公開

「創薬加速に向けたタンパク質構造解析基盤技術開発」 第1回中間評価分科会説明資料
資料6－1

事業名：
健康安心イノベーションプログラム
「創薬加速に向けたタンパク質構造解析基盤技術開発」
（研究開発期間：H19年度～H23年度　5年間）

第1回　中間評価分科会説明資料

議題5　プロジェクトの全体概要説明　（公開）

平成21年8月12日（水）

NEDO

健康安心イノベーションプログラム
「創薬加速に向けたタンパク質構造解析基盤技術開発」

発表者：NEDO

I.　事業の位置づけ・必要性について

II. 研究開発マネジメントについて

発表者：プロジェクトリーダー

III. 研究開発成果について

IV. 実用化の見通しについて

Ⅰ．事業の位置づけ･必要性

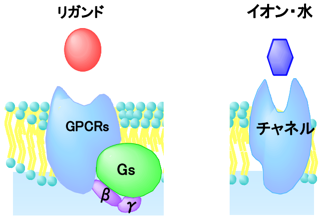
･NEDOの関与する意義
･事業の背景･目的･意義

NEDOの関与する意義

膜タンパク質及びその複合体の構造情報等に指南された創薬戦略
（SGDD: Structure Guided Drug Design）の実現が必要

市販薬剤の標的蛋白質

受容体	45%
イオンチャネル	5%
酵素	28%
ホルモン･因子	11%
作用点不明	7%
核内受容体	2%
DNA	2%



50%が膜タンパク質

合理的な化合物設計技術

- 立体構造情報
- 化合物結合シミュレーション
- 相互作用情報

データ

データ

3分野での同時技術開発

加速

化合物ライブラリー

探索プロセス

医薬リード化合物

事業原簿 1－3 ページ

NEDOの関与する意義

NEDO関与の必要性

- 新しい生命科学の知見の創出を促すような基盤技術の開発が必要であり、生物の研究者のみならず、物理、計測、情報など関連する*様々な分野の研究者からなる開発体制*を構築し、国が行う事業として、*集中的に推進する*ことが必要。
- また、最先端の研究開発であり、現時点においては産業化に向けた基礎的段階にあること、開発段階から産学官連携型による効率的な研究開発の推進が必要であり、*開発リスクが大きく多額の資金を要するため、民間企業のみで取り組むことが困難*であることから、ナショナルプロジェクトとして実施することが必要。

Ⅰ. 事業の位置づけ･必要性

NEDOの関与する意義

本事業は健康安心イノベーションプログラム（経産省）の一環として実施。

. 目的

今後、世界に類を見ない少子高齢化が進展する我が国において、国民が健康で安心して暮らせる社会を実現することは喫緊の課題である。具体的には、個の医療を通じて健康寿命の延伸、ＱＯＬ（Quality of Life：生活の質）の向上を図ることが求められている。

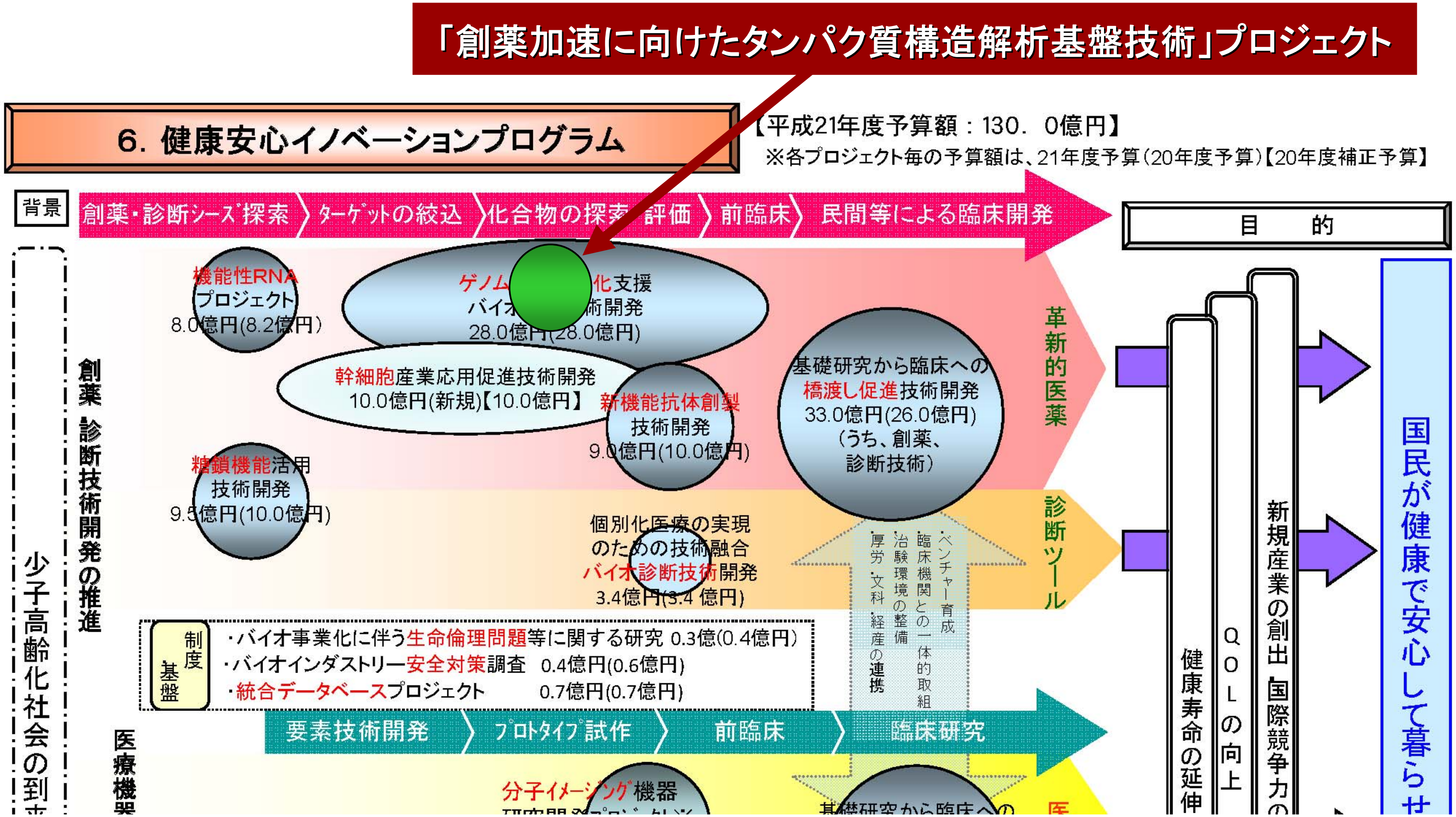
この目的を達成するため、創薬に資する基盤技術の開発、再生医療の確立、医療機器・福祉機器の開発等の手段を適切に組み合わせることによって、健康維持増進、疾患の早期診断、及び適切な治療法の提供を実現するほか、関連産業の競争力強化・ベンチャー企業の創出を図る。

「創薬加速に向けたタンパク質構造解析基盤技術開発」

Ⅰ. 事業の位置づけ・必要性

NEDOの関与する意義

「創薬・診断技術開発」の推進における「革新的医薬品の創出」を目指すプロジェクトとして位置づけられている。



Ⅰ．事業の位置づけ・必要性

事業の背景・目的・位置づけ

先行プロジェクトの成果を活用し、創薬加速の実現を目指す。

「創薬加速に向けたタンパク質構造解析基盤技術開発」（H19～）

創薬上有用な膜タンパク質及びその複合体に対してSGDDを進展

- 立体構造情報を取得
- 相互作用情報を取得
- 医薬リード化合物を取得

展開

企業との課題解決型連携による実証研究

連携

創薬加速のための膜タンパク質及びその複合体解析技術開発

- 生体内に近い状態での立体構造解析技術など
- 生体内に近い状態での相互作用解析技術など
- 構造・相互作用情報をもとにしたシミュレーション技術など

NEDO特別講座

活用

膜タンパク質及びその複合体を対象としうる解析技術を開発

立体構造解析技術

【主な成果】
○膜タンパクの立体構造解析を可能とする**極低温電子顕微鏡**を開発。

相互作用解析技術

【主な成果】
○膜タンパク質と相互作用するリガンドの相互作用部位を高感度・高精度に同定する技術を開発（**転移交差飽和法**）。

シミュレーション技術

【主な成果】
○タンパク質等のモデリング、タンパク質－薬物ドッキング、in silicoスクリーニング等を**高速、高精度に行なうソフトウェア**（***MyPresto***）を開発。

「生体高分子立体構造情報解析」（H14～H18）
（世界に先駆けた膜タンパク質をターゲットとしたタンパク質構造解析プロジェクト）

事業原簿　1－3ページ

事業実施の効果

●膜タンパク質及びその複合体に対するSGDDの実現

効果
・膜タンパク質及びその複合体に対する医薬リード化合物取得の効率化。既存の探索プロセス（ in silicoスクリーニング）に較べて、約10倍程度の効率化が期待できる。

・膜タンパク質及びその複合体を解析対象とできることにより、医薬標的タンパク質種が倍増の可能性（600-700種類へ）。

●創薬上有用な膜タンパク質の構造･機能解析による作用メカニズム解明。

効果
・新たな創薬標的の発見など。

Ⅱ．研究開発マネージメントについて

・事業の目標
・事業の計画内容

事業の目標

個別目標を達成し全体目標に至る。

①電子線等による膜タンパク質及びその複合体の構造解析技術

個別の目標

技術開発における**数値目標**:
生体内に近い状態での立体構造解析技術など

立体構造情報を取得する**膜タンパク種数**

②核磁気共鳴法等による膜タンパク質及びその複合体とリガンド分子の相互作用解析技術

個別の目標

技術開発における**数値目標**:
生体内に近い状態での相互作用解析技術など

相互作用情報を取得する**膜タンパク種数**

③高精度in silicoスクリーニング等のシミュレーション技術

個別の目標

技術開発における**数値目標**:
構造・相互作用情報をもとにしたシミュレーション技術など

取得する**医薬リード化合物数**

全体目標

創薬上有用な膜タンパク質及びその複合体に対してSGDDを進展。

事業の目標

個別目標　研究開発項目①： 電子線等による膜タンパク質及びその複合体の構造解析技術

中間目標（中間評価時）

1）細胞膜内での生体内に近い状態での膜タンパク質の立体構造を解析するため、以下の技術を開発する。また、これらの技術と既存技術を活用し、ヒト由来（発現系）膜タンパク質及びその複合体の構造を最低1個解析する。

2）2次元結晶化された膜タンパク質及びその複合体を水や脂質分子が観察できる2Åより高い分解能で3次元構造を解析する技術、細胞の自然な状態での膜タンパク質及びその複合体の3次元構造を解析する技術（電子線トモグラフィー等）を開発する。

3）結晶化できない膜タンパク質の立体構造を10Åより高い分解能で解析する技術（単粒子解析等）を開発する。

4）2）、3）を組み合わせることにより自然な状態の膜タンパク質及びその複合体の構造を解析する技術を開発する。

最終目標

1）細胞膜内での生体内に近い状態での膜タンパク質の立体構造を解析するため、以下の技術を開発する。また、これらの技術と既存技術を活用し、ヒト由来（発現系）膜タンパク質及びその複合体の構造を複数個解析する。

2） 2次元結晶化された膜タンパク質及びその複合体を水や脂質分子が観察できる2Åより高い分解能で3次元構造解析する技術、細胞膜内において自然な構造の状態で固定化された膜タンパク質等の全体像を電子線トモグラフィー等により50Åより高い分解能で3次元構造解析する技術を確立する。

3）結晶化できない膜タンパク質の立体構造を8Åより高い分解能で解析する技術（単粒子解析等）を開発する。

4）2）、3）を組み合わせることにより自然な状態の膜タンパク質及びその複合体の構造を解析する技術を開発する。

事業の目標

個別目標　研究開発項目②：　核磁気共鳴法等による膜タンパク質及びその複合体とリガンド分子の相互作用解析技術

中間目標（中間評価時）

生体内に近い状態での膜タンパク質及びその複合体とリガンド分子の相互作用を解析するため、以下の技術を開発する。また、これらの技術を基に、2個以上の膜タンパク質等創薬標的タンパク質を解析する。

a）解離定数がmM～μMと結合力が弱いリガンド分子の標的分子結合部位を同定する解析技術の開発を行う。

b）固体と液体が混合した不均一な系における膜タンパク質及びその複合体とリガンド分子の相互作用解析技術について従来法に比べ3倍に高感度化する。

最終目標

生体内に近い状態での膜タンパク質及びその複合体とリガンド分子の相互作用を解析するため、以下の技術を確立する。また、これらの技術を基に、5個以上の膜タンパク質等創薬標的タンパク質を解析する。

a）解離定数がmM～μMと結合力が弱いリガンド分子の結合構造の解析技術を確立する。

b）固体と液体が混合した不均一な系における膜タンパク質及びその複合体とリガンド分子の相互作用解析技術について従来法に比べ3倍に高感度化する。

c）細胞表層における生体内に近い状態での膜タンパク質及びその複合体とリガンド間相互作用を解析する技術を開発する。

事業の目標

個別目標　研究開発項目③：　高精度in silicoスクリーニング等のシミュレーション技術

中間目標（中間評価時）

高精度のインシリコスクリーニングを実現するため、以下の技術を開発する。さらに①②の技術開発との連携により、産業上有用な化合物を5個以上取得する。

1）タンパク質の動的性質を正しく評価し、タンパク質受容体への基質結合能を高い精度で計算できる新しい計算科学手法を開発し、インシリコスクリーニングの効率を従来法に比べ5倍程に上げる。

2）タンパク質と化合物とのドッキング計算手法の精度を高め、ターゲット選択性能を従来法に比べ5倍程度上げる。

3）タンパク質間相互作用を阻害・制御する低分子化合物の選択・設計の技術開発を行う。

最終目標

高精度のインシリコスクリーニングを実現するため、以下の技術を開発する。さらに①②の技術との連携により、産業上有用な化合物を10個以上取得する。

1）タンパク質の動的性質を正しく評価し、タンパク質受容体への基質結合能を高い精度で計算できる新しい計算科学手法を確立し、インシリコスクリーニングの効率を従来法に比べ10倍程にあげる。

2）タンパク質と化合物とのドッキング計算手法の精度を高め、ターゲット選択性能を従来法に比べ10倍程度上げる。

3）タンパク質間相互作用および超分子複合体の構造情報に基づく構造生理学、構造薬理学のアプローチにより、タンパク質間相互作用を阻害・制御する低分子化合物を選択・設計するため、医薬品化が困難な生理活性ペプチドから医薬品となりやすい非ペプチド性の化合物（低分子化合物等）を得る一般的手法を開発し、その技術の有効性を確認するため、最低1つの実証を行う。

事業の計画内容

研究開発の内容

①電子線等による膜タンパク質及びその複合体の構造解析技術

チームリーダー　京都大・藤吉教授

極低温電子顕微鏡を用い、電子線結晶学とトモグラフィー技術等を開発することにより、細胞表層で機能しているタンパク質の3次元構造や機能を解析するための基盤技術を開発する。

課題解決型連携（実証研究）

②核磁気共鳴法等による膜タンパク質及びその複合体とリガンド分子の相互作用解析技術

チームリーダー　東京大・嶋田教授

核磁気共鳴装置（NMR）により、細胞表層の膜タンパク質及びその複合体が、リガンド分子と相互作用する部位について、その構造情報を取得するための基盤技術を開発する。

課題解決型連携（実証研究）

③高精度in silicoスクリーニング等のシミュレーション技術

チームリーダー　大阪大・中村教授

膜タンパク質及びその複合体の構造情報を基にした、高精度*in silico*スクリーニングや動的、安定性モデリング技術を開発する。

課題解決型連携（実証研究）

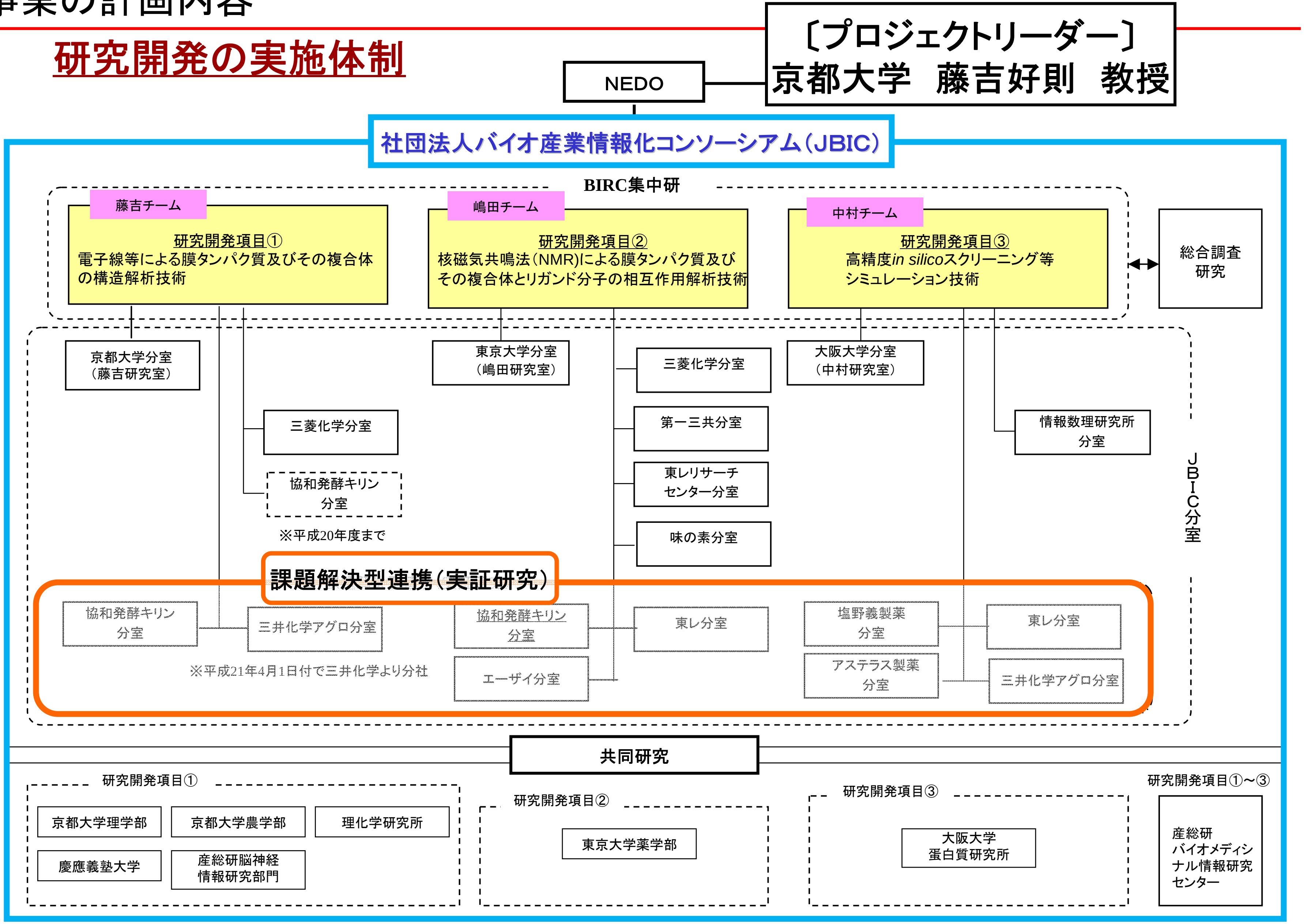
創薬上重要な標的タンパク質に対し互いに連携研究開発を推進

連携研究：阻害剤開発

連携研究：タンパク質複合体モデル構築を可能とする新規手法の開発

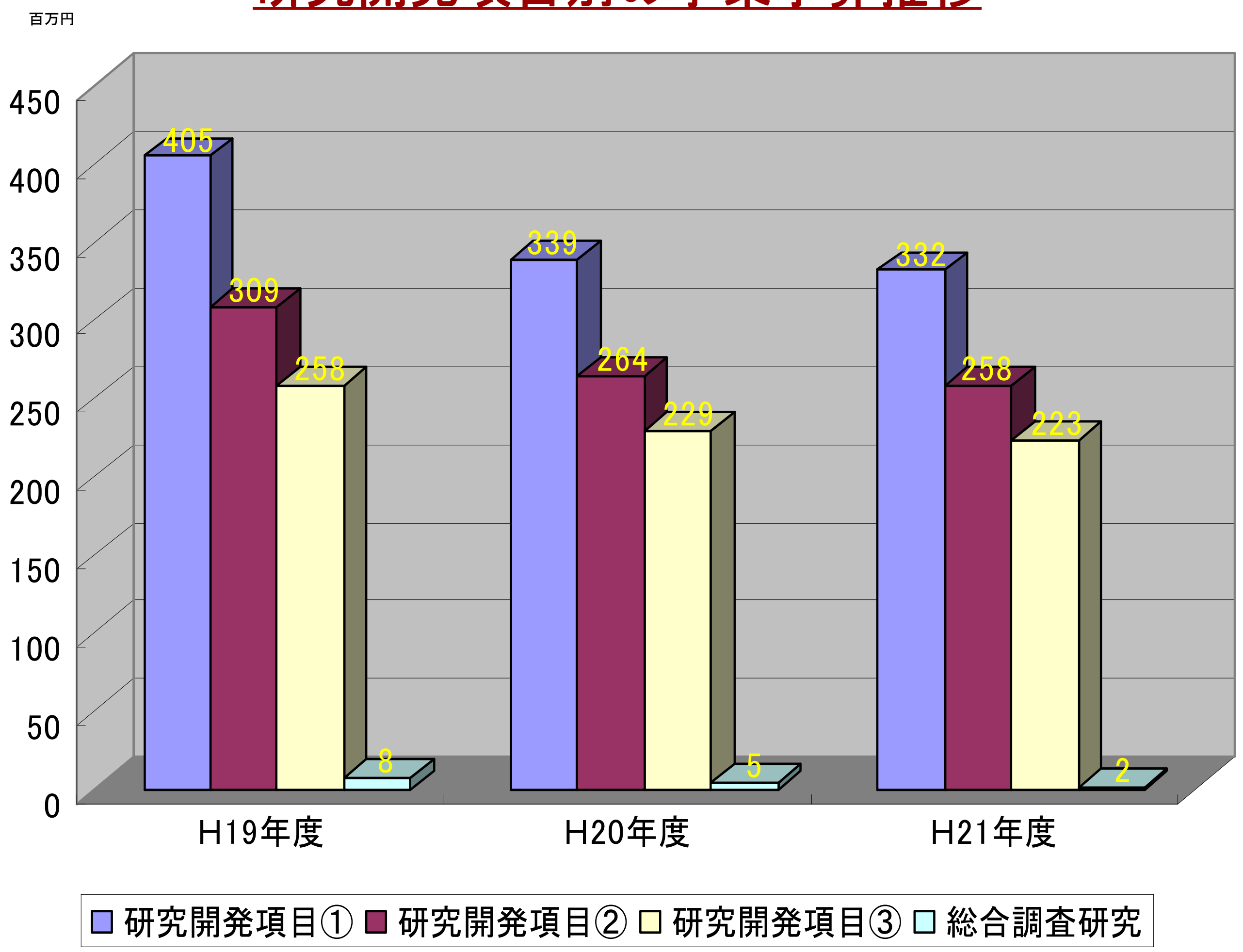
事業の計画内容

研究開発の実施体制



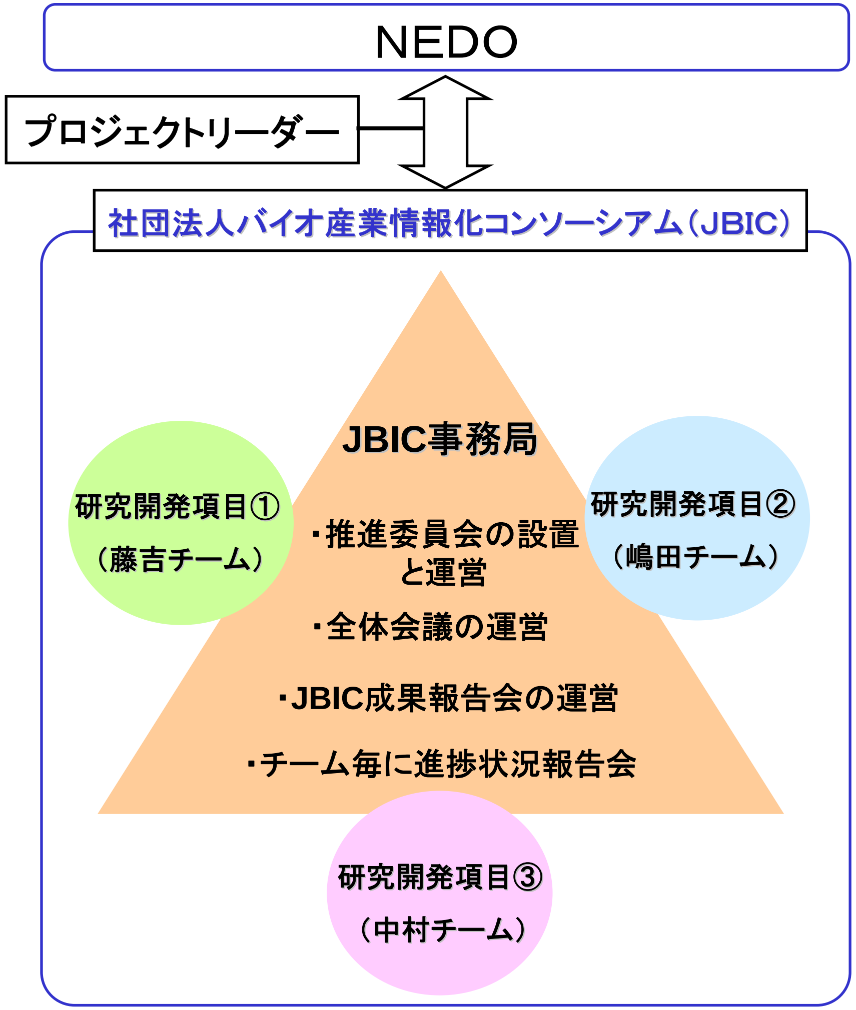
事業の計画内容

研究開発項目別の事業予算推移



事業の計画内容

研究開発の運営管理



研究開発推進の取り組み

プロジェクト全体の推進検討

〇全体会議（兼　推進委員会）開催

（研究開発の進捗状況報告と研究チーム間の連携強化）

・平成19年5月18日（金）　日本科学未来館

・平成21年1月30日（金）　日本科学未来館

各研究開発項目グループの推進検討

〇各グループの報告・推進会議

・月例検討会（お台場）などを実施

一般への研究報告と討論

〇JBIC成果報告会

・平成19年11月　1日（木）　東京ｺﾝﾌｧﾚﾝｽｾﾝﾀｰ・品川

・平成20年10月31日（金）　東京ｺﾝﾌｧﾚﾝｽｾﾝﾀｰ・品川

情勢変化等への対応

〇連携研究の強化

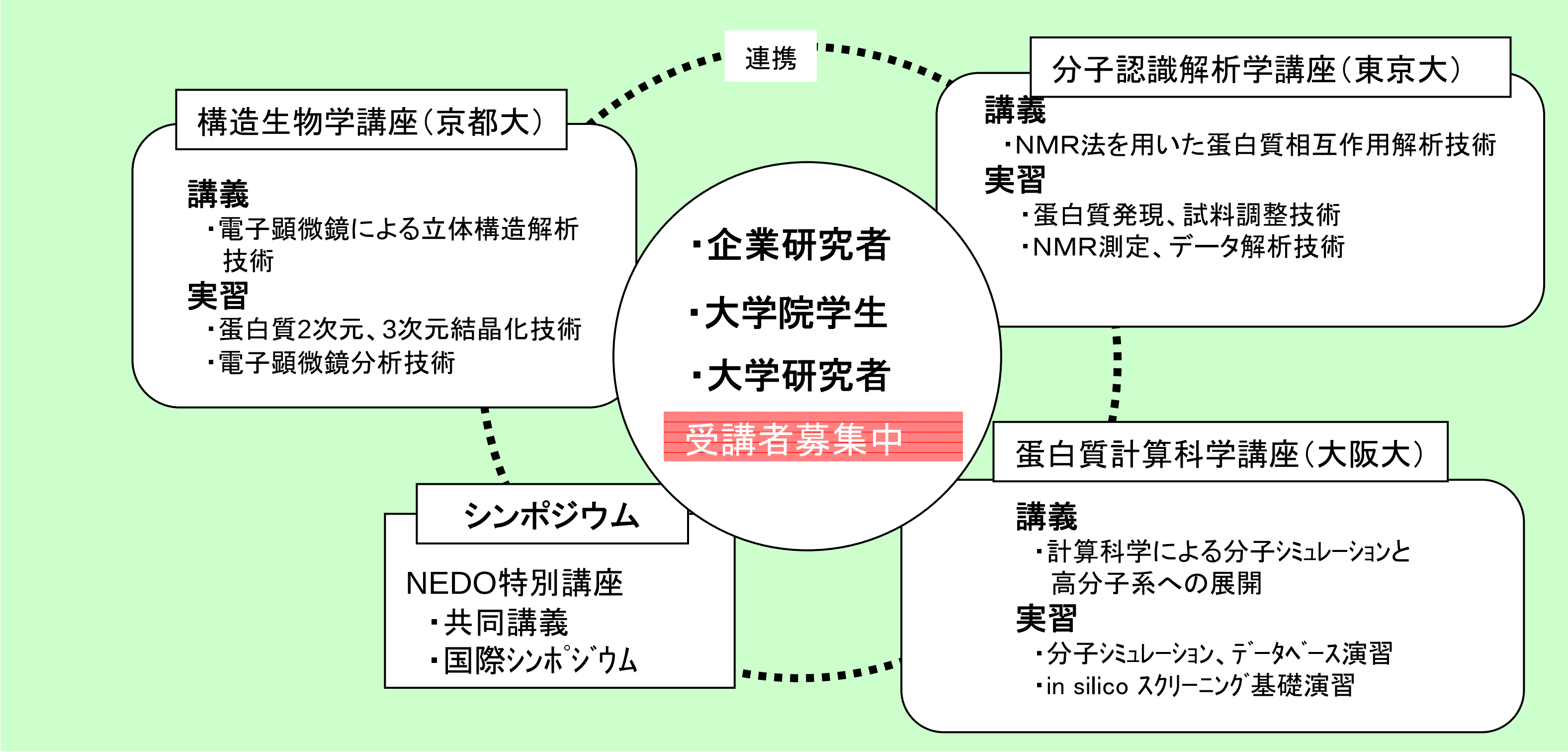
・阻害剤開発

・タンパク質複合体モデル構築を可能とする新規手法の開発

蛋白質立体構造解析NEDO特別講座
～ 創薬プロセスを加速する最新技術について、新しい産学交流の場で、NEDOプロジェクトの成果を還元 ～

NEDO特別講座

3分野にわたる講義・実習・シンポジウムを開催し、産学交流・人材育成の場を提供しています。



公開

Ⅲ．研究開発成果について

GOAL

創薬加速に向けたタンパク質構造解析**基盤技術開発**

平成21年８月１２日（水）

研究開発の内容

研究開発項目①

「電子線等による膜タンパク質及びその複合体の構造解析技術」

リーダー：藤吉好則（京都大学大学院理学研究科　教授）

研究開発項目②

「核磁気共鳴法等による膜タンパク質及びその複合体とリガンド分子の相互作用解析技術」

リーダー：嶋田一夫（東京大学大学院薬学系研究科　教授）

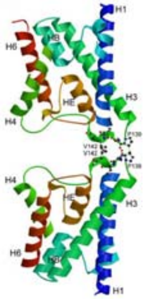
研究開発項目③

「高精度in silicoスクリーニング等のシミュレーション技術」

リーダー：中村春木（大阪大学蛋白質研究所　教授）

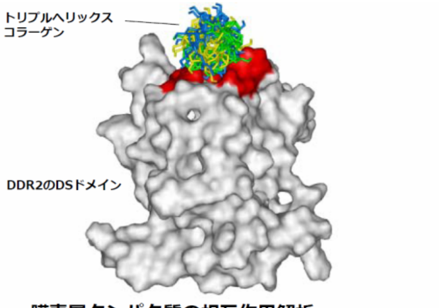
研究開発項目の関連

極低温電子顕微鏡法



水チャネルAQP4の構造

核磁気共鳴法の方法論開拓



膜表層タンパク質の相互作用解析 *EMBO J* (2007)

革新的構造解析技術

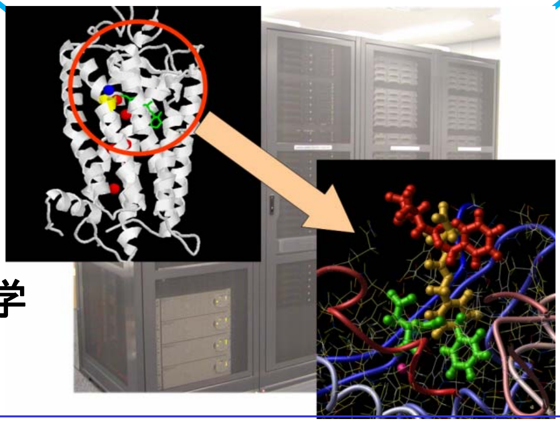
我が国オリジナルかつ世界最高水準の極低温電子顕微鏡を用い、電子線結晶学とトモグラフィー技術等を開発することにより、細胞表層で機能しているタンパク質の3次元構造や機能を解析するための基盤技術を開発する。

産業界のニーズを取り入れ
産業上、生物学的に重要な
標的タンパク質に対し互いに
連携研究開発を推進

革新的タンパク質 相互作用部位の解析技術

核磁気共鳴装置（NMR）により、細胞表層の膜タンパク質及びその複合体が、リガンド分子と相互作用する部位について、その構造情報を取得するための基盤技術を開発する。

計算科学



シミュレーション技術

膜タンパク質及びその複合体の構造情報を基にした、高精度*in silico* スクリーニングや動的、安定性モデリング技術を開発する。

中間目標と達成度　まとめ

■中間目標
☆達成度

研究開発項目①

■ ヒト由来(発現系)膜タンパク質の構造を最低1個解析する。
■ 2Åより高い分解能で構造解析技術開発
■ 電子線トモグラフィー法を開発
■ 10Å分解能での単粒子解析技術開発

☆ ヒト由来(発現系)膜タンパク質Cx26の構造を1個解析。
☆ 1.9Å分解能での解析技術開発
☆ 電子線トモグラフィー法を開発
☆ 10Å分解能での単粒子解析技術開発

研究開発項目②

■ 新たに開発した技術と従来開発の技術を用いて、2 個以上の膜タンパク質等創薬標的タンパク質を解析する。
■ 解離定数がmM～μMと結合力が弱いリガンド分子の標的分子結合部位を同定する解析技術の開発を行う。
■ 不均一な系における膜タンパク質・複合体とリガンド分子の相互作用解析技術について従来法に比べ3倍に高感度化する。

☆ 6個の膜タンパク質等創薬標的タンパク質を解析。
☆ 結合力が弱いリガンド分子の標的分子結合部位を解析する技術を開発。
☆ 不均一な系における膜タンパク質・複合体とリガンド分子の相互作用解析技術について従来法に比べ6倍に高感度化。

研究開発項目③

■ 産業上有用な化合物を5ヶ以上得る。
■ 受容体への基質結合能を高精度で計算できる新しい計算科学手法を開発し、インシリコスクリーニングの効率を従来法の5倍ほどに引き上げる。
■ ドッキング計算手法の精度を高め、ターゲット選択性能を従来法の5倍程度に引き上げる。
■ タンパク質間相互作用を阻害・制御する低分子化合物の選択・設計の技術開発。

☆ ヒット化合物を70ヶ以上、産業上有用な化合物を20ヶ以上得た。
☆ 受容体への基質結合能を高精度で計算できる新しい計算科学手法を開発し、インシリコスクリーニングの効率を従来法の10倍に引き上げる実証をした。
☆ ドッキング計算手法の精度を高め、ターゲット選択性能を従来法の5倍以上に引き上げた。
☆ タンパク質間相互作用を阻害・制御する新たな手法を開発した。

研究開発項目① 研究内容

GOAL
創薬加速に向けた膜タンパク質構造解析基盤技術を開発

1) 膜タンパク質及びその複合体の構造解析に必要な発現・精製技術、結晶化技術の開発

ソフトの目標

1-1) ヒト等真核生物由来の膜タンパク質の発現・精製
1-2) 結晶化技術の開発

2) 極低温高分解能電子顕微鏡や自動電子顕微鏡等の電子顕微鏡の開発、コンピューター解析の高速化と精密化

ハードの目標

2-1) 電子線トモグラフィー用極低温電子顕微鏡の開発
2-2) 高分解能解析用とトモグラフィー用プログラム開発
2-3) ２次元結晶化条件の検索を2倍以上に加速するシステム開発

3) 電子顕微鏡とX線によるタンパク質構造解析

解析の目標

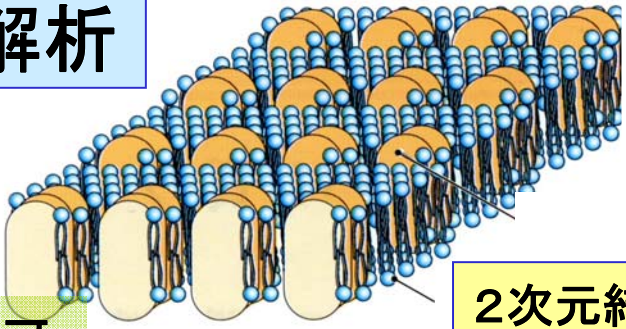
脂質膜の中での構造解析

・膜の中で構造研究が出来る

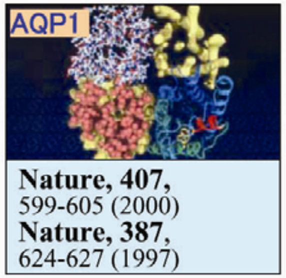
・結晶内の相互作用の影響少

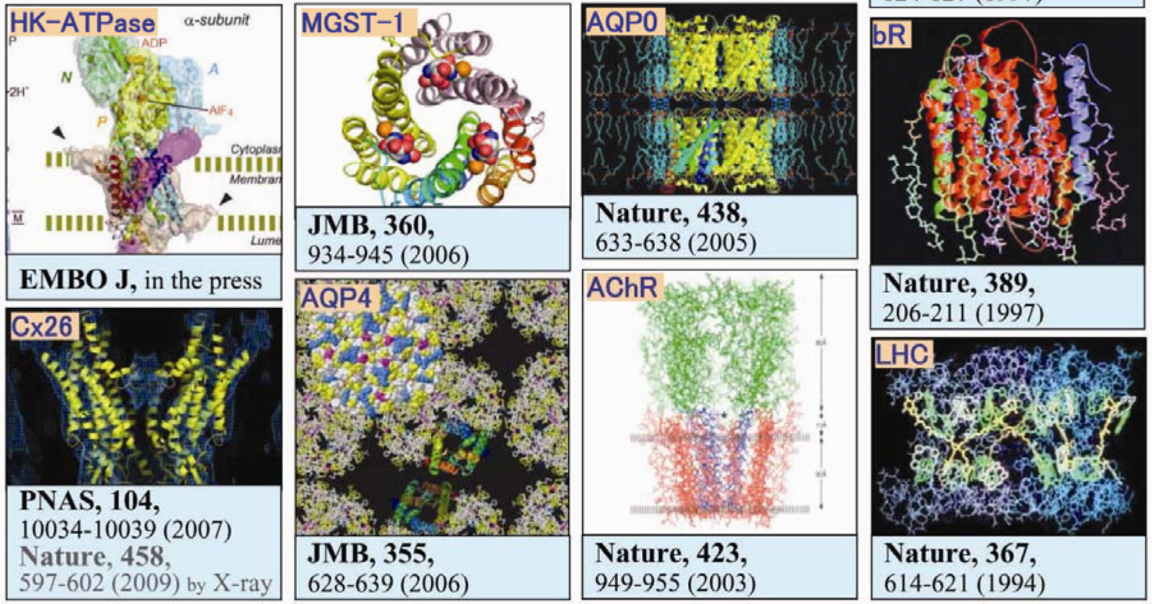
・結晶性の悪い結晶でも構造解析可

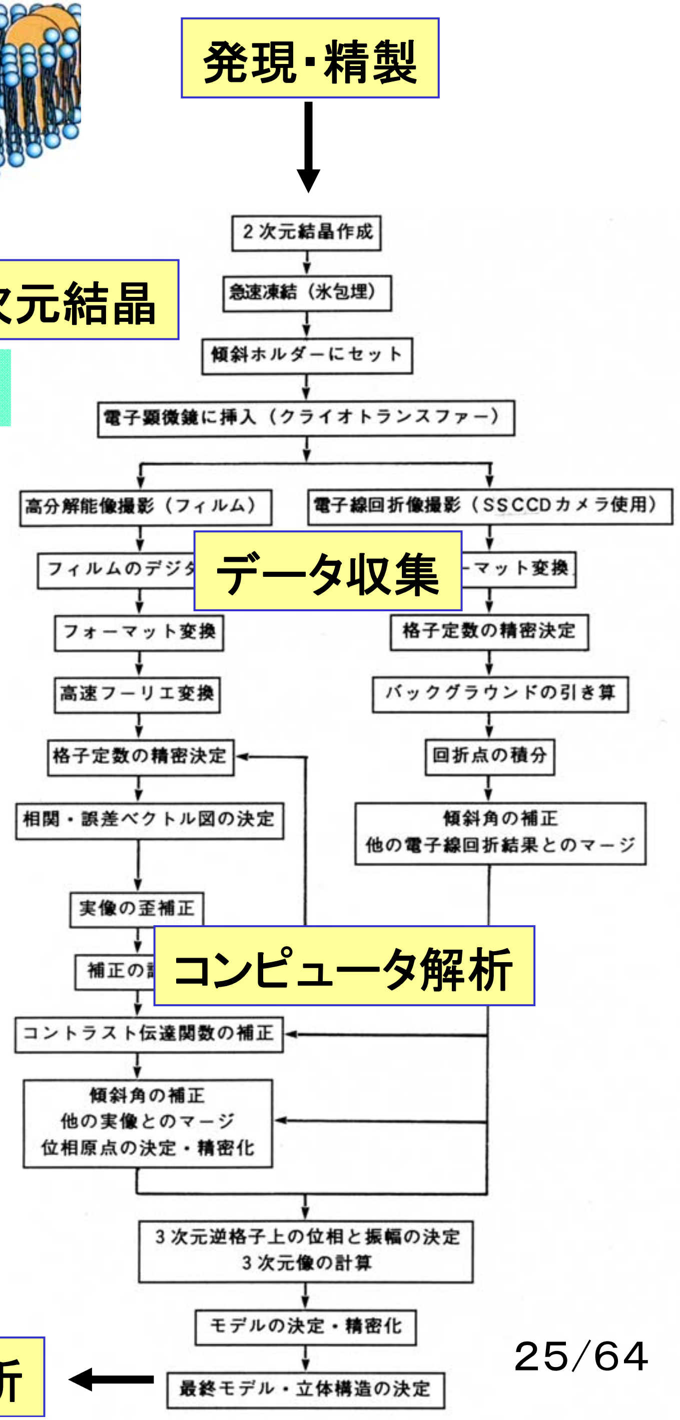
・位相が直接像から計算される



独自に開発した極低温電子顕微鏡と電子線結晶学を用いて解析された膜蛋白質の構造







機能解析

事業原簿　14ページ

研究開発項目① 達成目標

中間目標

1）細胞膜内での生体内に近い状態での膜タンパク質の立体構造を解析するため、以下の技術を開発する。また、これらの技術と既存技術を活用し、ヒト由来（発現系）膜タンパク質及びその複合体の構造を最低1個解析する。

2）2次元結晶化された膜タンパク質及びその複合体を水や脂質分子が観察できる2Åより高い分解能で3次元構造を解析する技術、細胞の自然な状態での膜タンパク質及びその複合体の3次元構造を解析する技術（電子線トモグラフィー等）を開発する。

3）結晶化できない膜タンパク質の立体構造を10Åより高い分解能で解析する技術（単粒子解析等）を開発する。

4）2）、3）を組み合わせることにより自然な状態の膜タンパク質及びその複合体の構造を解析する技術を開発する。

最終目標

1）細胞膜内での生体内に近い状態での膜タンパク質の立体構造を解析するため、以下の技術を開発する。また、これらの技術と既存技術を活用し、ヒト由来（発現系）膜タンパク質及びその複合体の構造を複数個解析する。

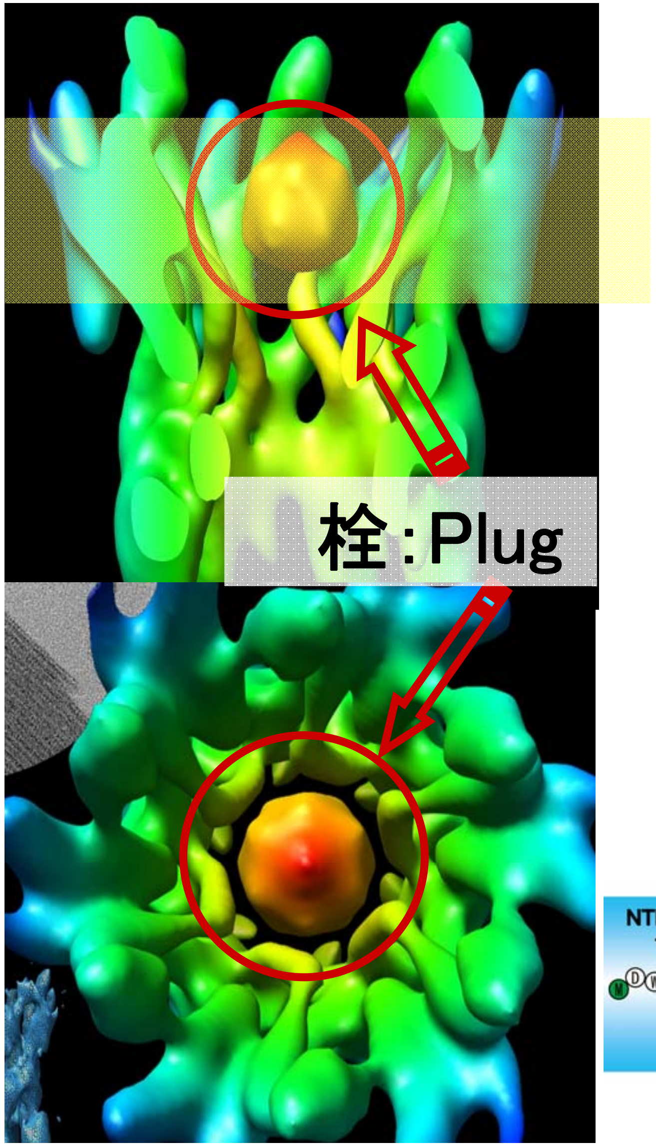
2） 2次元結晶化された膜タンパク質及びその複合体を水や脂質分子が観察できる2Åより高い分解能で3次元構造解析する技術、細胞膜内において自然な構造の状態で固定化された膜タンパク質等の全体像を電子線トモグラフィー等により50Åより高い分解能で3次元構造解析する技術を確立する。

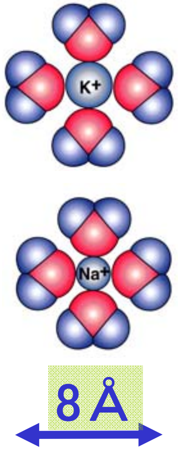
3）結晶化できない膜タンパク質の立体構造を8Åより高い分解能で解析する技術（単粒子解析等）を開発する。

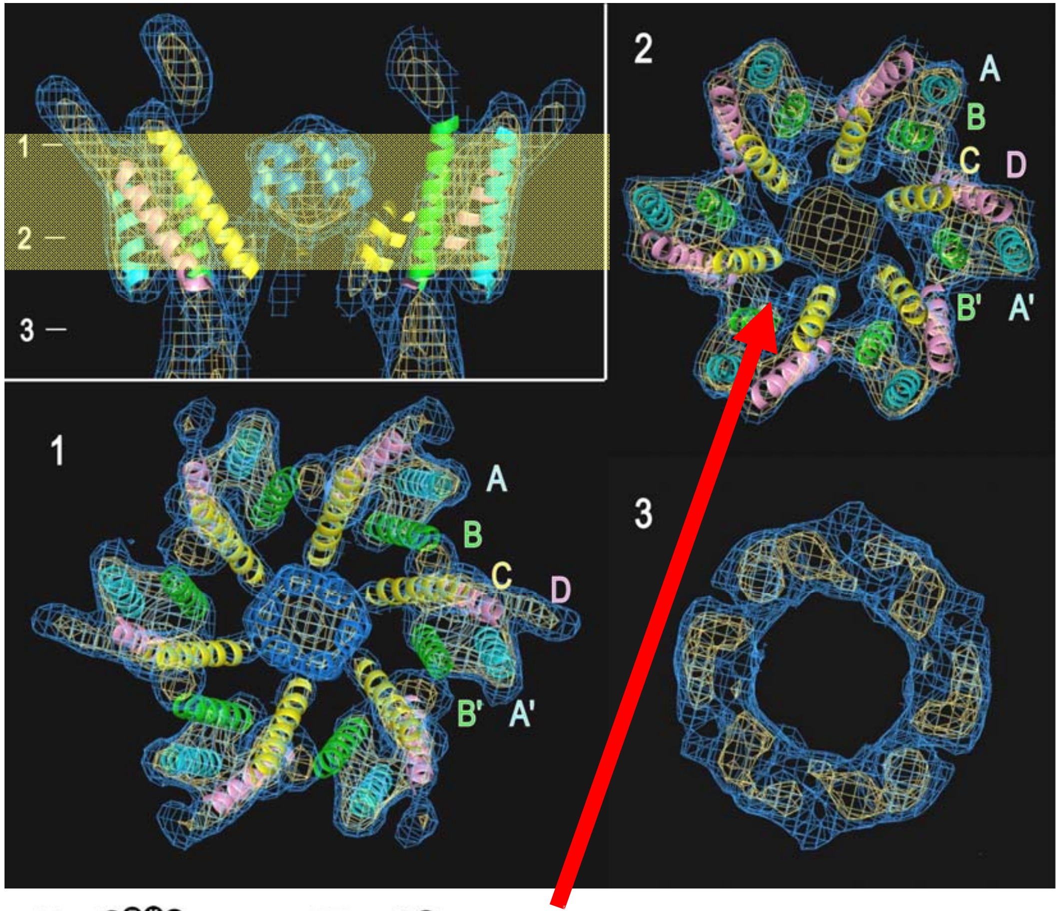
4）2）、3）を組み合わせることにより自然な状態の膜タンパク質及びその複合体の構造を解析する技術を開発する。

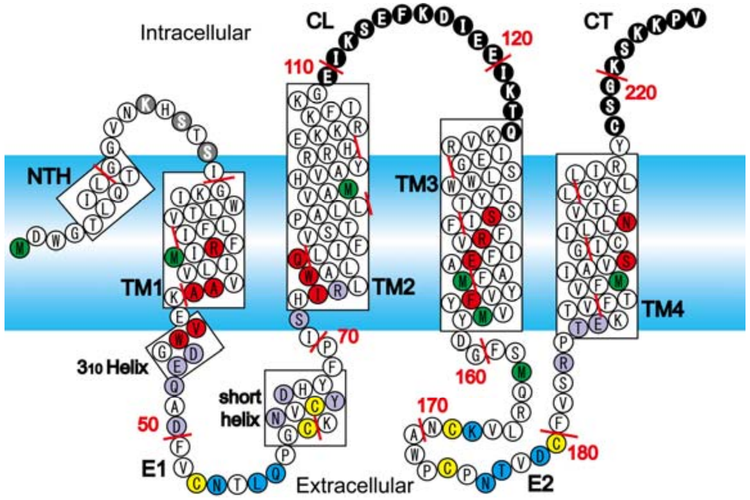
Cx26 のPlugモデル

PNAS, 104, 10034-10039 (2007)









イオンを透過しない
構造：8Åより狭い

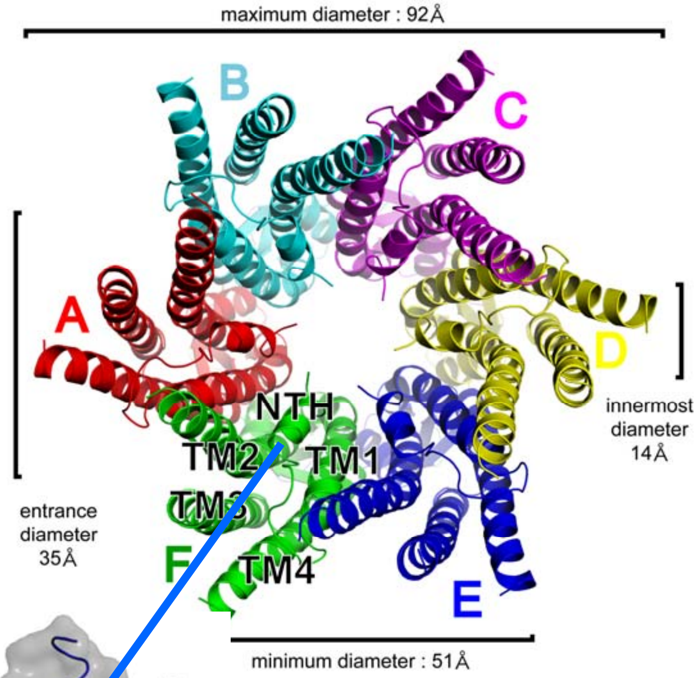
ヒト由来（発現系）の
膜タンパク質、
コネキシンの構造

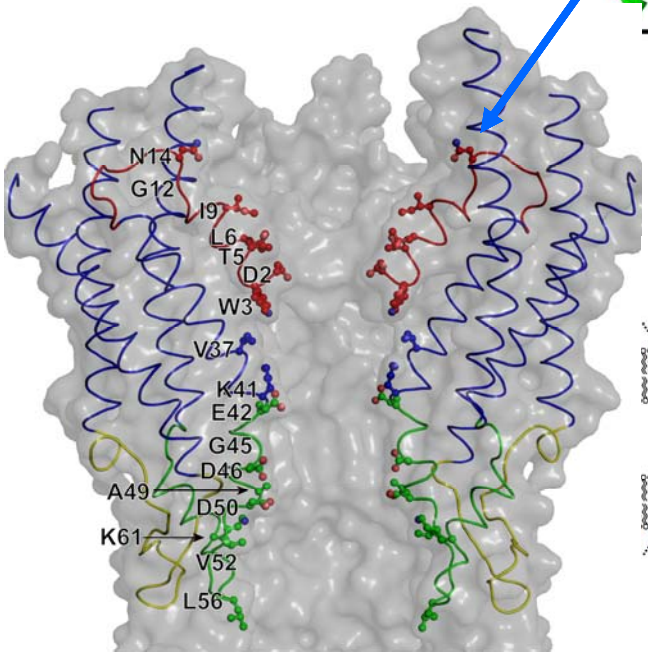
事業原簿　15ページ

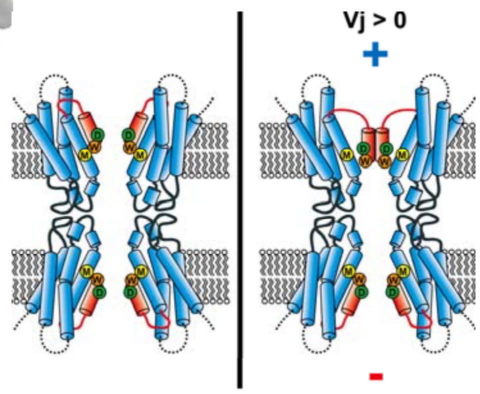
Cx26の構造

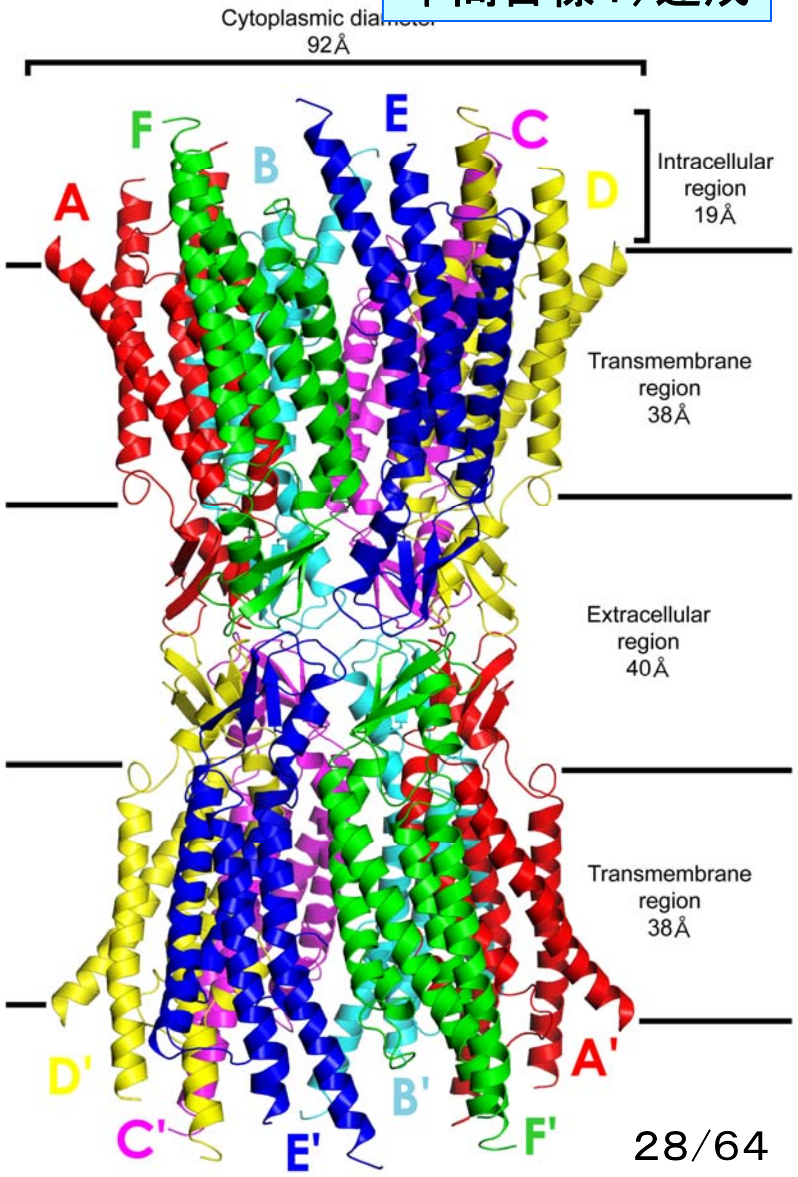
**ヒト由来（発現系）の
膜タンパク質、
コネキシン複合体の構造**

中間目標1）達成







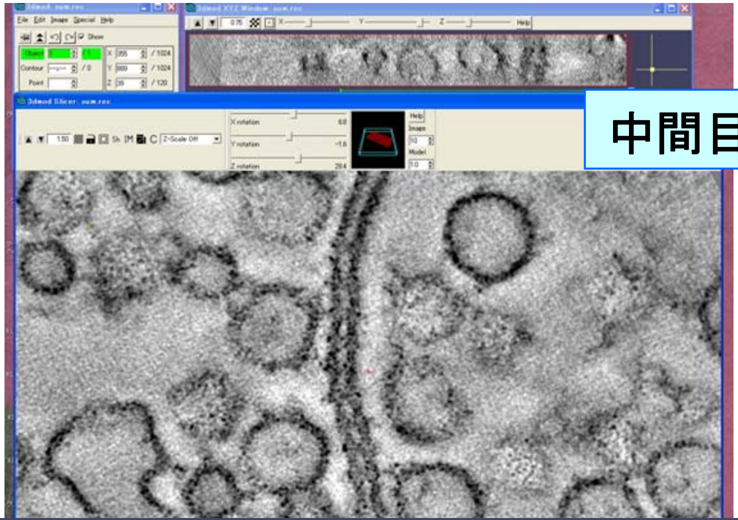


Nature, 458, 597-602 (2009)

事業原簿　17ページ

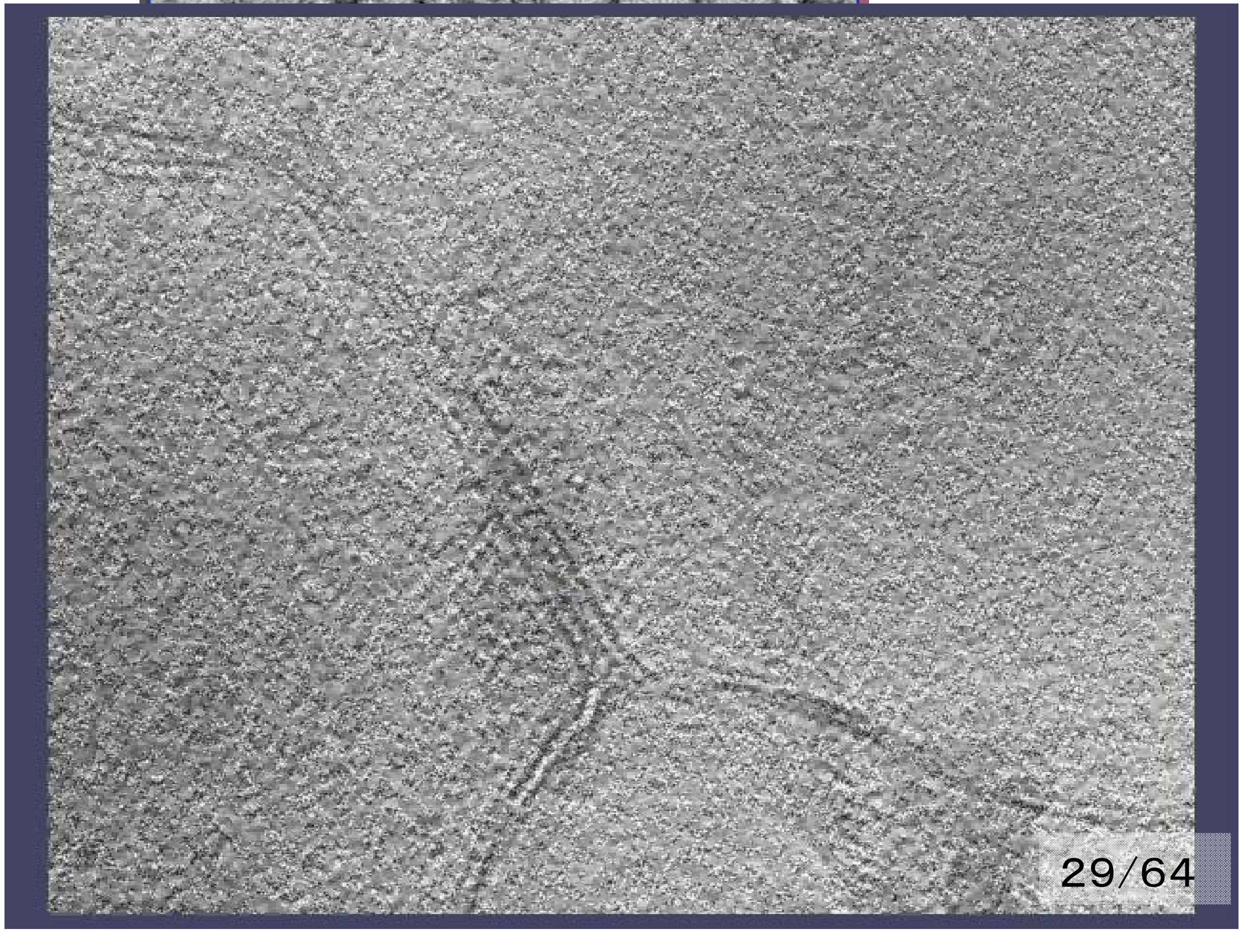
第7世代の極低温電子顕微鏡

細胞の自然な状態での膜タンパク質及びその複合体の3次元構造を解析する技術（電子線トモグラフィー等）を開発

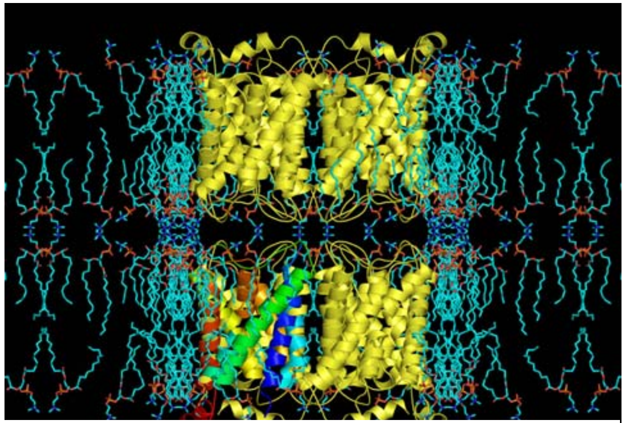


中間目標2）その1達成

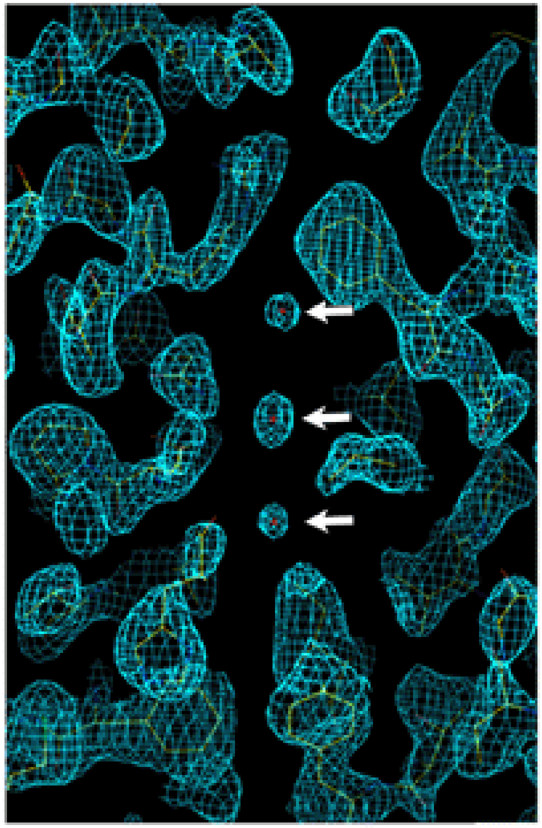
トモグラフィーによる立体構造のスライス像



1.9Å分解能での構造解析

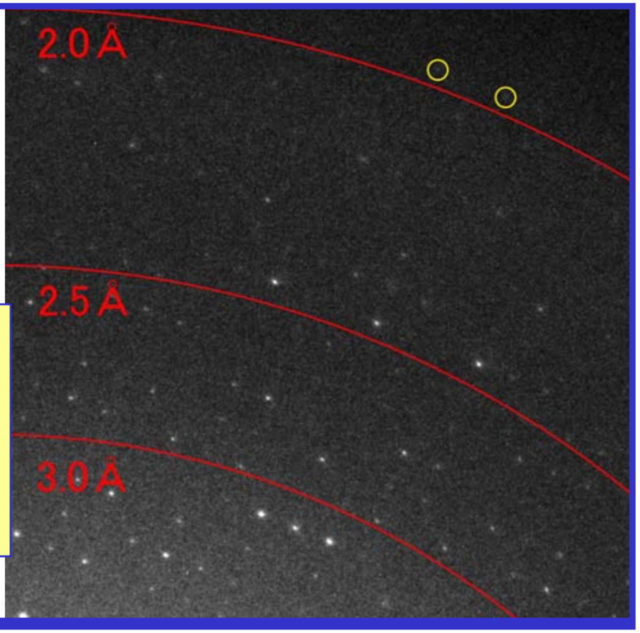


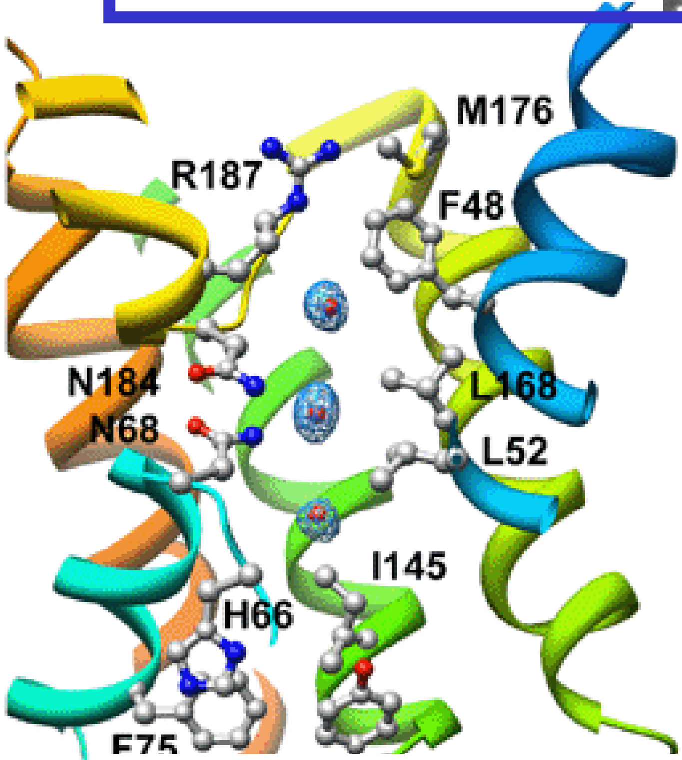
全ての脂質分子可視化



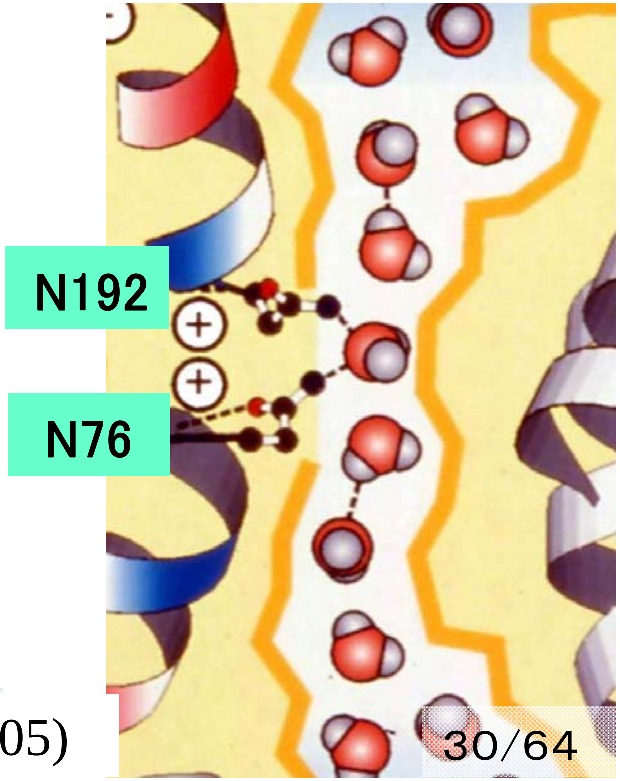
2次元結晶化された膜タンパク質及びその複合体を2Åより高い分解能で3次元構造を解析

AQP0のように特別良い結晶でないAQP4の2Åより高い分解能のデータ収集と解析を可能に！





Nature, 438, 633-638 (2005)



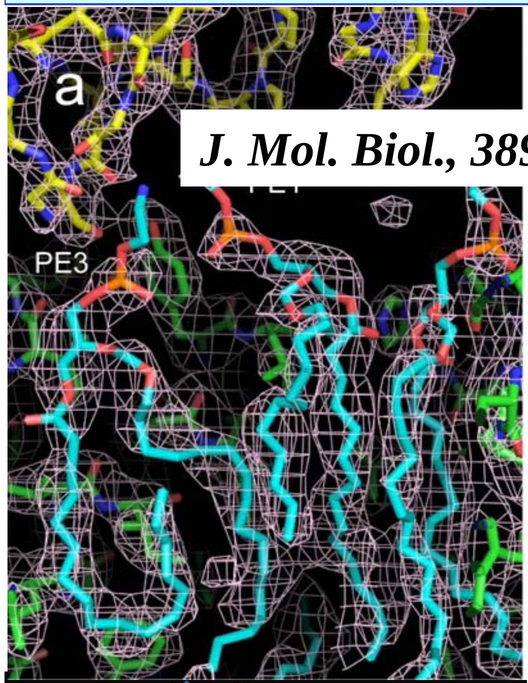
AQP4の水分子

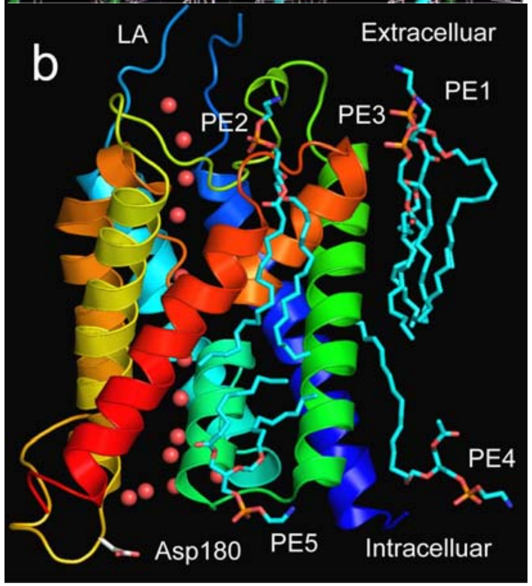
電子線結晶学
2.8Å分解能

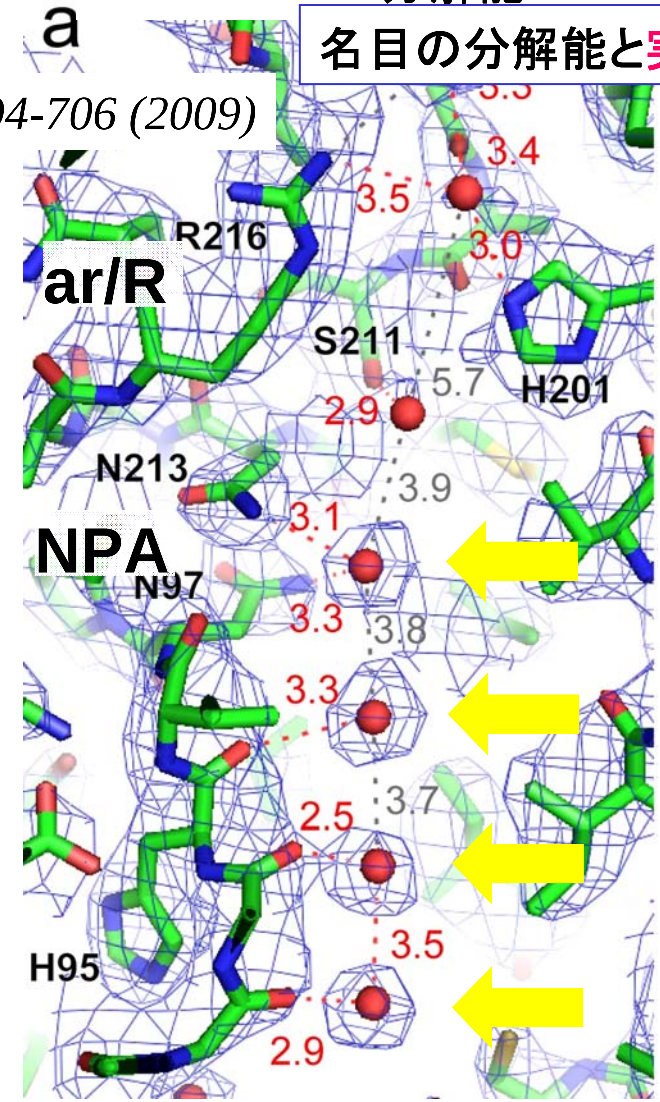
X線結晶学
1.8Å分解能

名目の分解能と実質の解像度

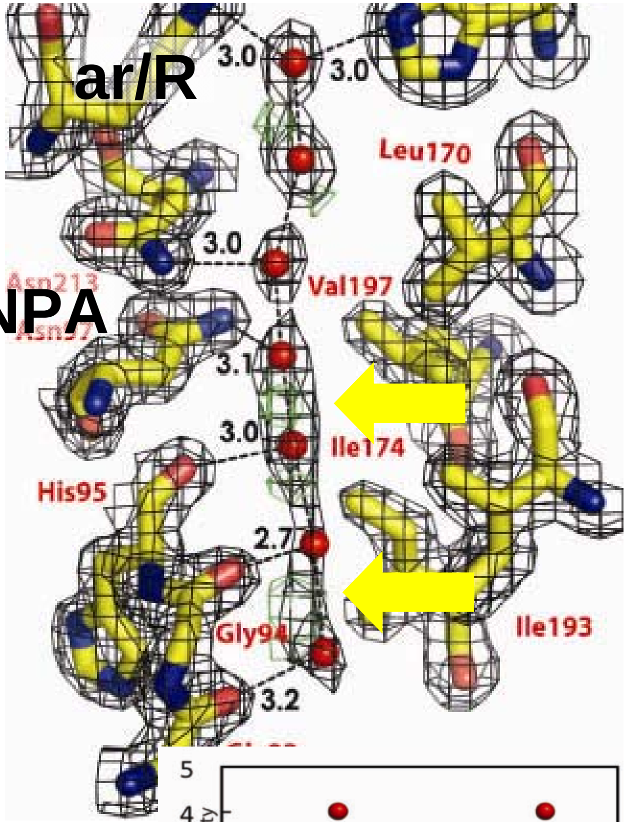
J. Mol. Biol., 389, 694-706 (2009)

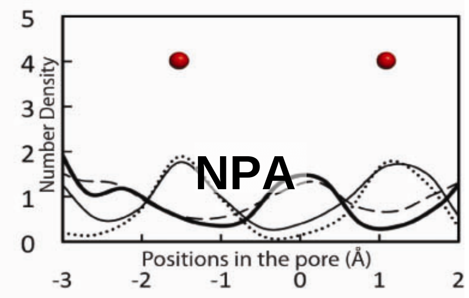






JD Ho et al., ***PNAS* 106,** *7437-42 (2009)*



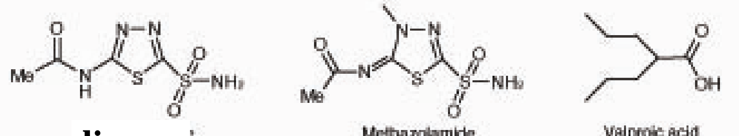


脂質分子や水分子の構造を解析できる
2Åより高い分解能で3次元構造を解析
する技術開発に成功

中間目標2)達成

AQP4の水透過阻害剤AZA

inhibitor of sulfonamide carbonic anhydrase

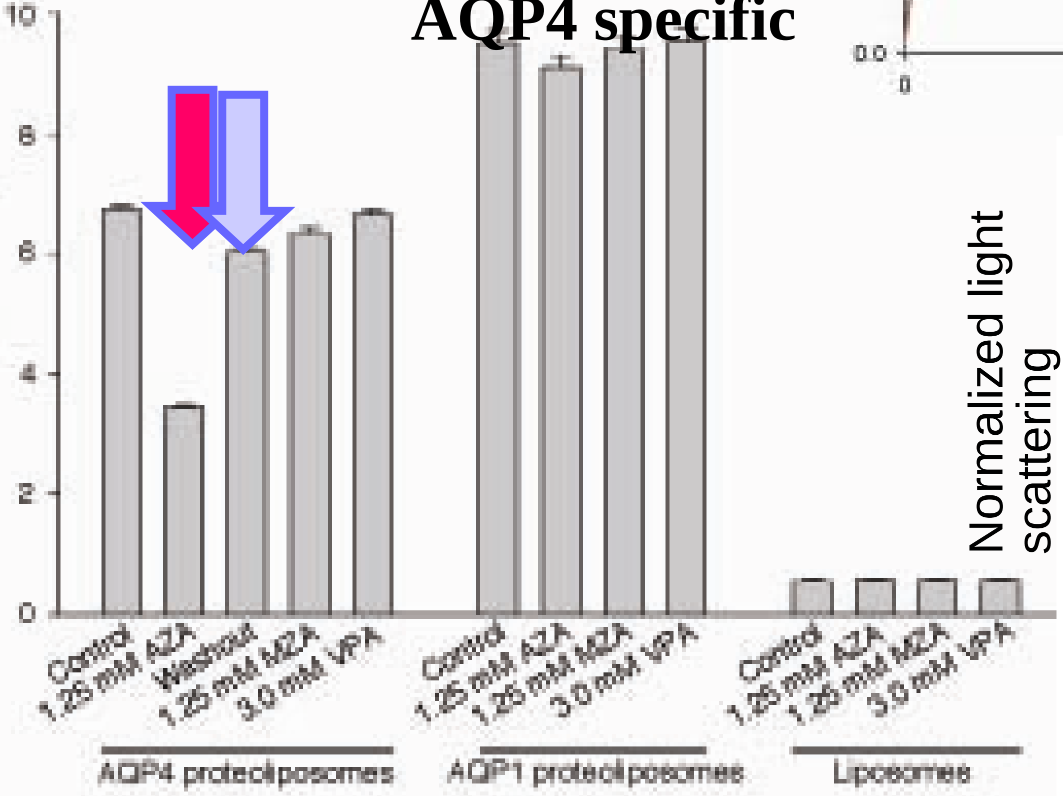


diamox

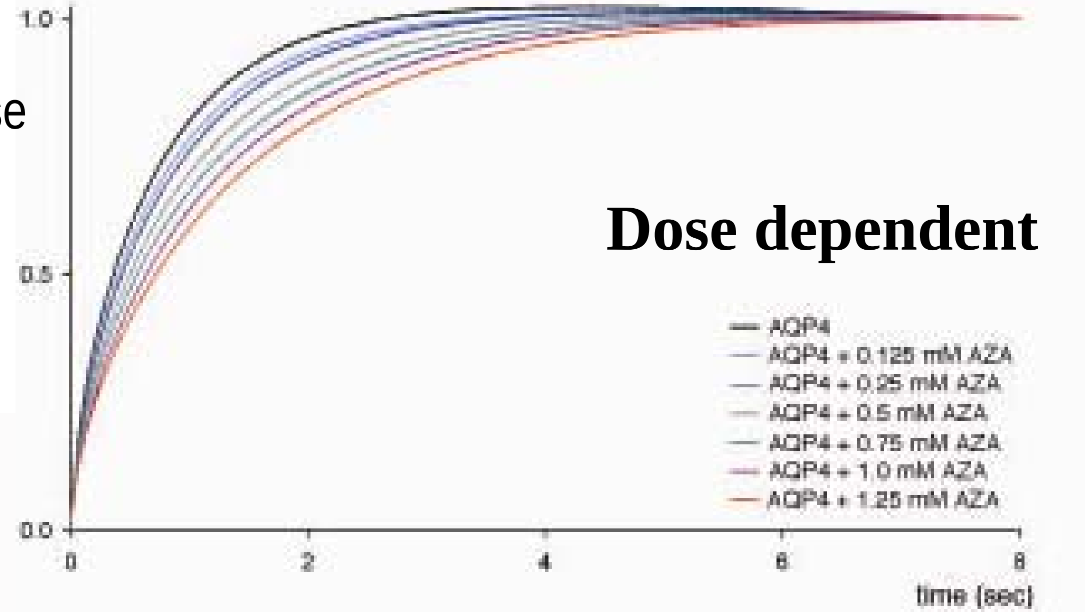
Reversible inhibition

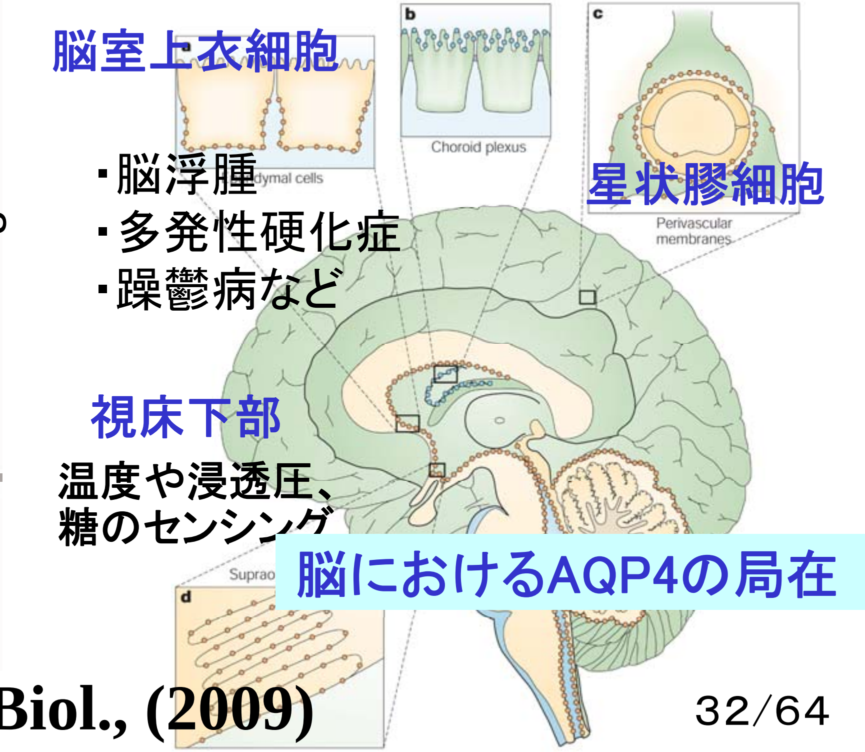
No inhibition

AQP4 specific



Dose dependent





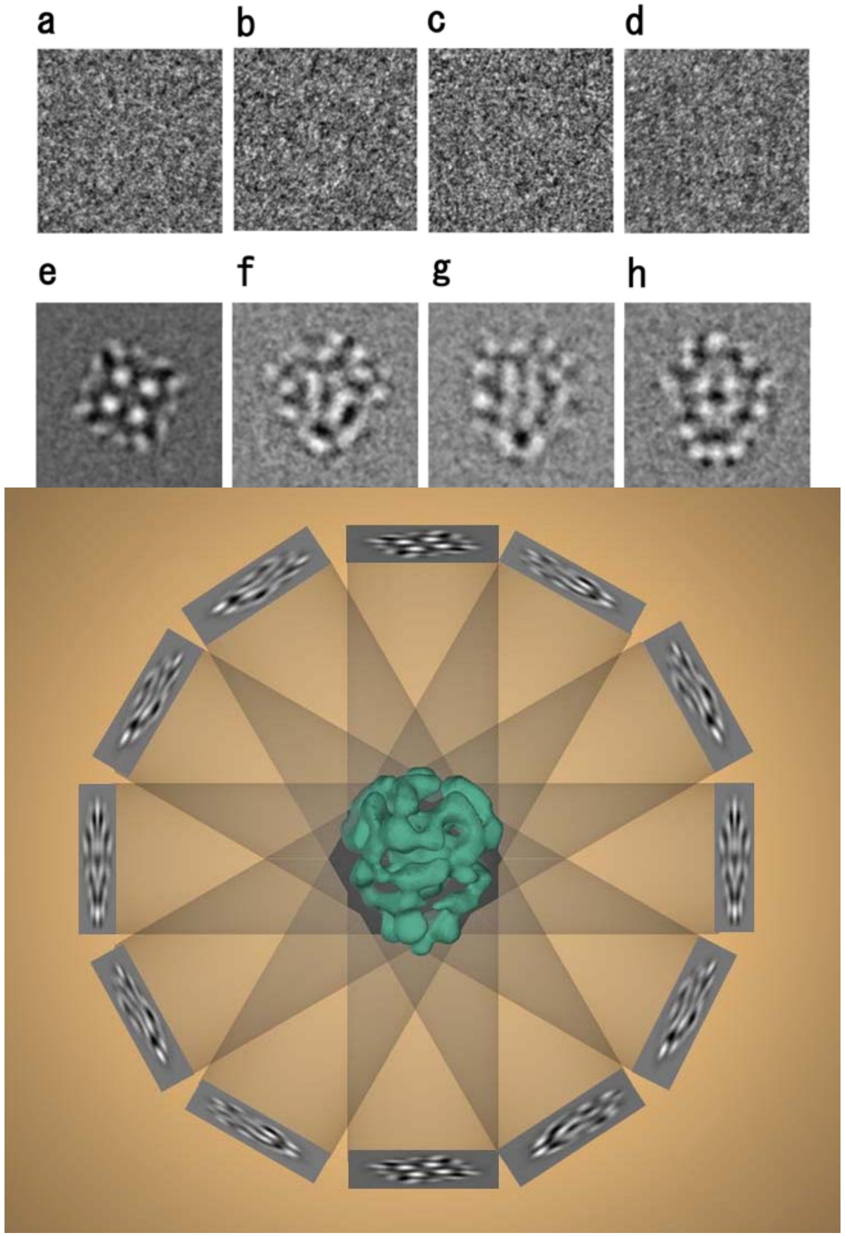
・脳浮腫
・多発性硬化症
・躁鬱病など

温度や浸透圧、糖のセンシング

脳におけるAQP4の局在

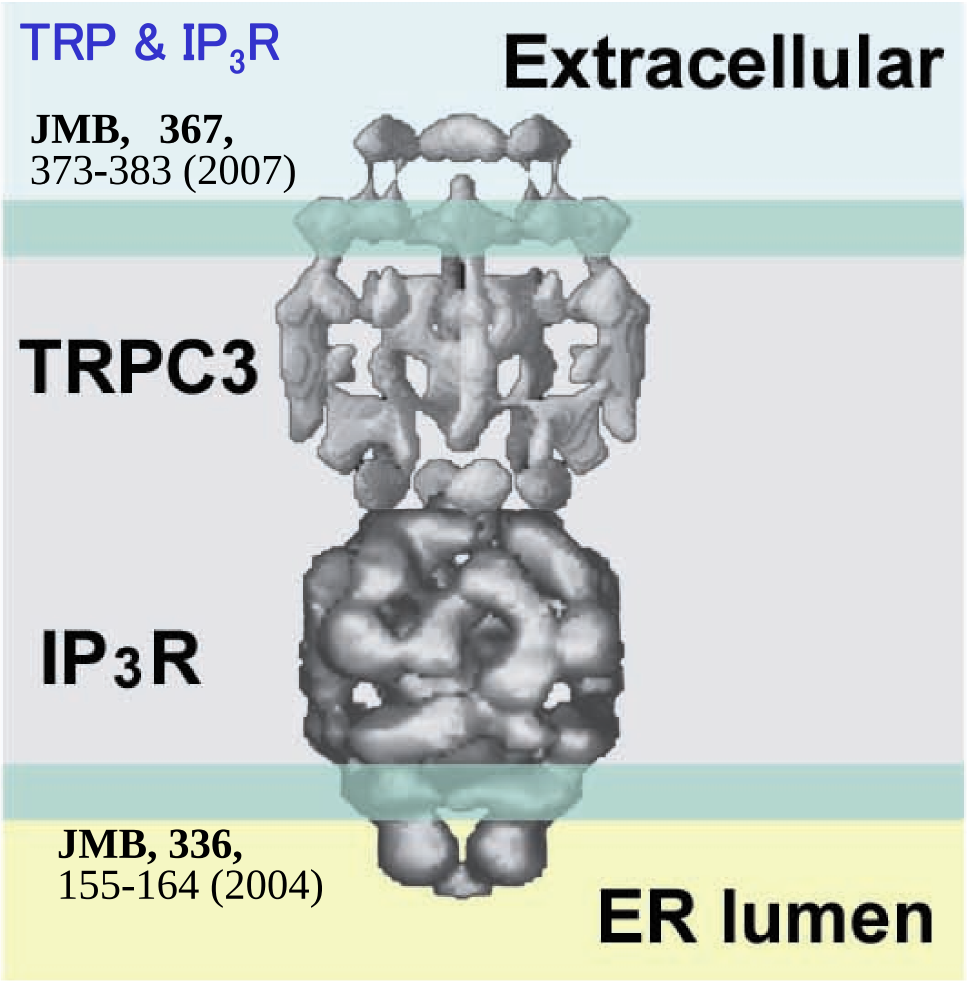
J Struc.Biol., (2009)

単粒子解析法



結晶化できない膜タンパク質の立体構造を10Åより高い分解能で解析する技術（単粒子解析等）を開発

中間目標3）達成

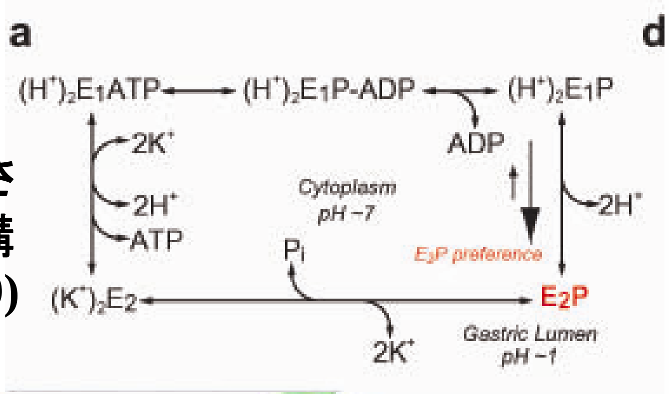


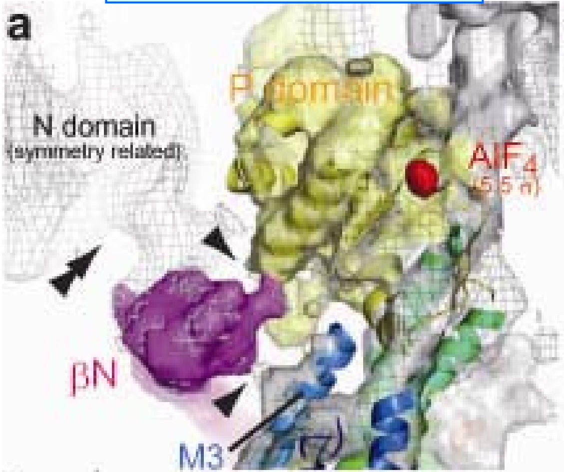
$P2X_2$ Structure, 17, 266-275 (2009)

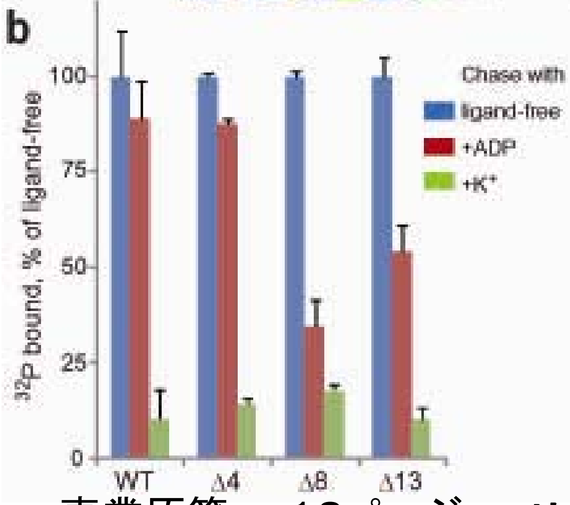
HK-ATPaseの構造

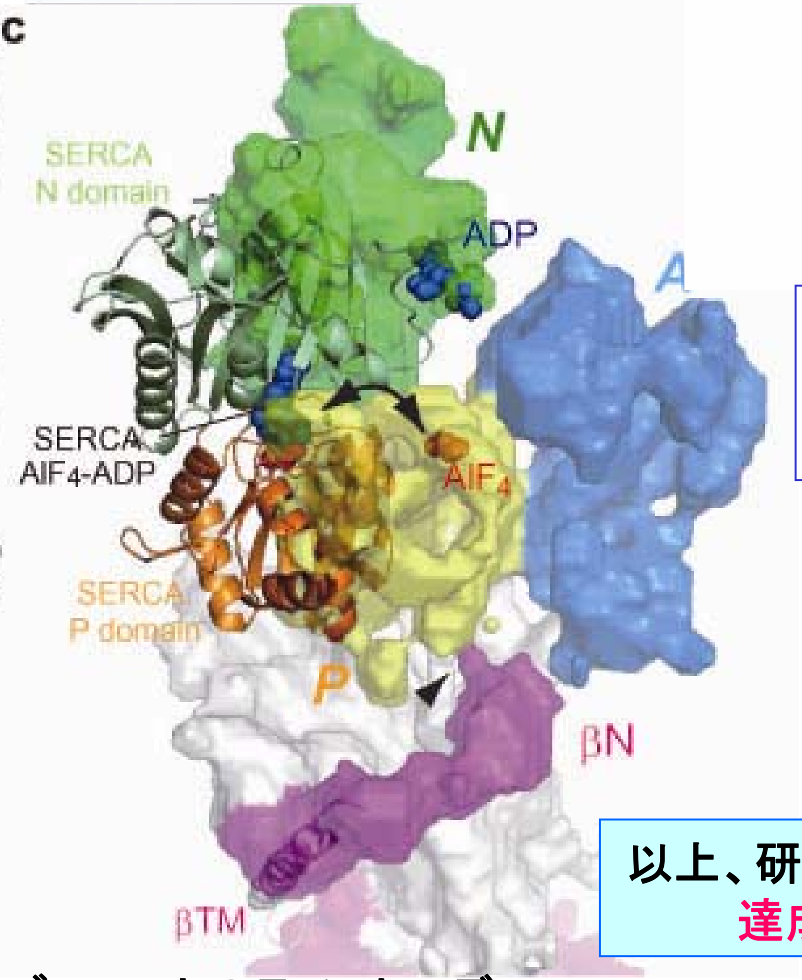
H+の濃度を100万倍の濃さにまでポンピングできる機構
EMBO J, 28, 1637-43 (2009)

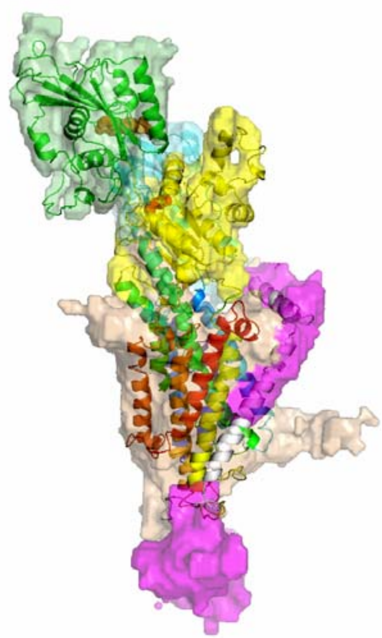
中間目標4）達成











ヌクレオソームや電子伝達系の複合体のX線構造解析にも成功

GOAL
創薬加速に向けた膜タンパク質構造解析基盤技術を開発

以上、研究開発項目①の中間目標**達成**されたと考えている

事業原簿　18ページ　βサブユニットのラチェトモデル

研究開発項目① 中間目標達成まとめ

中間目標

1）細胞膜内での生体内に近い状態での膜タンパク質の立体構造を解析するため、以下の技術を開発する。また、これらの技術と既存技術を活用し、ヒト由来（発現系）膜タンパク質及びその複合体の構造を最低1個解析する。

2）2次元結晶化された膜タンパク質及びその複合体を水や脂質分子が観察できる2Åより高い分解能で3次元構造を解析する技術、細胞の自然な状態での膜タンパク質及びその複合体の3次元構造を解析する技術（電子線トモグラフィー等）を開発する。

3）結晶化できない膜タンパク質の立体構造を10Åより高い分解能で解析する技術（単粒子解析等）を開発する。

4）2）、3）を組み合わせることにより自然な状態の膜タンパク質及びその複合体の構造を解析する技術を開発する。

達成度

達成度	内容
○	・ヒト由来（発現系）膜タンパク質Cx26の構造を解析。
○	・1.9Å分解能での解析技術を開発 ・電子線トモグラフィー法を開発
○	・10Å分解能での単粒子解析技術を開発
○	より自然な状態の膜タンパク質及びその複合体構造解析技術を開発

研究開発項目①の中間目標は達成された。

研究開発項目②

NMRを用いて膜タンパク質・リガンド相互作用を行うために必要なこと

- 適切なNMR試料調製法の開発
  - 多くの安定同位体可能な発現系が準備されている。
  - NMR測定のための溶液条件の最適化を迅速に行う。
  - 膜タンパク質を長時間安定化させる。
- 適切なNMR測定法の開発
  - 低分子リガンドとの相互作用解析を精密に行う。
  - 複合体モデル作成に必要な構造情報を得る（研究開発項目③との共同研究）。
  - 不均一かつ高分子量複合体系のNMR測定ができる。

事業原簿　49ページ

研究開発項目②の中間目標

研究開発項目

1. 安定同位体標識タンパク質調製系の確立
2. タンパク質複合体モデル構築を目指したNMR測定法の開発
3. リガンドベース創薬デザインのためのNMR 相互作用解析手法の開発・高度化
4. 細胞膜複合体相互作用解析のためのNMR 試料調製法の開発
5. 細胞膜複合体相互作用解析のためのNMR 解析法の開発

中間目標

生体内に近い状態での膜タンパク質及びその複合体とリガンド分子の相互作用を解析するため、以下の技術を開発する。また、これらの新たに開発された技術および従来開発してきた技術を併用して、2 個以上の膜タンパク質等創薬標的タンパク質を解析する。

a）解離定数がmM～μMと結合力が弱いリガンド分子の標的分子結合部位を同定する解析技術の開発を行う。

b）固体と液体が混合した不均一な系における膜タンパク質及びその複合体とリガンド分子の相互作用解析技術について従来法に比べ3倍に高感度化する。

安定同位体標識タンパク質調製系の確立

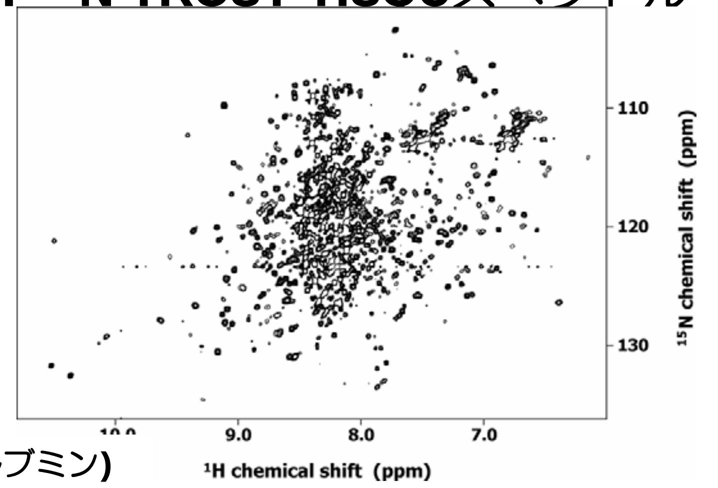
NMR解析を目指した新規酵母発現系の開発

- 背景
  - 汎用されている大腸菌発現系では翻訳後修飾および正しいダイサルファイド結合形成の観点で不十分
  - 真核細胞（酵母、昆虫細胞など）では安定同位体標識や発現量の観点で不十分

- 結果
  - *K. lactis* を用い、大腸菌と同程度の発現量および安定同位体標識コストの酵母発現系を構築

完全重水素化を施した**HAS**の

^{1}H-^{15}N TROSY-HSQCスペクトル



HSA (ヒト血清アルブミン**)**

Mol. mass. = 66,500 Da

S-S 結合 **: 17** 対

安定同位体標識タンパク質調製系の確立

NMR試料の最適溶媒条件の新規スクリーニング法の開発

- 背景
  - NMR 試料調製の一般的な流れ

目的タンパク質の発現・精製

↓

純度、生物活性の確認

↓

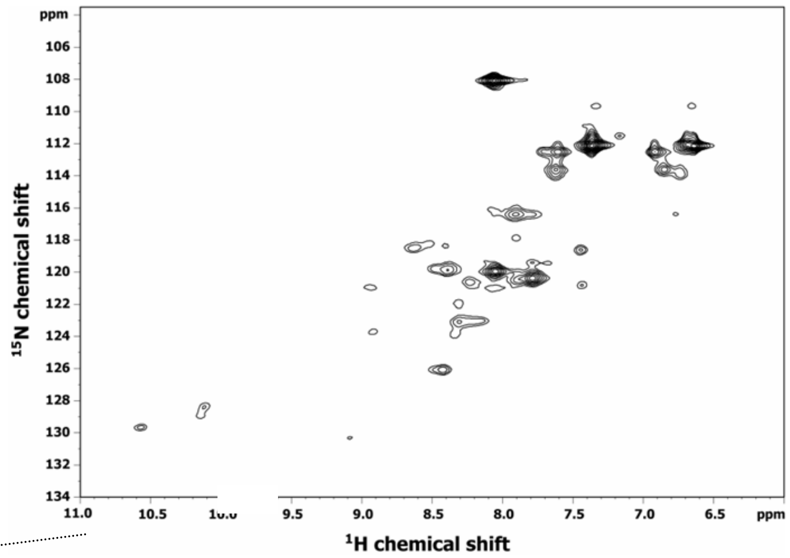
NMR スペクトルの確認

↓

NMRシグナル帰属・
構造解析・相互作用解析

凝集した試料の^{1}H–^{15}N HSQC
スペクトル

線幅が広く、観測シグナル数が少ない。



測定溶液条件(pH, 塩濃度等々)の試行錯誤的な検討に多大な時間と多くの試料が必要となる。

事業原簿　52ページ

安定同位体標識タンパク質調製系の確立

NMR試料の最適溶媒条件の新規スクリーニング法の開発

- 背景
  - NMR 試料調製の一般的な流れ

目的タンパク質の発現・精製

↓

純度、生物活性の確認

↓

NMR スペクトルの確認

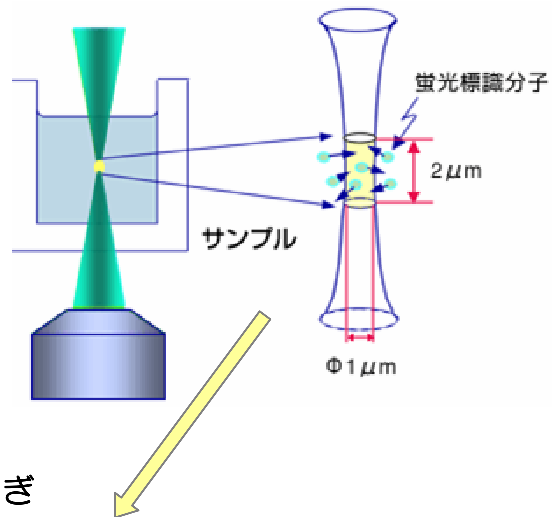
↓

NMRシグナル帰属・
構造解析・相互作用解析

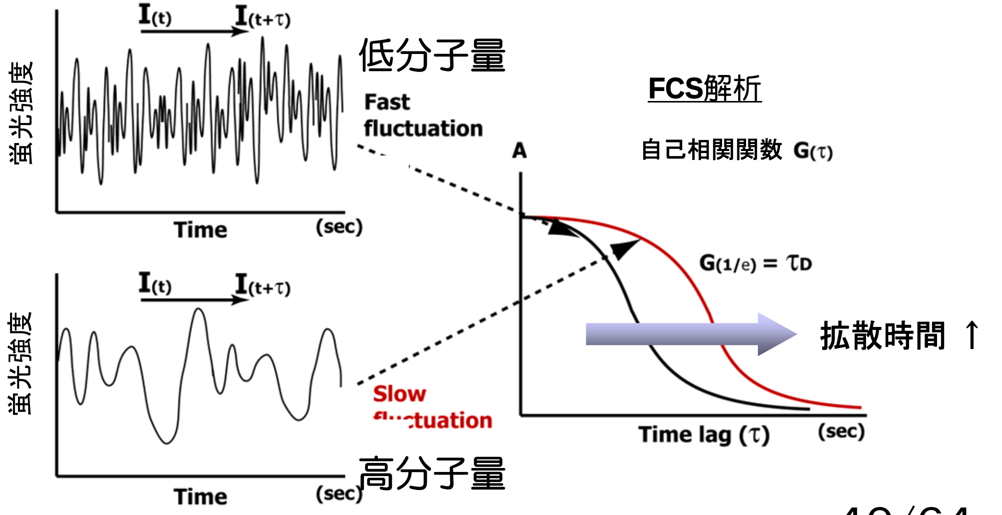
- 方策

一分子蛍光分析法

共焦点光学系
で観察



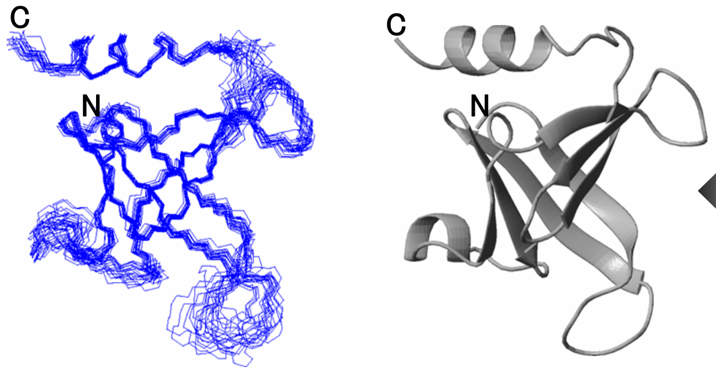
蛍光標識分子のゆらぎ

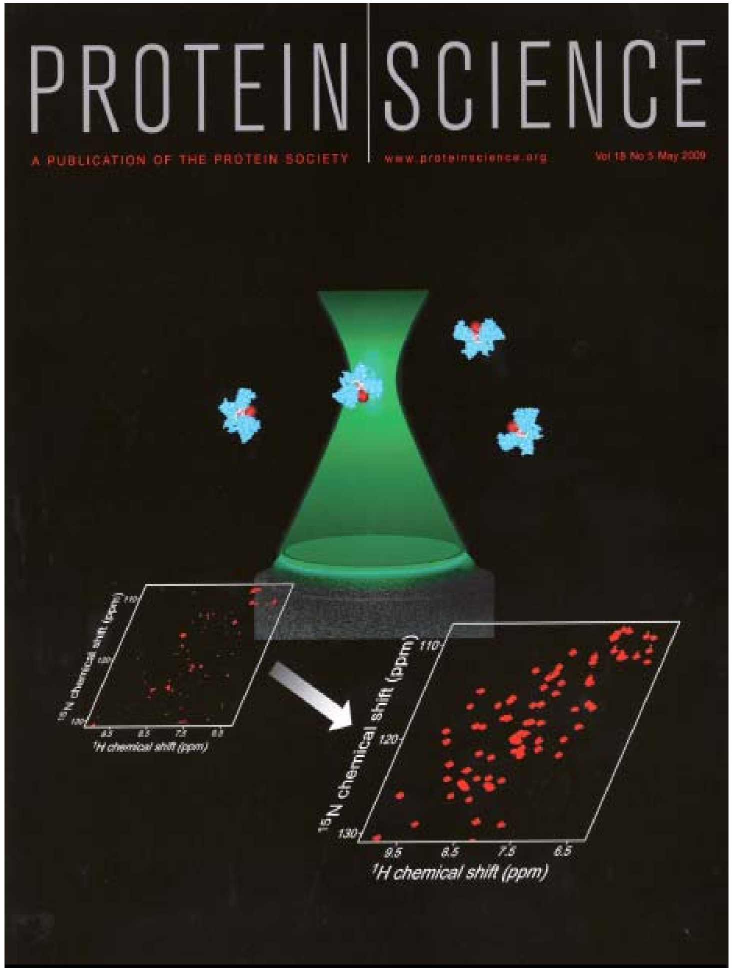


安定同位体標識タンパク質調製系の確立

試料 ： セラミド輸送タンパク質PHドメイン (CERT PH domain) (蛍光標識体 : 非標識体 = 1 nM : 4 mM)

CERT PHドメインの
立体構造決定・相互作用解析へ





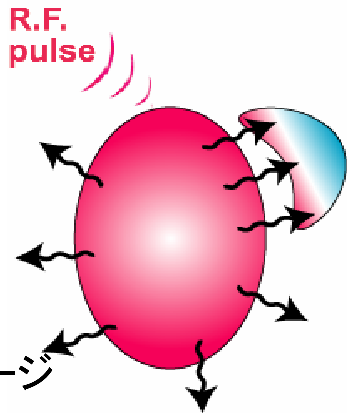
Sugiki et al. *Protein Sci.*, 18, 1115-1120 (2009)

従来15時間かかる条件検討を2時間で達成

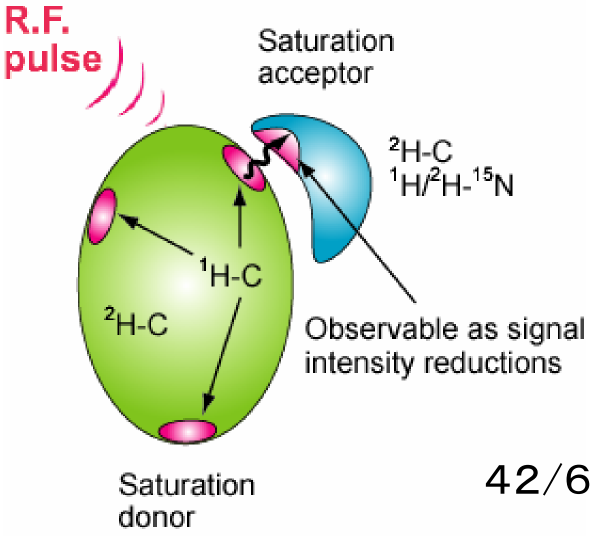
タンパク質複合体モデル構築を目指したNMR測定法の開発

アミノ酸選択的交差飽和(ASCS)法、ならびに、分子動力学的計算法の開発
研究開発項目③中村チームとの共同研究

- 背景
  - 交差飽和法で同定できるのは相互作用している面のみ
  - 複合体モデルを構築するためには受容体・リガンド残基間の距離情報が必要



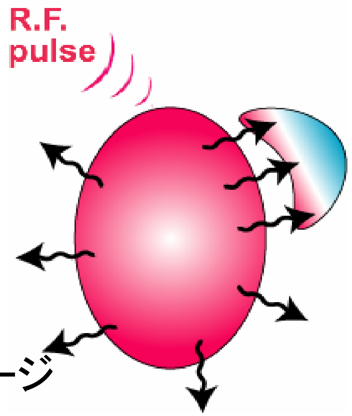
- 方策
  - 複数のアミノ酸選択的標識からの結果を統合することにより、受容体の帰属を行わずに残基間の交差飽和現象を抽出



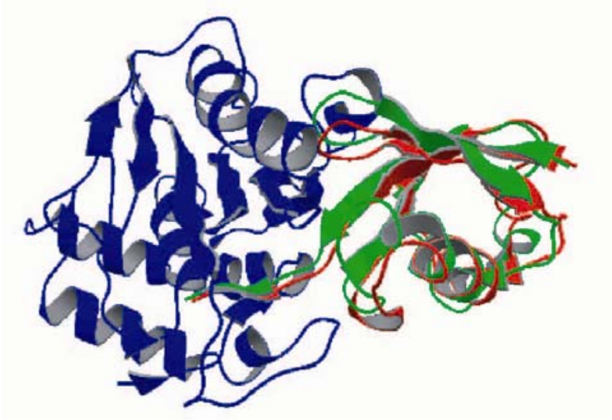
タンパク質複合体モデル構築を目指したNMR測定法の開発

アミノ酸選択的交差飽和(ASCS)法、ならびに、分子動力学的計算法の開発
研究開発項目③中村チームとの共同研究

- 背景
  - 交差飽和法で同定できるのは相互作用している面のみ
  - 複合体モデルを構築するためには受容体・リガンド残基間の距離情報が必要



- 結果
  - ASCS法により残基間距離情報の抽出に成功し、中村Tが開発した計算手法により複合体モデルの作成に成功

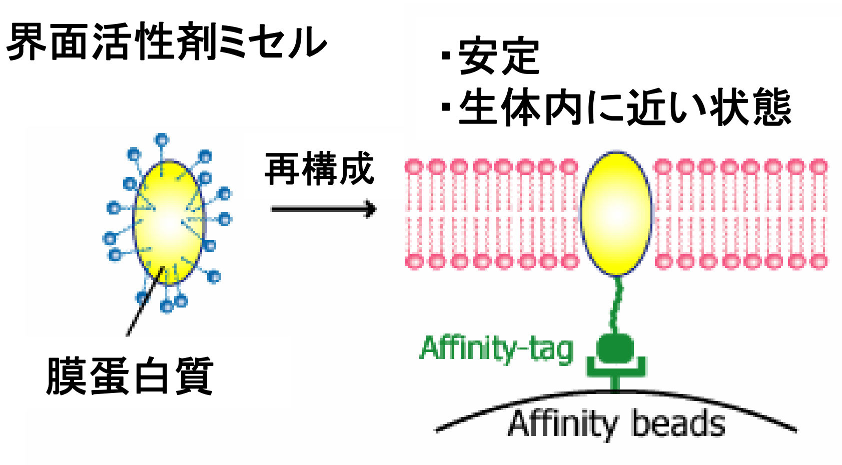


複合体モデルの構造
YUH(青)とUb(緑)で示した複合体の結晶構造に対して、YUH(青)とUb(赤)で示した複合体のモデル構造を重ね合わせた。

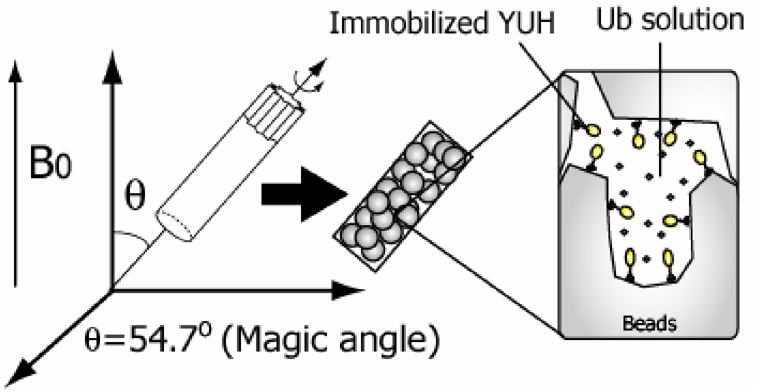
細胞膜複合体相互作用解析のための NMR 解析法開発

- 背景
  - 生体高分子立体情報解析PJで開発したプロテオリポソーム法は膜タンパク質・リガンド相互作用解析に適しているもののスペクトルの分解能の点で不十分であった。

- 方策
  - 固体高分解能NMRで用いられているマジック角回転（MAS)法を導入する。



Yokogawa M *et al.* J. Am. Chem. Soc. (2005)

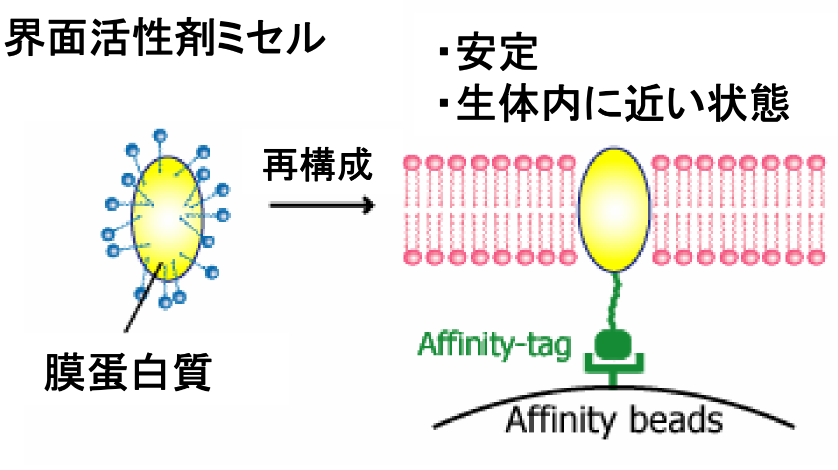


事業原簿　59ページ

細胞膜複合体相互作用解析のための NMR 解析法開発

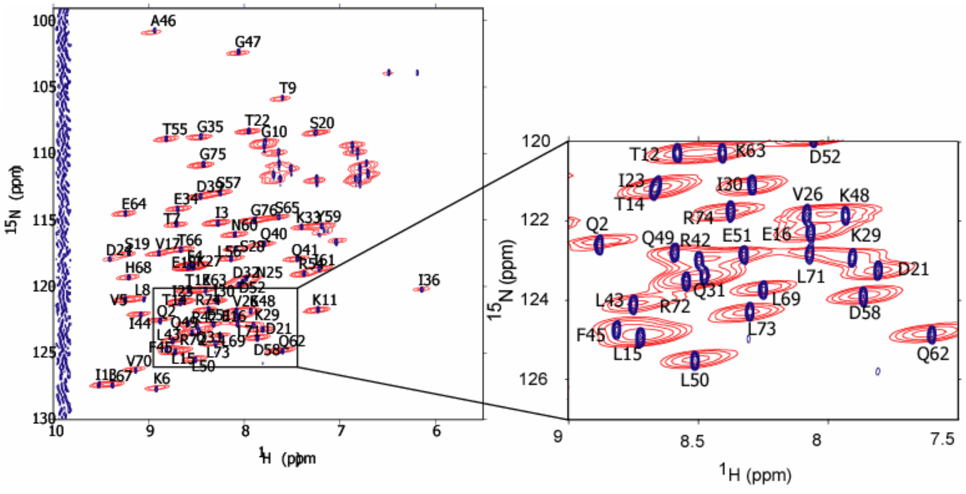
- 背景
  - 生体高分子立体情報解析PJで開発したプロテオリポソーム法は膜タンパク質・リガンド相互作用解析に適しているもののスペクトルの分解能の点で不十分であった。

- 結果
  - 固定化担体、固定化方法スピニング条件等の検討により、MAS条件下でNMR測定が可能となり、感度が6倍向上した。



Yokogawa M *et al.* J. Am. Chem. Soc. (2005)

不均一高分子量資料の感度をx倍向上させた点で中間目標達成



^{1}H-^{15}N HSQC of ubiquitin (76a.a.) mixed with beads

研究開発項目②の成果のまとめ

- 大腸菌と同程度の発現量および安定同位体標識コストでタンパク調製できる酵母発現系を構築した。
- 従来法と比較して7倍の迅速さでNMR溶液条件を最適化する手法を開発した。
- タンパク質複合体モデル作成に役立つNMR測定法を開発した。
- 不均一系膜タンパク質再構成系のスペクトルが従来法と比較して6倍の高感度で測定可能になった。
- 親和性が弱いリガンドと受容体間の距離を正確に見積もることができるNMR測定法を開発した（詳細は午後に説明）。

したがって中間目標は達成されたと考える。

研究開発項目②　中間目標達成まとめ

中間目標

　生体内に近い状態での膜タンパク質及びその複合体とリガンド分子の相互作用を解析するため、以下の技術を開発する。また、これらの新たに開発された技術および従来開発してきた技術を併用して、2 個以上の膜タンパク質等創薬標的タンパク質を解析する。

a) 解離定数がmM～μMと結合力が弱いリガンド分子の標的分子結合部位を同定する解析技術の開発を行う。

b) 固体と液体が混合した不均一な系における膜タンパク質及びその複合体とリガンド分子の相互作用解析技術について従来法に比べ3倍に高感度化する。

達成度

達成度	内容
○	・ 6個の膜タンパク質等創薬標的タンパク質を解析（詳細は午後に説明）。
○	・タンパク質複合体モデル作成に役立つNMR測定法を開発。 ・親和性が弱いリガンドと受容体間の距離を正確に見積もることができるNMR測定法を開発（詳細は午後に説明）。
○	・不均一系膜タンパク質再構成系のスペクトルが従来法と比較して6倍の高感度に。

研究開発項目②の中間目標は達成された。

「創薬加速に向けたタンパク質構造解析基盤技術開発」

研究開発項目③

「創薬加速のための計算科学研究の成果」

中村春木

大阪大学蛋白質研究所／
（独）産業技術総合研究所・ﾊﾞｲｵﾒﾃﾞｨｼﾅﾙ情報研究センター

BIRC集中研，阪大蛋白研，アステラス製薬，塩野義製薬，
情報数理研，東レ，日立ソフト，富士通，三井化学アグロ

研究開発項目③ 達成目標

中間目標

高精度のインシリコスクリーニングを実現するため、以下の技術を開発する。さらに①②の技術開発との連携により、産業上有用な化合物を5個以上取得する。

1）タンパク質の動的性質を正しく評価し、タンパク質受容体への基質結合能を高い精度で計算できる新しい計算科学手法を開発し、インシリコスクリーニングの効率を従来法に比べ5倍程に上げる。

2）タンパク質と化合物とのドッキング計算手法の精度を高め、ターゲット選択性能を従来法に比べ5倍程度上げる。

3）タンパク質間相互作用を阻害・制御する低分子化合物の選択・設計の技術開発を行う。

最終目標

高精度のインシリコスクリーニングを実現するため、以下の技術を開発する。さらに①②の技術と連携により、産業上有用な化合物を10個以上取得する。

1）タンパク質の動的性質を正しく評価し、タンパク質受容体への基質結合能を高い精度で計算できる新しい計算科学手法を確立し、インシリコスクリーニングの効率を従来法に比べ10倍程にあげる。

2）タンパク質と化合物とのドッキング計算手法の精度を高め、ターゲット選択性能を従来法に比べ10倍程度上げる。

3）タンパク質間相互作用および超分子複合体の構造情報に基づく構造生理学、構造薬理学のアプローチにより、タンパク質間相互作用を阻害・制御する低分子化合物を選択・設計するため、医薬品化が困難な生理活性ペプチドから医薬品となりやすい非ペプチド性の化合物（低分子化合物等）を得る一般的手法を開発し、その技術の有効性を確認するため、最低1つの実証を行う。

事業原簿　5ページ

（1）in silicoドッキング計算の高精度化: タンパク質および低分子リガンドの動的構造を考慮した結合エネルギー算出法の開発

(i) MTS法の改良：ssDSM (Sequence similarity Direct Score Matrix)法の開発と適用

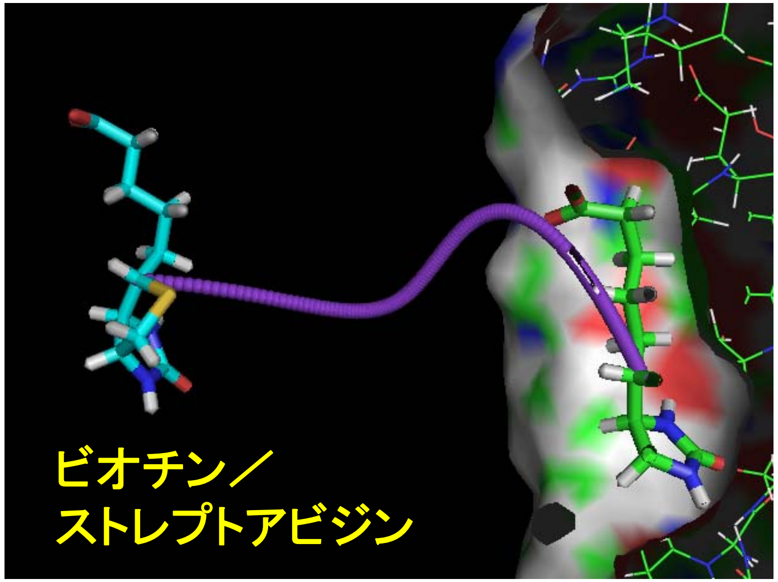
(ii)膜蛋白質の分子動力学計算とElastic Network Modelによる動的性質の抽出

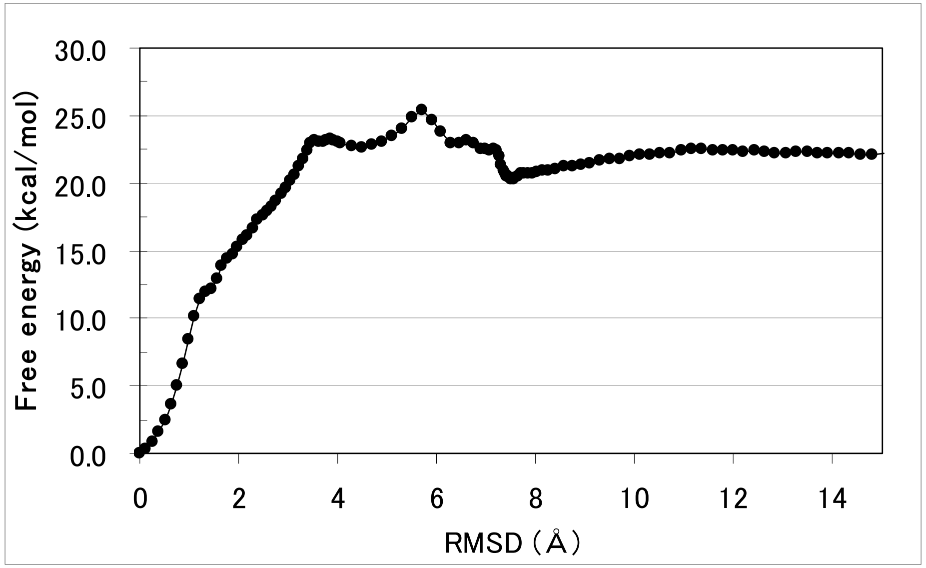
(iii)新しい結合自由エネルギー計算手法：Smooth Reaction Path Generation(SRPG)法

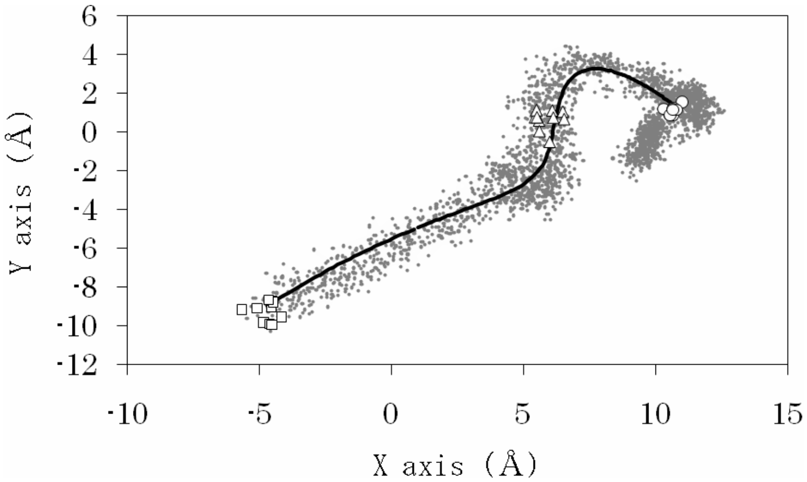
(iv)McMD計算法による蛋白質－阻害剤の結合自由エネルギー計算

(v)McMD計算法によるCoupled folding and binding現象の解析

(ii)新しい結合自由エネルギー計算手法：Smooth Reaction Path Generation(SRPG)法　(BIRC集中研）







(Fukunishi et al. (2009)
J. Chem. Inf. Model. , in press)

	SRPG法	実験値
ΔG (kcal/mol)	−16.5	−18.3

以前に開発したfilling potential法によってリガンドを複合体状態から離反させていく。
ルジャンドル多項式で3次元のパスをスムーズにつなぎ、Thermodynamic Integration法でPotential of Mean Force (PMF)を高精度で得て、結合自由エネルギーを算出する。

（2）構造生理学アプローチによる蛋白質間相互作用解析

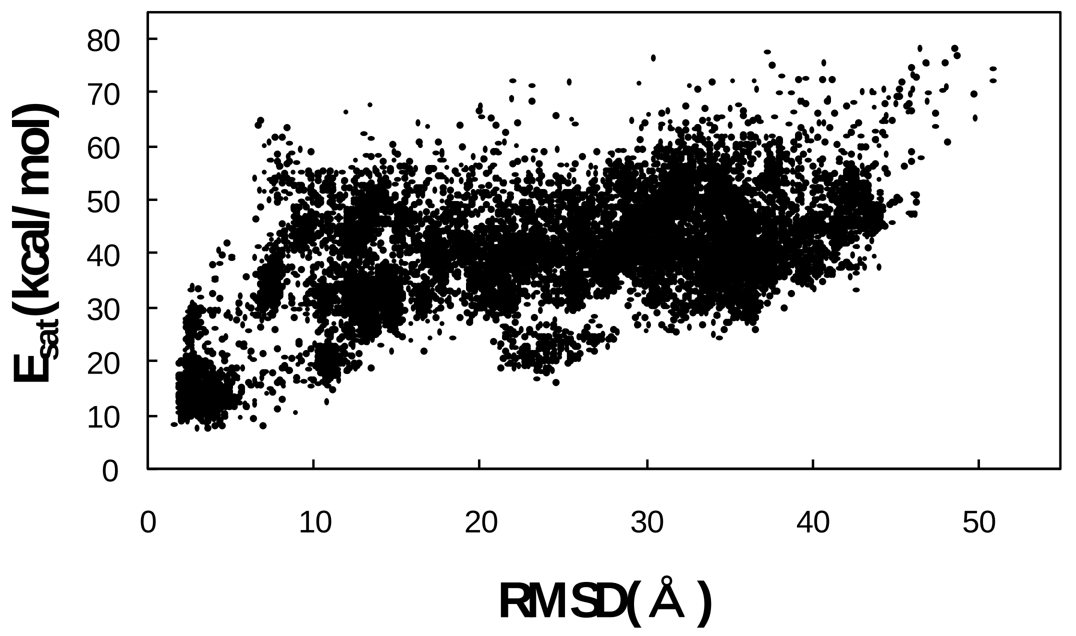
(i)タンパク質複合体構造予測法の開発 （BIRC集中研、阪大分室）

(ii)アミノ酸選択的交差飽和法の実験データを用いたタンパク質複合体構造の構築 （BIRC集中研，嶋田チームとの共同研究）

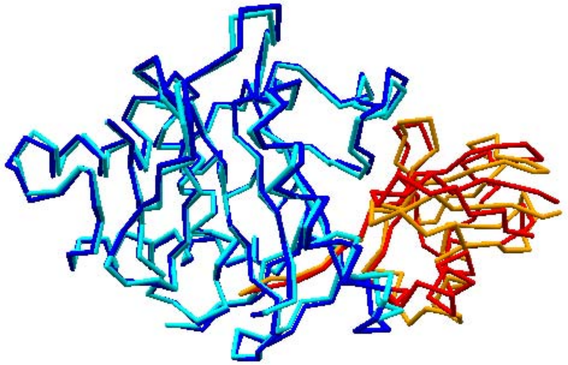
1）タンパク質間相互作用部位 ←NMRによるアミノ酸選択的交差緩和（ASCS）法

2）候補構造の発生と評価 ←タンパク質分子表面形状の相補性を満たす構造探索

$$E_{sat} = \frac{1}{2} W_{sat} \sum_{\text{all exp.}} \sum_{\substack{\text{acceptor} \\ \text{residues}}} (\eta_{calc} - \eta_{exp.})^2$$



Ubiquitin(Ub)とYUHの複合体モデル構造



Esatが最小の構造
(Esat=7.88 kcal/mol,
RMSD=3.05Å)

(iii)ペプチドと同様の結合性を有する非ペプチド性化合物を探索・設計する新しい手法の開発（BIRC集中研、塩野義製薬分室）

蛋白質リガンドや生理活性ペプチド
→　非ペプチド性低分子化合物への展開

(a) 新しい構造重ね合わせ法（MD-MVO法）の開発

→　最適なオーバーラップを探索

(b) Structure-based drug screening

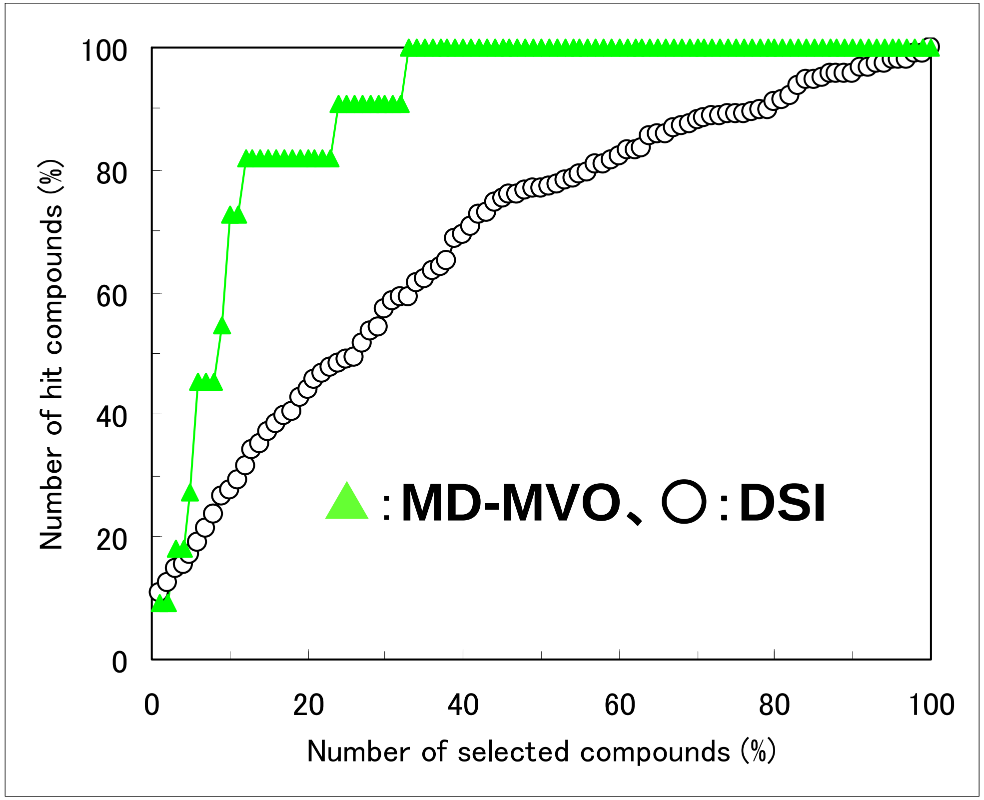
→　ダイナミックな構造モデルの利用

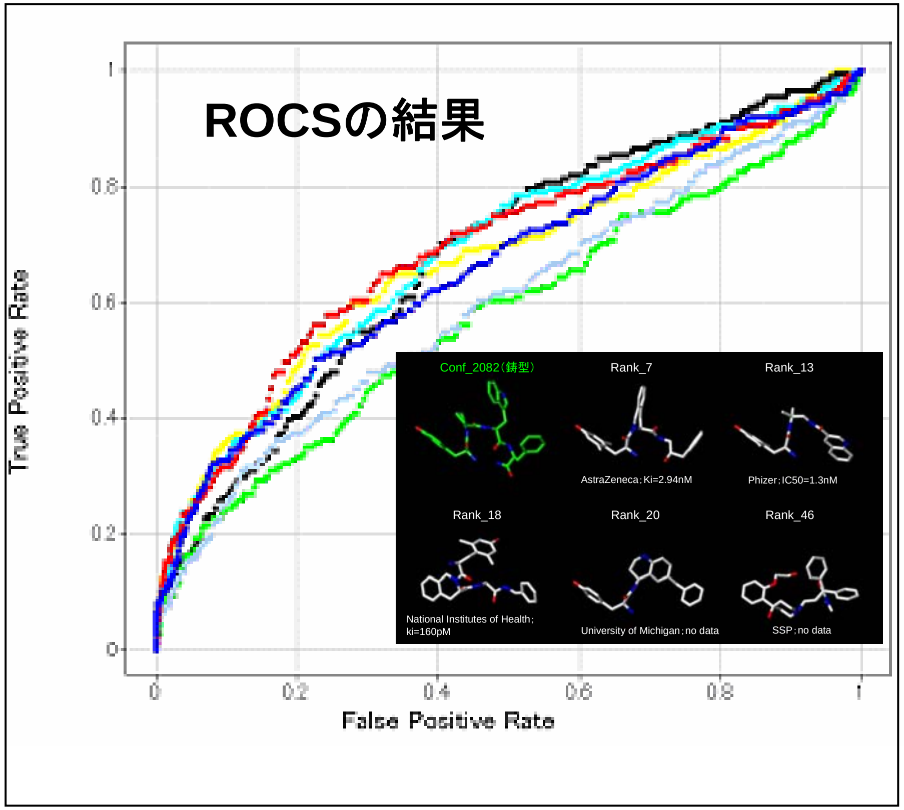
(c) Ligand-based drug screening
ペプチド性リガンドの多様な構造

→　可能性の高い安定配座を探索

(a) MD-MVO (Molecular Dynamics-Maximum Volume Overlap) 法 (BIRC集中研）

非ペプチド性μオピオイドのエンドモルフィン（4残基のペプチド）からの探索





MD-MVO法は、代表的な類似化合物探索ソフトROCSより有意に高いヒット率を示し、ペプチドリガンドからの低分子探索が可能なことを示した。

	MD - MVO		ROCS	
	AUC	hit ratio	AUC	hit ratio
Average	81.9	28.8	61.5	23.9

(AUC: Area Under the DB enrichment Curve)

Fukunishi & Nakamura (2008) J. Mol. Graph. Model. 27, 628-636.

事業原簿　101ページ

（3）創薬開発への応用促進に向けた技術開発

LigandBox:化合物データベース
蛋白質データベース

tplgene/tplgeneL :分子（蛋白質,低分子）の準備

myPresto

cosgene :構造探索エンジン

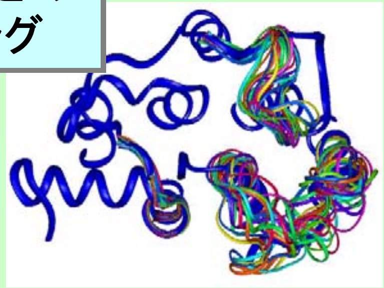
ツール

MTS/DSI :スクリーニング

sievgene :ラフなドッキング

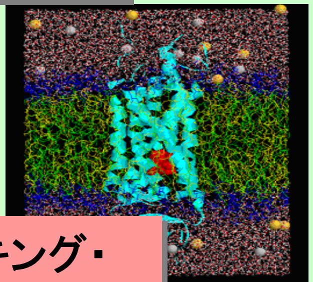
構造探索

蛋白質などのモデリング



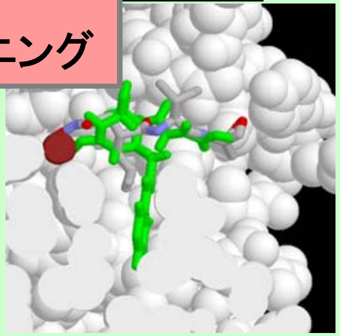
膜蛋白質の計算

長時間シミュレーション



情報解析

薬物ドッキング・薬物スクリーニング



tplgene / tplgeneL	トポロジー生成エンジン（蛋白質、低分子）
sievgene	ラフスクリーニングのためのドッキングエンジン
cosgene	MD計算による構造探索エンジン
各種ツール	*cosgene* の計算結果の解析ツール、etc.

【プログラム公開】*myPresto*（日本語ページ）　ダウンロード数：396 件
（2008年3月より一般公開）（英語ページ）　ダウンロード数：69 件

（3）創薬開発への応用促進に向けた技術開発

(i)分子シミュレーション高速化技術の開発 （情報数理研分室）

→ グラフィックボードの利用によって、約7.8倍オリジナル（CPU）よりも高速化する事ができた。

(ii)化合物データベースの構築と標準化・高度化 （BIRC集中研）

→ LigandBoxをさらに拡充し、1350万化合物（光学異性体あり）をNamiki および PubChemから作成した。

(iii)創薬の為の水溶解度予測 （アステラス製薬分室、BIRC集中研）

→ 薬物の水への溶解度を、従来の分子記述詞に加えて物理化学的性質を導入することにより、従来の予測法よりも有意に良い予測が可能となった。

(iv) hERGチャネル阻害剤予測法の開発 （東レ分室）

→ hERGチャネルのホモロジー・モデルに基づくCOMBINE法により、従来法に比べ、化合物の阻害活性予測の性能を7.9倍上げることができた。

(v)これまでに開発したドッキング法によるヒット化合物の取得 （BIRC集中研、塩野義製薬分室、三井化学アグロ分室、アステラス製薬分室）

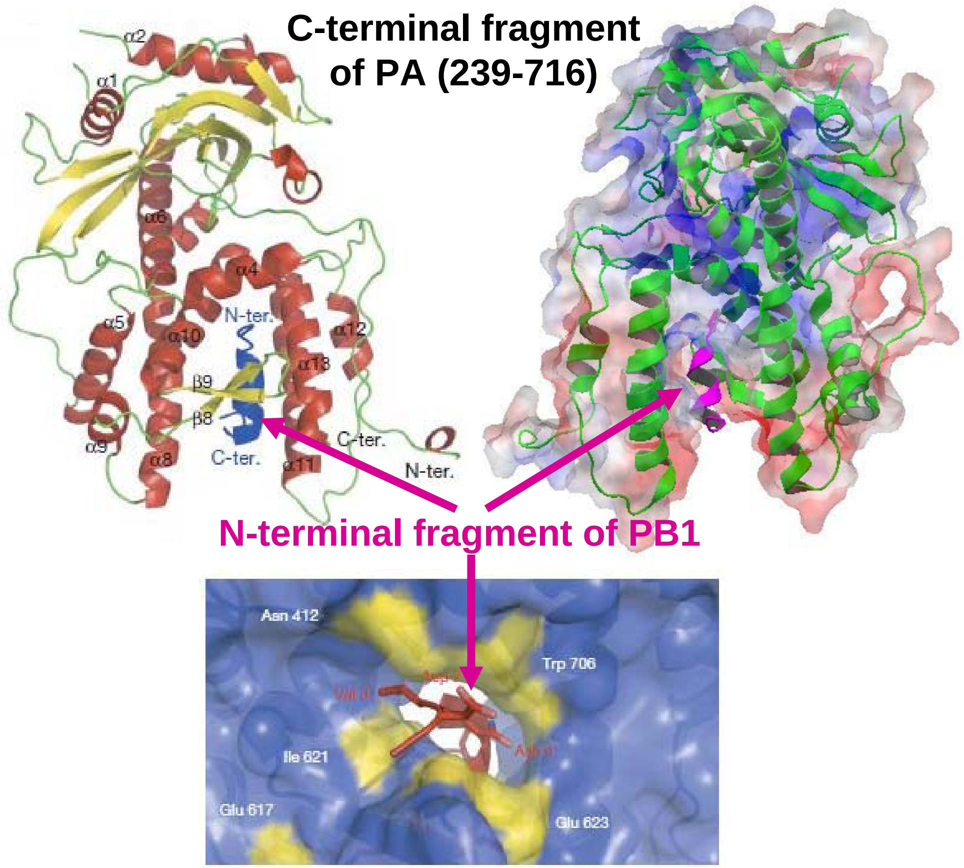
産業上有用な化合物の取得

(a) 塩野義製薬、三井アグリにおいて70を超えるヒット化合物を取得。うち、20個程の化合物が、構造上、新規性が高く産業上有用と考えられる。

(b) 横浜市大との共同研究でインフルエンザウイルスRNAポリメラーゼPA-PB1複合体の阻害剤として3化合物を発見した。

(c) GPCRの新たなヒット化合物探索において、上位1%の選択的ヒット率は66%で、GOLDの3.3%に比べ 20倍。国際的な業界標準ソフトに対する優位性を確認。

インフルエンザ・ウィルスRNAポリメラーゼ



(Obayashi et al. (2008) *Nature*, 454, 1127-1131)

研究開発項目③　中間目標達成まとめ

中間目標

高精度のインシリコスクリーニングを実現するため、以下の技術を開発する。さらに①②の技術開発との連携により、産業上有用な化合物を5個以上取得する。

1)タンパク質の動的性質を正しく評価し、タンパク質受容体への基質結合能を高い精度で計算できる新しい計算科学手法を開発し、インシリコスクリーニングの効率を従来法に比べ5倍程に上げる。

2)タンパク質と化合物とのドッキング計算手法の精度を高め、ターゲット選択性能を従来法に比べ5倍程度上げる。

3)タンパク質間相互作用を阻害・制御する低分子化合物の選択・設計の技術開発を行う。

達成度

達成度	内　　容
○	μオピオイド受容体アゴニスト(48)や農薬のシードとなる化合物(23)およびインフルエンザ・ウィルスのPA-PB1複合体阻害剤(3)など70を超えるヒット化合物を得、有用な化合物を20ヶ程得た。
○	タンパク質の分子動力学計算に基づく、新たな結合自由エネルギー計算手法を開発した。 また、通常のヒット化合物の探索ではヒット率は0.1～1%程度（1000ヶ～10000ヶに1つ程度のヒット率）であるのに対して、10標的タンパク質に対し、平均10%以上でヒット化合物を得た。
○	データベースエンリッチメント・カーブにおいて上位1%における選択的なヒット率は、ssDSM法は通常のドッキング手法の5.1倍（45.8/8.9%)、標的タンパク質の動的モデルによるMTS法ではGOLDに比べ20倍（66/3.3）、機械学習法とMTS & DSIを組み合わせた方法ではS社ソフトに比べて18.0倍（22.1/1.2）を得た。hERGチャネル阻害活性予測は7.9倍。
○	MD-MVO法を開発し、ペプチド・リガンドからの低分子探索が可能なことを示した。

研究開発項目③の中間目標は達成された。

― 論文、講演、特許、報道 ―

平成19年度～平成21年度

論文・総説	講演・研究発表	特許（国内）	特許（海外）	報道・受賞
103	125	4	2	3

主な論文、特許

【論文】
1. A. Oshima, K. Tani, Y. Hiroaki, Y. Fujiyoshi and G. E. Sosinsky, **PNAS,104,** 10034-10039 (2007)
2. S. Maeda, S. Nakagawa, M. Suga, E. Yamashita, A. Oshima, Y. Fujiyoshi and T. Tsukihara, **Nature**, **458,** 597-602 (2009)
3. K. Abe, K. Tani, T. Nishizawa and Y. Fujiyoshi., **EMBO J.**, **28**, 1637-1643 (2009)
4. K. Tani, T. Mitsuma, Y. Hiroaki, A. Kamegawa, K. Nishikawa, Y. Tanimura and Y. Fujiyoshi, **J. Mol. Biol., 389,** 694-706 (2009)
5. M. Toei, C. Gerle, M. Nakano, K. Tani, N. Gyobu, M. Tamakoshi, N. Sone, M. Yoshida, Y. Fujiyoshi, K. Mitsuoka and K. Yokoyama, **PNAS, 104,** 20256-20261 (2007)
6. Senda, M., Muto, S., Horikoshi, M. and Senda, T., **Acta Crystallogr. F64**, 960-965 (2008)
7. Senda. M., Kishigami, S., Kimura, S., Fukuda, M., Ishida, T. and Senda, T., **J. Mol. Biol. 373**, 382-400 (2007).
8. Mio, K., Kubo,Y., Ogura, T., Yamamoto, T., Arisaka, F., Sato, C., ***J. Biol. Chem***. **283**(2), 1137-1145 (2008)
9. Maruyama, Y., Ogura, T., Mio, K., Kiyonaka, S., Kato, K., Mori, Y., Sato, C., ***J. Biol. Chem***. **282**(51), 36961-36970 (2007)
10. Yazawa, M., Ferrante, C., Feng, J., Mio, K., Ogura, T., Zhang, M., Lin,P-H., Pan,Z., Komazaki, S., Kato, K., Nishi, M., Zhao, X., Weisleder, N., Sato, C., Ma, J., & Takeshima, H., ***Nature,*** **448**, 78-82 (2007)
11. Mio, K., Ogura, T., Yamamoto, T., Hiroaki, Y., Fujiyoshi, Y., Kubo, Y., Sato, C., **Structure 17**, 266-275 (2009)
12. Yasuhisa Kimura., Shin-ya Morita, Michinori Matsuo, Kazumitsu Ueda., **Cancer Sci.** 1303-1310 (2007)
13. Masako Hozoji, Yasuhisa Kimura, Noriyuki Kioka, Kazumitsu Ueda., **J. Biol. Chem. 284**, 11293 - 11300 (2009)
14. Hirai, T., Mitsuoka, K., Kidera, A. & Fujiyoshi, Y., **J. Electron Microsc.** 56(4) 131-40 (2007)
15. Kadohira I, Abe Y, Nuriya M, Sano K, Tsuji S, Arimitsu T, Yoshimura Y,Yasui M., **BBRC. 377,** 463-8 (2008)
16. Tatsumi K, Tsuji S, Miwa H, Morisaku T, Nuriya M, Orihara M, Kaneko K,Okano H, Yasui M., **FEBS Lett. 583**, 2077-82 (2009)

― 論文、講演、特許、報道 ―

続き

17. Koh Takeuchi, Hideo Takahashi, Seiko Kawano, and Ichio Shimada, **J. Biol. Chem. 282**, 15179-15186 (2007).
18. Osamu Ichikawa, Masanori Osawa, Noritaka Nishida, Naoki Goshima, Nobuo Nomura, and Ichio Shimada, **EMBO J. 26**, 4168-4176 (2007)
19. Shunsuke Igarashi, Masanori Osawa, Koh Takeuchi, Shin-ichiro Ozawa, and Ichio Shimada, **J. Am. Chem. Soc. 130**, 12168-12176 (2008)
20. Masayoshi Sakakura, Sarawut Oo-Puthinan, Chifumi Moriyama, Tomomi Kimura, Jun Moriya, **J. Biol. Chem. 283**, 33665-33673 (2008)
21. Kozue Kato-Takagaki, Yumiko Mizukoshi, Yoshitaka Yoshizawa, Daisuke Akazawa, Yuichi Torii, Katsuki Ono, **J. Biol. Chem. 284,** 10720-7 (2009)
22. Shingo Nakada, Masayoshi Sakakura, Hideo Takahashi, Suguru Okuda, Hajime Tokuda & Ichio Shimada, **J. Biol. Chem.** in press
23. Y. Fukunishi and H. Nakamura, **Journal of Chemical Information and Modeling. 48**, 148-156 (2008)
24. N. Kamiya, Y. Yonezawa, H. Nakamura, J. Higo, **Proteins, 70**, 41-53 (2008)
25. Y. Fukunishi and H. Nakamura, **J Chemical Information and Modeling. 48**, 148-156 (2008)
26. Y. Fukunishi, Y. Sugihara, Y. Mikami, K. Sakai, H. Kusudo, H. Nakamura, **Synthesiology, 2**, 60-68 (2009)
27. Y. Fukunishi and H. Nakamura, **J. Molecular Graphics and Modeling, 27**, 628-636 (2009)
28. Y. Fukunishi, T. Mashimo, M. Orita, K. Ohno, H. Nakamura, **J. Chemical Information and Modeling, 49**, 925-933 (2009)

【特許】

（国　内）

1. 川田正晃、<u>佐藤主税</u>、特願2005-223566「構造推定システム、構造推定方法およびプログラム」
2. 川田正晃、<u>佐藤主税</u>、特願2006-339812「構造推定システム、構造推定方法およびプログラム」
3. 「蛋白質複合体解析法」, 高橋栄夫、嶋田一夫、中村壮史, 特許3947775号 (2007.4.27)
4. 「ファージディスプレイ法を用いた分子間相互作用解析方法」, 水越弓子、高橋栄夫、嶋田一夫, 特許第4184907号（2008.9.12)

（外　国）

1. 川田正晃、<u>佐藤主税</u>、PCT/JP2007/069565「構造推定システム、構造推定方法およびプログラム」
2. 川田正晃、<u>佐藤主税</u>、特願2008-289005「画像処理システム、画像処理方法、プログラムおよび記録媒体」

成果の実用化の具体例

1） 生体内に近い状態の構造を観察することが出来る電子線トモクラフィー用極低温電子顕微鏡の開発・改良を行い、第7世代の極低温電子顕微鏡として完成 ⇒ 実用化

2） 水チャネルAQP4のインヒビターの開発に成功、共同研究によるこのインヒビターの改良を行い ⇒ これらの技術の実用化を目指す

3） 新規NMR用酵母発現系の開発により、相互作用用解析など創薬加速研究に重要な技術を開発した ⇒ 実用化

4） 生体内に近い状態での膜タンパク質及びその複合体とリガンド分子の相互作用を解析するために、解離定数が弱いリガンド分子の標的分子結合部位を同定する技術を開発し、固体と液体が混在した不均一な系における膜タンパク質とリガンド分子の相互作用解析技術の高感度化に成功している ⇒ 実用化の見通し

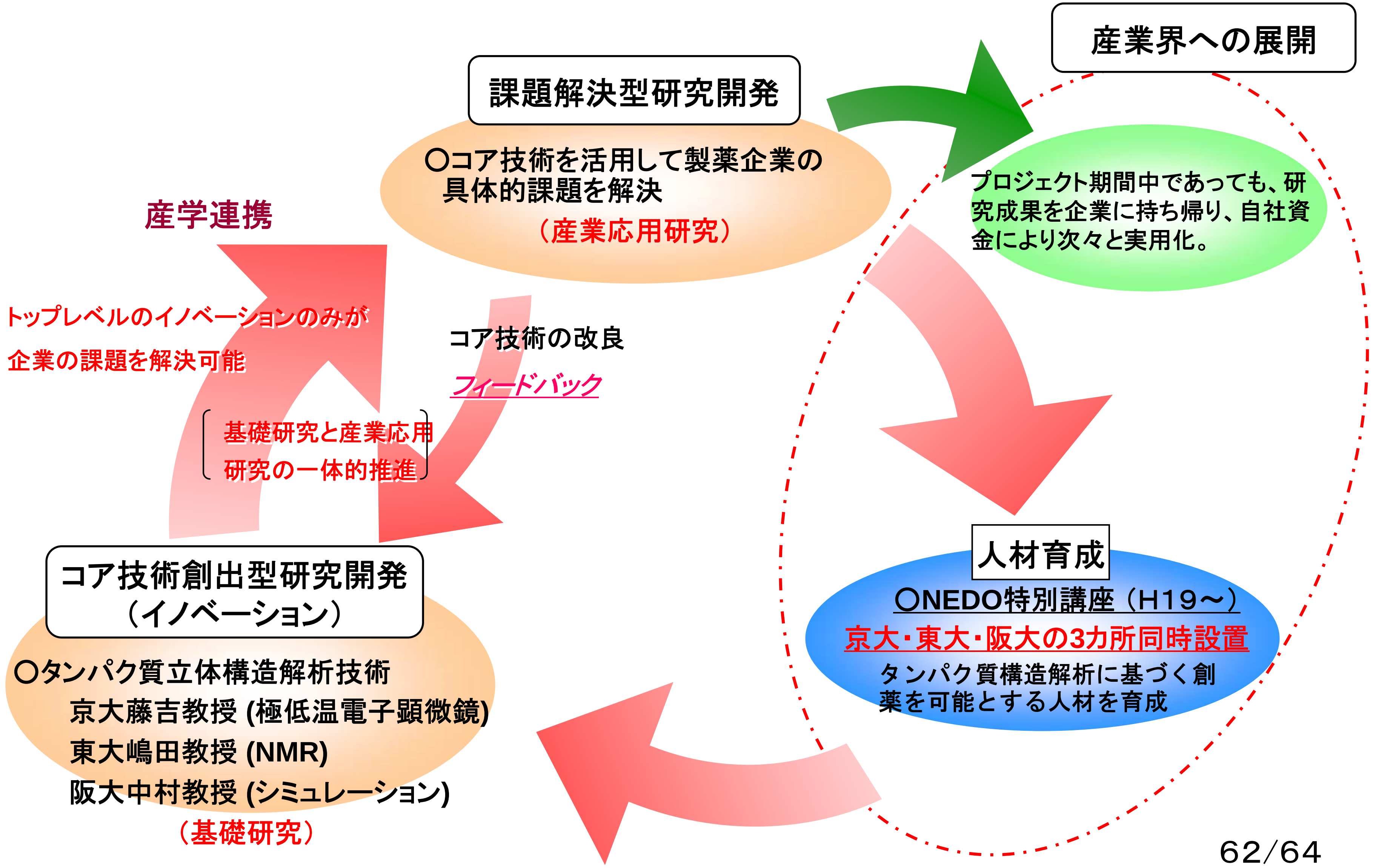
5） アミノ酸選択的交差飽和法（ASCS法）と分子動力学的計算を組み合わせることによって、受容体のNMRスペクトルの帰属を行わないで、相互作用しているタンパク質複合体のモデル構築を可能にする方法の開発を進めている。独自に開発したNMR測定法であるASCS法によりアミノ酸残基間距離情報を抽出し、先端的分子動力学計算法を用いて複合体のモデルを作製することに成功している。この様な共同研究が進展 ⇒ 実用化の見通し

6） インフルエンザウィルス用PA-PB1複合体阻害剤をはじめ、ドッキングシミュレーションによってヒット化合物を取得 ⇒ 実用化の見通し

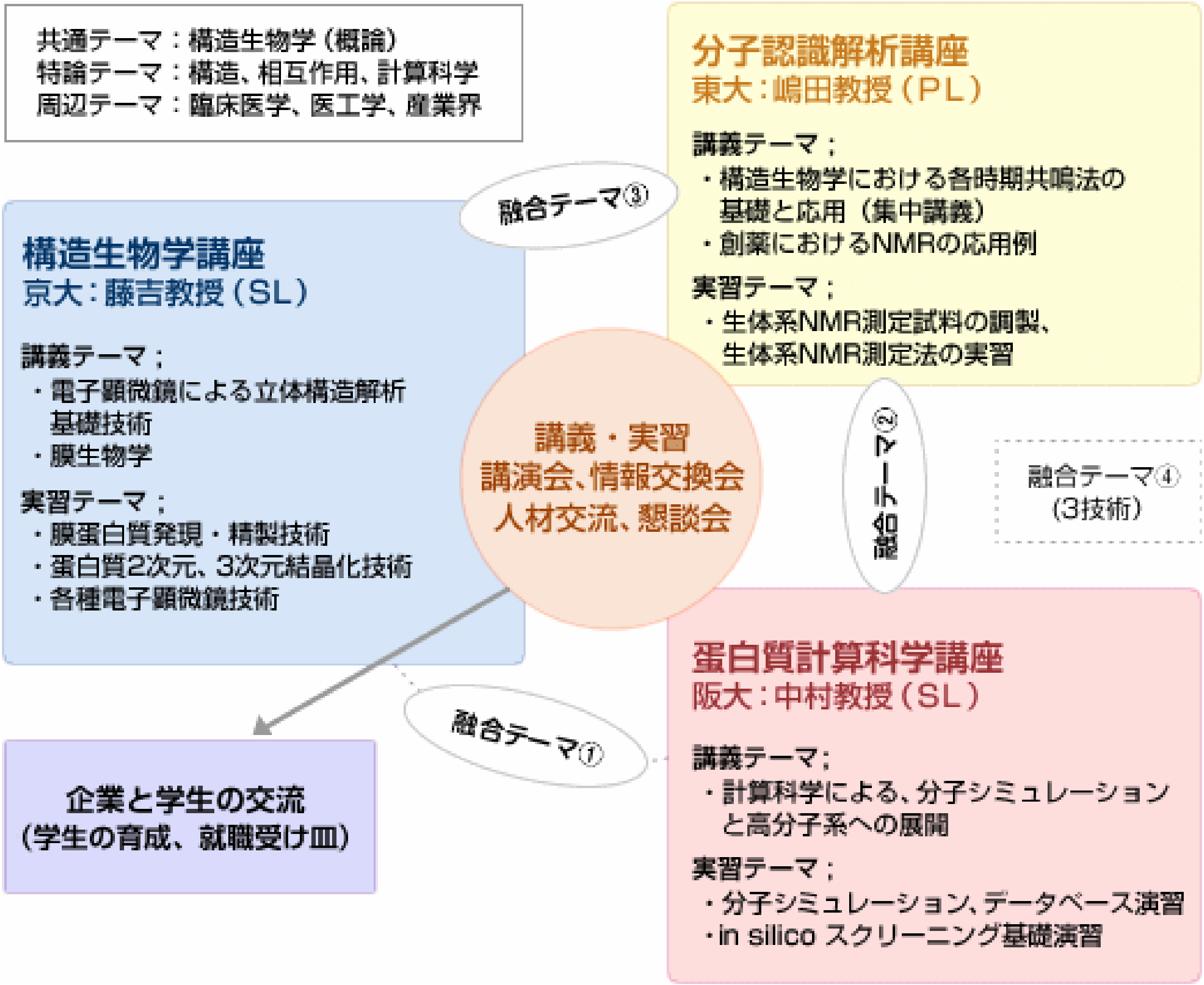
7） myPrestoは400回ほどのダウンロードなどをはじめすでに活用される ⇒ 実用化

事業原簿 154ページ

成果普及への取り組み


産業界への展開
課題解決型研究開発
○コア技術を活用して製薬企業の
具体的課題を解決
（産業応用研究）
プロジェクト期間中であっても、研
究成果を企業に持ち帰り、自社資
金により次々と実用化。
産学連携
トップレベルのイノベーションのみが
企業の課題を解決可能
コア技術の改良
フィードバック
基礎研究と産業応用
研究の一体的推進
人材育成
○NEDO特別講座（H19～）
京大・東大・阪大の3カ所同時設置
タンパク質構造解析に基づく創
薬を可能とする人材を育成
コア技術創出型研究開発
（イノベーション）
○タンパク質立体構造解析技術
京大藤吉教授 (極低温電子顕微鏡)
東大嶋田教授 (NMR)
阪大中村教授 (シミュレーション)
（基礎研究）

蛋白質立体構造解析NEDO特別講座



蛋白質立体構造解析NEDO特別講座

実績（H19年度～H21年8月現在）

講　義	回数	累計人数
基礎講義	16	189
応用講義	11	109
集中講義	12	85
基礎実習	11	86
応用実習	9	45
テーマ別講義	11	101
テーマ別実習	8	69
総累計	78	684

<u>累計参加企業、研究機関及び大学数</u>

参加企業数：56社、

研究機関：　4機関、大学：　17大学

講義風景

NEDO講座
から
教科書出版