

(健康安心プログラム)
「生体高分子立体構造情報解析」基本計画

バイオテクノロジー・医療技術開発部

1. 研究開発の目的・内容・目標

(1) 研究開発の目的

本研究開発は、遺伝子やタンパク質等の生体分子の機能・構造解析等を行うとともに、それらの研究を強力に推進するためのバイオツールやバイオインフォマティクスの開発、成果を高度に利用するためのデータベース整備や先端技術を応用した高度医療機器開発等により、テーラーメイド医療・予防医療・再生医療の実現や画期的な新薬の開発、医療機器、福祉機器等の開発・実用化を促進することによって健康寿命を延伸し、今後、世界に類を見ない少子高齢化社会を迎える我が国において、国民が健康で安心して暮らせる社会の実現を目指すことを目的とする「健康安心プログラム」の一環として実施する。

近年、ヒトゲノムを始めとして種々の生物種のゲノム配列解析は急速に発展を見せ、これにより生物に様々な機能を賦与している遺伝子に関する膨大なデータが蓄積されるに至っている。遺伝子は転写後、様々なタンパク質に翻訳されその機能を発揮しており、これまで蓄積された膨大なゲノム配列データを人間社会の発展、健康・福祉に役立てるためには、遺伝子機能発現の本体であるタンパク質がどのような機構でそれを行っているか、またタンパク質同士、また他の生体高分子（核酸、脂質、多糖類等）と相互作用し、その機能を発揮しているかを明らかにすることが必要である。これらの機構の解明にはアミノ酸配列情報だけでは困難で、立体構造情報からのアプローチが不可欠である。これまでタンパク質等の立体構造情報を解析する手法として、主にX線結晶解析法と核磁気共鳴法が用いられてきた。両手法とも水溶性で結晶が得られやすい可溶性タンパク質の構造解析には有効であるが、生体での情報の受容伝達、生体防御、選択的透過やエネルギー変換等、特に重要な役割を担っている非水溶性の膜タンパク質については、可溶化や結晶化が困難を極めるため、その適用が遅れている。また、膜タンパク質の機能発現には、膜内外のタンパク質との相互作用が重要であるが、これについてはタンパク質分子同士、また他の分子等がどの面でどの様に相互作用するのかという詳細な解析手法の開発が遅れていたため、その情報を生かした創薬等の産業利用への展開が拒まれてきた。さらに、膜タンパク質については、数少ない立体構造情報をもとにして、変化に富む機能構造を予測するためには、精度の高いモデリング技術が不可欠であり、巨大な分子、複合体であるため計算に多大な時間を要する等の問題を克服しなければならない。

本研究開発では、膜タンパク質及び関連タンパク質の複合体について、膜タンパク質の構造解析に有効な電子顕微鏡解析、及びそのための工夫をこらしたX線結晶解析法等を用いて原子レベルでの立体構造を明らかにし、その機能の分子機構解明に踏み込むとともに、核磁気共鳴法等によって分子間相互作用を効率的かつ高精度に解析する技術を開発する。さらに、これらの解析効率を向上させ、技術開発を加速するため高精度モデリング技術やシミュレーション技術の開発を行う。これらの技術開発によってタンパク質等の生体高分子の構造情報を利用するための技術を確立するとともに、ゲノムサイエンスの発展により重要分野となるバイオインフォマティクスに係る共通基盤技術の形成を行い、これらの技術に係る実証として膜タンパク質やその複合体等の構造解析を目的とする。これにより、「健康・安心プログラム」の目標であるテーラーメイド医療の実現に即した画期的な新薬開発に資するとともに、その他高感度バイ

オセンサー、高品質な食品等の開発が可能となり、新たなバイオテクノロジー産業はもとより、農業や環境などの広範な分野での新規産業の創出に活用する。

(2) 研究開発の目標

(最終目標：平成18年度末)

膜タンパク質を主たるターゲットとして、解析すべき膜タンパク質等の試料取得手法の確立及び電子顕微鏡、X線及びNMR（核磁気共鳴）装置を用いた構造解析、相互作用解析技術を確立するとともに、高精度モデリング技術、シミュレーション技術の開発を進め、高度情報技術を用いて精緻な構造情報の解析手法を確立する。

開発した解析技術等を用いて、受容体やチャンネル等の膜タンパク質の構造解析を複数個行う。また、膜タンパク質に係る複合体やヒト完全長 cDNA クローンから得られる有用タンパク質の構造解析を実施するとともに、膜タンパク質等にタンパク質、基質、低分子化合物等が作用し機能を制御する機構を構造面から解明する。

(中間目標：平成16年度末)

膜タンパク質の試料取得、精製、結晶化技術の開発に重点を置き、平行して構造、相互作用解析技術を、実例に適用可能まで開発を進める。

構造解析、相互作用解析する目標タンパク質を絞り解析に着手する。

(3) 研究開発の内容

上記目標を達成するために、以下の研究開発項目について、別紙の研究実施計画に基づき研究開発を実施する。

- ①電子線及びX線等による膜タンパク質等の構造、分子機構解析技術の開発及びデータの取得
- ②核磁気共鳴法（NMR）等による膜関連タンパク質間、その他の分子との相互作用解析技術の開発及び、データの取得
- ③膜タンパク質関連分子（タンパク質、核酸、脂質、多糖質等）複合体の構造、分子機構及び生物機能解析技術の開発及びデータの取得
- ④データベースとシミュレーション計算を活用した構造情報解析技術の開発

さらに、①②③から得られた実験情報を④のデータベースやシミュレーションに取り入れるとともに、④で得られた結果を①②③にフィードバックし、構造決定や相互作用解析を支援する。

2. 研究開発の実施方式

(1) 研究開発の実施体制

- ① 本研究開発は、平成12年度から平成13年度まで特殊法人新エネルギー・産業技術総合開発機構（以下「特殊法人NEDO」という。）が実施した「生体高分子の構造情報利用技術開発」の実質的継続事業として、平成14年度は経済産業省産業技術環境局研究開発課及び製造産業局生物化学産業課において基本計画を策定し事業を実施したが、平成15年度上期は特殊法人NEDOにおいて、平成15年度下期以降は、独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構（以下「NEDO技術開発機構」という。）において委託して実施する。したがって、平成15年度以降も、実質的に継続事業であるため、原則NEDO技術開発機構において公募による研究開発実施者の選定は行わない。
- ② また、共同研究開発に参加する各研究開発グループの有する研究開発ポテンシャルの最大限の活用により効率的な研究開発の推進を図る観点から、研究体にはNEDO技術開発機構が指名した東京大学大学院薬学系研究科教授 嶋田 一夫氏を研究

開発責任者（以下「プロジェクトリーダー」という。）とし、その下で効果的な研究開発を実施する。

（２）研究開発の運営管理

研究開発全体の管理・執行に責任を有するNEDO技術開発機構は、経済産業省及び研究開発責任者と密接な関係を維持しつつ、プログラムの目的及び目標、並びに本研究開発の目的及び目標に照らして適切な運営管理を実施する。具体的には、必要に応じて、NEDO技術開発機構に設置する委員会及び技術検討会等、外部有識者の意見を運営管理に反映させる他、四半期に一回程度プロジェクトリーダー等を通じて研究開発の進捗について報告を受けること等を行う。

３．研究開発の実施期間

本研究開発の期間は、平成14年度から平成18年度までの5年間とする。

４．評価に関する事項

NEDO技術開発機構は、技術的及び政策的観点から、研究開発の意義、目標達成度、成果の技術的意義ならびに将来の産業への波及効果等について、外部有識者による研究開発の中間評価を平成16年度に、事後評価を平成19年度に実施する。なお、評価の時期については、当該研究開発に係る技術動向、政策動向や当該研究開発の進捗状況等に応じて、前倒しする等、適宜見直すものとする。

５．その他重要事項

（１）研究開発成果の取扱い

①共通基盤技術の形成に資する成果の普及

得られた研究成果のうち、下記共通基盤技術に係る研究開発成果については、NEDO技術開発機構、実施者とも普及に努めるものとする。

a)実現手法の確立、体系的整理

- ・膜タンパク質の新規な大量発現・精製技術
- ・膜タンパク質の結晶化手法
- ・電子顕微鏡によるタンパク質の立体構造決定手法
- ・X線結晶解析における精密構造決定法
- ・結晶化の非常に困難なタンパク質を単分子で解析する手法
- ・NMR用の膜関連タンパク質、ドメイン等の試料作製手法
- ・NMRシグナルを用いた複合体界面残基の同定法
- ・膜関連タンパク質の立体構造構築計算手法及び精密化計算手法
- ・受容体・リガンド相互作用の定量的計算手法
- ・複合体の機能構造を解析する手法

b)新たな特性データの取得・整備

- ・膜タンパク質の立体構造データの取得
- ・膜関連タンパク質と低分子化合物との相互作用解析データの取得
- ・膜関連タンパク質間及びタンパク質・生体高分子の相互作用解析データの取得
- ・膜タンパク質の機能発現に係る複合体の立体構造データの取得
- ・膜関連タンパク質の立体構造と生物機能との相関データの取得

c)試験・評価手法、ツールの提供

- ・膜タンパク質の新規な大量発現・精製技術
- ・膜タンパク質の結晶化手法
- ・電子顕微鏡によるタンパク質の立体構造決定手法
- ・膜タンパク質の構造解析を効率良く行う高分解能電子顕微鏡

- ・結晶化の非常に困難なタンパク質を単分子で解析する手法
- ・X線結晶解析における迅速精密化計算手法
- ・極微小結晶によるX線結晶解析法
- ・NMR用の膜タンパク質、ドメイン等の試料作製手法
- ・NMRシグナルを用いた複合体界面残基の同定法
- ・NMRを用いた膜タンパク質複合体の相互作用解析手法
- ・タンパク質の立体構造構築計算手法及び精密化計算手法
- ・*in silico*（電算機）スクリーニング技術

②知的基盤整備事業又は標準化等との連携

得られた研究開発の成果については、知的基盤整備または標準化等との連携を図るため、データベースへのデータ提供、標準情報（TR）制度への提案等を積極的に行う。

③知的財産権の所属

委託研究開発の成果に関わる知的財産権については「独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構新エネルギー・産業技術業務方法書」第26条の規定等に基づき、原則として、すべて受託先に帰属させることとする。

（2）基本計画の変更

NEDO技術開発機構は、研究開発内容の妥当性を確保するため、社会・経済的状況、内外の研究開発動向、政策動向、プログラム基本計画の変更、第三者の視点からの評価結果、研究開発費の確保状況、当該研究開発の進捗状況等を総合的に勘案し、達成目標、実施期間、研究開発体制等、基本計画の見直しを弾力的に行うものとする。

（3）根拠法

本研究開発は、独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構法第15条第1項第2号に基づき実施する。

6. 基本計画の改訂履歴

- （1）平成15年3月、制定。ただし、本事業は、平成14年度に経済産業省の直轄事業として開始され、経済産業省において基本計画が制定されている。
- （2）平成16年3月、独立行政法人移行に伴い、法人名、略称、根拠法等の変更を行うとともに、経済産業省のプログラム基本計画の改訂に伴い、プログラム名及びプログラムの目的に関する記述を改訂。

(別紙) 研究開発計画

研究開発項目①「電子線及びX線等による膜タンパク質等の構造、分子機構解析技術の開発及びデータの取得」

1. 研究開発の必要性

全タンパク質の30%を占める膜タンパク質は生体機能において情報伝達、イオン輸送等の重要な役割を担っている。しかしながら、膜タンパク質は、X線結晶解析等の現在の構造解析に必要な量の精製及び結晶化が極めて困難であることから、その構造と分子機構の解析はほとんど進んでおらず、膜タンパク質の構造とそれに基づく分子機構の解明が重要な研究課題となっている。したがって、本研究開発は、膜タンパク質を中心とするタンパク質の構造とその分子機構を解明するため、構造解析に十分な量の発現・精製及び結晶化技術の開発を行うとともに、従来のX線結晶解析に変わる新たな手法として電子線を用いた膜タンパク質の構造解析法を加速するための装置と技術、解析用コンピュータプログラムの改良・開発等を行う。独自に開発した低温電子顕微鏡とX線を用いて、実際に膜蛋白質の構造解析を行い、それらの分子機構を構造学的な視点から解明する。

2. 研究開発の具体的内容

(1) 膜タンパク質の構造解析に供する結晶化技術の開発

電子線を用いた構造解析に必要な膜タンパク質等の発現・精製技術、2次元結晶化技術、及び、結晶化条件の検索を迅速に行うためのシステム装置の開発を実施する。

(2) 電子線によるタンパク質の構造解析技術の開発

X線結晶構造解析を行うことが困難な膜タンパク質等の立体構造を、電子顕微鏡により解析する技術及びそのシステム装置を開発する。3次元結晶化が困難なタンパク質を構造解析するための極低温電子顕微鏡技術と電子線結晶学と単粒子解析を用いた構造解析システムの開発を実施すると共に、実際に膜タンパク質の構造を解析する。

(3) X線によるタンパク質の構造解析技術の開発

X線結晶解析ではタンパク質の大型結晶が必要であるが、そのためには十分な量の膜蛋白質を発現し、精製する必要がある。これら、膜タンパク質の3次元結晶化条件を検討する上で必要な技術を開発し、さらに微小結晶のX線回折を測定可能とする技術を開発し、膜タンパク質等の立体構造をX線結晶解析により原子レベルで解析する。

3. 達成目標

(中間目標：平成16年度末)

- (1) 膜タンパク質を大量に発現し、活性のある状態のまま高純度で精製できるシステムを開発する(数10mg程度)。
- (2) 迅速な立体構造解析のためのデータ収集を可能にする低温電子顕微鏡システムを開発する。
- (3) 電子線結晶学による高分解能の立体構造解析を行うコンピュータプログラムを開発する。
- (4) 結晶化が非常に困難なものに対しては、単粒子にて構造解析が可能な電子顕微鏡手法を開発する。
- (5) 微小結晶(数10 μ m)でX線回折像が得られる技術を開発する。

(最終目標：平成18年度末)

- (1) 膜タンパク質の2次元結晶、3次元結晶等の結晶化システムを開発する。
- (2) 十分な量のタンパク質の精製を行い、多くの結晶化条件の検討を可能にすることによりX線結晶解析を実現する。
- (3) 上記、3.(1)～(5)で開発したシステムと4.(1)～(2)の結晶構造解析法等を用いて、複数個の受容体、チャンネル等の膜タンパク質の構造を本研究期間中に解析し、これらの技術の有用性を実証する。

研究開発項目②「核磁気共鳴法（NMR）等によるタンパク質間、その他の分子との相互作用解析技術の開発及び、データの取得」

1. 研究開発の必要性

NMRは水溶液中の生体高分子の立体構造解析、相互作用解析に有効な手段と考えられるが、分子量4万以上の高分子量タンパク質は構造解析が極めて困難なこと、及び膜タンパク質の可溶化技術が確立していないことから、高分子量タンパク質及び膜タンパク質に対する構造解析、相互作用解析はほとんど進んでおらず重要な研究課題となっている。

したがって、本研究開発は、NMRを用いて高分子量タンパク質複合体及び膜タンパク質複合体における相互作用部位（以下「界面」という。）を同定することが可能な測定・解析技術の開発を行うとともに、解析データを取得する。

2. 研究開発の具体的内容

（1）高分子量タンパク質複合体における分子間相互作用解析技術

タンパク質と生体高分子あるいは細胞との複合体形成に伴うタンパク質の構造変化の検出及び複合体におけるタンパク質界面残基の高精度同定に関するNMR測定・解析技術を開発し、解析データを取得する。

（2）膜タンパク質および関連タンパク質複合体の分子間相互作用解析技術

膜タンパク質と関連タンパク質の可溶化、機能部分のドメイン化、膜への埋め込み技術などNMR試料調製法の開発、及びこれらタンパク質複合体の分子間相互作用解析を可能とする高感度NMR測定技術の開発を行う。また、開発された技術に基づき、解析データを取得す。

（3）固体NMRによる膜タンパク質の部分構造、相互作用解析技術

近年可溶化できないタンパク質について、固体状態でNMRを測定する技術が開発されてきた。現時点では分解能等において、得られる情報に制約は多いが、安定同位体標識と組み合わせることにより、新たな膜タンパク質の構造解析、相互作用部位の測定・解析技術を開発するとともに解析データを取得する。

3. 達成目標

（中間目標：平成16年度末）

- （1）150K以上の分子量を持つ高分子量タンパク質複合体の界面残基を、従来法と比較してより高感度およびより高精度に同定する測定手法の開発を行う。
- （2）無細胞蛋白発現系により膜蛋白質を調製するシステムを構築する。

（最終目標：平成18年度末）

- （1）分子量10万以上の高分子量タンパク質複合体において、生体高分子とタンパク質間の界面を90%以上（NMRより同定された残基数／界面構成残基数）の精度で同定する。
- （2）NMR解析に用いることが可能な膜タンパク質及び関連タンパク質溶液を調製する技術を開発する。
- （3）膜タンパク質複合体に対する高感度測定を可能にする多核種NMR測定技術を開発する。
- （4）膜タンパク質及び関連タンパク質の機能ドメインを可溶化し、安定同位体標識する技術を開発する。

- (5) 固体NMR法により膜タンパク質の部分構造、相互作用部位を決定する方法を開発する。
- (6) 上記(1)～(5)で研究開発された技術等を用いて複数個の受容体やチャネル等の膜タンパク質および関連タンパク質に関して実際のデータの取得を行う。

研究開発項目③「膜タンパク質関連分子複合体等の構造、分子機構及び生物機能解析技術の開発及びデータの取得」

1. 研究開発の必要性

膜タンパク質を始めとするタンパク質を創薬等に活用するには、それらがどのような高分子（タンパク質、核酸、脂質、多糖質等）と相互作用し、どのような構造の変化を伴って生体内で機能しているか解析する必要がある。そのためには、対象のタンパク質単体だけでなく、相互作用している高分子を含め、安定な複合体全体、相互作用リレー系の構造解析を実施するとともに、複合体の形成や相互作用に関する分子機構の解明を行い、生物機能に結びつけることが不可欠である。

したがって、本研究開発では情報伝達に係わる膜タンパク質を中心とするタンパク質及びそれらと関連する高分子等との複合体について、構造とその分子機構及び機能の解明を行うため必要な解析技術の開発を行うとともに、解析データの取得を実施する。

2. 研究開発の具体的内容

(1) 細胞内外の情報伝達相互作用系にかかわるタンパク質等の構造と機能解析

膜タンパク質を介しての細胞内外への情報伝達系において、情報伝達機構に關与する膜タンパク質及び関連する複合体について構造解析及び機能の推定を実施する。

(2) ヒトの生体に存在している高分子複合体の構造・機能の解明による創薬等基盤情報の獲得

ヒト完全長 cDNA クローン及び配列情報を活用し、ヒトの体内で高度な機能を発揮していると考えられる高分子複合体について構造解析及び機能の推定を実施し、創薬開発等に有用な情報を提供する。

3. 達成目標

(中間目標：平成16年度末)

- (1) 光受容タンパク質ロドプシンの構造解析の精密化と励起型の結晶化。
- (2) ペプチド受容GPCR（Gタンパク質共役受容体）の単離、精製。
- (3) 複合体形成によって機能発揮するタンパク質の探索。

(最終目標：平成18年度末)

- (1) 種々の状態における光受容タンパク質の構造解析と、情報受容機構の解明。
- (2) ロドプシン型GPCRの単離、構造解析と、情報受容機構の解明。
- (3) 神経情報伝達に関わる受容体とそれに相互作用する蛋白質の探索、単離。
- (4) リガンド駆動型受容体から細胞内への情報伝達機構の構造的解明。
- (5) 複合体形成によって機能発揮するタンパク質の構造、機能解析法の開発。
- (6) ヒト完全長 cDNA から発現させたタンパク質等の高分子複合体の構造解析と機能解明。

研究開発項目④「データベースとシミュレーション計算を活用した構造情報解析技術の開発」

1. 研究開発の必要性

ゲノム情報を活用するために、タンパク質の構造情報として立体構造データベースに蓄積する作業が進展しつつある。これらの構造決定を加速し、かつ蓄積された構造情報を正確に理解し創薬等への応用へ結びつけるためには、タンパク質立体構造の迅速決定を支援し構造精密化を行うモデリング技術、及びタンパク質の相互作用を解析するシミュレーション技術の確立が必須である。しかしながら、現在の構造モデリング技術は精度が不十分であり、またタンパク質の相互作用シミュレーションでは分子同士の動的な構造変化が考慮されておらず、実際の生体内での相互作用が正確に反映できない等の問題点がある。

したがって、本研究開発は、タンパク質立体構造の解析を支援する高精度・高速な構造モデリング技術、及び膜タンパク質等の動的な構造変化も考慮して相互作用を解析するシミュレーション技術等の構造情報解析技術の開発を行う一方、急速に進展しつつあるグリッド技術にも対応する。

2. 研究開発の具体的内容

(1) タンパク質立体構造の高精度・高速モデリング技術の開発

膜タンパク質等の高効率な分子構造探索のための基本ソフトウェアを作製するとともに高精度の力場パラメータを開発し、X線結晶解析、電子顕微鏡、NMR等による実験情報、ゲノムデータベース及び立体構造データベースとをグリッド技術によって統合化して、高精度化・迅速化した膜タンパク質等の立体構造モデリング技術を開発する。

(2) 分子間相互作用シミュレーションとその評価技術の開発

実用的な *in silico* スクリーニングを目的として、膜タンパク質等とリガンド（タンパク質、基質、低分子化合物）のドッキングとその評価を高速に行うとともに、双方の分子の構造変化を考慮した定量的な相互作用シミュレーション技術を開発する。また、この技術の評価を行うため、細胞膜に局在する受容体蛋白質および酵素蛋白質における実験的検証を行い、その結果をフィードバックすることによりシミュレーション技術を高度化する。

3. 達成目標

(中間目標：平成16年度末)

- (1) 膜タンパク質等について、溶媒分子や膜分子も含んだ状態で、数千万の異なる状態の構造を探索し、自由エネルギー的に安定な構造を得るモデリング技術を開発する。
- (2) 膜タンパク質等とリガンドの双方の構造変化を考慮した *in silico* スクリーニングを行うシミュレーション技術を開発する。

(最終目標：平成18年度末)

- (1) 膜タンパク質等のモデリング技術の計算速度と精度をさらに高め、実証実験に合致する結果が得られるシミュレーション技術とする。
- (2) *in silico* スクリーニング技術の計算速度と精度をさらに高め、実証実験に合致する結果が得られるシミュレーション技術とする。

注：*in silico*スクリーニング コンピュータ上で医薬品等の候補物質を選抜すること