

## 目次

<b>プログラム</b>	<b>2</b>
<hr/>	
<b>遺伝情報デコードシステム解明へ向けたプロテオミクス解析</b> 招待講演者：五十嵐 和彦(東北大学)	<b>3</b>
<hr/>	
<b>タンパク 3000 プロジェクト個別的解析プログラム</b> 「翻訳後修飾と輸送」の成果 中核機関代表者：若槻 壮市(高エネルギー加速器研究機構)	<b>9</b>
<hr/>	
<b>タンパク質フォールドの積木細工と医薬品への展開</b> 東北大学よりの講演：熊谷 泉(東北大学)	<b>17</b>
<hr/>	
<b>蛋白質立体構造からの創薬を目指して</b> 発現から薬物設計まで 企業講演者：杉尾 成俊(ソイジーン株式会社)	<b>23</b>
<hr/>	
<b>タンパク質立体構造情報にもとづく機能推定</b> RNA 結合タンパク質推定を中心に 各機関分担者：由良 敬(日本原子力研究開発機構)	<b>29</b>
<hr/>	
<b>タンパク質立体構造情報の産業的インパクト</b> 企業講演者：鈴木 榮一郎(味の素株式会社)	<b>37</b>
<hr/>	
<b>細菌膜孔形成毒素の3D 構造解析から解明された膜孔形成機構</b> 東北大学よりの講演：神尾 好是(東北大学名誉教授)	<b>45</b>
<hr/>	
<b>日本における Chemical Biology 研究</b> 招待講演者：長野 哲雄(東京大学)	<b>53</b>
<hr/>	
<b>展示企業一覧 / ポスター一覧</b>	<b>59</b>
<hr/>	

文部科学省タンパク 3000 プロジェクト  
「第5回産学連携フォーラム in 仙台」  
プログラム

主 催：文部科学省 / タンパク 3000 プロジェクト産学連携フォーラム実行委員会  
共 催：蛋白質構造解析コンソーシアム  
後 援：日本製薬工業協会 / 東北大学  
会 場：仙台国際センター2階 展示ホール「桜」 仙台市青葉区青葉山  
日 時：2006年6月30日(金) フォーラム 10:30 ~ 17:00 交流会 17:15 ~ 19:00  
参加費：無料

---

10:30~10:35	主催者挨拶	文部科学省
10:35~10:45	来賓挨拶	東北大学総長 吉本 高志
10:45~10:55	タンパク 3000 プロジェクト概要	実行委員長 田之倉 優(東京大学)
10:55~11:25	遺伝情報デコードシステム解明へ向けたプロテオミクス解析	招待講演者：五十嵐 和彦(東北大学)
11:25~11:45	タンパク 3000 プロジェクト個別的解析プログラム「翻訳後修飾と輸送」の成果	中核機関代表者：若槻 壮市(高エネルギー加速器研究機構)

---

11:45~13:00	休憩	
-------------	----	--

---

13:00~13:20	タンパク質フォールドの積木細工と医薬品への展開	東北大学よりの講演：熊谷 泉(東北大学)
13:20~13:50	蛋白質立体構造からの創薬を目指して 発現から薬物設計まで	企業講演者：杉尾 成俊(ソイジーン株式会社)
13:50~14:10	タンパク質立体構造情報にもとづく機能推定 RNA 結合タンパク質推定を中心に	各機関分担者：由良 敬(日本原子力研究開発機構)
14:10~14:40	タンパク質立体構造情報の産業的インパクト	企業講演者：鈴木 榮一郎(味の素株式会社)
14:40~15:00	細菌膜孔形成毒素の3D 構造解析から解明された膜孔形成機構	東北大学よりの講演：神尾 好是(東北大学名誉教授)

---

15:00~16:25	ポスターセッション	
-------------	-----------	--

---

16:25~16:55	日本における Chemical Biology 研究	招待講演者：長野 哲雄(東京大学)
16:55~17:00	閉会の挨拶	実行副委員長 西島 和三(持田製薬株式会社)
17:15~	交流会	

---

## 招待講演

# 遺伝情報デコードシステム解明 へ向けたプロテオミクス解析

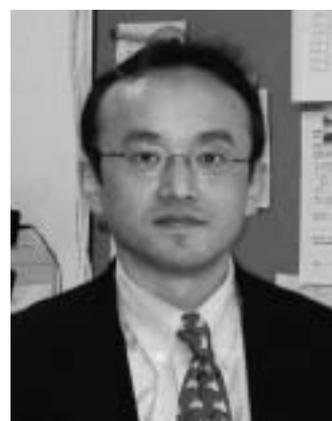
### 五十嵐 和彦(いがらし・かずひこ)

東北大学大学院医学系研究科生物化学分野教授。医学博士。

1987年 3月 東北大学医学部卒業  
1991年 3月 東北大学大学院医学研究科修了(第一医化学)  
1991年 4月 シカゴ大学博士研究員  
1993年 3月 東北大学医学部助手(第二医化学)  
1995年 10月 筑波大学先端学際領域研究センター 講師  
1998年 4月 東北大学医学部助教授(医化学分野)  
1999年 9月 広島大学医学部教授(生化学第二講座)  
2005年 4月より現職

1998年 日本生化学会奨励賞

2006年 日本学術振興会賞



# 遺伝情報デコードシステム解明へ向けたプロテオミクス解析

五十嵐 和彦(東北大学大学院医学系研究科)

## 遺伝情報デコードシステム

人を含む全ての生命体は、そのゲノムに書き込まれた遺伝情報をベースとした生涯をおくる。ヒトゲノムプロジェクトにより、私たちの持つゲノムDNAはほぼ解読され、約2万5000個の遺伝子を有すると推定されている。しかし、この遺伝情報がどのようにして個体を作り出し、一生を全うする上でどのように働くのか、未知の部分が多く残っている。ゲノムが生命を支える基本メカニズムの一つは、プログラム通りにゲノムの情報を正確に読み出すこと、そして同時に、様々な生活環境に応じて読み出す情報の量・質を柔軟に調節することにあると考えられる。例えば、普段私たちが口にする食事によっても遺伝子の発現は刻々と変化し、精神的ストレスが遺伝子発現に影響を与える可能性も浮上している。このような臨機応変に遺伝情報を読み出すシステム(デコードシステム)の全体像を理解することを目指し、文部科学省特定領域研究「遺伝情報デコード」が開始された。その第一の目標は、遺伝子発現のスイッチ 蛋白質(転写因子)やクロマチン(DNAが格納用蛋白質により折りたたまれたもの)の構造を調節する因子などが互いに結合して形成する複合体を同定し、その機能を探ることにある。第二の目標は、細胞内シグナル伝達系、遺伝子スイッチ、そして、スイッチによって作動する標的遺伝子セットが作り出す蛋白質・遺伝子ネットワークを、細胞分化やホルモン作用などの生命現象に注目して解明することにある。現在49研究チームが遂行している一連の研究により、全ての細胞に存在する均一なゲノムから必要な遺伝情報が解凍され、多様な生命現象が紡ぎ出される仕組みの一端が解明されるものと期待される。

## 研究例 転写因子 Bach1-p53 複合体による癌抑制システムの制御

Bach1はグロビン遺伝子やヘムオキシゲナーゼ1遺伝子などの発現を抑える転写抑制因子である。ヘムオキシゲナーゼ1は抗酸化ストレス防御の重要な酵素であり、Bach1ノックアウトマウスでは同酵素が非ストレス時にも高発現することから、Bach1は酸化ストレス応答のブレーキと言える。また、Bach1ノックアウトマウスでは動脈硬化や心筋梗塞など、酸化ストレスが関与する病態が軽減することから、Bach1はヒトでもこれら病態を左右する可能性がある。

Bach1は単独ではDNAに結合できず、Maf癌因子ファミリーとヘテロ二量体を形成することにより、DNA結合能を獲得する。Bach1の作用機構を解明するために、Bach1複合体の精製を試みた。エピトープ付加Bach1を発現するマウス赤白血病細胞(MEL)株を樹立し、8Lから

16Lの大量培養を行い、核抽出液を得た。その後、エピトープに対する抗体ビーズを用いてアフィニティー精製を行い、さらにグリセロール密度勾配遠心にて複数のBach1複合体を分離した。その構成要素を質量分析計などで解析したところ、予想通りMafファミリーのMafKやMafGが含まれるとともに、ヒストン修飾酵素やコリプレッサーなども見い出された。現在、これら構成要素の機能解析を試みている。さらに、予想外なことにp53癌抑制因子も含まれていた。p53はDNA損傷などにより誘導され、細胞周期の停止、細胞の老化、そしてアポトーシスを引き起こすことにより癌化を防ぐ。Bach1複合体にp53が含まれる事実は、Bach1がp53癌抑制システムにおいても何らかの作用を有することが示唆される。この可能性を、Bach1ノックアウト細胞などを用いて解析を進めているので、その知見などを紹介し、酸化ストレス応答システムと癌抑制システムの連携について、蛋白質複合体の視点から討論したい。

no.01



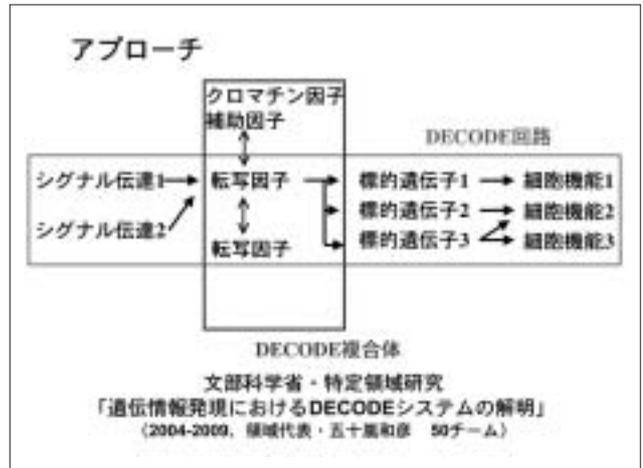
文部科学省タンパク3000プロジェクト  
第5回産学連携フォーラム in仙台



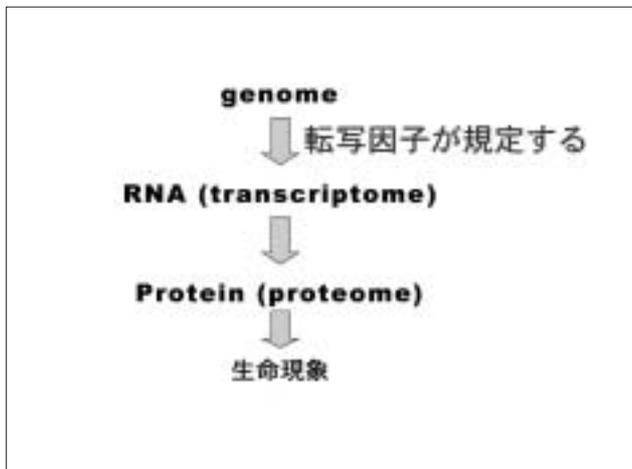
## 遺伝情報デコードシステム解明 へ向けたプロテオミクス解析

東北大学大学院医学系研究科  
生物化学分野  
五十嵐和彦

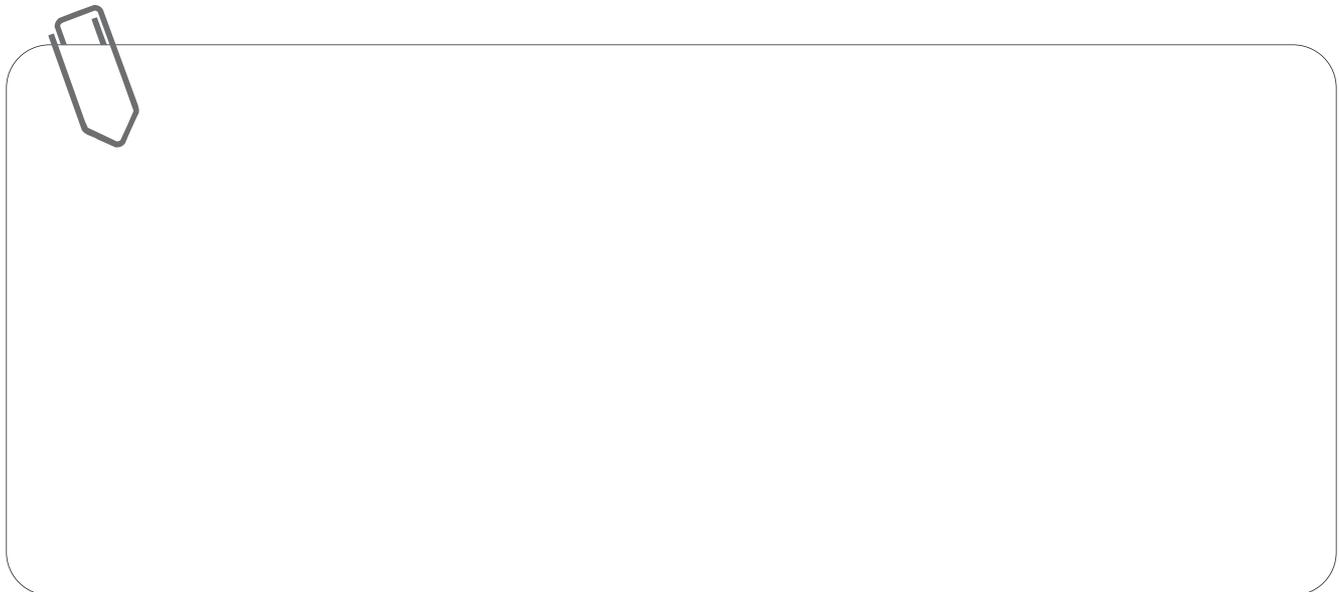
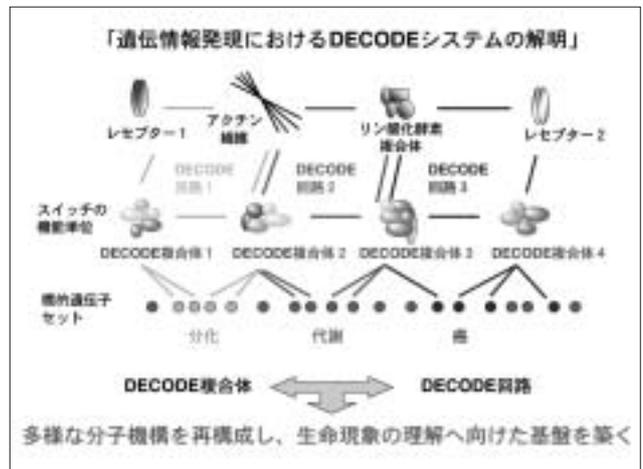
no.03



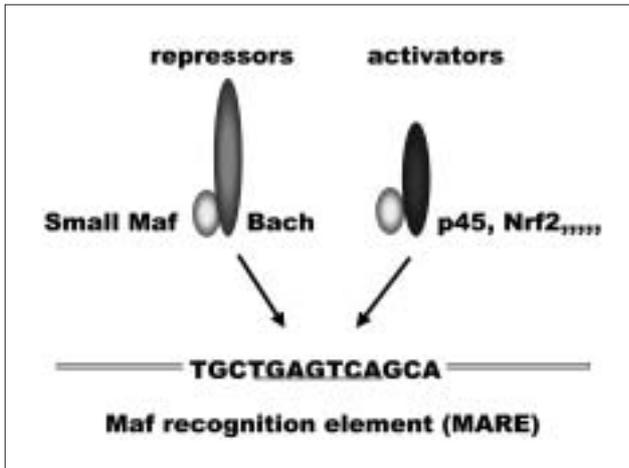
no.02



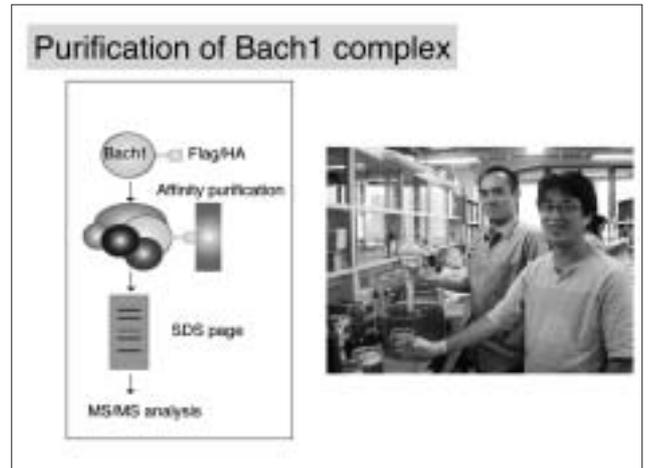
no.04



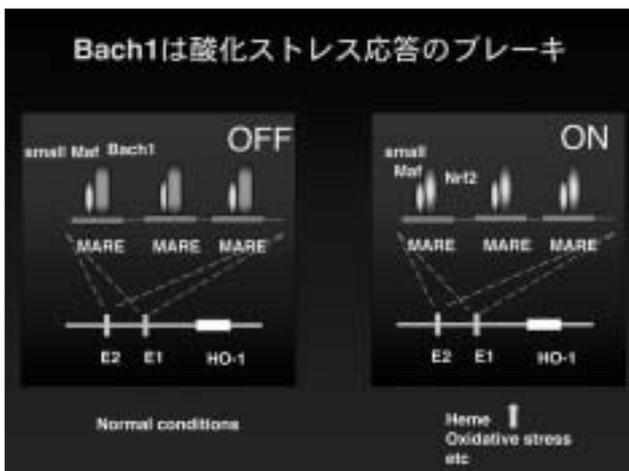
no.05



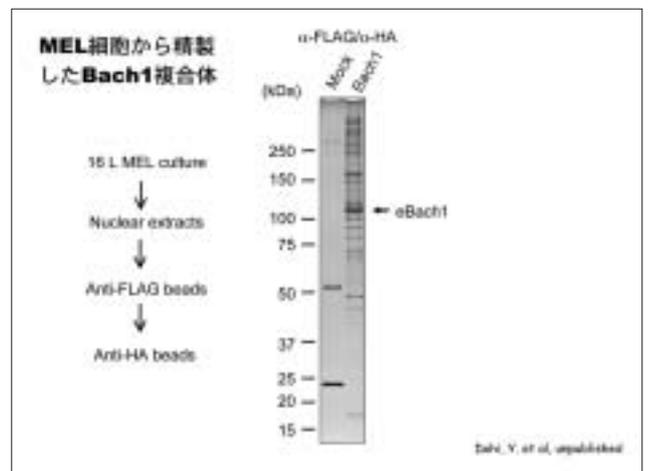
no.07



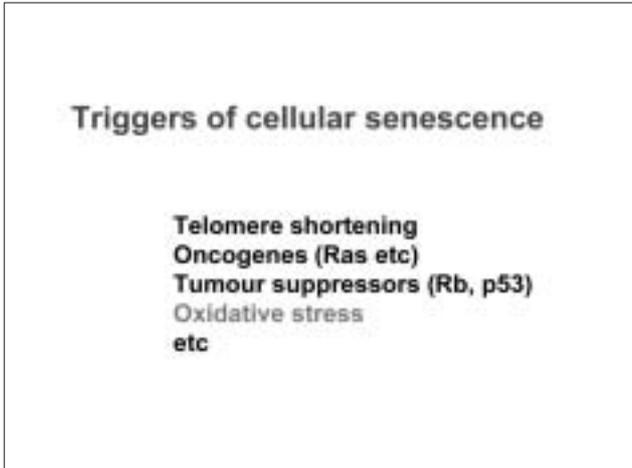
no.06



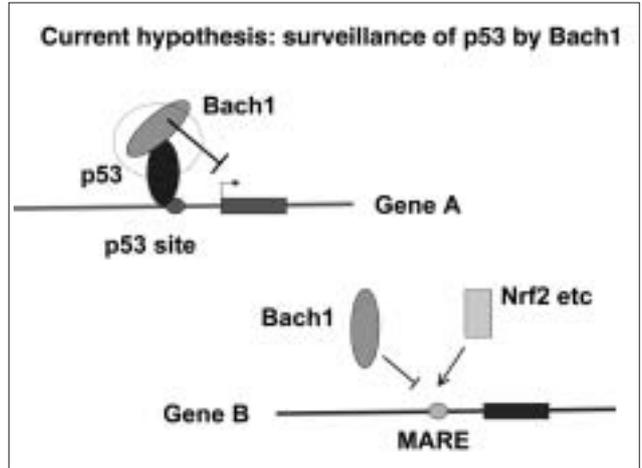
no.08



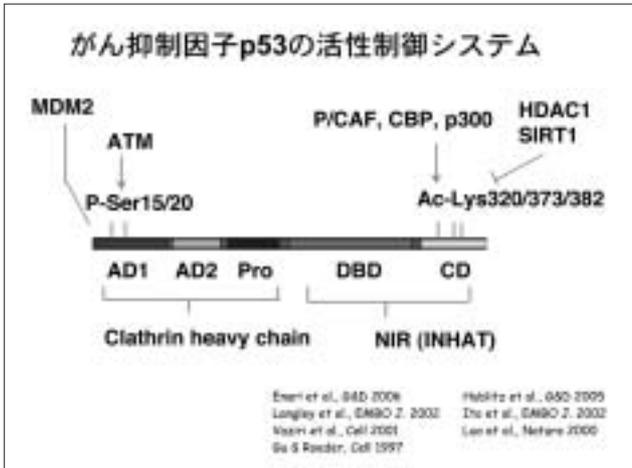
no.09



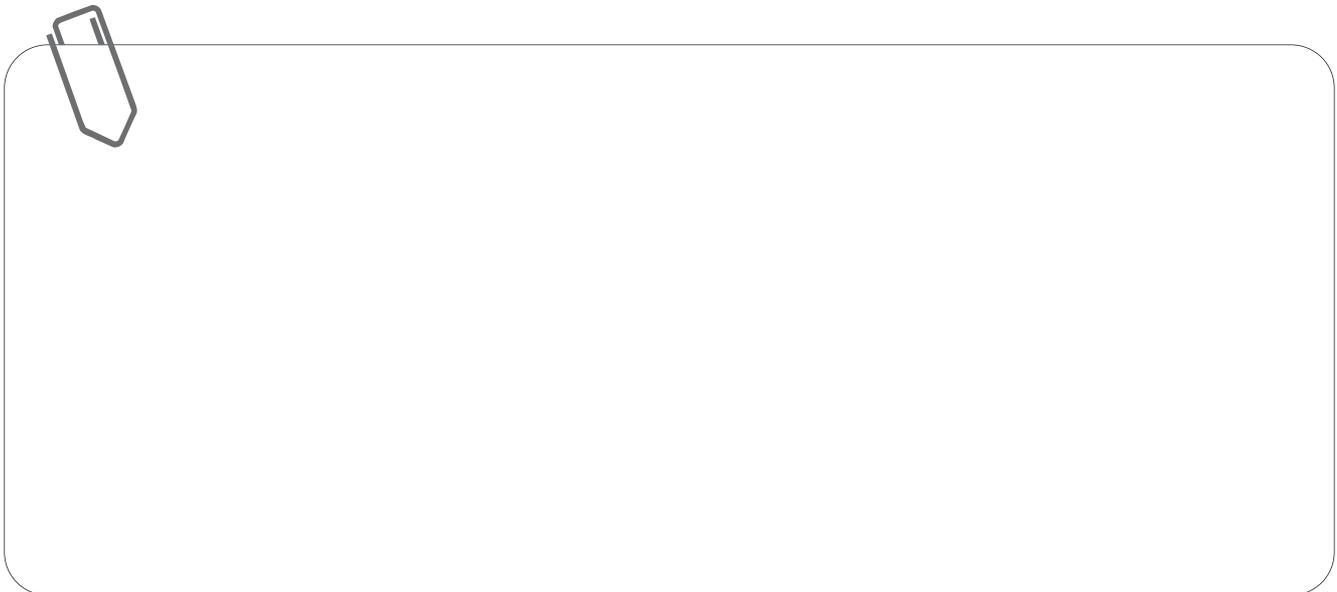
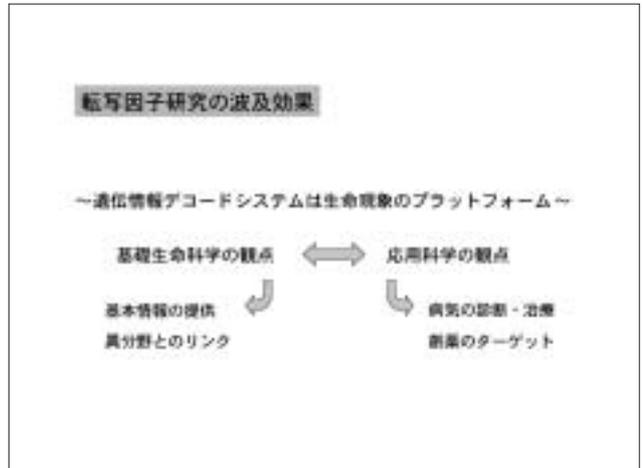
no.11



no.10



no.12



## 中核機関代表者講演

# タンパク 3000 プロジェクト 個別的解析プログラム 「翻訳後修飾と輸送」の成果

### 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教授。放射光科学研究施設長。  
構造生物学研究センター長。東京大学新領域メディカルゲノム専攻客員教授。  
東京大学放射光科学研究連携機構生命科学部門長兼任。



- 1982年 東京大学工学部化学工学科卒業
- 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修了
- 1990年 スタンフォード大学化学科博士課程修了( Ph.D in Chemistry )
- 1990年 オックスフォード大学ポスドクフェロー
- 1994年 European Synchrotron Radiation Facility ビームラインサイエンティスト、  
同年ビームライン責任者
- 1999年 ESRF Macromolecular Crystallography Group グループリーダー
- 2000年 高エネルギー加速器研究機構物質構造科学研究所構造生物学グループリーダー
- 2003年 構造生物学研究センターを立ち上げセンター長
- 2006年 放射光科学研究施設長、東京大学新領域メディカルゲノム専攻客員教授、  
東京大学放射光科学研究連携機構生命科学部門長兼任

- 2000年～2001年 理研播磨 Spring-8 客員研究主幹
- 2002年～文部科学省タンパク 3000 プロジェクト拠点代表者

主な著書は、“ Impact of insertion devices on macromolecular crystallography ”、UNDULATORS, WIGGLERS AND APPLICATION( 分担執筆 )、「国際マヴェリックへの道」( 分担執筆 )

# タンパク 3000 プロジェクト個別的解析プログラム 「翻訳後修飾と輸送」の成果

若槻 壮市(高エネルギー加速器研究機構)

本チームはタンパク質の細胞内小胞輸送、脂質選択的輸送、糖鎖修飾に主眼をおいた翻訳後修飾をターゲットとして、タンパク-タンパク、タンパク-糖鎖、タンパク-脂質の相互作用の解析を進めている。これらの分子間相互作用の研究において、細胞分子生物学的機能解析と放射光X線結晶・NMR構造解析を両輪としながら、X線小角散乱、表面プラズモン共鳴、質量分析等も積極的に取り入れている。中核機関である高エネ機構・構造生物学研究センターでは、その中でも特に放射光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、大学共同利用、産学利用等の施設運用を行うとともに、構造解析ビームラインを用いた構造生物学研究、産官学連携研究を行っている。本講演では、まずタンパク質複合体の放射光X線結晶構造解析で必要となる様々な技術について現状と次世代放射光源を含めた将来展望について述べる。また、大型放射光の産業利用を促進するため、現在進めている製薬関連企業との共同研究や構造生物ビームラインの利用をこれまで以上に進め、東日本における製薬、食品、化学関連企業の産学利用・産官連携の中核となることを目指している。

次に、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 $\mu\text{M}$ )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ことが多く、複合体タンパク質の(共)発現、精製が困難であるだけでなく、構造解析に耐えうる結晶を得ることが困難な場合が多い。GGA[1-8]、Tom1[9]、Hrs[10]、ユビキチン[8-10]、Emp46p, Emp47p[11]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、糖転移酵素[12-14]、ヒト由来シアリダーゼ[15]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、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。特に、これらの過程で重要となる、相互作用としては弱い、選択性のあるタンパク-タンパク相互作用に焦点を当て、複合体や糖タンパク質糖鎖の構造解析にX線だけでなく、NMR、質量分析、いろいろな生化学実験を組み合わせた解析を行った例を紹介する。今後の方向性としては、先天性筋ジストロフィー、心臓病、がん、糖尿病などの重篤な病気に関連したタンパク質や、そこで重要となる脂質、糖鎖などの翻訳後修飾やタンパク質輸送の作用機序の解明を目指すとともに、解析の困難なターゲットに対応した結晶構造解析の方法論・技術開発も重点的に行っていく。

## 参考文献

- [1] K. Nakayama & S. Wakatsuki, *Cell Struct. Funct.* 28, 431, 2003
- [2] T. Shiba *et al.*, *Nature* 415, 937, 2002

- [ 3 ] T. Shiba *et al.*, *Traffic* **5**, 437, 2004
- [ 4 ] T. Shiba *et al.*, *Nature Structural Biology* **10**, 386, 2003
- [ 5 ] Y. Shiba *et al.*, *J. Biol. Chem.* **279**, 7105, 2004
- [ 6 ] T. Nogi *et al.*, *Nature Structural Biology* **9**, 527, 2002
- [ 7 ] M. Kawasaki *et al.*, *Current Opinion in Structural Biology* **15**, 681, 2005
- [ 8 ] M. Kawasaki *et al.*, *Genes Cells* **10**, 639, 2005
- [ 9 ] M. Akutsu *et al.*, *FEBS Letters* **579**, 5385, 2005
- [ 10 ] S. Hirano *et al.*, *Nature Structural and Molecular Biology* **13**, 272, 2006
- [ 11 ] T. Satoh *et al.*, *J. Biol. Chem.* **281**, 10410, 2006.
- [ 12 ] S. Kakuda *et al.*, *J. Biol. Chem.* **279**, 22693, 2004.
- [ 13 ] T. Shiba *et al.*, *PROTEINS: Structure, Function, and Bioinformatics*, *in press*.
- [ 14 ] T. Kubota *et al.*, *J. Mol. Biol.* **359**, 708, 2006
- [ 15 ] L. Chavas *et al.*, *J. Biol. Chem.* **280**, 469, 2005

no.01

第4回 タンパク3000産学連携フォーラム 仙台  
**タンパク3000プロジェクト**  
**個別的解析プログラム**  
**「翻訳後修飾と輸送」の成果**

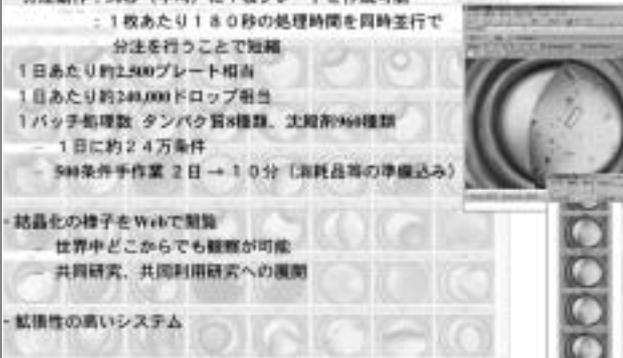
1. 放射光X線結晶構造解析高度化のための新規技術
2. 細胞内輸送系と翻訳後修飾
3. 産学利用と産官学連携
4. 放射光将来展望

高エネルギー加速器研究機構  
 物質構造科学研究所  
 構造生物学研究センター  
 若狭 社志

no.04

**全自動タンパク質結晶化・観察システムの開発**

- 世界最高の結晶化条件探索速度を有する大規模結晶化システム  
 分注動作：36秒（平均）に1枚プレートを作成可能  
 : 1枚あたり180秒の処理時間を同時並行で  
 分注を行うことで短縮  
 1日あたり約2,500プレート相当  
 1日あたり約240,000ドロップ相当  
 1バッチ処理数：タンパク質8種類、沈殿剤468種類  
 : 1日に約24万条件  
 : 544条件手作業 2日 → 10分（消耗品等の準備込み）
- 結晶化の様子をWebで観覧  
 : 世界中どこからでも観覧が可能  
 : 共同研究、共同利用研究への展開
- 信頼性の高いシステム



no.02

**KEK-PF 構造生物学研究センター**



AR NW12A  
 PF BL-5A  
 次世代X線検出器 XIG-HARP  
 結晶化ロボット 一日24万条件  
 ココはエクスプレス (20km/h 10分)  
 マイクロコンピュータ  
 翻訳後修飾と輸送の構造ゲノム科学

no.05

**PFの構造生物学ビームライン**



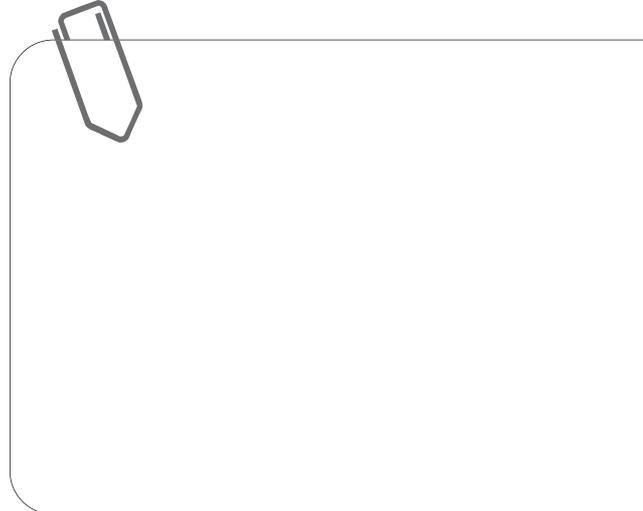
~2005年2月  
 3本のハイスループットビームラインBL-5AとNW12A  
 PF-AR (6.5GeV)  
 PF-ring (2.5GeV)  
 BL-17  
 ミニボールアンジュレータ  
 2005年3月~  
 30%のビームタイムをタンパク3000個別的解析プロジェクト(82課題)で利用。

no.03

**全自動タンパク質結晶化・観察システムの開発**



分注システム Dispensing system  
 Incubators (恒温容器)  
 観察システム Observation system  
 コントロールPC



no.06

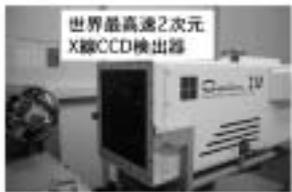
ハイスルーブットビームラインPF-AR NW12A  
平成15年4月にユーザーに公開され稼働を開始



~10分で1データセット



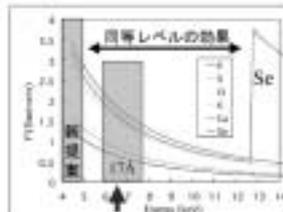
精密サンプル回転軸  
最大回転変位量2.2ミクロン



世界最高速2次元  
X線CCD検出器

no.08

BL-17A&ミニポールアンジュレータビームライン  
低エネルギーX線をさらに積極的に利用



同等レベルの強度

○軟弱原子はほとんどの場合タンパク質分子中に含まれており、主イオン結晶のみでの構造決定ができるため、構造解析のスピードが上がる。その他、P, Cl, K, Ca等の軽原子も、タンパク質結晶中に含まれることが多く、それらを積極的に使用することにより位相精度を上げることができる。

図. タンパク質結晶中に含まれる軽原子の高分散効果

BL-17Aでは典型的なタンパク質の位相決定を可能にする。

→ シグナルを増大させ、巨大分子の構造解析を可能にする。

no.07

A new multipole wiggler MAD beam line BL-5A in Photon Factory

Operation since April 2004

Superfine diffractometer for micro crystals (rotation error: 1  $\mu\text{m}$ )

ADSC Q315: large area (315mm square) & fast readout (1 sec).

Large unit cells

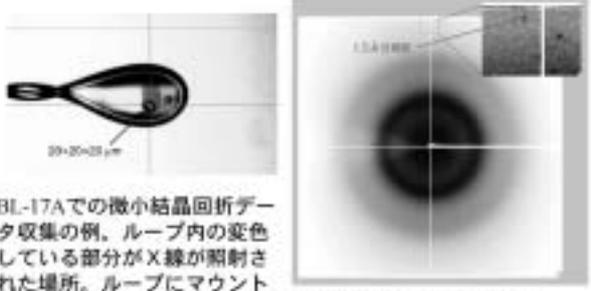
$a=b=141\text{\AA}$ ,  $c=470\text{\AA}$ , resolution 2.15 $\text{\AA}$   
Prof. Jeremy Tame & Sam-Yong Park (Yokohama)

RNA polymerase elongation complex (MW ~420kDa), P4, 2, 2,  $a=157\text{\AA}$ ,  $c=503\text{\AA}$ , resolution 3 $\text{\AA}$   
Dr. Dmitry Vassylyev (Harima Riken)



no.09

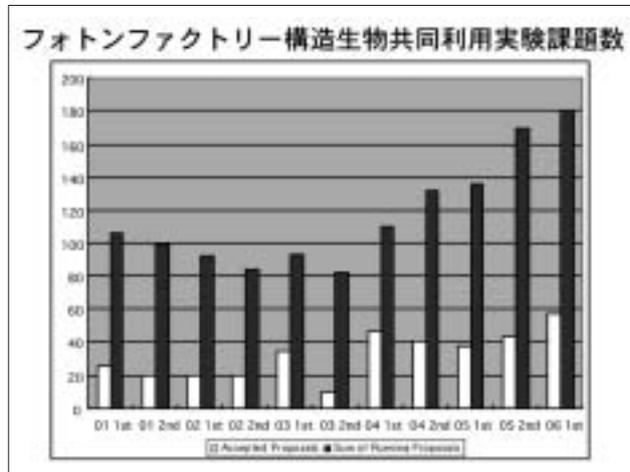
BL-17A マイクロビーム初の微小結晶実験



BL-17Aでの微小結晶回折データ収集の例。ループ内の変色している部分がX線が照射された場所。ループにマウントされた2つの微小結晶のうち1つだけを選択的に照射し、回折データ測定。

左図の微小結晶からの回折像。  
スリット: 20  $\mu\text{m}$  × 20  $\mu\text{m}$ ,  
露光時間: 20秒, 最高分解能 1.5  $\text{\AA}$ 。  
PFニュース2006年5月号表紙

no.10





no.16

Ariの結合部位はエフェクターとの結合だけでなく、  
その他のタンパク質との結合にも用いられている。  
コレラ毒が宿主細胞を侵略する際に  
ヒトのタンパク質輸送系を利用

Katsunaki, Nakayama, & Wakatsuki,  
*Current Opinion in Structural Biology*  
2005, 15, 681

AriS-CTA1 (コレラ毒)  
CTA1

シアトル大学Wiss 164教授グループの研究  
C.J. Otsuki, et al. and W.G.J. Ho, *Science* 12  
August 2005

T. Shiba, et al., *Nature Structural Biology* 10  
386-393, 2003

no.18

ペプチドグリカン認識におけるパターン認識分子メカニズム  
ショウジョウバエのペプチドグリカン認識タンパク質の構造をBL-5で解析  
～自然免疫系における異物認識に新しいメカニズムを提案～

Chang-I Chang, Keitaro Hara, Yoganaray Chelliah, Dominique Mergin-Laurods, Seichi Wakatsuki and Johann Deisenhofer : Structure of the ectodomain of Drosophila peptidoglycan-recognition protein LCa suggests a molecular mechanism for pattern recognition. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 102, 10279-10284 (2005)

no.17

Ca<sup>2+</sup>非依存型 Emp46pとEmp47p (*S. cerevisiae*  
出芽酵母の糖鎖認識ドメインの構造

Ca<sup>2+</sup>非依存型  
K<sup>+</sup>依存型

Ca<sup>2+</sup>非依存型

Tadashi Sato et al., *J. Biol. Chem.* 281, 10410, 2006

no.19

**Double sided ubiquitin binding is  
ubiquitous!**  
Hrs-UIP has higher affinity for  
multiply monoubiquitinated receptors.

今日の構造解析

H. Stenmark, Oslo, Norwayとの共同研究  
S. Hirano et al., *Nature Struct. & Mol. Biol.*, 13, 272-7, March 2006

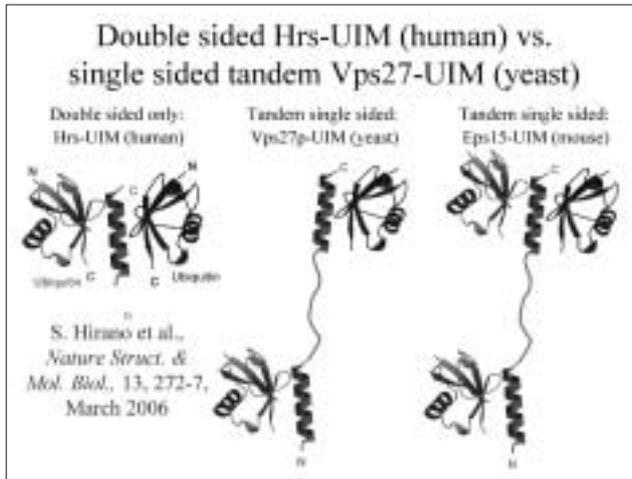
no.20

Canon on a theme of ubiquitin

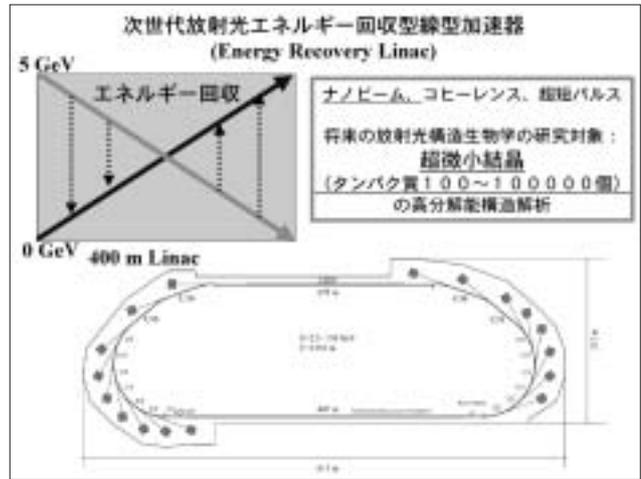
E \_ EL **L**AL LSQ \_ E  
LQEEEEELQLALALSQSEAEK  
E \_ QL **L**AL QSE \_ E

Double sided ubiquitin binding  
S. Hirano et al., *Nature Struct. & Mol. Biol.*, 13, 272-7, March 2006

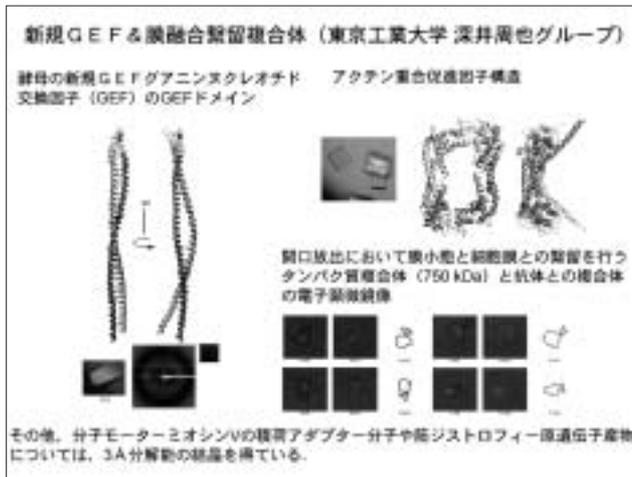
no.21



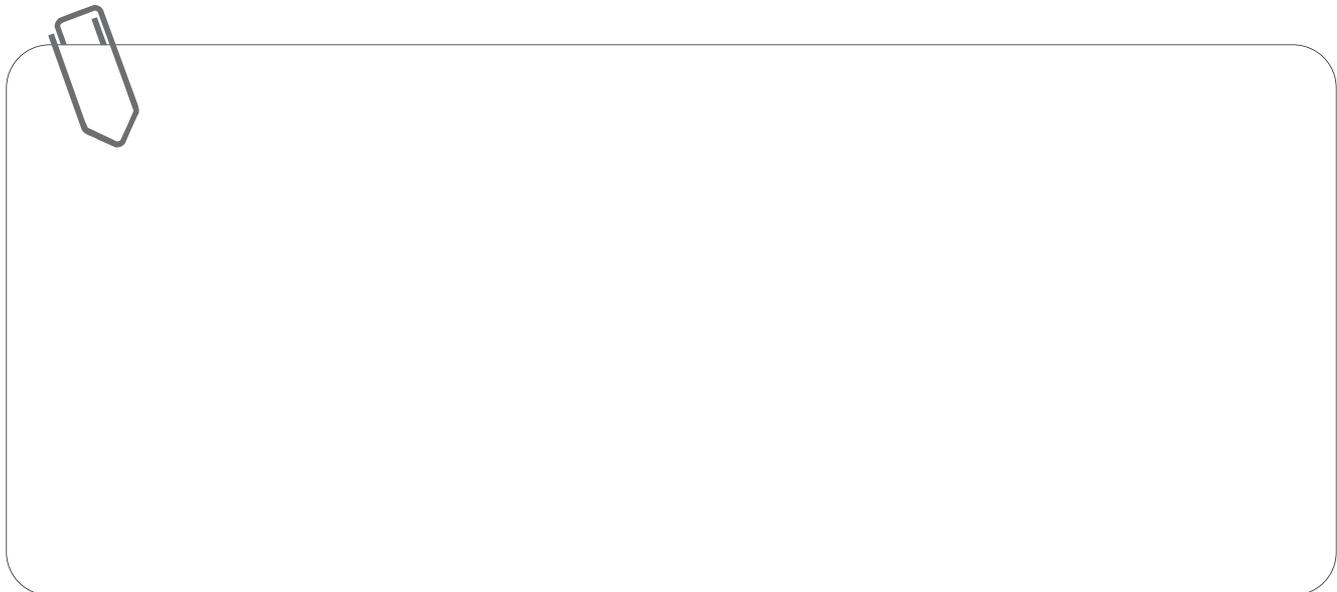
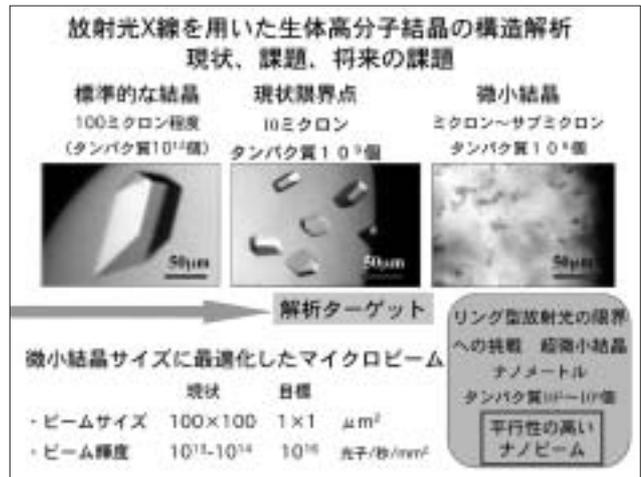
no.23



no.22



no.24



## 東北大学よりの講演

# タンパク質フォールドの積木細工と 医薬品への展開

### 熊谷 泉(くまがい・いずみ)

東北大学大学院工学研究科バイオ工学専攻教授。理学博士。

- 1972年 3月 東京大学教養学部基礎科学科卒業
- 1977年 3月 東京大学大学院理学系研究科博士課程修了
- 1977年 4月 日本学術振興会奨励研究員
- 1978年 4月 三菱化成生命科学研究所特別研究員
- 1980年 11月 マックスプランク分子遺伝学研究所・ベルリン自由大学博士研究員
- 1983年 7月 東京大学工学部工業化学科助手
- 1991年 7月 東京大学工学部工業化学科助教授
- 1995年 4月より現職



1983年以来、遺伝子工学による新機能蛋白質の作製と機能・構造解析に従事。現在は組換え抗体の創製と応用研究を展開している。

# タンパク質フォールドの積木細工と医薬品への展開

熊谷 泉(東北大学大学院工学研究科)

多くのタンパク質が分子量1~2万のフォールドから構成されていることは広く認識されている。歴史的には、免疫グロブリンの構造解析から提案された概念であり、免疫グロブリンフォールドは典型的な基本フォールドである。遺伝子組換え技術の発展により、このフォールドを基本単位として、様々な構造フォーマットが考案、作製され、機能解析されるようになってきている。これらは、免疫グロブリンフォールドという安定なタンパク質構造・機能単位の融合方法を変化させることによって、多種多様な構造フォーマットを実現でき、新機能を創出できている、とあってよいであろう。また、このフォールドをプラットフォームとして、その相補性決定領域(CDR)のアミノ酸残基を変化させて、低分子から細胞表面に至るまで多種多様の標的分子に対する高い特異性・親和性を創出する分子機構は、分子認識あるいは分子設計という観点からも今なお興味深いところである。

抗体は、タンパク質医薬品市場の上位に名を連ねるなど、その高い抗原特異性及び機能性から分子標的医薬として脚光を浴びている。現在、19種類の抗体医薬が上市されているが、何れもIgG型である。演者の研究グループでは、免疫グロブリンフォールド(Igフォールド)の人工的組み合わせによる、多機能抗体の開発と利用に取り組んできた。

## Igフォールドのスワッピング

### diabody とがん免疫治療

2種類の一本鎖抗体の可変領域の片方をもう一方のものと置き換えて構築する最小の組換え型二重特異性抗体(diabody)に着目し、がん免疫療法へ展開してきた。このdiabodyの構築法はタンパク質におけるフォールドのスワッピングの応用と位置づけることができる。

上皮増殖因子受容体(ErbB1)は、がん細胞の増殖、血管新生、アポトーシス回避、転移などに関係し、その発現量と悪性度の相関性は極めて高いといわれており、がん治療薬の標的として優れている。このような観点から、抗ErbB1抗体として抗体528をとりあげ、その可変領域をヒト化し、ヒト化した抗CD3抗体OKT3可変領域との組み合わせによりヒト化Ex3 diabodyを構築した。ヒト化Ex3 diabodyは、活性化T-リンパ球(T-LAK)を併用した*in vitro*細胞傷害性試験において、極めて低濃度でがん細胞に対する傷害活性を示した。またヒト胆管癌移植SCIDマウスを用いた*in vivo*治療モデル実験において、T-LAK単独を投与した群に比べ顕著な腫瘍の縮退効果が見られた(*Cancer Immunol. Immunother.*, 53, 497-504(2004)、*Clin Cancer Res.*(2006)印刷中)。以上の基礎的知見を基盤として、ヒト化Ex3 diabodyの臨床応用への展開を目指している。

## Igフォールドの機能変換と立体構造情報

抗体医薬は分子標的医薬としては理想的であることが再認識されつつあるが、大量投与の必要性から、薬剤の確保が大きな問題である。この点を克服する方策の一つは、高機能化をはかることだと思われる。抗体の抗原結合部位の改変を通じて、抗原に対する親和性の向上が高機能化に結びつくと期待される。この目的

のためには立体構造情報は極めて有用である。演者の研究グループでは、モデル抗体として抗リゾチーム抗体 HyHEL-10 と抗原複合体の立体構造解析を行い (*J. Biol. Chem.*, 274, 27623-27631(1999))、抗原結合部位の立体構造情報から、CDR の一部に無作為変異を導入し、人工選択系を利用することにより、エピトープ構造が異なる相同抗原に対して十分な親和性を創出することができた (*J. Biol. Chem.*, 275, 12813-12820(2000) , *J. Biol. Chem.*, 278, 24929-24936(2003))。この手法を上記のヒト化抗 ErbB1 抗体 528 にも適用しつつある。ヒト化抗体 528 の可変領域の立体構造情報に基づき、H 鎖 CDR の溶媒接触領域に無作為変異を導入し、人工選択を行った。その結果、1 アミノ酸残基の置換で一桁近い親和性の向上が達成された。この変異をヒト化 Ex3 diabody に導入することにより高機能化が実現できると思われる。

#### Ig フォールドの多価化と高機能化

IgG 型抗体は抗原結合部位を 2 ヶ所持ち、抗原結合においてアビディティ効果を有することが良く知られている。そこで、ヒト化 Ex3 diabody をヒト IgG1 の Fc 領域に融合した新規二重特異性抗体を作製した。Ex3 diabody-Fc は *in vitro* 細胞傷害性試験において一桁以上の高活性を示し、マウスを用いた *in vivo* 治療モデル実験においても、単独投与で十分な抗腫瘍活性を観測している。

このような、Ig フォールドの高機能化とそれらの積木細工により構築した多機能抗体の次世代抗体医薬としての進展に期待したい。

no.01

# タンパク質フォールドの積木細工と 医薬品への展開

東北大学・大学院工学研究科  
熊谷 泉

文部科学省タンパク3000プロジェクト  
第5回産学連携フォーラム in 仙台  
2006.6.30 仙台国際センター

no.03

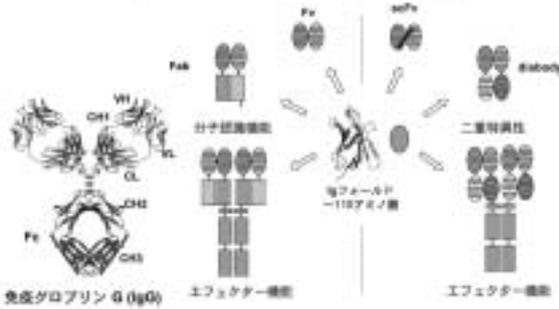
# Igフォールドのスイッチング —diabodyとがん免疫治療—

## Igフォールドの機能変換と立体構造情報

## Igフォールドの多価化と高機能化

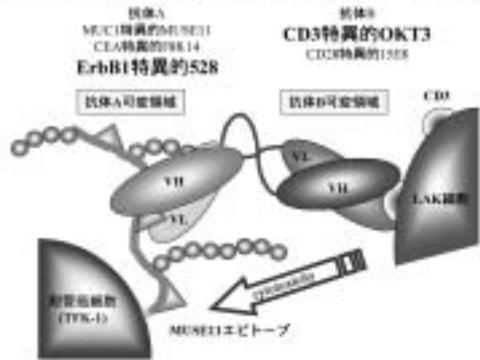
no.02

# フォールドと機能の積木細工



no.04

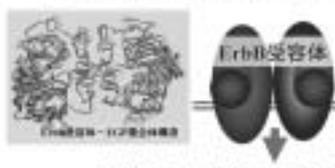
# diabodyのがん免疫療法への展開



no.05

### 標的抗原

標的分子ErbB受容体は消化器癌において過剰発現が高頻度



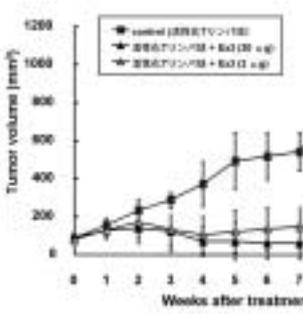
- 主に癌細胞表面に存在
- 正常組織では細胞表面の発現が少ない
- 過剰発現時でも遮断することが少ない

腫瘍細胞のセルサイクルの進行、血管新生、転移、アポトーシスの回避、化学療法への抵抗性等に関与

ErbB受容体を標的とした新規細胞換え抗体医薬

no.07

### ヒト胆管癌皮下移植マウス治療モデル実験

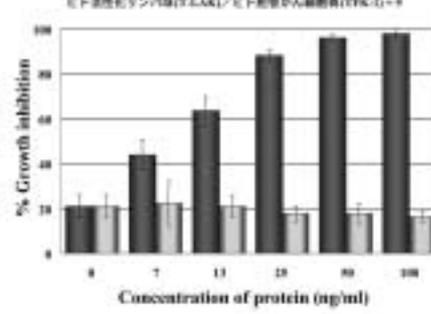
Weeks	control (裸鼠+TC119)	過剰発現リンパ球 + ErbB 阻害剤	正常発現リンパ球 + ErbB 阻害剤
0	0	0	0
1	~100	~100	~100
2	~150	~150	~150
3	~200	~200	~200
4	~300	~300	~300
5	~450	~450	~450
6	~600	~600	~600
7	~750	~750	~750
8	~900	~900	~900
9	~1050	~1050	~1050
10	~1100	~1100	~1100

腫瘍の測定 (2週間後 + length 12)

no.06

### Ex3 (ErbB1 × CD3) diabodyの細胞傷害性

ヒト過剰発現リンパ球 (IL-2/IL-15) / ヒト胆管癌細胞株 (TC119)



Concentration (ng/ml)	% Growth inhibition
0	~10
1	~45
10	~65
100	~85
1000	~95
10000	~98



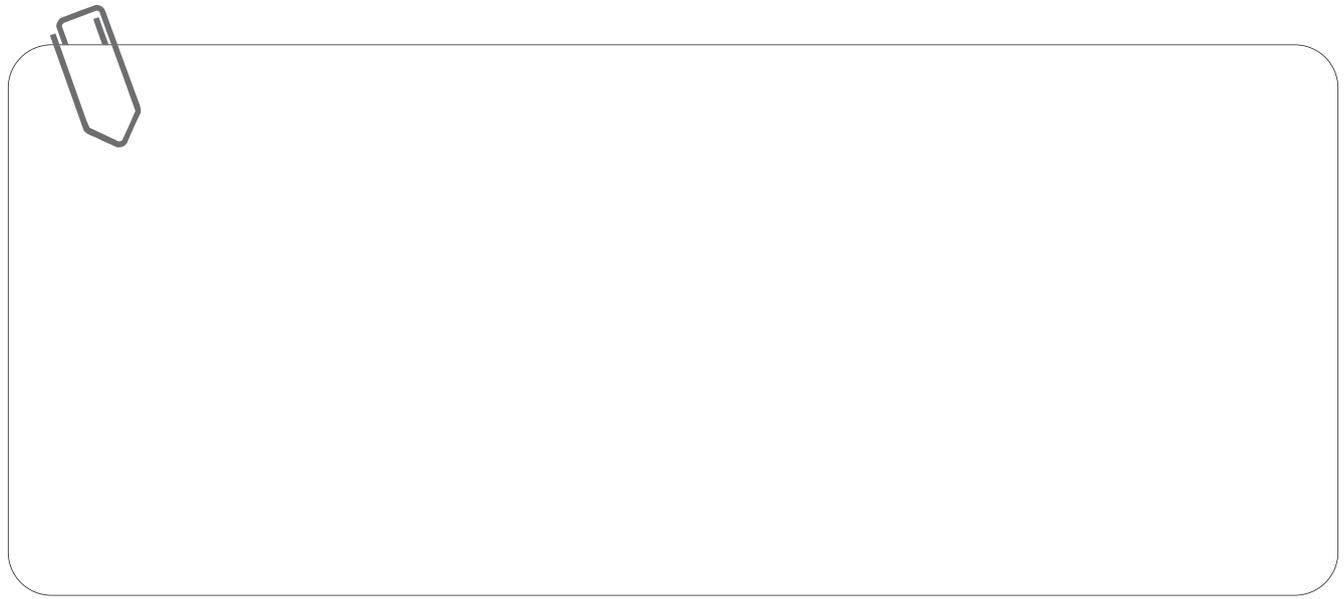
no.08

### Ex3diabody

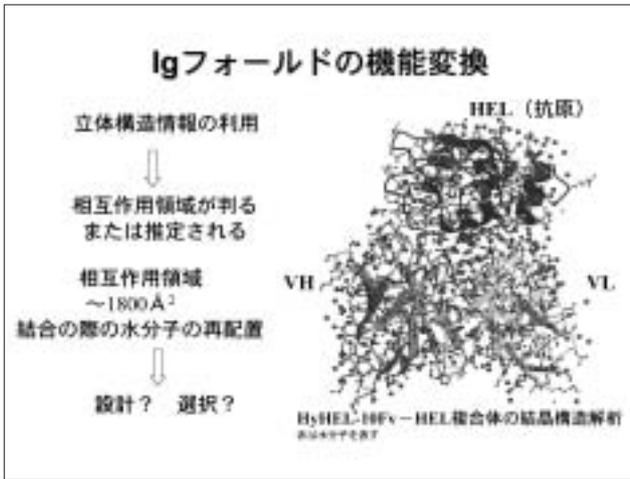
ErbB1及びCD3を標的としたヒト化二重特異性成分分子抗体

- *In vitro* 実験
  - ErbB1及びCD3特異的
  - CD3陽性細胞の腫瘍細胞同種への集着能、及び強力な抗腫瘍活性
  - 集着に伴いIL-2、GM-CSF、TNF- $\alpha$ 、IL-3等の増加
- アニマルモデル
  - SCIDマウスを用いた治療実験において、4匹中3匹に有効
  - ノドマウスを用いた生存試験においても顕著な生存延長

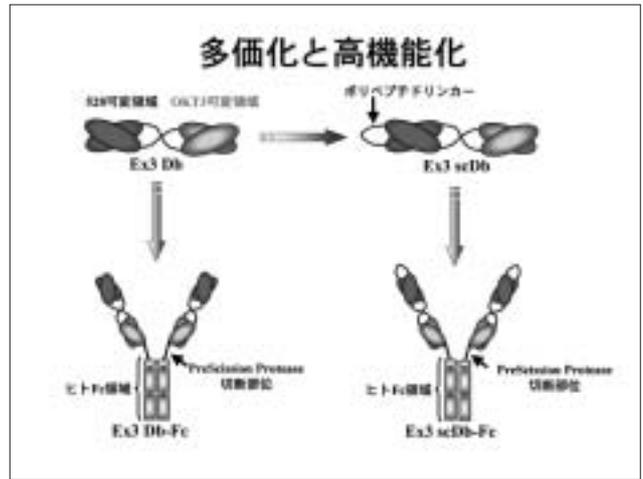
トランスレーショナルリサーチ

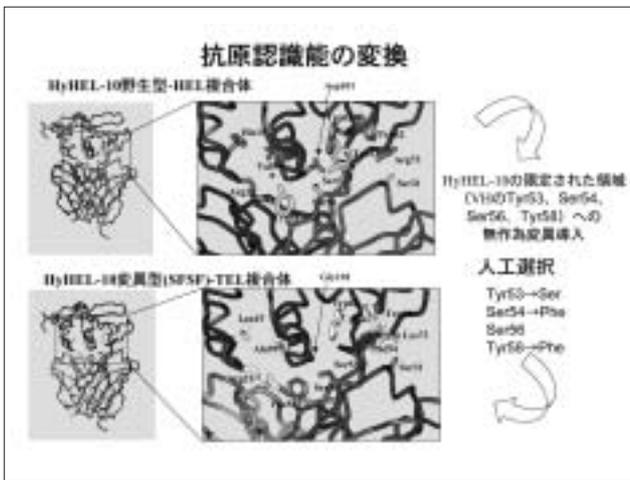
no.09



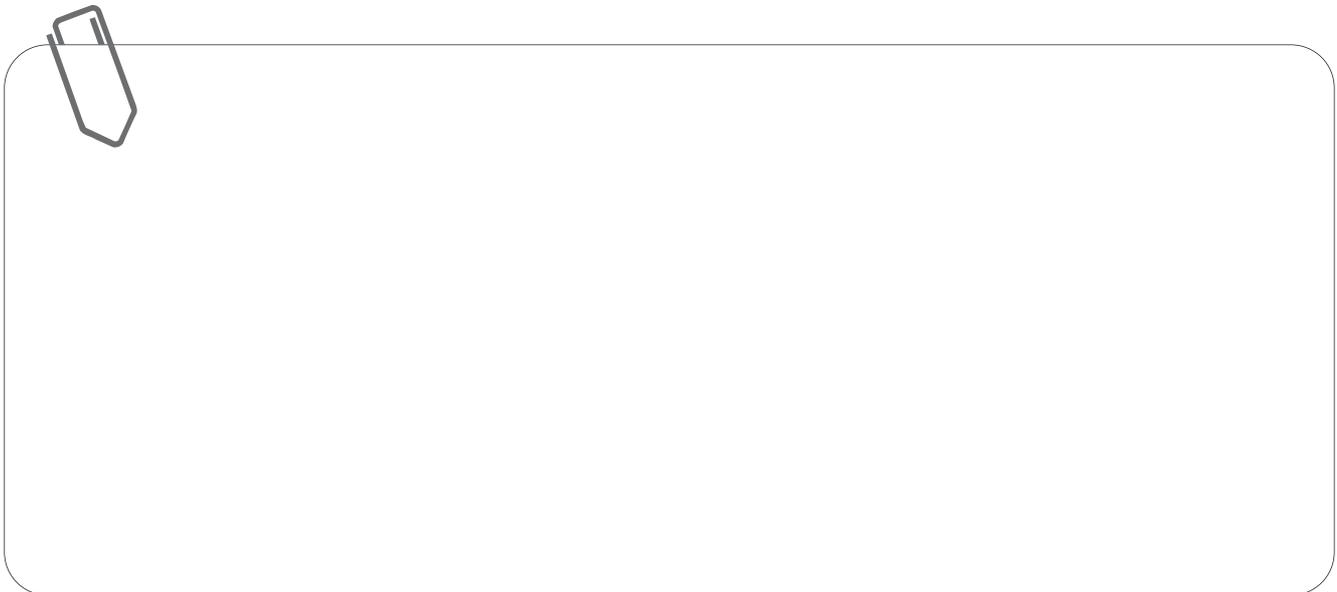
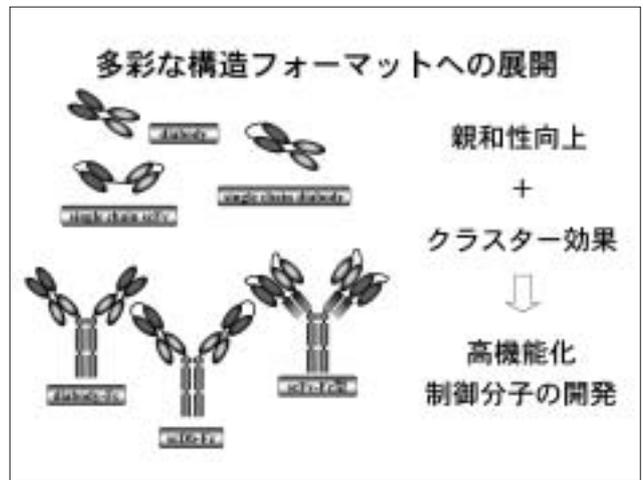
no.11



no.10



no.12



企業講演

ゾイジーン株式会社

蛋白質立体構造からの  
創薬を目指して  
発現から薬物設計まで

杉尾 成俊(すぎお・しげとし)

ゾイジーン株式会社構造解析事業部事業部長。薬学博士。

1980年3月 東京理科大学薬学部製薬学科卒業  
1985年3月 大阪大学大学院薬学研究科博士課程修了(薬学博士)  
1985年4月 株式会社ミドリ十字入社  
1990～1993年 米国 Brandeis University 客員研究員  
1991年4月 株式会社ミドリ十字 中央研究所主任研究員  
1997年3月 株式会社ミドリ十字退職  
1997年4月 三菱化学株式会社入社。横浜総合研究所主任研究員  
2002年1月 ゾイジーン株式会社 グループリーダー  
2003～2004年 京都大学化学研究所客員助教授  
2005年4月 ゾイジーン株式会社 構造解析ビジネスユニット主管  
2006年1月より現職  
2006年4月 株式会社三菱化学科学技術研究センター テーマリーダー  
2006年4月 横浜市立大学大学院国際総合科学研究科客員教授



専門は構造生物学、蛋白質科学。特にX線結晶構造解析。現在は構造生物学の創薬への応用と新技術開発に関心を持つ。

# 蛋白質立体構造からの創薬を目指して

## 発現から薬物設計まで

杉尾 成俊(ソイジーン株式会社)

### 概要

疾病標的蛋白質の立体構造を基にした分子設計は創薬研究における重要な基盤技術となっており、化合物の設計技法と標的蛋白質の3次元構造解析がその成否を決定すると考えられる。構造ゲノム科学におけるハイスループット技術開発は蛋白質の3次元構造解析を大幅に加速しているが、蛋白質の結晶構造解析においては、良質な結晶を得るための技術が特に注目されている。ソイジーンでは蛋白質の発現から結晶構造解析に関連した各種の技術開発を実施すると共に、4年間で20種類のヒト創薬標的蛋白質と10種類の微生物等由来の蛋白質の結晶構造解析に成功している。本講演では、これらの技術を紹介すると共に、化合物設計技法への取り組みについても言及する。

### 小麦胚芽無細胞蛋白合成系

無細胞蛋白合成系は、RNAポリメラーゼによる鋳型DNAの転写反応(mRNAの生成)と、リボソームによるmRNAの翻訳(蛋白質の合成)を試験管内で行う蛋白発現系である。PCRにより直鎖状鋳型DNAを作ればベクター構築が不要であり、細胞破碎等の煩雑な操作が不要なため、少量多品種の同時発現検討に向いている。また、シャペロンや可溶化補助剤を合成反応液に直接添加できるため、種々の合成条件を的確かつ高速に検討できる。ジスルフィド結合を有する分泌蛋白質の発現にも、反応系の酸化還元状態を制御する等により対応可能となっている。

特に、小麦胚芽無細胞蛋白合成系は蛋白合成阻害因子、蛋白分解酵素、翻訳後修飾酵素などを殆ど含まないため、分解や修飾を受けない蛋白質を多量に調製するのに適している。また、蛋白質合成速度が比較的遅いため、他の無細胞蛋白合成系に比べて合成された蛋白質分子のフォールディングが良好と言われており、物理化学的に均質な蛋白質を必要とする構造解析用の大量試料調製にも適している。ソイジーンでは高活性な小麦胚芽抽出液製造技術や新規合成方法等の利用技術の確立に努めてきた。その結果、ヒトcDNAクローンライブラリに含まれる数千種類の蛋白質を小麦胚芽無細胞蛋白合成系で発現検討し、7割程度が可溶性発現することを確認した。また、数百種類の創薬標的蛋白質についての機能解析や、6種類の蛋白質の結晶構造解析に成功している。

### 可溶性発現配列の選択

薬物分子の設計に必要な標的蛋白質の3次元構造を迅速に決定する方法として、機能ドメインの切り出しがある。可溶性に優れた機能性ドメインの切断箇所を推定するため、類縁蛋白質のアミノ酸配列解析にホモロジーモデルからの3次元構造情報を加味したin silico蛋白質可溶性予測法を開発した。予想された切断箇所を有するトランケート型蛋白質に複数の精製タグを融合させた組み合わせをPCRで増幅して直鎖状鋳型DNAを調製し、小麦胚芽無細胞蛋白合成系により全ての精製タグ融合トランケート型蛋白質を並列合成し、得られた粗精製蛋白質につき可溶性合成量と均質性の簡易評価を実施している。適正な精製タグと発現配列の組み合わせを選択することにより、不溶化や凝集性による結晶化の失敗を回避できるようになった。また、

上記一連の作業を迅速かつ省力化するため、96穴プレートフォーマット対応の自動分注装置を用いて、PCR反応準備・転写反応・翻訳反応・粗精製・電気泳動ゲルへの試料添加の各工程を自動化した。

### 結晶化技術

沈殿剤溶液調製、結晶化、結晶観察の3工程で専用装置を開発・導入し、迅速化と高精度化、微量化、省力化を同時に達成した。まず、沈殿剤溶液を結晶化プレートの各ウェルに直接調製する自動分注装置を開発した。100種類のストック溶液から任意のものを0.5～100 $\mu$ L注入でき、独自スクリーニングキットの開発や、蛋白質毎の最適化での特注溶液セットの調製などに広く利用している。独立した100チャンネルの非接触分注機構によって相互汚染なしに結晶化プレートに96種類の任意条件を15分間で作成できる。次に、沈殿剤溶液と蛋白質溶液を100nLずつ混合分注して母液を4分間で作成する自動分注装置を導入し、蛋白質溶液の消費量を手作業の1/10とした。また、5と20の恒温槽を有する自動結晶観察装置を導入し、結晶化条件スクリーニングや最適化における母液状態の経時変化を自動記録している。

一方、実験結果の評価・解析・実験計画策定等の作業は、熟練した研究者の力量に依存していたため、自動装置の導入のみでは結晶化条件の発見と最適化の全工程を迅速に行うことは困難である。そこで、結晶観察装置に蓄えられた実験条件・結果のデータベースを数理モデルにより解析し、最適な結晶化条件を得るための研究者支援ソフトウェア群をWindows2000/XP上で構築した。また、市販の結晶化スクリーニングキットに含まれる条件は統計的に大きく偏っており、良質な統計モデルを構築しにくい一因と考えられた。そこで、選択した化合物の出現頻度を平滑化して各条件間の統計的距離を最大化したランダムスクリーニングキットを作成し、実際の結晶化に活用している。

no.01

## ゾイジーン株式会社 会社概要

・資本金： 30億円 (三菱化学が全額出資)  
 ・設立： 2001年12月26日  
 ・従業員数： 55名 (研究者50名、Ph.D. 20名)  
 ・所在地： 横浜市青葉区鴨志田町1000番地  
 ・連絡先： 電話 045-963-4510 (代表)  
 E-mail <http://www.zoogene.co.jp>  
 ・事業内容： 創薬資源の開発およびライセンス提供  
 1. 蛋白質合成関連事業  
 2. 蛋白質のX線構造解析の受託  
 3. 蛋白質の核磁気共鳴(NMR)解析の受託・ライセンス  
 4. 無細胞蛋白質ディスプレイ(CFPD)技術の受託・ライセンス  
 5. 創薬ヒット化合物設計およびその最適化の受託  
 6. 自社医薬候補化合物のライセンス及び共同研究・開発

Zoogene

no.03

## 構造解析技術の特徴 (1)

### 小麦胚芽無細胞蛋白質合成系の利用

無細胞合成系

約1日間

生細胞系 (大腸菌等)

1ヶ月

Zoogene

no.02

## 技術プラットフォーム

テクノロジープラットフォーム

cDNA

ハイワイフォー-7  
ディスプレイ

小麦胚芽抽出液

無細胞蛋白質合成

蛋白質精製

構造解析事業

化合物提示事業

蛋白質 3D構造

分子設計 合成・評価

リード化合物

顧客 (医薬品メーカー)

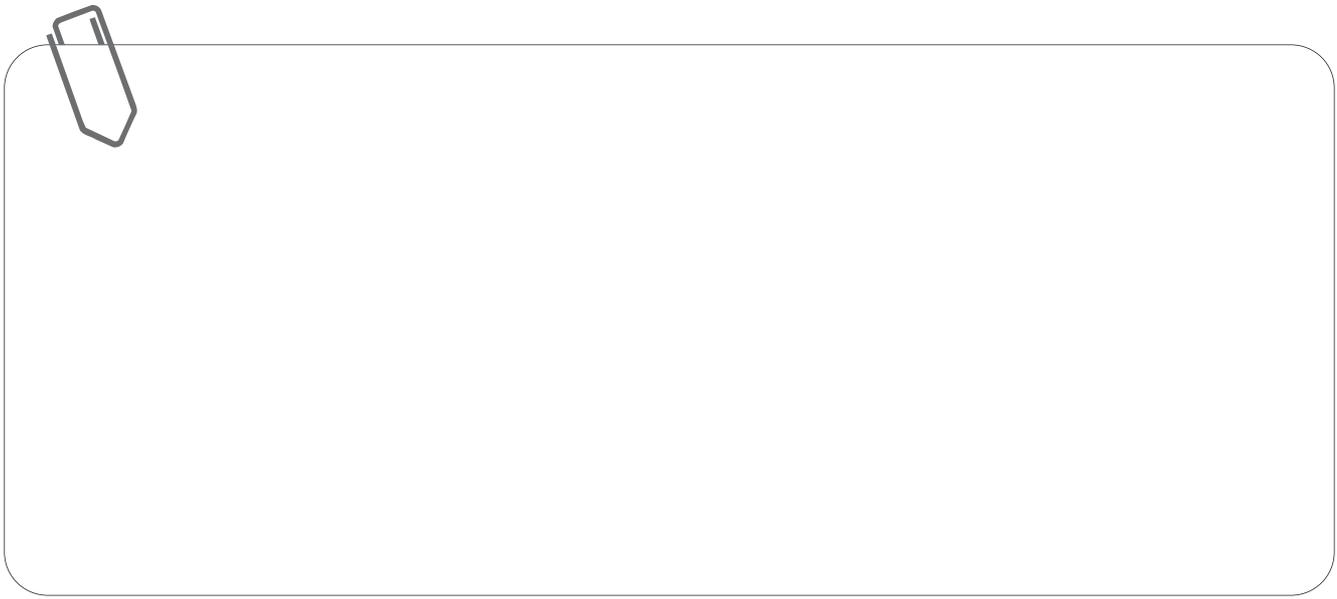
Zoogene

no.04

## 小麦胚芽無細胞蛋白質合成系の特徴

	大腸菌生細胞系	小麦胚芽無細胞系
遺伝子から発現までの期間	約1ヶ月	1週間
細胞培養・破砕	要	不要
ハイスループット性	低	高
蛋白質発現	不溶化しやすい	不溶化しにくい
スケーラビリティ	検討必要	良好
目的蛋白質の消化	されやすい	なし
宿主由来蛋白質の合成	あり	なし
ラベル化蛋白質の合成	低効率	高効率
細胞毒性蛋白質の合成	難	可能
膜蛋白質の合成	難	可能(ミクロソーム等)
補酵素、界面活性剤等の添加	難	可能

Zoogene



no.05

### 構造解析技術の特徴 (2)

#### 可溶性ドメイン配列の決定

- ・ バイオインフォマティクス技術により標的蛋白質の全配列から可溶性ドメイン配列を予測
- ・ 小麦胚芽無細胞合成系による少量多品種同時発現 (96穴フォーマット) で、可溶性ドメイン配列を決定

↓

不溶化・凝集が問題となる蛋白質も結晶化検討へ

ZOEGENE

no.07

### 可溶性ドメイン配列の決定

小麦胚芽無細胞合成系による  
ハイスループットパラレル合成

可溶性・高発現性評価

高可溶性均質蛋白の検出

高可溶性均質蛋白の検出

ZOEGENE

no.06

### 可溶性ドメイン配列の決定

可溶性予測      配列情報による予測      構造情報による予測

配列設計

N末端付録部位 (4ヶ所)      C末端付録部位 (4ヶ所)

多ヶ所付録付配列の組み合わせ  
8ヶ配列 =  
N端4ヶ所 x C端4ヶ所 x タグ4種類

ZOEGENE

no.08

### 構造解析技術の特徴 (3)

#### 精製・分析技術

精製・分析技術を駆使し、蛋白質を結晶化に適した溶液状態にする。

- 化学的純度を高める
- 分子構造の均質性を高める
- 単分散状態にする

↓

結晶化の成功確率が向上

ZOEGENE



no.09

## 構造解析技術の特徴（４）



### 結晶化技術

- プレスクリーニングによる蛋白質濃度の至適化により、無駄な蛋白質消費を回避
- 結晶化ロボット群を用いて少量蛋白質で多数条件をスクリーニング（100nL/ドロップ）し、高い再現性と網羅性を両立
- 最適結晶化条件を独自数理モデル解析により論理的かつ迅速に導出

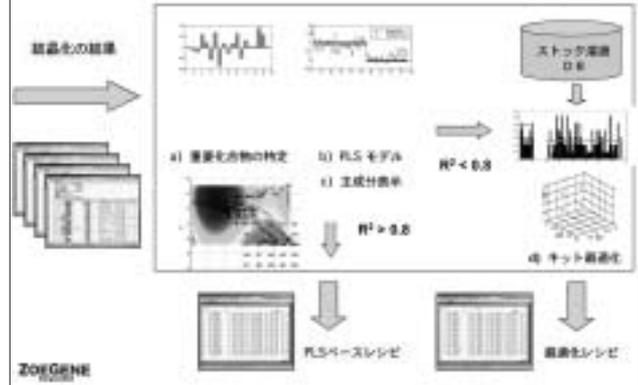


候補化合物との複合体形成に有利な結晶形を選択

ZOEGENE

no.11

## 結晶化支援ソフトウェア群



ZOEGENE

no.10

## 結晶化専用ロボット群



(a) 次級剤溶液調製

- ・ストック溶液100種類
- ・10~15分で次級剤溶液（96条件）を調製

蛋白質溶液消費量  
100nL/ドロップ



(c) 保管・観察

- ・5℃、20℃保管
- ・自動撮影
- ・結晶化条件と結果を統合してDB化

(b) 母液作成



ZOEGENE

no.12

## 化合物設計手法



1. CPADD (Closest Packing Approach for denovo Drug Design)  
最密充填de novo設計法。精緻で網羅的で新規性の高い複数の骨格(化合物)の創出  
hit/lead generation
2. ez-Suite :  
原子種の最適化(ez-Z)、fragment伸長(ez-Evo)  
fragment削除(ez-Del)、fragment結合(ez-Connect)  
hit evolution/optimization
3. PBVS (Pharmacophore-Based Virtual Screening)  
既存リガンドのターゲット蛋白への結合様式と pharmacophore 推定による化合物創出  
hit generation/evolution

ZOEGENE

## 各機関分担者講演

# タンパク質立体構造情報に もとづく機能推定

## RNA 結合タンパク質推定を中心に

由良 敬(ゆら・けい)

日本原子力研究開発機構システム計算科学センター  
シミュレーション技術開発室量子生命情報解析チーム研究副主幹。  
理学博士。



- 1988年 3月 早稲田大学工学部応用物理学卒業
- 1990年 3月 早稲田大学大学院理工学研究科物理学及び応用物理学専攻  
修士課程修了
- 1993年 3月 名古屋大学大学院理学研究科生命理学専攻博士後期課程修了
- 1993年 4月 名古屋大学理学部助手
- 1996年 4月 名古屋大学大学院理工学研究科助手
- 2002年 1月 日本原子力研究所計算科学技術推進センター量子生命情報解析グループ研究員
- 2003年 4月 日本原子力研究所計算科学技術推進センター量子生命情報解析グループ副主任研究員
- 2004年 4月 日本原子力研究所計算科学技術推進センター量子生命情報解析グループ副主任研究員  
(サブグループリーダー)
- 2005年 10月～現在 日本原子力研究開発機構システム計算科学センターシミュレーション技術開発室  
量子生命情報解析チーム(チームリーダー)

# タンパク質立体構造情報にもとづく機能推定

## RNA 結合タンパク質推定を中心に

由良 敬(日本原子力研究開発機構 システム計算科学センター  
シミュレーション技術開発室 量子生命情報解析チーム)

ゲノム塩基配列読み取り後の研究により、ヒトゲノムにどのようなアミノ酸配列をもつタンパク質がコードされているかが、徐々に明らかにされてきている。同時に、これらのタンパク質が担っている機能の解析も進められている。タンパク質は立体構造を形成して機能することより、タンパク質の立体構造を決定するプロジェクトもタンパク質の機能解析の一環と位置づけることができる。しかし、タンパク質の立体構造とゲノム塩基配列のみが与えられたときに、タンパク質の機能を導出することは、一般的には容易なことではない。タンパク質の立体構造などからその機能を推定する手法の開発は、バイオインフォマティクスにおける大きな課題のひとつである。

我々の研究チームでは、ゲノム塩基配列とタンパク質の立体構造が与えられたときに、どのようにしてタンパク質の機能を推定するかを研究している。ここでは、この研究の重要な部分として展開しているRNAと相互作用するタンパク質のRNA界面の推定法を取り上げる。

トランスクリプトーム解析により、タンパク質をコードしていないRNAが、既知機能性RNA以外にも数多く転写されていることが判明してきている。これらのRNAはノンコーディングRNA(ncRNA)と総称される。マウスでは、ncRNAが約16,000同定されており、これらの大部分は何らかの機能を持っていると考えられている。ヒトでは、少なくとも約1,380のncRNAが存在することが判明している。これらncRNAや機能性RNAは、タンパク質と相互作用して機能する。よく知られているリボソームは、リボソームRNA(rRNA)と50個をこえるタンパク質との複合体であり、スプライソソームは、核内低分子RNA(snRNA)と非常に多くのタンパク質との複合体と考えられている。転写後の真核生物mRNAはリボソームによって翻訳されるまでに、多くのタンパク質核酸複合体と相互作用しながら加工を受け輸送される。RNAと相互作用するタンパク質は、ヒトの場合、2,500以上存在するという推定もある。

RNAがタンパク質と相互作用することで機能していることより、RNAとタンパク質との複合体立体構造が機能の理解に必要となる。しかしRNAと相互作用するタンパク質の立体構造がRNAとの複合体で決定される例は多くはない。そこでタンパク質の立体構造からRNAがどのように相互作用するかを推定することが重要となる。DNAとタンパク質の相互作用面に関する構造バイオインフォマティクス解析は非常に多くなされているが、RNAとタンパク質の相互作用

の解析は、データが数少なかったためあまり行われていなかった。しかし最新のタンパク質立体構造データベースにはタンパク質とRNAの複合体構造が90種類程度存在することより、RNAとタンパク質の相互作用が、DNAとタンパク質の相互作用同様、統計的解析の対象となり得る状況にあることがわかった。

そこで本研究では、タンパク質とRNAとの複合体構造を推定する第一歩として、タンパク質表面のRNA相互作用部位推定を試みた。構造既知のタンパク質RNA複合体からRNAとの界面の特徴を捉えるために、タンパク質表面における界面の広さ、および界面にあらわれるアミノ酸残基種の違いを統計的に解析することで、界面の特徴を抽出した。統計解析の方法を工夫することで、今までに明らかにされていないRNA界面の性質を見いだすことができた。これらの統計量とゲノム塩基配列から推定される大量の類縁アミノ酸配列の情報を導入することで、比較的高い精度でRNA界面を予測することができるようになった。

ここで開発した手法は、タンパク質の立体構造から、RNAに限らず他分子との相互作用面を推定することにも利用できる可能性があり、我々の研究室では本手法の適用範囲の拡大を進めている。

no.01

タンパク質立体構造情報にもとづく機能推定  
— RNA結合タンパク質推定を中心に—

日本原子力研究開発機構  
システム計算科学センター  
シミュレーション技術開発室  
量子生命情報解析チーム

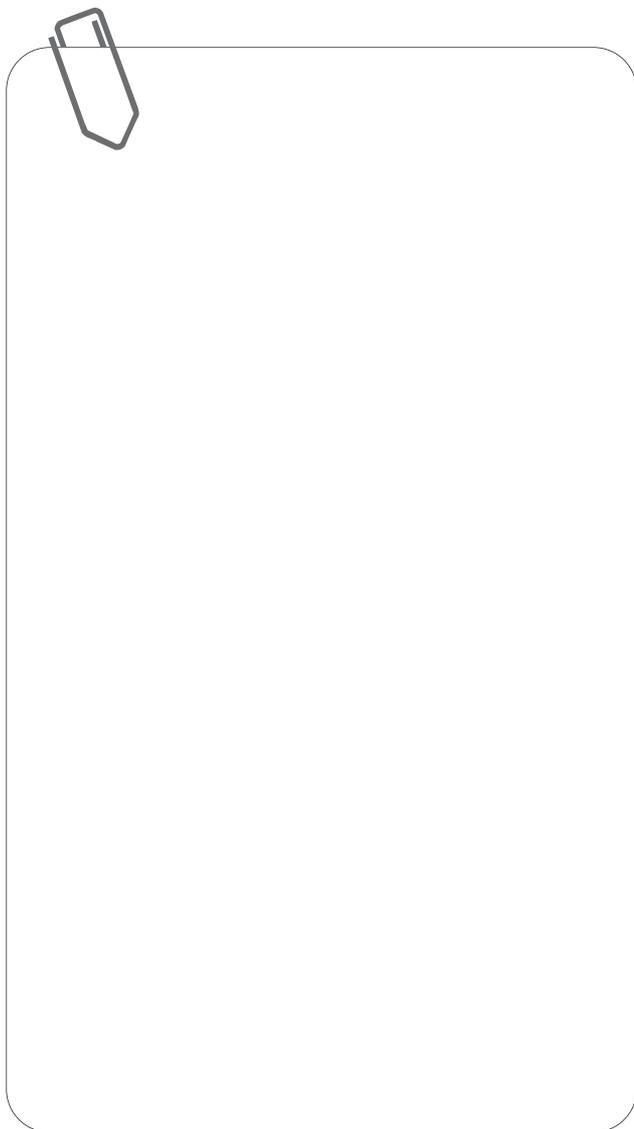
由良 敬

文部科学省スーパーコンピュータセンター  
第1回 量子生命フォーラムの模様  
(2009年4月20日)

no.02

ヒトゲノム読み取りプロジェクト



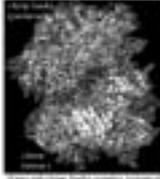


no.03

生命活動の主要な部品はタンパク質  
ゲノムがわかっていても生命活動を記述できるわけではない。

タンパク質は立体構造を形成して機能する。  
塩基配列は2次元、タンパク質立体構造は3次元空間

タンパク質立体構造決定  
プロジェクトの始動

no.04

「ポスト」構造ゲノミクスにおけるバイオインフォマティクス

↓

タンパク質立体構造からの情報抽出

いろいろある中で、

タンパク質の立体構造情報にもとづくRNAの結合予測

no.05



no.06

機能性RNAが大量に存在することがわかってきた

既知機能性RNA  
リボゾームRNA、トランスファーRNAなど

新規RNA (生物学的な機能をしているに違いない)  
160,000種類 (マウス) (Rayon et al., 2006)  
1,300種類以上 (ヒト) (Iwanishi et al., 2004)

これらRNAは、何をしているのか?  
mRNAスプライシング、mRNA輸送、タンパク質翻訳、...

これらRNAは、タンパク質と相互作用して機能しているだろう  
ヒトゲノムにコードされているタンパク質の2,500個程度 (全タンパク質の約8%) はRNAと相互作用するらしい (Kozak, 2001).

RNAとタンパク質がおりなす未知の生物学がありそう!

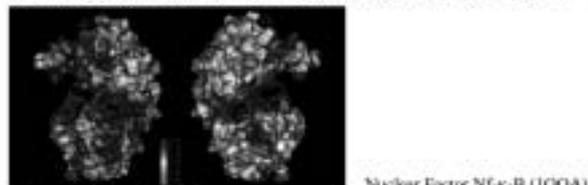
no.07

現在のゲノム生物学の状況において、RNAの構造バイオインフォマティクスで解くべき問題設定は何か?

1. ゲノム塩基配列からRNAと相互作用するタンパク質を推定する。
2. タンパク質立体構造が与えられたときに、RNA結合タンパク質かどうかを推定する。
3. RNA結合タンパク質の立体構造が与えられたときに、どこがRNAとの相互作用面かを推定する。

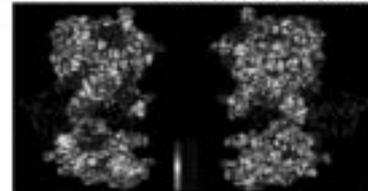
no.08

RNA結合タンパク質の立体構造情報から、RNAとの相互作用面を推定するには...



Sex-lethal protein (1B7F)

Nuclear Factor NF-k-B (1G0A)

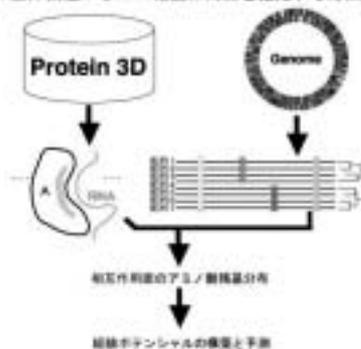


Shimada et al (2011) has argued that DNA/RNA-binding surface of protein cannot be identified only with calculated electrostatic potential.

no.09

### 目的

ゲノムプロジェクトと構造ゲノムプロジェクトの産物を活用してRNA結合タンパク質の立体構造からRNA相互作用面を推定する方法を構築する。



no.10

### 方法

1. タンパク質RNA複合体立体構造データベースの構築とタンパク質のRNA界面の同定と界面の特徴抽出
2. アミノ酸残基単位のRNAとの相互作用統計量の測定方法の構築
3. RNA界面の予測

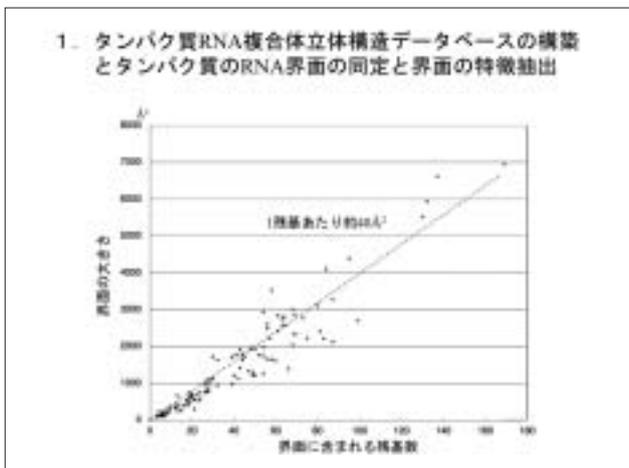
no.11

1. タンパク質RNA複合体立体構造データベースの構築とタンパク質のRNA界面の同定と界面の特徴抽出



86種類のRNA結合タンパク質がRNAとの複合体で立体構造が決定されている。  
(DNA結合タンパク質の場合の半分以下)

no.12



no.13

2. アミノ酸残基単位のRNAとの相互作用統計量の測定方法の構築

■Frequency of each amino acid type  $i$  on protein surface

$$f_i = \frac{n_i}{\sum_{i=1}^{20} n_i}$$

■Frequency of each amino acid type  $i$  in protein-RNA interface

$$\bar{f}_i = \frac{\bar{n}_i}{\sum_{i=1}^{20} \bar{n}_i}$$

where  $n_i$  is the number of amino acid type  $i$  on the protein surface; and  $\bar{n}_i$  is the number of amino acid type  $i$  in the interface.

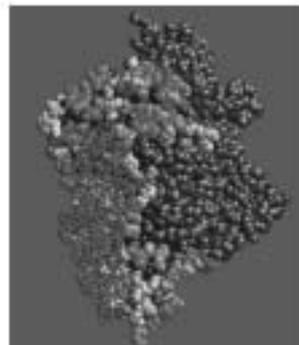
■Residue interface propensity ( $P_i$ )

$$P_i = \frac{\bar{f}_i}{f_i} \Rightarrow \log_2 P_i$$

$P_i > 1$  ( $\log_2 P_i > 0$ ) indicates that a residue occurs more frequently in the interface than in the protein surface.

no.14

### 3. RNA界面の予測

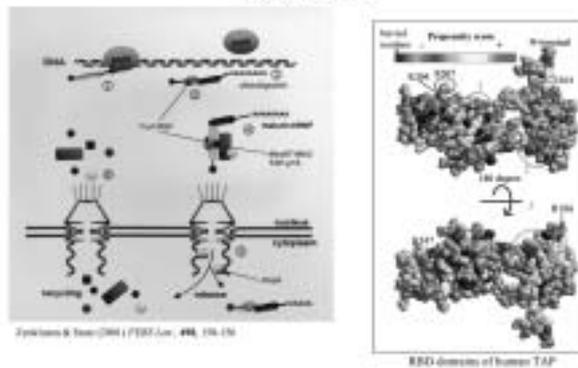


Asp tRNA 合成酵素の場合

no.15

### 3. RNA界面の予測

#### mRNA転送システム



no.16

### 共同研究者

Daeh, T.P. Kim (原子力機構, 慶応義塾女子大学)  
Kim, T.P.O., et al. (2005) Gene 346: 277-285.

藤 達志 (原子力機構)

# タンパク質立体構造情報の 産業的インパクト

## 鈴木 榮一郎(すずき・えいいちろう)

味の素株式会社理事。薬学博士。

1976年 東京大学大学院理学系研究科化学専攻修士課程修了  
1977年 同薬学系研究科博士課程中退。味の素(株)入社  
1982年 論文博士(東京大学)。  
1984年～1987年 米国UCSF博士研究員  
1990年 味の素(株)中央研究所主任研究員  
1994年 同上主席研究員  
2001年～2003年 北陸先端大学客員教授  
2002年～現在 横浜市立大学客員教授  
2005年～現在 東京大学特任教授  
2006年6月 同社退職後現職



専門は構造化学。現在、同社ライフサイエンス研究所にて、NMR、in vivo NMR、計算科学、X線解析、MS分析などを総合的に利用したタンパク質構造機能研究に従事。平成16年度には、日本化学会化学技術賞、化学バイオつくば賞(いずれも5名共同の筆頭・5位)受賞。

著書に、日本分光学会測定法シリーズ41「NMR分光法 原理から応用まで」(分担編集・執筆)など。

# タンパク質立体構造情報の産業的インパクト

鈴木 榮一郎(味の素株式会社)

はじめに

まず、タンパク質と弊社事業との関わりとしては、味の素(旨味)やアスパルテーム(甘味)の受容体、医薬(阻害剤・遮断薬 作動薬等)の作用対象、グルタミン酸等のアミノ酸発酵菌における生合成系酵素、などが挙げられる。そこに、新しい展開として、解明可能範囲の拡大並びに所要期間の短縮(テクノロジーの進歩)、米国の国策(プロパテント政策)への対応などを背景に、西暦2000年前後のわが国では、タンパク質の立体構造解析に企業の関心が醸成された。

今現在は、必ずしもその当時のような関心が持続している訳だけでもない状況にある。その原因・理由に関する演者の個人的見解は、極めて単純であり、科学的発見と産業的有用性のギャップの厳しさに関する認識の欠如にあると言わざるを得ない。タンパク質の立体構造情報を産業的に有用なものとして活用していくためには、どうすれば良いかについて、以下、限定的な例に過ぎないながらも、3つの実用例を紹介することで、そのインパクトを実感して頂ければ、誠に幸いである。

## その1. 事業化成功後のタンパク質製品の立体構造解析

トランスグルタミナーゼ(TG)は、蛋白質中のGln残基の $\gamma$ -カルボキシアミド基と各種一級アミンとの間のアシル基転移反応を触媒する酵素であり、分子量、 $\text{Ca}^{2+}$ 依存性等の観点から、ヒト血液凝固因子XIIIに代表される真核生物由来TGと、微生物由来TGの2つに大別される。本研究で主題とする微生物由来のTG(microbial transglutaminase; MTG)は、分子量約3万7000の、 $\text{Ca}^{2+}$ 非依存性のTGであり、かまぼこ製造、食肉接着等の食品加工の分野で、「タンパク質同士をつなぎ合わせる事が出来る酵素」(Lys残基の $\epsilon$ -アミノ基が一級アミンとして反応するので、蛋白質分子間に $(-\text{Glu})\text{-Lys}$ 架橋の形成が可能)として幅広く利用されている。

## その2. 主力低分子製品の製造法開発への活用

うま味調味料「味の素」は、主成分のグルタミン酸ナトリウム水和物(MSG; 97.5%)と重要副成分のリボヌクレオチドナトリウム(イノシン酸ナトリウムとグアニル酸ナトリウムの混合物; 2.5%)からなる。イノシン酸ナトリウムは、古くから“だし”として使用されてきた“鰹節”のうま味成分で、魚肉・牛肉・鶏肉などに多く含まれている一方、グアニル酸ナトリウムは“干し椎茸”のうま味成分で、きのこ類に多く含まれている。これらの核酸系うま味調味料は“昆布”のうま味成分であるグルタミン酸ナトリウムと併用することにより、相乗的に呈味性を増し、強く豊かなうま味を作り出すことから、1909年以来グルタミン酸ナトリウム事業を世界的に展開してきた当社にとって、これらの供給は重要な課題であった。

核酸系うま味調味料の工業的製法としては、A)RNAの酵素分解法、B)イノシン酸の直接発酵法、C)イノシンを発酵法で製造し、ATPをエネルギー源として、キナーゼによりリン酸化してイノシン酸にする方法、D)キサンチル酸を発酵法で製造し、酵素的にグアニル酸に変換する方法、E)ヌクレオチドを発酵法で製造し、それを化学的にリン酸化する方法などが知られている。我々は、コスト競争力強化および世界的需要増への対応としてATPのリサイクルを必要としない酵素的リン酸化反応による新製法の開発に取り組んだ。そして、ピロリン酸をリン酸供与体としてイノシンの5'位を位置選択性の高いヌクレオチド-ピロリン酸リン酸基転移酵素によってリン酸化し、イノシン酸を生産する方法の開発に成功し<sup>1)</sup>、本リン酸基転移酵素による高効率イノシン酸生産が期待された。

### (1) 実用酵素創生上の課題

上記方法では、イノシンに対する親和性を向上させ、イノシンのリン酸化に適用できるように改変した酵素を用いたが、グアニシンのリン酸化反応の場合にはグアニシンの溶解度がイノシンに比べ桁低いいため、グアニル酸生産へは適用できず、工業化推進上の大きな課題であった。そこで、実用酵素創生の具体的な数値目標としてグアニンに対

するミカエリス定数( $K_m$ )の一桁低下させることと定め、酵素の高機能化に取り組んだ。また、同時に、活性中心への水分子の接近も抑制することにより、加水分解の抑制も可能であることも示すこととした。

(2) 酵素の高機能化に汎用性のある方法論の着想

当該酵素の高機能化研究に先立ち、1996年頃、グアノシン選択能の高いリボヌクレアゼT1に関するNMRとX線による構造機能研究を精力的に進め、酵素のフレキシブル部位による基質認識の意義の明確化に成功した<sup>2)</sup>。

また、当該酵素の改変実験と並行して、微生物由来トランスグルタミナーゼ(MTG)を題材に、NMR観測で検出され得る構造フレキシビリティを有し、且つ、活性中心に影響を与える残基の改変の有効性を確認している<sup>3)</sup>。この際、活性評価には、独自開発の「酵素標識NMR法」(Enzymatic Labeling Technique)<sup>4)</sup>を用いている。

(3) 当該酵素のX線結晶構造解析の実現

1998年迄には、結晶化並びに重原子探索が完了し、リン酸基転移酵素の立体構造(6量体; 図1)の解析に成功した<sup>5)</sup>。

(4) 親和性の向上を目指した改変研究の遂行

得られた立体構造に基づき、フレキシブル領域のアミノ酸残基とヌクレオシドの複合体モデルを構築し(図2)、「分子間力」に関する考究等、物理化学的考察を行った上で、基質結合部位の対グアノシン親和性を高めるべくアミノ酸置換を施した。即ち、Ser72 → Pheなどのアミノ酸置換を積み重ねた結果、その高機能化に成功するに至った<sup>6)</sup>。

(5) 加水分解の抑制改変の実施

一例として、Leu140をPheに置換することにより、反応速度が向上することが明らかになった。

(6) 実用突然変異酵素の取得とその産業的效果

以上の成功に基づき、実用突然変異酵素の取得に成功し、それに基づき、酵素法による核酸製造の工業化プロセスの開発とプラント建設に踏み出すことができ、2003年に念願の生産開始に辿り着いた。この結果、核酸製造コストの大幅削減に成功した。

(7) その後の展開：他酵素への適用

トランスフェラーゼ類を中心に、事業展開において重要度の高い種々の産業用酵素の高機能化も、工業的実用性を有するレベルで続々と成功しており、これらの戦略は一般性と継続性を有している。また、工業化におけるボトルネックを実験的立体構造、或いは、計算科学的モデルに立脚してブレイクスルーすることが出来たことは、タンパク質立体構造の産業的有用性の実証に成功したことを意味する。

本稿は、日本化学会化学技術賞の内容の抜粋である<sup>7)</sup>。

参考文献

1. Mihara Y, Utagawa T, Yamada H and Asano Y: *Appl. Environ. Microbiol.*, **66**, 2811-2816(2000)
2. Ishikawa K, Suzuki E \*, Tanokura M, Takahashi K: *Biochemistry*, **35**, 8329-34(1996)
3. Shimba N, Shinohara M, Yokoyama K, Kashiwagi T, Ishikawa K, Ejima D, Suzuki E \*: *FEBS Lett.*, **517** 175-9(2002)

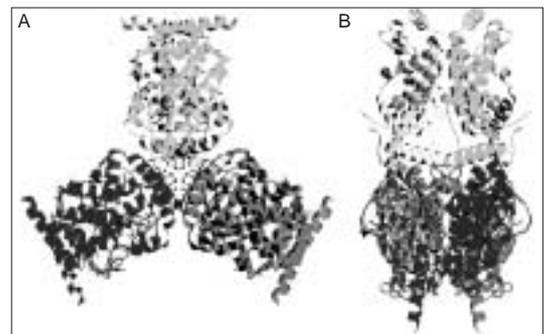


図1. 当該酵素の結晶構造 2量体(濃・淡)が3つ(赤・青・緑)集まった6量体(ホモ・ヘキサマー)

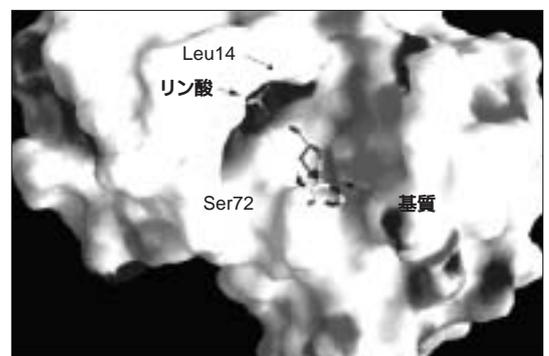


図2. 酵素への基質結合モデル 青・赤は正・負の電荷の密集部(各々、塩基性・酸性アミノ酸の多い部分)

4. Shimba N, Yamada, N, Yokoyama, K, and Suzuki, E: *Anal. Biochem.*, **301**, 123-127(2002)
5. Ishikawa K, Mihara Y, Gondoh K, Suzuki E \*, Asano Y: *EMBO J.* **19**, 2412-23(2000)
6. Ishikawa K, Mihara Y, Shimba N, Ohtsu N, Kawasaki H, Suzuki E \*, Asano Y: *Protein Eng.* **15**, 539-43(2002)
7. 日本化学会平成16年度化学技術賞「立体構造情報に基づく工業用トランスフェラ - ゼ類の高機能化技術の開発とその実用ヌクレオチド生産酵素創生への応用」味の素株式会社の鈴木栄一郎、石川弘紀、三原康博、榛葉信久、及び、富山県立大学教授浅野泰久氏の計5名の共同受賞の内容。

### その3. わが国独自研究開発手法の開発

#### 分子量無限系でのNMRによる相互作用界面同定法

NMRの生体高分子(例えば蛋白質)への応用は、NMRの装置が高磁場化され性能を上げていく中で実現されている。現在一般的に売られている装置では920MHzが最高だが、装置(磁石)の開発レベルでは1GHzにも達する勢いである。NMR装置の性能が上がると、低い濃度のサンプルや短い時間での測定が可能になる。また、1991年R.R.Ernstが「高分解能NMRの開発」、2002年K.Wuethrichが「生体高分子の同定および構造解析のための手法の開発」でノーベル化学賞を受賞しており、測定手法も発達してきた。

#### (1)基礎研究

東大嶋田研究室では、1999年に交差飽和現象(Cross saturation phenomena)を利用し蛋白質複合体の界面残基を特定することで、他の解析法に比べ、高精度に相互作用界面残基を決定することが可能なNMR交差飽和法を開発した。これは、「生体分子複合体の界面残基を同定する方法」として特許申請した(味の素出願; 2000-214997; 公開2002-31610)。しかしながら、交差飽和法はProtein-IとProtein-IIの複合体にラジオ波を照射し、その変化を複合体のまま直接観察する方法であるため、観測できる複合体の分子量は10万程度までであった。この限界を克服するため、交差飽和法を改良し、結合状態の相互作用を解離状態で観測する「転移交差飽和法」(Transferred cross saturation; TCS法)を開発した(図1)。これは、Protein-IIに照射したラジオ波がその界面を通してProtein-Iの界面へと影響を与え、結合・解離の交換現象により単体になったProtein-Iを観測する方法である。これは、複合体そのものを観測対象としないので、複合体の片方が巨大蛋白質でも対応でき、交差飽和法の適用分子量限界は事実上なくなったといえる。更に、Protein-Iの分岐鎖アミノ酸のメチル基を選択的に標識することで、蛋白質複合体の検出感度や飽和移動効率が著しく向上した。これは、相互作用界面を高感度かつ高効率に決定できる方法(側鎖法)「蛋白質複合体解析法」として特許申請した(産総研・味の素共願; 2002-217938; 公開2004-61216)。

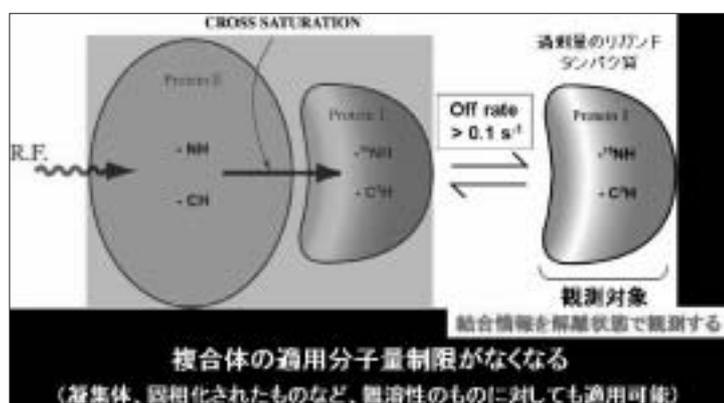


図1 転移交差飽和法(分子量限界なし)

以上、蛋白質相互作用界面同定手法としての交差飽和・転移交差飽和法の特長をまとめると。

- (1)従来法に比べ、高精度の相互作用界面の同定が可能。更に高精度の理論計算(ドッキングシミュレーション)に寄与。
- (2)NMR法であるため、適用範囲が広い。膜蛋白質複合体などの不均一な相互作用系にも適用可能。
- (3)転移交差飽和法に拡張することで、適応複合体分子量に制限無。

(2) 実用超高分子量複合体系への応用研究

以上のような技術を産業応用として、疾患に関与する蛋白質の例で紹介したい。

血栓形成のメカニズムは、大きく分けて3つの段階がある。初めに体内の血管が損傷して、血管の内側の繊維状コラーゲンが露出したところに、血液中に存在するフォン・ウィルブラント因子(vWF)のA3ドメインと呼ばれる部分が接着する。次に

このコラーゲンに固定化されたvWFの別のドメイン(A1)が血小板上の膜蛋白質と接着する。更に、この血小板にvWFのA1ドメインが接着して、また次の血小板を接着する仕組みで、血栓が形成されていく。

A3ドメインがコラーゲン結合に関わっている事は明らかにされていたが、相互作用機構は不明だった。そこで、本研究では、上記手法の格好の応用例を示すべく、抗血栓薬開発に役立つ構造情報として、血栓形成の初期段階に関与するA3ドメインと血管の内側を形成している繊維状コラーゲンとの相互作用様式の解明を目指すこととした。

繊維状コラーゲンが不均一・不溶性であることから、構造生物学的な解析手法が適用し難い系である。この相互作用は血栓症などの創薬ターゲットになり得るものだが、コラーゲンは通常の球状タンパク質とは異なり、不溶性・不均一性を有した巨大で複雑な繊維構造を形成するため、これまでこれを対象とした原子レベルでの相互作用解析を行うことが困難だった。本研究では、不溶性繊維状コラーゲンに<sup>2</sup>H、<sup>15</sup>N標識を施したA3ドメインをモル比で10倍添加した極めて粘性の高い試料を測定対象とした。

不溶性のコラーゲンにラジオ波パルスを照射すると、結合しているA3ドメインへ交差飽和の影響を与える。A3ドメインは、すばやく解離し、NMRでまだ飽和の影響が残っている解離状態のA3ドメインを観測する。結合定数が適切な範囲にある場合、解離したA3ドメインにラジオ波照射による飽和現象が残っているのが観察できる。すなわち、不溶性のコラーゲンに特異的に照射したラジオ波は、接触したA3の界面に存在する残基(I978やY1017)に影響を与え、シグナル強度は落ちる。一方、A1047は変化していないことから、界面に存在していない事がわかる。このようにして、すべてのシグナルの変化を観察し、三重鎖ヘリックスのコラーゲンがA3ドメインのどの部位に結合しているかを決定した。

その結果、A3ドメインには、コラーゲンが結合するのに適した半径15 程度で疎水性の高い溝状構造があることが明らかとなった(図2)。

本研究は、血栓形成に関与するA3・コラーゲン複合体の、血栓形成を阻害する新規薬物設計のための構造情報を与えた点で世界的にも注目度の高い研究である。系全体が巨大・超高分子量であるが故にこれまで扱い難かった分子の相互作用ネットワークの解明が可能になったことを意味しており、生体内の様々な生体分子間の相互作用部位を明らかにすることができれば、生命現象を分子レベルで解明するだけでなく、相互作用部位を標的とした新規薬物の設計にとって重要な情報を与え新たな疾患の治療方法開発につながる可能性を秘めていると考えている。これは、「タンパク質間の相互作用界面情報を用いた疾患関連アミノ酸残基の特定方法およびそれを用いた薬物スクリーニング法」として特許申請した(味の素出願 2002-242295 ; 公開2004-85206)。

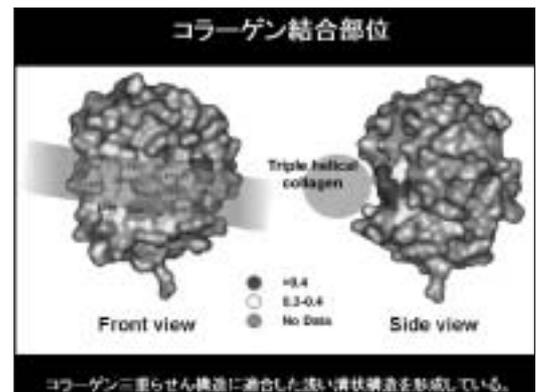


図2 コラーゲンの結合部位

注：本研究は、平成12年より実施されたいわゆる小淵ミレニアム計画の一環である。産学官連携の研究所「生物情報解析研究センター」がお台場に設立され(図16)、経済産業省・NEDOによる「生体高分子立体構造情報解析」プロジェクト、嶋田一夫チームリーダー(東大院薬教授)を中心に行われた。本研究の結果、高橋栄夫(産業技術総合研究所)、西田貴紀(バイオ産業情報化コンソーシアム)、尾上弘美、榎葉信久、及び、鈴木榮一郎(以上3名、味の素(株)ライフサイエンス研究所)の5名は、財団法人化学・バイオつくば財団より、2005年6月、第13回化学・バイオつくば賞を受賞することができた。本研究を行うにあたりまして、NEDO及び嶋田一夫チームリーダーに感謝する。

no.01

## タンパク質立体構造情報の の産業的イパ 外

味の素株式会社  
鈴木栄一郎

no.02

## タンパク質

弊事業との関わり：

味の素（旨味）・アスパルテーム（甘味）の受容体  
医薬（阻害剤・遮断薬／作動薬等）の作用対象  
アミノ酸発酵菌における生合成系酵素

新しい展開：

タンパク質の立体構造解析に企業の関心。  
解明可能範囲の拡大&所要期間の短縮（テクノロジーの進歩）、  
米国の国策（プロパテント政策）の推進。

no.03

ポストゲノム配列解析  
プロテオミクス研究  
蛋白質構造機能研究  
Genome → Proteome → Metabolome

蛋白質機能原理の解明

基本認識：立体構造・機能相関解析技術は、  
大型のハイテク設備と熟練研究員が必須な最先端  
技術。取組み如何で、バ 付企業の将来決する。

Structure isn't everything, but sure helps

勝利の条件：立体構造が分かった後の活用策。  
= 昨秋、日米欧3極がその線に沿った合意。

no.04

**NMRによる原子間距離情報取得法の実用化：  
ファルマコフォアの決定と結合阻害剤の設計**  
対象：血栓症 v WFA3-Collagen

no.05

**NMRによる v WFA3の相互作用界面**  
=変異体の活性評価結果

Nature Structural Biology, 10,53-58(2003)

薬物-受容体相互作用研究：  
可溶性受容体調製に成功  
⇒ NMR, MS用  
に安定供給可能に。

no.06

**計算科学で52万構造をデータベース化**

ITの活用：PC1000台を用いた網羅的データ解析  
(名古屋大・朝/北里大・相山尚教授と共同の共同研究)

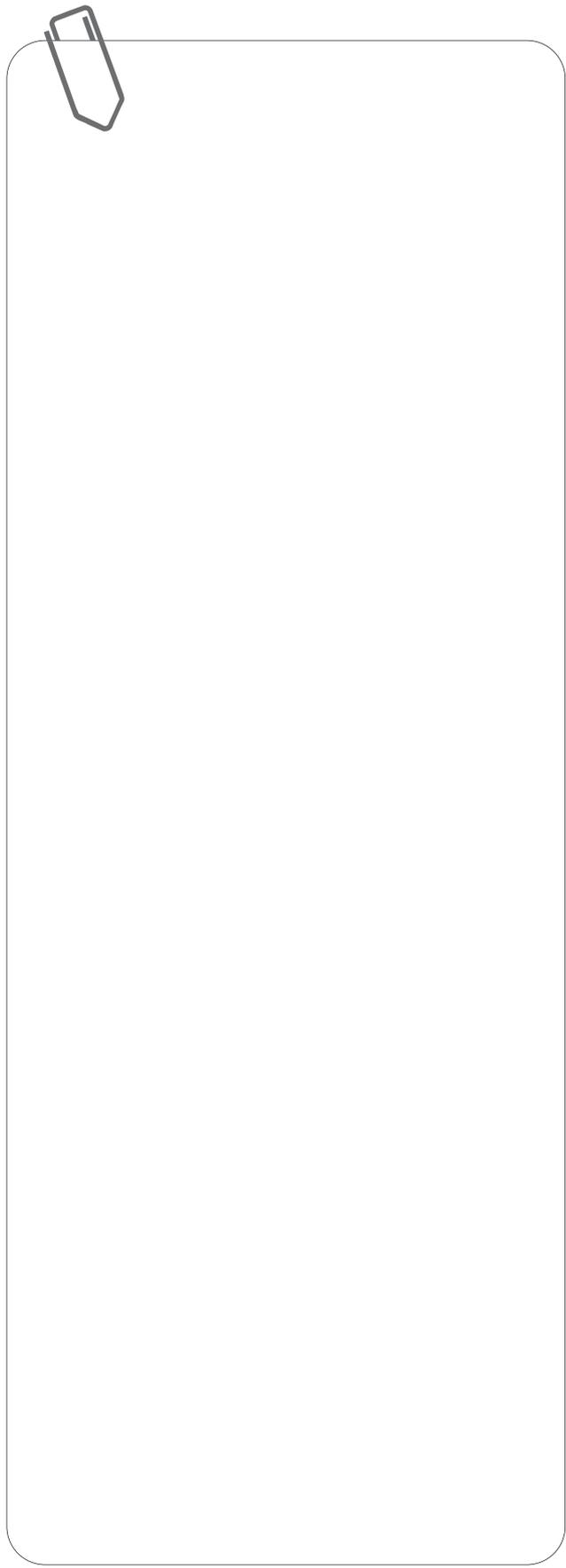
実験構造を参照して未知構造を高精度に予測  
FAMS：5万個の模造モデル/日

・タンパク30000種に及び、今後急速な勢いで  
「タンパク質基本構造の解析」進む見通し

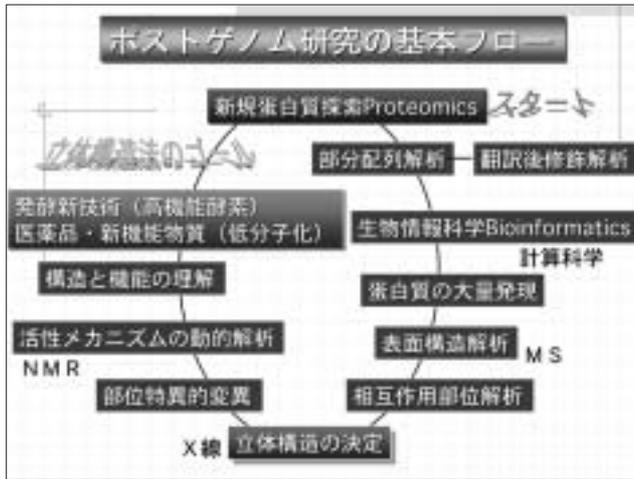
=インシリコでの遺伝子機能推定・改変で、新薬  
新薬開発の迅速化・効率化を促す時代の到来

**モデリングとMSの融合、BI特許出願**

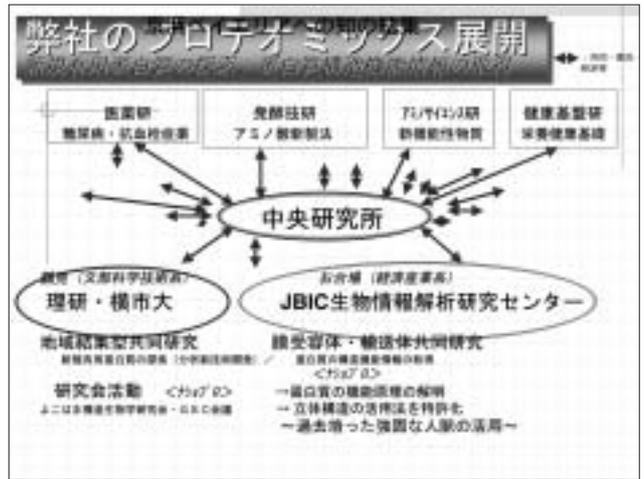
立体構造解析の問題点：タンパク質の大量発見が必要、結晶化検出  
不安定同位体標識、高濃度タンパク質の検出



no.07



no.09



no.08

### ポストゲノム戦略

**要素技術毎にナショナルプロ参加**

- 1) NMR: お台場プロジェクト
- 2) 計算科学: 北陸先端大との連携講座研究
- 3) MS: 横浜市地域結集型共同研究
- 4) X線: 東大・宇宙開発事業団との共同研究

**大局的視点に基づく対外連携戦略**

- 5) 略
- 6) 略
- 7) 略

**→インシリコでのXXXの実現**

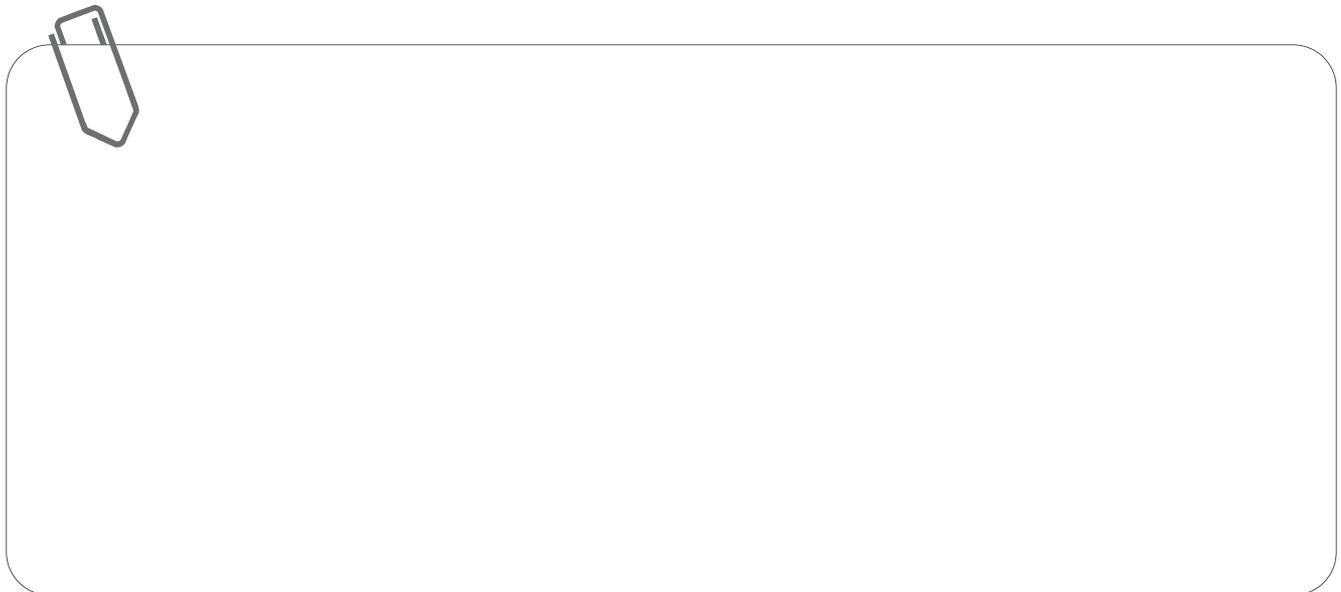
no.10

### 研究開発・応用展開の起承転結

科学技術的発見と産業的実用性のギャップ

起	承	転	結
新事実の発見	企業の	発明・発見・	社会的発言権
新原理の発見	智の資産蓄積	革新的テーマ	確保
新方法論の創出		による産業界	科学技術政策
新産業観の確立		の先導	の主導
有用機能の発見		諸事業への	
有用物質の発見	知的所有権	情報移転、	企業の
有用プロセスの発見	確保	研究開発協力、	経済基盤強化
有用ツール		新事業創出	
人 材 育 成			

(GSC会議議長・和田昭允先生オリジナル・理研版を改造)



## 東北大学よりの講演

# 細菌膜孔形成毒素の 3D 構造解析から解明された 膜孔形成機構

### 神尾 好是(かみお・よしゆき)

東北大学名誉教授。東北学院大学環境防災工学研究所客員教授。  
尚絅学院大学客員教授。農学博士。医学博士。



1966年 3月 東北大学農学部農芸化学科卒業  
1972年 3月 東北大学大学院農学研究科農芸化学専攻博士課程修了  
1972年 4月 朝日麦酒株式会社入社、中央研究所勤務  
1974年 7月 カリフォルニア大学バークレー校博士研究員  
1976年 3月 イリノイ大学アバナ校博士研究員  
1977年 3月 信州大学医学部助教授  
1987年 11月 東北大学農学部助教授  
1994年 7月 東北大学農学部教授  
1998年 4月 東北大学大学院農学研究科教授  
2006年 4月 東北大学名誉教授

現在は東北学院大学環境防災工学研究所客員教授ならびに尚絅学院大学客員教授

専門は応用微生物学、細菌毒素学

1987年 3月 日本農芸化学奨励賞受賞  
1999年 3月 日本農芸化学会賞受賞  
2002年 3月 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry 論文賞受賞

# 細菌膜孔形成毒素の3D 構造解析から解明された膜孔形成機構

神尾 好是(東北大学名誉教授、現東北学院大学客員教授、尚絅学院大学客員教授)

細菌は宿主への感染に際し様々な毒素を産生する。毒素の作用機構及び宿主防御系との関係を解明することは、抗生物質の乱用と耐性菌の出現という終わりのない競争から抜け出し、新しい感染症治療を考える上で欠くことができないテーマである。

病原細菌の溶血毒素は、宿主の防御系を攻撃して感染の成立を促進する病原因子であり、その多くが宿主細胞の細胞膜に穴を開けて細胞崩壊を誘導する膜孔形成毒素である。膜孔形成毒素は、水溶性タンパク質として菌体外に分泌されるが、標的細胞に結合すると大きく分子構造を変化して細胞膜へ入り込み、自己集合してチャネル超分子(毒素超チャネル)を形成する。例えば赤血球崩壊毒素は膜上で超チャネルを形成してヘモグロビンを漏出させる。一方、白血球崩壊毒素は、膜孔超分子を形成すると共に、ホスフォリパーゼ $A_2$ など膜酵素を活性化して白血球崩壊を促進する。しかし、細胞崩壊機構の全貌は未だに不明であり、特に、毒素分子が膜に突き刺さる仕組み、毒素分子の集合、および毒素超チャネルを介するシグナル伝達の仕組みは、未開拓の研究課題である。

黄色ブドウ球菌はシステイン残基を持たない2成分の蛋白質から構成される白血球崩壊毒素ロイコシジン並びに赤血球崩壊毒素 $\alpha$ -ヘモリジンを大量に細胞外に分泌する。本講演者等は1991年、黄色ブドウ球菌の上記2成分性血球崩壊毒素の遺伝子のクローン化に成功し、毒素による血球崩壊機構の分子レベルでの究明を可能にしてきた。そして、(1)ロイコシジン並びに $\alpha$ -ヘモリジンはそれぞれLukFとLukS、LukFとHlg2から成り、LukFを共通成分とする2成分毒素であること、一方、PV-ロイコシジンはLukF-PVとLukS-PVから成る二成分毒素であること、(2)PV-ロイコシジン遺伝子は新規溶原ファージPVLゲノム上に存在し、ファージ感染によりロイコシジン生産性が伝播されること、(3) $\alpha$ -ヘモリジンの2成分は水溶性のモノマー分子として分泌され、標的細胞膜に結合して、4:3あるいは3:4比で交互に配置しながら分子集合し、ヘテロ7量中間体を経て劇的な構造変化を起こし、水不溶性の膜孔を形成し、最終的には数百個の膜孔が集合した直径約 $1\mu\text{m}$ の『超チャネル』を形成して赤血球を崩壊すること、(4)ロイコシジン活性にはLukSあるいはLukS-PVの白血球膜上でのプロテインキナーゼによるリン酸化が必須であること、等の新事実を明らかにしてきた。さらには、PVLの全ゲノム構造解析、並びに毒素成分の細胞崩壊特異性に係わるアミノ酸残基の同定、並びにヒト血清中におけるロイコシジン並びに $\alpha$ -ヘモリジン活性阻害物質の発見と同定に成功した。また(5)米国コロンビア大学・Eric Gouaux博士との共同研究でLukFの3D構造を解析し、水可溶性モノマーとして分泌される毒素成分が標的細胞膜上で水不溶性分子へ構造変化を起こす機構を解明した。さらに2003年には東北大学先進医工学研究機構教授樋口秀男博士との共同研究で、(6)LukFの3D構造解析結果に基づいてLukF並びにHlg2の化学修飾誘導体を作製し、「1分子測

定技術」を駆使して、 $\alpha$ -ヘモリジンにおいて「プレステム保持7量体から成る膜孔中間体」を発見すると共に、下図に示す毒素分子の標的細胞膜上で起こる時々刻々の構造変化を可視化追跡し、毒素2成分の標的細胞間及び毒素成分間のナノレベルでの相互作用、膜孔形成過程、並びに『超チャネル』形成機序の全貌を解明した。

本研究の成果は本毒素にとどまらず、広く生物由来の膜孔毒素の作用機構に新概念を植え付ける重要なものとなるばかりでなく、細胞膜上における水可溶性蛋白質分子のダイナミックな構造変化を伴う水不溶性超分子形成機構の理解に大きな示唆を与え、“膜における蛋白質のナノ構造の変化を1分子で追跡する”新研究分野の創設となった。さらに毒素の作用を抑制することによる感染抑止剤の開発等、医学的応用面においてもさらに進展する事が期待できる。

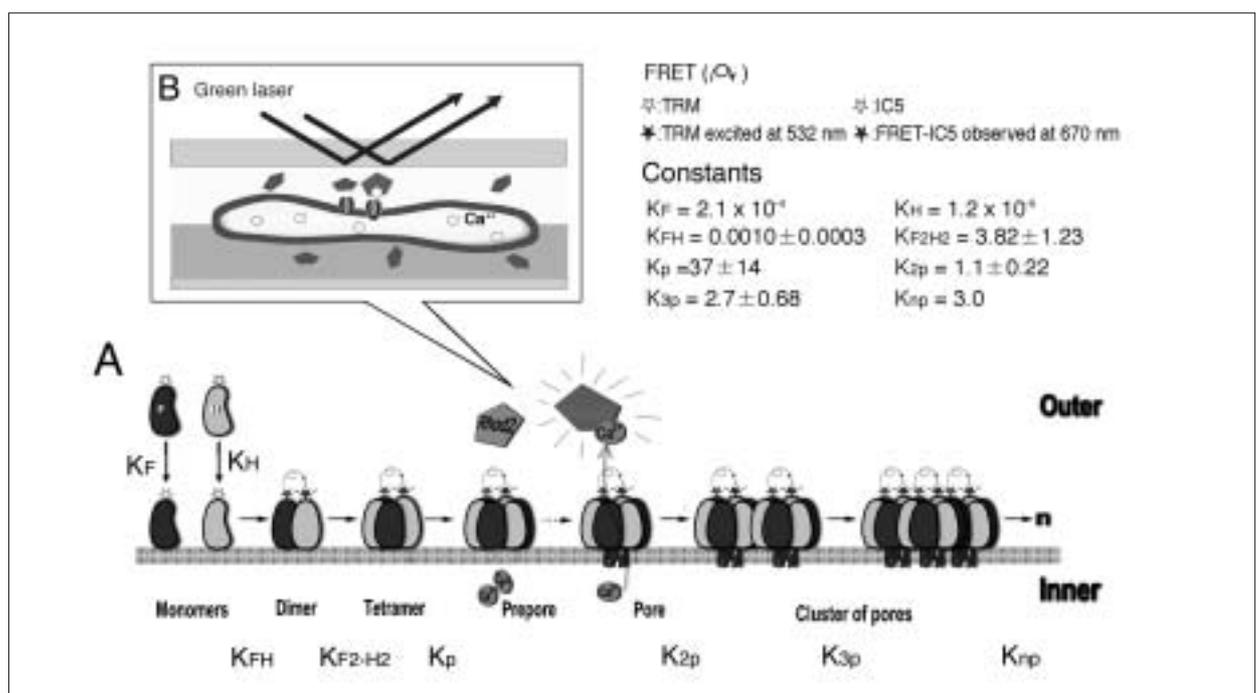


図 ヒト細胞膜上における  $\alpha$ -ヘモリジンの膜孔『超チャネル』の形成機構

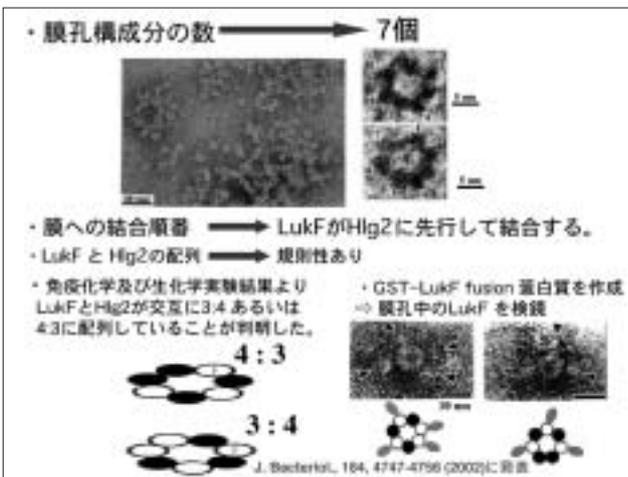
(1)水溶性 LukF の Y72 残基を介した初発の細胞膜への結合並びに LukF 結合で助長される水溶性 Hlg2 の細胞膜への結合が起き、次に(2) LukF の S34 残基と Hlg2 の Q29 残基間での疎水結合による[LukF-Hlg2] 2量体が形成される。続いて(3) 2量体の集合による4量体が形成され、これに2量体が結合し6量体が形成される。さらに(4) LukF もしくは Hlg2 の6量体への組み込みによる7量体プレステム中間体(preopore)が形成される。続いて(5)プレステムの伸長によるステムが形成され、ヘテロ7量体から成る一つの膜孔(pore)の形成が完了する。ここでステム形成には LukF の W177 と W198 残基の細胞膜上のフォスファチジルコリンのコリン部位への結合が必須である。最後に、(6) 50 ~ 数百個の膜孔が細胞膜上で自己集合して『膜孔超チャネル』が形成される。本超チャネルの形成に伴う細胞膜の陥没が起き細胞内のヘモグロビンの急激な漏出が起き赤血球の崩壊が起きる。



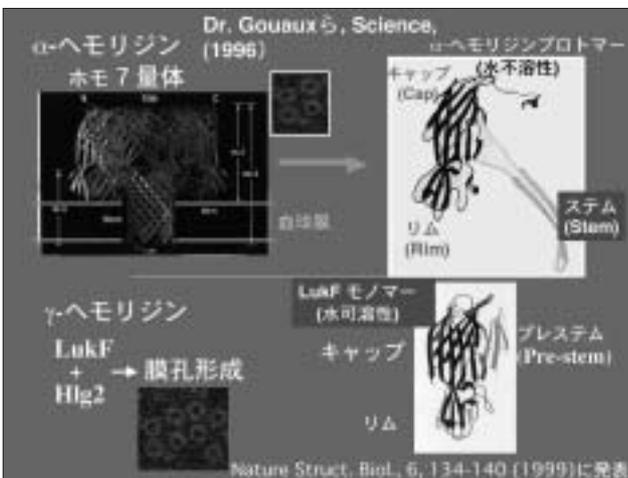
no.05



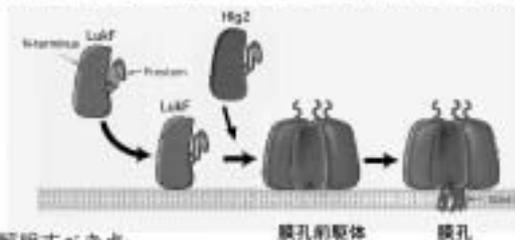
no.06



no.07



### 予想される $\gamma$ ヘモリジンの赤血球細胞上での構築機構



解明すべき点:

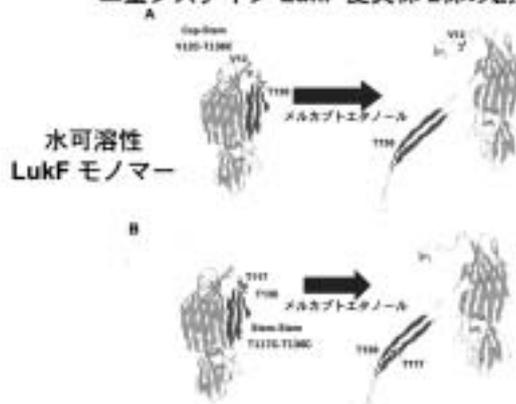
- ・1個の膜孔に何個の LukF と Hlg2 が存在するのか?
- ・結合順序が存在するか?
- ・1個の膜孔において、LukF と Hlg2 の配列に規則性があるのか?
- ・標的細胞上でどのようにして LukF and Hlg2 が集合するのか?
- ・集合過程で上記の膜孔前駆体 が存在するか?
- ・標的細胞への LukF の初発の結合に関与するアミノ酸残基は何か?
- ・膜孔形成のタイミングは何か?

ヘテロ7量体の膜孔前駆体が存在するか?

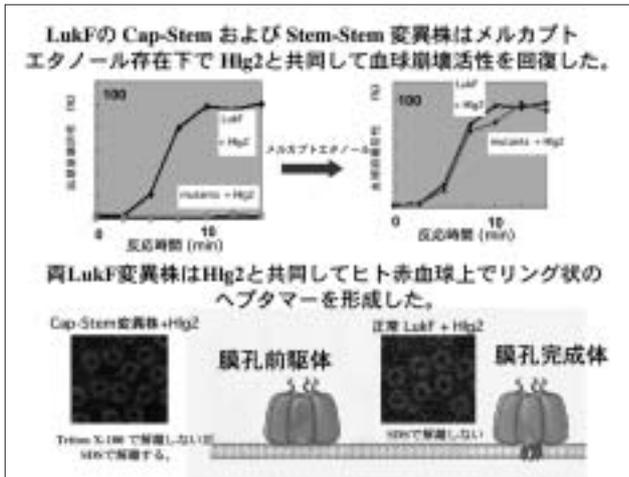


膜孔前駆体 (ヘテロ7量体) を人工的に創成してその存在を検討した。

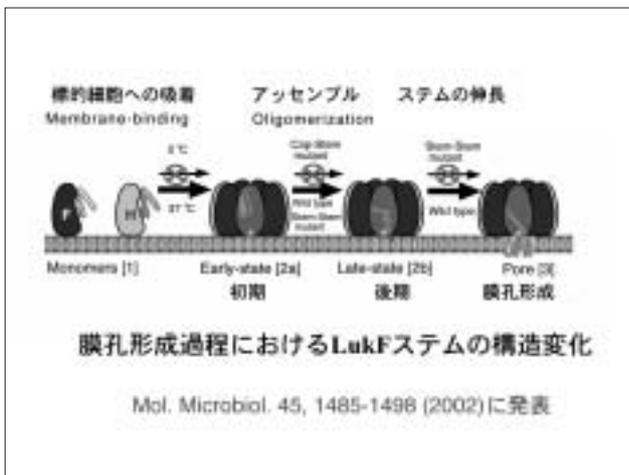
### 二重システイン LukF 変異株 2株の創成



no.11



no.12



no.13

1分子観察技法を駆使しての  
γヘモリジン膜孔形成の  
リアルタイム追跡  
(Real-time visualization of assembly of γ-hemolysin  
components by single molecule technique)



## 招待講演

# 日本における Chemical Biology 研究

### 長野 哲雄(ながの・てつお)

東京大学大学院薬学系研究科薬品代謝化学教室教授。

1972年 3月 東京大学薬学部卒業  
1977年 3月 東京大学薬学系大学院博士課程修了  
1977年 12月 東京大学薬学部助手  
1983年 8月 米国デューク大学医学部 Research Associate  
1986年 4月 東京大学薬学部助教授  
1996年 5月 東京大学薬学部教授  
1997年 4月 東京大学大学院薬学系研究科教授(大学重点化)  
2004年 4月 東京大学大学院薬学系研究科・副研究科長  
2006年 4月 東京大学大学院薬学系研究科教授 現在に至る  
2006年 3月から現在 日本薬学会副会頭



現在は Chemical Biology(生命現象を分子レベルで解明する事を目的として、生理活性分子の可視化ならびに受容体・酵素の新規活性制御法開発)に関する研究を行っている。

2006年日本薬学会賞(社団法人日本薬学会)2005年島津賞(財団法人島津科学技術振興財団)2004年上原賞(財団法人上原記念生命科学財団)ほか受賞歴多数。

主たる編著書として、「創薬化学」(長野、夏莉、原 編著、東京化学同人)、「NO 化学と生物」(学会出版センター)、「新版 錯体化学」(講談社サイエンティフィック)など多数。

# 日本における Chemical Biology 研究

長野 哲雄(東京大学大学院薬学系研究科)

## 1. Chemical Biology とは

新しい分析法あるいは機能解析法は従来の研究スタイルを大きく変えることがある。ライフサイエンス研究においてはノックアウト動物の作出技術やRNAiなどはその良い例である。これらの技術の出現によって、酵素や受容体などの生体機能分子の生理作用の解明が格段に進展した。今ではこれらの方法を全く使用しないライフサイエンス研究は考えられない。Chemical Biology は、ノックアウト技術やRNAiに見られるような新たな機能解析手段を提供し、研究の新展開を促す可能性を秘めた学問である。

Chemical Biology は「化学的観点から、あるいは化学的手法を用いて生命現象を解明する学問分野」と定義できる。DNA、RNA あるいはタンパク質などの生体高分子あるいはCa<sup>2+</sup> や一酸化窒素のような生理活性分子と特異的に相互作用する低分子化合物を開発し、これらを用いて生体分子の機能解析さらに生命現象の解明を行うもので、化学をツールとして生命科学を展開することになる。しばしばBiochemistryと比較されるが、BiochemistryはBiologistが化学物質あるいは化学反応に基づいて生命現象を理解しようとするものであり、一方、Chemical Biologyは化学的な手段を用いて生命現象を解明しようとするものである。この点で両者の考え方は大きく異なる。

現在行われているChemical Biology研究はその内容から分子イメージング(特に、Cell Biology等の基礎科学分野では蛍光を用いた光イメージングが重要)に関する研究と生体制御に関するケミカルジェネティクス研究に分けられる。

前者はグリーン蛍光タンパク質(GFP)などの蛍光タンパク質や機能性蛍光プローブを用いて生体分子の動的な解析を行い、生命現象の解明に資するものである。米国のTsienや日本の宮脇(理研)、梅澤(東大院理)、演者等のグループにより活発に展開されている。後者の生体制御に関するChemical Biologyは低分子化合物で細胞の機能を制御する研究分野であり、ケミカルジェネティクスと呼ばれている。このような生体高分子を制御する低分子化合物は医薬品開発におけるリード化合物になる可能性を秘めており、低分子化合物の創製は基礎科学だけではなく、医療産業への貢献も大きい。

## 2. 化合物ライブラリーの必要性

生体高分子を特異的に制御する低分子化合物を創製するためにはどのような基盤整備をする必要があるだろうか？

例えば、タンパク質のX線構造解析データがあったとしても有機合成化学者は直ちに高い特異性を有した低分子化合物を開発できるわけではない。これは医薬品の開発と全く同じである。タンパク質のX線構造解析データは低分子化合物を分子設計する上で強力な情報になることはもちろんである。しかし、そのほかに、ランダムに活性をスクリーニングできる化合物ライブラリーが必要不可欠である。一般に製薬企業は50万種類以上の化合物を保有していると言われている。これは製薬企業のかげがえのない財産であり、公にすることはもちろんない。生体高分子の制御化合物探索の第一歩は化合物ライブラリーからスクリーニングによりヒット化合物を見つけ出すことである。化合物ライブラリーなしには特異性のある低分子化合物の開発は不

可能に近い。しかし残念なことに、現在の日本には公的化合物ライブラリーは存在しない。それに対して、スクリーニング系に適用できる(あるいは“したい”)疾患関連の生体高分子を研究している研究者は数多くいる。

ライブラリーの構築と共にスクリーニングシステムの構築およびヒット化合物をリード化合物にまで持ち上げる有機合成システムの構築の3者が有機的に連携して、はじめて実りある Chemical Biology 研究分野が構築でき、切れ味鋭い実用的機能性低分子化合物が創出できることになる。

### 3. Chemical Biology 研究の現状

Chemical Biology 研究については、現在日本のみならず欧米でも活発な展開が見られる。学術雑誌だけを見ても、Cell Press から Chemistry & Biology が発刊されていたが、2005年にはNature Chemical Biology が創刊され、2006年にはアメリカ化学会から ACS Chemical Biology が刊行された。

日本においては、2005年春に日本 Chemical Biology 研究会が発足した。これは、今まで日本薬学会、日本化学会あるいは日本生化学会などに分散していた Chemical Biology 研究者が共通に情報交換できる場として設立されたものである。日本では個々には優れた研究を行っている研究者もいるが、上述の公的化合物ライブラリーの例にみられるように基盤が整備されていなかったため、研究の効率は極めて悪かった。2006年5月には東京一ツ橋で日本 Chemical Biology 研究会第1回年会が開催され、今年が日本における Chemical Biology 研究元年に位置づけられる。

本講演においては、日本の Chemical Biology 研究の現状を具体例を交えながら解説したい。

no.01

文部科学省タンパク3000プロジェクト  
『第5回 産学連携フォーラム in 信州』  
2006年6月30日

**日本におけるChemical Biology研究**

東京大学大学院薬学系研究科  
長野 哲雄

no.03

**ケミカルバイオロジーの現状**

大学等の対応

- Harvard(米) : Dept of ChemistryをDept of Chem& Chem Biolに改組 (1996)
- Cornell University (米) : 同様の改組 (1998)
- Scripps Institute (米) : The Skaggs Institute for Chemical Biologyを設立 (1996)
- University of Leicester (英) : Centre for Chemical Biologyを設立 (2001)
- University of Leeds (英) : MSc (修士課程) in Chemical Biologyを設立 (Wellcome Trustから7.5万ポンド (10億円換) の間接支援, 2003)
- EMBL Heidelberg (独) : Chemical Biology Core Facilityを設立 (2004)

NIHの研費戦略5本柱の一つ

- システムバイオロジー
- ケミカルバイオロジー
- 構造生物学
- バイオインフォマティクス
- ナノメディシン

新専門雑誌の創刊

- BMC Chemical Biology 2001年創刊
- Cell PressのChemistry & Biology刊行
- Nature Chemical Biology 2005年創刊
- RCS(英・王立化学協会)Molecular BioSystems 2005年
- ACS (米・化学会) Chemical Biology 2006年

no.02



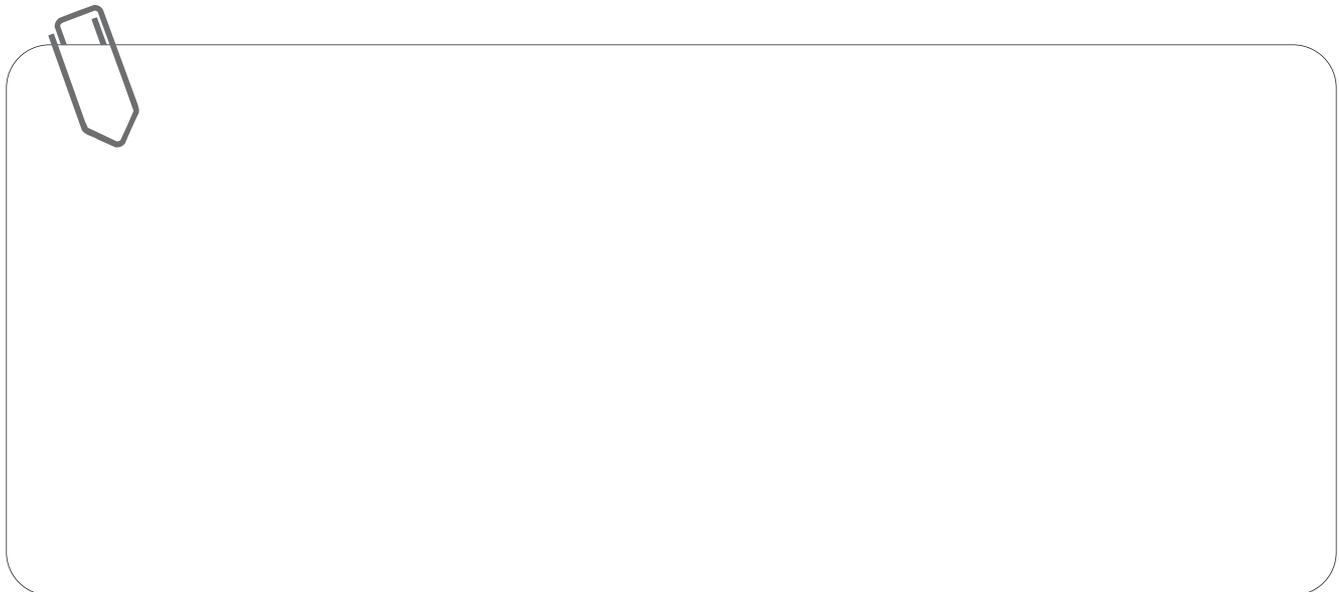
no.04

**化学と工業** 4

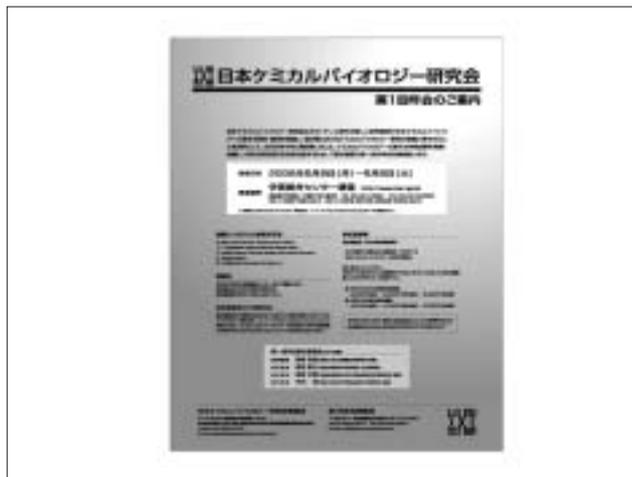
日本化学会会員誌「化学と工業」  
2008年4月号

**細胞工学** 11

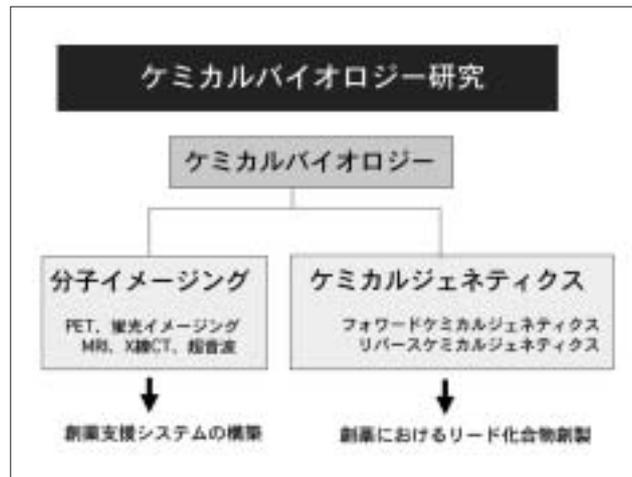
Cell Biologyの専門雑誌  
2005年11月号



no.05



no.07



no.06



no.08

**講演概要**

これからの生命科学研究の重要な課題の一つとして、

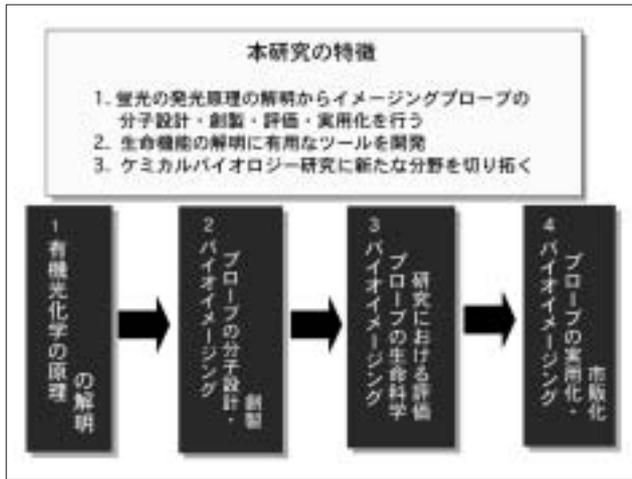
“生きている状態”の細胞あるいは生体組織中から生理活性分子を時間と場所を特定して、その活性あるいは量を的確に捉え、生理活性分子のダイナミックな変化を解析することが挙げられる。

↓

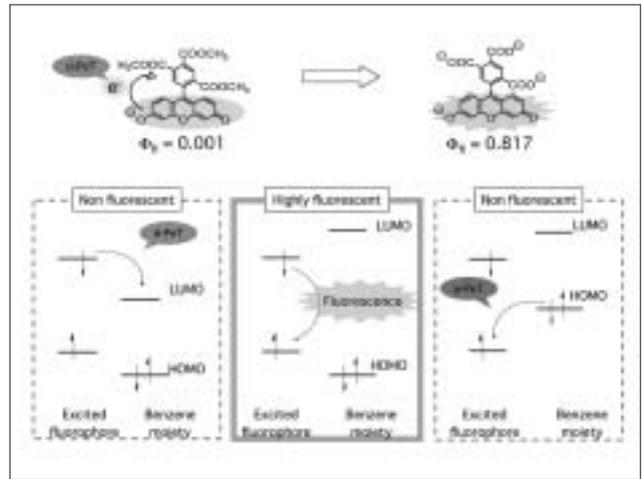
このための強力なツールとなるバイオイメージングプローブを論理的に分子設計する方法について講演する。開発したプローブの有用性についても生細胞、生体組織への応用を紹介する。



no.09



no.11



no.10

**講演内容**

1. バイオイメージングプローブの分子設計原理
2. 一酸化窒素蛍光プローブ
3. 亜鉛蛍光プローブ
4.  $\beta$ -ガラクトシダーゼ蛍光プローブ
5. タンパク質の可視化プローブ

no.12

**開発に成功した生体可視化プローブ**

市販中の可視化プローブ

- 【蛍光プローブ】...
- 一酸化窒素 (NO) プローブ (DAF-2, DAF-FDA, DAFFM, DAF-FM DA, DARAM, DAR-AM, DA, DA-MO, DAC) ● Various Esterase プローブ
- Highly Reactive Oxygen Species (D-1, HFF, APT)
- Zn<sup>2+</sup> プローブ (ACF1, DAF-2, DAF-2 DA, DAF1, DAF, DAF-R-2)
- H<sub>2</sub>O<sup>2</sup> プローブ (2'-CF)
- 一酸化炭素 (CO) プローブ (BFAI, DNK)
- caspase プローブ ● Anion プローブ (TZ413-C6)
- phosphatase プローブ (PF)
- protein tyrosine phosphatase プローブ (PTP) ● OD プローブ
- 1-Galactosidase プローブ ● Glucosidase プローブ
- Alkaline phosphatase プローブ
- 【酵素免疫蛍光プローブ】... 蛍光ラジカル/イオン検体
- 【活性酸素検出プローブ】... n-ethylmaleimide

**【展示・広告掲載企業一覧】(50音順)**

シスメックス株式会社.....	60
ゾイジーン株式会社.....	61
独立行政法人宇宙航空研究開発機構.....	62
ナカライテスク株式会社.....	63
フリューダイト株式会社.....	64

バイオ分野・タンパク質の研究・開発に

## 粒子径、ゼータ電位、分子量を1台で計測



- ①小容量分析 (12 $\mu$ L $\sim$ )
- ②高感度粒子径測定 (0.6nm $\sim$ 6000nm)
- ③広濃度範囲 (0.1 ppm $\sim$ 40%w/v)

測定項目 (原理)	ゼータ電位 (M3-PALS)	粒子径 (NIBS)	分子量 (静的光散乱法)
測定範囲	3nm - 10 $\mu$ m	0.6nm - 6000nm	1000 - 2 $\times$ 10 <sup>7</sup> Da
Nano ZS	●	●	●
Nano S	—	●	●
Nano Z	●	—	—

(注) 実際の仕様は試料と溶媒によって異なります。

### ●利用事例

- ・溶液中タンパク質の動的変化のモニタリング
- ・タンパク質結晶化のスクリーニング
- ・タンパク質の相互作用評価
- ・DDSキャリアーの分散条件評価 など

### [多彩なオプションと付属品]

- ・MPT-2(自動液定装置)
- ・各種サンプルセル
- ・標準物質(粒子径とゼータ電位)

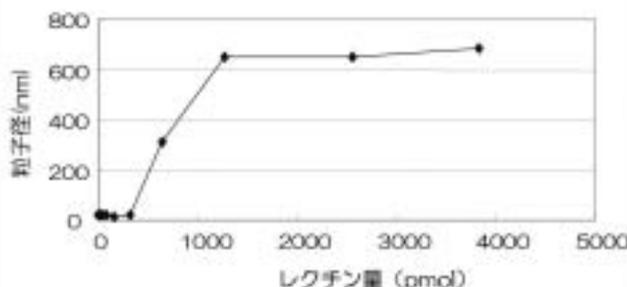


自動液定装置 MPT-2

### 測定事例-①

#### 機能性タンパク質の結合活性

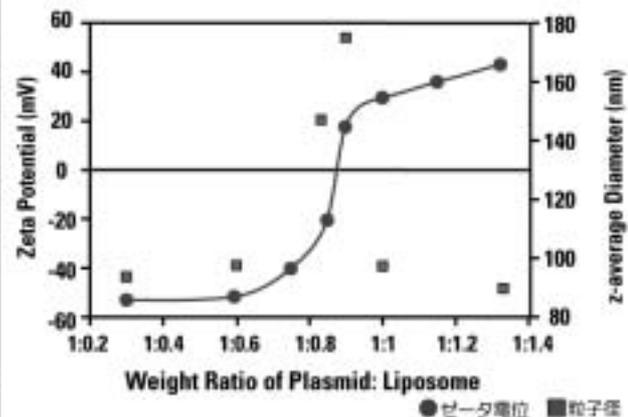
グルコースと特異的に結合するレクチン Concanavalin A(ConA)とマルトース(グルコースの $\alpha$ 1,4 結合で形成される2糖)を側鎖に持つポリマーとの結合の様子を観察。約500pmol存在する条件下で反応が進行し始めていることがわかる。これを他のタンパク質と比較することで親和性評価への利用が期待できる。



### 測定事例-②

#### リボソームの表面装飾

カチオン性リボソームとプラスミドの最適比率の決定にゼータ電位を測定する。



お問い合わせ

**シスメックス株式会社** 科学計測事業部

受託測定、デモのご依頼を随時受け付けております

<http://particle.sysmex.co.jp/>

粒子計測専用フリーダイヤル

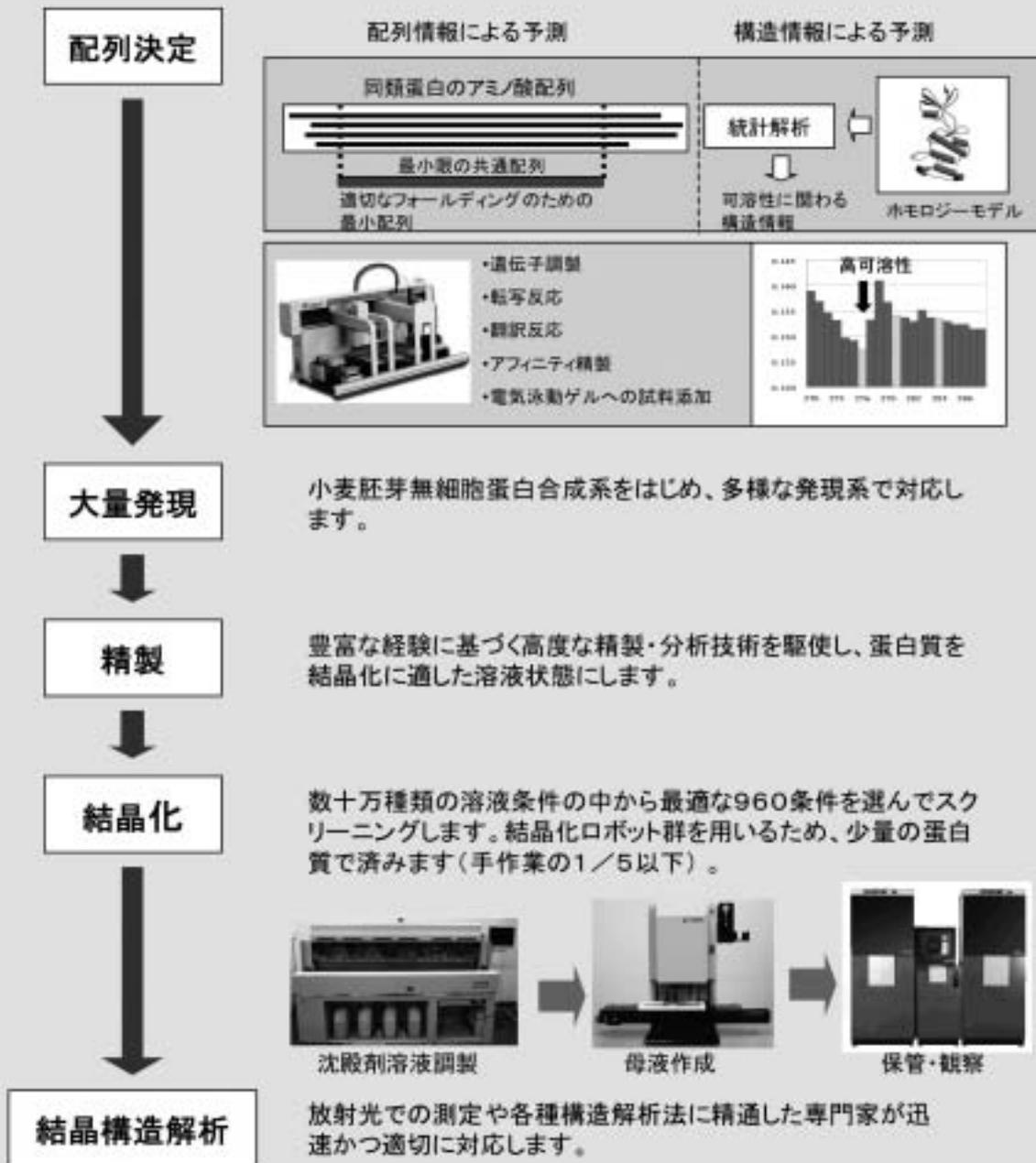
0120-57-17-14

神戸: 千651-2271 神戸市西区高塚台4丁目4番4号 TEL: 078-991-2091 FAX: 078-997-9976  
東京: 千113-0033 東京都文京区本郷2丁目30番11号 TEL: 03-3814-5146 FAX: 03-3814-5068

## ゾイジーンの受託サービス

### 蛋白質の結晶構造解析

可溶性機能ドメインの配列決定は、結晶化・構造解析を成功させるコツだといわれています。ゾイジーンでは小麦胚芽無細胞蛋白質合成の技術をおおいに利用した、配列決定受託サービスもおこなっています。確実な結晶化・構造解析ステップへ進むために是非ご利用ください。また、お客様の蛋白質をお預かりし、性状分析・結晶化・構造解析も致します。



※各サービスの個別受託も承ります  
※期間・価格については お気軽にお問い合わせください

**ゾイジーン** 株式会社

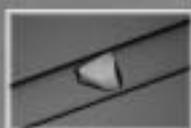
神奈川県横浜市青葉区鶴志田町1000番地 (三菱化学グループ横浜研究センター内)  
TEL 045-963-4516 FAX 045-963-4518  
URL: <http://www.zoegene.co.jp>

宇宙航空研究開発機構（JAXA）は  
タンパク質の構造解析とその応用に貢献するため  
宇宙環境を利用して高品質なタンパク質結晶を  
取得するサービスを提供しています



<連絡先>

(独) 宇宙航空研究開発機構  
宇宙環境利用センター  
茨城県つくば市千現2-1-1  
Tel: 029-868-3643  
Fax: 029-868-3956  
mail: crystal@jaxa.jp

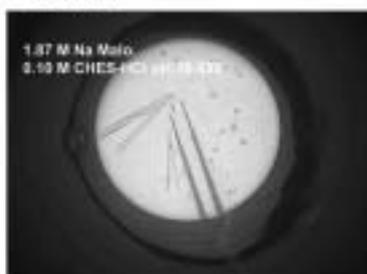




## タンパク質結晶化試薬

X線構造解析用の結晶化試薬原液タイプ27品目をご用意致しましたので ご紹介させていただきます。タンパク質結晶化試薬は、独立行政法人 理化学研究所 播磨研究所 先端タンパク質結晶学研究グループの技術指導のもとに製造しております。

### ■使用例



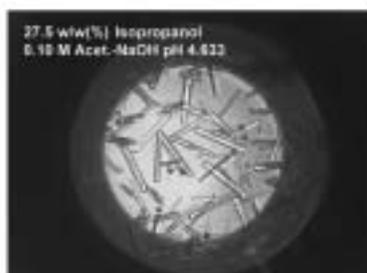
1.87 M Na Malo  
0.10 M CHES-HCl pH 5.33



20 w/w(%) MPD  
0.10 M Citr.-HCl pH 5.46



1.93 M Amm. Sulf.  
0.10 M Citr.-HCl pH 5.3  
10 w/w(%) Dioxane



27.5 w/w(%) Isopropanol  
0.10 M Acet.-NaOH pH 4.823



12.5 w/w(%) PEG-4K  
0.10 M Tris-HCl pH 8.544



1.10 M Li Sulf.  
0.10 M Acet.-NaOH pH 4.9

データご提供：独立行政法人 理化学研究所 播磨研究所 先端タンパク質結晶学研究グループ

## タンパク質受託研究サービス

プロテインウェーブ社ではタンパク質のX線結晶構造解析受託研究サービスを実施しております。結晶化スクリーニング用に理化学研究所が開発した自動結晶化観察ロボットシステム、ファインクリスタル(TERA II)を導入したプロテインウェーブ社のサービスをご案内致します。



全自動結晶化観察ロボットシステム ファインクリスタル (TERA II型)

- 発現系の構築からX線結晶構造解析まで一貫した短納期受託サービス体制を構築
- 発現系として大腸菌、昆虫細胞、バキュロウイルス系に対応
- 全自動結晶化・観察ロボットシステム“TERA”を利用
- “TERA”導入に関して理化学研究所・播磨研究所が技術支援

### TERAの基本性能

- 結晶化
  - ・初期スクリーニング3,600条件
  - ・オプションでさらに1,000条件
- 結晶の評価
  - ・自動観察による結晶化チェック
  - ・画像の収集と判定
- 最適化
  - ・結晶条件の絞り込み

## ナカライテスク株式会社

〒604-0855 京都市中京区二条通烏丸西入東五層町498

Web site

<http://www.nacalai.co.jp>

価格・納期のご照会 フリーダイヤル：0120-489-552

製品に関するご照会 TEL：075-211-2703 FAX：075-211-2673

E-mail：info-tech@nacalai.co.jp

# Do more with less. 超微量のサンプルで 最大の成果を タンパク質結晶化用 TOPAZ®システム

Fluidigm 

今よりも効率的な構造解析法をお探しの方に、最高のシステムをご紹介します。拡散法を基本とした結晶化テクノロジーであるTOPAZシステムが、結晶化条件の決定と面折用結晶の育成の全行程をラボで実現します。TOPAZには多くの有用な機能が統合されており、時間と資源を最大限に活用することができます。従来法と比較して1回の試験で使用するサンプル量をはるかに少なく抑えながら、これまで求められていたスループット、利便性、信頼性も向上しています。

少ないサンプルでいかに多くの成果を得ることができるか、ぜひご覧ください。TOPAZソリューションで成功を収めた創薬ベンチャー企業であるRx<sup>3</sup> Pharmaceuticalsの実例を無料でご提供いたします。今すぐお問い合わせください。

## スループット

TOPAZ 896スクリーニングチップは、1試験につき15 nL未満というわずかなサンプル量で768種類の結晶化試験を同時に実施することができます。



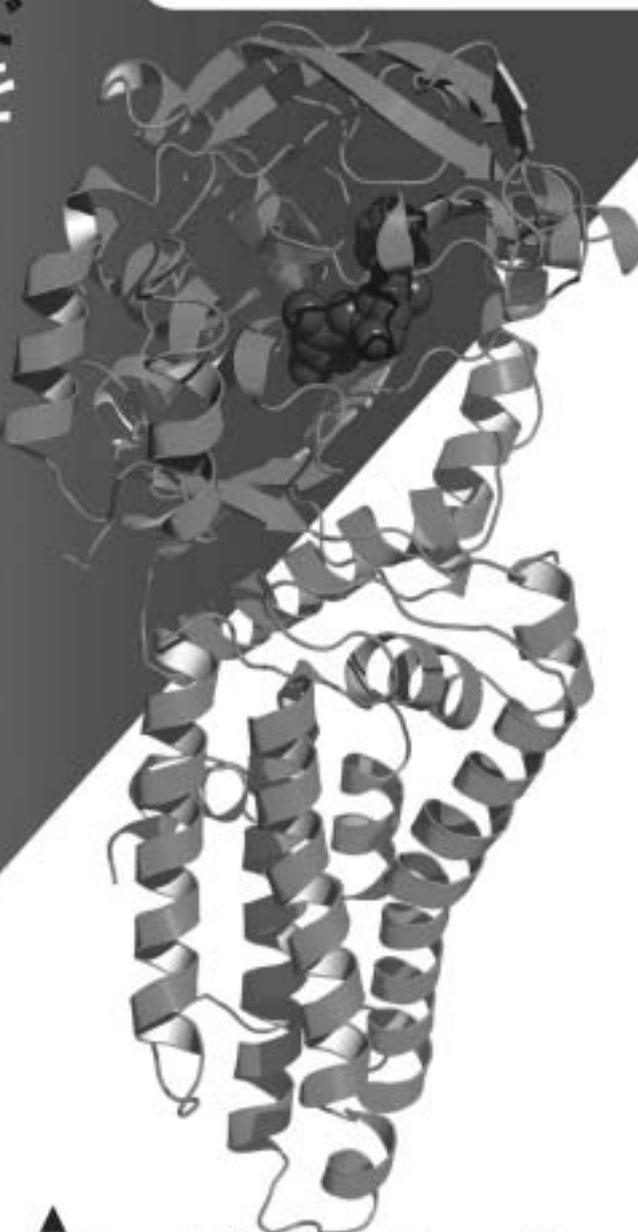
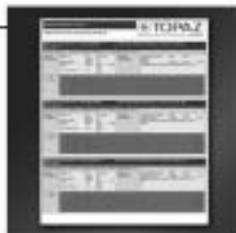
## 利便性

TOPAZソフトウェア・スイートを用いて試験のセットアップから解析までのワークフローを管理することで、短時間で試験結果を得ることができます。



## 信頼性

TOPAZスクリーニングチップは結晶化条件から不要ファクターを無くすことで、実験の再現性と自動画像分析の精度を高めました。試験結果のレポートは、最も結晶化率の高い条件だけを表示するよう簡単に設定することができます。



▲ Rx<sup>3</sup> Pharmaceuticals社 (<http://www.rx3pharma.com/>)が解析した、グラム陽性病原体から得られたメチオニルトRNAシナーゼのインヒビター結合体構造。TOPAZシステム利用しているラボで2005年に解明された、30を超える構造のうちの1つです。

[www.fluidigm.com/topaz](http://www.fluidigm.com/topaz)

© Fluidigm Corporation. All rights reserved. Fluidigm, the Fluidigm logo, and TOPAZ are trademarks or registered trademarks of Fluidigm Corporation in the U.S. and/or other countries.

FLUIDIGM CORPORATION  
7180 SHORELINE COURT, SOUTH SAN FRANCISCO, CA 94080  
PHONE: 650.256.6900 FAX: 650.871.7152

フリューダイム株式会社  
〒104-8041 東京都中央区新富1-1-7 新富アイビービル4階  
電話: 03-3555-2351 FAX: 03-3555-2352

【ポスター 一覽】

ポスター番号	プログラム名	領域名	表題	発表者名	研究機関
P-01	網羅的解析プログラム		RSGI と産学連携	田中仰子	理化学研究所ゲノム科学総合研究センター
P-02			タンパク質試料調製技術	青木雅昭, 今高寛晃, 白水美香子	理化学研究所ゲノム科学総合研究センター
P-03			タンパク質合成技術・標識技術の高度化	坂本健作, 平尾一郎	理化学研究所ゲノム科学総合研究センター
P-04			X線関連技術	山本雅貴, 新海曉男, 国島直樹	理化学研究所ゲノム科学総合研究センター
P-05			NMR 関連技術	小林直宏, Peter Guntert, 山崎俊夫, 前田秀明	理化学研究所ゲノム科学総合研究センター
P-06			NMR 解析バイブライソ	木川隆則, 井上 真, 小柴生造	理化学研究所ゲノム科学総合研究センター
P-07			タンパク質構造の応用技術(1)	松尾洋, 泰地真弘人, 廣田洋	理化学研究所ゲノム科学総合研究センター
P-08			タンパク質構造の応用技術(2)	梅山秀明, 佐藤万仁, 大貫裕之	理化学研究所ゲノム科学総合研究センター
P-09			解析タンパク質の例(1)感染症関連(ウイルス, 細菌)	倉光成紀, 松本武久, 別所義隆	理化学研究所ゲノム科学総合研究センター
P-10			解析タンパク質の例(2)ヒトの疾患関連タンパク質	半田徳子, 斉藤謙平, 林 文晶, 村山和隆	理化学研究所ゲノム科学総合研究センター
P-11			発生・分化とDNAの複製・修復の構造プロテオミクスと産学連携	田之倉優	東京大学大学院農学生命科学研究科
P-12		発生・分化とDNAの複製・修復	活性化酸素生成酵素の構造と反応機構および創薬	岡本研, 松村智裕, 草野輝男, 川口裕子, 松本浩二, 近藤史郎, 福成篤, 西野朋子, 西野武士	日本医科大学大学院医科生物化学分野、富士薬品(株)、帝人ファーマ、三菱ウエルファーマ
P-13			真核生物の祖先サームプラズマのDNA複製と細胞骨格関連タンパク質の解析	根本直樹, 山岸明彦	東京薬科大学生命科学部
P-14			シトクロムP450norの構造と機能	大島理絵子, 伏信進矢, 祥雲弘文	東京大学大学院農学生命科学研究科
P-15			「転写・翻訳」北海道中核拠点の取り組み	拠点代表 田中勲	北海道大学
P-16	個別的解析プログラム		「転写・翻訳」サブ拠点の取り組み - 蛋白質調製に関する技術開発 -	田中良和 <sup>(1)(2)</sup> , 梅津光央 <sup>(1)</sup> , 熊谷泉 <sup>(1)</sup> , 津本浩平 <sup>(1)(2)</sup>	1) 東京大学大学院工学研究科、 2) 東京大学大学院新領域創成科学研究科
P-17			PFにおけるビームラインの高度化とロボティクスを用いた構造解析の自動化	若槻壮市, 加藤龍一, 五十嵐教之, 川崎政人, 松垣直宏, 平木雅彦, 山田悠介	高エネルギー加速器研究機構・物質構造科学研究所・構造生物学研究センター
P-18		翻訳後修飾と輸送	翻訳後修飾と輸送に関わるタンパク質群の構造機能解析	若槻壮市, 加藤龍一, 五十嵐教之, 川崎政人, 松垣直宏, 平木雅彦, 山田悠介	高エネルギー加速器研究機構・物質構造科学研究所・構造生物学研究センター
P-19			先天性筋ジストロフィーに関連する糖転移酵素	遠藤玉夫	財団法人東京都高齢者研究・福祉派興財団 東京都老人総合研究所
P-20			がん、マラリア、ウイルス感染を標的とした創薬指向型基礎研究 PF ビームラインを用いて得られた成果	田中信忠	昭和大薬学部
P-21			タンパク質高次構造形成と機能発現	三木邦夫, 野中 剛	京都大学大学院理学研究科
P-22		タンパク質高次構造形成と機能発現	単細胞生物由来分子シャペロン蛋白質の構造と機能に関する研究	養王田正文	東京農工大学大学院共生命科学技術研究部

ポスター 番号	プログラム名	領域名	表題	発表者名	研究機関
P-23			イオンチャネル・細胞増殖受容体を制御する NHERF と細胞接着を支えるERM タンパク質との複合体の構造と機能	寺脇慎一、三島(前崎)綾子、箱崎敏雄	奈良先端科学技術大学院大学・情報生命・構造生物
P-24			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 <sup>1)2)</sup> 、内藤雅人 <sup>1)</sup> 、稲垣冬彦 <sup>1)3)</sup>	1)北海道大学大学院薬学研究所、2)JSPS、3)タンパク 3000
P-25		細胞内 シグナル伝達	オートファジーに必須な二つの結合系に関わる Atg タンパク質群の網羅的構造解析	鈴木展生、松下美奈子、菅原健二、山田勇也、佐藤健二、藤岡博子、稲垣冬彦	北海道大学大学院薬学研究所 構造生物学分野
P-26			ヒト胎盤特異的HLA-G抗原の二量体の持つ強い免疫抑制シグナル伝達とその立体構造基盤	白石充典 <sup>1)</sup> 、黒木喜美子 <sup>1)</sup> 、梶川瑞穂 <sup>1)</sup> 、田畑栄一 <sup>1)</sup> 、中村聖子 <sup>1)</sup> 、福永裕子 <sup>1)</sup> 、尾瀬瀬之 <sup>1)</sup> 、ラスバラ リンダ <sup>1)</sup> 、白鳥行大 <sup>2)</sup> 、荒瀬 尚 <sup>2)</sup> 、神田大輔 <sup>1)</sup> 、前仲勝実 <sup>1)</sup>	1)九州大学生体防御医学研究ワクチン開発構造生物学分野、2)大阪大学微生物病研究所免疫化学分野
P-27			タンパク 3000 プロジェクト・個別的解析プログラム「脳・神経系」	個別的解析プログラム「脳・神経系」	
P-28			大阪大学蛋白質研究所生体超分子構造解析ヒームライン		大阪大学蛋白質研究所
P-29	個別的解析 プログラム	脳・神経系	創薬パリュウチエインによるPGD合成酵素の阻害剤開発	井上豪 <sup>1)2)</sup> 、門祐示 <sup>1)</sup> 、松村浩由 <sup>1)</sup> 、甲斐泰 <sup>1)</sup> 、福西快文 <sup>3)</sup> 、中村春木 <sup>4)2)</sup> 、木下普富 <sup>5)</sup> 、仲西功 <sup>6)</sup> 、南方聖司 <sup>7)</sup> 、小松満男 <sup>7)</sup> 、入倉大介 <sup>8)</sup> 、熊坂崇 <sup>8)</sup> 、山本雅貴 <sup>8)</sup> 、宮野雅司 <sup>8)</sup> 、有竹浩介 <sup>9)</sup> 、裏出良博 <sup>9)</sup> 、坂田恒昭 <sup>2)10)</sup>	1)大阪大学大学院工学研究科構造物理化学、2)NPO 法人バイオグリッド関西、3)産業技術総合研究所生物情報解析センター、4)大阪大学蛋白質研究所、5)大阪府立大学大学院理学系研究科、6)京都大学大学院薬学研究所、7)大阪大学大学院工学研究科精密合成化学、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-30			代謝系グループの全体概要	倉光成紀 <sup>1)</sup> 、増井良治 <sup>1)</sup> 、川端猛 <sup>2)</sup>	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
P-31			方法論の開発	倉光成紀 <sup>1)</sup> 、増井良治 <sup>1)</sup> 、杉尾成俊 <sup>2)</sup> 、安宅光雄 <sup>3)</sup> 、小林達彦 <sup>4)</sup> 、日ひ隆雄 <sup>5)</sup> 、黒川洋一 <sup>5)</sup> 、小田順一 <sup>5)</sup>	1)大阪大学大学院理学研究科、2)ソイジーン、3)産業技術総合研究所、4)筑波大学応用生物科学系、5)福井県立大学生物資源学部
P-32		代謝系	メラニン生成酵素「チロシナーゼ」の三次元構造	杉山政則、熊谷孝則、的場康彦	広島大学大学院医歯薬学総合研究科
P-33			超好熱菌由来色素依存性デヒドログナーゼを利用したバイオエレクトロセシンク	大島敏久 <sup>1)</sup> 、櫻庭春彦 <sup>2)</sup> 、川上竜巳 <sup>2)</sup> 、津下英明 <sup>3)</sup>	1)九州大学大学院農学研究科、2)徳島大学大学院工学研究科、3)徳島文理大学健康科学研究科
P-34			有用キラル化合物生産とタンパク質低温発現	三原久明 <sup>1)</sup> 、宮原郁子 <sup>2)</sup> 、広津建 <sup>2)</sup> 、栗原達夫 <sup>1)</sup> 、江崎信芳 <sup>1)</sup>	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

ポスター番号	表題	発表者名	研究機関
P-35	黄色ブドウ球菌由来 IsdH の NEAT ドメインの結晶構造解析	未垂由子 <sup>1)</sup> 、田中良和 <sup>1)2)4)</sup> 、黒田誠 <sup>3)</sup> 、津本浩平 <sup>1)2)</sup> 、太田敏子 <sup>3)</sup> 、田中勲 <sup>4)</sup> 、熊谷泉 <sup>1)</sup>	1)東北大学大学院工学研究科、 2)東京大学大学院新領域創成科学研究科、 3)筑波大学大学院人間総合科学研究科、 4)北海道大学大学院理学研究科
P-36	アルギニンを用いた新規蛋白質可溶化法とその機構解明	梅津光央 <sup>1)</sup> 、津本浩平 <sup>2)</sup> 、新田茂輝 <sup>2)</sup> 、阿尻雅文 <sup>1)</sup> 、熊谷泉 <sup>2)</sup>	1)東北大学多元物質科学研究所、 2)東北大学大学院工学研究科
P-37	抗EGFR 528 mAbを用いたヒト型化 diabody の <i>in vivo</i> 効果	浅野竜太郎、曾根由希子、川口博子、熊谷泉	東北大学大学院工学研究科
P-38	CHO 細胞を用いた diabody 調製系の構築と新規組換え型二重特異性抗体の開発検討	生駒桂子、浅野竜太郎、熊谷泉	東北大学大学院工学研究科
P-39	フアージ提示法を用いたヒト型化抗EGFR 抗体の親和性向上	中西猛、丸喬光、浅野竜太郎、熊谷泉	東北大学大学院工学研究科
P-40	金表面を認識するヒト抗体の創製	渡邊秀樹 <sup>1)</sup> 、塚塚秀則 <sup>2)</sup> 、今村剛士 <sup>2)</sup> 、熊谷泉 <sup>1)</sup>	1)東北大学大学院工学研究科、 2)キヤノン中央研究所
P-41	材料工学へ向けた抗体工学的应用	金崎健吾 <sup>1)</sup> 、渡邊秀樹 <sup>1)</sup> 、塚塚秀則 <sup>2)</sup> 、今村剛士 <sup>2)</sup> 、熊谷泉 <sup>1)</sup>	1)東北大学大学院工学研究科、 2)キヤノン中央研究所
P-42	金表面を標的とした多機能性抗体に関する研究	服部峰充 <sup>1)</sup> 、中西猛 <sup>1)</sup> 、梅津光央 <sup>2)</sup> 、阿尻雅文 <sup>2)</sup> 、熊谷泉 <sup>1)</sup>	1)東北大学大学院工学研究科、 2)東北大学多元物質科学研究所
P-43	新規ナノマテリアル結合抗体の作製	菅野貴成 <sup>1)</sup> 、梅津光央 <sup>1)</sup> 、水田真道 <sup>1)</sup> 、津本浩平 <sup>2)</sup> 、大原智 <sup>1)</sup> 、高見誠一 <sup>1)</sup> 、熊谷泉 <sup>2)</sup> 、阿尻雅文 <sup>1)</sup>	1)東北大学多元物質科学研究所、 2)東北大学大学院工学研究科
P-44	酸化金属ナノ構造体の作製	Carlos A. Del Carpio <sup>1)</sup> 、一石英一郎 <sup>2)</sup> 、Mohamed Ismael <sup>1)</sup> 、Abdul Rajjak <sup>1)</sup> 、裴強 <sup>1)</sup> 、坪井秀行 <sup>1)</sup> 、遠藤明 <sup>1)</sup> 、高羽洋充 <sup>1)</sup> 、久保百司 <sup>1)3)3)</sup> 、西島和三 <sup>1)3)3)</sup> 、宮本明 <sup>1)3)3)</sup>	1)東北大学大学院工学研究科、2)東北大学先進医学研究機構、3)科学技術振興機構さがけ、4)特田製薬株式会社、5)東北大学未来科学技術共同研究センター
P-45	ポストゲノム時代におけるタンパク質構造及び機能自動解析全般基盤システム MIAX	古山通久 <sup>1)</sup> 、笠原浩太 <sup>1)</sup> 、Mohamed Ismael <sup>1)</sup> 、本荘純博 <sup>1)</sup> 、Abdul Rajjak <sup>1)</sup> 、裴強 <sup>1)</sup> 、坪井秀行 <sup>1)</sup> 、遠藤明 <sup>1)</sup> 、高羽洋充 <sup>1)</sup> 、久保百司 <sup>1)2)</sup> 、Carlos A. Del Carpio <sup>1)</sup> 、西島和三 <sup>3)4)</sup> 、寺崎哲也 <sup>5)6)</sup> 、宮本明 <sup>1)4)</sup>	1)東北大学大学院工学研究科、2)科学技術振興機構さがけ、3)特田製薬株式会社、4)東北大学未来科学技術共同研究センター、5)東北大学大学院薬学研究科、6)科学技術振興機構SORST
P-46	薬物体内動態研究への統合化計算化学アプローチ	内田康雄 <sup>1)</sup> 、上家潤一 <sup>1)2)</sup> 、大槻純男 <sup>1)2)</sup> 、寺崎哲也 <sup>1)2)</sup>	1)東北大学大学院薬学研究科、 2)科学技術振興機構SORST
P-47	ABC トランスポーターの大規模基質スクリーニングを可能にするLC-MS/MS-Cocktail 法の開発	上家潤一 <sup>1)2)</sup> 、勝倉由樹 <sup>1)</sup> 、大槻純男 <sup>1)2)</sup> 、寺崎哲也 <sup>1)2)</sup>	1)東北大学大学院薬学研究科、 2)科学技術振興機構SORST
P-48	LC-MS/MSを用いたトランスポータータンパク質の大規模定量測定法の開発		

東北大学

発表番号	表題	発表者名	研究機関
P-48	機能性タンパク質のフォークシング	眞野成康 <sup>1)</sup> 、後藤順一 <sup>1)2)</sup>	1)東北大学大学院薬学研究科、 2)東北大学病院薬学部
P-49	銅輸送膜タンパク質 Ctrl のメチオニンモノマーへの銅の結合	斎藤志帆、三浦隆史、竹内英夫	東北大学大学院薬学研究科
P-50	セドサイシンファミリ酵素 kumamolisin-As の構造と触媒部位変化	大久保安由美、中山亨	東北大学大学院工学系研究科 バイオ工学専攻
P-51	B 細胞における転写因子 MatK および Bach2 蛋白質複合体の解析	加藤恭文 <sup>1)</sup> 、井倉毅 <sup>1)</sup> 、星川裕 <sup>2)</sup> 、野田哲生 <sup>2)</sup> 、武藤哲彦 <sup>1)</sup> 、五十嵐和彦 <sup>1)</sup>	1)東北大学大学院医学系研究科医科学専攻 細胞生物学講座生物化学分野、2)財団法人 癌研究会ゲノムセンターゲノム多様性プロ ジェクト
P-52	遺伝情報の維持と発現に関する蛋白質の立体構造解析	伊藤晋敏 <sup>1)2)</sup> 、村山和隆 <sup>1)2)</sup> 、寺田貴帆 <sup>2)3)</sup> 、 白水美香子 <sup>2)3)</sup> 、倉光成紀 <sup>3)4)</sup> 、横山茂之 <sup>2)3)5)</sup> 、 五十嵐和彦 <sup>6)</sup>	1)東北大学先進理工学研究機構、2)理化学 研究所ゲノム科学総合研究センター、 3)理化学研究所播磨研究所、4)大阪大学大 学院理学系研究科、5)東京大学大学院理学 系研究科、6)東北大学大学院医学系研究科
P-53	歯周病患者唾液中に検出される歯炎作用を持つ ラクトフェリン分子の性状と産生機構	小峯健一 <sup>1)2)</sup> 、黒石智誠 <sup>1)</sup> 、小澤亜紀子 <sup>3)</sup> 、小峯優美子 <sup>2)</sup> 、 南匠 <sup>3)</sup> 、島内英俊 <sup>3)</sup> 、菅原俊二 <sup>1)</sup>	1)東北大学大学院歯学研究科口腔分子制御 学、2)株式会社多機能性蛋白研究所、3)東北大 学大学院歯学研究科歯内歯周治療学
P-54	伸展刺激を受けた歯根膜細胞は、TACE 発現を増加させ RANKL 修飾を介して破骨細胞形成を活性化しない	菅崎弘幸 <sup>1)</sup> 、千葉美麗 <sup>2)</sup> 、荒井季実子 <sup>1)</sup> 、山本照子 <sup>1)</sup>	1)東北大学大学院歯学研究科口腔保健発育 学講座顎口腔矯正学分野、 2)東北大学大学院歯学研究科口腔保健発育 学講座口腔障害科学分野
P-55	魚類卵由来 L-Rhamnose 結合特異性レクチンの構造 及び機能相関	渡邊康春 <sup>1)</sup> 、小川智久 <sup>1)</sup> 、村本光二 <sup>1)</sup> 、中村修 <sup>2)</sup> 、渡辺翼 <sup>2)</sup> 、 神谷久男 <sup>2)</sup>	1)東北大学大学院生命科学科学研究科、 2)北里大学水産学部
P-56	魚類ガレクチンの耐熱化構造要素の解析	今野歩 <sup>1)</sup> 、伊藤由鷹 <sup>1)</sup> 、小川智久 <sup>1)</sup> 、村本光二 <sup>1)</sup> 、 堀生 光山くらら <sup>2)</sup> 、白井剛 <sup>2)</sup>	1)東北大学大学院生命科学科学研究科、 2)生物分子工学研究所
P-57	アルカリ耐性枯草菌 NKS21 由来サチライシン ALPI の 超高分解能結晶構造解析	黒河博文 <sup>1)</sup> 、古山種俊 <sup>1)</sup> 、阿部敬悦 <sup>2)</sup> 、内田隆史 <sup>2)</sup> 、 山形洋平 <sup>2)</sup>	1)東北大学多元物質科学研究科、 2)東北大学大学院農学研究科
P-58	ズブチリンをモデルとしたタンパク質の アルカリ耐性機構の解析	山形洋平 <sup>1)</sup> 、阿部敬悦 <sup>1)</sup> 、黒河博文 <sup>2)</sup> 、古山種俊 <sup>2)</sup> 、 内田隆史 <sup>1)</sup>	1)東北大学多元物質科学研究科、 2)東北大学大学院農学研究科
P-59	組換えタンパク質発現細胞アレイの構築および 電気化学的活性評価	長峯邦明 <sup>1)</sup> 、大原典子 <sup>1)</sup> 、小野寺志穂 <sup>1)</sup> 、栗原愛 <sup>1)</sup> 、安川 智之 <sup>1)</sup> 、珠玖仁 <sup>1)</sup> 、浅野竜太郎 <sup>2)</sup> 、熊谷泉 <sup>2)</sup> 、永永智一 <sup>1)</sup>	1)東北大学大学院環境科学研究科環境科学 専攻、2)東北大学大学院工学研究科バイオ 工学専攻

東北大学

実行組織：タンパク 3000 プロジェクト産学連携フォーラム実行委員会

実行委員長

東京大学大学院農学生命科学研究科・教授 田之倉 優

実行副委員長

持田製薬株式会社 開発本部・主事 西島 和三

実行委員

北海道大学大学院薬学研究科・教授 稲垣 冬彦

大阪大学大学院理学研究科・教授 倉光 成紀

北海道大学大学院理学研究科・教授 田中 勲

大阪大学蛋白質研究所・教授 中川 敦史

横浜市立大学大学院国際総合科学研究科・教授 西村 善文

京都大学大学院理学研究科・教授 三木 邦夫

理化学研究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 横山 茂之

高エネルギー加速器研究機構・物質構造科学研究所・教授 若槻 壮市