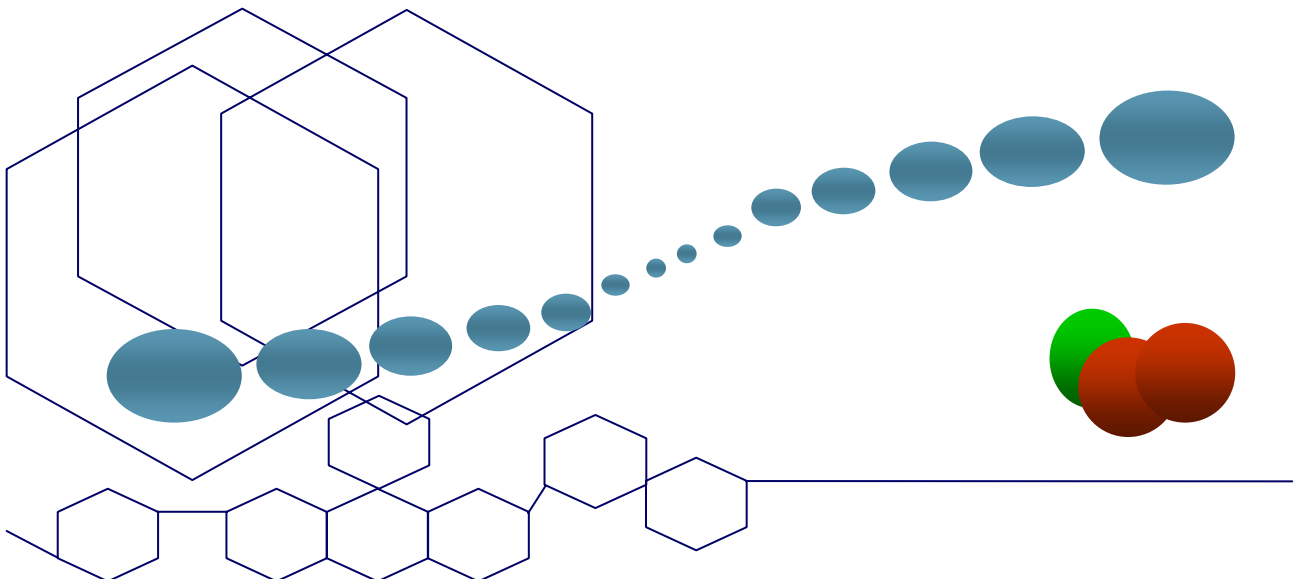


REPRORI

**株式会社リバース・
プロテオミクス研究所**

**Reverse Proteomics Research
Institute, Co., Ltd.**

URL:<http://www.reprori.jp>

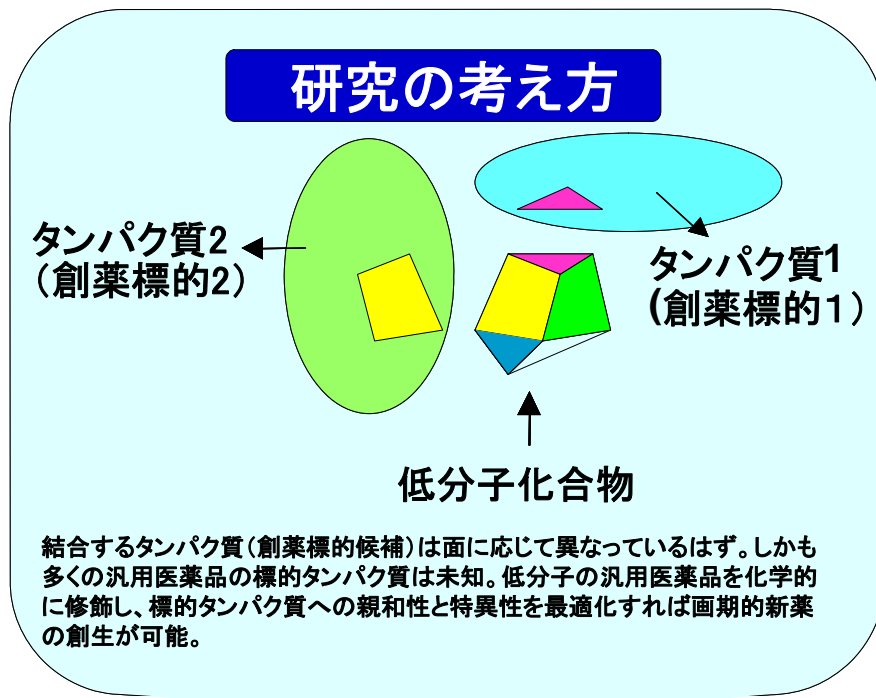


REPRORIの研究コンセプトー逆転の発想で新薬開発ー

国策プロジェクトとして進められた完全長cDNA収集の成果及びその遺伝子を基に新しい蛋白質を発現させる研究体制が整備され、これが世界をリードする日本の強みとなっております。REPRORIは、こうした日本の強みを活かし、従来とは逆の発想で医薬品を開発していこうとするものです。即ち、医薬品と新しく見出された総ての蛋白質の相性(親和性)を実験的に調べ、医薬品と密接な関係を示す蛋白質(標的蛋白質)を研究します。

その為、機能が不明の発現された蛋白質を素早く医薬品と反応する標的蛋白質群に特定することができます。さらに情報のデータベース化により新規蛋白質の役割の解明と知的財産化が世界に先駆け可能とすることができます。これら標的蛋白質の製造や知的財産権を新薬の創出に活用してまいります。

今、世界の目は、多量に得られた遺伝子情報の中から如何に早く価値のある標的蛋白質を見つけ、知的財産化することに向けられています。REPRORIは経済産業省が中心になってすでに進められている蛋白質機能解析プロジェクトなどと歩調を合わせ、世界をリードする研究所を目指します。



REPRORIのNEDO委託研究事業

- 1) 基盤技術研究促進事業(民間基盤技術研究支援制度)「タンパク質ー汎用低分子医薬品相互作用の重点的解析による創薬研究のための基盤技術開発」(平成13ー17年度)
- 2) 「タンパク質機能解析・活用プロジェクト」研究開発6サブテーマのうちの1サブテーマである「スプライシング・バリエーションの取得技術の開発」(平成14ー17年度) ((社)バイオ産業情報コンソーシアムが委託先で、当社はその分室)

汎用医薬品を親和性プローブとするヒト全長cDNA由来機能未知タンパク質からの創薬標的タンパク質の探索研究

画期的新薬を創製するための新規標的タンパク質を見出すことを目的として研究を行っている。本研究の特徴は、研究材料としてこれまでに医薬品として使われてきた低分子化合物および、ヒト完全長cDNAから発現させた機能未知のタンパク質を用い、両者の相互作用を網羅的に解析しようとするところにある。既存の医薬品には、その薬理作用(医薬品としての主作用のみならず副作用も含む)の分子機構すなわち、標的タンパク質分子が不明であるものが数多く存在し、それらを明らかにすることは新薬開発の糸口となる可能性が高い。

タンパク質-低分子化合物の相互作用を測定する方法は従来から数多く存在するが、本研究では、網羅的解析を行うためにスループットの高い方法であること、化合物に蛍光ラベル等の修飾を行う必要がないこと、および熱力学的解析により結合解離定数が求められ、特異性の高い相互作用を見出すことが可能であることから、サイズ・エクスクルージョン・クロマトグラフィー(SEC)法(図1-1)および表面プラズモン共鳴(SPR)法(1-2)を採用した。これらの2つの測定技術について改良検討を行った結果、SEC法については現時点で可能な限りの微小化を行うことにより、またSPR法についてはセンサーチップへの汎用的なタンパク質固定化方法を開発することによって、いずれもタンパク質-低分子化合物相互作用の網羅的解析に適用可能な技術へと改良することに成功した。

以上の開発した基盤技術をもちいてヒト全長cDNAから発現させたタンパク質と医薬品との相互作用解析による新規創薬標的タンパク質の探索を進めている。

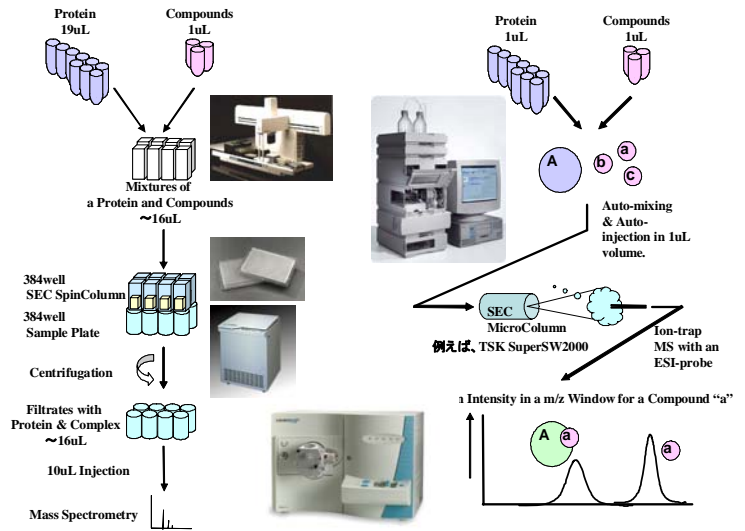


図1-1 新規技術開発によるSEC-MS法(スピン・カラム法とマイクロLC法)の微小化

SEC法と質量分析計を組み合わせた方法(SEC-MS法)についてスピン・カラム法(左)およびマイクロLC法(右)の2つの方法で、それぞれを微小化、データ解析自動化、低分子化合物の多重化によるタンパク質必要量の低減などを図り、微量で高速の新解析技術の確立した。これにより、非常に多くのタンパク質を対象とする低分子医薬品などとの相互作用解析が可能となった。

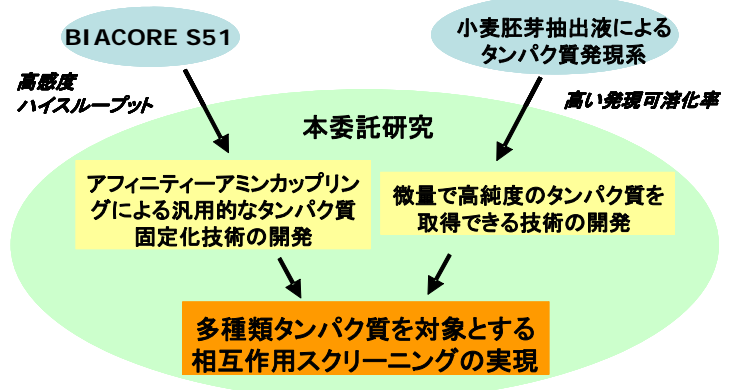


図1-2 新規技術開発によるのBiacore法の高効率化

少量のタンパク質を汎用的に安定した形でセンサーチップ上に固定化する新技術、および小麦胚芽抽出液発現において微量タンパク質を高純度で精製する新技術を確立した。これらにより、創薬標的として特に有用性の高いタンパク質を対象を絞った医薬品との相互作用解析が可能となった。

化合物固相化樹脂ビーズ法(新規な固相表面化学)を用いた 低分子化合物-タンパク質相互作用解析における基盤技術開発による 創薬標的タンパク質の探索研究

ゲノム時代においても、興味ある生理活性を有する化合物の標的タンパク質の同定あるいは作用メカニズムを解明する目的に、化合物を固定化したアフィニティ樹脂が最も効率的な手法の一つとしてしばしば用いられている。しかし、本手法の基盤技術に関する網羅的・定量的な検討はあまり成されていないのが現状である。研究所発足当初より本課題に取り組み、(1)非特異的タンパク質(妨害タンパク質)の抑制のための親水性スパーサーの導入、(2)非特異的タンパク質吸着を抑制した新規樹脂の合成、(3)化合物固定化に必要なリンカー導入位置検討を大幅に削減できる新手法(Chemical Shot Gun法)の開発、(4)金属表面上における非特異的タンパク質の抑制、(5)ligand-target proteinの結合を阻害しない環境の構築、(6)樹脂上に結合したタンパク質の特異性を検定する方法、(7)疎水性カラムを用いた妨害タンパク質を事前に選択的に除去する方法、(8)高頻度にフッ素置換されたカラムを用いた妨害タンパク質を事前に選択的に除去する方法等の具体的成果を挙げることができた。これらの成果は、単にアフィニティカラムの基盤技術向上に貢献するのみに限らず、広く低分子あるいはタンパク質、核酸等の高分子を固定化し相互作用を研究する、あるいは非特異的な好ましくない作用を抑制する際に適応可能な技術と考えられる。

現在、これらの開発技術をもとに医療上重要な画期的新薬開発をめざして、低分子医薬品を親和性プローブとした新規創薬標的タンパク質の探索を進めている。

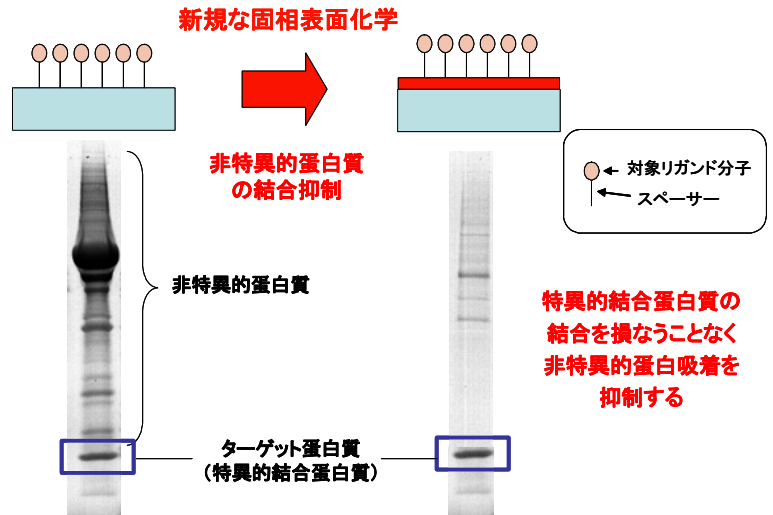


図2-1 固相表面技術開発による蛋白質と化合物との効率的な相互作用解析技術の開発

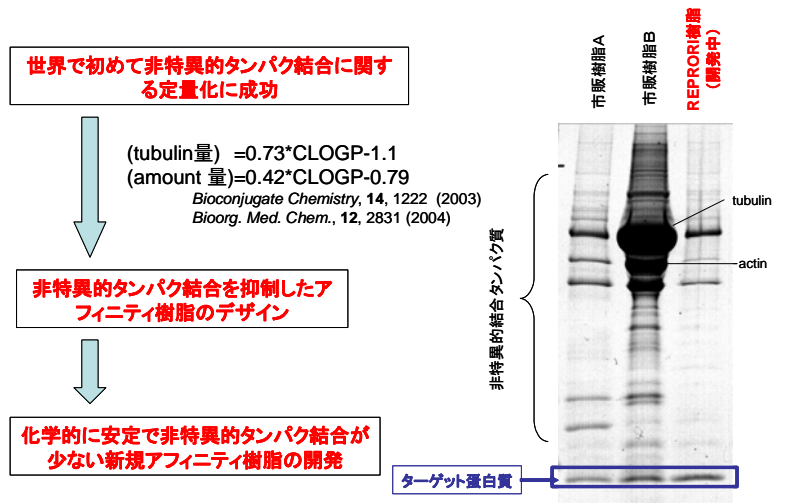


図2-2 固相表面技術開発による新規アフィニティ樹脂の開発

汎用医薬品-タンパク質相互作用データベースの開発と知識ベースの構築

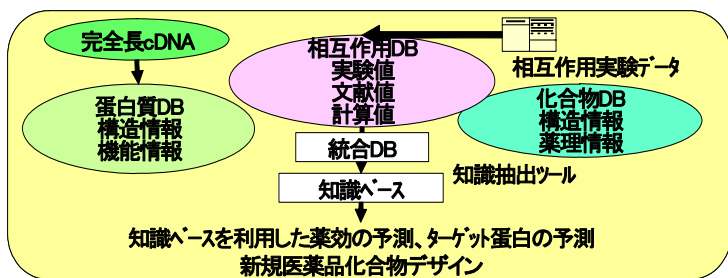


図3-1 汎用医薬品-タンパク質相互作用統合化データベースと知識ベース

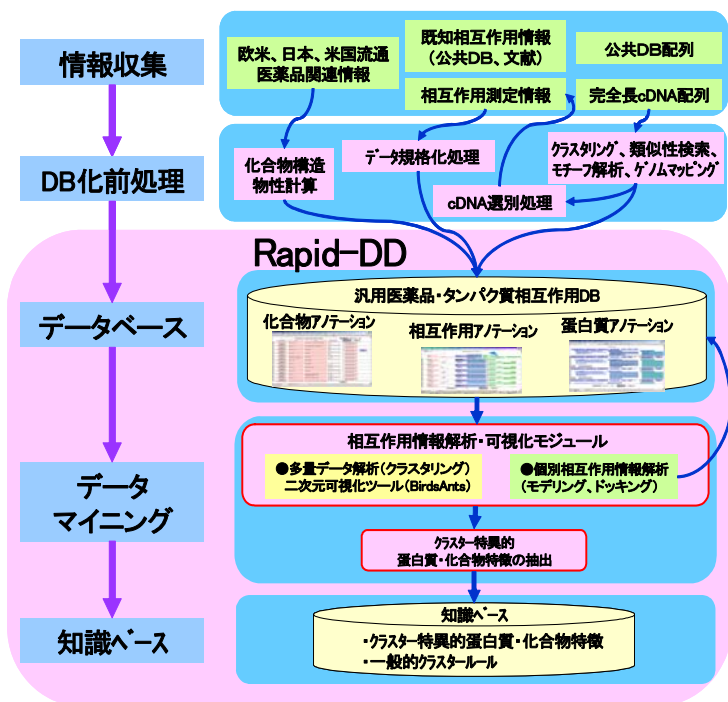


図3-2 情報収集から1次解析処理・DB化・二次解析処理・知識ベース化の流れ

新しい創薬ターゲットタンパク質を多数発見することを目指して、既存汎用医薬品と完全長cDNAから取得した蛋白質間の相互作用を網羅的に測定し、得られた相互作用データを医薬品やタンパク質のアノテーション情報と共にデータベース化している。さらに、これらのデータから知識を抽出するためのデータマイニングシステムを構築し、新たな相互作用や薬効の予測に活用可能な知識ベースの構築を行っている(図3-1)。

本プロジェクトの大きな特徴の一つは、医薬品化合物とタンパク質間相互作用のマトリクスとしての情報が大規模に取得できる点にある。相互作用マトリクスのクラスタリングを行い、得られたクラスターに共通の属性を探っていくことで、各クラスターにとって重要な性質を抽出していくことが可能になる。それらを知識として収集していくことによって、知識ベースが構築できると考えられる。そこで、このような相互作用情報の知識ベース化のフローをインタラクティブに行うことが可能なシステム(Rapid-DD, Rational Analysis of Proteins-Interactions with Drugs for Drug-Discovery)の開発を行っている。

その中で重要な部分を占めるクラスタリングとその可視化を行うシステム(BirdsAnts; Bringing Informative Rules from a Database System, Aiming at Novel Targets Search)では、医薬品とタンパク質の属性と相互作用をマトリクスの形で表現する(図3-3)。BirdsAntsでは、多量のデータを可視化するときは要約度の大きなセルを用いて色彩パターンによってデータを理解し、その中のより少量な部分に着目する場合は、要約度の小さなセルを用いてより詳しい情報を見ることができる。

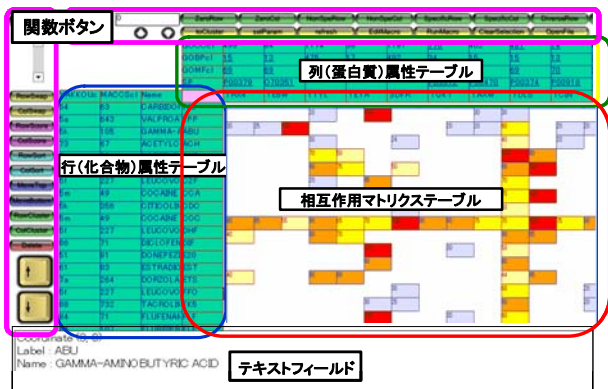


図3-3 BirdsAntsのメイン画面の構成

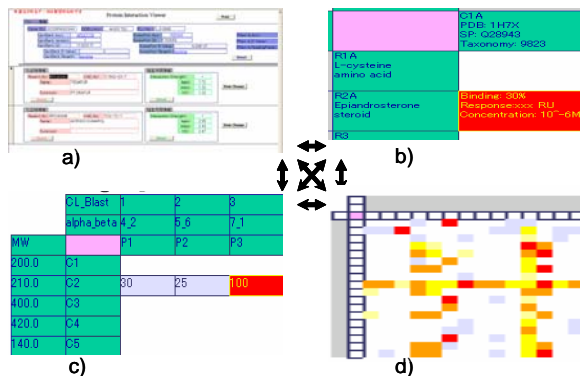


図3-4 BirdsAntsの4つの要約度表示間の遷移

ヒト全長cDNAとスプライシング・バリエント

新エネルギー・産業技術総合開発機構(NEDO)の「タンパク質機能解析・活用プロジェクト」は、(社)バイオ産業情報コンソーシアム(JBIC)が委託先で、当社はその分室として研究開発に参加している。本テーマは、我が国が優位性を保持するヒト完全長cDNA等を利用して、多数のタンパク質の機能解析を実施し、網羅的な機能情報データ等を蓄積することにより知的基盤を整備し、我が国のバイオ産業活動の振興に資することを目的とする。このプロジェクトには、研究開発6サブテーマがある。そのうちの1サブテーマである「スプライシング・バリエントの取得技術の開発」について、当社、(株)日立製作所、(株)不二家、(株)日立サイエンスシステムズ、東洋紡績(株)、JBIC、(独)製品評価技術基盤機構の7機関のJBIC分室で分担し、1万個以上の新規ヒトスプライシング・バリエントcDNAを探索、取得し、配列解析及びデータベース化を行う。

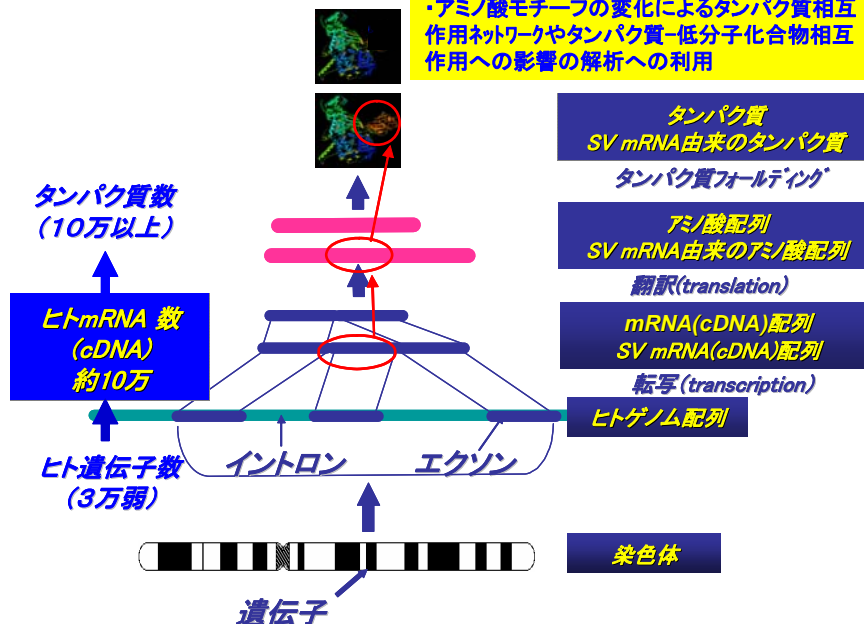
全長cDNA配列解析をしたクローンは、ヒトゲノムシーケンスの完了に伴い配列情報からさらなる遺伝子の機能解析を行うための重要なツールとなる。ヒトゲノムの遺伝子数は3万弱と予測されているが、転写されるmRNAの種類は、その数倍あると予測されている。その差は、スプライシングや転写開始点の多様性によると言われている。本研究では、オリゴキャップ法によるヒトの各種臓器・細胞からの全長率の非常に高い(約90%)cDNAライブラリー約100種を構築し、その約140万の5'-末端配列を解析したcDNAクローンのリソースから、スプライシングや転写開始点のバリエントを取得し、タンパク質領域やアミノ酸配列での多様性などについて解析を行っている。特に、ヒト遺伝子の転写開始点やスプライシングによる転写産物のうちで、疾患などとの関連で発現特異性のあるものなどに注目して解析を進めている。

SV mRNA (cDNA) 解析の目的・意義

構造・機能の多様性
疾患との関連

ゲノム配列からでは予測できないmRNAのスプライシングや転写開始点の多様性をもとにしたヒト遺伝子(cDNA)構造・機能と疾患の関係が解析できる。

- ・スプライシングや転写開始点の違いによる発現特異性・機能の変化と疾患の関係の解析
- ・アミノ酸モチーフの変化によるタンパク質相互作用ネットワークやタンパク質-低分子化合物相互作用への影響の解析への利用



ヒトSV cDNA 取得・解析の概要

1万種以上のSV cDNAの取得とデータベース構築

SV cDNA全長配列解析



SV cDNA候補クローン選択

実験による選択
in silicoによる選択

全長率約90%のヒト完全長cDNA
約1.4百万の5'-末端部分配列保有
(遺伝子カバー率:約80%)

約3万のヒト完全長cDNA
配列解析(1999.3-2002.3)

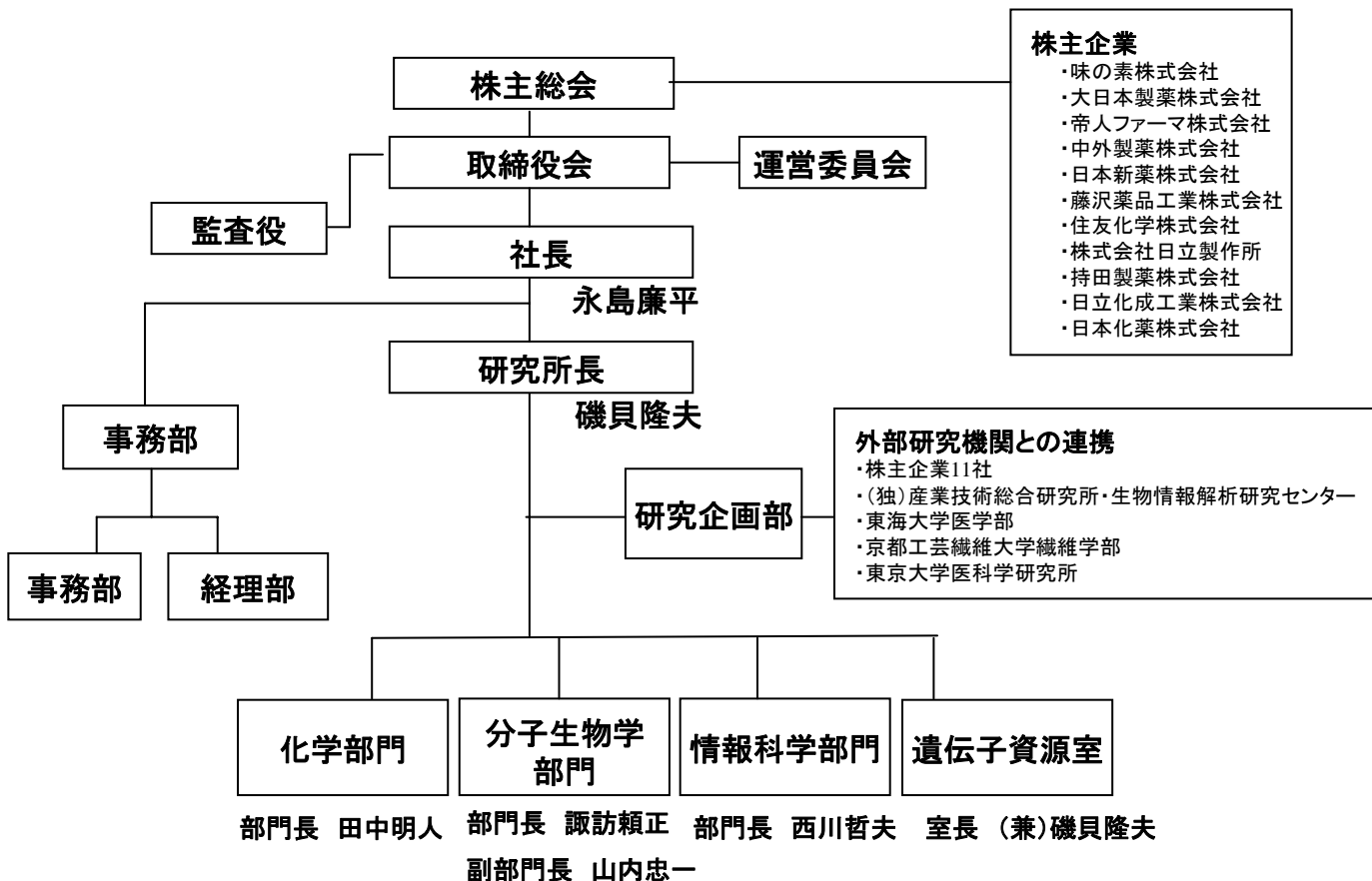
NEDO「完全長cDNA構造解析」成果

図4-1 スプライシング・バリエントcDNAの取得技術の開発

(株)リバース・プロテオミクス研究所

- 英名 : Reverse Proteomics Research Institute Co., Ltd.
(略称: REPRORI) URL: <http://www.reprori.jp>
- 設立 : 2001年5月31日
- 本社 : 千葉県木更津市かずさ鎌足二丁目6番地7
- 資本金 : 3,300万円
- 出資会社 : 味の素株式会社、大日本製薬株式会社、
帝人ファーマ株式会社、中外製薬株式会社、
日本新薬株式会社、藤沢薬品工業株式会社、
住友化学株式会社、株式会社日立製作所、
持田製薬株式会社、日立化成工業株式会社、
日本化薬株式会社
- 代表者 : 永島廉平
- 従業員数 : 39人 (含、派遣社員3名)
- 事業内容 : 医薬品及びその関連化合物と蛋白質の相互作用に関する
解析・評価技術の研究開発及びその研究成果の販売

研究所組織



このパンフレットに記載の研究成果は、新エネルギー・産業技術総合開発機構(NEDO)から委託を受けて実施したものである。

(株)リバーズ・プロテオミクス研究所
千葉県木更津市かずさ鎌足二丁目6番地7
(かずさDNA研究所4F)

TEL 0438-52-3975

FAX 0438-52-3986

<http://www.reprori.jp>

e-mail: administration@reprori.jp