

平成25年2月12日

日本学術振興会

「日本におけるケミカルバイオロジー研究の新展開」に関する研究開発専門委員会

理化学研究所・ケミカルバイオロジー研究領域における 化合物ライブラリーの構築と活用

独立行政法人理化学研究所

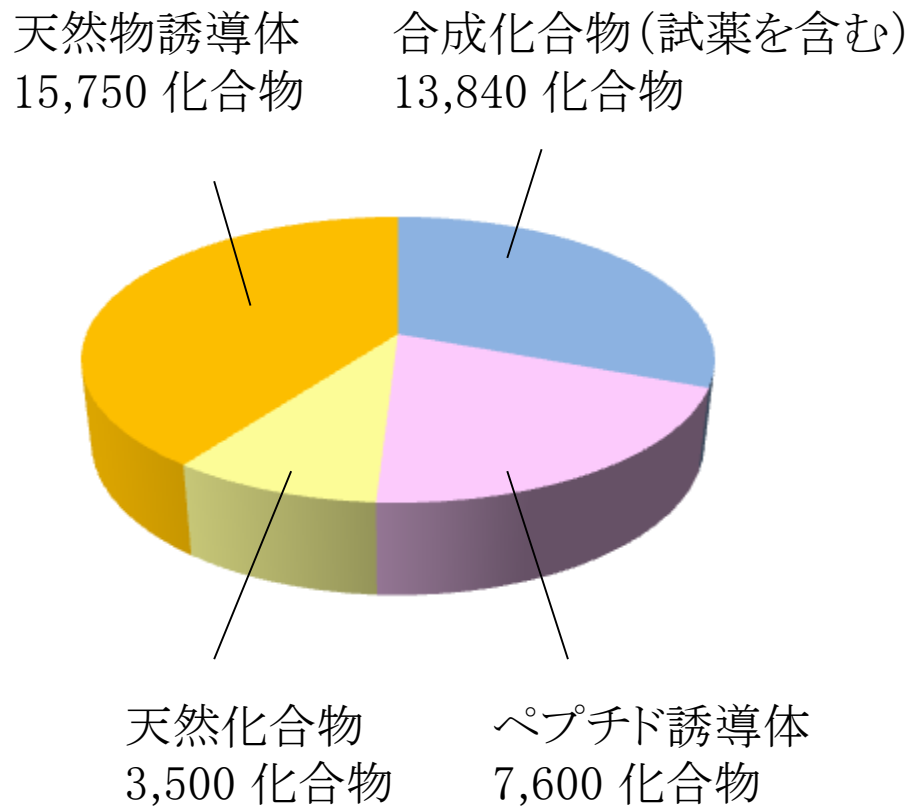
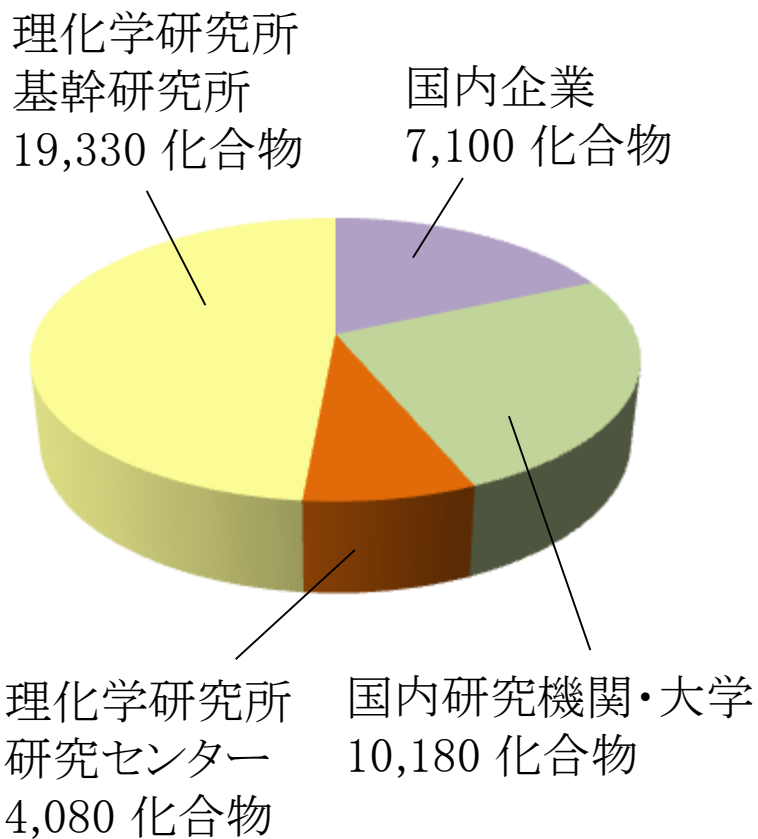
ケミカルバイオロジー研究領域

ケミカルバイオロジー研究基盤施設

齋藤 臣雄

天然化合物バンク (NPDepo) の化合物ライブラリー

化合物保有状況 約40,690 化合物



化合物ライブラリーの管理

化合物原体: 冷蔵保存



秤量と
溶液化

化合物溶液: 冷凍保存



チューブピッカー・
化合物溶液分注ロボット



分注



Software interface showing compound information for Erythromycin.

Compound ID: 10000002
 mol_name: Erythromycin
 CAS No.: 114-07-8
 Structure: C17H25NO13
 Molecular Weight: 733.95
 Biological Activity: Inhibits elongation at transpeptidation step.

Res. Date: 2005/02/14

Vial ID	TubeRack	TubeAddress	TubeID
875	9R00001	F07	43669669

Plate ID: AA00238 5 uL each

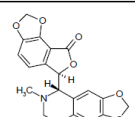
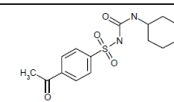
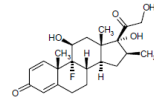
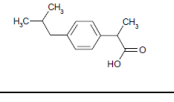
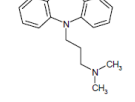
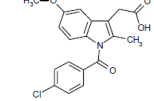
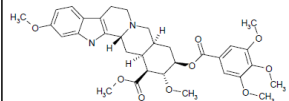
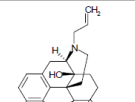
Well	RepositID	Name	Vial ID	Rack ID/Well	TubeID
A01	50000652	NPD1403	1471	9R00009	H11 45310108
A02	50000500	NPD255	1319	9R00009	B01 45309781
A03	50005587	TOFA	1264	9R00058	A08 59156973
A04	50003420	NPD4626	4239	9R00033	D01 57443728
A05	50004409	NPD1234	5228	9R00041	G05 57497578
A06	50003257	NPD4235	4076	9R00032	A02 57497482
A07	50003842	NPD505	4661	9R00036	G12 49938627
A08	50003702	NPD325	4521	9R00035	B01 57496560
A09	50003031	NPD3937	3850	9R00030	B01 57494929
A10	50003456	NPD4939	4275	9R00033	F08 57497201
A11	50000528	NPD4017	1347	9R00057	B03 45309761
A12	50000821	NPD1528	1640	9R00057	F07 45307285
B01	50005427	NPD486	6246	9R00050	F01 57604181
B02	10002675	NP21	6563	9R00053	D01 57602808
B03	10002891	NP62	6779	9R00055	B05 57603168
B04	10002652	NP252	6540	9R00053	B05 57602831
B05	10002979	NP99	6867	9R00055	H09 57603089
B06	50005283	NPD2995	6102	9R00049	C09 57604421
B07	50005581	NPD1027	6255	9R00051	H09 57601531
B08	50005326	NPD2993	6145	9R00049	F05 57604383
B09	10002689	NP287	6577	9R00053	D09 57602799
B10	10002757	NP413	6645	9R00053	H09 57603491
B11	10002742	NP382	6630	9R00053	H01 57603509
B12	10002939	NP453	6827	9R00055	F01 57603120
C01	10002549	NP450	6437	9R00052	C05 57600604
C02	10002608	NP214	6496	9R00052	G05 57602875
C03	50003073	NPD2628	3892	9R00062	E05 57494393
C04	10002905	NP376	6793	9R00055	C07 57603159
C05	50005430	NPD4197	6249	9R00050	F04 57604178
C06	10002864	NP129	6752	9R00054	H05 57603292
C07	50005288	NPD2497	6107	9R00049	D01 57604416
C08	10002715	NP312	6603	9R00053	F09 57603549
C09	10002612	NP96	6500	9R00052	G07 57602866
C10	10002540	NP123	6428	9R00052	B08 57601497
C11	50005418	NPD3954	6237	9R00050	E04 57604187
C12	50005489	NPD2604	6308	9R00051	A12 57602770
D01	50005341	NPD2930	6160	9R00049	G08 57604363
D02	10002670	NP267	6558	9R00053	C08 57602813
D03					

化合物プレート
(10, 5, 2.5, 1 mg/mL
x 5~20 μL)

スクリーニング用化合物プレート ~ 標準化合物/パイロットライブラリ

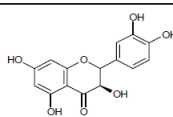
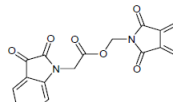
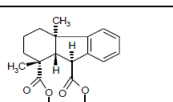
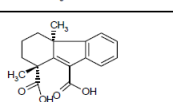
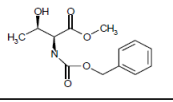
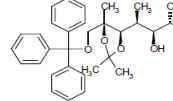
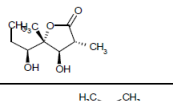
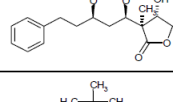
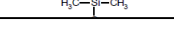
NPDepo 標準化合物ライブラリー

活性既知の化合物を80種選抜
構築したアッセイ系の評価に利用

RIKEN NPDepo Authentic Library				
Well	Name	Structure	Formula	MW
A02	(+)-Bicuculline		C20H17NO6	367.36
A03	Acetohexamide		C15H20N2O4S	324.40
A04	Betamethasone		C22H29FO5	392.47
A05	Ibuprofen		C13H18O2	206.29
A06	Imipramine		C19H24N2	280.42
A07	Indomethacin		C19H16ClNO4	357.80
A08	Reserpine		C33H40N2O9	608.69
A09	Naloxone hydrochloride		C19H21NO4	327.38

NPDepo パイロットライブラリー

NPDepo化合物ライブラリーの代表化合物を抽出
全化合物の構造領域の効率的なスクリーニング

CONFIDENTIAL RIKEN NPDepo Pilot Library				
No	Name	Structure	Formula	MW
1	(+/-)-Taxifolin		C15H12O7	304.26
2	(1,3-dioxo-1,3-dihydro-2H-isoindole-2-yl)methyl (2,3-dioxo-2,3-dihydro-1H-indole-1-yl)acetate		C19H12N2O6	364.32
3	(1R,4aR,9S,9aS)-1,4a-Dimethyl-2,3,4,4a,9a-hexahydro-1H-fluorene-1,9-dicarboxylic acid dimethyl ester		C19H24O4	316.40
4	(1R,4aS)-1,4a-Dimethyl-2,3,4,4a-tetrahydro-1H-fluorene-1,9-dicarboxylic acid		C17H18O4	286.33
5	(2S,3R)-2-Benzyloxycarbonylamino-3-hydroxy-butyric acid methyl ester		C13H17NO5	267.28
6	(2S,3S,4S)-3-Hydroxy-2-methyl-4-((4R,5R)-2,2,5-trimethyl-5-trityloxymethyl-[1,3]dioxolan-4-yl)-pentanoic acid methyl ester		C33H40O6	532.68
7	(3R,4R,5S)-4-Hydroxy-5-((S)-1-hydroxy-propyl)-3,5-dimethyl-dihydro-furan-2-one		C9H16O4	188.23
8	(3R,4S,5S)-5-Allyl-3-((4R,6R)-2,2-dimethyl-6-phenethyl-[1,3]dioxan-4-yl)-4-hydroxy-3-methyl-dihydro-furan-2-one		C22H30O5	374.48
	(3S,4R)-4-(tert-Butyl-dimethyl-...)			

スクリーニング用化合物プレート ～ パイロットライブラリー

効率的なケミカルスクリーニングのための化合物プレート

パイロットライブラリー (376化合物)



活性評価 (5プレート)

ヒット化合物 (8化合物～2%)



類似構造検索

誘導体、類縁構造化合物 (120化合物=8 x 15)



活性評価 (2プレート)

ヒット化合物 (12化合物/2クラス)



類似構造検索

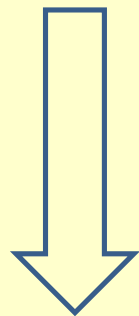
誘導体、類縁構造化合物 (60化合物=2 x 30)



活性評価 (1プレート)

準最適化構造・化合物 (活性関連データ)

全化合物 (20,000)



活性評価 (208～250プレート)

ヒット化合物 (100化合物～0.5%)



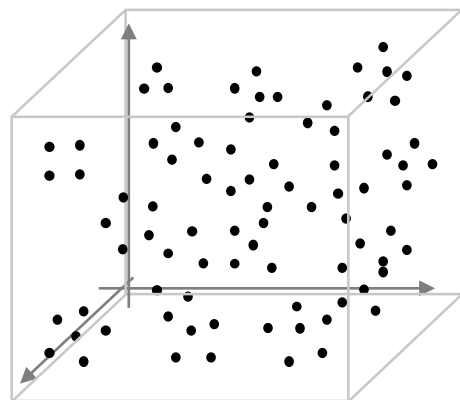
活性再評価 (2プレート)

準最適化構造・化合物 (活性関連データ)

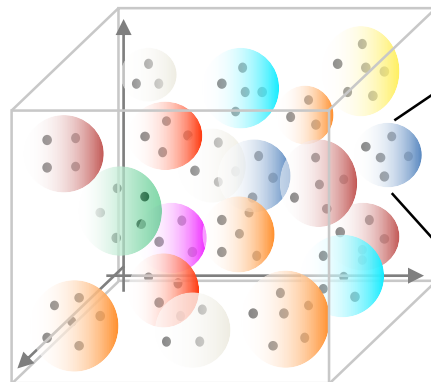
20,100化合物
(210～250プレート)

～560化合物
(～10プレート)

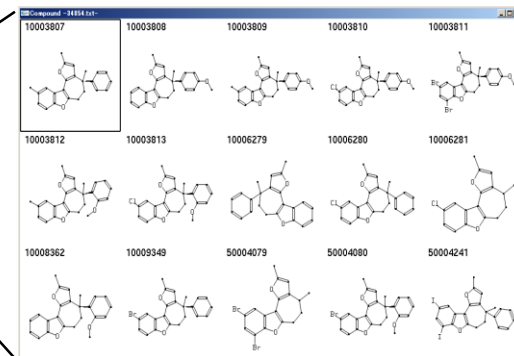
スクリーニング用化合物プレート ~ パイロットライブラリー



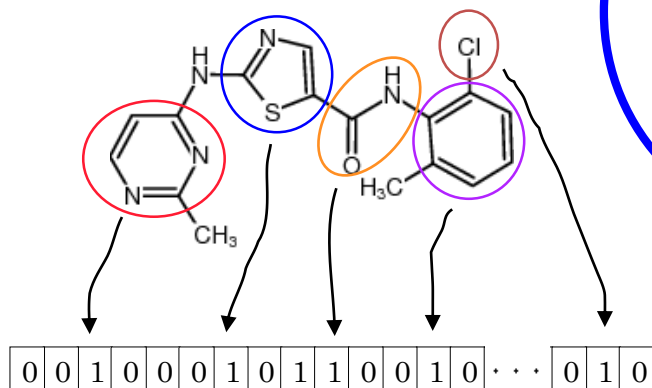
クラスタリング



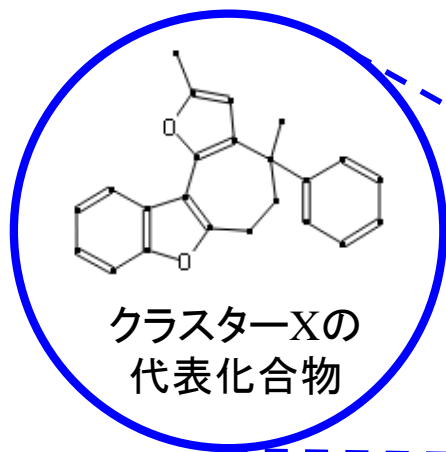
クラスターXの化合物群



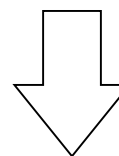
多次元ケミカルスペース



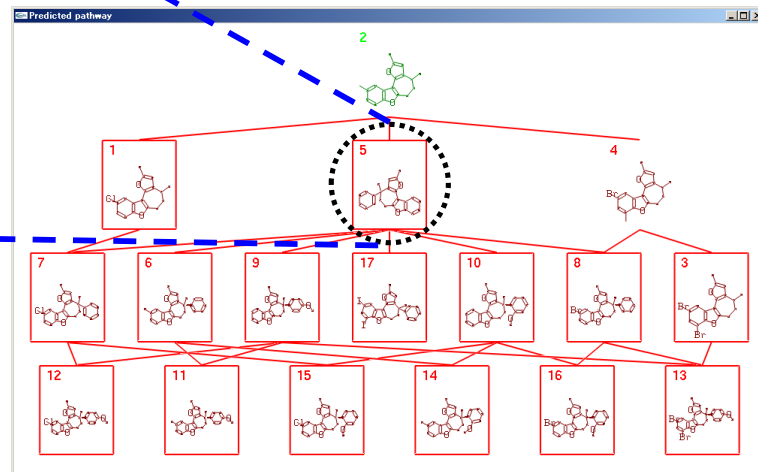
フィンガープリント(2048 bit)



クラスターXの
代表化合物



階層的
クラスタリング



パイロットライブラリーの更新

I. ケモインフォマティクスによるクラスタリング

NPDepo ライブラリー 20,305 化合物



構造のコード化



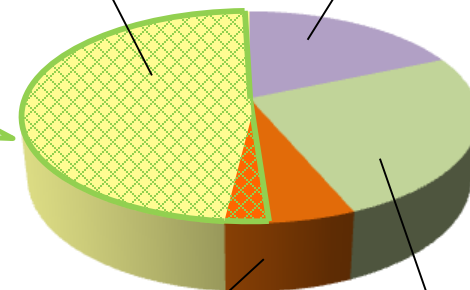
コードに基づく分類

400 クラスタ (サイズ: 1 ~ 398化合物)

18,972
+ 1,333
= 20,305

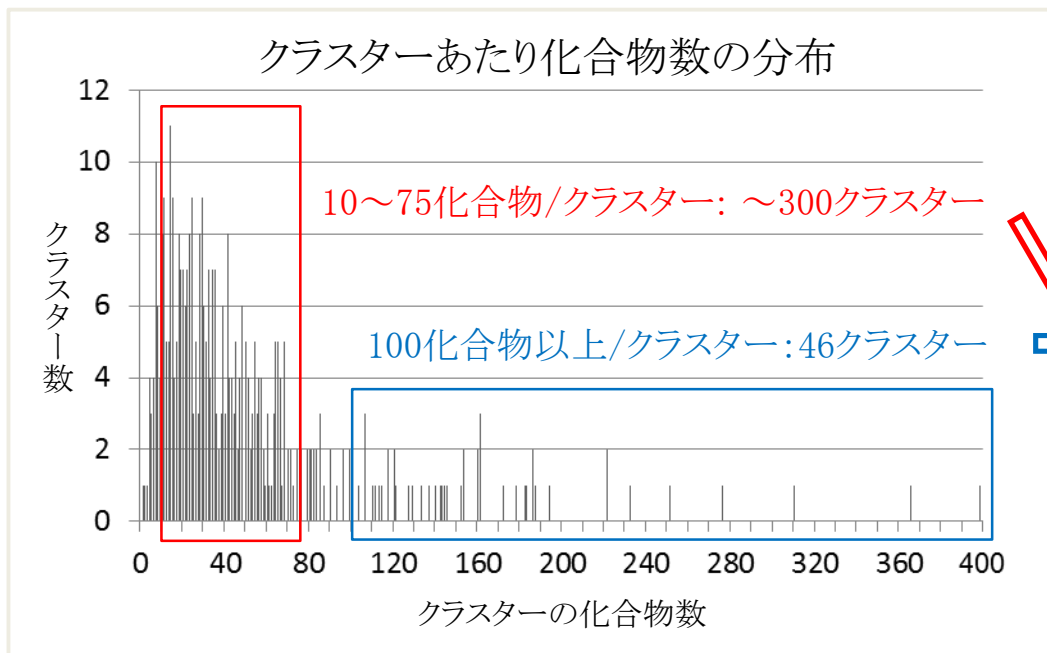
理化学研究所
基幹研究所
19,330 化合物

国内企業
7,100 化合物



理化学研究所
研究センター
4,080 化合物

国内研究機関・大学
10,180 化合物



骨格構造に基づく
クラスタの再分割

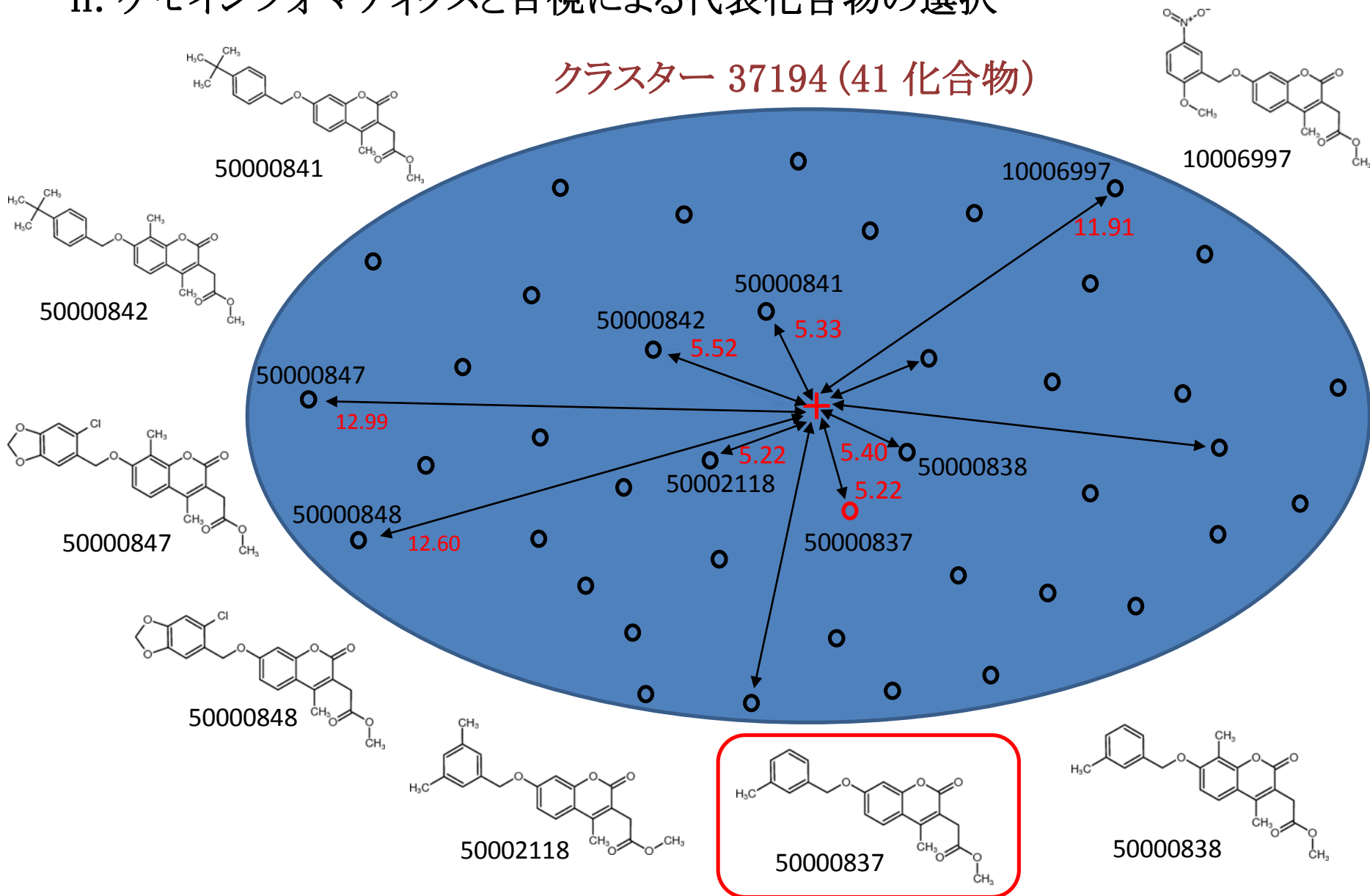


~500 クラスタの
代表化合物選択

パイロットライブラリーの更新

II. ケモインフォマティクスと目視による代表化合物の選択

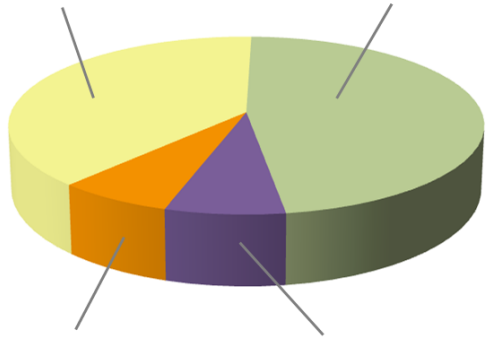
クラスター 37194 (41 化合物)



化合物提供実績 (2008年4月～2012年11月)

理化学研究所
基幹研究所
165件

国内大学
研究機関
210件

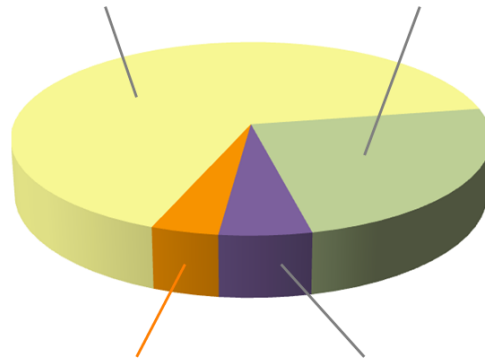


理化学研究所
研究センター
30件

海外研究機関
29件

理化学研究所
基幹研究所
104,000化合物

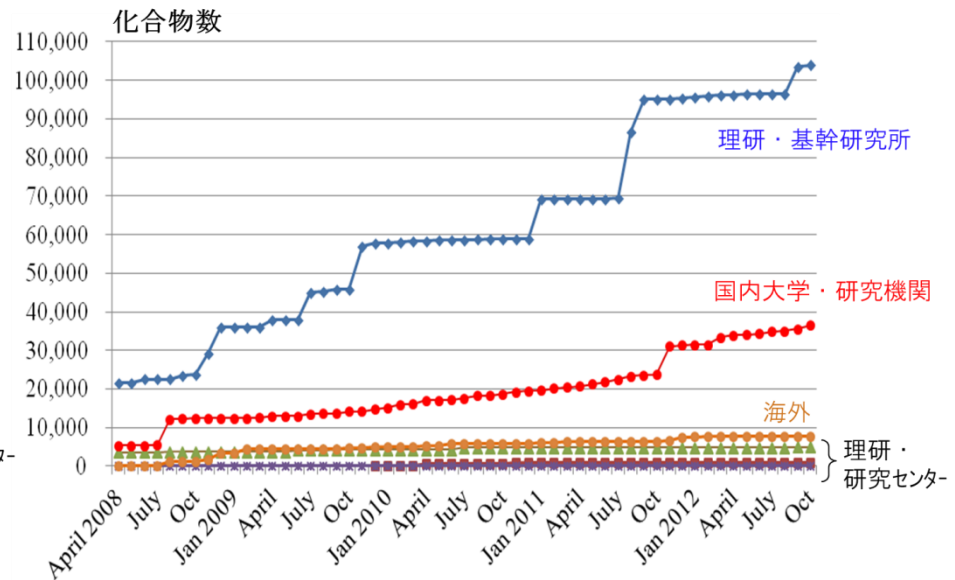
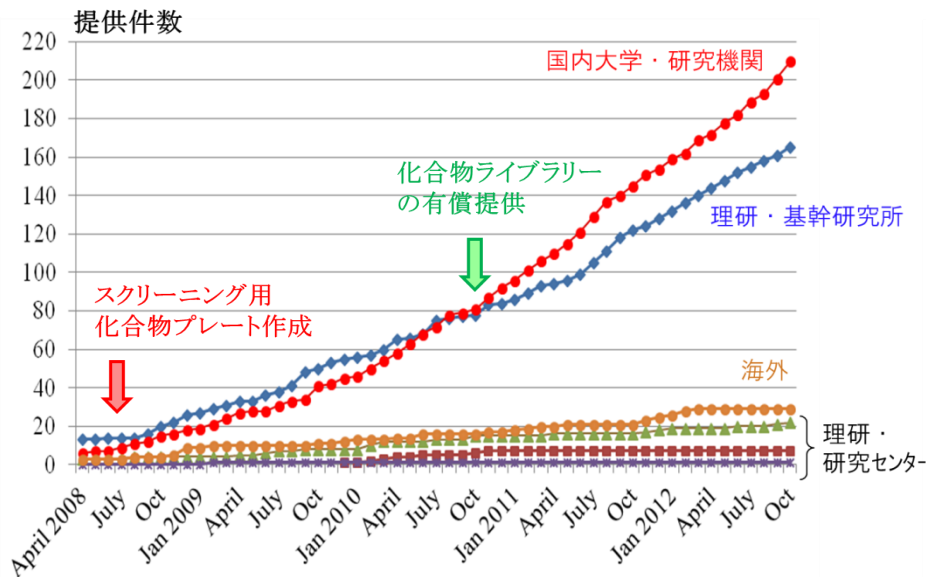
国内大学
研究機関
36,550化合物



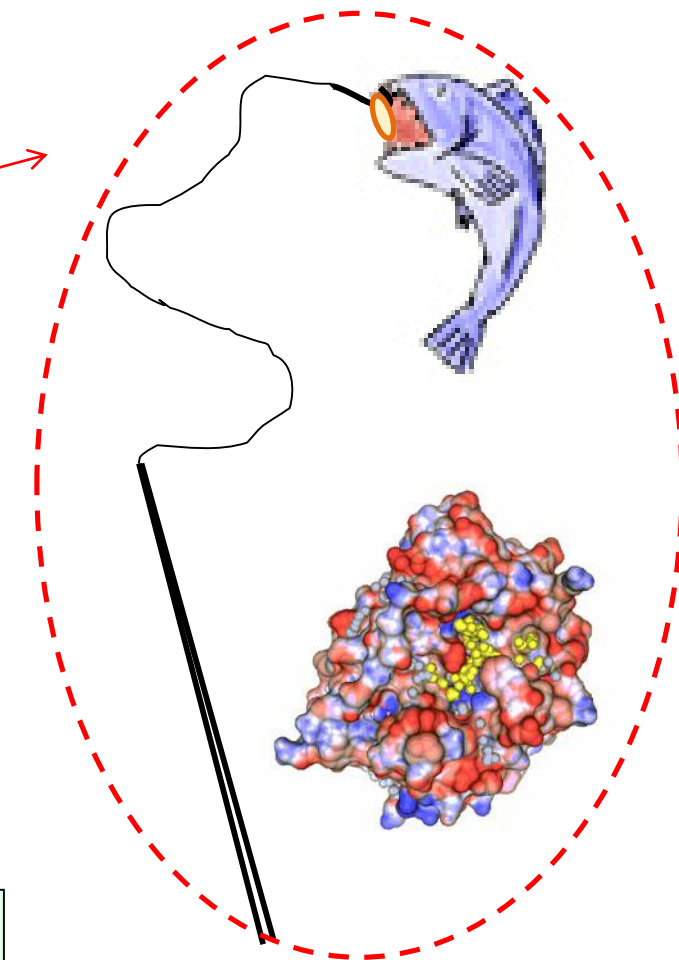
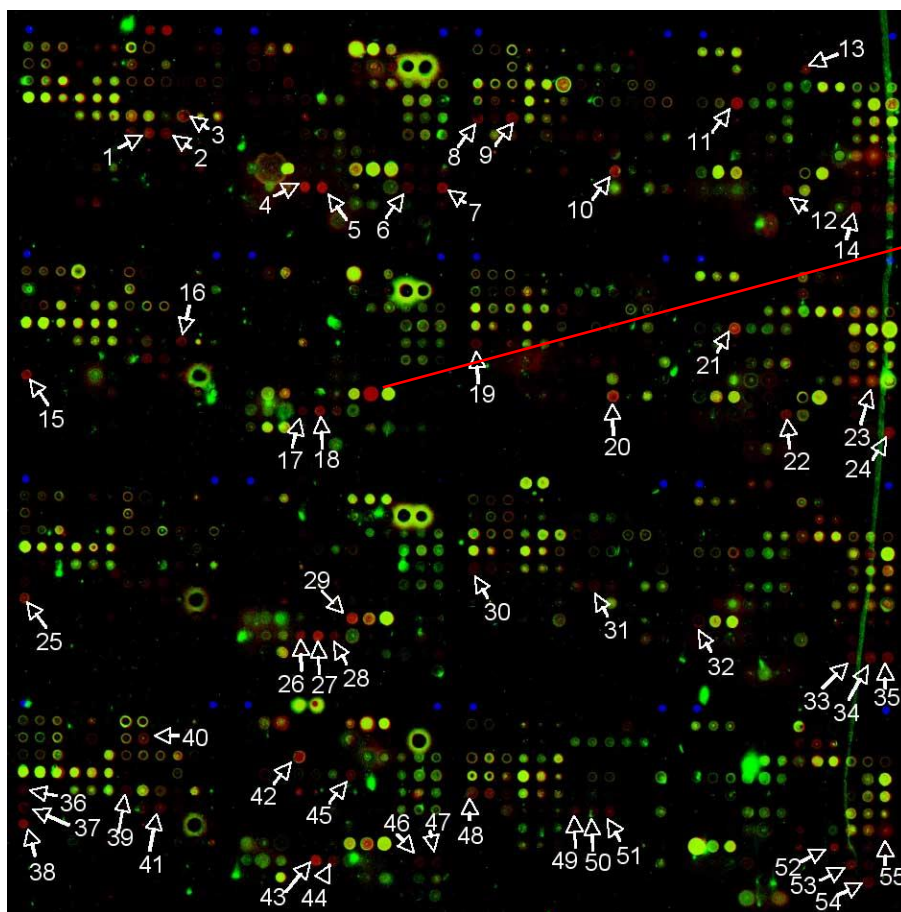
理化学研究所
研究センター
5,900化合物

海外研究機関
7,850化合物

延べ提供数
434件
154,300 化合物



化合物アレイスクリーニングのイメージ

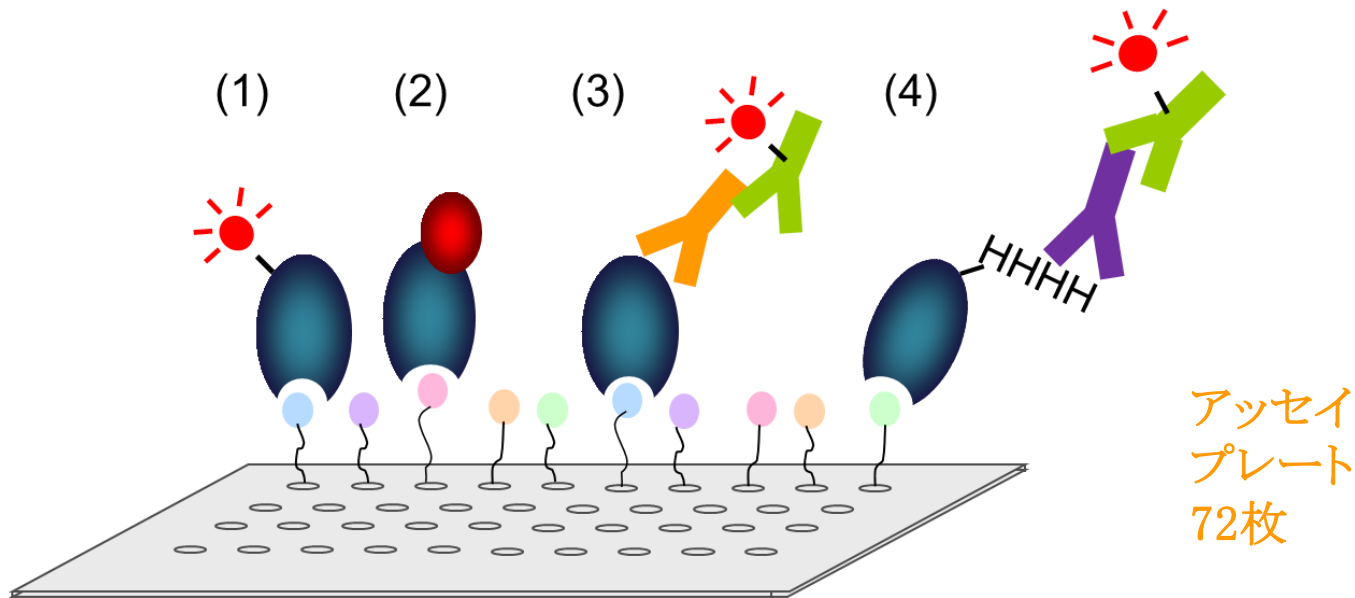


- 活性型タンパク質のみと相互作用した化合物
- 不活性型タンパク質のみと相互作用した化合物
- 両方のタンパク質と相互作用した化合物、あるいは、自家蛍光をもつ化合物

化合物アレイスクリーニング

高スループット化

タンパク質の標識法・検出法

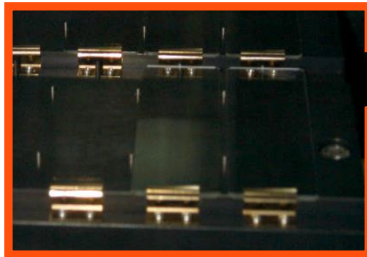
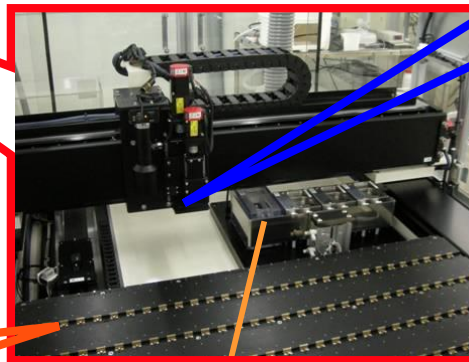


化合物アレイ1枚

- (1) 蛍光標識剤を用いた化学標識 (Cy3/5, Alexa533, ...).
- (2) 蛍光ペプチドが融合したタンパク質 (GFP, RFP, .../ mCherry)
- (3) 被検タンパク質に特異的な抗体と蛍光標識二次抗体による検出.
- (4) 被検タンパク質に付いたタグの抗体による検出 (His or GST).

化合物アレイ作製用スポットター： 化合物アレイヤー

約4,600-6,900種類の化合物を、スライドガラスの上にスポットする
約30時間で200枚の化合物アレイチップを自動で作製する
各スポットの溶液量は5nL、1ランあたり約10 μ L



スライドガラスを固定する

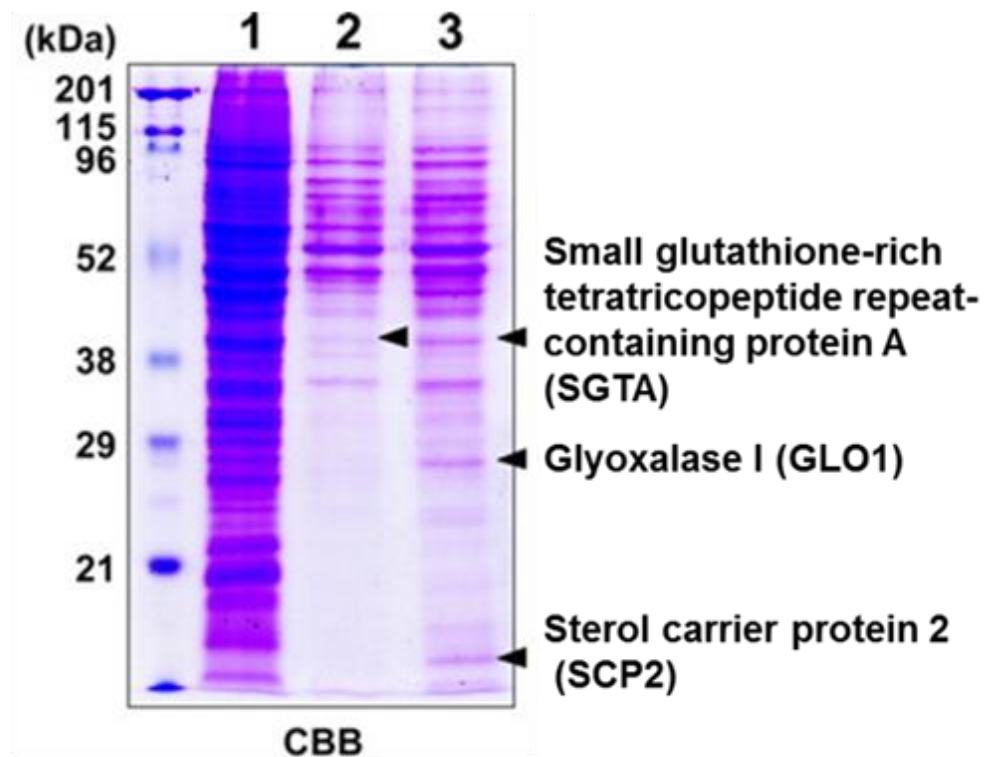
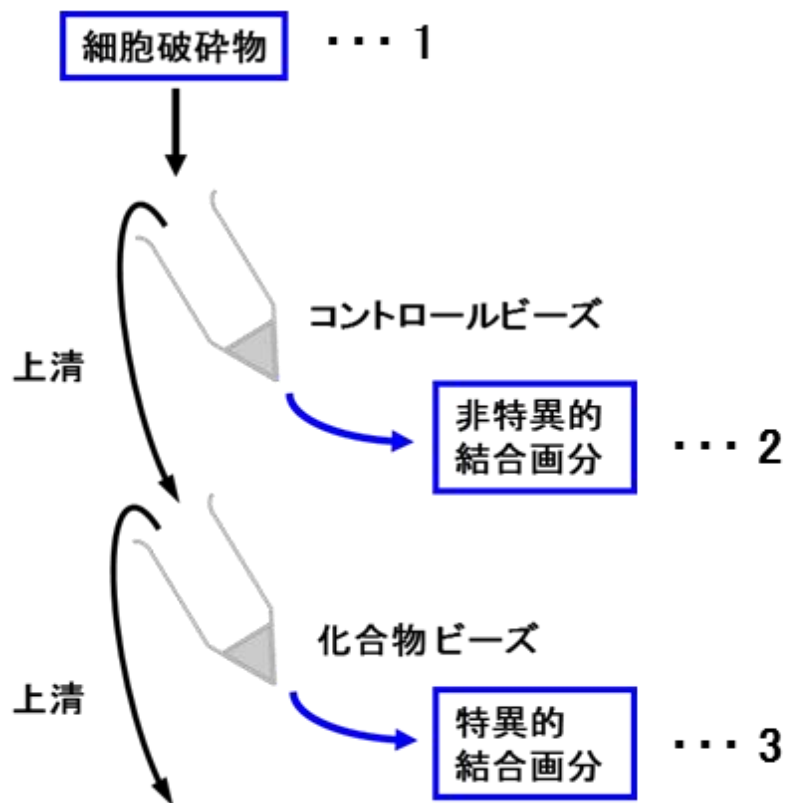
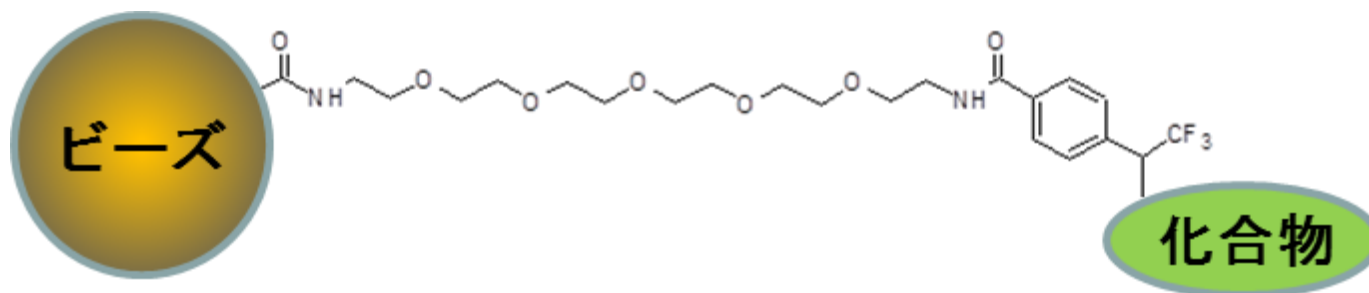
一度に、200枚のスライドガラスを
並べて、化合物アレイチップを作る

ピンの中に残った化合物溶
液を、3種類の溶媒を使って
洗い流し、乾燥させる

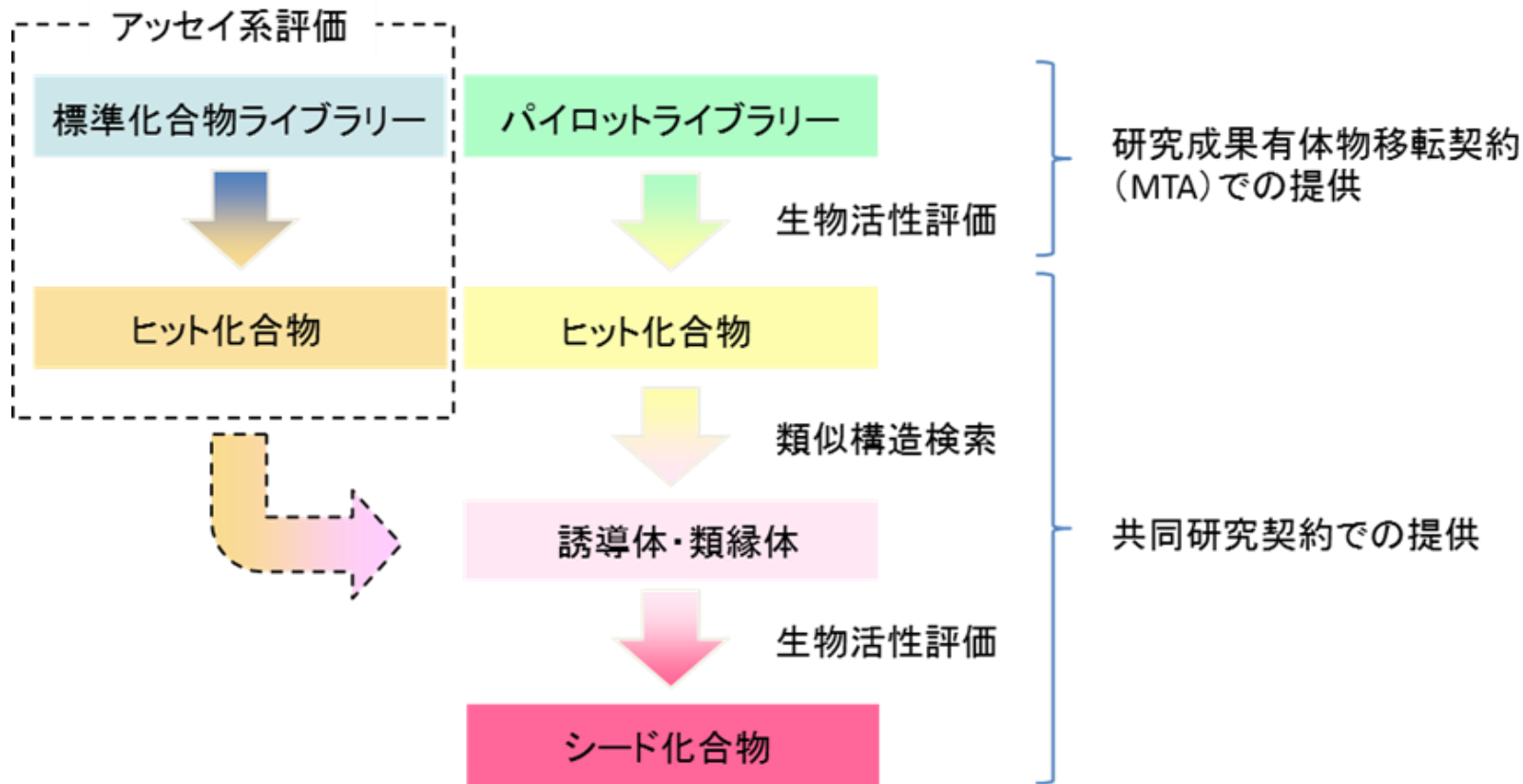
極微量の化合物溶液を
スライドガラス表面に
載せていく

16本のピン先にある穴から
化合物溶液が出てくる

化合物ビーズを用いた標的タンパク質同定



有償研究支援 ～ 化合物ライブラリー



化合物ライブラリー ※1	単位	提供手数料(円)	
		成果非占有	成果占有
標準化合物ライブラリー	1プレート	12,889	(30,167)※2
パイロットライブラリー	5プレート	36,727	117,937

有償研究支援 ～ 化合物アレイスクリーニング

研究支援利用者

タンパク質の調製

生物活性評価

タンパク質

化合物

評価結果報告

ケミカルバイオロジー研究基盤施設

化合物アレイの作製

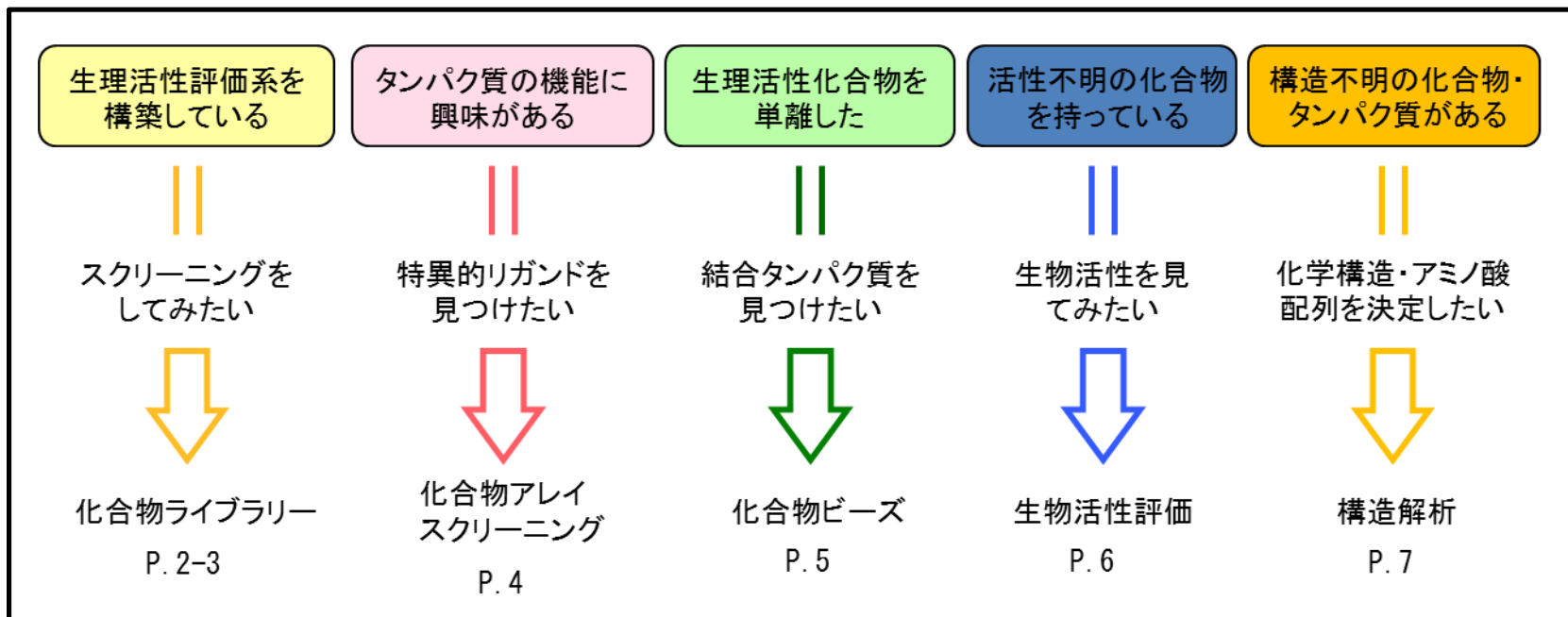
化合物アレイスクリーニング実施

ヒット化合物・類縁化合物の
選定・分注

共同研究計画策定

	PEG リンカー	Proline リンカー
タグ・抗体標識	¥359,648 (税込 ¥377,630)	¥454,111 (税込 ¥476,817)
タンパク標識	¥290,503 (税込 ¥305,028)	¥377,420 (税込 ¥396,291)

あなたが必要としている研究支援は？



理化学研究所 基幹研究所 ケミカルバイオロジー研究領域 ケミカルバイオロジー研究基盤施設・NPDepo

“ケミカルバイオロジー”は、化学物質を出発点として生命現象の解明を目指す研究領域です。ケミカルバイオロジー研究を推進するためには、化合物構造に多様性のある化合物ライブラリーと、これを有効活用するための生物活性評価システムの整備が必要です。これらは、生物、化学分野の基礎研究にとどまらず、医・農薬、診断薬の開発研究の出発点として活用することができます。



長田裕之 施設長
兼 ケミカルバイオロジー
研究領域・領域長

理化学研究所・ケミカルバイオロジー研究基盤施設では、放線菌や糸状菌の二次代謝制御に関する遺伝子レベルの研究および、その代謝物に関する有機化学的研究を通して化合物ライブラリーを整備しています。また、化合物アレイスクリーニング技術など、高度な生物活性化合物探索手法を開発して、生体タンパク質の機能を制御する化合物を探索するプラットフォームを整備しています。逆に、生理活性化合物に対する結合タンパク質、受容体を探索・同定したり、作用プロファイルを調べることも可能です。私たちは、我が国のケミカルバイオロジー研究を推進する目的で、天然化合物バンク・Natural Products Depository (NPDepo) を設立して、これらの研究基盤を大学や公的研究所、延いては、企業に提供しています。

現在、提供している研究支援は、おおまかに、以下に記載した5種類に分類できます。あなたの研究スタンス、やりたいことに応じて支援内容が選択できます。また、それらをタンドムに組み合わせて利用することも可能です。



ケミカルバイオロジー研究棟

問い合わせ先：

ケミカルバイオロジー研究基盤施設
支援促進チーム

tsaito@riken.jp (斎藤臣雄)

npd@riken.jp

生物活性評価支援

ほ乳類培養細胞を用いた評価系

1. 細胞増殖への影響解析
 - 1) tsFT210細胞のG2/M期特異的細胞周期阻害作用の検定
 - 2) Balb-MK細胞のEGF刺激によるマイトジェン阻害作用の検定
2. 細胞分化への影響解析
 - 1) HL60細胞の分化誘導活性の検定
 - 2) PC-12細胞、SH-SY5Y細胞における神経分化誘導活性評価
 - 3) PC-12細胞におけるNGFによる神経分化誘導を抑制する活性評価
 - 4) K562細胞の分化誘導活性の検定
 - 5) C3H10T1/2細胞、MC3T3E1細胞における骨形成誘導活性評価
3. 細胞形態への影響解析
 - 1) がん細胞の正常形態復帰活性
 - 2) K562細胞のブレッピング、アンチブレッピング

微生物細胞を用いた評価系

1. 酵母増殖を阻害する分子標的への影響解析 ～ エイズウイルスVpr阻害活性
2. 微生物の形態変化を指標とした探索系 ～ いもち病菌を用いた抗真菌活性評価
3. 細胞増殖への影響解析 ～ 1) 大腸菌(*E. coli*)、2) 出芽酵母(*S. cerevisiae*)

In Vitroでの評価系

1. 酵素活性への影響の評価系 ～ 1) MAPキナーゼ、2) PDI、3) チロシンホスファターゼ
2. タンパク質間相互作用への影響の評価系 ～ Plk1のPBDに依存した結合

生合成化学技術による天然化合物新規類縁体の創製

- 遺伝子の破壊により生合成経路を改変
⇒ 平常時には検出されない有用二次代謝化合物を蓄積させる
- 生合成遺伝子クラスタ特異的転写因子の活性化
⇒ 有用二次代謝化合物の生産増大
- 休眠遺伝子クラスタを覚醒する化合物を探索
⇒ 有用二次代謝化合物生合成遺伝子を誘導して産生させる

