

成果報告票(技術開発研究・代表機関のマネジメント)

課 題 名	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
機 関 名	独立行政法人理化学研究所
代 表 研 究 者 名	横山 茂之

1. 課題開始時における達成目標

タンパク質の生産に関する共通性・汎用性の高い基盤的な技術を開発し、本事業の研究を支援することのできる研究基盤「タンパク質発現ライブラリー基盤」を構築することを目的とする。構造解析においては、重要ターゲットタンパク質の試料調製段階が高難度で、深刻なボトルネックとなることが多い。高難度タンパク質といわれるものは、その本来の機能と対応して、多回膜貫通、高分子量複合体の形成、翻訳後修飾（糖鎖の付加、リン酸化等の翻訳後修飾等）、活性制御機構に根ざす多状態性や構造・機能の短寿命性等の多様な特性をもつ。この問題を解決するため、高難度タンパク質（高分子量複合体、膜タンパク質等）の調製のための優れた要素技術を開発するとともに、タンパク質試料が構造解析に適しているか否かを分析・評価するためのシステムを作成する。多様な困難さをもつ重要ターゲットタンパク質について、発現方法、結晶化条件等の広範囲な探索と最適化を行うシステムを構築し、その結果を体系化することによって、構造解析や機能解析に適した試料調製を可能にする研究基盤を整備する。

2. 平成23年5月末時点における課題全体の事業計画に対する研究成果

(1) 成果概要

高難度タンパク質として、ヒト由来の膜タンパク質（特に GPCR 等の多数回膜貫通型タンパク質、膜タンパク質複合体）、高分子量複合体（特にヘテロ多量体）、巨大タンパク質（1300 残基超）等をターゲットに選んで、第一に、高難度タンパク質の特性に合わせた優れた要素技術を新たに開発・高度化し、第二に、それぞれのターゲットに適した方法を探索するスクリーニングシステムを構築した。これらの新規で有用な技術を活用して、他領域との連携を進めるとともに、多くの個別課題との連携を、主に高難度試料作製・結晶化に関する共同研究の形で進めた。平成23年度の補助金化にともない、開発した技術基盤を活用し、創薬支援プラットフォームとして、インシリコ創薬への貢献を果たしている。

確立した技術：●無細胞タンパク質合成法による膜タンパク質の生産技術。●構造・機能解析に適した膜タンパク質試料作製のための性状評価技術。●新規の脂質メソフェーズ法による膜タンパク質の結晶化技術。●無細胞タンパク質合成法による高分子複合体の生産技術。●培養細胞等による膜タンパク質／高分子量複合体の生産技術。●非天然型アミノ酸の部位特異的導入の利用技術。●タンパク質の系統的巻き戻し技術。●新しい結晶化要素技術とそのシステム化。●構造・機能解析に適したタンパク質生産・結晶化法の合理的スクリーニング技術。●マイクロビームの利用に向けた微小結晶操作技術。

達成した目標：●数十種類の GPCR 等のヒト多回膜貫通型タンパク質の高品質試料の生産。●高成功率での高難度膜タンパク質の生産・結晶化、構造・機能解析。●200 kDa 級のヒト長鎖タンパク質の生産。●十数サブユニット高分子量ヘテロ複合体（～700 kDa 級）の生産。●高分子量ヘテロ複合体（～500 kDa 級）の生産・結晶化、構造解析。●高分子量タンパク質・核酸複合体の生産・結晶化、構造解析。●ヌクレオソーム複合体の生産・結晶化と構造・機能解析。●天然型修飾（アセチル化、糖鎖等）を均一に含むタンパク質の生産、「エピヌクレオソーム」への応用。●個別ターゲットタンパク質研究に貢献。●生産・解析・制御の他の技術開発課題との連携を推進。●制御化合物と標的タンパク質との複合体の生産・結晶化と構造解析の加速、インシリコ創薬への貢献。●GPCR 等の機能性抗体の取得、抗体医薬開発への貢献。●高難度タンパク質の生産・結晶化の技術移転、製品化の推進。

(2) 技術開発の進捗及び成果

I. タンパク質合成法

本研究開発の国際的にも類を見ない特徴は、第一に、タンパク質合成系として、無細胞系と生細胞系を、それぞれの特徴を活かして組み合わせること、第二に、拡張遺伝暗号技術を活用して、タンパク質の部位特異的に、非天然型アミノ酸および天然型翻訳後修飾アミノ酸を組み込むことである。

1. 無細胞系および細胞系のタンパク質合成技術（横山茂之、遠藤弥重太、上田卓也、田之倉優他）

無細胞タンパク質合成系は、世界をリードする本研究での高度化の成果として、合成量、品質、費用対効果、利便性のいずれをとっても、構造解析試料を生産する方法として非常に優れていることを実証した。無細胞系は、大腸菌、小麦胚芽、ヒト培養細胞、昆虫（ショウジョウバエ）培養細胞等から作製しており、ヒト・昆虫の無細胞系で転写・翻訳共役系を構築するなど、利便性を高め、いずれも実用レ

ベルである。特に、高難度のタンパク質に威力を発揮し、大腸菌生細胞系等を凌駕する。膜タンパク質では、脂質二重膜やミセル等への組み込みに、質的・量的に優れる。高分子量ヘテロ複合体でも、均一性が高く、結晶性のよい複合体試料が得られている（実例はII.に後述）。さらに、タンパク質の翻訳後修飾については、糖鎖、リン酸化など、細胞系より均一な試料が得られるという優位性がある（アセチルリジン等の応用例は後述）。ヒト無細胞系は、長鎖タンパク質（200 kDa 級）や巨大複合体の合成に優れる。また、高度な安定同位体標識試料、細胞毒性を有するタンパク質などの生産にも適する。微量の機能解析には、再構成タンパク質合成系である PURE システムが有用である。

細胞系では、ヒト由来の膜タンパク質、高分子量タンパク質等の発現のための哺乳類細胞系として、ヒト HEK293EBNA 浮遊細胞株を用いるトランジェント発現によって、2 mL スケールの発現スクリーニングからリットル・スケールでの大量発現までを迅速に行えるシステムを確立した。通常は、この系で目的タンパク質の調製に必要な条件等を十分に確立した後に、バキュロウイルスと昆虫細胞の系を用いて、さらなる合成量アップを行う。また、分裂酵母の新規発現ベクターシステムを開発し、形質転換体のスクリーニングを効率化した。大腸菌で封入体を形成した場合の高圧による系統的な巻き戻しプロトコルを確立した。

これらの様々な合成法、条件から目的タンパク質に適したものを選択するために、マルチステップで最適化する合理的なスクリーニングシステムを構築した。合成法、条件等の選択には、産物の量のみでなく、複数の物理化学・生化学的方法により、安定性、均一性等を評価する。結晶性の評価では、還元メチル化、変異導入、結晶化時のアガロース添加等を体系的に行う。コンストラクトの選択は結晶性を大きく左右するが、タンパク質の末端や内部の困難配列の処理法を、無細胞系（クローニングせずに PCR フラグメントで可能）や、HEK293 細胞（トランジェント発現）等を活用して選択する。タグや融合タンパク質の選択も同様である。適切な複合体形成が品質改良に必須となることが多いが、多数の組合せや条件を迅速にスクリーニングできる。さらに、本システムは、創薬ターゲット（しばしば高難度）の構造に基づく創薬開発にも極めて有効である。

2. 非天然型アミノ酸のタンパク質への部位特異的導入技術（坂本健作、横山茂之）。

本技術の大幅な改良・拡充を行い、世界最高の技術水準を実現した。ヒト等の哺乳動物培養細胞、昆虫（ショウジョウバエ）培養細胞、酵母、大腸菌等の細胞系、無細胞系において、チロシンやリジンの有用な誘導体をタンパク質の任意の部位に導入することが可能になった。特に、大腸菌の翻訳終結因子 RF1 遺伝子破壊株を世界に先駆けて開発し、導入効率を飛躍的に向上し、通常のアミノ酸と同等（ほぼ 100%）とすることに成功した。この結果、収量が通常の組換え体と同等になったことに加えて、非天然型アミノ酸や翻訳後修飾アミノ酸（アセチルリジン等）を、タンパク質の複数の指定した部位に導入した試料を均一・大量に調製することが可能になった（ヌクレオソームへの応用等を後述）。分子内 FRET のための蛍光標識の導入に、RF1 破壊株が極めて有用であった。また、高難度複合体構造解明の一環としてタンパク質複合体を光架橋して構造解明する技術開発に取り組み、初の架橋タンパク質複合体構造を解明した。さらに、ヨード原子含有アミノ酸の導入が X 線位相決定に役立つことや、部位特異的な蛍光修飾法が脂質マトリクス内の膜タンパク質結晶の観察に役立つことも示した。

II. 膜タンパク質の生産と結晶化

1. 大腸菌無細胞合成系を利用した膜タンパク質の生産技術（横山茂之、寺田貴帆、染谷友美）。

大腸菌無細胞合成法を、構造決定可能な膜タンパク質試料調製法として確立した。無細胞合成系に界面活性剤を共存下で合成し、可溶性に発現させる方法は、多種類の多数回膜貫通型タンパク質の合成で有用性が実証できた。さらに、活性型の膜タンパク質を脂質二重膜環境に合成するための新たな手法として、脂質・界面活性剤共存透析法（リポソームの形成と膜タンパク質の合成・膜への組込を共役）を開発した。本法により、カサノリ由来ロドプシンについて活性型試料を調製し、脂質メソフェーズ法（後述）で結晶化し、BL32XU を用いて、真核生物の光駆動プロトンポンプとして初めての構造を 1.6 Å 分解能で決定した。無細胞合成系は、通常、細胞系と比べて合成量が格段に多く、高純度の試料の大量調製が可能であり、ヒトのタイトジャンクションタンパク質、ケモカイン受容体等の構造解析による評価を進めた。

2. コムギ無細胞系を用いた膜タンパク質合成法の開発（遠藤弥重太）。

プロテオリポソーム生産を経る膜タンパク質の一般的な調製技術の開発を進めた。リポソーム共存下の翻訳反応により、1) 機能的に活性を保持した膜タンパク質・リポソーム複合体を生産、2) このプロテオリポソームを簡単な遠心によって沈殿回収（精製タグは不要）、3) 特定の溶液組成と界面活性剤で温和に処理し、プロテオリポソームから膜タンパク質を可溶化する。ヒト GPCR を含む 30 種以上の膜タンパク質が可溶性で、ゲル濾過クロマトグラフィーで単分散性をした。

3. 膜タンパク質精製標品の性状評価（横山茂之、染谷友美、寺田貴帆）。

CPM 法による熱安定性とフォールドの評価法、結合脂質等の検出と定量による安定化因子の同定法、SPR 法による未精製段階の活性評価法などを確立することにより、細胞/無細胞合成、精製、結晶化の

方法選択と条件最適化を確実に出来るようになり、標品の品質が飛躍的に向上した。

4. 膜タンパク質の結晶化を促進する脂質ライブラリーと新しい結晶化法の開発 (羽藤正勝)。

脂質二重膜環境中で結晶化を行う脂質メソフェーズ法は、可溶化により不安定になる膜タンパク質の結晶化に適した手法であるが、利用出来るマトリクス脂質種が少なく、20℃付近に限られる等の問題があった。本研究では、脂質メソフェーズを取るイソプレノイド鎖型脂質を、複数の鎖長と極性基を組み合わせ 10 種以上開発した。この脂質群は広い温度範囲で用いることが可能 (0℃も可能で、膜タンパク質の 20 度の安定化に相当)。従来構造解析ができなかった膜タンパク質でも高分解能結晶が得られた。

5. 体系的な発現スクリーニング (横山茂之、染谷友美) 計 40 種のヒト膜タンパク質をトライアルセットとし、大腸菌無細胞合成から酵母、昆虫細胞、哺乳動物細胞に至る多様な発現系を用いて発現効率、界面活性剤による可溶化効率等を系統的に評価した。さらに条件を絞って最適化し、ケモカイン受容体 (GPCR)、トランスポーター、タイトジャンクションタンパク質等について、大量調製から結晶化へのプロトコルを確立し、高い成功率で構造解析を可能にすることに成功した。

III. 高分子量複合体の生産と結晶化

1. 無細胞系および生細胞系による高分子量複合体の生産 (横山茂之、遠藤弥重太、脇山素明、今高寛晃、染谷友美、寺田貴帆、梅原崇史、坂本健作)。

上述のとおり、無細胞タンパク質合成法は、多重ヘテロ複合体の生産に優れている。多重タンパク質複合体では、(1)発現用 DNA を適切な量比で混合することで必要なモル比が得られる、(2)発現順をコントロールできる、(3)シャペロン等の補充が容易、(4)核酸やその他のリガンドも可能、等の様々なメリットがあり、均一性が高く、結晶性のよい複合体試料が得られ、多くの結晶構造解析に成功した。

細胞系では、バキュロウイルスと昆虫細胞の発現も、多重感染で大量調製に用いることができる。また、8 成分共発現の大腸菌汎用ベクターを開発し、ヒト 26S プロテアソーム制御リング複合体 (7 成分) の再構成に成功した。小麦胚芽無細胞系でもプロテアソームの再構成が可能になった。高密度培養が可能なピキア酵母を利用して、真核細胞内在性複合体の調製技術を開発し、12~15 成分の真核複合体群を調製した。細胞系または無細胞系で、十数サブユニット高分子量ヘテロ複合体 (700 kDa 級) の生産、500 kDa 級複合体の生産・結晶化、構造解析に成功している。

非天然型アミノ酸導入技術の応用では、タンパク質複合体の光架橋を、複合体内部のタンパク質間相互作用解析に応用することに成功し、構造解析に適した試料の作製が可能になった。架橋体をそのまま構造解析試料に用いることにも道が拓かれている。

2. ヒト「エピヌクレオソーム」の生産技術 (横山茂之、坂本健作、梅原崇史)。

非天然型アミノ酸導入技術の応用により、遺伝情報発現の反応場となるヌクレオソームコア粒子 (NCP) に複数のエピジェネティック情報 (アセチル化・メチル化様・リン酸化・DNA メチル化) を導入した「エピヌクレオソーム」の再構成技術を世界に先駆けて開発した。これにより、ヒトエピゲノムを標的とした創薬技術が初めて本格的に可能となった。また、NCP を中心とする「構造エピゲノミクス」の技術基盤を確立した。実際、NCP に結合するタンパク質の探索評価系を開発して、ヒト転写調節因子が NCP に結合した複合体構造を初めて解明した。また、NCP 脱メチル化酵素と長鎖ヒストンとの複合体構造解明により、ヌクレオソーム脱修飾の新規分子機構を解明した。

IV. 創薬プラットフォーム

1. インシリコスクリーニングと構造に基づくシード最適化 (横山茂之、梅原崇史、半田徳子)

本課題で開発した高難度タンパク質の生産・結晶化の新たな技術基盤は、立体構造に基づくインシリコスクリーニングとシード最適化のプラットフォームとしても極めて有用である。すでに、十件以上の標的タンパク質と候補化合物との複合体の生産・結晶化と構造解析を行って、最適化を行い、IC₅₀ が nM レベルのシード化合物を多数得ている (別紙)。標的タンパク質の生産には、無細胞タンパク質合成技術が威力を発揮している。他方、非天然型アミノ酸導入技術の応用である「エピヌクレオソーム」を基質とする化合物アッセイ系を用いる化合物スクリーニングも開始している。

2. 機能性抗体の作製 (横山茂之、染谷友美)。

GPCR 等の多数回膜貫通タンパク質を無細胞合成とリポソームへの組込みを行い、抗原として用いて機能性抗体の取得を行った。抗体医薬として必要な Kd サブ nM レベルの抗体が既に得られている。

3. タンパク質の構造解析件数

PDB 登録数	81 件
PDB 登録の有無にかかわらず構造解析したタンパク質数	176 件

4. 課題全体の論文発表件数	111 件
----------------	-------

生産C 1 代表機関のマネジメント

5. 各機関の公開したツールやデータベース等の件数	9件
6. 課題全体の特許出願件数	27件（うち国外19件）
7. 課題全体の成果を活用した共同研究数（プログラム内外含む）	252件 （うち産業界との共同研究数13件）
8. 当初計画に対する達成度	
当初計画で目指した新規要素技術開発とそれらのシステム化は、全て達成することができた。それに加えて、プログラム内外の共同研究により、開発した新しい技術を用いることで初めて可能になった試料調製、結晶化、構造解析、機能解析、インシリコ創薬等で、研究成果に大きく貢献することができた。	
9. 課題内の情報共有・連携体制	
「トライアルセット」を共通化することで、課題内の技術開発に軸を通し、様々な要素技術を共有することで全体としての目標達成を可能にした。課題内での技術を移転・汎用化により、商品化も進めた。	
10. 他の課題との情報共有・連携	
<p>開発した技術基盤を活用して、生命・医薬・食環の多くの課題との連携・共同研究を推進した。主なものは次の通り。●プログラム内での技術の普及と共同研究への発展を目的として脂質メソフェーズ法講習会を実施。●月原先生：脂質メソフェーズ法を用いたギャップジャンクションチャネルタンパク質の結晶化の実施と技術移転。●FBA2・田中先生：プロテアソーム制御リング複合体の再構成（世界初）。●FBA4・佐藤先生：結晶化が困難な P1B-type ATPase は、可溶性部が大きく、脂質メソフェーズへの再構成は無理と考えられていたが、新手法を導入し、機能を維持したまま再構成する方法を見だし、結晶化を可能にした。●FBA5・中川先生：脂質メソフェーズ法を用いた膜電位センサータンパク質の結晶化の実施と技術移転。●FBA7・匂坂先生：Claudin-4 結合タンパク質 C-CPE 遺伝子提供を受けた。C-CPE と Claudin-4 の複合体を大腸菌無細胞技術によって合成、精製し、結晶化に成功した。●FBA8・岩井先生：非天然型アミノ酸技術により、高分子複合体 LUBAC とユビキチンとの光架橋を行い、ユビキチン認識に必須な領域の同定に成功した。●FBB4・岩田先生：腸球菌 V 型 ATPase の A3B3 複合体は、大腸菌や腸球菌での発現・精製が困難であったが、大腸菌無細胞タンパク質合成技術の適用により大量精製に成功、X 線結晶構造が決定された。脂質メソフェーズ法に関する技術移転。●FBB5・濡木先生：新たな細胞技術を適用して、非翻訳 RNA 関連のヒト Dicer、Argonaute 等の高分子量複合体の大量発現に成功。脂質メソフェーズ法に関する情報提供。●MPA2・福井先生：大腸菌無細胞合成技術等によって、DOCK2、ELMO1 の機能領域の同定、構造解析に適した領域・発現系を選択し、それらの機能的複合体構造の決定に成功。Dock2, Dock180 について ELMO1 および Rac1 との高分子量複合体（20 万超）について大量発現し、Dock180 複合体では結晶化に成功。●MPA4・富田先生：γセクレターゼのヘテロ複合体膜タンパク質を、大腸菌無細胞合成技術により再構成した。また、γセクレターゼのホモログ SPP については、無細胞合成 SPP が天然 SPP と同等の活性を示し、大量精製と結晶化にも成功。●MPA6・門脇先生：インシリコ薬剤探索において、AMPK 等の標的酵素タンパク質試料の調製、阻害化合物との複合体の結晶化と構造解析に、本課題で開発した生産システムを活用。複合体構造に基づく最適化サイクルを回し、新規の阻害化合物を得ることに成功。他方、極めて高難度なアディポネクチン受容体（AdipoR1/2）について、昆虫細胞とヒト細胞を中心に、生産の要素技術（欠損変異、融合タンパク質作成、安定化脂質・界面活性剤の同定、相互作用分子との相互作用解析、立体構造認識抗体作成等）を駆使してスクリーニングや大量調製、結晶化を行い、AdipoR2 および AdipoR1・抗体複合体の結晶化に</p>	

成功。●MPB1・松島先生：GPCR とリガンド等との結合解析のため開発した手法を適用し、ヒト培養細胞で発現させた CCR2 がリガンド MCP-1 と結合することを示唆。MCP-1 は、大腸菌無細胞蛋白質合成系により大量調製し、CCR2 の発現量を上げることに成功。●MPB2・清水先生：メチル化酵素と結合する再構成ヌクレオソームコア粒子を供与する連携。●FEA6・伊藤先生：非天然型アミノ酸として翻訳後修飾（アセチルリジン）を導入する技術を適用し、任意の部位に修飾を導入したタンパク質（HMGCL）の均一な試料を大量に得ることに初めて成功して、脱アセチル化酵素 SIRT3 の阻害剤探索、2次評価に活用。●PPD1・高木先生：ターゲットタグ（P4×3-tag）発現ベクター、精製用樹脂及び抗体の提供を受け、利用法を検討した。●PPD2 のスクリーニング技術を利用した試料安定生産条件の探索、PPD1 のタグ技術を利用した精製条件の検討を行った。（山下担当分）●PPD3・岩田先生：本課題で調製した AdipoR1、AdipoR2、Claudin-4 試料を用いて、結晶化促進用モノクローナル抗体の作製を共同で行い、共結晶化に好ましい、天然構造を認識する高親和性 IgG 産生クローンを得た。●SAC1・山本先生：脂質メソフェーズ中の蛍光標識タンパク質微小結晶を提供し、SPRING-8 BL32XU においてマイクロビームでの蛍光標識膜タンパク質微小結晶検出系の開発に貢献。また、蛍光標識結晶をターゲットし、微小結晶の X 線回折データセットを取得。●SAD1・出村先生：大腸菌無細胞合成により、数種類のアミノ酸を選択的安定同位体標識した膜タンパク質試料を大量調製し、固体 NMR 解析用試料として提供。●CRC1・長野先生：ライブラリーから候補化合物群の供与を受ける。標的タンパク質試料（Pim1 等）を作製し、化合物との複合体構造を決定。

1 1. 人材育成

全体交流会や班会議等により、技術開発や構造生物学の若手研究者の育成に力を入れた。

1 2. 終了までの具体的な見通し

開発した技術基盤を活用して、プログラム内外との連携・共同研究を推進する。膜タンパク質（7回膜貫通受容体等）、巨大複合体などを含む著しく高難度の試料について、既に試料調製・結晶化に成功しており、多数の構造を決定し、大きな成果を上げられると考えている。補助金化に伴い、創薬等支援プラットフォームとして、シードの最適化までに行い、インシリコ創薬に大きく貢献する。

1 3. 本プログラムにおける成果が我が国の科学技術発展及び産業応用等に与える効果について

本プログラム終了後は、現在すでに開始している技術移転・普及を、基礎研究および産業応用の両面で、さらに拡大する。技術移転や共同研究として特に引き合いの多いものは、GPCR 等の膜タンパク質の無細胞合成、それを応用した機能性抗体開発と薬剤スクリーニング、脂質メソフェーズによる結晶化と立体構造解析；非天然型アミノ酸導入によるタンパク質間相互作用の解析、エピヌクレオソーム等を用いるエピジェネティクス解析、それらを応用した薬剤スクリーニング等である（製薬企業 6 社と開始している）。アカデミア発のインシリコ創薬を支援するプラットフォームとしては、現在開始している支援を拡大して継続することにより、複数のリードの製薬企業等への導出が可能と期待される。無細胞タンパク質合成等の研究試薬は、ThermoFisher、TAKARA 等からの販売を継続して広く普及するとともに、非天然型アミノ酸導入技術、脂質メソフェーズによる膜タンパク質結晶化等も製品化を進める。

1 4. 特記事項

マイクロビームラインの利用に向けた微小結晶操作技術の開発に参加しており、今後は、創薬のためのハイスループット化等で連携を強める予定である。

生産C1 代表機関のマネジメント

15. 研究費一覧

	19年度	20年度	21年度	22年度		23年度	計
設備備品費 (千円)	13,091	4,259	13,432	2,226	物品費 (千円)	47,603	
試作品費 (千円)	0	0	11,882	0	人件費・謝金 (千円)	406,570	
人件費 (千円)	289,603	400,293	401,593	410,995	旅費 (千円)	182,932	
業務実施費 (千円)	404,998	255,448	201,554	160,009	その他 (千円)	8,995	
間接経費 (千円)	212,308	198,000	188,539	171,970	間接経費 (千円)	0	
合計 (千円)	920,000	858,000	817,000	745,200	合計 (千円)	646,100	3,986,300

成果報告票（技術開発研究・各機関）

代表／分担機関の課題名	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
代表／分担機関	独立行政法人理化学研究所
機関の代表研究者名	横山 茂之

1. 課題開始時における各機関の達成目標

タンパク質の生産に関する共通性・汎用性の高い基盤的な技術を開発し、本事業の研究を支援することのできる研究基盤「タンパク質発現ライブラリー基盤」を構築することを目的とする。構造解析においては、重要ターゲットタンパク質の試料調製段階が高難度で、深刻なボトルネックとなることが多い。高難度タンパク質といわれるものは、その本来の機能と対応して、多回膜貫通、高分子量複合体の形成、翻訳後修飾（糖鎖の付加、リン酸化等の翻訳後修飾等）、活性制御機構に根ざす多状態性や構造・機能の短寿命性等の多様な特性をもつ。この問題を解決するため、高難度タンパク質（高分子量複合体、膜タンパク質等）の調製のための優れた要素技術を開発するとともに、タンパク質試料が構造解析に適しているか否かを分析・評価するためのシステムを作成する。多様な困難さをもつ重要ターゲットタンパク質について、発現方法、結晶化条件等の広範囲な探索と最適化を行うシステムを構築し、その結果を体系化することによって、構造解析や機能解析に適した試料調製を可能にする研究基盤を整備する。

2. 平成23年5月末時点における各機関の事業計画に対する研究成果

(1) 成果概要

高難度タンパク質として、ヒト由来の膜タンパク質（特に GPCR 等の多数回膜貫通型タンパク質、膜タンパク質複合体）、高分子量複合体（特にヘテロ多量体）、巨大タンパク質（1300 残基超）等をターゲットに選んで、第一に、高難度タンパク質の特性に合わせた優れた要素技術を新たに開発・高度化し、第二に、それぞれのターゲットに適した方法を探索するスクリーニングシステムを構築した。これらの新規で有用な技術を活用して、他領域との連携を進めるとともに、多くの個別課題との連携を、主に高難度試料作製・結晶化に関する共同研究の形で進めた。平成23年度の補助金化にとまない、開発した技術基盤を活用し、創薬支援プラットフォームとして、インシリコ創薬への貢献を果たしている。

確立した技術：●無細胞タンパク質合成法による膜タンパク質の生産技術。●構造・機能解析に適した膜タンパク質試料作製のための性状評価技術。●新規の脂質メソフェーズ法による膜タンパク質の結晶化技術。●無細胞タンパク質合成法による高分子複合体の生産技術。●培養細胞等による膜タンパク質／高分子量複合体の生産技術。●非天然型アミノ酸の部位特異的導入の利用技術。●タンパク質の系統的巻き戻し技術。●新しい結晶化要素技術とそのシステム化。●構造・機能解析に適したタンパク質生産・結晶化法の合理的スクリーニング技術。●マイクロビームの利用に向けた微小結晶操作技術。

達成した目標：●数十種類の GPCR 等のヒト多回膜貫通型タンパク質の高品質試料の生産。●高成功率での高難度膜タンパク質の生産・結晶化、構造・機能解析。●200 kDa 級のヒト長鎖タンパク質の生産。●十数サブユニット高分子量ヘテロ複合体（～700 kDa 級）の生産。●高分子量ヘテロ複合体（～500 kDa 級）の生産・結晶化、構造解析。●高分子量タンパク質・核酸複合体の生産・結晶化、構造解析。●ヌクレオソーム複合体の生産・結晶化と構造・機能解析。●天然型修飾（アセチル化、糖鎖等）を均一に含むタンパク質の生産、「エピヌクレオソーム」への応用。●個別ターゲットタンパク質研究に貢献。●生産・解析・制御の他の技術開発課題との連携を推進。●制御化合物と標的タンパク質との複合体の生産・結晶化と構造解析の加速、インシリコ創薬への貢献。●GPCR 等の機能性抗体の取得、抗体医薬開発への貢献。●高難度タンパク質の生産・結晶化の技術移転、製品化の推進。

(2) 技術開発の進捗及び成果

I. タンパク質合成法

本研究開発の国際的にも類を見ない特徴は、第一に、タンパク質合成系として、無細胞系と生細胞系を、それぞれの特徴を活かして組み合わせること、第二に、拡張遺伝暗号技術を活用して、タンパク質の部位特異的に、非天然型アミノ酸および天然型翻訳後修飾アミノ酸を組み込むことである。

1. 無細胞系および細胞系のタンパク質合成技術 (横山茂之、遠藤弥重太、他)

無細胞タンパク質合成系は、世界をリードする本研究での高度化の成果として、合成量、品質、費用対効果、利便性のいずれをとっても、構造解析試料を生産する方法として非常に優れていることを実証した。無細胞系は、大腸菌、小麦胚芽、ヒト培養細胞、昆虫 (ショウジョウバエ) 培養細胞等から作製しており、ヒト・昆虫の無細胞系で転写・翻訳共役系を構築するなど、利便性を高め、いずれも実用レベルである。特に、高難度のタンパク質に威力を発揮し、大腸菌生細胞系等を凌駕する。膜タンパク質では、脂質二重膜やミセル等への組み込みに、質的・量的に優れる。高分子量ヘテロ複合体でも、均一性が高く、結晶性のよい複合体試料が得られている (実例は II. に後述)。さらに、タンパク質の翻訳後修飾については、糖鎖、リン酸化など、細胞系より均一な試料が得られるという優位性がある (アセチルリジン等の応用例は後述)。ヒト無細胞系は、長鎖タンパク質 (200 kDa 級) や巨大複合体の合成に優れる。また、高度な安定同位体標識試料、細胞毒性を有するタンパク質などの生産にも適する。

細胞系では、ヒト由来の膜タンパク質、高分子量タンパク質等の発現のための哺乳類細胞系として、ヒト HEK293EBNA 浮遊細胞株を用いるトランジェント発現によって、2 mL スケールの発現スクリーニングからリットル・スケールでの大量発現までを迅速に行えるシステムを確立した。通常は、この系で目的タンパク質の調製に必要な条件等を十分に確立した後に、バキュロウイルスと昆虫細胞の系を用いて、さらなる合成量アップを行う。また、分裂酵母の新規発現ベクターシステムを開発し、形質転換体のスクリーニングを効率化した。

これらの様々な合成法、条件から目的タンパク質に適したものを選択するために、マルチステップで最適化する合理的なスクリーニングシステムを構築した。合成法、条件等の選択には、産物の量のみでなく、複数の物理化学・生化学的方法により、安定性、均一性等を評価する。結晶性の評価では、還元メチル化、変異導入、結晶化時のアガロース添加等を体系的に行う。コンストラクトの選択は結晶性を大きく左右するが、タンパク質の末端や内部の困難配列の処理法を、無細胞系 (クローニングせずに PCR フラグメントで可能) や、HEK293 細胞 (トランジェント発現) 等を活用して選択する。タグや融合タンパク質の選択も同様である。適切な複合体形成が品質改良に必須となることが多いが、多数の組合せや条件を迅速にスクリーニングできる。さらに、本システムは、創薬ターゲット (しばしば高難度) の構造に基づく創薬開発にも極めて有効である。

2. 非天然型アミノ酸のタンパク質への部位特異的導入技術 (坂本健作、横山茂之)。

本技術の大幅な改良・拡充を行い、世界最高の技術水準を実現した。ヒト等の哺乳動物培養細胞、昆虫 (ショウジョウバエ) 培養細胞、酵母、大腸菌等の細胞系、無細胞系において、チロシンやリジンの有用な誘導体をタンパク質の任意の部位に導入することが可能になった。特に、大腸菌の翻訳終結因子 RF1 遺伝子破壊株を世界に先駆けて開発し、導入効率を飛躍的に向上し、通常のアミノ酸と同等 (ほぼ 100%) とすることに成功した。この結果、収量が通常の組換え体と同等になったことに加えて、非天然型アミノ酸や翻訳後修飾アミノ酸 (アセチルリジン等) を、タンパク質の複数の指定した部位に導入した試料を均一・大量に調製することが可能になった (ヌクレオソームへの応用等を後述)。分子内 FRET のための蛍光標識の導入に、RF1 破壊株が極めて有用であった。また、高難度複合体構造解明の一環としてタンパク質複合体を光架橋して構造解明する技術開発に取り組み、初の架橋タンパク質複合体構造を解明した。さらに、ヨード原子含有アミノ酸の導入が X 線位相決定に役立つことや、部位特異的な蛍光修飾法が脂質マトリクス内の膜タンパク質結晶の観察に役立つことも示した。

II. 膜タンパク質の生産と結晶化

1. 大腸菌無細胞合成系を利用した膜タンパク質の生産技術 (横山茂之、寺田貴帆、染谷友美)。

大腸菌無細胞合成法を、構造決定可能な膜タンパク質試料調製法として確立した。無細胞合成系に界面活性剤を共存下で合成し、可溶性に発現させる方法は、多種類の多数回膜貫通型タンパク質の合成で有用性が実証できた。さらに、活性型の膜タンパク質を脂質二重膜環境に合成するための新たな手法として、脂質・界面活性剤共存透析法 (リポソームの形成と膜タンパク質の合成・膜への組込を共役) を開発した。本法により、カサノリ由来ロドプシンについて活性型試料を調製し、脂質メソフェーズ法 (後述) で結晶化し、BL32XU を用いて、真核生物の光駆動プロトンポンプとして初めての構造を 1.6 Å 分解能で決定した。無細胞合成系は、通常、細胞系と比べて合成量が格段に多く、高純度の試料の大量調製が可能であり、ヒトのタイトジャンクションタンパク質、ケモカイン受容体等の構造解析による評価を進めた。

2. コムギ無細胞系を用いた膜タンパク質合成法の開発 (遠藤弥重太)。

プロテオリポソーム生産を経る膜タンパク質の一般的な調製技術の開発を進めた。リポソーム共存下の翻訳反応により、1) 機能的に活性を保持した膜タンパク質・リポソーム複合体を生産、2) このプロテオリポソームを簡単な遠心によって沈殿回収（精製タグは不要）、3) 特定の溶液組成と界面活性剤で温和に処理し、プロテオリポソームから膜タンパク質を可溶化する。ヒト GPCR を含む 30 種以上の膜タンパク質が可溶性で、ゲル濾過クロマトグラフィーで単分散性をした。

3. 膜タンパク質精製標品の性状評価（横山茂之、染谷友美、寺田貴帆）。

CPM 法による熱安定性とフォールドの評価法、結合脂質等の検出と定量による安定化因子の同定法、SPR 法による未精製段階の活性評価法などを確立することにより、細胞/無細胞合成、精製、結晶化の方法選択と条件最適化を確実にこなせるようになり、標品の品質が飛躍的に向上した。

4. 膜タンパク質の結晶化を促進する脂質ライブラリーと新しい結晶化法の開発（羽藤正勝）。

脂質二重膜環境中で結晶化を行う脂質メソフェーズ法は、可溶化により不安定になる膜タンパク質の結晶化に適した手法であるが、利用出来るマトリクス脂質種が少なく、20°C 付近に限られる等の問題があった。本研究では、脂質メソフェーズを取るイソプレノイド鎖型脂質を、複数の鎖長と極性基を組み合わせ 10 種以上開発した。この脂質群は広い温度範囲で用いることが可能（0°C も可能で、膜タンパク質の 20 度の安定化に相当）。従来構造解析ができなかった膜タンパク質でも高分解能結晶が得られた。

5. 体系的な発現スクリーニング（横山茂之、染谷友美）計 40 種のヒト膜タンパク質をトライアルセットとし、大腸菌無細胞合成から酵母、昆虫細胞、哺乳動物細胞に至る多様な発現系を用いて発現効率、界面活性剤による可溶化効率等を系統的に評価した。さらに条件を絞って最適化し、ケモカイン受容体（GPCR）、トランスポーター、タイトジャンクションタンパク質等について、大量調製から結晶化へのプロトコルを確立し、高い成功率で構造解析を可能にすることに成功した。

III. 高分子量複合体の生産と結晶化

1. 無細胞系および生細胞系による高分子量複合体の生産（横山茂之、遠藤弥重太、脇山素明、今高寛晃、染谷友美、寺田貴帆、梅原崇史、坂本健作）。

上述のとおり、無細胞タンパク質合成法は、多重ヘテロ複合体の生産に優れている。多重タンパク質複合体では、(1)発現用 DNA を適切な量比で混合することで必要なモル比が得られる、(2)発現順をコントロールできる、(3)シャペロン等の補充が容易、(4)核酸やその他のリガンドも可能、等の様々なメリットがあり、均一性が高く、結晶性のよい複合体試料が得られ、多くの結晶構造解析に成功した。

細胞系では、バキュロウイルスと昆虫細胞の発現も、多重感染で大量調製に用いることができる。また、8 成分共発現の大腸菌汎用ベクターを開発し、ヒト 26S プロテアソーム制御リング複合体（7 成分）の再構成に成功した。小麦胚芽無細胞系でもプロテアソームの再構成が可能になった。高密度培養が可能なピキア酵母を利用して、真核細胞内在性複合体の調製技術を開発し、12~15 成分の真核複合体群を調製した。細胞系または無細胞系で、十数サブユニット高分子量ヘテロ複合体（700 kDa 級）の生産、500 kDa 級複合体の生産・結晶化、構造解析に成功している。

非天然型アミノ酸導入技術の応用では、タンパク質複合体の光架橋を、複合体内部のタンパク質間相互作用解析に応用することに成功し、構造解析に適した試料の作製が可能になった。架橋体をそのまま構造解析試料に用いることにも道が拓かれている。

2. ヒト「エピヌクレオソーム」の生産技術（横山茂之、坂本健作、梅原崇史）。

非天然型アミノ酸導入技術の応用により、遺伝情報発現の反応場となるヌクレオソームコア粒子（NCP）に複数のエピジェネティック情報（アセチル化・メチル化様・リン酸化・DNA メチル化）を導入した「エピヌクレオソーム」の再構成技術を世界に先駆けて開発した。これにより、ヒトエピゲノムを標的とした創薬技術が初めて本格的に可能となった。また、NCP を中心とする「構造エピゲノミクス」の技術基盤を確立した。実際、NCP に結合するタンパク質の探索評価系を開発して、ヒト転写調節因子が NCP に結合した複合体構造を初めて解明した。また、NCP 脱メチル化酵素と長鎖ヒストンとの複合体構造解明により、ヌクレオソーム脱修飾の新規分子機構を解明した。

IV. 創薬プラットフォーム

1. インシリコスクリーニングと構造に基づくシード最適化（横山茂之、梅原崇史、半田徳子）

本課題で開発した高難度タンパク質の生産・結晶化の新たな技術基盤は、立体構造に基づくインシリコスクリーニングとシード最適化のプラットフォームとしても極めて有用である。すでに、十件以上の標的タンパク質と候補化合物との複合体の生産・結晶化と構造解析を行って、最適化を行い、IC₅₀ が nM レベルのシード化合物を多数得ている。標的タンパク質の生産には、無細胞タンパク質合成技術が威力を発揮している。他方、非天然型アミノ酸導入技術の応用である「エピヌクレオソーム」を基質とする

化合物アッセイ系を用いる化合物スクリーニングも開始している。	
2. 機能性抗体の作製 （横山茂之、染谷友美）。	
GPCR等の多数回膜貫通タンパク質を無細胞合成とリポソームへの組み込みを行い、抗原として用いて機能性抗体の取得を行った。抗体医薬として必要な Kd サブ nM レベルの抗体が既に得られている。	
3. タンパク質の構造解析件数	
PDB 登録数	65 件
PDB 登録の有無にかかわらず構造解析したタンパク質数	156 件
4. 各機関の論文発表件数	77 件
5. 各機関の公開したツールやデータベース等の件数	6 件
6. 各機関の特許出願件数	26 件（うち国外 19 件）
7. 各機関の成果を活用した共同研究数（プログラム内外含む）	223 件 （うち産業界との共同研究数 9 件）
8. 当初計画に対する各機関の達成度	
当初計画で目指した新規要素技術開発とそれらのシステム化は、全て達成することができた。それに加えて、プログラム内外の共同研究により、開発した新しい技術を用いることで初めて可能になった試料調製、結晶化、構造解析、機能解析、インシリコ創薬等で、研究成果に大きく貢献することができた。	
9. 課題内の情報共有・連携体制	
「トライアルセット」を共通化することで、課題内の技術開発に軸を通し、様々な要素技術を共有することで全体としての目標達成を可能にした。課題内での技術を移転・汎用化により、商品化も進めた。	
10. 他の課題との情報共有・連携	
開発した技術基盤を活用して、生命・医薬・食環の多くの課題との連携・共同研究を推進した。主なものは次の通り。●プログラム内での技術の普及と共同研究への発展を目的として脂質メソフェーズ法講習会を実施。●月原先生：脂質メソフェーズ法を用いたギャップジャンクションチャネルタンパク質の結晶化の実施と技術移転。●FBA2・田中先生：プロテアソーム制御リング複合体の再構成（世界初）。●FBA4・佐藤先生：結晶化が困難な P1B-type ATPase は、可溶性部が大きく、脂質メソフェーズへの再構成は無理と考えられていたが、新手法を導入し、機能を維持したまま再構成する方法を見だし、結晶化を可能にした。●FBA5・中川先生：脂質メソフェーズ法を用いた膜電位センサータンパク質の結晶化の実施と技術移転。●FBA7・匂坂先生：Claudin-4 結合タンパク質 C-CPE 遺伝子提供を受けた。C-CPE と Claudin-4 の複合体を大腸菌無細胞技術によって合成、精製し、結晶化に成功した。●FBA8・岩井先生：非天然型アミノ酸技術により、高分子複合体 LUBAC とユビキチンとの光架橋を行い、ユビキチン認識に必須な領域の同定に成功した。●FBB4・岩田先生：腸球菌 V 型 ATPase の A3B3 複合体は、大腸菌や腸球菌での発現・精製が困難であったが、大腸菌無細胞タンパク質合成技術の適用により大量精製に成功、X 線結晶構造が決定された。脂質メソフェーズ法に関する技術移転。●FBB5・濡木先生：新たな細胞技術を適用して、非翻訳 RNA 関連のヒト Dicer、Argonaute 等の高分子量複合体の大量発現に成功。脂質メソフェーズ法に関する情報提供。●MPA2・福井先生：大腸菌無細胞合成技術等によって、DOCK2、ELMO1 の機能領域の同定、構造解析に適した領域・発現系を選択し、それらの機能的複合体構造の決定に成功。Dock2, Dock180 について ELMO1 および Rac1 との高分子量複合体（20 万超）について大量発現し、Dock180 複合体では結晶化に成功。●MPA4・富田先生： γ セクレターゼのヘテロ複合体膜タンパク質を、大腸菌無細胞合成技術により再構成した。また、 γ セクレターゼのホモログ SPP については、無細胞合成 SPP が天然 SPP と同等の活性を示し、大量精製と結晶化にも成功。●MPA6・門脇先生：インシリコ薬剤探索において、AMPK 等の標的酵素タンパク質試料の調製、阻害化合物との複合体の結晶化と構造解析に、本課題で開発した生産システムを活用。複合体構造に基づく最適化サイクルを回し、新規の阻害化合物を得ることに成功。他方、極めて高難度なアディポネクチン受容体（AdipoR1/2）について、昆虫細胞とヒト細胞を中心に、生産の要素技術（欠損変異、融合タンパク質作成、安定化脂質・界面活性剤の同定、相互作用分子との相互作用解析、立体構造認識抗体作成等）を	

駆使してスクリーニングや大量調製、結晶化を行い、AdipoR2 および AdipoR1・抗体複合体の結晶化に成功。●MPB1・松島先生：GPCR とリガンド等との結合解析のため開発した手法を適用し、ヒト培養細胞で発現させた CCR2 がリガンド MCP-1 と結合することを示唆。MCP-1 は、大腸菌無細胞蛋白質合成系により大量調製し、CCR2 の発現量を上げることに成功。●MPB2・清水先生：メチル化酵素と結合する再構成ヌクレオソームコア粒子を供与する連携。●FEA6・伊藤先生：非天然型アミノ酸として翻訳後修飾（アセチルリジン）を導入する技術を適用し、任意の部位に修飾を導入したタンパク質（HMGCL）の均一な試料を大量に得ることに初めて成功して、脱アセチル化酵素 SIRT3 の阻害剤探索、2次評価に活用。●PPD1・高木先生：ターゲットタグ（P4×3-tag）発現ベクター、精製用樹脂及び抗体の提供を受け、利用法を検討した。●PPD2 のスクリーニング技術を利用した試料安定生産条件の探索、PPD1 のタグ技術を利用した精製条件の検討を行った。（山下担当分）●PPD3・岩田先生：本課題で調製した AdipoR1、AdipoR2、Claudin-4 試料を用いて、結晶化促進用モノクローナル抗体の作製を共同で行い、共結晶化に好ましい、天然構造を認識する高親和性 IgG 産生クローンを得た。●SAC1・山本先生：脂質メソフェーズ中の蛍光標識タンパク質微小結晶を提供し、SPRING-8 BL32XU においてマイクロビームでの蛍光標識膜タンパク質微小結晶検出系の開発に貢献。また、蛍光標識結晶をターゲットし、微小結晶の X 線回折データセットを取得。●SAD1・出村先生：大腸菌無細胞合成により、数種類のアミノ酸を選択的安定同位体標識した膜タンパク質試料を大量調製し、固体 NMR 解析用試料として提供。●CRC1・長野先生：ライブラリーから候補化合物群の供与を受ける。標的タンパク質試料（Pim1 等）を作製し、化合物との複合体構造を決定。

1.1. 人材育成

本課題では高難度タンパク質の調製・結晶化のために、世界をリードする高度な技術を開発しており、個別の課題を通してでは非常に困難な、技術開発分野での優れた人材の育成に、大きく貢献した。更に、全体交流会や班会議等への参加により、次世代の構造生物学の指導者の育成にも力を入れた。

1.2. 終了までの具体的な見通し

開発した技術基盤を活用して、プログラム内外との連携・共同研究を推進する。膜タンパク質（7回膜貫通受容体等）、巨大複合体などを含む著しく高難度の試料について、既に試料調製・結晶化に成功しており、多数の構造を決定し、大きな成果を上げられると考えている。補助金に伴い、創薬等支援プラットフォームとして、シードの最適化までに行い、インシリコ創薬に大きく貢献する。

1.3. 本プログラムにおける成果が我が国の科学技術発展及び産業応用に与える効果について

本プログラム終了後は、現在すでに開始している技術移転・普及を、基礎研究および産業応用の両面で、さらに拡大する。技術移転や共同研究として特に引き合いの多いものは、GPCR 等の膜タンパク質の無細胞合成、それを応用した機能性抗体開発と薬剤スクリーニング、脂質メソフェーズによる結晶化と立体構造解析；非天然型アミノ酸導入によるタンパク質間相互作用の解析、エピヌクレオソーム等を用いるエピジェネティクス解析、それらを応用した薬剤スクリーニング等である（製薬企業6社と開始している）。アカデミア発のインシリコ創薬を支援するプラットフォームとしては、現在開始している支援を拡大して継続することにより、複数のリードの製薬企業等への導出が可能と期待される。無細胞タンパク質合成等の研究試薬は、ThermoFisher、TAKARA 等からの販売を継続して広く普及するとともに、非天然型アミノ酸導入技術、脂質メソフェーズによる膜タンパク質結晶化等も製品化を進める。

1.4. 特記事項

マイクロビームビームラインの利用に向けた微小結晶操作技術の開発に参加しており、今後は、創薬のためのハイスループット化等で連携を強める予定である。

1.5. 研究費一覧

	19年度	20年度	21年度	22年度		23年度	計
設備備品費（千円）	10,000	4,000	0	350	設備備品費（千円）	26,250.00	
試作品費（千円）	0	0	11,881.8	0	人件費（千円）	362847.077	
人件費（千円）	262,574.925	362,682.537	362,086.851	368,108.296	事業実施費（千円）	180902.923	
業務実施費（千円）	364,348.152	227,355.925	182,072.888	136,618.628	その他（千円）	0.000	
間接経費（千円）	191,076.923	178,211.538	166,812.461	151,523.076	間接経費（千円）	0	

生産C 1 - A

合計（千円）	828,000	772,250	722,854	656,600	合計（千円）	570,000	3,549,704
--------	---------	---------	---------	---------	--------	---------	-----------

代表／分担機関の課題名	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（PURE system 技術の高度化ならびにタンパク質の系統的巻き戻し技術の確立）
代表／分担機関	国立大学法人東京大学
機関の代表研究者名	大学院新領域創成科学研究科 教授 上田 卓也 大学院農学生命科学研究科 教授 田之倉 優

1. 課題開始時における各機関の達成目標

①. 膜タンパク質の合成のための **PURE system** の開発 代表的な膜タンパク質を発現させ、各々の因子要求性を詳細に解析し、膜タンパク質合成用の **PURE system** の高度化を行う。キット化を図ることで蛋白質生産システムとして提供する。

②. 複数遺伝子の共発現による複合体発現系の開発 **FoF1-ATP** 合成酵素をモデル蛋白質として、これらのサブユニットの共発現による膜タンパク質複合体の形成プロセスを詳細に解析し、膜複合体合成に適した **PURE system** の基本設計を行う。

③. タンパク質の系統的巻き戻し（リフォールディング）技術の確立 凝集抑制溶液を用いた（変性剤あり）方法と高圧処理（変性剤なし）による方法で系統的巻き戻し技術を確立する。巻き戻しで得られたタンパク質は、CDや活性測定等で評価し、活性型タンパク質の立体構造を決定する。また、膜タンパク質を高圧処理し、効率の良い可溶化条件を検討する。

天然構造への巻き戻し

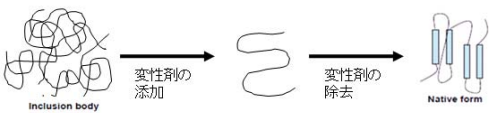
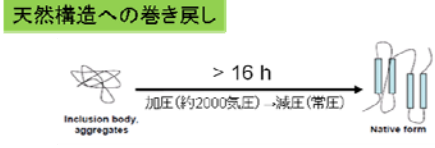


図1 凝集抑制溶液を用いた巻き戻し

天然構造への巻き戻し



天然構造の救出

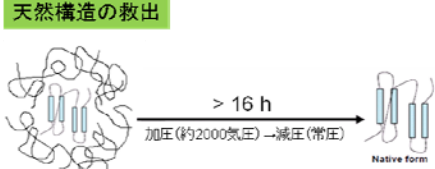


図2 高圧処理(変性剤を用いない)による巻き戻しと救出*

※凝集体の中には二次構造を保持し、天然構造のフォールドに近いものが存在しており、高圧処理を施すことで凝集体から分離することができる。

2. 平成23年5月末時点における各機関の事業計画に対する研究成果

(1) 成果概要

- ①. 膜タンパク質の合成のための **PURE system** の開発 **PURE system** に *a* サブユニット (*a*) を欠損した **FoF1** を持つプロテオリポソームを加え *a* タンパク質を合成した。その結果、*a* 合成により相補された **FoF1** の完全な機能回復が確認された。また *a* の膜貫通部分に位置する重要残基をアラニン置換した変異体を解析し、活性に対する重要部位を同定した。
- ②. 複数遺伝子の共発現による複合体発現系の開発 **Fo** を構築する全サブユニット *a*, *b*, *c* 3つの遺伝子を PCR 法により調整し、リポソームを含む **PURE system** 内で共発現をおこなった。**Fo** 複合体として約 70-80nM の合成効率であった。さらに **F1** 複合体を投入することにより ATPase 依存的プロトンポンプ活性を検出することができた。

③. タンパク質の系統的巻き戻し（リフォールディング）技術の確立 不溶性に発現したタンパク質を凝集抑制溶液を用いた（変性剤あり）方法や高压処理（変性剤なし）による方法でリフォールディングさせ、構造解析までの系統的プロセスを確立した。また、膜タンパク質の可溶化において界面活性剤存在下、高压処理することで細胞膜から抽出することに成功した。

(2) 技術開発の進捗及び成果

- ①. FoF1 Δa 複合体を組み込んだプロテオリポソームを PURE system に加え、欠損している a タンパク質を無細胞合成した。その結果 FoF1 の ATP 加水分解によるプロトン輸送能と逆反応である ATP 合成活性が確認された。これは補填された FoF1 が完全に機能を回復したことを示している。また、a サブユニットの膜貫通領域に存在する塩基側鎖をアラニン置換した5つの変異体を無細胞合成し活性の変化を解析した。その結果、N90A と R169A では不活性型となることが明らかになった。また D112A と Q217A では活性の著しい低下を観察したものの、完全な消失にはいたらなかった。これによりこれらのアミノ酸は、a サブユニットのもつ隣接する c リングへのプロトンの受け渡し機能において主要な役割を果たす残基であることが明らかとなった。さらにこれら変異体を大腸菌で発現したところ、D112A と Q217A の変異については a サブユニットを膜面分へ合成できず無細胞系の有効性が示された。
- ②. Fo を構築する a、b、c サブユニットはそれぞれ 1:2:10 のストイキオメトリーで複合体を構築することが知られているが、さらにプライベートシャペロンである UncI という膜蛋白質が FoF1 のオペロン上にコードされている。この UncI を含む4種の膜蛋白質を PURE system 内で共発現をおこなったところ、100 μL 反応液当たり 7-8 pmol の Fo 複合体を合成することができた (Fig.3)。合成結果後、FoF1 の ATPase 依存的プロトンポンプ活性の測定をおこなったところ、上記①のケースと比べても非常に良好な活性を検出することができた (Fig.1)。しかし UncI の活性発現に対する寄与は確認されなかったため、UncI は Fo の発現には必ずしも必要ではなくむしろプロテアーゼや他の煩雑因子が多く含まれる細胞内において Fo の構築を保護する機能であることが示唆された。こういった結果は、高度に純化された本系をもちいて初めて明らかになったことであり、いまままで詳細な生化学的解析が困難だった膜蛋白質の研究を加速させる事例にあたると言えるだろう。

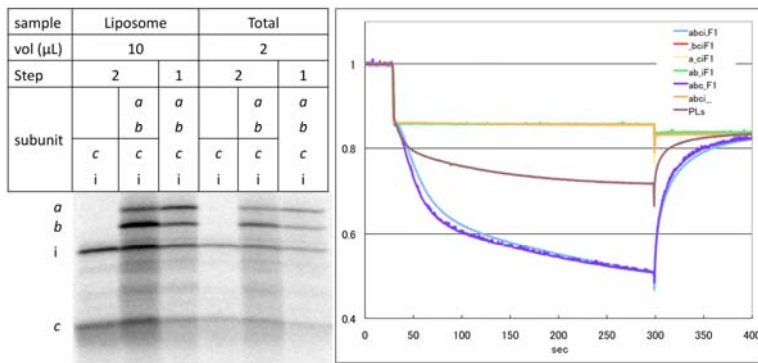


Fig. 1 PURE system における Fo 全サブユニットタンパク質の共発現（左）と合成後の ATPase 依存的プロトンポンプ活性（右）。

上記①②の実験結果については昨年その方法論をまとめ論文とした (*Methods in Molecular Biology*, 607:161-71)。また a サブユニットに関する生化学的解析結果についても現在投稿中である。 (*J. Bio. Chem.* submitted)。

当初の目的である“膜蛋白質合成・解析用の PURE system の高度化”と“膜蛋白質複合体合成に適した系の基本設計”という主要項目については、a サブユニット解析と機能を保持した Fo の無細胞合成の結果から達成できたと言える。

本研究で得られた成果について、2010 年度だけでも ALife XII in Denmark (poster)、第五回無細胞生物

科学学会 in 岡山市(poster)、第 4 8 回日本生物物理学会年会 in 仙台市(poster&oral)において発表した。また ALifeXII においては、Poster 賞を受賞した。

基盤技術である PURE system の高度化と、付加因子であるリポソームの条件検討については既に開発の大部分が終了している。また今回モデルとなった FoF1 以外にも SecYEG 膜蛋白質複合体においても成功をしていることから、共通性・汎用性の高い技術基盤が整備されていると言える。

- ③. 不溶性画分に発現したタンパク質を対象として巻き戻しによる活性型タンパク質の調製を試みた。第一に変性剤を用いない系として高压処理を施した巻き戻し実験 (PreEMT(BaroFold)を使用した 2000 気圧処理)、第二に変性剤を用いた巻き戻し法での巻き戻し実験 (iFOLD2(Novagen)の 95 種類の溶液条件) を行った。脱アセチル化酵素については、iFOLD2 で可溶化率の高い条件の全てで酵素活性が確認でき、濁度と活性に負の相関が認められた。また、iFOLD2 の条件から変性剤を除いて高压処理したところ、より効率の良い巻き戻し条件を確立することができた。ジスルフィド結合を有しているサイトカインは高压処理を施して各種クロマトグラフィーによる精製後、¹H-¹⁵N HSQC 測定を行い、可溶性発現したタンパク質と全く同じフォールドを持つタンパク質が封入体から得られることを示した (図 1)。

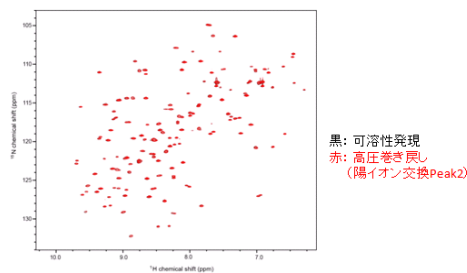


図 1 巻き戻しによって調製したサイトカインの NMR 解析 (¹H-¹⁵N HSQC)

ヌクレアーゼ (図 2)、酸化還元酵素 (図 3) については高压処理で可溶化したサンプルから結晶を得ることに成功し、結晶構造を決定した。ヌクレアーゼは 150×150×100 μm、酸化還元酵素は 100×50×30 μm の大きさの結晶を得て、ヌクレアーゼは放射光施設で 1.6 Å 分解能の X 線回折データを取得し、構造を決定した ($R_{work} = 17.0\%$, $R_{free} = 19.1\%$)。酸化還元酵素は放射光施設で 2.2 Å 分解能の X 線回折データを取得し、構造の精密化を進めている ($R_{work} = 22.9\%$, $R_{free} = 27.3\%$)。酸化還元酵素はさらに 2 種類の化合物を結合させて結晶を得ることに成功し、それぞれ 1.95 Å、2.05 Å 分解能の回折データを取得している。さらにサイトカインは 2.0 Å の回折データを取得し、構造を決定することに成功した ($R_{work} = 18.3\%$, $R_{free} = 23.5\%$)。変異体についても同様の巻き戻しを行い、1.6 Å の回折データをもとに現在精密化を進めている ($R_{work} = 26.3\%$, $R_{free} = 30.3\%$)。

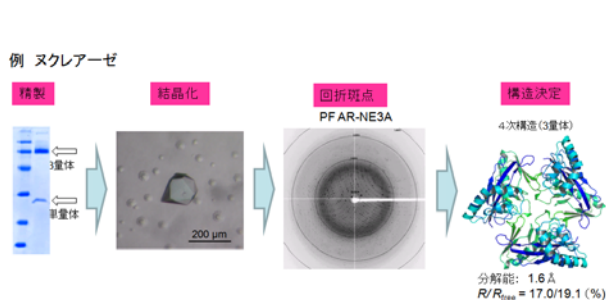


図 2 巻き戻しによるヌクレアーゼの結晶構造解析

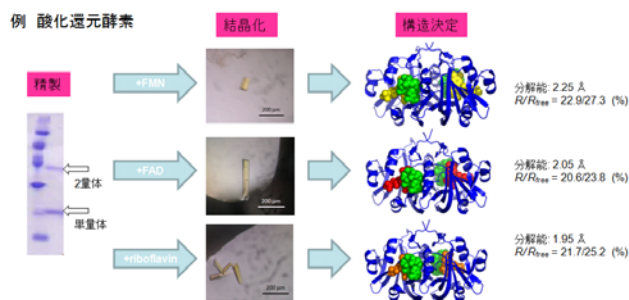


図 3 巻き戻しによる酸化還元酵素の結晶構造解析

受容体膜タンパク質については界面活性剤存在下、膜画分を高压処理することで細胞膜から抽出することができた。表面プラズモン共鳴によるリガンド結合解析を行い、リガンド結合能の検出にも成功した。また、トランスポーターは界面活性剤存在下、高压処理を施すことで可溶化を確認でき、高压処理を施す時間を変えることで可溶化する量が異なることを示した。

生産C 1 - B

これらの結果をもとに効率的巻き戻しのフローチャートを作成し、パイプラインの構築を進めた。構造解析の成功事例を示し、さらに産業界を含めた共同研究も進めていることから予想を上回る成果を達成したと考える。巻き戻し技術は、無細胞発現系などの手法を使っても凝集体として不溶性発現するようなタンパク質を活性型のタンパク質として回収できる可能性が開けるため、共通性・汎用性の高い技術といえる。今後は制御領域の化合物ライブラリーを利用する等、さらなる巻き戻しの促進を図る。

他分野の研究者や産業界に成果の活用を推進するために、産学懇談会や研究会でのプレゼンテーションや雑誌の特集号への掲載など、外部への研究成果の発信を積極的に行っている。

3. タンパク質の構造解析件数

PDB 登録数	16 件
PDB 登録の有無にかかわらず構造解析したタンパク質数	20 件
4. 各機関の論文発表件数	30 件
5. 各機関の公開したツールやデータベース等の件数	0 件
6. 各機関の特許出願件数	1 件 (うち国外〇件)
7. 各機関の成果を活用した共同研究数 (プログラム内外含む)	26 件 (うち産業界との共同研究数 4 件)

8. 当初計画に対する各機関の達成度

当初計画で目指した「膜蛋白質合成・解析用の PURE system の高度化」と「膜蛋白質複合体合成に適した系の基本設計」はすべて達成することができた。さらに、本系を応用してモデルタンパク質複合体 FoF1-ATP 合成酵素以外にも、SecYEG についても良好な結果が得られた。

タンパク質の系統的巻き戻し技術の確立については、封入体から活性型タンパク質を調製することができた。構造解析の成功事例を示し、産業界を含めた共同研究も進めていることから予想を上回る成果を達成したと考える。

9. 課題内の情報共有・連携体制

課題内での技術を移転・汎用化により商品化も進めた。班会議に参加し、進捗の報告や今後の技術開発、プログラムへの貢献に関する活発な議論を行うことで情報を共有している。また、課題内で可溶化しないサンプルの提供をうけ、高圧処理による共同研究を進めている。

10. 他の課題との情報共有・連携

いくつかの他グループ(企業を含む)に PURE system を提供し、あるいは他グループから封入体に発現したサンプル及びプラスミドの提供を受けるなどして共同研究を進めている。さらに化合物ライブラリーを利用することにより制御領域との連携を進めている。

11. 人材育成

代表研究者の定めた研究目標・計画に基づき、プロジェクト構成員であるポスドクおよび特任助教が段階的な短期実験プランニングをおこないこれを実行した。また研究背景や実験技術を学部生、大学院生に教授し共に実験データの取得につとめた。これらの研究データは代表研究者を主としたラボミーティングで定期的に発表し、学術的な観点からの意見交換やディスカッションをおこなった。また大学院生、

生産C1-B

参加研究者を全体交流会、班会議等に参加させ技術習得や情報の収集、ディスカッションを積極的に行える環境を整えることによって若手の人材育成に努めている。プロジェクトに参加した研究員のプロジェクト終了後の進路については、この分野において引き続き研究活動に従事することを予定しているが現在未定である。

1 2. 終了までの具体的な見通し

すでに活性を維持した膜蛋白質複合体 Fo の無細胞合成は成功しているため、今後は可溶性蛋白質複合体 F1 の無細胞合成と、さらに FoF1 両者を一段階で合成することに挑戦する。これにより、多種類（8 サブユニット）の蛋白質を無細胞で共発現する際の各合成量調整や活性発現への寄与についても解析をおこなうことが可能である。またミトコンドリア異常や脂質代謝異常により引き起こされる疾患には膜蛋白質の異常に起因したものが多く見られるため、これら疾患に関する基礎解析ツールとして本技術を応用し、開発技術の有用性の実証をおこなう。

巻き戻し技術の更なる汎用化・最適化に向けてキットや試料調製法を開発するとともに、化合物ライブラリーを積極的に利用する。また、支援も円滑に推進させる。他分野の研究者や産業界に成果の活用を推進するために、産学懇談会や研究会でのプレゼンテーションを積極的に行っている。

1 3. 本プログラムにおける成果が我が国の科学技術発展及び産業応用に与える効果について

本研究課題で得られた成果は、特に膜蛋白質をターゲットとした創薬開発のため、標的膜蛋白質サンプルの入手法として利用できる。またさらに、単に蛋白質合成系としての利用だけではなく、機能評価系に直接移行できるという利用価値がある。創薬開発に向けた技術発進を通して社会へ還元していくとともに、さらなる新規技術の創成にも貢献していく。これまでも公開シンポジウムや、雑誌、産学懇談会等で広報してきているが、今後さらに広報していくことで積極的に共同研究を推進する。

1 4. 特記事項

膜蛋白質解析のために体系化した無細胞技術とそのストラテジーをより広いフィールドで活用するために、共同研究と研究支援の両面について実施体制を整えている。特に上記 13 にも記述した創薬への応用に関しては他の技術拠点との連携を経て、その汎用化を視野に入れた運用を試みる。

1 5. 研究費一覧

	19年度	20年度	21年度	22年度		23年度	計
設備備品費（千円）	3,091	259	8,558	1,876	物品費（千円）	14,753	
試作品費（千円）					人件費・謝金（千円）	37,792	
人件費（千円）	27,028	37,610	36,251	32,560	旅費（千円）	2,010	
業務実施費（千円）	39,112	26,708	15,303	17,333	その他（千円）	5,445	
間接経費（千円）	20,769	19,373	18,034	15,531	間接経費（千円）	0	57,507
合計（千円）	90,000	83,950	78,146	67,300	合計（千円）	60,000	379,396

分担機関の課題名	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（高度タンパク質生産基盤技術の汎用化）
分担機関	株式会社プロテイン・エクスプレス
機関の代表研究者名	高木 広明

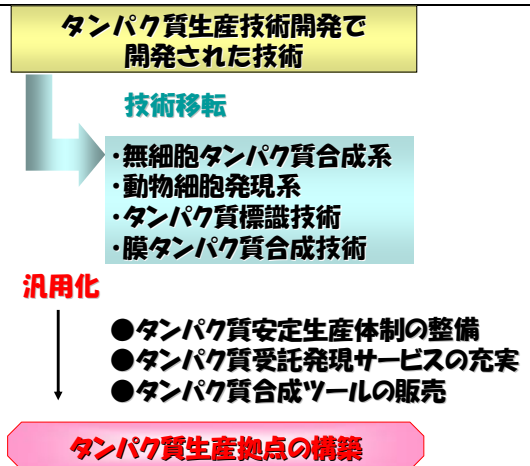
1. 課題開始時における各機関の達成目標

タンパク質の生産に関する共通性・汎用性の高い基盤的な技術を開発し、本事業の研究を支援することのできる研究基盤「タンパク質発現ライブラリー基盤」を構築することを目的とする。

構造解析においては、重要ターゲットタンパク質の試料調製段階が高難度で、深刻なボトルネックとなることが多い。高難度タンパク質といわれるものは、その本来の機能と対応して、多回膜貫通、高分子量複合体の形成、翻訳後のプロセッシングと修飾（糖鎖の付加、リン酸化等の翻訳後修飾等）、活性制御機構に根ざす多状態性や構造・機能の短寿命性等の多様な特性をもつ。この問題を解決するため、高難度タンパク質（高分子量複合体、膜タンパク質等）の調製のための優れた要素技術を開発するとともに、タンパク質試料が構造解析に適しているか否かを分析・評価するためのシステムを作成する。多様な困難さをもつ重要ターゲットタンパク質について、発現方法、結晶化条件等の広範囲な探索と最適化を行うシステムを構築し、その結果を体系化することによって、構造解析や機能解析に適した試料調製を可能にする研究基盤を整備する。

このため、独立行政法人理化学研究所、国立大学法人東京大学、株式会社プロテイン・エクスプレスおよび株式会社セルフサイエンスが共同で業務を行う。

株式会社プロテイン・エクスプレスでは独立行政法人理化学研究所および国立大学法人東京大学で開発・保有するタンパク質生産技術を移転・汎用化して、ターゲットタンパク質研究の支援を行なう。



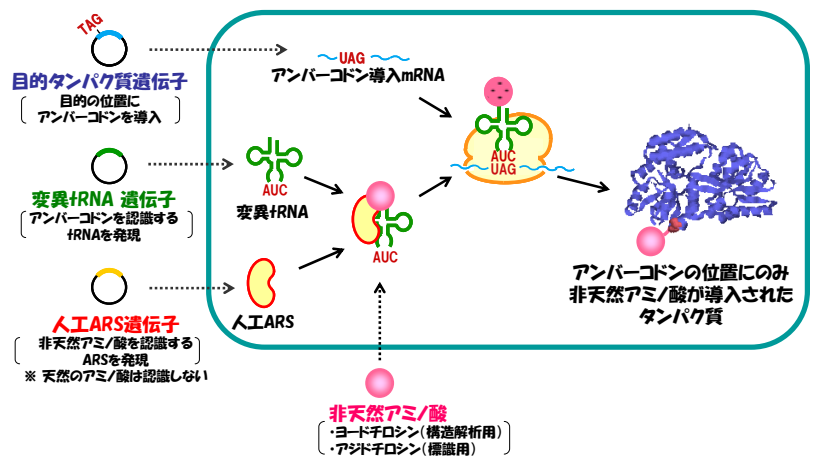
2. 平成23年5月末時点における各機関の事業計画に対する研究成果

(1) 成果概要

●再構成無細胞タンパク質合成技術の検証を行なった。転写，翻訳，エネルギー再生に必要なタンパク質因子調製法の技術移転、リボソームの効率的な調製方法の技術移転により、再構成無細胞系でタンパク質の合成を検証した。市販には至らなかった。

●in vivo 非天然アミノ酸導入技術を取り上げ、大腸菌および動物細胞による非天然アミノ酸を組み込んだタンパク質の合成技術の検証ならびに本技術の事業化のための評価試験をおこなった。

非天然アミノ酸であるヨードチロシン、アジドチロシン、アジドZ



リジンの導入効率を高める検討、アジドチロシン導入タンパク質に蛍光色素などを標識する Staudinger Ligation 効率向上試験を行った。前者は95%以上、後者は60%程度の導入・標識効率まで向上させたが、標識効率80%以上の目標には達せず汎用化までには至っていない。

●研究支援として、構造解析用無細胞タンパク質合成キットの提供の実現のため、独立行政法人理化学研究所が保有する特許「無細胞タンパク質合成用抽出液の製造方法及びその方法により製造される細胞抽出液」日本：特願2004-105251 欧州：EP 04734357.9 (EP 1655375) 米国：US 11/282613 (US 2006-0134735) の実施許諾を受け、無細胞タンパク質合成キットの販売を開始した (RYTS)。さらに、本キットを用いたタンパク質生産サービスの提供のための社内体制の整備を行なった。



RYTSの大腸菌抽出液は、独立行政法人 理化学研究所によって、X線構造解析、NMR構造解析用として開発され¹⁻⁴、以下の特徴を持っています。

特徴
高分子量タンパク質の合成
 ・ CloverDirect™試薬を用いた非天然アミノ酸導入タンパク質合成
 ・ 300 μLの当たり、最大150 μgのタンパク質が合成可能
 ・ 透析膜を利用することで、長時間の合成反応が可能

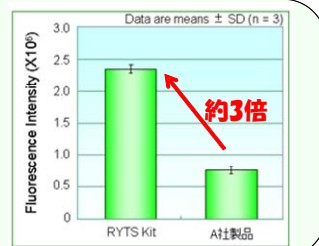
- 1) *Analytical Biochemistry*, 377, 156-161 (2008)
- 2) *Eur. J. Biochem.*, 239, 881-886 (1996)
- 3) *Journal of Structural and Functional Genomics*, 5, 63-68 (2004)
- 4) *Protein Expression and Purification*, 68, 128-136 (2009)

性能比較

RYTS Kitおよび他社(A社)製品を用いて発現させた Green Fluorescent Protein (GFP)の蛍光強度測定

約3倍の蛍光強度を得ることができた。
 -> 正しい構造を持ったGFPが効率的に合成されている

**X線構造解析
 NMR構造解析** に適している



(2) 技術開発の進捗及び成果

- ・ 研究の進捗状況・成果
 → 成果概要のように、概ね目標通りに進捗している。
- ・ 論文発表、公開したツールやデータベース等、特許件数
 → 検証および汎用化を目的としているため、それぞれの公表はない。
- ・ 課題公募時の目的に対し、どの程度達成されているか。
 → 90%程度の達成率。膜タンパク質合成の検証と汎用化が未達。
- ・ 外部への研究成果等の発信
 → 2010. 2. 15 日経バイオテックに、大腸菌無細胞たんぱく質合成キット発売記事を掲載する。
- ・ 本プログラムの研究支援のために共通性・汎用性の高い基盤的な技術開発や技術基盤の整備を行っているか。
 → 整備を行っている。
- ・ 生産、解析、制御等の情報の共有化が進められているか。
 → 分担機関である当社からの発信はない。

3. タンパク質の構造解析件数

PDB 登録数	0 件
PDB 登録の有無にかかわらず構造解析したタンパク質数	0 件
4. 各機関の論文発表件数	0 件
5. 各機関の公開したツールやデータベース等の件数	0 件

生産C1-C

6. 各機関の特許出願件数	0件（うち国外0件）						
7. 各機関の成果を活用した共同研究数（プログラム内外含む）	0件 （うち産業界との共同研究数0件）						
8. 当初計画に対する各機関の達成度							
90%程度の達成率。膜タンパク質合成の検証と汎用化が未達。							
9. 課題内の情報共有・連携体制							
<ul style="list-style-type: none"> ・班会議だけでなく、代表機関／代表者と進捗状況などに関して会議・面談を行っている。 ・本プロジェクトから派生した NEDO 助成事業では、代表機関を共同研究者として情報の共有・連携を図った。 							
10. 他の課題との情報共有・連携							
分担機関である当社と他の課題との連携は少ない。							
11. 人材育成							
株式会社なので、人材の育成や教育には力点を置いていない。							
12. 終了までの具体的な見通し							
<p>タンパク質生産では我が国が世界をリードしている無細胞合成系とタンパク質標識技術の技術移転と汎用化を主テーマとしている。大腸菌無細胞合成に関しては汎用化を行い、国内外で最も効率よいキットとして一般に提供できるようにした。さらに、この系を進化させ、SS や膜タンパク質を効率よく生産できるキットに進化させる。SS は終了までに完成できそうである。</p> <p>タンパク質の標識に関しては、標識タンパク質の用途開発に焦点を当て、新規な蛍光均一免疫測定法を別のプロジェクトで開発した。本成果を社会に還元するための取り組みを、共同研究開発を通し積極的に行なうとともに、具体的な測定項目や測定方法を提案している。</p>							
13. 本プログラムにおける成果が我が国の科学技術発展及び産業応用に与える効果について							
<p>タンパク質生産技術は、タンパク質の構造解析のみならずタンパク質機能解析、タンパク質や抗体に基づく計測技術等に必須な基盤技術であり、医薬、食品、環境分野など産業応用に重要な技術である。当社は本プログラムにおいてタンパク質生産技術の技術移転や汎用化を行い、社会に研究用試薬・有用タンパク質・測定法等を提供していきます。</p>							
14. 特記事項							
<p>タンパク質生産技術の産業化の一環として、当社の「ブレビバチルス菌を用いた抗体精製用タンパク質製造技術の開発」は、関東経済産業局から平成 23 年 6 月に「中小企業のものづくり基盤技術の高度化に関する法律」に基づく特定研究開発等計画の認定を受けました。</p>							
15. 研究費一覧							
	19年度	20年度	21年度	22年度		23年度	計
設備備品費（千円）	0	0	0	0	物品費（千円）	0	
試作品費（千円）	0	0	0	0	人件費・謝金（千円）	3,837	
人件費（千円）	0	0	3,256	3,249	旅費（千円）	0	
業務実施費（千円）	769	692	2,898	2,366	その他（千円）	2,663	
間接経費（千円）	231	208	1,846	1,685	間接経費（千円）	0	3,969
合計（千円）	1,000	900	8,000	7,300	合計（千円）	6,500	23,700

分担機関の課題名	小麦胚芽無細胞タンパク質合成技術を用いたタンパク質生産基盤技術の汎用化
分担機関	株式会社セルフリースサイエンス
機関の代表研究者名	森下 了

1. 課題開始時における各機関の達成目標

タンパク質の生産に関する共通性・汎用性の高い基盤的な技術を開発し、本事業の研究を支援することのできる研究基盤「タンパク質発現ライブラリー基盤」を構築することを目的とする。

構造解析においては、重要ターゲットタンパク質の試料調製段階が高難度で、深刻なボトルネックとなることが多い。高難度タンパク質といわれるものは、その本来の機能と対応して、多回膜貫通、高分子量複合体の形成、翻訳後のプロセッシングと修飾（糖鎖の付加、リン酸化等の翻訳後修飾等）、活性制御機構に根ざす多状態性や構造・機能の短寿命性等の多様なw特性をもつ。

この問題を解決するため、高難度タンパク質（高分子量複合体、膜タンパク質等）の調製のための優れた要素技術を開発するとともに、タンパク質試料が構造解析に適しているか否かを分析・評価するためのシステムを作成する。多様な困難さをもつ重要ターゲットタンパク質について、発現方法、結晶化条件等の広範囲な探索と最適化を行うシステムを構築し、その結果を体系化することによって、構造解析や機能解析に適した試料調製を可能にする研究基盤を整備する。

株式会社セルフリースサイエンスでは高度化された小麦胚芽無細胞タンパク質合成技術を用い、構造解析可能な高難度タンパク質の安定生産を実現させ、ターゲットタンパク質研究の支援を行なう。



2. 平成23年5月末時点における各機関の事業計画に対する研究成果

(1) 成果概要

株式会社セルフリースサイエンスでは、これまで、

- 1) 理化学研究所の遠藤グループと膜タンパク質合成要素技術に関する情報交換を行い、
- 2) 小麦系での膜タンパク質合成要素技術の移転を受け、
- 3) 株式会社セルフリースサイエンスが保有するタンパク質合成量 10 mg/mL、反応ボリューム最大 100 mL の自動合成装置に2) を対応させることを検討し、対応を可能とさせた。

続いて、

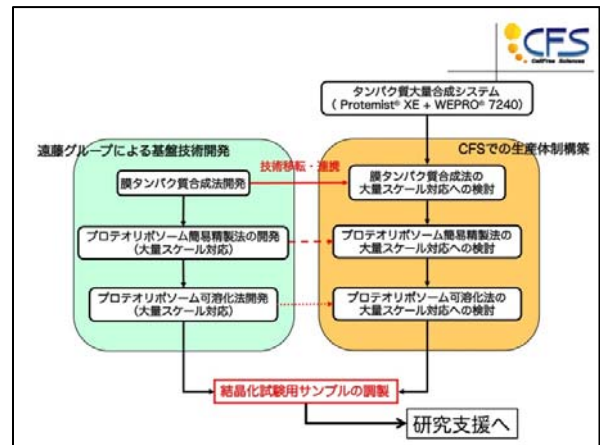
- 4) 遠藤グループが開発した精製 tag を付加することなく膜タンパク質（プロテオリポソーム）を精製する方法の技術移転を受けて3) に対応させる技術移転を行い、膜タンパク質生産の汎用化開発検討を行ってきた。

また高難度タンパク質には膜タンパク質に加え、巨大複合体タンパク質も挙げられる。研究支援

として東京都医学総合研究所 田中啓二先生と共同で、

- 5) 19S プロテアソーム複合体の再構成を試み、小麦系で目的タンパク質が合成され、かつ複合体をとっていることが確認出来た。

当初計画していた業務の内、高難度タンパク質の大量合成と可溶化は成功し、ターゲットタンパク研究者への支援体制の基盤を構築できた。構造解析に向けた膜タンパク質の大量精製法の確立が遅れている為、大量のタンパク供給は行うことが難しい現況であるが、タンパク質の大量合成と粗精製・可溶化および小量精製については技術を確認していることから、支援を行うことが出来る。



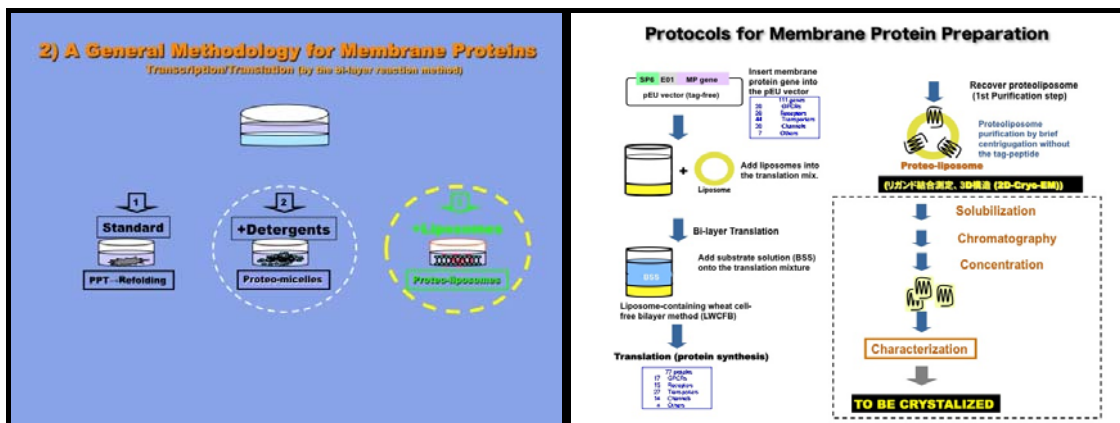
(2) 技術開発の進捗及び成果

1) 膜タンパク質合成要素技術に関する情報交換

小麦胚芽無細胞タンパク質合成技術を用いた膜タンパク質及び複合体タンパク質合成要素技術に関しては、理化学研究所 遠藤グループで開発が進められている。支援事業への速やかな技術移転を鑑み、情報交換会を設けて、進行状況、問題点に関して連携を密にとっていく。特にリポソームを用いた膜タンパク質合成法の現況についてディスカッションを行ってきた。

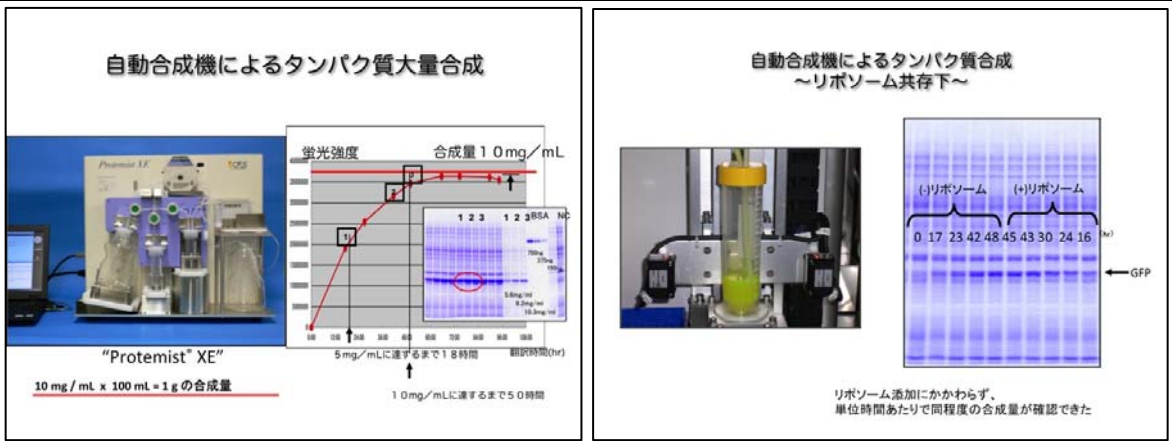
2) 膜タンパク質合成要素技術の技術移転

小麦胚芽無細胞タンパク質合成技術を用いた膜タンパク質の合成にリポソームの添加が有効であることが確かめられ、技術の開発が進められてきた。これまでに遠藤研究室より、1) リポソームの精製方法、2) リポソームの調製方法、3) リポソームを用いた膜タンパク質の合成方法、について技術移転を受けている。



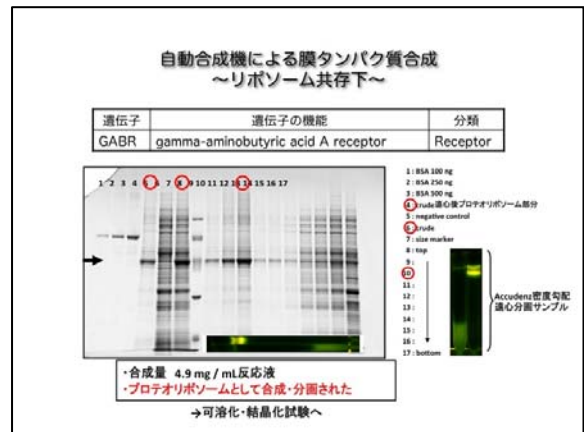
3) 膜タンパク質の大量合成に向けた方法開発

当社ではタンパク質合成量 10 mg / mL (最大)、反応ボリューム 100 mL (1 バッチあたり最大 1000 mg) のタンパク質自動合成装置を開発しており、この装置が遠藤グループから技術移転された「リポソームを用いた膜タンパク質の合成方法」に対応できるように開発し、対応が可能であることを確認している。

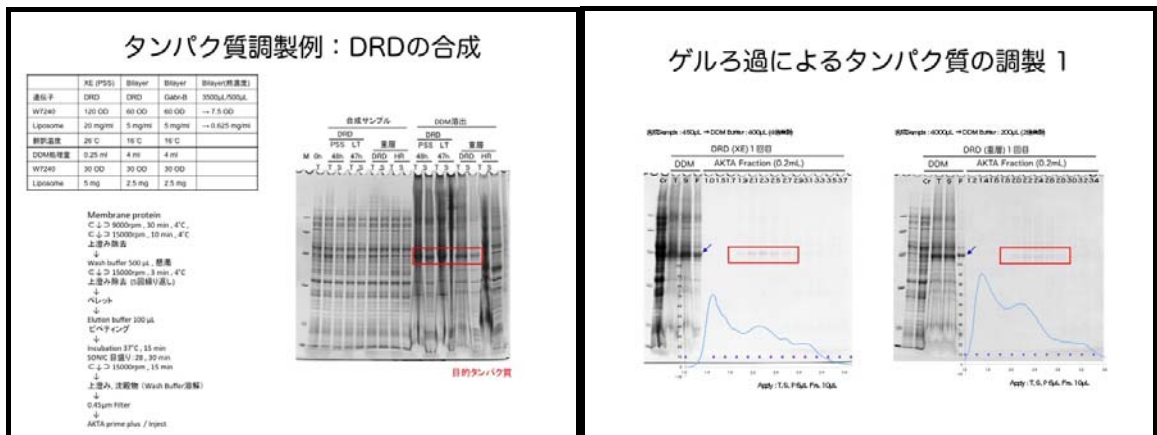


4) 精製 tag を付加しない膜タンパク質の合成・精製法の技術移転

タンパク質精製は目的タンパク質から tag を除く段階で収量が大きく落ちることに難点があった。遠藤グループでは「Accudenz 密度勾配遠心法による膜タンパク質精製法」について開発を進めてきたが、その過程で精製 tag を付加することなく膜タンパク質を精製する方法のブレイクスルーを見出している。遠藤グループから技術移転を受け、膜タンパク質生産の汎用化開発検討を行ってきた。



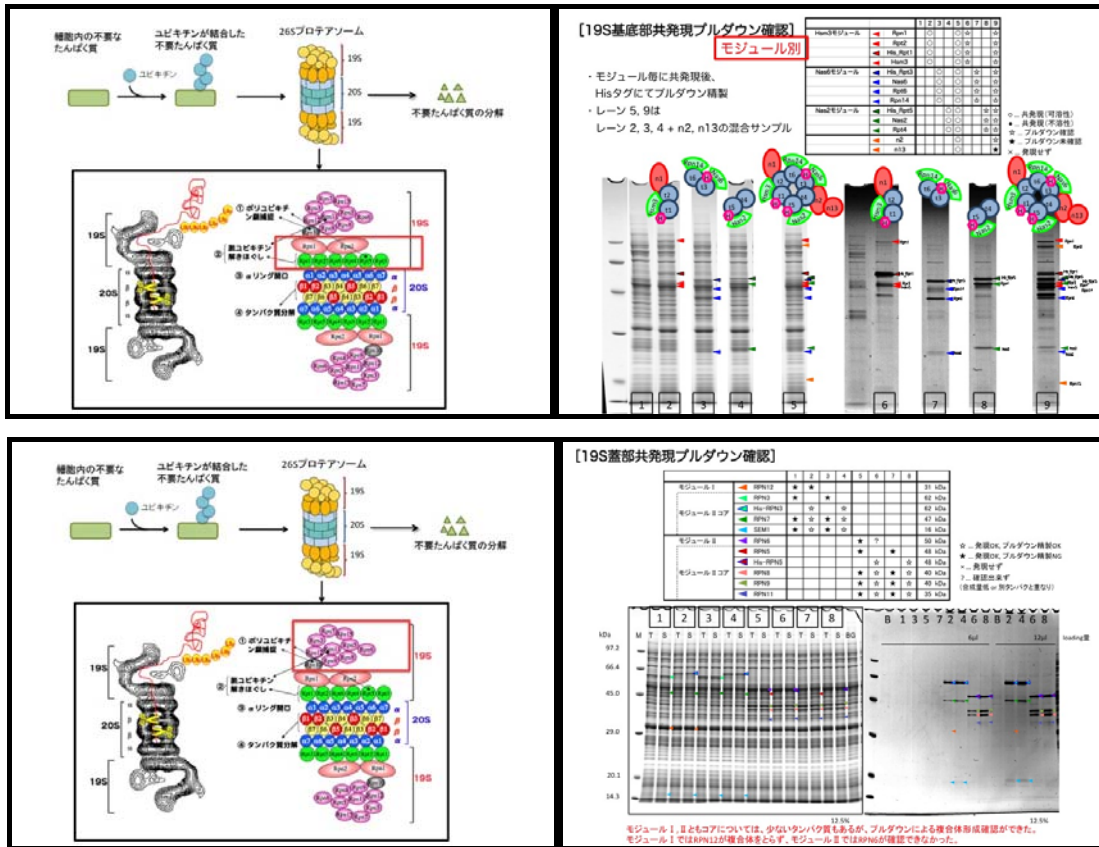
この方法は少量試験向きでありタンパク質の大量調製には難がある。そこで新たに遠藤グループが開発した遠心沈降法によるプロテオリボソーム精製法の技術移転を受け、当社自動タンパク質合成機器による合成法とこの精製法を組合せた方法を試験した。その結果、膜タンパク質の効率的な合成と比較的高い精製度が確認された。



5) 複合体タンパク質の調製検討

高難度タンパク質には膜タンパク質に加え、巨大複合体タンパク質も挙げられる。ターゲットタンパクプログラム内共同研究として、東京都医学総合研究所 田中啓二先生と 19S プロテアソーム複合体の再構成を試みた。19S プロテアソームの基底部、蓋部について自動合成機で目的タンパク質を複合体として合成した。合成後、自動精製によりプル

ダウン試験を行い、目的複合体が調製されているかを確認した。目的タンパク質が合成され、かつ複合体をとっていることが確認出来た。



3. タンパク質の構造解析件数

PDB 登録数	0 件
PDB 登録の有無にかかわらず構造解析したタンパク質数	0 件
4. 各機関の論文発表件数	0 件
5. 各機関の公開したツールやデータベース等の件数	0 件
6. 各機関の特許出願件数	0 件
7. 各機関の成果を活用した共同研究数 (プログラム内外含む)	2 件

8. 当初計画に対する各機関の達成度

当初計画していた業務の内、高難度タンパク質の大量合成と可溶化は成功し、ターゲットタンパク質研究者への支援体制の基盤を構築できた。構造解析に向けた膜タンパク質の大量精製法の確立が遅れている為、大量のタンパク供給は行うことが難しい現況であるが、タンパク質の大量合成と粗精製・可溶化および小量精製については技術を確立していることから、支援を行うことが出来る。

9. 課題内の情報共有・連携体制

研究参画機関による班会議に出席し、要素技術の紹介、進捗の報告、今後の技術開発計画やプログラムへの貢献を初めとする活発な議論をすることにより、研究推進体制を強化出来たと考える。

10. 他の課題との情報共有・連携							
ターゲットタンパクプログラム内共同研究として、東京都医学総合研究所 田中啓二先生と19Sプロテアソーム複合体の再構成を試みている。また開発された技術を用いた外部共同研究として、ウイルス複製関連複合体タンパク質の調製・解析を進めている。							
11. 人材育成							
本プログラムを通じて代表研究者が社員（業務担当者）に対し、技術指導を行っている。							
12. 終了までの具体的な見通し							
これまで汎用化を進めてきた無細胞技術に関して、代表機関・独立行政法人理化学研究所が行うタンパク質生産技術の実施に必要となる高度な試薬・材料の作製を担当し、高度研究技術のタイムリーな共用を可能にする。							
①生産技術に必要な試料作製法の開発							
独立行政法人理化学研究所が窓口となって行う生産技術の共用において、大規模な利用に適合させるために理化学研究所が改良した技術を移転して、試薬・材料の作製方法を改良する。							
②ターゲットタンパク研究への支援							
生産基盤技術（小麦胚芽無細胞タンパク質発現など）に基づいて、ターゲットタンパク研究プログラムの技術共用に必要となる試薬・材料（主に小麦無細胞タンパク質合成系関連の細胞抽出液、酵素類等）の最新プロトコールでの作製を行う。							
13. 本プログラムにおける成果が我が国の科学技術発展及び産業応用に与える効果について							
本研究で開発した生産技術は、ライフサイエンスの研究において重要なターゲットとなる高難度タンパク質群の生産を可能にするため、広範囲の研究者にとって意義がある。したがって、技術移転による研究者への普及に加えて、企業活動として、試薬や装置の製品化、当該技術を利用したサービス（タンパク質生産受託等）の提供、タンパク質製品の生産等の社会還元が可能になると期待される。							
株式会社セルフサイエンスはタンパク質発現の技術やサービスを提供する専門企業であり、タンパク質合成キットや各種合成用試薬・全自動タンパク質合成装置の販売ならびに受託合成も行っている。本研究で構築するタンパク質生産基盤について、技術開発終了後のユーザーサービスを担当する予定であり、将来に亘る研究支援業務を充分に行うことが可能である。							
14. 特記事項							
小麦胚芽無細胞タンパク質合成技術の移転と汎用化、特に機器を用いたタンパク質大量合成系への応用に成功し、リポソームを使用した膜タンパク質の大量調製に成果を上げた。							
15. 研究費一覧							
	19年度	20年度	21年度	22年度		23年度	計
設備備品費（千円）	0	0	4,874	0	物品費（千円）	6,600	
試作品費（千円）	0	0	0	0	人件費・謝金（千円）	0	
人件費（千円）	0	0	0	3,000	旅費（千円）	0	
業務実施費（千円）	769	692	1,280	2,692	その他（千円）	0	
間接経費（千円）	231	208	1,846	1,708	間接経費（千円）	0	3,993
合計（千円）	1,000	900	8,000	7,400	合計（千円）	6,600	23,900

代表／分担機関の課題名	機能性を保持した膜貫通タンパク質生産のための膜移行性評価系の開発
代表／分担機関	独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構
機関の代表研究者名	日下部 裕子

1. 課題開始時における各機関の達成目標

タンパク質の生産に関する共通性・汎用性の高い基盤的な技術により国内のタンパク質研究を支援する「タンパク質発現ライブラリー基盤」の一部として、特に細胞膜受容体をはじめとした高難度タンパク質生産の一部を分担する。具体的には、平成 21 年度までに食環 B 課題にて開発した独自の受容体膜移行評価系を利用し、代表機関が行うタンパク質生産のうち、受容体試料発現に必要な膜移行タグの設計や選択を担当する。

2. 平成 23 年 5 月末時点における各機関の事業計画に対する研究成果

(1) 成果概要

平成 21 年度まで食環 B にて確立したヒト甘味受容体を構成する分子 hT1R2 の膜外部位にタグを付加する方法をヒト甘味受容体構成分子 hT1R3 にも適用する事で、ヘテロ二量体の G タンパク質共役 7 回膜貫通型受容体(GPCR)の膜移行性と刺激に対する受容性を蛍光標識を指標に同時に解析することが可能になった。この成果により、機能性を保持したタンパク質を高効率で生産する分子の選択の効率性が向上することが期待される。また、ヒト甘味受容体の膜移行機序を解析したところ、hT1R2 と hT1R3 の膜外部位の相互作用が効果的な膜移行に必要なことが示され、甘味受容体と同様ヘテロ二量体を形成する(GPCR)である GABAB 受容体とは異なる独自の膜移行性を保有する可能性が高い事が示された。

(2) 技術開発の進捗及び成果

平成 21 年度まで食環 B にて確立したヒト甘味受容体を構成する分子 hT1R2 の膜外部位にタグを付加する方法を、ヒト甘味受容体構成分子 hT1R3 に適用した。これらのタグを付加した分子を利用して、ヒト甘味受容体の構造機能解析を進めた(図 1)。タグを付加した甘味受容体変異体 c-Myc-hT1R2/FLAG-hT1R3 を導入した培養細胞 HEK293 について、c-Myc タグあるいは FLAG タグに対する抗体染色を培養細胞を固定させない状態で行うことで、培養細胞の膜表面に移行した受容体を検知できることが明らかになった。また、この染色の強さはフローサイトメトリーを用いることにより数値化が可能であり、移行度の強弱を比較できることも示された(図 2)。次に、タグを付加した hT1R2/hT1R3 の甘味応答能をカルシウムイメージング法により確認した。その結果、タグを付加しない hT1R2/hT1R3 と同様、人工甘味料アセサルファム K に対する応答が確認された(図 2)。また、甘味応答測定に際しては、マルチプレートリーダーを用いた細胞応答を行うことで効率的に応答測定を行った。これらの方法を比較検討することで、様々な変異体の甘味受容能の差の原因が膜移行性にあるのか、受容構造の変化にあるのかを判別できるようになった。

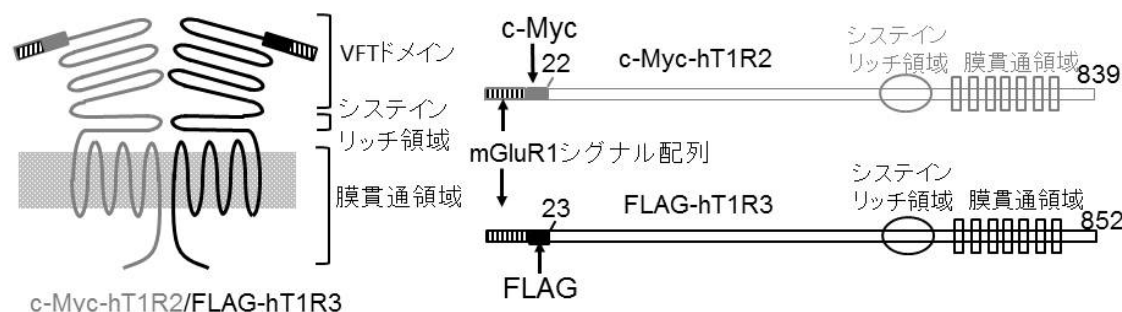


図1：N端にタグを付加したヒト甘味受容体 hT1R2/hT1R3 の模式図

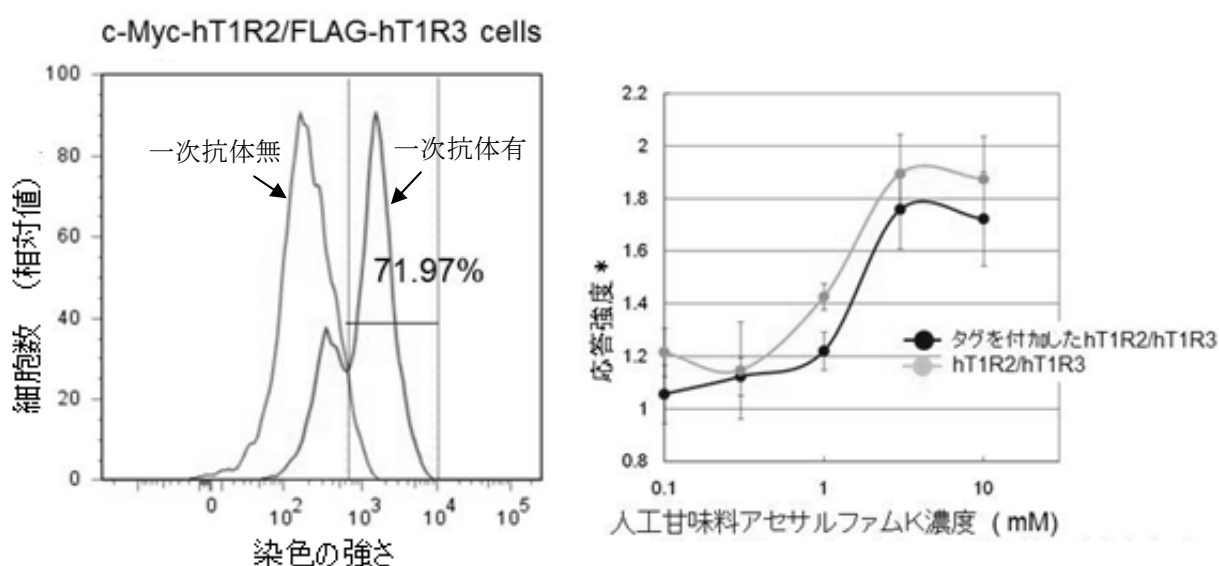


図2：タグを付加した受容体を発現させた細胞の染色性と応答性の解析

左：フローサイトメトリーを用いた表面にタグが移行した細胞の割合の評価

タグを付加したヒト甘味受容体 hT1R2/hT1R3 が膜に移行している細胞 (71.97%) と移行していない細胞の二つのピークが観察されている。

右：タグを付加したヒト甘味受容体 hT1R2/hT1R3 を発現させた細胞の甘味応答性

タグを付加していないヒト甘味受容体とほぼ同等の甘味応答が観察された。

②膜移行性評価系を利用した多重膜貫通タンパク質の構造・機能性評価

多重膜貫通型かつヘテロ二量体であるヒト甘味受容体 hT1R2 および hT1R3 をモデルタンパク質として変異体作製を行い、先に確立したタグを付加した受容体(c-Myc-hT1R2 および FLAG-hT1R3)の利用により膜移行性、二量体形成能、応答測定を組み合わせることで構造・機能性評価を行った。まず、c-Myc-hT1R2 および FLAG-hT1R3 を単独で HEK293 細胞に発現させた場合の両分子の膜移行度を解析した。その結果、c-Myc-hT1R2、FLAG-hT1R3 の両者とも単独では、細胞内に発現していることは確認されたものの、膜移行は抗体染色法では確認できない程度に低いことが明らかになった。また、甘味に対する応答は c-Myc-hT1R2 のみを発現させた場合ではほとんど観察されず、FLAG-hT1R3 のみでは著しく低い応答のみが観察された。一方、c-Myc-hT1R2 および FLAG-hT1R3 を同時に発現させた場合は hT1R2、hT1R3 とともに膜に移行することが示された。さらに、FLAG-hT1R3 を恒常的に発現させた細胞に c-Myc-hT1R2 を一過的に発現させると、c-Myc-hT1R2 を発現させた時のみ FLAG-hT1R3 が膜に移行することを観察した。c-Myc-hT1R2/FLAG-hT1R3 は甘味応答することも確認できたことから、ヒト甘味受容体 hT1R2/hT1R3 の二量体形成による膜表面の移行が甘味受容に重要な役割を果たすことが示唆された。次に、膜移行に関わる hT1R2 と hT1R3 の相互作用部位の検討を行った。甘味受容体 hT1R2/hT1R3 と同様 G タンパク質共役型受容体ファミリーのクラス C タイプの属する受容体でヘテロ二量体を形成する GABAB 受容体は受容体 C 末端部位が相互に結合することにより二量体を形成した状態で膜に移行し受容体として機能することが知られている。そこで、c-Myc-hT1R2/FLAG-hT1R3 の一部分を欠損させた変異体を作成することで、膜移行に関わる部位の特定を試みた。hT1R2 および hT1R3 の膜外部位である Venus flytrap (VFT) ドメインを欠損する変異体(c-Myc-xHH2, FLAG-xHH3)を作製し、それぞれ単独の膜移行能および FLAG-hT1R3 あるいは c-Myc-hT1R2 との共発現、すなわち c-Myc-xHH2/ FLAG-hT1R3 および c-Myc-hT1R2/FLAG-xHH3 におけるそれぞれの分子の膜移行能を解析した。その結果、c-Myc-xHH2、

FLAG-xHH3 単独でも、c-Myc-xHH2/ FLAG-hT1R3, c-Myc-hT1R2/FLAG-xHH3 においても膜移行する分子を観察しなかった。また、それぞれを発現させた HEK293 細胞は甘味応答を示さなかった。以上のことから、hT1R2 と hT1R3 の膜移行に関与する部位はそれぞれの VFT ドメイン中に存在する可能性が示された。よって、hT1R2/hT1R3 の膜移行機序は、GABAB 受容体と全く異なる独自のものを保有する可能性が高いことが示唆された。

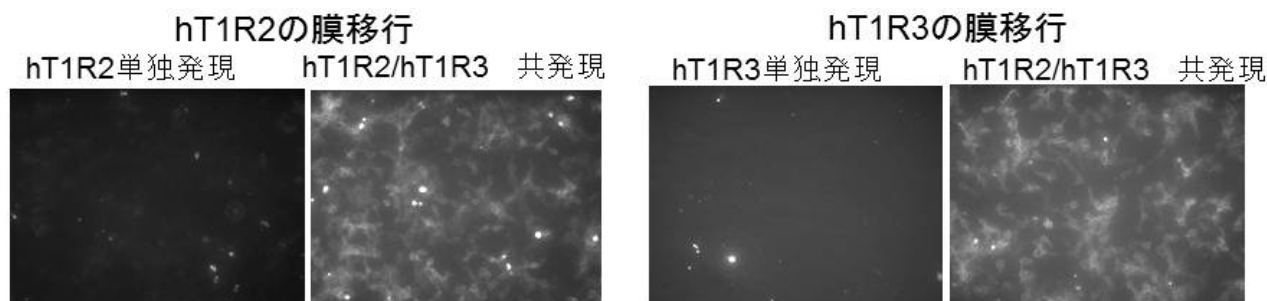


図3：変異体の利用によるヒト甘味受容体 hT1R2/hT1R3 膜移行機序の解析

HEK293 細胞にタグを付加した hT1R2 および hT1R3 を単独あるいは共発現させ、未固定状態でタグに対する抗体染色を行って膜移行を評価した。

左：hT1R2 に付加した c-Myc タグに対する抗体染色の結果

右：hT1R3 に付加した FLAG タグに対する抗体染色の結果

この結果から hT1R2 と hT1R3 の相互作用により膜移行が促進されることが示唆される。

次にマウスの甘味受容体 mT1R2/mT1R3 についても同様の実験を行った。その結果 mT1R3 は単独で発現させると、甘味応答は観察されないが膜移行は観察されることが明らかになり、味覚受容体の膜移行性は種により異なる可能性が示された。膜移行性の高い種類の膜タンパク質は膜移行性の低いタンパク質よりも機能を保持したタンパク質の生産が容易であることが予想される。よって、受容体構造機能解析に適した分子の選択に、膜移行評価系を利用した系を利用して膜移行性の高い分子種を選抜することが、受容体構造機能解析に適した分子の選択に有効である可能性が示された。

3. タンパク質の構造解析件数

PDB 登録数	0 件
PDB 登録の有無にかかわらず構造解析したタンパク質数	0 件
4. 各機関の論文発表件数	0 件
5. 各機関の公開したツールやデータベース等の件数	0 件
6. 各機関の特許出願件数	0 件 (うち国外 0 件)
7. 各機関の成果を活用した共同研究数 (プログラム内外含む)	1 件 (うち産業界との共同研究数 0 件)

8. 当初計画に対する各機関の達成度

本課題により、多重膜貫通型かつヘテロ二量体という機能性を保持したタンパク質の生産が困難なタンパク質について、機能性を維持したままタグを付加する方法を開発し、応答性と膜移行度を平衡して解析できる系を確立した。この成果を他の多重膜貫通・多量体に応用することで、当初計画した通り機

能性を保持した生産性の高いタンパク質の選抜の効率性を上げる事が期待できる。

9. 課題内の情報共有・連携体制

互いの専門分野の違いを活かして、それぞれの機関で実施する課題の支援を互いに行うなど、密接に連携して研究を実施した。また、情報共有のため、研究成果発表会や公開シンポジウム等、ターゲットタンパク研究プログラムの会議の機会を生かして研究進捗状況の報告と研究計画の打ち合わせを行った。さらに、電子メールや電話などで随時研究打ち合わせを行い、常に互いの最新の研究進捗状況を把握した状態で課題を実施した。

10. 他の課題との情報共有・連携

生産 D2 のスクリーニング技術を利用した試料安定生産条件の探索、生産 D1 のタグ技術を利用した精製条件の検討を行っている。また生産 C1 の課題内連携として、試料の変異導入や化学修飾による安定生産条件検討をすすめている。

11. 人材育成

契約職員として雇用しているポスマスについて、機関の研究代表者が論文発表および学会発表を実施させることにより、研究教育を行った。また、研究打ち合わせを週 1 回程度行う事で、研究の進め方の教育、スキルアップなどに努めた。本プログラム終了後は、他機関の派遣研究員になる予定である。また、本プログラムでの成果を利用して学位の取得を目指す予定である。

12. 終了までの具体的な見通し

味覚受容体の膜移行性については、ヒトとマウスの膜移行性の違いを利用して膜移行に関与するドメインの同定を目指す。また、膜移行性評価系については、さまざまなタグとそれに対する抗体を検討することで、定量性や感度の高い評価系の構築を目指し、他のタンパク質生産課題に情報提供する。

・技術移転を目的とした共同研究等の状況：本プログラムで使用している甘味受容体を恒常的に発現している培養細胞を用いた食品成分の甘味増強能の解析を、短期間研修という形で民間企業への技術移転を図っている。現時点では共同研究までは発展していないが、研修をきっかけとした共同研究への展開を目指している。

・他分野の研究者に成果の活用を推進するための方策：研究代表者が所属する独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構 食品総合研究所では、毎年個々の研究成果を民間企業の研究者に公開する研究展示会を行う事で、成果の活用を目指している。研究代表者は、本プログラムでの成果を研究展示会で公表して、他分野の研究者へ成果の活用をアピールしている。

13. 本プログラムにおける成果が我が国の科学技術発展及び産業応用に与える効果について

本プログラムにより得た膜移行性評価系および膜移行機序の解明は、解析が困難な多重膜貫通タンパク質の効率性の高い生産条件の確立に寄与することで、多重膜貫通タンパク質の構造機能解析に貢献する。特に、本課題で取り組んだ G タンパク質共役型受容体の C タイプは、膜外ドメインと膜貫通ドメインの両方に受容サイトが存在するという特徴的な構造からアロステリック調節剤が新たに開発されるなど、構造機能の解明と創薬との関係が密接であり、本課題の成果を生かした効率性の高い生産条件の確立が創薬に貢献することが期待される。

14. 特記事項

本課題では、多重膜貫通タンパク質かつヘテロダイマーであるタンパク質をターゲットとして研究を行った。他の G タンパク質共役型受容体と比較して発現量が少なく不安定であるという難点を保有する

生産C 1 - E

味覚受容体 T1rs の膜移行性と応答性を構造機能の観点から明らかにすることで、解析が困難な他の分子についても、大量生産を阻む因子を明らかにして効率性の高い生産に導く戦略の一つとして、本課題の成果が生かせると考えている。

15. 研究費一覧

	19年度	20年度	21年度	22年度		23年度	計
設備備品費 (千円)	0	0	0	0	物品費 (千円)	0	
試作品費 (千円)	0	0	0	0	人件費・謝金 (千円)	2094	
人件費 (千円)	0	0	0	4078	旅費 (千円)	19	
業務実施費 (千円)	0	0	0	999	その他 (千円)	887	
間接経費 (千円)	0	0	0	1523	間接経費 (千円)	0	1523
合計 (千円)	0	0	0	6600	合計 (千円)	3000	9600