

N N
タンパク3000総合シンポジウム

タンパク3000の成果と 今後のタンパク研究展望

予稿集

平成19年2月27日(火) 10:00~17:45

東京国際フォーラム ホールB7

【主催】文部科学省／タンパク3000総合シンポジウム実行委員会

【後援】日本核磁気共鳴学会／日本結晶学会／日本生化学会／日本生物物理学会／日本蛋白質科学会／

日本農芸化学会／日本分光学会／日本分子生物学会／日本放射光学会／日本薬学会／日本製薬工業協会

タンパク3000プロジェクトホームページ

URL : <http://www.mext-life.jp/protein/>

プログラム

タンパク3000の成果と今後のタンパク研究展望

平成19年2月27日(火)

10:00 ~ 10:10 主催者挨拶 文部科学省

第1部 タンパク質と生命現象

座長：三木邦夫(京都大学)

- | | | |
|---------------|---|----|
| 10:10 ~ 10:55 | タンパク質研究の基礎と応用
別府 輝彦(日本大学) | 02 |
| 10:55 ~ 11:40 | タンパク質研究からさぐる生命機能
山本 雅(東京大学医科学研究所) | 03 |
| 11:40 ~ 12:10 | タンパク質研究とタンパク3000
大島 泰郎(共和化工株式会社) | 05 |
| 12:10 ~ 13:30 | ポスターセッション・休憩 | |

第2部 タンパク研究の現状

座長：西村善文(横浜市立大学)/倉光成紀(大阪大学)

- | | | |
|---------------|--|----|
| 13:30 ~ 13:55 | 構造・機能解析のためのタンパク質生産
横山 茂之(理化学研究所) | 08 |
| 13:55 ~ 14:20 | タンパク質のX線結晶構造解析
田中 勲(北海道大学) | 10 |
| 14:20 ~ 14:45 | 創薬への構造解析情報の利用
西島 和三(持田製薬株式会社) | 12 |
| 14:45 ~ 15:10 | 産業利用を目指したタンパク質構造解析
田之倉 優(東京大学) | 15 |
| 15:10 ~ 15:55 | ポスターセッション・コーヒーブレイク | |

第3部 タンパク研究のこれから

構造決定への新しい手法

座長：中川敦史(大阪大学蛋白質研究所)/稲垣冬彦(北海道大学)

- | | | |
|---------------|--|----|
| 15:55 ~ 16:20 | タンパク質構造情報からタンパク質機能情報へ
中村 春木(大阪大学蛋白質研究所) | 18 |
| 16:20 ~ 16:45 | 難発現性タンパク質の生産と精製
ターゲットタンパク質構造解析のボトルネック解消に向けて
高木 淳一(大阪大学蛋白質研究所) | 20 |
| 16:45 ~ 17:10 | 放射光X線タンパク質構造解析の展開
汎用化技術と高難度ターゲットへの挑戦
若槻 壮市(高エネルギー加速器研究機構) | 22 |
| 17:10 ~ 17:35 | タンパク質制御化合物の創出
長野 哲雄(東京大学) | 24 |
| 17:35 ~ 17:45 | 閉会の挨拶 | |

18:00 ~ 19:30(予定)「交流会」

ポスター一覧/巻末資料

26

第1部

タンパク質と生命現象

10:10
}
12:10



三木 邦夫
(みき くにお)

京都大学大学院理学研究科
教授。工学博士。

座長紹介

1975年大阪大学工学部石油化学科卒業。77年大阪大学大学院工学研究科石油化学専攻前期課程修了。78年大阪大学大学院工学研究科石油化学専攻博士後期課程中退。78～90年大阪大学工学部助手。81年工学博士(大阪大学)。

82～83年ドイツ連邦共和国・マックスプランク生化学研究所(Robert Huber教授)博士研究員(文部省在外研究員)。

91年東京工業大学資源化学研究所助教授。94年京都大学理学部教授を経て、95年より現職。

東北大学学際科学研究センター教授、京都大学大学院理学研究科付属機器分析センター長、理化学研究所(播磨研究所)招聘主任研究員などを兼務。

専門は、タンパク質結晶学、構造生物学。

主な所属学会は、日本蛋白質科学会(第6回年年会会長)、日本生物物理学会(委員)、日本結晶学

会(評議員、1998年度年会実行委員長)、日本生化学会(評議員)、日本化学会、American Crystallographic Association(アメリカ結晶学会)など。

1987年日本化学会進歩賞、2001年日本結晶学会学術賞受賞。

PROTEINS: Structure, Function and Bioinformatics誌(Wiley-Liss), Editorial Board; Acta Crystallographica誌 Section D: Biological Crystallography(International Union of Crystallography, 国際結晶学連合)Co-Editor; Zeitschrift für Kristallographie誌(Oldenbourg, München)Editor。

著書に、『ゲノミクス・プロテオミクスの新展開 生物情報の解析と応用(今中忠行監修)』(編集ならびに分担執筆、エヌ・ティー・エス、2004)、『ナノテクノロジーによる生命科学、ナノバイオロジー(竹安邦夫編)』(分担執筆、共立出版、2004)、『第5版実験化学講座(日本化学会編)、第11巻、第29巻』(分担執筆、丸善、2006)などがある。

タンパク質研究の基礎と応用

タンパク質の構造 機能相関の解明を中心課題とする構造生物学は、生命科学の基盤として戦略的に位置づけられるとともに、それから生まれるであろう応用的成果についても大きな期待を持たれている。そこで考えられている基本戦略は、例えばタンパク質工学が端的に現しているように、生物機能の論理にもとづく「設計」にあるといえるだろう。一方でこれまでの生物利用技術の開発では、例えば微生物起源の医薬探索に見るように、膨大な生物多様性を対象にした経験にもとづく「探索」によって多くのブレークスルーがなされてきた。極めて対照的であると同時に相補的なこの二つの戦略の役割を正確に計ることは、ポストゲノムの流れの中でタンパク質研究の目標が創薬にまで拡張されるようになった状況の中では特に必要と思われる。

以下二つのトピックスについての私の古い経験が、タンパク質3000によって実現した現在の高度な状況の対照としての役を果たすだけでなく、上述した戦略を含む、研究における基礎と応用の関係について考える材料になることを希望する。

I. 凝乳酵素のタンパク質工学

チーズ製造に不可欠な凝乳酵素として用いられる二種のアスパラギン酸プロテアーゼ 仔牛キモシン及びケカビ *Rhizomucor* ペブシン について、

1980年代に遺伝子組換え技術による量産と部位特異的変異による性質の改良を第一の目的に行った研究の経験を通して当時のタンパク質構造解析の一端を振り返るとともに、特に大腸菌宿主において生成した異種タンパク封入体のrefolding制御、および酵母宿主における分泌発現に伴う糖鎖付加の部位特異性に関して問題提起を試みる。同時に、応用的立場を取ることがもたらす研究上の効用について意見を述べたい。

微生物起源の生理活性物質の探索

微生物が生産する新しい生理活性物質の探索は、研究手段として有用な特異的阻害剤を生み出すことで基礎的にも貢献してきた。我々がフレンド白血病細胞の分化誘導を指標に見出し、分子標的をヒストン脱アセチル化酵素と同定したトリコスタチンは同酵素遺伝子のクローン化に途を開き、またカビの形態異常誘起を指標に見出したレプトマイシンの標的は核膜輸送系 exportin であることが明らかにされ、いずれも真核細胞における核機能解析の強力なプローブとなった。タンパク質 > 創薬プログラムと見かけ上は逆方向のこの種の研究の意義と、そこで鍵となる実験者の個性の重要性について意見を述べたい。

1956年東京大学農学部農芸化学科卒業。東京大学大学院博士課程修了。東京大学農学部教授、日本大学生物資源科学部教授を経て2004年より現職。

専門は応用微生物学、生命工学。現在は微生物の共生と放線菌の分

化に関心を持つ。

1996年紫綬褒章、98年学士院賞受賞。



別府 輝彦
(べっぴてるひこ)

学士院会員、東京大学名誉教授、日本大学大学院総合科学研究科教授。農学博士。

タンパク質研究からさぐる生命機能

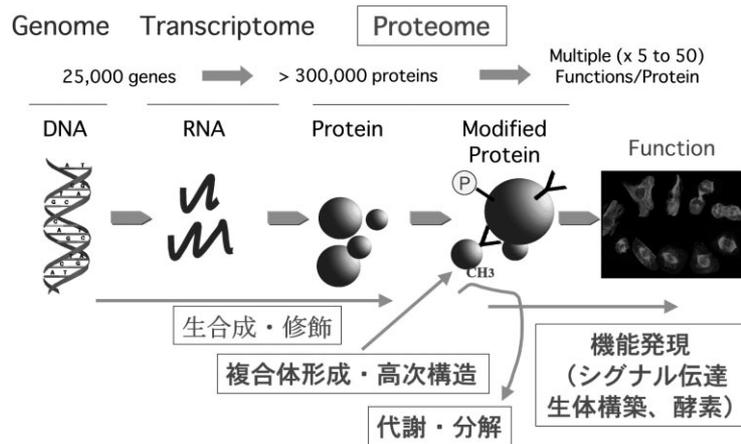
タンパク質は生体を構成し、また生体の機能を担う重要な生体高分子である。糖、脂質等の役割を決しておるそかにするものではないが、ゲノムに描かれた生命の設計図の上にとって、生命現象を担う中心的「実行部隊」はタンパク質であるといつてよいだろう。

タンパク質研究と一口にいってもどのような研究をさすのかすぐには伝わってこない。それは、タンパク質研究が様々な視点でなされているからである。例えばタンパク質の生化学、タンパク質の生合成・翻訳、タンパク質の分解、タンパク質の構造、タンパク質の作用、タンパク質の機能応用などを

容易にあげることができる。また最近では、細胞内の全遺伝情報を対象にしたゲノム研究と同様の考えで、細胞内の全タンパク情報を対象とするプロテオーム研究が推進され始めている。これはシステムズバイオロジーの重要な一翼を担う研究となろう。本演題ではタンパク質の作用について、チロシンキナーゼによるシグナル伝達という視点から取り上げ、「チロシンキナーゼ研究から探る生命機能」として紹介する。

チロシンキナーゼの存在が明らかにされて30年近くになるが、この間チロシンキナーゼが高等生物の機能に深く関わっていることが示されてきた。つ

タンパク質研究



1977年大阪大学大学院理学研究科博士課程生理学専攻修了。

91年東京大学医科学研究所教授、2003年より所長。

専門は分子生物学。特に癌と細胞内シグナル伝達。

1984年癌学会奨励賞、87年高松宮

妃癌研究基金学術賞、90年朝日賞、2003年アメリカ合衆国NIH Fogarty Scholar受賞。



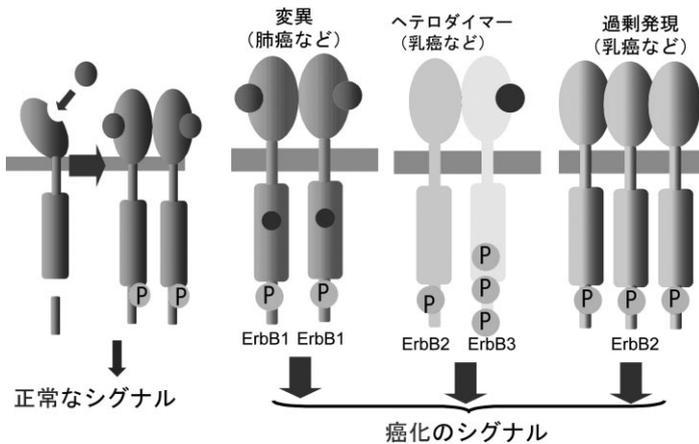
山本 雅
(やまもと ただし)

東京大学医科学研究所所長。癌・細胞増殖部門 癌細胞シグナル分野教授。理学博士。

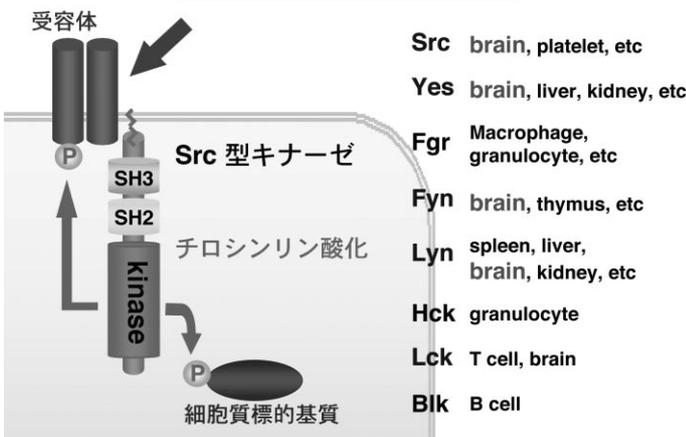
まり、癌・細胞増殖、免疫応答、神経機能を含む様々な生命現象で重要な役割を果たしていることが明らかにされてきた。チロシンキナーゼは、細胞内チロシンキナーゼと受容体型チロシンキナーゼに大別される。最初にチロシンキナーゼとして報告されたSrcタンパク質は前者の代表であり、また増殖因子受容体であるEGF受容体(ErbB1)は後者の代表である。いずれも癌遺伝子産物として解析が進められたが、正常細胞においても多様な機能を担っていることがわかってきた。

まずはじめに、発癌・細胞増殖研究において明らかとなってきた、ErbBファミリータンパク質を介するシグナル伝達機構や、ErbBファミリーを標的とするがん治療に関して話題を提供する。ついで、Srcを中心とするSrcファミリータンパク質が神経機能といった高次生命現象で重要な役割を果たしていることについて触れ、チロシンリン酸化反応というタンパク質の一機能と脳機能の関わりを紹介する。その中で、タンパク質の機能研究を進める上での構造生物学の重要性に言及したい。

癌細胞におけるEGFRファミリーのシグナル伝達異常



Src型チロシンキナーゼ



タンパク質研究とタンパク 3000

ヒトゲノムの解読完了を頂点として、多くの生物種のゲノム情報が解読され、生命の研究は新たな段階、ポストゲノム時代に突入した。ゲノム情報がいつ、どこで、どんなタンパク質を作り、タンパク質はどのような働きをするかを調べるのが生命研究の新たな中心的課題としてクローズアップされ、タンパク質が脚光を浴びる時代が始まった。それ以前もタンパク質は、生命研究の主要な研究対象ではあったが、その内容が劇的に変化し、新たな研究領域が創成されたといつてよいであろう。一つのタンパク質を扱っていても、ゲノム情報を基礎にして細胞構造など空間的にも、進化系統など時間的にも他のタンパク質や生体成分との繋がりを意識した研究しか許されなくなった。

このような学問的な趨勢を背景とし、タンパク質の時代の大型プロジェクトとして、国際的な「タンパク質構造の辞典」作りに一翼を担うことを目的としたタンパク 3000 は、タンパク質を巡る我が国の研究環境を著しく改善し、研究の質を劇的に変化させた。かつて、タンパク質を精製しその結晶を作り3次元構造を決めることは、限られた数の専門家の「研究」であったが、今では3次元構造は研究の出発点にすぎなくなった。タンパク質の調製、精製、結晶化のいずれも迅速化、あるいは自動化され、レシピにしたがって料理を作るより簡単になった。「誰にでも、どんなタンパク質でも立体構

造が描ける」という究極の目標に向かって大きな前進を遂げた。

今後のタンパク質研究は、生物物理学、細胞生物学、発生学や進化系統学など他の関連領域分野との接点をより一層深め、多様な方向へ進展していくと考えられており、事実、すでにそのような方向に向かって多くの成果が上がりつつある。たとえば、タンパク質間の相互作用、細胞内のタンパク質の動態、タンパク質1分子の解析、形態形成の機構などである。今後の研究の流れは大きく二つの方向に分極化していくのであろう。一つは、生体反応に関わるタンパク質の構造変化やタンパク質が他のタンパク質や生体分子をどう認識するかなどタンパク質それ自体の構造や機能の分子機構のより精緻な理解を目指す研究と、タンパク質の構造機能を基盤として複雑で高度に制御された生命システムの理解を目指す方向である。前者では、今後も高度な機器や手法を開発していくことが要求され、時間的にも空間的にもより分解能の高い解析が、後者では、膨大な情報量を取り扱うため計算機科学の手法が重要となろう。

タンパク 3000 プロジェクトは、その性格上、基盤作りが主眼であり、その成果が生命を理解する分野において、あるいは医療など産業応用の分野においてどう貢献するかは、今後の研究の動向に委ねられている。

東京都生まれ。
東京大学理学部卒業、同大学院生物化学専攻修了。
1983年より東京工業大学教授。
95年より東京薬科大学教授を経て、2005年より現職。
1997～2000年度日本蛋白質学会会長。04～05年度日本蛋白質科学会

長。01年度よりJST-CREST「タンパク質の構造・機能発現のメカニズム」研究総括。

著書に『タンパク質実験法全4巻(東京化学同人)』、『生化学実験法全5巻(東京化学同人)』、『好熱性細菌(東大出版会)』などがある。



大島 泰郎
(おおしま たいろう)
共和化工株式会社環境微生物学研究所長。東京工業大学名誉教授。東京薬科大学名誉教授。

第2部

タンパク研究の現状

13:30
|
15:10



西村 善文

(にしむら よしふみ)

横浜市立大学大学院国際総合科学研究科生体超分子科学専攻生体超分子機能科学研究室教授。薬学博士。

座長紹介

1971年東京大学薬学部薬学科卒業。73年東京大学大学院薬学系研究科製薬化学専攻修士課程修了。76年東京大学大学院薬学系研究科製薬化学専攻博士課程中退。76年薬学博士(東京大学)の学位授与。

76年東京大学薬学部教務職員。77年東京大学薬学部助手。89年東京大学薬学部助教授。89年横浜市立大学大学院総合理学研究科教授。2005年横浜

市立大学大学院国際総合科学研究科(名称変更)教授、現在に至る。

専門は構造生物学。特に転写因子やテロメアタンパク質を中心としたヒト核内タンパク質の構造機能解析。

1982年日本分光学会論文賞受賞。

著書に『NMR分光法 原理から応用まで』(日本分光学会、2004年)などがある。



倉光 成紀

(くらみつ せいき)

大阪大学大学院理学研究科教授。理学博士。

座長紹介

1972年大阪大学理学部卒業。77年大阪大学大学院理学研究科生物化学専攻博士課程修了。

77年日本学術振興会奨励研究員。82年大阪医科大学医化学教室助手。89年同助教授を経て、91年より現職。99年より理化学研究所放射光利用連携研究グループディレクターを兼任。

2000～02年大阪大学評議員。

専門は生化学、生物物理学、分子生物学。特に、

タンパク質工学など。

1990年日本ビタミン学会奨励賞受賞。2000年、02年日本生化学会 J.Biochem. 論文賞受賞。

著書に『生物学が変わる!』(大阪大学出版会、2004年)などがある。

構造・機能解析のためのタンパク質生産



図1 X線結晶構造解析におけるタンパク質試料調製と構造解析の流れ(理化学研究所の例)(1)
タンパク質の発現で無細胞タンパク質合成を用いることがユニークである。

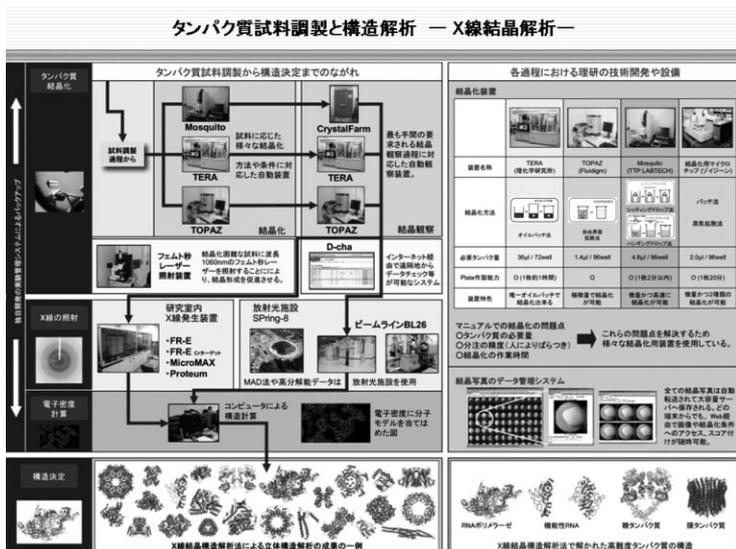


図2 X線結晶構造解析におけるタンパク質試料調製と構造解析の流れ(理化学研究所の例)(2)
結晶化条件のスクリーニングは、種々の方法を組み合わせている。

ライフサイエンス研究において、ターゲットとなるタンパク質の試料調製は、構造および機能の解析の鍵となる。タンパク質の立体構造解析を成功させるには、機能を発揮できる状態のタンパク質試料を作成することが重要である。タンパク質は多様で、それぞれ個性がある。そのような多種多様な重要タンパク質の大規模な構造・機能解析のために、タンパク3000プロジェクトは、新規のタンパク質調製技術の開発と実用化に成功し、今後のさらなる飛躍の礎を築いた。

タンパク質の発現には、大腸菌、酵母等を宿主とする方法が用いられることが多いが、昆虫、哺乳動物などの培養細胞も多く利用されている。我々は、これらの生きた細胞のシステムに加えて、無細胞タンパク質合成法を、構造解析試料の調製に大規模に用いている。大腸菌、ヒト培養細胞、昆虫培養細胞等由来の無細胞タンパク質合成システムを構築し、いろいろな目的に活用している。X線結晶構造解析では、無細胞系でセレノメチオンを導入した試料を効率よく作成している(図1、2)。また、愛媛大学の遠藤弥重太教授の開発がよく知られている小麦胚芽の無細胞合成システムも用いている。ヒト無細胞システムを用いて、糖鎖修飾を受けたタンパク質を合成することにも成功した。多数回膜貫通型タンパク質の発現は、大腸菌では困難なことも多い。その場合は、ピキアやバキュロウイルスの発現系を用いるが、最近、無細胞系で機能を持った膜タンパク質を大量に合成することも可能になった。無細胞合成法は、遺伝子をベクターにクローニングすることなく、PCR断片のままを用いることができ、発現条件等のスクリーニングにも適している。

タンパク3000プロジェクトにおいて、理化学研究所では、立体構造解析の約半数を、NMR

タンパク質試料調製と構造解析 —NMR—

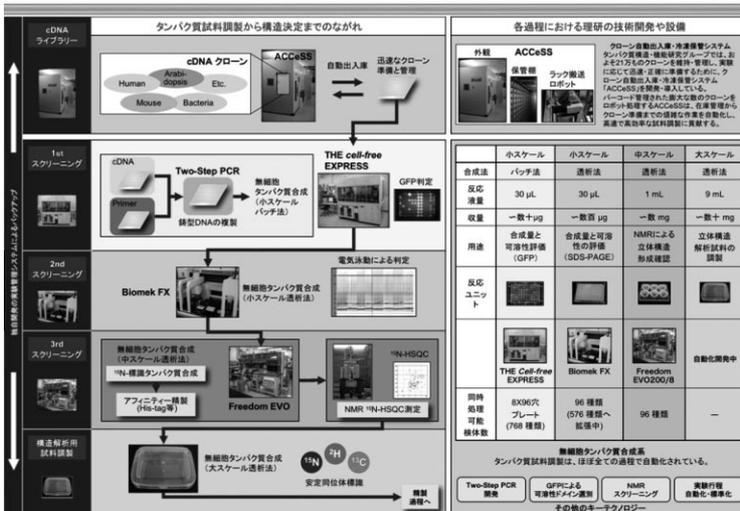


図3 NMR解析におけるタンパク質試料調製と構造解析の流れ(理化学研究所の例(1))
小～大スケールの無細胞タンパク質合成用装置(反応容器とロボット)を開発している。

タンパク質試料調製と構造解析 —NMR—



図4 NMR解析におけるタンパク質試料調製と構造解析の流れ(理化学研究所の例(2))
数十万のコンストラクトのスクリーニングにより、約千もの多数の構造解析に成功した。

解析によって行っている(現在1,100構造以上)。その大半はヒトあるいはマウス由来(主として機能ドメイン試料)であり、国際的にも大きな寄与をしている。このような多数の構造解析に適した試料を調製することができたのは、大腸菌由来無細胞タンパク質合成法を用いる発現スクリーニングシステムを構築して、体系的に用いたためである(図3、4)。ヒト・マウスの完全長cDNAの2段階PCRにより、目的とするドメインを複数のコンストラクトとして取り出し、微量発現(GFP融合により発現と可溶性をチェック)、中量発現と自動タグ精製(N-15標識してHSQCスペクトルにより構造解析可能性をチェック)、大量発現と精製(C-13、N-15の二重標識してNMRによる立体構造解析に用いる)と順次、スケールを上げながら、最適なコンストラクトを絞り込む。これらのスクリーニングは、ロボットを用いる並列化、自動化により、人手をかけずにハイスループットに行える。亜鉛などの金属を結合したタンパク質の発現も、体系的に行うことが可能になった。

タンパク質の位置特異的に有用な非天然型アミノ酸を導入する技術の開発にも取り組んでいる。アミノアシルtRNA合成酵素のタンパク質工学的改変により、ヨードチロシン(X線結晶構造解析の位相決定に利用)、光架橋性アミノ酸(複合体の同定や安定化に利用)、蛍光性アミノ酸等を導入することを可能にしている。非天然型アミノ酸の同定は、大腸菌(生細胞、無細胞)、動物培養細胞等を用いることができる。

タンパク質の試料を自由に調製できるようになることは、そのタンパク質自体を深く理解することに直結している。今後は、ますます困難度を増すタンパク質試料調製(「生産」)において、さらなる技術開発を進め、その普及を図るとともに、タンパク質構造・機能の体系的な解明に取り組んでいくことが重要である。

1981年東京大学大学院理学系研究科博士課程修了。
東京大学理学部助手、助教授、91年に教授。93～2006年理化学研究所横山構造分子生物学研究室主任研究員を兼任。1998～2006年同所ゲノム科学総合研究センタータンパク質構

造・機能研究グループプロジェクトディレクター、1999～2006年同所ストラクチャーーム研究グループグループディレクターを経て、04年より現職。



横山 茂之
(よこやま しげゆき)
理化学研究所先端タンパク質結晶学グループグループディレクター。理学博士。

タンパク質のX線結晶構造解析

タンパク3000プロジェクトでは、タンパク質構造解析のハイスループット化を進めるためにさまざまな基盤技術の開発が行われた。ここではX線結晶構造解析の技術開発を中心に、タンパク質構造解析の現状を紹介する。

タンパク3000プロジェクトも含め、世界の構造ゲノム科学プロジェクトは、X線結晶構造解析技術の発展に大きく依存している。プロジェクトの5年間で、結晶化装置、結晶観察装置、データ収集装置、構造解析ソフトウェアなどで自動化が進められた結果、構造解析のスピードは飛躍的に上がった。

PFや播磨理研のような大規模施設では独自の自動結晶化装置開発が行われ、一般の研究室では微量溶液分注機ベースのタンパク質結晶化ロボットが導入された。自動結晶観察装置としては、PFや播磨理研さらには北大拠点で独自装置が開発された他、いくつかの大学には製品化されたロボットが導入されている。しかし、結晶の自動判別には困難が多く、現時点でも満足いくソフトウェアはない。

回折データ収集についても自動化が進められた。PFとSPring-8の放射光施設では、それぞれ独自の結晶交換ロボットが設置されている。PFは

Stanford Automated Mounting system(SAM)を導入しBL5AとNW12Aで試験運用が始まっている。一方SPring-8は独自の規格によるSPACEシステムを開発した。しかし、リモート利用、メールイン利用のどちらの方法でも、ユーザーの側に、まだこれらの自動化装置を使用するだけの体制が整っていないため、本格的な利用は今後に残されている。

構造解析計算の分野でも自動化が進められた。多くは外国で開発されたプログラムが使われているが、その中で、北大拠点では、初期位相・初期モデルを元に、構造構築および構造精密化を行う自動精密化プログラムLAFIREを開発した。LAFIREは精密化プログラムCNS 或いはREFMAC5と連動し、断片的な初期モデルから水分子を拾うまで、Rfree 因子をモニターしながら、タンパク質分子構造精密化の過程を自動で行うソフトウェアである。このプログラムを用いて、数十のタンパク質の精密化が自動で行われた。各ステップの自動プログラムを統合することによる全自動構造解析システムの開発も始まっている。

これらの種々の自動化と相まって、構造解析の根幹である位相決定法に非常に大きな進展があった。構造ゲノム科学プロジェクト誕生の最も大きな原動力となったのは、セレノメチオニン(Se-Met)置換タンパク質を利用した多波長異常散乱法(MAD法)である。MAD法は、それまで最大の問題とされていた位相問題を事実上解消した。しかし、図1に示す通り、この数年間でSAD法(単波長異常散乱法)がMAD法に取って代わりつつある。MAD法とSAD法の違いを簡単に表現すれば、前者が二波長以上でのデータを必要とするのに対し、後者では一波長のデータで解析が行なわれることにある。放射光施設でデータをとる限りこの違いはそう重要ではない。しかし波長選択が事実上不可能な実験系X線を使つての実験では、この違いは

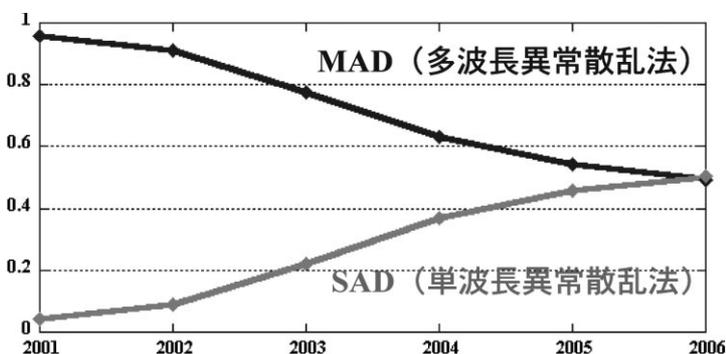


図1 多波長異常散乱法(MAD法)と単波長異常散乱法(SAD法)による解析の割合

PDBに登録されたタンパク質より集計。この5年間でSAD法はMAD法を凌ぐようになった。

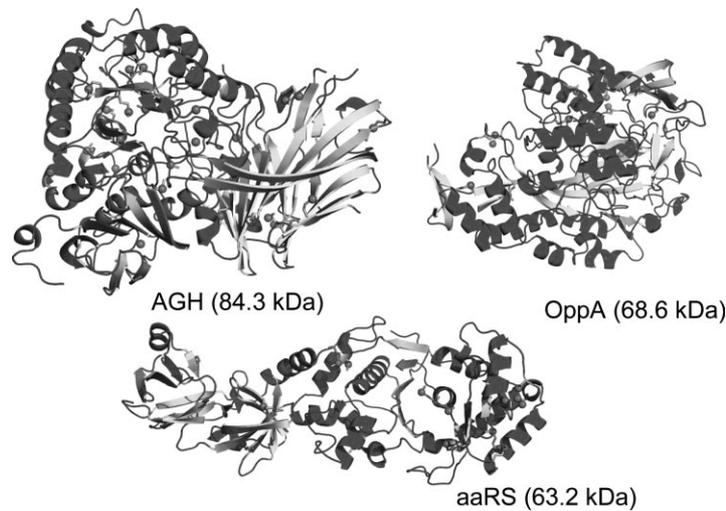


図2 非標識のまま解析されたタンパク質

2.29 の長波長X線(Cr K 特性線)を使用してS-SAD法で構造解析した比較的大型のタンパク質の例。AGHは同手法で解析した現時点での世界最大のもの。S-SAD法は、タンパク質に始めから含まれているイオウ原子の異常散乱を利用する。それぞれのタンパク質のイオウ原子位置を図中に球で示した。

大きい。SAD法の普及は、これまで不可能だった解析が実験室でも可能になったことを意味している。

世界的にはまだSe-Met利用のSe-SAD法が主流であるが、日本ではさらに一歩進んでタンパク質中に含まれるイオウ原子を使って非標識のまま解析するS-SAD法の実用化を視野に入れつつある。SAD法を持つ真の重要性は、データ収集時間が半分になったことでも、実験室系のX線で構造解析が可能になったことでもなく、重原子マーカを入れることなく解析する道を開いたところにある。MAD法では吸収端の前後でデータ収集が行われるために、吸収端が適当な波長領域にない原子を

マーカとして使うことができない。実際、タンパク質に普通に含まれているイオウ原子は、吸収端が5 付近にあるために多波長異常散乱法では使えなかった。一方、SAD法では吸収端を利用する必要は必ずしもないので、位相決定のためのマーカ原子としてイオウ原子を使うことが可能である。しかしイオウ原子からのシグナルはセレン原子と比べて数倍小さい。S-SAD法を適用するには非常に注意深い測定が必要である。図2は、北大拠点で行われた非標識タンパク質の構造解析例の一端である。良い結晶が得られ、注意深い測定を実施すれば、タンパク質中にはじめから含まれているイオウ原子を使っての構造解析が可能になってきている。

1974年大阪大学大学院理学研究科博士課程中退。

名古屋大学工学部助手。旧西ドイツマックスプランク分子遺伝学研究所研究員。北海道大学理学部助教授、北海道大学理学部教授。北海道大学大学院理学研究科教授を経て、2006

年より現職。

専門は構造生物学、X線結晶構造解析。現在のテーマは遺伝子発現に関わるタンパク質のX線結晶構造解析。



田中 勲
(たなか いさお)

北海道大学大学院先端生命科学研究院教授。理学博士。

創薬への構造解析情報の利用

ゲノム ポストゲノム研究の成果を活かしながら新薬の研究開発を進めていくためには、薬物が標的とする疾患関連タンパク質群の構造および機能情報を有効に活用する必要がある。日本製薬工業協会(製薬協)の蛋白質構造解析コンソーシアム(蛋白コンソ)加盟 21 社では、SPring-8の専用ビームライン(創薬産業BL)を利用した構造解析情報が各社の創薬に貢献しつつある。本講演では、タンパク3000 プロジェクトの進展と歩調を合わせた蛋白コンソの状況を報告し、「創薬への構造解析情報の利用」を具体的な事例で紹介する。また、新たに開始されるターゲットタンパク研究プログラムへの期待、さらに構造機能解析に関わる次世代の研究技術基盤整備への展望にも言及する。

1. 新薬への研究開発の概況

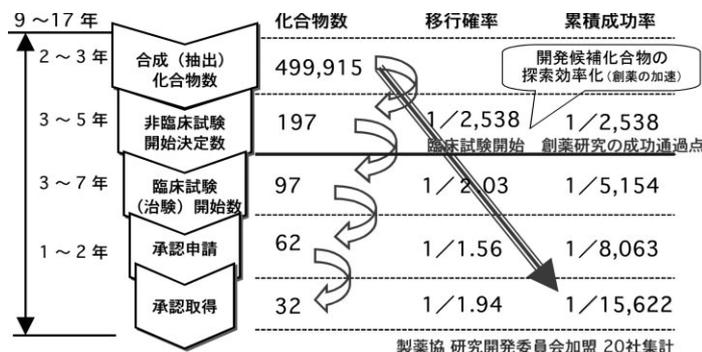
新薬誕生への道程は長く、その研究開発プロセスではヒトを対象とする臨床試験(治験)以降は莫大な経費と長期間を要することから、臨床試験に供与される開発候補化合物を探索する創薬プロセス

が重要である。現在、製薬企業の研究所では、疾患関連タンパク質の構造・機能情報を活用した薬物スクリーニングあるいは医薬品設計が展開しつつある。その合理的な創薬プロセスから優れた開発候補化合物が探索されて、新薬への研究開発期間が短縮し成功確率が向上することが期待されている(図1)。

一方、タンパク3000 および製薬企業は主として可溶性タンパク質(酵素等)を構造解析の対象としている。しかし、既存薬剤が標的とするタンパク質の半分以上は膜タンパク質である。克服すべき課題は多いが、疾患関連の標的分子として膜タンパク質の構造・機能解析の進展が期待されている。標的とする疾患タンパク質が変われば、その疾患を克服するより優れた新薬が創製され、国民の健康への貢献も大きいであろう。

2. 創薬への構造解析情報の利用

製薬協に加盟する22社(2001年公募時点:エーザイ、大塚製薬、キッセイ薬品工業、協和発酵工



- (1) 研究開発期間 9~17年
- (2) 研究開発費用 1成分あたりの開発費用は約 500 億円
{ * 米国では約 850億円}
- (3) 薬の開発成功率 15,622分の1
最近5年間(2001~2005年)で承認された新薬は32個(6個/年)

製薬協 DATA BOOK (2001-2005)

図1 新薬への研究開発：プロセスと成功確率

図2 蛋白質構造解析
コンソーシアムの
概要

アステラス製薬(山之内製薬+藤沢薬品)、エーザイ、大塚製薬、キッセイ薬品、協和発酵、三共、塩野義製薬、大正製薬、大日本住友製薬、大鵬薬品、武田薬品、田辺製薬、第一製薬、中外製薬、帝人ファーマ、日本新薬、日本たばこ産業、万有製薬、三菱ウェルファーマ、明治製菓、持田製薬 以上21社



1. 安定なコンソーシアム活動：第1期(2001年4月~2007年3月)、第2期(2007年4月~2012年3月)
2. 理研構造ゲノムBL(BL26B1/B2)と同時建設 ←2002年4月 タンパク3000プロジェクト開始
3. 所有権、利用権、業務義務等は参加企業平等 ・専用BL建設費 約5.5億円(1社2,500万円)
・年間経費(補修/消耗部品/人件費) 約1.1億円(1社500万円)
4. 専用BL共同利用(年間約400シフト)1社約20シフト=160時間/年間



ESRF (欧州)



SPring-8 (兵庫)



APS (米国)

業、三共、塩野義製薬、大正製薬、大日本製薬、大鵬薬品工業、武田薬品工業、田辺製薬、第一製薬、中外製薬、帝人ファーマ、日本新薬、日本たばこ産業、万有製薬、藤沢薬品工業、三菱ウェルファーマ、明治製菓、持田製薬、山之内製薬)は、タンパク質およびその複合体の立体構造解析が次世代創薬の中心的技術であるとの認識から、蛋白コンソを設立し、SPring-8に専用の創薬産業BLを完成させた(図2)。この創薬産業BLはタンパク3000プロジェクト関連の理研専用BL(理研構造ゲノム：BL26B1&B2)と同時建設によって建設経費軽減や技術サポート支援等の恩恵を受けてきた。また、同時期にスタートしたタンパク3000プロジェクトの進展に伴う研究成果、特に基盤技術を蛋白コンソ加盟企業が利用できたことは大変幸運であった。さらに、専用BL建設を最優先課題として発足した蛋白コンソ設立を契機として、宇宙空間あるいは超高磁場NMRの民間企業利用、さらに疾患プロテオミクス等の関連研究が推進されたことは大きな収穫であった。

一方、製薬企業の研究テーマ等は高度に機密事項であり、創薬産業BLを利用した研究成果の多くは成果専有として非公開である。しかし、蛋白コンソの第1回成果発表会(2005年12月)で報告された標的タンパク質およびその複合体の高精度な構造解析情報は、SPring-8の高輝度を十分活かした結果であり、創薬産業BLの貢献その存在意義を示す内容であった。創薬産業BLを利用したタンパク質構造情報は、各社の創薬プロセスで有効に利用されつつあると確信している。本講演では、弊社における標的タンパク質と低分子化合物の複合体構造解析情報の活用事例を示しながら、合理的な創薬プロセス実現への試行を紹介する。

3. 構造機能解析の産学官連携

現況、今後、展望

病気の診断および治療技術の研究開発には、疾患関連タンパク質群を同定し、その機能ネットワークを解析する研究が重要である。今後、ターゲットタンパク研究プログラムに代表されるタンパク質関

1980年東北大学大学院理学研究科化学修士課程修了。

80年持田製薬(株)中央研究所の新薬探索業務を経て、本社の企画業務を担当。工学博士。

現在、持田製薬(株)医薬開発本部主事、日本製薬工業協会研究開発委員会専門委員(2001~06年蛋白質構造解析コンソーシアム幹事長、02~04年創薬プロテオーム研究会幹事長)、東北大学客員教授、横浜市立大

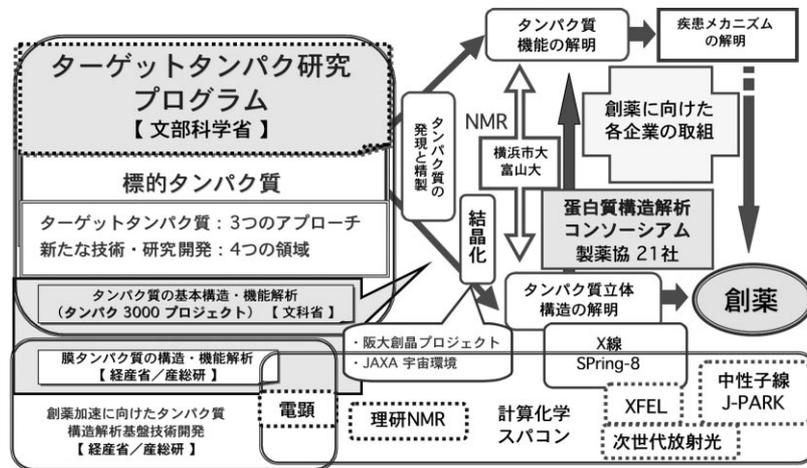
学客員教授、東京大学特任教授、総合科学技術会議科学技術連携施策群ポストゲノムWG委員、科学技術学術審議会研究評価部会委員、タンパク3000プロジェクト推進委員(知財産業連携WG主査)、疾患プロテオミクス研究会常任理事、日本薬学会薬学研究ビジョン部会常任世話人など。

関心事は、産学官連携による創薬プロセスの研究技術基盤整備。



西島 和三
(にしじま かずみ)

持田製薬(株)医薬開発本部主事。工学博士。



～ 第4期 (2011～2015年) 科学技術基本計画

図3 創薬への構造解析情報の利用 現況、展望

連プロジェクトおよび公的研究施設等が相互に協力する体制が構築されれば、新薬の標的となる疾患関連タンパク質群の探索等が加速して、創薬への取組が一段と活性化されることが期待される。その先、現在構築中の国家基幹技術あるいは特定先端大型研究施設 (X線自由電子レーザー、次世代スパコン等) が第4期科学技術基本計画で利用促進される段階では、薬物の標的となるタンパク質群の構造変化等が高精度に追跡されて疾患メカニズム等が分子レベルで詳細に解明されるであろう。その

時、「創薬への構造解析情報の利用」は当然の前提となっているに違いない(図3)。

一方、合理的な創薬たとえばゲノム創薬において、探索された開発候補薬物については生体内での動態を含めた詳細な挙動研究(分子イメージング等の利用)が重要であり、その情報を踏まえた開発候補品の絞込が新薬への研究開発期間の短縮、成功確率の向上に貢献するであろう。その結果として、高活性かつ高選択で副作用の少ない新薬の創製が論理的かつ効率的に実現可能である(図4)。

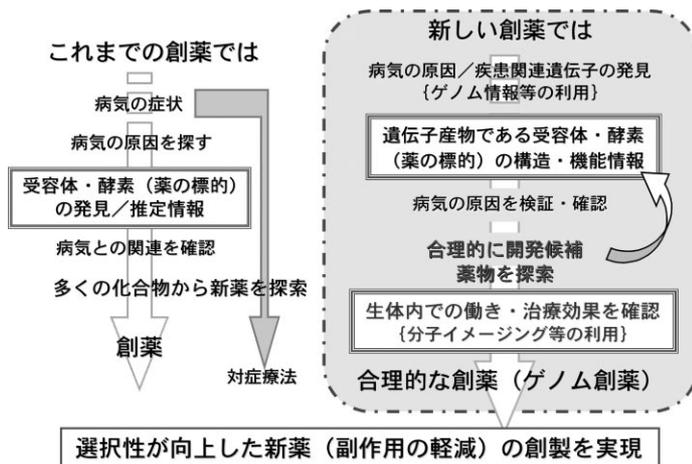


図4 合理的な創薬(ゲノム創薬)～近未来の創薬

産業利用を目指したタンパク質構造解析

国民の安全・安心の確保および健康の増進は、早急実現されるべき重要な課題である。その実現のためには、戦略的なプロテオミクス研究が重要な位置を占める。本発表では、個別的解析プログラム「発生・分化とDNAの複製・修復」の成果の中から、今後健康増進や環境保全の分野で産業利用可能と期待される成果5例について紹介する。

1. 肥大型・拘束型心筋症治療薬のリード化合物としての茶カテキン

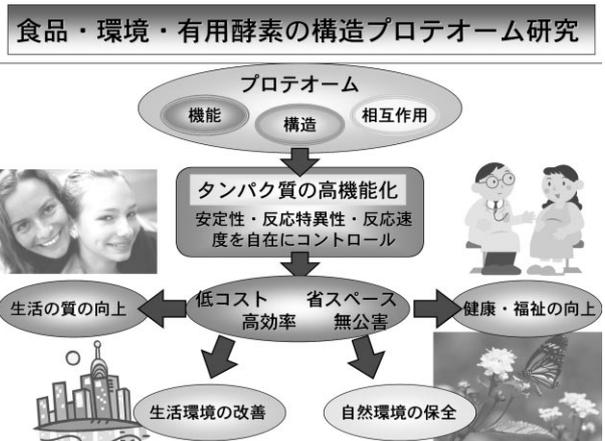
心筋症は、主に拡張型・肥大型・拘束型が知られている。心室が硬くて拡がりにくい拘束型心筋症では、心筋が異常に厚くなる肥大型で示されていたカルシウム感受性の増強作用よりも大きく亢進されることを明らかにした。そこで、我々はトロポニンのカルシウム感受性を調節する化合物の探索を行い、茶カテキンの一種であるEGCGが試験管内でトロポニンのカルシウム感受性を減弱させることを明らかにした。さらに核磁気共鳴(NMR法)と水晶発振子マイクロバランス測定法(QCM)を用いてEGCGの作用機構も明らかにした。食品成分である茶カテキンEGCGのトロポニンに対するカルシウム感受性減弱作用が今後、肥大型・拘束型心筋症治療薬開発に役立つと期待される。

2. ミトコンドリアDNAの複製異常による老化促進

ミトコンドリアDNA(mtDNA)複製酵素Polgに変異導入しその校正活性を低下させたトランスジェニックマウスを作成したところ、早老症の特徴を示した。このことから、mtDNA変異の蓄積により老化が進行し、その老化機構にはアポトーシス(プログラム細胞死)が関与していること、また活性酸素種による酸化障害が必ずしも老化に関与していないことを示した。新たな老化メカニズムの解明は、老化抑制に役立つ機能性食品の開発につながる可能性がある。

3. 摂取カロリー制限による加齢性難聴発症の抑制

加齢性難聴を発症するモデルマウスにおいて、摂



1974年東京大学理学部生物化学科卒業。79年東京大学大学院博士課程修了。

東京大学理学部助教授、東京大学生物生産工学研究センター教授を経て、98年より現職。

専門は、生化学、蛋白質工学、食品科学。特に構造生物学。

現在は産業応用を目指した蛋白質の構造解析に関心を持つ。

共編著に『食品の科学』(東京化学同人、2005)、共訳に『生化学キートン』、『分子生物学キートン』(いずれもシュプリンガーフェアラーク東京、2002)などがある。



田之倉 優
(たのくら まさる)

東京大学大学院農学生命科学研究科応用生命化学専攻教授。理学博士。

取カロリーを制限すると加齢性難聴の発症が抑制された。カロリー制限によりSIRT1遺伝子の転写レベルが上がり、p53依存性アポトーシスを抑制することにより、加齢性難聴の発症が遅れたと考えられる。摂取カロリーの制限およびそれと同様の効果を示す食品成分の摂取が、ヒトの加齢性難聴の予防法になる可能性が示唆された。

4. 脱硫酵素群の立体構造解析による反応機構の解明

重油による土壤汚染や海洋汚染を軽減するために、ジベンゾチオフェン(DBT)に代表される硫黄化合物の分解(脱硫)が極めて重要である。我々は、難分解性汚染物質であるDBTを栄養源として利用可能な微生物*Rhodococcus erythropolis*の脱硫経路に関わる3種類の酵素すべての立体構造解析に成功し、その反応機構を解析した。今後、これらの立体構造情報を元に、耐溶媒化(油中でも活性を保持するために)・耐熱化(製油所での利用の

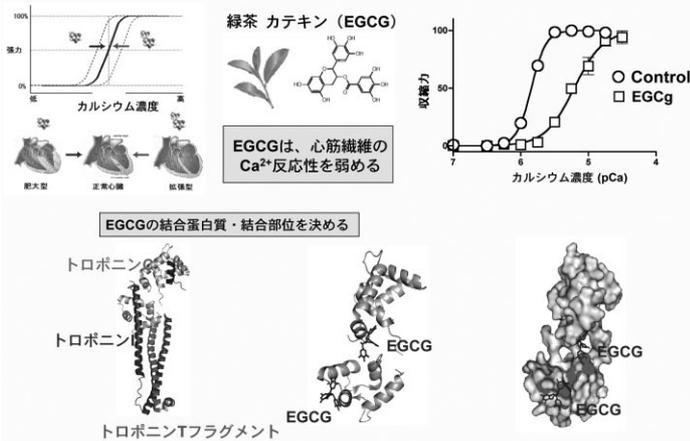
ために)・反応効率向上・基質選択性改変の改変等、脱硫酵素群の高機能化を進め、近い将来実際に酵素群を利用した脱硫が実現し、環境保全に役立つことを願っている。

5. 有害性合成色素分解酵素の立体構造解析と水質改善への応用の可能性

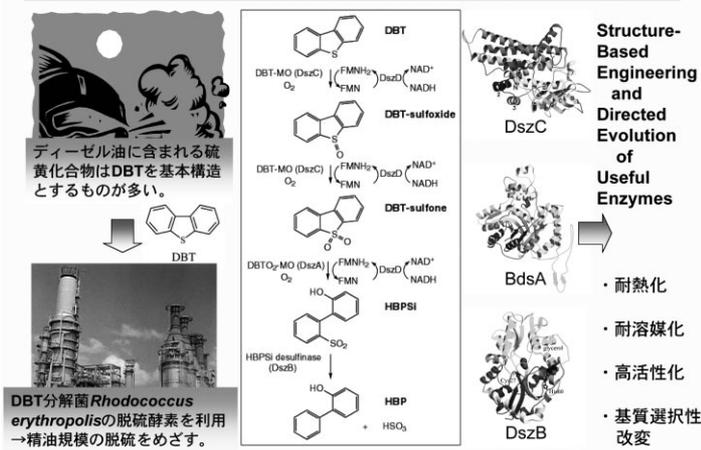
世界的規模での産業の発展にともない、環境汚染物質を浄化する技術開発が急務となっている。アゾ基(N=N)を持つ合成色素(アゾ化合物)は製造が容易で安定なことから、印刷、染色、着色料、化粧品など様々な用途で大量に使用されている。だがその安定性のため、一度環境中に放出されると自然界の浄化作用では分解されずに環境汚染を引き起こす。なかには、遺伝子変異を引き起こすなどの有害性があるものも数多く存在する。我々は、有害かつ汎用性の高いアゾ化合物、メチルレッドを分解する大腸菌由来の酵素AzoRの立体構造をX線構造解析によって決定し、その反応機構を明らかにした。この成果により、アゾ化合物分解酵素の研究開発(水質改善への応用など)が飛躍的に発展すると期待される。

近年、タンパク質の構造解析技術が発展して、さまざまな分野への応用が加速度的に広がっており、立体構造に基づいた薬剤デザイン(Structure-Based Drug Design, SBDD)や、タンパク質・酵素の高機能化(Structure-Based Engineering and Directed Evolution of Enzyme)など、産業における新しい技術革新をもたらしつつある。産業分野において、タンパク質の構造解析の成果が今後ますます重要になっていくだろう。

カテキン(EGCG)は心臓病治療薬開発のリード化合物に成り得る



脱硫酵素による石油中硫黄化合物の除去



第3部

タンパク研究のこれから 構造決定への新しい手法

15:55
|
17:35



中川 敦史

(なかがわ あつし)

大阪大学蛋白質研究所附属
プロテオミクス研究センター
(超分子構造解析学研究所)
教授。理学博士。

座長紹介

1983年名古屋大学理学部化学科卒業。86年大阪大学大学院理学研究科博士課程中退。

86年高エネルギー物理学研究所放射光実験施設助手、95年北海道大学大学院理学研究科助教授、99年大阪大学蛋白質研究所助教授を経て2003年より現職。

専門は構造生物学。特にX線結晶学。現在は放射光を利用した生体超分子複合体の構造解析に関

心を持つ。

1993年日本結晶学会進歩賞受賞。

共著に『バイオ高性能機器・新技術利用マニュアル』(共立出版、2004年)、『蛋白質がわかる』(羊土社、2003年)などがある。



稲垣 冬彦

(いながき ふゆひこ)

北海道大学大学院薬学研究
科教授。

座長紹介

1970年東京大学理学部化学科卒業。72年東京大学大学院理学系研究科化学専門課程修士課程修了。74年東京大学大学院理学系研究科生物化学専門課程博士課程中退。76年東京大学理学系研究科理学博士学位取得。

74年東京大学生物化学教室(文部教官)、81年(株)東レリサーチセンター研究員、86年(財)東京都臨床医学総合研究所生理活性物質研究部門室長を経て、99年より現職。

タンパク質構造情報から タンパク質機能情報へ

構造ゲノム科学 / 構造プロテオミクスの目的は、ゲノムに書き込まれたタンパク質の機能に関する情報を、タンパク質の立体構造から読み取ろうとすることにある。タンパク質の立体構造は、それぞれのタンパク質ファミリー毎にほぼ同一のかたちをとると考えると、ファミリー代表の立体構造が決定されれば、ゲノム中に書き込まれたタンパク質のかたちがほぼ推定できる。

まず、日本国内のタンパク3000プロジェクトによって、どのようなタンパク質構造の解明がなされてきたかを調査した結果を紹介する。プロジェクト開始時の2002年4月から2006年12月末までに、本プロジェクトに参加した国内のグループが構造決定を行いPDB(Protein Data Bank: タンパク質立体構造のデータベース、<http://www.pdbj.org/>)に登録し、公開された総データ件数は2,317件であった。PDBには登録しているものの未だ公開されていないものも多いため、既に3,000件を越える構造が決定されPDBに登録もされているようではあるが、今回は2006年末の時点でPDBから公開されているものに限る。

1件のPDBのデータに、同一でないペプチド鎖が

複数含まれている「複合体タンパク質」の場合もあるため、同一でないペプチド鎖の本数で数えると2,732構造が決定されている。さらに、これら2,732ペプチド鎖のうち918のペプチド鎖が、2002年4月の時点で構造が既知であった全タンパク質と30%以下の相同性しか持たない配列を持つものであった。言い換えると、30%以下の相同性という観点でタンパク質ファミリーを定義すると、新規タンパク質ファミリー代表として918の立体構造を本プロジェクトで決定できたことになる。さらに、この918のペプチド鎖のうち、122のドメインが新規なフォールド(かたち)を持つことが明らかになった。

これらの成果は、米国で行われている構造ゲノムプロジェクトであるPSI(Protein Structure Initiative)の2000年~2005年1月末までの成果[PDBデータ数: 1,032件、ペプチド鎖数: 1,043、新規な配列: 597、新規なドメイン・フォールド: 48(スーパーファミリーを含むと74)]と比較できる数値であり、タンパク3000のプロジェクトにおいては、構造既知のタンパク質と同一のファミリーのタンパク質構造の解析も行われてはいるが、多数の新規なファミリーの構造やドメイン・フォールドの発見に寄与したことは明らかである。

さらに、米国のPSIが、構造ゲノム科学として、個々の遺伝子に対応するタンパク質の構造決定を進めてきたという事情に対して、タンパク3000においては、より構造プロテオミクス(タンパク質間相互作用や複合体タンパク質に対する構造生物学)という視点も強く入っていた。そのため、PSIでは異なるペプチド鎖とPDBデータの比が1.01(1,043/1,032)であったのに対し、タンパク3000では1.18(2,732/2,317)と高い数値となっている。また、図1に示すように、決定されたタンパク質構造には、ダイマーのみでなく、より多くの異なるペプチド鎖からなる複雑なヘテロ・オリゴマー構造(複合体構

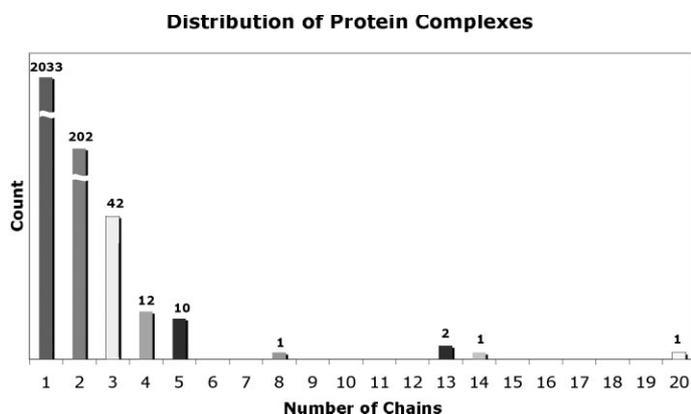
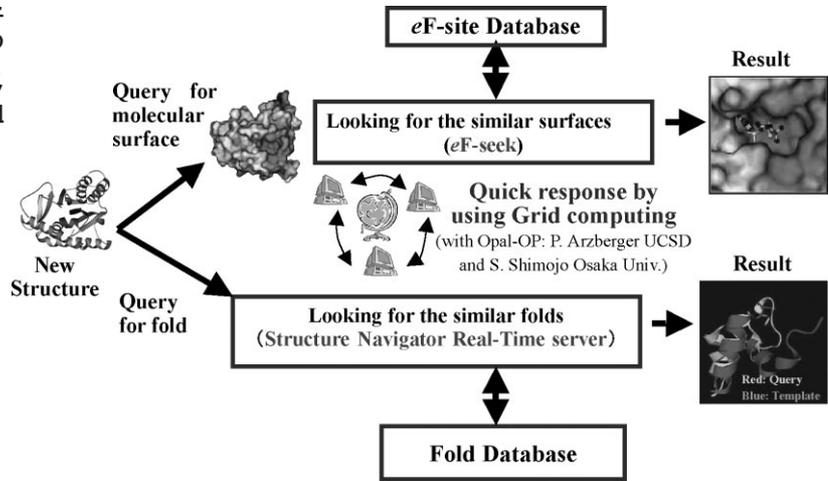


図1 異なるペプチド鎖による複合体としてタンパク3000プロジェクトにおいて構造が決定されたタンパク質複合体中のペプチド鎖の数の分布

図2 タンパク質分子の形や分子表面構造・物性についてのアナログ量に対する検索を、グリッド・コンピューティングを利用しての実施する仕組み



造)も多く含まれていることがわかる。

ところで、構造ゲノム科学/プロテオミクスによって決定されたタンパク質には、生化学的機能が未知のものも多く含まれており、タンパク3000の成果の中にも多くの機能未知タンパク質がある。一般に、機能未知のタンパク質機能を推定するには、(1)配列情報からタンパク質全体あるいは局所的な類似配列を探索する方法、(2)フォールドの類似性から弱い配列の相同性や保存されている局所的アミノ酸配列を見つける方法、(3)フォールドが異なっても機能部位の原子配置の類似性を探索する方法、(4)フォールドが異なっても機能部位の局所的な分子表面の形と物性の類似性を探索

する方法、がある。(1)は古典的な配列の相同性検索に他ならず本質的にはdiscreteな値の比較であるが、(2)~(4)はanalog値の比較であり計算機資源を多く必要とする。このため、高速性を発揮できるアルゴリズムの開発と伴に、グリッド計算システムのような新しいネットワーク技術が有効である(図2)。さらにタンパク質間相互作用については、複合体構造の予測が世界中で試みられており演者のグループも実施しているが、intrinsically unfolded protein / domain の存在が明らかになるに従い、その問題点も表面化しつつある。これらの最近の解析・予測手法を紹介するとともに、タンパク3000の成果に対する具体的な利用例について紹介する。

1975年東京大学理学部物理学科卒業。東京大学大学院理学系研究科物理学専攻博士課程修了。

東京大学工学部物理工学科助手、蛋白質工学研究所第2研究部部长、生物分子工学研究所情報解析研究部門部門長を経て、99年より現職。

専門は生物物理学、蛋白質科学。

特に蛋白質の構造・機能と電気物性、分子設計。現在はデータベースと分子シミュレーションの融合に関心を持つ。

共著に『蛋白質工学』(朝倉書店、1991年)、『タンパク質のかたちと物性』(共立出版、1997年)などがある。



中村 春木
(なかむら はるき)

大阪大学蛋白質研究所附属プロテオミクス総合研究センター長、教授。理学博士。

難発現性タンパク質の生産と精製

ターゲットタンパク質構造解析のボトルネック解消に向けて

タンパク 3000 プログラムの成果を挙げるまでもなく、現代のライフサイエンスにおいてX線結晶解析を中心としたタンパク質の立体構造解析の進展は目を見張るべきものがある。しかし医学的・生物学的に重要なタンパク質が全て順調に解析されているわけではない。周知のように膜タンパク質はもっとも調製・解析が困難なターゲットであり、高等生物のゲノムの約3割を占めるといふ膜タンパク質の構造解析は遅々として進まない。その膜タンパク質と同様に構造生物学者にとって厄介な存在なのが、受容体の細胞外ドメインを含めた細胞外タンパク質である。その厄介さの原因の一つが糖鎖などの翻訳後修飾の存在であり、これによって大腸菌のポピュラーな発現系が使えないことがネックとなるのは周知のことである。

なぜ細胞外タンパク質は糖鎖を持つのだろうか？細胞外スペースは細胞内や核内と違ってプロテアーゼによる切断や酸化による化学的変性、物理的な剪断などにさらされる危険が高く、unstructuredな

構造は許容されにくい。そこでタンパク質はジスルフィド架橋によって小さな身体を頑丈にし、糖鎖という「ソフトな鎧」をまとうことによって分解の脅威から身を守るように進化したと思われる。このようなタンパク質を解析のターゲットとする場合、翻訳後修飾の出来る真核生物の発現系、特に高等動物細胞での組み換え発現が必要となる。しかしここに大きなボトルネックが存在する。それは、(1)糖鎖の不均一性、(2)高収量を阻む品質管理機構、(3)微量精製の必要、である。

1. 発現における糖鎖の問題

糖鎖の存在は結晶化には不利に働く。そもそもが多様なコンフォーメーションを取りうる親水性のポリマーである糖鎖は、タンパク質が結晶格子にきっちりと収まる為にあまり助けにならないと考えられるが、それ以上に深刻なのは、タンパク質の糖鎖が一定の組成をとらない混合物である点である。せっかくアミノ酸配列としては100%純粋なタンパク質を精製出来ても、糖鎖の組成がバラバラなせいで化学的に不均一な(すなわち結晶化には極めて不都合な)ものになってしまうのである。そこで結晶化品質の糖タンパク質を調製するのに威力を発揮するのが、各種の糖修飾パスウェイに異常を持つ細胞株である。CHO細胞の亜株であるCHO Lec 3.2.8.1株はGlcNAc転移酵素異常、シアル酸輸送異常、UDP Gal輸送異常という複合欠損により、プロセッシングが途中で止まり、全てのN結合型糖鎖はハイマンノース型に、O結合型糖鎖はGalNAc単糖になってしまう(図1)。その結果、合成されるタンパク質は極めて均一なグリコフォームを持ち、たとえ糖含量の高い糖タンパク質でも電気泳動の際にシャープなバンドを見せるようになる(図2)。このような細胞を使った発現系は数多くの糖タンパク質の構造解析の実績を持つ。

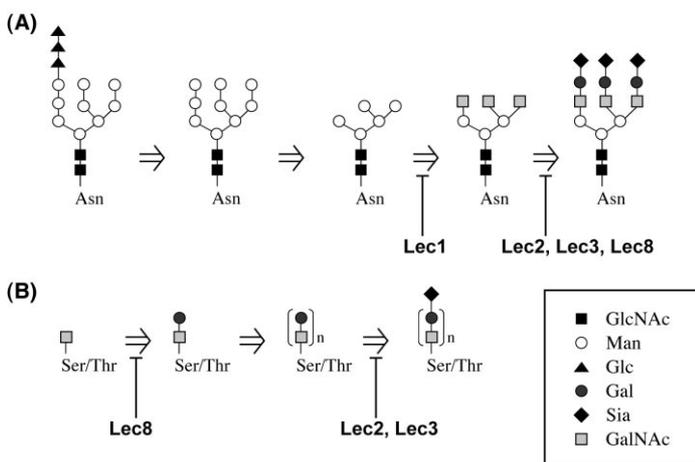


図1 CHO Lec細胞株における糖鎖プロセッシングの異常 (A)にはN型糖鎖、(B)にはO型糖鎖について、ほ乳類細胞におけるその成熟経路を示す。各ステップには様々な酵素や輸送体が関与するが、Lec変異株は図に示したようなステップで反応を遮断するので、結果的にそれより先の修飾が起こらない。

2. 発現における品質管理機構の問題
高等動物の細胞はタンパク質の品質管理(QC)機構を備えている。ミスフォールドしたタンパク質を除去するだけでなく、あるタンパク質が正しい場所やタイミングでのみ生成される事を保証するシステムであり、じつは「難発現性タンパク質」と呼ばれる

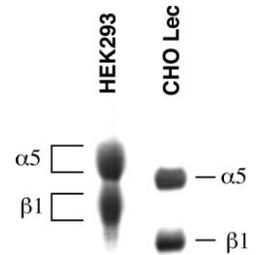
ケースの多くがこれに起因していると考えられる。発生や分化に関わるタンパク質などの多くはこれに当てはまり、プライベートシャペロンの導入や、誘導性発現など、バイオロジーの知見に根ざした生産技術の工夫が求められる。しかしこの問題は逆に捉えれば問題解決をやさしくしているとも言える。すなわち、このようなQC機構を通り抜けてきたタンパク質は、その構造的・機能的完全性が保証されているわけであるから、たとえ微量であっても極めて高い品質を持っているので、解析に成功する確率は高いことになる。一般に困難と思われている動物細胞発現系が、じつは優位性も併せ持っていることを知ることは大切である。

3. 微量タンパク質解析の問題

そこで重要となるのが、「いかに高品質のタンパク質の微量精製を達成し、その微量タンパク質から解析を成功させるか」という点である。前述のような動物細胞発現系では、培地1mL中にマイクログラムレベルのタンパク質が存在すれば良い方である。培地には通常血清が含まれるため、ターゲットタンパク質の初期純度は0.1%を大きく下回る。(大腸菌の典型的な発現系なら数十%にのぼること

図2 CHO Lec 3.2.8.1 細胞株で発現したタンパク質糖鎖の均一性

ここには α_5 β_1 インテグリンの全細胞外領域を含む可溶性フラグメントを HEK293 および CHO Lec 3.2.8.1 細胞で発現、精製したものの電気泳動像を示す。 α_5 は 13、 β_1 は 11 カ所の N 型糖鎖付加部位を持つ。CHO Lec で発現すると見かけ上の分子量が小さくなるだけでなく、バンドのスメアリングも解消され、糖鎖がより小さく、しかもより均一なものに変わっていることがわかる。



も珍しくはない)。そのような粗試料からのタンパク質精製に特化したアフィニティタグシステムは市販されているが、選択の余地は少なく、大きな改良が望まれる。

微量のタンパク質(mg以下)しか得られない場合、以前なら誰もが断念していただろう構造解析も、近年の技術革新で可能になりつつある。X線結晶解析には結晶化が必須であるが、そのためには膨大な数の条件検討が必要である。問題は、このような様々な条件検討は比較的大量の試料を必要とすること、そして評価の手段が結晶化そのもの以外にないこと、である。その解決のため、極微量で結晶化スクリーニングが出来る各種の装置の開発が進んできた。本来は構造ゲノミクスのようなハイスループット解析のために開発されてきたテクノロジーであるが、少量しか手に入らない試料についてじっくりと攻める時にこそ、実はこの技術は真の威力を発揮する。微量のタンパク質(ただし高品質)で結晶化が出来、しかも小さい結晶から構造解析が可能となると、研究用タンパク質生産のボトルネックは「研究者の生物学の知識」だけになっているかもしれない。

1985年東京工業大学理学部化学科卒業。90年東京工業大学大学院理工学研究科博士課程修了。

東京工業大学生命理工学部助手、ハーバード大学医学部病理学科講師(Instructor)、ハーバード大学医学部小児科助教授(Assistant Professor)を経て、2003年より現職。

専門はタンパク質化学、構造生物学。特にレセプター・リガンド相互作用の構造生物学的解明。

著書(翻訳)に『ポストゲノム時代のタンパク質科学 構造・機能・ゲノミクス』(Arthur Lesk著、高木淳一訳、化学同人、2007年)などがある。



高木 淳一
(たかぎ じゅんいち)
大阪大学蛋白質研究所
附属プロテオミクス総合
研究センター教授。理学
博士。

放射光 X 線タンパク質構造解析の展開 汎用化技術と高難度ターゲットへの挑戦

生体分子が織り成すネットワーク全体をシステムとして理解するためには、遺伝子産物であるタンパク質や核酸がどのような機能を持つかを知り、それらが生体分子ネットワークの中でターゲットとなる他のタンパク質、核酸、脂質、糖鎖などどのような相互作用するかを原子レベルで捉えることが重要で、それにより機能発現機序の理解が飛躍的に進むと考えられる。これら生体分子の構造解析研究においては、電子顕微鏡、NMR、質量分析とならんで、放射光 X 線結晶構造解析を用いた原子レベルでの構造解析が特に重要とされている。現在、世界各国で、放射光 X 線を用いたタンパク質の構造解析用ビームラインの開発、設計、建設が行われ、広く構造生物学研究者によって利用されている。これらの施設では、従来の構造生物学研究や構造プロテオミクス研究だけでなく、創薬や、食品、環境といった応用分野における産官学連携研究も広く行われている。

本講演では、タンパク質複合体の放射光 X 線結晶構造解析が必要となる挿入光源ビームライン、高精度回折計、ユーザーフレンドリーな実験環境の整備などについてこれまでの開発状況 [1-4] を

紹介するとともに、これらの技術を用いて行った、翻訳後修飾(特に糖鎖修飾)と細胞内小胞輸送系におけるマルチドメインタンパク質の構造プロテオミクスについて紹介する。ここで対象となるタンパク質は、親和性はそれほど高くない($K_d=1\sim$ 数百 μM)ものの、選択性が高く、かつトランジエントな相互作用を対象とするものが多い。従って、それら複合体タンパク質の(共)発現、精製は困難である事が多く、構造解析に耐えうる結晶を得ることはさらに困難である。GGA[5-7]、Hrs[8]、ユビキチン[8, 9]、FIP/Rab11[10]など小胞体、ゴルジ体、エンドソーム、リソソーム等の輸送系で働くアダプタータンパク質や、Emp46, 47p[11]、ガレクチン[12]などの糖鎖関連タンパク質についていくつか具体例を挙げ、放射光 X 線結晶構造解析だけでなく、X 線小角散乱、NMR、質量分析、生化学実験を組み合わせ、構造解析と機能解析の密接な連携により細胞生物学的理解が進んできた過程をたどる。

近年、このような技術の進展とそれを利用した成果の創出を背景として、放射光を用いた構造生物学研究はこれまでの取り扱いやすい原核生物あるい

SPring-8(播磨)

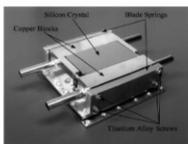


Photon Factory (つくば)



超高精度 X 線分光器の開発

- ・液体窒素循環冷却による熱歪みの軽減
- ・マイクロビームに向けた高精度 & 安定化



超高精度高速ゴニオメータの開発

- ・サブミクロン以下の精度を持った超高精度回転軸
- ・迅速データ収集を可能にする高速回転軸



は真核生物でも単ドメインなどの構造・機能解析から、タンパク質の調製・結晶化・構造解析の困難なターゲット、すなわち、ウイルスなど非常に大きな超複合体、私達の健康に直結したヒト由来タンパク質や病原菌、生命機能の理解を目的としたタンパク質ネットワークの解明のための構造生物学に焦点が移ってきている。これらの高難度タンパク質をターゲットとした立体構造解析では、対象となるタンパク質が良質な結晶にならず数ミクロン以下の微小結晶しか得られないことが多い。立体構造解析に必要な回折強度は結晶の体積に比例するため、微小結晶を用いた場合、精度や分解能の不足により現在の放射光ビームラインでの構造解析は事実上不可能である。また、今後はこれまで以上に格子定数の大きな超分子複合体、結晶化やセレン化のしにくい高難度のタンパク質複合体がターゲットとなる。微小結晶にマイクロビームを安定に照射するためには、サンプル位置でサブミクロン精度のビーム位置安定性や強度変動の最小化などが求められる。加えて、微小結晶の操作技術やサブミクロン以下の高精度ゴニオメータなど、実験ステーション周辺にも多くの技術革新が必要である。そのためには、光源・分光器・集光光学系・回折計などのあらゆるビームライン要素についての技術開発が不可欠である。一方、構造決定に必要な位相情報は、現在、重原子によるラベル化タンパク質結晶の多波長異常分散を用いて得る方法が主流で、ラベル化できないタンパク質結晶の構造決定は非常に困難である。しかし、低エネルギーX線マイ

クロビームとタンパク質に元来含まれる軽原子の異常分散を利用した単波長異常分散(SAD)法を組み合わせることで、位相を決定することができ、構造解析も可能となる。その際、X線ビームの安定照射に加えて、吸収によるビーム強度の低下、高いバックグラウンド、より深刻なサンプルの放射線損傷、などの問題を解決する必要がある。講演の後半では、これらの解析で重要となる低エネルギー単波長異常分散(SAD)法、超分子複合体X線結晶構造解析、マイクロビーム、微小結晶のハンドリング、遠隔操作等の、放射光X線ビームライン複合技術の将来展望について議論する。

参考文献

- [1] N. Igarashi et al. *AIP Conf. Prof.*, **879**, 812, 2007
- [2] M. Hiraki et al., *AIP Conf. Prof.*, **879**, 1924, 2007
- [3] Y. Gaponov et al., *AIP Conf. Prof.*, **879**, 1932, 2007
- [4] N. Matsugaki et al., *AIP Conf. Prof.*, **879**, 1936, 2007
- [5] T. Shiba et al. *Nature*, **415**, 937, 2002
- [6] T. Shiba et al. *Nature Structural Biology*, **10**, 386, 2003
- [7] T. Nogi et al. *Nature Structural Biology*, **9**, 527, 2002
- [8] S. Hirano et al., *Nature Structural and Molecular Biology*, **13**, 272, 2006
- [9] S. Hirano et al., *Nature Structural Molecular Biology*, **13**, 1031, 2006
- [10] T. Shiba et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 15416, 2006
- [11] T. Satoh et al., *J. Biol. Chem.*, **281**, 10410, 2006
- [12] M. Nagae et al., *J. Biol. Chem.*, **281**, 35884, 2006

東京大学大学院新領域創成科学研究科メディカルゲノム専攻連携講座教授。東京大学放射光連携研究機構生命科学部門長を兼任。Ph.D. in Chemistry。

1984年東京大学大学院工学系研究科化学工学専攻修士課程終了。90スタンフォード大学化学科博士課程

修了。

European Synchrotron Radiation Facility(ESRF X)1994年~2000年)を経て、現職。

専門は放射光X線蛋白質結晶学と構造生物学。

2006年日本結晶学会学術賞受賞。



若槻 壮市
(わかつき そういち)
高エネルギー加速器研究機構物質構造科学研究所放射光研究施設施設長、研究主幹、教授。

タンパク質制御化合物の創出

酵素や受容体などの重要な生体分子であるタンパク質の機能解析を推進するためには、これらの機能を制御する特異的な低分子化合物を開発することが重要である。このような制御化合物はタンパク質の高次構造に基づいて分子設計することが可能であり、構造生物学の進展が極めて重要であることは言うまでもない。その一方で、タンパク質の高次構造が未知の場合に、制御化合物がそのターゲットタンパク質に高い親和性を有していることに基いて、タンパク質の共結晶化など構造解析に有用となることもある。このように制御化合物の創製・開発はタンパク質の構造解析と密接に関連し、相互に支援する関係にある。

制御化合物を開発するためには基盤の整備と技術開発が必要となる。すなわち、

- 1) 化合物ライブラリーの基盤整備と技術開発
 - 2) スクリーニングシステムの基盤整備と技術開発
 - 3) インシリコアプローチを導入した制御化合物創製の基盤整備と技術開発
- である。

技術開発として、Cheminformatics に基づいたヒット効率の高い化合物の収集、大学発あるいは

天然化合物など特徴ある化合物の収集、高感度および高速のスクリーニングシステム、インシリコアプローチによる迅速なヒット化合物探索と高度の有機合成化学に基づいたリード化合物創製の最適化技術が必要である。

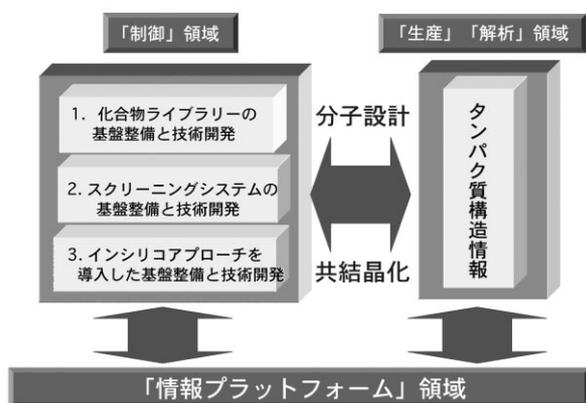
数百万種類からなる化合物群を化合物の構造と物理化学的性質に基づいた多様性あるいはターゲットタンパク質への適合性を考慮したバーチャルスクリーニングにより選別し、さらに化合物の lead-likeness に基づいたスクリーニングにより質の良い化合物を収集し、化合物ライブラリーとして研究基盤を構築する。ライブラリーは目的に応じて、ジェネラルライブラリーとフォーカスライブラリーに分けられる。

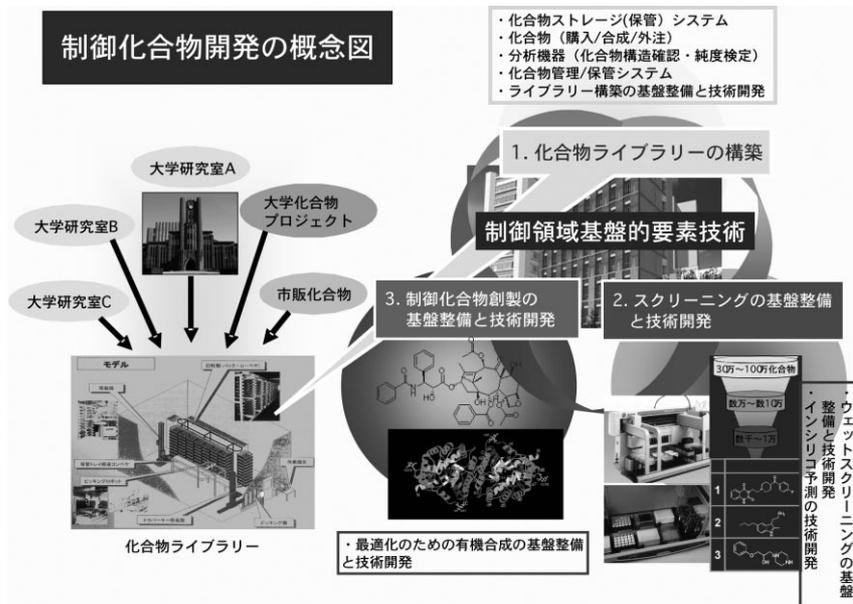
ジェネラルライブラリーは化合物の多様性などを指標にフィルターをかけた上で収集することになる。タンパク質の機能評価に充分効果的な10数万化合物のライブラリーをデザインする。フォーカスライブラリーはターゲットタンパク質として選択されたタンパク質ファミリーを対象として、その立体構造を用いてバーチャルスクリーニングを行うことにより選別する。タンパク3000プロジェクトなど構造生物学の成果が有用となる。

なお、これら2つのライブラリーに加えてフラグメント化合物ライブラリーの構築も重要である。このライブラリーはインシリコアプローチでフラグメント化合物を適当なリンカーで繋ぐことにより、高活性化化合物をデザインする方法であるが、これは先進的な技術開発を伴う。

天然物化学研究は日本が世界をリードしている分野であるが、天然化合物ライブラリーの構築も重要である。古来より、多くの薬理活性化化合物が天然化合物から生み出された。天然化合物の収集を目的として、微生物の二次代謝産物を網羅的に取得する。また、天然化合物を基盤に化学修飾あるいは生物変換を施した天然型非天然化合物、天然

タンパク質構造解析研究とタンパク質制御化合物開発研究は相互に関連している





化合物を標識化したプローブ化合物を作成することも重要である。

次にスクリーニングの技術開発であるが、この技術開発の成否が制御化合物開発の鍵を握っていると言っても過言ではない。開発すべきスクリーニング技術として、

- 1) 高感度、特異的であること
- 2) 多検体処理を可能とする高速であること
- 3) False positive や false negative をなくすこと

ターゲットタンパク質は貴重であり、往々にして極微量である。極微量のタンパク質と的確に相互作用する化合物をスクリーニングする汎用性のある技術が求められている。また、特異的であることも必要である。10万種類の化合物から間違いなくヒット化合物を見出す技術は現在においても非常に重要な技術開発項目である。

上記のことを可能にする技術として、1チップあたり約2,000スポットをアレイ化する技術や蛍光相関分光を用いたスクリーニング技術が有望である。

また、スクリーニングのための新規プローブ、例えば蛍光長寿命型プローブの開発などは極めて有効であろう。

ヒット化合物からリード化合物を創出する最適化技術は、タンパク質の高次構造の支援に基づいて行われるが、これに関しては最先端の有機合成化学者の参加が必要である。

おわりに、これらの情報を格納し、実験室で利用できるDBの構築も不可欠であることを強調したい。ターゲットタンパク質に対して、生物活性を調べた化合物の構造情報や物理化学的性質などの情報を格納するDBが求められる。DBには化合物情報のみならずターゲットタンパク質の情報も含まれる。化合物の構造をクエリーとして、それに対して活性を有するタンパク質の検索やその逆の検索も可能となるDBを構築し、迅速なヒット化合物の探索と新規リード化合物の設計や創薬ターゲットタンパク質の探索など様々な用途に使えるシステムの構築が有用であろう。

1972年東京大学薬学部卒業。77年東京大学薬学系大学院博士課程修了。東京大学薬学部助教授を経て、96年より現職。

専門は薬化学。特に分子イメージング研究。現在はケミカルバイオロジーに関心を持つ。

2007年3月より日本薬学会次期会頭。04～06年東京大学大学院薬学系研究科副研究科長。1998～99年東京大学総長補佐。

受賞歴は2006年紫綬褒章受賞。06年日本薬学会学会賞受賞(社団法人日本薬学会)。05年島津賞受賞(財団法人島津科学技術振興財団)。04年上原賞受賞(財団法人上原記念生命科学財団)。02年山崎貞一賞受賞(財団法人材料科学技術振興財団)。00年持田記念学術賞受賞(財団法人持田記念医学薬学振興財団)。1999年市村学術賞受賞(財団法人新技術開発財団)。90年日本薬学会奨励賞受

賞(社団法人日本薬学会)。著書に『創薬科学』(東京化学同人、2004年)などがある。



長野 哲雄
(ながの てつお)

東京大学大学院薬学系研究科教授。薬学博士。

ポスター一覧

ポスター 番号	プログ ラム名	領域名	演題	発表者	所属
P-001	網羅的 解析 プログラ ム		RSGIの目的と戦略	横山茂之	理化学研究所
P-002			RSGI解析パイプライン	渡部暁、青木雅昭、関英子、松田貴意	理化学研究所
P-003			RSGI解析パイプライン	渡部暁、青木雅昭、関英子、松田貴意	理化学研究所
P-004			RSGI解析パイプライン	渡部暁、青木雅昭、関英子、松田貴意	理化学研究所
P-005			RSGI解析パイプライン	白水美香子、林文晶	理化学研究所
P-006			RSGI解析パイプライン	白水美香子、林文晶	理化学研究所
P-007			RSGI解析パイプライン	寺田貴帆、岸下誠一郎	理化学研究所
P-008			RSGI解析パイプライン	寺田貴帆、岸下誠一郎	理化学研究所
P-009			RSGI解析パイプライン	武藤裕、林文晶	理化学研究所
P-010			RSGI解析パイプライン	武藤裕、林文晶	理化学研究所
P-011			RSGI解析パイプライン	武藤裕	理化学研究所
P-012			新規タンパク質発現技術	今高寛晃	理化学研究所
P-013			新規タンパク質発現技術	染谷友美、脇山素明	理化学研究所
P-014			合成技術の高度化	坂本健作	理化学研究所
P-015			タンパク質機能制御高分子の開発	平尾一郎	理化学研究所
P-016			構造機能解析の成果の概要	横山茂之	理化学研究所
P-017			NMR法によるタンパク質機能ドメイン の網羅的解析概要	井上真	理化学研究所
P-018			NMR法によるタンパク質機能ドメイン の網羅的解析概要	井上真	理化学研究所
P-019			NMR法によるタンパク質機能ドメイン の網羅的解析概要	井上真	理化学研究所
P-020			NMR法によるタンパク質機能ドメイン の網羅的解析	横山茂之、林文晶、武藤裕	理化学研究所
P-021			NMR法によるタンパク質機能ドメイン の網羅的解析	横山茂之、林文晶、武藤裕	理化学研究所
P-022			NMR法によるタンパク質機能ドメイン の網羅的解析	横山茂之、林文晶、武藤裕	理化学研究所
P-023			高度好熱菌丸ごと一匹プロジェクト	海老原章郎、新海暁男	理化学研究所
P-024			遺伝子の情報発現システムの解明に 向けて	横山茂之	理化学研究所
P-025			遺伝子の情報発現システム DNA複製・組換え・修復	香川亘	理化学研究所
P-026			遺伝子の情報発現システム 転写	関根俊一	理化学研究所
P-027			遺伝子の情報発現システム 転写	関根俊一	理化学研究所
P-028			遺伝子の情報発現システム tRNA プロセッシング	別所義隆、竹本千重	理化学研究所
P-029			遺伝子の情報発現システム 翻訳	別所義隆、竹本千重	理化学研究所
P-030			遺伝子の情報発現システム 翻訳	別所義隆、竹本千重	理化学研究所
P-031			シグナル伝達ネットワークの解明に 向けて	白水美香子	理化学研究所
P-032			シグナル伝達ネットワーク 膜貫通型受容体、低分子量Gタンパ ク質を介するシグナル	白水美香子、染谷友美	理化学研究所

ポスター 番号	プログ ラム名	領域名	演題	発表者	所属
P-033	網羅的 解析 プログラ ム		シグナル伝達ネットワーク クロマチン転写制御ネットワークに 関わるタンパク質群	梅原崇史	理化学研究所
P-034			感染症対策のターゲットと治療薬の開発	松本武久、村松知成	理化学研究所
P-035			感染症対策のターゲットと治療薬の開発	松本武久、村松知成	理化学研究所
P-036			タンパク質立体構造予測	佐藤万仁、田仲昭子	理化学研究所
P-037			タンパク質立体構造情報に基づく 薬剤設計	佐藤万仁、田仲昭子	理化学研究所
P-038			タンパク質機能の計算的アプローチ	畠山真里子、泰地真弘人	理化学研究所
P-039			FANTOMとDNA ブック	林崎良英、河合純	理化学研究所
P-040			NMR パイプライン公開モニター	前田秀明	理化学研究所
P-041	発生・ 分化と DNAの 複製・ 修復	個別的 解析 プログラ ム	5年間の成果概要と基盤技術開発	田之倉優	東京大学大学院農学生命科学研究科
P-042			メダカ孵化酵素 HCE、LCE の立体構造 解析	工藤紀雄 1)、安増茂樹 2)、井内一郎 2)、 田之倉優 1)	1)東京大学大学院農学生命科学研究科、 2)上智大学生命科学研究科
P-043			ショウジョウバエの肢の分化に関わる転 写調節因子とその認識 DNA の三者複合 体結晶構造解析	宮園健一 1)、小嶋徹也 2)、永田宏次 1)、 西郷薫 3)、田之倉優 1)	1)東京大学大学院農学生命科学研究科、 2)東京大学大学院新領域創成科学研究科、 3)東京大学大学院理学系研究科
P-043			心筋トロポニンの Ca ²⁺ 感受性抑制物質 の発見とその作用機構の解析	湯本史明 1) 2)、只野尚登 3) 4)、 永田宏次 1)、森本幸生 3)、大槻磐男 2)、 田之倉優 1)	1)東京大学大学院農学生命科学研究科、 2)東京慈恵会医科大学医学部、3)九州大学 大学院医学研究院、4)全薬工業
P-044			脱硫酵素による芳香族硫黄化合物分解 経路の解明	李愚哲 1)、大城隆 2)、松原俊之 2)、 和泉好計 2)、田之倉優 1)	1)東京大学大学院農学生命科学研究科、 2)鳥取大学工学部
P-044			大腸菌由来アゾ還元酵素 Azor(Azo- reductase)の結晶構造 有害性合成色 素分解酵素の立体構造解明	伊東孝祐 1)、中西雅之 2)、李愚哲 1)、 佐々木宏 1)、善野修平 3)、西郷薫 3)、 北出幸夫 2)、田之倉優 1)	1)東京大学大学院農学生命科学研究科、 2)岐阜大学工学部、 3)東京大学大学院理学系研究科
P-045			Dicer の RNase ドメインの結晶構造 解析	竹下大二郎 1)、善野修平 2)、李愚哲 1)、 永田宏次 1)、西郷薫 2)、田之倉優 1)	1)東京大学大学院農学生命科学研究科、 2)東京大学大学院理学系研究科
P-045			超好熱古細菌 <i>Pyrococcus abyssi</i> 由来 新規制限酵素 <i>Pab</i> の X線結晶構造解析	宮園健一 1) 6)、渡部美紀 2) 4) 6)、 石川健 4) 5)、永田宏次 1)、澤崎達也 3)、 遠藤弥重太 3)、田之倉優 1)、小林一三 2) 4)	1)東京大学大学院農学生命科学研究科、 2)東京大学大学院新領域創成科学研究科、 3)愛媛大学無細胞センター、4)東京大学医 科学研究所、5)東京大学大学院理学系研究 科、6)Contributed equally
P-046			小麦無細胞発現系を用いた多換体タン パク質の発現・解析技術	澤崎達也、遠藤弥重太	愛媛大学
P-047			タンパク質 NMR 解析のボトルネックを 解決する方法	河野俊之 1)、若松馨 2)	1)三菱化学生命科学研究所、 2)群馬大学工学部
P-048	復元古代 NDK と古細菌由来脂質合成 酵素の立体構造解析	根本直樹 1)、宮園健一 2)、木村光夫 1) 3)、 横堀伸一 1)、田之倉優 2)、山岸明彦 1)	1)東京薬科大学生命科学、 2)東京大学大学院農学生命科学研究科、 3)東京大学大学院理学系研究科		
P-049	大腸菌 DNA の複製開始関連タンパク質 の立体構造と機能	植田正	九州大学大学院薬学研究院		
P-050	尿酸産生酵素と種々の阻害剤との複合 体結晶構造から学ぶこと 構造的創薬の分子基盤	岡本研、松村智裕、西野朋子、西野武士	日本医科大学		
P-051	転写・ 翻訳系		タンパク 3000 プロジェクトのための X線結晶構造解析基盤技術開発とその 利用および成果	渡邊信久、姚閔、坂井直樹、周勇、高永貴、 田中良和、林毅、田中勲	北海道大学先端生命科学研究院
P-052			新規転写関連タンパク質 STPR ドメイ ンのタンデムリピート構造	出村誠 1)、相沢智康 1) 2)、熊木康裕 3)、 齋藤伸 2)	1)北海道大学先端生命科学研究院、2)北海 道大学理学院、3)北海道大学理学研究院
P-053			放線菌を宿主とした組換えタンパク質生 産系の開発	田村具博、中島信孝、三谷恭雄、 Khalid Sallam	産業技術総合研究所ゲノムファクトリー研究 部門
P-054			東京大学(新領域)サブ拠点の研究成果	津本浩平	東京大学大学院新領域創成科学研究科
P-055			翻訳反応駆動部を構成するリボソーム タンパク質複合体	内海利男 1)、長沼孝雄 1)、牧泰史 1)、 姚閔 2)、田中勲 2)	1)新潟大学理学部生物学科、 2)北海道大学大学院先端生命科学研究院
P-056			RNA 修飾関連タンパク質の探索と機能 解析	鈴木勉	東京大学大学院工学系研究科
P-057			リボソーム・RRF 複合体の立体構造解析	吉田卓也	大阪大学大学院薬学研究科
P-058			翻訳反応調節因子の構造生物学	木村誠、高木久徳、中島崇、角田佳充	九州大学大学院農学研究院
P-059			翻訳・複製のエラーを防ぐ hMTH1 の 構造と機能	山縣ゆり子	熊本大学大学院医学薬学研究部
P-060			CCA 付加酵素による特異的 RNA 重合 反応の動的メカニズム	瀧木理	東京工業大学大学院生命理工学研究科

ポスター 番号	プログ ラム名	領域名	演題	発表者	所属
P-061	転写・ 翻訳系		基本転写因子と転写関連因子のNMRによる構造解析	長土居有隆、奥田昌彦、野村充、明石知子、西村善文	横浜市立大学大学院国際総合科学研究科
P-062			テロメア結合タンパク質とテロメアDNA/テロメレスRNAの相互作用及び神経分化を制御するタンパク質と標的RNAの相互作用	大山貴子、松上明正、小野朝美、小野愛美、大柄昌太、河合文隆、永田崇、片平正人	横浜市立大学大学院国際総合科学研究科
P-063			X線による転写因子とヒストン修飾酵素の構造ゲノム科学	佐藤衛、清水敏之、橋本博	横浜市立大学大学院国際総合科学研究科
P-064			病気関連タンパク質の構造解析	朴三用、雲財悟、Jeremy Tame	横浜市立大学大学院国際総合科学研究科
P-065			DNAとPhoB DNA結合ドメインの間の水分子を介した相互作用	山根努、岡村英保、池口満徳、西村善文、木寺詔紀	横浜市立大学大学院国際総合科学研究科
P-066			転写制御因子 核酸複合体の静的・動的分子構造と機能との相関	椎名政昭、浜田恵輔、佐藤光、緒方一博	横浜市立大学大学院医学研究科
P-067			免疫・アレルギーに関与するIL-18経路を仲介するMyD88 TIRドメインと微小管動態を制御する新規ドメインの構造機能解析	柘尾豪人1)、大西秀典2)3)、岩谷奈央子1)3)、廣明秀一3)、白川昌宏1)	1)京都大学大学院工学研究科、 2)岐阜大学医学部、 3)横浜市立大学大学院国際総合科学研究科
P-068			翻訳制御因子の生化学とNMRによる構造解析	嶋田一夫、大澤匡範、堅田利明、紺谷園二、梶保博昭、福山征光	東京大学大学院薬学系研究科
P-069			基本転写因子TFIIEの機能解析	田中亜紀、中坪拓也、大熊芳明	富山大学大学院医学薬学研究部
P-070			ダイオキシン類分解に関与する酵素群のX線結晶構造解析	小田切正人1)2)、飯田敏也2)、工藤俊章1)2)	1)横浜市立大学大学院国際総合科学研究科、 2)理化学研究所
P-071	個別的 解析 プログラム	翻訳後 修飾 と 輸送	「翻訳後修飾と輸送」研究班の組織と成果	若槻壮市	高エネルギー加速器研究機構物質構造科学研究所放射光科学研究施設
P-072			高エネルギー加速器研究機構(KEK)放射光科学研究施設(PF)におけるハイスルーブットX線結晶構造解析の取り組み	五十嵐教之、松垣直宏、山田悠介、若槻壮市	高エネルギー加速器研究機構物質構造科学研究所放射光科学研究施設
P-073			ロボティクスを用いた構造解析の自動化と高速化	平木雅彦、五十嵐教之、松垣直宏、山田悠介、加藤龍一、若槻壮市	高エネルギー加速器研究機構物質構造科学研究所放射光科学研究施設
P-074			細胞内のタンパク質輸送に関わるタンパク質GGAとその複合体	中山和久1)、申恵媛1)、片岡幹雄2)、上久保裕生2)、志波智生*3)、川崎政人3)、山田悠介3)、井上道雄3)、加藤龍一3)、若槻壮市3)	1)京都大学大学院薬学系研究科、2)奈良先端科学技術大学院大学物質創生研究科、3)高エネルギー加速器研究機構物質構造科学研究所放射光科学研究施設(*現所属:東京大学大学院総合文化研究科)
P-075			タンパク質の選別輸送機構の分子・細胞・個体レベルでの解析	中山和久1)、申恵媛1)、村田昌之2)、加納ふみ2)、大野博司3)	1)京都大学大学院薬学系研究科、2)東京大学大学院総合文化研究科、3)理化学研究所免疫アレルギー科学総合研究センター
P-076			開口放出とベルオキシソーム膜輸送の構造的基盤	加藤博章1)、中津亨1)、中野博明1)、柴田洋之*1)、田中信忠2)、深井周也3)	1)京都大学大学院薬学系研究科(*現所属:国立循環器病センター心臓生理部)、2)昭和大学薬学部、3)東京工業大学バイオ研究基盤支援総合センター
P-077			記憶やウイルス感染を司る糖鎖を合成・分解するタンパク質群	岡昌吾1)、角田品子1)、川崎敏祐2)、山本憲一3)、土屋敦子3)、片山高嶺4)、志波智生*5)、長江雅倫5)、Leo Chavas5)、加藤龍一5)、若槻壮市5)	1)京都大学医学部、2)立命館大学糖鎖センター、3)京都大学大学院生命科学研究科、4)石川県立大学工学部、5)高エネルギー加速器研究機構物質構造科学研究所放射光科学研究施設(*現所属:東京大学大学院総合文化研究科)
P-078			タンパク質による糖鎖認識の体系的解析と構造基盤の解明	加藤晃一1)2)、山口芳樹1)、神谷由紀子1)、矢木宏和1)、笹川拓明2)、高橋禮子1)、野中孝昌3)、毛塚雄一郎3)、井手尾浩子4)、山下克子4)、渡邊剛志5)、加藤龍一6)、若槻壮市6)	1)名古屋大学大学院薬学系研究科、2)分子科学研究所、3)長岡技術科学大学生物系、4)東京工業大学イノベーション研究推進体、5)新潟大学農学部、6)高エネルギー加速器研究機構物質構造科学研究所放射光科学研究施設
P-079			翻訳後修飾と輸送 N及びO型糖鎖のコア構造の生合成に関わる糖転移酵素の解析	井原秀之1)2)、池田義孝2)、藤間祥子3)、三善英知4)、松本明郎1)、中川敦史5)、谷口直之1)、久保田智巳6)、杉岡しげみ6)、古川早苗6)、成松久6)、渡辺明子6)、千葉靖典6)、地神芳文6)、志波智生*7)、加藤龍一7)、若槻壮市7)	1)大阪大学微生物病研究所、2)佐賀大学医学部、3)東京大学薬学部、4)大阪大学医学部、5)大阪大学蛋白研、6)産総研糖鎖医学研究センター、7)高エネルギー加速器研究機構物質構造科学研究所放射光科学研究施設(*現所属:東京大学大学院総合文化研究科)
P-080			医薬応用を目指した構造解析と構造機能解析支援のためのバイオインフォマティクス	田中信忠1)、日下部吉男1)、阪本泰光1)、由良敬2)	1)昭和大学薬学部、2)日本原子力研究開発機構システム計算科学センター
P-081	タン パク 質 と 機 能 高 次 構 造 形 成		タンパク質高次構造形成と機能発現	三木邦夫	京都大学大学院理学研究科
P-082			鉄硫黄クラスター合成に関与するISCおよびSUFタンパク質の構造と機能の解析	和田啓、鷺見法香、下村喜充、高橋康弘、福山恵一	大阪大学大学院理学研究科
P-083			グライコ蛋白質11S形成機構の解明と種子グロブリンの構造解析	三上文三、伊藤貴文、福田貴子、Krisna Prak、丸山伸之、内海成	京都大学農学研究科応用生命科学専攻 農学専攻
P-084			MAP-LC3およびDSPの立体構造と機能	河野隆英、水口峰之、河野敬一	富山大学大学院医学薬学研究部、 北海道大学大学院理学研究科

ポスター 番号	プログ ラム名	領域名	演題	発表者	所属
P-085	タンパク質高次構造形成と機能発現		超好熱始原菌由来 Ni-Fe hydrogenase 成熟化因子の構造・機能解析	今中忠行、跡見晴幸、松見理恵、渡部聡、新井崇之、三木邦夫	京都大学大学院工学研究科、 京都大学大学院理学研究科
P-086			超好熱性古細菌由来プレフォルディンと型シャペロニンの構造、機能、及び協調作用機構	養王田正文、大海証、神前太郎、村瀬陽介、尾高雅文、座古保、飯塚怜、木田宗志、庄村康人、三木邦夫	東京農工大学大学院工学府、理化学研究所、 東京大学大学院薬学研究所、京都大学大学院理学研究科
P-087			ATP 依存性プロテアーゼ FtsH の結晶構造と機能	寿野良二、土屋大輔、丹羽一、森川耿右、吉田賢右	東京工業大学資源化学研究所、大阪大学蛋白質研究所、慶應義塾大学、インベリアルカレッジ・イギリス
P-088			DsbB-DsbA 複合体の結晶構造とジスルフィド結合形成機構の構造基盤	稲葉謙次、村上聡、鈴木守、中川敦史、山下栄樹、岡田健吾、伊藤維昭	京都大学ウイルス研究所、九州大学生体防御医学研究所、大阪大学産業科学研究所、 大阪大学蛋白質研究所、奈良先端科学技術大学院大学
P-089			抗体を用いた分泌タンパク質の機能および構造解析	玉田太郎、本庄栄二郎、新井栄揮、正山祥生、黒木良太	日本原子力研究開発機構量子ビーム応用研究部門
P-090			ミトコンドリアのキノール酸化酵素の構造と機能	原田繁春、清水洋成、城戸康年、ダニエル・健・福岡、坂元君年、北潔	京都工芸繊維大学工芸科学研究所、 東京大学大学院医学系研究科
P-091			新規同位体標識技術を用いる蛋白質構造決定	甲斐荘正恒	SAIL テクノロジーズ株式会社
P-092			ERM タンパク質とアダプタータンパク質 NHERF との複合体の構造	寺脇慎一、前崎綾子、箱嶋敏雄	奈良先端科学技術大学院大学
P-093			ERM タンパク質と接着分子 CD43 との複合体の構造	高井友美子、北野健、前崎綾子、寺脇慎一、箱嶋敏雄	奈良先端科学技術大学院大学
P-094			PriA タンパク質による DNA3' 末端の塩基非選択的認識機構の解明	神田大輔	九州大学
P-095	免疫系細胞表面受容体群のリガンド認識機構の構造基盤	前仲勝実	九州大学		
P-096	好中球活性化酸素発生系(phox系)細胞質因子、p40phoxの構造とその制御機構	本坊和也、水上令子、湯澤聡、武谷立、鈴木展生、藤岡優子、鎌倉幸子、住本英樹、稲垣冬彦	北海道大学大学院薬学研究院		
P-097	溶液 NMR 分光法における自動測定・解析システム「Olivia」の開発	横地政志、小橋川敬博、関口真二、稲垣冬彦	北海道大学大学院薬学研究院		
P-098	好中球活性化酸素発生系を制御するタンパク質 p47phox の新規認識機構	小椋賢治、湯沢聡、住本英樹、稲垣冬彦	北海道大学大学院薬学研究院		
P-099	オートファジー関連タンパク質の網羅的構造機能解析	鈴木展生、松下美奈子、菅原健二、山田勇也、足立わか、佐藤健次、藤岡優子、水島昇、大隅良典、稲垣冬彦	北海道大学大学院薬学研究院		
P-100	効率的なタンパク質リン酸化修飾手法の開発	小橋川敬博、内藤雅人、稲垣冬彦	北海道大学大学院薬学研究院		
P-101	プロジェクトの概要と主な成果	個別的解析プログラム「脳・神経系」	大阪大学蛋白質研究所		
P-102	主な技術開発の成果	個別的解析プログラム「脳・神経系」	大阪大学蛋白質研究所		
P-103	抗うつ治療薬の開発を目指した膜結合型モノアミン酸化酵素 A の立体構造解析	月原富武、中川敦史	大阪大学蛋白質研究所		
P-104	脳の層構造形成を司る細胞外因子リリーリンの立体構造	禾見和、安井典久、北尾公英、岩崎憲治、高木淳一	大阪大学蛋白質研究所		
P-105	ナルコレプシー原因の脳内ホルモンペプチドオレキシン A の NMR による解析	池上貴久 1)、高井朋代 1)、高谷隆男 2)、中野睦子 2)、松田奈緒子 2)、神田仁美 1)、阿久津秀雄 1)、中川敦史 1)、相本三郎 1)、永井克也 1)	1)大阪大学蛋白質研究所、 2)大阪産業振興機構 TLO		
P-106	カルノシン分解酵素 CN2 の立体構造と、L-カルノシンの中枢ヒスタミン神経系を介した代謝調節	楠木正巳、奥村宣明、海野英昭、山下哲生、宇治田小百合、大谷寛人、奥村明子、永井克也	大阪大学蛋白質研究所		
P-107	ヒト由来造血器型プロスタグランジン D 合成酵素の解析および阻害剤の開発	井上豪 1) 2)、松村浩由 1)、甲斐泰 1)、門祐示 1)、福西快文 3)、中村春木 4) 2)、木下誉富 5)、仲西功 6)、奥野恭史 6)、南方聖司 7)、宮野雅司 8)、有村浩介 9)、裏出良博 9)、坂田恒昭 2) 10)	1)大阪大学大学院工・構造物理化学、 2)NPO 法人バイオグリッド関西、3)産総研・生物情報解析センター、4)大阪大学・蛋白質研、5)大阪府立大・院理、6)京都大学・院薬、7)大阪大学大学院工・精密合成化学、8)理化学研究所・播磨研究所、9)大阪バイオサイエンス研究所、10)大阪大学・サイバーメディア		
P-108	好熱性藍色細菌の時計タンパク質の構造解析	石浦正寛 1)、今田勝巳 2)	1)名古屋大学遺伝子実験施設、 2)大阪大学生命機能研究科		
P-109	薬剤排出トランスポーターの結晶構造解析およびメカニズム解明	村上聡	大阪大学産業科学研究所		
P-110	べん毛関連蛋白質の構造解析	今田勝巳 1)、本間道夫 2)、川岸郁朗 2)	1)大阪大学生命機能研究科、 2)名古屋大学理学部		

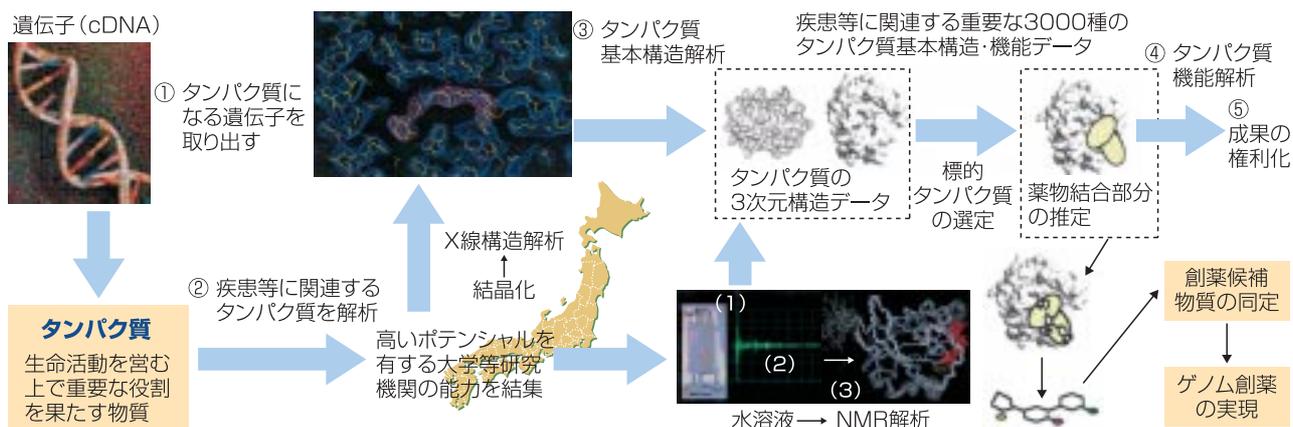
ポスター 番号	プログ ラム名	領域名	演題	発表者	所属
P-111	個別的 解析 プログラ ム	代謝系	代謝系グループの全体概要	倉光成紀1)、増井良治1)、川端猛2)	1)大阪大学大学院理学研究科、 2)奈良先端科学技術大学院大学情報科学
P-112			タンパク質解析のための方法論の開発	倉光成紀1)、小林達彦2)、安宅光雄3)、 杉尾成俊4)、山根隆5)、日比隆雄6)	1)大阪大学大学院理学研究科、2)筑波大学 大学院生命環境科学、3)産業技術総合研究 所、4)ソライオン株式会社、5)名古屋大学 大学院生物機能工、6)福井県立大学生物資源
P-113			医学・薬学関連のタンパク質(1)	小熊惠二	岡山大学大学院医歯薬学総合研究科
P-114			医学・薬学関連のタンパク質(2)	杉山政則	広島大学大学院医歯薬学総合研究科
P-115			医学・薬学関連のタンパク質(3)	芳本忠1)、稲垣賢二2)	1)長崎大学大学院医歯薬学総合研究科、 2)岡山大学大学院自然科学研究科
P-116			医学・薬学関連のタンパク質(4)	藤田直也1)、福井清2)	1)癌研究会・癌化学療法センター、 2)徳島大学分子酵素学研究センター
P-117			食品・環境関連のタンパク質(1)	江崎信芳1)、宮原郁子2)	1)京都大学化学研究所、 2)大阪市立大学大学院理学研究科
P-118			食品・環境関連のタンパク質(2)	大島敏久1)、津下英明2)	1)九州大学大学院農学研究院、 2)徳島文理大学健康科学研究所
P-119			基本的な生命関連のタンパク質(1)	神山勉1)、竹中章郎2)、若木高善3)、 神鳥成弘4)	1)名古屋大学大学院理学研究科、 2)東京工業大学大学院生命理工、 3)東京大学大学院農学生命研究科、 4)香川大学総合情報基盤センター医学部
P-120			基本的な生命関連のタンパク質(2)	中山亨1)、三瓶巖一2)、八年年晴3)、 近藤寛樹4)	1)東北大学大学院工学研究科、2)電気通信 大学電気通信、3)高知大学農学部、4)九州 工業大学情報工学

タンパク3000プロジェクト

<http://www.mext-life.jp/protein/>

● プロジェクトの概要と目的

わが国発のゲノム創薬の実現等を目指し、世界最先端設備（NMR、大型放射光施設等）を駆使し、産官学の研究能力を結集して平成18年度までに生命を司るのに重要なタンパク質のうち1/3に相当する約3000種類以上のタンパク質の基本構造およびその機能の解析を行う。それに基づく薬剤設計や解析結果の特許化等を図ることにより、わが国発のバイオテクノロジーを駆使するゲノム創薬の実現に貢献し、ひいては医薬品生産額の増加や国際協力の強化等によりわが国の経済発展に資する。



● プロジェクトの必要性と背景

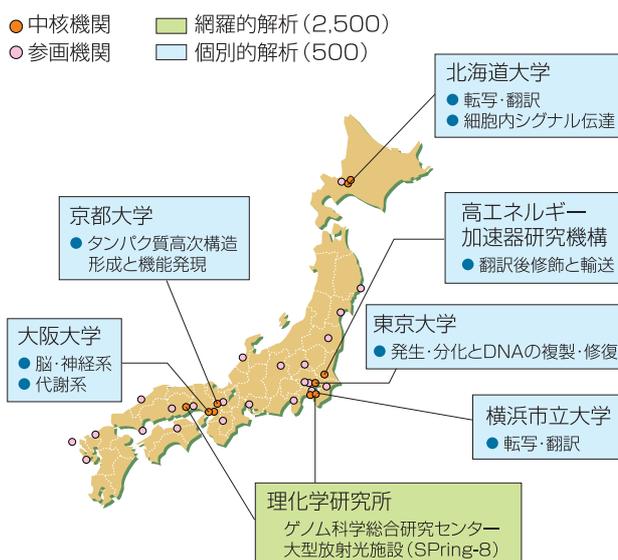
タンパク質の構造・機能解析は熾烈な国際競争が起こっている分野であり、知的財産に結びつく可能性が高いことから、わが国としても早急に取り組み、進めなければ社会的・経済的にも大きな不利益を生ずることになる。このため、わが国のもてるポテンシャルを最大限に活用するとともに、産官学のセクターを超えた能力を結集し、明確な国家目標の下で効果的・効率的に事業を推進することがきわめて重要である。

● 実施体制

- 中核機関
- 理化学研究所……………網羅的解析
 - 北海道大学……………転写・翻訳、細胞内シグナル伝達
 - 高エネルギー加速器研究機構……………翻訳後修飾と輸送
 - 東京大学……………発生と分化とDNAの複製・修復
 - 横浜市立大学……………転写・翻訳
 - 京都大学……………タンパク質高次構造形成と機能発現
 - 大阪大学……………脳・神経系、代謝系

推進体制

関係機関や産業界から専門家・有識者からなる「タンパク3000プロジェクト推進委員会」を設置し、評価委員会からの勧告に基づきプロジェクトの進捗状況、連帯推進および改善方策の提示等を行っている。また、知財・産業連携等、プロジェクト全体に共通する課題等はワーキンググループを設置して横断的に対応している。



PDB (Protein DataBank)

世界中で解析されたタンパク質の立体構造は、国際的なデータベースのPDB (Protein DataBank) に登録され、誰でも無料で利用できる。日本では、日本蛋白質構造データバンク (PDBj: <http://www.pdbj.org>) が、登録とデータのダウンロード、その他の解析サービスを行っている。

X線結晶構造解析



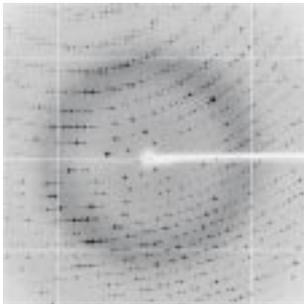
① タンパク質結晶



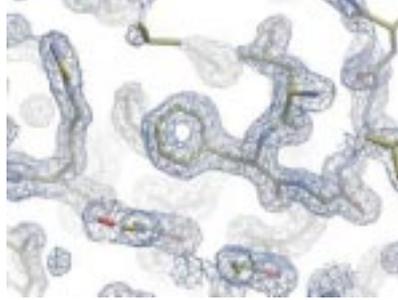
X線結晶構造解析では、

- ① まず遺伝子操作や生化学的な手法を駆使して目的とするタンパク質を大量に調整して結晶化する。この結晶化が構造解析の律速段階となることが多い。
- ② 作成した結晶にX線を照射して回折パターンを得る。このとき、大強度のX線を用いると小さな結晶でも鮮明な回折パターンが得られる。
- ③ 得られた回折パターンと結晶内のラベル原子からの位相情報をもとにタンパク質の電子密度図を得る。
- ④ その電子密度図に化学構造モデルをあてはめ、タンパク質全体の構造モデルを構築する。

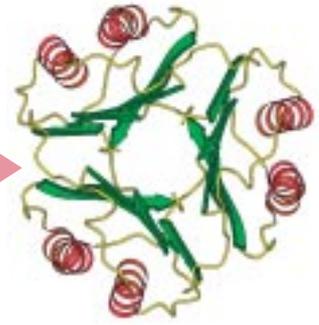
【特徴】 X線結晶構造解析には結晶が必須だが、タンパク質の大きさに制限がなく、構造を原子レベルで直接みられる。



② X線回折パターン



③ 電子密度図



④ 構造モデル

X線結晶構造解析の大規模施設

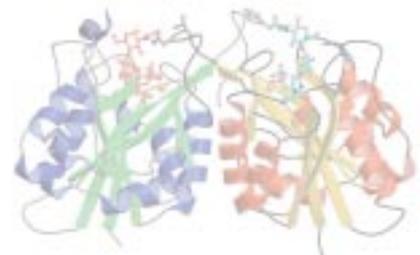


大型放射光施設
(SPring-8)

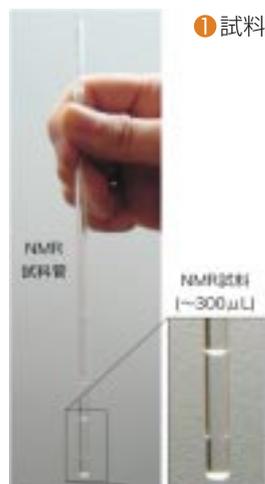


実験ステーション

高エネルギー加速器
研究機構 (KEK)
PhotonFactory
(PF)



NMR (核磁気共鳴) 解析

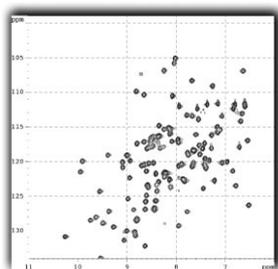


① 試料の調製

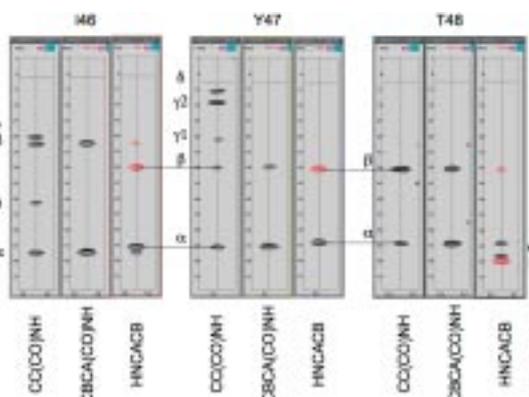
NMR (核磁気共鳴) 解析では、

- ① 安定同位体 (^{13}C , ^{15}N) で標識したタンパク質試料を調製する。
- ② いろいろな原子核に対応する電磁波を与え、その応答を計測する。
- ③ その計測結果を統合して、各種の多次元NMRスペクトルを得る。
- ④ このNMRスペクトルを解析して、個々のシグナルが20種類のアミノ酸のどの原子に対応するかを決定する。
- ⑤ タンパク質中の水素原子間の距離と角度についての情報等をもとに、立体構造を決定する。

【特徴】 NMRスペクトルでは水溶液の試料も対象にできるため、結晶化が困難なタンパク質の解析が可能である。



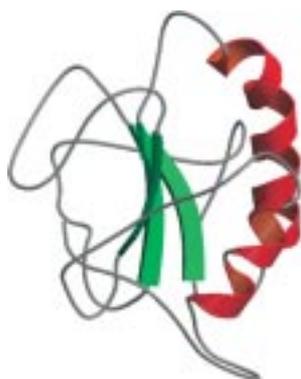
② NMR測定



③ NMRスペクトル解析



④ 距離情報の取得



⑤ 立体構造決定

NMRの大規模施設



理化学研究所
ゲノム科学総合研究センター



NMR分光計

タンパク3000総合シンポジウム

タンパク3000の成果と 今後のタンパク研究展望

【お問い合わせ先】株式会社クバプロ

〒102-0072 千代田区飯田橋3-11-15 UEDAビル 6階 TEL: 03-3238-1689 FAX: 03-3238-1837 E-mail: symposium@kuba.jp