

建設・改造ビームラインを使って

AR-NE3A が創薬研究にもたらすインパクト

天野 靖士

アステラス製薬株式会社研究本部化学研究所リード化学研究室

1. はじめに

創薬研究において標的タンパク質の立体構造情報を活用することは、リード化合物の創製や候補化合物の最適化研究を効率かつ迅速に行うために非常に重要である。また、タンパク質結晶構造解析技術や放射光ビームラインのめざましい進歩により、近年、数多くの創薬標的タンパク質の結晶構造が報告されており、結晶構造解析を創薬研究へ応用できる機会が非常に増えているといえる。しかしながら、単にアポ体の結晶構造が得られたのみでは、化合物がどのように作用しているかを明らかにすることはできないため、創薬研究への応用は難しい。実際に創薬研究へ寄与するためには、自社で合成あるいは発見された化合物との複合体構造情報をできるだけ早く研究者へフィードバックし、各種薬理データ、物性データと合わせて議論することが必要である。また、研究の過程においては、1つの標的タンパク質に対し数百個もの多様な候補化合物が見出されてくる。これらの化合物と標的タンパク質との複合体構造はいずれも重要な情報となるため、創薬研究におけるタンパク質結晶構造解析には膨大なキャパシティが必要となってくる。

近年のタンパク質結晶構造解析技術の進展、豊富な構造情報という背景に加え、自社で保有する高純度タンパク質大量作製技術、結晶解析技術を創薬研究に最大限活用するために、アステラス製薬株式会社（以下、アステラス製薬）では、フラグメントエポリユーションという独自のリード化合物創製法を考案、実践している [1]。フラグメントエポリユーションでは、多様な低分子化合物（フラグメント）ライブラリーをスクリーニングし、低活性ながらタンパク質との重要な相互作用をもったフラグメントを見出すことがまず必要となる。さらに、ヒットとして見出されたフラグメントを、その相互作用情報に基づきコンビナトリアルケミストリーなどによって合成展開し、活性評価、複合体結晶構造解析を行って次の合成方針に反映させるというサイクルを迅速に回転させることで、より早く効率的にリード化合物を創製することができる。これらの過程では、ハイスループット、ハイキャパシティなタンパク質結晶構造解析が必須である。

このような状況を踏まえ、アステラス製薬は、創薬研究に最適なハイスループット型ビームラインの開発研究をフォトンファクトリーへ委託した。開発においては、短時間でより多くの試料をできる限り人の手を介さずに測定できるという点を最も優先していただいた。その結果完成したビームラインが AR-NE3A である。AR-NE3A では、フォ

トンファクトリーにあるタンパク質結晶構造解析ビームラインの中で最も強力な X 線を試料に照射することが可能で、高速高感度の CCD 検出器と合わせ、短時間（1つの試料につき最短で2分以下）でのデータ収集を実現している。また、従来より開発が進められてきた試料交換ロボット PAM および自動データ処理ソフトウェアについてもさらなる開発が進められ、自動連続データ測定・処理が可能となっている [2-4]。結果として、我々が期待していた以上の能力をもったビームラインが完成され、2009年4月の本格稼働後、収集された数多くの貴重なデータが創薬研究を大きく推進している。本稿においては、昨年度のビームタイム利用を通して改めて確認できた、AR-NE3A の優れた特徴について紹介したい。

2. AR-NE3A の利用状況

図1に、アステラス製薬の過去5年間におけるフォトンファクトリーのビームライン利用状況を示す。2008年度までは AR-NW12A および BL-5A を利用していたが、2007年度においてこれらのビームラインに設置した PAM の本格的な運用が始まったことにより、ビームタイムあたりの試料数を増加させることができていた。2007、2008年度における PAM の利用は自動連続測定ではなく、実験ハッチ外から PAM を制御して結晶交換を行うものであったが、DSS および実験ハッチの開閉と手作業による結晶交換が不要となったことで、効率的なビームライン利用が可能となった。また、この2年間の利用結果を基に PAM およびオートセンタリング機能に様々な改良が加えられ、AR-NE3A の自動測定に活かされたという点でも AR-NW12A、BL-5A における PAM の利用の意義は大きかったと考え

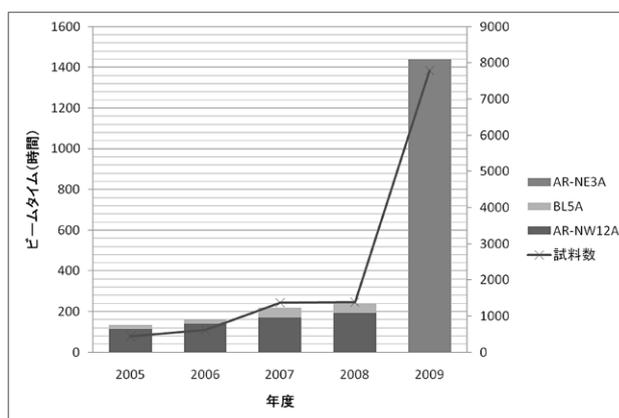


図1 アステラス製薬におけるフォトンファクトリーの利用状況。

ている。2008年度においては244時間のビームタイムに対し試料数は1390個であった。昨年度は、完成したAR-NE3Aにおいて、委託研究に伴い与えられた60日間の優先利用枠をすべて消費し、測定した試料数は7786個であった。すべての試料は自動実験による連続データ測定と自動処理を行った。ビームタイムの増大に応じて試料数を増やすことができた要因としては、研究員がビームラインに拘束される時間が、自動実験の実現により2008年度までと同等以下に抑えられたことが大きい。また、自社研究所内に構築してきた、タンパク質大量作製設備、自動結晶化装置群および自動構造解析システムにより、大量の結晶作成と測定データの迅速な解析に対応できたこともその要因としてあげられる。なお、今年度にはPAMの改良による結晶交換時間の短縮も予定されており試料数をさらに増やすことができるものと期待される。

3. 自動データ測定・処理

AR-NE3Aの最大の特徴が、自動データ測定・処理を可能としている点である。その核となるのが試料交換ロボットPAMで、スタンフォード放射光研究所で開発されたSAMを基に、より高速な作業が可能となるようにフォトンファクトリーにおいて開発されたロボットである。このロボットを利用することで、ユーザーの手を介することなく連続で288個の試料を測定することが可能となる。さらに、自動測定においては、試料に確実にX線を照射するためにオートセンタリング機能が必須となる。これらを利用した自動実験を実施するにあたり、ユーザーとしては準備した試料をロスすることなく確実に測定できることを望むが、昨年度の実績では、ロボットのハンドリングミスなどによって測定ができなかった試料数は13個と全体のわずか0.17%であった。また、オートセンタリングについても98.75%の試料でセンタリングに成功しており、ビームタイムをほとんどロスすることなくデータ測定を実施することができた。また、1年間の自動実験の実施を通して、結晶を固定するループの形状によってセンタリングの成否が左右されることがわかってきたため、使用するループを選別することでオートセンタリングの成功率はさらに高めることができると考えている。

自動データ処理に関しては、昨年度の中で大幅な改良が進められてきたため、処理の成功率を算出することはできないが、最終的に構築されたデータ処理方法においては、十分な質をもったX線回折データであればほぼ確実に正しい指数付けができることを確認している。処理速度についても、ビームラインに設置された複数の解析用コンピュータで並行処理させることにより、データ測定に要する時間と同等以下の時間内にスケーリングまで処理を完了させることができおり、十分な速度を有している。この自動データ処理は、週に300個前後の試料から測定したデータを扱う私達にとって非常に有用であり、従来マニュアルで行ってきた処理に要する時間を他の研究活動にあてられるという意味で大変価値のある機能の1つである。

4. 創薬研究における成果

研究の性格上、残念ながら本稿において詳述することはできないが、昨年度AR-NE3Aで測定したデータから得られた成果を簡単に紹介したい。ここでは、創薬標的として解析の対象にした多くのタンパク質の中から2つのタンパク質をとりあげ、それぞれ標的タンパク質A、Bとする。標的タンパク質A、Bともにフラグメントエポリユーションによるリード化合物創製を進めている。

標的Aについては、約200個のフラグメントに対してAR-NE3Aを利用したハイスループット複合体結晶構造解析を実施することによって、その中にわずか1個含まれていた新規結合様式をもつフラグメントを迅速に見出すことができた。このフラグメントから、コンビナトリアルケミストリーによる合成展開によって阻害活性が400倍向上した候補化合物が得られている。

標的Bについては、約150個のフラグメントに対して実施した複合体結晶構造解析の結果を解析し、基質認識サイトのアミノ酸残基と相互作用しうるスキップフォールドを見出した。さらに、社内化合物ライブラリーから、このスキップフォールドを含む約200個の化合物を探索し複合体結晶構造解析を実施した結果、そのうちの1個の化合物が、上記のアミノ酸残基と相互作用するとともに、基質認識サイトとは異なるサイトにおいても強い相互作用を有することが判明した。標的Bの阻害剤として、この化合物のように2点において相互作用する化合物は報告されておらず、新規性、ポテンシャルともに高い候補化合物を見出したといえる。

5. 最後に

本稿で紹介した研究成果はごく一部であり、数々の発見、ブレイクスルーがAR-NE3Aによってもたらされている。新薬の研究開発には10～15年が必要であり、解決すべき課題も多く残されているが、AR-NE3Aでの研究成果を病気で苦しむ患者さんへと還元できるよう今後も創薬研究に取り組みたいと考えている。今後のAR-NE3Aの利用継続、さらなる改良についてもフォトンファクトリーの皆様のご協力をいただければ幸いです。AR-NE3Aの建設にご尽力いただいた、若槻壯市先生、山田悠介助教をはじめとした構造生物学研究センターの皆様、フォトンファクトリーの皆様にこの場をお借りして感謝申し上げます。

参考文献

- [1] 阪下日登志, 第10回日本蛋白質科学会年会1WF-5, 2010年6月16日～18日, 札幌コンベンションセンター
- [2] Hiraki M, Watanabe S, Phonda N, Yamada Y, Matsugaki N, Igarashi N, Gaponov Y, Wakatsuki S, J Synchrotron Radiat. 2008, 15, 300-303.
- [3] Yamada Y, Phonda N, Matsugaki N, Igarashi N, Hiraki M, Wakatsuki S, J Synchrotron Radiat. 2008, 15, 296-299.
- [4] http://pfweis.kek.jp/index_ja.html