

タンパク質生産技術開発に基づく 「タンパク質発現ライブラリー基盤」の構築

生産
C1

代表機関：理化学研究所生命分子システム基盤研究領域
代表研究者：横山茂之

背景

- タンパク質の構造と機能を調べるには、タンパク質の合成・精製・結晶化が必要
- 重要な生命現象を担う膜タンパク質や巨大な複合体タンパク質は、特に合成・精製・結晶化が困難

成果

- 構造と機能を保持した状態の膜タンパク質を大量につくる技術を開発
- 脂質メソフェイズ法の技術開発を進め、複数の膜タンパク質の結晶化に成功
- タンパク質に非天然型アミノ酸を効率よく導入する世界初の新規酵素を開発

タンパク質の構造と機能を調べるためには、目的のタンパク質を大量に合成・精製して質のよい試料を用意しなければなりません。X線結晶構造解析によって立体構造を知るには、さらにこの試料を結晶化させることも必要です。しかし、重要な生命現象を担うタンパク質には、生体膜に埋まっている“膜タンパク質”や、さまざまな分子が結合した巨大な“タンパク質複合体”もあり、これらの合成や結晶化は特に困難です。私たちは、こうした難解析タンパク質を合成・精製・結晶化するための優れた技術を体系的に整備して、数多くの選択肢の中から各タンパク質に最適な方法を選択できるようにし、本プログラム内の多くの研究グループと連携を行ってきました。

膜タンパク質の多くは、膜に埋まっていないとその構造や機能を維持できません。そのため、私たちは膜に埋まった状態のタ

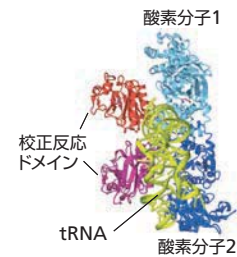
ンパク質を合成する技術の開発に力を入れました。以前に開発した無細胞タンパク質合成系を基本とし、さらに界面活性剤をうまく利用してタンパク質の合成と人工の脂質二重膜の形成を同時に行わせ、活性をもった膜タンパク質を合成する方法を開発しました。また、複合体タンパク質についても、無細胞タンパク質合成系の最適化や、生細胞の系における発現系の構築により、合成に成功しています。

さらに、膜タンパク質の結晶化のために、私たちは脂質メソフェイズ法の開発も進めています。タンパク質の性質に合わせた液晶材料の開発や、実験機器、実験手法の開発等により、複数の膜タンパク質の結晶化に成功しています。

一方で、非天然型アミノ酸をタンパク質に導入する多数の技術も確立しました。この技術により、タンパク質に新規な性質や

人為的な修飾を施すことが可能になります。例えば、蛍光をもつ非天然型アミノ酸を導入することで、細胞内で相互作用するようすとらえたり、複合体の構造解析に活用したりできます。また、非天然型アミノ酸としてヨードチロシンを導入すると、ヨードチロシンに含まれるヨウ素がX線結晶構造解析の際に強力な目印となるので、導入したタンパク質は、通常の実験室に設置可能な小型のX線発生装置でも立体構造解明に必須な位相決定を容易に行うことができるようになります。私たちは、より確実に非天然型アミノ酸を導入するために、「校正」機能のある新規酵素を世界で初めて開発しました。

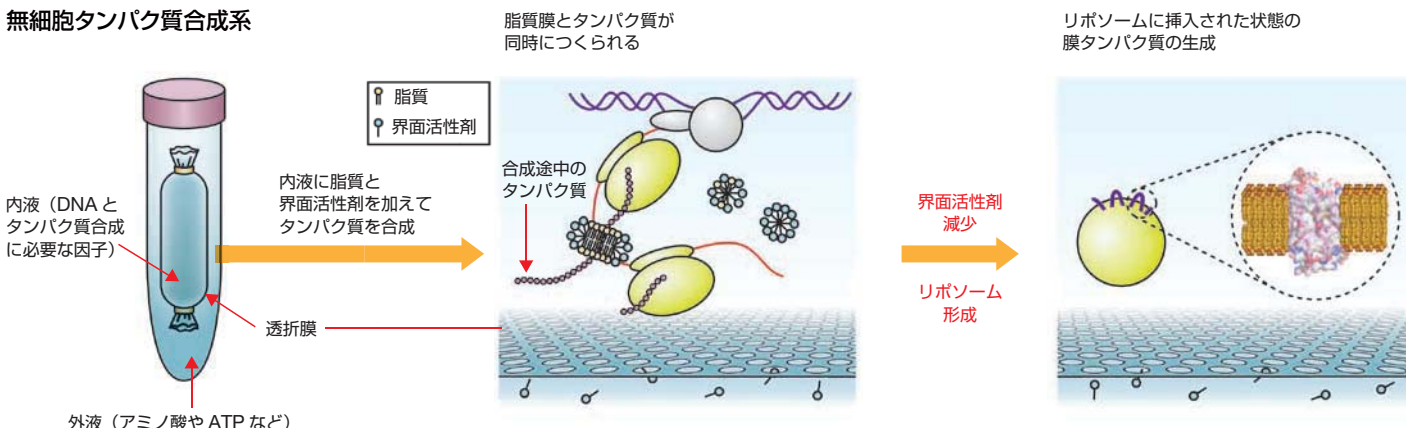
今後は、こうした要素技術を高度化し、新規開発も行うことで、合成・精製・結晶化を自由自在に行えるシステムの構築を目指し、プログラム内外の多様なニーズに応えたいと思います。



ヨードチロシンをタンパク質に組み込むtRNAをつくる酵素。X線結晶構造解析による立体構造情報をもとに酵素を設計し、まちがったアミノ酸をtRNAに結合させないように校正機能をもたせた。

図版提供：横山茂之

無細胞タンパク質合成系



開発した膜タンパク質の合成法。反応液に脂質と界面活性剤を加えておき、透折により、界面活性剤の濃度を徐々に下げることによって、膜タンパク質合成と脂質二重膜（リボソーム）の構築を同時に行わせる。これにより膜に埋め込まれた状態の膜タンパク質が得られる。

図版提供：横山茂之

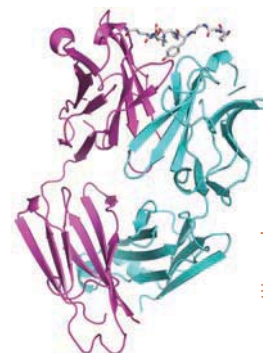
新規タグ技術を中心とした膜蛋白質・細胞外蛋白質の高品質生産と精製システムの開発



代表機関：大阪大学蛋白質研究所

代表研究者：高木淳一

- 背景**
- ヒトのタンパク質を研究するには、ヒトなど哺乳動物の細胞につくらせるほうがよい
 - しかし、哺乳動物細胞にタンパク質をつくらせる場合、タンパク質を持続的に、たくさん生産する細胞クローンを選別するのが難しい
 - タンパク質を精製することは、結晶化させるにも、機能を研究するにも重要
- 成果**
- 新しいタグ（TARGET タグ）を開発し、これを用いてタンパク質をたくさん生産する動物細胞クローンの選別に成功
 - 第2のタグとして、目的タンパク質から簡単に切り離せる eTEV タグを開発
 - 2つのタグの組み合わせで、どんなタンパク質でも簡単に検出・定量・精製が可能に



TARGET タグペプチド（棒模型で示す）と抗体の複合体の構造。
提供：高木淳一

タンパク質の構造と機能を解析するための試料は、大腸菌につくらせることが多いのですが、ヒトのタンパク質を大腸菌につくらせると、構造や機能が本来とは違ってしまうことがあります。このため、医療や創薬へ応用を考えれば、ヒトのタンパク質はヒトなど哺乳動物の細胞につくらせるほうがよいのです。しかし、哺乳動物細胞を使う場合、目的のタンパク質をたくさんつくる細胞を選別するのがむずかしく、そのことが大きなネックとなっています。

一方、私たちは、目的のタンパク質にタグ（荷札）をつけておき、このタグを見分

けて結合する抗体を用いることで、タンパク質を精製する技術を開発してきました。抗体を固定しておいて、さまざまなタンパク質の入った溶液を流すと、タグのついたタンパク質だけを抗体が捕まえます。そのタンパク質を、あとから別の液体で流し出すのです。すでに、繰り返し使えてコストも安いシステムを完成させています。

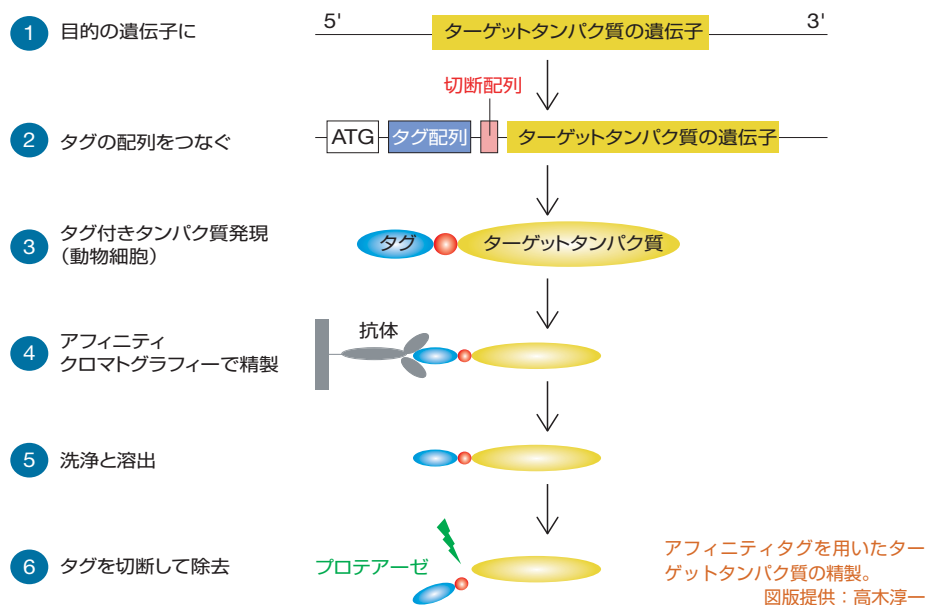
そこで、この技術を活用して、細胞の培養液の上清（上澄み）に目的のタンパク質が含まれているかどうかを判定し、目的のタンパク質をたくさんつくる細胞を簡単に選別する方法を開発しました。この技術の

ポイントは、タグと抗体がきちんと結合するようにすることです。そのために、私たちは、抗体が認識するタグのアミノ酸の並び方の特徴を突き止め、それをもとに、抗体との結合に優れたタグを設計し、TARGET タグと名づけました。実際に、このタグを使って、「医薬B3」グループのターゲットであるNPP2をつくる哺乳動物細胞を選別することができ、「医薬B4」グループとの連携では、sema6Aとプレキシニンについて、細胞選別から結晶化、構造決定まで成功しました。

また、第2のタグとして、eTEV というタグを用いる精製システムも開発しました。こちらの場合、eTEV をきちんと見分ける抗体をつくるのがポイントでした。eTEV タグは、ある酵素を使うと、目的のタンパク質から簡単に切り離すことができます。この特徴を生かして、eTEV タグとTARGET タグをタンデムにつなぎ、どんなタンパク質でも簡単に検出・定量・精製、さらにはタグの除去ができる「ダブルタグ」システムを構築しました。

抗体を用いたタグシステムのほかに、膜タンパク質や微量の可溶性タンパク質に対し、未精製状態でも蛍光ラベルができる ABZip タグシステムも開発しています。

このように、私たちは「タグ」を利用してタンパク質を見分ける技術を開発することで、解析が困難なタンパク質の研究に貢献しています。



膜タンパク質結晶化の 革新的支援法の開発

代表機関：京都大学大学院薬学研究科

代表研究者：加藤博章

背景

- 膜タンパク質は大量合成も結晶化も難しいことが、構造解析のネックとなっている
- 結晶化能を判定する技術はいろいろあるが、より正確で、より速い技術が求められている

成果

- 高感度で、結晶化能の判定に適した分離のできる電気泳動法を開発した
- メタノール資化性酵母の小器官ペルオキシソームに、ヒト由来の膜タンパク質を局在化した状態で生成できた

膜タンパク質は、生命現象においても、創薬のターゲットとしても重要です。しかし、大量合成も結晶化も難しいことが、構造解析のネックとなっています。

そこで私たちは、ヒトを中心とする真核生物の膜タンパク質について、結晶化するかどうか（結晶化能）を少ない試料で迅速に判定する技術（スクリーニング）と、膜タンパク質を大量に生産する技術を開発してきました。開発した技術で、「食環A4」グループ、「食環B2」グループの研究を支援しました。

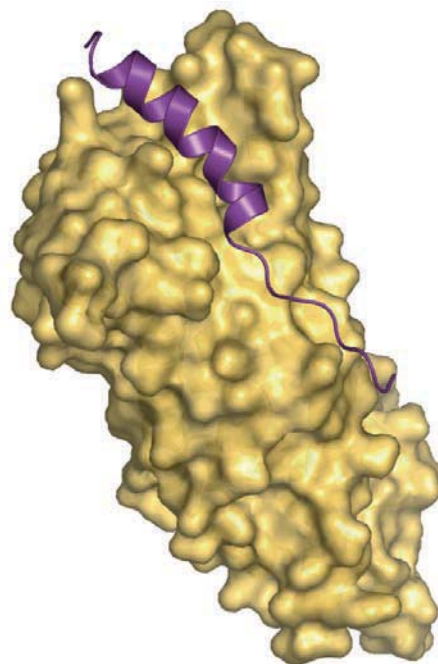
結晶化能のスクリーニング技術として開発したのは、GFP融合タンパク質In-gel蛍

光Native電気泳動法です。これは、目的のタンパク質にGFP（蛍光タンパク質）を付加しておき、電気泳動で分離した後、蛍光で検出するものです。微量のタンパク質でも検出できるよう、検出感度の向上を図りました。また、タンパク質の結晶化能は、そのタンパク質の溶液中での分散状態（単独のもの、2個、3個・・・と集まったものの比率）に大きく左右されます。私たちは、この分散状態が的確に現れるような電気泳動の条件を見いだしました。この手法は、多数の試料の結晶化能を同時に評価するのに利用できると期待しています。

一方、膜タンパク質の大量合成法として、

メタノール資化性酵母を用いる方法を開発しています。この酵母は、メタノールを与えて培養すると、ペルオキシソームという細胞内の小器官が大きくなります。そこで、酵母にヒトの膜タンパク質をたくさんつけさせ、このペルオキシソームの膜に集めようと考えたのです。しかし、細胞内には、ほかにも膜で囲まれた小器官があり、つけさせたタンパク質がそちらの膜に入ってしまうという問題が起きました。

そこで、ヒトの細胞でペルオキシソームの膜にタンパク質を運ぶはたらきをするPex19pというタンパク質をこの酵母に導入し、ヒト由来のペルオキシソーム膜タンパク質をつくらせたところ、このタンパク質がペルオキシソーム様の膜に入ってくれました。この研究には、Pex19pとその受容体であるPex3pの複合体の構造解析に成功したことが大いに役立ちました。今後は、この手法をほかの膜タンパク質にも応用できればと考えています。



ヒトPex3p-Pex19p (1-44) 複合体の結晶構造。ペルオキシソーム膜タンパク質群を輸送するPex19pの断片（紫色）が、その受容体であるPex3p（黄色）に結合している。

図版提供：加藤博章

抗体を用いた 膜蛋白質結晶化技術の確立

代表機関：京都大学大学院医学研究科

代表研究者：岩田 想

背景

- 膜タンパク質を生体膜から溶かしだすのに使われる界面活性剤は、結晶化を阻害する
- 膜タンパク質の特定の部位に結合する抗体を使うと、結晶化を促進できる

成果

- 哺乳類由来の膜タンパク質に対し、高い親和性をもつ抗体を効率よく作製する技術を確立
- 膜タンパク質と抗体の複合体では結晶化が促進され、単体結晶に比べ分解能が向上した

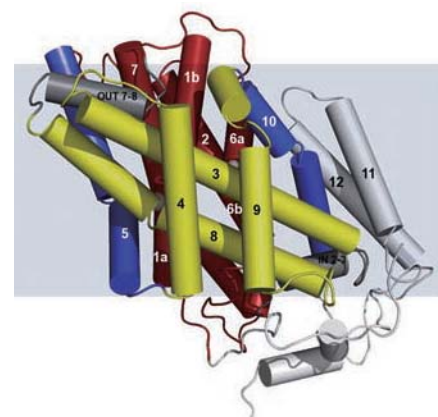
膜タンパク質の構造解析が難しい原因の1つは、結晶化の過程にあります。タンパク質を結晶化させるためには、いったん水に溶かす必要があります。膜タンパク質は水に溶けにくい領域が多いため、界面活性剤を使用しますが、この界面活性剤の集合体（ミセル）が膜タンパク質を覆うため、結晶ができにくくなってしまいます。

この問題を解決するため、私たちは、膜タンパク質の特定部分に結合する抗体を利用する方法を世界で初めて試み、1995年に細菌の膜タンパク質の結晶を得て構造解析を成功させました。抗体が結合することで膜タンパク質の一部が安定化し、水に溶けやすい部分が広がるため、結晶化しやすくなるのです。そこで、本課題では、この技術をあらゆる膜タンパク質に適用することを目指して開発を進め、目標を達成することができました。

抗体はマウスの免疫機構を用いて作製し

ます。従来は、膜タンパク質の精製標準品や部分オリゴペプチドを抗原としてマウスに与え、抗体を作製していました。しかしこの方法では、哺乳類由来の膜タンパク質に対して親和性の高い抗体を得るのは困難でした。そこで、膜タンパク質を、細胞膜でのかたちを保持したまま、マウスに与えることのできる技術を開発しました。この技術によって、ターゲットとする膜タンパク質ごとに、その立体構造を認識する抗体を効率よく作製することが可能になりました。さらに、マウスのつくる抗体の中から、目的の抗体を選び出すためのスクリーニング技術を開発し、時間的およびコスト的な問題を改善しました。

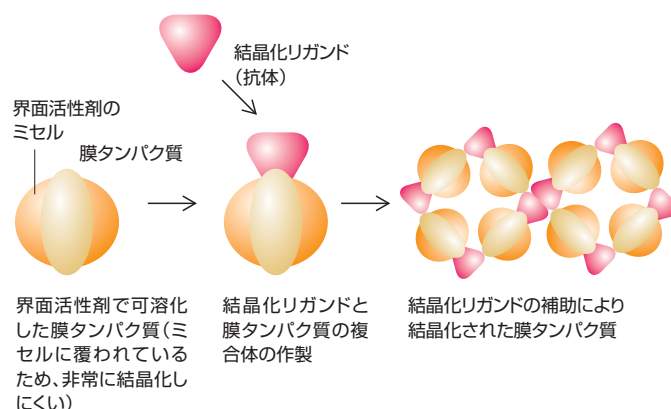
開発した技術により、実際に、数種の哺乳類由来の膜タンパク質に対して親和性の高い抗体をつくることに成功しました。一部については、膜タンパク質と抗体の複合体を結晶化して構造解析を行い、抗体を使



ヒダントイン輸送体 (Mhp1) の構造。輸送機構が解明され、ヒトの神経疾患の病態解明や治療法の開発につながる可能性もある。
図版提供：岩田 想

用しない場合に比べてずっと高分解能で解析できることを確かめました。

開発した技術を生かして、新たなタンパク質の構造決定にも取り組んでいます。その1つとして、ミクロバクテリウムという細菌の細胞膜にあるヒダントイン輸送体 (Mhp1) の構造を解析し、それに基づいて輸送のメカニズムを明らかにしました。ヒトの神経伝達物質輸送体も、同様のメカニズムをとっていると考えられていることから、この知見はヒトの神経疾患の病態解明や治療法の開発につながる可能性があります。



抗体を用いた膜タンパク質の結晶化の原理。抗体が結晶化リガンド（結晶化の際に特定のタンパク質部分に結合する物質）の役割をする。
図版提供：岩田 想

高難度タンパク質をターゲットとした放射光X線結晶構造解析技術の開発

代表機関：高エネルギー加速器研究機構物質構造科学研究所

代表研究者：若槻壮市

背景

- 放射光X線は、タンパク質結晶構造解析に威力を発揮する
- しかし、重要なタンパク質には、小さな結晶しか得られないものが多い
- また、タンパク質に重原子で目印をつけると、構造解析はしやすくなるが、結晶化しにくくなる

成果

- 10 μm角以下の微小結晶でも構造解析のできる「超高輝度マイクロビーム」用のビームラインが完成
- 重原子を導入せずに構造解析のできる「低エネルギーマイクロビーム」用のビームラインが完成
- 周辺技術も開発が進む

複雑なタンパク質の構造を解析するのに、放射光X線を用いて結晶からデータを得る方法は強力です。しかし、重要な生命現象や病気にかかわるタンパク質は、結晶が得られたとしても小さく、結晶性が悪い場合がほとんどです。また、構造解析を行いやすくするため、タンパク質に重原子を導入して目印とする手法がありますが、その場合も結晶は得にくいのです。こうした問題を乗り越えて結晶構造解析を行うため、私たちは、日本にある2つの放射光施設で、これまでより優れたX線ビームを得るためのビームラインを開発しました。

その1つであるSPring-8では、小さな

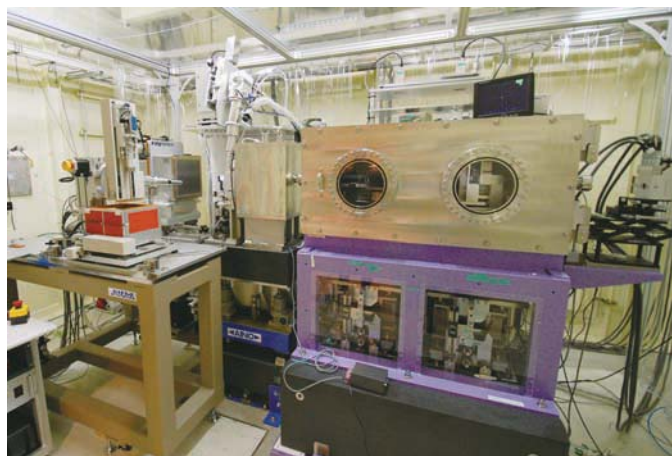
結晶による回折実験のために、1 μm平方以下に集光された「超高輝度マイクロビーム」をつくるのに成功しました。このビームは世界最高の集光度を誇り、10 μm角以下の微小結晶でも構造解析が可能です。これまでは最低でも20~30 μm角の結晶が必要だったので、今回の成果により、大きな結晶の得にくいタンパク質にも構造解析の道が開かれたことの意義は非常に大きいと言えます。

もう1つの放射光施設、Photon Factoryでは、波長の長い(=エネルギーの低い)「低エネルギーマイクロビーム」用のビームラインが完成しました。波長の長いX線を使

うと、人工的に重原子を導入しなくても、タンパク質の中にもともとある硫黄原子が手がかりとなるので、天然のタンパク質をそのまま構造解析に使うことができます。そのため、波長の長いX線ビームを整備することは、結晶構造解析の適用範囲を広げるのにとても重要なのです。

一方、私たちは、ビームラインと合わせて使用する結晶の操作・加工技術や解析の効率化技術の開発にも取り組んでいます。例えば、微小結晶では、強いX線をあてないとデータを測定できませんが、強いX線は結晶に損傷を与えます。このため、ビームの強さや結晶の大きさと損傷の程度の間関係を詳しく調べ、最適なデータ収集を行えるよう、データの収集法や処理法を開発しています。

2つのビームラインは、平成22年秋から本格的な利用が始まる予定です。プログラム外の研究者も利用することができ、広く課題の募集が行われています。それぞれに特徴をもつ2つのビームラインが、本プログラムだけでなく、日本のタンパク質研究を加速するものと期待しています。



SPring-8の超高輝度マイクロビームによる微小結晶解析を可能にする実験ステーション。
写真提供：理化学研究所 山本雅貴（分担研究者）



Photon Factoryの低エネルギーマイクロビームをつくる短周期アンジュレータ。
写真提供：若槻壮市

固体 NMR 膜蛋白質複合体構造解析技術

代表機関：大阪大学蛋白質研究所

代表研究者：藤原敏道

背景

- 固体 NMR は膜タンパク質の構造解析法の 1 つとして期待されている
- しかし、感度と分解能（見分ける力）が低いという欠点がある

成果

- モデルタンパク質で、固体 NMR 法により構造解析が行えるめどが立った
- 電子を利用した新たな測定法により、感度を 30 倍まで向上させることに成功した

タンパク質の構造解析に使われる核磁気共鳴（NMR：Nuclear Magnetic Resonance）法では、通常、タンパク質を水などの液体に溶かして測定します。液体中ではタンパク質が高速で動き回るため、向きによる信号の違いが平均化されるからです。しかし、細胞膜などではたらく膜タンパク質は、水に溶かすと構造が変わってしまいます。そこで、膜内にある状態で固体のまま測定する「固体NMR法」を用いることが考えられます。しかし、この方法には感度と分解能（見分ける力）が低いという欠点があります。それを現実に使用可能なレベルまで向上させるのが、私たちの研

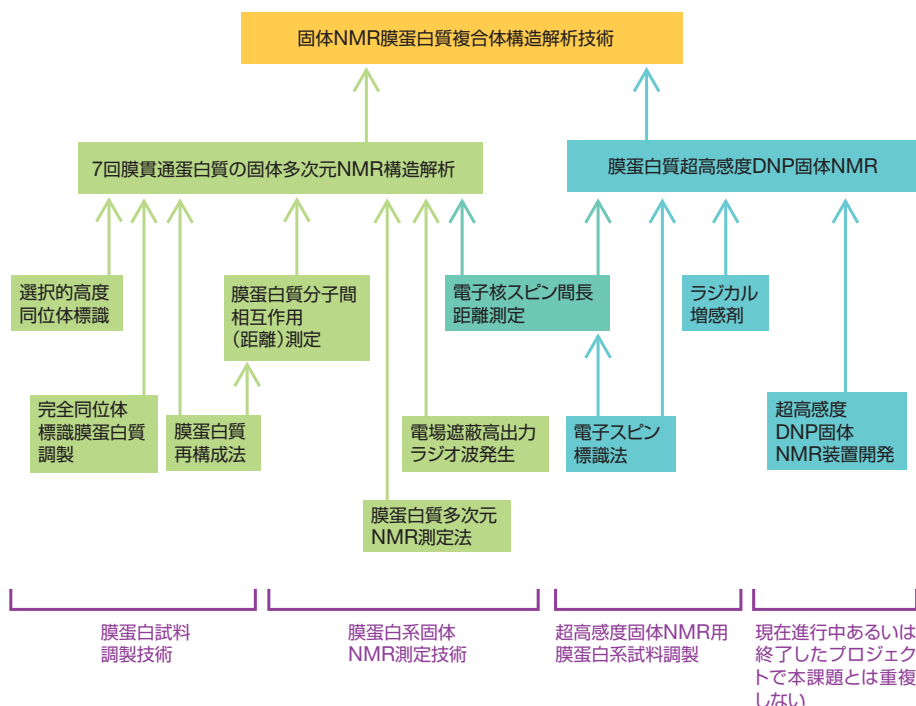
究目的です。

まず、従来の固体NMR法で測定条件の最適化を行い、膜タンパク質の複合体をモデルとして、構造解析技術の確立を目指しました。具体的には、塩素を運ぶハロロドプシン膜タンパク質に注目し、これとともににはたらくpHtrIIというタンパク質との複合体を解析する過程で、さまざまな技術を向上させています。その結果、ハロロドプシンにおけるアミノ酸の並び順（一次構造）と信号の相関づけを65%まで進めることができました。また、膜の中にある部分と外に突き出した水溶性部分の信号を区別できる実験手法を開発し、pHtrIIの水

溶性部分が α ヘリックス構造をもつことを明らかにしました。これは、固体NMRだからこそ得られた成果です。

一方、NMRの測定データを解析して立体構造を得るための効率的な計算法も開発しました。この解析法は、さまざまな膜タンパク質のNMRに適用できるものと考えています。

固体NMR法の高感度化については、従来の100倍以上という目標を立てました。NMR法は、高磁場におかれた原子核が分極して磁石のように振る舞う性質を利用したもので、この性質は電子ももっています。電子の分極は水素原子核の約660倍も強いので、これを利用して感度向上につなげようとしています。高輝度テラヘルツ波光源を用いた測定装置や、電子を供給するための新しい試薬を開発し、現時点で30倍の高感度化に成功しています。また、90K以下という温度で実験できれば、感度は300倍に到達しうることもわかりました。



固体NMR法での構造解析を達成するため、さまざまな技術開発を行ってきた。図版提供：藤原敏道

SAIL 法による 蛋白質構造解析技術の多様化

解析
D2

代表機関：名古屋大学大学院理学研究科
代表研究者：甲斐荘正恒

背景

- タンパク質の構造解析 NMR 技術は、分子量が増大するほど適用が困難となる
- 必要十分な原子位置の NMR 情報のみを選択的に入手できる SAIL 法に期待がかかる
- SAIL 法の普及には、NMR 解析の自動化を含め基盤技術開発を達成する必要がある

成果

- 立体構造決定の自動化に必要な純度の SAIL タンパク質合成手順を確立し、従来法では困難だったタンパク質の完全自動構造解析に成功
- 選択的 SAIL 標識法を用いて、アミノ酸側鎖の OH 基や SH 基の新規解析技術を開発
- 従来の NMR 法では解析が難しかった芳香環の回転やジスルフィド結合の異性化等のタンパク質の大きい揺らぎに関する解析に SAIL 法を応用

タンパク質構造解析に用いる核磁気共鳴 (NMR) 法は、分子内の水素原子間の相対的位置関係等を利用して立体構造決定を行う手法です。そのため、分子量が大きくなるほど NMR による信号数が増大し、NMR スペクトルが複雑になって解析が困難になります。そこで、私たちが考案した SAIL 法が力を発揮します。

SAIL 法は、タンパク質試料の NMR で観測される水素数を大幅に“間引く”点に大きな特徴があります。NMR は原子核の種類によって得られる信号位置 (共鳴周波

数) がおおむね決まっており、例えば、水素 (^1H) と重水素 (^2H) は、化学的性質は似ていますが、NMR 共鳴周波数は大きく異なります。そこで、構造決定したいタンパク質中の水素のうちで、必要な構造情報を与えるもの以外をすべて人為的に重水素に置換することにより、NMR スペクトルは構造情報を失わずに簡略化され、その結果、大きなタンパク質でも迅速、かつ高精度に構造決定することができるのです。

SAIL 法の世界標準化という目標に向けての第一の重要課題は、SAIL タンパク質

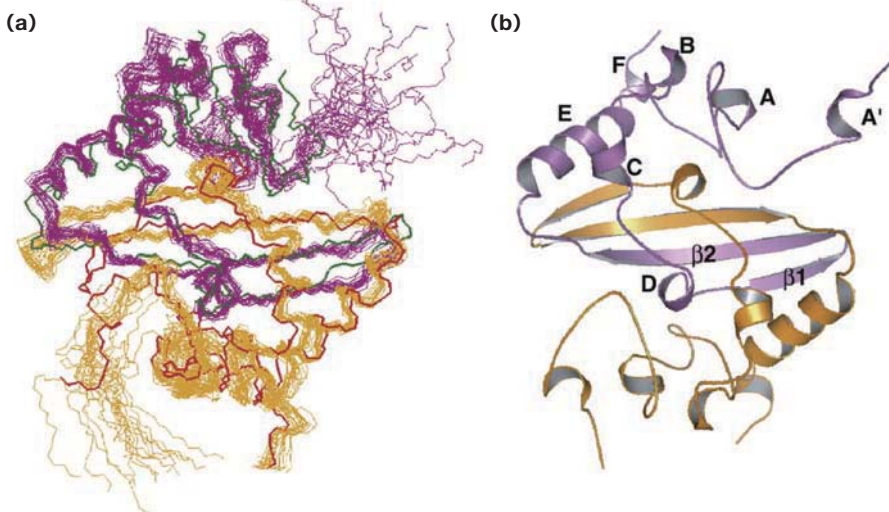
の調製法の改良でした。SAIL タンパク質は、一定の規則に従って特定部位を安定同位体置換したアミノ酸、すなわち SAIL アミノ酸 (立体整列同位体標識アミノ酸) のみから構成されます。このようなタンパク質を大腸菌等を用いて調製すると、貴重な SAIL アミノ酸を菌体の増殖に流用される、代謝により SAIL アミノ酸の同位体希釈が起こる等の深刻な問題が生じます。

そこで、本課題では、無細胞タンパク質合成系を利用し、この合成系のもつ問題点を一つひとつ克服して、高純度 SAIL タンパク質の合成法を確立しました。そして、こうして調製した高純度の SAIL タンパク質を用いて、従来の NMR 手法では困難だった難易度の高いタンパク質の構造解析に成功しました (図参照)。

また、人手を介入させずに NMR データから直接に高精度の構造決定を行う、完全自動 NMR 構造解析技術 (SAIL-FLYA 法) の開発にも成功しました。これも SAIL 法の普及にとって重要です。現在のところ、低分子量タンパク質の構造決定に有効であることを確認していますが、今後はさらに大きなタンパク質への適用が課題です。

本課題では、タンパク質の特定部位の立体構造とその動きを高精度にとらえるさまざまな新規手法の開発にも取り組みました。その結果、芳香環の回転、ジスルフィド (S-S) 結合の立体構造の変化、水酸基 (-OH) やチオール基 (-SH) の水素交換速度などを測定するのに成功しました。このような詳細な局所構造とその揺らぎは、SAIL 法により初めて解明されるもので、その測定技術は、タンパク質複合体の生物機能解析に大きな役割を果たすでしょう。

このように、SAIL 法のもつ大きな可能性を明確に示すことができました。今後は、生物学的により重要なタンパク質を対象に研究成果をあげるとともに、SAIL 法の問題点であるコストの削減にも取り組み、SAIL 法の世界標準化の推進に努力するつもりです。



重症急性呼吸器症候群 (SARS) ウイルスのヌクレオキャプシドタンパク質の C 末端側ドメイン。同ドメインは SARS ウイルス RNA との結合を担う重要な機能領域に相当する。従来法では困難であった同タンパク質の溶液構造決定を、SAIL 法により実現した。決定された構造は結晶構造 (赤、緑) とよく一致する (a)。同ドメインは 28kDa のホモダイマーを形成する (b)。Reprinted from Takeda et al. (2007) *J. Mol. Biol.* **380**, 608-622, Copyright (2010), with permission from Elsevier

化合物ライブラリーの基盤構築とタンパク質制御技術の開発

代表機関：東京大学大学院薬学系研究科／生物機能制御化合物ライブラリー機構
代表研究者：長野哲雄

背景

- タンパク質に結合して、その活性を制御する化合物は、タンパク質の機能の研究に役立ち、創薬につながる
- 化合物を集めたライブラリーがあると、制御化合物を効率的に探索できる
- 米国や韓国では国が大規模ライブラリーを構築している

成果

- 20万種類の化合物を収集し、ライブラリーを構築した。
- 多くの研究者が本ライブラリーを利用し、ナノモルレベルの活性を有する制御化合物を10個以上発見。動物試験や前臨床試験に進んでいるものもある

タンパク質のはたらきは、タンパク質に結合する低分子化合物によって、抑えられたり、活性化されたりします。数ある化合物の中から、こうした化合物を見つけ出すことができれば、タンパク質のはたらきを制御するのに使えます。特に、病気に関係するタンパク質のはたらきを制御するものは、医薬品の候補として重要です。そこで、私たちは、さまざまな化合物を集めた「化合物ライブラリー」を構築しています。

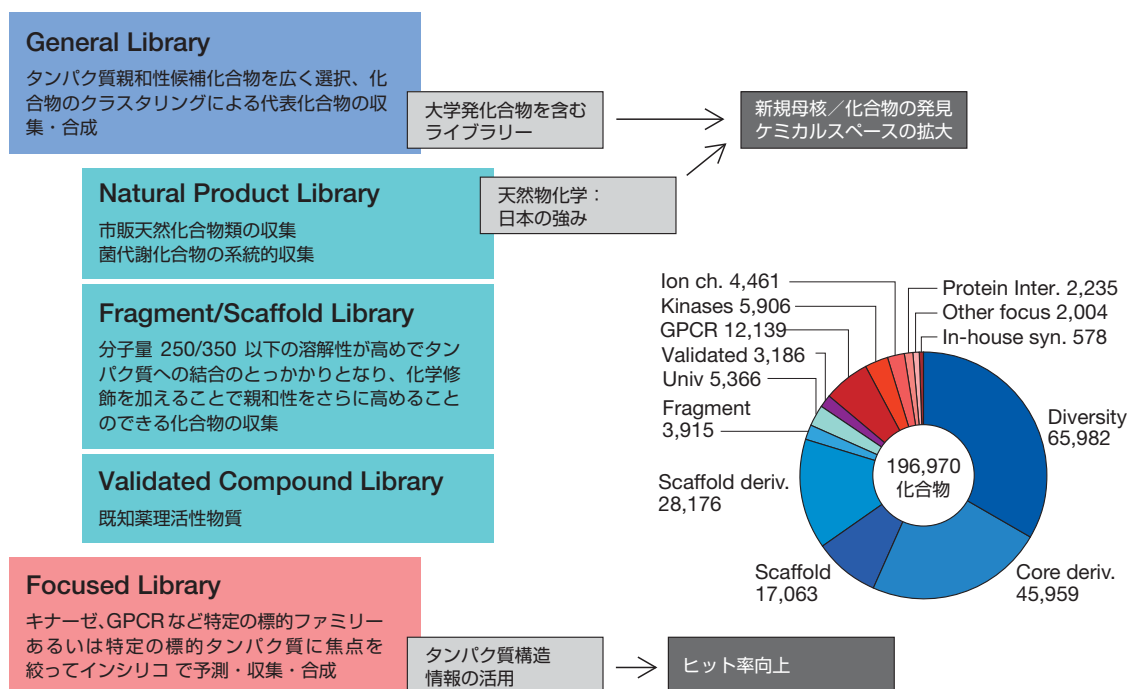
これまでに約20万種（2010年3月現在）の化合物を収集しました。市販化合物の中から選択したほか、大学が所蔵していた化

合物、新たに合成した化合物も含まれています。これらの化合物は、収集の基準によっていくつかのライブラリーに分かれていますが、探索を効率的に開始できるよう、20万種の中から9600種類の「精鋭」を選んだコア・ライブラリーも構築しました。また、立体構造が既知あるいは推測可能なタンパク質については、コンピューターの中でタンパク質の構造に化合物をあてはめてみる「インシリコスクリーニング」によって、結合しそうな化合物を絞り込んでから、それらの化合物の実物を収集してライブラリーを構築しました。このライブラリ

ーから、実際に制御活性をもつ化合物が見つかっています。さらに、人類はこれまでに活性化化合物を天然化合物から数多く見いだしてきたことから、天然化合物の収集も行っており、特に糸状菌や放線菌による代謝化合物を系統的に収集しています。

一方、制御活性をもつ化合物を実験で見つけ出す「ウェットスクリーニング」の技術開発にも取り組んでいます。希少な化合物を用いて探索が行えるように、化合物のアレイを作製してスクリーニングを行う技術を確認しました。また、膜タンパク質が細胞内で動くようすを追跡できる新しい蛍光プローブも開発しました

これまでに本プログラム内の14チームに対して、ライブラリーから44万サンプル（2010年9月現在）の提供を行っており、必要に応じてスクリーニングの支援もしています。また、プログラム外の研究者に提供する体制も整え、55万サンプル（同）の提供を行っています。今後もより多くのユーザーが効果的に利用できるシステムの構築に努めたいと思っています。



化合物ライブラリーの2010年3月末における構成。図版提供：長野哲雄

ターゲットタンパク研究 情報プラットフォームの構築運用

代表機関：情報・システム研究機構国立遺伝学研究所
代表研究者：菅原秀明

- 背景**
- 大規模な研究開発プログラムの「見える化」は時代の要請
 - ターゲットタンパク研究と技術開発研究お互いの「見える化」が必須

- 成果**
- 最新動向と研究成果を広く一般に伝える公開ポータルサイトの構築と運用
 - 多様な研究課題の相乗作用を加速する共有ポータルサイトの構築と運用
 - 次世代のタンパク研究をも支える情報資源の開発と提供

本プログラムから、重要なタンパク質の構造と機能の情報が産み出され、タンパク質実験技術も次々に開発されています。こうした成果を、知っていただき活用していただく場が、公開ポータルサイトです。公開ポータルサイトは、いつでも、どこでも、どなたでもご利用いただけます。このサイトで、例えば、本プログラムが世界で初めて明らかにしたタンパク質構造を知ることができます。また、タンパク質研究の面白さを、中高生から一般の方々にお伝えしようとするリーフレットも、ここから入手できます。

ターゲットタンパク研究課題について

は、研究対象となっている生命現象のネットワークとタンパク質や化合物を俯瞰できる「ネットワークデータベース」を公開しています。「生産C1」課題の成果による大腸菌全タンパク可溶性データベース(eSOL)、「生命A3」課題の協力によるオートファジーデータベースも公開しており、「医薬A5」課題の協力によるトリパノソマデータベースや、「情報D1」課題で開発されたタンパク質単体や複合体の構造を予測解析するソフトウェアの公開も進んでいます。

共有ポータルサイトは、本プログラムの研究実施者に向けたサイトです。このサイ



ターゲットタンパク研究プログラムでは、YouTubeに専用チャンネルを設けて、タンパク質に関する講演ビデオを掲載したり、タンパク質が立体構造をとっていくシミュレーション結果のビデオを紹介している (<http://www.youtube.com/user/TargetTanpaku>)。 画像提供：菅原秀明

トで、参画機関の間で情報を共有することができます。また、「解析C1」で開発支援している播磨と筑波2拠点のチームラインをまとめて利用予約できるオンラインシステム、報告書や評価のアーカイブ、報告書作成支援機能などを提供して、研究実施者の便宜も図っています。

タンパク研究を支える情報資源も、複数のアミノ酸配列データベースを集約したデータベース(CASA)、アミノ酸配列からタンパク質の構造や機能の推定を行うオンデマンド解析システム(FUJI)、タンパク質-化合物相互作用の情報を収集・統合したデータベース(PCI)を展開しています。また、タンパク質研究に有用なサイトを選別・分類して短評をつけたリンク集(TPリンク)も公開しています。本プログラムで開発された実験手法については、実験プロトコル(手順)を標準形式でとりまとめた蛋白質実験情報マネージメント・システム(PREIMS)から公開しています。

私たちは、これからも、情報公開と情報共有の機能を充実させて、情報プラットフォームが次世代のタンパク質研究の情報基盤として引き継がれることを目指します。

The screenshot shows the TargetTanpaku portal website. It features a 'お知らせ・トピックス' (News/Topics) section with articles about database releases and protein structure announcements. Below this is a 'TP 構造ギャラリー' (TP Structure Gallery) displaying several protein structures with their IDs and names: [3ALB] ubiquitin, [3A5Y] GenX, [3A5Z] GenX - EF-P complex, [3ACL] pirin, and [3AFN] A1-R. A sidebar on the right provides 'プロジェクトの背景' (Project Background), 'プロジェクトの概要' (Project Overview), and 'ターゲットタンパク研究テーマ' (Target Protein Research Themes).

公開ポータルサイトからターゲットタンパク研究プログラムの最新動向を知ることができる (URL : <http://www.tanpaku.org/>、連絡先 : portal@tanpaku.org)。データベースと解析ソフトウェアは「情報検索・解析」のメニューから。 画像提供：菅原秀明

タンパク質の複合体構造を推定するための 構造バイオインフォマティクス

代表機関：お茶の水女子大学大学院人間文化創成科学研究科
代表研究者：由良 敬

背景

- タンパク質複合体や多くのドメインからなるタンパク質は、実験で構造を解析するのが難しい
- 生命科学と情報科学を融合した「バイオインフォマティクス」により、コンピュータの中でタンパク質の立体構造を予測することが求められている

成果

- タンパク質の立体構造を高精度にモデリングする Web ツールを開発
- ドメイン間・タンパク質間の相互作用部位を予測する Web ツールも開発

生命現象は、いくつものタンパク質がネットワークを形成し、作用し合うことで引き起こされます。そのため、生命現象のしくみを分子レベルで理解するためには、タンパク質複合体の立体構造を知ることが重要です。しかし、結晶をつくるのが難しいなどの理由から、複合体の立体構造の解析は難航しがちです。また、真核生物では、いくつものドメインが組み合わさって1つの大きなタンパク質を形成している場合が多く、このようなタンパク質も全体の立体構造を決定できるのはまれです。

そこで私たちは、調べたいタンパク質の

立体構造を既知の構造から高い精度で予測する技術と、ドメインの構造からタンパク質の全体構造を、またタンパク質単体の構造から複合体の全体構造を予測するための技術を開発しました。

タンパク質の立体構造を予測するために、「ホモロジーモデリング」という手法があります。これは、すでに立体構造がわかっている相同タンパク質（進化上、類縁関係にあるタンパク質）をベースのかたちとし、そのタンパク質と調べたいタンパク質のアミノ酸配列を照らし合わせることで、立体構造を構築していく方法です。こ

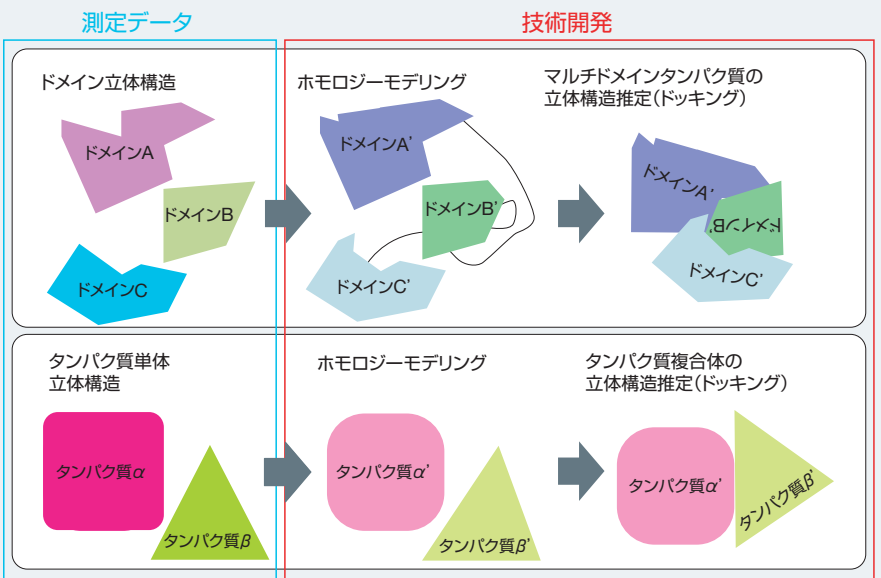
の方法では、アミノ酸配列が類似する部分を揃えて並べる技術（並べたものをアラインメントといいます）が重要になります。比較する配列の長さが一致しないときには隙間（ギャップ）を挿入して類似する部分の位置を合わせますが、このときギャップペナルティという減点を課して、配列の類似度を評価していきます。ギャップペナルティの決め方は難しいのですが、私たちは決め方をより理論的なものに改良し、高精度なアラインメントが得られるまったく新しいWebツールを構築しました。

また、ドメイン間の界面の相互作用部位にどんなアミノ酸残基が現れやすいかを解析し、特徴を見いだしました。この特徴を指標にして、複数のドメインからなるタンパク質のドメイン間相互作用部位を予測する方法を開発しました。

一方、タンパク質のアミノ酸配列において、進化の過程で保存されてきた部分を特定し、立体構造上に位置づけすることで、タンパク質の機能部位を予測する「進化トレース法」という予測法があります。これを改良して、複合体を形成するタンパク質間の相互作用部位を自動的に予測できるWebツールを開発しました。

さらに、開発したこれらのツールを統合して、2つのアミノ酸配列から複合体構造を推定するための技術開発を行っています。また、各技術は独立のツールとしても利用できるようにテストを行っています。今後はこれらのツールをWeb上に公開し、広くタンパク質科学の発展に資するよう努めていきたいと思ひます。

タンパク質およびドメイン複合体構造推定



複数のドメインからなるタンパク質およびタンパク質複合体の構造推定。ドメインやタンパク質単体の測定または予測データから全体の立体構造を予測する技術を開発した。
図版提供：由良 敬