

## はじめに

我々は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本委託研究を行った。本委託研究の特徴は、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。既存医薬品には、その薬理作用(主薬効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。

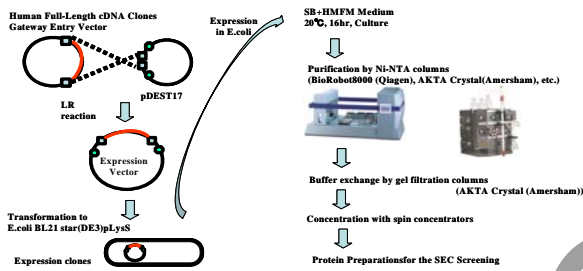
タンパク質と低分子化合物の相互作用を測定する方法は従来から数多く存在するが、本委託研究では網羅的解析を行うために、スループットの高い方法であること、および熱力学的解析により結合解離定数が求められ、特異性の高い相互作用を見出すことが可能であることから、Size Exclusion Chromatography-Mass Spectrometry (SEC-MS) 法および、Surface Plasmon Resonance Biosensor (Biacore) 法を採用した。しかし、これら2つの技術とも、タンパク質-低分子化合物相互作用の網羅的解析に適用するには課題があり、改良を加える必要があった。

## 技術開発の成果

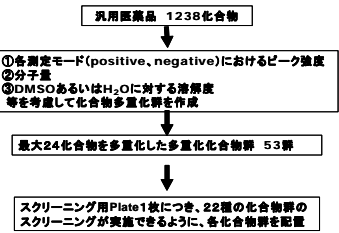
### 1. SEC-MS法によるタンパク質-医薬品相互作用ハイスループットスクリーニングシステムの構築

図2 SEC-MS法の流れ:

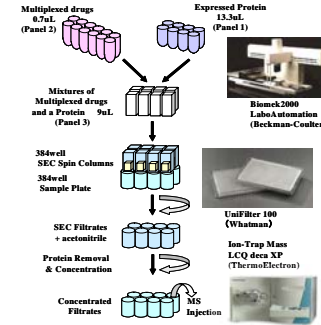
A. ヒト完全長cDNAクローンのタンパク質発現と精製.



B. 医薬品化合物の多重化サンプル調製.



C. SECスピナラムによるタンパク質結合化合物の分離とESI-MSによる同定.



SEC-MS法(図1)について微小化、データ解析の自動化、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、微量で高速の新規解析システムを確立した。これにより、非常に多くのタンパク質と低分子医薬品との相互作用解析が可能となった。本システムを用いることにより、測定開始から解析まで約2日間で相互作用候補ペアを抽出することができる(11種のタンパク質と1238種の医薬品化合物を対象とする場合)。相互作用候補ペアについては、さらに濃度依存性試験による検証を行う(図2A-E)。

本委託研究により、従来法に比べ、解析に必要なタンパク質が約1/20に低減され、また、解析のスループットも大きく向上した(表1)。

図1 SEC-MS法の概略

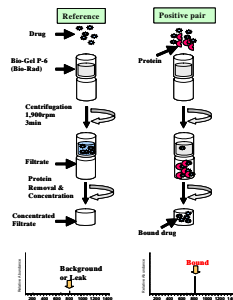
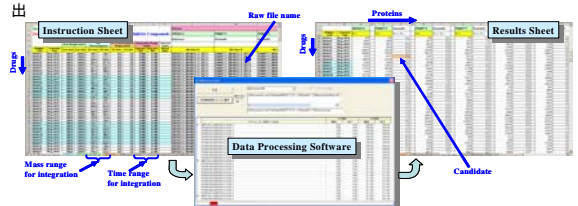


表1 本委託研究により達成されたSEC-MS法改良のまとめ

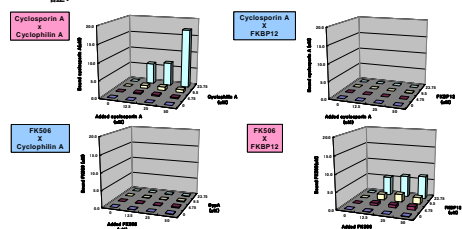
	REPRORI	F.J.Moy et al. <sup>2)</sup>
<b>SEC Condition</b>		
Spin-Columns/Plate	384-wells	96-wells
Column Bed Volume	20 µL	300 µL
Protein Conc. in sample	23.75 µM	100 µM
Drug Conc. in sample	50 µM	1000 µM
Sample Volume/Column	9 µL	25 µL
<b>Sample Requirements</b>		
Drug Multiplicity	24	10
Protein moles/Analysis	333 pmoles	2500 pmoles
Total protein moles for 1238 Drugs	18 nmoles	310 nmoles
<b>MS Throughput</b>		
MS Interval/sample	2.8 min	2.8 min
Screening Throughput for 1238 Drugs	148 min	348 min

参考文献 2) F.J.Moy et al., Anal. Chem., 72 (2001), 571-581.

D. データ処理プログラム(Msbat)を用いた各化合物のMSスペクトル強度の自動抽出



E. 濃度依存性試験による相互作用ヒットペアの検証.



# パネル4: ヒト完全長cDNAから発現させたタンパク質と汎用医薬品の網羅的な相互作用解析(2)

## 2. タンパク質固相化型BIACORE法による結合解離定数の測定と、さらに多様な相互作用解析への展開

相互作用ヒットペアについては、Biacore法により結合解離定数の測定を行っているが、我々は新規のタンパク質固定化法(図3)と微量タンパク質を高純度で精製する技術を確認して、Biacore法のスループット向上させることに成功し、Biacore法でも相互作用スクリーニングを実施することを可能にした(図4、5、および表2)。これにより、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相互作用解析を実施している。

また、CC chemokine receptor 1 (CCR1)をモデルとして、膜受容体を活性を保持したままBiacoreセンサーチップに固定化することにも成功した(図6)。

図4 新規技術開発によるBiacore法の高効率化

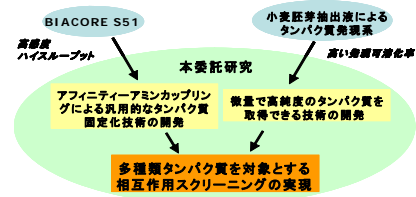


表2 本委託研究により達成されたBiacore法改良のまとめ

	Conventional methods	The affinity-amine coupling methods
Amount of protein required	>10 µg	1 µg
Throughput of the screening	2~3 proteins/week	10 proteins/week

図5 マトリックス化したBiacore法スクリーニングデータ

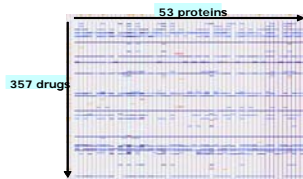
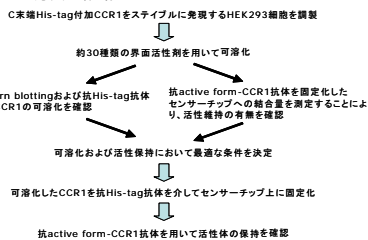
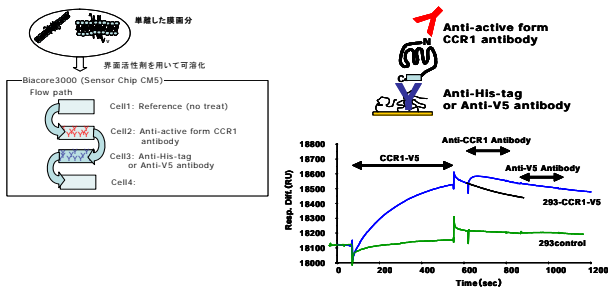


図6 活性を保持したCC chemokine receptor 1 (CCR1)のBiacoreセンサーチップへの固定化

### A. 方法の概略



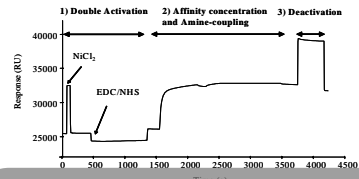
### B. センサーチップへの固定化と活性の確認



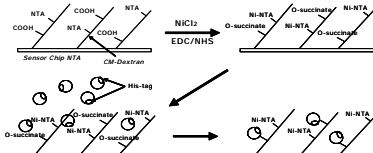
## まとめ

- SEC-MS法およびBiacore法について改良検討を行った結果、SEC-MS法については、現時点で可能な限りの微小化とシステム化を行うことにより、またBiacore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法を開発することにより、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した技術へと改良することに成功した。
- 平成17年度までに、SEC-MS法で約60万ペア、Biacore法で約9万ペアのヒトタンパク質-汎用医薬品相互作用データを取得し、解析を行って多数の相互作用ポジティブペアを見出している。

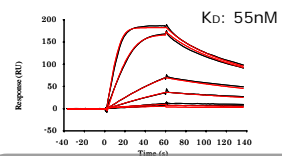
図3 新規タンパク質固定化法(アフィニティー・アミン・カップリング法の開発) A. 固定化の手順



### B. タンパク質固定化の予想図



### C. 新規固定化法で固定化したタンパク質への化合物の結合解析 (Cyclophilin A-Cyclosporine A)



### D. 新規固定化法による各種タンパク質の固定化

Ligand	Purity	Immobilized (RU)
Cyclophilin A	>90%	6,224
FKBP12	>90%	4,491
COX-2	>70%	9,219
Akt1/PKBa	>80%	5,019
MSK1	>90%	6,232
PKA	>90%	4,135
PRAK	>90%	5,870
ROKα/ROCK-II	>20%	4,776

- 得られた相互作用ポジティブペアの情報は、相互作用データベース(パネル5を参照)に入力するとともに、タンパク質および化合物に関する各種の情報を解析することにより、創薬標的として重要性の高いペアの絞り込みを行った。
- 得られた相互作用ポジティブペアに関する解析の結果、新規創薬標的候補となる多数のタンパク質を見出しており、それらのなかには抗2型糖尿病剤の新規標的候補タンパク質が含まれる。