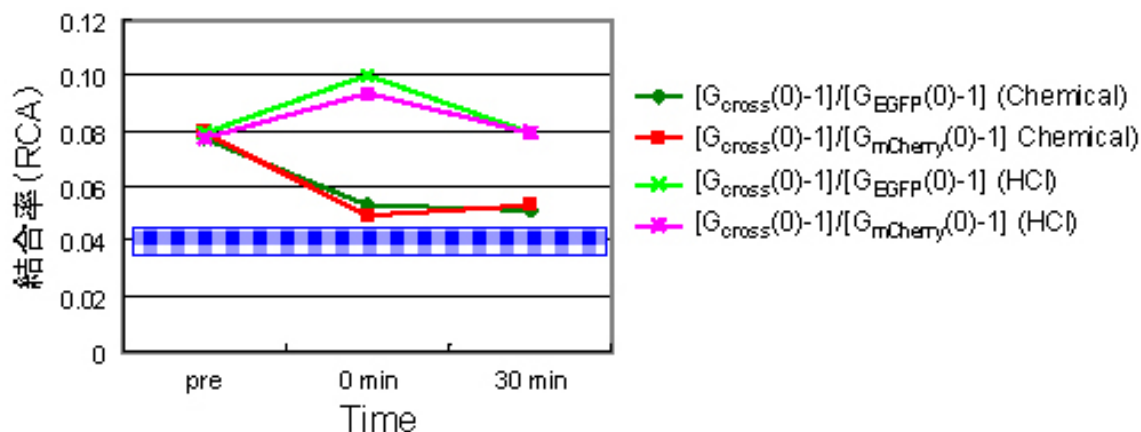
また、大腸菌によって発現した蛍光タンパク質融合型 CAPN10 (1-49)(CAPN10 と省略), ID3424\_dN41 (ID3424 と省略) の相互作用を検出と薬剤の影響を確認するために FCCS 測定をない、スクリーニング系を確立した。CAPN10-EGFP, ID3424-mCherry を混合し、測定したところ、微弱ではあるが、相互相関が得られた。相対相関強度 (Relative cross amplitude: RCA) は negative control よりわずかだが高かった。

薬剤を添加したところ、相互相関が消失した。コントロールとして、薬剤の vehicle である HCl を

添加したところ、相互相関は消失しなかった。以上 CAPN10 (1-49), ID3424\_dN4 の相互作用を検出したものと思われる。

図 2.1-3 相対相関強度 (Relative cross amplitude: RCA) の変化

pre: 薬剤添加前, 0 min: 薬剤添加直後, 30 min: 薬剤添加後 30 分。青タイル部分は negative control (EGFP 単体+ mCherry 単体) の RCA。



細胞ベースでの系の構築に関して、特に 18 年度は PAC1-mKeima\_MiCy-PAC2、mKeima-PPP2R5E\_mMiCy-SGOL1、mKeima-PPP2R5D\_mMiCy-SGOL1 相互作用構築、平成 19 年度は CAPN10-mKeima\_mMiCy-ID3424 の確立を行った。また CAPN10/ID3424 を中心として全長からフラグメントまで 4 つの組み合わせで行った。これまで明確な細胞内における相互作用の検出は確立していないが、CAPN10 (1-329)- ID3424, CAPN10 (1-49)- ID3424 において、まだ再現的ではないが、相互作用が観察された。

その他にも HCV 関連 11 種類について蛋白質を作製し検討を行なった。そのうち、8 種類に於いて系が確立したことを確認した。他の疾患関連タンパク質相互作用においては、トータルで次表の 17~22 の 6 種を構築し、2 種において測定が可能であった。また、FCCS 用の蛍光タンパク質開発も兼ねて Caspase3 のアッセイ系も構築した。

表 2.1-1 作製した FCCS アッセイ

	Protein 1 / Protein 2	FP1	FP2	Assay
1	HCV_A (23a.a.) / a (63a.a.)	dKeima	EGFP	○
2	HCV_A (23a.a.) / a (63a.a.)	mKeima	EGFP	○
3	HCV_A (23a.a.) / b (112a.a.)	dKeima	EGFP	○
4	HCV_B (40a.a.) / c (70a.a.)	mKeima	CFP	○
5	HCV_C (43a.a.) / d (31a.a.)	dKeima	EGFP	×
6	HCV_C (43a.a.) / e (47a.a.)	dKeima	EGFP	×
7	HCV_D (32a.a.) / f (69a.a.)	dKeima	EGFP	○
8	HCV_E (60a.a.) / g (38a.a.)	dKeima	EGFP	○
9	HCV_F (29a.a.) / g (38a.a.)	dKeima	EGFP	○
10	HCV_G (89a.a.) / h (36a.a.)	dKeima	EGFP	○
11	HCV_H (70a.a.) / i (44a.a.)	dKeima	EGFP	×
12	Caspase	dKeima	mMiCy	○
13	Caspase	mKeima	mMiCy	○
14	Caspase	mKeima	mAG	○
15	Caspase	mKeima	mACy	○
16	Caspase	mKeima	tKCy	○
17	ERK2 / MEK	mKeima	tKCy	×
18	PAC1 / PAC2	mKeima	mMiCy	○
19	PPP2R5E / SGOL1	mKeima	mMiCy	×
20	PPP2R5D / SGOL1	mKeima	mMiCy	×
21	CAPN10 / ID3424	mKeima	mMiCy	×
22	ERK/DHPS	mKeima	mMiCy	○

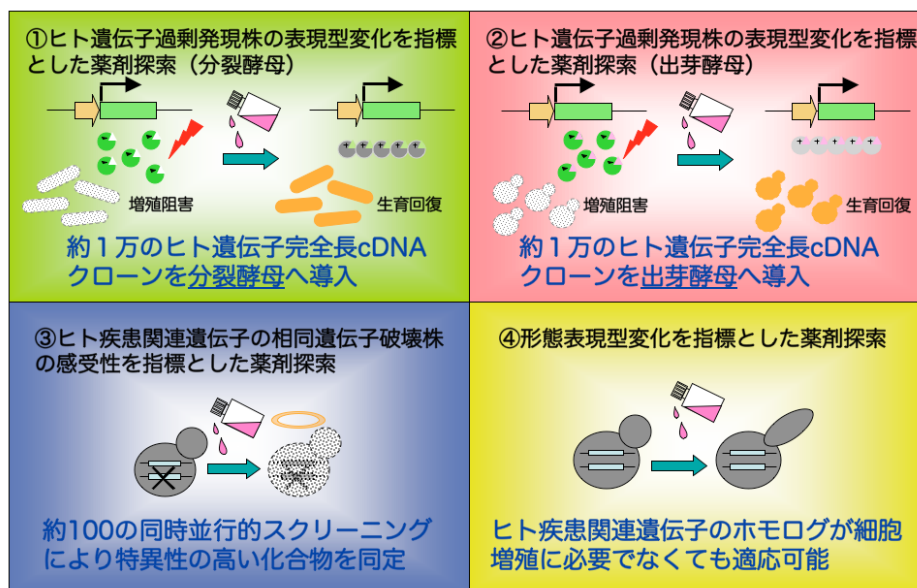
### 3.スクリーニング技術開発(モデル生物)

#### <⑤化合物等の探索技術の開発>

多様なポストゲノムツールボックスが整備されたモデル生物は、疾患関連遺伝子の変異や過剰発現によって引き起こされる細胞レベル、個体レベルの表現型変化をモニターするための格好のシステムであり、新たな制御物質の探索系として大変優れている。表現型変化を指標にすることで、タンパク質相互作用の観察が困難な疾患関連遺伝子についてもその阻害剤探索が可能になり、致死や形態異常といった共通の表現型を用いて機能の異なる複数の遺伝子産物の制御物質を同時に探索できる。本研究ではモデル生物である酵母、ショウジョウバエ、マウスを用いて独自の表現型スクリーニング系を構築し、天然化合物スクリーニングチームから提供される微生物培養サンプルを用いて探索研究を実施する。

酵母を用いたスクリーニング系開発では、ヒト疾患関連遺伝子産物制御法の開発を行った。1) ヒト遺伝子を出芽酵母及び分裂酵母に導入した株を合計19,799個作製し、過剰発現によって致死の表現型が現れる遺伝子を1,756個同定した。また、分裂酵母遺伝子の過剰発現株4,846個のうち、致死遺伝子を173個同定した。これら同定遺伝子のうちヒト疾患関連遺伝子またはその分裂酵母ホモログを中心に選んだ過剰発現による生育阻害のアッセイ系を59個確立した(図1①②)。2) ヒトの遺伝病原因遺伝子ホモログや細胞周期等の細胞機能に関与し、酵母からヒトまで保存されている遺伝子を含む遺伝子のハプロ不全破壊株を利用した探索系を94個確立した(図1③)。3) 細胞の形態情報を指標とした探索・評価系を1個確立した(図1④)。4) 酵母2-ハイブリッド法を用いたタンパク質間相互作用阻害物質を探索する系を3個確立した。以上、157個のアッセイ系を確立し、微生物培養サンプルおよび精製化合物ライブラリーから、新規化合物3個(JBIR-14、JBIR-19、JBIR-20)を含む123個の活性物質を取得した。

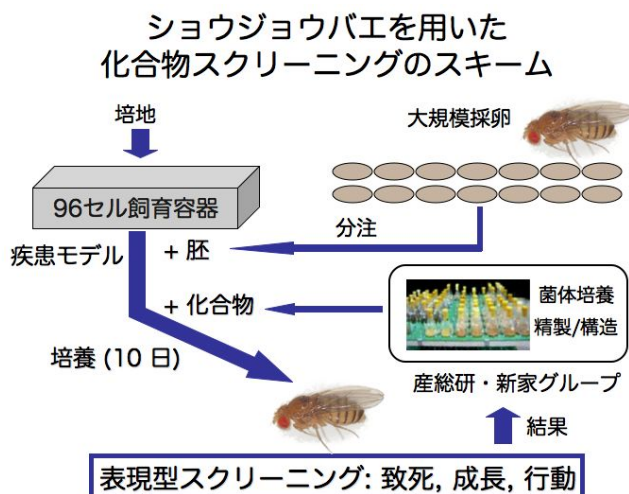
図1 酵母を用いた薬剤探索系



また、上記の阻害剤探索系・薬剤の作用機構解析系に加え、5)特定の遺伝子の過剰発現による薬剤に対する耐性化および感受性化をDNAマイクロアレイにより一度に検出し、薬剤標的分子探索および薬剤の作用機構解析の可能な系を樹立した。

ショウジョウバエを用いた疾患関連遺伝子産物制御法の開発においては、まず個体レベルの表現型に影響を与える化合物をハイスループットにスクリーニングするための、大規模採卵法、飼育セルへの自動分注法、および発生・成長・行動機能を検定する基本アッセイシステムを確立した。独自の飼育容器をベースにしたスクリーニング系の最適化により、

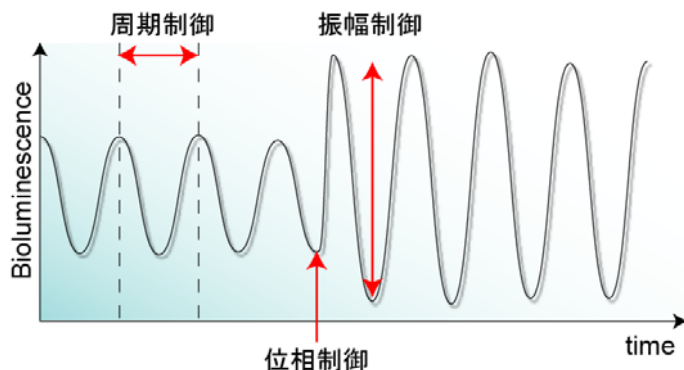
1日最大1,500サンプルをアッセイできるスループットを達成した。本システムを用いて、スクリーニング技術開発(天然化合物)チームにより供給された培養菌体抽出物合計23,604サンプルのショウジョウバエ個体の表現型に及ぼす活性をスクリーニングした。具体的には、1)野生型に対する成長抑制活性、2)過栄養障害の抑制活性、3)ポリグル



タミン病における運動障害の抑制活性を指標とした。その結果、1)の成長を抑制する5個の化合物を同定し、そのうちの2個(JBIR-15、JBIR-16)は新規化合物であった。2)および3)は現在進行中であるが、それぞれ7個、10個の候補サンプルを見出した。また、糖尿病やがんなどの疾患モデルとなる各種シグナル伝達系の変異体を用いた新しいアッセイ系、および微量サンプルで定量性の高いインジェクションによるアッセイ系を確立した。

マウスを用いた行動リズム制御法の開発では、体内時計の周期・振幅・位相をそれぞれ制御可能な化合物を分離するための実験系を確立した。まず培養細胞を用いたスクリーニングを行い、スクリーニング技術開発(天然化合物)チームにより供給された天然化合物から活性新規な短周期化合物7種、既知化合物ライブラリーからは、周期延長化合物10種、振幅制御化合物12種を得た。現在、組織レベルにおける活性を検証中であり、これまでに周期延長化合物10種全てが組織レベルにおいても周期延長を誘導可能である事を見出した。今後個体レベルでも検証を行う。

さらに、各化合物の作用標的を探索し、周期延長化合物のほぼ全て(9種)が、時計タンパク質ネットワークの重要な素過程に関わる酵素Xの活性を制御している事を明らかにした。また振幅制御化合物においては、それらがある特定のシグナル伝達経路に密接に関



わっている事を明らかにした。これにより、表現型スクリーニングと特異的な分子標的に対する *in vitro* スクリーニングとを両輪とし、より効率的な化合物分離が可能となった。

## スクリーニング技術開発(モデル生物)における主な成果

スクリーニング系	スクリーニング 系数	対象疾患	スクリーニング 総数	ヒット数	新規 化合物
酵母	157	癌、代謝疾患	1,009,593	123	4
ショウジョウバエ	3	癌、糖尿病、 中枢疾患	36,169	85	2
生物時計	2	睡眠障害	19,680	6	0



### 3.1 酵母を用いたヒト疾患関連遺伝子産物制御法の開発

#### <⑤化合物等の探索技術の開発>

実施体制:JBIC 分室 14 (JBIC)

共同実施先:理化学研究所・和光、長浜バイオ大学、東京大学新領域、産業技術総合研究所

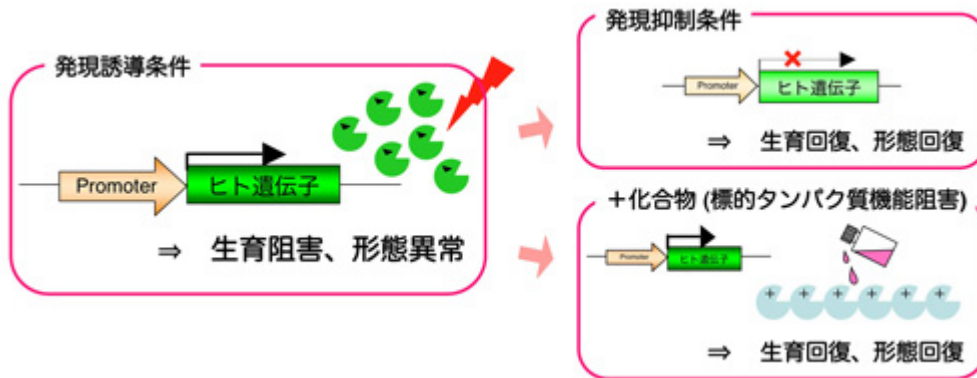
酵母は動物細胞のモデルとして有用でありながら、遺伝子操作が容易で寒天培地・液体培地などで簡単に培養でき、また、全遺伝子クローニング、変異(遺伝子破壊)株ライブラリー、誘導発現系など多様なツールが用意されていることから、疾患関連遺伝子の変異や過剰発現によって引き起こされる表現型変化を観察するのに格好のシステムである。本研究チーム(酵母チーム)では「ケミカルゲノミクス」を用いたヒト疾患関連遺伝子産物に対する「薬剤探索系」や酵母のゲノム情報をもとにした効率的かつ迅速な「標的分子同定法」を開発する。なお、これらの探索研究および標的分子探索を行う際には、遺伝学的に多剤超感受性となった株を作製して利用する。

#### 成果1:過剰発現による致死性の回復を指標としたスクリーニング系を構築した

Gateway化されたヒト完全長cDNAを酵母に導入し過剰発現させ、生育阻害や形態変化を引き起こすヒト遺伝子を網羅的かつ効率的にリストアップし、その遺伝子産物の機能制御物質を高速かつ高効率に発見するための技術を開発した。具体的には、生育阻害などの表現型を回復させることを指標に特異的阻害物質を探索した(図1)(Sekigawa *et al.*, *J. Biomol. Screen.*, 2010)。この方法の最大の利点は、機能の異なる複数の遺伝子産物の制御物質を生育阻害という共通の表現型を指標に同時に探索できる点にある。分裂酵母、出芽酵母において酵母遺伝子、ヒト遺伝子を導入した株を合計24,645種類作製し、過剰発現によって致死の表現型が現れる遺伝子を1,929個同定した。これらの中には細胞の増殖・接着・運動、がん化、クロマチン・転写、低分子量Gタンパク質、タンパク質分解等に関与する遺伝子が多く含まれていた。過剰発現を利用した探索系を合計59種類確立し、それぞれの系に対し微生物培養サンプルや精製化合物ライブラリーの活性を評価したところ、新規化合物(JBIR-14)(Ueda *et al.*, *J. Antibiot.*, 2010)を含む71個の活性化化合物を得た。その他、産業上有用な化合物として、Gliotoxin類を同定した。これは、複数の致死遺伝子による生育阻害を回復する化合物であったが、作用機構解析の結果、ヒストンH3リジン9のメチル化酵素を阻害することが判明した。また、ヒストン脱メチル化酵素FBXL10に対するスクリーニングにおいて、パラベン類化合物を同定した。ヒストンメチル化は疾患に関与する様々なエピジェネティクス変化に関わる。これを制御することで医療応用が期待される。さらに、がん細胞のテロメア伸長にかかわるタンキラーゼについて阻害活性を示す化合物を同定することに成功した(Yashiroda *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2010)。得られた化合物については、安全性、有効性を改善するための構造変換が必要である。

図1 ヒト cDNA 過剰発現酵母株を用いた阻害剤探索系



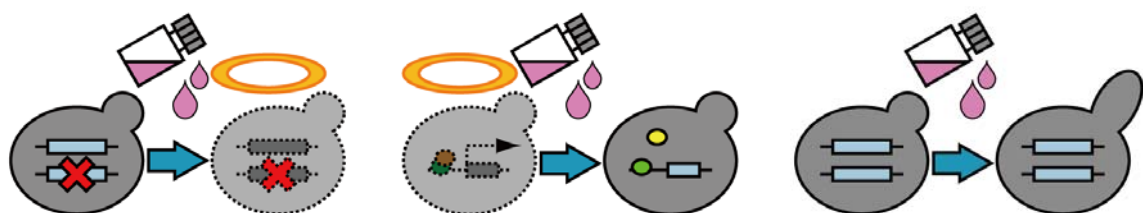


**成果2: 遺伝子変異株の増殖や野生型株の形態変化を指標とした効率的スクリーニング系を構築した**

ヒト疾患遺伝子の相同遺伝子破壊株の増殖阻害やヒト遺伝子導入株の増殖回復、野生型株の形態表現型変化を指標とした効率的スクリーニング系を構築した。具体的には、ヒト疾患関連遺伝子の相同遺伝子を含む出芽酵母ハプロ不全株ライブラリーを用いて、94 種類の経路特異的な増殖阻害剤を同時並行的に探索が行えるスクリーニング系を構築した(図2①)。また、ヒト遺伝子産物の相互作用ペアの中で *in vitro* でのアッセイ系の構築が困難とされた 3 種のペアにおいて、カウンターセクションが可能なレポーター遺伝子を用いることによって相互作用阻害剤をポジティブセクションで探索が行える酵母 2-ハイブリッド法を構築した(図2②)。さらに、既に構築した迅速かつ精密に形態情報を自動解析できるイメージプロセッシング技術と酵母全遺伝子破壊株の形態情報データベース(Ohya *et al.*, *PNAS*, 2005)を技術的基盤として、出芽酵母細胞の丸さや大きさなどの形態表現型変化という、増殖とはまったく異なる複数の観点によるスクリーニング系を初めて立ち上げた(図2③)。出芽酵母ハプロ不全株を用いたスクリーニング系で、6,600 個の微生物培養サンプル等々を評価したところ、18 個の経路特異的に増殖阻害を示す活性化化合物を得た。また、形態表現型変化を指標としたスクリーニング系で、4,960 個の微生物培養サンプル等々を評価したところ、新規化合物2個(JBIR-19, JBIR-20; Kozone *et al.*, *J. Antibiot.*, 2009)を含む 34 個の形態異常を示す活性化化合物を得た。

図2 増殖や形態変化を指標とした効率的阻害剤探索系

- ①ハプロ不全株を用いた  
阻害剤探索系
- ②酵母 2-ハイブリッド法  
による阻害剤探索系
- ③形態表現型変化を指標  
とした阻害剤探索系

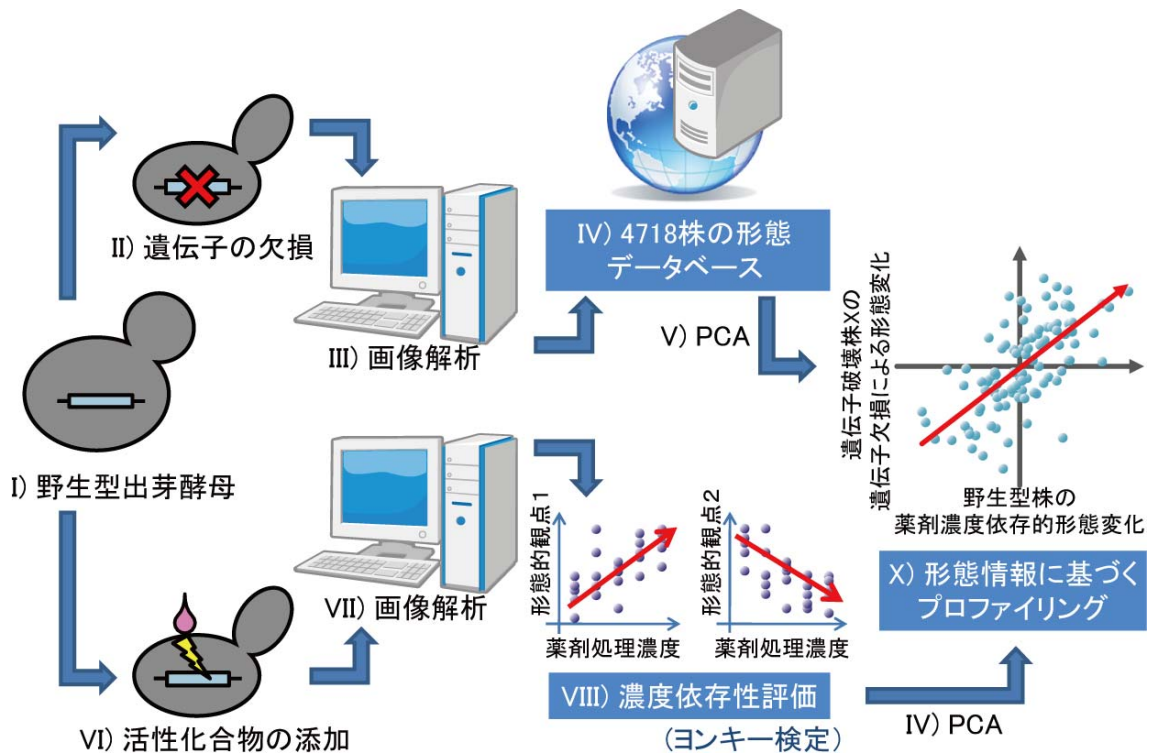


**成果3: 形態表現型に基づく活性化化合物の細胞内標的を推定する方法を確立した**

活性化化合物によって引き起こされる野生型酵母の形態表現型の特徴と、遺伝子破壊によって

引き起こされる形態的特徴の比較を行って活性化合物の標的分子を推定する新しい方法を確立した(図3; Ohnuki *et al.*, *PLoS ONE*, 2010)。具体的には、まず野生型酵母に複数の濃度で活性化合物を処理した時の濃度依存的形態変化を CalMorph 画像解析システム(Ohya *et al.*, *PNAS*, 2005)を使って細胞形状、アクチン、核の特徴を 501 の観点から多次元的に捉える。次に構築済みの酵母全遺伝子破壊株の形態表現型データベースの中から統計的手法を用いて形態プロファイルが類似する遺伝子破壊株を探索する。形態的特徴が似ている遺伝子破壊株こそが標的候補の遺伝子破壊株である。開発した方法の有効性を検証するために、標的がわかっている4つの活性化合物をテストケースとして調べたところ、4つの活性化合物のうち3つで標的分子を正しく予想することができた。重複遺伝子の遺伝子産物が標的になる場合には単独遺伝子の破壊によって表現型が表れず、標的予想がうまくできなかった。しかし、全ての活性化合物で、形態プロファイルが類似する上位 100 株中に標的分子が関与する細胞プロセスの遺伝子破壊株が集まっていた。この新しい標的推定法は、形態プロファイリングを迅速に行うためのソフトウェアも公開済みであることから、汎用性が高く波及効果も極めて大きい。

図3 高次元細胞形態情報プロファイリングによる活性化合物の標的推定法



#### 成果4: 細胞形態に基づく標的推定法の実用化と精度向上に向けた技術を確立した

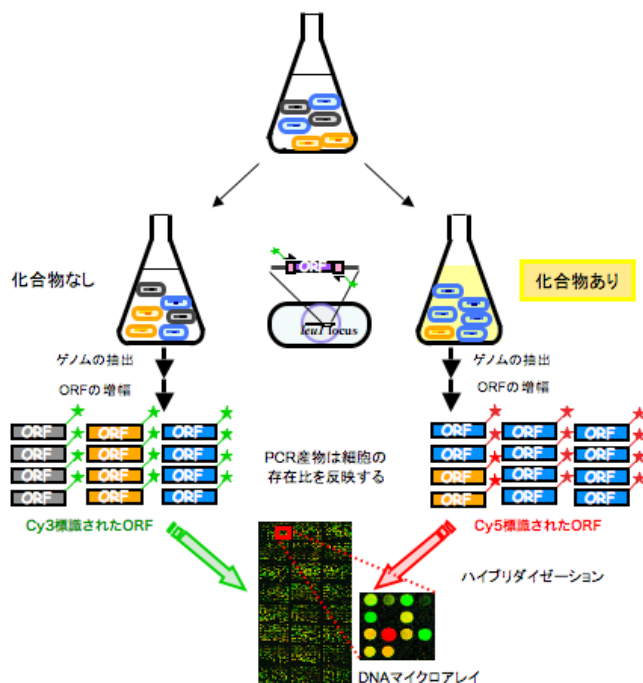
成果3の形態表現型に基づく活性化合物の標的推定法は、①充分量の活性化合物を確保できない場合、②活性化合物処理や遺伝子破壊によって細胞形状、アクチン、核の形態表現型を引き起こさない場合には適用が難しいという問題があった。そこでこれらの問題を克服するための周辺関連技術を開発した。具体的には、①培養条件のスケールダウンと活性化合物取り込み能向上株を用いることで使用する活性化合物の量を最大 120 分の 1 にすることができた。②画像解析の際に観測する対象を従来の細胞壁と核、アクチン細胞骨格の 3 つから、液胞やゴルジ体、ミトコンドリアなどのオルガネラを含む 9 つに増やすことで、今までの 501 から 1,000 を超える観点で表

現型を解析できるようになった(Negishi *et al.*, *J. Biotechnol.*, 2009)。これらの技術により、糖新生阻害剤のスクリーニングにより得られた vanillin (Hashimoto *et al.*, *J. Antibiot.*, 2009) や新規化合物 JBIR-19 の標的分子を推定することが可能になった。

### 成果5: 薬剤の標的分子解明のための網羅的薬剤感受性試験法を確立した

化合物の標的タンパク質を同定するため、特異的なタンパク質と低分子化合物の組み合わせを網羅的に探索するケミカルゲノミクスという方法論を用いた試験法の確立を行った。具体的には、分裂酵母の約 5,000 個の全遺伝子過剰発現株セット (Matsuyama *et al.*, *Nat. Biotechnol.*, 2006) を用いて、個々の遺伝子の過剰発現によって変化する薬剤感受性の情報を用いて、薬剤の作用機構解析ができることを示してきた。その結果、新規海洋天然物 Theonellamide の作用機構の解明に成功した (Nishimura *et al.*, *Nat. Chem. Biol.*, 2010)。さらに、化合物のプロファイルデータの収集をより高速化・簡便化するために、薬剤感受性の著しく高い分裂酵母変異体を作製し、その細胞に約 5,000 の分裂酵母遺伝子それぞれを過剰発現した株コレクションを化合物存在下において混合培養し、化合物に対して耐性化する過剰発現株や、超感受性化する過剰発現株を DNA マイクロアレイを用いて網羅的に探索できる系を開発・確立した (図3) (Arita *et al.*, *Mol. BioSyst.*, in press)。この技術によって1度に 5000 遺伝子の効果を見ることができるようになり、しかも薬剤感受性型酵母を用いることにより化合物の使用量を最小限に抑えることができるので、稀少化合物を含むさまざまな化合物の作用機序、および標的分子を同定することが可能となり、その波及効果は極めて大きいと考えられる。

図4 薬剤感受性・耐性遺伝子の迅速検出法



### 3.2 ショウジョウバエを用いた疾患関連遺伝子産物制御法の開発

#### <⑤化合物等の探索技術の開発>

実施体制: JBIC 分室 14 (JBIC)

共同実施先: 首都大学東京、産業技術総合研究所

ショウジョウバエの個体レベルの表現型に対する化合物の作用を高感度に検出できるハイスルーブットなアッセイ系を開発し、疾患関連遺伝子産物を制御する化合物の取得を目的とする。

#### 成果1: ハイスルーブットなアッセイ系の開発

ショウジョウバエを本格的に化合物スクリーニングに利用するには、多数のサンプルを迅速にアッセイできるハイスルーブット化が不可欠である。本プロジェクトでは、ショウジョウバエを飼育できる世界最小の飼育容器を開発すると共に、卵の大規模採取、分注法を確立した。この特殊容器を用いることにより、96サンプル単位で化合物をアッセイすることが可能となった。また、独自の採卵用容器を使って、1日あたり最大4万個の卵を回収する方法を確立し、96個のセルに各10-20の卵(胚)2分以内で分注する装置を開発した。さらに、個体の生存率、および行動機能を定量的に測定するための装置を開発した。これらの技術開発により、ショウジョウバエを使って1日最大1500サンプルの化合物をスクリーニングできる世界で唯一のシステムを構築した(図1、図2)。

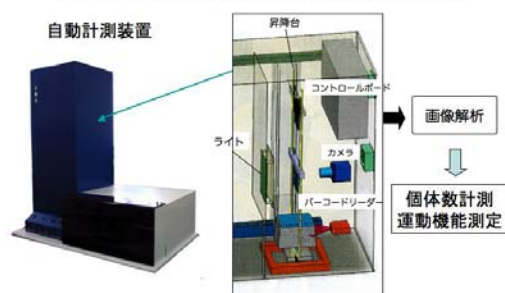
図1. ショウジョウバエ飼育用小型セル

a) 8連セル      b) 96セル(12列)ラック



胚から成虫間までの発生過程、および成虫の飼育に用いる。

図2. 個体数計測、運動機能測定装置



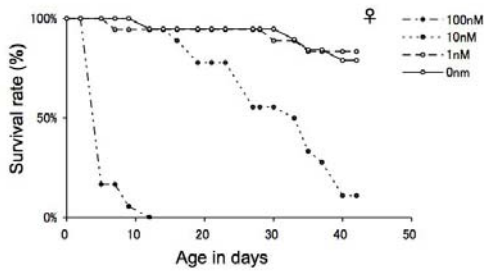
飼育用小型セルを使って、個体数、運動機能を自動測定できる

#### 成果2: 成長阻害活性をもつ化合物のスクリーニングと同定

産総研の新家グループと連携して、培養菌株抽出物14, 884サンプルについて、ショウジョウバエ成長阻害活性を指標としたスクリーニングを行った。その結果、3個の既知化合物 (Streptovitacin, di-2-ethylhexyl phthalate, Staurosporine) のほか、新規化合物として、JBIR-15、および JBIR-16 を同定した。両者は類縁体であり、共に強力な殺虫作用を有する(図3)。類似の構造をもつ化合物の既知機能から、神経毒として作用するものと考えられる。動物細胞には毒性を示さないことから、殺虫剤としての応用が考えられる。



図3. JBIR-15 の濃度依存的致死効果

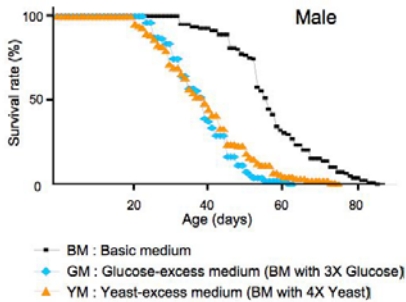


JBIR-15を培地中に各濃度で添加したときの成虫寿命 (JBIR-16も同様)

### 成果3:新しい疾患モデルの開発 (代謝障害)

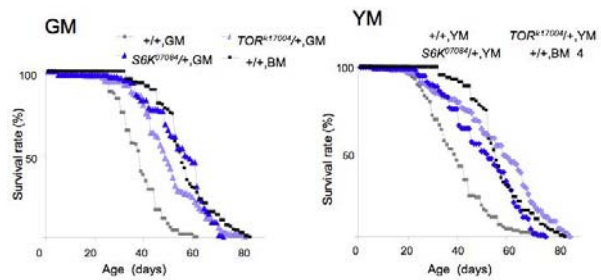
インスリンシグナル経路は、体内に取り込んだ栄養を最適に利用するための重要な機構であり、その破綻は糖尿病の原因となる。ショウジョウバエを用いて、過栄養による代謝障害モデルの開発を行った。具体的には、グルコース、およびタンパク質を過剰に摂取させることにより、通常10週間程度の寿命が1週間程度に短縮される条件を見出した(図4)。また、インスリンシグナルに関与する遺伝子の突然変異体は、この表現型を示さないことを示した(図5)。このモデルは、インスリン経路の抑制作用をもつ化合物のスクリーニングに有用である。

図4. 過栄養による寿命の短縮



各栄養条件下で、成虫を飼育し、寿命を測定したもの(雌も同様)

図5. TOR S6K 変異による過栄養障害の抑制



インスリン経路の下流にあるTOR、およびS6Kの変異体は、過栄養条件下でも、短命にならない。

### 成果4:神経変性疾患モデルでの化合物の効果の検証

ハンチントン病やマシャド・ジョゼフ病などのポリグルタミン病の原因遺伝子をショウジョウバエで発現させると神経変性を起こす。クライミングアッセイによって運動障害の表現型を示す。この運動障害を指標として化合物スクリーニングを行うには、運動機能を定量的に測定するアッセイ系が必要である。上述の小型飼育容器にショウジョウバエ成虫入れ、行動機能測定装置を用いて、ポリグルタミン病モデルにおける行動機能を7日齢、および14日齢において測定したところ、雌雄ともに加齢に伴い運動機能の有意な低下が認められた。この加齢性運動失調モデルをつかって、HDAC 阻害剤であるフェニルブチレート投与したところ、運動性の回復が認められた。培養菌株抽出物ライブラリーのスクリーニングでは、有意な回復を示したものは得られなかったが、原理的には神経変性疾患治療薬のスクリーニング系として利用できるものと考えられる。

### 成果5:植物由来化合物の寿命延長効果とその標的遺伝子の同定

成果1の小型セルを使うことにより、微量の化合物で個体の表現型をアッセイすることが可能になった。クマイザサ由来の化合物がショウジョウバエの寿命を延長することを見出し、質量分析等によりその構造を決定した。また、構造的に類似する他の化合物が同様にショウジョウバエの寿命を延長することを確認した。さらに、その化合物は、活性酸素を発生する酵素に対して阻害作用を示すこと示した。このことを遺伝学的に検証するために、RNA 干渉法を用いてショウジョウバエ生体内において標的酵素遺伝子の発現を抑制したところ、化合物と同様に寿命の延長が認められた。老化に伴って発症する疾患の予防、診断、治療に役立つ可能性がある。

### 3.3 体系的な転写ネットワーク同定を利用した行動リズム制御法の開発

#### <⑤化合物等の探索技術の開発>

実施体制: JBIC 分室 14 (JBIC)

共同実施先: 理化学研究所・神戸

本課題では、生体の体内時計を任意に制御することが可能な化合物の取得を目指した。

まず化合物が体内時計の表現型(周期や振幅等)に与える影響を測定するため、培養細胞に時計遺伝子 Per2 プロモータの下流にホタルルシフェラーゼをつないだレポーターベクターを導入し、体内時計に依存して概日振動する生物発光により、体内時計の表現型を測定するリアルタイム測定系を開発した。次に多数の化合物の影響を迅速に探索するために、測定系をハイスループット化した。このハイスループット測定系を用い、化合物添加時の概日振動の変化を精度良く測定することによって、体内時計を制御可能な化合物をハイスループットにスクリーニングする系を立ち上げた(図1)。

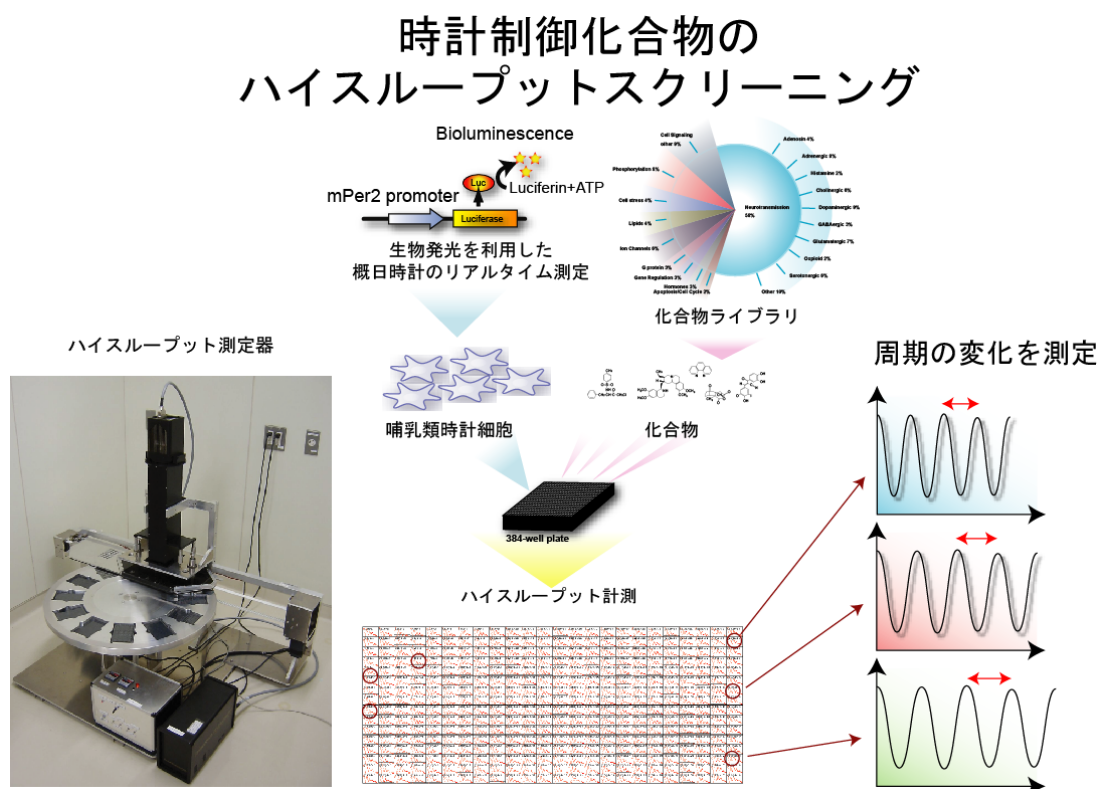


図1 時計制御化合物のハイスループットスクリーニング系

体内時計の周期を制御可能な化合物をハイスループットに探索した。

#### 成果 1: 長周期化合物の分離に成功

前述のハイスループット測定系を用いて、体内時計の周期を制御可能な化合物の分離を試みた。まず既知化合物ライブラリー(126 化合物)を用いて、スクリーニングを行い、1st スクリーニン

グにて、166 種類の周期制御候補化合物を得た。さらにそれらの化合物について活性の濃度依存性を詳細に測定した(2nd スクリーニング)。その結果、強力な周期制御活性を持つ 28 種類の化合物を同定した。これらの中から特に強力な 10 種類の化合物について、マウス個体から調整した視交叉上核(SCN)組織培養系を用い、組織レベルの時計に対する効果を検証した結果、どの化合物も組織レベルの時計の周期をも濃度依存的に制御可能である事が示された(図2)。

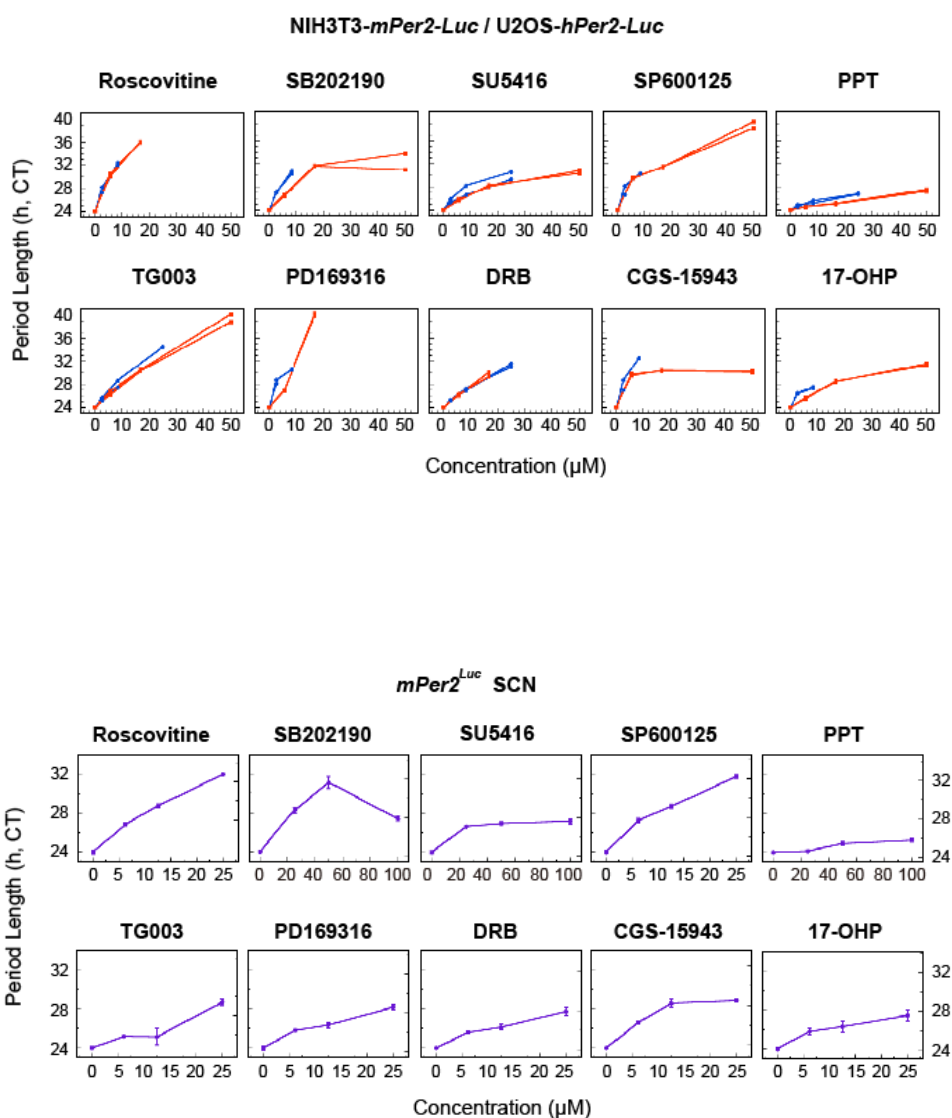


図 2. 長周期化合物による濃度依存的な概日時計の周期延長

縦軸に周期(h)を示し、横軸に各薬剤の濃度(μM)を示した。上段:マウス及びヒトの培養細胞(青:マウス(NIH3T3),赤:ヒト(U2OS)),下段:マウス視交叉上核(SCN)。SCNの時計を濃度依存的に長周期化することの可能な化合物の同定に成功した。

これらの中には通常約 24 時間周期の細胞の体内時計を倍の長さ(約 48 時間)まで変化させるほどの強力な活性を持つ化合物が存在していた(図 3)。



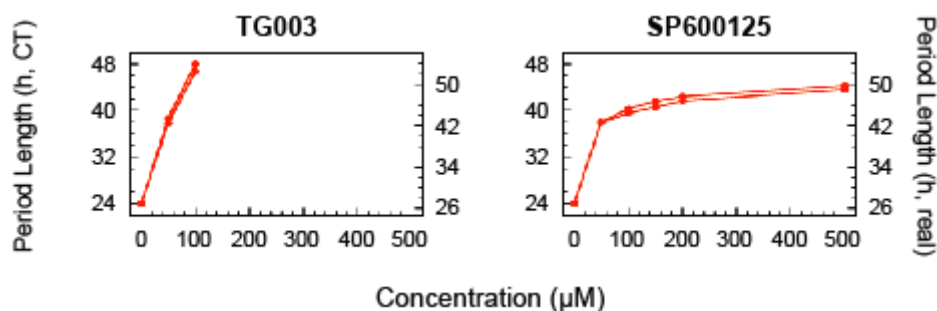


図 3 高濃度の長周期化合物の影響

高濃度の長周期化合物は細胞の概日時計周期を 2 倍もの長さ(約 48 時間)に延長する事が可能であった。縦軸が周期長(h)、横軸が化合物濃度(μM)である。

また分離した化合物のうち1つはホルモン前駆体であり、医療応用性が高いと判断し、医薬特許申請済みである。

## 成果 2: 長周期化合物の標的分子の同定に成功

前述の体内時計長周期化合物の作用機構を分子レベルで理解するために、それらの化合物の作用標的分子を探索した。その結果、ほぼ全て(10 種類中 9 種類)が、時計タンパク質ネットワークの重要な素過程に関わるリン酸化酵素 CKI  $\epsilon / \delta$  の活性を阻害する事を見出した(図 4)。また、詳細な解析の結果、この酵素の時計タンパク Per2 に対するリン酸化反応が温度補償性等の概日時計システムに特徴的な性質を担っており、概日時計周期制御の中心的な役割を果たしている事が明らかになった。したがって本課題にて分離した長周期化合物は、リン酸化酵素 CKI  $\epsilon / \delta$  の活性制御を介して体内時計の周期長を制御していると考えられた。このように、リン酸化酵素 CKI  $\epsilon / \delta$  が概日時計周期制御のための有効な創薬ターゲットであることを示す事に成功した。

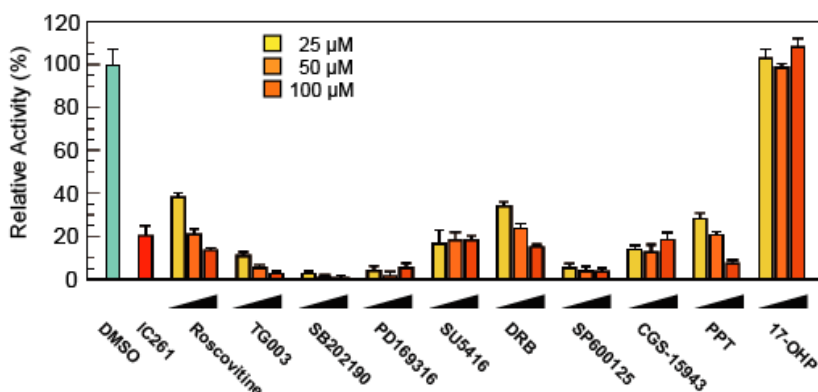


図 3. CKI  $\epsilon$  ...in vitro kinase assay

化合物が CKI  $\epsilon$  の酵素活性に与える影響を in vitro kinase assay によって測定した。溶媒(DMSO)のみ添加時の活性を 100%とし、各薬剤添加時の活性を相対値で示している。縦軸が相対活性。横軸に各薬剤を示している。各薬剤の添加最終濃度は、100, 50, 25 uM。10 種の長周期化合物のうち 9 種が酵素 CKI  $\epsilon$  の活性を濃度依存

的に強く阻害した。

### 【まとめ】

- ・ 培養細胞を用いて概日時計の振る舞いを高精度に計測し、その振る舞いに影響を与える化合物をハイスループットに探索する「ハイスループット表現型スクリーニング系」を、確立した。
- ・ 10種類の強力な長周期化合物の分離に成功した。そのうちの1つはホルモン前駆体であり、医療応用性が高いと判断し、医薬特許申請済みである。
- ・ 長周期化合物の標的分子が、リン酸化酵素 CKI  $\epsilon / \delta$  であることを明らかにし、時計タンパク Per2 に対するリン酸化反応が概日時計周期制御のための有効な創薬ターゲットに成り得る事を示した。

### 特許

名称「体内時計周期延長剤およびそれを含む概日リズム障害治療薬」

出願番号 P-C81240

出願人 独立行政法人理化学研究所

### 発明の概要

プロゲステロンまたはその誘導体を含む、体内時計周期延長剤を提供する。体内時計周期を延長することで、概日リズム障害を治療することができる。プロゲステロンまたはその誘導体は医薬として既に使用されているため、安全に使用できる。

### 論文発表

Isojima, Y., Nakajima, M., Ukai, H., Fujishima, H., Yamada, R.G., Masumoto, K., Kiuchi, R., Ishida, M., Ukai-Tadenuma, M., Minami, Y., Kito, R., Nakao, K., Kishimoto, W., Yoo, S. H., Shimomura, K., Takao, T., Takano, A., Kojima, T., Nagai, K., Sakaki, Y., Takahashi, J. S., & Ueda, H.R. CKI  $\epsilon / \delta$ -dependent phosphorylation is a temperature-insensitive, period-determining process in the mammalian circadian clock. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106, 15744–15749 (2009)

#### 4.モデル動物での化合物評価

##### <⑦化合物等の評価技術の開発>

スクリーニングにより得られた化合物等が真に生体制御に利用できるか、あるいは創薬開発に結びつくかを、動物個体レベルで検証するための評価系が創薬開発には必要である。その過程を加速化することを目的に、マウス等の生きた動物(遺伝子改変動物、疾患モデル)の個体内部でのイメージングを可能とする基盤技術の開発を行う。

個体レベルの評価技術として、いわゆる分子イメージングが脚光を浴びつつあるが、ここでは、本プロジェクトの化合物スクリーニング過程で多用される蛍光イメージングを個体レベルで可能にする技術の開発を行う。

#### 4.1 モデル動物での化合物評価

##### <⑦化合物等の評価技術の開発>

実施体制:JBIC 分室 17(JBIC)、JBIC 分室 18(オリンパス)、JBIC 分室 19(東レリサーチ)

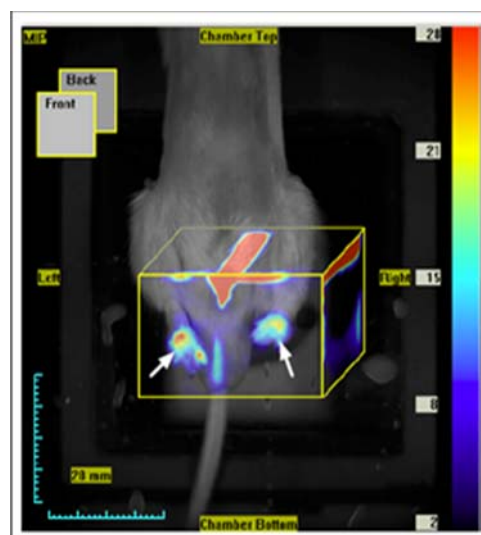
共同研究:理化学研究所、東京大学、北海道大学

スクリーニングにより得られた化合物等が真に生体制御に利用できるか、あるいは創薬開発に結びつくかを、動物個体レベルで検証するための評価系が創薬開発には必要である。そこで、本テーマでは、遺伝子改変動物や疾患モデルを用いて、化合物等の効果、安全性の評価を迅速に行うことを可能にする個体レベルの蛍光イメージング技術の開発を行う。

本テーマは、理化学研究所(筑波研究所・バイオリソースセンター)、東京大学(大学院情報理工学系)、北海道大学(電子研)、オリンパス、東レリサーチによって構成される。理研グループは、オリンパス等が開発したイメージング機器、すなわち針状レンズを装備したin vivoレーザー走査型顕微鏡(IV100)や、非侵襲的にマウス個体内の蛍光プローブ検出を可能とする蛍光分子トモグラフィー装置を用いた生体内イメージング基盤技術を確立し、理研が収集した各種の疾患モデルや独自に開発した遺伝子導入動物を利用し、実際に種々の生体機能評価系(オートファジー、小胞体ストレス、関節リウマチ)を構築した。

東大グループは、ロボティクス技術を用いて、生体イメージングの大きな問題点である動物の呼吸、拍動などによる蛍光顕微鏡画像のぶれを制御する 2 種類の技術の開発を行い、実際に、ぶれを有意に低減することに成功した。

北大グループは東レリサーチと共同で、臓器まるごとのレベルで分子間相互作用を検出することを試み、そのための正立型蛍光相関分光測定装置の作製を行った。



蛍光分子トモグラフィーによる生体内イメージング



型連携企業が開発中の抗がん剤候補物質に対するヒト細胞株の感受性・非感受性を鑑別できる遺伝子発現データセットを開発した。平成 20 年度は、課題解決型連携企業から提供されるサンプルから遺伝子発現プロファイルを取得・解析することにより、臨床試験で毒性が検出されたために開発中止となった薬剤の毒性を動物試験における遺伝子発現変動解析で予測できる可能性があることを明らかにした。

### III. 研究開発成果について

#### 2. バイオテクノロジー開発技術研究組合委託分研究開発成果(平成 18~21 年度)

##### ⑧マイクロサテライトマーカーを利用した疾患関連遺伝子探索技術により特定された疾患感受性遺伝子群の抽出技術の研究開発

実施体制: ジェノダイブファーマ株式会社(平成 19 年度まで)

共同研究: 東海大学医学部猪子研究室

再委託: 東海大学医学部猪子研究室(平成 20 年度からバイオ組合から)

#### (1) 研究開発の成果

##### 1) 糖尿病感受性遺伝子をターゲットとした創薬へのアプローチ

###### A 糖尿病感受性遺伝子

ゲノムワイド遺伝解析によって、ヒト糖尿病感受性遺伝子を2個、即ち、プロテインキナーゼPKXとエンドサイトーシス関連因子を同定した。双方とも、ヒト糖尿病感受性遺伝因子としての同定は我々の例が初めてである。

###### B プロテインキナーゼPKXを標的としたin silico創薬

2つの戦略でPKXのin silico低分子化合物スクリーニングを行った。戦略1では、PKXと、その相互作用因子との相互作用面を標的とした。戦略2では、“Druggable Concavity”と推定されるタンパク質表面の領域に対する結合低分子をスクリーニングした。

in silicoで選定した化合物については、PKXに対する効果を培養細胞にて検討した結果、活性化に伴うPKXの不溶性画分への移行を阻害する化合物を4個同定した。

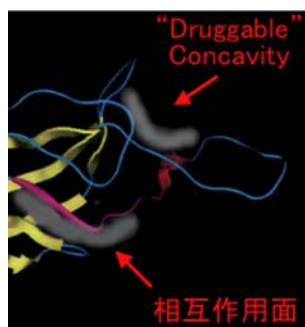


図1 PKX阻害低分子化合物  
スクリーニングの戦略

###### C エンドサイトーシス関連因子の相互作用解析

我々が糖尿病感受性遺伝子として同定したエンドサイトーシス関連因子は、脳での発現が高いことが知られているが、その作用部位や機能は不明である。そこで、後述する独自の酵母ツーハイブリッド(YTH)法を用いて相互作用解析を行い、計169個のYTH相互作用因子を同定した。これら相互作用因子から、このエンドサイトーシス関連因子の作用点がシナプス小胞開口放出・リサイクリングの過程であることが示唆された。

#### 2) 基盤技術としての酵母ツーハイブリッド法の再構築

## A 酵母ツーハイブリッド法

遺伝子機能解析、特に、因子間相互作用解析の基盤技術である酵母ツーハイブリッド(YTH)法は、ベイト(餌)タンパクとプレイ(獲物)タンパクの相互作用に依存するリポーター遺伝子発現を指標として用いる相互作用解析・スクリーニング法である。YTH法を実際に行う上で鍵となるプロセスは、陽性/偽陽性判別であるが、我々はこのプロセスに、新たなコンセプトによる判定法を開発・導入し、ベイト/プレイ両依存性を示す陽性クローンを、両依存性を示さない偽陽性クローンから、直接的に簡便に選別することを可能にした。

### B 直接的な偽陽性判別法を導入した新規酵母ツーハイブリッド法

新酵母ツーハイブリッドシステムの有効性の検証、並びに、各種疾患感受性遺伝子の相互作用因子同定を目的として、11個のヒト遺伝子、及び、6個の酵母遺伝子を対象とした相互作用解析を行った結果、遺伝子当たり100程度のYTH相互作用因子を得た。同一遺伝子をBaitとして用いた過去のYTH解析と比較して、平均14倍のYTH相互作用因子が得られており、新規法での格段の検出力向上が明らかである。従って、この新YTH法は、その検出力の高さ故、並びに、システムとして組み込まれた直接的偽陽性判別法の信頼度故に、一般的にも有用であると考えられる。

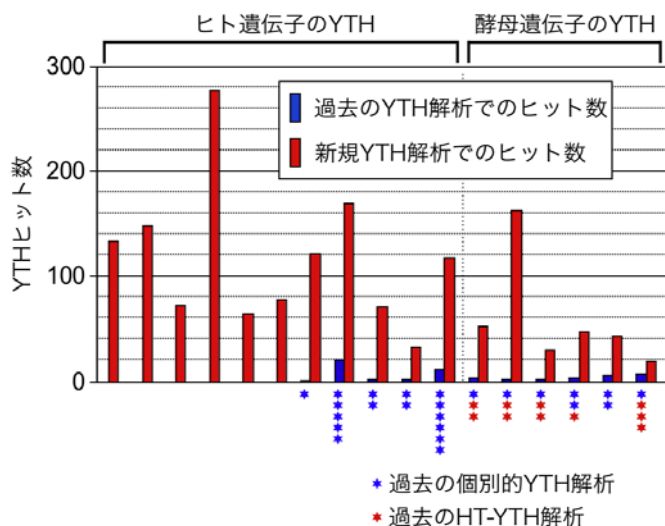


図2 新規YTH法の結果の概略

## 3) 高血圧感受性遺伝子に関連する創薬ターゲットの抽出

### A 高血圧感受性遺伝子 LPIN1

本態性高血圧のゲノムワイド遺伝解析より、LPIN1、SMOC2を高血圧感受性遺伝子として特定した。LPIN1については、従来肥満関連遺伝子として注目されてきたが、高血圧との関係については知られていない。そこで、LPIN1変異マウスを用い血圧測定を行ったところ、顕著な血圧の上昇が見られた。また、ヒト検体を用いたQTL(量的形質遺伝子座)解析の結果は、LPIN1の血圧への効果を示すものであった。これらの結果は、LPIN1が高血圧の遺伝要因であるとする我々の先の結果と一致する。LPIN1とPPAR $\gamma$ のコアクチベーターであるPGC1 $\alpha$ との相互作用が既に報告されている。従って、LPIN1-PGC1 $\alpha$ を標的とすることによって、レニン・アンジオテンシン・アルドステロン系等を標的とした従来の降圧剤とは原理的に異なる、生活習慣病の根幹を標的とした高血圧予防・治療剤の開発に繋がる可能性が期待される。



## B 高血圧感受性遺伝子 SMOC2——新YTH法を中心としたネットワーク解析の例——

SMOC2は、Osteonectin等と同ファミリーに属する細胞外基質タンパク質であり、機能、或いは、発現の亢進が高血圧に関連すると考えられる。

我々はSMOC2の独自YTH解析によって279のYTH相互作用因子を得た。これら279因子に対する既知の相互作用因子を公開データベース(BioGRID DB)を用いて網羅的に検索することによって、約20因子から構成される密な閉じたネットワークが抽出された。この相互作用ネットワークより、特定の細胞外基質3因子とSMOC2の相互作用表面を、有望な創薬ターゲットとして同定した。

### 4) 関節リウマチ感受性遺伝子をターゲットとした創薬戦略

#### A リウマチ抑制因子としてのNFKBIL1

NFKBIL1は、関節リウマチ感受性遺伝子として我々が独自に同定した遺伝子であり、リウマチの抑制因子であると考えられる。そこで、NFKBIL1過剰発現トランスジェニックマウスを作成し、マウスリウマチモデルとして広く使用されているコラーゲン誘導関節炎の発症への影響を観察した。その結果、NFKBIL1過剰発現は、関節炎の発症頻度、重症度の双方の減少を齎すことが明らかとなり、動物個体においてのリウマチ抑制因子としての作用を確認することができた。

#### B NFKBIL1の作用機序

NFKBIL1は、構造的類似性に基づいてNF $\kappa$ B inhibitor-like protein 1と命名されている。しかし、細胞生存や生体防御に重要な役割を果たす転写調節因子NF $\kappa$ Bとの機能的な関連はまったく明らかではなかった。そこで、タンパクアフィニティ精製法による相互作用因子同定を行ったところ、NF $\kappa$ Bシグナル伝達系の関連因子が同定された。この結果を手がかりとして行った免疫沈降-イムノブロット解析や、RNA干渉実験等の詳細な解析により、NFKBIL1はNF $\kappa$ B非古典的経路の因子群と相互作用する特異的な抑制因子であることを見出した。従って、創薬へのアプローチとしては、NFKBIL1の機能・発現の亢進、或いは、NF $\kappa$ B非古典的経路の特異的抑制に焦点を絞った戦略が有効であると考えられる。

## (2) 目標に照らした達成状況

### ① 目標とその達成度

計画開始時に設定した具体的な2項目の目標は、疾患感受性遺伝子を起点とした疾患カスケードを合計3個構築すること、及び、*in silico*による化合物設計を行い、ヒット化合物候補を2個得ること、であった。前者については、我々が同定した疾患感受性遺伝子である糖尿病感受性遺伝子(PKXとエンドサイトーシス関連因子)、高血圧感受性遺伝子(LPIN1とSMOC2)、関節リウマチ(NFKBIL1)を起点とする機能ネットワークを明らかにした。また、LPIN1、NFKBIL1については、動物モデルを用いてこれらの遺伝子の機能欠損と疾患の関係の検証も行った。また、後者の化合物同定については、その機能の抑制が糖尿病症状の緩和をもたらすことが予想されるPKXを対象として、*in silico*化合物設計とそれに続く培養細胞系での活性検証によって、4個の阻害低分子化合物を見出した。

### ② 成果の意義

本研究では、糖尿病、高血圧、関節リウマチの感受性遺伝子について、それらの機能ネットワークを見出すとともに、創薬ターゲットとなり得るタンパク質間相互作用を特定した。各々、既存の治

療薬ターゲットとは重複しておらず、これらの疾患の治療薬開発に向けて、新たなコンセプトに基づく戦略を具体的に提示するものである。また、糖尿病については、本研究で見出した PKX 阻害化合物は、直接医薬品への出発点として有効であることが期待される。

本研究では、遺伝子から創薬へのアプローチの出発点における基盤技術として、酵母ツーハイブリッド法を再検討し、独自システムを構築した。従来法に比較して飛躍的に検出力が向上しており、また、鍵となる陽性・偽陽性判定についてもシステム内に組み込むことによって高い信頼性を実現した。創薬を目指したアプローチに限らず相互作用解析は遺伝子機能の解明と、それが関与するネットワークの特定に不可欠であり、我々の *in silico* 化合物設計法の有効性の実証とともに、基盤技術の進展として重要である。

### ③実用化の見通しについてと波及効果

#### 1 各疾患遺伝子を起点とする創薬ターゲットについて

既存治療薬のターゲットとは重複しない各創薬ターゲットについては、既に鍵となる相互作用因子候補を同定しており、具体的な創薬戦略を提示し得る段階にある。

#### 2 プロテインキナーゼ PKX 阻害剤

新たなコンセプトに基づく糖尿病治療薬の開発に向けて、同定された PKX 阻害剤の動物モデルでの効果の検証を経て、実用化を目指す。

#### 3 遺伝子から創薬への戦略の提示

本研究では5つの疾患感受性遺伝子を起点として、各々現時点での到達点に差はあるものの、具体的な創薬ターゲットの提示、さらには、相互作用を指標とした化合物探索のロジックの提示が可能で知見を集積することができた。本研究においてもその有効性を実証した化合物設計法とともに、ファーマコジェノミクス全般への波及効果が予想される。

#### 4 新規酵母ツーハイブリッド法

酵母ツーハイブリッド法には、既に多数の企業が参入している。新たなロジックを導入した本研究の新規酵母ツーハイブリッド法の、ハイスループット化、実用化を早期に実現する計画である。

## ⑨siRNA ライブラリー等を用いた生物機能制御遺伝子の探索技術及び創薬標的検証技術の研究開発

実施体制: アステラス製薬株式会社

共同研究: 東海大学医学部、北里大学薬学部、兵庫医療大学薬学部

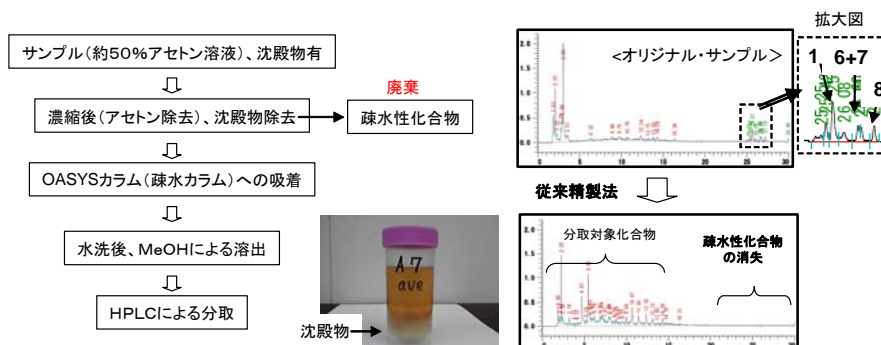
### 1. 糖尿病創薬標的の基盤技術開発(発見、生物学的評価及び化合物創出)

・**siRNA を用いる方法:** siRNA を用いた実験を行う際、遺伝子導入の効率、各細胞毎のバラつきおよび毒性が一番の問題となる。そこで我々は、肝臓細胞で、DNA を好成績に遺伝子導入可能な siRNA の遺伝子導入系を構築した。

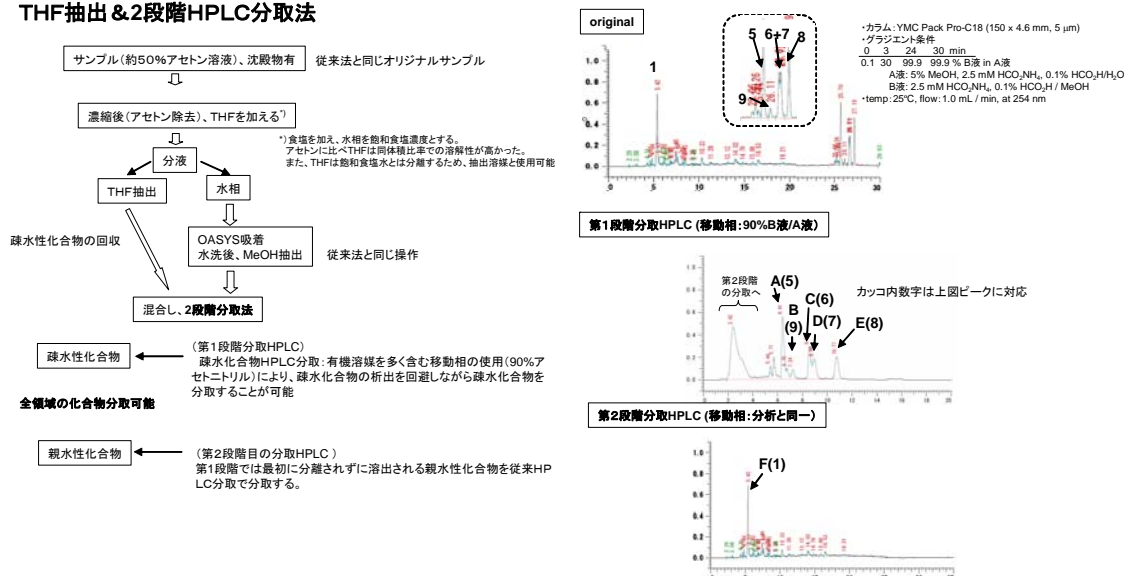
・**化合物を用いる方法:** 天然化合物 糖尿病創薬標的を同定するための有用な天然物を取得する為に、微生物の代謝を活性化することにより、未利用天然物を生産させる放線菌の育種技術の開発を行った。その結果、各菌株が生産することが知られている既知化合物の他、多くの新規化合物ピークを得た。

醗酵産物の従来の抽出法では、疎水性な化合物のライブラリー化の効率が低くなる懸念があった。そこで、我々はこれらの問題を解決するため、新たに THF 抽出法&2 段階分取 HPLC 法を開発した。

#### 従来法による醗酵天然物精製法と問題点



#### THF抽出&2段階HPLC分取法



以上を組み合わせ、新規天然物を単離し、産総研のライブラリーへと提供した。

一方、次世代天然化合物統合データベース構築の基礎検討のために、これらの生産物と生合成遺伝子との関連づけを試みた。活性化に用いた放線菌の内 3 種類の菌株 *Streptomyces tsukubaensis* 9993, *Streptomyces* sp. 6982, *Streptomyces* sp. 631689 のドラフトゲノムシーケンスを解析した。9993 株では、総計 289Mb の read 配列より約 7.7Mb(冗長度 37.5)の塩基配列が推定された。このドラフト配列中からは Tacrolimus 生合成遺伝子クラスターなど、PKS, NRPS を含む 11 個の 2 次代謝遺伝子クラスターが見出された。*Streptomyces tsukubaensis* 9993 のゲノム解析結果に関しては、Journal of Molecular Evolution 投稿準備中である。

**低分子化合物** ドラッグライクネスを担保する手段として、既存の薬物から共通の構造を抽出し、そのような共通構造を有する化合物ライブラリーを構築する手法が考えられる。そこで、主に購入可能な医薬品からなる化合物群より最優先構造および／または優先的部分構造を含むと言う観点から 103 化合物を抽出し小型の化合物ライブラリーを構築した。

また、1,3,5-オキサザトリキナン骨格をスペーサーに持つトリプレット薬からなる低分子化合物ライブラリーを構築した。トリプレット薬は1分子中に3つの薬物単位を持つ化合物で、同種の2つの薬物単位と1つの異なる薬物単位から成る非対称トリプレット薬は、作用の増強と2種の薬理作用(デュアル作用)の両方が期待できる。

・**網羅的遺伝子発現を用いる方法**: 体内時計は、生体内のあらゆる機能調整に影響を及ぼすことが分かってきている。肝臓などの体のさまざまな器官は、体内時計に合わせて活動している。このため、体内時計が乱れれば、これらの体の器官の活動も乱れてしまう。そこで、我々は、不規則な摂食行動による代謝活動への影響および糖尿病、肥満における肝臓、脂肪組織における体内時計への影響の検討を行った。単純な発現量の比較ではなく、一日の遺伝子発現パターンの相違から、標的因子を探索する事が可能になり、より正確な標的因子の探索が可能となる基盤開発に成功した。

・**マルチインディケーター細胞を用いる方法**: 同一のタンパク質の活性を阻害する化合物は、一般的によく似た表現型を示す。化合物の標的となるタンパク質は、遺伝子によりコードされている。siRNA などにより遺伝子の発現を抑制すると、化合物による阻害時と同様の表現型を示すと予想される。さらに、標的未知の化合物を作用させた細胞の表現型が、ある標的既知の化合物や siRNA 作用時と同様の表現型を示せば、その標的未知化合物は同じのターゲットを持つことが推測される。細胞の「見た目」からターゲットが推測できる。標的既知の小規模標準化合物ライブラリーを用いて、各化合物処理後の核、細胞質、オルガネラのそれぞれの蛍光像を取得した画像ライブラリーの構築と、それから面積、蛍光量、真円度、周囲長、数などを網羅的に数値化した情報、さらに複数のパラメータを組み合わせた情報も加え、簡易的な表現型のデータベースを構築した。

・**アフィニティークロマトグラフィーを用いる方法**: 標的蛋白質探索研究の第一歩に当該生理活性物質が直接結合する蛋白質に絞る戦術は特に効果的である。アフィニティークロマトグラフィー法は、生理活性物質を適当な固相担体に固定化し、標的蛋白質を含むことが既知な臓器あるいは細胞から調整したライゼートと混合し、特異的に結合する蛋白質を網羅的に同定する方法である。今回、我々はこれまでの検討によってラット初代肝細胞を用いた糖新生評価において、明確な阻害作用が認められ、今後の抗糖尿病薬として期待される 5 種類の天然化合物および低分子化合物に関し、独自に開発した NEDO 成果物であるアフィニティ樹脂用固相担体(AquaFirmus、筑波家田化学より販売中)を用いターゲット探索を行った。これらの化合物が明確な in vivo 糖新生

抑制作用を示すことから、これらの天然物のターゲットが同定されれば、魅力ある創薬ターゲットとなることが期待される。

・**計算化学を用いる方法**： 1. 標的分子の立体構造情報を活用した *in silico* 探索

標的分子の立体構造情報を活用すれば、より正確な *in silico* 探索が可能になる。本プロジェクトでは、主に次の2段階で標的分子に基づく *in silico* 探索を行った。第一段階は、標的分子におけるリガンド結合部位の特徴を活用した pre-screening である。第二段階は、標的分子と低分子のドッキング・シミュレーションである。シミュレーションには当該研究者らによって開発されたソフトウェア ASEDock<sup>2)</sup>を使用した。本研究では、市販されている化合物を独自の方法で編集統合した大規模化合物データベース(約 500 万化合物からなる)を *in silico* 探索の主な対象とした。

2. 既知分子の化学構造を活用した *in silico* 探索

報告されている化合物の文献調査を行い、データベース化した。その後、X 線解析で明らかにされている結合部に対するアゴニストの結合様式を解析した。上記大規模化合物データベース(約 450 万化合物)から、化合物を抽出した。更にこれらの化合物と標的との結合性をドッキング・シミュレーション(ASEDock)で解析した。

## 2. 糖尿病創薬標的の各論

・**siRNA および化合物を用いた新規糖尿病創薬標的の探索**： ラット肝臓樹立細胞 H4IIEC3 を用い、糖新生抑制活性を指標とし、魅力的な糖尿病創薬標的を探索するツールとしての化合物を得ること目的として種々のタイプのスクリーニングを行ない、ヒット遺伝子および化合物を得た。

・**AngptlX**： 近年の研究により脂肪組織から分泌される因子の多くが、肝臓および筋肉に働き、代謝を制御している事が報告されている。そのため、脂肪組織において、発現が摂食行動のリズムパターンと同時刻で日内リズムを刻み、且つ、糖尿および肥満によって発現が減少する分泌タンパクを探索を行なったところ、AGF (Angptl6)のファミリーである「AngptlX」が、その条件に該当した。AngptlX は摂食時に発現が上昇し、インスリン感受性を亢進する事で、過度の血糖や中性脂肪の上昇を抑制している事が示唆され、糖尿病患者においては、その発現が減少し、インスリン抵抗性を呈する事が考えられる(現在、論文投稿中)。AngptlX を標的とした創薬は、糖尿病の治療薬の新たな作用機構の一つとして有用であると考えられる。

・**遺伝子 9**： AngptlX の場合と同様にマイクロアレイの結果から、「遺伝子9」の発現が肥満・糖尿で変化する事が明らかとなった。「遺伝子9」は心臓や脳において病態に関係なく発現しているが、糖尿病病態進行によって、それまで発現していなかった脂肪組織で発現が急上昇することが明らかとなり、内臓肥満と連関が示唆された。遺伝子9は糖尿病患者において、Glut4 あるいは LDL、VLDL 受容体の発現を抑制する事で、高血糖および高 LDL/VLDL 血症を引き起している事が示唆され、遺伝子9を標的とした創薬が、糖尿病治療に新たな知見をもたらす可能性が考えられる。(現在、論文投稿準備中)

・**PPAR**： 本研究では、生理活性物質の構造情報と標的分子の構造情報の両面からのドラッグデザイン技術開発を志向していることから、糖尿病治療薬としての創薬標的分子としては新しくはないが、化合物 (agonist) の構造情報、標的分子の構造情報ともに豊富に存在する PPAR (peroxisome proliferator sctivated receptor) を選定した。また、糖尿病のみならず、近年注目されているメタボリックシンドローム治療への効果も考慮し、 $\alpha$ 、 $\gamma$ 、 $\delta$  の全てまたは2種を標的とした、pan agonist または dual agoist の設計を目標とした。化合物 KA53 は特許化合物に比べて

PPAR $\gamma$  および  $\delta$  に対して数十倍強い agonist 活性を示した。KA53 については、ソフトウェア ASEDock を用いて PPAR 結合部位とのドッキング計算を実施し、それらの結合様式を可視化した。これらの情報を基に化合物の設計と合成を再度実施し、PPAR $\gamma$  /  $\delta$  dual agonist 活性が KA53 と同等以上の化合物を4種取得した。また、PPAR $\gamma$  作用強度 (potency) が KA53 以上の化合物2種を取得した。

・AGF: AGF は肝臓で発現し、血管新生を制御する分泌因子として同定された。近年、トランスジェニックマウスおよびノックアウトマウスの解析により、抗肥満・糖尿病作用を有する事が報告されたが、AGF の受容体および作用標的組織が不明であるため、AGF が何故、抗肥満および抗糖尿病作用を示すのかは明らかとなっていなかった。我々は、本プロジェクトにおいて、AGF が肝実質細胞の糖新生の律速酵素である G6Pase の発現を抑制し、糖産生を抑制している事を明らかにした。また、詳細な作用機構解析を行ったところ、インスリンシグナルの鍵因子である Akt の活性化を介し、G6Pase の正の転写因子である Foxo1 の核外移行を引き起し、その活性を抑制している事が明らかとなった (kitazawa M, et al. J Pharmacol Exp Ther. 2007)。

・PP2A: 計算科学に関しては、上記の項を参照。天然化合物FR177391は、強力なPP2Aの選択的阻害剤であり、in vivo において血中コレステロール低下作用を示す。1,3,5-オキサザトリキナン骨格をスペーサーに持つトリプレット薬は3次元的に様々な方向にファーマコフォア結合可能な置換基を配置できるという特徴を利用し、PP2A (Proton Phosphatase 2A) 阻害剤の設計を試みた。すなわち、FR177391 およびオカダ酸とPP2Aとのドッキング計算結果を基に、約1600化合物を設計した。設計化合物とPP2Aとのドッキング計算結果から高いスコアを示したトリプレット薬を合成し、評価に供した。

## ⑩化合物又は相互作用を探索/評価する基盤技術の開発

実施体制:株式会社日立製作所

本研究では、「金ナノ粒子センサを用いた新たな分子間相互作用解析システムの開発」と「トランスポーターの機能を調整する化合物の探索, 評価基盤技術の開発」を行った。

ハイスループットかつ低コストで, 網羅的にタンパク質の相互作用解析を行う事が可能となる新たな手法の技術開発が期待されている背景を受け, 分子間相互作用計測を簡便かつ高効率で行える基盤システムを, 金ナノ粒子センサを用いて開発した。

(1) 糖尿病に関与することが示唆されている PPARA(Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Alpha)と RXRA(Retinoid X Receptor Alpha)タンパク質の相互作用を測定するにあたり, 測定ターゲット以外の非特異検出が課題であった。そこで非特異シグナル削減を目的に, ブロッキング条件と緩衝液条件を適正化し, 非特異検出率で評価した。実験では PPARA を固定化したセンサに対する 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  RXRA 測定と同時に, 対照として 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  別タンパク質の測定も行い特異性を検討した。測定条件を 1  $\text{mg}/\text{mL}$  BSA を用いたセンサ表面ブロッキング, 緩衝液への 250  $\text{mM}$  イミダゾールの添加に適正化した結果, 非特異検出率 0.28 で適正化前の 0.84 から 3 倍向上し, 疾病関連タンパク質の解析事例を蓄積した。(2)金ナノ粒子センサの解析データ蓄積が少ないため, 医薬品候補としての十分な活性や物性を有する化合物(以下リード化合物)の探索ができるなど, アプリケーション開発が課題であった。そこで, リード化合物探索への適用を目的に, モデルタンパク質にリード化合物を作用させ, リード化合物添加によるシグナル変化の有無を検討した。モデルタンパク質にはアステラス製薬でもリード化合物創製アッセイ系構築に使用した PPAR と RXR 系を, リード化合物には 9-cis レチノイン酸を用いた。その結果, ピークシフト値は, 9-cis レチノイン酸濃度 0  $\text{M}$  で 0.3  $\text{nm}$  であったのに対し, 10  $\text{mM}$  では 0.8  $\text{nm}$  に増大し, 金ナノ粒子センサのリード化合物探索への適用の可能性を確認できた。(3) 夾雑物中測定では測定ターゲット濃度が低いためにシグナルが小さくなる場合が多い。そのため夾雑物を含む環境下での検出技術の開発を行うにあたって, 小さい測定シグナルを特異的に増幅することが課題であった。そこで, 測定シグナルの特異的な増幅を目的に, 抗 Flag(8 アミノ酸からなる抗原決定基)抗体を用いて Flag を付加したタンパク質のシグナル増幅を検討した。実験では PPARA を固定化したセンサに, Flag を付加した RXRA(Flag-RXRA)10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  を特異的に結合させた後, 抗 Flag 抗体 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  を作用させた。またシグナル増幅の特異性を確認するため, 対照として His を付加した RXRA(His-RXRA)を作用させ, 抗 Flag 抗体でシグナル増幅を行った。その結果, His-RXRA ではシグナル増幅がなかったのに対して Flag-RXRA でシグナル増幅を確認し, 夾雑物を含む環境下での検出技術が開発できた。(4)金ナノ粒子センサを用いた生体分子間相互作用測定装置の最大の課題は検出感度であり, 現行装置の抗体検出感度は 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  と他社製品よりも数桁低い。そこで我々は装置の検出感度向上を目的に, 装置性能に与える影響が大きい分光光度計を現行装置よりも高スペックなものを用いて新装置を製作し, その性能を BSA 対 BSA 抗体測定で評価した。その結果, 新装置で 0.01  $\mu\text{g}/\text{mL}$ (従来比 100 倍)の BSA 抗体検出に成功して, 現行装置の 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  からの感度向上した。

アフリカツメガエル卵母細胞発現系にトランスポーターを創薬標的とした基質・阻害剤のスクリ

ーニング、薬物動態試験を行うための解析システムの構築及びアフリカツメガエル卵母細胞に薬剤を直接注入する自動化装置などの基盤技術を開発した。

基盤技術の評価の為に、細胞外から細胞内へ薬剤を吸収するトランスポーターで糖尿病に関与する hOCT1(Human Organic Cation Transporter 1), hOCT2(Human Organic Cation Transporter 2)または細胞内から細胞外へ薬剤を排出するトランスポーターで抗がん剤耐性に関与する hMDR1(Human Multidrug Resistance 1)の発現系を構築した。開発した発現系を用いて基質・阻害剤スクリーニング、薬物動態試験が解析可能であるか確認するために、機能解析を行った。

吸収系のトランスポーターにおいては、hOCT1 wild type および hOCT2 isoform a 遺伝子発現卵母細胞を作製した。遺伝子発現卵母細胞の機能バリデーションには、hOCTs の典型的基質である  $^{14}\text{C}$  標識 Metformin の細胞内輸送試験、日本人に発現頻度の高い hOCT1 変異体の細胞内輸送試験などを行った。その結果、 $^{14}\text{C}$ -Metformin の卵母細胞内への輸送が確認でき、卵母細胞による hOCTs 発現系が作成でき、基質スクリーニングが可能で有ることが示せた。

排出系のトランスポーターにおいては、輸送能の解析のためには細胞内に薬剤を導入する必要がある。そこで、薬剤を卵母細胞に直接注入可能な自動化装置を開発した。



自動薬剤導入装置

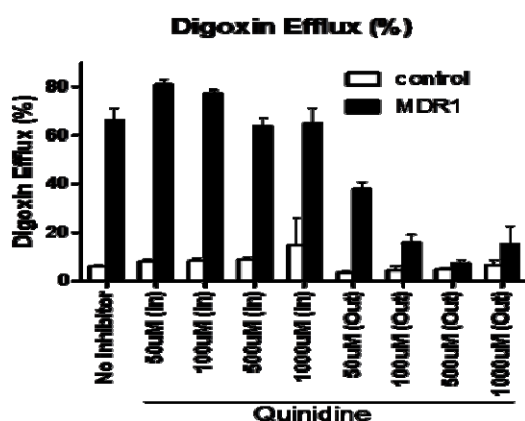
装置の評価には高分子の薬剤として放射性標識イヌリン ( $^{14}\text{C}$ -inulin) 及び低分子の薬剤として放射性標識マンニトール ( $^3\text{H}$ -mannitol) を用いた。薬剤保持能を評価するために薬剤を注入してから一定時間後の卵母細胞外への薬剤の放出量及び卵母細胞内の薬剤含有量の測定を行った。さらに、注入時の外液へのリークの測定も行った。 $^{14}\text{C}$ -inulin の6時間後までの薬剤放出量は一定かつ1%未満であった。さらに、注入時のリークは20%程度であったが、卵母細胞内に注入された薬剤量は一定であった。 $^3\text{H}$ -mannitol においては6時間後までの薬剤放出量は時間依存性かつ直線的に増加したが、全体の7%にすぎなかった。さらに卵母細胞内の薬剤量は放出量に依存して減少した。なお、注入時のリークは34%程度であった。細胞冷却機能の搭載により外液への薬剤のリークを減らすこともできた。この装置により、96穴プレート一枚分の細胞に約5分で再現性良く薬剤を導入可能になった。

開発した hMDR1 遺伝子発現卵母細胞と自動薬剤導入装置によるアッセイ系を検証するために、10種類の放射性標識された既知薬剤化合物で評価し、基質スクリーニングが可能で有ることが示された。さらに、同様な実験を非放射性的の薬剤化合物で行い、卵母細胞1細胞からの排出過程を、質量分析計(LC-MS/MS法)を用いて定量した。薬剤には10種類の化合物中、排出率が高か



った 4 種類の薬剤 (Doxorubicin(抗がん剤), Vinblastine(抗がん剤), Vincristine(抗がん剤), Digoxin(強心薬)) を選択した。ラジオアイソトープ法で定量された結果と質量分析法で定量された結果はほぼ同等であり, ラジオアイソトープ法を質量分析法で置き換え可能であることが示された。

本基盤技術が適用可能な範囲を拡大するために, ラジオアイソトープ法では困難な複数薬剤の同時定量を行った。その一例として, 基質 Digoxin と阻害剤 Quinidine(抗不整脈剤)を用いた薬物相互作用の検証を質量分析方法で行った。原理的に, 質量分析法を用いると無染色の複数薬剤の同時定量が可能であるが, ラジオアイソトープ法では複数薬剤の放射性ラベル化及びその検出が困難である。検証には, 基質 Digoxin の典型的な阻害剤である Quinidine を用いた。Quinidine が細胞の内側もしくは外側から Digoxin の輸送を阻害しているか確認するために, 内側もしくは外側に Quinidine を導入して, Digoxin 輸送能を評価した。その結果, 細胞内側にある Quinidine では Digoxin の輸送を阻害できないことが示され, 既存の知見と一致した。これらの結果より, 開発した基盤技術が薬物動態試験及び阻害剤スクリーニングに適用可能であることが示された。



Digoxin と Quinidine の薬物相互作用

薬物相互作用解析を通して培養細胞発現系と卵母細胞発現系での違いを検証した。比較に用いた培養細胞発現系にはブタ腎上皮細胞由来の LLC-PK1 細胞を用いた。フィルターメンブレン上で LLC-PK1 細胞を培養し, 方向性を持った細胞膜を人工的に作成し, 基質 Digoxin 輸送能の評価を Apical 側(細胞の頂上側)または Basal 側(細胞の基底側)に阻害剤 Quinidine を導入して行った。実験手法が違うため単純に比較することは難しいが, 卵母細胞発現系で得られた結果と同じ傾向が見られた。他の細胞系にも適用可能な定量系であることが示され, 汎用性の高いシステムであることが示された。

## IV. 実用化の見通しについて

### 一般社団法人バイオ産業情報化コンソーシアム委託分

課題解決型企業連携という新しい枠組みを設けて製薬関連企業の本プロジェクトへの参画を募ることにより、従来型の技術開発系企業6社に加えて、国内の製薬関連企業19社の参画が実現した。課題解決型企業連携とは、製薬企業が現在当面している研究課題(臨床開発薬のターゲットタンパク質決定、薬理メカニズムの解明、創薬候補化合物の探索など)について、本プロジェクトにて開発したタンパク質相互作用解析技術等の新規技術、各種のスクリーニング系、cDNA 等のリソースを活用して、各製薬企業が抱える創薬ボトルネックの解消に貢献することにある。

また、企業向け成果報告会を定期的に開催し、技術開発途中の早い段階でその成果を参画企業に開示した。企業の意見を取り入れることにより、企業のニーズにあった技術開発へフィードバックするとともに、企業への円滑な技術移転を図った。

### 研究開発項目①「タンパク質の相互作用解析等により創薬ターゲット候補・疾患メカニズムを解明する技術の開発」

#### ①タンパク質ネットワーク解析技術の開発

課題解決型企業連携として、各企業が抱えている個別課題に関連する解析を実施した。企業から提供された創薬ターゲット候補となっているタンパク質などのサンプルに対して疾患関連タンパク質ネットワーク解析を行い、その bait タンパク質の機能情報および創薬ターゲット候補情報を得た(8社 133 サンプル)。また、企業から提供された開発薬、或いは上市薬化合物のターゲットタンパク質解析を行い、化合物の作用メカニズムに関する情報を得た(11社 81 化合物)。これらの企業由来の標的や化合物にかかわる相互作用の解析は、それ自体が各社の創薬に密接にかかわるものであり、すでに実用化されている。現時点で、1化合物については、解析結果によりそのターゲットタンパク質を明らかにし、臨床研究へ進んでいる。

#### ②タンパク質相互作用情報の検証技術の開発

Amalgaam(有)では、メモリーダイ蛍光タンパク質 Kusabira-Green (mKG)を改良したタンパク質間相互作用解析キット Fluo-Chase Kit を製品化し、2007年6月、(株)医学生物学研究所から販売を開始した。(株)医学生物学研究所では、mKG-N 末端側断片、mKG-C 末端側断片を検出するモノクローナル抗体を開発し、両抗体とも2007年11月、販売を開始した。Amalgaam(有)では、FRETドナー用蛍光タンパク質単量体 Umikinoko-Green (mUkG)の販売を、2008年に開始した。

Multisite Gateway 法によるマルチ遺伝子発現クローンを染色体特定部位へ導入する技術は、再生医療・遺伝子治療分野の企業や研究機関、製薬企業や関連研究分野への貢献が期待できるため、インビトロジェン社との協力においてこの技術の提供を検討している。

ヒト完全長 cDNA ライブラリーは、製薬企業や大学等の研究機関における基礎的なバイオ研究から創薬開発まで広く活用できる。Human Gene & Protein Database (HGPD)の公開を開始し、製品評価技術基盤機構より、これらのヒトタンパク質発現リソースクローンを一般配布しているが、新たに開発したクローンも、公開・配布する予定である。

### ③タンパク質相互作用予測技術の開発

タンパク質間相互作用制御化合物のインシリコスクリーニングに特化した、タンパク質立体構造予測やタンパク質-タンパク質ドッキングシミュレーション、インシリコスクリーニング等の成熟した要素技術の効率的な統合化のノウハウそのものが実用化として期待できる。今後、より多くの民間企業との実施例を充実させることで、技術移転やインシリコ解析技術者の育成に貢献できると考えている。

### ④疾患関連遺伝子探索技術の開発

糖尿病関連遺伝子探索の成果である糖尿病感受性遺伝子に係る相互作用分子の同定結果については、参画している製薬企業が興味を持ち、実用化に向けた検討を始める予定である。

## 研究開発項目②「生物機能を制御する化合物等を探索・評価する技術の開発」

### ⑤化合物等の探索技術の開発

産総研および NITE によるインハウスライブラリー (157,019 サンプル) に加え、製薬系企業等 (188,274 サンプル、13 社+1 社団法人) 提供のライブラリーを含んだ合計 345,293 サンプルからなる世界最大級の天然物ライブラリーは、平成 23 年 5 月に設立した次世代天然物化学技術研究組合で管理されるようになり、アカデミアおよび民間企業を対象とした相互利用および普及利用を目的として、広く国内の様々なスクリーニングに適用可能となった。これにより、我が国の創薬が推進されることが期待される。

また、このプロジェクトで独自に得られた新規化合物については、化合物高機能化チームにおける誘導体展開も含め、詳細な生物活性を検討中である。産業上有用と期待される化合物については、動態、毒性などを考慮しながら改良を行い、参画している製薬企業への導出を検討する。

### ⑥化合物等の高機能化技術の開発

これまで合成が困難であったデオキシオリゴ糖連結法を開発し、アグリコンに直接デオキシ糖を導入するという高度な技術を開発した。非天然型アミノ酸、およびヒドロキシカルボン酸を含む環状デブシペプチドのライブラリー合成法を確立した。また、天然物をモチーフとした新規骨格化合物ライブラリー合成法を開発した。これらの化合物は化合物ライブラリーに登録し、様々なスクリーニングに利用されており、ヒットがあればフォーカストライブラリーを合成できる体制にある。また、分子プローブの作製技術についてはほぼ実用レベルにあり、課題解決型企業連携におけるタンパク質ネットワーク解析の成果に繋がっている。

### ⑦化合物等の評価技術の開発

臓器固定用 3 次元マイクロステージ及び画像安定化技術は、生体内イメージングにおいて重要な技術であり、将来事業化される可能性は高い。マイクロアレイによる化合物評価では、参画している製薬企業にて開発中の抗がん剤の効く・効かないを区別する遺伝子セットを同定し、その成果を企業に開示した。感受性評価によって治験対象者を絞り込むことが可能となり、大幅な治験コストの削減が期待できる。

## <研究チーム相互連携による成果>

### 2) HSP47-コラーゲン相互作用阻害化合物の創製

HSP47 は、肝硬変・肺繊維症やケロイド治療のターゲットとして、米国では RNA 干渉剤が臨床研究の Phase III 試験にステップアップしている。一方、当研究開発で得られた HSP47 とコラーゲンとの相互作用を阻害する天然物由来の化合物は分子量 500 を切る低分子であり、このよう低分子化合物がタンパク質の相互作用界面を制御できる可能性を示せた意義は大きく、今後ドラッグライクな化合物に構造最適化できれば、極めて有望な創薬リード化合物となる可能性がある。

### 3) TDP1 阻害剤のインシリコ解析に則した高度化

天然物の 10 倍以上強い細胞毒性を示した SP055 は、がん細胞パネル評価において十分に低い有効濃度で既存薬とは異なる増殖阻害作用を示す核酸ミメティクスとして、製薬企業の開発薬としてステージアップの検討を行っている。ベースとなる天然化合物の全合成が達成できれば、本プロジェクトの解析モデルを用いた天然化合物からの誘導体への展開を通じて、より強力な抗腫瘍活性を持つ化合物の創製が期待される。

### 4) Spiruchostatin をモチーフとする HDAC 阻害剤の創製

天然化合物に関しては、既に前臨床試験が終了し、今後、製薬企業での開発が進む予定である。本プロジェクトで創製した化合物は、臨床試験を行う化合物のバックアップとして、また、確立した合成法は、天然化合物の低コストな合成手段としての活用が期待される。

### 5) 新規テロメラゼ阻害剤の開発

テロメア選択的、非選択的 (myc プロモーターに作用) の 2 種類の化合物を得ているが、現在、国内をはじめ、フランス、アメリカ、スイス、シンガポールで詳細な活性試験を行っている。また、天然化合物 telomestatin が悪性グリオーマ由来のがん幹細胞に対して極めて有効であることが示され、アメリカのオハイオ大学で今後の開発を検討中である。天然化合物と逆立体を有する新たな合成誘導体には、より強力な抗がん幹細胞効果が期待されている。

### 6) タンパク質間相互作用を低分子化合物で制御する新戦略

従来までの「鍵と鍵穴」モデルに指南されるインシリコ戦略では、多様なタンパク質相互作用結合部を持つタンパク質間相互作用を制御する低分子ヒット化合物を同定することは難しい。本プロジェクトで開発したタンパク質相互作用様式分類に則したインシリコスクリーニング戦略そのものが、民間企業における実用化プロトコルとなりうる。さらに、標的となるタンパク質間相互作用様式に基づいて低分子化合物群を選定できれば、これはタンパク質間相互作用制御化合物のフォーカスライブラリーとなるため、新規かつ実用的な手法として民間企業等での活用が期待できる。

## <個別研究開発>

### 1) 遺伝子レベルでの創薬ターゲット決定の効率化 (EXPOC マウス開発)

EXPOC®マウスによる疾患関連遺伝子探索では、EXPOC®マウスの表現型解析において特に顕著な表現型を呈した 6 つの因子を発見し、創薬ターゲットとしての有用性を評価する二次評価

試験を実施。今後は、創薬研究⇒非臨床試験⇒臨床試験⇒新規メカニズムにもとづく医薬品開発に向けた取り組みを行う計画である。

## 2) 翻訳リプログラミングに基づく統一的なスクリーニング系の構築(RAPID システム開発)

さらに、改変遺伝暗号翻訳環状ペプチド合成システム(RaPID)については、新規特殊ペプチド薬剤候補を迅速且つ確実に探索する技術として、PeptiDream社(2006年設立)に東大TLOを通して排他的ライセンスが行われ、25人の研究者を抱えるベンチャー企業に成長した。同社は本システムの改良を進め、RaPID・PDシステムを確立した。課題解決型研究の参画企業3社の薬剤標的ではいずれも高活性の特殊ペプチドが見出され、そのうち1社とは既に継続研究契約が成立し、他の標的も含めた特殊ペプチド薬剤探索がスタートしている。また、同社は独自に国内大手製薬企業2社および海外大手製薬企業4社と契約を結び、特殊ペプチド薬剤探索を進めている。

## バイオテクノロジー開発技術研究組合委託分

### ⑧マイクロサテライトマーカーを利用した疾患関連遺伝子探索技術により特定された疾患感受性遺伝子群の創薬価値抽出技術の開発

新たなアプローチを取り入れた(独自の遺伝解析により見出した疾患感受性遺伝子群を基盤とした)、創薬ターゲットの抽出、ゲノム創薬手法の実用化をほぼ達成した。

### ⑨siRNA ライブラリー等を用いた生物機能制御遺伝子の探索技術及び創薬標的検証技術の研究開発

開発した「創薬標的探索の基本技術」は、アステラス、東海大学、北里大学、兵庫医療大学等にて、独自に或いは共同して各機関で事業化し活用する。発見された2つの「糖尿病標的蛋白質」に関しては、アステラスにて疾患構造や指向領域変化等も勘案しつつ、可能な限り自社テーマとして継続事業化検討を行う。

### ⑩化合物又は相互作用を探索、評価する基盤技術の研究開発

新規薬剤の効率的な開発に有効な装置ビジネス、受託解析ビジネスの展開を計画している。

## 健康安心イノベーションプログラム基本計画

### 1. 目的

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、QOL(Quality of Life:生活の質)の向上を図ることが求められている。

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、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。

### 2. 政策的位置付け

#### ○「イノベーション25」(2007年6月閣議決定)

生涯健康な社会形成に向けて中長期的に取り組むべき課題として、治療重点の医療から予防・健康増進を重視する保健医療体系の転換、生命倫理・安全性と医療技術促進政策の調和などをとりあげ、再生医療及び在宅医療・介護に係る社会還元加速プロジェクトを実施するとともに、臨床研究・臨床への橋渡し研究をはじめとする研究開発ロードマップの提示により所要の措置を講じていくこととしている。

#### ○がん対策推進基本計画(2007年6月閣議決定)

がん対策基本法に基づき、国、地方公共団体及び関係者等が、がん対策を総合的かつ計画的に推進するために策定された基本方針であり、取り組むべき施策の一つとして「がん研究」が取り上げられている。具体的には、現状、診断薬・診断機器の開発、治療薬・治療機器の開発等が推進されているが、さらに、有用な早期診断技術についての研究開発の推進等に取り組むことが提示されている。

#### ○革新的医薬品・医療機器創出のための5か年戦略(2007年4月)

文部科学省、厚生労働省及び経済産業省の間において革新的な医薬品・医療機器の創出に向け、研究資金の集中投入、ベンチャー企業の育成、臨床研究・治験環境の整備、薬事法における審査の迅速化・質の向上など、研究から上市に至る過程の一貫かつ集中的な支援を実施することとしている。

#### ○新健康フロンティア戦略(2007年4月新健康フロンティア戦略賢人会議)、同アクションプラン(2007年12月)

健康寿命の延伸や生活の質の向上を図ることを目的として策定された新健康フロンティア戦

略及び新健康フロンティア戦略アクションプランの中で、「人間の活動領域の拡張に向けた取組」及び「医療・福祉技術のイノベーション」において、「先進的予防・診断・治療技術の開発」や「医薬等ベンチャー・基盤産業支援対策」等の施策が提示されている。

○科学技術の振興及び成果の社会への還元に向けた制度改革について(2006年12月総合科学技術会議)

科学技術の振興や成果還元上障害となる制度的な阻害要因として研究現場等で顕在化している諸問題を解決するための制度改革の実現に向け、制度所管省庁等が取り組むべき工程表とともに意見具申を行っている。

この中で、「治験を含む臨床研究の総合的推進」として、①支援体制等の整備増強、②臨床研究者・臨床研究支援人材の確保と育成、③研究推進や承認審査のための環境整備、④国民の参画の4つの観点から改革の方向を示している。

○ライフサイエンス推進議員連盟決議(2006年12月)

イノベーションの成果である革新的な医薬品・医療機器を迅速に国民に提供するため、①治験を含む臨床研究の活性化、②新たな医薬品等の承認審査の迅速化、③①及び②に関して総合的に検討を行い、当該問題を国全体で取り組むためのハイレベルな政策対話の実現に向け、政府として早急な対応を図るべきであることを決議している。

○経済成長戦略大綱(2006年7月財政・経済一体改革会議)

がん等の生活習慣病や感染症等各種疾病対策の推進等国民の保健医療水準の向上に資する医薬品・医療機器産業について、関係府省・機関、企業等の双方向の連携の下、特に、基礎・基盤研究、臨床研究及び基礎研究から臨床研究への橋渡し研究を推進するとともに、臨床研究基盤の整備、治験環境の充実等の国民に医薬品・医療機器を迅速に届けるための環境整備を行うことが提示されている。

○新経済成長戦略(2006年6月経済産業省とりまとめ)

産業界、学界、公的機関、政府が連携し、研究から市場へ、市場から研究へと、双方向で鋭い軸が通るようなシステム改革(イノベーションの加速化～「イノベーション・スーパーハイウェイ構想」)を実現するための施策として「がん対策等に資する先進医療機器・技術」の推進、「医薬分野での官民一体の対話の場」など事業化に向けた環境の整備が提示されている。

○第3期科学技術基本計画(2006年3月閣議決定)

第2期計画において、優先的に資源を配分することとされたライフサイエンス分野を、引き続き、特に重点的に研究開発を推進すべき分野(重点推進4分野)として位置づけ。また、研究分野の重点化にとどまらず、分野内の重点化も進め、選択と集中による戦略性の強化を図り、基本理念の下で新たに設定する6つの政策目標(イノベーター日本ー革新を続ける強靱な経済・産業を実現、生涯はつらつ生活ー子供から高齢者まで健康な日本を実現等)との関係を明確化することとしている。

○バイオテクノロジー戦略大綱(2002年12月BT戦略会議取りまとめ)及び産業発掘戦略ー技術革新(「経済財政運営と構造改革に関する基本方針2002」(2002年6月閣議決定)に基づ



き2002年12月取りまとめ)

健康・バイオテクノロジー分野における3つの戦略目標(「研究開発の圧倒的充実」、「産業プロセスの抜本的強化」及び「国民理解の徹底的浸透」)に対応している。

○経済財政運営と構造改革に関する基本方針2005(2005年6月閣議決定)

2006年度までの2年間(重点強化期間)における重点課題として、「新しい躍動の時代に向けて、少子高齢化とグローバル化を乗り切る基盤をつくること」という課題を掲げ、その課題に対し、「3. 持続的な社会保障制度の構築(健康・予防介護等の推進)」や「6. グローバル戦略の強化(「新産業創造戦略2005」の推進)」を取り組むべき事項としている。

○「新産業創造戦略2005」(2005年6月経済産業省取りまとめ、同月13日経済財政諮問会議に報告)

社会ニーズに対応する新産業分野として、「(5)健康・福祉・機器・サービス」を戦略7分野の1つとしており、2010年の市場規模として約75兆円を掲げ、それに向けたアクションプログラムとし取り組むこととしている5つの課題には、「バイオ技術を活用した個別化医療や予防医療等の実現・普及」、「革新的な医療・福祉機器の開発・普及の促進」が提示されている。

### 3. 達成目標

- ①医薬品の成功確率の向上に資する技術開発や臨床への橋渡し研究等を通じた、医薬品の上市期間の短縮や開発コストの低減
- ②治療機器、再生医療を含む先進的な医療機器開発等の推進による国内外生産シェアの増大、厚生労働省との連携事業(マッチングファンド、医療機器開発ガイドラインの策定など)による開発から製品に至るまでの期間の短縮等を達成する。

### 4. 研究開発内容

#### 【プロジェクト】

#### I. 創薬・診断

##### I-1. 革新的医薬品の創出

##### (1)糖鎖機能活用技術開発(運営費交付金)

##### ①概要

我が国が強みを持つ糖鎖工学分野において、これまでに取得・開発した「糖鎖遺伝子ライブラリー」「糖鎖構造解析技術」「糖鎖合成技術」を活用し、癌や感染症など様々な疾病に関与する糖鎖の機能を解析する基盤技術を確立し、我が国の優位性を維持するとともに、創薬・診断等の分野における糖鎖機能の産業利用の促進を図る。

##### ②技術目標及び達成時期

2010年度までに、糖鎖や糖タンパク質などの機能を分子レベルで効率的に解明するための基盤技術、糖鎖の機能解析・検証技術、及び、有用性が認められた糖鎖機能を産

業利用するための基盤技術を開発する。

③研究開発期間

2006年度～2010年度

(2)機能性RNAプロジェクト(運営費交付金)

①概要

近年の研究成果により、タンパク質の合成に関与する既知のRNAとは異なり、がんや発生分化等の重要な生命現象に関与するタンパク質をコードしていないRNA(機能性RNA)の存在が明らかになってきており、世界中の注目を集めている。機能性RNAは再生医療やRNA医薬等への応用化にもつながることが期待されていることから、機能性RNA解析のための新規ツールを開発し、機能解析を行うことにより、本分野における我が国の優位性を確立する。

②技術目標及び達成時期

2009年度までに、機能性RNAの候補となるRNAをゲノム配列上から探索するバイオインフォマティクス技術の開発や、機能性RNAを解析するための支援機器やツールの開発を行い、機能性RNAの機能解析を行う。

③研究開発期間

2005年度～2009年度

(3)ゲノム創薬加速化支援バイオ基盤技術開発(化合物等を活用した生物システム制御基盤技術開発)(運営費交付金)

①概要

我が国が強みとする完全長 cDNA ライブラリーやタンパク質相互作用解析技術等を最大限に活用し、重要なタンパク質ネットワーク解析等により創薬の対象となるタンパク質の効率的な絞り込みを行うとともに、疾患等の生物現象を制御する化合物の探索まで、一貫した技術開発を行う。

②技術目標及び達成時期

2010年度までに、超高速・高感度にタンパク質の相互作用を解析する技術や疾患を制御する化合物の探索・評価技術を開発する。

③研究開発期間

2006年度～2010年度

(4)ゲノム創薬加速化支援バイオ基盤技術開発(創薬加速に向けたタンパク質構造解析基盤技術開発)

①概要

創薬上重要な膜タンパク質は複合体を形成していることも多く、その構造解析及び相互

作用の情報を取得することは創薬研究において重要であるが、その解析は非常に困難である。そこで、膜タンパク質やその複合体の構造情報を取得する新たな技術等の開発に向けて、タンパク質の立体構造及びその構造変化や膜タンパク質複合体の構造情報等の解析及び構造情報を基にした高精度なシミュレーション技術を開発する。

②技術目標及び達成時期

2011年度までに生体内に近い状態での膜タンパク質及びその複合体の構造解析手法、リガンド分子との相互作用解析手法を確立するとともに、当該技術から得られた情報に基づく *in silico* スクリーニング手法を確立する。

③研究開発期間

2007年度～2011年度

(5)ゲノム創薬加速化支援バイオ基盤技術開発(モデル細胞を用いた遺伝子機能等解析技術開発)(運営費交付金)

i)研究用モデル細胞の創製技術開発

①概要

医薬品開発における安全性や薬理評価の確実性の向上等、創薬に向けた研究開発を加速するためには、ヒト生体内における様々な反応や遺伝子の機能をより高い精度で解析するツールの開発が重要である。そのため、人体の組織や疾病等の様々なヒトモデル細胞株を創製するための基盤となる技術開発を行う。

②技術目標及び達成時期

2009年度までに、創薬等の研究開発に資する研究用細胞の創製技術を確立し、複数種の研究用のヒトモデル細胞を創製する。

③研究開発期間

2005年度～2009年度

ii)細胞アレイ等による遺伝子機能の解析技術開発

①概要

世界的にゲノム創薬が競争激化しているが、創薬のターゲットとなる遺伝子を絞り込みいち早く特許を押さえてしまうことが産業競争力強化のためには重要である。このためには、生体内で非常に複雑に制御されている遺伝子ネットワークシステムを高速・高感度に解析するシステムを開発し、創薬のターゲットの効率的な絞り込みを行うことが必要である。具体的には、多数の細胞に同時に異なる遺伝子を高効率で導入することにより、複数の遺伝子発現等の時系列計測を行い、得られる種々の細胞応答データから遺伝子ネットワークを解析する細胞アレイ技術を確立し、疾患関連遺伝子等、特定の創薬ターゲットの同定に有用な汎用性の高い解析ツールの開発を行う。

②技術目標及び達成時期

2009年度までに、細胞イベント(遺伝子発現、たんぱく質の細胞内局在性等)を測定す

のための網羅的なレポーターシステム並びに測定装置を新規に開発し、得られるデータから遺伝子ネットワークの解析システムを確立する。

③研究開発期間

2005年度～2009年度

(6)新機能抗体創製技術開発(運営費交付金)

①概要

ポストゲノム研究や診断・創薬等において重要となっている機能を有する抗体を創製するため、創薬標的として産業利用上重要だが、解析が困難な膜タンパク質やタンパク質複合体を特異的に認識できる抗体を系統的に作成する技術や抗体の分離・精製を高効率に行うための技術の開発を行う。

②技術目標及び達成時期

2010年度までに、産業上有用と考えられるタンパク質やその複合体を特異的に認識する抗体を創製するための基盤技術、及び、製造コスト低減に向けた抗体の分離・精製等を高効率に行う技術を開発する。

③研究開発期間

2006年度～2010年度

(7)基礎研究から臨床研究への橋渡し促進技術開発(運営費交付金)

i)橋渡し及び臨床研究拠点を活用した研究開発(運営費交付金)

①概要

がん対策等の国民医療高度化を目指し、急速に発展している多様なバイオ技術の融合と医療現場への円滑な橋渡しによるイノベーションの創出・加速のため、総合科学技術会議のもと文部科学省及び厚生労働省と連携し、橋渡し研究の強化に一体的に取り組む。具体的には、民間企業と臨床研究機関(文部科学省や厚生労働省が整備する橋渡し研究拠点等)が一体となって行う、医薬品、医療機器、診断ツール等の開発を推進する。

②技術目標及び達成時期

2011年度までに医療現場及び臨床研究からのフィードバックに基づく研究開発により、医薬品、医療機器、診断ツール等の研究開発成果を円滑に実用化につなげる仕組みを確立する。

③研究開発期間

2007年度～2011年度

ii)バイオ診断ツール実用化開発(運営費交付金)

①概要

我が国が有する微細加工技術・表面処理技術といったナノテク等の強みを活かし、微量サンプルから高感度・安価で再現性よく多様な遺伝情報(SNPs、mRNA、タンパク質等)

を検出するためのバイオ診断機器を開発し、臨床現場において有効性を検証することにより個別化医療の実現に寄与する。

②技術目標及び達成時期

SNPs、mRNA、タンパク質等の遺伝情報を計測対象とするバイオ診断機器の実用化開発を行い、2008年度までに、許認可用データ取得可能な技術レベルに達することを旨す。

③研究開発期間

2006度～2008年度

I-2. 診断ツールの開発

(1)個別化医療実現のための技術融合バイオ診断技術開発(運営費交付金)

①概要

我が国が有する微細加工技術・表面処理技術といったナノテク等の強みを活かし、染色体異常を高感度、高精度かつ迅速、安価で非コード領域までを検出するゲノムアレイや解析基盤技術開発を行うとともに、診断への応用を可能とする全自動解析システムの開発を行う。

②技術目標及び達成時期

2010年度までに、BACを用いた非コード領域を含むゲノム全領域を検出できる高精度ゲノムアレイを開発する。さらに、臨床現場において、微量サンプル(数ナノグラム)から、12時間以内に染色体異常(増幅、欠失、コピー数多型等)を、低コストかつ定量性・再現性を確保して検出ができる自動染色体異常解析システムのプロトタイプを開発する。

③研究開発期間

2006年度～2010年度

(2)糖鎖機能活用技術開発(運営費交付金)【再掲】

(3)基礎研究から臨床研究への橋渡し促進技術開発(運営費交付金)【再掲】

I-3. 創薬・診断に係る基盤整備

(1)統合データベースプロジェクト

①概要

ライフサイエンス分野では、自身の研究成果と既存の研究成果と対比することにより、自身の研究成果の仮説を考案する手がかりが得られたり、新しい実用化の発想が得られたりする可能性があるため、国家プロジェクト等により産生された研究データを一括して活

用できるデータベースが、産業界や社会から要望されている。

このため、政府全体の“生命科学データベース統合化の取組”の一環として、経済産業省関連の公的資金研究から産出される研究データを、産業上の有用性を評価のうえ、統合化し、産業界等に提供する。

②技術目標及び達成時期

2010年までに経済産業省関連機関により実施されたライフサイエンス分野の研究開発プロジェクトの成果に関する情報提供サイトを構築・運用する。また、ヒト遺伝子に関連した各種研究成果に関しては、平性17～19年度に実施したゲノム情報統合プロジェクトにおいて構築した「ヒト全遺伝子のアノテーション統合データベース(H-Invitational)」を基礎として、経済産業省関連の研究成果を連携して利用できるシステムを構築する。

③研究開発期間

2008年度～2010年度

II. 診断・治療機器、再生医療等

II-1. 診断・治療機器の開発

(1)分子イメージング機器研究開発プロジェクト(運営費交付金)

i)生活習慣病超早期診断眼底イメージング機器研究開発プロジェクト

①概要

細小血管の分子レベルでの代謝機能を非侵襲で可視化する細胞代謝イメージングを実現し、代謝異常を細胞レベルで観察することにより、循環器系疾患等の早期の診断・治療を図る。

②技術目標及び達成時期

2009年度までに、ナノテクノロジーを活用した光学基盤技術等を確立することにより、細胞やタンパク質レベルの組織診断を可能とする機器を開発する。

③研究開発期間

2005年度～2009年度

ii)悪性腫瘍等治療支援分子イメージング機器研究開発プロジェクト

①概要

良性・悪性の区別も含めた腫瘍の超早期診断を実現するため、悪性腫瘍に特異的に反応する標的物質を利用することにより生体細胞の分子レベルの機能変化を抽出・検出できる機器の開発を行う。

②技術目標及び達成時期

2009年度までに、全身で3mm、局所で1mmの分解能を有する分子イメージング機器を開発する。

③研究開発期間

2005年度～2009年度

(2)次世代DDS型悪性腫瘍治療システムの研究開発事業(運営費交付金)

①概要

DDSのさらなる裾野の拡大、及び早期実用化を目指し、様々な外部エネルギー(機器技術)と薬剤技術を組み合わせることにより、比較的人体の深部にある臓器(肺、消化器)等のがんを対象としたDDS型治療システムの開発を行う。

②技術目標及び達成時期

光線力学治療システムの前臨床試験の開始及び治療効果・安全性の検証と、超音波診断・治療システムの前臨床試験を可能とする薬剤及び装置の完成に関する開発を難治性がんの治療に向けて行う。

③研究開発期間

2006年度～2009年度

(3)インテリジェント手術機器研究開発プロジェクト(運営費交付金)

①概要

手術中ががん細胞等の病巣部の位置や動きを正確に診断しながら、必要最小限の切除で確実かつ安全に治療できる診断と治療が一体となった内視鏡手術支援システムの開発を行う。

②技術目標及び達成時期

・主要部位対象機器研究開発

脳神経外科領域、胸部外科領域、及び消化器外科領域を対象に、基盤技術を確立し、それらの技術を融合化して、製品化・実用化の目処をつける。非臨床試験を実施し、その有効性と安全性を確認する試験結果を得ることを目標とする。

・研究連携型機器開発

子宮内で行われる出生前治療を行うための新しい手術システム・機器を開発する。非臨床試験を実施し、その有効性と安全性を確認する試験結果を得ることを目標とする。

③研究開発期間

2007年度～2011年度(研究連携型機器開発は、2007年度～2009年度)

(4)基礎研究から臨床研究への橋渡し促進技術開発(運営費交付金)【再掲】

Ⅱ-2. 再生医療の実用化

(1)再生医療評価研究開発事業(運営費交付金)

#### i) 評価技術の開発

##### ①概要

ヒトから細胞を採取し、これを体外で培養、必要に応じて組織に分化させ、これを患者に移植・治療する再生医療の国内での早期実用化、産業化を目指し、患者自身の細胞の採取・培養から組織形成・治療までの評価プロセス及び基準を開発、体系化する。

##### ②技術目標及び達成時期

2009年度までに、再生医療の早期実用化、産業化のための、細胞培養評価法の開発、組織形成評価法の開発、実用化レベルでの評価基準の確立を行う。

##### ③研究開発期間

2005年度～2009年度

#### ii) 心筋再生治療研究開発プロジェクト

##### ①概要

心筋再生治療の早期実用化を目指すために、厚い心筋組織で構築された内部に酸素や栄養を供給できるような血管網を有するバイオ心筋の作成技術を開発する。

##### ②技術目標及び達成時期

2009年度までに厚さが5mm以上、酸素、栄養を供給できる血管網を有した心筋組織を開発する。

##### ③研究開発期間

2006年度～2009年度

#### iii) 三次元複合臓器構造体研究開発プロジェクト

##### ①概要

生体適合性等を備えた三次元複合臓器構造体を開発し、従来のティッシュエンジニアリング技術では適用できない臓器の再生を可能にするため、大型化、三次元構造化、自己組織化及び計測評価法の確立のための技術基盤の開発を行う。

##### ②技術目標及び達成時期

2009年度までに従来のティッシュエンジニアリング技術による単層構造に比べて再生組織の厚さが10倍以上及び構造体積は100倍以上、含有組織は従来の単一組織から3種類以上の複合組織化技術を開発する。

##### ③研究開発期間

2006年度～2009年度

#### (2) 基礎研究から臨床研究への橋渡し促進技術開発(運営費交付金)【再掲】

### II-3. 福祉機器の開発



## (1) 福祉用具実用化開発推進事業(運営費交付金)

### ①概要

「福祉用具の研究開発及び普及の促進に関する法律」(福祉用具法)に基づき、高齢者・心身障害者及び介護者の生活の質の向上を目的として、生活支援分野、社会活動支援分野を中心とした福祉用具の実用化開発を行う民間企業等に対し、研究開発費用の2/3以内を補助することで、多様な福祉ニーズに対応するとともに、当該分野における新産業の創出、成長の促進に資する。

### ②技術目標及び達成時期

高齢者、障害者の生活支援、社会参加支援に資する福祉用具の実用化開発を促進することにより、高齢者等の生活における負担の軽減を図り、安全で安心のできる生活を実現する。より具体的な目標として、各々の補助対象事業終了後3年経過した時点で50パーセント以上を製品化する。

### ③研究開発期間

1993年度～

## Ⅱ-4. 診断・治療機器、再生医療等に係る基盤整備

### (1) 医療機器開発ガイドライン策定事業

#### ①概要

医療機器産業への投資、新規企業参入、医療機器研究開発の促進及び薬事法審査の円滑化・迅速化にも資する「医療機器開発ガイドライン」を厚生労働省との連携の下、産学の協力を得て、個別の医療機器ごとに策定し、国内での機器開発促進の環境整備を図るとともに、医療機器メーカーと材料・部品メーカーの適切なリスク分担を可能とするモデル契約の策定やリスクマネジメント手法の開発等について検討を行う。

#### ②技術目標及び達成時期

2010年度までに、今後実用化が期待される先進的な医療機器(7機種程度)について、工学的安定性や生物学的安定性等に関する詳細な評価基準を策定し、開発ガイドラインとして取りまとめる。また、治療機器への部材供給活性化のための調査研究を行い、医療機器開発に反映させることで、ハイリスクな医療機器に対する材料・部品の提供を活性化し、医療機器産業の活性化に資するものとする。

#### ③研究開発期間

2008年度～2010年度

### (2) 福祉機器情報収集・分析・提供事業

#### ①概要

福祉用具法に基づき、民間による福祉機器の実用化のための研究開発を促進するため、福祉機器に関する産業技術に係る情報の収集・分析・提供事業を実施することで、当

該分野における福祉機器の普及や新規産業の創出・成長の促進を図る。

②技術目標及び達成時期

各年において福祉機器に係るニーズ等の調査の実施及び福祉用具実用化推進事業で開発された福祉機器の各種展示会等への出展による情報収集・分析・情報の提供を実施する。

③研究開発期間

1993年度～

5. 政策目標の実現に向けた環境整備(成果の実用化、導入普及に向けた取組)

○バイオテクノロジーに係る研究開発・産業化関連

[調査研究]

1) バイオインダストリー安全対策調査(2000～2009年度)

バイオテクノロジーの安全性を確保するため、これまで得られている知見を基に、安全性関連データベースの整備、安全性評価手法の高度化に必要な事項の検討及びガイドラインの作成を行う。

2) バイオ事業化に伴う生命倫理問題等に関する研究(2002～2011年度)

バイオテクノロジーの実用化に際して、新たな技術に対する国民の理解と合意を得るため、新たな技術の産業化に伴って発生する、我が国の社会における様々な問題を、文献の収集、国内外の調査等を行うことにより研究する。さらに、バイオテクノロジーに対する理解を深めるための情報発信等、社会的受容(public acceptance)を高めるための活動を支援する。

[標準化]

・各プロジェクトで得られた成果のうち、標準化すべきものについては、適切な標準化活動(国際規格(ISO/IEC)、日本工業規格(JIS)、その他国際的に認知された標準の提案等)を実施する。具体的には、統合データベースの情報やインターネットに公開されている情報資源等を相互運用するために、必要なデータ形式、フォーマット等の標準化を推進する。

[導入普及促進]

・個人遺伝情報保護ガイドラインの適切な運用

ゲノム研究の進展は、個人遺伝情報を用い、情報技術を駆使した幅広い医療・健康サービスによる人々の健康や福祉の向上、さらには新しい医療・健康サービス産業の育成に重要な役割を果たそうとしているが、その際、人権を尊重し、社会の理解と協力を得て、個人遺伝情報の厳格な管理の下で適正に事業を実施することが不可欠である。そのため、個人遺伝情報を安全に保護するために作成した事業者が遵守すべきルール「経済産業分野のうち個人遺伝情報を用いた事業分野における個人情報保護ガイドライン(2004年12月17日告示)」(個人遺伝情

報保護ガイドラインという)を適切に運用する。

#### [産業間連携]

##### ・研究開発型ベンチャー支援

バイオベンチャーは商品を市場に送り出すまでに長期間を要する、研究開発のために多額の資金調達を必要とする、事業を行うために様々な規制・審査を経る必要がある等、他業種のベンチャー企業と比較して困難な問題を抱えていることが多い。そのため、バイオベンチャーの様々な問題に対して施策への反映を検討し、補助金等の施策の紹介を通じてバイオベンチャー振興を図る。

また、「産業クラスター計画」に基づき、全国のバイオクラスターにおいて、企業間のネットワーク形成の支援、産学連携による研究開発プロジェクトの支援、地域系ベンチャーファンドによる資金調達支援等を実施していく。

##### ・基礎研究から臨床研究への橋渡し促進技術開発(運営費交付金)【再掲】

#### [プロジェクト等間の連携について]

・ゲノム創薬加速化支援バイオ基盤技術開発(化合物等を活用した生物システム制御基盤技術開発)については、タンパク質機能解析・活用プロジェクトの成果を活用することで、超高速・高感度にタンパク質の相互作用を解析する技術を開発する。

・ゲノム創薬加速化支援バイオ基盤技術開発(創薬加速に向けたタンパク質構造解析基盤技術開発)については、「生体高分子立体構造情報解析」の成果を活用することで、膜タンパク質やその複合体の構造情報を取得する新たな技術等の開発に向けて、タンパク質の立体構造及びその構造変化や膜タンパク質複合体の構造情報等の解析及び構造情報を基にした高精度なシミュレーション技術を開発する。

・糖鎖機能活用技術開発については、糖鎖合成関連遺伝子ライブラリー構築、糖鎖エンジニアリングプロジェクトの成果を活用することで、糖鎖の機能を効率的に解析するための基盤技術を開発する。

・ゲノム創薬加速化支援バイオ基盤技術開発の「化合物等を活用した生物システム制御基盤技術開発」、「創薬加速に向けたタンパク質構造解析基盤技術開発」、「モデル細胞を用いた遺伝子機能等解析技術開発」については、必要に応じ、各々の成果を活用し、効率的、効果的な研究開発を図る。

#### [関係機関との連携]

・総合科学技術会議が推進する基本政策推進専門調査会 分野別推進総合PT ライフサイエンスPT及び科学技術連携施策(「生命科学の基礎・基盤」、「臨床研究・臨床への橋渡し研究」)の下、各プロジェクトについて、関係府省との適切な連携を図る。また、2007年1月に設置された「革新的創薬のための官民対話」の場を通じ、医薬品分野のイノベーションの創出と産業の国際競争力強化に係る諸施策の方向性に対する製薬業界、教育・研究機関、行政(文部科学省、厚生労働省、経済産業省)の認識の共有化を図る。

#### [その他]

##### ・特許への取組

一段と激化する特許戦争の中、成果実用化・効率的な研究開発を推進するため、プロジェクト企画段階から、研究テーマ周辺の論文及び特許状況のサーベイ実施やプロジェクト実施段階における特許出願後の事業化構想等、特許に関する戦略的取組(プロパテントアプローチの導入)を実施する。

#### ○医療福祉機器関連

##### [標準化]

高齢者等支援機器については、関係省庁との緊密な連携の下、標準化等の手法による実用化及び普及の方策を検討する。

##### [導入普及促進]

##### ・福祉医療関連機器普及促進(財政投融资制度)(1992年度～2008年9月末)

医療・福祉関連機器の開発、生産、流通、販売等の関連する供給体制を強化するために必要となる設備に対し、長期かつ低金利な融資制度により支援を行い、さらなる製品の高品質化、低価格化を実現し、安定的な供給体制を確保する。

##### [関係機関との連携]

・医療の進歩・国民の健康に貢献する医療機器・用具の産業技術力向上及び国際競争力強化を目指し、研究開発から市場化までのすべてのプロセスにおけるマクロな戦略の検討と、医療機器の重要性について社会的認知の向上を実現するための仕組み及び個別プロジェクトの形成をはかることを使命とした「医療技術産業戦略コンソーシアム(METIS)」が平成13年に設立され、現在第3期に入っている。また、平成19年4月には「革新的医療機器の創出に向けた医療機器産業界との懇談会」が設置され、経済産業省、厚生労働省、文部科学省の3省が連携して取りまとめた「革新的医薬品・医療機器創出のための5か年戦略」を早期実行するための官民対話が推進されている。

#### [その他]

## ・薬事法審査の迅速化

医療機器の審査体制の強化による薬事法審査の迅速化の観点から、2004年から独立行政法人産業技術総合開発機構の工学系研究者を独立行政法人医薬品医療機器総合機構へ派遣したところである。

## 6. 研究開発の実施に当たっての留意事項

事業の全部又は一部について独立行政法人の運営費交付金により実施されるもの（事業名に（運営費交付金）と記載したものは、中期目標、中期計画等に基づき、運営費交付金の総額の範囲内で、当該独立行政法人の裁量によって実施されるものである。

なお、適切な時期に、実用化・市場化状況等について検証する。

## 7. 改訂履歴

- (1) 平成12年12月28日付けがん・心疾患等対応高度医療機器プログラム制定。
- (2) 平成14年2月26日付け健康維持・増進のためのバイオテクノロジー基盤研究プログラム基本計画制定。
- (3) 平成14年2月28日付け健康寿命延伸のための医療福祉機器高度化プログラム基本計画制定。がん・心疾患等対応高度医療機器プログラム(平成12・12・27工総第13号)は、廃止。
- (4) 平成15年1月27日付け健康維持・増進のためのバイオテクノロジー基盤研究プログラム基本計画制定。健康維持・増進のためのバイオテクノロジー基盤研究プログラム基本計画(平成14・02・25産局第4号)は、廃止。
- (5) 平成15年3月10日付け健康寿命延伸のための医療福祉機器高度化プログラム基本計画制定。健康寿命延伸のための医療福祉機器高度化プログラム基本計画(平成14・02・05産局第2号)は、廃止。
- (6) 平成16年2月3日付け制定。健康維持・増進のためのバイオテクノロジー基盤研究プログラム基本計画(平成15・01・23産局第4号)及び健康寿命延伸のための医療福祉機器高度化プログラム基本計画(平成15・03・07産局第17号)は、本プログラム基本計画に統合することとし、廃止。
- (7) 平成17年3月31日付け制定。健康安心プログラム基本計画(平成16・02・03産局第12号)は、廃止。
- (8) 平成18年3月31日付け制定。健康安心プログラム基本計画(平成17・03・25産局第1号)は、廃止。
- (9) 平成19年4月2日付け制定。健康安心プログラム基本計画(平成18・03・31産局第2号))は、廃止。
- (10) 平成20年4月1日付け制定。健康安心プログラム基本計画(平成19・03・20産局第5号))は、廃止。

（健康安心イノベーションプログラム）  
「化合物等を活用した生物システム制御基盤技術開発」基本計画

バイオテクノロジー・医療技術開発部

1. 研究開発の目的・目標・内容

(1) 研究開発の目的

本研究開発は、遺伝子やタンパク質等の生体分子の機能・構造解析等を行うとともに、それらの研究を強力に推進するためのバイオツールやバイオインフォマティクスの開発、成果を高度に利用するためのデータベース整備や先端技術を応用した高度医療機器開発等により、個別化医療・予防医療・再生医療の実現や画期的な新薬の開発、医療機器、福祉機器等の開発・実用化を促進することによって健康寿命を延伸し、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の実現を目指すことを目的とする「健康安心プログラム」の中の「ゲノム創薬加速化支援バイオ基盤技術開発」の一環として実施する。

近年、創薬の研究開発コストの増大、新薬承認件数の減少等により、創薬に関わる企業負担と開発リスクが増大している。最近のゲノム研究及びポストゲノム研究の進展により、ヒトゲノム配列が解読され、さらに疾患に関連するタンパク質等が解明されていることから、現在数百ある創薬ターゲットの数は 10 倍以上に増加すると期待されている。このため、今後の創薬国際競争においては、創薬プロセス初期のターゲット探索段階において、いかに確実に創薬につながる新たな創薬ターゲットを確定することが極めて重要になっている。また、創薬候補の化合物についても、コンビナトリアルケミストリーの進展により化合物の種類は急速に増加したものの、創薬ターゲットにヒットする化合物の増加には必ずしも結びついていない状況である。こうした状況の中、欧米では、化合物の探索を含めた研究開発が進行しており、このため我が国においても生物機能を制御する新規骨格化合物等を探索・評価する技術開発を推進することが必要である。

本プロジェクトでは、ポストゲノム研究の産業利用が期待される「ゲノム創薬」の加速を支援するため、我が国の強みとする完全長cDNAリソースや、世界最高レベルのタンパク質の相互作用解析技術等を最大限に活用し、創薬ターゲット候補となりうるタンパク質相互作用の解析等により創薬ターゲット候補の絞り込みを行うとともに、疾患等の生物現象を制御する新規骨格化合物等の探索・評価を行うための技術開発を行うことにより、創薬等の研究開発を加速する。これによりバイオテクノロジーの産業化において有用な知見が蓄積しバイオ産業の情報基盤を強化する。また個別化医療や画期的な新薬の創出の期待ができるとともに、我が国バイオ産業の競争力強化・新産業の創出を図り、国際的優位性を確保することを目的とする。

(2) 研究開発の目標

① 最終目標（平成22年度末）

超高速・高感度にタンパク質の相互作用を解析する技術を開発し、疾患に係わるタンパク質相互作用の解析等を行うことにより、創薬ターゲット候補となる新規の重要なタンパク質相互作用情報を 500 以上同定する。また、得られた情報を元に、創薬ターゲットや疾患メカニズムの解明を行うとともに、疾患を制御する化合物の探索・評価技術を開発し、産業上有用な化合物等を 50 以上取得する。

## ②中間目標(平成20年度末)

タンパク質の相互作用解析技術の高速化・高感度化に目途をつけるとともに、疾患に係わるタンパク質相互作用等を解析し、創薬ターゲット候補となる新規の重要なタンパク質相互作用情報を 250 以上同定する。また、疾患を制御する化合物の探索・評価技術の開発に目途をつけ、産業上有用な化合物等を 25 以上取得する。

## (3)研究開発内容

上記目標を達成するために、以下の研究開発項目について、別紙の研究開発計画に基づき研究開発を実施する。

- ① タンパク質の相互作用解析等により創薬ターゲット候補・疾患メカニズムを解明する技術の開発
- ② 生物機能を制御する化合物等を探索・評価する技術の開発

## 2. 研究開発の実施方式

### (1)研究開発の実施体制

- ① 本研究開発は、独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構(以下、「NEDO技術開発機構」という)が、単独ないし複数の原則、本邦の企業、研究組合、公益法人等の研究機関(原則、国内に研究開発拠点を有していること。ただし、国外企業の特別な研究開発能力、研究施設等の活用あるいは国際標準獲得の観点からの国外企業との連携が必要な場合はこの限りではない。)から公募によって研究開発実施者を選定後、共同研究契約等を締結する研究体を構築し、委託して実施する。
- ② 共同研究に参加する各研究開発グループの有する研究ポテンシャルの最大限の活用により効率的な研究開発の推進を図る観点から、研究体にはNEDO技術開発機構が委託先決定後に指名した独立行政法人産業技術総合研究所生物情報解析研究センター・タンパク質ネットワーク解析チームの夏目徹チーム長を研究開発責任者(プロジェクトリーダー)とし、その下に研究者を可能な限り結集して効果的な研究開発を実施する。

### (2)研究開発の運営管理

研究開発全体の管理・執行に責任を有するNEDO技術開発機構は、経済産業省及びプロジェクトリーダーと密接な関係を維持しつつ、プログラムの目的及び目標、並びに本研究開発の目的及び目標に照らして適切な運営管理を実施する。具体的には、必要に応じて、NEDO技術開発機構に設置する委員会及び技術検討会等、外部有識者の意見を運営管理に反映させる他、四半期に一回程度プロジェクトリーダー等を通じて研究開発の進捗について報告を受けること等を行う。

### 3. 研究開発の実施期間

本研究開発の実施期間は、平成18年度から平成22年度までの5年間とする。

### 4. 評価に関する事項

NEDO 技術開発機構は、技術的及び政策的観点から、研究開発の意義、目標達成度、成果の技術的意義ならびに将来の産業への波及効果等について、外部有識者による研究開発の中間評価を平成 20 年度、事後評価を平成 23 年度に実施する。なお、評価の時期については、当該研究開発に係る技術動向、政策動向や当該研究開発の進捗状況等に応じて、前倒しする等、適宜見直すものとする。

### 5. その他重要事項

#### (1) 研究開発成果の取り扱い

##### ① 共通基盤技術の形成に資する成果の普及

得られた研究開発成果のうち、下記共通基盤技術に係る研究開発成果については、NEDO技術開発機構、実施者とも普及に努めるものとする。

- a) タンパク質相互作用解析技術
- b) 薬剤候補探索・評価技術
- c) 創薬ターゲット情報、疾患メカニズム情報、制御化合物情報等、本技術開発を通じて得られる有用な情報

##### ② 知的基盤整備事業又は標準化等との連携

得られた研究開発の成果については、知的基盤整備または標準化等との連携を図るため、データベースへのデータ提供、標準情報(TR)制度への提案等を積極的に行う。

##### ③ 知的財産権の帰属

委託研究開発の成果に関わる知的財産権については「独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構新エネルギー・産業技術業務方法書」第26条の規定等に基づき、原則として、すべて受託先に帰属させることとする。

##### ④ 成果の産業化

- a) 受託者は、本研究開発から得られる研究開発成果の産業面での着実な活用を図るため、本研究開発の終了後に実施すべき取り組みのあり方や研究開発成果の産業面での活用のビジネスモデルを立案するとともに、立案した取り組みのあり方とビジネスモデルについて、研究開発の進捗等を考慮して、研究開発期間中に必要な見直しを行う。
- b) 受託者は、上記a)で立案した取り組みとビジネスモデルを本研究開発終了後、実行に移し、成果の産業面での活用に努めるものとする。

#### (2) 基本計画の変更

NEDO技術開発機構は、研究開発内容の妥当性を確保するため、社会・経済状況、内外の研究開発動向、政策動向、プログラム基本計画の変更、第三者の視点からの評価結果、研究開発費の確保状況、当該研究開発の進捗状況等を総合的に勘案し、達成目標、実施期間、研究開発体制等、基本計画の見直しを弾力的に行うものとする。



### (3) 根拠法

本研究開発は、独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構法第15条第1項第2号に基づき実施する。

### (4) 関連指針の厳守

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

## 6. 基本計画の改訂履歴

(1) 平成18年1月制定。

(2) 平成20年3月、プロジェクトリーダー名を記載し改訂。

## (別紙)研究開発計画

### 研究開発項目①「タンパク質の相互作用解析等により創薬ターゲット候補・疾患メカニズムを解明する技術の開発」

#### 1. 研究開発の必要性

近年、創薬の研究開発費が増加しているにもかかわらず、新薬の承認件数が低迷している。その一因として、創薬ターゲットの特定が不十分であり、疾患メカニズムが十分解明されていないことが指摘されており、創薬ターゲットを特定し、疾患メカニズムを解明する新たな技術が切望されている。

このため、我が国の強みとする世界最高レベルのタンパク質の相互作用解析技術等を最大限に活用し、創薬ターゲット候補となりうるタンパク質相互作用の解析により創薬ターゲット候補を絞り込む技術を開発する必要がある。さらに、タンパク質相互作用解析によりリストアップされたタンパク質相互作用が、創薬ターゲット候補として真に有効であるのかを細胞レベル等で正確に検証する技術等を開発することが必要である。

#### 2. 具体的研究開発内容

##### (1) タンパク質相互作用ネットワーク解析技術の開発

質量分析システム等によりタンパク質相互作用のネットワークを超高感度・高速で解析する技術を開発・確立する。また、ただ単に相互作用のネットワークを検出するのみならず、薬剤等外部の刺激によって変化する細胞の状態を、タンパク質相互作用ネットワークの変化等の分子レベルで捉えることで新たな創薬ターゲット候補の同定、疾患メカニズムの解明を行う。具体的には、研究開発項目②により、表現型等を指標に探索されて獲得された活性化合物が与えるタンパク質相互作用の変化を捉え、薬剤候補の作用メカニズムを分子レベルで明らかにする。

##### (2) タンパク質相互作用情報の検証技術の開発

細胞内のタンパク質に、上記(1)で発見されたタンパク質相互作用を細胞内での実験系で検証するため、相互作用するタンパク質複合体に特異的に結合する分子プローブ等を高速に作製する技術を開発する。また、本技術を用いて、得られた相互作用タンパク質が創薬ターゲット候補として有効であるか等の検証も合わせて行う。

##### (3) タンパク質相互作用予測技術の開発

タンパク質相互作用ネットワーク解析により明らかとなった新規疾患関連タンパク質の構造シミュレーションを行い、それを基にタンパク質相互作用ドメインを予測する技術を開発する。また、その相互作用を制御する低分子化合物を予測するin silicoスクリーニング技術を開発する。

##### (4) 疾患関連遺伝子探索技術の開発

タンパク質相互作用ネットワーク解析により明らかとなった創薬ターゲットタンパク質候補及びその

相互作用ネットワークにより関連するタンパク質・遺伝子候補について、遺伝子多型マーカータイピング等の遺伝学的な解析を行い、疾患とタンパク質及び疾患メカニズムを解明する。

### 3. 達成目標

#### ①最終目標(平成22年度末)

超高速・高感度にタンパク質相互作用を解析する技術を開発し、疾患に係わるタンパク質相互作用の解析等を行うことにより、創薬ターゲット候補となる新規の重要なタンパク質相互作用情報を500以上同定する。

タンパク質相互作用予測技術により、創薬ターゲット候補として有望な50以上のタンパク質相互作用ドメインを予測する。

疾患に関連する遺伝子候補について10以上の遺伝学的解析を行う。

#### ②中間目標(平成20年度末)

超高速・高感度にタンパク質相互作用を解析する技術の開発に目途をつけ、疾患に係わるタンパク質相互作用の解析を行うことにより、創薬ターゲット候補となる重要なタンパク質相互作用情報を250以上同定するとともに、細胞内での検証技術を確立し、相互作用情報の検証を行う。

タンパク質相互作用予測技術により、創薬ターゲット候補として有望な25以上のタンパク質相互作用ドメインを予測するとともに、Wetでの検証を行うことで予測技術の精度を確認する。

疾患に関連する遺伝子候補について5以上の遺伝学的解析を行う。

## 研究開発項目②「生物機能を制御する化合物等を探索・評価する技術の開発」

### 1. 研究開発の必要性

近年、コンビナトリアルケミストリーの進展により化合物の種類は急速に増加したものの、創薬ターゲットにヒットする化合物の増加には必ずしも結びついていない状況であり、生物機能を制御する新規骨格化合物等を探索・評価する技術開発が望まれている。

このため、創薬ターゲット候補となりうるタンパク質ネットワークを対象に、これを制御する化合物等を高速・高感度に検出・スクリーニングできる技術を開発する必要がある。また、発見されたヒット化合物について機能や類縁体等のバラエティを向上させる技術開発が必要であるとともに、発見された化合物等が真に生体機能の制御に利用できるか、あるいは産業上有用かを、疾患モデル動物等で検証することが重要である。

### 2. 具体的研究開発内容

#### (1)化合物等の探索技術の開発

細胞レベル等で生物機能を制御する化合物等を高速・高感度に評価できるスクリーニング技術を開発する。化合物スクリーニングは、タンパク質相互作用を高効率に検出できる蛍光計測技術等をin vitro系及び細胞系で開発して行う。また、蛍光計測技術の高度化に必要な蛍光色素・蛍光タンパク質を開発する。スクリーニングに用いる化合物等は活性が豊富な天然化合物を中心として探索・評

価する。国内外において菌株等を収集し、スクリーニングを行う。

また、タンパク質相互作用等を指標としたスクリーニング系の構築が困難な疾患関連遺伝子については、遺伝子改変酵母やショウジョウバエ突然変異体等を開発し、表現型を指標とする化合物スクリーニング系の開発を行い、生物機能を制御する新たな化合物等を見いだす。

#### (2) 化合物等の高機能化技術の開発

スクリーニングにより得られた生体機能を制御する化合物について、化合物の誘導体化技術開発や新規骨格化合物の創製技術開発等を行うことにより生理活性等を高める高機能化技術を開発する。

#### (3) 化合物等の評価技術の開発

スクリーニングにより得られた生体機能を制御する化合物および高機能化された化合物が真に生体制御に利用できるか、あるいは創薬開発に結びつくかを、疾患モデル動物や遺伝子改変動物等の個体レベルで、評価・検証する。また、新たな評価系を開発し、評価・検証する。

また、化合物および各種薬効・毒性標準品をヒト培養細胞およびラットに暴露し、遺伝子発現変化をマイクロアレイ等を用いて体系的に解析することにより、化合物等の生物学的活性(薬効と毒性)を基盤研究段階で評価する技術を開発する。

### 3. 達成目標

#### ①最終目標(平成22年度末)

タンパク質相互作用を高効率に検出できる *in vitro* 及び細胞レベルの蛍光検出技術等を確立し、相互作用等を制御する化合物等を探索・評価するための技術を確立し、産業上有用な化合物を 50 以上取得する。

#### ②中間目標(平成20年度末)

タンパク質相互作用を高効率に検出できる蛍光検出技術等の開発に目途をつけ、タンパク質相互作用等を制御する化合物等を探索・評価するための技術の確立に目途をつける。これにより、タンパク質相互作用を制御する産業上有用な化合物等を25以上取得する。

（健康安心イノベーションプログラム）  
「ゲノム創薬加速化支援バイオ基盤技術開発  
／化合物等を活用した生物システム制御基盤技術開発」基本計画

バイオテクノロジー・医療技術開発部

## 1. 研究開発の目的・目標・内容

### （1）研究開発の目的

本研究開発は、遺伝子やタンパク質等の生体分子の機能・構造解析等を行うとともに、それらの研究を強力に推進するためのバイオツールやバイオインフォマティクスの開発、成果を高度に利用するためのデータベース整備や先端技術を応用した高度医療機器開発等により、個別化医療・予防医療・再生医療の実現や画期的な新薬の開発、医療機器、福祉機器等の開発・実用化を促進することによって健康寿命を延伸し、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の実現を目指すことを目的とする「健康安心イノベーションプログラム」の中の「ゲノム創薬加速化支援バイオ基盤技術開発」の一環として実施する。

近年、創薬の研究開発コストの増大、新薬承認件数の減少等により、創薬に関わる企業負担と開発リスクが増大している。最近のゲノム研究及びポストゲノム研究の進展により、ヒトゲノム配列が解読され、さらに疾患に関連するタンパク質等が解明されていることから、現在数百ある創薬ターゲットの数は 10 倍以上に増加すると期待されている。このため、今後の創薬国際競争においては、創薬プロセス初期のターゲット探索段階において、いかに確実に創薬につながる新たな創薬ターゲットを確定することが極めて重要になっている。また、創薬候補の化合物についても、コンビナトリアルケミストリーの進展により化合物の種類は急速に増加したものの、創薬ターゲットにヒットする化合物の増加には必ずしも結びついていない状況である。こうした状況の中、欧米では、化合物の探索を含めた研究開発が進行しており、このため我が国においても生物機能を制御する新規骨格化合物等を探索・評価する技術開発を推進することが必要である。

本プロジェクトでは、ポストゲノム研究の産業利用が期待される「ゲノム創薬」の加速を支援するため、我が国の強みとする完全長cDNAリソースや、世界最高レベルのタンパク質の相互作用解析技術等を最大限に活用し、創薬ターゲット候補となりうるタンパク質相互作用の解析等により創薬ターゲット候補の絞り込みを行うとともに、疾患等の生物現象を制御する新規骨格化合物等の探索・評価を行うための技術開発を行うことにより、創薬等の研究開発を加速する。これによりバイオテクノロジーの産業化において有用な知見が蓄積しバイオ産業の情報基盤を強化する。また個別化医療や画期的な新薬の創出の期待ができるとともに、我が国バイオ産業の競争力強化・新産業の創出を図り、国際的優位性を確保することを目的とする。

### （2）研究開発の目標

#### ①最終目標（平成22年度末）

タンパク質相互作用を標的とする創薬に必要な要素技術について10個以上の相互作用情報を対象に制御物質のスクリーニング等を行うことにより検証し、製薬企業等で実践的に利用可能なレ

ベルまでシステムを確立する。さらに3～4程度の創薬開発候補ターゲットに関して、臨床薬のリード化合物と成りうるタンパク質相互作用制御物質を創製する。

## ②中間目標(平成20年度末)

タンパク質の相互作用解析技術の高速化・高感度化に目途をつけるとともに、疾患に係わるタンパク質相互作用等を解析し、創薬ターゲット候補となる新規の重要なタンパク質相互作用情報を250以上同定する。また、疾患を制御する化合物の探索・評価技術の開発に目途をつけ、産業上有用な化合物等を25以上取得する。

## (3)研究開発内容

上記目標を達成するために、以下の研究開発項目について、別紙の研究開発計画に基づき研究開発を実施する。

- ③ タンパク質の相互作用解析等により創薬ターゲット候補・疾患メカニズムを解明する技術の開発
- ④ 生物機能を制御する化合物等を探索・評価する技術の開発

## 2. 研究開発の実施方式

### (1)研究開発の実施体制

- ③ 本研究開発は、独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構(以下、「NEDO技術開発機構」という)が、単独ないし複数の原則、本邦の企業、研究組合、公益法人等の研究機関(原則、国内に研究開発拠点を有していること。ただし、国外企業の特別な研究開発能力、研究施設等の活用あるいは国際標準獲得の観点からの国外企業との連携が必要な場合はこの限りではない。)から公募によって研究開発実施者を選定後、共同研究契約等を締結する研究体を構築し、委託して実施する。
- ④ 共同研究に参加する各研究開発グループの有する研究ポテンシャルの最大限の活用により効率的な研究開発の推進を図る観点から、研究体にはNEDO技術開発機構が指名した独立行政法人産業技術総合研究所生物情報解析研究センター・タンパク質ネットワーク解析チームの夏目徹チーム長を研究開発責任者(プロジェクトリーダー)とし、その下に研究者を可能な限り結集して効果的な研究開発を実施する。

### (2)研究開発の運営管理

研究開発全体の管理・執行に責任を有するNEDO技術開発機構は、経済産業省及びプロジェクトリーダーと密接な関係を維持しつつ、プログラムの目的及び目標、並びに本研究開発の目的及び目標に照らして適切な運営管理を実施する。具体的には、コアとなる開発項目毎にSPLを新たに配置し、PL、SPL及びNEDOをメンバーとする定期的な進捗連絡会議の開催し、情報共有を徹底すると共に、課題の設定、問題点の把握と解決・対策に向けて、NEDOが積極的に加わり議論し推進し、NEDO技術開発機構に設置する研究推進委員会等、外部有識者の意見を運営管理に反映させる。

## 3. 研究開発の実施期間

本研究開発の実施期間は、平成18年度から平成22年度までの5年間とする。

## 4. 評価に関する事項

NEDO 技術開発機構は、技術的及び政策的観点から、研究開発の意義、目標達成度、成果の技術的意義ならびに将来の産業への波及効果等について、外部有識者による研究開発の中間評価を平成 20

年度、事後評価を平成 23 年度に実施する。なお、評価の時期については、当該研究開発に係る技術動向、政策動向や当該研究開発の進捗状況等に応じて、前倒しする等、適宜見直すものとする。

## 5. その他重要事項

### (1) 研究開発成果の取り扱い

#### ① 共通基盤技術の形成に資する成果の普及

得られた研究開発成果のうち、下記共通基盤技術に係る研究開発成果については、NEDO技術開発機構、実施者とも普及に努めるものとする。

d) タンパク質相互作用解析技術

e) 薬剤候補探索・評価技術

f) 創薬ターゲット情報、疾患メカニズム情報、制御化合物情報等、本技術開発を通じて得られる有用な情報

#### ② 知的基盤整備事業又は標準化等との連携

得られた研究開発の成果については、知的基盤整備事業又は標準化等との連携を図るため、データベースへのデータの提供、標準案の提案等を積極的に行う。

#### ③ 知的財産権の帰属

委託研究開発の成果に関わる知的財産権については「独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構新エネルギー・産業技術業務方法書」第27条の規定等に基づき、原則として、すべて受託先に帰属させることとする。

#### ④ 成果の産業化

c) 受託者は、本研究開発から得られる研究開発成果の産業面での着実な活用を図るため、本研究開発の終了後に実施すべき取り組みのあり方や研究開発成果の産業面での活用のビジネスモデルを立案するとともに、立案した取り組みのあり方とビジネスモデルについて、研究開発の進捗等を考慮して、研究開発期間中に必要な見直しを行う。

d) 受託者は、上記a)で立案した取り組みとビジネスモデルを本研究開発終了後、実行に移し、成果の産業面での活用に努めるものとする。

### (2) 基本計画の変更

NEDO技術開発機構は、研究開発内容の妥当性を確保するため、社会・経済状況、内外の研究開発動向、政策動向、プログラム基本計画の変更、第三者の視点からの評価結果、研究開発費の確保状況、当該研究開発の進捗状況等を総合的に勘案し、達成目標、実施期間、研究開発体制等、基本計画の見直しを弾力的に行うものとする。

### (3) 根拠法

本研究開発は、独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構法第15条第1項第2号に基づき実施する。

### (4) 関連指針の厳守

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

## 6. 基本計画の改訂履歴

- (1) 平成18年1月制定。
- (2) 平成20年3月、プロジェクトリーダー名を記載し改訂。
- (3) 平成20年7月、イノベーションプログラム基本計画の制定により「(1) 研究開発の目的」の記載を改訂
- (4) 平成21年3月、平成20年度中間評価を踏まえ、①情報共有徹底と連携強化のための主要テーマ毎にサブプロジェクトリーダーを配置したマネジメント体制の刷新、②集中と選択による実施テーマの統廃合及び③最終目標をより高次の目標へ変更により改訂。



## (別紙)研究開発計画

### 研究開発項目①「タンパク質の相互作用解析等により創薬ターゲット候補・疾患メカニズムを解明する技術の開発」

#### 1. 研究開発の必要性

近年、創薬の研究開発費が増加しているにもかかわらず、新薬の承認件数が低迷している。その一因として、創薬ターゲットの特定が不十分であり、疾患メカニズムが十分解明されていないことが指摘されており、創薬ターゲットを特定し、疾患メカニズムを解明する新たな技術が切望されている。

このため、我が国の強みとする世界最高レベルのタンパク質の相互作用解析技術等を最大限に活用し、創薬ターゲット候補となりうるタンパク質相互作用の解析により創薬ターゲット候補を絞り込む技術を開発する必要がある。さらに、タンパク質相互作用解析によりリストアップされたタンパク質相互作用が、創薬ターゲット候補として真に有効であるのかを細胞レベル等で正確に検証する技術等を開発することが必要である。

#### 2. 具体的研究開発内容

##### (1) 遺伝子及びタンパク質相互作用ネットワーク解析技術の開発

質量分析システム等により遺伝子やタンパク質相互作用のネットワークを超高感度・高速で解析する技術を開発・確立する。ただ単に相互作用のネットワークを検出するのみならず、薬剤等外部の刺激によって変化する細胞の状態を、遺伝子やタンパク質相互作用ネットワークの変化等を分子レベルで捉えることで、新たな創薬ターゲット候補の同定、疾患メカニズムの解明を行う。具体的には、研究開発項目②により、表現型等を指標に探索されて獲得された活性化合物が与えるタンパク質相互作用の変化を捉え、薬剤候補の作用メカニズムを分子レベルで明らかにする。

##### (2) タンパク質相互作用情報の検証技術の開発

細胞内のタンパク質に、上記(1)で発見されたタンパク質相互作用を細胞内での実験系で検証するため、相互作用するタンパク質複合体に特異的に結合する分子プローブ等を高速に作製する技術を開発する。また、本技術を用いて、得られた相互作用タンパク質が創薬ターゲット候補として有効であるか等の検証も合わせて行う。

また、細胞系での検証が困難な場合には、遺伝子改変酵母やショウジョウバエ突然変異体等を開発し、表現型を指標としてタンパク質相互作用情報の検証を行う。

##### (3) タンパク質相互作用予測技術の開発

タンパク質相互作用ネットワーク解析により明らかとなった新規疾患関連タンパク質の構造シミュレーションを行い、それを基にタンパク質相互作用ドメインを予測する技術を開発する。また、その相互作用を制御する低分子化合物を予測するin silicoスクリーニング技術を開発する。

#### 3. 達成目標

##### ①最終目標(平成22年度末)

超高速・高感度にタンパク質相互作用を解析する技術を活用し、疾患に係わるタンパク質相互作用の解析等を行うことにより、創薬ターゲット候補となる新規の重要なタンパク質相互作用情報を

500 以上同定する。

同定したタンパク質相互作用情報からタンパク質相互作用予測技術を用いて、タンパク質相互作用を標的とする創薬に必要な要素技術の検証に最適な 10 個以上の相互作用情報を取得するとともに、臨床薬の開発候補ターゲットと成りうる3~4程度の相互作用情報を取得する。研究開発項目②での検証等の結果をフィードバックし、製薬企業等で実践的に利用可能なレベルまでシステムを確立する。

#### ②中間目標(平成20年度末)

超高速・高感度にタンパク質相互作用を解析する技術の開発に目途をつけ、疾患に係わるタンパク質相互作用の解析を行うことにより、創薬ターゲット候補となる重要なタンパク質相互作用情報を250 以上同定するとともに、細胞内での検証技術を確立し、相互作用情報の検証を行う。

タンパク質相互作用予測技術により、創薬ターゲット候補として有望な 25 以上のタンパク質相互作用ドメインを予測するとともに、Wet での検証を行うことで予測技術の精度を確認する。

疾患に関連する遺伝子候補について 5 以上の遺伝学的解析を行う。

### 研究開発項目②「生物機能を制御する化合物等を探索・評価する技術の開発」

#### 1. 研究開発の必要性

近年、コンビナトリアルケミストリーの進展により化合物の種類は急速に増加したものの、創薬ターゲットにヒットする化合物の増加には必ずしも結びついていない状況であり、生物機能を制御する新規骨格化合物等を探索・評価する技術開発が望まれている。

このため、創薬ターゲット候補となりうるタンパク質ネットワークを対象に、これを制御する化合物等を高速・高感度に検出・スクリーニングできる技術を開発する必要がある。また、発見されたヒット化合物について機能や類縁体等のバラエティを向上させる技術開発が必要であるとともに、発見された化合物等が真に生体機能の制御に利用できるか、あるいは産業上有用かを、疾患モデル動物等で検証することが重要である。

#### 2. 具体的研究開発内容

##### (1)化合物等の探索技術の開発

細胞レベル等で生物機能を制御する化合物等を高速・高感度に評価できるスクリーニング技術を開発する。化合物スクリーニングは、タンパク質相互作用を高効率に検出できる蛍光計測技術等をin vitro系 及び細胞系で開発して行う。また、蛍光計測技術の高度化に必要な蛍光色素・蛍光タンパク質を開発する。スクリーニングに用いる化合物等は活性が豊富な天然化合物を中心として探索・評価する。国内外において菌株等を収集し、スクリーニングを行う。

##### (2)化合物等の高機能化技術の開発

スクリーニングにより得られた生体機能を制御する化合物について、化合物の誘導体化技術開発や新規骨格化合物の創製技術開発等を行うことにより生理活性等を高める高機能化技術を開発する。また、スクリーニングにより得られた生体機能を制御する化合物および高機能化された化合物が真に生体制御に利用できるか、あるいは創薬開発に結びつくかを、疾患モデル動物や遺伝子改変動物等の個体レベルで、評価・検証する。

### 3. 達成目標

#### ①最終目標(平成22年度末)

研究開発項目①で決定した10個以上の相互作用情報を用いて、化合物の探索・高機能化技術を検証し、製薬企業等で実践的に利用可能なレベルまでシステムを確立する。さらに、研究開発項目①にて見出したターゲット、あるいは重要な創薬対象として選抜した3～4程度の創薬開発候補ターゲットに関して、臨床薬のリード化合物となりうるタンパク質相互作用制御物質を創製する。

#### ②中間目標(平成20年度末)

タンパク質相互作用を高効率に検出できる蛍光検出技術等の開発に目途をつけ、タンパク質相互作用等を制御する化合物等を探索・評価するための技術の確立に目途をつける。これにより、タンパク質相互作用を制御する産業上有用な化合物等を25以上取得する。

# 創薬・診断分野

健康寿命の延伸、QOL（Quality of Life：生活の質）の向上は世界全体の願いであり、特に、今後、少子高齢化が他国に先駆けて進行する日本にとっては、喫緊の課題である。このために創薬・診断分野では、2005年の技術戦略マップ策定当初から①「疾患の早期診断」、「適切な治療法の提供」によって、より良い医療サービスを提供していくとともに、②「予防医療による健康維持増進」によって、治療から予防へと転換し、より個人に適切に対応する「個の医療」を実現することを目標とし、技術動向や社会情勢の変化を踏まえて毎年度改訂を行ってきた。これにより、本分野における技術の俯瞰や将来への道筋の提示については一定の役割を果たしてきたものと考えられる。

しかし、前述した目標を達成するためには、技術の延長にとどまらず、国民に深刻な影響を与えている疾患の克服への技術の貢献可能性を改めて検討することが必要なことから、技術戦略マップ2010においては、患者数・治療満足度の低さ等から「アルツハイマー」、「糖尿病」、「がん」を選定し、各疾患の治療のあるべき将来像から導き出される必要な技術開発と、共通基盤技術の抽出を行った。

網羅性は技術戦略マップ2009に委ねつつ、課題解決に向けて特に必要となるであろう技術の抽出に注力した。本マップについては、関係者の意見を踏まえつつ、今後とも不断の見直しを行っていく予定である。

## 創薬・診断分野の技術戦略マップ

### I. 導入シナリオ

#### (1) 創薬・診断分野の目標と将来実現する社会像

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、喫緊の課題である。そのために創薬・診断分野が果たす役割は大きい。

2009年12月30日には新成長戦略（基本方針）が閣議決定され、その中で「ライフ・イノベーションによる健康大国戦略」として、医療・介護・健康関連産業の成長産業化、日本発の革新的な医薬品、医療・介護技術の研究開発等を通じて、2020年までに「医療・介護・健康関連サービスの需要に見合った産業育成と雇用の創出、新規市場約45兆円、新規雇用約280万人」とする目標が示されたところである。

技術戦略マップは、本目標の達成にも資する具体的な方策について、主に技術開発を視点に据えつつ記載したものであるが、導入シナリオにおいては、特に開発した技術を社会へ繋げていくために必要となるレギュレーション対応や社会基盤整備等を示した。

現在行われている疾患の予防や診断では、家族の病歴・自らの健診から得られる基礎的なデータや、集団健診から得られる平均値等の統計データが主として用いられている。また、各疾患と遺伝子発現等の関連を知る上で欠かせない臨床サンプルの数的不足や散逸もあって、現状では非臨床試験や少数のサンプルから得られたバイオマーカーを、画一的に利用している。さらには、発症メカニズムが不明な数多くの疾患については、正確な予防法は依然として確立していない。画像診断や病理組織診断についても、近年の多様化、小型化等により、疾患の早期診断に重要な役割を果たしつつあるが、まだ用途は限定的で、今後とも更なる技術開発の必要がある。

一方で、基礎研究の進展によって、ゲノム、エピゲノム、RNA、タンパク質、糖鎖、脂質等の様々な切り口や統合的なアプローチによって、生命現象や疾患メカニズムに関する研究が急激に進展しており、基礎的な研究成果が臨床の現場へと一刻も早く応用されるよう、切れ目のない研究開発体制の構築が求められている。

また近年、国民の健康に対する関心も高まり、今後、日常生活における生体情報の取得や自主的な健康管理が一層普及すると予想され、前述した技術の進展、臨床サンプルの収集やバンキングともあいまって、革新的な診断薬・治療薬の創出や個人に最適な医療の提供・普及が期待される。

こうした現状を踏まえ、今回の導入シナリオの策定にあたっては2009年までの改訂作業を継承し、我が国が取るべき具体的方策の一つとして重要な考え方として、「安全性が高く優れた日本発の革新的な医薬品を創出しつつ、健康寿命の延伸、最適な医療の実現、医療産業力の強化を図る」という考えをベースに、20年後のあるべき姿を見

据え、「より予防的な治療」の実現へと向かうことが重要であると分析した。

次いで、「より予防的な治療」を具体化し、将来実現すべき社会像として以下の方向性を提示した。

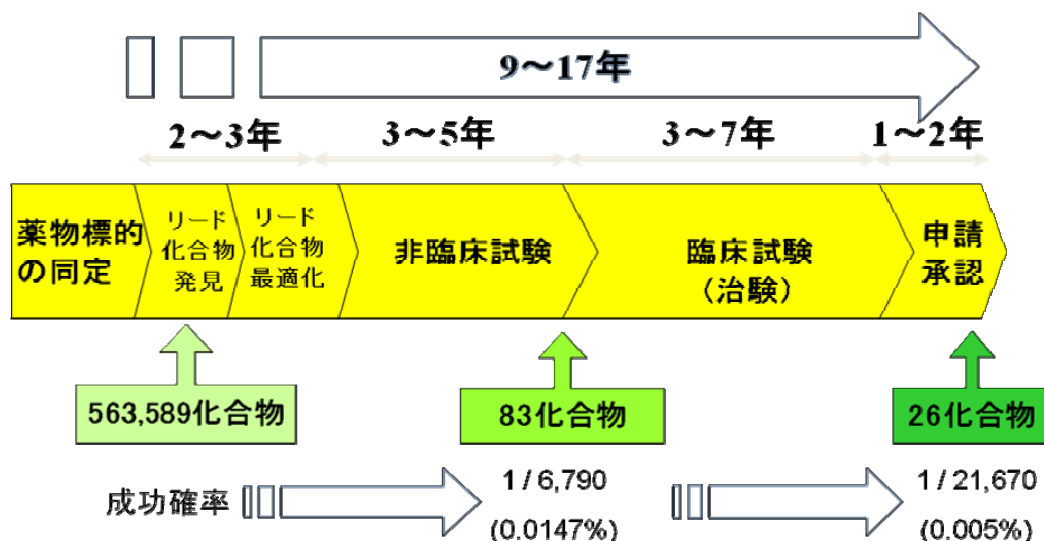
- ① 有効な予防が開発され、疾患発症年数を遅らせ、重症化を防ぐ
- ② エビデンスに基づく最適な診断治療が、より正確・安全に受けられる
- ③ 患者のQOLが向上し、高齢化社会を健康に過ごすことができる
- ④ 医療関連産業分野の技術革新により、安全性が高く優れた日本発の革新的な医薬品や医療サービスを創出し、世界への貢献を図りつつ国際競争力を強化する

さらに、創薬や診断技術の開発といった開発プロセスの改善という視点から、国民に深刻な影響を与えている疾患の克服への技術の貢献可能性を検討するため、患者数・治療満足度の低さ等から「アルツハイマー」、「糖尿病」、「がん」を検討対象の疾患とし、課題解決のために必要な技術を抽出して、それぞれに導入シナリオを検討した。加えて、疾患ごとの検討結果を俯瞰し、あるべき将来像への変革に共通して必要となる産業波及性の高い重要技術課題を抽出して、共通の導入シナリオを作成した。共通する重要技術課題としてまとめた項目は、①ヒト臨床情報・サンプルのバンキング、②ヒト生体機能のモニタリング、③エビデンスに基づく創薬診断である。

## (2) 研究開発の取組

現在の創薬プロセスにおいては、1つの医薬品が製品化されるまでに、9~17年程度の期間及び500億円を超える開発費が必要であるといわれている。研究開発費のうちの7割強は、臨床試験までに投入されている。

図1 新薬開発の特質 (03年~07年の例)



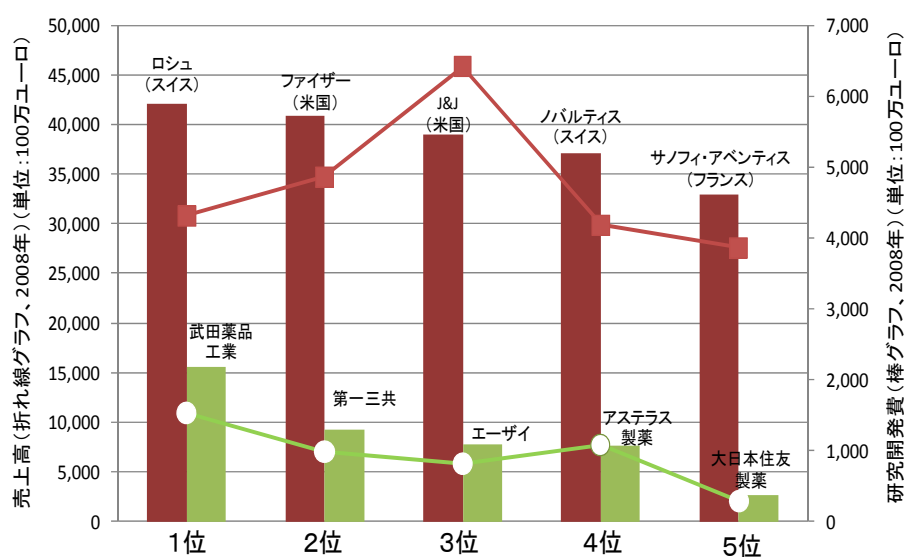
出典：てきすとぶつく 製薬産業 2009

また、研究開発領域の拡大とともに臨床試験開始後の成功確率が減少傾向にあるこ

とから、製薬企業における研究開発費の総額は増大し、創薬における研究開発リスクはますます高まる傾向にある。

我が国の企業の研究開発投資は、欧米と比べると規模で劣る。例えば全世界・日本の製薬企業の研究開発投資トップ5社を比べると、研究開発費・売上高ともに、規模の格差が顕著である。また、政府の研究開発規模も10倍近くの差がある。一方で、このような状況下、売上高は必ずしも大きくないが、医薬品の世界売り上げランキング50位以内に日本オリジンの医薬品が10品目入っており、限定的な領域での強みが伺われる。

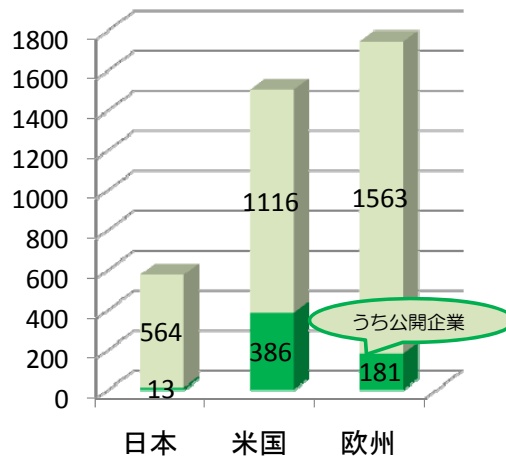
図2 全世界・日本の製薬企業トップ5社の比較



(出典) European Commission The 2009 EU Industrial R&D Investment Scoreboard より経済産業省作成

また、バイオベンチャーは、他分野ベンチャー企業以上に重要な役割を担うところであるが、企業数、ベンチャーキャピタルからの投資額、開発起源企業別にみたバイオ医薬品数において、我が国のバイオベンチャーは、欧米との比較において、質・量ともに不十分と言わざるを得ない。

図 3 バイオベンチャーの企業数海外比較



出典：E&Y「Global Biotechnology Report 2008」バイオインダストリー協会「2007年バイオベンチャー統計調査」

このため、我が国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ためには、基礎研究の成果を迅速に臨床に橋渡ししていくことを含め、産業界のニーズや我が国の強みを踏まえつつ、創薬の成功確率を向上し新薬を効率的に生み出す創薬力強化のための産業基盤の整備、診断と治療が一体化した新しい医療を実現する技術開発に加え、オープンイノベーション環境の整備などに政府予算を投入していくことが重要である。

このような状況の中、経済産業省においては、生体分子の機能・構造・ネットワーク解析や、それら研究を強力に推進するためのバイオツールやバイオインフォマティクスの開発、成果を高度に活用するためのデータベース整備等を行うことにより、個人に適切に対応した医療、予防医療の実現や画期的な新薬の開発、健康維持・増進につながる新しい産業の創出に向けた取組を行ってきた。今後とも、各省庁連携のもと、ゲノム、エピゲノム、RNA、タンパク質、糖鎖、脂質等、様々な切り口や統合的なアプローチによって、生命現象や疾患メカニズムに関する研究を進展させていくとともに、基礎研究の成果に基づく波及効果の高い革新的な診断・治療技術をいち早く産業応用へと繋げ、ライフ・イノベーションによる国際競争力の強化によって、日本の成長を牽引する産業セクターとすべく研究開発を行っていく。

### (3) 関連施策の取組

創薬・診断分野における将来像を実現するためには、研究開発のみならず、開発の迅速化や成果普及につながる制度整備、将来の国際展開を見据えた標準化の取組等の関連施策を研究開発政策と一体的に推進する必要がある。このため、政府関係機関に



において以下の取組がなされている。

〔起業・事業支援〕

- ・ 「産業クラスター計画」に基づき、全国のバイオクラスターにおいて、企業間のネットワーク形成の支援、産学連携による研究開発プロジェクトの支援、地域系ベンチャーファンドによる資金調達支援等の実施。

〔導入補助・支援〕

- ・ 個人遺伝情報保護ガイドラインの適切な運用
- ・ バイオインダストリー安全対策調査の実施
- ・ バイオ事業化に伴う生命倫理問題等に関する研究の実施

〔ガイドライン整備〕

- ・ テーラーメイド医療用診断機器 (DNA チップ) 開発ガイドライン 2007—遺伝子型 (ジェノタイピング) 検定用 DNA チップに関して—」を 2007 年 5 月に公表。翌 2008 年 4 月に、厚生労働省より「DNA チップを用いた遺伝子型判定用診断薬に関する評価指標」が公表。
- ・ 発現解析 DNA チップガイドラインについて医療機器ガイドライン策定事業の中で継続審議中。

〔規制・制度改革、他省庁との連携〕

- ・ バイオ・イノベーション研究会の下での医薬品産業を発展拡大させるための方策の検討。
- ・ 内閣府、文部科学省、厚生労働省及び経済産業省の間で2009年2月に改訂した「革新的医薬品・医療機器創出のための5か年戦略」に基づき、研究資金の集中投入、ベンチャー企業の育成、臨床研究・治験環境の整備、アジアとの連携、薬事法における審査の迅速化・質の向上、イノベーションの適切な評価等、本分野における研究から上市に至る過程の一貫かつ集中的な支援の実施。
- ・ 2008年7月22日に設置された「健康研究推進会議」による、先端医療開発特区（スーパー特区）」制度の推進と各省が実施している臨床研究や橋渡し研究を一体的に運用していくための司令塔機能の発揮。

〔基準・標準化〕

- ・ バイオチップのデータ信頼性・互換性向上のための基準・標準化活動の推進を目的として、2007年10月、特定非営利活動法人バイオチップコンソーシアムが設立（参加企業68社）。

〔知的基盤整備〕

- ・ 研究開発の企画段階から、研究テーマ周辺の論文及び特許状況のサーベイ実施や研究開発の実施段階における特許出願後の事業化構想等、特許に関する戦略的取組の実施をサポート。

〔特許化〕

- ・特許庁は、2008年10月より、現行の早期審査よりも更に早期に審査を行う「スーパー早期審査制度」を創設、早期の事業化を目指す発明やライフサイクルが短い発明への早期審査のニーズを充足させるべく、制度を構築。

#### (4) 海外での取組

米国では、NIHにおける約3兆円の研究開発予算のうち、約90%が大学や病院といった外部へのグラントに充当され、10%がNIH クリニカルセンター等の内部研究に充てられている。2009年度においては、ARRA (American Recovery and Reinvestment Act; 米国再生・再投資法)により、NIH 予算は約1兆円上積みされ、生物医療学研究等の研究開発の加速が予想される。NIH では、NIH に属する27 研究所全体として取り組むべき研究分野を見極めることを目的に、NIH ロードマップを2003年9月に作成し、以下の主要テーマについて取組が行われている。

##### ①New Pathways to Discovery :

生体メカニズムの理解を主眼とした、細胞や組織を構成する生体分子のネットワーク、分子イメージング、構造生物学、バイオインフォマティクス、ナノ医療等に係る研究開発。

##### ②Research Team of the Future

専門分野を越えた学際的研究を行うチーム、新しい組織モデルの検討。特にハイリスク研究分野では、43の橋渡し研究、81の新規事業、115のニューイノベーター研究に資金が配分されている。

##### ③Re-Engineering the Clinical Research Enterprise

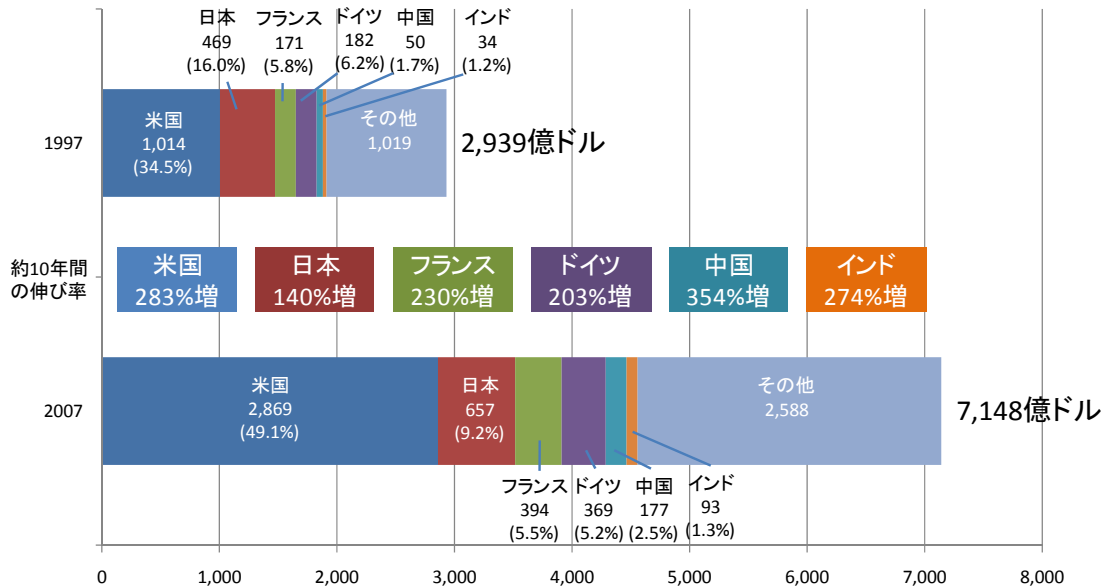
研究上の発見や諸成果を、迅速に臨床現場に展開するためのシステム構築。

欧州では、科学技術に関する総合的なプログラム (Framework Programme) を3~4年単位で実施している。2006年12月には、2007年~2013年の取組を示したFP7が策定・開始されている。FP7においては、欧州レベルでの官民パートナーシップを実現化する新たな手法として共同研究イニシアチブが取り組まれており、6領域のイニシアチブの1つとして、「革新的医薬品イニシアチブ」が展開されている。当該イニシアチブでは、十分な医療が提供されていない領域に、研究成果の迅速な橋渡しを促進する仕組みを構築することを狙いとしている。

#### (5) 民間での取組

過去10年で、世界の医薬品市場はおよそ2倍近く拡大しているが、日本市場の伸びは2割程度にとどまり、結果として日本が占める割合は半減している。

図4 世界の医薬品市場の推移



出典：「第1回バイオ・イノベーション研究会」資料

こうした中、経営基盤の強化を図るため、企業間の再編や外部リソースの活用が進んでいる。

表1：近年の再編動向（国内）

統合年	主たる企業名
2005年	・アステラス製薬（山之内製薬、藤沢薬品工業） ・大日本住友製薬（大日本製薬、住友製薬）
2007年	・第一三共（三共、第一製薬） ・田辺三菱製薬（田辺製薬、三菱ウェルファーマ）
2008年	・協和発酵キリン（協和発酵、キリンファーマ）

外部リソースの活用は、経営基盤の強化を図ることにとどまらず、企業にとってこれまで研究が立ち後れていた有用技術の早期導入に役立っているケースもあり、技術が国境を越える一つの契機にもなっている。

また、主要薬が相次いで特許切れになる「2010年問題」を見据え、米国企業を中心とした大規模な買収・合併の動きが加速していることも、今後の企業における研究開発に影響を与えることが予想される。

表2：国境を越えた組織再編・技術提携

公表時期	内容
2008年5月	武田薬品工業がミレニアム・ファーマシューティカルズ社(米)を88億ドルで買収

2008年9月	ベーリンガーインゲルハイム(独)と北海道大学発ベンチャー、イーベックが5,500万ユーロで抗体作成技術のライセンス契約を締結
2009年1月	ファイザー(米)がワイス(米)を680億ドルで買収
2009年3月	メルク(米)がシェリング・プラウ(米)を411億ドルで買収
2009年3月	ロシュ(スイス)がジェネンティック(米)を468億ドルで買収

## (6) 改訂のポイント

- 新たな創薬・診断分野の技術戦略マップを作成するに当たり、患者数・治療満足度の低さ等から「アルツハイマー」、「糖尿病」、「がん」を選定、それぞれに導入シナリオを検討した後、そこから導かれる以下のあるべき姿・将来像と必要な技術開発を示した共通の導入シナリオを作成した。
- (1) 創薬・診断分野の目標と将来実現する社会像において、新成長戦略(基本方針)に関する記載を追加した。
- [ガイドライン整備]の欄にDNAチップガイドラインに関する記載を追加した。
- [規制・制度改革、他省庁との連携]の欄に経済産業省において開催した「バイオ・イノベーション研究会」に関する記載を追加した。
- [基準・標準化]の欄に特定非営利活動法人バイオチップコンソーシアムに関する記載を追加した。
- (4) 海外での取組において、米国NIHの研究開発予算に関する記載を追加した。

## II. 技術マップ

### (1) 技術マップ

国民にとって最大の関心事項である健康とは、「病気になった場合に早期に健康状態に戻れること」、そして、「そもそも病気にならず健康であり続けること」に、大きく二分される。この2つのニーズに対応するためには、将来の疾患リスクを事前に把握した上で、予防的医療も視野に入れ、各人において日々の健康管理を可能とすること、また、より早期に適切な診断によって病気の兆候を捕まえるとともに、診断に基づき個々人に応じた副作用の少ない最適な医療を提供することが重要である。

このため、技術戦略マップ策定当初から、①「より良い医薬品の開発・提供」及び②「健康産業の創造(治療から予防への転換)」を2つの戦略として位置づけ、ニーズに従って必要な技術を技術マップ上に俯瞰してきた。しかし、前述したように、創薬や診断技術の開発といった開発プロセスの改善という視点から、国民に深刻な影響を与えている疾患の克服への技術の貢献可能性を検討することの重要性にかんがみ、患者数・治療満足度の低さ等から「アルツハイマー」、「糖尿病」、「がん」を検討対象の疾患とし、「健常ー発症ー治療」というフェーズごとに、課題解決のために必要な技術を抽出した。さらに疾患ごとの検討結果を俯瞰し、あるべき将来像への変革に共通し

て必要となる産業波及性の高い重要技術課題を抽出した、「共通技術マップ」を作成した。

2009 年度まで改訂を重ねてきた技術戦略マップを下敷きとしつつ、「より予防的な医療へと変革を推し進めること」が重要であるとの考えに基づき、「現状」を「あるべき姿」へと変革を促していくうえでキーとなる産業波及性の高い重要技術を抽出した。具体的には、「共通技術マップ」としてまとめた項目は、①ヒト臨床情報・サンプルのバンキング、②ヒト生体機能のモニタリング、③エビデンスに基づく創薬診断である。より詳細に例示すると、臨床サンプルバンクの整備や疾患と生活習慣に関するコホート研究、バイオインフォマティクス・シミュレーションツールの開発等の *in silico* 解析の進展、エピゲノム情報等の解析、サロゲートマーカーの開発、イメージング技術の開発等、いずれも、健常なうちに疾患の兆候をいち早く予測するための技術が挙げられた。

## (2) 重要技術の考え方

網羅的な技術の俯瞰と重要技術の抽出については、技術戦略マップ 2009 における作業結果を引き続き踏襲するものとし、技術戦略マップ 2010 については、前述したように 3 疾患に係る問題の解決に資する技術について記載した。

## (3) 改訂のポイント

- 国民の生活の質に大きな影響を及ぼしている「アルツハイマー」、「糖尿病」、「がん」と、そこから導き出される共通の技術マップを作成した。

# Ⅲ. 技術ロードマップ

## (1) 技術ロードマップ

導入シナリオ及び技術マップと同様に、「アルツハイマー」、「糖尿病」、「がん」の 3 疾患の技術ロードマップに加え、各疾患の治療等のあるべき将来像から導き出される必要な技術を俯瞰する、共通の技術ロードマップも作成した。

「①ヒト臨床情報・サンプルのバンキング」について、アルツハイマー病等精神性疾患はヒトで特に発達した高次機能の障害であることから、イメージング技術等の基礎科学の発展を踏まえつつ、ヒトを対象として疾患メカニズムを探索することが極めて重要であるとした。加えて、がん等の領域においても、ヒト個体やヒト臨床サンプルを対象とした研究アプローチの重要性が示唆された。2030 年を目処に、ヒト臨床サンプルバンキングシステムが構築され、ヒトを対象とした解析から示唆された疾患メカニズムを、ヒトの病態を忠実に再現したモデル動物等を用いた創薬・診断技術開発に応用する等、大きな変革と進展が期待される。

また、「②ヒト生体機能のモニタリング」については、疾患の予防的な観点から重要な課題として取り上げた。将来、病気になるかどうかは遺伝子情報のみでは決まらず、その脆弱性や環境因子の影響によって左右される。環境因子等の影響を最初に受ける

のはゲノムのエピジェネティック的な変化と考えられることから、パーソナルゲノムやエピゲノムに関する解析を一層進展させることが重要であると分析した。これにより、正確なリスク診断の実用化や、解析によって得られた情報を自己管理するシステムの構築が期待される。サロゲートマーカーや薬効評価のイメージングツールの開発を通じて、一層早期かつ適切な診断・治療の実現が望まれる。

「③エビデンスに基づく創薬診断」については、ファーマコゲノミクス解析による薬剤の応答性や有害事象高リスク群に対する治療が実施されることにより、新薬開発成功率が向上することが期待される。また、高性能な診断技術をベースに、診断と治療に対する一体的な研究開発に取り組むことが重要と分析した。

これらの技術開発の実現を通じて、現在の治療を中心とした医療から、予防を重視した医療へと変遷し、また、病気になった場合であっても、現在、治療困難な疾患も含め、患者の体質・遺伝情報や病態に応じた個別療法の提供が可能になる等、個別化医療が進展することが期待される。

## (2) 改訂のポイント

- 国民の生活の質に大きな影響を及ぼしている「アルツハイマー」、「糖尿病」、「がん」と、そこから導き出される共通の技術ロードマップを作成した。

## IV. その他の改訂のポイント

### ○ 国際競争ポジション（ベンチマーキング）

- 図 3 に「バイオベンチャーの企業数海外比較」、図 4 に「世界の医薬品市場の推移」を追加した。

## 20年後の予防、診断、治療の姿（創薬診断技術）

あるべき  
姿

- ◆ 有効な予防法が開発され、疾患発症年齢を遅らせ、重症化を防ぐ
- ◆ エビデンスに基づく最適な診断治療が、より正確・安全に受けられる
- ◆ 患者のQOLが向上し、高齢化社会を健康に過ごすことができる
- ◆ 医療関連産業分野の技術革新により、国際競争力が強化される

健康寿命延伸  
最適な医療の実現  
医療産業力の強化

現 状

技術開発

将 来 像

予  
防

- 食事・運動・禁煙等、生活習慣の改善により予防する
- 家族の病歴や健診等の結果で、発病リスク・可能性を判断する
- 発病メカニズムが不明な疾患では、明確な予防法が存在しない

診  
断

- 画一的な項目を対象とした集団健診で、平均値を指標に健康度を判断する
- 少数のバイオマーカーを、個別検診で利用する
- 画像や病理組織による診断は、限定的である

治  
療

- 医薬品は対症療法が中心で、個々の患者に最適な効果を持つとは限らない
- 外科手術、薬物療法（分子標的薬・バイオ医薬）、放射線療法等、複数の治療法を組み合わせる

### ①ヒト臨床情報・サンプルのバンキング

- ◆ 健常人を含めたヒト臨床サンプルの効率的収集と、バンキングシステム
- ◆ 前向きコホート研究・大規模臨床データベースと、インテリジェントな情報処理基盤技術

### ②ヒト生体機能のモニタリング

- ◆ ゲノム、エピゲノム情報等の統合的解析
- ◆ 実用的バイオマーカー、サロゲートマーカー
- ◆ イメージング技術（画像診断技術）の向上と、多様な生体機能のモニタリング技術

### ③エビデンスに基づく創薬診断

- ◆ エビデンスに基づく予防・診断・治療の新たな方法と医薬の開発による選択肢の拡大

予  
防

- ゲノム・エピゲノム情報解析等により、各個人の疾患発症リスクが的確に判断できる
- リアルタイム生活習慣計測や発症リスクバイオマーカー測定により、健康管理・食品・薬剤等、各自に最適な疾患の予防手段を選択し、発症を予防できる
- バイオマーカー・遺伝子検査、画像診断等を用い、複数の治療薬や治療法から各自に最適な薬や治療法が選択でき、治療効果の判定や再発等も、モニターできる
- 核酸医薬、次世代抗体医薬等、画期的な医薬品が実現する
- 部分的には、失われた臓器の機能再建等、再生医療による治療が受けられる
- 最適な治療により、社会復帰までの時間が短縮する
- 疾患と共存し、QOLを維持できる健康管理法が確立する

診  
断・  
治  
療

## 20年後のアルツハイマー病(AD)の予防、診断、治療の姿

### あるべき姿

- ◆ アルツハイマー病(AD)による神経変性メカニズムが解明され、制御可能な疾患となる
- ◆ 予防的治療法の確立により、発症年齢を5年遅らせる
- ◆ 高齢者が健康に過ごすことにより、本人・家族のQOLの向上、社会活力の維持につながる
- ◆ AD患者が大半を占める認知症の介護費(2000年度推計で約2.3兆円)を大幅に削減できる

### 現状

#### 基礎・臨床研究

- 疾患メカニズムが解明されず、明確な予防法が存在しない
- 日本はADの疫学研究が不十分

#### 診断

- 自覚(他覚)症状に伴う臨床心理学的検査が中心である
- 早期発見が困難で、加齢等による認知機能低下との区別が難しい

#### 治療

- 医薬品による対症療法が中心
- 一度失われた認知機能の回復は困難である
- アミロイド仮説に基づいた医薬品等、根本治療を目指した薬が開発されている

#### 社会環境

- 在宅介護や施設介護など、高齢者の介護様式は多様化している
- 認知症による社会的負担は深刻である

### 技術開発

#### ①メカニズム解明に向けた基礎研究

- ◆ 病態解明のためのツール開発、及びヒトの病態を忠実に再現できる動物モデルの開発
- ◆ 大規模臨床データベースの構築・解析と、疫学をベースとした前向きコホート研究

#### ②早期診断による早期治療への展開

- ◆ 血液などを用いたAD特異的バイオマーカーの開発
- ◆ 微量のアミロイド、神経回路異常を高感度に検出する機能画像検査法の開発

#### ③認知機能維持・回復のための治療

- ◆ 新規作用機序を持つ医薬品の開発
- ◆ エビデンスに基づいた統合的医療と評価法の開発

社会環境の整備は診断・治療技術開発のドライバーとなる

### 将来像

#### 予防

- AD発症リスクのメカニズムが解明され、発症年齢を遅らせる
- 画像診断等を用いた早期診断と予防的治療により、症状発現を未然に防ぐ
- 軽度認知機能障害を正確に診断し、進行防止治療を開始できる
- 体液バイオマーカー・遺伝子検査、画像診断等を活用し、複数の薬から最適な治療薬が選択できる
- 適切な治療とリハビリにより、一定レベルの認知機能を回復できる

#### 診断・治療

#### 社会環境

- 地域コミュニティがネットワーク化され、ADの早期発見・治療が実現するとともに、患者の認知機能の維持により、介護者等の負担も軽減される
- 治験拠点と支援体制の整備等により、診断・治療技術開発が効率化される
- 世界に先立って超高齢化社会となる日本の経験・技術を、海外に広める



# 20年後の糖尿病の予防、診断、治療の姿

あるべき姿

- ◆ 糖尿病の平均発症年齢を10年遅らせる
- ◆ 患者自身が合併症発症抑制の管理ができる
- ◆ 合併症発症まで至る人は現在の十分の一になる

現状

技術開発

将来像

予防

- 食事・運動・禁煙等、生活習慣改善による予防が中心

診断

- <発症診断>
- 重症化するまで自覚症状がない
  - 血糖値による診断に加え、新診断基準でヘモグロビンA1cも追加へ
- <合併症リスク診断>
- 合併症の遺伝子多型検査を一部開始

治療

- <糖尿病治療>
- 病態進展に伴い、食事・運動療法、治療薬、インスリン投与等を組み合わせる
  - 治療途中のドロップアウトが多い
  - 低血糖を起こさない血糖制御薬が上市された
- <合併症治療>
- 網膜症・脳血管障害・心血管障害は、動脈硬化前段階の制御により改善できる
  - 腎症は治療継続しても進行例がある

社会環境

- 特定健診・保健指導は低受診率が課題
- 健康日本21
- 一部地域での地域医療連携

①健康管理与予備軍の発症予防

- ◆ リアルタイム生体情報モニタリングと、遺伝・環境要因等多数の情報を扱うデータマイニングに基づく健康管理法
- ◆ ゲノム、エピゲノム情報等を統合したインテリジェント創薬等による予防薬
- ◆ 実用的サロゲートマーカー測定機器

②合併症リスクの発見

- ◆ 合併症リスク診断の有効なバイオマーカーの開発
- ◆ 動脈硬化等合併症リスクの簡便な診断技術

③合併症の予防と治療

- ◆ インテリジェント創薬等による糖尿病及び合併症治療薬の開発

<予防>

- リアルタイムな生活習慣計測と発症リスクのバイオマーカーの測定等により、食事をはじめ、各個人に最適な生活習慣と予防手段を選択できる
- カロリー制限模倣薬、体重減少模倣薬、運動模倣薬等が開発され、予備軍の糖尿病発症が抑制できる

<合併症診断と予防>

- リアルタイムな生活習慣計測と発症リスクバイオマーカーの測定等により、糖尿病合併症リスク診断・予防ができる

<診断と治療>

- 血糖値を最適にコントロールし、糖尿病と共存できる
- 各個人の遺伝的背景と環境要因に適応した、糖尿病治療薬及び、一定の機能回復効果のある合併症治療薬を選択できる
- 再生医療による糖尿病治療が開始される

予防

診断・治療

# 20年後のがんの予防、診断、治療の姿

あるべき姿

- ◆ がん死亡率を40 %減(平成16年比、75歳以下年齢調整死亡率)
- ◆ 有効な予防法を50種類以上開発
- ◆ 生存率に加え、QOLを重視した治療の日常化

現 状

技 術 開 発

将 来 像

予 防

- 家族の病歴や健診等の結果で、発病リスクを推定する
- 禁煙・運動等、効果のある予防法は限定的である

診 断

- 画一的な項目を対象とした集団健診で、平均値を指標に健康度を判断する
- 少数のバイオマーカーを、個別検診で利用する
- 病理組織による診断が主流である

治 療

- 細胞毒性のある薬剤が中心である
- 外科手術、薬物療法(分子標的薬・バイオ医薬)、放射線療法等、複数の治療法を組み合わせる
- 医薬品の臨床開発に課題が多い

社 会 環 境

- 第3次対がん10か年総合戦略(研究事業)
- がん対策基本法
- がん対策推進基本計画
- がん情報サービス
- 健康増進法

①サロゲートマーカーの開発

- ◆ 正常組織も対象とした、多型解析を含むゲノム・エピゲノム解析
- ◆ ゲノム・エピゲノム情報等に基づくサロゲートマーカーの開発

②早期がん病変の性質解明と検出

- ◆ 早期がん病変及び、がん細胞の特異的性質(転移、浸潤、がん幹細胞、細胞形質転換等)の生物学的機構の解明
- ◆ がん細胞及び免疫状態のモニタリング・イメージング技術の開発

③豊富かつ適切な治療法の選択

- ◆ がんの特異的性質を標的とした画期的医薬品及び治療法(がんワクチン、核酸医薬、予防薬、遺伝子・細胞治療、再生医療等)の開発
- ◆ ファーマコゲノミクスのマーカー開発

- ◆ 社会・政策的対応・支援の強化
- ◆ 新薬開発のスピードアップ

<エビデンスに基づく予防>

- ゲノム・エピゲノム情報等を統合し、リアルタイムに発病危険性を判定できる
- 危険性に応じた健康管理(生活習慣・食品・薬剤等)により、発症が予防できる

<超早期診断>

- 血液等のサロゲートマーカーが充実し、簡単に診断できる
- イメージング技術等により、超早期から病変が確認され、組織観察に依存せず治療の判断ができる

<個別化医療>

- 早期発見と治療法の充実により、完治するがんが大幅に増加する
- がんの病態や体質に加えて、QOLや経済性も考慮し、各個人に最適な治療が受けられる
- 治療に伴う苦痛が軽減され、社会復帰までの時間が短縮する
- 失われた臓器の機能回復など、一部のがんで再生医療が始まる

予 防

診 断 ・ 治 療

# 創薬・診断分野の技術マップ(1/4)

	健 常	発 症	治 療
<b>①ヒト臨床情報・サンプルのバンキング</b>			
健常人を含めたヒト臨床サンプルの効率的収集と、バンキングシステム	臨床サンプルバンクの整備、高精度なサンプルの解析法		
	ヒト細胞製造・培養技術	iPS細胞研究	
	ヒト病態を忠実に再現できる動物モデル、病態プロセスモデルの開発		
前向きコホート研究・大規模臨床データベースと、インテリジェントな情報処理基盤技術	疾患と生活習慣に関するコホート研究		
	バイオインフォマティクス(統計・疫学的解析手法等)とデータマイニング技術		
	臨床研究データに基づくシミュレーションツールの開発		
	疾患の特異的性質の解明		
<b>②ヒト生体機能のモニタリング</b>			
ゲノム、エピゲノム情報等の統合的解析	ゲノムワイド解析などを用いた網羅的遺伝子解析		
	エピゲノム情報等の変化の網羅的解析		
	バイオインフォマティクス・データマイニング技術による統合的解析手法		
実用的バイオマーカー、サロゲートマーカー	生活習慣(食事・運動量)バイオマーカー開発		
	簡便でリアルタイム計測可能なバイオマーカー測定機器開発		
	超早期診断のためのバイオマーカー・測定機器開発		
	発症リスクバイオマーカー開発		
	合併症発症リスクバイオマーカー開発		
イメージング技術(画像診断技術)の向上と、多様な生体機能のモニタリング技術	時系列 in vivo 1細胞計測技術		
	体液バイオマーカーの検査技術		
	異常などを早期から評価できるイメージング技術		
	高感度機能画像検査法		
	小型・簡易なゲノム・エピゲノム測定装置		
	ヒトを対象とした病態解明、薬効評価のためのツール開発		
<b>③エビデンスに基づく創薬診断</b>			
エビデンスに基づく予防・診断・治療の新たな方法と医薬の開発による選択肢の拡大	リアルタイムなリスク診断に基づく予防薬・予防法		
	薬物動態、薬力学、ファーマコゲノミクス解析技術		
	再生医療による治療法		
	エビデンスに基づく分子標的薬(抗体医薬)		
	核酸医薬		
	免疫療法		
	遺伝子治療・細胞治療法		
	疼痛緩和薬		

# 創薬・診断分野の技術マップ(2/4)

## アルツハイマー病技術マップ

	健 常	発 症	治 療
<b>①メカニズム解明に向けた基礎研究</b>			
病態解明のためのツール開発、及びヒトの病態を忠実に再現できる動物モデルの開発		ヒトを対象とした病態解明、薬効評価のためのツール開発 動物モデル・病態プロセスモデルの開発	
大規模臨床データベースの構築・解析と、疫学をベースとした前向きコホート研究	コンピュータを利用した臨床心理学的試験法	ヒト脳バンクの整備と、剖検脳試料の高精度解析法 AD初期病変に対応した臨床心理検査の開発	
<b>②早期診断による早期治療への展開</b>			
血液などを用いたAD特異的バイオマーカーの開発		髄液中のアミロイドβ, tauなどADバイオマーカーの開発 尿・血液等由来のADバイオマーカーの開発 AD特異的体液バイオマーカーの測定装置・イメージング技術 ゲノムワイド解析などを用いた網羅的遺伝子解析	
微量のアミロイド、神経回路異常を高感度に検出する機能画像検査法の開発	神経回路異常等を早期から検出するイメージング技術	微量アミロイドを高感度に検出するイメージング技術 脳血流、脳萎縮のイメージング技術	
<b>③認知機能維持・回復のための治療</b>			
新規作用機序を持つ医薬品の開発	糖尿病などADリスク疾患の治療法	AchE阻害剤など対症療法 セクレターゼ阻害剤やアミロイドβ・tau免疫療法など根本治療薬 脳特異的な薬物送達(DDS)技術 幹細胞を利用した神経細胞再生医療	
エビデンスに基づいた統合的医療と評価法の開発	遺伝子検査等によるAD発症リスク評価	臨床研究データに基づくシミュレーションツールの開発 認知機能を維持・回復させるコンピュータ支援プログラムの開発 ITを活用した生涯健康管理データの蓄積と活用	

# 創薬・診断分野の技術マップ(3/4)

## 糖尿病 技術マップ

	健 常	発 症	治 療
<b>①健康管理と予備軍の発症予防</b>			
リアルタイム生体情報モニタリングと、遺伝・環境要因等多数の情報を扱うデータマイニングに基づく健康管理法	発症リスクバイオマーカーの開発 生活習慣計測マーカーの開発 糖尿病と生活習慣に関するコホート研究 バイオインフォマティクス・データマイニング技術		
ゲノム・エピゲノム情報等を統合したインテリジェント創薬による予防薬	アディポネクチン上昇薬（体重減少模倣薬） 基礎代謝上昇薬（運動模倣薬） カロリー制限模倣薬	血管病に向かうプロセス制御薬	
実用的サロゲートマーカー測定機器	各種パラメータ計測法(ゲノムワイド、パーソナルゲノム解析、生活習慣等) 次世代臨床検査機器、個別診断機器 時系列 in vivo 1細胞計測技術		
<b>②合併症リスクの発見</b>			
合併症リスク診断の有効なバイオマーカーの開発	簡便でリアルタイムに計測可能な生活習慣(食事・運動量)バイオマーカー・測定機器	合併症発症リスクバイオマーカーの開発	
動脈硬化等合併症リスクの簡便な診断技術	リアルタイム・非侵襲計測技術 パーソナルゲノム等を活用した診断機器 頸動脈エコーの自動測定		
<b>③合併症の予防と治療</b>			
インテリジェント創薬等による糖尿病及び合併症治療薬の開発	インテリジェント創薬(多数のパラメーターを統合) DDS技術	再生医療・遺伝子治療 $\beta$ 細胞移植 腎再生誘導・線維化抑制技術 脂肪細胞の形質転換制御 AGE(終末糖化産物)除去技術	



# 創薬・診断分野の技術マップ(4/4)

## がん 技術マップ

	健 常	発 症	治 療
<b>①サロゲートマーカーの開発</b>			
正常組織も対象とした、多型解析を含むゲノム・エピゲノム解析	バイオインフォマティクス、システム生物学		
	多型解析を中心としたゲノム解析		
ゲノム・エピゲノム情報等に基づくサロゲートマーカーの開発	超早期診断も可能なサロゲートマーカーの開発		
	個人に最適ながんスクリーニングマーカーの開発		
<b>②早期がん病変の性質解明と検出法</b>			
早期がん病変及び、がん細胞の特異的性質(転移、浸潤、がん幹細胞、細胞形質転換等)の生物学的機構の解明	頻度の高いがんのリスク解析		
	遺伝性腫瘍の遺伝子診断		
	がん細胞の特異的性質解明(転移、浸潤、がん幹細胞など)		
がん細胞および免疫状態のモニタリング・イメージング技術の開発	リアルタイムの発がんリスク診断装置		
	個人に最適ながんリスク自己診断システム		
	がん細胞および免疫機能のモニタリング・イメージング技術		
<b>③豊富かつ適切な治療法の選択</b>			
がんの特異的性質を標的とした画期的医薬品及び治療法(がんワクチン、核酸医薬、予防薬、遺伝子・細胞治療、再生医療等)の開発	発症リスクに合わせた予防薬・機能性食品		
	がん本態解明に基づく分子標的薬		
	浸潤転移等を抑制する免疫療法(ペプチド療法等)		
	核酸医薬		
	遺伝子治療・細胞治療		
	DDS		
	がん幹細胞を標的とした創薬・iPS細胞研究		
	再生医療		
がん疼痛緩和薬			
ファーマコゲノミクスのマーカー開発	ファーマコゲノミクスのマーカー		
	ファーマコゲノミクスによる治療法の有効性、安全性評価法		
	がん細胞の特性に基づいたがんの個別化医療		

事前評価書

	作成日	平成 17 年 10 月 5 日 平成 年 月 日改訂
1. 事業名称 (コード番号)	化合物等を活用した生物システム制御基盤技術開発	
2. 推進部署名	バイオテクノロジー・医療技術開発部	
3. 事業概要	<p>(1)概要</p> <p>ポストゲノム研究の産業利用が期待される「ゲノム創薬」の加速を支援するため、ゲノム情報からタンパク質の解析、化合物の探索技術までの一貫したゲノム創薬の基盤技術開発を行い、我が国のバイオ産業の競争力強化を図る。</p> <p>我が国が強みとする完全長cDNAリソースや、タンパク質の相互作用解析技術基盤等を最大限に活用し、タンパク質の相互作用解析等により創薬ターゲット・疾患メカニズムを解析する技術、生物機能を制御する化合物等を探索・評価する画期的な技術等の開発を行う。</p> <p>(2)事業規模:平成 18 年度事業費 30 億円</p> <p>(3)事業期間:平成 18 年度～22 年度(5 年間)</p>	
4. 評価の検討状況		

#### (1) 事業の位置付け・必要性

本プロジェクトは、健康・安心プログラムの一環として実施されるものである。プログラムの目標である「国民が健康で安心して暮らせる社会の実現」に向け、達成すべき重要な課題のひとつとして個別化医療の実現や画期的な新薬の開発が掲げられている。

近年、製薬企業の臨床試験や、副作用事故発生時の訴訟等に係わるコスト等、新薬開発に係わる企業負担と開発リスクが増大している。一方、保険制度などの社会コストの大幅低減を主目的として、個別化医療・予防医療等の実現が政策的にも求められ、バイオテクノロジーを活用した画期的なゲノム創薬が重要になっている。

最近のポストゲノム研究の進展により、現在数百ある創薬ターゲットの数は 10 倍以上に増加すると期待されている。このため、今後の創薬国際競争においては、創薬プロセス初期のターゲット探索段階において、いかに確実に創薬につながる新たな創薬ターゲットを確定することが極めて重要となっている。この中で、タンパク質相互作用を対象に創薬ターゲット・疾患メカニズムを解明する技術が創薬ターゲットを特定する新たな手法として期待されている。

本プロジェクトは、タンパク質の相互作用等により創薬ターゲット候補・疾患メカニズムを解明する技術の開発、及びタンパク質の相互作用を制御する化合物等の探索等を行うための技術の開発を行う。これによりバイオテクノロジー産業化において有用な知見が蓄積しバイオテクノロジー産業の基盤を構築するとともに、創薬等の研究開発を加速し、個別化医療の実現や画期的な新薬の創出が期待できる。

技術戦略マップ(平成 17 年 3 月経済産業省策定)においては、個別化医療の実現に向けた技術のうち、波及効果が高く、医薬品開発の効率化に資する技術として、位置づけられている。個別技術としては、標的タンパク質効率化のうち「分子間相互作用解析技術」「ケミカルジェネティクス」、標的タンパク質に最適な薬物設計のうち「構造多様性に富んだ化合物ライブラリーの構築」「ケミカルライブラリーの化合物機能アノテーション」「低分子・タンパク質親和性解析技術」に位置づけられる。



## (2) 研究開発目標の妥当性

### <目標>

創薬等を加速するため、次の技術開発を行う。

- ① タンパク質の相互作用解析等により創薬ターゲット候補・疾患メカニズムを解析する技術の開発
- ② 生物機能を制御する化合物等を探索・評価する画期的な技術の開発

数値目標は次の通り:

- ・ 疾患に関わるタンパク質ネットワークを解析し、創薬ターゲット候補となりうる重要なタンパク質相互作用情報を 500 以上同定する。また、タンパク質相互作用を制御する産業上有用な化合物等を 50 以上取得する。

### <妥当性>

目標設定は、創薬基盤技術を確立する段階である本プロジェクトとしては十分と考えられるが、NEDO POST2 やワークショップ等を通じて意見聴取し、妥当性について更に検討する。

## (3) 研究開発マネジメント

公募を行い最適な研究開発体制を構築する。プロジェクトリーダーを選定し、プロジェクトリーダーと協議して研究管理を行う。また、研究開発委員会を年 2~3 回開催し、研究テーマ間の連携の強化、進捗状況を踏まえた予算配分・事業計画の策定を行う。プロジェクト開始後 3 年目に中間評価を行い、その評価結果を踏まえ事業全体を見直す。

国内の主要な製薬企業、研究機関、バイオ関連技術開発メーカーの積極的な参画を促し、その力量が縦横に発揮できる産学官連携のプロジェクト体制を構築し、効果的に運営する。企業における創薬ターゲット探索等の課題を解決できるような連携体制を構築する。参画する各研究機関と企業は、産業上有効な基本特許ポートフォリオの構築が重視され、研究期間中であつても化合物等の成果を企業等に移転できるプロジェクト運営を行う。

## (4) 研究開発成果

本プロジェクトでは、疾患等の分子メカニズムに係わり、創薬ターゲットの新たな候補となるタンパク質相互作用を明らかにし、その制御に係わる低分子化合物、天然生理活性物質等を探索・同定する。また、その制御物質を用いて生物機能の制御機構を解明すると共に、得られた情報と制御物質を創薬プラットフォームとして提供し産業界を支援する。

## (5) 実用化・事業化の見通し

本プロジェクトは、個別化医療の実現及び画期的な新薬開発及びポストゲノム研究の産業化に寄与する基盤を構築する技術開発であり、高い波及効果が見込まれる。特に、この基盤構築の過程で、タンパク質相互作用を制御する産業上有用な化合物等を 50 以上見出し、特許資産を形成することを目指しており、それを企業に提供することで国内産業の活性化につながるが見込まれる。

(6) その他特記事項

(7) 総合評価

本プロジェクトは、我が国の強みである完全長 cDNA リソース、LC-MS 等によるタンパク質相互作用解析技術、化合物・天然生理活性物質等の探索・評価技術等を結集するもので、個別企業では整備しきれない内容である。NEDO として実施する意義は大きく、また大きな成果が見込まれる。

「化合物等を活用した生物システム制御基盤技術開発 基本計画（案）」に対するパブリックコメント募集の結果について

平成18年3月22日  
NEDO技術開発機構  
バイオ・医療技術開発部

NEDO POST 3において標記基本計画（案）に対するパブリックコメントの募集を行いました結果をご報告いたします。  
お寄せいただきましたご意見を検討し、別添の基本計画に反映させていただきました。  
みなさまからのご協力を頂き、ありがとうございました。

1. パブリックコメント募集期間

平成18年12月21日～平成18年1月31日

2. パブリックコメント投稿数＜有効のもの＞

計3件

3. パブリックコメントの内容とそれに対する考え方

ご意見の概要	ご意見に対する考え方	基本計画への反映
全体について		

<p>[意見1] 1. のタンパク質の相互作用を用いるのは良いとしても、2. の「画期的な技術の開発」は具体性に欠ける。現在では、細胞の可視化技術が進み、今や、In vitro (試験管内) や in silico (コンピュータシミュレーション) で得られた結果を、実際の生きた細胞でアッセイできるようになって来ている。真に、創薬を目指すのであれば、そういった生きた可視化細胞を用いるアプローチとの併用が望ましいのでは？</p> <p>[意見2] 標的蛋白質に最適な薬物設計のうち「分子間相互作用解析技術」「ケミカルジェネティクス」などの個別技術を開発する事になっていますが、具体的なテーマとして「ウィルス対策」技術開発を明記・掲げて欲しい。鳥インフルエンザの人間への波及に怖れおののいていますが、本開発プロジェクトの成果が、どの程度貢献出来るか見直して欲しい。ウィルスも蛋白質ですので、蛋白質の相互作用解明は十分に貢献出来ると思います。実際に研究開発対象になっているのであれば、国民に判りやすい表現でアピールするのも必要だと思います。</p> <p>[意見3] 本事業では創薬等を加速するために、「創薬ターゲット候補・疾患メカニズムの解析」と、「化合物の探索・評価技術」の二点が技術開発目標として掲げられている。特に、二点目の「化合物の探索・評価技術」について、広義のケミカルバイオロジック的概念からすると、従来の化学合成法では合成不可能であった化合物へも対象を広げた研究・開発の可能性も出てくると思われる。酵素などの生体触媒分子と有機合成を組み合わせたとような研究グループを参画させる必要があるのではないか？</p>	<p>[考え方と対応]</p> <p>画期的な技術提案の募集であり、あえて限定的な記述を行わない。研究開発項目②(3)において可視化動物例を記載している。</p> <p>5年間24億円の国PJに応しい画期的内容を期待。提案があれば採択審査委員会で審査。</p> <p>提案があれば採択審査委員会で審査。</p>	<p>[反映の有無と反映内容]</p> <p>特になし。</p> <p>特になし。</p> <p>特になし。</p>
---	---	--

以上

<別紙>

一般社団法人バイオ産業情報化コンソーシアム委託分 成果リスト

年度別件数集計表

年度	論文	総説、解説、 著書	講演・学会	特許	報道
平成18 年度	89	28	165	5	1
平成19 年度	80	32	164	7	19
平成20 年度	46	9	81	13	2
平成21 年度	82	5	81	6	3
平成22 年度	93	14	72	14	1
計	390	88	563	45	26

1. 論文

(1) 査読のある原著論文

研究開発項目①

タンパク質ネットワーク解析技術の開発

<平成18年度>

1. Hamazaki J, Iemura S, Natsume T, Yashiroda H, Tanaka K, Murata S: A novel proteasome interacting protein recruits the deubiquitinating enzyme UCH37 to 26S proteasomes. EMBO J 25:4524-4536, 2006
2. Hirano Y, Hayashi H, Iemura S, Hendil KB, Niwa S, Kishimoto T, Kasahara M, Natsume T, Tanaka K, Murata S: Cooperation of multiple chaperones required for the assembly of mammalian 20S proteasomes. Mol Cell 24:977-984, 2006
3. Hyodo-Miura J, Yamamoto TS, Hyodo AC, Iemura S, Kusakabe M, Nishida E, Natsume T, Ueno N: XGAP, an ArfGAP, is required for polarized localization of PAR proteins and cell polarity in *Xenopus* gastrulation. Dev Cell 11:69-79, 2006
4. Kajino T, Ren H, Iemura S, Natsume T, Stefansson B, Brautigan DL, Matsumoto K, Ninomiya-Tsuji J: Protein phosphatase 6 down-regulates TAK1 kinase activation

- in the IL-1 signaling pathway. *J Biol Chem* 281:39891-39896, 2006
5. Kitajima TS, Sakuno T, Ishiguro K, Iemura S, Natsume T, Kawashima SA, Watanabe Y: Shugoshin collaborates with protein phosphatase 2A to protect cohesin. *Nature* 441:46-52, 2006
  6. Polouliakh N, Natsume T, Harada H, Fujibuchi W, Horton P: Comparative genomic analysis of transcription regulation elements involved in human map kinase G-protein coupling pathway. *J Bioinform Comput Biol* 4:469-482, 2006
  7. Sato S, Fukasawa M, Yamakawa Y, Natsume T, Suzuki T, Shoji I, Aizaki H, Miyamura T, Nishijima M: Proteomic profiling of lipid droplet proteins in hepatoma cell lines expressing hepatitis C virus core protein. *J Biochem* 139:921-930, 2006
  8. Terasawa K, Yoshimatsu K, Iemura S, Natsume T, Tanaka K, Minami Y: Cdc37 interacts with the glycine-rich loop of Hsp90 client kinases. *Mol Cell Biol* 26:3378-3389, 2006
  9. Yamada M, Ohnishi J, Ohkawara B, Iemura S, Satoh K, Hyodo-Miura J, Kawachi K, Natsume T, Shibuya H: NARF, an nemo-like kinase (NLK)-associated ring finger protein regulates the ubiquitylation and degradation of T cell factor/lymphoid enhancer factor (TCF/LEF). *J Biol Chem* 281:20749-20760, 2006

<平成19年度>

1. Iioka H, Iemura S, Natsume T, Kinoshita N: Wnt signalling regulates paxillin ubiquitination essential for mesodermal cell motility. *Nat Cell Biol* 9:813-821, 2007
2. Komatsu M, Waguri S, Koike M, Sou YS, Ueno T, Hara T, Mizushima N, Iwata J, Ezaki J, Murata S, Hamazaki J, Nishito Y, Iemura S, Natsume T, Yanagawa T, Uwayama J, Warabi E, Yoshida H, Ishii T, Kobayashi A, Yamamoto M, Yue Z, Uchiyama Y, Kominami E, Tanaka K: Homeostatic levels of p62 control cytoplasmic inclusion body formation in autophagy-deficient mice. *Cell* 131:1149-1163, 2007
3. Lee RH, Iioka H, Ohashi M, Iemura S, Natsume T, Kinoshita N: XRab40 and XCullin5 form a ubiquitin ligase complex essential for the noncanonical Wnt pathway. *EMBO J* 26:3592-3606, 2007
4. Nakagawa T, Shirane M, Iemura S, Natsume T, Nakayama KI: Anchoring of the 26S proteasome to the organellar membrane by FKBP38. *Genes Cells* 12:709-719, 2007
5. Saijou E, Itoh T, Kim KW, Iemura S, Natsume T, Miyajima A: Nucleocytoplasmic shuttling of the zinc finger protein EZI Is mediated by importin-7-dependent

- nuclear import and CRM1-independent export mechanisms. *J Biol Chem* 282:32327-32337, 2007
6. Satoh K, Ohnishi J, Sato A, Takeyama M, Iemura S, Natsume T, Shibuya H: Nemo-like kinase-myocyte enhancer factor 2A signaling regulates anterior formation in *Xenopus* development. *Mol Cell Biol* 27:7623-7630, 2007
  7. Ueda JY, Togashi T, Matukura S, Nagai A, Nakashima T, Komaki H, Anzai K, Harayama S, Doi T, Takahashi T, Natsume T, Kisu Y, Goshima N, Nomura N, Takagi M, Shin-Ya K: A novel nuclear export inhibitor JBIR-02, a new piericidin discovered from *Streptomyces* sp. ML55. *J Antibiot (Tokyo)* 60:459-462, 2007
  8. Ueda JY, Hashimoto J, Nagai A, Nakashima T, Komaki H, Anzai K, Harayama S, Doi T, Takahashi T, Nagasawa K, Natsume T, Takagi M, Shin-ya K: New aureothin derivative, alloaureothin, from *Streptomyces* sp. MM23. *J Antibiot (Tokyo)* 60:321-324, 2007

<平成20年度>

1. J. Hamuro, O. Higuchi, K. Okada, M. Ueno, S. Iemura, T. Natsume, H. Spearman, D. Beeson, and Y. Yamanashi. Mutations causing DOK7 congenital myasthenia ablate functional motifs in Dok-7. *J. Biol. Chem.*, **283**, 5518-5524 (2008).
2. S. Hara, E. Kiyokawa, S. Iemura, T. Natsume, T. Wassmer, P. J. Cullen, H. Hiai, and M. Matsuda. The DHR1 domain of DOCK180 binds to SNX5 and regulates cation-independent mannose 6-phosphate receptor transport. *Mol. Biol. Cell.*, **19**, 3823-3835 (2008).
3. T. Hara, A. Takamura, C. Kishi, S. Iemura, T. Natsume, J. L. Guan, and N. Mizushima. FIP200, a ULK-interacting protein, is required for autophagosome formation in mammalian cells. *J. Cell. Biol.*, **181**, 497-510 (2008).
4. K. Ota, K. Kito, S. Iemura, T. Natsume, and T. Ito. A parallel affinity purification method for selective isolation of polyubiquitinated proteins. *Proteomics.*, **8**, 3004-3007 (2008).
5. T. Saneyoshi, G. Wayman, D. Fortin, M. Davare, N. Hoshi, N. Nozaki, T. Natsume, and T. R. Soderling. Activity-dependent synaptogenesis: regulation by a CaM-kinase kinase/CaM-kinase I/betaPIX signaling complex. *Neuron.*, **57**, 94-107 (2008).
6. T. Tomita, T. Kido, R. Kurotani, S. Iemura, E. Sterneck, T. Natsume, C. Vinson, and S. Kimura. CAATT/enhancer-binding proteins alpha and delta interact with NKX2-1 to synergistically activate mouse secretoglobin 3A2 gene expression. *J. Biol. Chem.*, **283**, 25617-25627 (2008).

<平成 21 年度>

1. J. Hashimoto, T. Watanabe, T. Seki, S. Karasawa, M. Izumikawa, T. Seki, S. Iemura, T. Natsume, N. Nomura, N. Goshima, A. Miyawaki, M. Takagi, and K. Shin-Ya. Novel in vitro protein fragment complementation assay applicable to high-throughput screening in a 1536-well format. *J. Biomol. Screen.*, **14**, 970-979 (2009).
2. N. Hosokawa, T. Sasaki, S. Iemura, T. Natsume, T. Hara, and N. Mizushima. Atg101, a novel mammalian autophagy protein interacting with Atg13. *Autophagy.*, **5**, 973-979 (2009).
3. N. Hosokawa, T. Hara, T. Kaizuka, C. Kishi, A. Takamura, Y. Miura, S. Iemura, T. Natsume, K. Takehana, N. Yamada, J. L. Guan, N. Oshiro, and N. Mizushima. Nutrient-dependent mTORC1 association with the ULK1-Atg13-FIP200 complex required for autophagy. *Mol. Biol. Cell.*, **20**, 1981-1991 (2009).
4. T. Kaneko, J. Hamazaki, S. Iemura, K. Sasaki, K. Furuyama, T. Natsume, K. Tanaka, and S. Murata. Assembly pathway of the Mammalian proteasome base subcomplex is mediated by multiple specific chaperones. *Cell.*, **137**, 914-925 (2009).
5. H. Kiefer, A. Mizutani, S. Iemura, T. Natsume, H. Ando, Y. Kuroda, and K. Mikoshiba. Inositol 1,4,5-triphosphate receptor-binding protein released with inositol 1,4,5-triphosphate (IRBIT) associates with components of the mRNA 3' processing machinery in a phosphorylation-dependent manner and inhibits polyadenylation. *J. Biol. Chem.*, **284**, 10694-10705 (2009).
6. M. Nishiyama, K. Oshikawa, Y. Tsukada, T. Nakagawa, S. Iemura, T. Natsume, Y. Fan, A. Kikuchi, A. I. Skoultchi, and K. I. Nakayama. CHD8 suppresses p53-mediated apoptosis through histone H1 recruitment during early embryogenesis. *Nat. Cell. Biol.*, **11**, 172-182 (2009).
7. M. S. Patrick, H. Oda, K. Hayakawa, Y. Sato, K. Eshima, T. Kirikae, S. Iemura, M. Shirai, T. Abe, T. Natsume, T. Sasazuki, and H. Suzuki. Gasp, a Grb2-associating protein, is critical for positive selection of thymocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **106**, 16345-16350 (2009).
8. M. Sagara, Y. Kawasaki, S. I. Iemura, T. Natsume, Y. Takai, and T. Akiyama. Asef2 and Neurabin2 cooperatively regulate actin cytoskeletal organization and are involved in HGF-induced cell migration. *Oncogene.*, **28**, 1357-1365 (2009).
9. S. Saita, M. Shirane, T. Natume, S. Iemura, and K. I. Nakayama. Promotion of neurite extension by protrudin requires its interaction with vesicle-associated membrane protein-associated protein. *J. Biol. Chem.*, **284**, 13766-13777 (2009).



10. M. Tachibana, E. Kiyokawa, S. Hara, S. Iemura, T. Natsume, T. Manabe, and M. Matsuda. Ankyrin repeat domain 28 (ANKRD28), a novel binding partner of DOCK180, promotes cell migration by regulating focal adhesion formation. *Exp. Cell. Res.*, **315**, 863-876 (2009).
11. K. Takeda, Y. Komuro, T. Hayakawa, H. Oguchi, Y. Ishida, S. Murakami, T. Noguchi, H. Kinoshita, Y. Sekine, S. Iemura, T. Natsume, and H. Ichijo. Mitochondrial phosphoglycerate mutase 5 uses alternate catalytic activity as a protein serine/threonine phosphatase to activate ASK1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **106**, 12301-12305 (2009).
12. Y. Yamazumi, A. Kamiya, A. Nishida, A. Nishihara, S. Iemura, T. Natsume, and T. Akiyama. The transmembrane nucleoporin NDC1 is required for targeting of ALADIN to nuclear pore complexes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **389**, 100-104 (2009).
13. S. Akieda-Asai, N. Zaima, K. Ikegami, T. Kahyo, I. Yao, T. Hatanaka, S. Iemura, R. Sugiyama, T. Yokozeki, Y. Eishi, M. Koike, K. Ikeda, T. Chiba, H. Yamaza, I. Shimokawa, S. Y. Song, A. Matsuno, A. Mizutani, M. Sawabe, M. V. Chao, M. Tanaka, Y. Kanaho, T. Natsume, H. Sugimura, Y. Date, M. W. McBurney, L. Guarente, and M. Setou. SIRT1 Regulates Thyroid-Stimulating Hormone Release by Enhancing PIP5Kgamma Activity through Deacetylation of Specific Lysine Residues in Mammals. *PLoS. One.*, **5**, e11755 (2010).
14. T. Kaizuka, T. Hara, N. Oshiro, U. Kikkawa, K. Yonezawa, K. Takehana, S. Iemura, T. Natsume, and N. Mizushima. Tti1 and Tel2 are critical factors in mammalian target of rapamycin complex assembly. *J. Biol. Chem.*, **285**, 20109-20116 (2010).
15. M. Komatsu, H. Kurokawa, S. Waguri, K. Taguchi, A. Kobayashi, Y. Ichimura, Y. S. Sou, I. Ueno, A. Sakamoto, K. I. Tong, M. Kim, Y. Nishito, S. Iemura, T. Natsume, T. Ueno, E. Kominami, H. Motohashi, K. Tanaka, and M. Yamamoto. The selective autophagy substrate p62 activates the stress responsive transcription factor Nrf2 through inactivation of Keap1. *Nat. Cell. Biol.*, **12**, 213-223 (2010).
16. T. Kotani, S. Iemura, T. Natsume, K. Kawakami, and M. Yamashita. Mys protein regulates protein kinase A activity by interacting with regulatory type Ialpha subunit during vertebrate development. *J. Biol. Chem.*, **285**, 5106-5116 (2010).
17. T. Kunoh, T. Noda, K. Koseki, M. Sekigawa, M. Takagi, K. Shin-ya, N. Goshima, S. Iemura, T. Natsume, S. Wada, Y. Mukai, S. Ohta, R. Sasaki, and T. Mizukami. A novel human dynactin-associated protein, dynAP, promotes activation of Akt, and ergosterol-related compounds induce dynAP-dependent apoptosis of human cancer cells. *Mol. Cancer. Ther.*, **9**, 2934-2942 (2010).

18. S. Nakada, I. Tai, S. Panier, A. Al-Hakim, S. Iemura, Y. C. Juang, L. O'Donnell, A. Kumakubo, M. Munro, F. Sicheri, A. C. Gingras, T. Natsume, T. Suda, and D. Durocher. Non-canonical inhibition of DNA damage-dependent ubiquitination by OTUB1. *Nature.*, **466**, 941-946 (2010).

<平成 22 年度>

1. Nakamura T, Hayashi T, Mimori-Kiyosue Y, Sakaue F, Matsuura K, Iemura S, Natsume T, Akiyama T. The PX-RICS-14-3-3zeta/theta complex couples N-cadherin-beta-catenin with dynein-dynactin to mediate its export from the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 285, 16145-16154 (2010)
2. Kaizuka T, Hara T, Oshiro N, Kikkawa U, Yonezawa K, Takehana K, Iemura S, Natsume T, Mizushima N. The selective autophagy substrate p62 activates the stress responsive transcription factor Nrf2 through inactivation of Keap1. *J. Biol. Chem.* 285, 20109-20116 (2010)
3. Akieda-Asai S, Zaima N, Ikegami K, Kahyo T, Yao I, Hatanaka T, Iemura S, Sugiyama R, Yokozeki T, Eishi Y, Koike M, Ikeda K, Chiba T, Yamaza H, Shimokawa I, Song SY, Matsuno A, Mizutani A, Sawabe M, Chao MV, Tanaka M, Kanaho Y, Natsume T, Sugimura H, Date Y, McBurney MW, Guarente L, Setou M. SIRT1 Regulates Thyroid-Stimulating Hormone Release by Enhancing PIP5Kgamma Activity through Deacetylation of Specific Lysine Residues in Mammals. *PLoS. One.* 5, e11755 (2010)
4. Nakada S, Tai I, Panier S, Al-Hakim A, Iemura S, Juang YC, O'Donnell L, Kumakubo A, Munro M, Sicheri F, Gingras AC, Natsume T, Suda T, Durocher D. Non-canonical inhibition of DNA damage-dependent ubiquitination by OTUB1. *Nature.* 466, 941-946 (2010)
5. Kunoh T, Noda T, Koseki K, Sekigawa M, Takagi M, Shin-ya K, Goshima N, Iemura S, Natsume T, Wada S, Mukai Y, Ohta S, Sasaki R, Mizukami T. A novel human dynactin-associated protein, dynAP, promotes activation of Akt, and ergosterol-related compounds induce dynAP-dependent apoptosis of human cancer cells. *Mol. Cancer. Ther.* 9, 2934-2942 (2010)
6. Hanafusa H, Ishikawa K, Kedashiro S, Saigo T, Iemura S, Natsume T, Komada M, Shibuya H, Nara A, Matsumoto K. Leucine-rich repeat kinase LRRK1 regulates endosomal trafficking of the EGF receptor. *Nat. Commun.* 158 (2011)
7. Inoue Y, Iemura S, Natsume T, Miyazawa K, Imamura T. Suppression of p53 activity through the cooperative action of Ski and histone deacetylase SIRT1. *J. Biol. Chem.* **285**, 6311-6320 (2011).

8. Oh KH, Yang SW, Park JM, Seol JH, Iemura S, Natsume T, Murata S, Tanaka K, Jeon YJ, Chung CH. Control of AIF-mediated cell death by antagonistic functions of CHIP ubiquitin E3 ligase and USP2 deubiquitinating enzyme. *Cell Death Differ.* Feb 4. (2011).

## 研究開発項目②

### タンパク質相互作用情報の検証技術の開発

#### <平成18年度>

1. H. Izuta, M. Ikeno, N. Suzuki, T. Tomonaga, N. Nozaki, C. Obuse, Y. Kisu, N. Goshima, F. Nomura, N. Nomura, K. Yoda. Comprehensive analysis of the ICEN (Interphase Centromere Complex) components enriched in the CENP-A chromatin of human cells. *Gene Cells* 11, 673-984 (2006)
2. H. Takeda, A. Fukumoto, A. Miura, N. Goshima, N. Nomura. High-throughput kinase assay based on surface plasmon resonance suitable for native protein substrates. *Analytical Biochemistry* 357, 262-271 (2006)
3. A. Miura, R. Honma, T. Togashi, Y. Yanagisawa, E. Ito, J. Imai, T. Isogai, N. Goshima, S. Watanabe, N. Nomura. Differential responses of normal human coronary artery endothelial cells against multiple cytokines comparatively assessed by gene expression profiles. *FEBS Letter*, 580, 6871-6879 (2006)

#### <平成19年度>

1. J. Ueda, T. Togashi, S. Matsukura, A. Nagai, T. Nakashima, H. Komaki, K. Anzai, S. Harayama, T. Doi, T. Takahashi, T. Natsume, Y. Kisu, N. Goshima, N. Nomura, M. Takagi, K. Shin-ya. A novel nuclear export inhibitor JBIR-02, a piericidin derivative from *Streptomyces* sp. ML55. *J. Antibiot.* 60 (7), 459-462 (2007)
2. O. Ichikawa, M. Osawa, N. Nishida, N. Goshima, N. Nomura, I. Shimada. Structural basis of the collagen-binding mode of discoidin domain receptor 2. *EMBO J.* 26 (18), 4168-4176 (2007)

#### <平成20年度>

1. Naoki Goshima, Yoshifumi Kawamura, Akiko Fukumoto, Aya Miura, Reiko Honma, Ryohei Satoh, Ai Wakamatsu, Jun-ichi Yamamoto, Kouichi Kimura, Tetsuo Nishikawa, Taichi Andoh, Yuki Iida, Kumiko Ishikawa, Emi Ito, Naoko Kagawa, Chie Kaminaga, Kei-ichi Kanehori, Bunsei Kawakami, Kiyokazu Kenmochi, Rie

Kimura, Miki Kobayashi, Toshihiro Kuroita, Hisashi Kuwayama, Yukio Maruyama, Kiyoshi Matsuo, Kazuyoshi Minami, Mariko Mitsubori, Masatoshi Mori, Riyo Morishita, Atsushi Murase, Akira Nishikawa, Shigemichi Nishikawa, Toshihiko Okamoto, Noriko Sakagami, Yutaka Sakamoto, Yukari Sasaki, Tomoe Seki, Saki Sono, Akio Sugiyama, Tsuyoshi Sumiya, Tomoko Takayama, Yukiko Takayama, Hiroyuki Takeda, Takushi Togashi, Kazuhide Yahata, Hiroko Yamada, Yuka Yanagisawa, Yaeta Endo, Fumio Imamoto, Yasutomo Kisu, Shigeo Tanaka, Takao Isogai, Jun-ichi Imai, Shinya Watanabe, Nobuo Nomura. Human protein factory for converting the transcriptome into an in vitro-expressed proteome. *Nature Methods*. 5 (12):1011-7 (2008)

2. Yukio Maruyama, Ai Wakamatsu, Yoshifumi Kawamura, Kouichi Kimura, Jun-ichi Yamamoto, Tetsuo Nishikawa, Yasutomo Kisu, Sumio Sugano, Naoki Goshima, Takao Isogai, Nobuo Nomura. Human Gene and Protein Database (HGPD): a novel database presenting a large quantity of experiment-based results in human proteomics. *Nucleic Acids Res.*, 37 (Database issue):D762-6 (2009)

<平成 2 1 年度>

1. Junko Hashimoto, Taku Watanabe, Tatsuya Seki, Satoshi Karasawa, Miho Izumikawa, Tomoe Seki, Shun-ichiro Iemura, Tohru Natsume, Nobuo Nomura, Naoki Goshima, Atsushi Miyawaki, Motoki Takagi and Kazuo Shin-ya, Novel In Vitro Protein Fragment Complementation Assay Applicable to High-Throughput Screening in 1536-Well Format. *Journal of Biomolecular Screening*. 14(8), 970-979. (2009)

<平成 2 2 年度>

1. Hiroyuki Takeda, Yoshifumi Kawamura, Aya Miura, Masatoshi Mori, Ai Wakamatsu, Jun-ichi Yamamoto, Takao Isogai, Masaki Matsumoto, Keiichi I. Nakayama, Tohru Natsume, Nobuo Nomura, and Naoki Goshima. Comparative analysis of human Src-family kinase substrate specificity in vitro. *J. Proteome Res.* 9, 5982–5993 (2010)
2. Shuichi Hirose, Yoshifumi Kawamura, Masatoshi Mori, Kiyonobu Yokota, Tamotsu Noguchi, Naoki Goshima. Development and evaluation of data-driven designed tags (DDTs) for controlling protein solubility. *New Biotechnology*. In press 2010.
3. Ryo Nagashio, Yuichi Sato, Toshihide Matsumoto, Taihei Kageyama, Yukitoshi Satoh, Ryuge Shinichiro, Noriyuki Masuda, Naoki Goshima, Shi-Xu Jiang, Isao Okayasu. Expression of RACK1 is a novel biomarker in pulmonary

- adenocarcinomas. *Lung Cancer* 69, 54-59 (2010)
4. Masayuki Sekigawa, Tatsuki Kunoh, Shu-ichi Wada, Yukio Mukai, Kazuhiko Ohshima, Shinji Ohta, Naoki Goshima, Ryuzo Sasaki and Tamio Mizukami  
Comprehensive Screening of Human Genes with Inhibitory Effects on Yeast Growth and Validation of a Yeast Cell-Based System for Screening Chemicals. *J Biomol Screen.* 15(4), 368-378 (2010)
  5. Yoko Yashiroda, Reika Okamoto, Kaori Hatsugai, Yasushi Takemoto, Naoki Goshima, Tamio Saito, Makiko Hamamoto, Yoshikazu Sugimoto, Hiroyuki Osada, Hiroyuki Seimiya, and Minoru Yoshida. A novel yeast cell-based screening identifies flavone as a tankyrase inhibitor. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 394, 569-573(2010).
  6. Yohei Sugano, Yoshifumi Kawamura, Naoki Goshima, Satoru Ohgiya.  
Introduction of amino acid residues at the N-terminus of the zeocin-resistance protein increases its expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology Letters* 32 : 1515-1521 (2010)
  7. Takehiko Sahara, Takako Goda, Nobuo Nomura, Ryohei Satoh, Yoshifumi Kawamura, Naoki Goshima, and Satoru Ohgiya Yeast-based expression system for efficient protein production at low temperatures. *Biotechniques.* In press.
  8. Tatsuki Kunoh, Masayuki Sekigawa, Motoki Takagi, Kazuo Shinya, Naoki Goshima, Shun-ichiro Iemura, Tohru Natsume, Shu-ichi Wada, Yukio Mukai, Shinji Ohta, Ryuzo Sasaki and Tamio Mizukami. A Novel Human Dynactin-Associated Protein, dynAP, Promotes Activation of Akt/PKB, and Screened Chemicals Induce dynAP-Dependent Apoptosis of Human Cancer Cells. *Molecular Cancer Therapeutics.*9(11), 2934-2942. (2010)
  9. Shuichi Hirose, Yoshifumi Kawamura, Kiyonobu Yokota, Toshihiro Kuroita, Tohru Natsume, Kazuo Komiya, Tsuyoshi Tsutsumi, Yorimasa Suwa, Takao Isogai, Naoki Goshima, Tamotsu Noguchi Statistical analysis of features associated with protein expression/solubility in an *in vivo Escherichia coli* expression system and a wheat germ cell-free expression system. *Journal of Biochemistry,* in press.
  10. Toshihide Matsumoto, Shinichiro Ryuge, Makoto Kobayashi, Taihei Kageyama, Manabu Hattori, Naoki Goshima, Shi-Xu Jiang, Makoto Saegusa, Akira Iyoda, Yukitoshi Satoh, Noriyuki Masuda, Yuichi Sato Anti-HuC and HuD autoantibodies are differential sero-diagnostic markers for small cell carcinoma from large cell neuroendocrine carcinoma of the lung. *International Journal of Oncology.* in press.
  11. Makoto Matsuyama, Hidemasa Goto, Kousuke Kasahara, Yoshitaka Kawakami,

Makoto Nakanishi, Tohru Kiyono, Naoki Goshima, Masaki Inagaki Nuclear Chk1 prevents premature mitotic entry. J. Cell Sci., in press.

12. Shuichi Hirose, Yoshifumi Kawamura, Masatoshi Mori, Kiyonobu Yokota, Tamotsu Noguchi, Naoki Goshima. Development and evaluation of data-driven designed tags (DDTs) for controlling protein solubility. New Biotechnology. In press 2010.

### 研究開発項目③

#### タンパク質相互作用予測技術の開発

##### <平成18年度>

1. Suenaga, A., Okimoto, N., Futatsugi, N., Hirano, Y., Narumi, T., Ohno, Y., Yanai, R., Hirokawa, T., Ebisuzaki, T., Konagaya, A. & Taiji, M. Structure and dynamics of RNA polymerase II elongation complex. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **343** (1), 90-98 (2006)
2. Ren, F., Tsubota, A., Hirokawa, T., Kumada, H., Yang, Z. & Tanaka, H. A unique amino acid substitution, T126I, in human genotype C of hepatitis B virus S gene and its possible influence on antigenic structural change. *Gene* **383**, 43-51 (2006)

##### <平成19年度>

1. Tashiro, T., Nakagawa, R., Hirokawa, T., Inoue, S., Watarai, H., Taniguchi, M. & Mori, K. RCAI-56, a carbocyclic analogue of KRN7000: its synthesis and potent activity for natural killer (NK) T cells to preferentially produce interferon- $\gamma$ . *Tetrahedron Lett.* **48**, 3343-3347 (2007)
2. Usui, T., Ban, H.S., Kawada, J., Hirokawa, T., Nakamura, H. Discovery of indenopyrazoles as EGFR and VEGFR-2 tyrosine kinase inhibitors by in silico high-throughput screening. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **18**, 285-288 (2007)

##### <平成20年度>

1. Katada, S., Hirokawa, T., Touhara, K. Exploring the odorant binding site of a G-protein-coupled olfactory receptor. *Current Computer-Aided Drug Design* **4**, 123-131 (2008)
2. Mori, Y., Hirokawa, T., Aoki, K., Satomi, H., Takeda, S., Aburada, M., Miyamoto, K. Structure activity relationships of quinoxalin-2-one derivatives as platelet-derived growth factor-beta receptor (PDGFbeta R) inhibitors, derived from molecular modeling. *Chem. Pharm. Bull.* **56**, 682-687 (2008)

<平成21年度>

1. Tagami, U., Shimba, N., Nakamura, M., Yokoyama, K., Suzuki, E., Hirokawa T. Substrate specificity of microbial transglutaminase as revealed by three-dimensional docking simulation and mutagenesis. *Protein Eng. Des. Sel.* **22**, 747-52 (2009)
2. Iida, K., Tera, M., Hirokawa, T., Shin-ya, K., Nagasawa, K. G-quadruplex recognition by macrocyclic hexaoxazole (6OTD) dimer: greater selectivity than monomer. *Chem Commun (Camb)*. **42**, 6481-6483 (2009)
3. Yoshida, T., Kadota, Y., Hitaoka, S., Kori, E., Horikawa, Y., Taguchi, M., Tsuji, D., Hirokawa, T., Chuman, H., Itoh, K. Expression and molecular dynamics studies on effect of amino acid substitutions at Arg344 in human cathepsin A on the protein local conformation. *Biochim. Biophys. Acta.* **1794**, 1693-1699 (2009)
4. Koshimizu, H., Kiyosue, K., Hara, T., Hazama, S., Suzuki, S., Uegaki, K., Nagappan, G., Zaitsev, E., Hirokawa, T., Tatsu, Y., Ogura, A., Lu, B., Kojima, M. Multiple functions of precursor BDNF to CNS neurons: negative regulation of neurite growth, spine formation and cell survival. *Mol Brain* **2**. 27 (2009)
5. Tashiro, T., Nakagawa, R., Hirokawa, T., Inoue, S., Watarai, H., Taniguchi, M., Mori, K. RCAI-37, 56, 59, 60, 92, 101, and 102, cyclitol and carbasugar analogs of KRN7000: their synthesis and bioactivity for mouse lymphocytes to produce Th1-biased cytokines. *Bioorg Med Chem.* **17**, 6360-6373 (2009)
6. Kawajiri, K., Kobayashi, Y., Ohtake, F., Ikuta, T., Matsushima, Y., Mimura, J., Pettersson, S., Pollenz, RS., Sakaki, T., Hirokawa, T., Akiyama, T., Kurosumi, M., Poellinger, L., Kato, S., Fujii-Kuriyama, Y. Aryl hydrocarbon receptor suppresses intestinal carcinogenesis in ApcMin/+ mice with natural ligands. *Proc Natl Acad Sci USA.* **106**, 13481-13486 (2009)
7. Fujiwara, D., Ye, Z., Gouda, M., Yokota, K., Tsumuraya, T., Fujii I. Selection of inhibitory peptides for Aurora-A kinase from a phage-displayed library of helix-loop-helix peptides. *Bioorg Med Chem Lett.* **20**, 1776-1778 (2010)
8. El-Haggar, R., Kamikawa, K., Machi, K., Ye, Z., Ishino, Y., Tsumuraya, T., Fujii I. Molecular design of small organic molecules based on structural information for a conformationally constrained peptide that binds to G-CSF receptor. *Bioorg Med Chem Lett.* **20**, 1169-1172 (2010).

<平成22年度>

1. Yabuuchi, H., Nijjima, S., Takematsu, H., Ida, T., Hirokawa, T., Hara, T., Ogawa, T., Minowa, Y., Tsujimoto, G. and Okuno, Y. Analysis of multiple compound-protein

- interactions reveals novel bioactive molecules *Molecular Systems Biology*, 2011, **7**, 472.
2. Mukai, Y., Yoshizawa, M., Sasaki, T., Ikeda, M., Tomii, K., Hirokawa, T. and Suwa, M., Discrimination of Golgi Type II Membrane Proteins Based on Their Hydrophathy Profiles and the Amino Acid Propensities of Their Transmembrane Regions *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 2011, **75**, 82-88.
  3. Saito, S., Hirokawa, T. and Horimoto, K. Discovery of Chemical Compound Groups with Common Structures by a Network Analysis Approach (Affinity Prediction Method) *J. Chem. Inf. Model.*, 2010, **51**, 61-68.
  4. Iida, K., Tera, M., Hirokawa, T., Shin-Ya, K. and Nagasawa, K. Synthesis of Macrocyclic Hexaoxazole (6OTD) Dimers, Containing Guanidine and Amine Functionalized Side Chains, and an Evaluation of Their Telomeric G4 Stabilizing Properties *J. Nucleic Acids*, 2010, 217627.
  5. Uchikoga, N. and Hirokawa, T. Analysis of protein-protein docking decoys using interaction fingerprints: application to the reconstruction of CaM-ligand complexes *BMC Bioinformatics*, 2010, **11**, 236.
  6. Watanabe, M., Hirokawa, T., Kobayashi, T., Yoshida, A., Ito, Y., Yamada, S., Orimoto, N., Yamasaki, Y., Arisawa, M. and Shuto, S. Investigation of the bioactive conformation of histamine H3 receptor antagonists by the cyclopropylic strain-based conformational restriction strategy *J. Med. Chem.*, 2010, **53**, 3585-3593.
  7. Izumikawa, M., Hashimoto, J., Hirokawa, T., Sugimoto, S., Kato, T., Takagi, M., Shin-Ya, K. JBIR-22, an inhibitor for protein-protein interaction of the homodimer of proteasome assembly factor 3 *J. Nat. Prod.*, 2010, **73**, 628-631.
  8. Oda, M., Saito, M., Tsumuraya, T., Fujii, I. Contribution of the trifluoroacetyl group in the thermodynamics of antigen-antibody binding. *J Mol Recognit.* **23**, 263-270 (2010)

#### 研究開発項目④

##### 疾患関連遺伝子探索技術の開発

<平成18年度>

1. Yokoi N, Kanamori M, Horikawa Y, Takeda J, Sanke T, Furuta H, Nanjo K, Mori H, Kasuga M, Hara K, Kadowaki T, Tanizawa Y, Oka Y, Iwami Y, Ohgawara H, Yamada Y, Seino Y, Yano H, Cox NJ, and Seino S. Association Studies of Variants in



the Genes Involved in Pancreatic  $\beta$ -Cell Function in Type 2 Diabetes in Japanese.  
*Diabetes* **55**: 2379-86, 2006

<平成19年度>

1. Moro H, Sato H, Ida I, Oshima A, Sakurai N, Shihara N, Horikawa Y, and Mikuni M Effect of SKF-38393, a dopamine D1 receptor agonist on expression of amphetamine-induced behavioral sensitization and expression of immediate early gene are in prefrontal cortex of rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **87**: 56-64, 2007
2. Oda N, Imamura S, Fujita T, Inagaki K, Kakizawa H, Hayakawa N, Suzuki A, Takeda J, Horikawa Y, and Itoh M. The ratio of leptin / adiponectin can be used as an index of insulin resistance. *Metabolism* **57**: 268-273, 2008
3. Miyake K, Horikawa Y, Hara k, Yasuda k, Osawa H, Furuta H, Hirota Y, Yamagata K, Hinokio Y, Oka Y, Iwasaki N, Iwamoto Y, Yamada Y, Seino Y, Maegawa H, Kashiwagi A, Yamamoto K, Tokunaga K, Takeda J, Makino H, Nanjo K, Kadowaki K and Kasuga M. Association of *TCF7L2* polymorphisms with susceptibility to type 2 diabetes in 4,087 Japanese subjects. *J. Hum. Genet.* **53**: 174-180, 2008

<平成20年度>

1. Tomizuka K, *et al.* R-spondin1 plays an essential role in ovarian development through positively regulating Wnt-4 signaling. *Hum. Mol. Genet.* **17**:1278-1291, 2008
2. Zenibayashi M, Miyake K, Horikawa Y, Hirota Y, Teranishi T, Kouyama K, Sakaguchi K, Takeda J, Kasuga M. Lack of association of *LRP5* and *LRP6* polymorphisms with type 2 diabetes mellitus in the Japanese population. *Endocr. J.* **55**, 699-707, 2008
3. Horikawa Y, Miyake K, Yasuda K, Enya M, Hirota Y, Yamagata K, Hinokio Y, Oka Y, Iwasaki N, Iwamoto Y, Yamada Y, Seino Y, Maegawa H, Kashiwagi A, Yamamoto K, Tokunaga K, Takeda J, Kasuga M. Replication of genome-wide association studies of type 2 diabetes susceptibility in Japan. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **93**, 3136-3141, 2008
4. Sato H, Horikawa Y, Iizuka K, Sakurai N, Tanaka T, Shihara N, Ohshima A, Takeda J, Mikuni M. Large-scale analysis of glucocorticoid target genes in rat hypothalamus. *J. Neurochem.* **106**, 805-814, 2008
5. Enya M, Horikawa Y, Kuroda E, Yonemaru K, Tonooka N, Tomura H, Oda N, Shihara N, Iizuka K, Saibara T, Takeda J. Mutations in the small heterodimer partner gene increase morbidity risk in Japanese type 2 diabetes patients. *Hum.*

*Mutat.* **29**,271-E277, 2008

6. Iizuka K, Takeda J, Horikawa Y. Regulation of lipogenesis via BHLHB2/DEC1 and ChREBP feedback looping *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 374: 95-100, 2008
7. Iizuka K, Takeda J, Horikawa Y. ChREBP: A glucose-activated transcription factor involved in the development of metabolic syndrome *Endocr. J.* 55: 617-624, 2008

<平成 21 年度>

1. Iizuka K, Takeda J, Horikawa Y. Hepatic overexpression of dominant negative Mlx improves metabolic profile in diabetes-prone C57BL/6J mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 379: 499-504, 2009
2. Kuroda E, Horikawa Y, Enya M, Oda N, Suzuki E, Iizuka K, and Takeda J. Identification of minimal promoter and genetic variants of Kruppel-like factor 11 gene and association analysis with type 2 diabetes in Japanese. *Endocr. J.* 56:275-286, 2009
3. Miyake K, Yang W, Hara K, Yasuda K, Horikawa Y, Osawa H, Furuta H, Ng MCY, Hirota Y, Mori H, Ido K, Yamagata K, Hinokio Y, Oka Y, Iwasaki N, Iwamoto Y, Yamada Y, Seino Y, Maegawa H, Kashiwagi A, Wang HY, Tanahashi T, Nakamura N, Takeda J, Maeda E, Yamamoto K, Tokunaga K, Ma RCW, So WY, Chan JCN, Kamatani N, Makino H, Nanjo K, Kadowaki T, Kasuga M. Validation of associations of candidate SNPs identified in a multistage genome-wide association study with type 2 diabetes mellitus as well as analysis of gene-gene interaction and construction of a prediction model for the disease. *J. Hum. Genet.* 54: 236-241, 2009
4. Ishiyama M, Suzuki E, Katsuda J, Murase H, Tajima Y, Horikawa Y, Goto S, Fujita T, Takeda J. Associations of coronary artery calcification and carotid intima-media thickness with plasma concentrations of vascular calcification inhibitors in type 2 diabetic patients. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 85: 189-196, 2009
5. Iizuka K, Takeda J, Horikawa Y. Glucose induces FGF21 mRNA expression through ChREBP activation in rat hepatocytes. *FEBS Lett.* 583: 2882-2886, 2009

<平成 22 年度>

1. Motohashi K, Toda T, Sue M, Furihata K, Shizuri Y, Matsuo Y, Kasai H, Shin-Ya K, Takagi M, Izumikawa M, Horikawa Y, Seto H. Isolation and structure elucidation of tumescenamides A and B, two peptides produced by *Streptomyces tumescens* YM23-260. *J Antibiot (Tokyo)* 63: 549-552, 2010
2. Horikawa Y, Enya M, Iizuka K, Chen GY, Kawachi SI, Suwa T, and Takeda J. Synergistic Effect of  $\alpha$ -Glucosidase Inhibitors and Dipeptidyl Peptidase 4 Inhibitor

Treatment J Diabetes Invest. 2010 (in press) on-line published.

## 研究開発項目⑤

### 化合物等の探索技術の開発

<平成18年度>

1. Hara C, Tateyama K, Akamatsu N, Imabayashi H, Karaki K, Okano H and Miyawaki A A practical device for delivery of molecules into multiple neurons in culture. *Brain Cell Biology* **35**, 229-237 (2006)
2. Ando R, Flors C, Mizuno H, Hofkens J, Miyawaki A. Highlighted generation of fluorescence signals using simultaneous two-color irradiation on Dronpa mutants. *Biophysical J.* **92**, L97-99 (2007)
3. Yoshizaki, H., Mochizuki, N., Gotoh, Y., and Matsuda, M. Akt-PDK1 Complex Mediates EGF-induced Membrane Protrusion through Ral Activation. *Mol. Biol. Cell* **18**, 119-128 (2007)
4. Tojima T, Akiyama H, Itofusa R, Li Y, Katayama H, Miyawaki A, Kamiguchi H. Attractive axon guidance involves asymmetric membrane transport and exocytosis in the growth cone. *Nat. Neurosci.* **10**, 58-66 (2006)
5. Yamada M, Tanemura K, Okada S, Iwanami A, Nakamura M, Mizuno H, Ozawa M, Ohyama-Goto R, Kitamura N, Kawano M, Tan-Takeuchi K, Ohtsuka C, Miyawaki A, Takashima A, Ogawa M, Toyama Y, Okano H, Kondo T. Electrical stimulation modulates fate determination of differentiating embryonic stem cells. *Stem Cells* **25** (3), 562-570(2006)
6. Hosoi H, Mizuno H, Miyawaki A, Tahara T. Competition between Energy and Proton Transfer in Ultrafast Excited-State Dynamics of an Oligomeric Fluorescent Protein Red Kaede. *J Phys Chem B Condens Matter Mater Surf Interfaces Biophys.* **110**, 22853-22860 (2006)
7. Chan MC, Karasawa S, Mizuno H, Bosanac I, Ho D, Prive GG, Miyawaki A, Ikura M. Structural characterization of a blue chromoprotein and its yellow mutant from the sea anemone *Cnidopus japonicus*. *J. Biol. Chem.* **281**, 37813-37819 (2006)
8. Kazuno AA, Munakata K, Nagai T, Shimozone S, Tanaka M, Yoneda M, Kato N, Miyawaki A, Kato T. Identification of Mitochondrial DNA Polymorphisms That Alter Mitochondrial Matrix pH and Intracellular Calcium Dynamics. *PLoS Genet.* **2**, e128, 1-11. (2006)
9. Dedeker P, Hotta JI, Ando R, Miyawaki A, Engelborghs Y, Hofkens J. Fast and

- Reversible Photoswitching of the Fluorescent Protein Dronpa as Evidenced by Fluorescence Correlation Spectroscopy. *Biophys J* L01-L03. (2006)
10. Habuchi S, Dedecker P, Hotta J, Flors C, Ando R, Mizuno H, Miyawaki A, Hofkens J. Photo-induced protonation/deprotonation in the GFP-like fluorescent protein Dronpa: mechanism responsible for the reversible photoswitching. *Photochem Photobiol. Sci.* **5**, 567-76. (2006)
  11. Matsu-Ura T, Michikawa T, Inoue T, Miyawaki A, Yoshida M, Mikoshiba K. Cytosolic inositol 1,4,5-trisphosphate dynamics during intracellular calcium oscillations in living cells. *J. Cell. Biol.* **173**(5), 755-765 (2006)
  12. Mutoh T, Miyata T, Kashiwagi S, Miyawaki A, Ogawa M. Dynamic behavior of individual cells in developing organotypic brain slices revealed by the photoconvertible protein Kaede. *Exp. Neurol.* **200**, 430-437 (2006)
  13. Shimozone S; Hosoi H; Mizuno H; Fukano T; Tahara T; Miyawaki A. Concatenation of Cyan and Yellow Fluorescent Proteins for Efficient Resonance Energy Transfer. *Biochemistry* **45**, 6267-6271 (2006)
  14. Kogure T, Karasawa S, Araki T, Saito K, Kinjo M, Miyawaki A. A fluorescent variant of a protein from the stony coral *Montipora* facilitates dual-color single-laser fluorescence cross-correlation spectroscopy. *Nature Biotechnology* **24**, 577-581 (2006)
  15. Kiyokawa, E., Hara, S., Nakamura, T., and Matsuda, M. Fluorescence (Forster) resonance energy transfer imaging of oncogene activity in living cells. *Cancer Sci.*, **97**, 8-15. (2006)
  16. Nakamura, T., Kurokawa, K., Kiyokawa, E., and Matsuda, M. Analysis of the spatiotemporal activation of rho GTPases using Raichu probes. *Methods Enzymol.* **406**, 315-332 (2006)
  17. Fujioka, A., Terai, K., Itoh, R. E., Aoki, K., Nakamura, T., Kuroda, S., Nishida, E., and Matsuda, M. Dynamics of the RAS/ERK map kinase cascade as monitored by fluorescence probes. *J. Biol. Chem.* **281**, 8917-8926. (2006)
  18. Kawase, K., Nakamura, T., Takaya, A., Aoki, K., Namikawa, K., Kiyama, H., Inagaki, S., Takemoto, H., Saltiel, A. R., and Matsuda, M. GTP hydrolysis by the Rho family GTPase TC10 promotes exocytic vesicle fusion. *Dev. Cell* **11**, 411-421. (2006)
  19. Yoshizaki, H., Aoki, K., Nakamura, T., and Matsuda, M. Regulation of RalA GTPase by phosphatidylinositol 3-kinase as visualized by FRET probes. *Biochem. Soc. Trans.* **34**, 851-854. (2006)
  20. Rieko Oyama, Hideaki Takashima, Masato Yonezawa, Nobuhide Doi, Etsuko

- Miyamoto-Sato, Masataka Kinjo and Hiroshi Yanagawa. Protein–protein interaction analysis by C-terminally specific fluorescence labeling and fluorescence cross-correlation spectroscopy. *Nucleic Acids Research* **34**, e102 (2006)
21. Changi Pack, Kenta Saito, Mamoru Tamura, and Masataka Kinjo. Microenvironment and effect of energy depletion in the nucleus analyzed by mobility of multiple oligomeric EGFPs. *Biophys J.* **91**, 3921-3936 (2006)
  22. Yu Ohsugi, Kenta Saito, Mamoru Tamura and Masataka Kinjo. Lateral Mobility of Membrane-Binding Proteins in Living Cells Measured by Total Internal Reflection Fluorescence Correlation Spectroscopy. *Biophys J.* **91**, 3456–3464 (2006)
  23. Y. Ohsugi and Masataka Kinjo. Analysis of membrane-binding protein mobility in living cells using total internal reflection fluorescence correlation spectroscopy. *Biophysical Reviews and Letters* **1**, 293-299 (2006)
  24. Hiroki Konno, Tomoe Murakami, Fumihiko Fujii, Fumie Koyama, Hanayo Ueoka-Nakanishi, Chan-Gi Pack, Masataka Kinjo, and Toru Hisabori. The regulator of the F1 motor: Inhibition of rotation of cyanobacterial F1-ATPase by the  $\epsilon$  subunit. *EMBO J.* **25**, 4596 - 4604 (2006)
  25. Akira Kitamura, Hiroshi Kubota, Chan-Gi Pack, Gen Matsumoto, Shoshiro Hirayama, Yasuo Takahashi, Hiroshi Kimura, Masataka Kinjo, Richard I. Morimoto and Kazuhiro Nagata. Cytosolic chaperonin prevents polyglutamine toxicity with altering the aggregation state *Nature Cell Biology* **8** (10):1163-1169 (2006)
  26. Shigeko Kawai-Noma Satoru Ayano, Chan-Gi Pack, Masataka Kinjo, Masasuke Yoshida, Kenji Yasuda and Hideki Taguchi. Dynamics of yeast prion aggregates in single living cells. *Genes to Cells* **11**, 1085–1096 (2006)
  27. Jin T, Fujii F, Yamada E, Yoshinobu Nodasaka and Masataka Kinjo. Control of the optical properties of quantum dots by surface coating with calix[n]arene carboxylic acids. *J. American Chemical. Society* **128** (29): 9288-9289 (2006)
  28. Yasutomo Nomura, Hirobumi Fuchigami, Hiroaki Kii, Zhonggang Feng, Takao Nakamura and Masataka Kinjo. Direct quantification of gene expression using fluorescence correlation spectroscopy. *Current Pharmaceutical Biotechnology.* (2006) in press
  29. Hideki Muto, Issei Nagao, Taku Demura, Hiroo Fukuda, Masataka Kinjo, and Kotaro T. Yamamoto. Fluorescence cross-correlation analyses of molecular interaction between an Aux/IAA protein, MSG2/IAA19, and protein-protein interaction domains of auxin response factors of Arabidopsis expressed in HeLa cells. *Plant Cell Physiol.* **47**, 1095-1101 (2006)

30. Yasutomo Nomura, Hirobumi Fuchigami, Hiroaki Kii, Zhonggang Feng, Takao Nakamura and Masataka Kinjo. Quantification of size distribution of restriction fragments in mitochondrial genome using fluorescence correlation spectroscopy. *Experimental and Molecular Pathology* **80**, 275-278 (2006)
31. Yasutomo Nomura, Hirobumi Fuchigami, Hiroaki Kii, Zhonggang Feng, Takao Nakamura and Masataka Kinjo. Detection of oxidative stress-induced mitochondrial DNA damage using fluorescence correlation spectroscopy. *Analytical Biochemistry* **350**, 196-201 (2006)
32. Hiroaki Kii, Takuya Takagi, Akira Sasaki, Takaharu Okajima, and Masataka Kinjo. DNA Microstructure Based on Self-Assembly of 4-Sticky-End Holiday Junctions in Aqueous Solution. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* **7**, 726-729 (2007)
33. Fukuda, T. and Ohya, Y. Recruitment of RecA homologs Dmc1p and Rad51p to the double-strand break repair site initiated by meiosis-specific endonuclease VDE (PI-SceI). *Mol. Genet. Genomics* **275**, 204-214 (2006)
34. Suzuki, G., Sawai, H., Ohtani, M., Nogami, S., Sano-Kumagai, F., Saka, A., Yukawa, M., Saito, TL., Sese, J., Hirata, D., Morishita, S., Ohya, Y. Evaluation of image processing programs for accurate measurement of budding and fission yeast morphology. *Curr. Genet.* **49**, 237-247 (2006)
35. Fukuda T, Ohta K, Ohya Y. Investigation of the mechanism of meiotic DNA cleavage by VMA1-derived endonuclease uncovers a meiotic alteration in chromatin structure around the target site. *Eukaryot. Cell* **5**, 981-990 (2006)
36. Matsuyama, A., Arai, R., Yashiroda, Y., Shirai, A., Kamata, A., Sekido, S., Kobayashi, Y., Hashimoto, A., Hamamoto, M., Hiraoka, Y., Horinouchi, S., and Yoshida, M. ORFeome cloning and global analysis of protein localization in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Nat. Biotech.* **24**, 841-845 (2006)
37. Yoshida S, Kono K, Lowery DM, Bartolini S, Yaffe MB, Ohya Y, Pellman D. Polo-like kinase Cdc5 controls the local activation of Rho1 to promote cytokinesis. *Science* **313**, 108-111 (2006)
38. Parsons AB, Lopez A, Givoni IE, Williams DE, Gray CA, Porter J, Chua G, Sopko R, Brost RL, Ho CH, Wang J, Ketela T, Brenner C, Brill JA, Fernandez GE, Lorenz TC, Payne GS, Ishihara S, Ohya Y, Andrews B, Hughes TR, Frey BJ, Graham TR, Andersen RJ, Boone C. Exploring the mode-of-action of bioactive compounds by chemical-genetic profiling in yeast. *Cell* **126**, 611-625. (2006)
39. Nakai, R., Ishida, H., Asai, A., Ogawa, H., Yamamoto, Y., Kawasaki, K., Akinaga, S., Mizukami, T., and Yamashita, Y. Novel telomerase inhibitors identified by a forward chemical genetics approach using a yeast strain with shortened telomere

- length. *Chem. Biol.* **13**, 183-190 (2006)
40. Ishihara S, Hirata A, Nogami S, Beauvais A, Latge JP, Ohya Y. Homologous subunits of yeast 1,3-beta-glucan synthase are important for spore wall assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot. Cell* **6**, 143-156 (2007)
  41. Peyre, J-B., Seabrooke, S., Randlett, O., Kisiel, M., Aigaki, T., Stewart, B.A. Interaction of cytoskeleton genes with *Drosophila NSF2* neuromuscular junction overgrowth. *Genesis* **44**, 595-600 (2006)
  42. Vिलлелла, А., Peyre, J-B., Aigaki T. and Hall, JC Defective transfer of seminal-fluid materials during matings of semi-fertile *fruitless* mutants in *Drosophila*. *J Comp Physiol A: Neuroethol Sens, Neural Behav Physiol.* **192**, 1253-1269. (2006)
  43. Oshima, K., Takeda, M., Kuranaga, E., Ueda, R., Aigaki, T., Miura, M. and Hayashi, S. IKKe regulates F-actin assembly and interacts with *Drosophila* IAP1 in cellular morphogenesis. *Curr. Biol.* **16**, 1531-1537(2006)
  44. Takeo, S., Tsuda, M., Akahori, S., Matsuo, T. and Aigaki, T. The calcineurin regulator Sra plays an essential role in female meiosis in *Drosophila*. *Curr. Biol.* **16**, 1435-1440 (2006)
  45. Tsuda, L., Kaido, M., Lim, Y.M., Kato, K., Aigaki, T., and Hayashi, S. An NRSF/REST-like repressor under negative control of Su(H)/SMRTER/Ebi repressor complex regulates eye development in *Drosophila*. *EMBO J.* **25**, 3191-3202 (2006)
  46. Tsuda, M., Seong K.-H. and Aigaki, T. POSH, a scaffold protein for JNK signaling, binds to ALG-2 and ALIX in *Drosophila*. *FEBS lett.* **580**, 3296-300 (2006)
  47. Zhang, D., Zhou, W., Yin, C., Chen, W., Ozawa, R., Ang, L.H., Anandan, L., Aigaki, T. and Hing, H. Misexpression screen for genes altering the olfactory map in *Drosophila*. *Genesis* **44**, 189-201 (2006)
  48. Hozumi, S., Maeda, R., Taniguchi, K., Kanai, M., Shirakabe, S., Sasamura, T., Speder, P., Noselli, S., Aigaki, T., Murakami, R. and Matsuno, K. An unconventional myosin in *Drosophila* reverses the default handedness in visceral organs. *Nature* **440**, 798-802 (2006)
  49. H. Tahara, K. Shin-ya, H. Seimiya, H. Yamada, T. Tsuruo and T. Ide. G-Quadruplex stabilization by telomestatin induces TRF2 protein dissociation from telomeres and anaphase bridge formation accompanied by loss of the 3' telomeric overhang in cancer cells. *Oncogene* **25**, 1955-1966 (2006)
  50. Y. Hayakawa, K. Sasaki, H. Adachi, K. Furihata, K. Nagai and K. Shin-ya. Thioviridamide, a novel apoptosis inducer in transformed cells from *Streptomyces olivoviridis*. *J. Antibiot.* **59**, 1-5 (2006)
  51. Hayakawa, K. Sasaki, K. Nagai, K. Shin-ya and K. Furihata. Structure of

- thioviridamide, a novel apoptosis inducer from *Streptomyces olivoviridis*. *J. Antibiot.* **59**, 6-10 (2006)
52. T. Doi, Y. Iijima, K. Shin-ya, A. Ganesan and T. Takahashi. A total synthesis of spiruchostatin A. *Tetrahedron Lett.* **47**, 1177-1180 (2006)
  53. L. Zhang, K. Tamura, K. Shin-ya and H. Takahashi. The telomerase inhibitor telomestatin induces telomere shortening and cell death in *Arabidopsis*. *Biochim. Biophys. Acta* **1763**, 39-44 (2006)
  54. I.-Ja Ryoo, H.-R. Park, S.-J. Choo, J.-H. Hwang, Y.-M. Park, K.-H. Bae, K. Shin-ya and I.-D. Yoo. Selective cytotoxic activity of valinomycin against HT-29 human colon carcinoma cells *via* down-regulation of GRP78. *Biol. Pharm. Bull.* **29**, 817-820 (2006)
  55. T. Doi, M. Yoshida, K. Shin-ya and T. Takahashi. Total synthesis of (*R*)-telomestatin. *Organic Lett.* **8**, 4165-4167 (2006)
  56. T. Tauchi, K. Shin-ya, G. Sashida, M. Sumi, S. Okabe, J. H. Ohyashiki and K. Ohyashiki. Telomerase inhibition with a novel G-quadruplex-interactive agent, telomestatin: *in vitro* and *in vivo* studies in acute leukemia. *Oncogene* **25**, 5719-5725 (2006)
  57. M. Tera, Y. Sohtome, H. Ishizuka, T. Doi, M. Takagi, K. Shin-ya and K. Nagasawa. Design and synthesis of telomestatin derivatives and their inhibitory activity of telomerase. *Heterocycles* **69**, 505-514 (2006)
  58. D. Gomez, M.-F. O'Donohue, T. Wenner, C. Douarre, J. Macadré, P. Koebel, M.-J. Giraud-Panis, H. Kaplan, A. Kolkes, K. Shin-ya, and J.-F. Riou. The G-quadruplex ligand telomestatin inhibits POT1 binding to telomeric sequences *in vitro* and induces GFP-POT1 dissociation from telomeres in human cells. *Cancer Res.* **66**, 6908-6912 (2006)
  59. D. Gomez, T. Wenner, B. Brassart, C. Douarre, M.-F. O'Donohue, V. El Khoury, K. Shin-ya, H. Morjani, C. Trentesaux and J.-F. Riou. Telomestatin induced telomere uncapping is modulated by POT1 through G-overhang extension in HT1080 human tumor cells. *J. Biol. Chem.* **281**, 38721-38729 (2006)
  60. K. Maeshima, K. Yahata, Y. Sasaki, R. Nakatomi, T. Tachibana, T. Hashikawa, F. Imamoto, N. Imamoto. Cell-cycle-dependent dynamics of nuclear pores: pore-free islands and lamins. *J. Cell Sci.* **119**, 4442-4451 (2006)

<平成19年度>

1. Kawano H, Kogure T, Abe Y, Mizuno H, Miyawaki A. Two-photon dual-color imaging using fluorescent proteins. *Nat Methods.* **5**(5), 373-374 (2008)



2. Shimozono S, Miyawaki A. A.Engineering FRET Constructs Using CFP and YFP. *Methods Cell Biol.* **85C**, 381-393 (2008)
3. Truong K, Sawano A, Miyawaki A, Ikura M. Calcium indicators based on calmodulin-fluorescent protein fusions. *Methods Mol Biol.*, 352: 71-82.(2007)
4. Fumihiko Fujii and Masataka, Kinjo. Detection of antigen protein using fluorescence cross-correlation spectroscopy and quantum-dots labeled antibody. *ChemBioChem.* **8** (18), 2199-2203 (2007)
5. Fujii F, Horiuchi M, Ueno M, Sakata H, Nagao I, Tamura M, Kinjo M. Detection of prion protein immune complex for bovine spongiform encephalopathy diagnosis using fluorescence correlation spectroscopy and fluorescence cross-correlation spectroscopy. *Anal. Biochem.* **370**, 131-141 (2007)
6. Takahashi Y, Okamoto Y, Popiel HA, Fujikake N, Toda T, Kinjo M, Nagai Y. Detection of polyglutamine protein oligomers in cells by fluorescence correlation spectroscopy. *J. Biol. Chem.* **282**, 24039-24048 (2007)
7. Kabayama K, Sato T, Saito K, Loberto N, Prinetti A, Sonnino S, Kinjo M, Igarashi Y, Inokuchi J. Dissociation of the insulin receptor and caveolin-1 complex by ganglioside GM3 in the state of insulin resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **104** (34), 13678-13683 (2007)
8. Masafumi Shimizu, Satoshi Sasaki and Masataka Kinjo. Triplet Fraction Buildup Effect of the DNA-YOYO Complex Studied with Fluorescence Correlation Spectroscopy. *Analytical Biochem.* **336** (1), 87-92 (2007)
9. Yoichi Araki, Takanori Kawano, Hidenori Taru, Yuhki Saito, Sachiyo Wada, Kanako Miyamoto, Hisako Kobayashi, Hiroyuki O. Ishikawa, Yu Ohsugi, Tohru Yamamoto, Kenji Matsuno, Masataka Kinjo, and Toshiharu Suzuki. The novel cargo Alcadein induces vesicle association of kinesin-1 motor components and activates axonal transport. *EMBO J.* **26**, 1475–1486 (2007)
10. Shintaro Mikuni, Changi Pack, Mamoru Tamura and Masataka Kinjo. Diffusion analysis of glucocorticoid receptor and antagonist effect in living cell nucleus. *Experimental and Molecular Patholog,* **82** (2), 163-168 (2007)
11. Shintaro Mikuni, Mamoru Tamura and Masataka Kinjo. Analysis of intranuclear binding process of glucocorticoid receptor using fluorescence correlation spectroscopy. *FEBS Letters* **581**, 389-393 (2007)
12. Aoki Y, Nagao I, Saito D, Ebe Y, Kinjo M, Tanaka M. Temporal and spatial localization of three germline-specific proteins in medaka. *Dev. Dyn.* **237** (3), 800-807 (2008)
13. Nagao I, Aoki Y, Tanaka M, Kinjo M. Analysis of the molecular dynamics of medaka

- nuage proteins by fluorescence correlation spectroscopy and fluorescence recovery after photobleaching. *FEBS J.* **275** (2), 341-349 (2008)
14. Nagaya H, Tamura T, Higa-Nishiyama A, Ohashi K, Takeuchi M, Hashimoto H, Hatsuzawa K, Kinjo M, Okada T, Wada I. Regulated motion of glycoproteins revealed by direct visualization of a single cargo in the endoplasmic reticulum. *J. Cell. Biol.* **180**(1), 129-43 (2008)
  15. Kikuchi Y, Mizuuchi E, Nogami S, Morishita S, and Ohya Y. Involvement of small GTPase Rho1p in cell size control in yeast. *FEMS Yeast Res.* **7**, 569-578 (2007)
  16. Nogami S, Ohya Y, Yvert G. Genetic complexity and QTL mapping of yeast morphological traits. *PLOS Genet.* **23**, e31 (2007)
  17. Ohnuki S, Nogami S, Kanai H, Hirata D, Nakatani Y, Morishita S, Ohya Y. Diversity of Ca<sup>2+</sup>-induced morphology revealed by morphological phenotyping of Ca<sup>2+</sup>-sensitive mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot. Cell* **6**, 817-830. (2007)
  18. Fukuda T, Ohya Y, Ohta K. Conditional genomic rearrangement by designed meiotic recombination using VDE (PI-SceI) in yeast. *Mol. Genet. Genomics* **278**, 467-478 (2007)
  19. Shindo M, Wada H, Kaido M, Tateno M, Aigaki T, Tsuda L, Hayashi S. Dual function of Src in the maintenance of adherens junctions during tracheal epithelial morphogenesis. *Development* **135**, 1355-1364 (2008)
  20. Yao, Y., Wu, Y., Yin, C., Ozawa, R., Aigaki, T., Wouda, R.R., Noordermeer, J.N., Fradkin, L.G., Hing, H. Antagonistic roles of Wnt5 and the Drl receptor in patterning the *Drosophila* antennal lobe. *Nat Neurosci.* **10**, 1423-1432 (2007)
  21. Taniguchi K, Hozumi S, Maeda R, Ooike M, Sasamura T, Aigaki T, Matsuno K. D-JNK signaling in visceral muscle cells controls the laterality of the *Drosophila* gut. *Dev Biol.* **311**, 251-263 (2007)
  22. Tsuda M, Sugiura T, Ishii T, Ishii N, Aigaki T. A mev-1-like dominant-negative SdhC increases oxidative stress and reduces lifespan in *Drosophila*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **363**, 342-346. (2007)
  23. Sakurai T, K., Kojima, T., Aigaki, T., Hayashi, S. Differential control of cell affinity required for progression and refinement of cell boundary during *Drosophila* leg segmentation, *Dev. Biol.* **309**, 126-136 (2007)
  24. Matsuo, T., Sugaya, S., Yasukawa, J., Aigaki, T., Fuyama, Y. Odorant-Binding Proteins OBP57d and OBP57e Affect Taste Perception and Host-Plant Preference in *Drosophila sechellia*. *PLoS Biol.* **5**, e118 (2007)
  25. Sasamura, T., Ishikawa, H.O., Sasaki, N., Higashi, S., Kanai, M., Nakao, S.,

- Ayukawa, T., Aigaki, T., Noda, K., Miyoshi, E., Taniguchi, N., Matsuno, K. The O-fucosyltransferase O-fut1 is an extracellular component that is essential for the constitutive endocytic trafficking of Notch in *Drosophila*. *Development* **134**, 1347-1356 (2007)
26. Umeda-Kameyama, Y., Tsuda, M., Ohkura, C., Matsuo, T., Namba, Y., Ohuchi, Y. and Aigaki, T. Thioredoxin suppresses Parkin-associated Endothelin Receptor-like Recepto-induced neurotoxicity and extends longevity in *Drosophila*. *J. Biol. Chem.* **282**, 11180-11187 (2007)
27. Shima, S., Aigaki, T., Nojima, T. and Yamamoto, D. Identification of *trf2* mutants of *Drosophila* with defects in anterior spiracle eversion. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **64**, 157-163(2007)
28. Hideki Ukai, Tetsuya J. Kobayashi Mamoru Nagano, Koh-hei Masumoto Mitsugu Sujino, Takao Kondo, Kazuhiro Yagita, Yasufumi Shigeyoshi and Hiroki R. Ueda\* “Melanopsin-dependent photo-perturbation reveals desynchronization underlying the singularity of mammalian circadian clocks. *Nature Cell Biology* **9**, 1327-1334 (2007)
29. H.-R. Park, I.-J. Ryoo, S.-J. Choo, J.-H. Hwang, J.-Y. Kim, M.-R. Cha, K. Shin-ya and I.-D.g Yoo. Glucose-deprived HT-29 human colon carcinoma cells are sensitive to verrucosidin as a GRP78 down-regulator. *Toxicology* **229**, 253-261 (2007)
30. A. Cheng, K. Shin-ya, R. Wan, S.-C. Tang, T. Miura, H. Tang, R. Khatri, M. Gleichman, X. Ouyang, D. Liu, H.-R. Park, J. Y. Chiang and M. P. Mattson. Telomere protection mechanisms change during neurogenesis and neuronal maturation: newly generated neurons are hypersensitive to telomere and DNA damage. *J. Neurosci.* **27** (14), 3722-3733 (2007)
31. H.-R. Park, S. Chijiwa, K. Furihata, Y. Hayakawa and K. Shin-ya. Relative and absolute configuration of versipelostatin, a down-regulator of molecular chaperone GRP78 expression. *Org. Lett.* **9** (8), 1457-1460 (2007)
32. Y. Matsuo, K. Kanoh, T. Yamori, H. Kasai, A. Katsuta, K. Adachi, K. Shin-ya and Y. Shizuri. Urukthapelstatin A, a novel cytotoxic substance from Marine-derived *Mechercharimyces asporophorigenens* YM11-542. I. Fermentation, Isolation and Biological Activities. *J. Antibiot.* **60**(4), 251-255 (2007)
33. J. Ueda, J. Hashimoto, A. Nagai, T. Nakashima, H. Komaki, K. Anzai, S. Harayama, T. Doi, T. Takahashi, K. Nagasawa, T. Natsume, M. Takagi and K. Shin-ya. New aureothin derivative, alloaureothin, from *Streptomyces* sp. MM23. *J. Antibiot.* **60**(5), 321-324 (2007)
34. J. Ueda, T. Togashi, S. Matsukura, A. Nagai, T. Nakashima, H. Komaki, K. Anzai, S.

- Harayama, T. Doi, T. Takahashi, T. Natsume, Y. Kisu, N. Goshima, N. Nomura, M. Takagi and K. Shin-ya. A novel nuclear export inhibitor JBIR-02, a piericidin derivative from *Streptomyces* sp. ML55. *J. Antibiot.* **60** (7), 459-462 (2007)
35. Y. Umeda, K. Furihata, S. Sakuda, H. Nagasawa, K. Ishigami, H. Watanabe M. Izumikawa, M. Takagi, T. Doi, Y. Nakao and K. Shin-ya. Absolute Structure of Prunustatin A, a Novel GRP78 Molecular Chaperone Down-Regulator. *Org. Lett.* **9** (21), 4239-4242 (2007)
36. P. S. Shirude, E. R. Gillies, S. Ladame, F. Godde, K. Shin-ya, I. Huc and S. Balasubramanian. Macrocyclic and helical oligoamides as a new class of G-quadruplex ligands. *J. Am. Chem. Soc.* **129** (39), 11890-11891 (2007)
37. M. Izumikawa, J. Ueda, S. Chijiwa, M. Takagi and K. Shin-ya. Novel GRP78 molecular chaperone expression down-regulators JBIR-04 and -05 isolated from *Streptomyces violaceoniger*. *J. Antibiot.* **60** (10), 640-644 (2007)
38. M. Ogata, J. Ueda, M. Hoshi, J. Hashimoto, T. Nakashima, K. Anzai, M. Takagi and K. Shin-ya. A Novel Indole-diterpenoid, JBIR-03 with Anti-MRSA Activity from *Dichotomomyces cejpaii* var. *cejpaii* NBRC 103559. *J. Antibiot.* **60**(10), 645-648 (2007)
39. T. Mori, T. Yamashita, K. Furihata, K. Nagai, K. Suzuki, Y. Hayakawa and K. Shin-ya. Burkholone, a new cytotoxic antibiotic against IGF-I dependent cells from *Burkholderia* sp. *J. Antibiot.* **60**(11), 713-716 (2007)
40. A. D. Cian, G. Cristofari, P. Reichenbach, E. D. Lemos, D. Monchaud, M.-P. Teulade-Fichou, K. Shin-ya, L. Lacroix, J. Lingner and J.-L. Mergny. Reevaluation of telomerase inhibition by quadruplex ligands and their mechanisms of action. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **104**(44), 17347-17352 (2007)
41. T. Funakoshi, K. Maeshima, K. Yahata, S. Sugano, F. Imamoto, N. Imamoto. Two distinct human POM121 genes: requirement for the formation of nuclear pore complexes. *FEBS Lett.* **581**(25), 4910-4916 (2007)
42. K. Yahata, K. Maeshima, T. Sone, T. Ando, M. Okabe, N. Imamoto, F. Imamoto. cHS4 insulator-mediated alleviation of promoter interference during cell-based expression of tandemly associated transgenes. *J. Mol. Biol.* **374**(3), 580-590 (2007)
43. K. S. Wendt, K. Yoshida, T. Itoh, M. Bando, B. Koch, E. Schirghuber, S. Tsutsumi, G. Nagae, K. Ishihara, T. Mishiro, K. Yahata, F. Imamoto, H. Aburatani, M. Nakao, N. Imamoto, K. Maeshima, K. Shirahige, J. M. Peters. Cohesin mediates transcriptional insulation by CCCTC-binding factor. *Nature* **451**(7180), 796-801 (2008)
44. K. Tahara, M. Takagi, M. Ohsugi, T. Sone, F. Nishiumi, K. Maeshima, Y. Horiuchi, N. Tokai-Nishizumi, F. Imamoto, T. Yamamoto, S. Kose, N. Imamoto. Importin-beta

and the small guanosine triphosphatase Ran mediate chromosome loading of the human chromokinesin Kid. *J. Cell Biol.* **180**(3), 493-506 (2008)

<平成20年度>

1. Kono K, Nogami S, Abe M, Nishizawa M, Morishita S, Pellman D, Ohya Y. G1/S Cyclin-Dependent Kinase Regulates Small GTPase Rho1p through Phosphorylation of RhoGEF Tus1p in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* **19**, 1763-1771 (2008)
2. J.-H. Hwang, J.-Y. Kim, M.-R. Cha, I.-J. Ryoo, S.-J. Choo, S.-M. Cho, Y. Tsukumo, A. Tomida, K. Shin-ya, Y.-I. Hwang, I.-D. Yoo, and H.-R. Park. Etoposide-resistant HT-29 human colon carcinoma cells during glucose deprivation are sensitive to piericidin A, a GRP78 down-regulator. *J. Cell. Physiol.* **215** (1), 243-250 (2008)
3. J. Ueda, A. Nagai, M. Izumikawa, S. Chijiwa, M. Takagi and Kazuo Shin-ya. A novel antimycin-like compound, JBIR-06, from *Streptomyces* sp. ML55. *J. Antibiot.* **61** (4), 241-244 (2008)
4. Y. Wu, K. Shin-ya and R. M. Brosh, Jr. FANCD1 helicase defective in Fanconi anemia and breast cancer unwinds G-quadruplex DNA to defend genomic stability. *Mol. Cell Biol.* **28** (12), 4116-4128 (2008)
5. M. Tera, H. Ishizuka, M. Takagi, M. Suganuma, K. Shin-ya and K. Nagasawa. Macrocyclic hexaoxazoles as sequence- and mode-selective G-quadruplex binders. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **47**, 5557-5560 (2008).
6. M. Izumikawa, H. Komaki, J. Hashimoto, M. Takagi and K. Shin-ya. Stawamycin analog, JBIR-11 from *Streptomyces viridochromogenes* subsp. *sulfomycini* NBRC13830. *J. Antibiot.*, **61**, 326-329 (2008).
7. S. J. Crabb, M. Howell, H. Rogers, M. Ishfaq, A. Yurek-George, K. Carey, B. M. Pickering, P. East, R. Mitter, S. Maeda, P. W. Johnson, P. Townsend, K. Shin-ya, M. Yoshida, A. Ganesan and Graham Packham. Characterisation of the *in vitro* activity of the depsipeptide histone deacetylase inhibitor spiruchostatin A. *Biochem. Pharmacol.*, **76**, 463-475 (2008).
8. Y. Hayakawa, Y. Hattori, T. Kawasaki, K. Kanoh, K. Adachi, Y. Shizuri and K. Shin-ya. Efrapoptin, a new down-regulator of the molecular chaperone GRP78 from a marine *Tolypocladium* sp. *J. Antibiot.*, **61**, 365-371 (2008).
9. Y. Numajiri, T. Takahashi, M. Takagi, K. Shin-ya and T. Doi. Total synthesis of largazole and its biological evaluation. *Synlett*, 2483-2486 (2008).
10. J. Ueda, S. Chijiwa, M. Takagi and K. Shin-ya. A novel versipelostatin analogue, versipelostatin F isolated from *Streptomyces versipellis* 4083-SVS6. *J. Antibiot.*, **61**,

752-755 (2008).

11. M. Izumikawa, H. Ukai, M. Takagi, H. R. Ueda and K. Shin-ya. JBIR-26, a novel natural compound from *Streptomyces* sp. AK-AH76, regulates mammalian circadian clock. *J. Antibiot.*, **61**, 756-758 (2008).
12. N. Arnoult, K. Shin-ya and J.-A. Londoño-Vallejo. Studying telomere replication by Q-CO-FISH: the effect of telomestatin, a potent G-quadruplex ligand. *Cytogenet. Genome Res.*, **122**, 229-236 (2008).

<平成 21 年度>

1. R. Bétous, L. Rey, G. Wang, M.-J. Pillaire, N. Puget, J. Selves, D. S. Biard, K. Shin-ya, K. M. Vasquez, C. Cazaux, J.-S. Hoffmann. Role of TLS DNA polymerases eta and kappa in processing naturally occurring structured DNA in human cells. *Mol. Carcinog.*, **48**, 369-378 (2009).
2. J. Matsuo, Y. Tsukumo, J. Sakurai, S. Tsukahara, H.-R. Park, K. Shin-ya, T. Watanabe, T. Tsuruo and A. Tomida. Preventing the unfolded protein response via aberrant activation of 4E-binding protein 1 by versipelostatatin. *Cancer Sci.*, **100**, 327-333 (2009).
3. K. Motohashi, J.-H. Hwang, M. Takagi and K. Shin-ya. JBIR-23 and -24, novel anticancer agents from *Streptomyces* sp. AK-AB27. *Org. Lett.*, **11**, 285-288 (2009).
4. M. Tera, K. Iida, H. Ishizuka, M. Takagi, M. Suganuma, T. Doi, K. Shin-ya and K. Nagasawa. Synthesis of a potent G-quadruplex-binding macrocyclic heptaioxazole. *ChemBioChem*, **10**, 431-435 (2009).
5. H. Komaki, M. Izumikawa, J. Ueda, T. Nakashima, S. T. Khan, M. Takagi and K. Shin-ya. Discover a pimaricin analog JBIR-13, from *Streptomyces bicolor* NBRC 12746 as predicted by sequence analysis of type I polyketide synthase gene. *Appl. Microbiol. and Biotechnol.*, **83**, 127-133 (2009).
6. Kozone, J. Ueda, M. Watanabe, S. Nogami, A. Nagai, S. Inaba, Y. Ohya, M. Takagi and K. Shin-ya. Novel 24-membered macrolides, JBIR-19 and -20 isolated from *Metarhizium* sp. fE61. *J. Antibiot.*, **62**, 159-162 (2009).
7. R. Murakami, J. Shinozaki, T. Kajiura, I. Kozone, M. Takagi, K. Shin-ya, H. Seto and Y. Hayakawa. Ammocidins B, C and D, new cytotoxic 20-membered macrolides from *Saccharothrix* sp. AJ9571. *J. Antibiot.*, **62**, 123-127 (2009).
8. R. Ueoka, A. Ito, M. Izumikawa, S. Maeda, M. Takagi, K. Shin-ya, M. Yoshida, R. W. M. van Soest and S. Matsunaga. Isolation of azaspiracid-2 from a marine sponge *Echinoclathria* sp. as a potent cytotoxin. *Toxicon*, **53**, 680-684 (2009).
9. M. Izumikawa, A. Nagai, T. Doi, M. Takagi and K. Shin-ya. JBIR-12, a novel

- antioxidative agent from *Penicillium* sp. NBRC 103941. *J. Antibiot.*, **62**, 177-180 (2009).
10. P. Zhao, J. Ueda, I. Kozone, S. Chijiwa, M. Takagi, F. Kudo, M. Nishiyama, K. Shin-ya and T.a Kuzuyama. New glycosylated derivatives of versipelostatin, the GRP78/Bip molecular chaperone down-regulator, from *Streptomyces versipellis* 4083-SVS6. *Org. Biomol. Chem.*, **7**, 1454-1460 (2009).
  11. Ueda, M. Takagi and K. Shin-ya. Two novel decanedieneamide derivatives, JBIR-07 and -08 from *Streptomyces versipellis* 4083-SVS6. *Nat. Prod. Res.*, **23**, 1337-1341 (2009).
  12. H. Tanaka, A. Yoshizawa, S. Chijiwa, M. Takagi, K. Shin-ya and T. Takahashi. Efficient synthesis of deoxysugar part of versipelostatin via direct and stereoselective glycosidation. *Chem. Asian J.*, **4**, 1114-1125 (2009).
  13. Y. Iijima, A. Munakata, K. Shin-ya, A. Ganesan, T. Doi and T. Takahashi. A solid-phase total synthesis of the cyclic depsipeptide HDAC inhibitor spiruchostatin A. *Tetrahedron Lett.*, **50**, 2970-2972 (2009).
  14. Motohashi, J. Hashimoto, S. Inaba, S. T. Khan, H. Komaki, A. Nagai, M. Takagi and K. Shin-ya. Novel sesquiterpenoids, JBIR-27 and -28 isolated from tunicate-derived fungus, *Penicillium* sp. SS080624SCf1. *J. Antibiot.*, **62**, 247-250 (2009).
  15. J. Ueda, J.-H. Hwang, T. Kato, A. Ochiai, K. Isshiki, M. Takagi and K. Shin-ya. JBIR-17, a novel trichostatin analogue from *Streptomyces* sp. 26634. *J. Antibiot.*, **62**, 283-285 (2009).
  16. S. Saito, A. Furuno, J. Sakurai, A. Sakamoto, H.-R. Park, K. Shin-ya, T. Tsuruo and A. Tomida. Chemical genomics identifies the unfolded protein response as a target for selective cancer cell killing during glucose deprivation. *Cancer Res.*, **69**, 4225-4234 (2009).
  17. T. Fujiwara, J.-H. Hwang, Akihiko Kanamoto, H. Nagai, M. Takagi and K. Shin-ya. JBIR-44, a new bromotyrosine compound from a marine sponge *Psammaphysilla purpurea*. *J. Antibiot.*, **62**, 393-395 (2009).
  18. S. T. Khan, S. Harayama, T. Tamura, Katsuhiko Ando, M. Takagi and K. Shin-ya. *Paraoerskovia marina* gen. nov., sp. nov., an actinobacterium isolated from marine sediment. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **59**, 2094-2098 (2009).
  19. J. Hashimoto, Taku Watanabe, Tatsuya Seki, Satoshi Karasawa, M. Izumikawa, Shun-ichiro Iemura, T. Natsume, N. Nomura, N. Goshima, Atushi Miyawaki, Tomoki Takagi and K. Shin-ya. Novel *in vitro* protein fragment complementation assay applicable to high-throughput screening in a 1536-well format. *Journal of*

- Biomol(ecular). Screen(ing).*, **14** (8), 970-979 (2009).
20. Motohashi, S. Inaba, M. Takagi and K. Shin-ya. JBIR-15, a new aspochracin derivative, isolated from a sponge-derived fungus, *Aspergillus sclerotiorum* Huber Sp080903f04. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **73** (8), 1898-1900 (2009).
  21. Kozone, J. Ueda, M. Takagi and K. Shin-ya. JBIR-52, a novel antimycin-like compound, from *Streptomyces* sp. ML55. *J. Antibiot.*, **62** (10), 593-595 (2009).
  22. A. Mukai, H. Komaki, M. Takagi and K. Shin-ya. Novel siderophore, JBIR-16, isolated from *Nocardia tenerifensis* NBRC 101015. *J. Antibiot.*, **62** (10), 601-603 (2009).
  23. Izumikawa, S. T. Khan, H. Komaki, A. Nagai, S. Inaba, M. Takagi and K. Shin-ya. JBIR-37 and -38, novel glycosyl benzenediols, isolated from the sponge-derived fungus, *Acremonium* sp. SpF080624G1f01. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **73** (9), 2138-2140 (2009).
  24. Temime-Smaali, L. Guittat, A. Sidibe, K. Shin-ya, C. Trentesaux, J.-F. Riou. The G-quadruplex ligand telomestatin impairs binding of topoisomerase IIIa to G-quadruplex-forming oligonucleotides and uncaps telomeres in ALT cells. *PLoS One.*, **4** (9), e6919 (2009).
  25. Iida, M., Tera, T. Hirokawa, K. Shin-ya and K. Nagasawa. G-Quadruplex recognition by macrocyclic hexaoxazole (GOTD) dimer: greater selectivity than monomer. *Chem. Commun.*, **42**, 6481-6483 (2009).
  26. Hashimoto, K. Motohashi, K. Sakamoto, S. Hashimoto, M. Yamanouchi, H. Tanaka, T. Takahashi, M. Takagi and K. Shin-ya. Screening and evaluation of new inhibitors of hepatic glucose production. *J. Antibiot.*, **62**, 625-629 (2009).
  27. S. Kishi, K. Shimoke, Y. Nakatani, T. Shimada, N. Okumura, K. Nagai, K. Shin-ya and T. Ikeuchi. Nerve growth factor attenuates 2-deoxy-D-glucose-triggered endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis via enhanced expression of GRP78. *Neurosci. Res.*, **66**, 14-21 (2010).
  28. A. Mukai, A. Nagai, S. Inaba, M. Takagi and K. Shin-ya. JBIR-54, new 4-pyridinone derivative, isolated from *Penicillium daleae* Zaleski fE50. *J. Antibiot.*, **62**, 705-706 (2009).
  29. Motohashi, M. Takagi and K. Shin-ya. JBIR-25, a novel antioxidative agent from *Hyphomycetes* sp. CR28109. *J. Antibiot.*, **62** (12), 703-704 (2009).
  30. S. Arnaudeau, P. Arboi, P. Bischof, K. Shin-ya, A. Tomida, T. Tsuruo, O. Irion and M. Cohen. Glucose-regulated protein 78: A new partner of p53 in trophoblast. *Proteomics*, **9**, 5316-5327 (2009).
  31. J. Ueda, M. Takagi and K. Shin-ya. Aminocaprophenone- and pyrrolidine-type



alkaloids from the leaves of *Ficus septica*. *J. Nat. Prod.*, **72**, 2181-2183 (2009).

<平成 22 年度>

1. T. Shalaby, A. O. von Bueren, M.-L. Hürlimann, G. Fiaschetti, D. Castelletti, M. Tera, K. Nagasawa, A. Arcaro, I. Jelesarov, K. Shin-ya and M. Grotzer. Disabling c-myc in childhood medulloblastoma and atypical teratoid/rhabdoid tumor cells by the potent G-quadruplex interactive agent S2T1-6OTD. *Mol. Cancer Ther.*, **9**, 167-179 (2010).
2. S. T. Khan, T. Tamura, M. Takagi and K. Shin-ya. *Streptomyces tateyamensis* sp. nov., *Streptomyces marinus* sp. nov. and *Streptomyces haliclona* sp. nov., three novel species of *Streptomyces* isolated from marine sponge *Haliclona* sp. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **60** (Pt 12), 2775-2779 (2010).
3. Izumikawa, S. T. Khan, H. Komaki, M. Takagi and K. Shin-ya. JBIR-31, a new teleocidin analog, produced by salt-requiring *Streptomyces* sp. NBRC 105896 isolated from a marine sponge. *J. Antibiot.*, **63**, 33-36 (2010).
4. Izumikawa, S. T. Khan, M. Takagi and K. Shin-ya. Sponge-derived *Streptomyces* producing isoprenoids via the mevalonate pathway. *J. Nat. Prod.*, **73**, 208-212 (2010).
5. K. Motohashi, M. Takagi and K. Shin-ya. Tetrapeptides possessing a unique skeleton, JBIR-34 and JBIR-35, isolated from a sponge-derived actinomycete, *Streptomyces* sp. Sp080513GE-23. *J. Nat. Prod.*, **73**, 226-228 (2010).
6. T. Fujiwara, A. Nagai, M. Takagi and K. Shin-ya. JBIR-69, a new peptide metabolite from *Streptomyces* sp. OG05. *J. Antibiot.*, **63**, 95-96 (2010).
7. S. T. Khan, M. Izumikawa, K. Motohashi, A. Mukai, M. Takagi and K. Shin-ya. Distribution of the 3-hydroxyl-3-methylglutaryl coenzyme A reductase gene and isoprenoid production in marine-derived actinobacteria. *FEMS Microbiol. Lett.*, **304** (1), 89-96 (2010).
8. J. Ueda, M. Takagi and K. Shin-ya. JBIR-14, a highly oxygenated ergostane, from *Isaria* sp. NBRC 104353. *J. Antibiot.*, **63**, 139-141 (2010).
9. H. Tanaka, A. Yoshizawa, S. Chijiwa, M. Takagi, K. Shin-ya and T. Takahashi. Combinatorial synthesis of deoxyhexasaccharides related to the landomycin A sugar moiety, based on an orthogonal deprotection strategy. *Chem. Asian J.*, **5**, 1407-1424 (2010).
10. M. Izumikawa, J. Hashimoto, T. Hirokawa, S. Sugimoto, T. Kato, M. Takagi and K. Shin-ya. JBIR-22, An Inhibitor for Protein-Protein Interaction of the homodimer of proteasome assembly factor 3. *J. Nat. Prod.*, **73**, 628-631 (2010).

11. J. Ueda, J. Hashimoto, S. Inaba, M. Takagi and K. Shin-ya. JBIR-59, a new sorbicillinoid, from marine-derived fungus *Penicillium citrinum* SpI080624G1f01. *J. Antibiot.*, **63**, 203-205 (2010).
12. J.-Y. Kim, J.-H. Hwang, M.-R. Cha, M.-Y. Yoon, E.-S. Son, A. Tomida, B. Ko, S.-W. Song, K. Shin-ya, Y.-I. Hwang, H.-R. Park. Arctigenin blocks the unfolded protein response and shows therapeutic antitumor activity. *J. Cell. Physiol.*, **224**, 33-40 (2010)
13. K. Motohashi, M. Takagi and K. Shin-ya. Tetracenoquinocin and 5-Iminoaranciamycin from a Sponge-Derived *Streptomyces* sp. Sp080513GE-26. *J. Nat. Prod.*, **73**, 755-758 (2010).
14. J. Ueda, M. Takagi and K. Shin-ya. JBIR-58, a new salicylamide derivative, isolated from a marine sponge-derived *Streptomyces* sp. SpD081030ME-02. *J. Antibiot.*, **63**, 267-269 (2010).
15. M. Tera, K. Iida, Ikebukuro, H. Seimiya, K. Shin-ya and K. Nagasawa. Visualization of G-quadruplexes by using a BODIPY-labeled macrocyclic heptaoxazole. *Org. Biomol. Chem.*, **8**, 2749-2755 (2010).
16. Y. Hayakawa, Y. Yamazaki, M. Kurita, T. Kawasaki, M. Takagi and K. Shin-ya. Flaviogeranin, a new neuroprotective compound from *Streptomyces* sp. *J. Antibiot.*, **63**, 379-380 (2010).
17. A. Nagai, S. T. Khan, T. Tamura, M. Takagi and K. Shin-ya. *Streptomyces aomiensis* sp. nov., a novel species of *Streptomyces* isolated from a soil sample using the membrane filter method. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, in press.
18. S. Baumann, S. Schoof, M. Bolten, C. Haering, M. Takagi, K. Shin-ya and H.-D. Arndt. Molecular determinants of microbial resistance to thiopeptide antibiotics. *J. Am. Chem. Soc.*, **132**, 6973-6981 (2010).
19. M. Takagi, K. Motohashi and K. Shin-ya Isolation of 2 new metabolites, JBIR-74 and -75, from the sponge-derived *Aspergillus* sp. fS14. *J. Antibiot.*, **63**, 393-395 (2010).
20. M. Izumikawa, J. Hashimoto, M. Takagi and K. Shin-ya. Isolation of two new terpeptin analogs-JBIR-81 and JBIR-82-from a seaweed-derived fungus, *Aspergillus* sp. SpD081030G1f1. *J. Antibiot.*, **63**, 389-391 (2010).
21. F. Rosu, V. Gabelica, N. Smargiasso, G. Mazzucchelli, K. Shin-ya, and E. D. Pauw Cation involvement in telomestatin binding to G-quadruplex DNA. *Journal of Nucleic Acids*, **2010**, Article ID 121259, 7 pages (2010).
22. K. Iida, M. Tera, Takatsugu Hirokawa, K. Shin-ya and K. Nagasawa. Synthesis of macrocyclic hexaoxazole (6OTD) dimers, containing guanidine and amine

- functionalized side chains, and an evaluation of their telomeric G4 stabilizing properties. *Journal of Nucleic Acids*, **2010**, Article ID 217627, 9 pages (2010).
23. M. Takagi, K. Motohashi, J.-H. Hwang, A. Nagai and K. Shin-ya. New tensidols, JBIR-86 and -87 isolated from fungus, *Aspergillus* sp. fJ80. *J. Antibiot.*, **63**, 371-373 (2010).
  24. M. Takagi, K. Motohashi, A. Nagai, J. Hashimoto and K. Shin-ya. JBIR-83 and -84, new promothiocin derivatives, isolated from *Streptomyces* sp. RI19. *J. Antibiot.*, **63**, 405-408 (2010).
  25. M. Takagi, K. Motohashi, S. T. Khan, J. Hashimoto and K. Shin-ya. JBIR-65, a new diterpene, isolated from a sponge-derived *Actinomadura* sp. SpB081030SC-15. *J. Antibiot.*, **63**, 401-403 (2010).
  26. Y. Wu, J. A. Sommers, A. N. Suhasini, T. Leonard, J. S. Deakyne, A. V. Mazin, K. Shin-ya, H. Kitao and R. M. Brosh, Jr.. Fanconi anemia Group J mutation abolishes its DNA repair function by uncoupling DNA translocation from helicase activity or disruption of protein-DNA complexes. *Blood*, **116**, 3780-3791 (2010).
  27. K. Motohashi, T. Toda, M. Sue, K. Furihata, Y. Shizuri, Y. Matsuo, H. Kasai, K. Shin-ya, M. Takagi, M. Izumikawa, Yukio Horikawa and H. Seto. Isolation and structure elucidation of tumescenamides A and B, two peptides produced by *Streptomyces tumescens* YM23-260. *J. Antibiot.*, **63**, 549-552 (2010).
  28. M. Yoshida, H. Takeuchi, Y. Ishida, Y. Yashiroda, M. Yoshida, M. Takagi, K. Shin-ya and T. Doi. Synthesis, structure determination, and biological evaluation of destruxin E. *Org. Lett.*, **12**, 3792-3795 (2010).
  29. K. Motohashi, M. Takagi, H. Yamamura, M. Hayakawa and K. Shin-ya. A new angucycline and a new butenolide isolated from lichen-derived *Streptomyces* spp. *J. Antibiot.*, **63**, 545-548 (2010).
  30. M. Takagi, K. Motohashi, A. Nagai, M. Izumikawa, M. Tanaka, S. Fuse, T. Doi, K. Iwase, A. Kawaguchi, K. Nagata, T. Takahashi and K. Shin-ya. Anti-influenza virus compound from *Streptomyces* sp. RI18. *Org. Lett.*, **12**, 4664-4666 (2010).
  31. S. T. Khan, H. Komaki, K. Motohashi, I. Kozono, A. Mukai, M. Takagi and K. Shin-ya. *Streptomyces* associated with a marine sponge *Haliclona* sp.; biosynthetic genes for secondary metabolites and products. *Environ. Microbiol.*, **13**, 391-403 (2011).
  32. J. Ueda, M. Takagi and K. Shin-ya. New xanthoquinodin-like compounds, JBIR-97, -98 and -99, obtained from marine sponge-derived fungus *Tritirachium* sp. SpB081112MEf2. *J. Antibiot.*, **63**, 615-618 (2010).
  33. J. Ueda, J. Hashimoto, H. Yamamura, M. Hayakawa, M. Takagi and K. Shin-ya. A

- new 16-membered tetraene macrolide JBIR-100 from a newly identified *Streptomyces* species. *J. Antibiot.*, **63**, 627-629 (2010).
34. M. Izumikawa, J. Hashimoto, M. Takagi and K. Shin-ya. Isolation of 2 new naphthablin analogs JBIR-79 and JBIR-80 from *Streptomyces* sp. RI24. *J. Antibiot.*, **63**, 729-731 (2010).
  35. S. Croci, C. V. Recktenwald, R. Lichtenfels, G. Nicoletti, S. P. Dressler, C. De Giovanni, A. Astolfi, A. Palladini, K. Shin-ya, L. Landuzzi, P. Nanni, P.-L. Lollini and B. Seliger. Proteomic and PROTEOMEX profiling of mammary cancer progression in a HER-2/neu oncogene-driven animal model system. *Proteomics*, **10**, 3835-3853 (2010).
  36. T. Kunoh, T. Noda, K. Koseki, M. Sekigawa, M. Takagi, K. Shin-ya, N. Goshima, S. Iemura, T. Natsume, S. Wada, Y. Mukai, S. Ohta, R. Sasaki and T. Mizukami. A novel human dynactin-associated protein, dynAP, promotes activation of Akt, and ergosterol-related compounds induce dynAP-dependent apoptosis of human cancer cells. *Mol. Cancer Ther.*, **9**, 2934-2942 (2010).
  37. M. Takagi, K. Motohashi, M. Izumikawa, S. T. Khan, J.-H. Hwang and K. Shin-ya. JBIR-66, a new metabolite isolated from tunicate-derived *Saccharopolyspora* sp. SS081219JE-28. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **74**, 2355-2357 (2010).
  38. J.-H. Hwang, M. Takagi, H. Murakami, Y. Sekido and K. Shin-ya. Induction of tubulin polymerization and apoptosis in malignant mesothelioma cells by a new compound JBIR-23. *Cancer Lett.*, **300**, 189-196 (2011).
  39. T. Doi, Kazuaki Shibata, M. Yoshida, M. Takagi, M. Tera, K. Nagasawa, K. Shin-ya and T. Takahashi. (*S*)-Stereoisomer of telomestatin as a potent G-quadruplex binder and telomerase inhibitor. *Org. Biomol. Chem.*, **9**, 387-393 (2011).
  40. T. Doi, Y. Numajiri, T. Takahashi, M. Takagi, and K. Shin-ya. Solid-phase total synthesis of (-)-apratoxin A and its analogues and their biological evaluation. *Chem. Asian J.*, **6**, 180-188 (2011).
  41. S. Majima, M. Tera, K. Iida, K. Shin-ya and K. Nagasawa. Design and synthesis of telomestatin derivatives containing methyl oxazole and their G-quadruplex stabilizing activities. *Heterocycles*, **82**, 1345-1357 (2011).
  42. H. Komaki, K. Ando, M. Takagi and K. Shin-ya. Dereplication of *Streptomyces* strains by automated Southern hybridization with a polyketide synthase gene probe. *Actinomycetologica*, **24**, 66-69 (2010).

研究開発項目⑥

化合物等の高機能化技術の開発

<平成18年度>

1. T. Doi, Y. Iijima, K. Shin-ya, A. Ganesan, T. Takahashi. A total synthesis of spiruchostatin A. *Tetrahedron Lett.*, **47**, 1177 (2006)
2. T. Doi, M. Yoshida, K. Shin-ya, T. Takahashi. Total Synthesis of (*R*)-Telomestatin" *Org. Lett.*, **8**, 4165 (2006)
3. T. Doi, S. Fuse, S. Miyamoto, K. Nakai, D. Sasuga, T. Takahashi. A formal total synthesis of taxol aided by an automated synthesizer. *Chem. Asian J.*, **1**, 370 (2006)
4. H. Tanaka, T. Hasegawa, H. Nakahara, N. Kita, T. Shibata, S. Oe, M. Ojika, K. Uchida, T. Takahashi. Polymer-Assisted Solution-phase Synthesis and their Neurite Outgrowth-Promoting Activity of 15-Deoxy- $\Delta$ 12,14-PGJ2 Derivatives. *Chem. Asian J.*, **1**, 669 (2006)
5. Murakami H., Ohta A., Ashigai H., and H. Suga A highly flexible tRNA acylation method nonnatural polypeptide synthesis. *Nature Methods* **3**, 357-359 (2006)
6. H. Tanaka, T. Ishida, N. Matoba, H. Tsukamoto, H. Yamada, T. Takahashi. Polymer-Assisted Strategy for the Deprotection of Protected Oligosaccharides. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **45**, 6349 (2006)
7. H. Tanaka, Y. Nishiura, T. Takahashi. Stereoselective Synthesis of Oligo- $\alpha$ (2,8) Sialic Acids. *J. Am. Chem. Soc.*, **128**, 7124(2006)
8. T. Doi, Y. Hoshina, H. Mogi, Y. Yamada, T. Takahashi. Solid-phase Combinatorial Synthesis of Aeruginosin Derivatives and Their Biological Evaluation. *J. Comb. Chem.*, **8**, 571 (2006)
9. T. Doi, Y. Numajiri, A. Munakata, T. Takahashi. A Total Synthesis of Apratoxin A. *Org. Lett.*, **8**, 531 (2006).
10. H. Tanaka, D. Takahashi, T. Takahashi. Stereoselective Synthesis of Oligo- $\alpha$ (2,8)-3-deoxy-D-manno-2-octulosonic Acid Derivatives. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **45**, 770 (2006)
11. M. Kitade, H. Tanaka, S. Oe, M. Iwashima, K. Iguchi, T. Takahashi. Solid-Phase Synthesis and Biological Activity a Combinatorial Cross-Conjugated Dienone Library. *Chem. Eur. J.*, **12** **1**, 368 (2006)
12. M. Tera, Y. Sohtome, H. Ishizuka, T. Doi, M. Takagi, K. Shin-ya, K. Nagasawa. Design and Synthesis of Telomestatin Derivatives and Their Inhibitory Activity of Telomerase. *Heterocycles*, **69**, 505 (2006).

<平成19年度>

1. H. Tanaka, H. Miyoshi, Y.-C. Chuang, Y. Ando, T. Takahashi. Solid-Phase Synthesis of Epigallocatechin Gallate Derivatives. *Angew. Chem., Int. Ed.*, **46**, 5934 (2007).
2. Y. Hoshina, Y. Yamada, H. Tanaka, T. Doi, T. Takahashi. Synthesis of Biologically Active Fluorescent-Labeled Aeruginosin Derivatives. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **17**, 2904 (2007).
3. T. Doi, A. Kinbara, H. Inoue, T. Takahashi. Donor-bound Glycosylation for Various Glycosyl Acceptors: Bidirectional Solid-phase Semisynthesis of Vancomycin and Its Derivatives. *Chem. Asian J.*, **2**, 188 (2007)
4. Y. Hoshina, T. Doi, T. Takashi. Synthesis of the octahydroindole unit of aeruginosins via asymmetric hydrogenation of the Diels-Alder adducts of 2-amido-2,4-pentadienoate. *Tetrahedron*, **63**, 12740 (2007).
5. T. Doi, K. Shibata, A. Kinbara, T. Takahashi. A Divergent Route to 3-Amino-2,3,6-trideoxysugars Including Branched Sugar. Synthesis of Vancosamine, Daunosamine, Saccharosamine, and Ristosamine. *Chem. Lett.*, **36**, 1372 (2007)
6. T. Doi, S. Kamioka, S. Shimazu, T. Takahashi. A Synthesis of RGD Model Cyclic Peptide by Palladium-catalyzed Carbonylative Macrolactamization. *Org. Lett.*, **10**, 817 (2008)
7. T. Doi, H. Inoue, M. Tokita, J. Watanabe, T. Takahashi. Sequential Palladium-catalyzed Coupling Reactions on Solid-Phase. *J. Com. Chem.*, **10**, 135 (2008)
8. M. Ohuchi, H. Murakami, H. Suga The flexizyme system: A highly flexible tRNA aminoacylation tool for the translation apparatus. *Current Opinion in Chemical Biology* **11**, 135-144 (2007)
9. A. Ohta, H. Murakami, E. Higashimura, H. Suga Synthesis of polyester by means of genetic code reprogramming. *Chemistry & Biology* **14**, 1315-1322 (2007)
10. T. Kawakami, H. Murakami, H. Suga Messenger RNA-directed incorporation of multiple N-methyl-amino acids into linear and cyclic peptides. *Chemistry & Biology* **15**, 32-42 (2008)
11. Y. Goto, A. Ohta, Y. Sako, Y. Yamagishi, H. Murakami, H. Suga Reprogramming the initiation event in translation for the synthesis of physiologically stable cyclic peptides. *ACS Chemical Biology* **3**, 120-129 (2008)

12. Y. Sako, Y. Goto, H. Murakami, H. Suga Ribosomal synthesis of peptidase-resistant peptides closed by a non-reducible inter-sidechain bond. *ACS Chemical Biology* **3**, 241-249 (2008).

<平成20年度>

1. Y. Numajiri, T. Takahashi, M. Takagi, K. Shin-ya, T. Doi. Total Synthesis of Largazole and Its Biological Evaluation. *Synlett*, 2483 (2008)
2. K. Nagai, T. Doi, T. Ohshiro, T. Sunazuka, H. Tomoda, T. Takahashi, S. Omura. Synthesis and Biological Evaluation of a Focused Library of Beauveriolides. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **18**, 4397 (2008)
3. T. Doi, H. Inoue, M. Tokita, J. Watanabe, T. Takahashi. Sequential Palladium-catalyzed Coupling Reactions on Solid-phase, *J. Comb. Chem.*, **10**, 135 (2008)
4. H. Tanaka, Y. Nishiura, T. Takahashi. An Efficient Convergent Synthesis of GP1c Ganglioside Epitope. *J. Am. Chem. Soc.*, **130**, 17244 (2008)
5. H. Tanaka, Y. Tatenno, Y. Nishiura, T. Takahashi. Efficient Synthesis of an  $\alpha(2,9)$  Trisialic Acid by One-Pot Glycosylation and Polymer-Assisted Deprotection. *Org. Lett.*, **10**, 5597 (2008)
6. H. Tanaka, Y. Ando, T. Abe, T. Takahashi. The Synthesis of D-Trihydroxylysine-Based Oligopeptides as a Hydrophilic Scaffold and its Application to the Synthesis of Bifunctional Chelating Agents for Use as Bone Tracers. *Chem. Asian J.*, **3**, 2033 (2008)
7. A. Ohta, Y. Yamagishi, H. Suga. Synthesis of biopolymers using genetic code reprogramming. *Current Opinion in Chemical Biology*, **12**, 159 (2008)
8. T.-J. Kang, H. Suga. Ribosomal synthesis of nonstandard peptides. *Biochemistry and Cell Biology*, **86**, 92 (2008)
9. Y. Sako, J. Morimoto, H. Murakami, H. Suga. Ribosomal synthesis of bicyclic peptides with two orthogonal inter-sidechain reactions. *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 7932 (2008)
10. Y. Goto, H. Murakami, H. Suga. Initiating translation with D-amino acids. *RNA*, **14**, 1390 (2008)
11. H. Xiao, H. Murakami, H. Suga, A. R. Ferré-D'Amaré. Structural basis of specific tRNA aminoacylation by a small in vitro selected ribozyme. *Nature*, **454**, 358 (2008)
12. T. Kawakami, H. Murakami, H. Suga\* "Ribosomal synthesis of polypeptoids and peptoid-peptide hybrids" *Journal of American Chemical Society* **130**, 16861-16863 (2008).

13. T.-J. Kang, S. Yuzawa, H. Suga\* "Expression of histone H3 tails with combinatorial lysine modifications under the reprogrammed genetic code for the investigation on epigenetic markers" *Chemistry & Biology* **15**, 1166-1174 (2008).
14. A. Ohta, H. Murakami, H. Suga\* "Polymerization of  $\alpha$ -hydroxy acids by ribosomes" *ChemBioChem* **9**, 2773-2778 (2008)
15. Y. Sako, Y. Goto, H. Murakami, H. Suga\* "Ribosomal synthesis of peptidase-resistant peptides closed by a non-reducible inter-sidechain bond" *ACS Chemical Biology* **3**, 241-249 (2008).
16. Y. Goto, A. Ohta, Y. Sako, Y. Yamagishi, H. Murakami, H. Suga\* "Reprogramming the initiation event in translation for the synthesis of physiologically stable cyclic peptides" *ACS Chemical Biology* **3**, 120-129 (2008).
17. T. Kawakami, H. Murakami, H. Suga\* "Messenger RNA-directed incorporation of multiple N-methyl-amino acids into linear and cyclic peptides" *Chemistry & Biology* **15**, 32-42 (2008).

<平成21年度>

1. Y. Tanaka, S. Fuse, H. Tanaka, T. Doi, T. Takahashi. An Efficient Synthesis of a Cyclic Ether Key Intermediate for 9-Membered Masked Eneidyne Using an Automated Synthesizer. *Org. Process Res. Dev.*, **13**, 1111 (2009)
2. S. Kamioka, T. Takahashi, S. Kawachi, H. Adachi, Y. Mori, K. Fujii, H. Uekusa, T. Doi. Chiral Tetraazamacrocycles Having Four Pendant-Arms. *Org. Lett.*, **11**, 2289 (2009)
3. H. Tanaka, Y. Nishiura, T. Takahashi. Stereoselective Synthesis of  $\alpha(2,9)$  Di- to Tetra-sialic Acids Using a 5,4-N,O-Carbonyl Protected Thiosialoside. *J. Org. Chem.*, **74**, 4383 (2009)
4. M. Izumikawa, A. Nagai, T. Doi, M. Takagi, K. Shin-ya. JBIR-12, a Novel Antioxidative Agent From *Penicillium sp.* NBRC 103941. *J. Antibiot.*, **62**, 177 (2009)
5. M. Takagi, J. Hashimoto, K. Motohashi, K. Sakamoto, S. Hashimoto, M. Yamanouchi, H. Tanaka, T. Takahashi, K. Shin-ya. Screening and evaluation of new inhibitors of hepatic glucose production. *J. Antibiot.*, **62**, 625 (2009)
6. M. Tera, K. Iida, H. Ishizuka, M. Takagi, M. Sukanuma, T. Doi, K. Shin-ya, K. Nagasawa. Synthesis of a Potent G-Quadruplex-Binding Macrocyclic Heptaioxazole. *ChemBioChem*, **10**, 431 (2009)
7. K. Hiroya, K. Kawamoto, K. Inamoto, T. Sakamoto, T. Doi. Synthesis of the core ring system of awajanomycin from N-Boc-3-methoxycarbonyl-2-pyridinone.



- Tetrahedron Lett.*, **50**, 2115 (2009)
8. Y. Iijima, A. Munakata, K. Shin-ya, A. Ganesan, T. Doi, T. Takahashi. Stereoselective A solid-phase total synthesis of the cyclic depsipeptide HDAC inhibitor spiruchostatin A. *Tetrahedron Lett.*, **50**, 2970 (2009)
  9. M. Yoshida, T. Doi, S. Kang, J. Watanabe, T. Takahashi. Solid-phase combinatorial synthesis of ester-type banana-shaped molecule by way of sequential palladium-catalyzed carbonylation. *Chem. Commun.*, **50**, 2756 (2009)
  10. T. Serizawa, S. Miyamoto, Y. Numajiri, S. Fuse, T. Doi, T. Takahashi. Stereoselective One-Pot Three-Component Coupling Approach Toward the Synthesis of the AC Ring System of Taxanes. *Tetrahedron Lett.*, **50**, 3408 (2009)
  11. H. Tanaka, A. Yoshizawa, S. Chijiwa, J. Ueda, M. Takagi, K. Shin-ya, T. Takahashi. Efficient Synthesis of Deoxysugar Part of Versipelostatin via Direct and Stereoselective Glycosidation and Revision of the Structure of the Trisaccharide Unit. *Chem. Asian J.*, **4**, 1114 (2009).
  12. Y. Numajiri, T. Takahashi, T. Doi. Total Synthesis of (-)-Apratoxin A, 34-Epimer, and Its Oxazoline Analogue. *Chem. Asian J.*, **4**, 111 (2009).
  13. T. Kawakami, A. Ohta, M. Ohuchi, H. Ashigai, H. Murakami, H. Suga\* "Diverse backbone-cyclized peptides via codon reprogramming" *Nature Chemical Biology* **5**, 888-890 (2009)
  14. N. Niwa, Y. Yamagishi, H. Murakami, H. Suga\* "A flexizyme that selectively charges amino acids activated by a water-friendly leaving group" *Bioorganic Medicinal Chemistry Letter* **19**, 3892-3894 (2009).
  15. Y. Goto, K. Iwasaki, K. Torikai, H. Murakami, H. Suga\* "Ribosomal synthesis of dehydrobutyrine- and methylanthionine-containing peptides" *Chemical Communication* 3419-3421 (2009).
  16. Y. Yamagishi, H. Ashigai, Y. Goto, H. Murakami, H. Suga\* "Ribosomal synthesis of cyclic peptides with a fluorogenic oxidative coupling reaction" *ChemBioChem* **10**, 1469-1472 (2009).
  17. E. Nakajima, Y. Goto, Y. Sako, H. Murakami, H. Suga\* "Ribosomal synthesis of peptides with C-terminal lactams, thiolactones, and alkylamides" *ChemBioChem* **10**, 1186-1192 (2009).
  18. Y. Goto, H. Suga\* "Translation initiation with initiator tRNA charged with exotic peptides" *Journal of the American Chemical Society*, **131**, 5040-5041 (2009).
  19. H. Murakami, A. Ohta, H. Suga\* "Bases in the anticodon loop of tRNA(GGC)(Ala) prevent misreading" *Nature Structural & Molecular Biology*, **16**, 353-358 (2009).

<平成 22 年度>

1. T. Doi, Y. Numajiri, T. Takahashi, M. Takagi, K. Shin-ya. Solid-phase Total Synthesis of (-)-Apratoxin A and Its Analogues and Their Biological Evaluation. *Chem. Asian J.*, **6**, 180 (2011)
2. T. Doi, K. Shibata, M. Yoshida, M. Takagi, M. Tera, K. Nagasawa, K. Shin-ya, T. Takahashi. (S)-Stereoisomer of Telomestatin as a Potent G-quadruplex Binder and Telomerase Inhibitor. *Org. Biomol. Chem.*, **9**, 387 (2011)
3. M. Yoshida, H. Takeuchi, Y. Ishida, Y. Yashiroda, M. Yoshida, M. Takagi, K. Shin-ya, T. Doi. Synthesis, Structure Determination, and Biological Evaluation of Destruxin E. *Org. Lett.*, **12**, 3792 (2010)
4. K. Tidgewell, N. Engene, T. Byrum, J. Media, T. Doi, F. A. Valeriote, W. H. Gerwick. Evalved Diversification of a Modular Natural Product Pathway: Apratoxins F and G, Two Cytotoxic Cyclic Depsipeptides from a Palmyra Collection of *Lyngbya bouillonii*. *ChemBioChem*. **11**, 1458 (2010)
5. K. Inamoto, T. Saito, K. Hiroya, T. Doi. Palladium-catalyzed Intramolecular Amidation of C(sp<sup>2</sup>)-H Bonds: Synthesis of 4-Aryl-2-quinolinones. *J. Org. Chem.*, **75**, 3900 (2010)
6. M. Takagi, K. Motohashi, A. Nagai, M. Izumikawa, M. Tanaka, S. Fuse, T. Doi, K. Iwase, A. Kawaguchi, K. Nagata, T. Takahashi, K. Shin-ya. Anti-influenza virus compound from *Streptomyces sp.* RI18. *Org. Lett.*, **12**, 4664 (2010)
7. S. Fuse, S. Sugiyama, T. Takahashi. Rapid Assembly of Resorcylic Acid Lactone Frameworks via Sequential Palladium-Catalyzed Coupling Reactions. *Chem. Asian J.*, **5**, 2459 (2010)
8. H. Tanaka, Y. Tanaka, M. Minoshima, S. Yamaguchi, S. Fuse, T. Doi, S. Kawauchi, H. Sugiyama, T. Takahashi. Synthesis of Bicyclic Eneidyne That Possess a Photosensitive Triggering Device and Exhibit Strong DNA Cleaving Activity. *Chem. Commun.*, **46**, 5942 (2010)
9. T. Serizawa, S. Miyamoto, S. Fuse, T. Doi, T. Takahashi. Construction of the ABC ring System of Taxanes via Stereoselective One-Pot Three-Component Coupling and Intramolecular Alkylation of a Protected Cyanohydrin Ether. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **83**, 942 (2010)
10. S. Kamioka, S. Sugiyama, T. Takahashi, T. Doi. Synthesis of Chiral Polyazamacrocycles of Variable Ring Size. *Org. Biomol. Chem.*, **8**, 2529 (2010)
11. K. Shibata, M. Yoshida, T. Doi, T. Takahashi. Derivatization of a Tris-oxazole Using Pd-catalyzed Coupling Reactions of a 5-Bromooxazole Moiety. *Tetrahedron Lett.*, **51**, 1674 (2010)

12. E. Inoko, Y. Nishiura, H. Tanaka, T. Takahashi, K. Furukawa, K. Kitajima, C. Sato. Developmental stage-dependent expression of a trisialic acid unit on glycoproteins in mouse brain as revealed by mAb.A2B5. *Glycobiology*, *20*, 916 (2010)
13. H. Tanaka, S. Yamaguchi, A. Yoshizawa, M. Takagi, K. Shin-ya, T. Takahashi. Combinatorial Synthesis of Deoxyhexasaccharides Related to the Landomycin A Sugar Moiety, Based on an Orthogonal Deprotection Strategy. *Chem. Asian J.*, *5*, 1407 (2010)
14. K. Machida, Y. Hirose, S. Fuse, T. Sugawara, T. Takahashi. Development and Application of a Solution-Phase Automated Synthesizer, 'ChemKonzert'. *Chem. Pharm. Bull.*, *58*, 87 (2010)
15. H. Tanaka, T. Kawai, Y. Adachi, N. Ohno, T. Takahashi.  $\beta$ (1,3) Branched Heptadeca- and Linear Hexadeca-saccharides Possessing an Aminoalkyl Group as a Strong Ligand to Dectin-1. *Chem. Commun.*, in press.
16. S. Fuse, K. Okada, Y. Iijima, A. Munakata, K. Machida, T. Takahashi, M. Takagi, K. Shin-ya, T. Doi. Total Synthesis of Spiruchostatin B Aided by an Automated Synthesizer. *Org. Biomol. Chem.*, in press DOI: 10.1039/C0OB01169J.
17. Y. Ohshiro, E. Nakajima, Y. Goto, S. Fuse, T. Takahashi, T. Doi, H. Suga. Ribosomal Synthesis of Backbone-Macrocyclic Peptides Containing  $\gamma$ -Amino Acids. *ChemBioChem*, in press.
18. Y. Ohshiro, E. Nakajima, Y. Goto, S. Fuse, T. Takahashi, T. Doi, H. Suga\* "Ribosomal synthesis of backbone-macrocyclic peptides containing  $\gamma$ -amino acids", *ChemBioChem* in press (2011)
19. Y. Goto, T. Katoh, H. Suga\* "Flexizymes for genetic code reprogramming" *Nature Protocols* in press (2011)
20. T.-J. Kang, Y. Hayashi, H. Suga\* "Synthesis of a Backbone-cyclic Peptide SFTI-1 Promoted by the Induced Peptidyl-tRNA Drop-off" *Angewandte Chemie International Edition* *50*, 2159-2161 (2011).
21. G. Hayashi, Y. Goto, H. Suga\* "Ribosome evolution for two artificial amino acids in *E. coli*" *Chemistry&Biology* *17*, 320-321 (2010).

## 研究開発項目⑦

### 化合物等の評価技術の開発

(平成 18 年度～平成 20 年度)

<平成 18 年度>

1. Miura A, Honma R, Togashi T, Yanagisawa Y, Ito E, Imai J, Isogai T, Goshima N, Watanabe S, Nomura N. Differential responses of normal human coronary artery endothelial cells against multiple cytokines comparatively assessed by gene expression profiles. *FEBS Lett.* **580**(30):6871-9 (2006)
2. Hamaguchi I, Imai JI, Momose H, Kawamura M, Mizukami T, Kato H, Naito S, Maeyama JI, Masumi A, Kuramitsu M, Takizawa K, Mochizuki M, Ochiai M, Yamamoto A, Horiuchi Y, Nomura N, Watanabe S, Yamaguchi K. Two vaccine toxicity-related genes Agp and Hpx could prove useful for pertussis vaccine safety control. *Vaccine.* **25**:3355-64 (2007)

<平成19年度>

1. S.O. Lee, Y. Nakamura, K. Yamane, T. Toujo, S. Takahashi, Y. Tanikawa, and H. Takahashi Image Stabilization for In vivo Microscopy by High Speed Visual Feedback Control. *IEEE Transactions on Robotics*, **24**(1): 45-54 (2008)
2. Ito E, Honma R, Yanagisawa Y, Imai J, Azuma S, Oyama T, Ohwada S, Akiyama T, Nomura N, Inoue J, Watanabe S, Semba K. Novel clusters of highly expressed genes accompany genomic amplification in breast cancers. *FEBS Lett.* **581**(21):3909-14 (2007)
3. Kato H, Honma R, Sanda T, Fujiwara T, Ito E, Yanagisawa Y, Imai J, Okamoto T, Watanabe S. Knock down of hSNF5/Ini1 causes cell cycle arrest and apoptosis in a p53-dependent manner. *Biochem Biophys Res Commun.* **361**(3):580-5 (2007)
4. Ninomiya K, Miyamoto T, Imai J, Fujita N, Suzuki T, Iwasaki R, Yagi M, Watanabe S, Toyama Y, Suda T. Osteoclastic activity induces osteomodulin expression in osteoblasts. *Biochem Biophys Res Commun.* **362**(2):460-6 (2007)
5. Yamaguchi N, Ito E, Azuma S, Honma R, Yanagisawa Y, Nishikawa A, Kawamura M, Imai J, Tatsuta K, Inoue J, Semba K, Watanabe S. FoxA1 as a lineage-specific oncogene in luminal type breast cancer. *Biochem Biophys Res Commun.* **365**(9):711-717 (2007)
6. Kobayakawa, S., Miike, K., Nakao, M. and Abe, K. Dynamic changes in the epigenomic state and nuclear organization of differentiating mouse embryonic stem cells. *Genes to Cells* **12**, 447-460 (2007)
7. Uematsu, M. *et al.* Quantitative chemical composition of cortical GABAergic neurons revealed in transgenic Venus-expressing rats. *Cereb. Cortex* **18**, 315-330. (2007)
8. Sugimoto, M. and Abe, K. X chromosome reactivation initiates in nascent primordial germ cells in mice. *PLoS genetics* **3**, e116. (2007)

9. Yamazaki, T. *et al.* Molecular dynamics of heterochromatin protein 1 $\beta$ , HP1 $\beta$ , during mouse preimplantation development. *J. Reprod. Dev.* **53**, 1035-1041. (2007)

<平成20年度>

## (2) 総説、解説、著書

### 研究開発項目①

#### タンパク質ネットワーク解析技術の開発

##### <平成18年度>

1. 夏目徹 「完全長ヒト cDNA を用いた大規模タンパク質ネットワーク解析」脳21 34(9), p.45-49 (279-283), 2006
2. 夏目徹 「タンパク質相互作用ネットワークの大規模解析からの展開：ケミカルバイオロジー From Systematic Analysis of Protein Interaction Networks to Chemicalbiology」細胞工学 25(6):p.613-8, 2006
3. 夏目徹 「ユビキチン・プロテアソーム系とオートファジー」蛋白質核酸酵素 51, (10)8月号増刊 ユビキチン・プロテアソーム系と大規模タンパク質ネットワーク解析, p.1183-1188, 2006
4. 夏目徹 「タンパク質相互作用を極める」蛋白質核酸酵素 51(12):p.1714-7, 2006

##### <平成19年度>

1. 家村俊一郎 「質量分析のためのサンプル調製法—エピトープタグ発現法」 実験ハンドブックシリーズ「分子間相互作用解析ハンドブック」, 53-57, 2007
2. 家村俊一郎、夏目 徹 「質量分析のためのサンプル調製（タンパク質ネットワーク大規模解析）」Journal of the Mass Spectrometry Society of Japan, 55, 165-171, 2007
3. 夏目徹、「ゲノムを医学する」 p.107-115 大規模タンパク質ネットワーク解析からの展開、南山堂, 2007
4. 夏目徹、蛋白質核酸酵素増刊 52(13 Suppl)「ケミカルバイオロジー」 p.1649-54 大規模タンパク質相互作用ネットワーク解析から展開するケミカルバイオロジープロジェクト、共立出版, 2007

##### <平成20年度>

1. 家村俊一郎、夏目 徹、「タンパク質のネットワーク解析から創薬へ（超高感度質量分析システムをどのように実現したか）」、*Synthesiology*. 1, 123-129 (2008).

##### <平成21年度>

##### <平成22年度>

## 研究開発項目②

### タンパク質相互作用情報の検証技術の開発

#### <平成18年度>

1. 五島直樹、野村信夫. 薬学研究ビジョン5 ヒトプロテオーム研究の基盤構築から網羅的機能解析へ. (2006) Pharma VISION NEWS Coll. Vol.2 p21-24.
2. 藤井郁雄. 進化分子工学による新規生体機能分子の設計と創出 化学と生物, Vol.45, No.2, 96-103 2007年2月

#### <平成19年度>

1. 藤井郁雄. 進化分子工学による機能性ペプチドの創出と低分子化へのアプローチ. 生化学, Vol.79, No.5, 462-465 2007年5月

#### <平成20年度>

#### <平成21年度>

#### <平成22年度>

1. 五島直樹、山口圭、無細胞翻訳系 「目的別で選べるプロトコール タンパク質発現プロトコール」、実験医学別冊 (羊土社) p.197-211 (2010)
2. 五島直樹、機能解析用プロテインチップー網羅的ヒト・タンパク質を搭載したタパク質チップの開発ー、バイオチップ実用化ハンドブック (エヌ・ティー・エス社) p.154-159 (2010)

## 研究開発項目③

### タンパク質相互作用予測技術の開発

#### <平成18年度>

#### <平成19年度>

1. 広川貴次、膜タンパク質と低分子化合物のドッキング、薬学雑誌、127: 123-131 (2007)
2. 磯辺俊明 他 編、分子間相互作用解析ハンドブック (第1章および第3章、分担執筆)、羊土社、132-136、242-248 (2007)

<平成20年度>

1. 広川貴次、創薬のための化合物ドッキングシミュレーション、月刊バイオインダストリー5月号、62-69 (2008)

<平成21年度>

<平成22年度>

**研究開発項目④**

**疾患関連遺伝子探索技術の開発**

<平成18年度>

1. Horikawa Y. Type 2 diabetes susceptibility gene-calpain 10 Endocr. J. 53: 567-76, 2006
2. 堀川幸男 インスリン抵抗性と遺伝素因 メディカルビューポイント 27: 4, 2006
3. 塩谷真由美、堀川幸男、宗 友厚、武田 純 若年発症の糖尿病における遺伝子スクリーニング 岐阜県内科医会雑誌 20: 29-31, 2006
4. 佐々木昭彦、堀川幸男、武田 純 MODY (1-6) 内分泌症候群 糖代謝、日本臨床、pp54-58、2006.
5. 飯塚勝美、堀川幸男 ChREBP メタボリックシンドローム-病因解明と予防・治療の最新戦略、日本臨床、pp249-253,2006

<平成19年度>

1. 塩谷真由美、堀川幸男、武田 純 SHP と糖脂質に関する代謝異常 最新医学 62: 63-68, 2007
2. 山本真由美、塩谷真由美、堀川幸男、武田 純 岐阜市における糖尿病診療の実態調査 岐阜県医師会医学雑誌 21 : 89-94、2008
3. 飯塚勝美、堀川幸男 カルパイン 10 カラー版 糖尿病学 基礎と臨床、西村書店 pp319-22、2007

<平成20年度>

1. Iizuka K, and Horikawa Y. ChREBP: A glucose-activated transcription factor involved in the development of metabolic syndrome Endocr. J.
2. 堀川幸男 糖尿病の新しい遺伝素因 Diabetes Frontier



3. 堀川幸男、塩谷真由美 疾患感受性遺伝子の解明の現状 新時代の糖尿病学—病因・診断・治療・研究の進歩、日本臨床
4. 塩谷 真由美、堀川 幸男 遺伝性肥満症 NASH 診療 next approach、中外医学社
5. 堀川 幸男、塩谷 真由美 TCF7L2 遺伝子 新時代の糖尿病学—病因 診断 治療研究の進歩、日本臨床

<平成21年度>

1. 飯塚勝美、堀川幸男、グルコース感受性転写因子：ChREBP 細胞工学 28:780-783, 2009
2. 堀川幸男、全ゲノム関連解析（GWAS）の成果をふまえた2型糖尿病遺伝子同定の現状と課題、Diabetes Journal 37:95-103, 2009
3. 堀川幸男、安田和基、オーダーメイド医療の将来、糖尿病治療の新しい展開、文光堂、pp118-125, 2009

<平成22年度>

1. 堀川幸男、武田 純、日本人の糖尿病治療における DPPIV 阻害剤の位置づけ DPPIV 阻害剤のすべて 先端医学社 pp155-162, 2010
2. 堀川幸男、塩谷真由美、武田 純、インクレチン・エンハンサーとその作用、我が国の糖尿病治療においてインクレチン製剤をどのように使うか、Progress in Medicine ライフ・サイエンス pp 345-352, 2010
3. 堀川幸男 武田 純、α-GI 阻害剤 メタボリックシンドローム、日本臨床、2010
4. 堀川幸男、2 型糖尿病ゲノム研究の現状と展望、Annual Review 内分泌代謝、中外医学社、pp, 2010.
5. 堀川幸男、武田 純、DPP4 阻害薬と他剤との併用療法 特集：糖尿病治療最前線 2011 月刊糖尿病、医学出版、2011
6. 堀川幸男、塩谷真由美、これからの糖尿病遺伝子同定戦略、医学のあゆみ 232 : 1201-1206, 2010
7. 堀川幸男、武田 純、インスリン抵抗性：第一選択薬は抵抗性改善薬かインクレチンか？、治療 92:611-617, 2010
8. 塩谷真由美、堀川幸男、武田 純、DPP-4 阻害薬 Q&A、薬局 61 : 78-82, 2010
9. 塩谷真由美、堀川幸男、武田 純、糖尿病網膜症の遺伝素因、あたらしい眼科 27 : 1223-1228、2010
10. 堀川幸男、GWAS と全ゲノムシーケンス、Diabetes Frontier,22:87-93, 2011

## 研究開発項目⑤

### 化合物等の探索技術の開発

<平成18年度>

1. 唐澤智司、宮脇敦史 サンゴの蛍光タンパク質を用いた試薬の開発 : バイオプロセスハンドブック : 第5編 第1章 (7) : 477-484, (2007)
2. Miyawaki A. Ratiometric Pericam. *Cell Biology* 317-324. (2006)
3. 唐澤智司、小暮貴子、宮脇敦史 蛍光タンパク質による細胞内分子イメージング, *細胞工学* 25 (8) 890-893 (2006)
4. 小暮貴子、唐澤智司、宮脇敦史 テクノ・トレンド 生体分子間相互作用を解析するためのツールとしての蛍光タンパク質 Keima, *バイオテクノロジージャーナル* 6 (6) 725-728 (2006)
5. 金城政孝 西村吾朗 4章 蛍光相関分光法 (蛍光分光とイメージングの手法, 御橋廣真編, 学会出版センター) 133-160. 2006
6. 三國新太郎、金城政孝: 細胞生物学における蛍光相関分光法と蛍光相互相関分光法。蛋白質核酸酵素 51, 1998-2005 (2006)
7. 中林孝和、飯森俊文、金城政孝、太田信廣 蛍光寿命イメージングシステムの作成と生体試料および高分子試料への応用. *分光研究* 55、 31-39 (2006)
8. 西村慎一、松山晃久、吉田稔 酵母を基盤としたケミカルゲノミクス *Bionics* 3: 39-45 (2006)
9. 野上識、森下真一、大矢禎一 細胞の形態から遺伝子の機能を予測する、*バイオインダストリー* 23, 49-54 (2006)
10. 荒井律子、松山晃久、八代田陽子、吉田稔 分裂酵母の全タンパク質大規模解析ローカリゾームとその利用 *バイオサイエンスとインダストリー* 64, 687-691 (2006)
11. 山下順範、水上民夫 酵母宿主のフォワードケミカルゲノミクスによる抗癌剤創薬の展開 *化学と生物* 45, 2-4 (2007)
12. Horiuchi, T. and Aigaki, T. Alternative *trans*-splicing: a novel mode of pre-mRNA processing. *Biol. Cell*, 98, 135-140(2006)
13. 相垣敏郎 ショウジョウバエを用いた抗老化遺伝子の探索 *医学のあゆみ* 217, 753-756 (2006)
14. 相垣敏郎体系的表現型の解析で探るショウジョウバエのゲノム機能 *実験医学増刊号* 25, 158-164 (2007)
15. 阻害剤活用ハンドブック 作用機序・生理機能などの重要データがわかる、第24章 テロメラゼ阻害剤、秋山徹・河府和義 編、羊土社、pp384-pp403、2006年10月1日刊

<平成19年度>

1. Miyawaki A, Schnitzer MJ. New technologies for neuroscience. *Curr Opin Neurobiol.* 17: 565-566, (2007)
2. Miyawaki A, Karasawa S. Memorizing spatiotemporal patterns. *Nat Chem Biol.* Oct;3(10):598-601.(2007)
3. 唐澤智司、宮脇敦史 新しい蛍光タンパク質の開発：化学と生物 45(12)863-868, (2007)
4. 唐澤智司、宮脇敦史 国産蛍光タンパク質による細胞内現象の可視化技術：感染・炎症・免疫 37(3)228-237, (2007)
5. 唐澤智司、宮脇敦史 蛍光蛋白—最近の進歩—：病理と臨床 25 (6) 520-525, (2007)
6. 唐澤智司、宮脇敦史 新しい特性をもった蛍光タンパク質の開発：分子イメージング 蛍光プローブが拓くライフサイエンスの未来：Part 3 3-2 55p, (2007)
7. 金城政孝、白 燦基 蛍光相関分光法と分子ものさしを用いた細胞内微環境の解析.. 北海道大学出版会, 73-85(2007)
8. 金城政孝 蛍光相関分光法による生体1分子解析.. 化学 別冊「分子イメージング」, 72-76(2007)
9. 金城政孝 FCSによる解析法 三國新太郎, .実験医学 別冊「分子間相互相互作用解析ハンドブック」 85-89 (2007)
10. 三國新太郎、小暮貴子、宮脇敦史、金城政孝 FCCSによるタンパク質相互作用解析 . 別冊「分子間相互相互作用解析ハンドブック」 95-95 (2007)
11. 金城政孝 相互作用の定量化：イメージングと蛍光相関分光法 , 化学と生物 45,570-756 (2007)
12. 水上民夫ら がんをとりまく医療環境—抗がん剤開発の環境変化を中心として— 医学のあゆみ 222, 965-970 (2007)
13. Yashiroda, Y., Matsuyama, A., and Yoshida, M. New insights into chemical biology from ORFeome libraries. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 12, 55-59. (2008)
14. 相垣敏郎 ショウジョウバエは長生きできるか：昆虫の老化と寿命 ECOSOPHIA エコソフィア 19, 31-36 (2007)
15. 上田 泰己「体内時計のシンギュラリティ現象の解明」時間生物学 Vol.14, No.1 (2008)

<平成20年度>

<平成21年度>

<平成22年度>

## 研究開発項目⑥

### 化合物等の高機能化技術の開発

#### <平成18年度>

1. 村上裕、菅裕明「フレキシザイムを用いた遺伝暗号の拡張とリプログラミング」蛋白質核酸酵素 2006 増刊号 51(16), 2496-2501.
2. 村上裕、菅裕明「フレキシザイム～遺伝暗号の拡張とリプログラミングへの応用」, バイオテクノロジージャーナル」 バイオテクノロジージャーナル 2006 11・12月号 6(6), 734-737.

#### <平成19年度>

1. 上田 泰己「体内時計のシンギュラリティ現象の解明」時間生物学 Vol.14, No.1 (2008)
2. H. Tanaka, H. Yamada, T. Takahashi, "Rapid-Synthesis of Oligosaccharides Based on One-Pot Glycosylation", Trend In Glycosci. Glycotech., 19, 183 (2007)
3. 田中浩士、土井隆行、高橋孝志、「コンビナトリアル化学及びラボオートメーション技術を利用したケミカルプローブ開発」 In ケミカルバイオロジー 蛋白質核酸酵素別冊、共立出版, 52,1655 (2007)
4. T. Doi, H. Tanaka, T. Takahashi, "High-Throughput Synthesis of Combinatorial Libraries Based on Natural Products", 有機合成化学協会誌, 65, 795 (2007)
5. 遺伝暗号のリプログラミングによるポリエステルの翻訳合成」太田 淳、村上 裕、菅 裕明 高分子 2007 56(4), 196-199
6. 後藤佑樹、太田淳、村上裕、菅裕明「特殊ペプチドのコンビナトリアル翻訳合成」化学工業 2007 58(4), 255-262
7. 川上隆史、村上裕、菅裕明「遺伝暗号をリプログラミングして特殊ペプチドをつくる」化学 2007 8,68-69

#### <平成20年度>

1. 村上裕、菅裕明「新創薬技術 RAPID システムとマイクロ・ナノデバイスへの期待」化学工業, 59, 463 (2008)
2. H. Tanaka, T. Takahashi, "Oligosaccharide Synthesis based on Combinatorial Chemistry and Labo Automation" p.177. Eds. N. Taniguchi, A. Suzuki, Y. Ito, H. Narimatsu, T. Kawasaki, S. Hase. In Experimental Glycoscience, Springer (2008)

<平成21年度>

1. 高橋孝志、布施新一郎、土井隆行「ラボオートメーション技術を活用したタキソールおよび9員環エンジイン化合物の合成」天然物合成の最前線, V. 生物活性天然物の高効率大量合成, 279 (2009)
2. 田中浩士、高橋孝志「ラボオートメーション技術を利用する効率的糖鎖合成技術の開発」 p.63-72 監修 正田晋一郎 稲津敏行 *In* 複合糖質の化学と最新応用技術 シーエムシー出版 (2009)

<平成22年度>

1. 稲本浄文、廣谷功、土井隆行「パラジウム触媒による炭素—水素結合官能基化 インダゾール, インドール, ベンゾチオフェン, ベンゾチアゾールの環構築」ファルマシア, 46, 229 (2010)
2. 高橋孝志「合成工学的新技术を利用した天然物およびその誘導体の効率的合成」有機合成化学協会誌, 印刷中

#### 研究開発項目⑦

##### 化合物等の評価技術の開発

(平成18年度～平成20年度)

<平成18年度>

<平成19年度>

<平成20年度>

## 2. 講演・学会発表

### 研究開発項目①

#### タンパク質ネットワーク解析技術の開発

<平成18年度>

1. 夏目徹：「ケミカルバイオロジー：大規模タンパク質ネットワーク解析からの展開」第6回日本蛋白質科学会年会 シンポジウム、京都国際会館、2006/04/24 (2006)
2. 夏目徹：「プロテオミクスのための、超高感度質量分析」第2回 JST-SENTAN シンポジウム－質量分析技術、先端計測機器への展開－、経団連会館、2006/05/09 (2006)
3. 夏目徹：「日本におけるケミカルバイオロジー」第54回質量分析総合討論会、大阪千里サイエンスセンタービル、2006/05/18 (2006)
4. 夏目徹：「大規模タンパク質ネットワーク解析からの展開」遺伝子・デリバリー研究会 第6回シンポジウム、九州大学医学部キャンパス百年講堂、2006/05/19 (2006)
5. 家村俊一郎：「Systematic Analysis of Protein Interaction Networks Using Human Full Length cDNA」20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress、京都国際会館、2006/06/19 (2006)
6. 家村俊一郎：「質量分析のための試料前処理法：プロテオミクス分野」第33回 BMS コンファレンス(BMS2006)、大津プリンスホテル、2006/07/03 (2006)
7. 夏目徹：「ケミカルバイオロジー：大規模タンパク質ネットワーク解析からの展開」第30回 阿蘇シンポジウム、阿蘇プリンスホテル、2006/07/29 (2006)
8. 夏目徹：[FROM SYSTEMATIC ANALYSIS OF PROTEIN INTERACTION NETWORKS TO CHEMICAL BIOLOGY]日本学術振興会ゲノムテクノロジー第164委員会シンポジウム、ホテルラフォーレ東京、2006/09/26 (2006)
9. 夏目徹：「ケミカルバイオロジー：大規模タンパク質ネットワーク解析からの展開」第23回 Combinatorial Chemistry 研究会、タワーホール船堀、2006/09/27 (2006)
10. 夏目徹：「ケミカルバイオロジー：大規模タンパク質ネットワーク解析からの展開」第65回 日本癌学会学術総会 シンポジウム、パシフィコ横浜、2006/09/30 (2006)
11. 夏目徹：「大規模タンパク質ネットワーク解析」新領域創成特別講義Ⅰ、東京大学新領域創成学科、2006/10/20 (2006)
12. 夏目徹：「化合物等を活用した生物システム制御基盤技術開発」プロジェクトの概要「タンパク質相互作用ネットワーク大規模解析からの展開」JBIC2006 プロジェクト研究成果報告会、東京コンファレンスセンター・品川、2006/11/01 (2006)
13. 夏目徹：「ケミカルバイオロジープロジェクト：大規模タンパク質ネットワーク解析から創薬へ」ゲノム創薬フォーラム 第9回シンポジウム、日本薬学会会長井記念館、2006/11/13 (2006)

14. 夏目徹：「タンパク質ネットワーク」化学・生物総合管理の再教育講座，お茶の水女子大学、2006/11/16（2006）
15. 夏目徹：「ケミカルバイオロジープロジェクト：大規模タンパク質ネットワーク解析からの展開」第6回 ケモゲノミクス研究会，京都大学薬学部記念講堂、2006/11/20（2006）
16. 夏目徹：「機能プロテオミクス」東工大化学科特別講義 東工大，医農薬概論講義、東京工業大学、2006/12/05（2006）
17. 夏目徹：「大規模タンパク質ネットワーク解析」東大工学部セミナー、東京工業大学、2006/12/05（2006）
18. 夏目徹：「ケミカルバイオロジープロジェクト：大規模タンパク質ネットワーク解析からの展開」第3回びわこバイオ国際セミナー、滋賀県長浜市長浜ロイヤルホテル、2006/12/21（2006）

<平成19年度>

1. 夏目徹：「タンパク質ネットワーク大規模解析」H18 クリニカルバイオインフォマティクス専門講座、東京大学臨床講堂講堂、2007/01/09（2007）
2. 夏目徹：[Systemic Analysis of Protein Interaction Networks using Human Full-Length cDNA]7th Joint Conference of the American Association for Cancer Research and the Japanese Cancer Association、アメリカ ハワイ、2007/01/22（2007）
3. 夏目徹：「ケミカルバイオロジープロジェクト：大規模タンパク質ネットワーク解析からの展開」九州大学 生体防御医学研究所セミナー、九州大学、2007/02/09（2007）
4. 夏目徹：「ケミカルバイオロジープロジェクト：大規模タンパク質ネットワーク解析からの展開」第3回メタボリズムのゲノムネットワーク研究会、大磯プリンスホテル、2007/03/24（2007）
5. 夏目徹：大規模タンパク質ネットワーク解析から展開するケミカルバイオロジー、第7回日本蛋白質科学会年会 シンポジウム，仙台国際センター、2007/05/24
6. 夏目徹：インタラクトミクスによる細胞内シグナル伝達パスウェイ解析 大学講義，東京医科歯科大学、2007/05/31（2007）
7. 夏目徹：タンパク質ネットワーク大規模解析から展望するケミカルバイオロジー、日本ヒトプロテオーム機構第5回大会、日本科学未来館、2007/07/30（2007）
8. 夏目徹：大規模タンパク質相互ネットワーク解析から展開するケミカルバイオロジー、CBI学会，化学会館7Fホール、2007/08/10（2007）
9. 夏目徹：From systematic analysis of pritein interaction networks to chemicalbiology、第66回日本癌学会学術総会シンポジウム，パシフィコ横浜、2007/10/03（2007）

10. 夏目徹：産総研における創薬基盤、トランスレーショナル研究推進上の課題等に関する研究会，六本木、2007/10/22（2007）
11. 夏目徹：タンパク質ネットワーク大規模解析から展開するケミカルバイオロジー、第21回 COE 講演会，神戸大学、2007/10/24（2007）
12. 夏目徹：タンパク質ネットワーク解析から展開するケミカルバイオロジー、  
“JBIC2007 プロジェクト研究成果報告会”，東京コンファレンスセンター・品川、  
2007/11/01（2007）
13. 夏目徹：タンパク質ネットワーク大規模解析から展開するケミカルバイオロジー、第  
26回メディシナルケミストリーシンポジウム，グリーンホール相模大野、2007/11/29  
（2007）

<平成20年度>

1. 夏目徹、「タンパク質ネットワーク大規模解析から展開するケミカルバイオロジー」、  
第26回メディシナルケミストリーシンポジウム，相模原市、2007年11月29日
2. 夏目徹、「タンパク質ネットワーク解析から展開するケミカルバイオロジー」、日本化  
学会第88春季年会，東京、2008年3月26日
3. 夏目徹、「ノイズ・ウォー —本当の高感度質量分析」、先端計測分析技術・機器開発事  
業 成果発表会，千葉市、2008年9月4日
4. T. Natsume., “Systematic Analysis of Protein Interaction Networks”，  
IPAB2008/AHeDD2008 合同シンポジウム，東京、2008年10月17日
5. 夏目徹、「タンパク質ネットワーク大規模解析からの展開するケミカルバイオロジー」、  
第31回日本分子生物学学会年会、第81回日本生化学会大会、合同大会(BMB2008)  
シンポジウム，神戸市、2008年12月12日
6. 布施新一郎、土井隆行、飯島悠介、宗像麻未、高橋孝志、Ganesan A.、新家一男、千々  
和修平、家村俊一郎、夏目 徹、「スピルコスタチンAの全合成と結合タンパク質ネ  
ットワーク解析」、日本ケミカルバイオロジー研究会 第3回年会、東京都、2008年5  
月19日
7. 澁谷浩司、中山 洋、家村俊一郎、夏目 徹、「パスウェイ・ネットワークの絶対定量  
による動態解析」、2008年度ゲノム特定4領域合同班会議、神戸市、2008年8月26  
日
8. 小谷友也、家村俊一郎、夏目徹、川上浩一、山下正兼、「脊椎動物発生過程においてプ  
ロテインキナーゼAの活性化を制御する分子機構の解明」、日本動物学会第79回大会、  
福岡市、2008年9月7日
9. 石田典子、家村俊一郎、夏目 徹、中山敬一、中山啓子、「新規 RING-finger タン  
パク質は NAP1L1 のユビキチン化を介して細胞増殖を制御する」、BMB2008（第  
31回日本分子生物学学会年会・第81回日本生化学会大会 合同大会）、神戸市、2008年



12月11日

10. 寺田優美、ハンクルクリストファー、家村俊一郎、夏目 徹、武田弘資、野口拓也、一條秀憲、「ROS 依存的なASK1 活性化制御機構における Peroxiredoxin1 の関与」、BMB2008 (第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会 合同大会)、神戸市、2008 年 12 月 10 日
11. 宮田直政、津田 学、家村俊一郎、夏目 徹、相垣敏郎、「ショウジョウバエ D-WIP 機能破壊変異体の作製と表現型の解析」、BMB2008 (第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会 合同大会)、神戸市、2008 年 12 月 10 日
12. Strahil Ivanov Pastuhov、花房 洋、家村俊一郎、夏目 徹、澁谷浩司、稲垣昌樹、松本邦弘、「パーキンソン病原因遺伝子 LRRK2 による vimentin cage 形成」、BMB2008 (第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会 合同大会)、神戸市、2008 年 12 月 10 日
13. 福島沖之、ストラヒルパストゥホフ、花房 洋、家村俊一郎、夏目 徹、澁谷浩司、松本邦弘、久本直毅、「線虫 *C.elegans* をモデル系とした BAG-2-Hsc70-CHIP 複合体による ROCO ファミリーキナーゼ LRRK の制御機構」、BMB2008 (第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会 合同大会)、神戸市、2008 年 12 月 11 日
14. 稲光正子、伊東 進、家村俊一郎、夏目 徹、加藤光保、「TGF- $\beta$  による calcineurin/NFAT シグナル抑制機構」、BMB2008 (第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会 合同大会)、神戸市、2008 年 12 月 12 日
15. 慶田城迅、花房 洋、家村俊一郎、夏目 徹、澁谷浩司、松本邦弘、「Dynein モータータンパク質結合因子 NudC は EGFR の細胞内トラフィックを制御している」、BMB2008 (第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会 合同大会)、神戸市、2008 年 12 月 12 日
16. 細川奈生、原 太一、高村聡人、岸千絵子、家村俊一郎、夏目 徹、水島 昇、「哺乳類 Atg13 は ULK1、FIP200 とともに 3MDa の複合体を形成する」、BMB2008 (第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会 合同大会)、神戸市、2008 年 12 月 12 日
17. 大西淳之、大西英理子、家村俊一郎、丸山 剛、西頭英起、石谷 太、夏目 徹、澁谷浩司、「p38 MAPK-NLK 経路による *Xenopus* 前頭部形成の制御機構」、BMB2008 (第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会 合同大会)、神戸市、2008 年 12 月 12 日

<平成 21 年度>

1. 夏目徹、「New generation of proteomics」、日本ヒトプロテオーム機構第 7 回大会、東京、2009 年 7 月 27 日

2. 澁谷浩司、中山 洋、家村俊一郎、夏目 徹、「パスウェイ・ネットワークの絶対定量による動態解析」、2009 年度ゲノム特定 4 領域合同班会議、神戸市、2009 年 8 月 31 日
3. 新木和孝、家村俊一郎、夏目 徹、永田和宏、「小胞体レドックスタンパク質ネットワーク解析」、第82回日本生化学会大会、神戸市、2009年10月22日
4. 片桐一美、松沢 厚、家村俊一郎、夏目 徹、武田弘資、一條秀憲、「過酸化水素依存的なASK1 活性化制御機構におけるPeroxioredoxin 1 の生理機能」、第82回日本生化学会大会、神戸市、2009年10月22日
5. 村上史織、岡田匡央、家村俊一郎、夏目 徹、武田弘資、一條秀憲、「新規ミトコンドリア外膜局在プロテインホスファターゼPGAM5 の機能解析」、第82回日本生化学会大会、神戸市、2009年10月23日
6. 関根悠介、園 直希、畑中 良、家村俊一郎、夏目 徹、倉永英里奈、三浦正幸、武田弘資、一條秀憲、「ASK1 活性化因子としてのKelch リポータータンパク質KLHDC10 の機能解析」、第82回日本生化学会大会、神戸市、2009年10月24日
7. 小谷友也、家村俊一郎、夏目 徹、川上浩一、山下正兼、「蛋白質間相互作用による新規プロテインキナーゼA 活性化機構」、第82回日本生化学会大会、神戸市、2009年10月24日
8. 貝塚剛志、原 太一、大城紀子、吉川 潮、米澤一仁、家村俊一郎、夏目 徹、水島 昇、「Mammalian Tti1 and Tel2 are important for mTOR complex formation」、第32回日本分子生物学会年会、横浜市、2009年12月12日
9. 石田典子、家村俊一郎、安井 明、夏目 徹、中山啓子、「Regulation of DNA double-strand break repair by ubiquitylation of Ku80 (Ku80 のユビキチン化を介したDNA 二重鎖切断修復制御)」、第32回日本分子生物学会年会、横浜市、2009年12月12日
10. 細川奈生、佐々木孝寛、家村俊一郎、夏目 徹、原 太一、水島 昇、「哺乳類 ULK1-Atg13-FIP200 複合体の新たな構成因子 Atg101 の発見」、第 82 回日本生化学会大会、神戸市、2009 年 10 月 23 日
11. 岡田匡央、武田弘資、家村俊一郎、夏目 徹、一條秀憲、「新規プロテインホスファターゼ PGAM5 によるスプライシング・コアクチベーターSRm160 のリン酸化レベル制御」、第 32 回日本分子生物学会年会、横浜市、2009 年 12 月 11 日
12. 中村 勉、林 寛敦、清末優子、坂上史佳、松浦 憲、家村俊一郎、夏目 徹、秋山 徹、「The PX-RICS/14-3-3zeta/theta complex couples the N-cadherin/beta-catenin cargo with the dynein/dynaectin motor to mediate its ER export」、第 32 回日本分子生物学会年会、横浜市、2009 年 12 月 11 日
13. 小出真季、名黒 功、家村俊一郎、夏目 徹、武田弘資、一條秀憲「新規 ASK3 結合分子 pICln のリン酸化制御機構」、第 32 回日本分子生物学会年会、横浜市、2009 年

12月11日

14. 片桐一美、松沢 厚、家村俊一郎、夏目 徹、武田弘資、一條秀憲、「過酸化水素依存的なASK1 活性化制御機構における Peroxiredoxin 1 の生理機能」、第32回日本分子生物学会年会、横浜市、2009年12月11日
15. 村上史織、岡田匡央、家村俊一郎、夏目 徹、武田弘資、一條秀憲、「新規ミトコンドリア外膜局在プロテインホスファターゼ PGAM5 の機能解析」、第32回日本分子生物学会年会、横浜市、2009年12月11日
16. 後藤利保、大西英理子、佐藤 淳、金 美善、家村俊一郎、石谷 太、夏目 徹、大西淳之、澁谷浩司、「NLK, an essential effector of anterior formation, functions downstream of p38 MAP kinase」、第32回日本分子生物学会年会、横浜市、2009年12月11日
17. 石田典子、家村俊一郎、安井 明、夏目 徹、中山啓子、「Ku80 のユビキチン化を介したDNA二重鎖切断修復制御」、第32回日本分子生物学会年会、横浜市、2009年12月11日
18. 貝塚剛志、原 太一、大城紀子、吉川 潮、米澤一仁、家村俊一郎、夏目 徹、水島昇、「Mammalian Tti1 and Tel2 are important for mTOR complex formation」、第32回日本分子生物学会年会、横浜市、2009年12月11日

<平成22年度>

1. 家村俊一郎、「超々高感度質量分析への挑戦」、日本ヒトプロテオーム機構第8回大会・第6回日本臨床プロテオーム研究会連合大会、浦安市、2010年7月27日
2. 夏目徹、「超高感度質量分析システム」、日本分子生物学会年会日本生化学会合同大会、神戸市、2010年12月10日
3. T. Natsume., “Challenge to Sensitive Mass Spectrometry for Protein Network Analysis.”, IEEE International Conference on Bioinformatics & Biomedicine, Hong Kong, 2010 December 20
4. 柳野卓也、日比陽子、伊藤雄貴、家村俊一郎、夏目 徹、渡辺 研、丸山和佳子、本山 昇、「酸化ストレスによるフォークヘッド型転写因子FOXO の活性化メカニズムの解析」、第33回日本基礎老化学会、名古屋市、2010年6月18日
5. 村上史織、武田弘資、西原順子、家村俊一郎、夏目 徹、一條秀憲、「ミトコンドリア膜電位低下によるミトコンドリア局在プロテインホスファターゼPGAM5の膜内切断」、BMB2010（第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会 合同大会）、神戸市、2010年12月8日
6. 藤本充章、瀧井良祐、Ramachandran Prakasam、譚 克、新川豊英、林田直樹、家村俊一郎、夏目 徹、中井 彰、「DNA修復因子RPAはHSF1によるHsp70の転写誘導に必要である」、BMB2010（第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大

- 会 合同大会)、神戸市、2010年12月8日
7. 西村多喜、井上貴雄、内田安則、山本章嗣、Vladimir Lupashin、家村俊一郎、夏目 徹、田口友彦、新井洋由、「OSBP and the COG complex regulate Golgi cholesterol level and intra-Golgi retrograde transport」、BMB2010 (第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会 合同大会)、神戸市、2010 年 12 月 7 日
  8. 藤本充章、瀧井良祐、Ramachandran Prakasam、譚 克、新川豊英、林田直樹、家村俊一郎、夏目 徹、中井 彰、「DNA 修復因子 RPA は HSF1 による Hsp70 の転写誘導に必要である」、BMB2010 (第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会 合同大会)、神戸市、2010 年 12 月 7 日
  9. Ramachandran Prakasam、藤本充章、瀧井良祐、譚 克、新川豊英、林田直樹、家村俊一郎、夏目 徹、中井 彰、「Nucleotide metabolic enzyme PRPS1 regulates heat shock factor 1」、BMB2010 (第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会 合同大会)、神戸市、2010 年 12 月 7 日
  10. 後藤利保、清水幹容、足達俊吾、佐藤清敏、家村俊一郎、夏目 徹、澁谷浩司、「IQGAP1 functions as a modulator for the nuclear localization of Dishevelled and beta-catenin in Wnt signaling」、BMB2010 (第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会 合同大会)、神戸市、2010 年 12 月 7 日
  11. 片桐一美、松沢 厚、家村俊一郎、夏目 徹、一條秀憲、「過酸化水素依存的な ASK1 活性化機構における Peroxiredoxin 1 の役割の解明」、BMB2010 (第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会 合同大会)、神戸市、2010 年 12 月 8 日
  12. 村上史織、武田弘資、西原順子、家村俊一郎、夏目 徹、一條秀憲、「ミトコンドリア膜電位低下によるミトコンドリア局在プロテインホスファターゼ PGAM5 の膜内切断」、BMB2010(第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会 合同大会)、神戸市、2010 年 12 月 9 日
  13. 森田智子、土谷佳樹、金 美姫、家村俊一郎、突出貴子、夏目 徹、山本雅之、小林聡、「Cytoplasmic and nuclear degradation mechanisms regulate biological function of the transcription factor Nrf1」、BMB2010 (第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会 合同大会)、神戸市、2010 年 12 月 9 日
  14. 杉浦仁美、新木和孝、家村俊一郎、夏目 徹、寶関 淳、永田和宏、「The novel thioredoxin-related transmembrane protein 4 works as a reductase in the endoplasmic reticulum」、BMB2010 (第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会 合同大会)、神戸市、2010 年 12 月 9 日
  15. 垣花太一、Stefano Vavassori、新木和孝、家村俊一郎、夏目 徹、Roberto Sitia、永田和宏、「The novel mechanism for localization of antioxidative enzyme Peroxiredoxin-4 (Prx4) in the ER」、BMB2010 (第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会 合同大会)、神戸市、2010 年 12 月 9 日

## 研究開発項目②

### タンパク質相互作用情報の検証技術の開発

#### <平成18年度>

1. 五島 直樹 他. ヒト cDNA の Gateway 化とケモバイオ研究への利用. 日本分子生物学会年会、2006 年 12 月 7 日
2. 藤井 郁雄. コンビナトリアル・バイオエンジニアリングによる受容体結合性リガンドの創出. JBIC2006 プロジェクト研究成果報告会
3. Daisuke Fujiwara<sup>1</sup>, Zengmao Ye<sup>2</sup>, Takeshi Tsumuraya, and Ikuo Fujii. A Phage Displayed Library of Constrained Loop Peptides. International Conference of 43rd Japanese Peptide Symposium/4th Peptide Engineering Meeting、2006 年 11 月 5～8 日
4. Zhengmao Ye, Takeshi Tsumuraya, Daisuke Fujiwara and Ikuo Fujii. Screening of Peptide Antagonists for Cytokine Receptors from Phage-displayed Libraries. International Conference of 43rd Japanese Peptide Symposium/4th Peptide Engineering Meeting.、2006 年 11 月 5～8 日

#### <平成19年度>

1. Lumine Matsumoto, Atsushi Iwata, Waragai Masaaki, Naoki Goshima, Nobuo Nomura, Shoji Tsuji. Rapid and quantitative analysis of serum anti-Ma2 antibody by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) in anti-Ma2 antibody-associated paraneoplastic syndrome American Academy of Neurology (Boston,USA) 2007 年 4 月 28 日
2. 木須康智 他. FLJ cDNA Gateway クローンを用いたヒトタンパク質の核内局在解析 BMB2007 (横浜)、2007 年 12 月 11～13 日
3. 松本ルミネ, 岩田淳, 山本知孝, 藁谷正明, 五島直樹, 野村信夫, 辻省次. ELISA 法による抗 Ma2 抗体の定量的測定法の開発 神経学会総会 2007 年 5 月 16 日
4. 富樫卓志、上田純也、松倉 進、望月宏美、永井文、高木基樹、新家一男、木須康智、野村信夫、五島直樹. Discovery of novel nuclear export inhibitor of beta-arrestin2 from Streptomyces sp.strain ML55. BMB2007、2007 年 12 月 11～13 日
5. 丸山 友希夫 他. Human Gene&Protein Database (HGPD)の構築および公開 BMB2007、2007 年 12 月 11～13 日
6. 古城周久、宮越陽、加藤静恵、八田知久、家村俊一郎、武山康子、葛西航、大場浩美、林恭行、夏目徹. HuCAL Technology:ファージディスプレイ法による HuCAL 抗体ライブラリーからのヒトモノクローナル抗体の選択と評価. BMB 2007、2007 年 12 月 14 日

7. Z. Ye, T.Tsumuraya, Y. Ishino, Y. Nishida, I. Fujii. Isolation of IL-5 Receptor Interacting Peptides using a constrained Helical Peptide Phage Display Library. Peptide Science、2008年3月
8. 藤井郁雄. Directed Evolution of Biofunctional Molecules in Phage-displayed Combinatorial Libraries. 1st Japanese-swiss Symposium on Chemical Biology (JSCB07)、2007年6月24日
9. 藤井郁雄. Directed Evolution of Peptide Ligands for G-CSF Receptor:A Correlation between  $\alpha$ -Helix Stability and Binding Affinity. The Korean for Microbiology and Biotechnology、2007年6月28日
10. 藤井郁雄. コンビナトリアル・バイオエンジニアリングによる受容体結合性リガンドの創出. JBIC 2007 プロジェクト成果報告会、2007年11月1日

<平成20年度>

1. 五島直樹、BMB2008 プロテオミクス研究最前線—網羅的タンパク質発現リソースからリバースプロテオミクスへの展開、2008年12月9日
2. 小橋友恵、唐沢智司、渡部 拓、関 達也、森 正敏、野村信夫、新家一男、宮脇敦史、夏目 徹、五島直樹、BMB2008 インビトロ・メモリーダイ法を用いたタンパク質相互作用測定システムの構築とその利用、2008年12月9日
3. 丸山友希夫、河村義史、若松愛、木村宏一、山本順一、西川哲夫、木須康智、菅野純夫、五島直樹、磯貝隆夫、野村信夫、BMB2008 Human Gene&Protein Database (HGPD)の公開および Gateway エントリークローンの配布、2008年12月9日

<平成21年度>

1. 五島直樹、蛋白質学会、コムギ無細胞タンパク質合成系を用いたヒト・インビトロプロテオーム研究、2009年5月20日
2. 中條岳志、大平高之、上田宏生、五島直樹、野村信夫、鈴木健夫、坂口裕理子、鈴木勉、RNA学会、ヒト RM44 複合体構成因子の同定と機能解析、2009年7月27日
3. 五島直樹、理化学研究所よこはま NMR 構造生物学研究会シンポジウム、ヒト・インビトロプロテオームを用いた抗体解析、2009年10月6日
4. 五島直樹、EU NMR シンポジウム (バーミンガム大学) Reverse proteomics approaches using genome-wide protein expression resources、2009年11月23日
5. 曾根 岳史、岸根 弘依、高田 葉子、安藤 太一、金 誠培、森 正敏、五島 直樹、今本文男、日本分子生物学会、Multisite Gateway 法を利用した *in vivo* タンパク質間相互作用検出系の開発: split luciferase アッセイ編、2009年12月11日
6. 五島直樹、日本分子生物学会、Biacore を用いた基質特異性の網羅的解析、2009年12月11日

<平成22年度>

1. 五島直樹、川上和孝、第31回日本アフェレシス学会学術大会（シンポジウム）網羅的な自己抗体解析による診断・治療法の開発、2010年11月5日
2. 志賀葉月、山口圭、松本知子、望月宏美、森正敏、河村義史、五島直樹、BMB2010、ヒト不安定遺伝子の Gateway クローニングにおけるプラスミド低コピー数大腸菌の利用、2010年12月7日
3. 河村義史、丸山友希夫、五島直樹、BMB2010、プロテオミクスリソースデータベースとしての Human Gene and Protein Database (HGPD) の発展、2010年12月7日

**研究開発項目③**

**タンパク質相互作用予測技術の開発**

<平成18年度>

1. 広川貴次：2006年5月8日 東京大学 COE シンポジウム「標的タンパク質の立体構造に基づく in silico スクリーニング」
2. 広川貴次：2006年5月17日 第5回バイオ EXPO2006 「GPCR を対象としたモデリングとドラッグデザイン」
3. 広川貴次：2006年5月23日 Asian Hub for e-Drug Discovery “Structure basis of antagonist binding for the histamine h1 receptor from molecular modeling and in silico screening“ Hirokawa T
4. 広川貴次：2006年6月14日 Structural Based Drug Design “Molecular modeling and in silico screening for the human histamine h1 receptor“ Hirokawa T
5. 広川貴次：2006年10月17日 第10回名古屋大学 VBL シンポジウム「創薬を指した受容体モデリングとバーチャルスクリーニング」 広川貴次
6. 広川貴次：2006年11月20日 大阪大学蛋白質研究所セミナー「GPCR の創薬インフォマティクス -立体構造モデリングを中心に-」 広川貴次

<平成19年度>

1. 広川貴次：2007年4月17日 Asian hub for e-drug discovery Symposium 2007 “CoLBA: a method for post-docking processing for drug discovery“
2. 広川貴次：2007年6月22日 国際バイオ EXPO 2007「標的タンパク質構造に基づく創薬分子設計」
3. 広川貴次：2007年9月14日 生物物理学的アプローチによるゲノム情報解析研究会「ドラッグブルゲノムから構造情報に基づくインシリコスクリーニングまで」
4. 広川貴次：2007年10月17日 薬学の未来を考える京都シンポジウム 「標的タン

パク質モデリングからのインシリコスクリーニング展開」

5. 内古閑伸之、広川貴次：2007年12月22日 第45回日本生物物理学会年会 「構造変化の大きなタンパク質におけるアミノ酸残基間の相互作用プロファイルを利用した複合体形成シミュレーション解析」
6. 内古閑伸之、広川貴次：2008年3月6日 第8回創薬インフォマティクス研究会 「大きな構造変化を伴うタンパク質複合体形成シミュレーションの相互作用プロファイルを用いた解析」

<平成20年度>

1. 広川貴次：2008年6月10日 第8回日本蛋白質科学会年会 □GPCR 解析研究の新展開ワークショップ- 「創薬に向けた GPCR モデリング」
2. 広川貴次：2008年7月3日 国際バイオ EXPO 2008「タンパク質構造に基づくインシリコスクリーニング」 広川貴次
3. Takatsugu Hirokawa: 2008/10/16 Aian Hub for e-Drug Discovery 2008 (Ebisu, TTokyo) “Protein structure-based virtual screening using concavity shape fingerprints”

<平成21年度>

1. 本野 千恵、広川 貴：2009年10月30日 日本生物物理学会第47回年会 “Virtual screening to separate active ligands from decoys using MD simulation and concavity shape comparing”
2. 広川貴次：2010年3月28日 日本薬学会第130年会 「分子モデリング技術による GPCR-リガンド複合体予測」

<平成22年度>

1. 広川貴次：2010年10月30日 第38回構造活性相関シンポジウム「単体および複合体タンパク質を標的としたインシリコスクリーニング」
2. 内古閑伸之、広川貴次、秋山 泰：2010年10月31日 第38回構造活性相関シンポジウム “Post-docking analysis in the prediction of protein complex with interaction“
3. Takatsugu Hirokawa：2010年12月18日 Asian e-Drug Discovery 2010 (Yonsei University, Korea) “In silico screening for protein-protein interaction inhibitors”
4. 広川貴次：2010年6月30日 第9回国際バイオ EXPO 「ケミカルバイオロジー-PJにおけるインシリコ解析の役割」



## 研究開発項目④

### 疾患関連遺伝子探索技術の開発

<平成18年度>

1. Muramatsu M, Wang H, Enya M, Horikawa Y, Tatemoto K, Suwa T, Mune T, Takeda J. Identification of Genes Specially Expressed in Pancreatic Islet. 88<sup>th</sup> Endocrine Society Annual Meeting, Boston, 2006
2. Horikawa Y. (Invited speaker) 『糖尿病の遺伝学研究の新しい展開』『日本の糖尿病治療の現状』中日協力糖尿病センター開設記念講演、鎮江、中国、2006
3. Sato H, Horikawa Y, Iizuka K, Sakurai N, Tanaka T, Shihara N, Oshima A, Takeda J, Mikuni M. Large-Scale Analysis of Glucocorticoid Responsive genes in rat hypothalamus The 37th annual meeting of the Society for Neuroscience, SanDiego, 2007 11
4. 宗 友厚、塩谷真由美、村松 学、佐久間博也、川地慎一、佐々木昭彦、諏訪哲也、加納克徳、堀川幸男、森田浩之、林 慎、山北宜由、武田則之、武田 純 細胞内コルチゾール再活性化機構と高血圧、糖・脂質代謝、内臓脂肪とのリンク、第79回 日本内分泌学会総会 2006年5月19-21日 神戸
5. 織田直久、稲垣一道、今村繁夫、関口佐保子、糸井智子、松本 崇、小野保長、石渡陽子、堀田恵子、永田睦子、柿澤弘章、早川伸樹、鈴木敦詞、堀川幸男、伊藤光泰、レプチン／アディポネクチン比の適正値の検討、第49回日本糖尿病学会年次学術集会 2006年5月25日
6. 村松 学、堀川幸男、塩谷真由美、諏訪哲也、武田 純、膵島特異的発現遺伝子の同定、第49回日本糖尿病学会年次学術集会 2006年5月25日
7. 志原伸幸、飯塚勝美、武田 純、堀川幸男、膵β細胞におけるカルパイン10の役割：膵島特異的カルパイン10トランスジェニックマウスを用いた解析、第49回日本糖尿病学会年次学術集会 2006年5月25日
8. 宗 友厚、塩谷真由美、村松 学、佐久間博也、川地慎一、佐々木昭彦、諏訪哲也、加納克徳、堀川幸男、森田浩之、林 慎、山北宜由、武田則之、武田 純、局所コルチゾール代謝機構と糖・脂質代謝・血圧とのリンクについての解析、第49回日本糖尿病学会年次学術集会 2006年5月26日
9. 大谷健一、堀川幸男、清水弘行、森 昌朋、カルパインはインスリン分泌に影響する、第49回日本糖尿病学会年次学術集会 2006年5月26日
10. 塩谷真由美、堀川幸男、武田 純、糖尿病発症における SHP 遺伝子変異の検討、第49回日本糖尿病学会年次学術集会 2006年5月26日
11. 飯塚勝美、堀川幸男、武田 純、Uyeda Kosaku、糖尿病関連病態における ChREBP の寄与、第49回日本糖尿病学会年次学術集会 2006年5月26日

12. 今村繁夫、織田直久、下村敦司、千田隆夫、稲垣一道、関口佐保子、糸井智子、松本崇、小野保長、安田啓子、堀田恵子、永田睦子、柿澤弘章、早川伸樹、鈴木敦詞、堀川幸男、伊藤光泰、インスリン遺伝子 A-2T 変異の At-T20 細胞での検討、第 49 回日本糖尿病学会年次学術集会 2006 年 5 月 26 日
13. 佐久間博也、堀川幸男、諏訪哲也、宗 友厚、武田 純、Cab45 によるインスリン分泌促進作用、第 49 回日本糖尿病学会年次学術集会 2006 年 5 月 27 日
14. 堀川幸男、2 型糖尿病と遺伝素因、第 7 回 阪神メタボリズム研究会、2006 年 6 月 15 日 尼崎
15. 堀川幸男、糖尿病遺伝子研究の新規展開、中日協力糖尿病センター設立記念講演、2006 年 6 月 27 日 鎮江
16. 堀川幸男、日本の糖尿病治療の現状、中日協力糖尿病センター設立記念講演、2006 年 6 月 28 日 鎮江
17. 堀川幸男、2 型糖尿病の遺伝素因、—日本人と糖尿病体質—第 144 回 飛騨臨床医会、日本人と糖尿病体質 2006 年 7 月 7 日、高山
18. 堀川幸男、日本人と糖尿病体質、第 9 回 西尾張地区糖尿病研究会、名古屋、2006 年 7 月 27 日
19. 堀川幸男、インクレチンを基軸とした糖尿病治療の新規展開 *Evolving diabetes and hypertension medical treatment* 2006 年 11 月 8 日、岐阜
20. 堀川幸男、タンパク質相互作用基点による 2 型糖尿病遺伝子パズルの解明、第 9 回ゲノム創薬フォーラムシンポジウム、2006 年 11 月 13 日、東京
21. 堀川 幸男、タンパク質相互作用基点による 2 型糖尿病遺伝素因パズルの解明、岐阜大学先創薬研究センター研究会 2007 年 2 月 20 日、岐阜
22. 堀川 幸男、インクレチンの日本人糖尿病治療への展開、消化管ホルモンとインスリン分泌セミナー 2007 年 2 月 24 日、岐阜
23. 富塚一磨、大島 毅、柿谷 誠、Walter D. Funk、新規成長因子 R-spondin1 の腸管上皮増殖促進作用、第 4 回 幹細胞シンポジウム、2006 年 5 月 19 日～20 日
24. 柿谷 誠、大島 毅、富塚 一磨、トランスジェニックキメラマウスによる分泌性蛋白質の迅速な新規インビボ機能解析システム、第 10 回がん分子標的治療研究会総会、2006 年 6 月 15 日～16 日
25. 柿谷誠、富塚一磨、液性因子の高効率生体内機能解析システム『HSKI システム』を用いた創薬ターゲット同定、JBIC 2006 プロジェクト成果報告会、2006 年 11 月 1 日

#### <平成 19 年度>

1. Mune T, Tanahashi H, Goshima E, Kawachi S, Sasaki A, Suwa T, Horikawa Y, Yamamoto M, Takeda N, Yasuda K, Takeda J. Hyperinsulinemic delayed

hypoglycemia in insulin receptor abnormality. 14<sup>th</sup> Japan-Korea Symposium on Diabetes Mellitus, Kyoto, 2007

2. 飯塚勝美、堀川幸男、グルコースセンサーChREBP に注目した肥満糖尿病病態の解析、第 50 回日本糖尿病学会年次学術集会 シンポジウム 2007 年 5 月 26 日
3. 塩谷真由美、堀川幸男、黒田 英嗣、武田 純、第 50 回日本糖尿病学会年次学術集会 2007 年 5 月 25 日
4. 黒田 英嗣、堀川幸男、塩谷真由美、武田 純、日本人 2 型糖尿病患者における MODY7 遺伝子 (KLF11) の解析、第 50 回日本糖尿病学会年次学術集会 2007 年 5 月 25 日
5. 飯塚勝美、Uyeda Kosaku、堀川幸男、肝特異的 ChREBP 過剰発現マウスの解析、第 50 回日本糖尿病学会年次学術集会 2007 年 5 月 26 日
6. 宗 友厚、棚橋弘成、五島英一、川地慎一、佐々木昭彦、諏訪哲也、堀川幸男、山本真由美、武田則之、安田圭吾、武田 純、高インスリン血症と遅延型低血糖を認めたインスリン受容体異常、第 50 回日本糖尿病学会年次学術集会 2007 年 5 月 26 日
7. 志原伸幸、堀川幸男、飯塚勝美、武田 純、ラット膝島発現分泌タンパクの探索、第 50 回日本糖尿病学会年次学術集会 2007 年 5 月 26 日
8. 佐藤大仁、堀川幸男、飯塚勝美、志原伸幸、大嶋明彦、武田 純、三國雅彦、視床下部グルココルチコイド感受性遺伝子の網羅的検索、第 80 回日本内分泌学会学術総会 2007 年 6 月 14 日
9. 飯塚勝美、志原伸幸、堀川幸男、カルパイン 10 はグルコース応答性インスリン分泌に関与する、第 80 回日本内分泌学会学術総会 2007 年 6 月 15 日
10. 堀川幸男、糖尿病治療の現状と将来の展望について、興和(株)社内講演会 2007 年 8 月 30 日 名古屋
11. 堀川 幸男、糖尿病関連遺伝子探索技術の開発、生物システム制御基盤技術開発 第 2 回研究推進委員会、2008 年 1 月 21 日 東京
12. 柿谷誠、堀越かおり、梶川美和、射場優美、大曾根佳尚、牧野詩子、秦敏宏、高木宏晃、来田里奈、池田祥久、太田宇海、加納さやか、小林大祐、河裾明石、石原俊江、大下美雪、内田圭亮、須永由香、菅原ゆり子、佐伽羅純一、生方菜緒里、藤倉綾子、山脇健吾、天貝樹子、西田怜奈、米屋隆、掛田実、池田宗弘、大島毅、岡田勉、富塚一磨、High-Speed Knock-In (HSKI) システムによる分泌蛋白質の機能解析 I: 分泌蛋白質の効率的なインビボ機能解析を可能にする HSKI システムの開発、BMB2007、2007 年 12 月 13 日
13. 堀越かおり、青木亜矢子、上田明子、梶川美和、射場優美、大曾根佳尚、牧野詩子、来田里奈、池田祥久、石原俊江、菅原ゆり子、佐伽羅純一、生方菜緒里、藤倉綾子、天貝樹子、大島毅、岡田勉、柿谷誠、富塚一磨、High-Speed Knock-In (HSKI) システムによる分泌蛋白質の機能解析 II: R-spondin ファミリー蛋白質の腸管上皮増殖

促進活性、BMB2007、2007年12月13日

14. 大島毅、天貝樹子、池田宗弘、堀越かおり、池田祥久、来田里奈、井上あやの、佐伽羅純一、菅原ゆり子、石原俊江、高木宏晃、秦敏宏、藤倉綾子、牧野詩子、射場優美、大下美雪、大曾根佳尚、太田宇海、梶川美和、加納さやか、河裾明石、小林大祐、柿谷誠、富塚一磨、High-Speed Knock-In (HSKI) システムによる分泌蛋白質の機能解析 III : Dkk-1 発現マウスの表現型解析、BMB2007、2007年12月13日
15. 富塚一磨、High-speed knock-in (HSKI) システムによる創薬ターゲット探索、第10回ヒューマンサイエンス総合研究ワークショップ『抗体医薬の現状と課題』、2007年11月6日

<平成20年度>

1. 堀川 幸男、膝島分泌タンパク（オステオネクチン）と糖尿病大血管症のリンク、第12回シンポジウム糖尿病 2008年4月19日
2. 堀川 幸男、糖尿病等疾患関連遺伝子探索、生物システム制御基盤技術開発 第1回ケモバイオプロジェクト成果報告会、2008年4月28日 東京
3. 山田 恵、林 祐一、今井沙織、犬塚 貴、堀川幸男、保住 功、糖尿病モデルマウス脊髄のメタロチオネインの変動—ALSとの関連性の検討、第49回 日本神経学会 2008年5月15日 横浜
4. 塩谷真由美、堀川幸男、武田 純、大規模ゲノムワイド関連解析由来2型糖尿病感受性SNPsの日本人における検討、第51回 日本糖尿病学会年次学術集会 2008年5月22日 東京
5. 飯塚勝美、堀川幸男、転写抑制因子 BHLHB2 はグルコースセンサーChREBP の標的遺伝子である、第51回 日本糖尿病学会年次学術集会 2008年5月23日 東京
6. 佐藤大仁、堀川幸男、飯塚勝美、桜井敬子、田中 毅、志原伸幸、大嶋明彦、武田 純、三國雅彦、視床下部グルココルチコイド反応性遺伝子の大規模解析、第51回 日本糖尿病学会年次学術集会 2008年5月23日 東京
7. 黒田英嗣、堀川幸男、塩谷真由美、飯塚勝美、武田 純、日本人2型糖尿病患者におけるMODY7 遺伝子(KLF11)の検討、第51回 日本糖尿病学会年次学術集会 2008年5月24日 東京
8. 西村英尚、堀川幸男、塩谷真由美、黒田英嗣、木全康良、武田 純、日本人2型糖尿病患者における膝分泌タンパク IGFBP-7 の検討、第51回 日本糖尿病学会年次学術集会 2008年5月24日 東京
9. 織田直久、横山敦司、稲垣一道、糸井智子、山元弘桜、浅野昇悟、柿澤弘章、早川伸樹、鈴木敦司、堀川幸男、伊藤光泰、Organic Cation Transporter 1 (OCT1)の多型とメトフォルミンの効果、第51回 日本糖尿病学会年次学術集会 2008年5月24日 東京

10. 富塚一磨、「抗体医薬の現状と未来、EXPOCT™ システムによるターゲット探索」、BTJ プロフェッショナルセミナー、2008 年 10 月 3 日
11. 柿谷誠、富塚一磨、「分泌蛋白質の高効率インビボ機能解析システムを用いたターゲット探索」、JBIC 2008 プロジェクト成果報告会、2008 年 10 月 31 日

<平成 21 年度>

1. 柿谷誠、富塚一磨、「液性因子の高効率生体内機能解析システム『EXPOC システム』を用いた創薬ターゲット同定」、JBIC 2009 プロジェクト成果報告会、2009 年 10 月 30 日
2. 堀川幸男、2 型糖尿病感受性遺伝子同定の軌跡、第 43 回糖尿病学の進歩 2009 年 2 月 21 日
3. 飯塚勝美、堀川 幸男、ChREBP と DEC1/BHLHB 2 は脂肪合成系酵素の発現調節においてフィードバックループを形成する、第 82 回日本内分泌学会学術総会 2009 年 4 月 23 日
4. 堀川幸男、ポストゲノムの糖尿病遺伝子パズルの解明戦略について、第 52 回日本糖尿病学会年次学術集会 2009 年 5 月 22 日
5. 飯塚勝美、武田 純、堀川幸男、転写因子 Mlx-1 の肝糖脂質代謝調節における役割、第 52 回日本糖尿病学会年次学術集会 2009 年 5 月 22 日
6. 塩谷真由美、堀川幸男、西村英尚、武田 純、全ゲノム関連解析により獲得された 2 型糖尿病感受性 SNPs の統合的解析、第 52 回日本糖尿病学会年次学術集会 2009 年 5 月 24 日
7. 徳永あゆみ、堀川幸男、秋田悦子、沖田考平、岩橋博見、下村伊一郎、武田 純、山縣和也、日本人非肥満 2 型糖尿病患者において、HNF-4a 遺伝子 P2 プロモーター領域の SNP がインスリン分泌と関連する、第 52 回日本糖尿病学会年次学術集会 2009 年 5 月 24 日
8. 堀川幸男、2 型糖尿病遺伝子同定戦略について、西尾張ミーティング、2009 年 6 月 11 日
9. 塩谷真由美、堀川幸男、武田 純、全ゲノム関連解析により獲得された 2 型糖尿病感受性 SNPs の統合的解析、第 53 回 日本人類遺伝学会 2009 年 9 月 26 日
10. 堀川幸男、相互作用タンパクを基点としたポストゲノムの 2 型糖尿病治療薬開発、JBIC2009 プロジェクト研究成果報告会 2009 年 10 月 30 日
11. 堀川幸男、Strategy to find novel type 2 diabetes susceptibility genes in the post genome sequencing era、New progress in diabetes research: From basic research to clinical trials、The joint international symposium on the 25th Kumamoto Medical Bioscience Symposium & G-COE program in Kumamoto University, 2009 第 25 回熊本医学生物科学シンポジウム 2009 年 11 月 13 日

12. 堀川幸男、糖尿病網膜症の遺伝素因について、3 学会合同学会 NOW2009 2009 年 12 月 6 日

<平成 22 年度>

1. 柿谷誠、富塚一磨、「液性因子の高効率生体内機能解析システム『EXPOC システム』を用いた創薬ターゲット同定」、JBIC2010 プロジェクト研究成果報告会、2010 年 10 月 29 日
2. 堀川幸男、インクレチン関連遺伝子多型と 2 型糖尿病の包括的関連解析、第 1 回東海インクレチン研究会 2010 年 2 月 26 日
3. 堀川 幸男、Strategy to find novel type 2 diabetes susceptibility genes in the post genome sequencing era、Danish-Japanese Joint Workshop “Molecular Diabetology”、Copenhagen Denmark, March 24<sup>th</sup>, 2010
4. 飯塚勝美、堀川幸男、服部泰輔、青松元昭、塩谷真由美、土田宏美、陳 佳英、武田純、FGF21 はラット初代肝細胞においてグルコース活性化転写因子 ChREBP により誘導される、第 53 回日本糖尿病学会年次学術集会 2009 年 5 月 27 日
5. 堀川幸男、塩谷真由美、川地慎一、飯塚勝美、諏訪哲也、武田 純、A-グルコシダーゼ阻害剤と DPP4 阻害剤による combination therapy、第 53 回日本糖尿病学会年次学術集会 2009 年 5 月 27 日
6. 塩谷真由美、堀川幸男、飯塚勝美、武田 純、2 型糖尿病発症におけるインクレチン関連遺伝子多型の影響について、第 53 回日本糖尿病学会年次学術集会 2009 年 5 月 27 日
7. 堀川幸男、糖尿病遺伝素因の光と影、第 61 回大阪大学第 2 内科内分泌代謝研究会 2010 年 7 月 10 日
8. 堀川幸男、トランスクリプトーム解析による合併症関連遺伝子の網羅的獲得、第 25 回糖尿病合併症学会 ワークショップ 2010 年 10 月 23 日
9. 堀川幸男、2 型糖尿病遺伝子素因の光と陰、第 7 回宮城血管フォーラム 2010 年 11 月 10 日
10. 堀川幸男、 $\alpha$ -グルコシダーゼと DPP4 の阻害による combination therapy、第 2 回東海インクレチン研究会 2011 年 2 月 4 日
11. 堀川幸男、The Genetics of Type 2 Diabetes: What have we Learned from GWAS? What is Next?、Japanese-Danish Kick-off Workshop “Molecular Diabetology” Kobe, Japan, March 8<sup>th</sup>, 2011

## 研究開発項目⑤

### 化合物等の探索技術の開発

<平成18年度>

1. 2006年12月 The 46th Annual Meeting of the American Society for Cell Biology "Innovations in Fluorescence Imaging of Cellular Functions Using Fluorescent Proteins" Atsushi Miyawaki
2. 2006年11月12日 京都賞ワークショップ "Live cell monitoring of protein activities" 松田道行
3. 2006年11月 Smilow Neuroscience Program, Dept. of Physiology and Neuroscience, New York University "New Fluorescent Probes and New Perspectives in Bioscience" Atsushi Miyawaki
4. 2006年11月 Research Institute of Molecular Pathology (IMP), Institute of Molecular "New Fluorescent Probes and New Perspectives in Bioscience" Atsushi Miyawaki
5. 2006年11月 National Institutes of Health (NIH) and Japan Society for Promotion of Science (JSPS) Joint Symposium: Frontiers in 21st Century Biomedical Science "New Fluorescent Probes and New Perspectives in Bioscience" Atsushi Miyawaki
6. 2006年10月 European Molecular Biology Organization (EMBO) Practical Course: Multi-photon imaging of living cells and tissues" Optical Labeling Techniques" Atsushi Miyawaki
7. 2006年10月 第2回骨免疫ワークショップ "生命情報の時空間的パターンの可視化" 宮脇敦史
8. 2006年10月 7th International Conference on Systems Biology" Spatio-temporal Patterns of Intracellular Signaling" Atsushi Miyawaki
9. 2006年9月 The 16th International Microscopy Congress (IMC16)" Visualization of cellular functions by fluorescence imaging" Atsushi Miyawaki
10. 2006年9月 奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科COEセミナー" ライブイメージング技術" 宮脇敦史
11. 2006年6月 2006 Gordon Research Conference (GRC): Single Molecular Approaches to Biology" Fluorescence imaging for cellular functions" Atsushi Miyawaki
12. 2006年6月 日本農芸化学会関東支部 2006年度第一回支部例会：受賞記念講演・シンポジウム「現象を操る分子をとる—ものとの極み—」"刺胞動物と蛍光蛋白質"宮脇敦史

13. 2006年5月 NICEM, MBL, Amalgaam and Carl Zeiss Korea Special Seminar & Workshop: Live Cell Imaging" New Fluorescent Probes and New Perspectives in Bioscience" Atsushi Miyawaki
14. 2006年5月 日本分子イメージング学会 "蛍光タンパク質を利用する分子イメージング" 宮脇敦史
15. 2006年5月 National Institutes of Health (NIH) meeting: Frontiers in Live Cell Imaging" Visualization of the Spatial and Temporal Dynamics of Intracellular Signaling" Atsushi Miyawaki
16. 2006年5月 Woodward Visiting Scholar Organic Seminar, Department of Chemistry & Chemical Biology, Harvard University" New Fluorescent Probes and New Perspectives in Bioscience" Atsushi Miyawaki
17. 2006年4月 Okinawa Institute of Science and Technology (OIST) International Workshop: Single Molecule Analysis" Spatial and temporal dynamics of intracellular signaling revealed by bioimaging" Atsushi Miyawaki
18. 2007年12月14日 BMB2007 (第30回分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会 合同大会 "コンプリメンテーション法を基にした新規蛍光タンパク質 monomeric Kusabira-Green を用いたタンパク質間相互作用解析" 渡部拓、藤岡亜紀、宮脇敦史、唐澤智司
19. 2006年4月24日 第6回日本蛋白質科学会年会 「蛍光相互相関法を用いた細胞内のタンパク質相互作用解析」金城政孝
20. 2006年5月 The Second NIBB-EMBL Symposium"Frontiers in Bioimaging. "Analysis of Microenvironment of Nucleus Using Fluorescence Correlation Spectroscopy". Masataka Kinjo
21. 2006年6月 The first international conference on Approaches to Single-Cell Analysis. "Analysis of biomolecular function in living cells using fluorescence correlation spectroscopy" Masataka Kinjo
22. 2006年7月 Asia-Pacific Workshop on Biological Physics "Lateral Diffusion of Membrane-Binding Proteins in Living Cells Analyzed by Total Internal Reflection Fluorescence Correlation Spectroscopy" Masataka Kinjo and Yu Ohsugi
23. 2006年9月 A one-day workshop: Cellular and Molecular Imaging. Center for Molecular Medicine. "Studies of protein dynamics in the cell nucleus with fluorescence correlation spectroscopy" Masataka Kinjo
24. 2006年12月 The 9th Carl Zeiss sponsored workshop on FCS and related methods. "Analysis of protein dynamics in the cell nucleus with fluorescence correlation spectroscopy" Masataka Kinjo
25. 2006年5月 ナショナルバイオリソースプロジェクトシンポジウム 「分裂酵母の



リバースプロテオミクスとケミカルゲノミクス」 吉田稔

26. 2006年6月 がん分子標的治療研究会総会 「化学療法を目指した酵母のケミカルゲノミクス」 吉田稔 (2006)
27. 2006年7月1日 Arrangement for Research Cooperation between the Institute of Physical and Chemical Research (RIKEN), Japan and Univerisite Louis Pasteur “From Chemical genetics to Chemical Genomics on Biologically Active Natural Products“ Yoshida, M.
28. 2006年8月11日 3<sup>rd</sup> –Japan-Finland Biotechnology Symposium “Chemical Biology of Natural Products Based on the Fission Yeast Reverse Proteomics“ Yoshida, M.
29. 2006年8月31日 3<sup>rd</sup> Interna “Cell Cycle Regulation of Small GTPase Rho1p through Phosphorylation of RhoGEFs in *Saccharomyces cerevisiae*“ tional Conference on Molecular Mechanism on fungal Cell Wall Biogenesis “Cell Cycle Regulation of Small GTPase Rho1p through Phosphorylation of RhoGEFs in *Saccharomyces cerevisiae*“ Ohya, Y.
30. 2006年9月 第65回日本癌学会学術総会：がん治療の認定医・専門医を目指す方のための3学会合同レクチャー「新しい創薬の展開」水上民夫
31. 2006年11月疾患プロテオミクス研究会第5回勉強会 「天然生理活性物質の化学遺伝学から化学ゲノミクスへの展開」吉田稔
32. 2006年12月21日 Biwako Bio Seminar From Genome to Business- Innovative Approach for Drug Discovery and Medicine “Chemical genetics merged with proteomics” Yoshida, M.
33. 2007年3月12日 The first International Fungal / Plant Cell Wall Meeting “Cell wall integrity checkpoint that monitors cell wall remodeling in *Saccharomyces cerevisiae*” Ohya, Y.
34. 2006年6月22日 20<sup>th</sup> IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology 11<sup>th</sup> FAOBMB Congress “Localizome: Global Analysis on Protein Localization in Fission Yeast” Arai, R., Yashiroda, Y., Matsuyama, A., Kamata, A., Watanabe, K., Shirai, A., Hiraoka, Y., Horinouchi, S., and Yoshida, M.
35. 2006年6月23日 20<sup>th</sup> IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology 11<sup>th</sup> FAOBMB Congress “A novel strategy to identify drug targets by using quantitative morphological traits of budding yeast” Nogami, S.
36. 2006年6月23日 20<sup>th</sup> IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology 11<sup>th</sup> FAOBMB Congress “Dynactin and its interacting molecules are involved in cell wall integrity checkpoint of *Saccharomyces*

*cerevisiae*”Kikuchi, Y.

37. 2006年6月23日 20<sup>th</sup> IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology 11<sup>th</sup> FAOBMB Congress “Quantitative morphological analyses of calcium-sensitive mutants of *Saccharomyces cerevisiae*” Ohnuki, S.
38. 2006年11月21~22日大阪大学蛋白研セミナー：生殖細胞形成と減数分裂 「ショウジョウバエの減数分裂を制御するカルシニューリンシグナル」 相垣敏郎
39. 2006年12月18日 ナショナルバイオリソースプロジェクト公開シンポジウム：ショウジョウバエ 「強制発現ベクター挿入システムを用いたショウジョウバエゲノムの機能解析」 相垣敏郎
40. 2006年6月20~23日 20<sup>th</sup> IUBMB “Expression of *lola* isoforms in *Drosophila*: complex patterns and a putative regulatory sequence conserved in *Anopheles gambiae*” Kuwa Terashima, Takayuki Horiuchi, Hilary Ranson, Natsuko Hagiwara, Takashi Matsuo, Toshiro Aigaki
41. 2006年6月20~23日 20<sup>th</sup> IUBMB “*dDLK*, a MAPKKK gene in *Drosophila*, regulates synaptic morphology through activation of JNK pathway” Taro Kaneuchi, Toru Togawa, Takashi Matsuo, Toshiro Aigaki
42. 2006年6月20~23日 20<sup>th</sup> IUBMB “Functional diversity of alternatively spliced *Lola* isoforms in *Drosophila*” Natsuko Hagiwara, Takayuki Horiuchi, Takashi Matsuo, Toshiro Aigaki
43. 2006年6月20~23日 20<sup>th</sup> IUBMB “The functional analysis of GDP-fucose in cell signaling performed by using *drosophila* *Gmd* null mutant” Tomonori Ayukawa, Hiroyuki O Ishikawa, Yukio Nakamura, Takeshi Sasamura, Toshiro Aigaki, Naoyuki Taniguchi
44. 2006年6月20~23日 20<sup>th</sup> IUBMB “*Grappa*, a new longevity gene in *Drosophila* Olivier List” Mihoko Tanaka, Yumi Umeda-Kameyama, Toru Togawa, Takashi Matsuo, Toshiro Aigaki
45. 2006年6月20~23日 20<sup>th</sup> IUBMB “Loss of *Sra*, a homolog of human *DSCR1*, induces locomotor hyperactivity in *Drosophila*” Shin Akahori, Satomi Takeo, Takashi Matsuo, Toshiro Aigaki
46. 2006年6月20~23日 20<sup>th</sup> IUBMB “The calcineurin regulator *Sra* plays an essential role in female meiosis in *Drosophila*” Satomi Takeo, Manabu Tsuda, Shin Akahori, Takashi Matsuo, Toshiro Aigaki
47. 2006年6月20~23日 20<sup>th</sup> IUBMB “A genetic screen to identify genes required for left-right asymmetry in *Drosophila melanogaster*” Reo Maeda, Shunya Hozumi, Kiichiro Taniguchi, Syuichi Shirakabe, Hiroo Fujiwara, Takeshi Sasamura, Toshiro Aigaki, Ryutaro Murakami, Kenji Matsuno

48. 2006年6月20~23日 20th IUBMB “The rearrangement of visceral musculature cells controlled by JNK signaling is involved in the left-right asymmetric looping of the anterior-midgut in *Drosophila*” Kiichiro Taniguchi, Shunya Hozumi, Reo Maeda, Shuichi Shirakabe, Hiroo Fujiwara, Sasamura Takeshi, Toshiro Aigaki, Kenji Matsuno
49. 2006年6月20~23日 20th IUBMB “Control of cellular morphogenesis by IKK $\epsilon$ , a negative regulator of F-actin assembly” Kenzi Oshima, Michiko Takeda, Toshiro Aigaki, Shigeo Hayashi
50. 2006年10月20日 分子細胞イメージングと疾患・創薬研究セミナーin神戸「一細胞発光測定で見えてきたもの ～概日時計システムの例～」
51. 2006年05月22日 SRBR (Society for Research on Biological Rhythms 10th Biennial Meeting) /Florida, USA “From Analysis to Synthesis of Mammalian Circadian Clocks”
52. 2006年10月09日 ICSB2006 (International Conference on Systems Biology) /Yokohama, Japan “Analysis and Synthesis of Circadian Clock”
53. 2006年06月22日 20th IUBMB (第20回国際生化学・分子生物学会議)「Analysis and Synthesis of Biological Networks」
54. 2006年07月13日 第4回COE研究討論会(神戸大学)「体内時計の解析と生成」
55. 2006年07月13日 SICe制御部門生物制御調査研究会第5回会合「Analysis and Synthesis of Mammalian Circadian Clocks」
56. 2006年08月12日 高度高熱菌丸ごと一匹プロジェクト「哺乳類体内時計の解析と生成Analysis and Synthesis of Mammalian Circadian Clocks」
57. 2006年08月24日 高遠・分子細胞生物学シンポジウム 第18回「哺乳類体内時計の解析と生成」
58. 2006年09月08日 第10回 Molecular Cardiovascular Conference「哺乳類体内時計の解析と生成～Analysis and Synthesis of Mammalian Circadian Clocks」
59. 2006年09月12日 日本バイオインフォマティクス学会関西地域部会第2回バイオメディカル研究会「生命システムの解析と生成」
60. 2006年10月18日 北大COE研究集会「生命リズムと振動子ネットワーク」 「哺乳類体内時計の解析と生成」
61. 2006年10月31日 武田薬品大阪研究所「システム生物学の現在：哺乳類体内時計解析と生成」
62. 2006年11月02日 IN Cell Users' Day 2006「動的で複雑な生命システム理解のための機能ゲノミクス」
63. 2006年11月18日 ゲノムひろば2006 in 京都「ゲノムセミナー」 「体内の時計を理解する」

64. 2006年11月21日 名古屋大学大学院 生命農学研究科「哺乳類の体内時計の解析と生成」
65. 2006年12月02日 第13回日本時間生物学会学術大会「Analysis and synthesis of circadian clocks」
66. 2006年12月06日 日本分子生物学会 2006フォーラム ランチョンセミナー「時計転写ネットワーク同定のための機能ゲノミクス」
67. 2006年12月11日 特許庁「Systems and Synthetic Biology:体内時計の解析と生成」
68. 2007年02月06日 奈良先端科学技術大学院大学 バイオサイエンス研究科「哺乳類体内時計の解析と生成Analysis and Synthesis of Mammalian Circadian Clocks」
69. 2007年03月17日 第71回日本循環器学会総会・学術集会「システムバイオロジーの現況」
70. 2007年03月20日 徳島大学ゲノム機能研究センター「Bioperturbation：光で生命現象を摂動・制御する」
71. 2006年6月16日 第10回がん分子標的治療研究会総会 「新規 GRP78 転写抑制物質 prunustatin に関する研究」 梅田幸子、千々和修平、新家一男
72. 2006年6月16日 第10回がん分子標的治療研究会総会 「テロメア G-tail を標的とした新規抗癌剤の開発」 田原栄俊、清宮啓之、新家一男、井出利憲
73. 2006年7月24日 ICOB-5 & ISCNP-25 IUPAC International Conference on Biodiversity and Natural Products (第25回天然物化学国際会議・第5回生物多様性国際会議) "Total synthesis of telomestatin" Takayuki Doi, Masahito Yoshida, Kazuo Shin-ya, and Takashi Takahashi
74. 2006年7月24日 ICOB-5 & ISCNP-25 IUPAC International Conference on Biodiversity and Natural Products "Total Synthesis of Telomestatin" (Poster) Takayuki Doi, Masahito Yoshida, Kazuo Shin-ya, Takashi Takahashi
75. 2006年7月25日 ICOB-5 & ISCNP-25 IUPAC International Conference on Biodiversity and Natural Products"Total Synthesis of Spiruchostatin A"(Poster) Yusuke Iijima, Takayuki Doi, A. Ganesan, Kazuo Shin-ya, Takashi Takahashi
76. 2006年11月5日～8日 International Conference of 43rd Japanese Peptide Symposium/ 4th Peptide Engineering Meeting "Total Synthesis of Spirichostatin" Yusuke Iijima, Takayuki Doi, A. Ganesan, Kazuo Shin-ya, Takashi Takahashi
77. 2006年11月5日～8日 International Conference of 43rd Japanese Peptide Symposium/ 4th Peptide Engineering Meeting "Total Synthesis of Telomestatin" Takayuki Doi, Masahito Yoshida, Kazuo Shin-ya, Takashi Takahashi
78. 2006年11月10日 18<sup>th</sup> EORTC-NCI-AACR meeting "New screening technology for development of effective anti-cancer drugs targeting telomere G-tail" Hidetoshi Tahara, Kazuo Shin-ya, Hiroyuki Seimiya, Toshinori Ide

<平成19年度>

1. 2007年4月18日 第5回理研・分子研合同シンポジウム エクストリームフォトニクス研究会 "New Fluorescent Probes and New Perspectives in Bioscience" 宮脇敦史
2. 2007年7月6日 第9回分子ダイナミック分光ワークショップ "蛍光タンパク質で拡がるライブイメージング技術" 宮脇敦史
3. 2007年7月8日 Gordon Conference on Calcium Signalling "Bio-sensors for calcium signaling" Atsushi Miyawaki
4. 2007年7月18日 25th JES Summer Seminar on Endocrinology & Metabolism "New Fluorescent Probes and New Perspectives in Bioscience" Atsushi Miyawaki
5. 2007年9月19日 第2回NIBBバイオイメージングフォーラム "New Fluorescent Probes and New Perspectives in Bioscience" 宮脇敦史
6. 2007年9月 EMBO Conference Series on the Assembly and Function of Neuronal Circuits "New Fluorescent Probes and New Perspectives in Bioscience" Atsushi Miyawaki
7. 2007年10月29日 Fluorescent Proteins and Biological Sensors "Innovations in fluorescence imaging of brain functions using fluorescent proteins" Atsushi Miyawaki,
8. 2008年2月 Nature Chemical Biology Symposium 2008: Chemical Neurobiology "New Fluorescent Probes and New Perspectives in Bioscience" Atsushi Miyawaki
9. 2007年6月 EMBO Practical Course: Imaging in 3D and the F-techniques:FRET, FCS, FLIM and FRAP "Dynamics and interaction of protein in living cell analysis by FCS" Masataka Kinjo
10. 2007年7月19日 第53回高分子夏季大学 「光相関分光法を用いた細胞内微環境の解析」 金城政孝
11. 2007年7月27日 産学官連携を指向した最前線セミナー「次世代バイオイメージングとしての蛍光相関分光法:分子間相互作用の解析による新たな医学研究の発展」 金城政孝
12. 2007年8月30日 日本分光学会第43回夏期セミナー「蛍光相関分光法」金城政孝
13. 2007年3月23日 2nd International Workshop on Cell Regulations in Division and Arrest "Dynactin and its interacting molecules are involved in cell wall integrity checkpoint of *Saccharomyces cerevisiae*" Ohya, Y.
14. 2007年4月東京大学大学院化学生命工学専攻講演会:化学とバイオの架け橋「ケミカルバイオロジーによるゲノム機能理解へのアプローチ」吉田稔
15. 2007年6月11日 4<sup>th</sup> International Fission Yeast Meeting "Reverse Proteomics and Chemical Genomics Based on Fission Yeast" Yoshida, M.

16. 2007年5月日本ヒトプロテオーム機構第5回大会「ゲノミクスを目指したリバースプロテオミクス」吉田稔
17. 2007年10月11-12日 International Symposium on Advanced Functional Genomics “Chemical Genetics Based on Fission Yeast ORFeome” Yoshida, M.
18. 2007年10月第45回日本癌治療学会総会 学術集会教育シンポジウム「がん先端医療の現在地～分子医薬開発～」水上民夫
19. 2007年11月18日 Symposium on Systems Biology Initiative “Chemical genomics to understand cell morphology of *Saccharomyces cerevisiae*” Ohya, Y.
20. 2008年3月15-17日 The 8th Korea-Japan Gerontologist Joint Meeting “Genes regulating body size, oxidative stress resistance and longevity in *Drosophila*. ” Aigaki, T.
21. 2008年2月味の素株式会社ライフサイエンス研究所セミナー「ショウジョウバエを用いた寿命関連遺伝子の探索と解析」相垣敏郎
22. 2007年9月(財)東京都精神医学総合研究所セミナー「カルシニューリン制御因子 DSCR1/Sra の機能解析」相垣敏郎
23. 2007年11月(財)東京都老人総合研究所セミナー「ショウジョウバエを用いた寿命遺伝子の探索」相垣敏郎
24. 2007年6月20-22日 第30回日本基礎老化学会「ショウジョウバエを用いた寿命遺伝子の探索」相垣敏郎、外川徹、金内太郎、福田隆之、船越政史、松尾隆嗣、津田学、村松圭吾
25. 2007年7月2-4日 JDRC8 “Genetic Analysis of lipB Encoding Lipoyltransferase in *Drosophila*” Yoshihito Kishita, Manabu Tsuda, Takayuki Fukuda, Takashi Matsuo, and Toshiro Aigaki.
26. 2007年7月2-4日 JDRC8 “Functional Analysis of Insulin Degrading Enzyme (Ide) in *Drosophila*” Toshikazu Kobayashi, Manabu Tsuda, Mizue Tomita, Takashi Matsuo, and Toshiro Aigaki.
27. 2007年7月2-4日 JDRC8 “*Drosophila* Rap2 Regulates Testes and Oocytes Morphogenesis via Organizing Actin Filaments” Naomasa Miyata, Takashi Matsuo, and Toshiro Aigaki.
28. 2007年7月2-4日 JDRC8 “Role of Calcineurin Signaling in Female Meiosis” Hironobu Nakamura, Saomi Takeo, Takashi Matsuo, Toshiro Aigaki.
29. 2007年7月2-4日 JDRC8 “Nutrient-Dependent Life Span in *Drosophila*” Mizue Tomita, Manabu Tsuda, Yukiko Sato, and Toshiro Aigaki.
30. 2007年7月2-4日 JDRC8 “Application of *Drosophila* Genetics to Studies on the Molecular Basis of Endosymbiosis and Reproductive in Insects” Hisashi Anbutsu, Toshiro Aigaki, and Takema Fukatsu.

31. 2007年7月2-4日 JDRC8 “Functions and Regulation of Lola Isoforms” Hillary Liesching, et al.
32. 2007年7月2-4日 JDRC8 “Thioredoxin Suppresses Pael-R/Polyglutamine-Induced Neurotoxicity and Extends Longevity in Drosophila” Manabu Tsuda, et al.
33. 2007年7月2-4日 JDRC8 “Evolution of the Odorant-binding protein 57d/e Expression Pattern in the Drosophila melanogaster Species Group” Jyunichiro Yasukawa, Sachiko Tomioka, Toshiro Aigaki, Takashi Matsuo.
34. 2007年7月2-4日 JDRC8 “Caps and Trn Control Homophilic Cell Recognition Required for Segment Boundary Refinement in Drosophila Leg” Kayoko Tsuda-Sakurai, Tetsuya Kojima, Satoshi Goto, Toshiro Aigaki, and Shigeo Hayashi.
35. 2007年7月2-4日 JDRC8 “D-JNK Signaling in Circular Visceral Muscle Cells Controls the Left-right Asymmetric Development of the Anterior-midgut in Drosophila” Kiichiro Taniguchi, et al.
36. 2007年7月2-4日 JDRC8 “Involvement of the Drosophila Calcineurin B2 Gene in Long-term Courtship Memory” Tasuhiro Nakai, Toshiro Aigaki, Takaomi Sakai.
37. 2007年7月2-4日 JDRC8 “Sra/DSCR1 regulates sleep in Drosophila” Hiroshi Negishi, et al.
38. 2007年7月2-4日 JDRC8 “Mitochondrial Protein Preli-like Regulates Development and Maintenance of Dendritic Trees of Drosophila Sensory Neurons” Asako Tsubouchi, Taiichi Tsuyama, Toshiro Aigaki, and Tadashi Uemura
39. 2007年9月12-14日 EDRC2007 “STRUCTURES AND FUNCTIONAL PROPERTIES OF P{GS} VECTORS AND INSERTIONS” Aigaki T, et al.
40. 2007年9月12-14日 EDRC2007 “THE IMPORTANCE OF CONTROLLING MITOCHONDRIAL FUSION IN GENERATION AND MAINTENANCE OF DENDRITIC BRANCHES” Uemura T, Tsubouchi A, Tsuyama , and Aigaki
41. 2007年12月11日 BMB2007(第30回日本分子生物学会年会) 「ビタミンC合成不全マウスを用いたin vivoビタミンC抗酸化能の検討」 天野晶子、近藤嘉高、佐藤安訓、町田武夫、相垣敏郎、丸山直記、石神昭人
42. 2007年12月13日 BMB2007(第30回日本分子生物学会年会) 「ショウジョウバエの寿命と体の大きさを制御する新規遺伝子」 船越政史、村松圭吾、津田学、初田浩志、森下真一、相垣敏郎
43. 2007年12月13日 BMB2007(第30回日本分子生物学会年会) 「ショウジョウバエ・モデルを用いた新規疾患関連遺伝子候補の同定とその機能解析」 臼井隆雄、奥田貴之、石川裕之、中山実、相垣敏郎、松野健治

44. 2007年12月14日 BMB2007(第30回日本分子生物学会年会)「ショウジョウバエを用いた新規の $\gamma$ -セクレターゼ調節因子の探索」 青山尚規、佐々木未沙子、吉田祐果、松野健治、相垣敏郎
45. 2007年12月14日 BMB2007(第30回日本分子生物学会年会)「ミトコンドリアタンパク質Preli-likeを介するショウジョウバエ末梢神経の樹状突起形成・維持機構」坪内朝子、津山泰一、相垣敏郎、上村匡
46. 2008年1月5-8日 2nd Genetic Analysis: Model Organisms to Human Biology “A large scale screen for genes affecting oxidative stress resistance, body size, and longevity in *Drosophila*” Toshiro Aigaki, Keigo Muramatsu, Toru Togawa, Manabu Tsuda, Yukiko Sato, Masabumi Funakoshi, Hiroshi Hatsuta, Shinichi Morishita.
47. 2008年3月6-7日 特定ゲノム4領域・第二回昆虫ゲノム研究会「Questions about a large gene: *Drosophila lola*」 Hillary Liesching, et al.
48. 2008年1月5-8日 2nd Genetic Analysis: Model Organisms to Human Biology “A large scale screen for genes affecting oxidative stress resistance, body size, and longevity in *Drosophila*” Aigaki T, Muramatsu K, Togawa T, Tsuda M, Sato Y, Funakoshi M, Hatsuta H, Morishita S. (2008)
49. 2007年05月30日 Cold Spring Harbor Laboratory 72nd Symposium: Clocks & Rhythms meeting /NY, USA “CONTROL AND DESIGN OF MAMMALIAN CLOCKS”
50. 2007年06月26日 Synthetic Biology 3.0 Conference in Zurich /Zurich, Switzerland “CONTROL AND DESIGN OF MAMMALIAN CLOCKS”
51. 2007年07月10日 KITP Program: Biological Switches and Clocks /Santa Barbara, USA “The Underlying Mechanism for Singularity Behavior of Circadian Clock”
52. 2007年05月30日 9th Functional Genomics: Synthetic Biology /Göteborg, Sweden “Control and design of mammalian clocks”
53. 2007年05月29日 第40回日本発生生物学会・第59回日本細胞生物学会 合同大会「細胞集団の振る舞いとして理解する概日時計」
54. 2007年09月06日 Joint Forum (Institute for Frontier Medical Sciences, Kyoto University, Institute of Molecular Embryology and Genetics, Kumamoto University, Keio University School of Medicine, RIKEN CDB)「The solution to one of longstanding and unsolved problems in circadian biology」
55. 2007年09月27日 (財)大阪バイオサイエンス研究所「哺乳類体内時計の解析と生成～ Analysis and Synthesis of Mammalian Circadian Clocks」
56. 2007年10月10日 FAT-DM (Future of Atherosclerosis, Hypertension and Diabetes mellitus) 研究会「体内時計のシステムバイオロジー」



57. 2007年10月18日 新産業を創る先端科学技術フォーラム2007「生命の仕組みを紐解く科学技術：体内時計を例に」
58. 2007年10月23日 Indo-JSPS-CDB Joint Meeting「Identify, Control and Design Cellular Clocks」
59. 2007年10月23日 慶應義塾大学先端生命科学研究所「体内時計のシステムバイオロジー」
60. 2007年11月14日 KAST（神奈川科学技術アカデミー）教育講座「体内時計解明のシステムバイオロジー」
61. 2007年11月28日 Pasteur CDB joint meeting「Control and Design of Mammalian Circadian Clocks」
62. 2007年12月08日 第19回分子糖尿病学シンポジウム「動的で複雑な生命システム理解のための機能ゲノミクス」
63. 2007年12月11日 第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会合同大会（BMB2007）「哺乳類体内時計の制御と設計」
64. 2008年01月20日 理研サイエンスセミナー「1000年でも2000年でも生きたい～体内時計がにぎる鍵～」
65. 2008年01月22日 財団法人国際科学技術財団「やさしい科学技術セミナー」「体内時計：社会の時間と私の時間」
66. 2008年01月29日 CNRS-INSERM-University (France)「Analysis and Synthesis of Mammalian Circadian Clocks」
67. 2008年02月02日 Cardiovascular Translational Research Conference 4th「体内の時間を制御する」
68. 2008年02月08日 国立大学法人九州大学 生体防御医学研究所「哺乳類体内時計のシステム生物学」
69. 2008年02月22日 赤坂精神医学懇話会「体内時計—社会の時間と私の時間」
70. 2008年02月29日 東北大学加齢医学研究所附属ゲノムリサーチセンター シンポジウム「哺乳類体内時計のネットワーク」
71. 2007年9月19日 創薬薬理フォーラム 第15回シンポジウム「新規分子シャペロン GRP78発現抑制物質versipelostatin—固形癌選択的抗腫瘍剤としての可能性—」新家一男
72. 2007年6月20日 Max-Planck Institute Seminar "Antitumor compounds of microbial origin" Kazuo Shin-y
73. 2007年3月28日 日本化学会 第87春季年会プログラム(2007)「固相合成法を用いたスピルコスタチンAおよび誘導体の合成」飯島悠介、土井隆行、Ganesan, A、新家一男、高橋孝志
74. 2007年3月28日 日本化学会 第87春季年会プログラム(2007)「(R)-および(S)-

テロメスタチンの全合成 (1)ーマクロラクタム化反応を用いた 24 員環化合物の合成」  
土井隆行、柴田和朗、吉田将人、新家一男、高橋孝志

75. 2007 年 3 月 28 日 日本化学会 第 87 春季年会プログラム (2007) 「(R)-および(S)-  
テロメスタチンの全合成 (2)」土井隆行、柴田和朗、吉田将人、新家一男、高橋孝志
76. 2007 年 3 月 28 日 日本化学会 第 87 春季年会プログラム (2007) 「テロメスタチ  
ンをリードとした新規 G-quadruplex ligand の合成研究」石塚大倫、寺正行、新家一  
男、長澤和夫
77. 2007 年 7 月 5 日 第 11 回 がん分子標的治療研究会総会「小胞体ストレス応答阻害  
剤を用いたがん細胞における遺伝子発現解析」齋藤さかえ、新家一男、鶴尾隆、富田  
章弘
78. 2007 年 8 月 1 日 第 27 回日本糖質学会年会「直接的グリコシル化反応を利用した立体  
選択的デオキシオリゴ糖の合成研究」吉澤篤、田中浩士、千々和修平、新家一男、高  
橋孝志
79. 2007 年 9 月 27 日 日本化学会第 1 回関東支部大会 (2007) 「テロメスタチンをリード  
とした DNA インターカレーター の合成と配列選択性の評価」寺正行、石塚大倫、高  
木基樹、新家一男、長澤和夫
80. 2007 年 10 月 4 日 第 66 回 日本癌学会総会”Chemical genomics analysis of unfolded  
protein response inhibitors in cancer cells” Sakae Saito, Kazuo Shin-ya, Takashi  
Tsuruo, Akihiro Tomida
81. 2007 年 11 月 28 日 第 26 回 メディシナルケミストリーシンポジウム「固相合成法を活用  
したスピルコスタチン A の全合成」土井隆行、飯島悠介、宗像麻未, A. Ganesan、新  
家一男、高橋孝志
82. 2007 年 9 月 21 日 第 49 回天然有機化合物討論会「スピルコスタチン A の全合成と結合  
タンパク質ネットワーク解析」土井隆行、飯島悠介、宗像麻未、高橋孝志、Ganesan  
A、新家一男、千々和修平、家村俊一郎、夏目徹
83. 2007 年 5 月 12 日 第 53 回有機合成化学協会関東支部シンポジウム「(R)-および(S)-テ  
ロメスタチンの全合成」柴田和朗、吉田将人、新家一男、土井隆行、高橋孝志

#### <平成 20 年度>

1. 2008 年 4 月 Focus on Microscopy 2008 “New fluorescent probes and new  
perspectives in bioscience” Atsushi Miyawaki, Asako Sakaue-Sawano, Ryoko Ando,  
Hideaki Mizuno, Takako Kogure, Hiroshi Kurokawa, Mayu Sugiyama, Kaoru  
Sugimura
2. 2008 年 3 月 日本農芸化学会 2008 年度大会「フォワードケミカルゲノミクス～天然  
生理活性物質の細胞内標的解明に向けて～」吉田稔
3. 2008 年 3 月 日本農芸化学会 2008 年度大会「リバースケミカルゲノミクス：致死遺

伝子の網羅的解析とそれを用いた薬剤探索」八代田陽子、吉田稔

4. 2008年3月 日本化学会第88回春季年会「ケミカルジェネティクスによる新規標的分子の発見と展開」吉田稔
5. 2008年04月12日 ESF-UB conference in Biomedicine "SYSTEMS BIOLOGY" /Sant Feliu de Guixols, Spain “SYSTEMS BIOLOGY OF MAMMALIAN CIRCADIAN CLOCKS”
6. 2008年04月19日 6th NIBB-EMBL Joint Meeting "Systems Biology and Functional Genomics"/Barcelona, Spain “Systems Biology of Mammalian Circadian Clocks”
7. 2008年05月20日 SRBR(Society for Research on Biological Rhythms 10th Biennial Meeting) / Florida, USA “Systems Biology of Mammalian Circadian Clocks”
8. 2008年03月26日 第85回日本生理学会大会「体内時計のシステムバイオロジー - Systems Biology of Mammalian Circadian Clocks」
9. 2008年3月27日 2008年度日本農芸化学会 「*Streptomyces roseolilacinus* NBRC 12815が産生するチロシナーゼ阻害物質」安齋こずえ、中島琢自、桑原奈津美、宮道慎二、小牧久幸、高木基樹、新家一男、原山重明、安藤勝彦
10. 2008年3月26日 日本薬学会第128回年会 「固相合成法を活用したスピルコスタチンAの全合成」土井隆行、飯島悠介、宗像麻未、A. Ganesan、新家一男、高橋孝志
11. 2008年3月28日 日本化学会 第88回春季年会プログラム(2008)「直接的かつ立体選択的グリコシル化反応を用いた糖鎖変換型Versipelostatin誘導体の合成研究」吉澤篤、田中浩士、千々和修平、新家一男、高橋孝志
12. 2008年3月28日 日本化学会 第88回春季年会プログラム(2008) 「環状テンプレートを基盤としたテロメスタチン誘導体合成に関する研究」柴田和朗、吉田将人、高木基樹、新家一男、土井隆行、高橋孝志
13. 2008年3月28日 日本化学会 第88回春季年会プログラム(2008)「テロメスタチンをリードとした大環状ヘキサオキサゾール(6OTD)誘導体の合成とG-quadruplex安定化の評価」寺正行、高木基樹、新家一男、長澤和夫
14. 2008年3月28日 日本化学会 第88回春季年会プログラム(2008)「テロメスタチン骨格を有する大環状ヘキサオキサゾール(6OTD)2量体化合物の合成と活性評価」飯田圭介、寺正行、高木基樹、新家一男、長澤和夫
15. 2008年3月28日 日本化学会 第88回春季年会プログラム(2008)「環状ヘプタオキサゾール(7OTD)誘導体の合成と活性評価」石塚大倫、寺正行、土井隆行、高木基樹、新家一男、長澤和夫
16. 2008年3月28日 日本化学会 第88回春季年会プログラム(2008)「アルケンクロスメタセシス反応を用いたTrapoxin誘導体の合成研究」土井隆行、田中隼人、高木基樹、

新家一男、高橋孝志

<平成21年度>

1. 2010年02月09日、8th AACR-JCA Joint meeting、Waikoloa, Hawaii、JBIR-23, a novel compound of microbial origin, induces cytotoxicity against malignant mesothelioma cells by tubulin polymerization and apoptosis、新家一男、村上秀樹、Hwang Ji-Hwan、関戸好孝、高木基樹
2. 2010年02月03日、AACR Cell Death Mechanisms and Cancer Therapy、San Diego、JBIR-23, a novel compound of microbial origin, induces cytotoxicity against malignant mesothelioma cells by tubulin polymerization and apoptosis、高木基樹、村上秀樹、Hwang Ji-Hwan、関戸好孝、新家一男
3. 2010年03月28日、2010年日本農芸化学会総会、東京、海綿由来の放線菌より単離した新規anthracycline、本橋慶一郎、高木基樹、新家一男
4. 2010年03月28日、2010年日本農芸化学会総会、東京、プロテアソーム形成を阻害する化合物JBIR-22に関する研究、泉川美穂、橋本絢子、広川貴次、杉本聡、加藤平、高木基樹、新家一男
5. 2010年03月28日、日本農芸化学会総会、東京、新規GRP78発現抑制物質JBIR-52に関する研究、小曾根郁子、上田純也、高木基樹、新家一男
6. 2010年3月18日、第9回日本再生医療学会総会、広島、iPS細胞誘導遺伝子の発現を上昇させる天然物化合物のスクリーニング、橋本絢子、今西哲、Hwang Ji-Hwan、向井啓、安藤太一、曾根史岳、今本文男、高木基樹、新家一男
7. 2009年10月8日、天然有機化合物討論会、名古屋、新種の*Streptomyces*属から単離された新規化合物に関する研究、本橋慶一郎、Tabrez Shams Khan、小牧久幸、小曾根育子、向井啓、高木基樹、新家一男

<平成22年度>

1. 2010年11月22日、マリンバイオテクノロジー学会懇談会、早稲田大学医・理・工融合生命研究センター、TWIns天然物の魅力と問題点、次世代天然物化学への展開、平成22年度 新家 一男、

研究開発項目⑥

化合物等の高機能化技術の開発

<平成18年度>

1. 2006年6月 前期(春季)有機合成化学講習会「天然物合成におけるラボオートメー

ション」高橋孝志

2. 2006年6月 瀋陽大学ソウル大学交流会「天然物ライブラリー構築」高橋孝志
3. 2006年4月 The 8<sup>th</sup> International Symposium on Organic Reactions “The Total Synthesis of Taxol Utilizing an Automated Synthesizer”,高橋孝志
4. 2006年6月 日本化学会関東支部講習会「コンビナトリアル化学：化合物ライブラリー合成の最近の動向」 土井隆行
5. 2006年7月 有機合成化学静岡シンポジウム 「環状生理活性天然物の全合成と誘導体ライブラリーの合成研究」 土井隆行
6. 2006年7月 千葉大学理学部講演会 「天然物の骨格合成を基盤とするコンビナトリアルライブラリー構築法の開発」土井隆行
7. 2006年11月9日 第90有機合成化学シンポジウム 「パラジウム触媒を用いたカルボニル化-環化反応を基盤とする環状ペプチド合成」 上岡正児, 島津さやか, 土井隆行, 高橋孝志
8. 2006年12月 明治薬科大学若手講演会「生理活性天然物の全合成研究, —タキソール, アプラトキシニンA—」 土井隆行
9. 2006年12月 東工大21世紀COEプログラム<化学分野>「大環状生理活性天然物の全合成」 土井隆行
10. 2006年7月2日 12th international conference on polymers and organic chemistry, poster "Polymer-assisted solution-phase synthesis of 15-deoxy- $\Delta$ 12,14-PGJ2 Derivatives and their neurite outgrowth-promoting activity" Tanaka H, Oe S, Hasegawa T, Nakahara H, Kita N, Shibata T, Ojika M, Uchida K, Takahashi T
11. 2006年7月24日 ICOB-5 & ISCNP-25 IUPAC international conference on biodiversity and natural products "Total synthesis of telomestatin" Doi T, Yoshida M, Shin-ya K, Takahashi T
12. 2006年7月25日 ICOB-5 & ISCNP-25 IUPAC international conference on biodiversity and natural products "Total synthesis of spiruchostatin A" Iijima Y, Doi T, Ganesan A, Shin-ya K, Takahashi T
13. 2006年7月25日 ICOB-5 & ISCNP-25 IUPAC international conference on biodiversity and natural products "Polymer-assisted solution-phase synthesis of 15-deoxy- $\delta$ 12,14-PGJ2 Derivatives and their neurite outgrowth-promoting activity" Tanaka H, Oe S, Hasegawa T, Nakahara H, Kita N, Shibata T, Ojika M, Uchida K, Takahashi T
14. 2006年10月16日 1st international conference on cutting-edge organic chemistry in Asia, invited lecture "Solid- and solution-phase synthesis of combinatorial natural product-based small molecule libraries" Takahashi T

15. 2006年11月5日 International conference of 43rd Japanese Peptide Symposium/4th peptide engineering meeting "Total synthesis of spiruchostatin A" Iijima Y, Doi T, Ganesan A, Shin-ya K, Takahashi T
16. 2006年11月5日 International conference of 43rd Japanese Peptide Symposium/4th peptide engineering meeting, poster "Total synthesis of telomestatin" Doi T, Yoshida M, Shin-ya K, Takahashi T
17. 2006年11月13日~17日 The Tenth International Kyoto Conference on New Aspects of Organic Chemistry (IKCOC-10) "Total Synthesis of Apratoxin A" T. Doi, Y. Numajiri, A. Munakata, T. Takahashi
18. 2006年11月9日~10日 第90回有機合成シンポジウム「パラジウム触媒を用いたカルボニル化-環化反応を基盤とする環状ペプチド合成」上岡正児、島津さやか、土井隆行、高橋孝志
19. 2006年10月11日~13日 第48回天然有機化合物討論会「 $\alpha(2,8)$ および $\alpha(2,9)$ オリゴシアル酸の立体選択的合成法の開発」田中浩士、西浦祐二、高橋孝志
20. 2006年9月26日~27日 第23回コンビケム研究会「ワンポットグリコシル化と固相脱保護法を利用した糖鎖ライブラリーの自動合成研究」石田匡祐、的場宣篤、塚本裕一、山田晴夫、田中浩士、高橋孝志
21. 2006年8月27日~8月30日 第5回国際シアロ糖鎖科学会議「Stereoselective Synthesis of Oligo- $\alpha(2,8)$  and  $\alpha(2,9)$  Sialic Acids」Hiroshi Tanaka, Yuji Nishiura, and Takashi Takahashi
22. 2006年8月23日~8月25日 第26回日本糖質学会年会「環状保護基を有するシアル酸糖供与体を用いた立体選択的 $\alpha(2,8)$ -オリゴシアル酸の合成」西浦祐二、田中浩士、高橋孝志
23. 2006年6月12日~6月14日「アプラトキシニンAの全合成」第89回有機合成シンポジウム、土井隆行、沼尻佳孝、宗像麻未、高橋孝志
24. 2006年6月12日~6月14日「直接的グリコシル化反応を用いた $\beta$ -2、6-ジデオキシオリゴ糖の合成研究」第51回有機合成化学協会関東支部シンポジウム、田中浩士、吉澤篤、高橋孝志
25. 2006年5月10~12日 International Conference on Microtechnologies on Medicine and Biology Hiroaki Suga
26. 2006年5月30~31日 Canadian Chemical Society International Conference "Advances in Nucleic Acid Chemistry" Hiroaki Suga
27. 2006年7月3~5日 天然物化学談話会 菅裕明
28. 2006年7月15~21日 Gordon Research Conference "Enzymes, Co-factors, and Metabolic Pathways" Hiroaki Suga

29. 2006年7月30日～8月4日 Gordon Research Conference “Bioorganic Chemistry”  
Hiroaki Suga
30. 2006年9月19日～20日 大阪大学21世紀COE産研国際会議、菅裕明
31. 2006年9月27日 第23回コンビケム研究会 菅裕明
32. 2006年9月28日 東京大学・ルイパストゥール大学合同シンポジウム 菅裕明
33. 2006年10月1日～6日 AARS meeting 2006 “Ribosomal incorporation of various  
N-acyl amino acids into the N-terminus of peptides“ Goto Y., Ashigai H., Sako Y.,  
Murakami, H., Suga, H.

<平成19年度>

1. 2007年2月 第4回日本カテキン学会総会「コンビナトリアル化学およびラボオート  
メーション技術を利用するエピカテキン類縁体の合成研究」 高橋孝志,田中浩士
2. 2007年2月 第5回バイオ計測研究会「コンビナトリアル合成とラボオートメーション」高橋孝志
3. 2006年10月 第1回アジア最先端有機化学国際会議“Solid- and Solution-Phase  
Syntheses of Combinatorial Natural Product-Based Small Molecule Libraries”高  
橋孝志
4. 2007年9月4日 2<sup>nd</sup> International Conference on Cutting-Edge Organic  
Chemistry in Asia “Total Synthesis of Natural Product and Biological Evaluation  
of Its Library” T. Doi
5. 2007年6月“Combinatorial Synthesis and Biological Evaluation of Cyclic Peptidic  
Natural Products” T. Doi
6. 2007年11月 有機合成化学講習会「生理活性天然有機化合物の合成を基盤とする生体  
制御化合物の探索」土井隆行
7. 2007年12月3日 The Takeda Science Foundation Symposium on PharmaSciences  
“Total synthesis and biological evaluation of telomestatin and its derivatives“Doi  
T, Yoshida M, Shibata K, Takagi M, Shin-ya K, Takahashi T
8. 2007年11月28日 第26回メディシナルケミストリーシンポジウム「固相合成法を活  
用したスピルコスタチンAの全合成」土井隆行, 飯島悠介, 宗像麻未, Ganesan A, 新  
家一男, 高橋孝志
9. 2007年11月8日 第90回有機合成シンポジウム「固相担持糖供与体を用いたグリコシ  
ル化反応の開発とバンコマイシン誘導体合成への応用」 金原篤, 井上仁史, 土井隆  
行, 高橋孝志
10. 2007年11月7日 第44回ペプチド討論会「Total synthesis of apratoxin A」  
Doi T, Numajiri Y, Munakata A, Takahashi T
11. 2007年9月27日 第25回コンビナトリアルケミストリー研究会「エピガロカテキンガ

レート類縁体の固相ライブラリー合成法の開発」田中浩士, 三好晴子, 北出誠, 高橋孝志

12. 2007年9月21日 第49回天然有機化合物討論会「スピルコスタチンAの全合成と結合タンパク質ネットワーク解析」土井隆行, 飯島悠介, 宗像麻未, 高橋孝志, Ganesan A, 新家一男, 千々和修平, 家村俊一郎, 夏目徹, Doi T
13. 2007年7月15日 Eurocombi-4 “Donor-bound glycosylation: Semisynthesis of vancomycin“ Doi T, Kinbara A, Takahashi T
14. 2007年6月27日 8th Tetrahedron symposium“Total synthesis of (R)-telomestatin“ Doi T, Yoshida Y, Shin-ya K, Takahashi T
15. 2007年5月11日 第53回有機合成化学協会関東支部シンポジウム 「(R)-および(S)-テロメスタチンの全合成」柴田和朗, 吉田将人, 新家一男, 土井隆行, 高橋孝志
16. 2007年8月1日～8月3日 第27回日本糖質学会年会「直接的グリコシル化反応を利用した立体選択的デオキシオリゴ糖の合成研究」吉澤 篤、田中浩士、千々和修平、新家一男、高橋孝志
17. 2007年6月12日～13日 第91回有機合成シンポジウム 「糖質を基盤とした分子イメージングプローブの開発—骨シンチグラフィ用プローブの合成研究—」田中浩士、安藤吉勇、阿部 務、高橋孝志
18. 2007年5月11日 第53回有機合成化学協会関東支部シンポジウム 「(R)-および(S)-テロメスタチンの全合成」柴田和朗、吉田将人、新家一男、土井隆行、高橋孝志
19. 2007年11月7日～9日 第44回ペプチド討論会「アプラトキシンAの全合成および誘導体合成を指向した固相合成法に関する研究」、土井隆行、沼尻佳孝、宗像麻未、高橋孝志
20. 2007年4月24日 第24回コンビケム研究会「新規水溶性テンプレートを利用した骨シンチグラフィ用分子プローブの合成」、安藤吉勇、田中浩士、阿部務、高橋孝志
21. 2007年6月 Tetrahedron-symposium “Glycosidation of a Solid-Supported Glycosyl Imidate Donor Using a Phenylsulfonate Traceless Linker: Application to the Synthesis of Vancomycin Derivatives” A. Kinbara, T. Doi, T. Takahashi
22. 2007年7月 Eurocombi-4 “A Combinatorial Synthesis of RGD Cyclic Peptide Library Utilizing a Palladium-catalyzed Carbonylative Cyclization on a Polymer Support” S. Kamioka, S. Shimazu, T. Doi, T. Takahashi
23. 2007年5月14日 Protein Engineering Summit“Ribosomal synthesis of non-standard peptides and their therapeutic application“ Hiroaki Suga
24. 2007年5月24日 第7回日本蛋白質科学会年会「遺伝暗号リプログラミングとケミカルバイオへの展開」菅 裕明
25. 2007年6月22日 EMBO Workshop, Chemistry and Biochemistry of Enzyme Catalysis by Biological Systems “Ribosomal synthesis of non-standard



peptides“ Hiroaki Suga

26. 2007年6月25日 EPFEL Chemical Biology Symposium“Ribosomal synthesis of non-standard peptides“ Hiroaki Suga
27. 2007年7月6日 50th Annual Meeting, Systems and Chemical Biology, Canadian Society of Biochemistry, Molecular & Cellular Biology “Ribosomal synthesis of non-standard peptides“ Hiroaki Suga
28. 2007年9月15日 東京大学生命化学ネットワークシンポジウム「遺伝暗号リプログラミングを駆使した新創薬技術RAPIDシステムの創成」菅裕明
29. 2007年11月8日 5th Anniversary Congress of International Drug Discovery Science and Technology“Ribosomal synthesis of non-standard peptides“ Hiroaki Suga
30. 2007年11月22日 JSPS Forum“Ribosomal synthesis of non-standard peptides“ Hiroaki Suga
31. 2007年11月27日 日本バイオマテリアル学会大会シンポジウム「遺伝子工学によるバイオマテリアルの合理的設計」村上裕、菅裕明
32. 2007年11月29日 ポリマー材料フォーラム「翻訳系を用いたポリエステルのプログラム合成」菅裕明

<平成20年度>

1. 2008年4月 第26回 Combinatorial Chemistry 研究会「ラボオートメーションを利用する天然物合成」高橋孝志
2. 2008年4月 第26回コンビケム研究会「固相合成法を用いた環状ペプチドライブラリーの合成」土井隆行
3. 2008年5月19日 日本ケミカルバイオロジー研究会 「スピルコスタチンAの全合成と結合タンパク質ネットワーク解析」布施新一郎、土井隆行、飯島悠介、宗像麻未、高橋孝志、Ganesan, A.、新家一男、千々和修平、家村俊一郎、夏目徹
4. 2008年6月 生体機能分子シンポジウム「環状ペプチド天然物の全合成と機能解明に向けたアプローチ」土井隆行
5. 2008年6月, 17th International Conference on Organic Synthesis (ICOS-17), “Michael Addition of Silyl Ketene Acetal to 2-Pyridinone Derivatives: Reactivity and Application to Synthetic Study of Awajanomycin”, Hiroya K, Kawamoto K, Inamoto K, Doi T
6. 2008年5月19日 日本ケミカルバイオロジー研究会「シンポジウムA：新バイオツール」菅裕明
7. 2008年6月6日 第7回新規素材探索研究会セミナー「特殊ペプチド医薬の翻訳プログラム合成」菅裕明

8. 2008年6月7日 第56回日本化学療法学会総会「Quorum-sensing アンタゴニストによる緑膿菌バイオフィーム形成阻害と剥離」菅裕明
9. 2008年6月18日 前期有機合成化学講習会「特殊ペプチドのプログラム翻訳合成から創薬へ」菅裕明
10. 2008年7月29日 日本ヒトプロテオーム機構第6回大会「生理活性天然物環状デブシペプチドのコンビナトリアル合成」土井隆行
11. 2008年9月, The 22nd Naito Conference on Chemical Biology, "Total Syntheses of (*R*)- and (*S*)-Telomestatin and its Biological Evaluation", Yoshida M, Shibata K, Takagi M, Shin-ya K, Takahashi T, Doi T
12. 2008年9月24日 第27回コンビケム研究会「ラボオートメーション技術を利用する9員環エンジン分子の合成研究」田中義一、布施新一郎、田中浩士、土井隆行、高橋孝志
13. 2008年9月30日 第50回天然有機化合物討論会「2-ピリジノン誘導体の官能基化法の開発と含窒素天然物合成への応用」廣谷功、川本啓、稲本浄文、土井隆行
14. 2008年10月4日 薬学会東北支部若手講演会「生理活性天然物の誘導体合成法の開発と機能解明に向けたアプローチ」土井隆行
15. 2008年10月11日 平成20年度化学系学協会東北大会「パラジウム触媒反応を用いた固相合成法の開発とコンビナトリアル合成」土井隆行
16. 2008年11月4日 第34回反応と合成の進歩シンポジウム「(*R*)-および(*S*)-テロメスタチンの全合成」吉田将人、柴田和朗、高橋孝志、高木基樹、新家一男、土井隆行
17. 2008年11月21日 第38回複素環化学討論会「パラジウム触媒炭素-水素結合活性化を利用する効率的含硫黄複素環化合物構築法の開発」稲本浄文、荒井ゆかり、長谷川千紗、廣谷功、土井隆行
18. 2009年3月26日 日本薬学会第129年会「ライブラリー構築を指向した固相法による Destruxin E の全合成研究」吉田将人、竹内久征、土井隆行
19. 2009年3月27日 日本薬学会第129年会「固相法を利用したスタチン誘導体ライブラリーの合成研究」吉田将人、菊池一輝、土井隆行
20. 2009年3月27日 日本化学会第89春季年会「環状ペプチド天然物の全合成と機能解明に向けたアプローチ」
21. 2009年3月28日 日本化学会第89春季年会「DNA塩基配列認識部位を有する9員環エンジン化合物の合成研究」田中義一、布施新一郎、田中浩士、土井隆行、高橋孝志
22. 2008年6月26日 Nanyang Technological University, Singapore "Genetic code reprogramming for the discovery of a novel class of peptide drug leads" Hiroaki Suga
23. 2008年8月28日 The 17th International Meeting of Methods in Protein Structural

- Analysis, Sapporo, Japan “Genetic code reprogramming for the discovery of a novel class of peptide drug leads” Hiroaki Suga
24. 2008年9月11日 Aminoacyl-tRNA Synthetase Meeting 2008, Veyrier du Lac, France  
“Genetic code reprogramming for the discovery of a novel class of peptide drug leads” Hiroaki Suga
  25. 2008年9月16日 International Symposium on Molecular Recognition of DNA: Biological Applications, Tokyo, Japan “Genetic code reprogramming for the discovery of a novel class of peptide drug leads” Hiroaki Suga
  26. 2008年10月30日 Japanese-German Frontier of Science, Heidelberg, Germany  
“Genetic codereprogramming for the discovery of a novel class of peptide drug leads” Hiroaki Suga
  27. 2008年11月12日 RIKEN International Conference in Chemical Biology, Narita, Japan “Genetic code reprogramming for the discovery of a novel class of peptide drug leads” Hiroaki Suga
  28. 2009年1月8日 ETH Zurich, Departmental Seminar in Organic Chemistry, Zurich, Switzerland “Genetic code reprogramming for the discovery of a novel class of peptide drug leads” Hiroaki Suga
  29. 2009年2月3日 Montana State University, Biofilm Engineering Conference, Montana, USA “Genetic code reprogramming for the discovery of a novel class of peptide drug leads” Hiroaki Suga

<平成21年度>

1. 2009年5月9日～10日 第57回有機合成化学協会関東支部シンポジウム（早稲田シンポジウム）－進化する有機合成化学－ 「Versipelostatin F糖鎖含有配糖体の合成研究」 田中浩士、赤座博人、吉澤 篤、千々和修平、高木基樹、新家一男、高橋孝志
2. 2009年5月9日～10日 第57回有機合成化学協会関東支部シンポジウム（早稲田シンポジウム）－進化する有機合成化学－ 「3成分連結法を基盤とするレゾルシン酸ラクトン類の効率的合成法の開発」 布施新一郎、杉山 栄、高橋孝志
3. 2009年5月30日 有機合成化学協会東北支部春の講演会「環状ペプチド様生理活性天然物の全合成研究と機能解明に向けたアプローチ」 土井隆行
4. 2009年6月10日～11日 第95回有機合成シンポジウム 「ランドマイシンデオキシオリゴ糖鎖類縁体のコンビナトリアル合成」 山口 渉、田中浩士、吉澤 篤、高橋孝志
5. 2009年9月4日 有機合成夏季セミナー「環状ペプチド様生理活性天然物の全合成から標的タンパク質複合体解析へ」

6. 2009年9月16日～18日 第26回有機合成化学セミナー「ランドマイシンデオキシオリゴ糖鎖類縁体のコンビナトリアル合成」山口 渉、田中浩士、吉澤 篤、高橋孝志
7. 2009年9月, 2nd Switzerland–Japan Bioluminescence Chemistry Symposium (SJBCS 2009), “Solid-phase Total Synthesis of Apratoxin A and Its Derivatives and Their Biological Evaluation”, Doi T
8. 2009年9月, The 2nd International Symposium on Combinatorial Sciences in Biology, Chemistry, Catalysts and Materials (SCS 09) “Synthetic study of telomestatin derivatives by way of palladium-catalyzed coupling reaction of 5-bromooxazole”, 柴田和朗、吉田将人、土井隆行、高木基樹、新家一男、高橋孝志
9. 2009年9月, The 2nd International Symposium on Combinatorial Sciences in Biology, Chemistry, Catalysts and Materials (SCS09), “Solid-phase Total Synthesis of Apratoxin A and Its Derivatives and Their Biological Evaluation”, Doi T
10. 2009年9月, Combinatorial Chemistry and Chemical Biology toward A New Paradigm for Drug Discovery (CCCB), “Total Synthesis and Biological Evaluation of Cyclic Depsipeptide Natural Products and Their Analogues” Doi T
11. 2009年9月, Combinatorial Chemistry and Chemical Biology toward A New Paradigm for Drug Discovery (CCCB), “Combinatorial Synthesis of Deoxyhexasaccharides Related to the Landomycin A Sugar Moiety, Based on an Orthogonal Deprotection Strategy.” Yamaguchi S, Tanaka H, Yoshizawa A, Takahashi T
12. 2009年9月, Combinatorial Chemistry and Chemical Biology toward A New Paradigm for Drug Discovery (CCCB), “Polymer-Assisted Strategy for the Synthesis of Oligosialic acids and Sulfated Saccharides” Tateno Y, Tanaka H, Ishida T, Takahashi T
13. 2009年9月, Combinatorial Chemistry and Chemical Biology toward A New Paradigm for Drug Discovery (CCCB), “Synthetic Study of Telomestatin Derivatives by Way of Palladium-catalyzed Coupling Reaction of 5-Bromooxazole” 柴田和朗、吉田将人、土井隆行、高木基樹、新家一男、高橋孝志
14. 2009年10月 JBIC2009プロジェクト研究成果報告会「インシリコ連携による天然物合成を基盤とする生体制御化合物の開発」土井隆行
15. 2009年10月, The 14th Japan-Korea Seminar on Organic Chemistry, “Total Synthesis of Cyclic Depsipeptide, Apratoxin A and Biological Evaluation of Its Analogues”, Doi T

16. 2009年12月, SIOC-SSOCJ COOPERATIVE SYMPOSIUM ON ORGANIC CHEMISTRY, “Total Synthesis and Biological Evaluation of Cyclic Depsipeptide Natural Products and Their Analogues: Spiruchostatin A and Largazole”, Doi T
17. 2010年3月27日 日本化学会第90春季年会「光照射によりビラジカル発生が誘起される環状エンジン化合物の合成」田中義一、布施新一郎、川内進、田中浩士、土井隆行、高橋孝志
18. 2010年3月30日 日本薬学会第130年会「多様性指向型生理活性天然物の全合成と機能解明に向けたアプローチ」土井隆行
19. 2010年3月30日 日本薬学会第130年会「V-ATPase阻害活性を有するDestruxin Eの全合成」吉田将人、竹内久征、八代田陽子、吉田稔、高木基樹、新家一男、土井隆行
20. 2010年3月30日 日本薬学会第130年会「Thielocin B1の合成研究」吉田将人、大澤宏祐、高木基樹、新家一男、土井隆行
21. 2009年9月8日 Naito Foundation Conference in Chemical Biology, Sapporo, Japan “Genetic code reprogramming for the discovery of a novel class of peptide drug leads” Hiroaki Suga
22. 2009年9月12日 Swiss-Japan Biomolecular Chemistry Symposium, Tokyo, Japan (as an organizing chair)
23. 2009年9月15日 Vanderbilt University Medical Center, Departmental Seminar, Nashville, USA “Genetic code reprogramming for the discovery of a novel class of peptide drug leads” Hiroaki Suga
24. 2009年9月18日 University of Illinois Urbana-Champaign, Departmental Seminar in Biochemistry, Urbana, USA “Genetic code reprogramming for the discovery of a novel class of peptide drug leads” Hiroaki Suga
25. 2009年9月23日 Harvard Medical School, Departmental Seminar in Genomics, Boston, USA “Genetic code reprogramming for the discovery of a novel class of peptide drug leads” Hiroaki Suga
26. 2009年9月29日 JSPS 2<sup>nd</sup> HOPE Meeting, Hakone, Japan “Genetic code reprogramming for the Discovery of a novel class of peptide drug leads” Hiroaki Suga
27. 2009年10月16日 The 1<sup>st</sup> International Conference for Circular Protein, Heron Island, Australia “Genetic code reprogramming for the discovery of a novel class of peptide drug leads” Hiroaki Suga
28. 2009年10月26日 Peptide Engineering: Therapeutic Peptide" Fifth Peptide Engineering Meeting, Barcelona, Spain “Genetic code reprogramming for the discovery of a novel class of peptide drug leads” Hiroaki Suga

29. 2009年11月1日 Institute for Research in Biomedicine, Barcelona, Spain “Genetic codereprogramming for the discovery of a novel class of peptide drug leads”  
Hiroaki Suga
30. 2009年11月4日 Nottingham ‘New Horizons’ meeting 2009, Nottingham, UK “Genetic code Reprogramming for the discovery of a novel class of peptide drug leads”  
Hiroaki Suga
31. 2009年11月6日 University of Oxford, Departmental Seminar in Chemistry, Oxford, UK “Genetic code reprogramming for the discovery of a novel class of peptide drug leads” Hiroaki Suga
32. 2009年11月9日 The 3rd Asia-Pacific International Peptide Symposium, Jeju Island, Korea “Genetic code reprogramming for the discovery of a novel class of peptide drug leads” Hiroaki Suga
33. 2010年1月29日 The 75<sup>th</sup> Israel Chemical Society Meeting, Israel “Genetic code reprogramming for the discovery of a novel class of peptide drug leads” Hiroaki Suga
34. 2010年3月1日 2010 Chemistry & Biology of Peptides Gordon Research Conference “Genetic code reprogramming for the discovery of a novel class of peptide drug leads” Hiroaki Suga
35. 2010年3月10日 Stanford University, Departmental Seminar in Chemistry and Biochemistry, USA “Genetic code reprogramming for the discovery of a novel class of peptide drug leads” Hiroaki Suga
36. 2010年3月27日 日本化学会第90春季年会(2010)「特殊ペプチド創薬」菅 裕明

<平成22年度>

1. 2010年6月 第97回有機合成シンポジウム「パラジウム触媒を用いた分子内辻アリル化反応による $\beta$ -アルケニル- $\alpha$ -アリールシクロペンタノン誘導体の不斉合成研究」廣谷功, 星野恒文, 高橋絵里菜, 中村優子, 稲本浄文, 土井隆行
2. 2010年7月 第45回天然物化学談話会「生物活性環状デプシペプチドの全合成と機能解明を目指して」土井隆行
3. 2010年8月, 25th International Carbohydrate Symposium, “Synthesis of Biologically Important Oligosaccharides Containing  $\alpha$  (2,8)Oligosialic Acids”, Tanaka T, Nishiura Y, Takahashi T
4. 2010年8月, 25th International Carbohydrate Symposium, “Synthesis of Functionalized Glycopolymers by  $\pi$ -Allyl Nickel Catalyzed Living Coordination Polymerization”, Ohira S, Tanaka H, Tomita I, Takahashi T

5. 2010年8月, 25th International Carbohydrate Symposium, "An Efficient Synthesis of Forssman Antigen and Structure-Activity Relationship", Takeuchi R, Tanaka H, Jinbo M, Takahashi T
6. 2010年9月1日, 3rd EuCheMS Chemistry Congress2010, "Efficient Syntheses of Taxol and 9-Membered Masked Eneidyne Using Automated Synthesizers", Fuse S, Tanaka T, Takahashi T
7. 2010年9月2日, 3rd EuCheMS Chemistry Congress2010, "Efficient Syntheses of Taxol and 9-Membered Masked Eneidyne Using Automated Synthesizers", Fuse S
8. 2010年9月 平成22年度化学系学協会東北大会環状デプシペプチドDestruxin Eの全合成」吉田将人, 竹内久征, 石田恵崇, 八代田陽子, 吉田 稔, 高木基樹, 新家一男, 土井隆行 <ポスター賞受賞>
9. 2010年9月 第52回天然有機化合物討論会「環状デプシペプチドDestruxin Eの全合成と生物活性評価」吉田将人, 竹内久征, 石田恵崇, 八代田陽子, 吉田 稔, 高木基樹, 新家一男, 土井隆行
10. 2010年10月 第40回複素環化学討論会「非対称化反応を用いた(+)-Lycopladine Aの全合成」廣谷功, 諏訪好泰, 市橋佑介, 稲本浄文, 土井隆行
11. 2010年10月 第49回日本薬学会東北支部大会「固相法を利用したスタチン誘導体ライブラリーの合成研究」吉田将人, 菊池一輝, 土井隆行
12. 2010年10月 第49回日本薬学会東北支部大会「Thielocin B1の全合成研究」吉田将人, 大澤宏祐, 高木基樹, 新家一男, 土井隆行
13. 2010年10月 JBIC2010プロジェクト成果報告会「インシリコ連携による天然物合成を基盤とする生体制御化合物の開発」土井隆行, 吉田将人, 布施新一郎, 田中正洋, 稲葉健一, Le Anh Tuan, 飯島悠介, 田中浩士, 高橋孝志, 高木基樹, 新家一男, 広川貴次
14. 2010年11月 第36回反応と合成の進歩シンポジウム「位置選択的環化反応を利用したフラボン骨格を基盤とする天然物誘導体の合成研究」吉田将人, 藤野雄太, 土井隆行
15. 2010年11月 第98回有機合成シンポジウム「ジアステレオ選択的なケタール化反応による不斉第四級炭素構築法の開発と(-)-Cepharamineの全合成研究」廣谷功, 市橋佑介, 関岡竜一, 稲本浄文, 土井隆行
16. 2010年11月, ICCEOCA-5/NICCEOCA-1, "Synthesis, Structure Determination, and Biological Evaluation of Destruxin E", Yoshida M, Takeuchi H, Ishida Y, Doi T
17. 2010年11月 創薬懇話会2010 in 蔵王「環状ペプチド様生理活性天然物の全合成から機能解明へのアプローチ」土井隆行

18. 2010年12月, 第32回東北薬学セミナー「生物活性天然物の全合成と機能解明に向けた研究」土井隆行
19. 2010年12月, 5th International Peptide Symposium, 47th Japanese Peptide Symposium, “Total Synthesis, Biological Evaluation, and Binding Protein Network Analysis of Natural Product Cyclic Depsipeptides, Spiruchostatin A and Apratoxin A”, Doi T, Numajiri Y, Iijima Y, Takahashi T, Takagi M, Shin-ya K, Iemura S, Natsume T
20. 2010年12月, 2010 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (PACIFICHEM 2010), "Total synthesis of apratoxin A and its analogs and their biological evaluation", Doi T
21. 2010年12月, 2010 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (PACIFICHEM 2010), “Efficient Syntheses of 9-Membered Masked Eneidyne and Taxol Aided by Automated Synthesizer”, Takahashi T, Tanaka Y, Fuse S
22. 2010年12月, 2010 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (PACIFICHEM 2010), “Combinatorial Synthesis of Ganglio-Series Ganglioside Epitopes”, Tanaka H, Nishiura Y, Takahashi T
23. 2010年3月28日 日本薬学会第131年会「Thielocin B1の全合成」吉田将人、大澤宏祐、高木基樹、新家一男、土井隆行
24. 2010年4月23日 University of California Irvine, Biochemistry Departmental Seminar, USA “Genetic code reprogramming for the discovery of a novel class of peptide drug leads” Hiroaki Suga
25. 2010年4月27日 The 2010 Annual Meeting of the American Society for Biochemistry and Molecular Biology, USA “Genetic code reprogramming for the discovery of a novel class of peptide drug leads” Hiroaki Suga
26. 2010年4月30日 Stanford University, Chemical and Systems Biology Departmental Seminar, California, USA “Genetic code reprogramming for the discovery of a novel class of peptide drug leads” Hiroaki Suga
27. 2010年5月14日 Yale University, Symposium of Chemical Biology, Connecticut, USA “Genetic code reprogramming for the discovery of a novel class of peptide drug leads” Hiroaki Suga
28. 2010年6月5日 仙台万有シンポジウム「特殊ペプチド創薬」菅 裕明
29. 2010年7月7日 第12回日本RNA学会年会「特殊ペプチド創薬」菅 裕明
30. 2010年9月18日 Symposium of the Strategic Japanese-Swedish Cooperative Program on “Multidisciplinary BIO”, Kyoto, Japan “Genetic code reprogramming for the discovery of a novel class of peptide drug leads” Hiroaki Suga
31. 2010年9月20日 第48回日本生物物理学会年会「特殊ペプチド創薬」菅 裕明



32. 2010年10月1日 Structural Epigenetics Symposium, Yokohama RIKEN, Japan  
“Genetic code reprogramming for the discovery of a novel class of peptide drug leads” Hiroaki Suga
33. 2010年10月27日 RIKEN Chemical Biology Symposium, Wako, Japan “Genetic code reprogramming for the discovery of a novel class of peptide drug leads” Hiroaki Suga
34. 2010年11月18日 第29回メディシナルケミストリーシンポジウム「特殊ペプチド創薬」菅裕明
35. 2010年12月8日 5<sup>th</sup> International Peptide Symposium, Kyoto, Japan “Genetic code reprogramming for the discovery of a novel class of peptide drug leads” Hiroaki Suga
36. 2010年12月18日 PacifiChem 2010, Honolulu, USA “Genetic code reprogramming for the discovery of a novel class of peptide drug leads” Hiroaki Suga
37. 2011年1月4日 22<sup>nd</sup> Enzyme Mechanisms Conference, St. Pete beach FL, USA  
“Genetic code reprogramming for the discovery of a novel class of peptide drug leads” Hiroaki Suga
38. 2011年1月21日 Royal Society discussion meeting: Chemical Origins and Early Evolution, London, UK “Genetic code reprogramming for the discovery of a novel class of peptide drug leads” Hiroaki Suga

## 研究開発項目⑦

### 化合物等の評価技術の開発

(平成18年度～平成20年度)

#### <平成18年度>

1. 2006年5月25日 第264回CBI学会研究講演会「蛍光を用いた in vivo イメージングの現状と将来」阿部訓也

#### <平成19年度>

1. 2007年10月3日 第66回日本癌学会学術総会 「蛍光を用いた in vivo イメージングの現状と将来 in vivo fluorescent imaging, current and future」阿部訓也
2. 2007年9月8-11日 Joint Molecular Imaging Conference “In vivo Motion Estimation for Image Stabilization in Optical Imaging through a Contact-type Sensor Device” S.O. Lee, T. Ozaki, K. Yamane and Y. Nakamura
3. 2007年7月12日 第13回日本IFTtoMM会議シンポジウム「小動物生体細胞観察

のための蛍光顕微鏡画像安定化」 李盛温, 中村仁彦, 山根克, 東條剛, 高橋誠也, 谷川慶, 高橋一

4. 2007年9月13-15日 第25回日本ロボット学会学術講演会「3次元運動計測に基づく画像安定化と生体分子イメージング」尾崎壮、李盛温、中村仁彦
5. 2007年9月13-15日 第25回日本ロボット学会学術講演会「対象の動きにより劣化した共焦点レーザー顕微鏡の画像の復元」李盛温、中村仁彦

<平成20年度>

1. 2008年5月 Conference for laboratory animal science and technology 2008、
2. 2008年9月 The World Molecular Imaging Congress, Nice, France.、In vivo measurement of gene expression, nuclear organization and subcellular organelle dynamics in live animals using a novel laser scanning microscopy system.、In vivo measurement of gene expression, nuclear organization and subcellular organelle dynamics in live animals using a novel laser scanning microscopy system.、 Liqin Cao, et al.

### 3. 特許

#### <平成18年度>

特願 2006-312000(H18/11/17)、非天然骨格をもつポリペプチドの翻訳合成とその応用、出願人：東京大学

特願 2007-010790 (H19/01/19)、新規ピエリシジン誘導体又はその塩、その製造方法及び該誘導体を有効成分とする抗腫瘍剤、出願人：産総研、JBIC

特願 2007-05319 (H19/03/02)、ヒトインターロイキン-5 受容体(hIL-5R)結合ペプチド  
出願人：大阪府立大学

特願 2007-052584 (H19/03/02)、新規化合物、若しくはその塩、及び抗腫瘍剤、並びに新規化合物の生産方法、出願人：産総研、JBIC

特願2007-080141 (H19/03/26)、環状ペプチド化合物の合成方法、出願人：東京大学

PCT/JP2008/55771 (H19/03/26)、平成19年度 特願 2007-080141 の PCT 出願、  
出願人：東京大学

#### <平成19年度>

PCT/JP2007/071986 (H19/11/3)、平成18年度の特願2006-312000のPCT出願、  
出願人：東京大学

特願2007-341080 (H19/12/28)、タンパク質を用いた癌を治療するための方法及び医薬組成物、出願人：キリンファーマ株式会社

特願2007-341096 (H19/12/28)、タンパク質を用いた癌を治療するための方法及び医薬組成物、出願人：キリンファーマ株式会社

特願2008-013698 (H20/01/24)、ポリヌクレオチド及びポリヌクレオチド類似体、出願人：産総研、JBIC

特願2008-021814 (H20/01/31)、3-ナフチルピラゾール化合物、  
出願人：興和、産総研

特願 2008-040307 (H20/02/21)、ヒスタミンH4受容体拮抗作用を有する化合物、  
出願人：興和、産総研

特願 2008-092264 (H20/03/31)、2-フェニルインドール化合物、  
出願人：興和、産総研

#### <平成20年度>

特願 2008-100505 (H20/04/08)、生体臓器支持装置および方法、  
出願人：理研、JBIC

特願 2008-111493、(H20/04/22)、ヒスタミンH4受容体拮抗作用を有する化合物、  
出願人：興和、産総研

特願 2008-138554、(H20/05/27)、ヒスタミンH4受容体拮抗作用を有する化合物、  
出願人：興和、産総研

特願 2008-135030 (H20/05/23)、新規 versipelostatin 誘導体、該誘導体の生産能を有する  
微生物、及び該微生物を用いた前記誘導体の生産方法、並びに抗がん剤、出願人：産総研、  
JBIC

特願 2008-144561(H20/06/02)、スクリーニングシステム、出願人：首都大学東京

特願 2008-147791 (H20/06/05)、新規化合物と微生物を用いたその生産方法、及びそれを  
有効成分とする抗酸化剤、出願人：産総研、JBIC

特願 2008-166494 (H20/06/25)、テロメラゼ阻害剤、出願人：東京農工大学、産総研、JBIC

特願 2008-244975 (H20/9/24)、タンパク質を用いた癌を治療するための方法及び医薬組成  
物、出願人：キリンファーマ株式会社

特願 2008-250925 (H20/09/29) 、ヒスタミン H2 受容体拮抗作用を有する化合物、  
出願人：興和、産総研

特願 2008-251383 (H20/09/29) 、ヒスタミン H2 受容体拮抗作用を有する化合物、  
出願人：興和、産総研

特願 2008-255804 (H20/09/30)、骨疾患治療用医薬組成物、出願人：協和発酵キリン株  
会社

PCT/JP2008/073980 (H20/12/26)、平成 19 年度の特願 2007-341096 の PCT 出願、  
出願人：協和発酵キリン株式会社

PCT/JP 2008/073981 (H20/12/26)、平成 19 年度の特願 2007-341080 の PCT 出願、  
出願人：協和発酵キリン株式会社

<平成 21 年度>

米国（仮出願）61174037 (H21/4/30)、血管障害を抑制するための医薬組成物、  
出願人：協和発酵キリン株式会社

特願 2009-131449 (H21/05/29)、骨疾患治療用医薬組成物、出願人：協和発酵キリン株  
会社、平成 20 年度 特願 2008-255804 の優先権主張出願

米国（仮出願）61222665 (H21/7/2)、鉄過剰疾患または鉄濃度を低下させることが有効な  
疾患に対する治療用医薬組成物、出願人：協和発酵キリン株式会社

PCT/JP2009/066996 (H21/9/30)、平成 20 年度の特願 2008-255804 の PCT 出願、  
出願人：協和発酵キリン株式会社

特願 2009 申請済み未公開案件 3 件

特願 2010 申請済み未公開案件 1 件

<平成 22 年度>

PCT/JP2010/057924 (H22/4/28)、平成 21 年度の米国（仮出願）61174037 の PCT 出願、

出願人：協和醸酵キリン株式会社  
PCT/JP2010/061286 (H22/7/1)、平成 21 年度の米国（仮出願）61222665 の PCT 出願、  
出願人：協和醸酵キリン株式会社  
特願 2010 申請済み未公開案件 9 件  
未公開特願に対する PCT3 件

#### 4. 報道

<平成 18 年度>

2006 年 6 月 9 日 日本産業新聞「細胞分裂促す酵素解明」

<平成 19 年度>

2007 年 8 月 8・15 日合併号 健康食品新聞（食品科学新聞社） ショウジョウバエを用いた抗酸化物質のスクリーニング・評価系の確立

2007年7月30日 日経産業新聞「『ペプチドを自在に合成』東大、創薬応用に期待」

2007 年 10 月 16 日 独立行政法人理化学研究所により Nature Cell Biology 掲載論文プレスリリース、[http://www.riken.jp/r-world/info/release/press/2007/071022\\_2/detail.html](http://www.riken.jp/r-world/info/release/press/2007/071022_2/detail.html)

2007 年 10 月 22 日 日刊工業新聞「夜中の光で体内時計一時停止 細胞の「脱同で発生理研など解明」

2007 年 10 月 22 日 毎日新聞「脳の時計細胞バラバラ —不眠・時差ぼけ— 齊停止説を否定 理研など解明」

2007 年 10 月 22 日 日本経済新聞「強い光で狂う体内時計 個々の細胞のリズムに乱れ 理研など実験」

2007 年 10 月 22 日 読売新聞「真夜中の光で・・・体内時計バラバラ」

2007 年 10 月 23 日 フジサンケイビジネスアイ「体内時計一時失調 細胞リズム乱れ原因 理研などマウスで解明」

2007 年 10 月 24 日 中日新聞「真夜中に強い光→個々の細胞 動きばらばら → 体内時計ストップ」

2007 年 10 月 26 日 科学新聞「真夜中の強い光にご注意！ 体内時計が一時的に停止するメカニズム解明」

2007 年 10 月 30 日 朝日新聞「細胞の同調乱れ体内時計が停止 夜中の光の影響解明 理研などのチーム」

2007 年 11 月 5 日 産経新聞「「体内時計の停止」原因究明 理化学研究所など研究チーム」

2008年1月10日 朝日新聞「万能細胞の鍵 解析へ協力」

2008年1月11日 日本経済新聞「新万能細胞研究に33億円、創薬向け技術開発」  
2008年2月7日 Medical Tribune 62-63「真夜中の強い光が体内時計を脱同調」  
2008年2月22日 日経産業新聞『特殊ペプチド』簡単合成 次世代医薬品材料に期待」  
2008年2月26日 岐阜新聞 生活習慣病治療薬を研究  
2008年3月19日 日経BP社today'sheadline 『エピジェネティクス研究の新ツールとして期待』菅裕明・東大教授らがリシン側鎖を複雑に修飾したヒストンテールを簡易合成」  
2008年3月28日 日本経済新聞「iPS細胞作製、天然化合物使い安全に」

#### <平成20年度>

2008年4月 BTJ ジャーナル（バイオテクノロジージャパン）「揺らぎで相互作用を探る。蛍光で個体の機能も解析」  
2008年11月25日 化学工業日報 ヒトクローン遺伝子供給開始－世界最大級1万5000種

#### <平成21年度>

2009年10月15日 化学工業日報「協和発酵キリン、抗体医薬の開発加速」  
2009年10月29日 日経産業新聞「協和キリン、抗原探索を効率化、遺伝子改変新型マウス、抗体薬開発に一役」  
2009年11月25日 化学工業日報「創薬開発加速へ基盤技術」薬理活性の天然物探索－30万ライブラリー構築・タンパク相互作用制御法

#### <平成22年度>

2010年8月13日 日経産業新聞 ハイテク monthly「重責を担うプロテオミクス」新薬開発に超高感度解析技術－創薬の標的続続と特定

## 5. その他

### ○ 受賞実績

日本抗生物質学術協議会住木梅澤賞、2006年11月、新家一男

### ○ 実用新案申請2006年11月

名称：培養用セル、発明者：相垣敏郎、用途：ショウジョウバエなどの小型生物を多検体培養できる小型で透明な容器。12列に編成して、96サンプルを同時に扱うことができる。

○ 液性因子の高効率生体内機能解析システムを「EXPOC」として日米欧及び中国において商標登録した。

- 1.出願国：EU、登録番号：007288939、登録日：2009/6/25
- 2.出願国：日本、登録番号：第 5246609 号、登録日：2009/7/10
- 3.出願国：アメリカ、登録番号：3836546、登録日：2010/8/2
- 4.出願国：中国、登録番号：6987310、登録日：2010/10/7

以上

## バイオテクノロジー開発技術研究組合委託分 成果リスト

### ⑧マイクロサテライトマーカーを利用した疾患関連遺伝子探索技術により特定された疾患感受性遺伝子群の抽出技術の研究開発

#### (1) 研究発表・講演（招待講演のみ）

- 1) Inoko H: Identification of NFKBIL1 as a susceptible locus of rheumatoid arthritis by genome-wide association using microsatellites and its functional analysis in osteoclastogenesis. Symposium "Pathogenesis and epidemiology of Intraocular inflammation" The 10th Congress of International Ocular Inflammation Society, 2009.
- 2) Shiina T, Inoko H: Genome analysis of the MHC regions in vertebrate species. Satellite Symposium of the 22<sup>nd</sup> EFI meeting "Primate Immunogenetics", 2008.
- 3) Shiina T, Inoko H: Comparative genome analysis of the MHC regions in vertebrate species. 2007. Goettingen Workshop on Immunogenetics, 2007.
- 4) 猪子英俊、ゲノム医学と生活習慣病関連遺伝子の探索、第15回湘南医学研究会、2009
- 5) 猪子英俊、HLAの多型性とその生物学的意義、第1回移植免疫学を学ぶ会、2009.
- 6) 猪子英俊、創薬に向けての生活習慣病の遺伝子の網羅的な探索と発症機構の解析、ゲノム研究最前線ーゲノム科学がもたらす生命の新たな理解ー、2008.
- 7) 猪子英俊、マイクロサテライトを用いたゲノムワイドな相関解析による尋常性乾癬の感受性の同定、第71回日本皮膚科学会東京支部学術大会特別講演、2008.
- 8) 猪子英俊、ヒト疾患遺伝子のゲノム解析から、創薬、予防・健康医学の臨床応用の時代へ、第80回臨床HLA研究会、2008.
- 9) 猪子英俊、生活習慣病などの難病の発症に関わる遺伝子群による罹患予測、及び機能解析による創薬の標的の絞り込み、2008年度健康食品管理士会近畿支部講演会、2008.
- 10) 猪子英俊、医療の中で活用される遺伝子解析、市民公開講座 東洋医学セミナー2008、2008.
- 11) 猪子英俊、生活習慣病のヒトゲノム多様性解析とテーラーメイド医療、ヒトゲノムと疾患ーテーラーメイド医療に向けーシンポジウム基調講演、第27回医学会総会、2007.
- 12) 猪子英俊、ポストゲノム時代のヒト疾患解析とその展開、第16回日本臨床環境医学会総会特別講演、2007.
- 13) 猪子英俊、マイクロサテライト多型を用いたゲノムワイド関連解析、第30回心筋代謝研究会、招待講演、2007.
- 14) 猪子英俊、マイクロサテライト多型を用いたゲノムワイド関連解析、第52回日本人



類遺伝学会シンポジウム、2007.

- 15) 猪子英俊、マイクロサテライト多型を用いたゲノムワイド関連解析、第 58 回日本染色体学会、第 17 回染色体コロキウム 2007 年合同大会ワークショップ、2007.
- 16) 猪子英俊：マイクロサテライトを用いたゲノムワイドな関連解析による多因子性疾患の感受性遺伝子の同定、シンポジウム「ゲノム科学による疾患の解明」、2006.
- 17) 猪子英俊：マイクロサテライトを用いたゲノムワイドな関連解析による多因子性疾患の感受性遺伝子の同定、大阪大学大学院薬学研究科セミナー、2006.
- 18) 猪子英俊：新興・再興感染症の脅威と健康食品“黒酵母由来  $\beta$ -グルカン”、電通シンポジウム、2006.
- 19) 猪子英俊：生活習慣病などの多因子性疾について 3 万個のマイクロサテライトを用いたゲノムワイドな関連解析による感受性遺伝子の同定、臨床 HLA 研究会、2006.
- 20) 猪子英俊：ゲノム多様性と疾患、第 57 回発生工学・疾患モデル研究会定例会、文部科学省科学技術振興調整費新興分野人材養成シンポジウム「ポストゲノム時代の臨床研究について」、2006.
- 21) 猪子英俊：マイクロサテライトを用いた多因子性疾患のゲノムワイドな関連解析、第 57 回発生工学・疾患モデル研究会定例会、2006.
- 22) 猪子英俊、疾患制御遺伝子の探索と評価技術の研究開発、第 24 回バイオテクノロジーシンポジウム、2006.
- 23) 猪子英俊、ゲノム解析を活用した創薬標的分子の探索、東海大学総合医学研究所公開シンポジウム「バイオ研究技術移転の東海大学モデルを考える」、2006.

## (2) 文献

Mano S, Endo TA, Oka A, Ozawa A, Gojobori T, Inoko H: Detecting linkage between a trait and a marker in a random mating population without pedigree record. PLoS ONE 4: e4956, 2009.

- 1) Hinohara K, Nakajima T, Yasunami M, Houda S, Sasaoka T, Yamamoto K, Lee BS, Shibata H, Tanaka-Takahashi Y, Takahashi M, Arimura T, Sato A, Naruse T, Ban J, Inoko H, Yamada Y, Sawabe M, Park JE, Izumi T, Kimura A. Megakaryoblastic leukemia factor-1 gene in the susceptibility to coronary artery disease. Hum Genet. 2009 Jun 10. [Epub ahead of print]
- 2) HUGO Pan-Asian SNP Consortium, Abdulla MA, Ahmed I, Assawamakin A, Bhak J, Brahmachari SK, Calacal GC, Chaurasia A, Chen CH, Chen J, Chen YT, Chu J, Cutiongco-de la Paz EM, De Ungria MC, Delfin FC, Edo J, Fuchareon S, Ghang H, Gojobori T, Han J, Ho SF, Hoh BP, Huang W, Inoko H, Jha P, Jinam TA, Jin L, Jung J, Kangwanpong D, Kampuansai J, Kennedy GC, Khurana P, Kim HL,

- Kim K, Kim S, Kim WY, Kimm K, Kimura R, Koike T, Kulawonganunchai S, Kumar V, Lai PS, Lee JY, Lee S, \*Liu ET, Majumder PP, Mandapati KK, Marzuki S, Mitchell W, Mukerji M, Naritomi K, Ngamphiw C, Niikawa N, Nishida N, Oh B, Oh S, Ohashi J, Oka A, Ong R, Padilla CD, Palittapongarnpim P, Perdigon HB, Phipps ME, Png E, Sakaki Y, Salvador JM, Sandraling Y, Scaria V, Seielstad M, Sidek MR, Sinha A, Srikummool M, Sudoyo H, Sugano S, Suryadi H, Suzuki Y, Tabbada KA, Tan A, Tokunaga K, Tongshima S, Villamor LP, Wang E, Wang Y, Wang H, Wu JY, Xiao H, Xu S, Yang JO, Shugart YY, Yoo HS, Yuan W, Zhao G, Zilfalil BA; Indian Genome Variation Consortium. Mapping human genetic diversity in Asia. *Science* 326: 1541-1545, 2009.
- 3) Tomiyama R, Meguro A, Ota M, Katsuyama Y, Nishide T, Uemoto R, Iijima Y, Ohno S, Inoko H, Mizuki N: Investigation of the association between Toll-like receptor 2 gene polymorphisms and Behçet's disease in Japanese patients. *Hum Immunol* 70: 41- 44, 2009.
  - 4) Ohtsuka M, Kimura M, Tanaka M, Inoko H: Recombinant DNA technologies for construction of precisely designed transgene constructs. *Curr Pharm Biotechnol.* 10: 244-251, 2009.
  - 5) Shichi D, Ota M, Katsuyama Y, Inoko H, Naruse TK, Kimura A: Complex divergence at a microsatellite marker C1\_2\_5 in the lineage of HLA-Cw/-B haplotype. *J Hum Genet* 54: 224-229, 2009.
  - 6) Yonezawa T, Kurata R, Kimura M, Inoko H: PKC Delta and Epsilon in drug targeting and therapeutics. *Recent Patents on DNA & Gene Sequences* 3: 96-101, 2009.
  - 7) Tabeta K, Shimada Y, Tai H, Ishihara Y, Noguchi T, Soga Y, Takashiba S, Suzuki G, Kobayashi T, Oka A, Kobayashi T, Yamazaki K, Inoko H, Yoshie H. Assessment of chromosome 19 for genetic association in severe chronic periodontitis. *J Periodontol* 80: 663-671, 2009.
  - 8) Ohtsuka M, Warita T, Sakurai T, Watanabe S, Inoko H, Sato M: Development of CRTEIL and CETRIZ, Cre-loxP-based systems, which allow change of expression of red to green or green to red fluorescence upon transfection with a cre-expression vector. *J Biomed Biotechnol.* 2009:985140, Epub 2009.
  - 9) Horie Y, Meguro A, Ota M, Kitaichi N, Katsuyama Y, Takemoto Y, Namba K, Yoshida K, Song YW, Park KS, Lee EB, Inoko H, Mizuki N, Ohno S: Association of TLR4 polymorphisms with Behcet's disease in a Korean population. *Rheumatology* 48: 638-642, 2009.
  - 10) Shojima J, Tanaka G, Keicho N, Tamiya G, Ando S, Oka A, Inoue Y, Suzuki K,

- Sakatani M, Okada M, Kobayashi N, Toyota E, Kudo K, Kajiki A, Nagai H, Kurashima A, Oketani N, Hayakawa H, Takemura T, Nakata K, Ito H, Morita T, Matsushita I, Hijikata M, Sakurada S, Sasazuki T, Inoko H: Identification of MICA as a Susceptibility Gene for Pulmonary Mycobacterium avium Complex Infection. *J Infect Dis* 199: 1707-1715, 2009.
- 11) Kongmaroeng C, Romphruk A, Ruangwerayut R, Paupairoj C, Leelayuwat C, Inoko H, Romphruk A: HLA-B\*15 subtypes in Burmese population by sequence-based typing. *Tissue Antigens*. 2009.
- 12) Ikamio M, Meguro A, Ota M, Nomura N, Kashiwagi K, Mabuchi F, Iijima H, Kawase K, Yamamoto T, Nakamura M, Negi A, Sagara T, Nishida T, Inatani M, Tanihara H, Aihara M, Araie M, Fukuchi T, Abe H, Higashide T, Sugiyama K, Kanamoto T, Kiuchi Y, Iwase A, Ohno S, Inoko H, Mizuki N: Investigation of the association between the GLC3A locus and normal tension glaucoma in Japanese patients by microsatellite analysis. *Clin Ophthalmol* 3: 183-188, 2009.
- 13) Nakamura K, Ota M, Meguro A, Nomura N, Kashiwagi K, Mabuchi F, Iijima H, Kawase K, Yamamoto T, Nakamura M, Negi A, Sagara T, Nishida T, Inatani M, Tanihara H, Aihara M, Araie M, Fukuchi T, Abe H, Higashide T, Sugiyama K, Kanamoto T, Kiuchi Y, Iwase A, Ohno S, Inoko H, Mizuki N: Association of microsatellite polymorphisms of the GPDS1 locus with normal tension glaucoma in the Japanese population. *Clin Ophthalmol* 3: 307-312, 2009.
- 14) Nakabayashi K, Komaki G, Tajima A, Ando T, Ishikawa M, Nomoto J, Hata K, Oka A, Inoko H, Sasazuki T; Japanese Genetic Research Group for Eating Disorders (JGRED), Shirasawa S: Identification of novel candidate loci for anorexia nervosa at 1q41 and 11q22 in Japanese by a genome-wide association analysis with microsatellite markers. *J Hum Genet* 54: 531-537, 2009.
- 15) Averdam A, Petersen B, Rosner C, Neff J, Roos C, Eberle M, Aujard F, Münch C, Schempp W, Carrington M, Shiina T, Inoko H, Knaust F, Coggill P, Sehra H, Beck S, Abi-Rached L, Reinhardt R, Walter L: A novel system of polymorphic and diverse NK cell receptors in primates. *PLoS Genet* 5: e1000688, Epub 2009.
- 16) Hui J, Oka A, James A, Palmer LJ, Musk AW, Beilby J, Inoko H: A genome-wide association scan for asthma in a general Australian population. *Hum Genet* 123: 297-306, 2008.
- 17) Ogawa S, Matsubara A, Onizuka M, Kashiwase K, Sanada M, Kato M, Nannya Y, Akatsuka Y, Satake M, Takita J, Chiba S, Saji H, Maruya E, Inoko H, Morishima Y, Kodera Y, Takehiko S; Japan Marrow Donation Program (JM DP): Exploration of

- the genetic basis of GVHD by genetic association studies. *Biol Blood Marrow Transplant.* 5(1 Suppl): 39-41, 2008.
- 18) Meguro A, Ota M, Katsuyama Y, Oka A, Ohno S, Inoko H, Mizuki N: Association of the toll-like receptor 4 gene polymorphisms with Behcet's disease. *Ann Rheum Dis* 67: 725-727, 2008.
  - 19) Ohtsuka M, Inoko H, Kulski JK, Yoshimura S: Major histocompatibility complex (Mhc) class Ib gene duplications, organization and expression patterns in mouse strain C57BL/6. *BMC Genomics* 9:178-192, 2008
  - 20) Rast JP, Rigoutsos I, Robinson-Rechavi M, Roch G, Saiga H, Sasakura Y, Satake M,
  - 21) Shibuya E, Meguro A, Ota M, Kashiwagi K, Mabuchi F, Iijima H, Kawase K, Yamamoto T, Nakamura M, Negi A, Sagara T, Nishida T, Inatani M, Tanihara H, Aihara M, Araie M, Fukuchi T, Abe H, Higashide T, Sugiyama K, Kanamoto T, Kiuchi Y, Iwase A, Ohno S, Inoko H, Mizuki N: Association of toll-like receptor 4 gene polymorphisms with normal tension glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 49: 4453-4457, 2008.
  - 22) Takemoto Y, Naruse T, Namba K, Kitaichi N, Ota M, Shindo Y, Mizuki N, Gul A, Madanat W, Chams H, Davatchi F, Inoko H, Ohno S, Kimura A: Re-evaluation of heterogeneity in HLA-B\*510101 associated with Behçet's disease. *Tissue Antigens* 72: 347-353, 2008.
  - 23) Hosomichi K, Miller MM, Goto RM, Wang Y, Suzuki S, Kulski JK, Nishibori M, Inoko H, Hanzawa K, Shiina T: Contribution of mutation, recombination, and gene conversion to chicken MHC-B haplotype diversity. *J Immunol* 181:3393-3399, 2008.
  - 24) Akiyama M, Yatsu K, Ota M, Katsuyama Y, Kashiwagi K, Mabuchi F, Iijima H, Kawase K, Yamamoto T, Nakamura M, Negi A, Sagara T, Kumagai N, Nishida T, Inatani M, Tanihara H, Ohno S, Inoko H, Mizuki N: Akiyama M, Yatsu K, Ota M, Katsuyama Y, Kashiwagi K, Mabuchi F, Iijima H, Kawase K, Yamamoto T, Nakamura M, Negi A, Sagara T, Kumagai N, Nishida T, Inatani M, Tanihara H, Ohno S, Inoko H, Mizuki N: Microsatellite analysis of the GLC1B locus on chromosome 2 points to NCK2 as a new candidate gene for normal tension glaucoma. *Br J Ophthalmol* 92: 1293-1296, 2008.
  - 25) Ohtsuka M, Mizutani A, Kikuti YY, Kulski JK, Sato M, Kimura M, Tanaka M, Inoko H. One-step generation of recombineering constructs by asymmetric-end ligation and negative selection. *Anal Biochem* 360: 306-308, 2008.
  - 26) Kikuchi T, Naruse TK, Onizuka M, Li S, Kimura T, Oka A, Morishima Y,

- Kulski JK, Ichimiya S, Sato N, Inoko H: Mapping of susceptibility and protective loci for acute GVHD in unrelated HLA-matched bone marrow transplantation donors and recipients using 155 microsatellite markers on chromosome 22. *Immunogenetics* 59: 99-108, 2008.
- 27) Bahram S, Inoko H: Microsatellite markers for genome-wide association studies. *Nature Reviews Genetics* 8: 164, 2007.
- 28) Yatsu K, Mizuki N, Hirawa N, Oka A, Itoh N, Yamane T, Ogawa M, Shiwa T, Tabara Y, Ohno S, Soma M, Hata A, Nakao K, Ueshima H, Ogihara T, Tomoike H, Miki T, Kimura A, Mano S, Kulski JK, Umemura S, Inoko H: High-resolution mapping for essential hypertension using microsatellite markers. *Hypertension* 49: 446-452, 2007.
- 29) Yasuno K, Ando S, Misumi S, Makino S, Kulski JK, Muratake T, Kaneko N, Amagane H, Someya T, Inoko H, Suga H, Kanemoto K, Tamiya G. Synergistic association of mitochondrial uncoupling protein (UCP) genes with schizophrenia. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 144: 250-253, 2007.
- 30) Ota M, Katsuyama Y, Hamano H, Umemura T, Kimura A, Yoshizawa K, Kiyosawa K, Fukushima H, Bahram S, Inoko H, Kawa S. Two critical genes (HLA-DRB1 and ABCF1) in the HLA region are associated with the susceptibility to autoimmune pancreatitis. *Immunogenetics* 59: 45-52, 2007.
- 31) Hayashi T, Inoko H, Nishizaki R, Ohno S, Mizuki Exclusion of transforming growth factor-beta1 as a candidate gene for myopia in the Japanese. *Jpn J Ophthalmol* 51: 96-99, 2007.
- 32) Tanaka T, Kitamura H, Sahara H, Imai A, Itoh Y, Honma I, Sato E, Kobayashi K, Maeda T, Takenouchi M, Ohta K, Sugawara F, Sakaguchi K, Ando A, Inoko H, Sato N, Tsukamoto T: Effects of a new immunosuppressive agent, beta-SQAG9, in swine kidney transplantation. *Transpl Immunol* 18: 67-71, 2007.
- 33) Kawase T, Morishima Y, Matsuo K, Kashiwase K, Inoko H, Saji H, Kato S, Juji T, Kodera Y, Sasazuki T: High-risk HLA allele mismatch combinations responsible for severe acute graft versus host disease and implication for its molecular mechanism. *Blood* 110: 2235-2241, 2007.
- 34) Inamori Y, Ota M, Inoko H, Okada E, Nishizaki R, Shiota T, Mok J, Oka A, Ohno S, Mizuki N: The COL1A1 gene and high myopia susceptibility in Japanese. *Hum Genet* 122: 151-157, 2007.
- 35) Kano T, Mori T, Furudono M, Ishikawa H, Watanabe H, Kikkawa E, Warita T, Onizuka M, Takahashi M, Maeda Y, Naruse T, Inoko H, Kimura A: Human leukocyte antigen may predict outcome of primary recurrent spontaneous abortion

- treated with paternal lymphocy alloimmunization therapy. *Am J Reprod Immunol* 58: 383–387, 2007.
- 36) Ito A, Ota M, Katsuyama Y, Inoko H, Ohno S, Mizuki N: Lack of association of Toll-like receptor 9 gene polymorphism with Behcet's disease in Japanese patients. *Tissue Antigens* 70: 423-426, 2007.
- 37) Shimada M, Onizuka M, Machida S, Suzuki R, Kojima M, Miyamura K, Kodera Y, Inoko H, Ando K: Association of autoimmune disease-related gene polymorphisms with chronic graft-versus-host disease. *Br J Haematol* 139: 458-463, 2007.
- 38) Ota M, Fukushima H, Kulski JK, Inoko H: Single nucleotide polymorphism detection by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism. *Nature Protocol* 2: 2857-2864, 2007.
- 39) Sasaki S, Ota M, Nishizuka R, Okada E, Mok J, Kimura T, Oka A, Katsuyama Y, Ohono S, Inoko H, Mizuki N: A single nucleotide polymorphism analysis of the LAMAAL gene in Japanese patients with high myopia. *Clinical Ophthalmology* 1: 289-295, 2007.
- 40) Yamane T, Mok J, Nishizuka R, Oka A, Nishizaki R, Meguro A, Yonemoto J, Kulski JK, Ohono S, Inoko H, Mizuki N: Lack of association with high myopia and the MYP2 locus in the Japanese population by high resolution analysis on chromosome 18. *Clinical Ophthalmology* 1: 311-316, 2007.
- 41) Mizuta I, Satake W, Nakabayashi Y, Ito C, Suzuki S, Momose, Nagai Y, Oka A, Inoko H, Fukae J, Saito Y, Sawabe M, Murayama S, Yamamoto M, Hattori N, Murata M, Toda T: Multiple candidate gene analysis identifies a-synuclein as a susceptibility gene for sporadic Parkinson's disease. *Hum Mol Genet* 15: 1151-1158, 2006.
- 42) Ohtsuka M, Ishii K, Kikuti YY, Warita T, Suszuki D, Sato D, Kimura M, Inoko H: Construction of mouse 129/Ola BAC library for the targeting experiments using E14 embryonic stem cells. *Genes Genet Syst* 81: 143-146, 2006.
- 43) Koishi S, Yamamoto K, Matsumoto H, Koishi S, Enseki Y, Oya A, Asakura A, Aoki Y, Atsumi M, Iga T, Inomata J, Inoko H, Sasaki T, Nanba E, Kato N, Ishii T, Yamazaki K: Serotonin transporter gene promoter polymorphism and autism: a family-based genetic association study in Japanese population. *Brain Development* 28: 257-260, 2006.
- 44) Nakanishi K, Inoko H: Combination of HLA-A24, -DQA1\*03, and -DR9 contributes to acute-onset and early complete  $\beta$ -cell destruction in type 1 diabetes: longitudinal study of residual  $\beta$ -cell function. *Diabetes* 55:

1862-1868, 2006.

- 45) Renard C, Hart WE, Sehra HK, Beasley HR, Coggill PC, Howe KL, Harrow JL, Gilbert JGR, Sims S, Rogers JR, Ando A, Shigenar A, Shiina T, Inoko H, Chardon P, Beck S: The Genomic Sequence and Analysis of the Swine Major Histocompatibility Complex. *Genomics* 88: 96-110, 2006.
- 46) Kawashima M, Tamiya G, Oka A, Hohjoh H, Juji T, Ebisawa T, Honda Y, Inoko H, Tokunaga K: Genomewide association analysis of human narcolepsy and a new resistance gene. *Am J Hum Genet* 79: 252-263, 2006.
- 47) Hasumi Y, Inoko H, Mano S, Ota M, Okada E, Kulski JK, Nishizaki R, Mok J, Oka A, Kumagai N, Nishida T, Ohno S, Mizuki N.: Analysis of single nucleotide polymorphisms at 13 loci within the transforming growth factor-induced factor gene shows no association with high myopia in Japanese subjects. *Immunogenetics*. 58: 947-953, 2006.
- 48) Horie Y, Takemoto Y, Miyazaki A, Namba K, Kase S, Yoshida K, Ota M, Hasumi Y, Inoko H, Mizuki N, Ohno S Tyrosinase gene family and Vogt-Koyanagi-Harada disease in Japanese patients. *Mol Vis* 12:1601-1605, 2006.

### (3) 特許等

- 1) 発明の名称：グラム陰性菌及び陽性菌に対する新しいペプチド抗菌剤
  - ① 発明者：猪子英俊、光永滋樹、良原栄策
  - ② 出願日：2010年2月26日
  - ③ 出願人：東海大学
  - ④ 国内出願番号：2010-41850 (PD0440GDP)
- 2) 発明の名称：緑膿菌に対する新しいペプチド抗菌剤
  - ① 発明者：猪子英俊、良原栄策
  - ② 出願日：2009年7月25日
  - ③ 出願人：東海大学、ジェノダイブファーマ
  - ④ 国内出願番号：2009-000095
- 3) 発明の名称：冠状動脈疾患リスクの検査方法
  - ① 発明者：猪子英俊、木村障方、日野原邦彦、中島敏晶、和泉徹、山田芳司
  - ② 出願日：2008年12月24日
  - ③ 出願人：東海大学、東京医科歯科大学、北里研究所、三重大学
  - ④ 国内出願番号：2008-327960
- 4) 発明の名称：尋常性乾癬検査用マーカー遺伝子
  - ① 発明者：猪子英俊、岡晃
  - ② 出願日：2008年1月25日

- ③ 出願人：東海大学、ジェノダイブファーマ
- ④ 国内出願番号：2008-000095
- 5) 発明の名称：NF- $\kappa$ B 活性化経路を調節する薬剤
  - ① 発明者：浅井常章、猪子英俊
  - ② 出願日：2006年11月20日
  - ③ 出願人：東海大学
  - ④ 国内出願番号：2006-313109
- 6) 発明の名称：摂食障害の検査用マーカー遺伝子
  - ① 発明者：猪子英俊、白澤専二
  - ② 出願日：2006年7月25日
  - ③ 出願人：東海大学
  - ④ 国内出願番号：2006-201944

(4) その他の公表（プレス発表等）  
なし

#### ⑨ siRNA ライブラリー等を用いた生物機能制御遺伝子の探索技術及び創薬標的検証技術の研究開発

(1) 研究発表・講演  
なし

(2) 文献

Yamajuku D, Okubo S, Haruma T, Inagaki T, Okuda Y, Kojima T, Noutomi K, Hashimoto S, Oda H. (2009) Regular feeding plays an important role in cholesterol homeostasis through the liver circadian clock. *Circ Res.* 105(6):545-8.

Inoue Y, Kurihara R, Tsuchida A, Hasegawa M, Nagashima T, Mori T, Niidome T, Katayama Y, Okitsu O. (2007) Efficient delivery of siRNA using dendritic poly(L-lysine) for loss-of-function analysis. *J Control Release.* 126(1):59-66.

Kitazawa M, Ohizumi Y, Oike Y, Hishinuma T, Hashimoto S. (2007) Angiopoietin-related growth factor (AGF) suppresses gluconeogenesis through the Akt/FoxO1-dependent pathway in hepatocytes. *J Pharmacol Exp Ther.* 323(3):787-793.

Nagase, H.; Watanabe, A.; Harada, M.; Nakajima, M.; Hasebe, K.; Mochizuki, H.; Yoza,



K.; Fujii, H. Novel Synthesis of a 1,3,5-Trioxazatriquinane Skeleton Using a Nitrogen Clamp, *Org. Lett.*, 2009, 11, 539.

(3) 特許等

なし

(4) その他の公表（プレス発表等）

なし

**⑩化合物又は相互作用を探索/評価する基盤技術の開発**

(1) 研究発表・講演

1) 秤真実、宮本哲郎、富樫盛典、大友純、岩柳隆夫、金ナノ粒子センサを用いた相互作用探索基盤システムの開発、第24回バイオテクノロジーシンポジウム、2006年11月、東京、ポスター発表

2) Otomo, J., Highthroughput oocyte expression of transporter genes for drug discovery., *BioMedical Transporters 2007*, 2007年8月, Kursaal, Switzerland, 招待講演

3) 大友純、化合物または相互作用を探索/評価する基盤技術の開発、第25回バイオテクノロジーシンポジウム、2007年11月、東京、ポスター発表

4) 大友純、橋場周平、トランスポーターを制御する化合物を探索/評価する基盤技術の研究開発、第26回バイオテクノロジーシンポジウム、2008年11月、東京、口頭発表

5) Otomo, J. and Hashiba, S. Development of an efflux transporter analysis system using an automated substrate injection apparatus for *Xenopus* oocytes., *BioMedical Transporters 2009*, 2009年8月, Thun, Switzerland. 口頭発表

6) 橋場周平、大友純、排出系トランスポーター解析基盤技術の開発、第27回バイオテクノロジーシンポジウム、2009年11月、東京、ポスター発表

(2) 文献

特になし。

(3) 特許等

特になし。

(4) その他の公表（プレス発表等）

特になし

