

# 光を使った化合物スクリーニング技術

## [技術の概要]

当機構では様々なアッセイ方法の支援を行っているが、特に吸光、蛍光、発光などの光を利用する多検体高速アッセイ法の支援に実績がある。

各種酵素による基質の変化やルシフェラーゼを用いるレポーター遺伝子アッセイ、タンパク質間相互作用検出、細胞内カルシウム濃度変化測定など用途は多岐にわたる。

特に、糖転移酵素やキナーゼに関し、低コストで行えるアッセイ方法を開発<sup>※</sup>し、技術提供可能である。

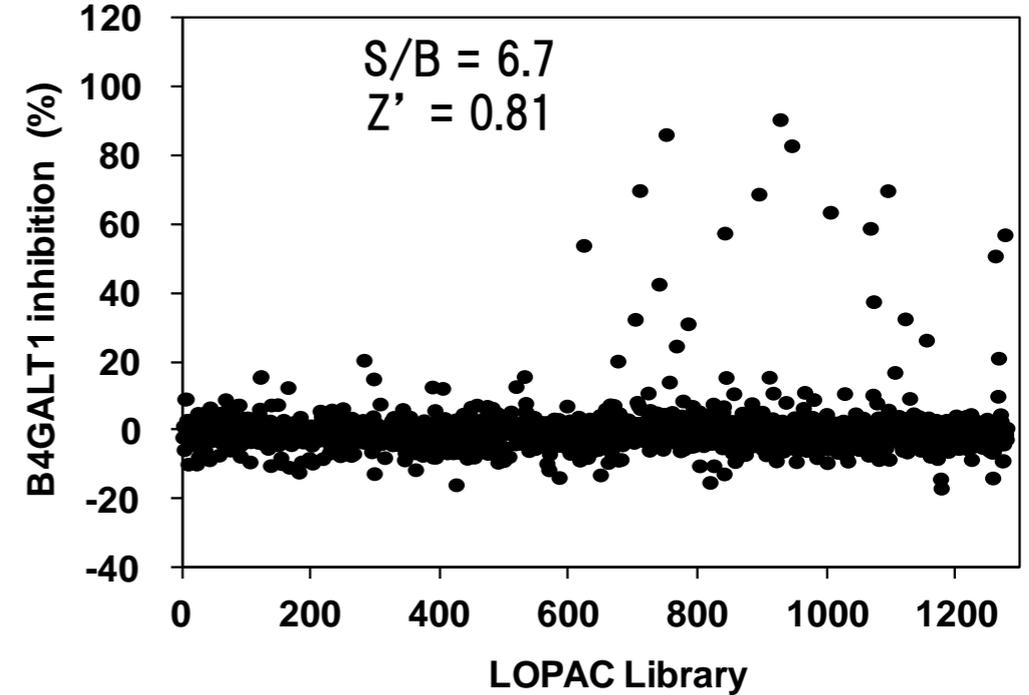
※熊谷ら 和光純薬時報、83(2)、14-17 (2015)

### 利用機器の例:

- プレートスタッカー付のプレートリーダー
- プレートイメージャー (FDSS7000)
- 細胞イメージャー (ArrayScan VTI)
- LabChipシステム (EZ Reader II)

## [技術の利用例]

既知薬理活性化合物ライブラリー(LOPAC)を用いた糖転移酵素B4GALT1の蛍光HTS



### 連絡先

[所属] 東京大学創薬機構

[名前] 小島宏建

**化合物ライブラリー** **検索**

<http://www.ddi.u-tokyo.ac.jp/> をご参照下さい

# 創薬コンサルティング

## [技術の概要]

### 専門家との創薬ブレインストーミング

最初から出口を踏まえて創薬開発を行うため、北大病院臨床開発研究センターとの連携による製薬企業OB等の専門家が加わったディスカッション、Brain storming (BS)ミーティング、創薬シーズ発掘を進めている。

- ・創薬標的とその競合状況等に関するアドバイス
- ・ハイスループット化に関するアドバイス



### シーズ探索・ 創薬BSミーティング

### 標的タンパク質発現系と結晶化の相談

糖鎖修飾が不要な場合

糖鎖修飾が必要な場合

発現系



大腸菌



HEK293S GnTI-細胞



カイコ  
バキュロウイルス

結晶化

細胞表面受容体・高等動物由来標的タンパク質・  
化合物複合体の結晶構造解析の実績あり

### 発現系構築・結晶化技術指導

## [技術の利用例]

### ➤ スクリーニングへの展開

2015年3月までに38件の相談会を実施し、12件がスクリーニングを実施。3件は評価系構築中。  
このうち、北大病院との連携による事前評価を受けた4件について、全てスクリーニングを展開している。

### ➤ タンパク質発現と結晶化

- 大腸菌封入体発現およびリフォールディング、ヒト培養細胞、カイコバキュロウイルス発現系など複数の技術を使い、標的タンパク質を調製した。
- 基質・細胞表面受容体の共結晶解析から、その阻害剤化合物合成の方針を決定した。

### 連絡先

[所属] 北海道大学薬学研究院  
創薬科学研究教育センター

[名前] 前仲勝実

[E-mail] machine\_info@pharm.hokudai.ac.jp

# アッセイ系構築・調整によるスクリーニング支援

## [技術の概要]

### アッセイ系の構築支援 HORNET、Mosquito 等

1. 創薬支援自動化スクリーニング装置 HORNET-HTSでは、96穴・384穴プレートについて、複雑なプレート操作やハイコンテント測定等の全自動化が可能である。
2. ナノリッター分注システムMosquitoでは、50nl~1.2 $\mu$ lの範囲内で正確に吸引、分注が可能である。タンパク質の結晶化にも利用できる。
3. PersonalPipettor230は直観的に操作ができる分注機で、他分注機では難しい滅菌操作が可能である。
4. プレートウォッシャーおよびマルチディスペンサーで、96穴及び384穴プレートを用いた様々なプレートハンドリングが可能である。



HTS screening  
HORNET-HTS



High contents  
image Operetta



ナノリットル分注器  
Mosquito LCP

スクリーニング系構築の手びき  
および結晶化の支援

## [技術の利用例]

### ➤ 21万化合物スクリーニングの実施

HORNETとOperettaを使用し、21万化合物に対するハイコンテントスクリーニングを支援した。

### ➤ 反応系の最小化、測定法の変更による最適化

- 偽陽性を生じやすい化合物評価系の最適化(使用機器:マルチディスペンサー)を行うことで新規評価系を構築した。
- 低コストかつハイスループットな実験系を構築し(使用機器:PersonalPipettor230、プレートウォッシャー、マルチディスペンサー)、約1万化合物を1ヶ月未満でアッセイした。

1万化合物スクリーニングを5件実施

### 連絡先

[所属] 北海道大学薬学研究院  
創薬科学研究教育センター

[名前] 前仲勝実

[E-mail] screening@pharm.hokudai.ac.jp

# 東北大学化合物ライブラリー

## [技術の概要]

- ◆ 東北大学薬学研究科有機化学系6分野が保有する独自の化合物群(約6,000化合物)
- ◆ ヘテロ環化合物、アルカロイド、環状ペプチド、フラボン、ジヒドロピリジン、複素環含有化合物、天然物、およびその合成中間体を含む多様な化合物ライブラリー
- ◆ DMSO溶液でスクリーニングに提供(96ウェル、384ウェルに分注)
- ◆ ヒット化合物発見後の合成展開を促進

### 内訳

・含ヘテロ環化合物	47%
・天然物、その類縁体	6%
・橋かけ構造	13%
・スピロ環	3%

## [技術の利用例]

- ◆ GPCR拮抗薬の探索
- ◆ 転写因子阻害剤の探索
- ◆ 特定細胞の増殖抑制剤の探索
- ◆ 特定酵素の発現抑制剤の探索
- ◆ 変異タンパク質の安定化剤の探索

### 連絡先

[所属] 東北大学大学院薬学研究科  
分子細胞生化学分野

[名前] 青木淳賢

[E-mail] jaoki@m.tohoku.ac.jp

# 化合物ライブラリ規模に応じたHTS技術支援

## [技術の概要]

### ① 大規模HTS支援システム

★Motomanアームロボットを核とした全自動HTSシステム。10万化合物以上の化合物ライブラリーのHTSも実施可能(～16,128サンプル/ラン)。アッセイの自動化に係るプログラム作成も支援いたします。

#### <搭載機器>

- ・Biomek NXP
- ・FLIPRTETRA
- ・Multidrop combi
- ・ELx405
- ・Cytomat2C
- ・SpectraMax Paradigm
- ・Vspin
- ・Plate hotel

### ② 中規模HTS支援システム

★ヒット・リード化合物の最適化、及び、小～中規模スクリーニングに特化したHTS支援システム。

#### <搭載機器>

- ・Multidrop combi
- ・Biomek FX
- ・Mosquito
- ・PHERAStar-FS
- ・CO<sub>2</sub>インキュベーター

### ③ その他;低酸素細胞培養解析プラットフォーム

★Ruskinn社製の低酸素グローブボックスがご利用頂けます。低酸素環境下(1%又は5%O<sub>2</sub>)での化合物処理等に最適です。



化合物数

100,000～

10,000～

1,000～

## [技術の利用例]

<ルシフェラーゼレポーター細胞を用いた実施例>

1. 384ウェルプレートへの細胞播種



2. 化合物添加前の前培養



3. 含化合物培地への培地交換

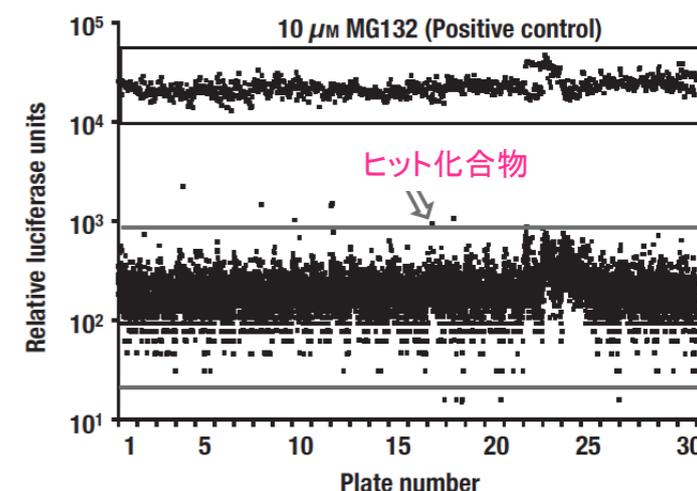


4. 化合物暴露



5. レポーター活性の測定

化合物数; 9,600  
ヒット化合物数; 6



Tsujita et al., Genes. Cells., 2015.

## 連絡先

[所属] 東北大学大学院医学系研究科  
医化学分野

[名前] 山本雅之

[E-mail] pford@med.tohoku.ac.jp

# ヒトiPS由来心筋細胞を用いたQT延長予測

## [技術の概要]

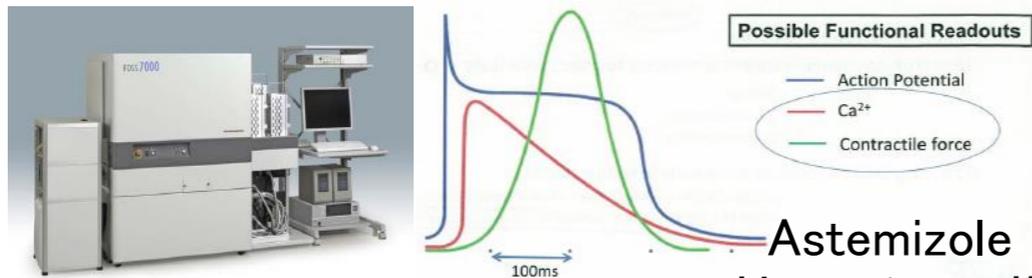
### 背景

- QT延長に関するガイドライン (ICH S7b) : ヒト医薬品の心室再分極遅延 (QT間隔延長) の潜在的可能性に関する非臨床的評価 (2005年; 日本は2009年)
- IKr (*hERG*) の他にQT延長に関与するK<sup>+</sup>、Na<sup>+</sup>、Ca<sup>2+</sup>チャネルアッセイも重要視されている。

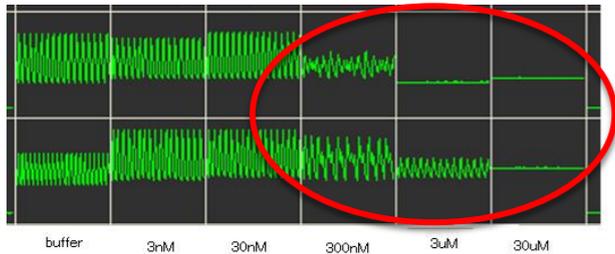
**問題:** 既存のPatchClamp法は高価な安定化発現細胞を20程度用意する必要がある。細胞の購入・維持・高価な機器の購入など探索段階の創薬研究においては問題があった。

**解決:** FDSS上でヒトiPS由来心筋細胞を用いたCa<sup>2+</sup> Flux Assayを行うことにより、網羅的なQT延長予測が可能になった。

**支援に供する設備名:** FDSS7000 (浜松ホトニクス)

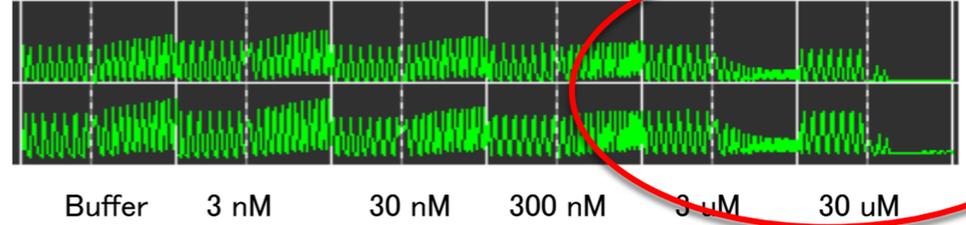


QT間隔延長、心室性不整脈、突然死が報告  
ピークの高さ、幅の変化

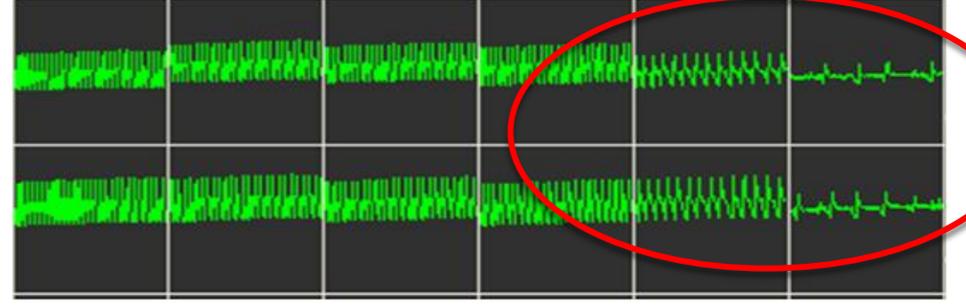


## [技術の利用例]

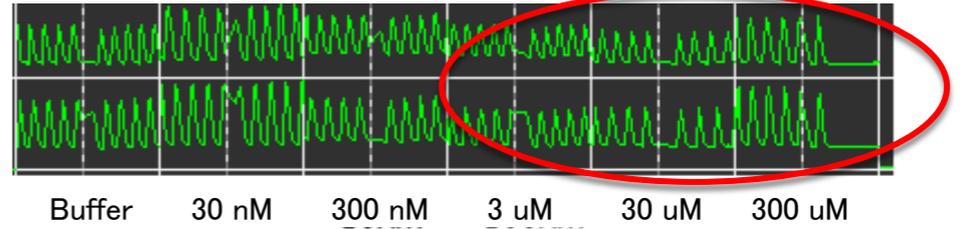
### Nifedipine (カルシウムブロッカー)



### Sotalol (第3クラス不整脈治療薬)



### Lidocaine (Naチャンネルブロッカー)



### 連絡先

[所属] 大阪大学薬学研究科  
 [名前] 辻川和文、寺下善一  
 [E-mail] pf-project@phs.osaka-u.ac.jp

# グリア細胞を標的とした創薬研究支援

## [技術の概要]

### ①グリア細胞の単離法を支援

近年、様々な中枢神経疾患とグリア細胞(アストロサイト、ミクログリア、オリゴデンドロサイト)の関与が明らかになってきている。そのため、特定のグリア細胞の単離法から評価や解析までを支援することで、グリア細胞を標的とした創薬研究を推進、加速させることが期待できる。



### ②グリア細胞の各種解析

単離したグリア細胞を解析へ!!

**FDSS7000EX**

Ca<sup>2+</sup>イメージング

グリア細胞に発現する受容体の機能を評価

**INCell Analyzer 2000**

蛍光イメージング

グリア細胞のタンパク質の発現および形態変化を観察

**FACS AriaIII**

ミクログリア

グリア細胞をソーティング

グリア細胞のタンパク質や遺伝子発現変化を解析

## [技術の利用例]

- アストロサイトやミクログリア細胞株に発現する受容体の機能を抑制する化合物や機能性抗体を96/384ウエルプレートを使用したカルシウムイメージング法により評価できる。 [FDSS7000EX]
- 既承認医薬品や化合物ライブラリー等を利用して、初代培養したアストロサイトやミクログリアに発現するタンパク質を増減させる化合物をスクリーニングにより探索できる。 [INCellAnalyzer 2000]
- 病態を改善させる薬物を投与した際に、脳や脊髄から単離したミクログリアに発現するタンパク質や遺伝子発現への影響を解析できる。 [FACS AriaIII]

### 連絡先

[所属] 九州大学薬学研究院薬理学分野

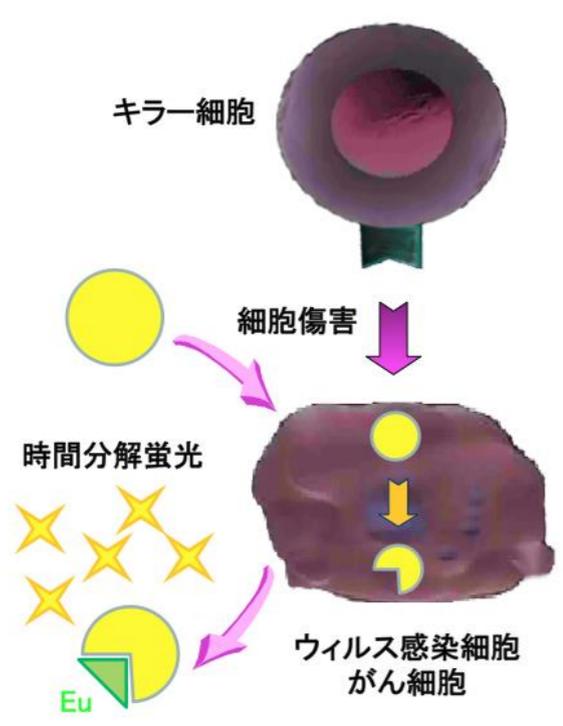
[名前] 井上和秀

[E-mail] inoue@phar.kyushu-u.ac.jp

# 細胞障害性検出キットの開発

## [技術の概要]

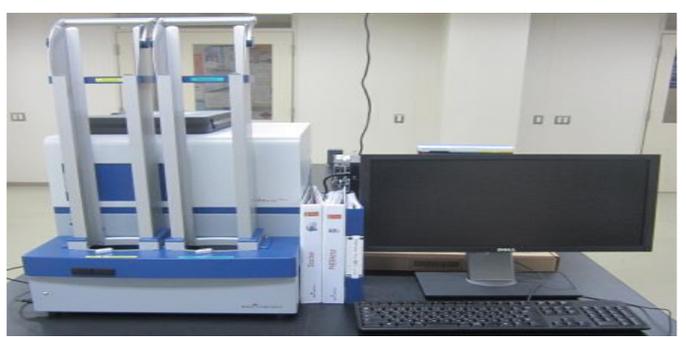
新規化合物および時間分解蛍光を用いた細胞障害アッセイキットの開発



ウイルス感染した細胞は、ナチュラルキラー細胞やT細胞に認識され、障害を受ける。細胞障害を定量する従来の $\gamma$ 線を用いたアッセイは煩雑である。我々は、非RI標識による高感度でHTSに利用可能な新規細胞障害アッセイ法を確立することに成功した。

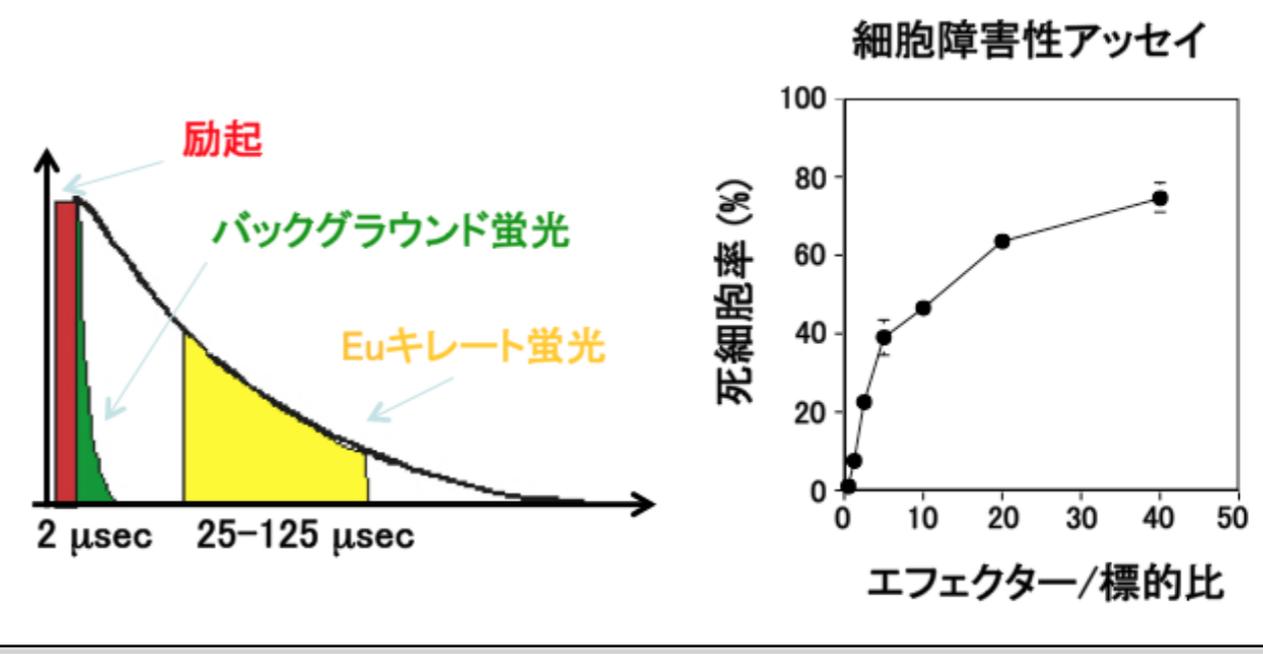
### 使用機器

PHERASTAR FS (BMG LABTECH)



## [技術の利用例]

新規キレート剤による時間分解蛍光を用いた非RI標識高感度細胞障害アッセイ系を樹立した。



### 連絡先

[所属] 長崎大学創薬研究教育センター

[名前] 植田弘師、田中義正

[E-mail] ueda@nagasaki-u.ac.jp

ystanaka@nagasaki-u.ac.jp