

# ゲノム情報を利用した創薬研究 ゲノミクス、 プロテオミクス技術

住友製薬(株)

研究本部 ゲノム科学研究所

小島 深一

木村 徹

## Drug Discovery Research Based on Genomics Information. –Transcriptomics and Proteomics Technologies–

Sumitomo Pharmaceuticals Co., Ltd.

Genomic Science Laboratories

Shinichi KOJIMA

Toru KIMURA

Only several months has passed since Human Genome Project was successfully finished in this April. However, it has already influenced wide variety of research areas. Especially in the pharmaceutical industry, the genomic information and technology is bringing an evolutionary change in its way of developing drugs, which is sometimes mentioned as a ‘paradigm shift’. Sumitomo Pharmaceuticals has started genomics based research to facilitate its productivity of drug discovery and development four years ago. In this review, we will focus on two key technologies, transcriptome and proteome analysis, to make the use of genomic information, and will show some of our data.

### はじめに

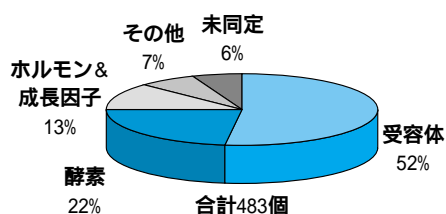
2001年2月にヒトゲノムの大まかな配列(ラフトラフト)が公表され<sup>1,2)</sup>、その後の厳密な塩基配列の確認作業を経て本年4月14日にヒトゲノム解析の終了が宣言された。このプロジェクトは30億塩基にも及ぶヒトゲノムの全DNA配列を決定するという壮大なもので、人類の月面到達にも匹敵する画期的な成果であるとされている。もう一つの画期的な点は、世界の研究者が情報の即時公開に同意した上で多数の研究機関が分担しながらプロジェクトが進行した点にある。情報技術の発展のお陰で、進行具合や得られたデータに対してインターネットを通じて世界の研究者が全く制限無しにリアルタイムにアクセスすることができた。プロジェクトの進行と並行して応用技術が開発され、またゲノム情報を利用した新たな研究戦略が立案されてきたため、既にゲノムプロジェクトの影響は様々な分野で現れている。産業界で最も大きな影響を受けたのは製薬業界である。それはヒトの健康を対象としているという事業の本質のためだけでなく、近年の著しい研究投資の増加にも拘らず新薬の承認が急減しており、従来の創薬方法の限界が見えてきて

いたため新たな方法論が待ち望まれていたという理由も大きい。実際に、ゲノム情報の充実が創薬研究においてパラダイムシフトと呼ばれるほど大きな影響をもたらしつつある。

遺伝子情報の充実とともに、医薬品が生体内で作用し薬理作用を示す源となる生体内物質(医薬品の分子ターゲットと呼ぶ)を遺伝子として捉えなおし分類することが可能になった。それによると、驚くべきことにこの100年余りの期間に世界で開発された医薬品はせいぜい500個の分子ターゲットしか持っていなかったことが明らかにされた<sup>3)</sup>。さらに、その多くはGPCR(Gタンパク共役型受容体)を代表とする受容体タンパク、チャンネル、トランスポーター、酵素と呼ばれる一群の遺伝子に集中している事がわかってきた(第1図)。全遺伝子の情報であるゲノム情報が解明されることによって、遺伝子の全てが明らかになると、その中に新たな創薬ターゲット遺伝子が2000から3000個見つかることが期待されている。今や薬のターゲットになり易い遺伝子の全リストを眺め、その中から対象疾患に関連する遺伝子を選択することから創薬研究が始まる事になった。これまでは創薬ターゲットになる遺伝子を長年の研究によって新たに発見するこ

とから研究が始まっていたのと比べると180度の転換である。更に、世界中の誰もがそのリストを手に行っているわけであり、如何にして早く目的に適ったターゲットを選び出すかといった競争が始まっている。一方生物を対象とした研究の手法にも大きな変革が訪れている。これまで生体内現象は全体を捉えることが難しく、部分的なモデル実験からの類推で何とか断片的に把握していた。ゲノム情報の充実によって、全ての遺伝子やタンパク質の変動を網羅的に解析し、そこから生体反応を演繹するという方法論が現実的になってきた。このような網羅的解析手法の中でmRNAの転写調節を対象とするものをトランスクリプトミクス、タンパク質の発現を対象とするものをプロテオミクスと呼んでいるが、いずれも莫大なデータを生成するのが一つの特徴であり、情報科学的な支援なくしては研究を進めることが出来ない。そこからこのような分野を専門とするバイオインフォマティクスと呼ばれる研究分野も出来てきている。

第1図 100年間の医薬品ターゲット生化学的機能別分類



Nature Biotech. 14, 151(96)

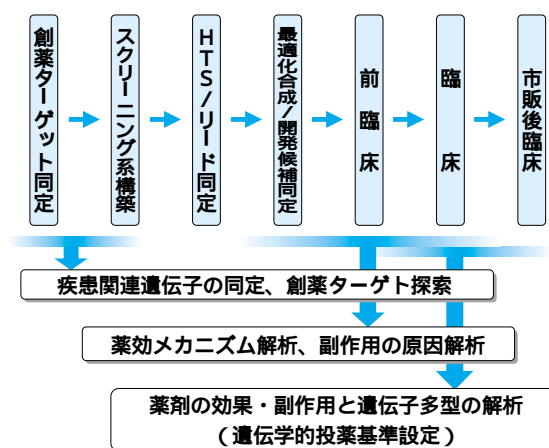
住友製薬でも、このようなゲノム技術を活用して創薬研究の促進を図るため、積極的な取り組みを進めている。本稿ではゲノム情報の利用において中心的な技術となるトランスクリプトミクス（本稿ではゲノミクス（研究）と呼ぶ）とプロテオミクスについて技術的な側面を中心に、住友化学と住友製薬が共同で運営している住友製薬ゲノム科学研究所の最新の成果を交えながら紹介する。

### 創薬へのゲノム技術の応用

創薬研究は図に示すように、創薬ターゲット遺伝子を選び出す段階から、化合物のスクリーニング、動物モデルでの薬効確認とリード化合物同定、より活性・安全性が高く優れた物性を有する化合物を選抜する最適化、定められた種々の安全性試験を実施しヒトに対する安全性を担保する前臨床試験、ヒトでの効果と安全性を確認する臨床試験をへて申請/審査され認可される。承認、上市された医薬品については更に有効性と安全性を確認するための市販後臨床試験を科されることもある（第2図）。このように数々

のステップを経て医薬品は出来あがるため、現在の創薬研究は一つの新薬を上市するために期間にして10年から15年、総研究開発費200億円以上を要する大きなプロジェクトとなっている。ゲノム情報の有効な活用は創薬研究の各段階において革新的な効果をもたらすものと期待されており、各社その利用技術の開発や応用研究に精を削っている。

第2図 創薬研究へのゲノム技術の応用



### 基盤技術

遺伝子は細胞の中ではDNAの塩基配列として記載されており、ヒトでは3 - 4万個の遺伝子が30億塩基対のゲノムDNA上に書かれているとされている。これらの遺伝子が必要な時に必要な場所でmRNAに転写され、それがタンパク質に翻訳されて機能を発揮する。従って遺伝子利用の第一段階であるmRNAの発現の検出と機能発現体であるタンパク質の発現解析を網羅的に行なうことによって生体内の事象を正確に捉えることができるようになる。機能発現体がタンパク質であるため本来はタンパク質の発現と機能の解析を網羅的に実施することが理想であるが、タンパク質は広範な化学的特性を持つ20種類のアミノ酸で構成されているため個々のタンパク質の物理化学的性質が大きく異なり、実験上、多種類の分子を同時に扱うのは困難が伴う。また、機能解析には化学修飾や立体構造の違いを識別しなければならないという問題もある。一方、mRNAは全ての遺伝子が互いに性質の似通った4種のリボ核酸の配列に違いがあるだけで、物理化学的性質は非常に似通っており、同時・網羅的解析には大変適した対象である。更に、核酸の特性である半保存的複製の原理を応用することによって一度精製したmRNAを試験管内で数十万倍に増幅（mRNAそのものの量を増やす事ができる）するといったことも可能である。そのため、実際の研究ではプロテオミクス技術とゲノミクス技術との両者のメリットを生かし

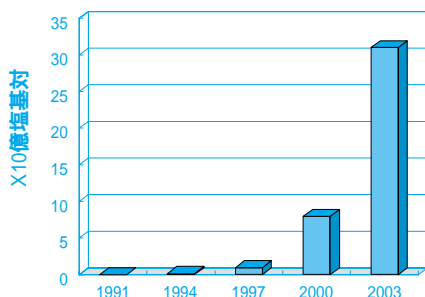
ながら進めることが必要になっている。ゲノム情報の充実と相俟ってゲノミクス分野ではDNAチップと呼ばれる革新技術が生まれ、プロテオミクスでは質量分析と2次元電気泳動法に画期的な改良が加えられていずれもゲノム科学研究には不可欠の実験手法となっている。次項ではバイオインフォマティクスとともにゲノミクス、プロテオミクスについてゲノム科学研究所の技術を中心に具体的事例を交えながら紹介する。

### ゲノム科学研究所における基盤技術整備

#### バイオインフォマティクス

遺伝子配列、遺伝子発現、タンパク質配列、タンパク質発現、タンパク質相互作用マップ、更には文献情報と生物研究において生成/解析の対象となるデータは爆発的な増加を見せており、公共データベースにおける遺伝子配列データだけでもこの10年間に約100倍に増加した(第3図)。所内で取得する遺伝子発現データも同様で、一回の実験で数十万データポイントといった情報が生成するため、この3年間で得られたデータは実に数百ギガバイトにもなる。このような大量のデータの整理保存/解析には情報科学的な手法が必須であり、当研究所でもバイオインフォマティクスを専門とする研究員を配し研究支援、基盤の整備を行なっている。更に、ゲノム情報の利用には公的データベースで公開される一次情報だけでは不十分で、スプライシングパターンや発現分布情報、機能分類などについての情報を加えて利用しやすい形に加工したデータベースをIncyte社から導入し、社内の全研究員がアクセスできる体制を整えている。こうした情報を用いることによって、例えば、創薬ターゲットになり得る受容体遺伝子全リストあるいは肝臓で発現している全ての遺伝子といった情報が即座に得られるようになっており、創薬研究の基盤となっている。

第3図 GenBank総登録塩基数の推移

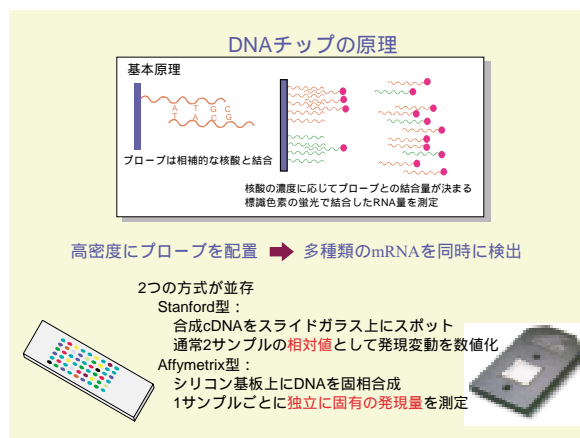


#### ゲノミクス

ゲノムDNA配列の解析が一通り終了した現在、DNAチップを用いた遺伝子発現解析が重要になって

きている。DNAチップとは数千から数万個程度の遺伝子の発現量を網羅的に解析する技術である。細胞あたり2、3分子のmRNAが存在すると充分に検出できる感度も有している。チップの作り方により大別してcDNAをプローブとしてスライドガラスに貼り付けるStanford型とシリコン基板上で固相合成したオリゴヌクレオチドをプローブにするAffymetrix型に分かれる<sup>4, 5)</sup>。Stanford型は通常1遺伝子を一つのプローブで同定するのに対して、Affymetrix型では1遺伝子を20以上のプローブで同定するといった原理上の違いもある。両者の最大の違いは、Affymetrix型は1サンプルごとに発現量を計測するのに対して、Stanford型では通常2サンプルの比として発現データが得られるといった点にある(第4図)。このため多サンプルの複雑な比較解析を行う上ではAffymetrix型が優れている。当研究所でもこのような点を重視して主にAffymetrix社のDNAチップを用いている。DNAチップの利用によって、数年前には一人の実験者が1遺伝子の発現量を解析するのに1週間を要していたのが、現在では2、3日で数万遺伝子の発現量を知ることができるようになってきている。2、3年前DNAチップの開発初期には、DNAチップはデータの再現性に問題があるとされていたが、当研究所では数十ステップの反応条件を詳細に検討し、実験のクオリティコントロールをきちんと行なうことによって現在では再現性の問題はほぼ解決している。

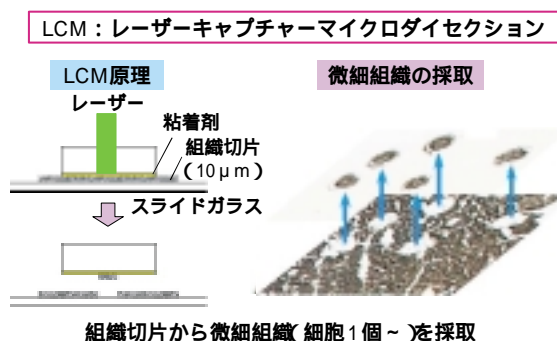
第4図



これまで肝臓、腎臓といった臓器ごとの解析が主であったが、各臓器内にも種々の機能を担っている器官がありそれぞれに異なる細胞から構成されているため、臓器全体を見るだけでは不十分な事が多い。最近になり、laser capture microdissection (LCM) と呼ばれる方法が実用化された(第5図)。この方法を使えばレーザー光を利用して狙った細胞だけを組織切片から切出すことができる。こうして調製されたRNAは

数百ナノグラム以下と非常に微量であるが、リニア増幅法と呼ばれるRNA増幅反応を用いると10万倍以上に増幅し、DNAチップ実験に供することができる<sup>6)</sup>。

第5図



DNAチップにより発生する大量のデータから疾患と関わりのある情報を選別するためには、まず比較対照データを持つ必要があるが、当研究所ではこのような目的でGeneLogic社やLifeSpan社といった専門のベンチャー企業から大規模なデータベースを導入している。GeneLogic社のデータベースには数千の健康者や患者のヒト組織サンプルから得られたDNAチップデータが納められており、社内研究で得られた情報を即座にヒト組織サンプルのデータと比較することによって、動物実験の結果をヒト疾患に対応付けることが可能になっている。LifeSpanデータベースは創薬ターゲットとして最も有望と考えられているGPCRに特化したデータベースであり、全てのGPCRのヒト組織切片中での発現分布情報を得ることができる。GPCRに限らず、各種遺伝子の組織内発現分布を調べることが必要なことが度々あるが、効率よく組織内発現分布を調べるための高効率in situハイブリダイゼーション法も独自に確立しており、1研究員が月間数十個の遺伝子进行处理することができる。また遺伝子機能抑制実験にsiRNAやアンチセンスDNAを用いるが、これらの設計法および細胞内導入法等独自技術の開発を行っており(いずれも特許出願済)全体の研究効率が向上するように努めている。

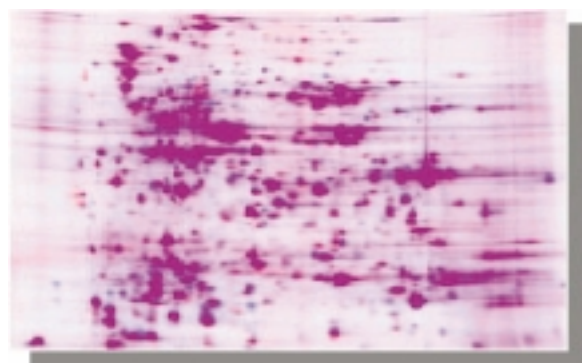
### プロテオミクス

プロテオームは遺伝子の転写産物mRNAの翻訳産物であるタンパク質群であり、その系統的な解析はプロテオミクスと称される。疾患あるいは薬剤によって生体内で変動するタンパク質を同定し、その機能、ネットワークを明らかにすることにより、疾患の原因、薬剤の作用点・副作用の解明に役立てつつある。プロテオミクスには、大別して発現プロテオミクスと機能プロテオミクスがある。発現プロテオミクスはタンパク質の発現量を比較定量する手法であ

り、二次元電気泳動法(2-DE)<sup>7)</sup>や質量分析法(MS)が用いられる。機能プロテオミクスとしては、相互作用するタンパク質を同定し、特定のタンパク質を細胞に過剰発現させ、あるいは細胞内のタンパク質を消失させることでタンパク質の機能を解析する技術がある。

以下に当研究所で確立した発現プロテオミクスの技術について概説する。2-DEはタンパク質の表面荷電および分子量の差で分離する手法であり、一度に約3000個のタンパク質の分離が可能である。従来は定量性、再現性に問題があったが、アマシャム・バイオサイエンス社により、蛍光ディファレンシャル二次元電気泳動システム2D-DIGE<sup>8)</sup>の手法が開発された(第6図)。本法により2種類のサンプルをそれぞれ異なる波長の蛍光試薬CyDyeでラベル化することにより、1枚のゲルで比較定量、統計解析することで信頼性のあるデータを取得することが可能になった。発現量に差のあるスポットを蛍光発色率の差によりモニターでき、ナノ・グラムオーダーの数千個のタンパク質について1.5倍以上の差を比較することが可能である。当研究所では、3年前に国内で最初に本技術を導入し、創薬研究への応用を図った。ただし、本システムの解像度をして約3000個のタンパク質しか解析できないため、十分な成果を得るためにはサンプルの前処理等の工夫が鍵である。細胞のオルガネラ分画は、2-DEの解像力をあげるためにも、タンパク質の局在情報を得るためにも非常に有用であり多用している。

第6図 蛍光ディファレンシャル二次元電気泳動像



プロテオーム解析のブレークスルーは、マスペクトル(MS)機器の性能が飛躍的に向上したこと、ゲノム配列が決定され、ペプチド配列をMSから検索により同定できるようになったことによりもたらされた。2種類のイオン化法、マトリックス支援レーザー脱離イオン化法(MALDI)<sup>9, 10)</sup>とエレクトロスプレーイオン化法(ESI)<sup>11)</sup>がタンパク質及びペプチドのイオン化を容易にし、MSによる生体高分子の解析が大きく進んだ。今では、タンパク質を酵素で分解した時

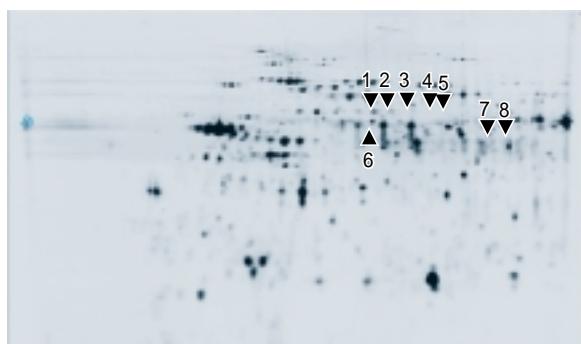


変動する4遺伝子を絞り込み、これら遺伝子の変動をタンパク質のレベルでも確認した。絞り込まれた遺伝子からカルシニューリン、NFAT2を介するカルシウムシグナル系が重要であることが示唆され、実験的にもカルシニューリンの阻害剤である免疫抑制剤サイクロスポリンAやNFAT2のアンチセンスDNAによって破骨細胞分化が抑制されることを確認した<sup>14)</sup>。この一連の結果によって、これまで臨床的に知られていた免疫抑制剤による骨破壊抑制のメカニズムが初めて分子レベルで明らかになった事になる。この成果は世界的にも高く評価されており海外学術誌の総説等でも紹介された。NFAT2そのものは転写因子であるため創薬ターゲットとしては適さないがNFAT2によって制御される遺伝子の中から創薬ターゲットとなり得る遺伝子の同定もできており(特許出願済)新たな創薬展開の可能性が出てきている(第8図、第9図)。

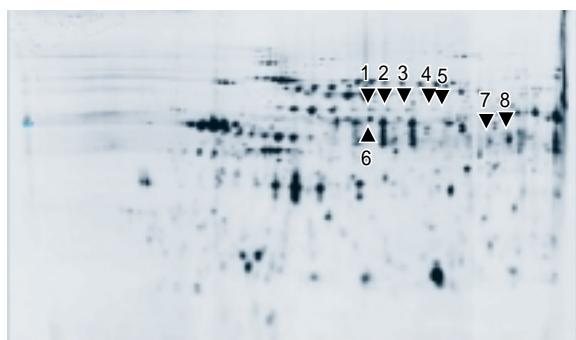
プロテオミクスによる虚血性心疾患病態モデルの解析  
 虚血性心疾患治療剤として研究が進められている薬剤について、他剤との差別化に繋がる作用点を探索する目的でプロテオーム解析を実施した。その基礎検討を兼ねてラット摘出灌流心を用いた虚血/再灌流モデルにおけるタンパク質変動を解析した。

虚血前、虚血(40分後)、再灌流(20分後)のラット心臓についてオルガネラ分画した後に、発現プロファイリングを実施した。核、未破壊の細胞画分、小胞体、ミトコンドリア、膜画分、細胞質可溶性タンパク質画分に分画した後に、それぞれの画分を蛍光試薬CyDyeでラベル化し、二次元電気泳動システム2D-DIGEにより解析した(第10図)。その結果、虚血、再灌流に伴って、ジスルフィドイソメラーゼ(PDA3)、ヒートショックタンパク質HSP60およびElongation Factor TUの発現量が変化することを見出した(第1表)。また、

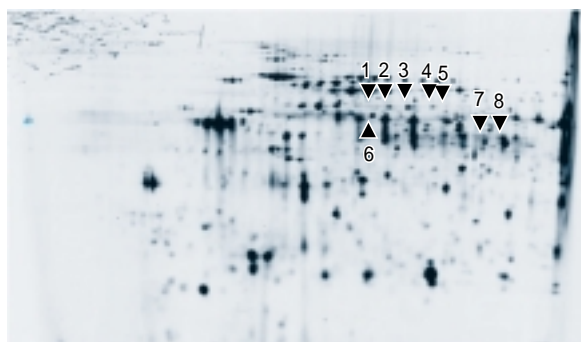
第10図 虚血性心疾患病態モデルの2D-DIGE解析



(a) 虚血前



(b) 虚血(40分間後)



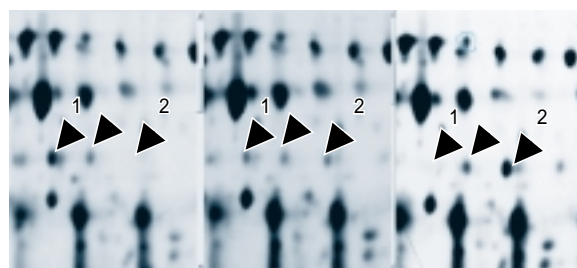
(c) 再灌流(20分後)

第1表

Spot No.	Identity	虚血後	再灌流後
1	Protein Disulfide Isomerase A3 Precursor(ERP60)		
2	Protein Disulfide Isomerase A3 Precursor(ERP60)		
3	Protein Disulfide Isomerase A3 Precursor(ERP60)		
4	Protein Disulfide Isomerase A3 Precursor(ERP60)		
5	Protein Disulfide Isomerase A3 Precursor(ERP60)		
6	60kDa Heat Shock Protein, Mitochondrial Precursor		
7	Elongation Factor TU, Mitochondrial Precursor		
8	Elongation Factor TU, Mitochondrial Precursor		

第11図 PDA3タンパク質の脱リン酸化スポットおよびリン酸化部位の同定

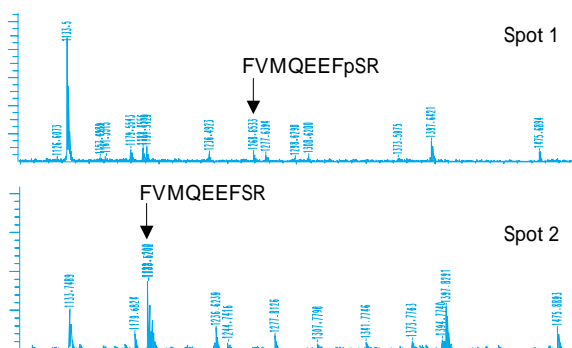
虚血前:(a) 虚血(40分間後):(b) 再灌流(20分後):(c)



(a)

(b)

(c)

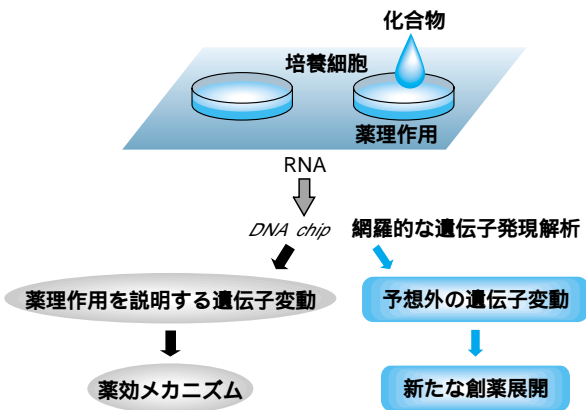


等電点の異なるスポット1および2について詳細に解析した結果、PDA3が脱リン酸化されていることを見出すと共に、PDA3のリン酸化部位を343残基目のSerと同定し、PDA3脱リン酸化と虚血との関連性を初めて明らかにすることができた<sup>15</sup>(第11図)。また、2D-DIGE解析技術が修飾タンパク質の変動解析に有効であること、MS/MS解析技術がリン酸化アミノ酸の同定に有効であることが実証された。

化合物の作用メカニズム解析からの創薬展開

新たな創薬ターゲット探索を目的とした病態および病態モデル解析と共に、ゲノム科学研究所で注力しているのが社内で研究中の化合物の作用メカニズム解析である。ゲノミクスの手法は網羅性に一つの特徴があり、薬効メカニズム解析を進める中で当初期待していない結果を得ることがある(第12図)。研究中の化合物の作用メカニズム解析を行った際、予想もしなかった一群のコレステロール代謝関連遺伝子の発現が抑制されることが判明し、実際に動物実験のデータを見直すとこの化合物やその類縁体を投与したラットでは血中のコレステロールが減少していることが確認されたため、それをきっかけに糖尿病をターゲットとした新たな創薬研究に発展した例もある。

第12図 薬剤作用メカニズム解析へのDNAチップの利用

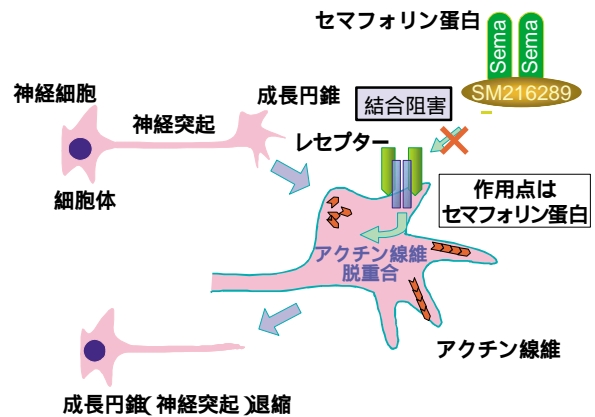


薬剤作用メカニズム解析

ゲノミクス技術は、従来の実験手法との密接な連携が伴わないと創薬研究としての成果にはつながらない。最近、創薬第一研究所などとも協力しながら神経再生促進剤 SM-216289 の作用メカニズムの解明に成功した<sup>16</sup>。この化合物については、研究当初からゲノムデータを積極的に活用して研究を推進してきた点からもゲノム科学と関りが深く、最近では脊髄損傷後の神経の再生を示した結果が新聞紙上などでも紹介され注目を集めている。SM-216289 はセマフォリン3A (Sema3A) と呼ばれる神経伸長抑制因子に対

する特異的な阻害剤であるが、このSM-216289 (糸状菌から単離された天然物) が高分子タンパク質であるSema3Aに直接結合してその受容体との結合を阻害するという非常にユニークな作用メカニズムを証明することができた(第13図)。このような阻害メカニズムはこれまであまり例がなく、初めて見出されたSema3A阻害剤であることと併せて高く評価されている。また、受容体への結合を阻害するという作用メカニズムは過剰なリガンドによる作用を選択的に抑制すると考えられ、創薬の観点からも有望でないかと期待されている。

第13図 SM-216289 : 作用メカニズム



おわりに

ゲノム技術は、薬理、合成、安全性といった従来からの創薬研究のプロセスと遊離したものではあり得ず、これらの研究と融合することによって最大の効果を発揮する。ゲノム科学研究所では非常に新しい研究分野であるゲノム科学の成果を創薬研究に有効に活用すべく種々の技術開発を進めながら、創薬研究に活用できるところから積極的に活用するといった姿勢で研究を進めている。本稿では創薬支援の観点から、技術を中心に幾つかの応用事例も織り交ぜて紹介したが、ここでは触れなかったことも多い。例えばテーラーメイド医療を目指した個人間の薬剤応答性の違いに関する研究、ゲノムデータベース解析から得られた情報に基づいたリバースジェネティック的な創薬研究なども積極的に進めているが今回は取り上げなかった。これらに関しては別の機会に紹介したいと思う。

引用文献

1) Venter JC, et al. : The sequence of human genome. Science 291 : 1304-51, 2001  
 2) Lander ES, et al. : Initial sequencing and analy-

- sis of the human genome. *Nature* 409 : 856-9, 2001
- 3) Drews I : *Nature Biotech.* 14, 1516 (1996)
- 4) Schena M, et al. : Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* 270 : 467-70, 1995
- 5) Lipshutz RJ, et al. : High density synthetic oligonucleotide arrays. *Nature Genet.* : 21, 20 - 24, 1999
- 6) Emmert-Buck MR, et al. : Laser capture microdissection. : *Science* 274 : 998 - 1002, 1996
- 7) O'Farrell PH : High resolution two-dimensional electrophoresis of protein. *J Biol Chem.* 250 : 4007 - 4021, 1975
- 8) Tonge R, et al : Validation and development of fluorescence two-dimensional differential gel electrophoresis proteomics technology. *Proteomics* 1 : 377 - 396, 2001
- 9) Tanaka K, et al : Protein and polymer analyses up to m/z 100,000 by laser ionization TOF-MS. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2 : 151, 1988
- 10) Hillenkamp F, et al : Mass spectrometry of peptides and proteins by matrix-assisted laser desorption/ionization. *Methods Enzymol.* 93 : 280 - 289, 1990
- 11) Fenn JB, et al : Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science* 46 : 64 - 67, 1989
- 12) Henzel WJ, et al : Identifying proteins from two-dimensional gels by molecular mass searching of peptides fragments in protein sequence databases. *Proc Natl Acad Sci USA* 90 : 5011 - 5015, 1993
- 13) Chernushevich IV, et al : Orthogonal-injection TOFMS for analyzing biomolecules. *Analytical Chemistry* 71 : 452A - 461A, 1999
- 14) Ishida, et al. : Large scale gene-expression analysis of osteoclastogenesis in vitro and elucidation of NFAT2 as a key regulator. *J. Biol. Chem* 277, 41147 - 41156, 2002
- 15) Sakai, et al. : Proteomic analysis of rat heart in ischemia and ischemia-reperfusion using fluorescence two-dimensional difference gel electrophoresis. *Proteomics.* 3 (7): 1318-24, 2003
- 16) Kikuchi, et al. : In vitro and in vivo characterization of a novel semaphorin 3A inhibitor, SM-216289 or Xanthofulvin. *J. Biol. Chem* in press

## PROFILE



小島 深一  
*Shinichi KOJIMA*

住友製薬株式会社  
研究本部 ゲノム科学研究所  
主席研究員、農学博士



木村 徹  
*Toru KIMURA*

住友製薬株式会社  
研究本部 ゲノム科学研究所  
主席研究員、理学博士