

「ゲノム創薬加速化支援バイオ産業基盤技術開発／
創薬加速に向けたタンパク質構造解析基盤技術開発」

事業原簿【公開版】

担当部	独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構 バイオテクノロジー・医療技術部
-----	--

目次

概要	2
プロジェクト用語集	7
I. 事業の位置付け・必要性について	13
1. 事業の背景・目的・位置付け	13
2. NEDO の関与の必要性・制度への適合性	13
2.1. NEDO が関与することの意義	13
2.2. 実施の効果	14
II. 研究開発マネジメントについて	15
1. 事業の目標	15
2. 事業の計画内容	16
2.1. 研究開発の内容	16
2.2. 研究開発の実施体制	18
2.3. 研究開発の運営管理	19
2.4. 研究開発成果の実用化に向けたマネジメントの妥当性	20
3. 情勢変化への対応	20
4. 中間評価結果への対応	20
5. 評価に関する事項	21
III. 研究開発成果について	22
1. 事業全体の成果	22
2. 研究開発項目毎の成果	25
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」	25
研究開発項目②「核磁気共鳴法（NMR）等による膜タンパク質およびその複合体とリガンド分子の相互作用解析技術」	89
研究開発項目③「高精度 <i>in silico</i> スクリーニング等のシミュレーション技術」	192
タンパク質立体構造解析 NEDO 特別講座	270
IV. 実用化に向けての見通し及び取り組みについて	275
1. 実用化に向けての見通し及び取り組みについて	275
添付資料	276
健康安心イノベーションプログラム基本計画	277
プロジェクト基本計画	287
特許・文献・外部発表等リスト	298
事前評価関連資料	333

会計・勘定		H19fy	H20fy	H21fy	H22fy	H23fy	H24fy	H25fy	総額
一般会計		980*	882	933	603	1,076	97	-	4,571
開発成果促進財源		-	-	70	170	-	920	30	1,190
総予算額		980*	882	1,003	773	1,076	1,017	30	5,761
* 平成 19 年度は経済産業省の直轄事業として実施。平成 20 年度から NEDO 事業。									
(契約種類)	(委託)	○							
	(助成) : 助成率△/□								
	(共同研究) : 負担率△/□								
	経産省担当原課	産業技術環境局研究開発課 製造産業局生物化学産業課							
プロジェクトリーダー	名古屋大学細胞生理学研究センター 教授 藤吉 好則								
チームリーダー	研究開発項目 ①	名古屋大学細胞生理学研究センター 教授 藤吉 好則							
	研究開発項目 ②	東京大学大学院薬学系研究科 教授 嶋田 一夫							
	研究開発項目 ③	大阪大学タンパク質質研究所 教授 中村 春木							
委託先	<ul style="list-style-type: none"> ○ (一社) バイオ産業情報化コンソーシアム ※分室 (15 社) 味の素 (株)、アステラス製薬 (株)、エーザイ (株)、協和発酵キリン (株)、塩野義製薬 (株)、(株) 情報数理研究所、第一三共 (株)、東レ (株)、(株) 東レリサーチセンター、日本電子 (株)、日本電子データム (株)、富士通 (株)、日本ソフトウェアエンジニアリング (株)、三井化学アグロ (株)、三菱化学 (株) ○ (国) 名古屋大学細胞生理学研究センター ○ (国) 東京大学大学院薬学系研究科 ※共同実施先 (1 大学) (公) 横浜市立大学大学院生命ナノシステム研究科 ○ (国) 大阪大学タンパク質質研究所 ○ (国) 京都大学大学院理学研究科 ○ (国) 京都大学大学院農学研究科 ○ (学) 慶應義塾大学大学院医学研究科 ○ (独) 産業技術総合研究所 ○ (独) 理化学研究所 								

<p>情勢変化への対応</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ 平成 21 年 12 月：加速等追加配賦制度により 70 百万円配賦 研究開発項目①において、ギャップ結合近傍の細胞内でベシクルと呼ばれる袋状の構造体が連続的に並んでいることを世界で初めて発見し、この発見を新たな創薬シーズに早急に発展させるために、構造体の解析に必要となる電界放出型走査電子顕微鏡を導入した。さらに、研究開発項目③において開発中のソフトウェアの演算速度・処理能力を向上させるために、複数の演算プログラムを並行して適用し最適なプログラムの選択を可能とする PC クラスタ型サーバ計算機を増設した。 ○ 平成 22 年 4 月：加速等追加配賦制度により 120 百万円配賦 本プロジェクトの成果普及の一環と位置付けた NEDO 特別講座を、平成 22 年度も引き続き実施するものとした。 ○ 平成 22 年 10 月：加速等追加配賦制度により 50 百万円配賦 研究開発項目②において開発中の相互作用解析技術の汎用性を高めるために、ペプチドホルモン等の低分子リガンドも解析対象とすることが可能な高感度 SPR 装置を導入した。 ○ 平成 24 年 4 月：加速等追加配賦制度により 920 百万円配賦 本プロジェクトに対する平成 24 年度一般会計予算が大幅に削減されたため、加速資金の配賦により当初の計画通りに研究開発を遂行した。 ○ 平成 25 年 4 月：開発成果創出促進制度により 30 百万円配賦 本プロジェクトの研究開発項目①～③は平成 24 年度をもって終了したが、開発された基盤技術は今後の創薬の合理化に必須なものになると考え、本プロジェクトの成果普及に加え、産業界との意見交換も行いながらプロジェクト成果の応用展開を検討するために、平成 25 年度も NEDO 特別講座を継続するものとした。 	
<p>中間評価結果への対応</p>	<p>μ オピオイド受容体を標的とした鎮痛・鎮静薬のリード化合物を、製薬企業との共同で、計算科学により効率的に取得した実績をプレスリリースした。</p> <p>さらに、癌治療薬の標的となり得る G タンパク質共役型受容体（膜タンパク質）の精緻な立体構造の解析に成功するとともに、G タンパク質共役型受容体のダイナミックな構造変化に基づく機能発現メカニズムを解明し、世界に先駆けて論文発表することができた。</p>	
<p>評価に関する事項</p>	<p>事前評価</p>	<p>平成 19 年度実施 担当部 バイオテクノロジー・医療技術開発部 ※平成 19 年度は経済産業省の直轄事業として実施し、平成 19 年度末に事前評価を行い平成 20 年度から NEDO 事業。</p>
	<p>中間評価</p>	<p>平成 21 年度実施 担当部 バイオテクノロジー・医療技術開発部</p>
	<p>事後評価</p>	<p>平成 25 年度実施 担当部 バイオテクノロジー・医療技術部</p>
<p>Ⅲ. 研究開発成果について</p>	<ul style="list-style-type: none"> ● 事業全体 世界最高レベルの膜タンパク質構造解析技術、タンパク質間相互作用解析技術、計算科学技術を確立し、創薬標的タンパク質の立体構造に基づく医薬品リード化合物の効率的な探索を実現するための要素技術を確立した。 ○ 研究開発項目①「電子線等による膜タンパク質およびその複合体の構造解析技術」 膜タンパク質の構造解析を進めるとともに、構造・機能解析のための膜タンパク質大量発現・精製法の確立、電子顕微鏡を中心とする装置開発を行った。本研究開発項目で開発した極低温電子顕微鏡により、脂質膜の中にある膜タンパク質の構造情報を高分解能で取得することが可能になった。 具体的には、水チャネル aquaporin-4 (AQP4) の 2 次元結晶を 2.8Å の高分解能で解析し、チャネルを透過する水分子を X 線解析より高い精度で可視化することに成功した。さらに、AQP4 阻害剤アセタゾールアミドとの複合体構造解析にも成功し、より選択性の高い阻害剤設計に資する構造情報を得ることができた。AQP4 阻害剤は脳浮腫治療薬となることが期待される。 また、多重膜 2 次元結晶の解析用プログラムを改良し、ATP 駆動型プロトンポンプである H^+, K^+-ATPase の構造を高分解能で解析するとともに、プロトンポンピング機構の解明にも成功した。 ○ 研究開発項目②「核磁気共鳴法等による膜タンパク質およびその複合体とリガン 	

ド分子の相互作用解析技術」

核磁気共鳴法 (NMR) を用いた新たなタンパク質-リガンド間相互作用解析法を開発するとともに、NMR 解析の対象とするタンパク質の大量発現系および調製法を確立した。さらに、タンパク質の細胞内における構造や機能を調べるために、細胞内タンパク質の NMR シグナルを直接観測する効率的な手法として、バイオリアクターを用いた in-cell NMR 法を開発した。

DIRECTION 法 (Difference of inversion recovery rate with and without target irradiation) は、リガンド-タンパク質間距離を正確に算出することが可能な相互作用部位同定法として開発された。MAPKp38 とその阻害剤 SB20358 の相互作用解析に適用した結果、阻害剤 SB20358 (リガンド) 内の各原子から MAPKp38 (タンパク質) 結合部位までの距離を高精度に算出できることが実証された。

アミノ酸選択的交差飽和法は、タンパク質-タンパク質複合体における結合界面を決定する NMR 手法として開発された。本法を適用して得られた構造情報を研究開発項目③における複合体モデル構造の分子動力学計算に取り込むことで、詳細な複合体モデルの構築が可能になった。

さらに、上記の解析手法を活用することにより、G タンパク質共役型受容体 (GPCR) のシグナル伝達機構の解明に成功した。具体的には、 β_2 アドレナリン受容体を解析対象として、結合するリガンド毎に受容体を介した細胞内シグナル伝達強度が異なる仕組みを解明した。すなわち、受容体作動薬もしくは受容体遮断薬の結合、リガンド未結合の状態によって、受容体の膜貫通領域の立体構造が大きく変化する (複数の立体構造間の動的平衡状態が大きく変化する) ことが見出され、これが細胞内シグナルの伝達強度を決定づけていることを明らかにした。

○ 研究開発項目③「高精度 *in silico* スクリーニング等シミュレーション技術」

マルチカノニカル分子動力学計算をはじめとする計算手法、理論計算値と研究開発項目②から得られる実験データを融合させたタンパク質-化合物およびタンパク質-タンパク質複合体予測手法等を新たに開発し、これらを導入した *in silico* スクリーニング/シミュレーションソフトウェアとして myPresto version[®] 4.2 を公開した。また、2,000 万個の低分子化合物につき 3 次元構造モデルのデータベース化を行い、溶解度、非特異的相互作用、発癌性等の予測情報も付加して、LigandBox として公開した。

さらに、開発したソフトウェアを実際の創薬標的に適用する実証研究を行い、複数の新規医薬品リード化合物を取得した。

実証研究成果のひとつとして、膜タンパク質である μ オピオイド受容体を標的とした鎮痛薬のリード化合物取得が挙げられる。

オピオイド受容体には μ 、 δ 、 κ のサブタイプが存在する。モルヒネ等の既存の鎮痛薬はオピオイド受容体を作用点とするが、サブタイプ選択性が低いことに起因する副作用が問題となっている。そこで、副作用の低減が期待できる μ オピオイド受容体選択的鎮痛薬の創製を目指し、 μ オピオイド受容体内因性リガンド (μ オピオイド) として知られる神経伝達ペプチドのエンドモルフィンに着目して、このエンドモルフィンの立体構造を模倣する非ペプチド性低分子化合物の取得を試みた。その結果、構築した低分子化合物データベースの中から、エンドモルフィンと立体構造の類似した 21 個の化合物を見出し、いずれの化合物も高い活性を示すことが確認できた。さらにそれら化合物の最適化に向けた合成展開により、複数個の医薬品候補化合物を取得した。

○ タンパク質立体構造解析 NEDO 特別講座

本プロジェクトで開発したタンパク質構造解析技術、タンパク質間相互作用解析技術、計算科学技術およびこれらの周辺技術を習得し発展させることのできる人材の育成、産学の人的交流、本プロジェクトの成果普及を目的として、「構造生物学講座」、「分子認識解析講座」および「タンパク質計算科学講座」と題した講義・実習を、京都大学、名古屋大学、大阪大学および東京大学にて開講した。平成 20 年度から平成 24 年度までに、大学院生および社会人を中心とした延べ 1,008 名の参加者を得た。

平成 25 年度も NEDO 特別講座を開講し、人材育成、産学の人的交流および成

	果普及を継続することとした。	
	投稿論文	「査読付き」283件
	特許	「出願済」2件、「登録」2件、「実施」0件（うち国際出願1件）
	その他の外部発表（プレス発表等）	435件
IV. 実用化の見通しについて	<p>研究開発項目①で開発した極低温電子顕微鏡・結晶解析用プログラム等を用いた解析により、創薬標的となり得る複数の膜タンパク質の構造情報を取得し、この構造情報を活用した企業による創薬研究が開始された。</p> <p>研究開発項目②で開発した NMR 測定法（アミノ酸特異的交差飽和法、DIRECTION 法等）により、タンパク質複合体の結合界面における構造情報の取得が可能になった。</p> <p>研究開発項目③で開発したシミュレーションソフトウェア myPresto® version 4.2 においては、研究開発項目②で得られる結合界面構造情報を分子動力学計算に組み入れることにより、タンパク質複合体構造を高精度に予測可能となった。本ソフトウェアは大阪大学および経済産業省ポータルサイトにて一般に公開されており、2013年2月現在の累計ダウンロード数は2,429件（日本語版：2,131件、英語版：298件）にのぼる。</p> <p>本プロジェクトの研究開発成果は、創薬標的タンパク質の立体構造に基づく医薬品リード化合物設計（構造創薬）を理論段階から実用段階に押し上げるものとなる。また、あらゆる創薬標的タンパク質に適用可能な大量発現系、試料調整法の確立をはじめ、研究開発項目①～③で開発した個々の要素技術は、構造創薬のみならず、従来の創薬手法においても極めて有用であり、創薬プロセス全般の効率向上に資するものと言える。</p>	
V. 基本計画に関する事項	作成時期	平成23年8月作成
	変更履歴	(1) 平成20年3月、制定。 (2) 平成22年3月、実施期間延長に伴う改訂。 (3) 平成23年2月、研究開発項目の整理に伴う改訂。 (4) 平成23年8月、研究開発項目<2>の追加に伴う改訂。

プロジェクト用語集

用語	解説
Actin	真核細胞の内部で繊維状の構造を形成する細胞骨格タンパク質のひとつ。分子量 5 万の球状タンパク質である G-actin が螺旋状に多数重合して繊維状のアクチン (F-actin) を形成する。アクチンの重合と脱重合は、さまざまなアクチン結合タンパク質との相互作用によって制御されている。
Affinity Chromatography	クロマトグラフ法の 1 種。固定相に極めて特定のタンパク質に対する選択性が高く、かつ結合力の高い物質を付加させ、タンパク質を精製する手法。
APs	Accelerator Processors の略。特殊な用途を高速に実施するためのチップ全体を意味し、具体的にはグラフィック表示を高速に行うためのグラフィクス・アクセレータや、GRAPE-DR のように数値演算を超高速に実施するために特殊に設計したチップが開発され、市販されている。
Ca ²⁺ -ATPase	アデノシン三リン酸 (ATP) の分解に伴うエネルギーを利用し、カルシウムを筋小胞体に取り込む膜タンパク質。
CAPRI	世界的な、タンパク質複合体構造の予測コンテスト。タンパク質の構造が提示され、世界中の計算チームがエントリーして、その複合体構造を計算で予測する。同時進行して複合体の構造解析が実験的に進められ、計算予測を完全なブラインドテストで評価する。
CDR	相補性決定領域。抗原と相互作用する可変領域の中で抗原との直接的結合を担う領域。遺伝子レベルでの変異や組み換えが多いために他との配列相同性が低く、超可変領域とも呼ばれ、抗原特異性に重要とされる。
COMBINE 法	Comparative Binding Energy Analysis の略。ドッキングソフト等を用いて作成した化合物-タンパク質複合体のポーズにおいて、両者の間の相互作用エネルギーを力場計算に基づいて算出し、それを注目するタンパク質の残基毎に振り直し、各値を記述子として定量的構造活性相関 (QSAR) 解析を行う方法のこと。力場計算における van der Waals エネルギーと静電エネルギーは物理化学的に算出されるが、それらの重みづけは標的タンパク質毎に調整されるため、実験値に近いスコアが得られやすい。
Co-LET 法	Co-Localization Expression Technique の略。Homer (Group I mGlu receptors と結合するタンパク質) を用いて膜タンパク質を効率よく局所的に大量に発現させる方法。
Coupled folding and binding	タンパク質の新しい分子認識メカニズム。相手と複合体を形成していない状態では特別なかたちをとらずにランダムな構造をもち、いわゆる天然変性状態となっているが、相手と遭遇するとフォールディングし (折れ畳まれ) 特別なかたちの複合体を形成し、生体信号伝達等を行うというもの。P. E. Wright が NMR によってその存在を証明したことでも有名である。
ESI-MS	Electron Spray Ionization-Mass Spectrometer の略。エレクトロスプレー法による試料イオン化法を用いる質量分析計。質量分析器の前段にマイクロ HPLC やキャピラリー電気泳動を設置し、混合試料から直接目的物質を分離、構造解析ができる。
Evolutionary Trace 法	タンパク質複合体において、もしその複合体が生物学的に重要ならば、生物種を越えて複合体構造は保持されなければならない。したがって、2 つのタンパク質の界面に存在するアミノ酸配列は、同時に進化ないし保存されなければならない。この性質を用いて、配列進化・保存からタンパク質界面に存在する残基を特定する手法のこと。
Fed-Batch 法	微生物の培養法。流加培養などともいわれる。微生物自身の生育や微生物が目的分子を大量発現するうえで必要な栄養素を、培養期間中常に添加し続ける方法。通常の培養に比べて、微生物の生育と目的分子の大量発現の両方を大きく増加させることができる。
GPCR	G-Protein Coupled Receptor の略。G タンパク質共役型受容体で、膜貫通領域を 7 本持つ。リガンド (タンパク質に特異的に結合する低分子物質) などの細胞外刺激により、3 量体 G タンパク質を活性化する。医薬品の 30% は GPCR のアゴニストまたはアンタゴニストである。

用語	解説
GPGPU	General Purpose GPU の略。Aps の 1 つであるグラフィックスアクセラレータとして、通常は PC で利用される画像処理を行う GPU (Graphics Processing Unit) をより汎用に利用するもの。NVIDIA 社が主要な製品を提供しており、NVIDIA 社が提唱する CUDA (Compute Unified Device Architecture : クーダ) と呼ばれる GPU 向けの C 言語の統合開発環境が利用されることが多い。
GRAPE-DR	東京大学情報理工学系・平木敬教授のグループが開発した演算チップで、512 個の要素プロセッサを集積し、1 チップで 512Gflops の計算速度を達成するもの。消費電力が少なく、高速演算を並列的に行う場合にコストパフォーマンスが優れたチップである。
hERG チャンネル	Human ether-a-go-go related gene (hERG) の遺伝子発現産物として同定された 6 回膜貫通ヘリックスを持つ心筋細胞にある膜タンパク質で、心臓の K ⁺ イオンチャンネル機能をもつ。一般に使用されている非循環器用薬剤を服用中に患者が失神もしくは突然死する報告があり、その症候は薬剤投与が引き起こす致命的な QT 延長による不整脈の惹起に起因し、その因子が hERG チャンネルであることが判明している。開発された薬剤の副作用として hERG チャンネル阻害を起こすこともあり、催不整脈作用との因果関係が明らかな場合には、承認後に市場から撤退を余儀なくされたり、開発が中止されるケースもある。
His-Tag	ヒスチジンタグの略。タンパク質の N 末端または C 末端に付加した 6 個のヒスチジン。発現タンパク質をこれにより対標識し、精製を容易にするために用いられる。
In-cell NMR	生きた細胞内におけるタンパク質の立体構造情報を得るための NMR 手法。高分解能 NMR スペクトルを測定するために、安定同位体標識を施したタンパク質を細胞内に導入する必要がある、これまでに大腸菌やアフリカツメガエル卵母細胞を用いた手法が開発されている。
INPHARMA 法	Inter-ligand NOE for Pharmacophore Mapping 法の略。互いに競合阻害する 2 種類のリガンド分子とその標的分子の共存下における NOESY 測定において観測されるリガンド分子間 NOE のこと。INPHARMA は標的分子のプロトンを経たスピン拡散現象により生じると考えられ、2 種類のリガンドの結合部位における相対配向に関する情報として活用できる。
In silico スクリーニング	計算科学的手法を用いて創薬標的タンパク質と相互作用する低分子化合物を見出すこと。医薬品等の候補物質を探索するとき用いられる。
In silico ドッキング	計算機上で化合物と標的タンパク質との相互作用を計算し、タンパク質-化合物複合体構造とその活性を予測すること。
LDL	Low Density Lipo-Protein の略。低密度リポタンパク質で、コレステロールの体内循環・移送に係わるキャリアー。酸化すると、いわゆる悪玉コレステロールの酸化 LDL となる。このレセプターは LOX-1 と呼ばれる。
Ligand efficiency	LE と略される。ヒット化合物をリード化合物・候補化合物へと展開していけるかを見積もる尺度の 1 つである。結合自由エネルギーを化合物に含まれる重原子の数で割った値であり、有望化合物では 0.3~0.5 kcal/mol 程度となる。活性が強い化合物が有望なのではなく、ligand efficiency の高い物質が有望と言える。PEI (%阻害/重原子数) と類似の概念である。
PACAP	Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide の略。脳下垂体に存在するタンパク質。
PLS 回帰	Partial Least Square の略。偏相関最小 2 乗回帰と訳され、回帰分析法の 1 つである。因子の多数の値とその結果が統計的に得られている場合、入力因子と結果との間に潜在変数を新たに導入し、それらの相関関係が最大となるように変数を設定することで、overfitting の危険性が少ない適切なあてはめができる手法。

用語	解説
REDPRO 標識	大腸菌を用いたタンパク質発現を重水中 (~100% D ₂ O) で行い、炭素源としてグルコース (非重水素標識体) を使用することで、プロトン密度が軽減されたタンパク質試料が調製される。本標識の場合、プロトン領域はほぼ完全に重水素化されるが、メチル基や芳香環についてはグルコース由来のプロトンが残るため、これらの NMR シグナルは感度良く観測される。
SDS-PAGE	Sodium Dodecylsulphonate-Poly Acrylamide Gel Electrophoresis の略。タンパク質の電気泳動法として一般的な方法。SDS を用いて試料を変性させた後、ポリアクリルアミドゲル板上で電気泳動を行う。
Sf9	夜盗蛾由来の継代培養できる昆虫細胞。膜タンパク質の発現系としてしばしば用いられる。
STD 法	Saturation Transfer Difference 法の略。標的分子選択的なラジオ波照射により標的分子のプロトンを飽和させ、その飽和が結合するリガンドにのみ転移する現象を利用した NMR スクリーニング手法。標的分子からリガンドへの飽和移動はリガンドシグナル強度の減少として検出されるが、その強度減少の程度は、リガンドプロトン-標的分子プロトン間距離にも依存することから、エピトープマッピング手法として利用された例もある。
TLC	Thin Layer Chromatography の略。薄層クロマトグラフィーと呼ばれるクロマトグラフ法の 1 つ。シリカゲルなどの固定相を塗布したガラス板上に混合物の試料を吸着させ、これを溶媒で展開することで混合物の各成分を分離・分析する。
Western Blotting	抗体を用いて、無数にあるタンパク質の中からある特定のタンパク質だけを検出する方法。電気泳動ゲルからタンパク質をニトロセルロース紙に転写し、その後、標識化した抗体により発色させ、特定のタンパク質を高感度検出する。
アクアポリン	水の透過機能を持つ膜タンパク質の 1 種。ヒトでは 12 種類がクローニングされ、アクアポリン-4 は主に脳に発現し、脳浮腫の病態生理への関与が示唆されている。
アゴニスト	ある生体作用物質の受容体 (レセプター) に結合し、同じ (あるいは似た) 作用を表す物質あるいは薬剤。
アシアロ糖タンパク質	糖タンパク質の糖鎖部分からシアル酸が除去されたもの。一般に糖鎖の非還元末端に結合するシアル酸はやや不安定なため、血中を循環中に徐々に分解していく。通常、シアル酸の分解に伴って、糖鎖の非還元末端は Gal もしくは GalNAc になる。
アンタゴニスト	前述のアゴニストに対し、拮抗的な作用を示す物質あるいは薬剤。
安定同位体標識	現在の生体高分子の NMR 解析においては、測定感度、選択性等の観点から、測定対象試料の構成元素である炭素、窒素、あるいは一部の水素を、安定同位元素 ¹³ C、 ¹⁵ N、あるいは ² H で標識することが必須となっている。一般的な安定同位体標識タンパク質試料調製は、大腸菌を利用したタンパク質大量発現の際、 ¹³ C、 ¹⁵ N、 ² H 標識した炭素源、窒素源、アミノ酸 (前駆体)、重水等を用いることで行われる。
アレスチン	G タンパク質共役型の情報伝達系に幅広く存在する水溶性のタンパク質。光受容体やアドレナリン受容体など G タンパク質共役型受容体のリン酸化型に特異的に結合し、情報伝達を抑制する。
一分子蛍光分析	試料溶液に共焦点レーザーを当て、その焦点部分をブラウン運動によって通過する蛍光標識分子の並進拡散時間を分析する手法。1 フェムトリットル (1 兆分の 1 リットル) という極めて小さな領域を観測領域とするため、試料分子の分子量や分子間相互作用などを一分子レベルで解析可能。
エピトープマッピング	元来は外来タンパク質分子の抗原性を示す部位を決定する手法の意味であったが、そこから派生してリガンド分子の標的タンパク質結合部位を同定する手法の意味で用いられる。

用語	解説
エンドサイトーシス	細胞が小胞（エンドソーム）を介して外環境から種々の物質を細胞内に取込む機構をいう。特に細胞表面の受容体を介してリガンドを取込む機構は受容体依存性エンドサイトーシスと呼ばれる。通常、取込まれたリガンドはリソソームまで運ばれ分解される。
エンリッチメント	薬物スクリーニング計算において予測化合物数に占める真のヒット化合物数の割合。通常、ランダムな実験では1万化合物に1化合物ヒットするので、もし計算で予測したヒット化合物候補100個中にヒット化合物が1個あれば、ランダム実験に対するエンリッチメントは100倍となる。横軸を選択した化合物数、縦軸をヒット化合物数としたグラフをデータベースエンリッチメントカーブと呼び、この曲線の下面積を area under curve (AUC) という。スクリーニング手法の良し悪しは通常 AUC で判断し、AUC が 50% ならランダムスクリーニングと変わらず、100% に近いものほど良い。
キナーゼ	ATP、ホスホエノールピルビン酸などヌクレオシド三リン酸を磷酸供与体とする磷酸基転移酵素。
グラフティング	グラフト=移植するという意味。ここでは抗体の CDR3 を他の抗体 (scaffold) の CDR3 へ移植し、キメラ抗体を作製している。
結合自由エネルギー (ΔG)	タンパク質と化合物間の結合に伴うエネルギー変化をいい、タンパク質と化合物の結合の強さを示す。通常、5 kcal/mol から 15 kcal/mol 程度である。酵素阻害剤の場合、天然の基質より 2 kcal/mol 程度 ΔG が強ければ 80-90% の阻害活性を示す。
交差飽和法	Cross-Saturation Method。高分子量 (50KDa 以上) のタンパク質複合体の相互作用界面に存在するアミノ酸残基を高精度に決定する手法として開発された新規 NMR 測定法。
構造インタラクトーム	インタラクトームは有機体における分子相互作用の全体を指し、構造インタラクトームとは、相互作用する分子の複合体立体構造全体を指す。
ゴニオメータ	試料を回転させ、電子線、X 線などの照射角度を変える装置。
コラーゲン	細胞外マトリックスの主要成分として、体内に最も多く含まれるタンパク質。一次配列に 3 残基ごとのグリシンの繰り返しを含み、3 本のポリペプチド鎖がより合わさってトリプルヘリックス構造を形成し、さらに規則的に会合して巨大で不溶性のコラーゲン線維となる。
生理活性ペプチド	生体物質であるか合成物質であるかを問わず、生物に対して生理作用ないしは薬理作用を発現するアミノ酸の重合体のうち、長さが短いものを指す。
双極子-双極子相互作用	核スピン間の磁氣的相互作用において、核スピン磁化の緩和の主な原因となる相互作用。そのハミルトニアンはスピン間距離の 3 乗に反比例するため、NOE や交差飽和法などスピン間距離を求める手法の基盤となる。原子の運動性が低いほど相互作用が大きくなるため、分子のダイナミクス解析法の基盤にもなっている。
代謝型グルタミン酸受容体	GPCR の 1 種。脳における神経伝達調節に重要な役割を担っていることが示唆されている。
縦緩和時間	静磁場中に置かれた核スピン系が非平衡の状態から熱平衡状態へと回復する過程を核スピン系の緩和といい、特に静磁場方向の磁化の緩和現象を縦緩和 (スピン-格子緩和) と呼ぶ。その熱平衡状態に達するまでの時間を縦緩和時間という。
単粒子解析法	タンパク質の結晶を使わずにタンパク質の立体構造を求める手法。X 線 CT と類似した考えで、多数のタンパク質単粒子の電子顕微鏡像を使い、コンピュータにより立体像を再構築する。
デコイセット	<i>In silico</i> 薬物スクリーニングの性能テストを行うとき、標的に対する活性化合物に加えて標的に対して活性がないであろう化合物集団を「デコイセット」として用いる。
ドッキング	計算機科学的手法により、タンパク質とリガンド複合体の立体構造を求めること。フレキシブルドッキングとは、タンパク質とリガンドの立体構造変化を考慮し計算する方法。

用語	解説
ナノ抗体	重鎖、軽鎖の4本鎖から成るヒト、マウス等の通常の抗体と異なり、重鎖2本のみからなるラクダ抗体のVHH(variable domain of heavy chain of heavy chain antibody)を指す。同程度の抗原親和性を示す通常の抗体よりもはるかに大きさが小さいことからナノ抗体と呼ばれる。
ヒアルロン酸	D-グルクロン酸とN-アセチルグルコサミンの2糖の繰り返しからなる直鎖状の高分子ポリマー。ヒアルロン酸は細胞外マトリックスの主成分として生体組織に広く分布し、炎症時には低分子量ヒアルロン酸が生成され、細胞運動を亢進させるなどの生理活性を有することが知られている。
標識アミノ酸のスクランブリング	生細胞では他のアミノ酸を前駆体として代謝により合成されるアミノ酸も存在する。したがって、同位体標識されたアミノ酸を生細胞に取り込ませてタンパク質を合成させる際、標識アミノ酸が代謝されることで、目的外の部位が標識されることがある(スクランブリング)。
ファージ・ディスプレイ法	タンパク質の選択的生産法の1つ。大腸菌に感染する繊維状ファージの遺伝子を組替え、ファージ表面に目的のタンパク質を“ディスプレイ”させることからの命名。
ファーマコフォア	リガンド分子が標的分子と結合するために必要となる官能基群、およびそれらの相対的な空間配置情報を指す。ファーマコフォアを特定することで、新規のリガンドを検索、デザインすることも可能になると考えられている。
並進拡散時間	試料分子がブラウン運動によって溶液中を自由拡散する際に、単位距離あたりを拡散するのに要する時間。ストークス・アインシュタインの法則により、溶液中の試料分子の並進拡散時間は分子半径に比例するため、並進拡散時間から試料分子の分子量を推定できる。
「オピオイド受容体	主に痛みに関与する受容体で、モルヒネの作用点。アゴニストは末期がんでの鎮痛、恐怖の緩和、アトピー性皮膚炎などの強度のかゆみの緩和に用いられる。オピオイド受容体のサブタイプには κ 、 δ がある。
マジック角高速回転	静磁場に対し約 54.7° 傾けた軸の周りに試料を高速回転することにより、不溶性成分により生じる局所磁場の不均一性を解消するとともに、双極子-双極子相互作用を減弱することによりスペクトルの高分解能化を図るNMR手法である。双極子-双極子相互作用はマジック角高速回転速度にほぼ反比例して減弱することが知られている。
マルチカノニカル法	拡張アンサンブル法などとも称される新しい統計物理学の手法で、温度などが定義された状態をそのまま計算するのではなく、一度分子が非常に運動しやすい仮想的な状態での計算を行い、その結果を現実の系に換算することで様々な構造変化を考慮した精密な計算を行う方法である。
ミトコンドリア	細胞内にある呼吸・エネルギー生成器官。
無細胞タンパク質合成／発現系	生きた細胞を用いずに、鋳型DNAやRNAポリメラーゼ、ATP、アミノ酸などを共栓付きフラスコ内で反応させてタンパク質を生産する技術。毒性タンパク質の発現による収量低下、発現タンパク質の再分解などにより細胞内では生産不能なタンパク質を生産できる可能性がある。細胞培養が不要のため、ハイスループットスクリーニングに向いている。
メチル選択標識法	イソロイシン、ロイシン、バリンのメチル基NMRシグナルを選択的に観測するための標識法。完全重水素化試料調製の途中段階に特定アミノ酸前駆体を添加することで、容易にメチル基選択標識が達成される。
モデリング	計算機化学において、タンパク質やリガンドのエネルギー的に安定な分子構造をコンピュータ計算により決定すること。各原子の位置は座標として表示される。
モノアミン酸化酵素-A	ミトコンドリア外膜および細胞外膜に1本の α ヘリックスが膜に貫通する形でアンカリングして存在し、ドーパミンなどの神経伝達物質の分解を触媒することにより中枢神経系をコントロールするタンパク質。このため、うつ病等の神経症治療薬の有望な標的タンパク質として知られている。

用語	解説
リード化合物	医薬品の原石となる化合物。誘導体化（化学修飾）することで、特異性、活性、薬物動態などの点で磨きあげられ、完成品である医薬品となる。通常、化学合成と誘導体化が容易で、誘導体に構造活性相関があり、化学反応性の高い置換基がない有機化合物をいう。
ロドプシン	眼球内にある光受容 GPCR。X 線結晶構造解析により立体構造が決定されている唯一の GPCR。
ローリング	白血球が血液中から炎症組織やリンパ管へと移行する際には、白血球が血管内皮細胞上をゆっくりと転がるように運動するローリングが最初のステップとなる。このようなローリングにおいては、一過的な結合の形成と解離が繰り返し起こっており、CD44 やセレクチンなどの細胞接着因子が関与する。

1. 事業の位置付け・必要性について

1. 事業の背景・目的・位置付け

本事業は、個別化医療・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「健康安心イノベーションプログラム」の一環で、革新的医薬品創出に資する基盤技術開発を目的として実施した。

創薬における研究開発費用が増加の一途をたどる一方で新薬上市数が低下するという世界的傾向の中、創薬研究開発の効率化・リスク低減は、我が国医薬品産業の国際競争力維持のためにも必要不可欠な要素となっている。研究開発費用の中でも臨床試験に要する費用の増大はとくに著しく、その結果として創薬シーズの探索研究に投じる予算が圧迫される傾向にあるため、探索研究効率の向上が喫緊の課題と言える。

2003年にヒト全遺伝子配列の解読が完了して以降、これら遺伝子にコードされるタンパク質およびその立体構造情報、生命現象との関連が相次いで明らかにされてきた。ヒト遺伝子にコードされる生体内タンパク質の数は25,000~30,000個と推定され、その中の10%は何らかの疾患発症に関与していると言われている。一方で、既存の薬剤の標的とされているタンパク質は200個あまりに過ぎない。したがって、創薬標的としてのポテンシャルがありながら、従来の創薬アプローチでは見逃されている、もしくは対象とすることが困難な生体内タンパク質が依然として数多く残されていると言える。こういったタンパク質を創薬標的とするために、タンパク質の立体構造に基づくコンピュータを用いた合理的な化合物設計というアプローチが提唱されて久しい。米国では産業競争力強化に向けて、米国内大手企業が協力して創薬支援体制を作り、大手IT企業の支援も受けて分子動力学計算専用のスーパーコンピューター“ANTON”を開発したように、欧米における産学官連携の取り組みは活発である。

遺伝子配列からの推定では、生体内タンパク質の3分の1から2分の1は膜タンパク質と考えられている。膜タンパク質は既存医薬品の標的タンパク質の約50%を占め、創薬標的として今後も重要なものと位置付けられるが、細胞膜上における複合体形成や構造変化等の複雑な機構によりその機能を発現・調節しているため、機能評価に適した試料調製が困難である等の理由により、従来の創薬手法による対象とすることには限界もあった。

こうした状況を踏まえ、本事業では、ヒト由来膜タンパク質に適した大量発現・試料調整法、生理的条件下の膜タンパク質の立体構造・機能解析技術、膜タンパク質-化合物相互作用解析技術、さらにこれら解析技術から得られる構造情報を取り込んだ計算科学技術確立し、膜タンパク質を創薬標的とした合理的な化合物設計を実現するための技術基盤の開発を目指した。さらに、講義と実習から成る「タンパク質立体構造解析 NEDO 特別講座」を開講し、開発技術を習得・発展させる人材の育成、産学の人的交流を促した。

2. NEDO の関与の必要性・制度への適合性

2.1. NEDO が関与することの意義

膜タンパク質の立体構造に基づいた医薬品リード化合物設計の難しさは、その機能発現が複雑な機構により制御されていることに依るところが大きい。すなわち、複合体形成や多様な構造変化を伴う膜タンパク質においては、化合物による機能制御に適した立体構造を高精度に推定することがリード化合物設計において最も重要となる。そのためには、生理的条件下でのタンパク質の機能発現、タンパク質間相互作用に関わる立体構造情報を取得する技術、さらにこれら情報を取り込んだ計算科学技術を効果的に連携させる必要があり、生物学、生理学、物理学、計算科学、情報工学をはじめとする多様な分野の第一線の研究者の英知を結集することが不可欠となる。さらに、産業応用を視野に入れた技術開発においては、企業も含めた一体的なオープンイノベーションを可能にする産学連携体制の構築が必要となり、そのためには国の支援の下、本事業をナショナルプロジェクトとして NEDO が実施することには意義がある。

2.2. 実施の効果

本事業の研究開発成果は、創薬標的タンパク質の立体構造に基づく合理的な医薬品リード化合物設計を汎用コンピュータによる計算科学的手法で実現するものである。これまでも15個以上の医薬品が計算科学を活用して開発されているが（表1）、本事業で開発した技術は計算科学的手法による医薬品設計を一段と高精度・高効率化するものとなり得ることから、産業界での普及が期待される。

また、あらゆる創薬標的タンパク質に適用可能な大量発現系、試料調整法の確立をはじめ、研究開発項目①～③で開発した個々の要素技術は従来の創薬手法においても極めて有用であり、創薬プロセス全般の効率向上に資するものと言える。

表1 計算科学を活用して開発された医薬品

一般名（商標）	適応症	開発元
オセルタミビル（タミフル）	インフルエンザ	ロシュ
セレコキシブ（セレコックス）	消炎・鎮痛	ファイザー
ドルゾラミド（トルソプト）	緑内障	メルク
エスシタロプラム（レクサプロ）	うつ病	ルンドベック
イマチニブ（グリベック）	慢性骨髄性白血病	ノバルティスファーマ
ダサチニブ（スプリセル）	慢性骨髄性白血病	ブリストル・マイヤーズ
ニロチニブ（タシグナ）	慢性骨髄性白血病	ノバルティスファーマ
ボルテゾミブ（ベルケイド）	多発性骨髄腫	ヤンセンファーマ
ゲフィチニブ（イレッサ）	肺癌	アストラゼネカ
エルロチニブ（タルセバ）	肺癌	OSI ファーマシューティカルズ
クリゾチニブ（ザーコリ）	肺癌	ファイザー
ラパチニブ（タイケルブ）	乳癌	グラクソ・スミスクライン
スニチニブ（スーテント）	消化管間質腫瘍、腎細胞癌、腭神経内分泌腫瘍	ファイザー
ソラフェニブ（ネクサバル）	腎細胞癌、肝細胞癌	バイエル
バンデタニブ（ザクティマ）*	甲状腺髄様癌	アストラゼネカ

* 日本では未承認

II. 研究開発マネジメントについて

1. 事業の目標

標的とする膜タンパク質の立体構造に指南された創薬戦略（SGDD: Structure-Guided Drug Development）を実現し、創薬研究を効率化する基盤技術の確立を目指して、下記のマイルストーンを設定した。

中間目標（平成 21 年度）

- 細胞膜内での生体内に近い状態での膜タンパク質およびその複合体の立体構造を解析するための技術を開発するとともに、ヒト由来（発現系）膜タンパク質およびその複合体の構造を最低 1 個解析する。
- 生体内に近い状態での膜タンパク質およ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の技術を開発するとともに、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。
- 高精度の *in silico* スクリーニングを実現するための技術を開発するとともに、産業上有用な化合物を 5 個以上取得する。

最終目標（平成 24 年度）

- 細胞膜内での生体内に近い状態での膜タンパク質およびその複合体の立体構造を解析するための技術を開発するとともに、ヒト由来（発現系）膜タンパク質およびその複合体の構造を複数個解析する。
- 生体内に近い状態での膜タンパク質およ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の技術を開発するとともに、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。
- 高精度の *in silico* スクリーニングを実現するための技術を開発するとともに、産業上有用な化合物を 10 個以上取得する

2. 事業の計画内容

2.1. 研究開発の内容

標的とする膜タンパク質の立体構造に指南された創薬戦略 (SGDD: Structure-Guided Drug Development) を実現し創薬研究を効率化する基盤技術を開発するために、以下の3つの研究開発項目および総合調査研究を実施するとともに、NEDO 特別講座を設置した。

なお、本事業の実施期間は6年間であり、平成19年度の1年間を経済産業省の直轄事業、平成20年度から平成24年度の5年間をNEDO 事業として実施した。

研究開発項目①	電子線等による膜タンパク質およびその複合体の構造解析技術
研究開発項目②	核磁気共鳴法 (NMR) 等による膜タンパク質およびその複合体とリガンド分子の相互作用解析技術
研究開発項目③	高精度 <i>in silico</i> スクリーニング等のシミュレーション技術
タンパク質立体構造解析 NEDO 特別講座	

各研究開発項目①～③は相互に連携しながら効率的なリード化合物スクリーニング手法に展開し、具体的な創薬実証研究に応用していくものとした。

以下に、各研究開発項目、総合調査研究およびNEDO 特別講座の概要を示す。

研究開発項目① 「電子線等による膜タンパク質およびその複合体の構造解析技術」

生理的機能を発揮している膜タンパク質およびその複合体の生体内に近い状態での構造を効率的に解析する基盤技術を開発した。とくに、解析が困難とされてきたヒトをはじめとする哺乳類由来の膜タンパク質およびその複合体の構造解析技術を発展させ、創薬ニーズに応える基盤技術として確立した。

(1) 膜タンパク質およびその複合体の構造解析に供する発現・精製、結晶化技術の開発

① 膜タンパク質およびその複合体の大量発現

ヒト等真核生物由来の膜タンパク質およびその複合体に関して、組み換え遺伝子技術と昆虫細胞等を用いた発現系の開発を進めて、解析が必要な膜タンパク質の発現・精製法を確立した。とくに水チャネル、イオンチャネル、GPCR など、創薬分野から期待されている膜タンパク質の構造解析を目指して大量発現・精製の研究を進めた。

② 膜タンパク質およびその複合体を細胞内に局在させて発現する方法の開発

任意の膜タンパク質およびその複合体を細胞内に局在させて発現する方法など、立体構造解析を行うために必要な発現技術の開発を進めた。

③ 解析が必要な膜タンパク質およびその複合体の精製・結晶化

解析が求められている膜タンパク質などの精製・結晶化を行った。

(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、コンピュータ解析の高速化と精密化

① 電子線トモグラフィー用極低温電子顕微鏡の開発

細胞に存在する生体内に近い状態の構造を解析することを実現するために、電子線トモグラフィー用極低温電子顕微鏡の開発を行い、これを用いた50Å程度の解析を行った。

② 電子線結晶学用プログラムの開発

2次元結晶化したヒト由来(発現系)の試料について、分解能2Åを超える精度の構造解析を可能にする電子線結晶学用プログラムを開発し、水分子や脂質分子を直接観察できる高分解能での解析を行った。

③ 単粒子解析用プログラムの開発

結晶化できない分子や複合体の構造解析を8Åの分解能で解析可能な単粒子解析用プログラムの開発を行った。さらに、細胞に存在する自然な状態での膜タンパク質およびその複合体の解析のために、高分解能の電子線トモグラフィー用コンピュータプログラムの開発を行った。

④ 2次元結晶化条件検査用自動電子顕微鏡の開発

2次元結晶化条件の検査を従来に比べ2倍以上の効率で行うために、2次元結晶化条件検査用自動電子顕微鏡の開発を行った。これにより、2次元結晶を作製する速度が向上し、構造解析が加速した。

(3) 電子顕微鏡と X 線によるタンパク質構造解析

上記で開発した技術を用いて、膜タンパク質およびその複合体の構造解析を行った。X 線結晶構造解析を用いて迅速に解析できるタンパク質複合体については、X 線による構造解析を進めた。3 次元結晶化が困難な膜タンパク質の構造解析は、電子線結晶学と単粒子解析を用いた構造解析を行い、細胞に存在する状態で電子線トモグラフィ解析も行うことで、膜タンパク質およびその複合体の自然な状態の構造解析を行った。

研究開発項目② 「核磁気共鳴法 (NMR) 等による膜タンパク質およびその複合体とリガンド分子の相互作用解析技術」

可溶化膜タンパク質のみならず、細胞膜中における膜タンパク質複合体を保持した状態でのリガンド相互作用解析を可能にする NMR 測定法、および NMR 測定用試料調製法の開発を行った。

(1) 安定同位体標識タンパク質調整系の確立

タンパク質の安定同位体標識において、試料調整法を系統化し、効率的に目的のタンパク質に適した試料調整法を探索するシステムの構築を目指した。具体的には、①安定同位体標識が可能なタンパク質発現系を系統的に選別する方法の確立、②不溶性画分でのみ発現されるタンパク質についての系統的なタンパク質巻戻し法の探索システムの確立、③得られたタンパク質 (複合体) 試料の溶液条件を検討し、NMR 測定に最適な溶液条件を高精度でかつ従来法に比べ 5 倍以上迅速に選別する手法の開発により、効率的な安定同位体標識タンパク質調製法の確立を行った。

(2) 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

構造解析へ適応可能なリガンドライブラリスクリーニングシステムなどの開発・高度化を進めるとともに、本システムに適応するため、および結合力の弱いリガンド分子の標的タンパク質結合部位を同定するための原子レベルでの相互作用解析法の開発を行うことにより、リガンドベースの創薬デザインを加速する情報を得るための技術開発を行った。また、本システムを疾患関連タンパク質複合体系に適用し、低分子リガンドおよびリガンドタンパク質と標的タンパク質の相互作用解析を行い、合理的創薬開発に供する構造情報を取得した。

(3) 細胞膜複合体相互作用解析のための NMR 試料調整法の開発

従来の膜タンパク質の構造生物学的研究では、膜タンパク質を可溶化剤により可溶化するなど、実際に膜タンパク質が機能する場とは異なる状態での解析が主流で、細胞表層に着目した研究は立ち遅れている。そこで、実際に細胞膜中で膜タンパク質が機能している状態を保持した、あるいはその状態を再構成した NMR 測定用試料調製法を開発した。

(4) 細胞膜複合体相互作用解析のための NMR 解析法の開発

細胞表層、細胞自身などを NMR 研究対象として取り上げるために、①高分子量超分子から高感度に精密な構造情報を取り出すこと、②高分子量化および液相・固相混合試料の不均一な磁化率に伴う NMR 線幅の増大を抑えることの 2 点を克服する技術を開発した。具体的には、NMR 測定装置および NMR 測定法の改良を行い、細胞表層に存在する膜タンパク質の相互作用様式が解明できる NMR 解析法の開発を行うと同時に、この手法の有効性を実証した。

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」

研究開発項目①および②から得られる膜タンパク質構造情報を活用し、*in silico* スクリーニングの精度および高速性の向上を図る新たな計算アルゴリズムとプログラムを開発し、さらに具体的な創薬開発に応用することで、開発した計算科学手法の効果を検証した。

(1) *In silico* ドッキング計算の高精度化

創薬プロセスにおける *in silico* ドッキング計算において、①タンパク質の動的性質を正しく評価するため、動的性質を抽出する手法の開発および動的構造のデータベースの設計・試作を行い、②ドッキングのスコアの精度を高めるため、タンパク質および低分子リガンドの動的構造、および各種相互作用を考慮した複合体の構造予測法および結合エネルギー算出法の開発を行った。

(2) 構造生理学アプローチによるタンパク質間相互作用解析

タンパク質は、タンパク質間の相互作用とそれに基づく超分子複合体として高度な生命現象を維持しているため、タンパク質間相互作用および超分子複合体の構造情報まで含めた詳細な解析「構造インタラクトーム」に踏み込み、タンパク質間相互作用の阻害等の創薬において有用な機能を有するものの活性の維持等の観点から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低分子化合物等へ展開するため、ペプチドと同様あるいはそれ以上の強い結合性を有する非ペプチド性化合物（低分子化合物等）を探索・設計する新しい手法の開発を行った。

(3) 創薬開発への応用促進に向けた技術開発

計算の高効率化と高速性が発揮できるアルゴリズムとプログラムの実装法の開発、専用ボードの利用、リガンド・データベースや計算結果を整理したデータベース等の開発を推進した。また、本研究開発のチーム間だけでなく、製薬企業と研究協力を行って具体的な創薬実証研究を実施した。さらに、開発したプログラムやデータベースを公開し、研究開発成果を広く社会に還元し、ウェブサイトから最新のプログラム、データ、情報を得られる仕組みとした。

総合調査研究

本事業に関連する技術動向の調査を行うとともに、研究開発成果を産業化につなげるための普及活動を行った。

タンパク質立体構造解析 NEDO 特別講座

本事業において開発した基盤技術の産業界への普及、人材育成および産学の人的交流を図るため、社会人等を対象に、講義と実習から成る以下の講座を設置した。

○ 「構造生物学講座」

設置大学： 京都大学、名古屋大学

講座代表者： 名古屋大学細胞生理学研究センター 藤吉 好則 教授

○ 「分子認識解析講座」

設置大学： 東京大学

講座代表者： 東京大学大学院薬学系研究科 嶋田 一夫 教授

○ 「タンパク質計算科学講座」

設置大学： 大阪大学

講座代表者： 大阪大学タンパク質質研究所 中村 春木 教授

2.2. 研究開発の実施体制

本事業の研究開発責任者（プロジェクトリーダー）を名古屋大学細胞生理学研究センターの藤吉好則教授とした。

本事業は、平成 19 年度の 1 年間を経済産業省の直轄事業、平成 20 年度から平成 24 年度の 5 年間に NEDO 事業として実施した。

NEDO 事業としての平成 20 年度～21 年度は、社団法人バイオ産業情報化コンソーシアム（JBIC）を研究開発実施者として、独立行政法人産業技術総合研究所バイオメディシナル情報研究センターに集中研を設置するとともに、バイオ関連企業内に JBIC 分室を設置して課題解決型連携を行った。さらに、大学および研究機関を JBIC の共同研究先とした（図 1）。

平成 22 年度以降は、JBIC、大学および研究機関を研究開発実施者とし、前年度までと同様に JBIC 内に集中研および課題解決型連携のための企業内 JBIC 分室を設置する研究実施体制を構築した（図 2）。

図1 平成20年度～平成21年度の実施体制図

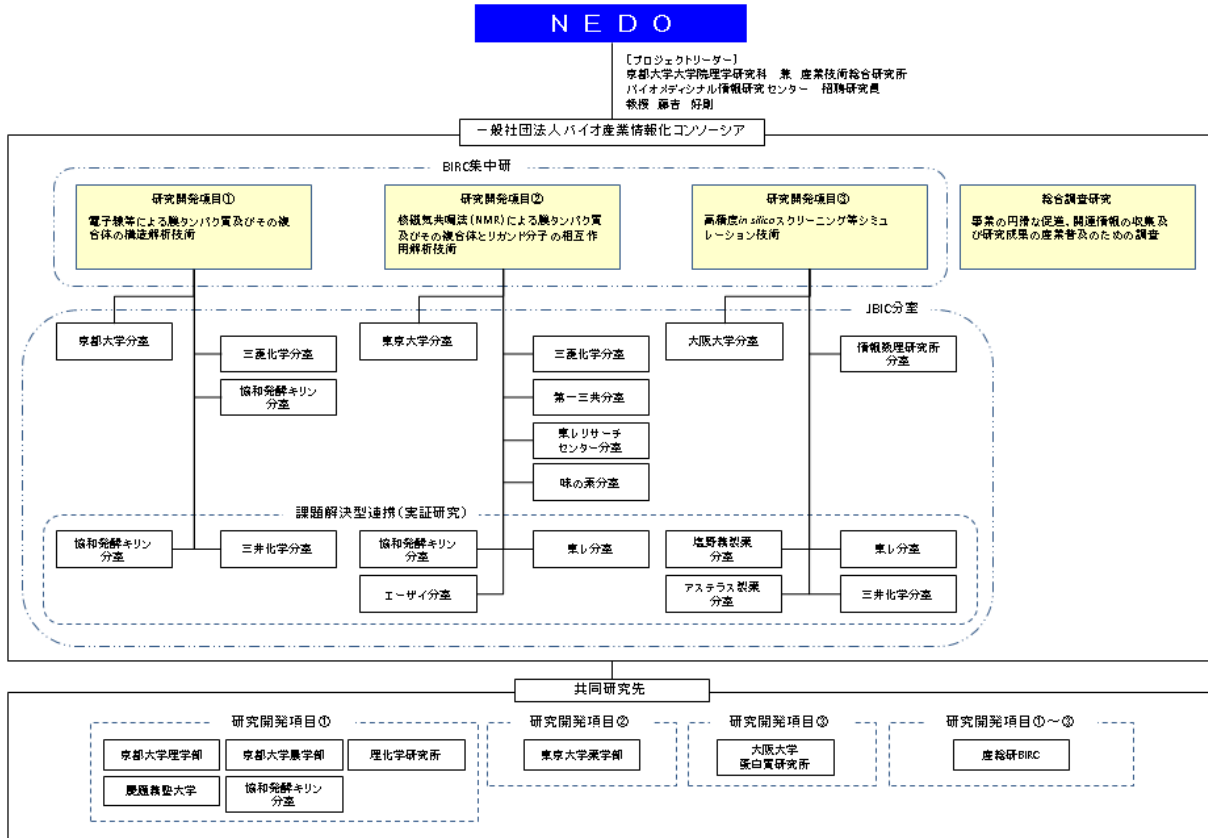
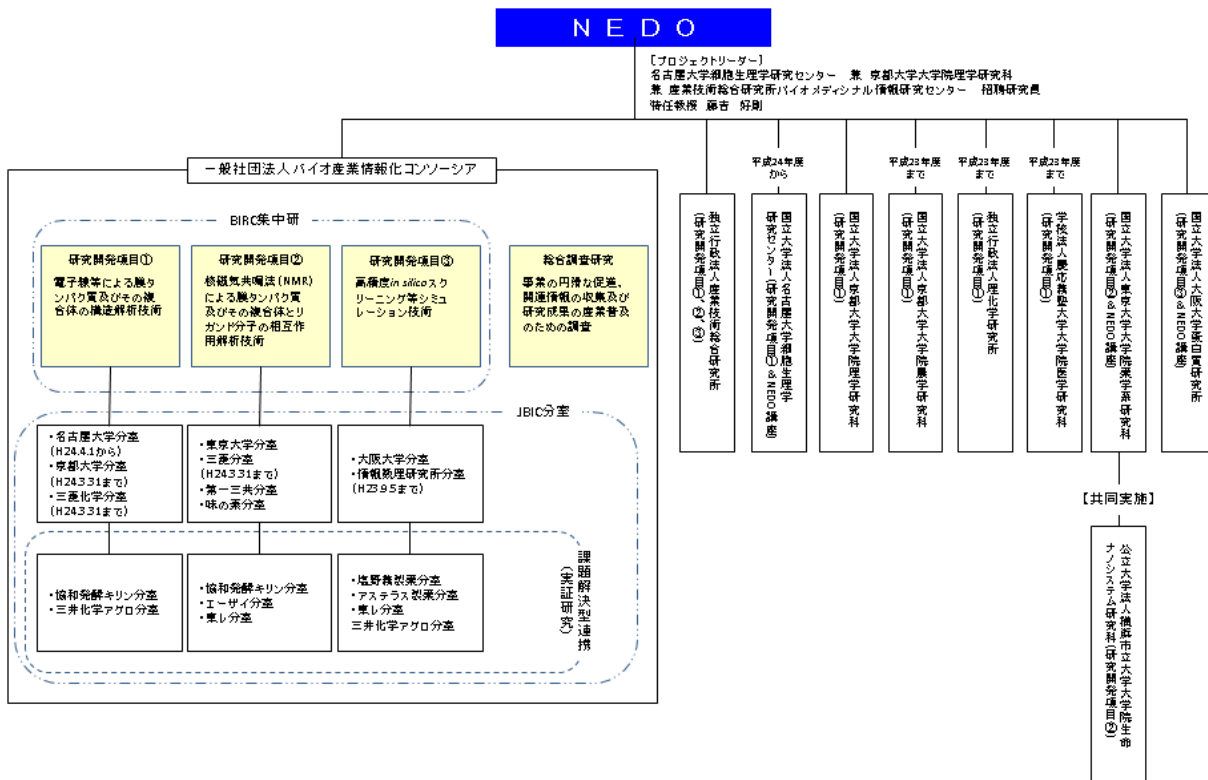


図2 平成22年度～平成24年度の実施体制図



2.3. 研究開発の運営管理

本事業を効率的かつ効果的に遂行するために、プロジェクトリーダーを委員長とする研究推進委員会を年度毎に開催し、研究開発の進捗・成果を実施者間で共有するとともに、課題とその後の研究開発方針につき検討した。

- 平成 20 年度研究推進委員会 平成 21 年 1 月 30 日開催
- 平成 22 年度研究推進委員会 平成 23 年 1 月 28 日開催
- 平成 23 年度研究推進委員会 平成 23 年 11 月 24 日開催
- 平成 24 年度研究推進委員会 平成 24 年 11 月 26 日開催

平成 21 年度は NEDO による中間評価にて研究開発の進捗・成果、課題および今後の方針を確認したため、研究推進委員会を開催しなかった。

2.4. 研究開発成果の実用化に向けたマネジメントの妥当性

研究開発成果に係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 25 条の規定等に基づき、原則として、全て研究開発実施者に帰属させるものとした。

社団法人バイオ産業情報化コンソーシアム（JBIC）においては、知財に関する規約を定め、実用化に向けた戦略を踏まえて参画企業の権利範囲を明らかにした上で、参画企業とアカデミアの共同で特許出願することを原則とした。

3. 情勢変化への対応

本事業に関連する技術動向を踏まえ、研究開発の効率的な推進および成果創出促進のために、下記の通り研究開発予算の追加配賦を実施した。

- 平成 21 年 12 月 加速等追加配賦制度により 70 百万円配賦

研究開発項目①において、ギャップ結合近傍の細胞内でベシクルと呼ばれる袋状の構造体が連続的に並んでいることを世界で初めて発見し、この発見を新たな創薬シーズに早急に発展させるために、構造体の解析に必要となる電界放出型走査電子顕微鏡を導入した。さらに、研究開発項目③において開発中のソフトウェアの演算速度・処理能力を向上させるために、複数の演算プログラムを並行して適用し最適なプログラムの選択を可能とする PC クラスタ型サーバ計算機を増設した。

- 平成 22 年 4 月 加速等追加配賦制度により 120 百万円配賦

本プロジェクトの成果普及の一環と位置付けた NEDO 特別講座を、平成 22 年度も引き続き実施するものとした。

- 平成 22 年 10 月 加速等追加配賦制度により 50 百万円配賦

研究開発項目②において開発中の相互作用解析技術の汎用性を高めるために、ペプチドホルモン等の低分子リガンドも解析対象とすることが可能な高感度 SPR 装置を導入した。

- 平成 24 年 4 月 加速等追加配賦制度により 920 百万円配賦

本プロジェクトに対する平成 24 年度一般会計予算が大幅に削減されたため、加速資金の配賦により当初の計画通りに研究開発を遂行した。

- 平成 25 年 4 月 開発成果創出促進制度により 30 百万円配賦

本プロジェクトの研究開発項目①～③は平成 24 年度をもって終了したが、開発された基盤技術は今後の創薬の合理化に必須なものになると考え、本プロジェクトの成果普及に加え、産業界との意見交換も行いながらプロジェクト成果の応用展開を検討するために、平成 25 年度も NEDO 特別講座を継続するものとした。

4. 中間評価結果への対応

中間評価においては、本研究開発成果を生かした創薬加速の実績をある程度公表することが求められた。これを受け、 μ オピオイド受容体を標的とした鎮痛・鎮静薬のリード化合物を、製薬企業との共同で、計算科学により効率的に取得した実績をプレスリリースした。

また、創薬標的として産業界に大きな影響を与えるような膜タンパク質を見出し、世界に先駆けて構造解析することが期待された。本プロジェクトにおいては、癌治療薬の標的となり得る G タンパク質共役型受容体（膜タンパク質）の精緻な立体構造の解析に成功するとともに、G タンパク質共役型受容体のダイナミックな構造変化に基づく機能発現メカニズムを解明し、世界に先駆けて論文発表す

ることができた。

5. 評価に関する事項

NEDO 事業として、平成 20 年 2 月に事前評価、平成 21 年 8 月に中間評価を実施した。

III. 研究開発成果について

1. 事業全体の成果

研究開発項目①においては、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を行う基盤技術の開発を進めた。さらに、膜タンパク質構造解析のための電子顕微鏡法を中心とする技術開発や装置開発を行った。本研究開発項目で開発した極低温電子顕微鏡、結晶解析用プログラム等を用いて得られた主な成果は以下の通りである。

脳で多くの発現が確認されている水チャネル aquaporin-4 (AQP4) 変異体の 2 次元結晶を作製し、電子線結晶構造解析により 2.8 Å 分解能で解析した。その密度図は、X 線結晶学による 1.8 Å 分解能の解析 (J.D. Ho et al., PNAS, 106, 7437-7442, 2009) より高い精度でチャネル内の水分子を分離して可視化することに成功した。また、脂質分子の構造解析にも成功した。その結果、水チャネルの速い水透過と高い選択性の分子機構を説明する H-bond isolation 機構を実証することができた。AQP4 は脳浮腫の原因となることが知られている。AQP4 の水透過を阻害する分子を探索した結果、ラット由来の AQP4 阻害剤 (アセタゾールアミド: AZA) を同定した。AQP4 とその阻害剤との複合体構造を解析し、その複合体構造に基づいて、より効果的な AQP4 阻害剤の開発も進めた。

ギャップ結合チャネル Cx26 の M34A 変異体の電子線結晶学による解析と野生型の X 線結晶学による解析によりプラグ構造を解明し、チャネルのプラグゲーティング機構を提案した。Cx26 の M34A 変異体の電子線結晶学による解析の分解能を向上させることにより、Cx26 の N 末端の 6 本のヘリックスが同じ深さでチャネルの中に挿入されているのではなく、上下 2 層になってプラグが形成されていることを解明した。無脊椎動物においては、イネキシンというギャップ結合を形成する分子が神経や筋肉のシグナル伝達において重要な役割を担っていることがわかっている。このイネキシンのギャップ結合チャネルの構造を電子線トモグラフィで解析した。また、極低温電子顕微鏡を用いた構造研究から、イネキシン INX-6 が作るギャップ結合チャネルは、コネキシンのそれより本質的に大きいことが明らかになった。

多層膜 2 次元結晶の解析用プログラムを改良し、上記 AQP4 や Cx26、 H^+, K^+ -ATPase 等の高分解能解析を可能にした。 H^+, K^+ -ATPase は、100 万倍という胃のプロトン勾配を作り出すことができる ATP 駆動型プロトンポンプである。電子線結晶学を用いた構造解析により、 E_2P から E_1P への逆回転を \textcircled{a} -subunit の N 末端が止めることが確認された。N 末端を除いた変異体は逆回転してしまうことが確認できたので、このような大きなプロトン勾配に逆らってポンピングすることができる H^+, K^+ -ATPase の機構としてラチェットモデルを提案した。さらに、胃酸分泌抑制剤候補となり得る複数の H^+, K^+ -ATPase 阻害剤との複合体構造も効率よく解析できるようになった。

本プロジェクトで開発した極低温電子顕微鏡は、膜タンパク質が自然な脂質膜の中にある状態での構造情報を高分解能で取得することができるため、この方法は構造に指南された創薬基盤技術として強力な方法となってきた。

研究開発項目②においては、核磁気共鳴法 (NMR) を用いたタンパク質間相互作用解析法の開発および実証研究を行った。主な成果は以下の通りである。

放線菌由来カリウムチャネル KcsA のイオン透過機構を解明した。KcsA は細胞内 pH に応答して開閉するカリウムチャネルである。中性ではイオンを通さない閉状態をとるが、開状態の pH 5 以下では一過性のピーク電流を示した後減衰し定常値に達する。単一チャネル解析の結果から、開状態では K^+ を透過する活性化状態と透過しない不活性化状態の間の平衡にあることが示唆されている。これまでに閉状態を取る KcsA の結晶構造が明らかにされ、膜貫通領域に形成される K^+ 透過路上に K^+ の透過を阻む helix bundle crossing と、その選択性を担う selectivity filter の 2 つのイオンゲートが存在することが示されている。また、変異体を用いた解析などから、開状態では helix bundle crossing が開くことが示唆されている。そこで、NMR を用いて開状態における不活性化の機構を動的構造の観点から解析した。その結果、閉状態では selectivity filter の K^+ 親和性が高く、 K^+ 濃度が数 mM の低い細胞外側から K^+ を捕捉できるため、生理的な条件下においては通常 selectivity filter に K^+ が結合している。酸性刺激によって helix bundle crossing が開き、selectivity filter が構造変化して K^+ 親和性が低下すると、活性化状態と不活性化状態の平衡が開始することを解明した。

G タンパク質共役型受容体 (GPCR) のシグナル伝達機構を解明した。GPCR は 7 回膜貫通構造を有する膜タンパク質ファミリーの 1 つであり、最大の創薬のターゲットでもある。GPCR はリガンドが存在しない状態でも G タンパク質を介したシグナルを惹起し (basal activity)、またリガンド結合によるシグナル伝達活性の強度 (efficacy) はリガンドによって異なることが知られている。これらの現象

は、他の受容体では見られない GPCR の機能的特徴である。リガンドは efficacy によって、full agonist、partial agonist、neutral antagonist、inverse agonist に分類され、これらは病態により使い分けられている。例えば、 β_2 アドレナリン受容体の場合、full agonist は partial agonist よりも急性の喘息に対してより有効である。したがって、efficacy の理解は GPCR 創薬において重要である。これまでに様々なリガンドに結合した GPCR の結晶構造が明らかになっているにもかかわらず、リガンドごとに efficacy が異なる機構は明らかではない。そこで、NMR を用いて、 β_2 アドレナリン受容体を解析対象とし、シグナル制御機構を明らかにした。その結果以下のことが判明した。

- i. β_2 アドレナリン受容体は、2 種類の不活性化状態と活性化状態の間の動的平衡状態にある。
- ii. Basal activity は動的構造平衡により生じる少量の活性型により生じる。
- iii. Efficacy の異なるリガンドはこの平衡をシフトさせ、inverse agonist、neutral antagonist、partial agonist、full agonist の違いは、活性化状態の割合の違いに起因する。

と結論した。GPCR においてはシグナル伝達に関わる膜貫通領域の構造変化様式は共通しており、本解析結果は多くの GPCR のシグナル制御機構を解明する上で普遍的な知見を与える。

研究開発項目③においては、structure-based drug screening (SBDS) と ligand-based drug screening (LBDS) の全体がつながるように、新規アルゴリズムに基づく計算機ソフトウェアや GPU を利用した高速分子動力学ソフトウェアの開発を行う一方、実験データと理論計算の融合による双方の長所を生かしたタンパク質-化合物複合体予測方法やタンパク質-タンパク質複合体予測手法などを新たに開発するとともに、myPresto version[®] 4.2 として継続的に一般に公開した。化合物データベースとしては、2,000 万化合物の 3 次元構造モデルのデータベース化を行い、さらに新たに開発した水溶解度推定手法を適用して溶解度、非特異的相互作用を有する確率、発がん性データを付加し、LigandBox として公開・配布すると同時に、独自の手法による高速類似化合物検索機能を持つウェブサイトも公開した。また、 μ オピオイド受容体をはじめとする創薬標的膜タンパク質に対して、これまでに開発した計算手法を適用した実証研究を行い、多くの新規活性化化合物を見出した。

事業全体の成果のまとめ

目 標	研究開発成果	達成度
事業全体	世界最高レベルの膜タンパク質構造解析技術、タンパク質間相互作用解析技術、計算科学技術を確立し、創薬標的タンパク質の立体構造に基づく医薬品リード化合物の効率的な探索を実現する創薬基盤技術を開発した。	達成
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」	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世界最高の分解能で解析するための技術を開発した。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3個以上解析した。	達成
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」	不均一系における膜タンパク質複合体、および細胞表面における生体内に近い状態での膜タンパク質複合体の相互作用解析のための NMR 測定法を開発し、6個の創薬標的膜タンパク質について、タンパク質複合体もしくはリガンド複合体での相互作用情報の取得に成功した。	達成
研究開発項目③ 「高精度 <i>in silico</i> スクリーニング等のシミュレーション技術」	高精度の <i>in silico</i> スクリーニング技術を開発し、業界標準であるソフトウェアに対する優位性を確認した。その手法により、 μ オピオイド受容体アゴニストや農薬のシードとなる化合物、インフルエンザウィルス RNA ポリメラーゼ PA-PB1 複合体阻害剤など、有用な化合物を総計 30 個以上取得した。	達成

年度毎の特許、論文、学会発表の件数

区分 年度	特許出願			論文 (査読付き)	学会発表
	国内	外国	PCT [※] 出願		
H19FY	0件	0件	0件	5件	2件
H20FY	1件	0件	0件	46件	88件
H21FY	0件	0件	0件	54件	53件
H22FY	1件	0件	1件	60件	121件
H23FY	0件	0件	0件	60件	112件
H24FY	0件	0件	0件	58件	43件

※Patent Cooperation Treaty：特許協力条約

2. 研究開発項目毎の成果

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」

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

① 組み換え遺伝子技術と昆虫細胞等による発現系を用いたヒト等真核生物由来膜タンパク質の発現・精製法、構造安定化法の開発

水チャンネル、イオンチャンネル、GPCR など、創薬分野からその構造情報が期待されている膜タンパク質の構造解析を目指して、大量発現・精製の研究を進めた。具体的には、脳に発現する水チャンネル AQP4 とその変異体、ギャップ結合チャンネル Cx26 とその変異体、ヒトエンドセリン受容体、特に ET_BR とそのキメラや変異体につき、昆虫細胞を用いた発現と精製を実施した。その結果、図 1 に示すように、発現・精製を安定に行う技術を確認した。また、GPCR の構造安定化変異体開発、安定化キメラ作製技術の開発も進めた。

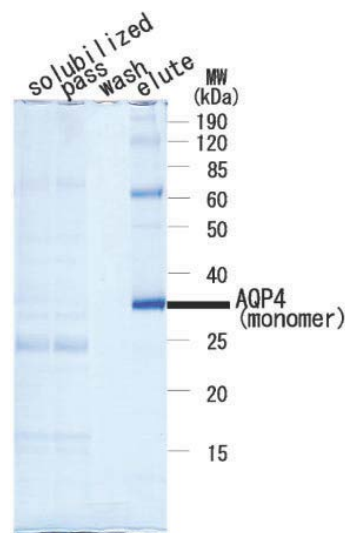


図 1 ヒスチジンタグ配列を付加した AQP4 を昆虫細胞 SF9 を用いて発現し、界面活性剤オクテチルグルコシド (OG) を用いて可溶化し、ヒスチジンのアフィニティー精製した結果、3L カルチャーにより 10mg 以上の AQP4 が精製できる。モノマーの位置以外にもバンドは観察されるが、これは水チャンネルが本来 4 量体で機能していることを反映している。他に顕著なバンドが見られないことからわかるように、昆虫細胞の発現系を用いて、高い精製度で構造と機能研究に必要な量の AQP4 が安定に発現・精製できている。

② 膜タンパク質の 2 次元結晶化法の開発

2 次元結晶化法の開発は、AQP4 とその変異体、Cx26 の変異体、イオンチャンネル、H,K-ATPase、液胞型 ATPase (V-ATPase)、GPCR、ミクロソーム型プロスタグランジン E 合成酵素 1 (MPGES1) 等を用いて実施した。図 2 に示すように、2Å より高い分解能の回折像を与えるような 2 次元結晶を作製した。その結果、AQP4 とその阻害剤候補化合物複合体やギャップ結合チャンネル Cx26、Na⁺チャンネル、H⁺,K⁺-ATPase、液胞型 ATPase (V-ATPase)、MPGES1 等の 2 次元結晶を作製することができた。

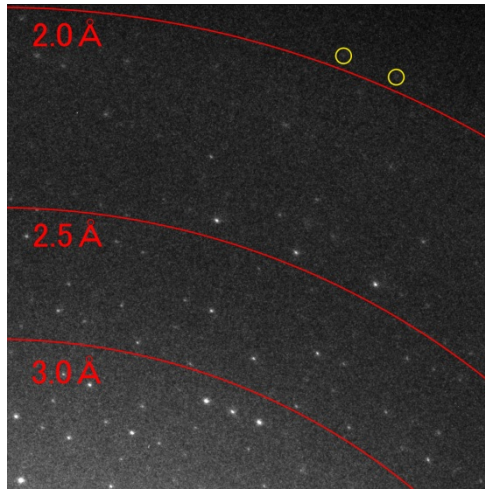


図2 AQP4の2次元結晶からの電子線回折像。丸で示すように、2Å分解能以上の回折点が観察される。

(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、コンピュータ解析の高速化と精密化

① 電子線トモグラフィー用極低温電子顕微鏡の開発

トモグラフィー用極低温電子顕微鏡として、トップエントリー式高分解能極低温電子顕微鏡に適した傾斜機構つき極低温電子顕微鏡を開発した。なお、この装置の低温ステージは外部制御の試料傾斜装置を備えているのみならず、傾斜軸からずれた位置にある試料部分を観察する場合に、傾斜によって試料位置がずれるのを補正するZ軸制御機構も備えている(図3)。

これを用いて、細胞に存在する生体内に近い状態のギャップ結合の構造を解析するための傾斜シリーズの撮影を行った。電子線トモグラフィー解析を行うことにより、ギャップ結合の立体構造を解析した。その立体構造のスライス像を図4に示す。この像からわかるように、脂質二重膜の構造を分離して観察できており、30Åより高い分解能の解析に成功したことを示している。

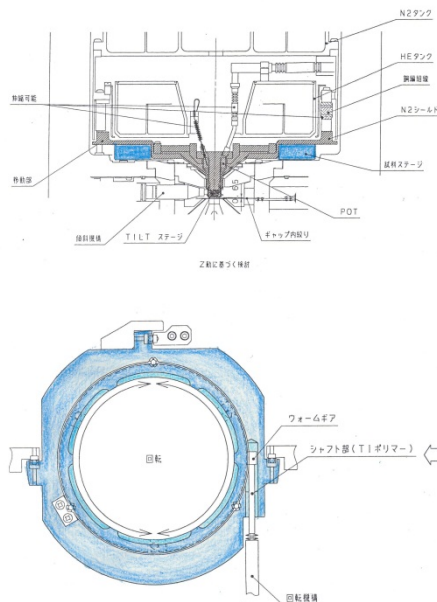


図3 試料の高さを任意に調節できるZコントロール機構を備えた極低温ステージ。外からの回転運動で、試料の高さを調節して変化させられる。

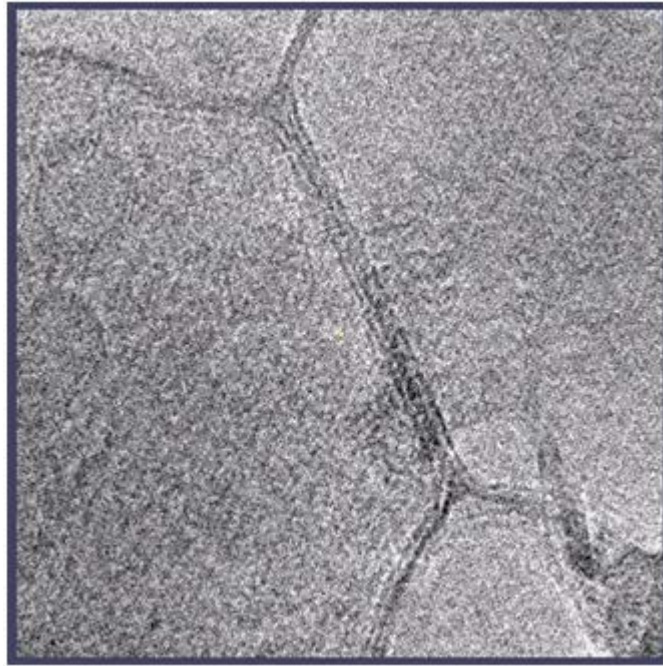


図 4 ギャップ結合部分の電子線後モグラフィ像から計算されたスライス像。立体構造のある高さ部分の構造をコンピュータ計算による切片で示したスライス像。ギャップ結合部を含む 2 つの膜が形成するギャップ結合部が観察され、脂質二重膜が分離して観察できる(2層の間隔は 30 Å 程度であり、それが綺麗に分離して観察される。それゆえ、解析された分解能が世界最高の 30 Å ということもできる)。また、1 方の側にはベシクルが繊維状7数本のコントラストとして観察できる。

② 高分解能構造解析を可能にする電子線結晶学による構造解析システムの開発

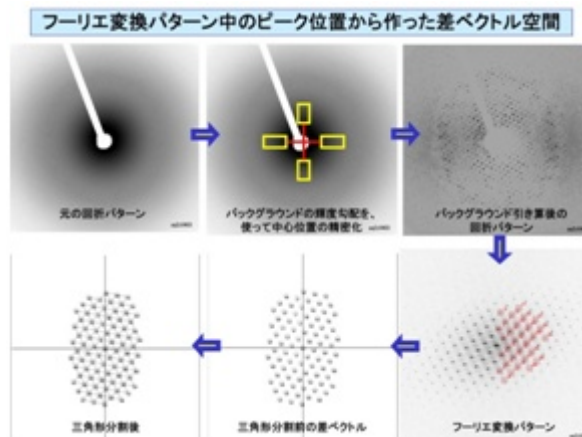


図 5 電子線回折像のピークを探索して自動的に指数付するコンピュータシステム。

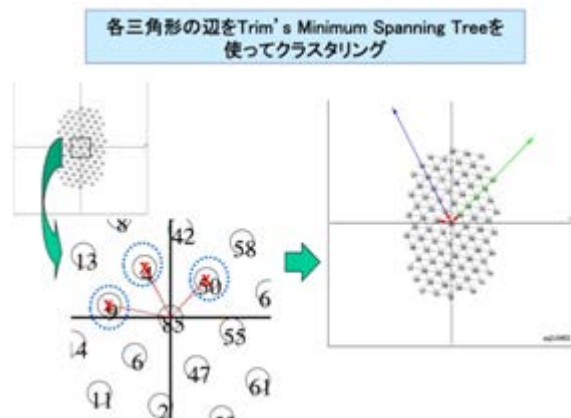


図6 電子線回折像の指数付を自動で行うためにクラスタリング計算を行う。

逆格子定数の精密化とその結果

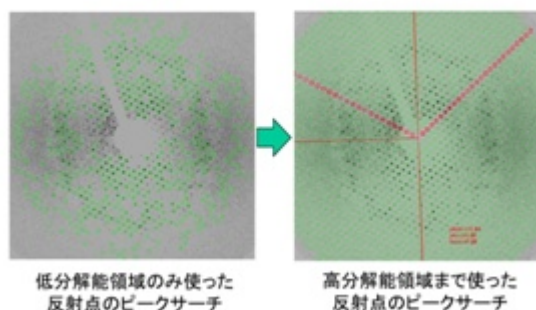


図7 電子線回折像のピークサーチを低分解能領域で行い、より高い分解能領域に広げていく自動ピークサーチシステム。

Manual indexing vs. Autoindexing

所要時間: Manual indexingで数分がAutoindexing~10秒に、
しかも、2 Åを超える解析を可能に

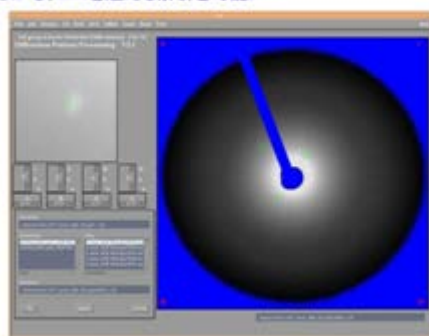


図8 電子線回折像の指数付を手動で行うと、熟練した研究者でも数分を要するが、本プロジェクトで開発した自動指数付では、10秒程度で行うことができる。

上記図5~8のように、2次元結晶化したヒト由来（発現系）の試料について、構造解析（分解能2 Åを超える精度）を可能にする効率の良い電子線結晶学用プログラムを開発した。

このコンピュータシステムを用いると、熟練した研究者でも数分以上かかる電子線回折像の指数付を10秒程度で行うことができるようになった。しかも、人為的間違いが生じないので、正確で速く高分解能の構造解析を進めることができる。

電子顕微鏡像の解析についても、効率よく正確に解析できる画像解析用コンピュータシステムを開発した。さらに、安定性が高く、電子線損傷を室温に比べて大幅に軽減できる極低温電子顕微鏡システムを用いて、高分解能のデータ収集が高効率で可能になる。2次元結晶を極低温電子顕微鏡用試料と

して作製するための技術も開発しているので、本プロジェクトで開発した解析コンピュータシステムを用いると、図9で示すように、水チャネル AQP4 のチャネル内の 8 個の水分子を分離して観察できるようになった。この解析に基づいて、我々が提案した H-bond Isolation 機構が正しいことを実証した。さらに、図 10 で示すように脂質分子の直接観察を可能にする高分解能解析を実現した。

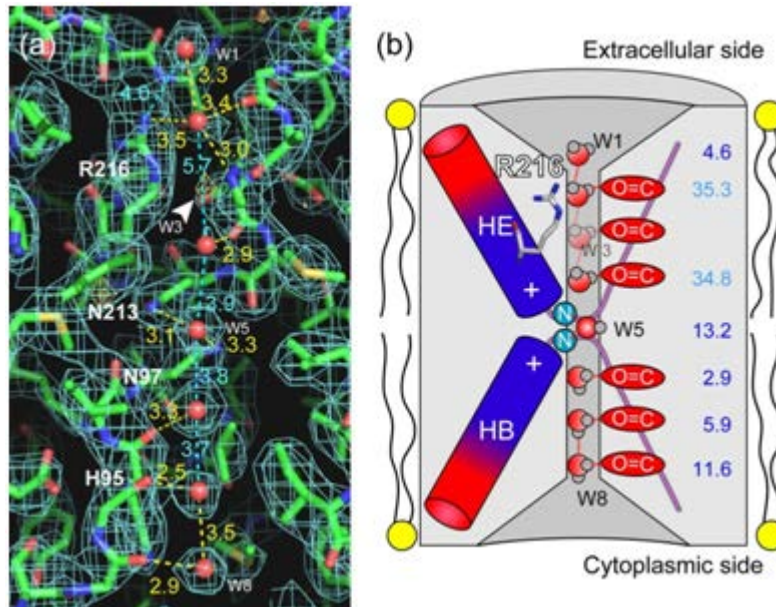


図9 AQP4 のドーパミンシグナルによるリン酸化をミミックする変異体の高分解能の構造解析から、チャネル内の全ての水分子、8 個をきれいに分離して観察するのに成功した。この解析によって、P. Agre 氏のノーベル賞の理由となった H-bond Isolation 機構は、当時はモデルとして提案したのであるが、これを完全に実証できた。

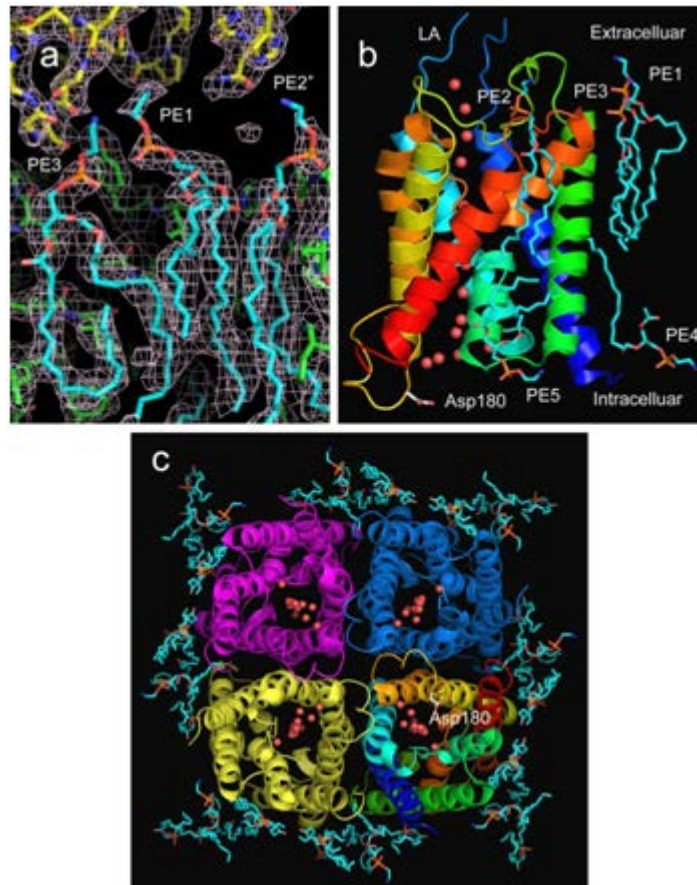


図 10 AQP4 の高分解能の構造解析により解析された、結晶内の脂質分子の構造 (a)。1 サブユニットの AQP1 分子とそれに結合した脂質分子 (b)。4 量体の構造と脂質分子を細胞内側から見た構造 (c)。高分解能の解析によって、水分子と共に、脂質分子の構造もきちんと分離して観察された。この解析から、AQP4 がアレイ構造を安定にとる場合の脂質分子との相互作用機構が解明されただけでなく、AQP4 分子が細胞外側で、反対の膜に存在するホスファチジルエタノールアミン (PE) と直接結合している構造も解明された。

③ 単粒子解析法

結晶化できない分子や複合体の構造解析を 8Å の分解能で解析することを目指して単粒子解析用プログラム開発を行った。しかし、単粒子解析に関しては、例えば、産総研と行った膜タンパク質 P2X の単粒子解析 (K. Mio et al., *Structure*, 17, 266-275, 2009) において、その構造解析に明らかに大きな誤りが含まれていた。残念ながらその理由は明確にされなかった。この様な状況で、膜タンパク質を単粒子解析法で解析して創薬加速に活用するのは危険が伴うことが心配された。しかも、単粒子解析法を用いる場合には、膜タンパク質を界面活性剤で可溶化した状態で構造解析することになる。この点も問題なので、当初の目標を変更すべきと考えた。それゆえ、比較的悪い小さい 2 次元結晶からでも効率よく構造解析出来る技術開発を目指す方向に、目標を変更することとした。その結果、良い大きい結晶の作製が困難な H^+, K^+ -ATPase の場合のように電子線回折像を撮影することができないような小さい 2 次元結晶からでも、非常に効率よく 8Å より高い分解能の解析ができるようになった。さらに、細胞に存在する自然な状態での膜タンパク質及びその複合体の解析のために、高分解能の電子線トモグラフィー用コンピュータプログラムの開発を日本電子との協力で行った。

④ 2 次元結晶作製法、2 次元結晶化条件探索自動システム開発

2 次元結晶化条件の検査を従来に比べ 2 倍以上の効率で行うための、2 次元結晶化条件検査用自動電子顕微鏡の開発を行った。2 次元結晶の作製はその条件検討を電子顕微鏡で行う必要があるために、光学顕微鏡を用いて容易に結晶化状態を観察できる 3 次元結晶より効率が悪くなってしまふ。この問題を軽減するために、2 次元結晶化条件を効率よく検索できる自動電子顕微鏡システムを図 11 のように

開発した。これによって、結晶化条件探索効率を2倍以上に向上させることができた。さらに、高性能 CCD とそれを制御するコンピュータプログラムを開発することにより、2次元結晶を作製する速度を飛躍的に向上させるとともに、実際に極低温電子顕微鏡を用いてデータ収集するシステムとしての効率も向上した。これらのシステムを活用して、図9や図11のような構造解析の効率とその質の向上という目標を達成した。



図11 2次元結晶化条件を探索するために、画像を自動で撮影し蓄積する自動電子顕微鏡を開発した。

(3) 電子顕微鏡と X 線による膜タンパク質の構造解析

上記(1)および(2)で開発した技術を用いて膜タンパク質、およびその複合体の構造解析を行った。以下の具体的な例で示すように、電子線結晶学を用いることによって、膜タンパク質の構造を生理的に近い状態で解析し、X線結晶構造解析を用いて迅速に解析できるタンパク質複合体についてはX線による構造解析を進めた。3次元結晶化が困難な膜タンパク質の構造解析は電子線結晶学を用いた構造解析を行い、図5に示したように、細胞に存在する状態で電子線トモグラフィーの解析も行うことで、膜タンパク質およびその複合体の自然な状態の構造解析を実施した。

① 水チャネル AQP11

水チャネル AQP11 はロックアウトすることにより多嚢胞性腎炎が生じることが知られている。AQP11 の発現系を確立し、水の透過性の測定を行った結果、このタイプの水チャネルはほとんどの水チャネルで保存されている NPA 配列の1つが NPC であるが、水を透過できることを明らかにした(図12)。なお、最も遅く発見された AQP12 も AQP11 と同じように、1つの NPA 配列が NPT となっているが、我々の測定結果は AQP12 も水チャネルである可能性を示唆している。

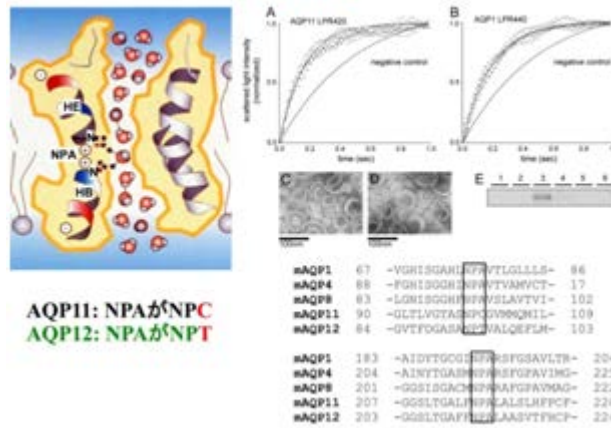


図 12 AQP11 は水チャネルファミリーでほとんど完全に保存されている NPA 配列が NPC であるが、水を透過する水チャネルであることが解明された。

② 電位感受性 Na⁺チャネル

バクテリア由来の様々な Na⁺チャネルの発現系を確立し、イオン選択性とゲーティング機構の解明を目指して電位感受性 Na⁺チャネルの構造と機能解析を進めた結果、電位感受性ドメインは横方向に大きく動くことができることが明らかになった。また、電位感受性ドメインの S4 ヘリックスが膜電位によって上下に動くことを S-S 結合を形成させる系統的な変異実験によって明らかにした。そして、入手できる出来る限り多くの電位感受性 Na⁺チャネルを比較することによってゲーティングに関わるモチーフと不活性化に関わる要素を明らかにした。さらに、Na⁺チャネルの C 末端の構造を解析することによって、この部分が形成する 4 本のヘリカルバンドルとその安定性が不活性化を加速することを解明した。電位感受性 Na⁺チャネルの 2 次元結晶を作製して、電子線結晶学による構造解析研究を進めた結果、電位感受性 Na⁺チャネルの 2 つのコンフォメーションの構造を解析した (図 13)。この解析では、不活性化状態の細胞質側の構造が 2 つのコンフォメーションで確実に異なることを示しており、鎮痛薬を開発する場合に、この細胞質側の部分を標的にすると良いという可能性が示唆された。

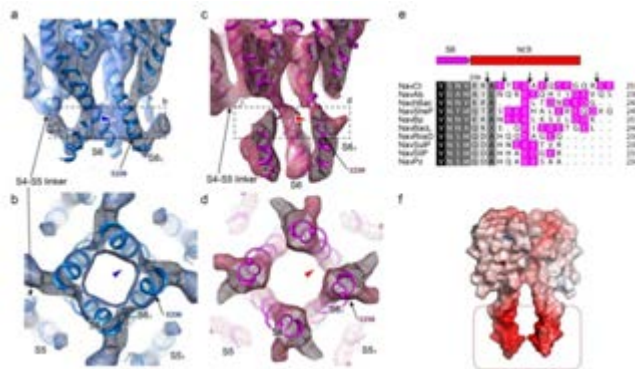


図 13 電位感受性 Na⁺チャネルが不活性化状態にある時の 2 つのコンフォメーションの構造。細胞質側の構造は不活性化状態特異的な構造を形成するので、この部分を標的とする創薬は、ありうと思っている。なお、電位感受性 Na⁺チャネルにはこの近傍に負に帯電したアミノ酸クラスターがあり、これが Na⁺チャネルの活性にとって重要であることが解明された。

③ ギャップ結合チャネル

心筋細胞が同期して機能するのも、ウイルスが感染した細胞の隣の細胞も免疫提示を行い Killer T-cell により除外されるのも、ヌクレオチドや、cAMP、IP3、アミノ酸、イオン、そしてペプチドが透過できるのも、さらに電気シナプスが速い情報伝達を行えるのも、ギャップ結合チャネルの働きが関わってなされている。我々は電子線結晶学により、難聴などの病気と関係がある変異 M34A を有する

ヒト由来のコネキシン 26 (CX26) の構造を解析してプラグゲーティングモデルを提案していたが、月原研との共同研究により野生型の構造を解明して、チャンネルが開いた状態と思われる構造を解析した (図 14)。この原子モデルを構築できる分解能での構造解析から、コネキシンの構造に関して混乱した状況に終止符をうつことができたので歴史的成果を得たといえる。この構造から、プラグを形成するヘリックスのトリプトファンが隣のサブユニットの 1 番目の膜貫通ヘリックスにあるメチオニン 34 と相互作用してチャンネルが開いた構造を保っていることが考えられ、この 34 番のメチオニンをアラニンに変異すると電気生理学的測定でこのチャンネルが閉じた状態をとることを確認した。ギャップ結合チャンネルは複雑なゲーティング制御を受けることが分かっているが、X 線結晶構造解析で構造解析するためには 3 次元結晶を作製する必要がある。細胞質側が強く相互作用することで 3 次元結晶が形成されているために、X 線結晶学を用いた構造解析では、細胞質側の構造は乱れて解析することができなかった (図 15)。ところが、この細胞質側はギャップ結合チャンネルの複雑なゲーティング制御機構に中心的に関わっていることが予想されている。一方、2 次元結晶を作製したところ、図 15 の真ん中に示すように、3 層の膜から結晶が形成されており、2 番目 (M2) の膜にあるギャップ結合チャンネルは、1 番目と 3 番目 (M1 と M3) の膜によって、外部の影響による変形から守られている。それゆえ、複雑なゲーティング機構を理解するためだけでなく、このギャップ結合チャンネルを標的とする創薬を考えるとときには、細胞質側の構造解析が極めて重要である。実際に図 15 に示すように細胞質側の複雑な構造が解析された。非常に興味深いことに、コネキシンは 6 量体でギャップ結合チャンネルを形作っているため、6 本の N 末端側のヘリックスによりプラグが形成されていると考えられる。この 6 本の短いヘリックスはチャンネルの同じ深さに挿入されているのではなく、4 本が深く挿入され 2 本が浅く挿入されている (図 15)。ギャップ結合チャンネルは、1kD を超えるペプチドなど比較的大きい分子を透過するが、電気シナプスでは非常に速いゲーティングを行うことが知られている。この大きく開いたチャンネルで速いゲーティングを行うという機能を両立させるのは困難だと思われるが、このプラグの 2 層構造は、その機能をうまく説明する。すなわち、6 本のヘリックス全てが、X 線結晶学によって解析された構造のようにメチオニンの 34 番と相互作用する位置に上がっていると、チャンネルの直径は 14Å 程度と大きな“穴”を開けることができる。一方、6 本のヘリックスの 1 本 (例えば浅く挿入されているヘリックスの内の 1 本) が引き上げられれば、水和したイオンも容易にギャップ結合チャンネルを透過できる。1 本のヘリックスを素早く上下させるだけで電気シナプスのイオン透過を制御できる。

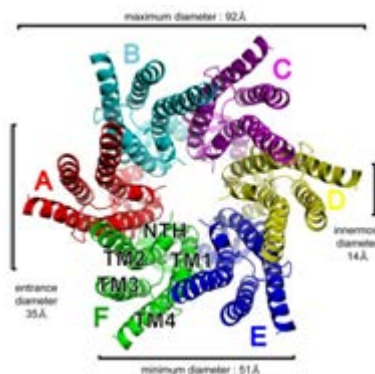


図 14 X 線結晶構造解析による Cx26 の構造。

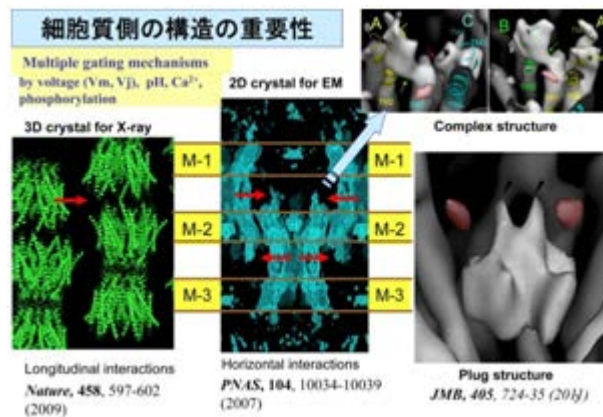


図 15 3次元の結晶から（X線結晶構造解析で）解析した Gx26 の構造（左）と電子線結晶学を用いて解析した構造（真ん中と右）。X線結晶学では結晶内での相互作用のために細胞質側の構造が見えないが、2次元結晶では M-2 の部分のギャップ結合構造は M-1 と M-3 の膜によって保護されているために、細胞質側の本来の構造が明らかになった。その結果、細胞質側の構造は極めて複雑であることが解明され、プラグは 6 本のヘリックスが 2 層に配置された構造を形成していることが明らかになった。

④ イネキシンの構造と機能

ギャップ結合を形成するチャンネルとしてイネキシリンが知られている。エビなどが非常に素早く動くことができるが、これはイネキシリンの電気シナプスによる情報伝達によると考えられる。アメリカザリガニの神経接合部の構造を電子線トモグラフィーで解析した結果、極めて多くのベシクルが、イネキシリンと結合することでギャップ結合チャンネル近傍に分布していることを明らかにした（図 16）。このトモグラフィー解析の結果は、*J. Struct. Biol.* の表紙を飾った。さらに、昆虫細胞での発現系を確立し、イネキシリン 6 の構造と機能解析を行った。イネキシリンによるギャップ結合の初めての構造情報が解析されたが、その結果、コネキシリンのギャップ結合より、チャンネル径もギャップ結合の膜の間隔も共に大きいことが明らかになった（図 17）。なお、論文には発表していないが、イネキシリン 6 のギャップ結合は、コネキシリンのギャップ結合チャンネルは 6 量体で形成されるが、8 量体でギャップ結合が形成されていることが初めて明らかになった。

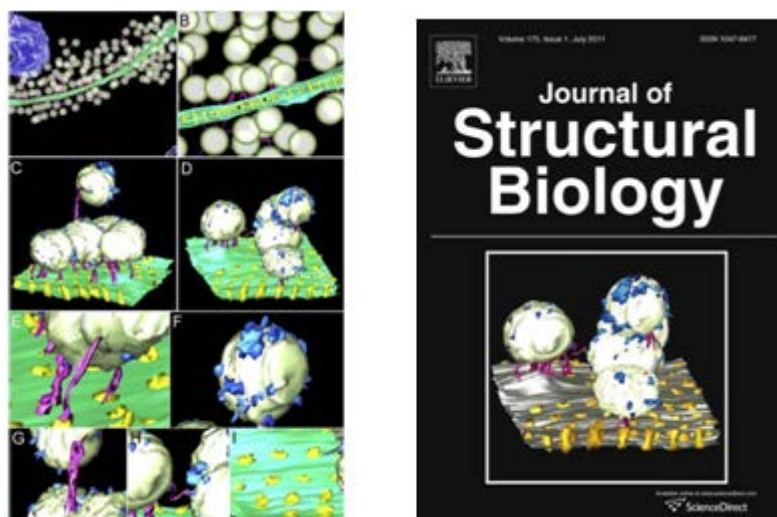


図 16 電子線トモグラフィーで解析したイネキシリンギャップ結合チャンネルの構造。ギャップ結合近傍にイネキシリンとの直接結合により繋がれた多くのベシクルが観察される（左）。この結果は *J. Struct. Biol.* の表紙を飾った（右）。

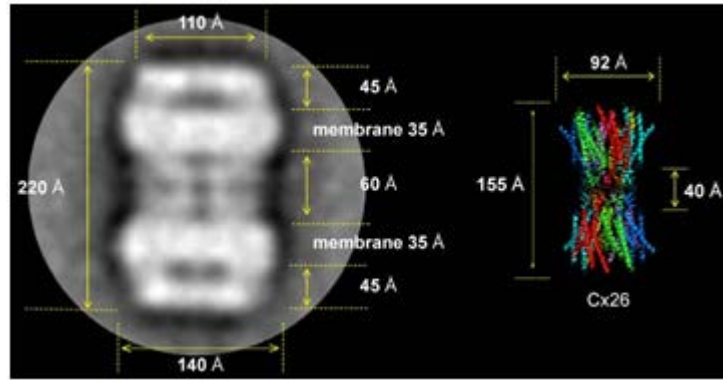


図 17 イネキシンのギャップ結合チャネルとコネキシンのギャップ結合チャネルとの大きさの比較。明らかに大きさが異なる。

⑤ 胃の pH 制御に関わるプロトンポンプの構造と機能

胃の内部は pH が 1 近くの酸性条件になっている。このような酸性の条件にするには強力なプロトンポンプの働きが必要である。豚の胃から精製した H^+, K^+ -ATPase の 2 次元結晶を作製して、電子線結晶学による構造解析を行った結果、細胞膜内外のプロトンの濃度を 100 万倍という驚異の濃度勾配までポンピングして達成できるプロトンポンプの特徴的な分子機構を解明した。この機構をラチェットモデルと名づけた。図 18 に示す様にポンピングの機能を担う α サブユニットが逆回転しないように β サブユニットのアミノ (N) 末端が、 α サブユニットの P ドメインに接触して、これがラチェットの働きをするようにポンプの逆回転を防ぐ構造を解明した。また、図 18b に示す様に N 末端を除いた変異体により、その機構を確認した。

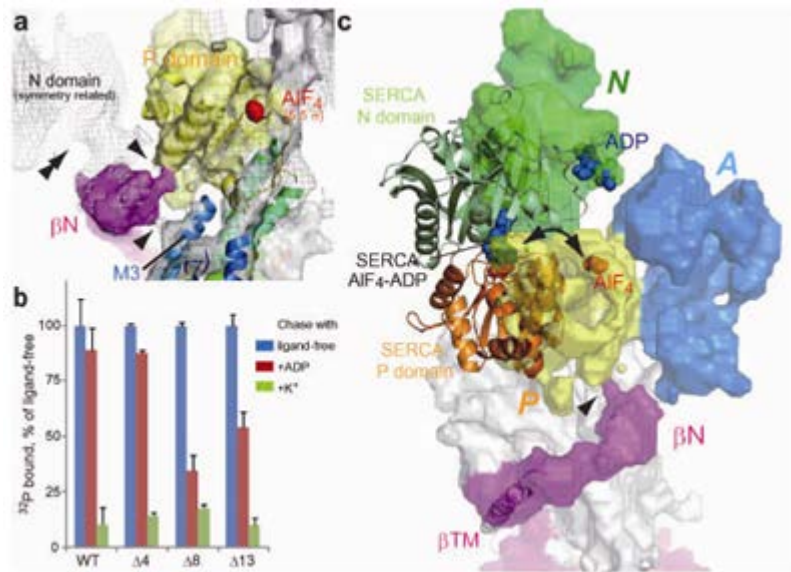


図 18 H^+, K^+ -ATPase の 2 次元結晶を作製して、電子線結晶学によって構造解析を行った結果。紫色の β サブユニットが α サブユニットの P ドメインに黒い矢印の部分で接して、プロトンポンプの逆回転を防ぐことによって、細胞膜内外のプロトンの濃度勾配を 100 万倍にもすることが出来る驚異の分子機構が解明された。

さらに、 H^+, K^+ -ATPase の阻害機能を有する AIF, BeF, MgF という 3 種類の阻害剤が結合した構造を解析して比較し E2P 状態の構造を解析した。また、 H^+, K^+ -ATPase の強力な阻害剤である SCH2808 との複合体の構造を解析することにより、膜貫通ヘリックスが大きく動いて結合した構造を形成することを解明した。実際にプロトンを酸性条件でポンピングするときには、中性付近でポンピングするより多くのエネルギーが必要と考えられる。それで、pH4 という酸性条件での構造解析を行い、 H^+, K^+ -ATPase によるプロトンのポンピングにおいて、中性条件近くでは 1 分子の ATP を分解することにより 2 個の H^+ と K^+ をそれぞれポンピングするが、酸性条件ではプロトンの勾配が大きくなり、1 分子の ATP を分

解するときには1個だけの H^+ と K^+ しかポンピングできないことを、構造解析に基づいて解明した(図19)。



図 19 電子線結晶学を用いて、pH4 という酸性条件で解析された H^+, K^+ -ATPase の構造。酸性条件はプロトンの勾配が大きくなり、1分子のATPを分解するときには1個だけの H^+ と K^+ しかポンピングできないことがpH4 という酸性条件で1分子の K^+ イオンしか観察できないことで確認された。

⑥ プロスタグランジン E2 合成酵素の電子線結晶構造 (バイオメディカル情報研究センター)

これまでに、毒物の体外への排出のため、グルタチオンを用いてをそれらを親水化するミクロソーム型グルタチオン転移酵素の電子線結晶構造解析を行ってきた。ミクロソーム型プロスタグランジンE合成酵素1 (MPGES1) は、同じ膜タンパク質ファミリーに属し、グルタチオン依存的にプロスタグランジン H2 からプロスタグランジン E2 への酸化還元反応を触媒することが知られている酵素である。MPGES1 は、リュウマチや発熱、痛みなどの多くのヒトの疾病に関与しており、新たな抗炎症薬開発の標的分子の一つである。その触媒機能を知るため、MPGES1 の2次元結晶を作製した。しかし、その結晶は不均質だったので、傾斜した試料からの回折図形と同時に、非傾斜の回折図形も合わせて測定し、その非傾斜の回折を同型の結晶のみを選び出すのに用いた。

このような解析法の改善の結果、100枚程度の同型の結晶からの回折図形が得られ、その構造を電子線結晶構造解析により3.5Åで決定した。また、その原子モデルから触媒機構を推定し、部位特異的な変異と活性測定により、いくつかの残基の役割を明らかにした。立体構造では、サブユニット間に結合したU字型のグルタチオンが観察できた。しかし、基質であるプロスタグランジン H2 の結合部位は閉じており、ヘリックスの細胞質側半分が開いて、そこにプロスタグランジン H2 が結合することが示唆された(図20)。これらの結果から、MPGES1 が特異的にプロスタグランジンの触媒反応を行う動的機構に関する知見が得られた。

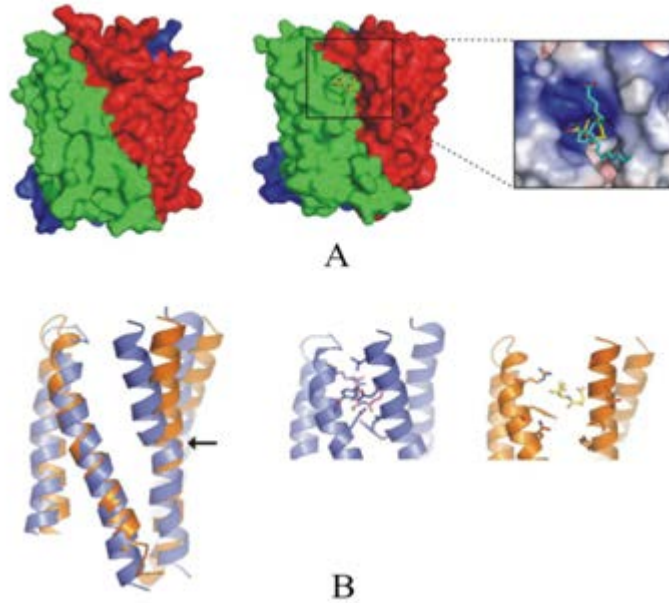


図 20 プロスタグランジン E₂ 合成酵素の閉じた立体構造と推定された開いた構造。

⑦ 単粒子解析によるシャペロニン複合体の反応中間体の構造 (バイオメディカル情報研究センター)
 シャペロニン GroEL は、GroES と ATP を利用して様々なタンパク質と相互作用し、それら基質タンパク質が正しい立体構造を形成するのを助けている分子シャペロンである。GroEL は 2 つの 7 量体のリングが重なった 14 量体で存在していることが知られており、そして、そのリングの一方に GroES の 7 量体が結合し、cis-cavity と呼ばれる空洞を形成する。その空洞内に基質タンパク質を取り込むことで、そのフォールディングを助けていると考えられているが、どのように基質タンパク質が空洞内に取り込まれているかは不明であった。

そこで、好熱菌から得られた、フォールディング途中の様々な基質タンパク質を結合した GroEL-GroES 基質複合体について、その単粒子解析を行い、その立体構造を得た。その立体構造中で、基質タンパク質に対応すると考えられる像を、cis-cavity の中央付近に観察することができた。それにより、すべての基質タンパク質が同じ部位で cis-cavity と相互作用しているわけではなく、主に電荷相互作用により、構造形成後の基質タンパク質の cis-cavity からの放出が促進されていることが示唆された (図 21)。

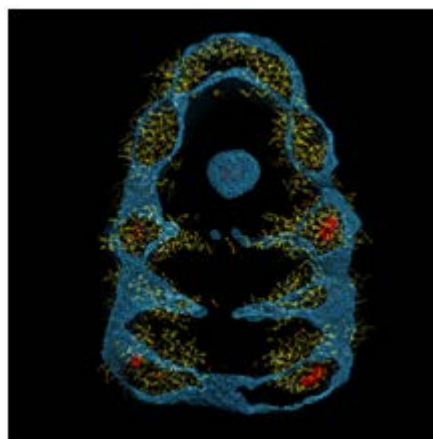


図 21 Cis-cavity 中に基質タンパク質が観察できるシャペロニン複合体の立体構造。

⑧ 単粒子解析を利用したチューブ状結晶の構造 (バイオメディカル情報研究センター)
 バンド 3 は、赤血球膜に豊富に存在する、重炭酸イオンと塩素イオンという陰イオンの交換を媒介する輸送体である。その C 末端ドメインは脂質膜内に存在し、陰イオン交換を行うことができることが知られている。そこで我々は、その C 末端ドメインについて、阻害剤で外向きに開いた構造で固定

した試料を用いて、2次元結晶化を行った。その結果、脂質二重層内に膜タンパク質がらせん状に配置したチューブ状結晶が得られた。しかし、そのチューブ状結晶は、直径が40nm程度と細く、一般的ならせん対称性を用いた構造決定はS/Nが悪く困難であった。そこで、それに単粒子解析を利用した反復らせん実空間再構成法を応用することで、その18Å分解能の立体構造を得ることができた。その立体構造から、C末端ドメインは脂質膜内で、二量体で存在していることが示された。そして、抗体電子顕微鏡法やC末端の切断により、その細胞内表面がチューブ状結晶では外を向いていることが明らかになった。それにより、細胞外側に大きなくぼみを持つ、1分子が2つのドメインから構成されている立体構造が明らかになった(図22)。

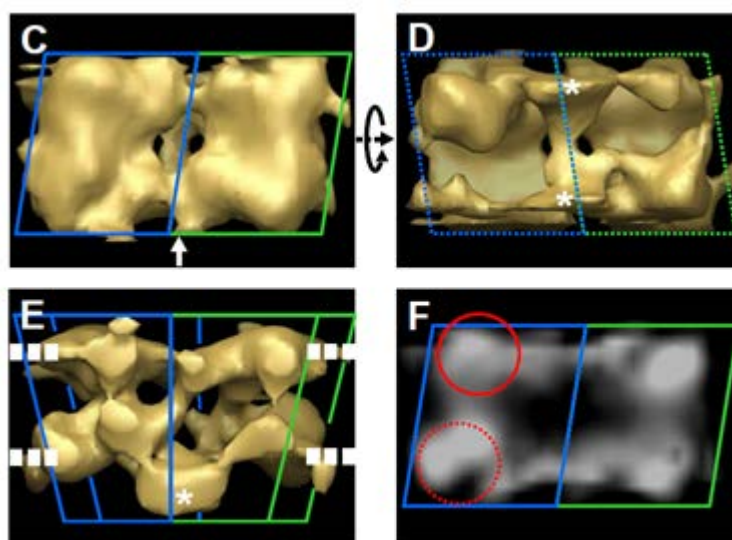


図22 分子中に2つのドメインが観察できるBand3の二量体の立体構造。

⑨ 転写における部位特異的ヌクレオソーム構造変換機構 (バイオメディカル情報研究センター)

生体内のゲノムDNAは全長数メートルにも及ぶが、ゲノムDNAがヒストンタンパク質に巻き付くように結合することでヌクレオソームと呼ばれる複合体を形成し、さらにクロマチン構造に凝集することでわずか数ミクロンの核内に収納されている。ヌクレオソームは、ゲノムDNAを紫外線や分解酵素による攻撃から守る一方で、ゲノムDNAに書き込まれた遺伝情報を読み出すための転写反応をも阻害する。そのため、必要な遺伝子を活性化するためには、決まった時期に決まった領域のヌクレオソームだけをほどいて転写反応を活性化する分子機構が必要である。国内外における研究の結果、(i) ヒストンの翻訳後修飾が転写活性化を引き起こす「目印」になっていること、(ii) ヌクレオソームを解離させるヒストンシャペロンなどの因子群が存在すること、が明らかにされてきた。細胞内におけるヒストンの翻訳後修飾状態は、転写活性化や不活性化を介して細胞機能の発現や制御と密接な関わりを持つことから、臓器細胞・癌細胞・ES細胞・iPS細胞などのヒストンの翻訳後修飾状態や転写活性などを網羅的に解析する国際共同プロジェクトが進められている。しかし、上記の項目(i)と(ii)とを結びつける分子機構の詳細、すなわち細胞内でどのようにして「目印」が見つけれ出され、どのようにしてヌクレオソームを解離させる因子が呼び寄せられ、さらにその後どのようにしてヌクレオソーム構造がほどけるかといった一連の分子機構の詳細は明らかにされていなかった(図23左)。このような状況下で当グループは、共同研究者である東京大学分子細胞生物学研究所の堀越先生のグループにより見出されていた、ヒストンシャペロンCIAと転写基本因子TFIID複合体に含まれるプロモドメイン(アセチル化ヒストンを認識するドメイン)との相互作用に着目した。TFIID複合体は15種類のサブユニット(TBPとTAF1-14)から構成される分子量約1MDaの巨大複合体であり、RNAポリメラーゼIIによる転写活性化に必須な因子であるが、TFIID複合体の各サブユニットの機能はほとんど未知である。上記の結果は、TFIID複合体が、「目印」の認識・ヌクレオソームの解離・転写活性化といった現象を結びつける因子であることを示唆している。しかし、ヌクレオソームの構造変換を含む転写活性化の過程は、多くの因子が次々に結合と解離を繰り返す過程であるため、CIAとプロモドメインの相互作用の生物学的重要性を通常の生物学的手法で証明することは不可能に近い。そこで、CIA-プロモ

ドメイン複合体および CIA-ヒストン複合体の結晶構造を解明し (図 24)、結晶構造に基づいた生化学的・遺伝学的実験を行うことで、プロモドメインと CIA が生体内においても確かに、結晶中と同じ様式で相互作用していることを示した。さらに、クロマチン免疫沈降実験と生化学的な競合実験を組み合わせることで、CIA がプロモドメインによってプロモーター上に呼び寄せられ、その CIA がヒストンに受け渡されて、プロモーター上のヒストンが除去されるという分子機構を世界に先駆けて示すことができた。このような経緯から「クロマチン鑄型からの転写活性化において、CIA が TFIID 複合体によって特定の遺伝子のプロモーター領域に呼び寄せられ、その CIA が近傍のヌクレオソームをほどこいて転写反応を活性化する」という分子機構モデルを提唱するに至った (図 23 右)。

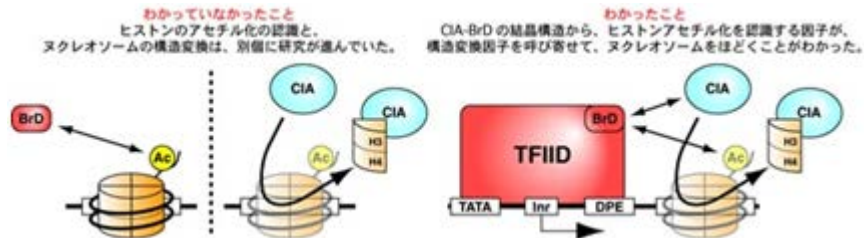


図 23 ヒストンの翻訳後修飾とヌクレオソーム構造変換機構の関係の解明

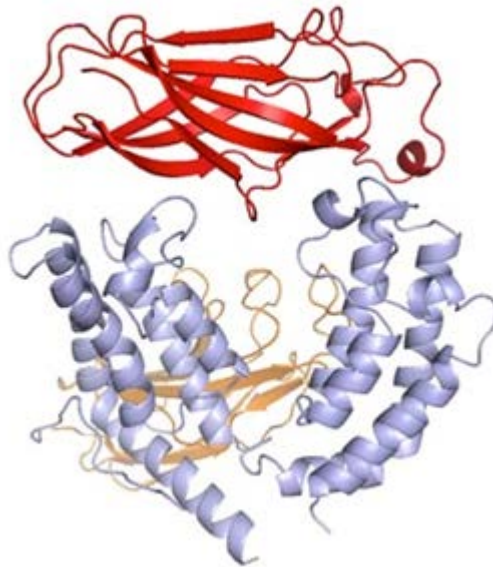


図 24 CIA-プロモドメイン複合体の結晶構造. CIA は、赤と橙で、プロモドメインは薄青色で示した。

⑩ ハロアルカン脱ハロゲン酵素 DbjA の鏡像異性体選択性機構 (バイオメディカル情報研究センター)
 同じ組成式を持つにも関わらず右手と左手のように鏡像の関係にあり、重ね合わせることができない分子の組を、鏡像異性体関係にあるという。鏡像異性体の化学的性質はよく似ているが、生物に対しては異なる作用を持つことがある。例えば、片方の鏡像異性体が薬効を示しても、もう一方は生物に害を及ぼすこともある。したがって鏡像異性体を作り分ける技術は工業的に重要である。多くの酵素は鏡像異性体の混合物と反応させると、その対称性の違いを区別して一方の鏡像異性体とだけと反応し、高光学純度の化合物を生産できる性質を有している。しかし、酵素をデザインして自由に鏡像異性体を作り分ける技術は確立されていない。環境汚染物質を無毒化する加水分解酵素としてダイズ根粒菌から単離したハロアルカン脱ハロゲン酵素 DbjA は 2 種類の基本骨格の異なる光学活性有機ハロゲン化合物をそれぞれ高光学純度のアルコールへ変換できる他のハロアルカン脱ハロゲン酵素には無い性質を有していた。この性質にはハロアルカン脱ハロゲン酵素中で DbjA だけが持つ数アミノ酸残基からなる挿入配列 (EB 領域) が関わっていると考え、X 線結晶構造解析 (図 25)、化学反応速度論的解析、基質とのモデリングの手法を組み合わせ EB 領域の機能を解析した。その結果、DbjA では EB 領域があることで酵素の活性部位の大きさが増し、鍵となる基質がそれぞれの形に合った配向で活性部位に取り込めるため、2 種類の基本骨格の異なる光学活性基質を高光学純度のアルコールへ変換でき

ることが明らかになった。本研究は、基質の結合に直接関与するアミノ酸残基を改変するのではなく、数アミノ酸残基の挿入や点変異を介して鍵空間の形状を変化させることによって酵素本来の活性を損なうことなく新たな基質特異性を付与できる技術基盤となった (Prokop et al. *Angew. Chem. Int.* 2010)。

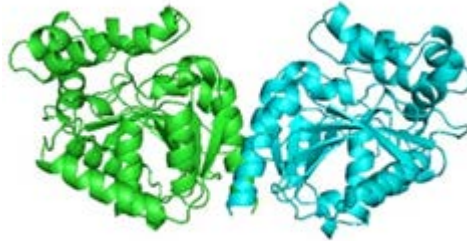


図 25 DbjA の結晶構造

⑪ D-セリンデヒドラターゼの X 線結晶構造 (バイオメディカル情報研究センター)

D-セリンデヒドラターゼ (DSD) は、哺乳類以外の脊椎動物の脳内で D-セリンを分解することが知られている。D-セリンは脊椎動物の中枢神経系において NMDA 型グルタミン酸受容体に結合し興奮性の神経情報伝達を調節していることが分かっており、DSD は生理学的役割とともに進化的な面からも注目されている (哺乳類は DSD を持たない)。ニワトリの DSD (chDSD) は、大腸菌など微生物由来の DSD (DsdA) とは一次構造が全く異なっており、酵素学的な面からも興味深い対象である。DSD は PLP を補酵素とする PLP 酵素であり、D-セリンを分解する脱水反応を触媒する。この反応では最初に D-セリンが PLP とシッフ塩基を形成してアルジミン中間体になり、次に α プロトンが引き抜かれ、引き続き β -OH 基が脱離する β -elimination が生じると考えられる。アルジミン中間体の形成後には理論的に 5 種類の反応が起こり得ると考えられるにも関わらず、chDSD の反応では脱水反応だけが生じる。その謎を解明するために X 線結晶構造解析で立体構造を決定した結果 (図 27)、chDSD の活性中心には PLP だけでなく Zn イオンが存在していた。Zn イオンを除いた chDSD-D-セリン複合体の構造と Zn 結合型 chDSD の構造を重ね合わせて考察した結果、D-セリンの β -OH 基が Zn イオンと相互作用できる位置にあることが確認できた。これらの結果から、活性中心の Zn イオンが D-セリンの β -OH 基と相互作用することで活性中心での D-セリンの配向が決まり DSD の反応特異性を高めていると考えられた (Tanaka et al. *J. Biol. Chem.* 2011)。



図 26 chDSD の結晶構造

⑫ ピロリ菌由来がんタンパク質 CagA の結晶構造 (バイオメディカル情報研究センター)

病原性のピロリ菌は cag PAI と呼ばれる疾患関連遺伝子領域を持っており、この部分には TFSS や CagA タンパク質をコードする遺伝子群が存在する。cagA 遺伝子によりコードされる CagA は、癌タンパク質として機能することが証明されている。近年の研究から、CagA は IV 型分泌機構により胃上皮細胞内に侵入することでヒトが本来持っている様々なタンパク質と複合体を形成すること、また、そ

の複合体が原因となって異常な分裂・増殖シグナルを生じ胃がんを誘発することが明らかになってきた。このような状況の下、我々のグループは、東大医学部の畠山グループと共同で CagA の結晶構造を世界にさきがけて決定した (Hayashi et al., *Cell Host Microbe* 2012) (図 27)。決定した CagA の構造は、残基番号 1-825 番までの N 末端部分で (以後、CagA-N と呼ぶ)、これ以降の約 300 アミノ酸残基から構成される部分は、NMR などによる解析から天然変性領域であることが示された (以降、ID-C と呼ぶ)。生化学的解析から、CagA-N 内にある NBS 配列と ID-C 内にある CBS 配列が相互作用することも明らかになった。興味深いことに、NBS と CBS の相互作用が阻害されている状態では、ID-C は天然変性状態をとるが、NBS と CBS との相互作用により ID-C 領域に 2 次構造が誘起され、ID-C 内の CM モチーフと PAR1 の相互作用が安定化することがわかった。その結果 SHP2 と EPIYA セグメント間の相互作用も促進され、細胞レベルの表現型の変化が顕著になることも示された。この結果から、構造領域の NBS と天然変性領域の CBS が相互作用することで EPIYA セグメントを含む ID-C 領域にある種の構造が誘起され、シグナル攪乱複合体が逐次的に形成されるという仮説を提案した (Hayashi et al., *Cell Host Microbe* 2012)。分子内において構造領域と天然変性領域が相互作用することにより、天然変性領域が保有する生物活性をフィンチューニングするという機構を示したのは本研究が初めてである。

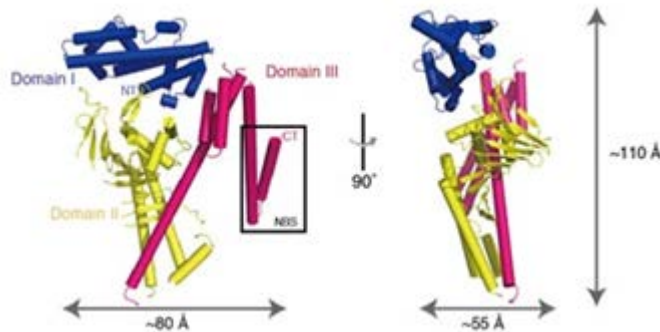


図 27 CagA の結晶構造

⑬ ビタミン C 合成酵素 SMP30 の結晶構造 (バイオメディカル情報研究センター)

加齢指標タンパク質 30 (SMP30) は加齢に伴い減少するタンパク質としてラットの肝臓から発見された。生物学的及び生化学的解析の結果から、SMP30 はマウス体内では L-グルン酸を環化し γ -ラクトン環を形成するグルコノラクトナーゼ (GNL) 活性を持ち、アスコルビン酸 (ビタミン C) の生合成経路に含まれる反応を触媒すると考えられている。しかし、SMP30 とその基質との複合体の構造は解明されておらず、 γ -ラクトン環が形成されるメカニズムは謎のままであった。そこで、マウス由来の SMP30 と基質類似体・生成物類似体との複合体の結晶構造を決定した (図 28)。その結果、 β -プロペラ構造の中心には二価イオンが存在しており、基質類似体として用いたキシリトールは二価イオンや触媒残基と相互作用することで環状に近い折れ曲がった状態で活性中心に結合していることが明らかになった。また、基質ポケットを覆うループ構造 (Lid loop) は、基質を環状に近い構造で結合させることにより基質の環化を促進する役割を果たしていると考えられる。これらの結果からマウス SMP30 の活性中心はグルン酸を環化し γ -ラクトン環を形成する触媒反応を促進させるために適した構造を持つことが明らかになった (Aizawa et al. *PLoS ONE* 2013)。

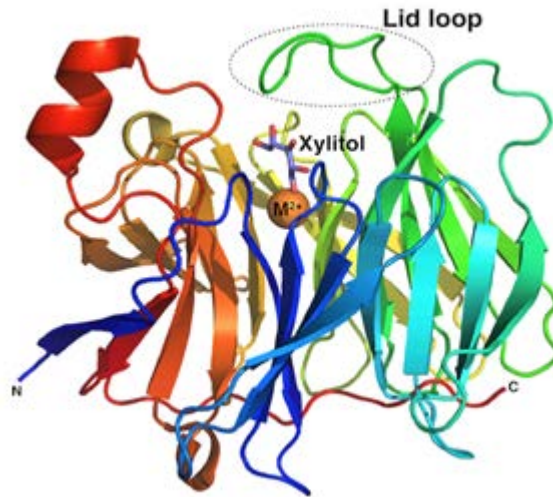


図 28 マウス SMP30 の結晶構造

(4) タンパク質およびその複合体の構造解析に供する発現・精製、結晶化技術の開発 (三菱化学分室)

① ミトコンドリアの融合・分裂に関わる高分子 GTPase : Dlp1

Dlp1 Isoform3 の野生型配列を大腸菌発現 Vector (pET32a) に挿入し、宿主大腸菌 *Rosetta* (DE3) 株にて大量発現した後、2 種類の陽イオン交換カラム、陰イオン交換カラム、ゲルろ過カラムにて精製した。数種類の Dynamin Family タンパク質との配列のアライメントや精製検討での分解傾向 (図 29)、もしくは当該分解物の N 末端配列解析などから、Dlp1 は少なくとも 3 ドメインを含み、アミノ酸番号 536-600 の領域は分解されやすいことが明らかとなった (図 30)。

これらを踏まえ、C 末端ドメイン (GTPase enhanced Domain : GED) のトランケート体を中心に各種タグを組み合わせて約 20 種類の配列を作成し発現検討を実施したが (図 30a)、可溶性に発現する配列を得ることができなかった。次に、精製時の分解物の N 末端配列解析から推定上 2 次構造をとらない領域に HRV3C Protease の認識配列を導入し、精製時に N 末端領域と C 末端領域を分離させる配列

(psp2) を作成し (図 30c)、発現・精製検討を実施した。しかしながら、精製時に各領域を消化できるものの、N 末端の Core domain (GTPase domain+Middle domain) と C 末端の GED を分離することができなかった (図 31A)。これらの結果により、Dlp1 では GED が Core domain に埋もれているか、もしくはドメイン同士の Cross-link が起こっているものとみられる。

さらに、分解されやすい領域の一部を含まない Dlp1 Isoform4 を選択し、この配列を基本に精製用タグもしくは分解領域に変異を導入し (図 30b)、発現・精製検討を実施した。その結果、Dlp1 Isoform4 もしくはその誘導体は Dlp1 Isoform3 とほぼ同様に精製することができ、SDS-PAGE 上でほぼシングルバンド、溶液光散乱測定で単分散・テトラマーを示すタンパク質試料が得られた (図 31B)。また、Dlp1 Isoform4 K571A 変異体では、精製時の分解が比較的抑えられることが明らかとなった。得られた Dlp1 Isoform4 K571A 高純度試料に対して基質アナログを含むいくつかの添加物等を選択し、結晶化を実施した。結晶化はリザーバー条件、温度条件、タンパク質濃度等を中心に約 3,000 条件を検討したが未だに粗結晶を得るまでに達していない。

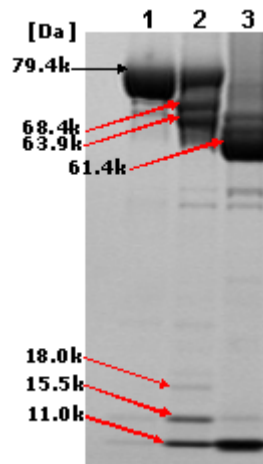


図 29 Dlp1 で観測された分解傾向

レーン 1 : 精製直後の Dlp1、レーン 2 : Dlp1 20°C 3 日、レーン 3 : Dlp1 20°C 6 日
分子量は分解物の N 末端配列解析による。

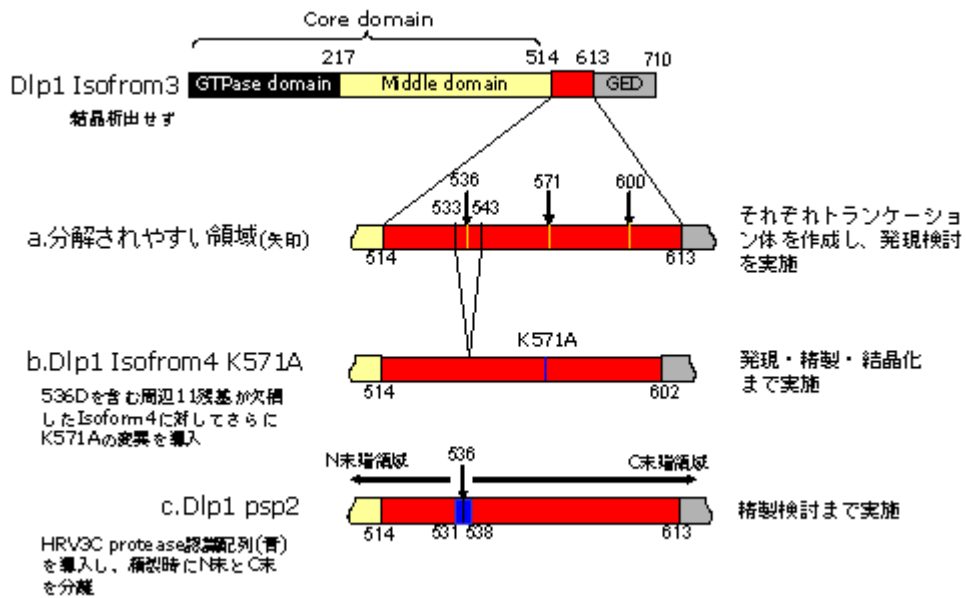


図 30 作成した各種トランケート体と進捗

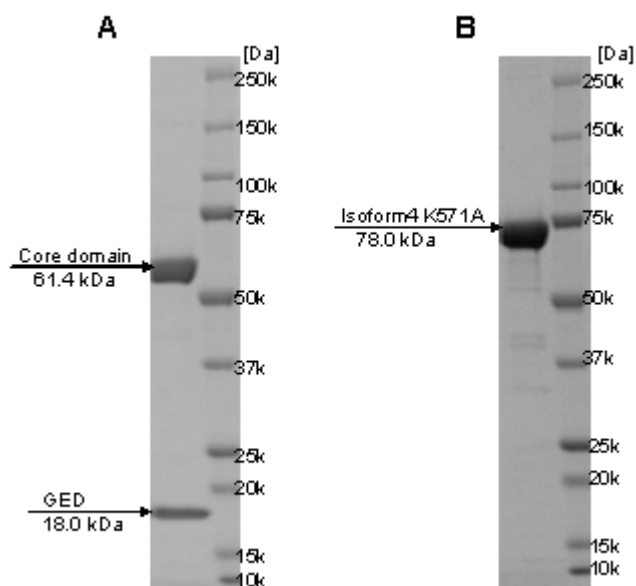


図 31 Dlp1 psp2 及び Isoform4 K571A 精製状況

ヒト Dlp1 (hDlp1) が属する Dynamin Family タンパク質は、GTPase ドメインが活性化すると互いに会合し、スパイラル状構造もしくは十数量体のリング状構造を形成することが知られており、この分子機構により、ミトコンドリアなどの細胞内小器官を分裂させるメカニズムが推測されている。すでに構築済みの大腸菌発現 hDlp1 (Isoform3) を用いてこれらの会合活性が再現できるかどうかの確認試験を実施した。

hDlp1 組み換えプラスミドを宿主大腸菌 *Rosetta* (DE3) 株にて大量発現した後、2 種類の陽イオン交換カラム、陰イオン交換カラム、ゲルろ過カラムにて精製した昨年度実施。得られた試料に基質 (GTP) の類似物質 (GMP-PNP) を透析により徐々に添加し、超遠心分離と SDS-PAGE (CBB 染色) による会合体の検出を試みた。その結果、当該試料は GMP-PNP 添加によって何らかの会合体 (もしくは凝集体) を形成していることが示唆された (図 32)。

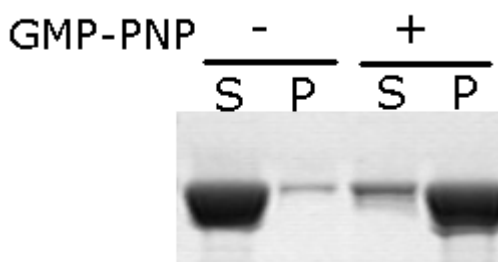


図 32 GMP-PNP 添加による hDlp1 の会合形成

S: 超遠心上清画分、P: 超遠心沈殿画分会合体を形成することにより、タンパク質は沈殿画分が増加する。

得られた会合体の観察を分子レベルで実施するため、電子顕微鏡測定に供した。試料を 0.2% 酢酸ウランによるネガティブ染色法とプラチナカーボンの蒸着角度を 6° に設定したシャドウ法により測定用試料を調製し、透過型電子顕微鏡 (JEM-1010: JEOL 日本電子社) を用いて撮像した。電子顕微鏡像の観察から、大腸菌発現 hDlp1 においてもスパイラル状に会合する活性が保持されていることを確認した (図 33)。またヒト Dynamin と比較して、スパイラルの伸長度合いが大きく、積み重なりが密な会合体を形成していることも明らかとなった (図 34)。さらに GMP-PNP 非添加の試料においても一部リング状の会合体の観測に成功し、hDlp1 は活性化しなくても、会合体状態になりうることも明らかとなった (図 35)。

一方、Dynamin Family タンパク質の会合にはタンパク質内のシステイン残基の還元状態が関与しているとの報告があり、システインをケトン的一种である ZPCK で酸化、修飾してしまうと、会合活性が不活化することが知られている。大腸菌発現 hDlp1 に対しても ZPCK を作用させ、電子顕微鏡像を

観察したところ、会合活性は観測されなかったが（図 36）、その試料に基質類似物質（GMP-PNP）を加えることでリング状までなら会合活性を回復させることに成功した（図 36）。

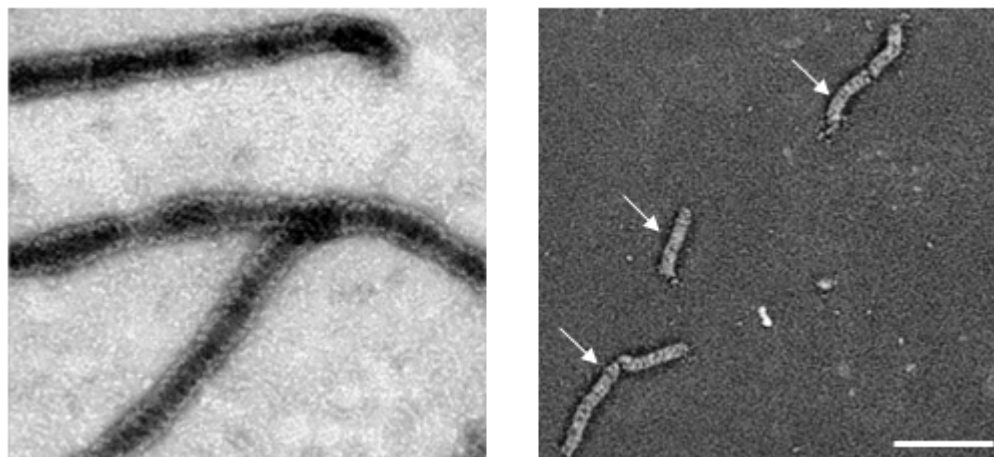


図 33 hDlp1 の GMP-PNP 添加によるスパイラル構造 (矢印)

- a. ネガティブ染色法の電子顕微鏡像、スケールバーは 60nm
- b. シャドウ法の電子顕微鏡像、スケールバーは 500nm

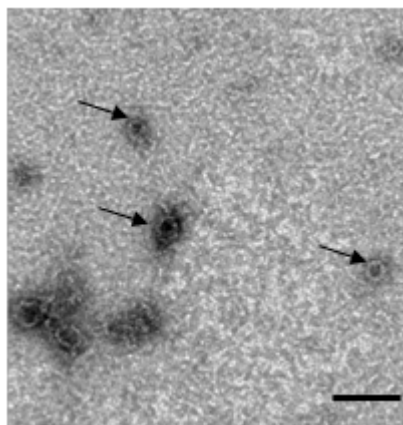


図 34 GMP-PNP 非添加 hDlp1 のリング状構造 (矢印)

ネガティブ染色法の電子顕微鏡像、スケールバーは 60nm

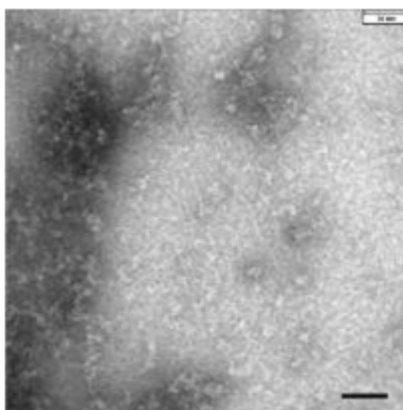


図 35 ZPK を作用させた hDlp1 (ZPK-hDlp1) の電子顕微鏡像ネガティブ染色法

スケールバーは 60nm

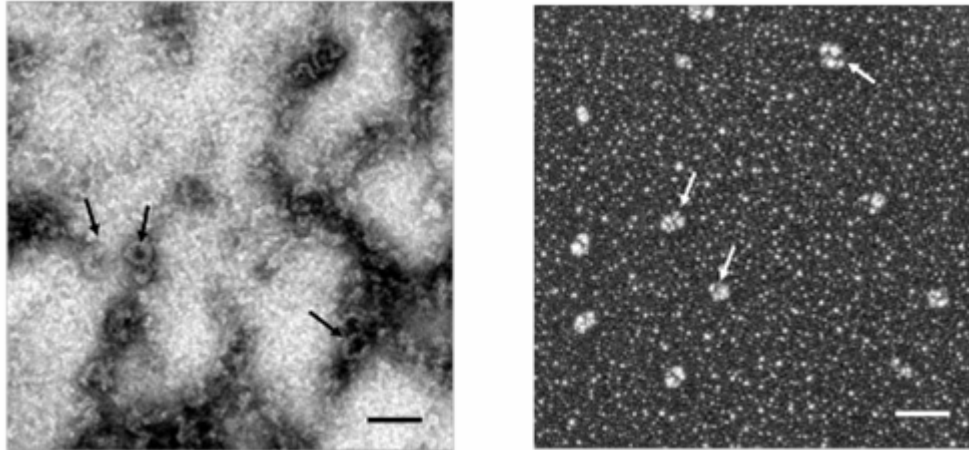


図 36 ZPCK-hDlp1 の GMP-PNP 添加によるリング構造 (矢印)

- a. ネガティブ染色法の電子顕微鏡像、スケールバーは 60nm
- b. シャドウ法の電子顕微鏡像、スケールバーは 100nm

hDlp1 の全長タンパク質 (図 38a) の結晶化に向けたアプローチは初年度より実施している。しかしながら、Dynamain Family GTPase の特徴である活性化すると螺旋状に会合しやすい性質 (図 37) が、Crystal Packing を著しく阻害するため、未だ構造解析可能な結晶は得られていない。また、結晶構造解析に向けた数十種類のトランケーション体の発現・精製を試みた (図 38 b) が、可溶性発現する配列は見出されなかった。これらのことより、Dlp1 の各ドメインのフォールディングには他のドメインとの相互作用が必要であると予想された。そこで、近年 Dynamain で報告された機能解析における配列情報を基に、Dlp1 配列とのアミノ酸配列アライメントを実施し、GTPase ドメインのフォールディングに重要と予想される C 末端領域の一部 (アミノ酸番号 709-736) を見出した。当該配列と GTPase ドメイン (1-329) をフレキシブルリンカー数残基で融合させた Dlp1-GG 配列 (図 38c) を設計した。この配列は表 1 の条件の発現検討によって可溶性発現を確認した。

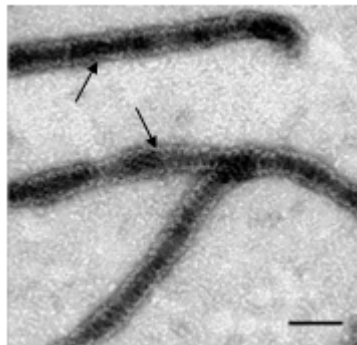


図 37 hDlp1 (Full-length) の GMP-PNP 添加によるスパイラル構造 (矢印)

ネガティブ染色法の電子顕微鏡像、スケールバーは 60nm

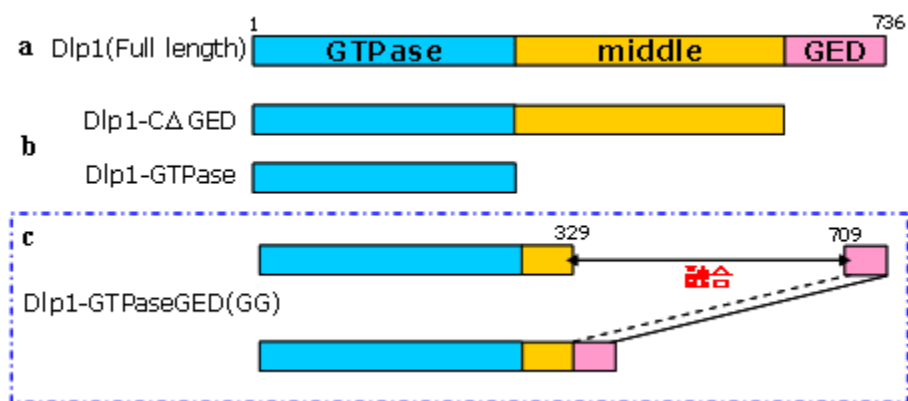


図 38 作成した hDlp1 の各種トランケーション体

表 1 Dlp1-GG 発現培養条件

配列	Dlp1-GG(1-329)(709-736)
Vector/精製タグ	pET/N末端GST
タグ除去酵素(認識配列)	HRV3C protease(LEVLFQ GP)
宿主/発現培地	Rosetta(DE3)/LB
培養条件	37°C, 3-4h
誘導OD ₆₀₀	0.6-0.8
誘導条件	20°C, 0.1 mM IPTG, O/N

Dlp1-GGの精製はアフィニティ精製 (Glutathione sepharose, GE Healthcare 社) に HRV3CProtease (Merck 社) によるオンカラム消化法を適用させた後、陽イオン交換カラム (Heparin sepharose, GE Healthcare 社)、ゲルろ過 (uperdex 200, GE Healthcare 社) でさらに高純度に精製した (図 39)。

結晶化では約 500 条件ほど検討したが、アポ体 (GTP アナログ非存在下) では結晶が得られなかった。そのため、 T_m (融解中点温度) を高温シフトさせる添加物を探索し、基質アナログである GMP-PNP を見出した。Dlp1-GG-GMP-PNP 複合体の結晶化は、ハンギングドロップ蒸気拡散法を用いて行い、約 500 条件のスクリーニングを実施した。構造解析可能な回折を示す結晶は、100 mM Bis-Tris-HCl pH6.5, 30% PEG550 MME, 50mM CaCl₂ の条件で約 2 日から 5 日で柱状晶として析出し、最終的には $0.3 \times 0.1 \times 0.1 \text{ mm}^3$ 程度まで成長した (図 40)。

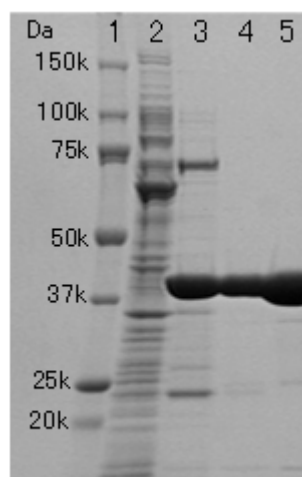


図 39 Dlp1-GG 精製工程 (SDS-PAGE)

レーン 1: 分子量マーカー、レーン 2: Crude Lysate、レーン 3: アフィニティ精製、レーン 4: 陽イオン交換精製
レーン 5: ゲルろ過精製 (最終標品)

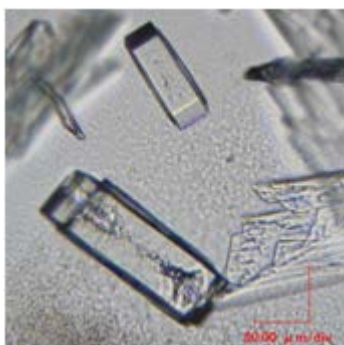


図 40 Dlp1-GG の結晶

調製した結晶の回折強度測定を放射光施設の Swiss Light Source のビームライン X06DA にて行い、2.0Å 分解能データを取得した。当該データに対して Dynamin-3 の GTPase ドメインの構造をモデル分子としてプログラム Phaser (CCP4) にて分子置換法を実施して位相を決定した。最終的にはプログラム Coot、Refmac (CCP4) にてモデル構築、構造精密化をそれぞれ実施し、構造決定に至った (表 2)。解析された Dlp1-GG の構造は二量体構造で活性部位には、GMP-PNP とマグネシウムイオンが 1 分子ずつ観測された (図 41)。また配列設計の際見出された C 末端領域は、結晶構造内でヘリックス構造をとっており (図 41 中のピンク)、近接する 2 本のヘリックス (図 41 中の緑色・黄色) と疎水コアを共有したヘリックスバンドルを形成していた。同様の方法で Dlp1-GG と GTP アナログ GMP-PCP, GDP.AIFx の 2 つの複合体の構造も得られている。

表 2 Dlp1-GG の測定統計値データおよび精密化データ

	GMP-PNP
Data collection	
Space group	$P2_12_1$
Cell dimensions · ·	
<i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> (Å)	51.34, 109.02, 128.82
Resolution (Å)	2.0(2.05-2.00) *
<i>R</i> _{merge}	8.0(97.7)
/ / · /	18.7(5.2)
Completeness (%)	98.7(97.7)
Redundancy	6.8(6.6)
Refinement	
Resolution (Å)	30-2.0
No. reflections	47180
<i>R</i> _{work} / <i>R</i> _{free}	19.9/23.9
No. atoms	
Protein	5344
Ligand/ion	93
Water	457
<i>B</i> -factors	
Protein	23.2
Ligand/ion	22.4
Water	23.7
R.m.s. deviations	
Bond lengths (Å)	0.009
Bond angles (°)	1.241

*括弧内は最外殻の値を示す。

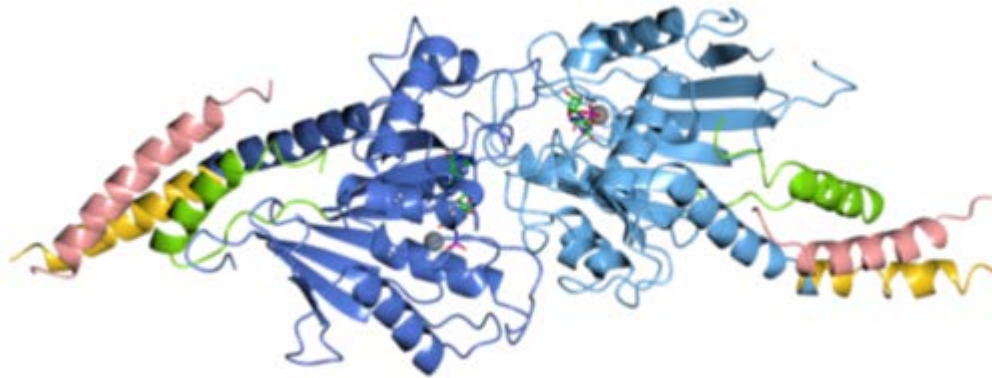


図 41 Dlp1-GG 全体構造(リボンモデル)

GMP-PNP をシリンダーモデル(緑色), マグネシウムイオンをボールモデル(灰色)で示す。

② 摂食抑制に関与する Leptin およびその受容体

Leptin の残基 22~167 (W100E アミノ酸置換) からなるトランケーション配列の N 末端にメチオニンが付加した大腸菌発現用ベクターを構築した。このベクターにより大腸菌宿主 *Rosetta* (DE3) を形質転換し、Leptin を発現する組換え大腸菌を取得した。この組換え大腸菌をジャーファーメンターにより高密度培養し、不溶性画分に 1.2 g/L 培養液の Leptin を取得した。不溶性画分の Leptin を文献情報に従って尿素変性後にリフォールディングした。リフォールディングサンプルを遠心分画し、その上清をゲルろ過クロマトグラフィー、Mono P カラムによる陰イオン交換クロマトグラフィー精製を行った。精製した Leptin を文献情報に従って結晶化 (図 42) し、2.3 Å 分解能での X 線結晶構造解析に成功した。

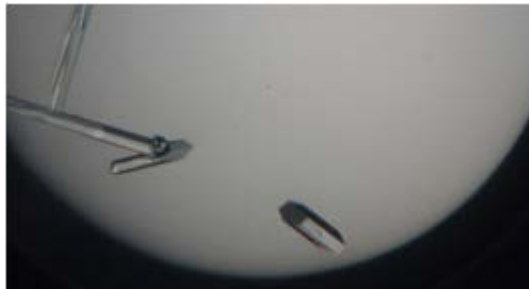


図 42 Leptin 結晶

LR の残基 32~579 からなるトランケーション配列の N 末端に gp67 分泌シグナル、C 末端に His×6 配列を付加したバキュロウイルス作製用トランスファーベクターを構築した。このベクターとバキュロウイルスゲノム DNA を Sf9 細胞にコトランスフェクションし、組換えバキュロウイルスを取得した。組換えバキュロウイルスを High Five 細胞に感染させ、LR を分泌発現させた。LR を含む培養上清をハイドロキシアパタイトによる前処理後、His タグアフィニティー精製、Mono P カラムによる陰イオン交換クロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィー精製を行い、LR を精製した。この LR と結晶化グレードの Leptin を混合し、複合体をゲルろ過クロマトグラフィー精製により取得した。LR 単体(分子量 24.7 kDa) でゲルろ過クロマトグラフィーを行った場合と比較して、LR と Leptin (16.1 kDa) の混合サンプルについてゲルろ過クロマトグラフィーを行うと、より高分子量側にシフトすることを確認した (図 43)。得られた Leptin/LR 複合体を濃縮し、現在、結晶化検討を実施中である。

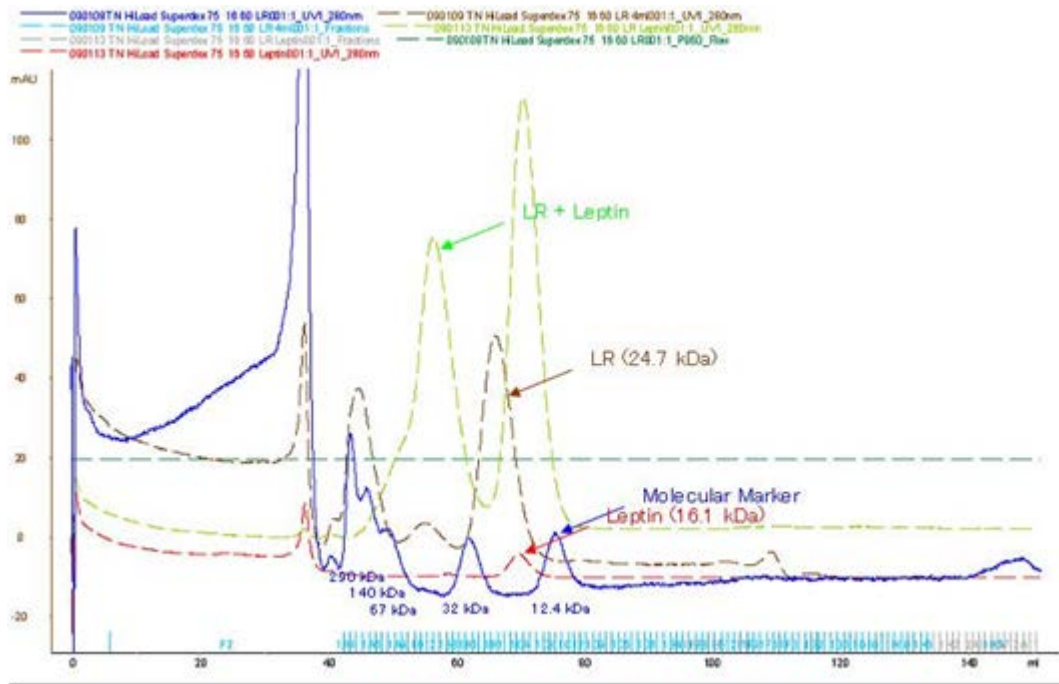


図 43 Leptin/LR のゲルろ過クロマトグラフィー

LR の残基 428～635 からなる部分配列の N 末端に gp67 分泌シグナル、C 末端に His×6 配列を付加した LR を昆虫細胞/バキュロウイルス発現系により分泌発現させた。LR を含む培養上清をヒドロキシアパタイトによる前処理後、Ni-NTA カラムによる His タグアフィニティー、Mono P カラムによる陰イオン交換クロマトグラフィー、Superdex 75 カラムによるゲルろ過クロマトグラフィーの順で精製し、LR の精製品を取得した。この LR と結晶化グレードの Leptin を混合し、ゲルろ過クロマトグラフィーを行った。LR 単体 (分子量 24.7 kDa) のゲルろ過クロマトグラムと比較して、より高分子量側 (分子量約 40kDa に相当) にピークシフトしたことから、Leptin-LR 複合体の形成が確認された (図 44)。

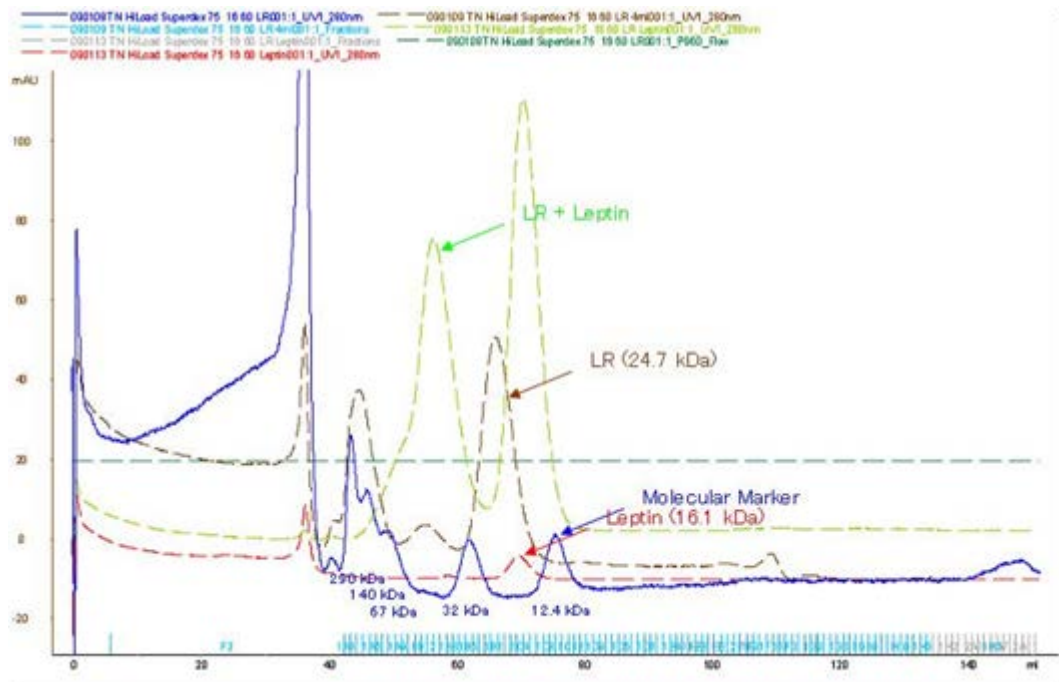


図 44 Leptin/LR のゲルろ過クロマトグラフィー

得られた Leptin/LR 複合体を 15 mg/ml まで濃縮し、2 種類の市販スクリーニングキット (INDEX : Hampton Research 社、PC-Custom-I : Axygen 社) 計 196 条件でシッティングドロップ蒸気拡散法による 20°C での結晶化を実施したが、ほとんどの条件で結晶化直後に沈殿を生じた。また、2 種類の市販スクリーニングキット (MemStat : Molecular Dimension 社、CrystalScreen Cryo: Hampton Research 社) 計 96 条件で Topaz (Fluidigm 社) による自由界面拡散法による結晶化を 20°C で実施したが、やはり多くの条件で沈殿を生じた。そこで、タンパク質濃度を 5 mg/ml、7.5 mg/ml 及び 15 mg/ml に設定し、市販スクリーニングキット (OptimiX-1 : Fluidigm 社) 計 96 条件で Topaz による自由界面拡散法による結晶化を 5°C 及び 20°C で実施した。この結果、単結晶の析出は確認できなかったが、タンパク質濃度 5 mg/ml、結晶化温度 5°C の場合に、PEG を沈殿剤とする 2 条件で粒状の結晶性析出物を得た (図 45)。

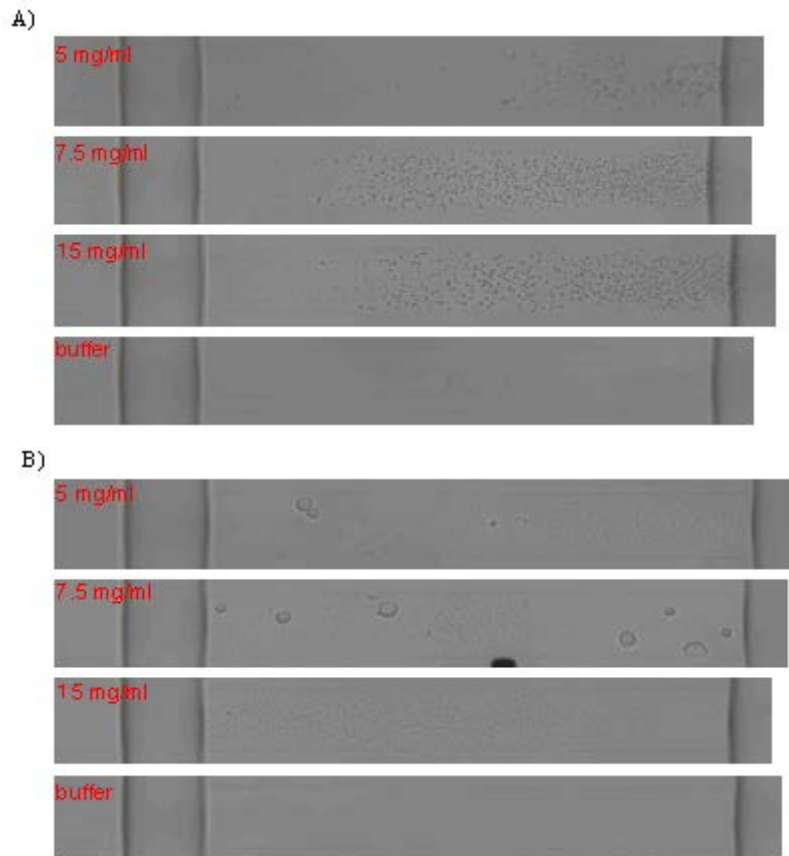


図 45 Leptin/LR の結晶性析出物

- A) 結晶化条件: 0.4 M lithium sulfate 0.1 M bis-Tris propane, pH 7.0 10% w/v PEG 20,000、5°C
 B) 結晶化条件: 0.3 M magnesium chloride 0.1 M sodium acetate, pH 4.6 10% w/v PEG 8000、5°C

しかし、この結晶性析出物に X 線照射したが、タンパク質結晶であると思われる反射は確認出来なかった。Leptin/LR 複合体について、結晶性析出物を得た条件近傍での結晶化条件の最適化 (沈殿剤、添加剤の種類と濃度、温度条件、タンパク質濃度の検討) を行ったが結晶は確認できなかった。他のスクリーニングキットを用いて新たな結晶化条件の探索を行ったが、結晶は確認出来なかった。

LR 構造解析のために昆虫細胞・バキュロウイルス発現系により LR 調製を行ってきた。しかし、これまでのところ、得られた LR と Leptin による複合体の構造解析可能な結晶の取得には至っていない。そこで、昆虫細胞・バキュロウイルス発現系では発現配列を検討した。また、LR をより高発現する発現系を探索すべく、大腸菌、小麦胚芽無細胞、*Brevibacillus choshinensis* (*B.choshinensis*)、*Kluyveromyces lactis* (*K.lactis*)、*Pichia pastoris* (*P.pastoris*) による LR 発現検討を行った。これらの発現系における発現配列は LR 全長 1165 アミノ酸の細胞外ドメインのうち Leptin Binding Domain と呼ばれる 428-635 アミノ酸トランケート体を用いた。

昆虫細胞・バキュロウイルス発現系

LR 全長 1165 アミノ酸の細胞外ドメインのうち Leptin Binding Domain と呼ばれる 428-635 アミノ酸トランケート体では Leptin との複合体の構造解析可能な結晶は得られていなかった。そこで、新たな発現配列を検討するため、428-631、428-627、428-623、428-619、428-615、432-635、436-635、440-635 の計 8 配列のトランケート体について発現検討した。その結果、428-635 と比較して C 末端を 4 アミノ酸削った 428-631 は発現量が約 1/2 に減少し、C 末端をさらに削った 428-627、428-623、428-619、428-615 は発現を確認できなかった。また、428-635 と比較して N 末端を 4 アミノ酸削った 432-635 は発現量が約 1/20 に減少した。N 末端をさらに削った 436-635、440-635 では発現を確認できなかった。これらのことから、発現配列としては 428-631 が候補として残ったが、本発現系では発現量が低いことからこれ以上の検討は一旦中断した。

大腸菌発現系

可溶化タグ付加、菌株、培養条件等の検討を行ったが、何れも LR は不溶化タンパク質として得られたため、尿素もしくはグアニジン塩酸塩による変性とリフォールディングの検討を行った。その結果、6M グアニジン塩酸塩により変性した C 末 6His タグ付加 LR を Ni-NTA を用いてアフィニティ精製し、4.5M 尿素へ置換した後にアルギニン塩酸塩添加によって尿素濃度希釈する方法が最も可溶性回収率の高い手法であることがわかった。しかし、得られた可溶性画分の多くが二量体以上の多量体を形成していたためリフォールディング時の酸化還元制御、pH、添加剤等の詳細条件検討が必要と考えられた。

小麦胚芽無細胞合成系

PCR により直鎖状鑄型を作製して様々な可溶化タグ付加検討を行ったところ、N 末 MBP タグ付加 LR の可溶性へのタンパク合成が確認されたが、プロテアーゼによる MBP タグ切断ができなかった。このことから分子量の大きい MBP によって全体が可溶性として得られているものの、LR 自体は適切にフォールドしていない可能性が示唆された。

B.choshinensis 発現系

本発現系は目的遺伝子の由来に関わらず S-S 結合を有するタンパク質の活性型での発現成功例が高い。今回は本発現系で実績のある FLAG タグを中心に N 末 FLAG、N 末 3FLAG、N 末 HisFLAG、C 末 His タグ付加 LR の発現検討を行った。その結果、N 末 3FLAG タグ、N 末 HisFLAG タグ付加 LR において最大で 2 mg/L の可溶性への発現が確認された (図 46)。しかしコロニーや培養のロットによる発現量の差が著しい上、菌体グリセロールストックからの発現に再現性が得られず、安定した発現が得られなかった。また、アフィニティ精製による回収率・精製純度が悪いことや、SPR による Leptin との親和性解析結果から、可溶性へ発現した LR の多くが適切にフォールドしていない可能性が考えられた。

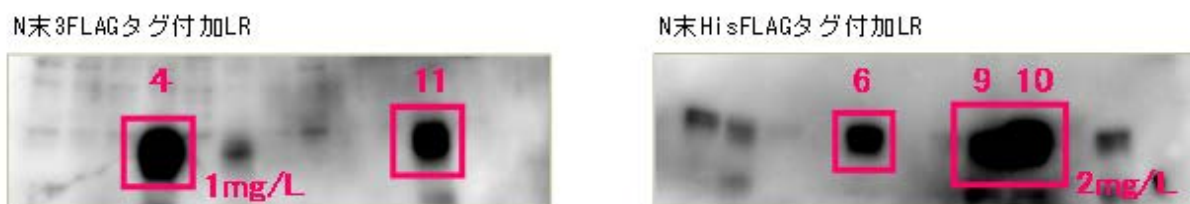


図 46 *B. choshinensis* 発現系による LR の抗 FLAG 抗体によるウエスタンブロットティング
4, 11, 6, 9, 10: それぞれのコロニー ID No.

K.lactis 発現系

本発現系は *P.pastoris* 発現系とは異なり galactose 資化性であるため methanol 毒性の心配が無くより安価に安定同位体標識できる可能性がある。今回は N 末 His、N 末 FLAGHis、N 末 HisFLAG、C 末 His、N 末 MBPHis、N 末 MBP-C 末 His タグ付加 LR の発現検討を行った。その結果、N 末 His、N 末 FLAGHis、N 末 HisFLAG、C 末 His タグ付加 LR はほとんど発現が確認できなかったが、N 末 MBPHis、N 末 MBP-C 末 His タグ付加 LR において可溶性画分への発現が見られた (図 47)。現在発現量、再現性の確認、アフィニティ精製条件検討を実施している。

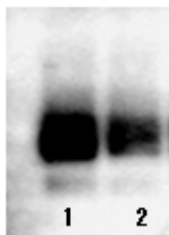


図 47 *K. lactis* 発現系による LR の抗 MBP 抗体によるウエスタンブロッティング
1: N 末 MBPHis タグ付加 LR, 2: N 末 MBP-C 末 His タグ付加 LR

P.pastoris 発現系

本発現系は安定同位体標識法が確立しており、高密度培養も可能である。今回は計 8 種類の分泌シグナル配列について C 末 His タグ付加 LR の発現検討を行った。その結果、どのシグナル配列においても C 末 His タグ付加 LR はほとんど発現が確認できなかった。そこで、分泌発現量が向上するという報告のある MBP タグを N 末に付加した N 末 MBP-C 末 His タグ付加 LR の発現検討を行った。その結果、分泌発現量は 1~2 mg/L 培養液まで向上した (図 48)。発現が確認できた LR は SDS-PAGE での解析によってバンドがラダー状に高分子量側へシフトしており、糖鎖修飾されている可能性があった。そこで、LR を脱糖酵素 PNGaseF により処理することによって低分子量化するか検討した。PNGaseF 処理サンプルを SDS-PAGE により解析したところ、PNGaseF 処理した LR は未処理の LR と比較して低分子量化したことから、分泌発現させた LR は糖鎖修飾により高分子量化したことを確認した (図 49)。現在、糖鎖修飾抑制のための変異体作製、培養条件および精製条件の検討を実施している。

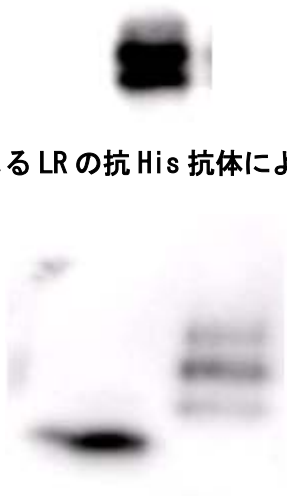


図 48 *P. pastoris* 発現系による LR の抗 His 抗体によるウエスタンブロッティング

図 49 *P. pastoris* 発現系による LR の脱糖酵素 PNGaseF 処理
1: PNGaseF 処理、2: PNGaseF 未処理

P.pastoris 発現系による LR の発現

本発現系は安定同位体標識法が確立しており、高密度培養も可能である。分泌発現量が向上するという報告のある MBP タグを N 末に付加した N 末 MBP-C 末 His タグ付加 LR の発現検討を行い、分泌発現量は 1~2 mg/L 培養液まで向上した。ここで分泌発現させた LR は糖鎖修飾により高分子量化していたことから、糖鎖修飾部位と予想される N433、N516、N624 を置換した変異体計 5 種類の LR 変異体 (M1: N433D/N516D/N624D、M2: N433Q/N516Q/N624Q、M3: N433D/N516D、M4: N433D/N624D、M5: N516D/N624D) の発現ベクターをそれぞれ作製した。これらのベクターにより形質転換した *P.pastoris* により発現検討を行った。その結果、M1 については野生型と同等の発現量であったが、M2 については発現量が大きく低下した。M3~M5 は M1、M2 と比較して SDS-PAGE で検出されたバンドの高分子量化が確認された。

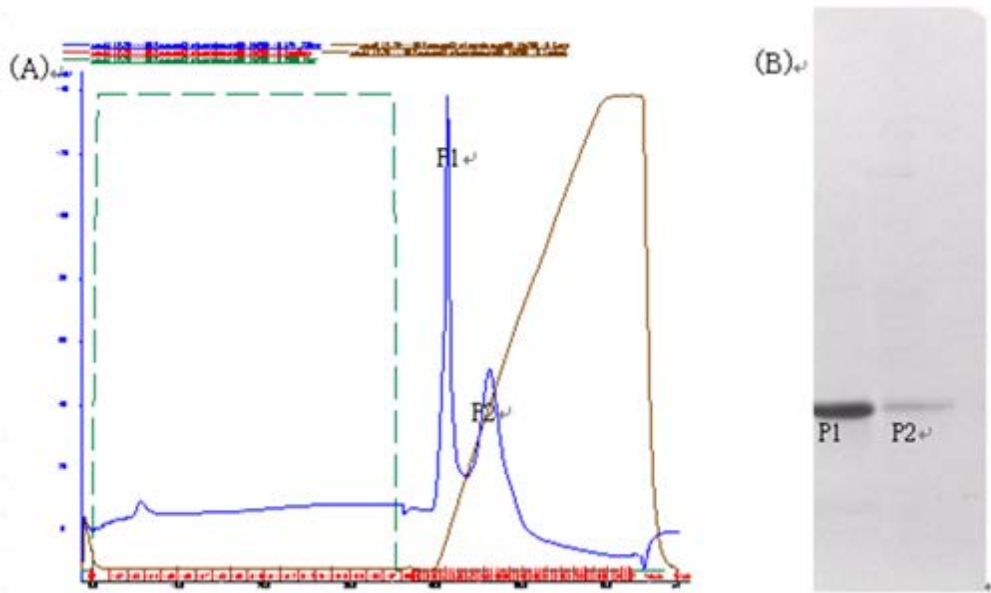


図 50 Resource Q 精製

- (A) His タグアフィニティ精製サンプルを ResourceQ で精製。2 本のピークを検出 (P1, P2)。
 (B) ResourceQ 精製サンプルの SDS-PAGE。P1、P2 とともに LR をメインバンド検出。

このことから、*P.pastoris* では LR の N433、N516、N624 はすべて糖鎖修飾され、N433D/N516D/N624D という変異導入が適していることが明らかとなった。変異体 M1 を分泌発現させ、培養上清からアフィニティ精製後、ResourceQ (陰イオン交換) 精製を実施した。ResourceQ 精製では 2 本のピーク (P1、P2) が得られ (図 50)、それぞれにつき Superdex75 10/300 を用いたゲルろ過精製を実施した。P1 はモノマー位置、P2 はオリゴマー位置にそれぞれ溶出した (図 51)。また、P1、P2 について Leptin との相互作用を Biacore により測定した。P1 の解離定数は 12.1 nM であり、昆虫細胞で発現・精製した LR (8.59 nM) と同等の相互作用を確認したが、P2 はシグナル値が低く、Leptin とは正常な相互作用を呈しなかった。本発現系では精製収量が低いことからこれ以上の検討は中断した。

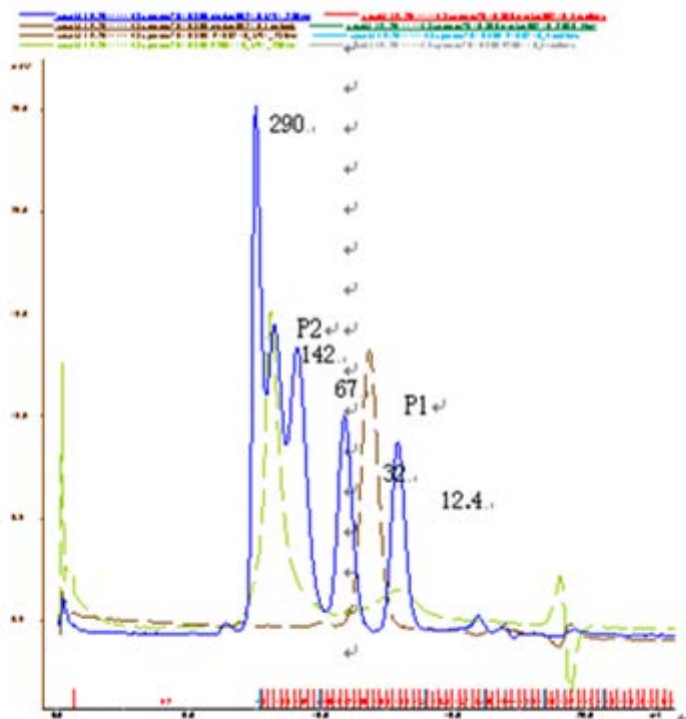


図 51 Superdex75 10/300 精製

ResourceQ 精製により得られた P1、P2 を Superdex75 10/300 によりそれぞれ精製。
P1 はモノマーの位置、P2 はオリゴマーの位置に検出。

哺乳類細胞発現系による LR の発現

本発現系は哺乳類細胞由来のタンパク質を発現させる場合、立体構造や修飾が天然型に近い状態で得ることが出来、安定同位体標識も可能である。また、近年では安定株取得によるタンパク質の生産だけではなく、一過性発現による短期間でのタンパク質の大量生産についても報告されている。今回、LR の糖鎖修飾部位と予想される N433、N516、N624 を置換した変異体を一過性発現系により分泌発現させるため、シグナル配列を付加したベクター5種類を構築した (Leptin receptor シグナル配列、BM40 シグナル配列、Murine Ig κ chain V-J2-C シグナル配列、Preprotrypsin シグナル配列、SEAP シグナル配列)。これらのシグナル配列を付加したベクター5種類を FreeStyle 293-F 細胞に導入し、一過性発現を実施したが、培養時間を 120 時間まで延ばしたが、LR の分泌発現は確認されなかった。本発現系では発現量が低いことからこれ以上の検討は中断した。

昆虫細胞・バキュロウイルス発現系による LR の発現

LR の糖鎖修飾部位と予想された N433、N516、N624 の 3 残基を Asp へ置換した変異体 (LR_M1) の昆虫細胞・バキュロウイルス発現系による分泌発現を検討した。分泌発現条件は最適化の結果、High Five 細胞 (細胞密度 2×10^6 cells/mL) に組換えバキュロウイルスを MOI 1 でトランスフェクションし 48 時間後に培養上清を回収する条件を選択した。培養上清への LR_M1 発現量は約 1.5 mg/L であった。Ni-NTA を用いた His アフィニティ、ResourceQ を用いたイオン交換、Superdex75 を用いたゲルろ過クロマトグラフィーにより精製した。イオン交換では Peak が 3 つに分離し、低塩濃度溶出の主要ピーク 2 つ (低塩濃度から Peak 1, Peak 2) はともに単量体であり、高塩濃度溶出の Peak 3 には単量体と二量体が混在していた。BIACORE による Leptin 親和性評価の結果、3 つの Peak は全て文献値と同等の KD 5-10 nM の Leptin 親和性を有することが明らかとなった。Peak 1 と 2 はイオン交換での溶出塩濃度差が僅か 8 mM であり、且つ、その量比は培養 lot によって様々だった。また、ともに単量体で同等の Leptin 親和性を有すること、そして何よりも少ない発現量からタンパク質量を稼ぐためにも、この 1, 2 両 Peak を今後の検討に使用することとした。

LR_M1-Leptin 複合体の結晶化

LR_M1-Leptin 複合体の精製を行うため、上記と同様の精製方法で ResourceQ により分離した LR_M1 Peak1 と 2 へ 1.5 倍モル量の Leptin を添加し、ゲルろ過クロマトグラフィーにより複合体形成画分のみを取得した。得られた複合体 (sample C1) を濃縮し 33 mg/mL の濃度で sitting drop 法により結晶化スクリーニング (kit: Crystal Screen, Index) を行ったが、20°C で 1 週間以上経過しても結晶は検出できなかった。一方、複合体として均一電荷なタンパク質を得る目的で Leptin をイオン交換前に添加して精製する検討を行った。複合体のイオン交換は単体より明確な Peak 分離が見られ、ゲルろ過後の最終精製タンパク質は Native-PAGE において sample C1 より高純度な複合体が得られた。得られた複合体 (sample C2) は 18 mg/mL の濃度で sitting drop 法により結晶化スクリーニング (kit: wizard, PEG Ion) を行ったが、20°C で 1 週間以上経過しても結晶は検出できなかった。次に sample C2 を Fluidigm による結晶化スクリーニング (kit: TOPAZ OptiMix-1, OptiMix-PEG) へ供した。その結果、0.4 M lithium sulfate 0.1M bis-tris pH 7.0, 10% PEG20,000 の溶液条件で 5°C 下において結晶のような析出が観測された。そこで、この溶液条件近傍において hanging drop 法により複合体 sample C2 の結晶化検討を実施したところ、再び結晶らしき析出が観測された。ところが、Izit Crystal Dye により染まらなかったため析出物は複合体結晶ではない可能性が高いと考えられた。

LR_M1 単体での結晶化

LR 変異体が結晶化可能な質の精製タンパク質であるか否かを確認するため、LR_M1 単体 (Peak1, 2 それぞれについて) で sitting drop 法により結晶化スクリーニングを Hampton Research 社のキット (Crystal Screen, Index Screen, PEG IonScreen) を用いて実施した。その結果、Peak 2 についてのみ、0.1 M MES (pH 6.5), 1.6 M Ammonium sulfate, 10% Dioxane の溶液条件下において針状結晶の析出が見られた。結晶成長のために hanging drop 法による溶液条件の最適化と播種の検討を行ったが、十分な大きさの結晶を得るには至らなかった。LR_M1 Peak2 の結晶写真を図 52 に示す。



図 52 LR_M1 Peak 2 の結晶

LR_M1 では ResourceQ での peak 2 のみに再現性良く結晶析出が確認されたが、Peak1 の場合は検討した全条件において結晶析出は見られず、イオン交換での溶出塩濃度の僅か 8 mM の差に、その性状の違いが起因すると考えられた。そこで結晶化検討に用いた Peak 1 と Peak2 を Native-PAGE へ供したところ、明確な移動度の相違が確認された (図 53 (a))。また、peak 1 と peak2 はゲルろ過クロマトグラフィーにおいてともに monomer として挙動したものの、peak2 の保持時間が僅かに短いことが明らかとなった (図 54)。これらの結果から、peak2 がリン酸化等の何らかの修飾を受けているか、あるいは、peak1 が何らかの限定分解を受けている可能性が示唆され、その違いが結晶析出に影響したと考えられた。

ちなみに、LR_M1 と Leptin との複合体結晶化検討 sample C1, C2 を Native-PAGE へ供したところ、恐らく LR 単体の Peak1 と peak2 由来と思われるダブルバンドが確認された (図 53 (b))。LR_M1 Peak2 のみからなる Leptin 複合体を用いると、結晶化検討に影響する可能性が示唆された。

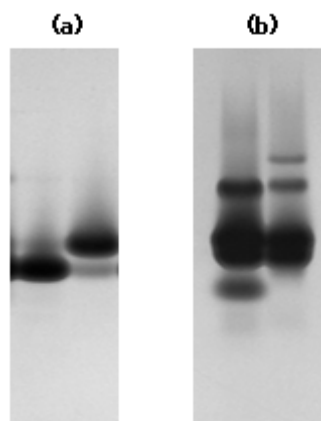


図 53 結晶化検討タンパク質の Native-Page

(a) LR 変異体単独。左レーンから peak2, peak1。
 (b) LR 変異体と Leptin との複合体。左レーンから sample C1, C2。

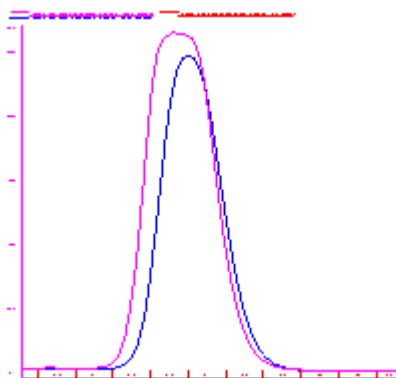


図 54 LR 変異体 peak 1 (青) と peak 2 (桃) ゲルろ過チャートの重ね合わせ

③ 12 回膜貫通型タンパク質セロトニントランスポーター

SERT の哺乳動物細胞発現系を構築するために PCR-based gene assembly によりコドン頻度を最適化した構造遺伝子を作成した。HEK293 細胞を用いたテトラサイクリン誘導発現系を用い一過性発現を確認した後、ヒト野生型 SERT の安定発現株を樹立した。発現量は 1~4.4 mg/litter 培養液であった。N 末端 Flag タグによりアフィニティー精製を行った後 (図 55) に全長の質量分析を行ったが、翻訳後修飾を加味した理論値と一致しなかった。そこで、N 末端タグで精製した SERT の C 末端アミノ酸配列解析を行った。C 末端の K610-V630 の発現を確認するために Lysyl endopeptidase のペプチド分解物を Nano ESI-MS に供し、理論分子量に相当する 1092.1299Da ($z=2$) のピークを得た。さらに、Nano ESI-MS/MS 分析により I612-L627 のアミノ酸配列が同定された。N 末端タグを用いたことと合わせて、全長発現がほぼ確認された (図 56)。

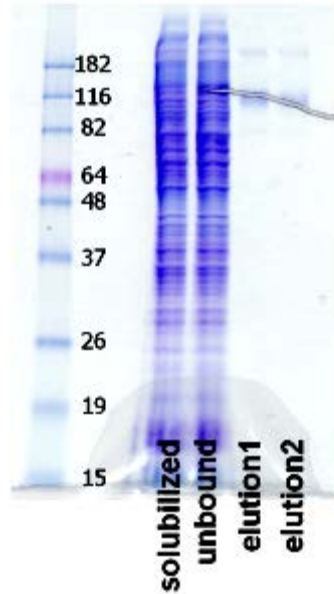


図 55 SERT のアフィニティー精製

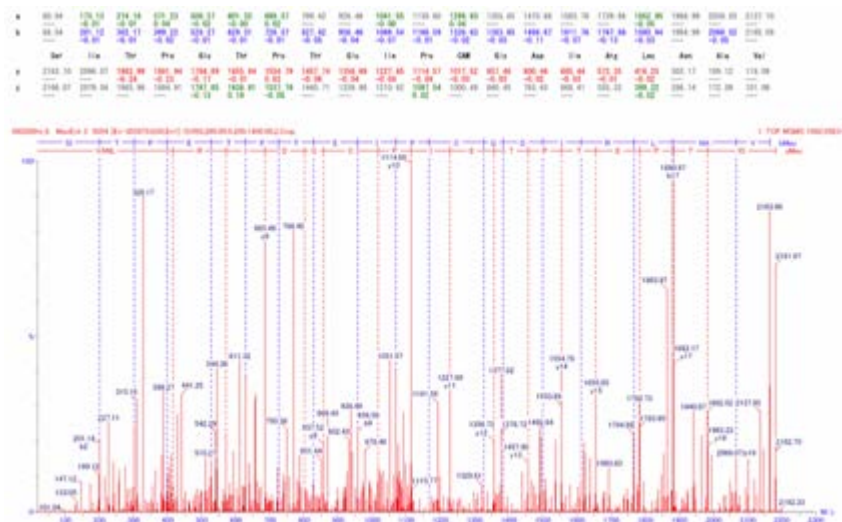


図 56 SERT C末端の Nano ESI-MS/MS 分析のピーク

SERTは糖鎖修飾によりシアル酸が付加される。各種脱糖鎖酵素を用いて糖鎖付与を確認したところ、非変性下でPNGaseFによる脱糖鎖処理が可能であり、糖鎖はタンパク質表面に存在することが確認できた (図 57)。

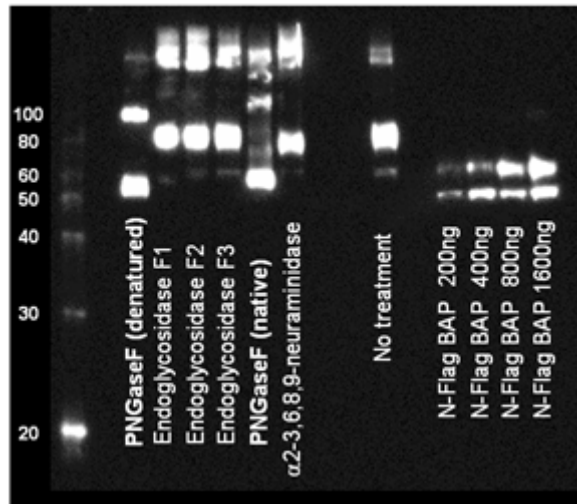


図 57 SERT 野生型の脱糖鎖処理

また、N 型糖鎖が付与される Asn208、Asn218 をグルタミンに変異させ発現レベルを確認したところ、N208Q・N217Q 二重変異体では野生型と比べ発現量の低下が認められた。また活性に関係ないとされる Cys15, Cys21, Cys109, Cys522, Cys622 は非特異的なジスルフィド結合を抑制するために Ser または Ala に変異させた。糖鎖認識型の分子シャペロンであるカルネキシンによる共発現が機能性発現量を向上させる既報があるため、筆者の MRC、Tate 教授にコンタクトを取り、トロント大学の David Williams 教授から犬カルネキシンベクターを供与頂いた。カルネキシンと一過性共発現させたところ N208Q・N217Q 変異型においても発現量が向上した (図 58)。非糖鎖付加型のタンパク質でもカルネキシンが発現量を増加させる既報があり、biogenesis については複雑なメカニズムがあると考えられる。

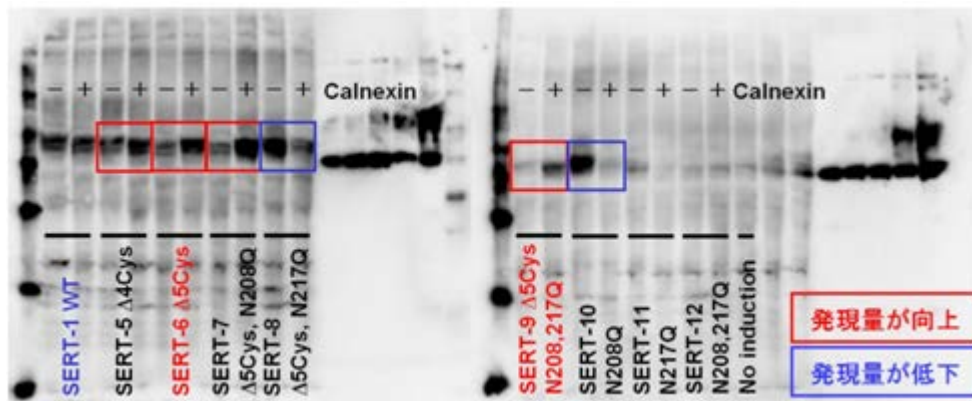


図 58 カルネキシンとの共発現による各種 SERT 変異体の発現量比較

Δ5Cys: C15S, C21S, C109A, C522S, C622A, Δ4Cys: C15S, C21S, C522S, C622A

発現した各種 SERT 変異体の Ligand binding activity を評価するために ^3H ラベルした imipramine を用いた Radio-ligand binding assay 系を確立した。インキュベーション温度・時間、 ^3H imipramine 濃度、非ラベル imipramine、タンパク質濃度、溶液条件の最適化を行い、可溶化及び精製後 SERT の活性測定系を構築した。Ligand 結合は 4°C 、10 分で飽和していることが確認された (図 59A)。 4°C 保存下では可溶化後の SERT は安定性が高く一週間は活性が保持されることが確認できた (図 59B)。各種変異体はいずれも imipramine 結合活性があることが確認できたため、発現量が高い糖鎖結合型 SERT として SERT-6 (C15S, C21S, C109A, C522S, C622S)、均一性がより高い非糖鎖結合型の SERT-9 (C15S, C21S, C109A, N208Q, N217Q, C522S, C622S) を候補配列に設定した。

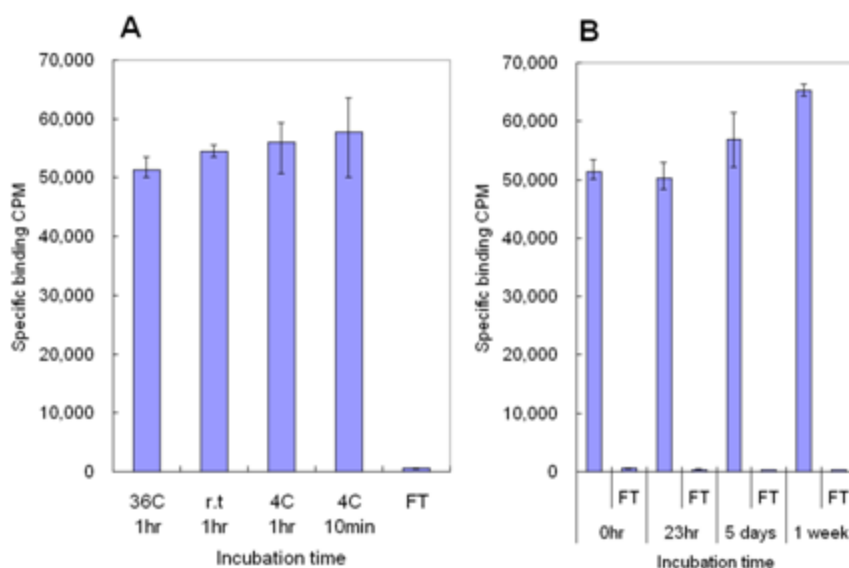


図 59 A: インキュベーション時間・温度の影響、B: 温度安定性、FT: SERT なしの Flow Through

SERT は精製後の活性が可溶化後と比べ格段に落ちることが見出された。Essential に活性維持に必要なコンポーネントが存在すると想定されたため、コレステロール様の CHS (Cholesteryl Hemisuccinate) を添加したところ、活性が回復した (再現性実験中)。また、37°C でインキュベートした際に CHS 添加により高次成分の形成が抑制されることから CHS が安定性に寄与していることが確認された。

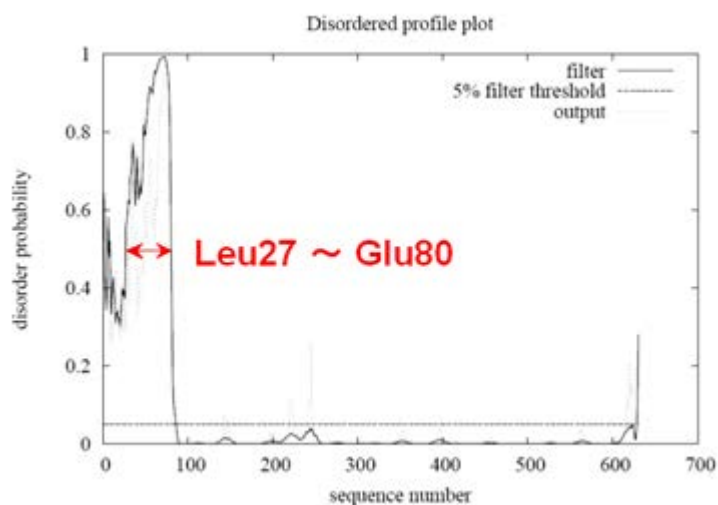


図 60 SERT の disordered region 予測
Leu27-Glu80: Disopred による解析で閾値 50%に相当する領域

バイオインフォマティクスによる検討を幾つか実施したところ、SERT の N 末端は Intrinsically Disordered Region を有する可能性が見出された。親水的で二次構造を取らないフレキシブルな領域が Leu27~Glu80 に存在するため (図 60)、限定分解法により切断部位の検討を行ったが PVDF 膜への転写後の CBB 染色効率が非常に悪く、N 末端配列解析による切断残基の確認はできなかった。そこで、6 種類のトレンケート配列 Leu27-Val630, Asp57-Val630, Arg60-Val630, Ser62-Val630, Thr68-Val630, Arg79-Val630 (t1~t6) を設計し、QuikChange Lightening Kit によりベクターを構築した。HEK293 細胞により一過性発現を行ったところ、いずれのトランケート体も Imipramine 結合活性が確認された (図 61)。SERT のトポロジーは膜貫通領域以外の cytosolic, extracellular 領域はこの Intrinsically Disordered Region が最も大きな配列であり、大規模な親水的構造を持たない比較的高疎水性の高い構造を取っていると考えられる。

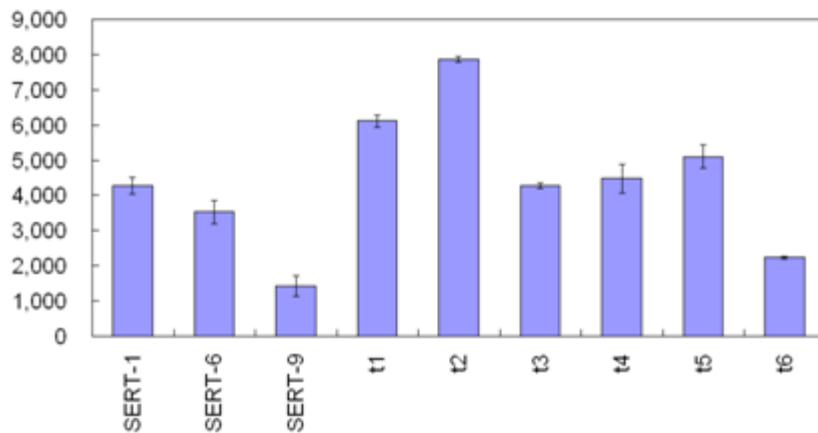


図 61 SERT 野生型 (SERT-1)、変異型 (SERT-6、9)、トランケート体 (t1~t6) の活性測定

SERT の高機能発現体を得るために PCR-based gene assembly 法により N 末端 Flag タグを有する構造遺伝子を作成し、HEK293 哺乳動物細胞の安定株を構築していた。IDR (Intrinsically disordered region) が N 末端細胞内領域に存在すると予想されることから、複数のトランケート体の安定株を構築し、その評価を行った。

トランケート体 SERT^{t1} (27-630), SERT^{t2} (57-630), SERT^{t3} (60-630), SERT^{t4} (62-630), SERT^{t5} (68-630), SERT^{t6} (79-630) は抗 Flag 抗体を用いたウェスタンブロットにより発現が確認された (図 62)。図 62 の高次のバンド (野生型で 70-90 kDa) は糖鎖付与型であり、低次のバンド (野生型 SERT_{WT} で 60 kDa) は非糖鎖付与型であることが糖鎖欠損型変異体 SERT_{CysAsn} の移動度から決定された。非特異的なジスルフィド結合を抑制するために作成した SERT_{Cys} は野生型と同様の発現量であり、分子シャペロンであるカルネキシンの共発現体 (SERT_{Cys}+CNX) でも顕著な発現量の変化は見られなかった。

Blue-Native PAGE は膜タンパク質の非変性状態の移動度を観測可能である。野生型及び各種トランケート体を供したところおよそ 330-390 kDa のバンドが確認された (図 63)。これは 4 量体~5 量体の位置に対応するが、SERT が細胞膜で多量体を形成する報告と一致した。

また、各トランケート体の機能を確認するために細胞レベルでの取り込みアッセイ系を構築した。このアッセイシステムでは神経伝達物質アナログである蛍光物質を用いており、細胞取り込みされない基質は細胞に透過しないクエンチャーにより消光される。30 分の間取り込み量を蛍光観察したところ

(n=3~12)、上記変異体及び各トランケート体で取り込みが確認できた (図 64A)。野生型の精製 SERT は ³H ラベルした imipramine 阻害剤と結合した (K_d = 69 nM) (図 64B)。また、Digitonin により可溶化したトランケート体についても imipramine との結合が確認され *in vitro* での結合活性があることが確認できた (図 64C)。各トランケート体の発現量とトランスポート活性の比較を行ったところ最もトランケート領域の多い SERTt6 で発現量当たりのトランスポート活性が高いことがわかった (図 64D)。これらの結果により、N 末端の IDR 領域を除いたトランケート体は *in vitro* での機能を有し、構造解析に適用可能であることを確認した。野生型の精製後収量は litter 培養当たり 1.5 mg だったが imipramine を用いた ligand binding assay からは機能発現量がおおよそ 1 mg/litter であり、60~70% の精製 SERT が機能を有していることが確認できた。

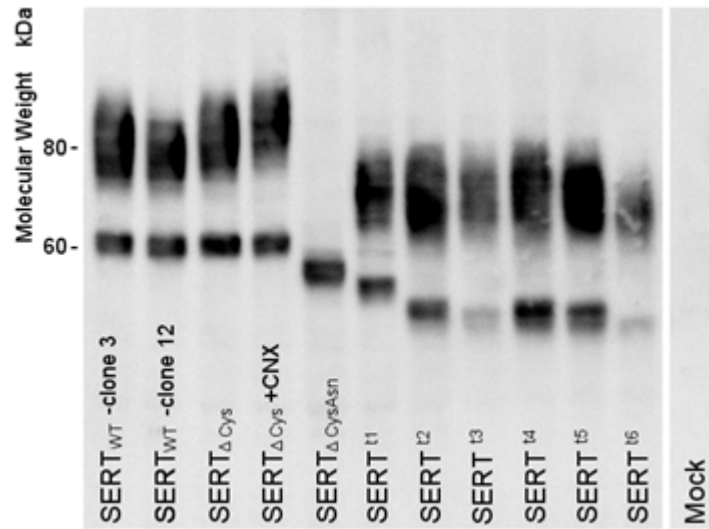


図 62 SERT 各変異体及びトランケート体のウェスタンブロット解析

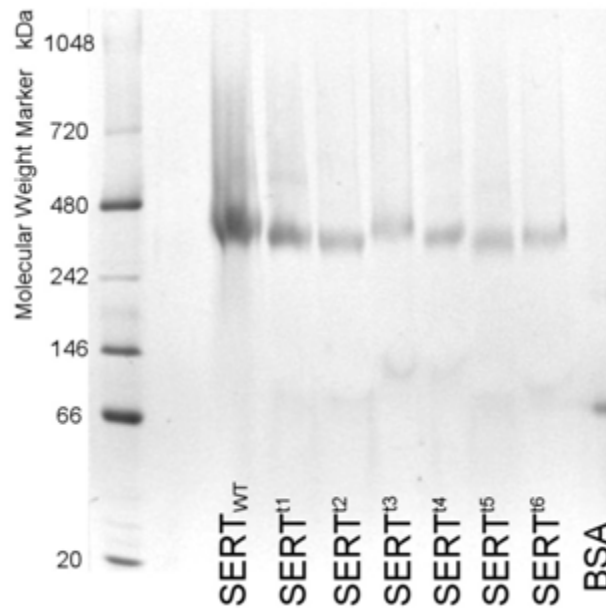


図 63 SERT 変異体及びトランケート体の BN-PAGE

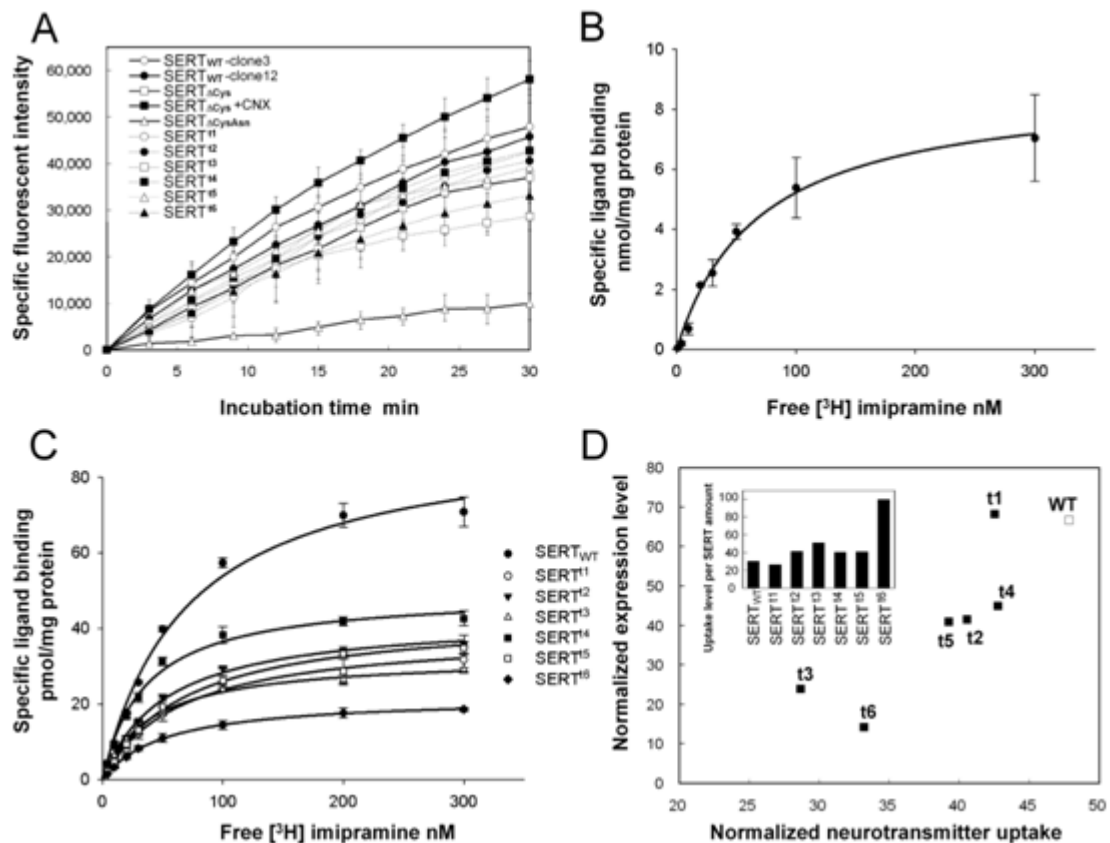


図 64 各種トランケート配列の機能解析

A: トランスポート活性、B: 精製後の結合活性、C: 可溶化後の結合活性、D: トランスポート量と発現量の関係

④ ペプチド輸送体 YdgR

主に発現検討を実施した (表 3)。発現配列は、発現量・精製効率等を検討し、YdgR(1-500)-LEVLVQ ↓GP-H×10 に決定した。発現 Plasmid は pET Vector の ribosomal binding site から開始コドン (ATG) までの距離を短く改良した pET32d を設計・採用した。発現大腸菌には膜タンパク質など毒性の高いタンパク質で実績のある B 株誘導体 OverExpress C43 (DE3) (Lucigen 社) を採用し、培養時の増殖を促すため、エアレーションの改良などを行った。これらの結果、アフィニティ (金属キレートレジン) 精製収量で 1L 培養液当たり約 2 mg の YdgR を回収できるようになった (図 65)。

表 3 決定した YdgR の発現条件

配列	YdgR(1-500)
Vector/精製タグ	pET32d/C末端His10
タグ除去酵素(認識配列)	HRV3C protease(LEVLVQ GP)
宿主/発現培地	O43(DE3)/TB
培養条件	37°C, 3-4h
誘導OD ₆₀₀	0.9-1.0
誘導条件	37°C, 0.1 mM IPTG, 3h

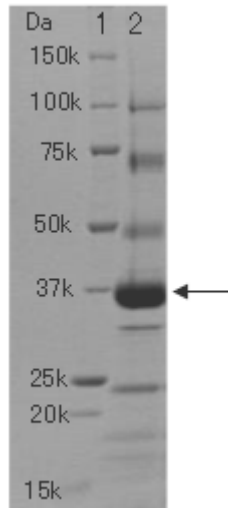


図 65 YdgR 発現（アフィニティ精製）結果（SDS-PAGE）
 レーン1:分子量マーカー、レーン2:アフィニティ精製、矢印は YdgR を示す

発現配列設計

膜タンパク質発現用に発現 Plasmid と発現配列を最適化した。発現 Plasmid は一般の pET (T7) 系発現ベクターを用いても発現量が著しく低いことから、膜タンパク質を大腸菌で効率良く発現できるように改良した pET32d Vector を設計した (図 66)。発現配列は精製効率を重視して 4 配列検討し、YdgR の C 末端に 10×His 精製タグと、そのタグを除去する HRV3C protease (Merck 社) の認識部位を付加した配列に決定した (表 4)。当該配列は下記の発現検討により精製効率が良好であり、発現量も精製収量換算で 1L 培養液あたり 1-2mg であることを確認した。

	塩基配列		YdgR発現量 (1L培養液あたり)
pET(T7)系	rbs	ATATACAT(8) ATG	< 0.1 mg
pET32d	rbs	ATATACA(7) ATG	1mg ~

図 66 YdgR 発現用に改良した Vector (pET32d) の配列

表 4 各 C 末端精製タグのアフィニティ精製後の収量と純度

タグ略称	配列	回収量*	純度	評価
CH6	LEHHHHHH	4-5mg	~6割	×
CH8	LEHHHHHHHH	3-5mg	6割	×
CPH6	LEVFAQ↓GPHHHHHHH	1-2.5mg	6割(リバース精製後~8割)	△
CPH10	LEVFAQ↓GPHHHHHHHH HHH	1-2mg	8割(リバース精製後~9割)	○

*1L 培養液あたりの回収量

発現検討

作製した発現ベクターにより膜タンパク質など高毒性タンパク質の発現で実績のある B 株誘導体 OverExpress C43 (DE3) (Lucigen 社) を形質転換した。50 mg/L カルベニシリンを含む TB 培地を用い

て前培養を行った後、前培養液を OD=0.04 になるように添加して 37°Cで本培養を実施した。培養時の増殖を促すため、誘導条件検討、エアレーションの改良等を実施し、発現条件を表 5 のように決定した。当該条件により、アフィニティ（金属キレートレジジン）精製収量で 1L 培養液当たり 2 mg 以上の YdgR の回収を確認した。

表 5 決定した YdgR の発現条件

発現ベクター	pET32d OPH10 YdgR
宿主	C43(DE3)
発現培地	TB, 50 mg/Lカルベニシリン
スケール	500 mL / 1 Lハネ付フラスコ
本培養	前培養液を OD=0.04 になるように添加, 37°C,3h
誘導OD	0.8-0.9
誘導条件	1mM IPTG, 3h, 37°C
エアレーション	高い (Breathe-EASIER*)

精製検討

上記で決定した条件で大量培養した菌体を用いて大量精製を実施した。菌体を高圧ホモジェナイザー (PANDA2X : Niro Soavi 社) にて溶菌し、100,000g までの段階的遠心分離により YdgR を含む膜タンパク質が埋没している膜画分を回収した。回収した膜画分 (溶液) に終濃度 2% となるように界面活性剤 n-Dodecyl-β-D-maltoside (DDM) を添加し、rotary shake により、膜画分から膜タンパク質を抽出した。アフィニティ精製は抽出液を Ni-NTA Superflow (QIAGEN 社) 5 mL 充填の HPLC 用手詰めカラムに吸着させ、30 カラムボリュームの洗浄の後 200mM Imidazole を含む溶出液にて溶出させた。回収画分に HRV3C protease (Merck 社) を添加し、4°Cで一昼夜反応させ YdgR より精製タグを消化し、当該タグ、夾雑タンパク質、HRV3C protease は HisTrapHP (GE healthcare 社) によるリバース精製により除去した。回収画分を分子量カットオフ 50 kDa の限外ろ過デバイスで約 10 mg/mL まで濃縮し、濃縮試料をゲルろ過カラム Superdex 200 10/300 (GE Healthcare) に供した。YdgR は凝集体と推定される void 領域と概ね単量体 (分子量約 55 kDa) と推定される 2 つのピークとして溶出され、後者を回収した (図 67)。ゲルろ過後、試料を上記の限外ろ過デバイスで、15mg/mL まで濃縮し、一昼夜の透析にて DDM の濃度を 0.02% のまで抑えた試料を結晶化用最終標品とした。最終標品の SDS-PAGE と精製工程の Blue Native-PAGE を図 68 に示す。

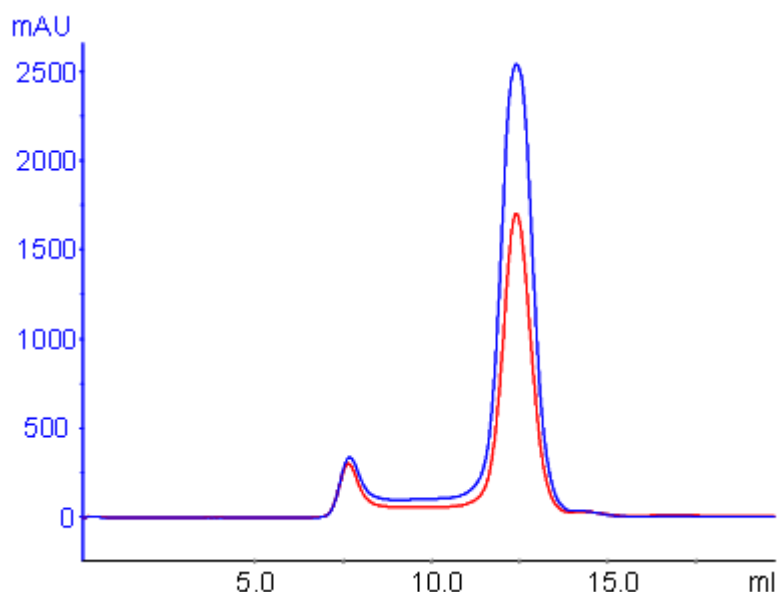


図 67 ゲルろ過 (Superdex 200 10/300) の溶出パターン
赤と青線はそれぞれ 260nm と 280nm の吸収スペクトルを示す。

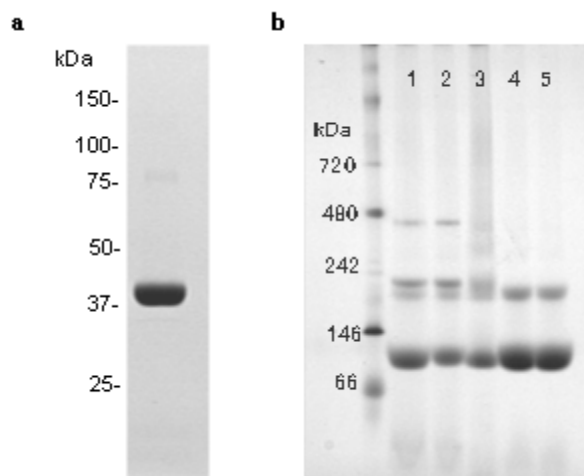


図 68 YdgR の各種電気泳動

a : SDS-Page (Coomassie 染色)、b : 各精製工程の Blue Native-Page
 レーン 1 : アフィニティ精製、 2 : リバース精製、 3 : ゲルろ過前濃縮
 4 : ゲルろ過精製、 5 : 濃縮・透析 (最終標品)

試料安定性測定

結晶化に向けて数日から数週間のインキュベーションに耐えうるタンパク試料を調製するため、試料の T_m (融解中点温度) を高温シフトさせる添加物を

N-[4-(7-diethylamino-4-methyl-3-coumarinyl)phenyl]maleimide (CPM) 試験法等で探索し、YdgR の熱安定性を改善する 3 種類の添加物 [20mM L-Arginine (pH5.6), 100mM D-Mannitol, 1mM DTT] を見出した。当該化合物を添加した試料は 20°C で 1 週間のインキュベーションの後でも、分散性と溶解性に優れ、水溶性タンパク質とほぼ同等な結晶化適合性を保持していることを確認した。

結晶化検討

結晶化は Fluidigm 社の超微量結晶化装置 TOPAZ による液-液拡散法を用い、Molecular Dimension 社の膜タンパク結晶化 kit を中心に約 1000 条件を検討した。その結果、表 6 の条件でアモルファスもしくは結晶と思われるヒットを得た。各結晶化条件の精密化とスケールアップにはマイクロバッチ法を、Additive screen には脂質 (モノオレイン) のメゾ相を使用した結晶化を採用し、放射光測定に十分と思われる大きさの結晶を取得した (表 6、図 69)。結晶は Izit Crystal Dye (Hampton Research 社) によって染色されることを確認し (図 69)、SDS-PAGE により目的タンパク質であることを確認した。調製した結晶の回折測定を放射光施設である高エネルギー加速器研究機構の Photon Factory のビームライン BL-17A にて行い、単結晶ではないが、20 Å 程度の低分解能の回折があることを確認した。

表 6 液-液拡散法でのヒット

Kit #	Salt	Buffer	Precipitant
MG1.27	0.04 M sodium chloride	0.04 M Tris pH8.0	27 % v/v PEG 350 MME
MG1.31	None	0.02 M bis Tris pH7.0	15 % w/v PEG 2000
MG2.04	None	0.02 M Tris pH7.5	22 % v/v PEG 550 MME
MG2.46	0.002 M zinc sulfate	0.08 M HEPES pH7.0	25 % v/v Jeffamine ED2001
MG2.36	0.001 M zinc sulfate	0.05 M HEPES pH7.8	28 % v/v PEG 600
MP18	None	0.02 M Tris pH7.5	12.5 % w/v PEG 2000 MME
MS9	0.1 M sodium chloride	0.1 M MES pH6.5	30 % v/v PEG 400

ハイライト (赤) : 結晶がマイクロバッチ法で再現し、放射光測定に十分な大きさに成長した条件。

Kit は MG:MemGold、MP:MemPlus、MS:MemSys (Molecular Dimension 社) を示す。

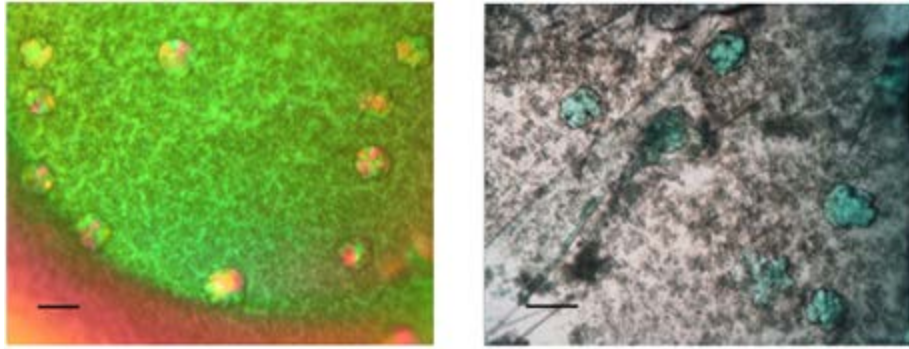


図 69 マイクロバッチ法で析出した結晶
 MemGold 2.36 で析出。スケールバーは 0.1mm を示す。
 左図は偏光写真、右図は当該結晶の染色後の写真。

(5) 膜タンパク質発現技術の開発 (三井化学アグロ分室)

① 膜タンパク質 A (昆虫由来、ホモペンタマー) 発現技術の開発

昆虫受容体 (膜タンパク質 A) の構造解析を目的として、昆虫頭部から RNA を抽出後、RT-PCR により DNA を増幅、塩基配列を決定して、昆虫受容体 cDNA を取得した。Bac-to-Bac 法により取得した昆虫受容体遺伝子の組み換え Baculovirus を作製し Sf9 細胞に感染させて、patch-clamp を用いて遺伝子の機能的発現を確認した。タンパク質の精製、および受容体の発現を簡便に検出する方法を確立する目的で、受容体の C 末端のペプチドに対する抗体を作製した。しかしながら、抗体を用いた Western Blotting により昆虫受容体タンパク質を検出することはできなかった。

そこで、Western Blotting や免疫沈降で実績の有る Tag を受容体の C 末端に付加した遺伝子を作製し、同様に組み換え Baculovirus を取得して、Sf9 細胞に感染させ発現検討を行った。patch-clamp を用いて活性を調べたところ、Tag が付加していないタンパク質と同様の活性が見られたことから、Tag を付加したことによる影響は無いと考えた。組み換え Baculovirus を感染させた Sf9 細胞を用いて Tag に対する抗体を用いて免疫沈降後、Western Blotting を行ったところ、昆虫受容体に相当する位置にバンド (図 70 右) を確認した。しかしながら、受容体タンパク質の発現量は低く、本発現系を用いて受容体の精製を行うことは困難であると考えた。

そこで、安定発現株なら大量培養が容易に行えると考え、Tag を付加した受容体遺伝子を Drosophila S2 細胞に導入して安定発現株を取得した。安定発現株の受容体遺伝子の機能的発現を patch-clamp を用いて確認した。また、Tag に対する抗体を用いて免疫沈降後、Western Blotting を行い、昆虫受容体に相当する位置にバンド (図 70 左) を確認したが、その発現は非常に低いものであった。

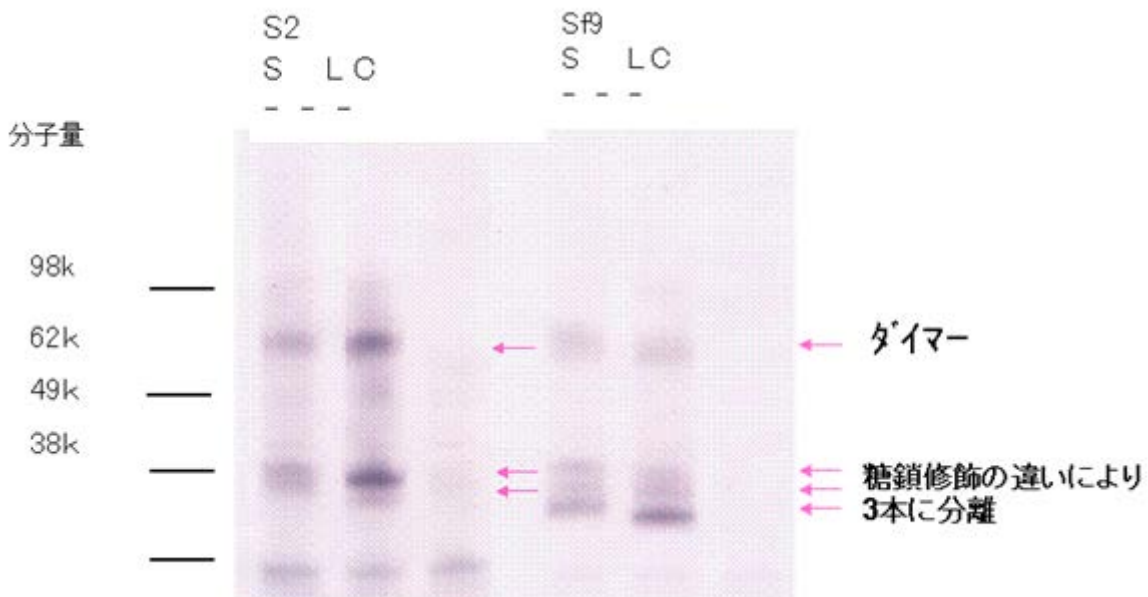


図 70 標的タンパク質の発現確認 (Western Blotting)

② 昆虫 RDL GABA 受容体発現技術の開発と応用

膜タンパク質 A (昆虫由来、ホモペンタマー) の発現技術を用いて、昆虫の RDL GABA 受容体 (ホモペンタマー) を機能的に発現し、フィプロニル抵抗性機序を解明した。

種々の昆虫由来の RDL GABA 受容体およびその変異体の安定発現株を構築したのでその中から免疫染色により発現量の高い株の選択を試みたが、発現量が低いためか、RDL GABA 受容体遺伝子を導入していない *Drosophila* S2 細胞と明確な差が得られなかった。

③ 膜タンパク質 B (昆虫由来、ホモペンタマー) 発現技術の開発

昆虫受容体 (膜タンパク質 B) の構造解析を目的として、昆虫から RNA を抽出後、RT-PCR により DNA を増幅、塩基配列を決定して、昆虫受容体 cDNA を取得した。昆虫受容体遺伝子の恒常発現型プラスミドを作製し *Drosophila* S2 細胞に導入して、安定発現細胞を構築した。安定発現株の受容体遺伝子の機能的発現は膜電位依存的蛍光プローブを用いて行なった。昆虫受容体の安定発現細胞はリガンド A に対しては安定的に活性を示したが、リガンド B に対する活性は不安定であった。発現細胞を S2 細胞から Sf9 細胞に変えたが同様な傾向が見られた。リガンド B に対する活性が不安定になる原因として、受容体が恒常的に発現することで細胞がダメージを受けているのではないかと考えた。

そこで、昆虫受容体遺伝子の誘導発現型プラスミドを作製し *Drosophila* S2 細胞に導入して、安定発現細胞を取得したが、やはり、リガンド B に対する活性は不安定であった。

次に、昆虫受容体 (膜タンパク質 B) の膜ドメインの構造解析を目的として、細胞外ドメインのリガンド結合ドメインは膜タンパク質 X 由来で膜ドメインは膜タンパク質 B 由来のキメラ遺伝子を作製した。キメラ遺伝子の恒常発現型プラスミドを作製し *Drosophila* S2 細胞、HEK 細胞に導入して、安定発現細胞を構築したところ、HEK 細胞株で膜タンパク質 X のリガンド X による安定的な活性が認められた。膜タンパク質 B の既知阻害剤で阻害活性を調べたところ、キメラタンパク質の活性は膜タンパク質 B の既知阻害剤で阻害された。以上の結果から、キメラタンパク質の膜ドメインは正常な構造を保持していると考え、キメラタンパク質の結晶化を試みたが、キメラタンパク質の精製・結晶化検討は困難であった。

④ 膜タンパク質 C (昆虫由来、ホモテトラマー) 発現技術の開発

産業応用上有用と考えられる膜タンパク質でホモテトラマー構造をもつイオンチャンネルをターゲットとして選定し、発現系構築を試みたが、大腸菌で微量の発現でも毒性を示すらしく、発現プラスミドの作製段階で IS1 配列が構造遺伝子中に入る等、発現プラスミドの構築が困難であった。そこでホモテトラマー構造をもつイオンチャンネルの遺伝子に合成イントロンを挿入した構造遺伝子を作製した。合成イントロンを挿入した構造遺伝子は、大腸菌中に安定に存在し、発現プラスミドの構築に成功した。そこで、イントロンを挿入した構造遺伝子の発現プラスミドを Sf9 細胞に導入し、シングルコロニーアイソレーションを行いリガンドに対して安定的に活性を示す安定発現株を選択した。安定発現株を用いてタンパク質の結晶化を試みたが、タンパク質の精製・結晶化検討は困難であった。

(6) 筋小胞体膜イオンチャンネル (産業技術総合研究バイオメディカル研究部門)

心筋の拍動や白血球での免疫の獲得において、 Ca^{2+} は最も重要な役割を果たす情報伝達物質の一つである。細胞の小胞体に貯蔵された Ca^{2+} はイオンチャンネル等によって放出されて枯渇し、その枯渇刺激により細胞質や細胞外から新たな Ca^{2+} 流入が起きる。枯渇した小胞体の Ca^{2+} は Ca ポンプを用いて ATP を使って補充される。これらのタンパク質の機能単位である複合体は、結晶作製が容易ではなく、電子顕微鏡をもちいた単粒子構造解析が有力な方法である。電子線単粒子解析を改良するために、非線形最適化法を組み合わせて、単粒子解析法の拾い上げプログラムを改良した。この方法を用いて、Na チャンネルや TRP (transient receptor potential) チャンネル、小胞体チャンネルなど、生理的に極めて重要な様々の蛋白質の構造・機能相関の解析を行っている。本研究では、神経や心筋などで Ca^{2+} 濃度制御器官として特殊に進化した筋小胞体に特に注目して研究を進めた。

電子線単粒子解析の分解能を向上させるために、非線形最適化法を組み合わせて、タンパク質粒子像自動拾い上げプログラムを開発した。改良された単粒子解析法を用いて、TRP (transient receptor potential) M2 チャンネルなど、生理的に重要な様々の蛋白質の構造・機能相関の解析を行っている。

電圧感受性 Na チャネルは神経伝達に極めて重要であり、その機能不全は不整脈や痙攣、骨格筋麻痺など重篤な疾病を引き起こす。海洋性高度好塩菌から発見された 6 回膜貫通型イオンチャネル (NaChBac) は 24 回膜貫通型 Na チャネルや Ca チャネルの原始型と考えられ、電圧感受機構を解明するためのモデルとして期待されている。本研究では NaChBac が 4 量体化してイオンチャネルとして働く機構を、細胞内 C 末領域に着目して行った。C 末 coiled-coil 領域を欠損した変異体は、チャネル活性は失われるにもかかわらず、4 量体構造を保持しうることが種々の生化学解析と電子顕微鏡観察の結果から明らかになった。本結果から、4 量体形成には通説とは異なる新たな責任領域が存在することが示唆された (*Prog. Biophys. Mol. Biol.* 2010)。現在この 4 回対称型の Na チャネルを用いて、さらなる Na チャネルの高分解能単粒子解析を進めているところである。

筋小胞体膜には様々なイオンチャネルが含まれている。細胞における様々な情報伝達に呼応して、貯蔵された Ca^{2+} を放出することによって様々な生理的に重要な役割・機能を果たしている。リアノジン受容体イオンチャネルは Ca を放出する機能を有するが、それとは逆に、K を流し込んでチャージのバランスを取るのが、分子量 33kDa の Mg33 チャネルである。その機能と構造を以前に報告した (*Nature* 2007)。今回はそれよりも分子量が小さい、23kDa の機能が未知な膜たんぱく質 Mg23 がターゲットである。その存在は以前から知られていたが、その機能はやはり陽イオンチャネルであることを見つけた。チャネルが開いた時には、様々な陽イオンを透過して、イオン選択性が低い。さらに、その構造がおよそ 36 量体からなるボール(深皿)状であることを決定し、国際誌に発表した (*Biochemistry* 2011)。このチャネルが Mg33 チャネルとどのように協調して小胞体からの Ca 放出を制御していくかが今後の課題である。これらのチャネルは様々な筋肉症、ひいては心筋症と深く関連することが推測される。今後は、実際の病気の解決に役立つように、さらに研究を進展させたい。

また、骨格筋や心筋の小胞体での Ca^{2+} 濃度制御におけるもう一方の主役である Ca^{2+} ポンプは、ATP を加水分解することで生じるエネルギーを使って Ca^{2+} の能動輸送を行なう膜タンパク質である。その構造機能相関を低分子量のプローブを用いて行った。その結果、生理的な役割が明解に異なる 2 つの構造に大別できることが判明した。

膜タンパク質は翻訳された後で、様々な修飾を経て機能を果たす Signal peptide peptidase (SPP) は、その様な修飾を行なう機能を持った膜タンパク質であり、基質タンパク質を膜内で切断する。SPP のアミノ酸配列は、アルツハイマー症の原因となる β -amyloid を生産する γ セクレターゼの活性中心サブユニット Presenilin と似ており、膜内配列切断酵素ファミリーに属する。また、SPP は C 型肝炎ウイルスやマラリアの増殖などに関わることが知られており、創薬標的タンパク質として期待されている。さらに、C 型肝炎ウイルスによる肝臓細胞の癌化には、ウイルスのコアタンパク質を SPP により切り出すステップが必須と思われる。本研究では、生化学的な解析より SPP は 4 量体構造で活性を持つこと、さらに、N 末端領域が 4 量体形成に不可欠であることを突き止めた。さらに、SPP の立体構造を理解するために、電子顕微鏡を用いた単粒子解析をおこなったところ、SPP は全体として、4 回対称の弾丸様の構造でした。膜貫通部位の内部には、親水性環境の隙間があることが判明し、それはタンパク質の切断反応に水分子が必要であることと良く一致する。また、タンパク質の外壁の膜貫通側には薄い部分があり、基質となるシグナル配列を含むペプチド鎖の導入・排出口になると考えられる。本成果は国際誌に発表した (*J. Biol. Chem.* 2011)。

(7) ATP 感受性カリウムチャネルの生産、精製手法の確立及び電子線単粒子解析による立体構造決定 (京都大学大学院農学研究科)

① ヒト培養細胞細胞による大量発現系構築

本研究で対象とする ATP 感受性カリウムチャネルは分子量約 900 kDa の巨大な膜タンパク質複合体である (図 71)。このため発現には高度な翻訳後修飾が必要であり、大腸菌や酵母など汎用される発現系は言うに及ばず、比較的哺乳類由来のタンパク質に対応できるとされている昆虫細胞発現系を用いても発現は困難であった。そこで本研究では哺乳類細胞を用いた発現系の開発を行った。浮遊培養に適応した HEK293 由来の細胞株 (freestyle293 株) に Kir6.2 と SUR1 の両サブユニットを共発現させたところ、カリウムチャネルの電流が観測された (図 72)。また、このチャネル電流は ATP 感受性カリウムチャネルの特異的な阻害剤である glibenclamide で完全に抑制されたことから遺伝子導入細胞で ATP 感受性カリウムチャネルが機能的に発現している事が確認された。一方、タンパク質の発現量は少ないと予想されたことから大量の発現細胞を取得する必要がある事が明らかとなった。

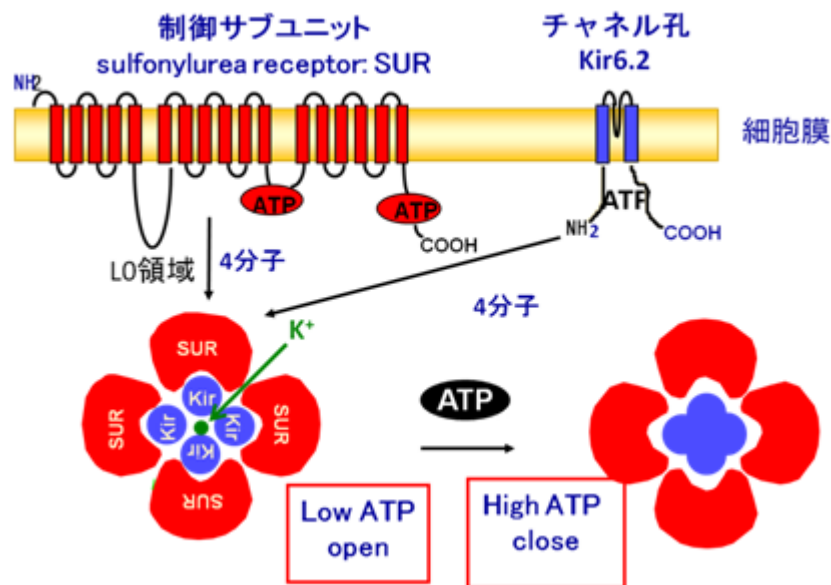


図 71 ATP 感受性カリウムチャンネルの構造模式図

ATP 感受性カリウムチャンネルはチャンネル孔を形成する Kir6.2 が 4 分子、制御サブユニットである SUR1 が 4 分子ずつ結合して形成されるヘテロ 8 量体構造をもつ。ATP 感受性カリウムチャンネルの活性は細胞内の ATP 濃度によって調節されることから細胞の代謝レベルセンサーとしての機能をもつ。

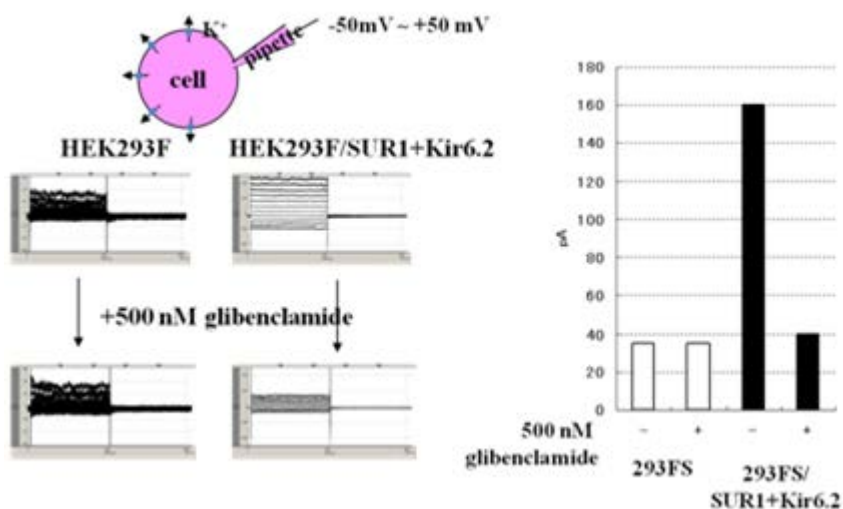


図 72 ヒト培養細胞を用いた ATP 感受性カリウムチャンネルの機能的発見

A: 浮遊培養が可能なヒト培養細胞株 (freestyle293 株) に ATP 感受性カリウムチャンネルを構成する遺伝子を一過的に導入し、ホールセルパッチクランプ法により細胞膜上のカリウム電流を測定した。ATP 感受性カリウムチャンネルを発現させた細胞では親株に比べ大きな電流が計測され、電流は ATP 感受性カリウムチャンネルの特異的阻害剤である glibenclamide によって完全に抑制された。
B: 電流量を定量化した。

そこで、続いてバイオリアクターを用いた細胞培養系の大規模化に着手した。培養器具には和研薬社製のセルマスターを用い、溶存酸素等の培養のパラメーターの最適化を行った(図 73A)。その結果、溶存酸素濃度を 3ppm、pH7.2 の状態で培養した場合に最も発現量が高く安定的に ATP 感受性カリウムチャンネルを生産できる事が明らかとなった。

ATP 感受性カリウムチャンネルはカリウムのリークチャンネルであり、細胞毒性を持つことから安定発現株による発見が出来ず、一過性のタンパク質発現法を選択する必要がある。したがって、実験ごとに遺伝子導入試薬によって遺伝子を導入する必要がある。この遺伝子導入試薬は 1L 培養あたり約 6 万円と非常にコストのかかるものであり、本発現系を一般化し、様々な創薬対象に応用するためには大幅なコスト削減が不可欠であった。本研究ではこれまで哺乳類細胞に遺伝子の導入が可能であると

報告されている化合物を用いて GFP 発現ベクターを導入し発現細胞の蛍光を測定する事で遺伝子導入効率の検討を行った(図 73B)。陽イオン性のリポソーム (DOTMA, DDAB) および陽イオン性ポリマーについて検討を行ったところ、直鎖状ポリエチレンイミン (25 kDa) を用いた場合に最も発現効率が低い事が明らかとなった。ポリエチレンイミンを用いた場合の目的タンパク質の発現量は市販薬を用いた場合と同等かそれ以上であり、十分実用に耐えるものであった。特筆すべきは遺伝子導入にかかるコストであり、これまで 6 万円必要であった遺伝子導入のコストをわずか 10 円とほぼ無視できるレベルまで低下させる事が可能となった。本研究で開発した哺乳類細胞による大量発現系は ATP 感受性カリウムチャンネルの発現精製の他、後述する HDL 産生にかかわる輸送体などの重要な創薬対象の発現精製に応用可能であった。本研究で開発した手法は哺乳類由来の膜タンパク質およびその複合体の発現を行う上で有用な手法である。

ついで ATP 感受性カリウムチャンネルの発現を最適化し、最も収量を得られる条件を決定した(図 74)。この結果、遺伝子導入後 48 時間後に発現は最大となり、最も収量が期待できる事が明らかとなった。また両サブユニットを共発現した場合には SUR1 サブユニットに成熟型糖鎖が付加されることから、発現された ATP 感受性カリウムチャンネルは細胞の品質管理機構を経過していると推測された。

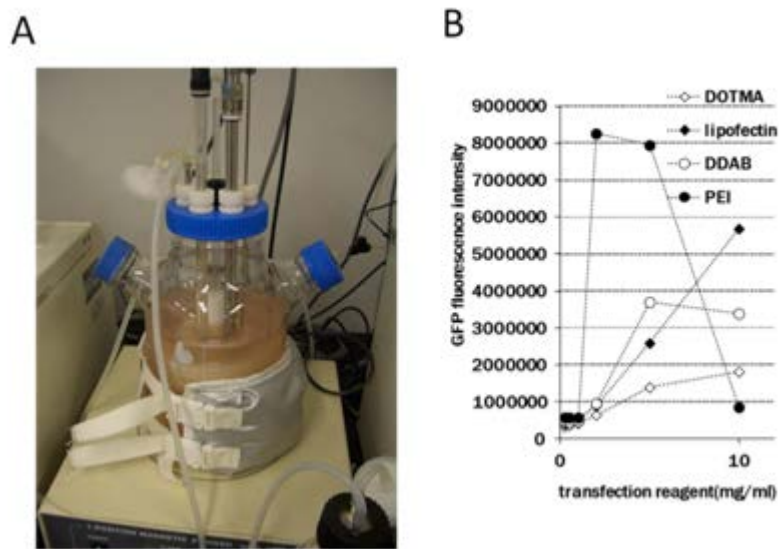


図 73 ヒト培養細胞を用いた ATP 感受性カリウムチャンネル発現系

A: 和研薬社製の cellmaster1700 を用いて温度、溶存酸素等の最適化により 3L スケールでの培養を達成した。

B: 遺伝子導入試薬の探索図に示した遺伝子導入試薬と GFP 発現遺伝子を混合し、プラスミド・遺伝子導入試薬複合体を形成させ、FreeStyle293 細胞に導入した。発現の効率は GFP の蛍光を用いて算出した。

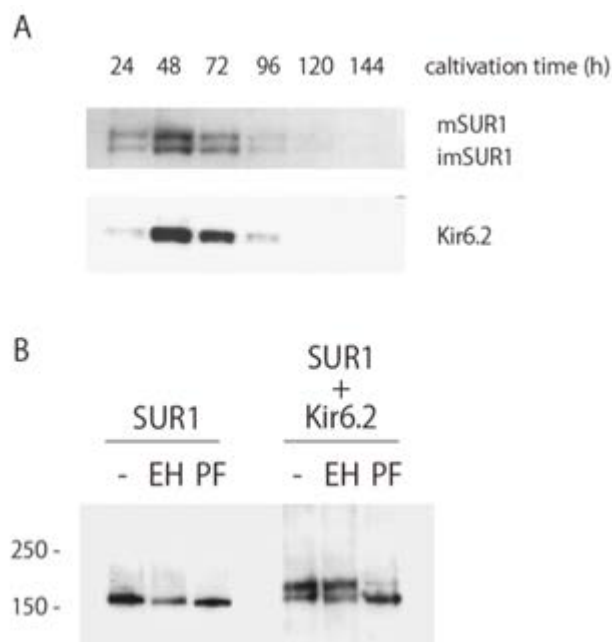


図 74 ATP 感受性カリウムチャネル発現の最適化

A : 最適な発現時間の検討。PEI を用いた遺伝子導入法により SUR1、Kir6.2 両遺伝子を一過的に発現させ、遺伝子導入後、図に示された時間に細胞を回収し、発現量をウエスタンブロット法により解析した。

B : SUR1 サブユニットの糖鎖解析。ATP 感受性カリウムチャネルが細胞の品質管理機構を潜り抜け、成熟型となっているかを糖鎖解析により検討した。

Kir6.2 サブユニットを共発現させた場合のみ SUR1 に成熟型糖鎖が付加される。

EH : EndoH (非成熟型糖鎖を切断)、PF : PNGaseF (成熟型、非成熟型糖鎖を切断)

② ATP 感受性カリウムチャネルの安定化条件の探索手法確立

上記研究項目①において ATP 感受性カリウムチャネルの精製の試行実験を行った結果、ATP 感受性カリウムチャネルはサブユニット間の相互作用が弱く、精製の第 1 段階である界面活性剤の可溶化によって容易に複合体が乖離する事が明らかとなった。そこで本研究では膜タンパク質の 3 次元結晶化の結晶化スクリーニングに有効であると報告されていた蛍光ゲルろ過法 (Kawate T, *Structure* Apr;14(4):673-81, 2006) を改良し、複合体安定化条件のスクリーニング系の開発を試みた。Kir6.2 および SUR1 の N 末端および C 末端に GFP を融合させて発現させたところ Kir6.2 の N,C 末端に GFP を融合したもの、および SUR1 の N 末端に GFP を融合させたものについて GFP 融合タンパク質の発現が確認できた。このうち Kir6.2 の N 末端に GFP を融合した変異体については活性な ATP 感受性カリウムチャネルが形成される事が報告されていたため、本研究ではこの変異体を用いて以降の解析を行った。

GFP 融合型 ATP 感受性カリウムチャネル発現細胞を様々な界面活性剤で可溶化し、ゲルろ過分析を行った。その結果ポリオキシエチレン系列の界面活性剤である C12E8 で可溶化した場合には分子量 900 kDa 付近に 8 量体と思われる位置に溶出ピークが確認できたのに対し、膜タンパク質の精製で汎用される DDM (n-Dodecyl- β -D-maltopyranoside) では複合体の予想サイズよりはるかに小さい 500 kDa 付近に溶出ピークが観察された (図 75)。これは GFP-Kir6.2 が 4 分子集合した予想分子量とほぼ同じであることから、複合体が乖離した結果であると推察された。また、技術的側面について述べると、本手法は 1 分析あたり 15 分で分析が可能であり、必要とされるタンパク質も精製タンパク質に換算して約 100 ng と極めて少ないことから、多検体の分析に適した手法であると考えられる。

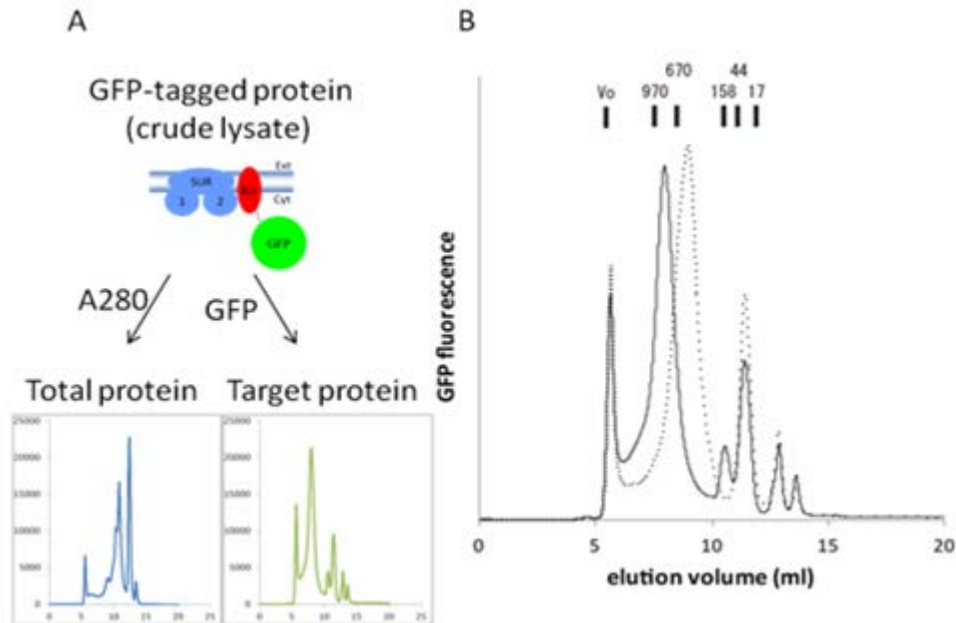


図 75 蛍光ゲルろ過分法による複合体形成の検出手法開発

A: 分析の概念図 (Kawate et al. *Structure* 14, 673, 2006)。GFP 融合型タンパク質を蛍光で検出することで精製せずとも特異的な認識が可能となる。

B: Kir6.2 サブユニットを GFP に付加し、蛍光ゲルろ過分法により分析した。その結果 C12E8 を可溶化剤として用いた場合 (実践) には 8 量体構造が維持されているのに対し、DDM (波線) では複合体構造が破壊され、Kir6.2 と SUR1 が乖離したことで低分子側にシグナルが検出される。

本手法を用いて様々な界面活性剤を検討した結果、ATP 感受性カリウムチャネルの可溶化には C12E8 が最も適している事が明らかとなった (図 76)。また、アルキル基が炭素 1 原子分だけ延長された C13E8 を用いて可溶化を行った場合にも複合体の乖離が観察されたことから、ATP 感受性カリウムチャネル複合体が極めて脆弱であり、機能的な精製には十分な条件検討が必要である事が示唆された。本研究では界面活性剤の他、塩の種類や濃度、pH、グリセロール濃度などについて網羅的に解析を行い、最も適した可溶化、精製条件を決定した。

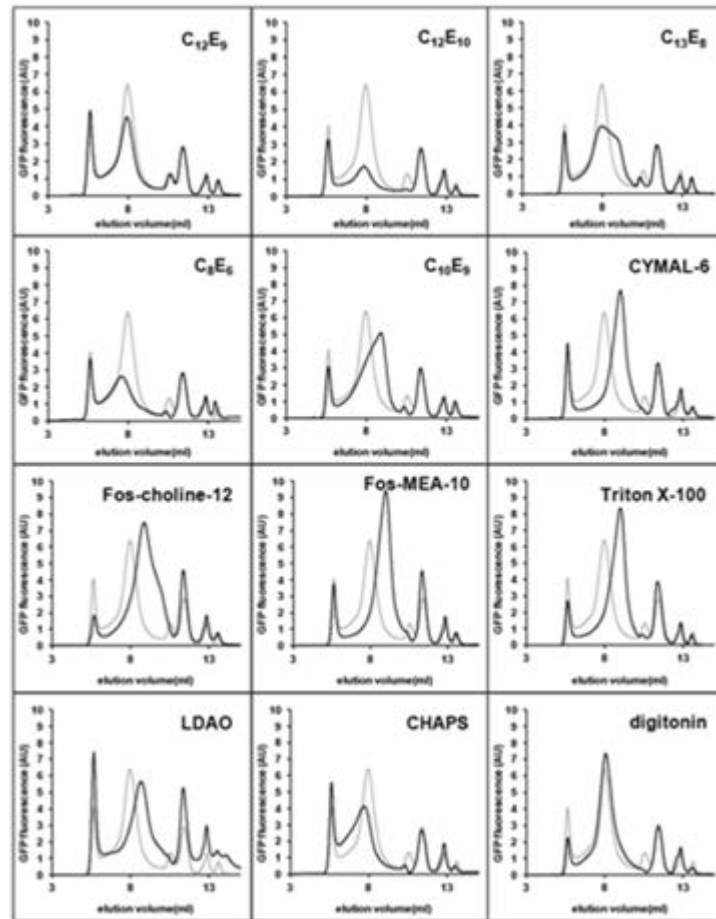


図 76 蛍光ゲルろ過法による複合体安定化条件の探索

各種界面活性剤が複合体の安定性に与える影響を解析した。複合体構造は C12E9、digitonin 中で保持されることが明らかとなった。対照として C12E8 で可溶化した場合の溶出パターンを薄線で示した。

③ ATP 感受性カリウムチャネルの精製

Kir6.2 および SUR1 の両サブユニットを効率的に同一細胞へ導入させるため、同一ベクター上に両遺伝子が組み込まれた発現用ベクターを作成した。これを上記研究開発項目①の手法により FreeStyle293 細胞に導入し、48 時間培養し ATP 感受性カリウムチャネルの発現を行った。ついで ATP 感受性カリウムチャネル発現細胞から膜画分を粗抽出し、高濃度の塩によって表在性タンパク質を除去した後、界面活性剤 (1% C12E8) で可溶化した。精製は Kir6.2 の C 末端に付加した Flag-tag を利用し抗 Flag-tag 抗体 (Flag-M2) を用いた免疫沈降法により行った。精製標品の純度は約 90% であり、Kir6.2 と SUR1 のサブユニット間のモル比は 1 : 1 であった (図 77)。また、精製標品の沈降速度評価、負染色電子顕微鏡像の直接観察により精製 ATP 感受性カリウムチャネルが 8 量体構造を保持している事が明らかとなった (図 78)。

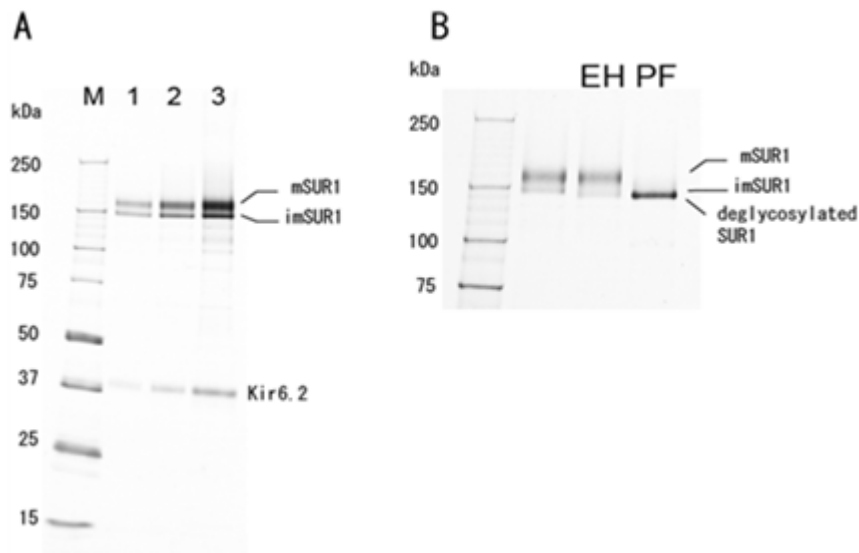


図 77 ATP 感受性カリウムチャネル複合体の精製

3L 培養した FreeStyle293 細胞に ATP 感受性カリウムチャネルを一過的に発現させ、C12E8 で膜を可溶化した後 Flag-tag による 1 段階精製を行った。

A : 銀染色による純度の確認。ImageJ を用いた解析から純度は約 90% と算出された。

B : 精製標品の糖鎖解析。精製標品の SUR1 サブユニットに付加された糖鎖は EndoH (図中 EH) に耐性であったことから成熟型糖鎖を付加されていることが明らかとなった。

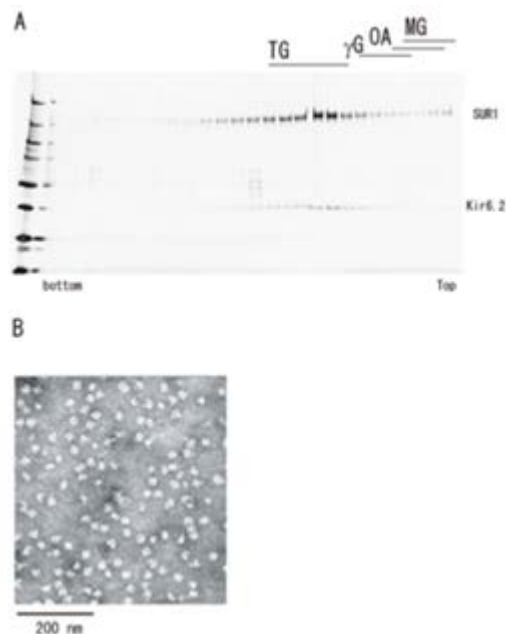


図 78 精製標品の 8 量体構造の確認

精製した ATP 感受性カリウムチャネル複合体が 8 量体構造を保持しているかどうかを検討するため複数の方法を用いて複合体の会合状態を検討した。

A : グラジエント超遠心法による確認 (分子量マーカー TG : 690kDa、 γ G : 140kDa、OA : 44kDa、MG : 13kDa)

B : 電子顕微鏡による確認。精製標品の染色像を撮影し、複合体が乖離しているか分子単位で検討した。精製標品はいずれも類似した粒径を示し、4 回対称性をもつ粒子として観察された。

得られた精製標品が活性な構造を保っているかどうかを判断するため 8-azidoATP による標識試験を行った。本手法は過去 ATP 結合性タンパク質の機能評価に使用されてきた手法であり、目的タンパク質の ATP 結合能を容易に判別可能である。精製 ATP 感受性カリウムチャネルと放射標識された 8-azidoATP を混合し、4°C または 37°C で結合させた。ここに紫外線を照射し azido-タンパク質間に共有結合を生じさせ、ATP 結合性タンパク質のみを標識した。その結果、精製標品の SUR1 サブユニット

が強く ATP によって標識される事が明らかとなった。また、トリプシンによる限定分解の結果、SUR1 に存在する 2 つのヌクレオチド結合領域 (NBF) の内、NBF1 は Mg^{2+} 非依存的に ATP を結合するのに 対し、NBF2 の ATP 結合には Mg^{2+} が必要である事が明らかとなった。これらの特徴は細胞膜中の結果 と同様であることから、精製標品は活性な構造を保持している事が確認された。また、精製標品の収 量は 1 リットル培養した細胞あたり約 50 μg であり、単粒子解析による構造決定には十分であると思 われた

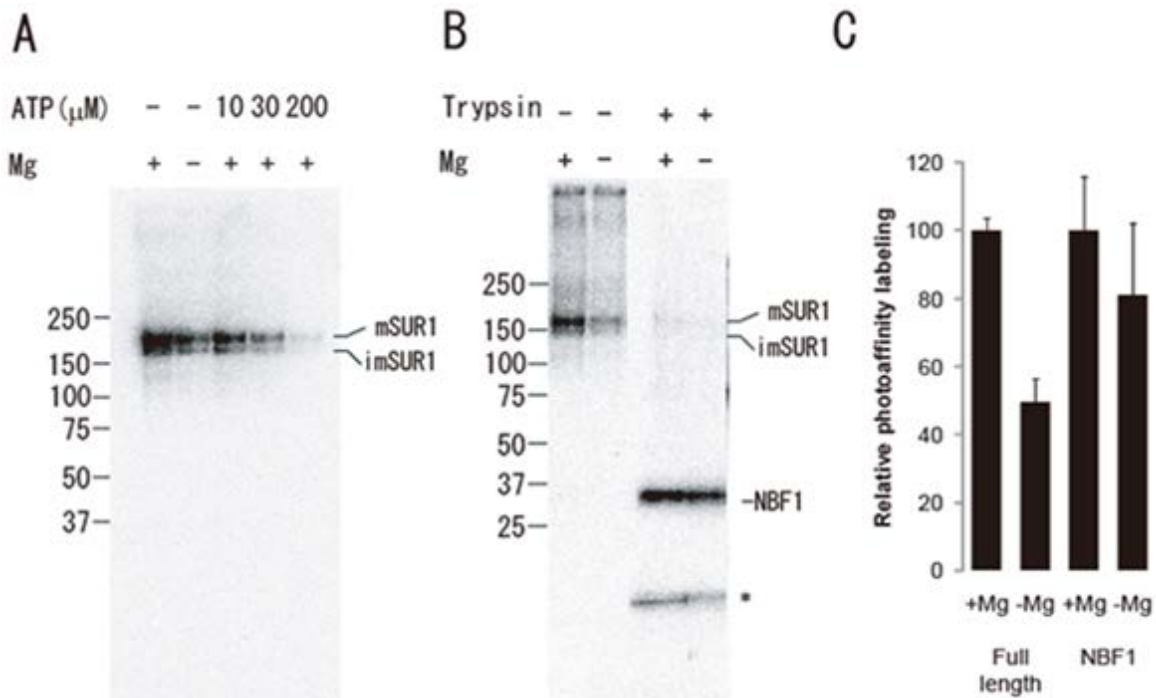


図 79 精製標品の機能性確認

精製した ATP 感受性カリウムチャンネル複合体が機能的な構造を保持しているかどうかを検査するため ATP 結合実験を行 った。

A: 精製 ATP 感受性カリウムチャンネル複合体の ATP 結合能の評価。精製標品を 8-azido- $\alpha^{32}P$ ATP を用いて光親和標識し、 放射活性によって結合能を評価した。

B: トリプシンによる限定分解試験。SUR1 サブユニットのいずれのヌクレオチド結合領域 (NBF) に ATP が結合している かを評価するためトリプシンによる限定分解を行い、NBF1 と NBF2 を分離した。

C: ATP 結合量の定量化。B に示された条件を 3 連で試験し、全長および NBF1 に結合する ATP 量を定量的に算出した。

④ 電子線単粒子解析による ATP 感受性カリウムチャンネルの構造決定

ATP 感受性カリウムチャンネルの全体構造を決定するため、精製 ATP 感受性カリウムチャンネルを 2% の酢酸ウランで負染色した標品の電子顕微鏡像を取得し、類似した像の分類からクラス平均像を作成 した (図 80)。このうち、8 割ほどの平均像ではチャンネルを膜表面に対して垂直方向からとらえた像で あると推測され、中心に 4 つの構造体があり、それを囲むように大小 2 つのドメインからなる構造体 が 4 個存在する事が明らかとなった (図 80B)。また、興味深い事にクラス平均像の中には外側の構造 体が 1 分子脱落したと思われる 7 量体構造が存在した (図 80D)。このことから 1 分子の SUR1 の位置 が明らかになると共に、SUR1 サブユニットは大小 2 つのドメインから構成され、SUR1 の 2 つのドメ インはそれぞれ異なる Kir6.2 サブユニットと相互作用している事が示唆された。また、研究項目②よ りチャンネルを不安定化する事が明らかとなった β -DDM を添加する事で 8 量体構造の割合が低下し、7 量体と思われる構造の割合が増加した。次いで観察された中心部の構造が Kir6.2 であり、周囲の構造 が SUR1 である事を再確認するため、報告されている結晶構造と比較を行った結果、中心部の構造は 報告されている Kir チャンネルとほぼ同じ大きさであり、周辺部のサブユニット構造では大小 2 つのド メインの内、大きいほうのドメインは SUR1 が属する ABC タンパク質のコア領域の大きさとほぼ一致 する事が明らかとなった (図 80E,F)。

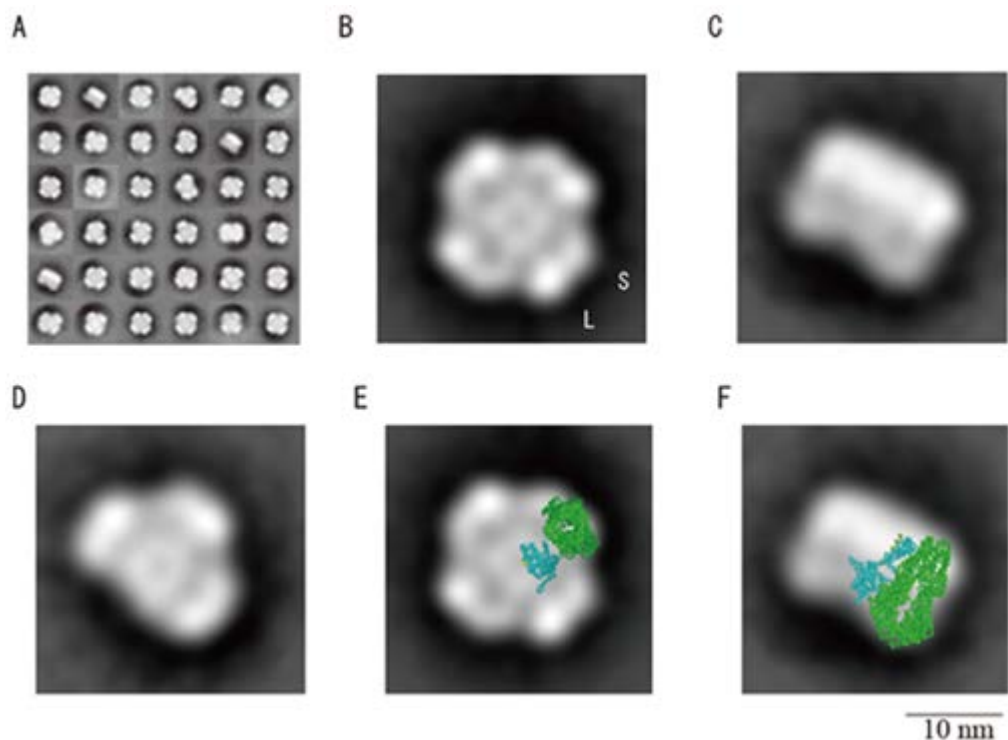


図 80 精製 ATP 感受性カリウムチャネルのプロジェクトマップ作製

負染色した精製 ATP 感受性カリウムチャネルの像から平均像を作成した (A)。上から見たと思われる平均像 (B) と横から見たと思われる平均像 (C) が観察された。また、解析の段階で制御サブユニットが 1 分子欠落したと思われる像 (D) も観察された。報告されている結晶構造と比較した結果、中心部の構造はバクテリアの K チャネル (青: 2QKS) と、周囲の構造のうち大きなドメインは ABC タンパク質のコア構造 (緑: 3B5X) とよく一致した (E, F)。

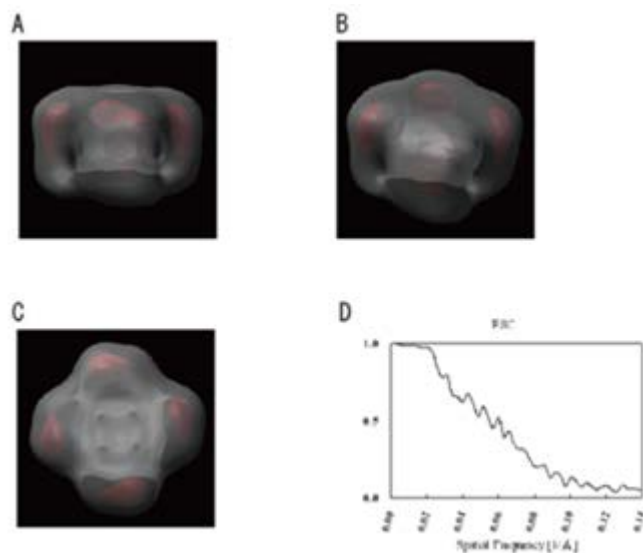


図 81 ATP 感受性カリウムチャネルの 3 次元像

赤で示した部分はより密な構造を取っていると思われる領域。チャネルサブユニットの細胞質側に大きな空洞が観察された。また D より分解能は 18 Å であった。

本研究は SUR1 が ABC タンパク質のコア領域とそれ以外のドメインからなり、さらにそれぞれ独立したドメイン構造をもつ事を明確に示した初めての結果である。

次いでえられたクラス平均像から 3 次元構造の再構築を試みた (図 81)。解析ソフト (IMAGIC) による画像統合の結果、分解能 18 Å での 3 次元構造再構築した。予想とは異なり Kir6.2 の細胞質側には全く構造が見えなかったことから、Kir6.2 の細胞質ドメインは非常に可塑的であり、様々な構造を取りうる事が示唆された。また、高密度および低密度部分を示したモデル像の比較から SUR1 は Kir6.2 に比べてより充填された密度の高い領域から形成される事が明らかとなった。

⑤ ATP 感受性カリウムチャネルにおけるサブユニット相互作用部位の同定

項目④で行った単粒子解析による立体構造の成果から SUR1 が大小 2 つのドメインから形成されそれぞれが異なる Kir6.2 と相互作用している様子が明らかとなった。また、SUR1 の大きなドメイン構造は ABC タンパク質に共通するコア構造に由来すると推測された。この仮説を立証するため、SUR1 のコア領域のみを Kir6.2 と共発現し、複合体の精製を試みた。欠損変異体の安定化条件を検討した結果、コア領域のみの SUR1 と Kir6.2 の相互作用は極めて弱く、精製はほぼ不可能である事が明らかとなった。一方、副次的な知見として SUR1 と Kir6.2 の相互作用には SUR1 の L0 と呼ばれる細胞質領域が重要である事が明らかとなった。また、この L0 領域には新生児糖尿病を引き起こす突然変異が知られていたことから、この領域は SUR1 と Kir6.2 の結合の他にチャネルの活性制御にも重要な役割を果たしている事が示唆された。本研究ではこの L0 領域のアミノ酸を 6 残基ずつアラニン置換変異体を作成し、項目①において開発した蛍光ゲルろ過法を用いて相互作用に重要なアミノ酸の同定を試みた。まずアラニン置換体の SUR1 と GFP 融合型の Kir6.2 を共発現させ、界面活性剤 (C12E8) で可溶化し、蛍光ゲルろ過法により複合体の形成状況を検証した。その結果、SUR1 の 221-232 番目のアミノ酸が結合に重要で、特に 229-TYWW-232 の配列が重要である事が明らかとなった。図 82 から明らかなように、これらのアミノ酸をアラニンに置換した場合には複合体のピーク形状が大きく崩れる。これはアラニン変異体の SUR1 が Kir6.2 と複合体を形成するものの、その安定性が野生型と比較して著しく劣っている事を示唆する。今後アラニン以外の変異体を作成し、同様に安定性を検証する事で、このアミノ酸配列の内、結合に真に重要な役割を果たす要素を確定する研究が待たれる。本研究はこれまでの方法とは全く異なったアプローチによる解析であり、今後チャネル活性の実験結果と併せる事でチャネル開閉における L0 領域の役割解明につながると期待できる。また本研究は項目②において開発した複合体の安定化手法の探索手法が精製手法の探索のみならず、相互作用領域の決定にも有効である事を示した実証例である。

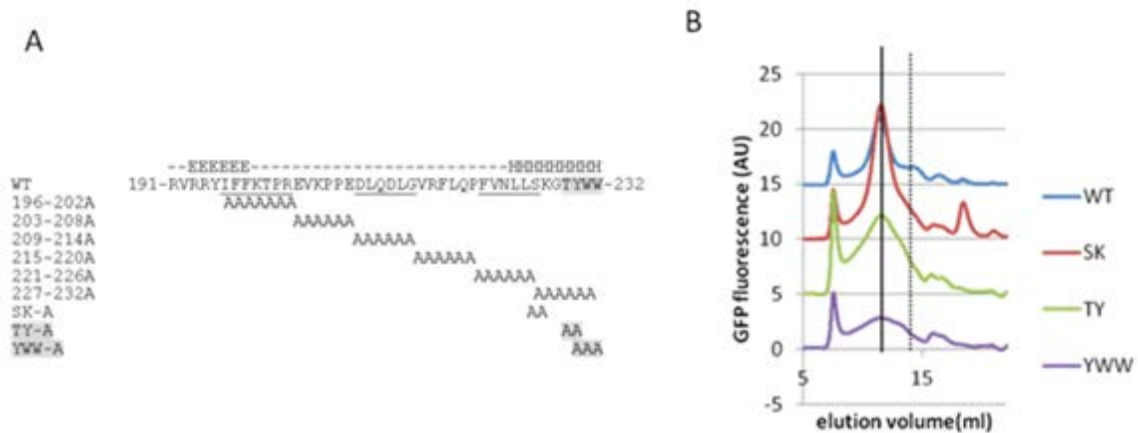


図 82 ATP 感受性カリウムチャネル複合体形成に重要なアミノ酸の同定

A : SUR1 の第一細胞内領域の配列。複合体が不安定になったアミノ酸を網掛けで示した。
 B : 各アラニン変異体の蛍光ゲルろ過分析の結果。実線は 8 量体の位置、点線は壊れた複合体の位置を示す。YWW をアラニンに置換した変異体では複合体が不安定であった。

⑥ HDL 産生にかかわるヒト膜輸送体の解析

血中の高密度リポタンパク質 (HDL : 善玉コレステロール) の濃度はアテローム性動脈硬化症の発症と逆相関する因子である。HDL は末梢からコレステロールを除去する唯一の機構であり、HDL の形成不全はコレステロールの末梢細胞への蓄積、特にマクロファージへの蓄積を引き起こす。これが動脈内のプラーク形成を引き起こし、血管の閉塞、血流障害を引き起こし、心筋梗塞や脳梗塞などが引き起こされる。日本においても動脈硬化は糖尿病と並んで食生活の欧米化に伴い顕在化してきた問題であり、早期の対策が求められている。HDL の形成には ABCA1 と ABCG1 の 2 つの ABC タンパク質が関与しており、動脈硬化症を創薬の対象として考える上で、これら 2 種類の詳細な解析は必須である。ABCA1 については我々が以前の研究で発現系の構築に成功し、ABCA1 が能動的な輸送体であり、脂質の中でもフォスファチジルコリン (PC) とコレステロールを好んで輸送する事を明らかとした。

一方 ABCG1 については未だに報告がなく、実際に輸送体として機能するのかという根本的な点を含めて未解決のままである。これはホモダイマーを形成して機能する ABCG1 複合体構造を保った機能的な状態で発現精製する事が困難である事がその大きな要因である事は間違いない。

項目①において達成したヒト培養細胞を用いた大量発現系は、ATP 感受性カリウムチャネル以外の様々な創薬ターゲットの発現に有効であると期待される。本研究開発項目ではヒト培養細胞発現系の応用としてヒト由来の ABCG1 について発現精製を試みその機能を明らかにする事を目的として研究を開始した。

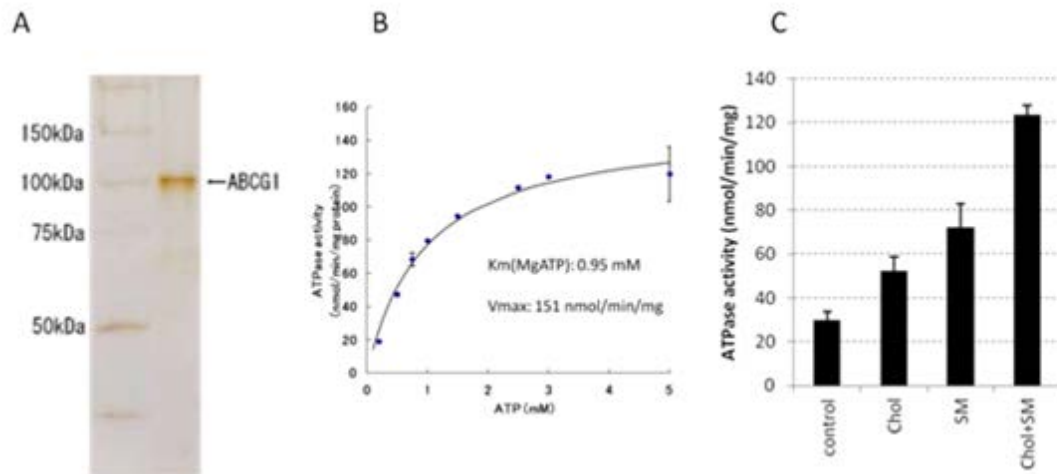


図 83 ヒト ABCG1 の精製と様々なリポソーム中での活性。ATP 感受性カリウムチャネル複合体形成に重要なアミノ酸の同定。

A: ヒト培養細胞を用いて発現精製を行った。銀染色の結果から純度は約 80%程度と予測された。

B: リポソームに再構成したヒト ABCG1 は ATP に対してミカエリス-メンテン型の活性を示した。この活性は報告されているトランスポーター型の ABC タンパク質に匹敵する活性であった。

C: 活性に対するスフィンゴミエリン (SM)、コレステロール (chol) の影響。リポソームに各 5%の SM と chol を添加し活性を測定した。SM, chol の添加により顕著に活性の上昇がみられた。

ヒト ABCG1 に GFP を融合させ FreeStyle293 細胞で一過的に発現させたところ、発現細胞からのコレステロール排出が検出された。このことから FreeStyle293 細胞を用いてヒト ABCG1 を機能的に発現可能である事が確認された。ついで項目②において開発した蛍光ゲルろ過法によって複合体構造に影響を与えない界面活性剤の探索を行った。昆虫細胞発現系を用いた試行実験から ABCG1 は安定性が低く、界面活性剤の選抜には困難が伴うと予想されていたが、予想とは異なりヒト ABCG1 は一般的に使われる界面活性剤の中で高い安定性を示した。このことから ABCG1 の発現には正しい発現系の選択が最重要事項である事が明らかとなった。また、続く精製の段階においても ABCG1 は高い安定性を示したことから、正しく発現した ABCG1 は強固な 2 量体構造をもつものと考えられた。次いで精製標品を用いて生化学的な解析を行った。精製 ABCG1 を卵黄由来の粗抽出脂質に再構成し、ATP 加水分解活性を測定したところ、輸送体型の ABC タンパク質と同様の ATP 加水分解活性 (150 nmol/min/mg protein) を示した。また脂質の種類について検討を行った結果、ABCG1 はスフィンゴミエリン (SM) やコレステロールの存在下で高い活性を示す事が明らかとなった。活性はフォスファチジルコリン (PC) の添加によっても検出されたが、同様の活性を得るために必要な濃度は SM やコレステロールの 2 倍以上であった。フォスファチジルセリン (PS) やフォスファチジルエタノールアミン (PE) 中ではほぼ活性を示さない事も明らかとなった(図 83)。ABC タンパク質の ATP 加水分解活性は輸送サイクルと共役しており、また活性は輸送基質の添加によって促進される事が報告されている。本研究で得た結果はヒト ABCG1 がスフィンゴミエリンやコレステロールの能動的な輸送体として機能する事を強く示唆するものであり、世界で初めての知見である。本研究は、生化学研究はもちろんの事、特異的な阻害剤の探索にも有効であり、高脂血症をターゲットとした創薬のリード化合物発見につながる成果が期待できる。

また、ABCA1 については生化学的手法と細胞生化学的手法を合わせる事で HDL 形成初期反応の機構解明を試みた。その結果、ABCA1 の細胞外領域にあるシステイン結合が輸送活性に極めて重要であ

る事、輸送が複数の段階に分けられる事などを明らかにした。

⑦ ヒト薬物排出トランスポーターの解析

ヒト MDR1 はがんの多剤耐性や体内の薬物動態に関与するため、創薬において重要である。MDR1 は分子量が 280-2000 程度の脂溶性化合物を幅広く認識するが、その認識メカニズムは従来の鍵と鍵穴モデルでは説明できず、不明な点が数多く残されている。本研究では精製タンパク質を用いた詳細な酵素化学的解析により、ヒト薬物排出トランスポーター (MDR1) は分子量 800 程度の化合物を最も効率よく認識し、コレステロールが低分子の化合物を認識する際に重要である事を明らかにした。コレステロールは MDR1 が比較的分子量の小さな化合物を認識する際に同時に基質結合部位内に入る事で化合物の見かけの分子量を増加させ、より効率的に認識させると考えられる。

(8) ヒト赤血球膜由来タンパク質バンド3の電子線結晶構造解析 (理研播磨研究所)

① バンド3の創薬の観点からの重要性

赤血球膜タンパク質に存在するバンド3は Anion Exchanger 1 とも呼ばれ、911 残基のアミノ酸からなる分子量約 10 万の膜タンパク質である。赤血球膜に占める膜タンパク質のうち約半分がバンド3であり、赤血球一つ当たり 1.2×10^5 コピー存在する。膜貫通ドメインは膜を 14 回貫通した膜貫通ヘリックスを持ち、膜外の重炭酸イオン (HCO_3^-) と膜内のクロライドイオン (Cl^-) の対向輸送を行い、生命維持に不可欠なガス交換の一端を担っている。またバンド3はマラリア原虫が赤血球に侵入する際の分子ターゲットとなっている (Li et al., *J. Biol. Chem.* 279 (7), pp5765-5775, 2004)。そのため東南アジアでは楕円赤血球症 (SAO) と呼ばれるバンド3の遺伝子変異 (E400-408) (Schofield et al., *Nature* 355, pp836-838, 1992) を有する患者がマラリアへの抵抗性が向上するため貧血の原因になるにも関わらず多数存在する。

② 二次元結晶を用いた電子線結晶構造解析による成果

バンド3試料は長崎大学の濱崎教授、および九州大学の康教授らのグループから提供を受けた。長年このバンド3の二次元結晶化に取り組み、本研究開発にも参画してくれた山口研究員らにより、らせん状結晶とチューブ状二次元結晶を得ることに成功した。らせん状結晶は単粒子解析法を応用した IHRSR 法により 20 Å 程度で立体構造解析した (Yamaguchi et al., *J. Struct. Biol.* 169, pp406-412, 2010)。チューブ状二次元結晶は MRC プログラムを使用して 7.5 Å 程度で三次元構造解析を行った (Yamaguchi et al., *J. Mol. Biol.*, 397, pp179-189, 2010) (図 84)。ベシクル状結晶の 7.5 Å 分解能の構造解析の結果、一つの結晶格子の中に二量体のバンド3膜貫通ドメインが 12 分子含まれていた。予想される 14 本のヘリックス全ては観察されなかったが、脂質二重膜を斜めに横断する特徴的な V 字型ヘリックスモチーフが 2 つ膜に対して反平行に配置されていることが明らかになるなど、以前の構造解析から格段にバンド3の構造理解が進んだ。

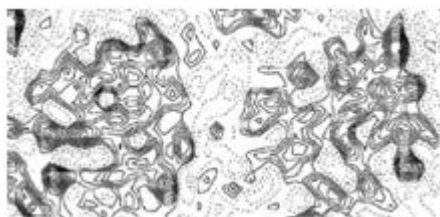


図 84 バンド3 投影像

バンド3の二次元結晶の電子顕微鏡像から得られた投影像。同じ結晶内でも左右異なるように若干の構造変化が識別される。

③ 高分解能構造解析のための精製方法の改良

さらにより高い分解能による構造解析を目指すために、これまでに精製法の改良・最適化と二次元結晶化条件の最適化を重点的に進めた。精製の最終ステップにゲルろ過クロマトグラフィーを導入し、単分散のシングルピークを得ることができた (図 85)。検討した結晶化条件には、まだ結晶の大きさが十分でなく ($\sim 1 \mu\text{m}$ 四方)、形成頻度も低いながら、高品質なシート状結晶 (図 86) が含まれていた。

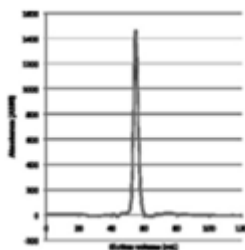


図 85 ゲルろ過クロマトグラフィーの溶出パターン

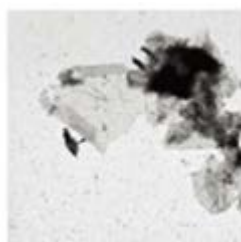


図 86 シート状結晶

阻害剤 H₂DIDS 濃度の最適化

架橋の割合を 100%に達していない可能性を考慮し、処理時間及び温度は変えずに通常 10 μ M 濃度で行う架橋処理を 100 μ M 濃度で行った。収率も倍近くに向上したが、SDS-PAGE で精度を確認すると、還元剤存在下において明らかに二量体のポリペプチドバンドが増え、オリゴマー化したマイナーバンドも目立った。二量体間で分子外架橋したものと考えられ、100 μ M では濃すぎると判断された。引き続き二次元結晶化を行い、同条件にてそれぞれ 1 μ m 四方のシート状結晶を作製できた。結晶の負染色を行い、電子顕微鏡で観察したところ、外見は変わらないものの、詳細は不明だが両者 (10 μ M v.s. 100 μ M H₂DIDS 濃度) の回折パターンは異なっていた。



図 87 10 μ M H₂DIDS vs. 100 μ M H₂DIDS

異なる阻害剤の評価

DIDS (4,4'-diisothiocyanotilbene-2,2'-disulfonic acid) は、バンド 3 の特定箇所 (Lys539 or Lys851) に結合する (Salhany et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, pp11844-11848, 1995)。

一旦結合すれば H₂DIDS と同様に、バンド 3 の安定性に効果的であることが確認できた。これまで通りの精製法が適用でき、二次元結晶化においても同条件にて 1 μ m 四方のシート状結晶やニードル上結晶を作製することができたが、H₂DIDS の結晶には及ばなかった。

DNDS (4,4'-dinitrostilbene-2,2'-disulfonate) もバンド 3 の透過活性阻害剤であるが、H₂DIDS や DIDS とは異なり、共有結合をしない可逆的な阻害剤である。この阻害剤の場合も、基本的にこれまで通りの精製法が適用できるところまで確認できた。

コンタミの除去

最終標品の電気泳動を行い銀染色による精製度の再評価を行ったところ、グリコフォリン A やアクアポリン-1 溶出位置相当のマイナーなコンタミバンドを検出した。バンド 3 膜貫通ドメインとマ

イナーバンドの溶出保持時間がほぼ同じであるために、陰イオン交換クロマトグラフィーの溶出条件（NaCl グラジエント勾配、ピークフラクションの取り方等）を変更しても除去は困難であった。しかしながら、グリコフォリン A のコンタミについては、クロマトグラフィー操作の前段階であるグリコフォリン A の選択的可溶化条件と塩析条件が影響することが分かった。現在のところ、C12E8 の濃度を 0.04% で可溶化し、塩析は最終塩濃度を 0.5M とした時にバンド 3 タンパク質の収率がもっとも良くなり、またグリコフォリン A のコンタミも改善することが分かった。この操作はアクアポリン-1 相当のコンタミには影響しなかった。一方でヒドロキシアパタイトカラムによるクロマトグラフィーでは、アプライ量の半分以上がフロースルー画分になってしまったものの、カラムに吸着した画分にはアクアポリン-1 相当のバンドは含まれなかった。

(9) MFS 型シュウ酸イオン輸送体の電子線結晶構造解析に向けた精製方法の改良（理研播磨研究所）

① シュウ酸イオン輸送体の創薬の観点からの重要性

シュウ酸イオン輸送体 (OxIT) はオキサロバクテリアの膜に存在する輸送体でシュウ酸を取り込みエネルギー源として使用している。OxIT は基質の電気化学ポテンシャル駆動型輸送体の中で最大のファミリーである MFS 型輸送体に属する。MFS はヒトにおいてもグルコース輸送体や神経伝達物質の輸送体をはじめとする 100 を超えるメンバが知られており、大変重要なファミリーである。OxIT に関しては電子線結晶学により 6.5 Å の三次元構造がこれまでに報告されている (Hirai T. et al., *Nat. Struct. Biol.*, 202) MFS 型輸送体の輸送機構をより深く理解するために高分解能の構造解析に向けて精製条件の最適化を行った。

② OxITHis 精製条件の改良-1

本研究の目的である MFS 型対向輸送体の一種であるシュウ酸輸送体 OxIT の高分解能立体構造に基づく作用機構解明のためには、まず高純度で立体構造的にも均一な精製試料の供給体制を確立することが重要である。そこで、本研究では、過去に 6.5 Å 分解能で構造決定された実績のあるヒスタグ融合 OxIT (OxITHis) を使用することとし、その精製条件の再検討を行った。まず、より高品質の精製標品を得るため低温 (20°C) での発現を試みた。OxITHis の発現プラスミドを、大腸菌 XL3 株に形質転換した。形質転換体のコロニーは、100mL のアンピシリンとスペクチノマイシンを含む LB 培地で一晩前培養したのち、6 本の 1 L の同培地のフラスコで培養した。濁度が 0.7 に達した時点で、1mM の IPTG で誘導を行うとともに、20°C で 24 時間培養し、菌体を回収した。膜タンパク質の精製は、目的タンパク質を発現した菌体を破碎した後、分画した細胞膜画分から、界面活性剤によって可溶化、抽出して行う。従来、菌体の破碎には凍結融解によっていたが、本研究では連続フレンチプレスによる破碎に変更した。破碎後、遠心分離による不溶物質を除去後、超遠心により膜画分を回収した。膜画分は、10 mM の基質シュウ酸カリウム、200mM のフッ化ナトリウムを含む溶液に懸濁後、界面活性剤 DDM を 40 mM になるように加え、膜タンパク質の可溶化を行った。可溶化された膜タンパク溶液は、Ni-NTA superflow 樹脂を使ったヒスタグアフィニティ精製に供した。従来のヒスタグ精製では、樹脂に吸着後 pH を下げることで、溶出を行っていたが、今回の精製では、250mM のイミダゾール添加による溶出に変更した。溶出された OxITHis を含む画分は、濃縮後 Superdex200 ゲルろ過カラムに供した。その結果、多量の高分子量成分を含むゲル濾過用秀津パターンがしめされた。SDS-PAGE による分析の結果、この精製条件では OxITHis の不安定が低く、凝集し高分子量成分が生じたと考えられた。

③ OxITHis 精製条件の改良-2

前回の結果を受け、下記の改良を加え、再度 OxITHis の精製を試みた。まず、精製に使用する溶液に、過去の文献で OxITHis の安定性の向上効果が報告されている、グリセロールを 20% 添加した。次に、精製中、常に還元状態を保ち OxITHis が持つシステイン残基のジスルフィド結合形成を抑制するため、ヒスタグ精製の段階まで還元剤 2-メルカプトエタノールを、それ以降の段階ではジチオスレイトールを使用する緩衝液に添加した。また、ゲルろ過カラムの溶出液について、非特異的吸着を除くために添加している 200mM の酢酸カリウムに、緩衝液を Na-HEPES pH7.5 から K-MES pH5.7 に置き換えた。改良の結果、以前のゲルろ過での溶出パターンに比べ、OxITHis が凝集した高分子量の成分が大幅に減少し、OxITHis 本来のコンフォメーションを保っていると考えられる単量体の溶出位置のピークの高さがまし、前回より高品質の OxITHis を得ることができた。

④ OxI THis の安定化条件の検討

前記精製によって得られた OxI THis を用いて、各種溶液条件下での安定性の検討を行った。溶液の置換には透析ボタンを使用した透析を使用し、約一週間の後の残存タンパク質量の測定と小スケールのゲルろ過カラムによる分析に供した。まず、グリセロールの影響を検討するため、それぞれ 0%、10%、20% のグリセロールを含む溶液（他 200mM 酢酸カリウム緩衝液 pH5, 10mM シュウ酸カリウム、1 mM DDM、1 mM DTT を含む）に置換した結果、グリセロール濃度の上昇に伴って残存タンパク質量の増加し、また OxI THis 凝集が少なることがゲルろ過で確認された。次いで、各種塩類を含む溶液（他 20% グリセロール、20mM 酢酸カリウム緩衝液 pH5, 10mM オギザロ酸カリウム、1 mM DDM、1 mM DTT を含む）に置換し結果、酢酸カリウム、硫酸カリウム、硫酸ナトリウムが、残存タンパク質量とゲルろ過 溶出パターンから OxI THis 安定性への影響が小さいことが確認された。そこで、これらの塩に対し、pH5~7 の範囲で同様に OxI THis の安定性を検討した結果、酢酸カリウムを含みと pH6 溶液条件が最も OxI THis の安定性が高いと判断された。

⑤ OxI THis 精製条件の改良-3

上記の OxI THis 安定条件をもとに、精製法に下記の改良を加えた。まず、精製に使用する溶液はすべて、20% のグリセロールと 200mM 酢酸カリウムを含むものとした。また、pH8 程度で操作する必要のあるヒスタグ精製後、直ちに pH6.2 のゲルろ過精製用溶液に対し透析し、その後ゲルろ過精製を行うこととした。さらに、システイン残基の酸化を防ぐ還元剤として、メルカプトエタノールおよびジチオスレイトールを使用していたが、還元剤 TCEP に統一した。これらの改良の結果、精製タンパク質の品質の指標となるゲルろ過カラムでの溶出パターンに大きな改善が見られた。すなわち、OxI THis が凝集した高分子量の成分はほとんど見られず、OxI THis は非常に狭いピーク形状の溶出パターンを示し、構造的にも均一な（単分散な）OxI THis が得られたことが示された。この精製の結果、6L の培養液から、約 5mg の構造研究十分な量の精製 OxI THis を得ることに成功した。

⑥ OxI THis 膜タンパク質の研究の成否に大きな影響を及ぼす界面活性剤の選択

各種界面活性剤を含む溶液中での OxI THis の安定性の検証を行った。試料を、各種界面活性剤を含む溶液に対し、透析ボタンを使用し約一週間透析したのちに、分析用のゲルろ過に供し、得られる溶出パターンから OxI THis の安定性を検証した。各界面活性剤溶液は 20% グリセロール、200mM 酢酸カリウム、10 mM シュウ酸カリウム、1 mM TCEP を共通成分として、限界ミセル濃度の 2 倍の界面活性剤を含むものを使用した。検討の結果、マルトシド系の界面活性剤では、DDM, UDM, CYMAL-7, CYMAL-6 を含む条件では OxI THis は比較的安定で、それらより短い炭化水素鎖をもつ界面活性剤で、凝集が進んだ溶出パターンを示した。マルトシド系以外では、ポリオキシエチレン系の C₁₂E₉, C₁₂E₈, C₁₃E₈ を用いたときに、安定した溶出パターンを示した。よって、これらの界面活性剤が、今後の OxI THis の構造研究に使用する界面活性剤の有力な候補と考えられた。

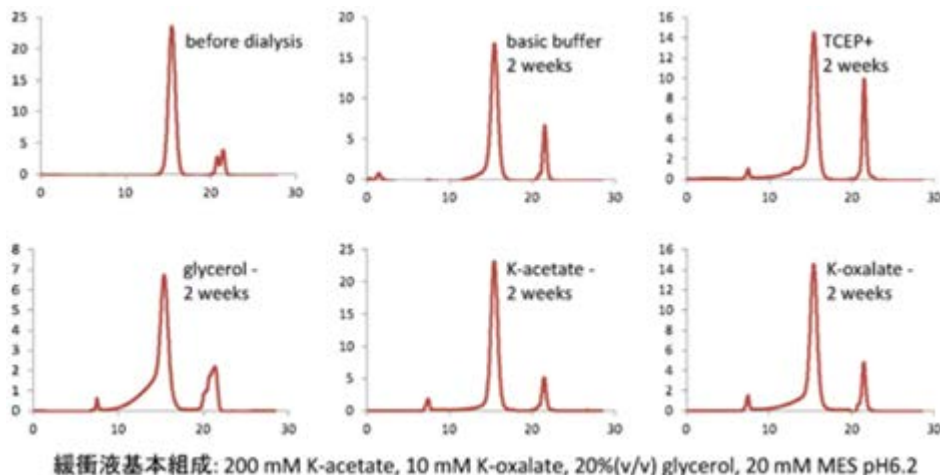


図 88 OxI THis のバッファー条件による安定性の評価

(10) 膜領域を解析するための電子線トモグラフィー技術の開発（理研播磨研究所）

① 電子線トモグラフィー関連ソフトウェアの開発と実際の適用

藤吉研究室において取得した電気シナプス結合部位を含むマーカーなしのクライオ・シングル傾斜トモグラフィーデータおよびマーカーなしの負染色ダブル傾斜トモグラフィーデータを依頼に応じて理研播磨研究所において順次処理し、解析結果をフィードバックした。マーカーなしのトモグラフィーデータの解析にはフロリダ州立大学で開発された **PROTOMO** パッケージ

(<http://www.electrontomography.org/>) を使用し、ダブル傾斜データのマージにはコロラド州立大学で開発された **IMOD** パッケージ (<http://bio3d.colorado.edu/imod>) を使用した。マーカー情報が存在しない2つのトモグラムをアライメントするために、各々の投影像からおおまかなアライメントを得、最終的に3次元のアライメントを行うための独自のスクリプトを開発し使用した。



図 89 ダブル傾斜データの3次元アライメント用変位図例

2つのトモグラムをいくつかのセグメントに分割しそれぞれのセグメントを3次元アライメントした時の位置のずれをベクトルで表示した図（変位を100倍に誇張。この情報から2つのトモグラムをマージした。）

(1 1) アクアポリン4の活性調節機構に関する研究（慶應義塾大学）

脳浮腫は脳を巻き込む様々な病態で引き起こされ、予後に大きな影響を与えるにもかかわらず、有効な予防・治療法が確立されていない。近年、アストロサイトの足突起に局限する水分子チャネルのアクアポリン4 (AQP4) が脳浮腫発生に寄与している可能性が示され、脳浮腫治療の標的として阻害薬の開発が期待されている。

我々は、ラット AQP4 の水透過性が亜鉛や銅イオンで抑制されることを見出した (Yukutake, et al, *Biochemistry*, 2011)。特に亜鉛の効果は完全に可逆的なもので、その調節は生理学的な意味合いがあることも期待される。そこで、本研究では、ヒト AQP4 についても同様の効果があるか否か検討することにした。

1AQP4 タンパク質の発現・精製および AQP4 プロテオリポソーム再構成

ヘキサヒスチジンタグ (6His-tag) 付きヒト AQP4 の cDNA をトランスファーベクターに導入し、組換えバキュロウィルスを作成した。Sf9 細胞の大量培養にウィルスに感染させ、AQP4 タンパク質を発現させた。細胞を低張液中でホモジェナイズし、細胞膜画分を単離し、オクチルグルコシドで可溶化したのち、ニッケルアフィニティーカラムにより AQP4 タンパク質精製を行った。精製 AQP4 タンパク質を合成脂質とオクチルグルコシド存在下で混和し、バッファーで希釈後、界面活性剤を除去し、AQP4 プロテオリポソームを得た。

2AQP4 プロテオリポソームによる機能アッセイ

AQP4 プロテオリポソームの水透過性測定は carboxyfluorescein quenching 法により行った。ストップフロー装置により AQP4 プロテオリポソーム液を瞬時に高張液と混和し、高浸透圧によるリポソーム収縮ともなうリポソーム内の蛍光色素の凝集による蛍光消失の時間経過から水透過性を算出した。

3Blue-Native PAGE

AQP4 のクラスター形成評価には Blue-Native PAGE を用いた。AQP4 プロテオリポソームを 1% ドデシルマルトシドで可溶化したのち、Native PAGE ゲルを用いて電気泳動した。タンパク質を PVDF 膜に転写し、抗 AQP4 抗体によるウェスタンブロットで可視化した。

ラットの AQP4 と同様、ヒト AQP4 においても亜鉛による水透過性の抑制を確認することができた。また、この効果は完全に可逆的なものであった。ヒト AQP1 に於いては、亜鉛の効果が認められないことから、亜鉛の効果はある程度 AQP4 に得的なものであることが推察された。次に、プロポフォ

ール、ミダゾラム、チオペンタール、セボフルランの AQP4 に対する効果を検討したところ、いずれも単独では AQP4 の水透過性に対する大きな変化は見られなかった。しかしながら、大変興味深いことに亜鉛イオン存在下では、プロポフォール投与により、AQP4 水透過性が可逆的に著しく阻害された。他の麻酔薬では同様の増強効果は見出せなかった。この亜鉛イオンとプロポフォールの効果は、完全ではないものの可逆的であることが確認できた。さらに興味深いことに Blue Native PAGE により、亜鉛イオンとプロポフォールの組み合わせが AQP4 の四量体の重合を促進している所見が得られた。この変化は、亜鉛の存在下（プロポフォール無し）で測定温度を室温から 30℃、50℃にしたときにも認められたことから、膜の流動性の変化が関与していることが強く示唆された。

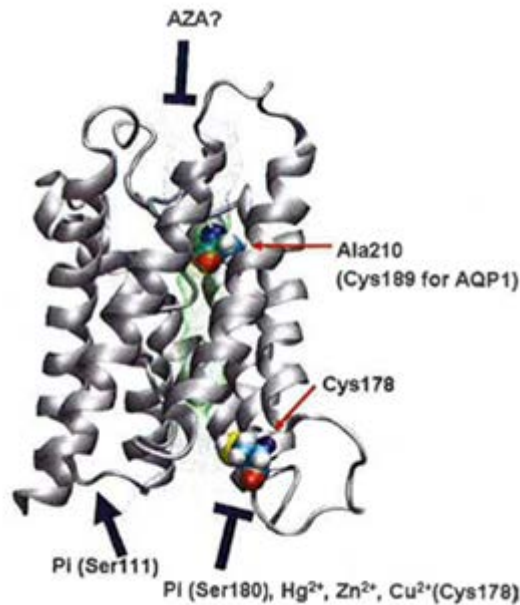


図 90 AQP4 の阻害部位

亜鉛イオンは配位結合により AQP4 に結合し、弱い阻害作用を有することが知られている。我々の結果から、プロポフォールがこの亜鉛の阻害作用を増強することを見出した。プロポフォールにより脂質膜流動性が上がり、AQP4 の側方拡散が活発となった状況下で、亜鉛イオンが AQP4 の重合を起こし、顕著な機能阻害を呈したものと考えられる（図 90）。

プロポフォールと亜鉛イオンの組み合わせが AQP4 の重合を促進し、AQP4 水透過性を著しく低下させた。この機序は脳浮腫治療に重要な役割を果たす AQP4 の機能調節に関して、新たな知見を与えるものと考えられる。

(12) 単一細胞における細胞膜水拡散イメージング法の開発（慶應義塾大学）

従来の細胞膜水透過性の測定は、浸透圧勾配下における細胞容積変化の速度から間接的に求めるにすぎなかった。そのため、細胞の形態等による影響もあり、正確な値を得ることは困難とされていた。そこで、本プロジェクトでは、CARS（Coherent anti-Stokes Raman Scattering）顕微鏡と非常に速い溶液交換システムを用いることで、単一細胞レベルで細胞膜を介する水の交換を直接イメージングして拡散係数を求めることができる画期的な方法を開発することとした。

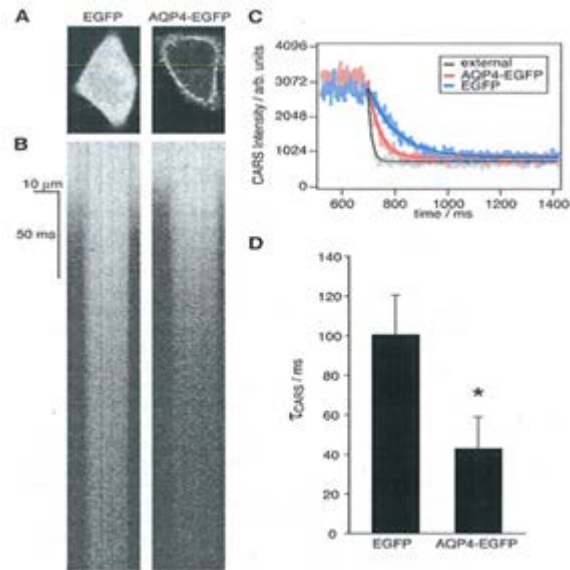


図 91 水の拡散的交換の Aquaporin 4 (AQP4) による促進

- A: EGFP を発現したコントロール HeLaS3 細胞 (左), AQP4-EGFP を発現した HeLaS3 細胞 (右) の蛍光イメージ
 B: ラインスキャン CARS イメージの H2O/ D2O 置換による経時変化
 C: CARS シグナル強度の経時変化および指数関数フィッティング
 D: コントロール細胞と AQP4-EGFP 発現細胞の t_{CARS} , * $p = 1.8 \times 10^{-16}$

CARS 顕微鏡は、それぞれの分子固有の振動の波長を 2 つの 2 光子レーザーを用いて、共鳴現象をおこし、物質固有の振動シグナルを増幅することで蛍光シグナルを用いることなくイメージングすることができる。ここでは、水分子の OH 伸展振動と重水分子の OD 伸展振動の振動数の違いを利用し、水分子あるいは重水分子のいずれかを可視化することを試みた。さらに細胞観測ステージで重水と水を急速に交換するシステムを開発し、交換に伴う細胞内外での水から重水への変化をイメージングし、その減衰速度から拡散係数を求めた。

Hela 細胞を用いて実際の観測を行った結果、単一細胞レベルで水と重水の交換による変化をイメージングすることができた (図 91)。また、ラインスキャンを導入することで、30 ミリ秒/イメージまで時間分解能を上げることができた。水から重水に高速に置換することで、水の減衰速度を測定した。また、細胞の体積、表面積も測定することで単一細胞における細胞膜水拡散係数を求めることができた。次にアクアポリンを一過性に強制発現させた Hela 細胞を用いて、アクアポリンの発現による水透過性の増加を比較検討した結果、アクアポリンの発現量と水透過速度との間に正の相関があることを示すこともできた。更に水拡散の温度依存性を検討するため、19°C、26°C、34°C の温度で同様の測定し、Arrhenius プロットを行なったところ、アクアポリンの発現による水透過性の増加は、温度非依存性であることが確認できた (図 92)。

CARS 顕微鏡は、水分子を蛍光ラベルすること無しにイメージングすることができるので、アクアポリンの調節機構や生物学的意義を検討する上で、大変有意義な測定方法となることが期待される。重水/水の速い交換システムと組み合わせることで、かなり制度の高い水拡散の測定を行なうことが可能となった。アクアポリンの発現量の増加に応じた水透過性の増大も確認でき、更にその増大は温度に非依存的であることも確認できたので、今回観測した水の透過性の増大は、アクアポリンを介するものであることが強く示唆された。

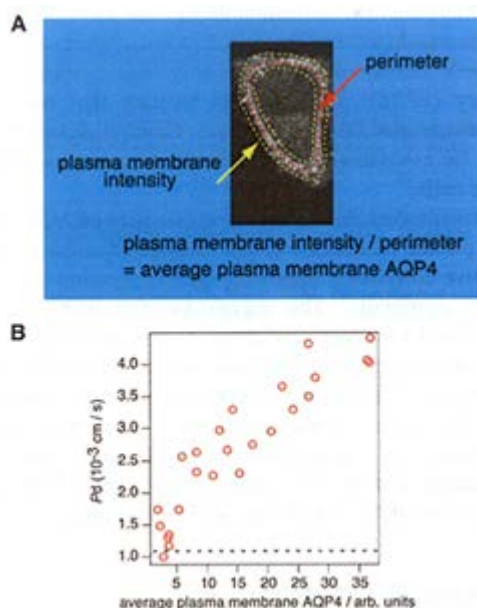


図 92 細胞膜上 AQP4 の量と、水の交換速度とが示す正の相関

A : HeLa 細胞の細胞膜に局在化した AQP4-EGFP の選別

B : 個々の細胞の、AQP4 量と水透過時定数 (pd) によるプロット; $r = 0.92$, $p = 0.0000015$

真核細胞を用いて、単一細胞レベルで水の拡散をライブイメージングする方法を確立した。この測定方法は、アクアポリンの発現量と水透過性との関係が検討できる十分に感度の高い方法であることが示された。

(1 3) 計算化学的手法を用いたアクアポリン 1 の選択的水分子透過機構に関する研究 (慶應義塾大学)

アクアポリンの機能を制御するような薬剤の発見は、その機能異常により起こる疾病の治療薬になると考えられる。しかしながら、これまでのところ、臨床応用可能なアクアポリンに対する阻害剤は見つかっていない。ところで、水銀などの金属は多くのアクアポリン中のシステイン残基に結合し、水分子透過を阻害することが生化学実験により知られている。しかし、その阻害機構について明確な答えはでていない。そこで、アクアポリン 1 中のシステイン残基に水銀が結合した系 (Hg-AQP1) と結合していない系 (Free AQP1) を構築して分子動力学計算を行い、両者の結果を比較することでアクアポリンの水銀による水分子透過阻害機構について解明することを研究の主な目的とした。

本研究では AQP1 を対象とした。まず、分子動力学シミュレーションにより、AQP1 の膜中での構造ダイナミクスに関する研究を行った。

分子動力学シミュレーションを行うためのモデル構造は次のように構築した。AQP1 の結晶解析構造を Protein Data Bank よりダウンロードした (PDB entry: 1J4N)。公開されている構造は単量体である。しかし、AQP1 は生体内では四量体として存在している。そこで、単量体構造から四量体構造を構築した。構築した四量体構造を脂質 (POPE) で構成された二重層膜に埋め込み、二重膜の上下に水分子 (TIP3P water) を発生させ、 $110\text{\AA} \times 110\text{\AA} \times 106\text{\AA}$ の直方体セルを構築した。このような巨大な系を単独の計算機で計算することは計算量が膨大となり困難なため、計算機を並列に繋ぎ、一台当たりの計算負荷を低減し高速に処理することの可能なクラスター・コンピュータ・システムを使用した。アクアポリン 1 中のシステイン残基に水銀が結合した系 (Hg-AQP1) と結合していない系 (Free AQP1) を構築し、温度 (310 K)、圧力 (1 atm) 一定 (NPT) の周期境界条件下で平衡状態の分子動力学シミュレーション各 40 ns 行った。計算プログラムは amber 8 を用いた。

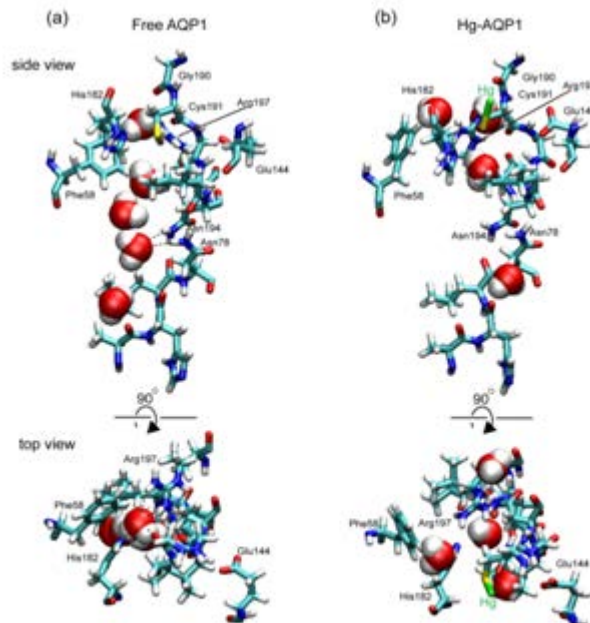


図 93 pore 内部での水分子の配向（水銀の有無による比較）

RMSD の結果から、分子動力学シミュレーションは 30ns 以降で平衡に達していることが分かった。そこで、データの解析は 30 ns から 40 ns の間でおこなった。

まず、Hg-AQP1 と Free AQP1 の水分子透過能を比較し、Hg-AQP1 が水分子透過能を有していないことを確認した（表 1）。両者の主鎖構造の変化はわずかであったことから、水銀の結合はアクアポリン 1 の構造骨格は影響を与えないことが分かった。また、水銀そのものは pore を塞いでいなかった。ところが、水銀が結合したシステインの周囲のアミノ酸に着目すると、両者に明らかな違いが見られた。水銀が結合することにより、水銀の結合したシステインの周囲のアミノ酸の側鎖の立体配置が変化し、pore 内部での水分子の配向に影響が出ることが分かった（図 93）。Pore 内部の水分子は Free AQP1 では一列に並んでいるが、Hg-AQP1 ではアミノ酸の側鎖の立体配置が崩れたことにより、一列に並ぶことができない。

表 7 水の透過個数

Free AQP1	23
Hg-AQP1	0

本研究の結果から水銀によるアクアポリンの水分子透過阻害機構は水銀が結合し、水銀そのものがポアを塞ぐのではなく、ポア周辺に位置するアミノ酸残基の立体配置が崩れることによるものであることが示唆された。

分子動力学計算により、生化学的な実験では確認することができなかった水銀による AQP1 の阻害機構の一端を説明することができた。アクアポリンのポアの入り口のりた構造は水分子選択性に重要な役割を担っていることが改めて確認できた。

研究開発項目②「核磁気共鳴法 (NMR) 等による膜タンパク質およびその複合体とリガンド分子の相互作用解析技術」

(1) 安定同位体標識タンパク質調製系の確立

① NMR 解析を目指した新規酵母発現系の開発 (バイオメディシナル情報研究センター)

安定同位体標識タンパク質の発現には、容易かつ適切な標識コストにて大量発現が可能な大腸菌発現系が一般的に用いられる。しかし、ヒト由来のタンパク質や、高次構造形成に複雑なジスルフィド結合や翻訳後修飾が必要なタンパク質などの場合、大腸菌を含む原核細胞では発現が困難である場合も多い。高等な真核細胞である昆虫細胞や動物細胞を利用した発現系では、活性を有するタンパク質発現に成功する確率が高いが、収量がそれほど高くないことに加え、最少培地を使用することができないため現実的なコストで安定同位体標識試料を調製することは困難になる。そのような場合、比較的大量に安定同位体標識タンパク質を発現できる真核細胞である酵母 *Pichia pastoris* (*P. pastoris*) 発現系が検討されることがあるが、炭素源として高価なメタノールを比較的大量に (> 15-20 mL/L) 必要とすることや、メタノール自体の細胞毒性のため、安定同位体標識試料調製系として汎用的に用いられているとは言い難い状況にある。(表 1)。

そこで、我々はこれらの問題を克服するため、酵母 *Kluyveromyces lactis* (*K. lactis*) を活用した、新しい安定同位体標識タンパク質発現システムの構築を行った。その結果、本発現系を用いて大腸菌発現系と同等のコストで安定同位体標識タンパク質を大量発現させることに成功した。

表 1 従来のタンパク質大量発現系の特徴

	取り扱い 容易さ	安定同位体 標識のコスト	発現量	翻訳後修飾	哺乳類由来タンパク質/ 多量ジスルフィド結合形 成タンパク質発現
原核細胞					
大腸菌	◎	◎	◎	×	△~×
¹³ C-グルコース (>4g/L) ¹⁵ N- ¹⁵ NH ₄ Cl (1g/L) 量水培養可能					
真核細胞					
<i>Pichia pastoris</i> (酵母)	○	×	○(分泌◎)	○	○
遠慮型メタノールの毒性 同位体標識メタノールのコスト					
Sf9, Sf21 (昆虫細胞)	△	×	△	○	○
CHO, HEK (動物細胞)	△	×	×	◎	◎

K. lactis の炭素源および培養法の検討

本来、*K. lactis* は、タンパク質発現誘導剤および単一炭素源として、20 g/L のガラクトースを利用する。しかし、¹³C 標識ガラクトースは高価 (¹³C グルコースの 10 倍以上の価格) であるため、¹³C 標識における障壁となりうる。そこで、グルコースでもタンパク質発現誘導は可能であるという報告と、*K. lactis* の中でもグルコース資化性が比較的高いと言われている GG799 株 (New England Biolabs) を利用し、グルコースを用いて *K. lactis* に目的タンパク質を大量発現させる発現条件の検討を行った。モデルタンパク質として maltose binding protein (MBP) を使用し、ファーメンター培養で MBP を培地上清中へと分泌発現させた。しかし、グルコースで十分量のタンパク質発現を達成するには 20 g/L 必要であり (図 1, lane 1)、大腸菌発現系と同レベルの 4 g/L のグルコース量では十分な発現誘導は認められなかった (図 1, lane 2)。そこで、培養法を詳細に検討した結果、ファーメンター培養中に新鮮な培地をペリスタポンプで供給しつづける Fed-Batch 法により、大腸菌発現系とほぼ同レベルのグルコース量 (5 g/L) でも十分な発現誘導が達成されることを見出した (図 1, lane 3)。

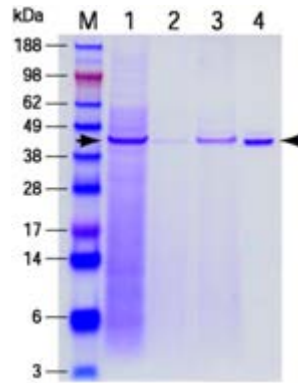


図1 *K. lactis* 発現系で大量発現した MBP の SDS-PAGE 像

レーン1: 通常ファーメンター培養 (20 g/L グルコース使用)

レーン2: 通常ファーメンター培養 (4 g/L グルコース使用)

レーン3: Fed-Batch 培養 (5 g/L グルコース使用)、レーン4: 精製した MBP

安定同位体標識効率の確認

発現させた均一 ^{13}C , ^{15}N 標識 MBP の性質と標識効率を、 ^1H - ^{15}N HSQC および 3 次元 HNCA スペクトルの測定と MALDI TOF-mass 測定によって評価した。 ^1H - ^{15}N HSQC シグナルは良好に分散しており、発現した MBP が正しいフォールドを形成していることを確認できた (図2, パネル左)。3 次元 HNCA スペクトルもシグナル/ノイズ比が十分高く、主鎖シグナルの連鎖帰属を進めることができたことから、十分高い効率で ^{13}C , ^{15}N 標識されていることが示された (図2, パネル右)。さらに、非標識、均一 ^{15}N 標識、および均一 ^{13}C , ^{15}N 標識 MBP について MALDI TOF-mass スペクトルの測定を行った結果、 ^{15}N および ^{13}C , ^{15}N の標識効率はそれぞれ約 93%、約 96%であることを確認した。

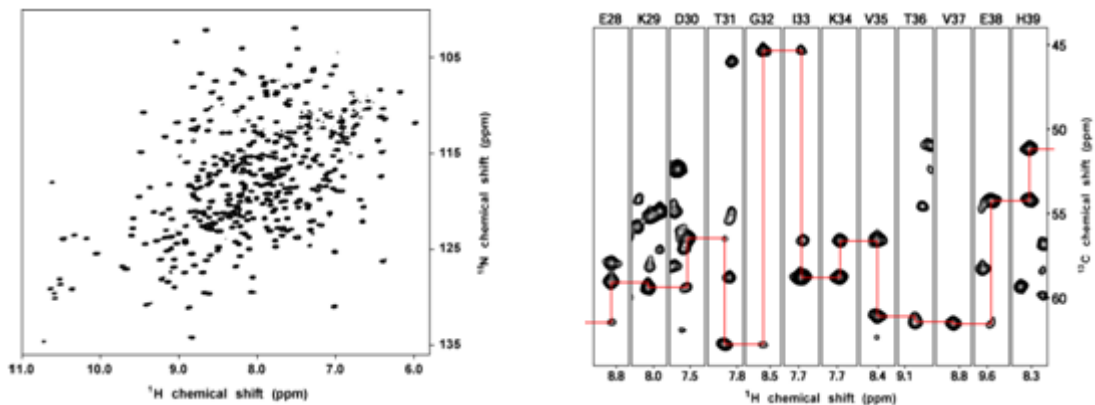


図2 Fed-Batch 培養で大量発現させた均一 ^{13}C , ^{15}N 標識 MBP の NMR スペクトル

パネル左: ^1H - ^{15}N HSQC スペクトル

パネル右: 3 次元 HNCA スペクトルにおける各アミノ酸残基の ^1H - ^{13}C strip 表示 (赤線: 各アミノ酸残基間の ^1H - ^{13}C - ^{15}N シグナルの相関)

酵母 *K. lactis* を使用し、かつ炭素源および培養法を工夫することにより、安定同位体標識のコストを大腸菌発現系と同レベルまで抑えた酵母発現系を構築することに成功した (表2)。

また *K. lactis* は、単一の炭素源を含む培地で培養し続けるだけで大量発現が可能であり、メタノールを添加する前に培地を交換する必要のある *P. pastoris* よりも作業上の手間が軽減される。そのような特長のため、*K. lactis* は取扱いや培養のスケールアップの容易さ、培養の再現性などにおいて優れており (表2)、目的タンパク質が酵母株で発現するかどうかの確認も比較的迅速にできるため、目的タンパク質を発現させる宿主を選択するうえで、大腸菌とともに第一選択肢になり得る発現系であると考えている。

表2 タンパク質大量発現系の特徴 (新たに *K. lactis* 発現系を加えた (赤字))

	取り扱い 容易さ	安定同位体 標識のコスト	発現量	翻訳後修飾	哺乳類由来タンパク質/ 多量ジスルフィド結合形 成タンパク質発現
原核細胞					
大腸菌	◎	◎ <small>¹³C-グルコース (4g/L) ¹⁵N-メチオニン (1g/L) 基本培養可能</small>	◎	×	△~×
真核細胞					
<i>Kluyveromyces lactis</i> (酵母)	◎	◎ <small>¹³C-グルコース (5g/L)</small>	◎ (分注◎)	◎	◎
<i>Pichia pastoris</i> (酵母)	○	×	○ (分注◎)	○	○
<small>誘導剤/メタノールの毒性 同位体標識メタノールのコスト</small>					
Sf9, Sf21 (昆虫細胞)	△	×	△	○	○
CHO, HEK (動物細胞)	△	×	×	◎	◎

重水素化タンパク質の大量発現法の確立

ヒト血清アルブミン (human serum albumin; HSA) は血漿中に含まれる総タンパク質の約 60% を占め、血管内外の水分の浸透圧調整に必須であるだけでなく、様々な薬物などの低分子の輸送タンパク質としても重要であることから、薬物と HSA の相互作用は、生体内での薬効発現にも深く関わってくるものである。しかし、ジスルフィド結合が 17 対存在し、分子量も比較的大きいため、native な立体構造の HSA を大腸菌で大量発現させることは不可能であった。

現在までの検討の結果、我々は native な立体構造の HSA を *K. lactis* で大量発現させることに成功している。HSA のような巨大分子を対象とする NMR 解析を進める場合、タンパク質の重水素化は必須となる。現在、*K. lactis* で重水素化タンパク質の大量発現を可能にする培養方法を探索中であり、重水素化 HSA を調製することができれば、これまで NMR 解析が困難であった薬物-HSA 複合体を対象とした相互作用解析を進展させることが可能になると考える。

アミノ酸選択的安定同位体標識法の開発

特定のアミノ酸を選択的に安定同位体標識する方法は、大腸菌ではほぼ確立されているが、*P. pastoris* をはじめとする酵母では未だ確立されていない。アミノ酸選択的標識は高分子量タンパク質の NMR 解析を進める上で必須の技術であり、重要な課題である。現在までの検討の結果、特定の安定同位体標識アミノ酸を Fed-Batch 法によって培養中に供給することで、そのアミノ酸のみを選択的かつ高効率で安定同位体標識した目的タンパク質を *K. lactis* で大量発現することに成功している。今後、他の安定同位体標識アミノ酸についても、その標識効率等を確認していくことで、*K. lactis* における体系的なアミノ酸選択的標識技術を確立する予定である。

膜タンパク質の大量発現系の開発

一般的に、GPCR などの多数回膜貫通タンパク質は、大腸菌発現系では大量発現が困難である場合が多い。近年、酵母 *P. pastoris* 発現系で GPCR 等の大量発現の成功例が増えてきており、酵母発現系の有効性が指摘され始めている。今後、膜タンパク質の発現における *K. lactis* 発現系の有効性を検証していく予定である。

② NMR 試料の最適溶媒条件の新規スクリーニング法の開発 (バイオメディシナル情報研究センター)

生体高分子の溶液 NMR 解析において、試料分子間の非特異的な凝集は NMR シグナルの線幅の増大を引き起こし、構造情報取得の妨げとなる。したがって、試料が単分散の状態に安定に存在する溶液条件を探索する必要がある。溶液条件の検討の手順として、様々な溶液組成の試料を調製して実際に NMR 測定を行うことで評価する手法がしばしば用いられるが、探索に必要な試料の量および費やす時間が膨大になるという難点があった。

溶液中における試料の並進拡散時間を少ない試料量で迅速に測定できる一分子蛍光分析法を用いることで、試料の凝集度と NMR スペクトルの質を迅速に評価できることを見出した。そこで、一分子蛍光分析法のハイスループット性を生かして、多種類の溶液条件を迅速、網羅的、体系的に探索する「溶液条件スクリーニングシステム」の構築を行った。

凝集性が高いために NMR 解析が困難であった ceramide trafficking protein (CERT) の PH ドメイン (CERT PH domain) の最適な溶液条件を本法にて探索した。その結果、凝集を改善させて良好なスペクトルを得られる溶液条件を一度のスクリーニング (従来の探索法の 7 倍以上の迅速性) で見出すことに成功し、CERT PH domain の溶液構造を決定することができたことから、本探索法の有効性が裏づけられた。

一分子蛍光分析による凝集検出の検証

一般的にサブミリモル濃度という高濃度溶液である NMR 試料の場合、NMR 測定に必要とされる高濃度状態において特に凝集が激しくなる場合も多い。試料の凝集度を調べる既存の手法としては、微量透析法 (目視で凝集の生成を検出する)、光散乱検出法、ゲル濾過法などが存在するが、しかしこれらの手法では、1) 見た目に沈殿が生じない凝集を検出できない、2) NMR 測定時と同等の高濃度状態で凝集度を見積もることが困難、といった問題があり、実際に NMR 測定を行ってみるまで NMR スペクトルの質を的確に判断できない場合も多い。その場合、凝集を解消する溶液条件を探索するには、様々な溶液組成の試料で NMR 測定を実際に行ってみるほかなく、したがって検討に必要な本数の NMR 試料を用意する必要があり、消費する試料量と NMR 測定時間は膨大なものとなる。

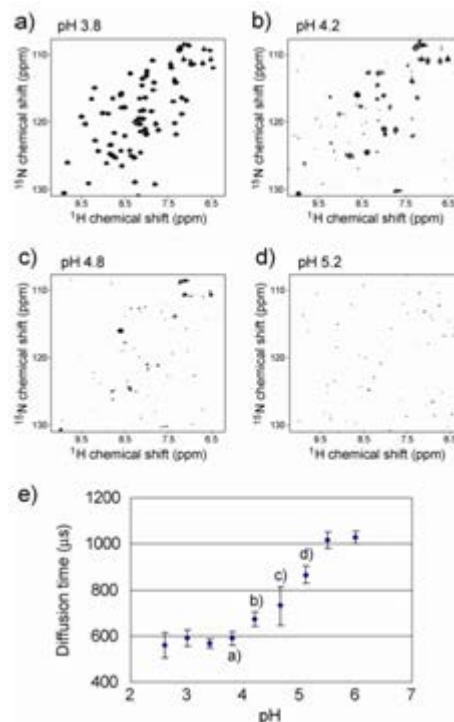


図 3 MIP-1α の ^1H - ^{15}N HSQC NMR と一分子蛍光分析

(a-d) 各 pH における MIP-1α の ^1H - ^{15}N HSQC スペクトル。

(e) 一分子蛍光分析で計測した各 pH における MIP-1α の並進拡散時間。

溶液中での試料の並進拡散時間を調べる手法である一分子蛍光分析法に着目した。そこでまず、一分子蛍光分析法が 1) NMR 試料のような高濃度試料の並進拡散時間を測定可能かどうか、2) 目視できない凝集を検出可能かどうか、を検証するため、pH の上昇によって凝集が進行し、それに伴って NMR スペクトルの質が低下するケモカイン MIP-1α について一分子蛍光分析を行った。

一分子蛍光分析は、蛍光標識した試料が 1-10 nM 存在する溶液で可能である。そこで、NMR 測定に必要な高い試料濃度で一分子蛍光分析を行うため、80 μM の MIP-1α (非標識) 溶液に蛍光標識 MIP-1α が 1 nM となるように混和したものについて一分子蛍光分析を行った。その結果、その状態で MIP-1α の並進拡散時間が測定可能であっただけでなく、pH の上昇に伴う MIP-1α の凝集亢進の様子を明瞭に検出することができた (図 3e)。また、そこで検出された凝集の亢進は、NMR スペクトルの質が低下していく様子に対応していた (図 3)。すなわち、一分子蛍光分析法を行うことによって、NMR 測定することなしに試料の凝集度と NMR スペクトルの質の良し悪しを判断することができることを見出した。この検討で、1 つの NMR スペクトルの測定に 400 μL の試料と約 3 時間の測定時間を必要としたため、

合計 1.6 mL の試料と約 12 時間の測定時間を必要とした。一方、一分子蛍光分析は 1 条件あたり 30 μL の試料と約 3 分の測定時間で済んだため、合計 270 μL の試料で 9 つの条件を 30 分弱程度で測定でき、NMR 測定を行うよりも多数の条件を少量の試料かつ短時間で検討することができた。また、一般的な NMR 試料のようなマイクロモル～ミリモルの高濃度試料溶液で凝集度が判断できたことから、本法は NMR 測定時と等しい条件下で凝集を判断することができる点で、既存の手法に比べて信頼性が高いと思われる。

溶液条件スクリーニングシステムの構築・実際の最適溶液条件の探索

試料の凝集が原因で NMR スペクトルの質が低く、解析が困難であった CERT PH domain について、凝集を解消する溶媒条件を一分子蛍光分析で探索した。また、探索にあたり、一分子蛍光分析は 384 穴プレートを使用し、必要な試料量が少ない (1 条件あたり 30 μL)、測定時間が短い (1 条件あたり 1 ～数分) という特長を生かし、多数の条件を網羅的かつ体系的に探索するためのシステムを構築した (チャート 1)。本システムは、目的タンパク質の蛍光色素標識と精製を行った後、まず pH と塩濃度および両者の組み合わせについて最適な条件を一分子蛍光分析で探索し、それで不十分であった場合は次の段階で様々な添加物 (塩、ポリオール類、界面活性剤など) を検討するという、段階的にスクリーニングを行う戦略をとった (チャート 1)。

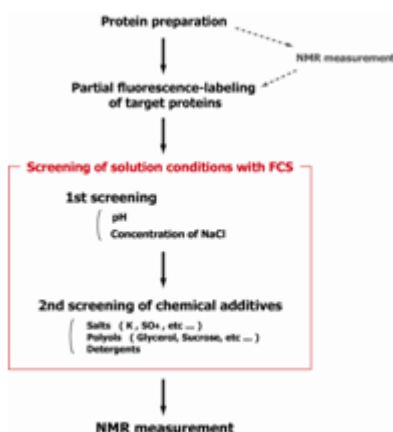


チャート 1 一分子蛍光分析を用いて最適溶液条件を網羅的に探索するシステムの構築

第一段階の探索の結果、pH 7.5 において最も並進拡散時間が低下した。しかし、その条件でも NMR スペクトルの改善は不十分であり、凝集は完全には解消されていないことがわかった (図 4a, c)。そこで次に、第一段階の探索で最も良好であった pH 7.5 の溶液に 14 種類の化合物を別々に添加し、一分子蛍光分析を行った。その結果、化合物 4 (50mM Na₂SO₄) 添加時に最も小さな並進拡散時間を示し、この条件での NMR スペクトルは質が顕著に改善していた (図 4b, d)。このスクリーニングで消費した CERT PH domain の総量は 450 μL (= NMR 測定 1-2 回分に相当) で、わずか 2 時間弱の一分子蛍光分析で 30 種類の溶液条件を 1 度に探索することができ、その結果 CERT PH domain の凝集を解消する条件を見出すことに成功した。

良好な溶液条件が決定できたことにより、CERT PH domain の NMR スペクトルの解析を進めることが可能になり、立体構造の決定を行うことができるまでに至った (図 5)。

それに加えて、CERT PH domain のリガンド結合部位とその認識様式について NMR 分光法で解析を行うことも可能になり、CERT PH domain の機能的特徴の詳細と生物学的重要性を構造生物学的な見地から解明しつつある。

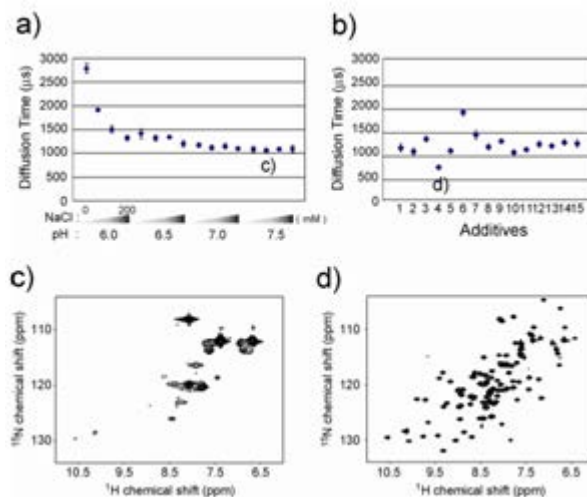


図4 一分子蛍光分析を用いて構築したシステムによる CERT PH domain の最適溶液条件の探索
 (a) 最適な pH と塩濃度の探索。(b) pH7.5 における添加物の探索。(c) pH 7.5 における CERT PH domain の 1H-15N HSQC スペクトル。(d) pH 7.5, 50 mM Na₂SO₄ における CERT PH domain の 1H-15N HSQC スペクトル。

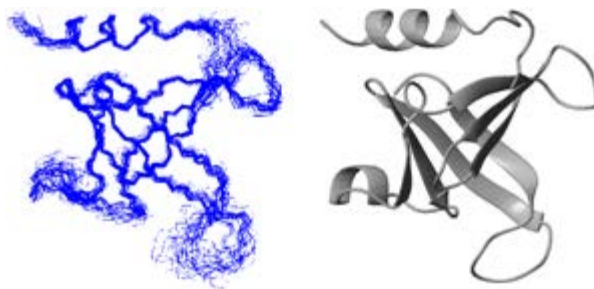


図5 構築したシステムを用いて CERT PH domain の最適溶液条件を見出した結果、NMR 解析で立体構造解析を行うことが可能になった。
 (左：20 構造の重ね合わせ、右：左図のリボン表示)

一分子蛍光分析法は 1) 目視できない凝集（見た目には溶けているがマイクロに凝集しているもの）を検出できる、2) NMR 測定に必要な高濃度試料でも凝集度を判別できる という点で、NMR 測定時により近い状況で凝集が評価できる。また、一分子蛍光分析法で測定した試料の並進拡散時間が NMR スペクトルの質と対応することから、NMR 測定を行うことなしに一分子蛍光分析によって NMR スペクトルの質を評価できることを見出した。

一分子蛍光分析法のもつハイスループット性を生かし、凝集を解消する溶液条件を探索する体系的なスクリーニングシステムを構築した。凝集が原因で NMR スペクトルの質が悪く、解析が困難であった CERT PH domain について、実際に本システムを適用したところ、最適な溶媒条件を約 2 時間の一分子蛍光分析で見出すことに成功した。同様の探索を実際の NMR 測定で行う場合、約 15 時間程度を要すると考えられることから、本法は従来法に比べて 7 倍以上の迅速性を達成しているといえる。本法は NMR 試料についてだけでなく、結晶化のための溶液条件の探索等にも適用可能と考えられ、構造生物学の幅広い分野に貢献する手法となることが期待できる。

必要試料量の少量化と検討条件数の拡大

現在の一分子蛍光分析装置では、384 穴プレートを使用し、1 穴あたりに必要な液量は 30 µL である。しかしながら観測領域である共焦点領域自体は極めて微小体積であることから、装置の改変を行うことで、より少量での測定を行うことは原理的には可能なはずである。1 穴あたりに必要な液量が 5 µL 程度である 1536 穴プレートが使用可能となれば、検討可能な条件数がさらに増え、より詳細な探索が可能になると期待される。

試料調製の自動化・高速化

現在、多種類の溶液条件は実験者が1つ1つ手作業で調製しており、検討可能な溶液条件の数および実験の再現性に限界がある。そこで、タンパク質の結晶化条件の探索などで用いられている多種類溶液自動調製装置を本スクリーニング法と融合することにより、自動化、高速化、検討数の拡大が期待できる。

(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

① タンパク質複合体ドッキングモデル構築を可能とする新規 NMR 手法であるアミノ酸選択的交差飽和 (ASCS) 法、ならびに分子動力的計算法の開発 (東大分室、共同研究：中村チーム)

タンパク質の分子認識機構を立体構造の見地から解明することにより、生体内の多様なシステムである細胞認識や免疫機構、シグナル伝達などの重要な知見を得ることができる。タンパク質の結合界面を決定する NMR 手法として、化学シフト摂動法や H-D 交換法などが用いられるが、当研究室ではこれらの手法よりも正確な結合界面決定法として、交差飽和法 (CS 法) の開発を行った。CS 法は目的分子 (アクセプター) に結合している標的分子を交差飽和源 (ドナー) とし、空間的に近接するアクセプター上の結合部位へと磁化飽和の移動を行う手法である。CS 法により、アクセプター上の結合界面を明らかとすることが可能であるが、ドナー全体を交差飽和源とするため、ドナー上のアクセプター結合部位に関する情報は得られない。しかしながら、より詳細な相互作用様式を明らかとするためには、両分子間の結合残基対の決定が必要となる。

そこで、ドナーに対して特定のアミノ酸以外を ^2H とする、アミノ酸選択的 ^1H ラベルを行い、交差飽和源を1種類のアミノ酸に限定する、アミノ酸選択的 CS (ASCS) 法を考案した (図6)。本手法により、ドナー上においてアクセプターへ近接するアミノ酸残基に関する情報が得られ、近接残基対の同定が可能となる。

さらに、得られた構造情報を中村チームに提供し、ASCS 法により得られる構造情報を満たす複合体モデル構築を計算する分子動力的手法の開発を行った。

本手法を検証する相互作用系として、76 アミノ酸残基である yeast ubiquitin (Ub) と、その加水分解酵素であり、234 アミノ酸残基である yeast ubiquitin hydrolase C90S 変異体 (YUH1) を選択した。両者の解離定数は 43nM であり、複合体の結晶構造は報告されている (DB code: 1CMX)。Ub をアクセプターに、YUH1 をドナーとして本手法に適用した。

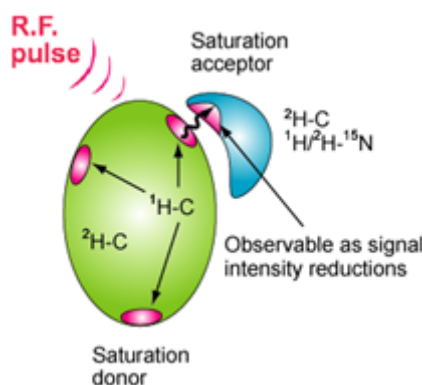


図6 アミノ酸選択的 CS 法

特定のアミノ酸以外を ^2H 化したドナーをアクセプターに結合させる。ラジオ波照射に伴い、ドナーの特定アミノ酸の脂肪族 ^1H の磁化が飽和され、交差飽和現象により、近傍のアクセプター残基へと飽和が伝播する。これを NMR シグナルの強度減少として検出する。

アミノ酸選択的 ^1H 標識の選択性と標識率の定量的評価

本手法で用いるドナーは、特定のアミノ酸のみが選択的に ^1H 標識され、他のアミノ酸を均一に ^2H 標識されている必要がある。このような標識法として、ドナーを発現する大腸菌を ^2H 化 M9 最小培地で培養し、発現誘導時に、 ^1H ラベルを行う対象の ^1H アミノ酸を、培地に含まれる当該 ^2H アミノ酸の 5 倍量添加し、6 時間後に集菌するという方法をとった。大腸菌はアミノ酸を代謝する様々な酵素を保持しており、添加したアミノ酸と他のアミノ酸間の変換が予想される。本手法は添加した

^1H アミノ酸が目的のアミノ酸にのみ効率よく取り込まれることが必須であるため、各アミノ酸の代謝状況を NMR 法により各原子ごとに確認した。Asn, Glu を除く 18 種類のアミノ酸について調べた結果 (表 3)、タンパク質を発現させるタイムスケールにおいて、Asp, Gln, Ser 以外のアミノ酸が選択ラベル可能であることが示された。

表 3 各アミノ酸の ^1H 標識の選択性と、部位ごとの標識率

amino acid	selectivity	percentage of ^1H				
		H_α	H_β	H_γ	H_δ	others
Ala	selective	44	78			
Arg	selective	96	84	86	74	
His	selective	51	67			77 ($\text{H}_{\beta 1}$), 63 ($\text{H}_{\beta 2}$)
Ile	selective	<3	90		100	86 ($\text{H}_{\beta 1,2,3}$), 100 (H_γ)
Leu	selective	10	100	100	97	
Lys	selective	72	93	93	93	75 (H_β)
Met	selective	40	71	94		80 (H_β)
Phe	selective	7	81		97	97 (H_β)
Pro	selective	54	79	79	56	
Trp	selective	10	45			75 ($\text{H}_{\beta 1}$), 77 ($\text{H}_{\beta 3}$), 77 82 ($\text{H}_{\beta 2}$), 79 (H_γ)
Tyr	selective	<3	56	74	78	
Cys	selective	<3	30			
Gly	selective	37				
Thr	partially metamobilized	83	100	86		81 (H_β)
Val	partially metamobilized	11	70	68		40 (Leu H_β), 51 (Leu H_β)
Asp	metabolized	54	N/A	N/A		
Gln	metabolized	<3	N/A			
Ser	metabolized	<3	N/A			

ASCS 法の実施、結果のアミノ酸選択性の評価

上述した方法で、目的のラベル状態を保持する YUH1 (ドナー) を調製した。これを従来法により精製した。Ub (アクセプター) は従来の CS 法と同様に、 $[\text{ul-}^2\text{H}, ^{15}\text{N}]$ 体として調製した。Ub を完全に YUH1 結合型とすることで、アミノ酸選択的 CS 法に適用する NMR サンプルとした。

そこで、選択ラベルが可能な 7 種類のアミノ酸についてアミノ酸選択的 CS 実験を行った。Ala, Leu, Pro および Tyr 選択的 CS 実験の結果、Ub の L71, L73, R74, G75 の延べ 7 残基に大きな交差飽和が観測された (図 7)。結晶構造において、これらの Ub 残基は ^1H ラベルを行った YUH1 のアミノ酸から 5 Å 以内に存在する。一方、5 Å 以上離れている残基には交差飽和が観測されなかった。このことは、近接アミノ酸からの交差飽和を観測する、アミノ酸選択的 CS 法が確立したことを示している。

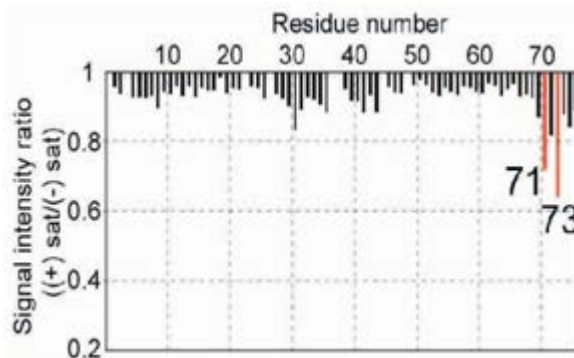


図 7 Ala 選択的 ASCS 実験

横軸は Ub の残基番号、縦軸は交差飽和にともなう NMR シグナルの強度減少率である。71 と 73 番目の Ub 残基に顕著な交差飽和が生じた。

ASCS 法による複合体中の分子間近接残基対の同定

交差飽和が観測された延べ 7 残基に対して、結晶構造に一致する交差飽和源の同定が実際に可能であるかの検証を行った。交差飽和源は、交差飽和が観測された Ub 残基から 5 Å 以内に存在すると考えられる。そこで、交差飽和を受けた Ub 残基のジオメトリーと一致する、YUH1 上で交差飽和源となったアミノ酸残基の組み合わせを検索した。まず、交差飽和源の種類と数を反映させて YUH1 から任意に延べ 7 残基を組み合わせさせた。これを最小二乗法により、交差飽和を受けた残基群と空間的に重ね合わせた。そして、対応する残基間の平均 RMSD をジオメトリーの一致度の指標とした。最小の RMSD

を示す組み合わせにおいて、各 YUH1 残基と、それぞれにジオメトリーが近接する Ub 残基を 7 個の近接残基対とした結果、両者は実際に結晶構造中において 5 Å 以内に近接していた (図 8)。よって、本手法によりタンパク質複合体の近接残基対の決定が可能であることが示された。

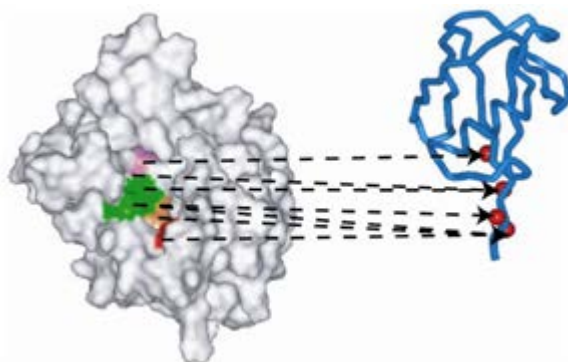


図 8 ASCS 結果を満たす分子間近接残基対

赤の球で示した交差飽和を受けた Ub(右)の残基に対して、交差飽和源となった YUH(左)のアミノ酸残基を矢印で対応させた。

ASCS 結果を満たす複合体モデルを構築する分子動力学計算 (中村チームとの共同研究)

次に、中村チームにより ASCS 結果を満たす複合体モデルを構築する分子動力学的 (MD) 計算法の確立が行われた。交差飽和の大きさは距離の 6 乗に反比例する。このことは、複合体の立体構造が明らかであれば、交差飽和の大きさを計算により算出することが可能であることを意味している。そこで、MD 計算を行った際に得られた複合体モデルについて、残基ごとに交差飽和の大きさを算出し、これを実際における ASCS 実験の交差飽和の大きさと比較することで、その差をエネルギー項 E_{sat} として取り扱った。これを通常行われる MD 計算におけるエネルギーに加算し、複合体のモデル構造を計算した (図 9)。なお複合体モデル作成の計算プロトコール詳細は、研究開発項目③を参照のこと。このように、ASCS 実験結果を MD 計算に含めることで、詳細な複合体モデルが構築できることを示した。

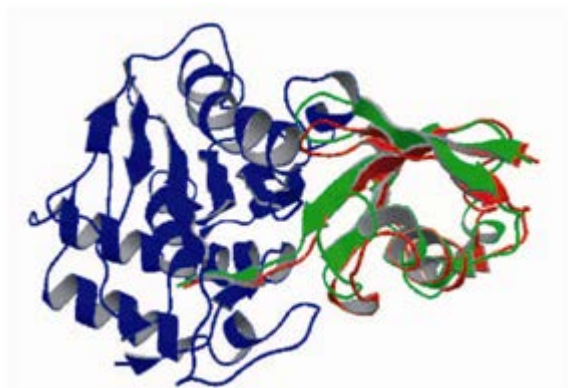


図 9 複合体モデルの構造

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。

本研究において我々は、タンパク質複合体の近接残基対を決定する手法として、アミノ酸選択的 CS 法を開発した。まず、本手法において選択ラベルが可能であるアミノ酸を明らかとした。それらのアミノ酸選択的 CS 実験を行った結果、近接残基対間に選択的な交差飽和の検出に成功した。この実験結果から、結晶構造に一致する近接残基対の同定に成功した。さらに、MD 計算において、ASCS 実験におけるエネルギー項を含めることで、結晶構造における複合体構造と同等の複合体モデル構造を構築することに成功した。

従来の NMR 法を用いた近接残基対の決定には、複合体状態における両分子の側鎖水素原子の NMR

シグナルおよび、分子間 NOE シグナルの帰属が必要であり、その同定には非常に多くの時間を費やす。また、分子量の増大に伴って、シグナルの帰属はより困難となることから、複合体として 30kDa 程度までの分子量に解析が限られていた。しかしながら、本手法においては非常に煩雑である上記の帰属は必要とせず、比較的容易に行える、複合体状態におけるアクセプター側の主鎖アミド水素原子のみの帰属が必要であるため、これまでに困難であった 30kDa 以上の複合体においても解析が可能であると予想される。

② 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（バイオメディシナル情報研究センター）

構造に指南された創薬デザインをリガンドー標的タンパク質間の相互作用様式を解明することで推し進めるための創薬基盤技術開発として、新たな NMR 相互作用解析手法の開発を行った。Saturation transfer difference (STD) 法は標的タンパク質ーリガンド相互作用において化合物側の相互作用部位を同定する方法としてよく用いられている。しかしながら現実には、リガンド分子の構造に依存した分子内緩和機構の違いなどにより STD 情報が変調を受けるため、得られる実験結果の定量性が乏しいことが知られている。それゆえ STD 法では相互作用部位を正確に同定できない、あるいは誤った部位を相互作用部位と錯誤する問題が指摘されており、より精度のよい相互解析手法の開発が求められている。そこで我々は創薬スクリーニングおよびドラッグデザインに供するのに十分な精度をもった新たな相互作用部位同定法：DIRECTION 法 (difference of inversion recovery rate with and without target irradiation 法) を開発した (図 10)。DIRECTION 法においては、リガンドと標的タンパク質の間の距離を反映する“分子間交差緩和速度”を正確に決定することが可能である。具体的にはリガンドと標的タンパク質の複合体を形成させた上で、タンパク質に対しラジオ波照射を行わない条件 (図 10A) と行った条件 (図 10B) におけるリガンド水素の縦緩和速度 (dl_z/dt) を測定する。ラジオ波照射を行わない条件 (図 10A) ではリガンド水素の縦緩和速度は図中の式であらわされるように、リガンド分子の構造に依存する二つの緩和機構 ($-R_l(I_z)$, $-\sigma_{IS}(S_z)$)、および化合物とタンパク質の間の距離を反映する“分子間交差緩和” ($-\sigma_{IX}(X_z)$) の和で記述される。一方、ラジオ波照射を行った条件 (図 10) においては“分子間交差緩和”項が消失する。このため、両条件における差を取ることで図中赤枠で囲った目的の“分子間交差緩和”項を抽出することが可能になる。以上の様に本方法を用いれば、化合物構造に依存する二つの緩和機構 ($-R_l(I_z)$, $-\sigma_{IS}(S_z)$) の影響を受けることなく、化合物-タンパク質間距離を正確に算出することが可能である

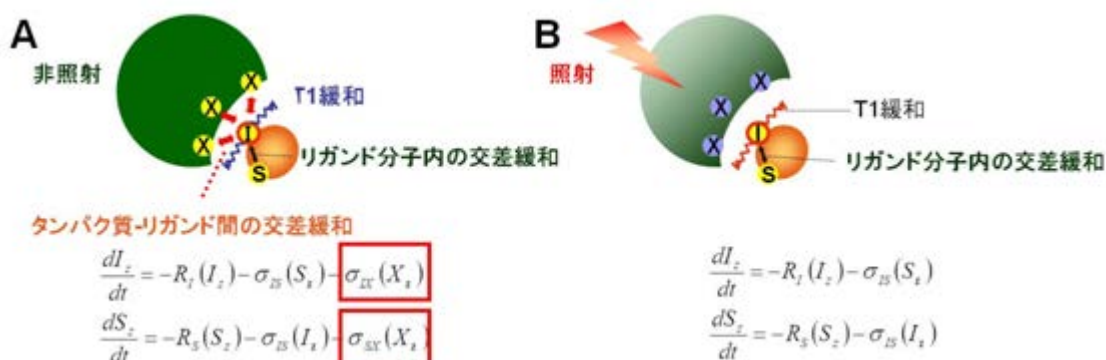


図 10 DIRECTION 法

(A) ラジオ波照射を行わない条件および (B) 行った条件における磁化移動様式を矢印で示し、磁化の時間依存変化を Bloch 方程式で記述した。

このように優れた理論的背景を保持する DIRECTION 法を阻害剤 SB20358 と MAPKp38 との相互作用系に適用したところ、従来法 (STD 法) と比較して、より高い精度で標的タンパク質・リガンド間距離情報を得ることに成功した。図 11 には SB20358 - MAPKp38 相互作用系において DIRECTION 法を STD 法と比較した結果を示す。SB20358 - MAPKp38 相互作用系においては、図 11C に示すような複合体 X 線結晶構造が得られており、SB20358 の H1, H4/5, H6 位が p38 の結合ポケットにより深く入り込む一方、H2, H3, Me は結合ポケットの外側に位置することがわかっている。STD 実験結果 (図 11A) においてはすべてのプロトンがほぼ同程度に飽和されており、結合様式を反映するような違いを

見出すことはできない。一方 DIRECTION 法 (図 11B) においては H6 が最も大きな緩和速度変化を示す一方、H2, H3, Me は緩和速度変化が小さく、複合体構造が正しく反映されている。

また原理的には DIRECTION 法から求まる分子間交差緩和速度は、リガンドからタンパク質プロトンまでの距離の 6 乗分の 1 の総和に比例する。実際、DIRECTION 実験においても観測された交差緩和速度 (図 11B) は X 線座標から計算されたリガンド-タンパク質プロトン間距離の 6 乗分の 1 の総和 (図 11C 右) と良く合致し、本手法がきわめてすぐれた定量性を持つことを示している。

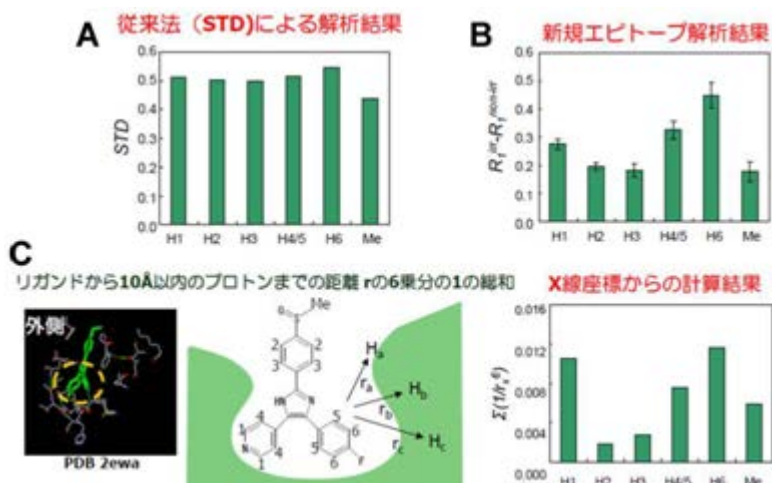


図 11 SB20358 - MAPKp38 相互作用系における STD 法と DIRECTION 法の比較

(A) STD 実験結果 (B) DIRECTION 実験結果 (C) 複合体結晶構造中における結合様式と複合体構造から算出されるリガンド-タンパク質プロトン間距離の 6 乗分の 1 の総和。

さらに DIRECTION 法を Fragment-based screening から同定された MAPKp38 リガンドである BMU に対して適用したところ、図 12 に示すように、4 位水素が他の水素に比べて小さな緩和速度変化を示した。先ほどの SB20358 の例とは異なり、BMU 分子全体が MAPKp38 に認識される。よって BMU-MAPKp38 相互作用における DIRECTION 法の実験結果は BMU の 4 位水素周辺にタンパク質水素が希薄で隙間が空いていることを示す。実際、BMU の 4 位をより大きな Phe に変換すると結合定数が 40 倍に上昇したと報告されており DIRECTION 法が Hit-to-lead プロセスの加速にも資することが示された。

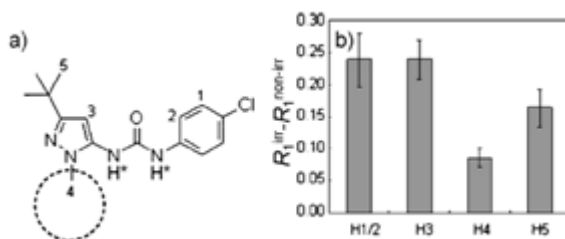


図 12 BMU - MAPKp38 相互作用系への DIRECTION 法の適用

(A) BMU の化学構造 (B) DIRECTION 実験結果

(3) 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

① 哺乳細胞内におけるタンパク質間相互作用を観測するための新規 in-cell NMR 測定法の開発 (東大分室)

細胞の機能発現は、細胞外シグナルに応答した細胞内生体分子の相互作用ネットワークの変化により達成される。細胞内では、膜タンパク質や、細胞骨格、細胞小器官などの構造体が、様々なタンパク質や補因子を保持しており、機能的な複合体としてその役割を担っている。そのため、生命現象の発動をタンパク質間相互作用の観点で解析する場合、機能を発揮する環境にある、よりインタクトに近い状態を構造生物学的対象とすることが望まれる。しかし、一般的な構造生物学的な解析では、高い純度のサンプルが解析対象となり、精製過程を必要とするため、構造体やタンパク質複合体を維持

したまま調製することは困難である。また、膜タンパク質は、界面活性剤中では安定性が著しく低下するため試料調製が問題となるケースが多い。その一方で NMR 法は、生体試料に対し非侵襲測定が可能であること、安定同位体標識により解析対象のみを選択的に観測可能であるという他の構造生物学的解析法にはない特長を持っている。そのため、細胞をそのまま用いて、細胞内におけるタンパク質の立体構造・相互作用解析への適用が可能である。特に、動物細胞内における高次生命現象を、インタクトに近い状態にて構造的に解析することができれば、創薬へと応用する道も開かれる。そこで、本研究では、哺乳細胞を用いて、細胞内におけるタンパク質-タンパク質間の相互作用を検出するための NMR 測定法の開発を目的とした。

細胞内にてアミノ酸残基毎の NMR シグナルを観測するためには、安定同位体標識を施した観測対象タンパク質を数 10 μM 程度細胞内に存在させる必要がある。これまでに、大腸菌内に過剰発現させた場合、および *Xenopus laevis* oocyte 内に microinjection した場合において、細胞内 NMR シグナルの観測が報告されているが、いずれの方法も哺乳細胞に対する適用は困難であるため、新たな手法が必要となる。そこで特別な装置を必要とせず、様々な種類の哺乳細胞に対して適用可能な汎用性の高い手法として、セミインタクト細胞の調製に用いられる streptolysin O (SLO) に注目した。SLO は、cholesterol と結合して形質膜上にポアを形成するため、細胞骨格や細胞内構造を保持した状態で、細胞質成分を自由に交換することができる。SLO が形成するポアの直径は約 30 nm であり、抗体 (150 kDa) や BSA (66 kDa) の導入が確認されているため、通常、NMR 観測対象となる 30 kDa 以下のタンパク質の導入は可能と考えられる。また、SLO により形成した形質膜上のポアは、細胞外に Ca^{2+} を添加することにより、再び塞がれる (reseal) ことが報告されている。そこで、SLO 処理と reseal を組み合わせることにより、細胞内部のみのタンパク質に由来する NMR シグナルを選択的に観測するための細胞調製方法の確立を目指した (図 13)。

細胞内にて NMR 観測および相互作用解析を行うためのモデル系として、細胞内に大量に存在する G-actin と相互作用する Thymosin β 4 (T β 4) を用いることとした。T β 4 は、大腸菌により発現させ、精製したものを用いた。細胞は、浮遊培養に適応させた 293F 細胞を用いた。

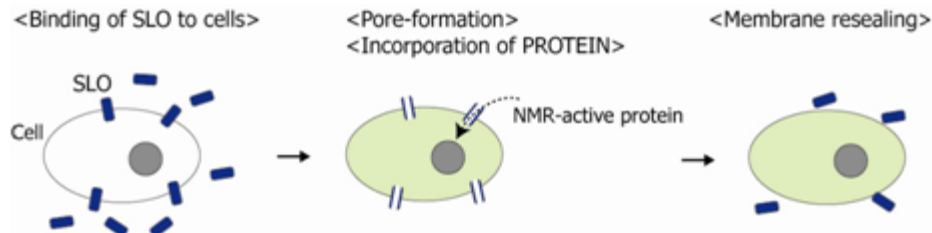


図 13 細胞調製方法の概略

細胞膜に対する SLO の結合、NMR 観測対象タンパク質 (あるいは、FITC 標識タンパク質) の導入、 Ca^{2+} 添加による細胞膜の再生 (resealing)、のステップから成る。

細胞内 NMR 観測のための細胞試料の調製方法の確立

まず、 10^7 程度の大量の細胞を SLO 処理し、NMR 観測可能な分子数の T β 4 を導入するための細胞の調製条件を、Fluorescein isothiocyanate (FITC) にて蛍光標識した T β 4 の導入を指標として検討した。Resealing の成否は、細胞調製後に、細胞膜非透過性の核染色試薬である Propidium iodide (PI) を添加して、染色されるか否かにて判断した。フローサイトメトリーにて FITC-positive/PI-negative の細胞集団が最も多く得られる条件を決定した (図 14a)。また、導入した FITC 標識 T β 4 を共焦点蛍光顕微鏡にて観測した結果、細胞質内に分布していたことから、細胞内 actin と相互作用可能な状態にて存在することが示された (図 14b)。次に、細胞内 T β 4 導入量の見積もりを行った。SLO 非添加時と添加時の FITC の蛍光強度 (蛍光波長 518 nm) の差より FITC-T β 4 導入量を算出した結果、細胞内濃度の平均は 50 μM 程度であったことから、NMR 測定に適用可能な量の T β 4 が細胞内に導入されたと判断した (図 14c)。最適化した条件を用いて [ul-15N] T β 4 を導入した細胞の ^1H - ^{15}N HSQC スペクトルを測定した結果、12 時間の測定にて十分な S/N 比のスペクトルが観測された (図 15)。測定後の細胞をスピンドウンした後の上清成分の NMR スペクトルを測定した結果、細胞を用いた測定時と比較してシグナル面積が、1/10 程度であったことから、細胞を用いた場合に観測されたスペクトルは、細胞内に存在する T β 4 に由来すると考えた。

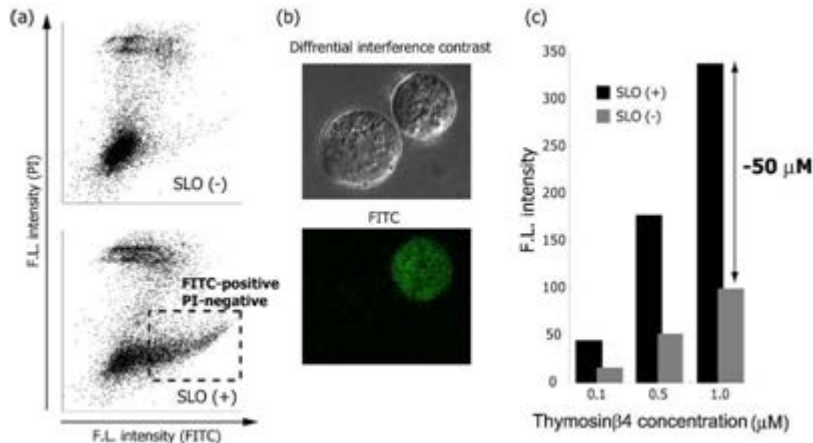


図 14 (a) 細胞調製時のフローサイトメトリーのプロファイル。SLO 非添加時(上)、SLO 添加時(下)。破線枠内の領域の細胞が、Tβ4 が導入された細胞集団を示す。(b) 細胞内に導入した Tβ4 の蛍光顕微鏡像。右上の細胞に FITC-Tβ4 が導入されている。(c) 細胞内 Tβ4 導入量の見積もり。横軸は、導入時に細胞外に添加した Tβ4 濃度を示す。SLO 非添加時と添加時の蛍光強度の差から、細胞内 Tβ4 導入量を算出した。

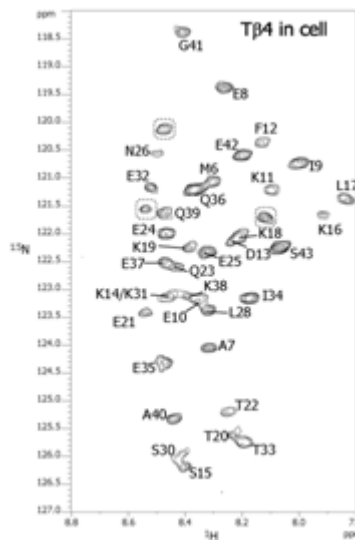


図 15 細胞内 Tβ4 の ¹H-¹⁵N HSQC スペクトル

図中、破線にて囲んだシグナルは、緩衝液中にて観測されるシグナルと、顕著に異なる化学シフトを与えている。その他のシグナルについては、同程度の化学シフトであったため、帰属を入れている。

細胞内に導入した Thymosinβ4 と内在性 G-actin との間の相互作用の検出

細胞内に導入した Tβ4 が、内在性の G-actin と相互作用しているか明らかにするため、細胞内 Tβ4 と緩衝液中 Tβ4 のスペクトル間における、各アミノ酸残基の化学シフト変化量を調べた(図 16)。両者間にて異なる化学シフトを与える原因として、G-actin との相互作用に加え、細胞質と緩衝液との pH・イオン強度の違いなど、さまざまな要因が考えられる。そこで、Tβ4 に対する G-actin の NMR 滴定実験を行い、各シグナルの化学シフト変化のパターンを比較した。生体内には ATP 型 G-actin (GT)、ADP 型 G-actin (GD) が存在しているため、それぞれを [ul-¹⁵N] Tβ4 に対して滴定した。

GT の結合に伴う化学シフト変化は、NMR タイムスケールと比較して遅い交換であり、0.1 ppm 以上離れた位置に複合体に由来する広幅化したシグナルが新たに観測された。一方、GD の結合に伴う化学シフト変化は、NMR タイムスケールと比較して速い交換であり、50μM Tβ4 に対して 10μM GD を滴定した結果、Q23, N26 にて最も大きな化学シフト変化が観測された。添加時に観測された化学シフト変化のパターンを調べた結果、細胞内 Tβ4 の NMR スペクトル中にて比較的大きな化学シフト変化が観測された T22, Q23, N26 にてその変化パターンがよく一致した(図 16b)。この結果は、細胞

内に導入した T β 4 が、T22-N26 を含む領域を介して GD と相互作用していることを示す。一方で、T β 4 の N 末端領域 (a.a. K3-K11) に集中して観測される 0.01 ppm 以上の比較的大きな化学シフト変化が、GD 滴定時には観測されていないことから、G-actin との結合以外の要因の存在が示唆される。

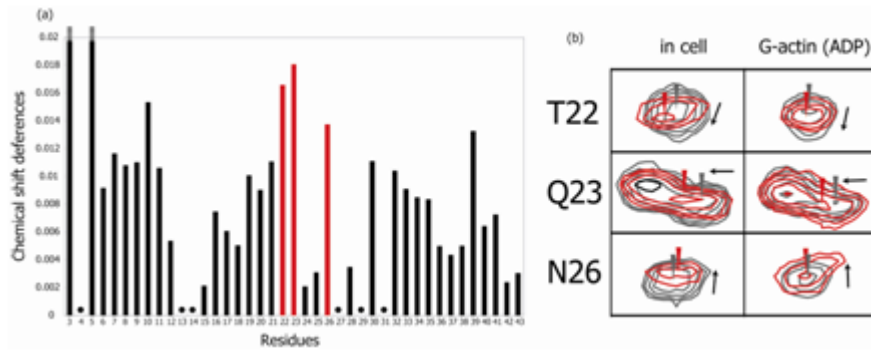


図 16 (a) 細胞内 T β 4 と緩衝液 (pH6.1) 中 T β 4 間の化学シフト変化量。黒丸は、プロリン残基あるいは、シグナルが縮重したアミノ酸残基を示す。(b) 細胞内にて観測された化学シフト変化と、ADP 型 G-actin 添加時に観測された化学シフト変化の様子の比較。G-actin 非存在下のシグナルを灰色にて示した。化学シフト変化の方向を矢印にて示した。

細胞内に導入した Thymosin β 4 の N 末端アセチル化修飾

生体内に発現した T β 4 は、翻訳開始メチオニンが切断され、N 末端となったセリン残基がアセチル化修飾を受ける。そのため、細胞内に導入した T β 4 の N 末端領域に観測された化学シフト変化が、細胞内における T β 4 の N 末端アセチル化を反映している可能性を検証した。化学合成したアセチル化 T β 4 の ^1H - ^{15}N HSQC スペクトルを測定し、細胞内にて測定した T β 4 のスペクトルと比較した。その結果、両者に共通して K3, D5 の顕著な化学シフト変化と、1 個の新たなシグナルが観測された (図 17a)。この結果は、細胞内に導入した T β 4 において N 末端のアセチル化が進行したことを示す。また、アセチル化による各アミノ酸残基の化学シフト変化量を調べた結果、アセチル化によって、E10 までの N 末端領域に比較的大きな化学シフト変化が誘起されており、細胞内にて観測された N 末端領域の化学シフト変化を説明する (図 17b)。

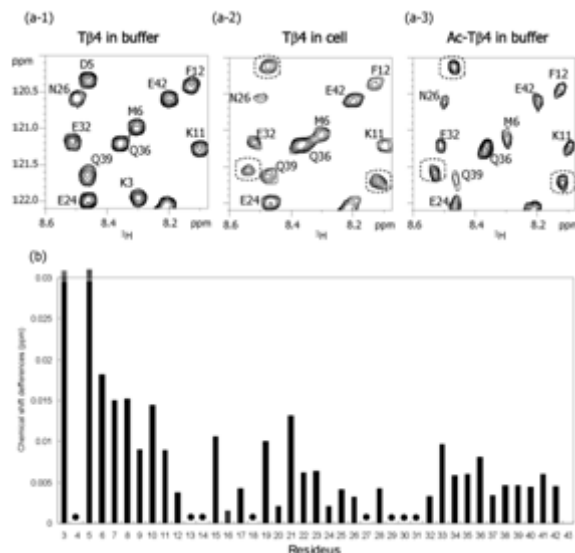


図 17 (a-1) 緩衝液中、(a-2) 細胞内における T β 4 のスペクトル。(a-3) 緩衝液中における N 末端アセチル化 T β 4 のスペクトル。破線枠内は、T β 4 を細胞内に導入した場合に、新たな化学シフト値に観測されたシグナルを示す。(b) N 末端アセチル化による化学シフト変化。黒丸は、プロリン残基あるいは、シグナルが縮重したアミノ酸残基を示す。

本研究において、哺乳細胞内にタンパク質を導入し、細胞内にて NMR 解析するための細胞試料の調製方法を確立した。まず、細胞内に導入した Tβ4 に由来する NMR シグナルの観測に成功し、Tβ4 が内在性の ADP 型 G-actin と相互作用していることも示した。さらに、細胞内に導入した Tβ4 が細胞内で N 末端のアセチル化修飾を受けることも判明した。以上の結果は、導入した Tβ4 の NMR シグナルがインタクトに近い環境にて観測されていることを示す。したがって本手法を適用することにより、生体内の状態を保ったまま、膜タンパク質やタンパク質複合体とリガンドとの間の相互作用解析が可能と考える。また、今回観測されたアセチル化のみならず、リン酸化など翻訳後修飾をアミノ酸残基レベルにて経時的・定量的な解析を行う上でも有用な手法であると考えられる。

② バイオリアクターを用いた in-cell NMR 法による細胞内タンパク質間相互作用の観測 (東大分室)
タンパク質の細胞内における構造や機能を調べるためには、可能な限り細胞内環境に近い条件で解析を行うことが重要である。in-cell NMR 法は、生きた細胞内のタンパク質の NMR シグナルを直接観測する手法であり、精製や結晶化を必要とする従来の手法とは異なり、タンパク質が実際に機能を発揮する環境下でのタンパク質構造や相互作用を解析することが出来る。

これまでに、細胞膜上に可逆的なポアを形成させる streptolysin O (SLO) を用いて、哺乳細胞内に安定同位体標識タンパク質を導入し NMR 観測を行う新規 in-cell NMR 法を開発した (図 18A)。当研究室では本手法を用いて、HEK293F 細胞に導入したアクチン結合タンパク質 thymosin β4 の in-cell NMR 測定を行い、細胞内に導入した thymosin β4 の NMR シグナルを観測することに成功している。さらに、in-cell NMR スペクトルにおける化学シフト変化から、導入した thymosin β4 が細胞内において翻訳後修飾 (アセチル化) を受けたことを明らかにした (図 18B)。

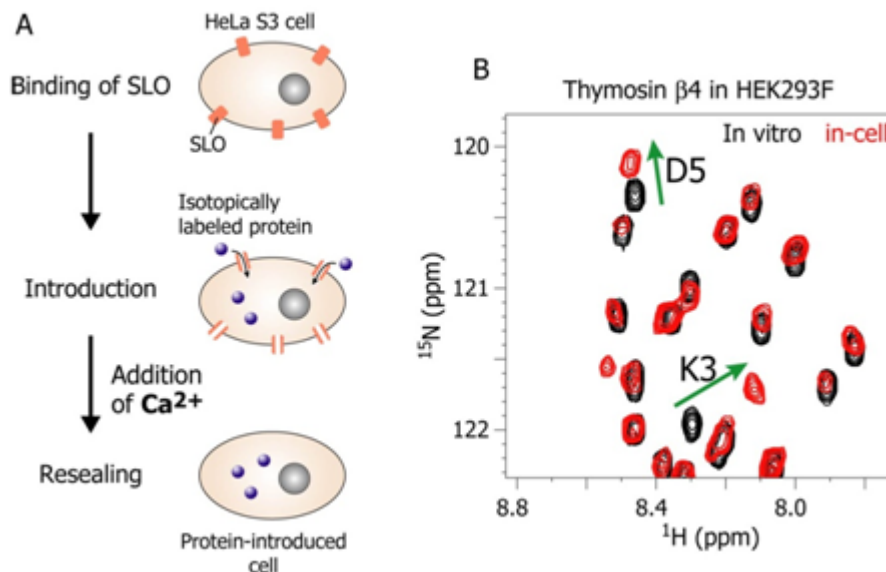


図 18 SLO を用いた in-cell NMR 解析

(A) SLO によるタンパク質導入法の概略。SLO によって形成したポアを通じて細胞内に安定同位体標識タンパク質を導入し、その後、Ca²⁺ によってポアを修復する。(B) HEK 293F 細胞内に導入した thymosin β4 の in-cell NMR スペクトルと (赤)、in vitro における thymosin β4 スペクトル (黒)。緑線でアセチル化に伴う化学シフト変化を示した。

しかし、哺乳細胞を対象とした in-cell NMR 測定法では、十分な測定感度を得るために、高い細胞密度で測定を行う必要がある。そのために、測定中に溶液中の培地成分や溶存酸素が枯渇し、測定環境が生理的条件から解離してしまうだけでなく、細胞内の ATP 濃度が顕著に低下することで細胞死が誘起されてしまう (図 19A)。さらに、細胞内に導入したタンパク質は経時的に細胞外へ漏出してしまふことが知られており、細胞外に漏出したタンパク質由来の NMR シグナルは細胞内タンパク質の観測の妨げとなる (図 19B)。よって、in-cell NMR 法はこれらのサンプルの経時的変化が起こる前に測定を終える必要があり、長時間の測定を必要とする様々な NMR 測定法を適用できないという問題があった。

NMR サンプル管内の細胞を生存状態に保つためには、サンプル管内に培地を灌流するバイオリアクターを用いることが有効である。そこで本研究では、哺乳細胞に対して適用可能なバイオリアクターを

開発し、生理的環境を保ちながら in-cell NMR 測定を行う手法を開発することを目的とした。また、開発した測定法により、転移交差飽和 (TCS) 法を用いて、細胞外から導入したタンパク質と内在性タンパク質との相互作用を解析することを目指した。

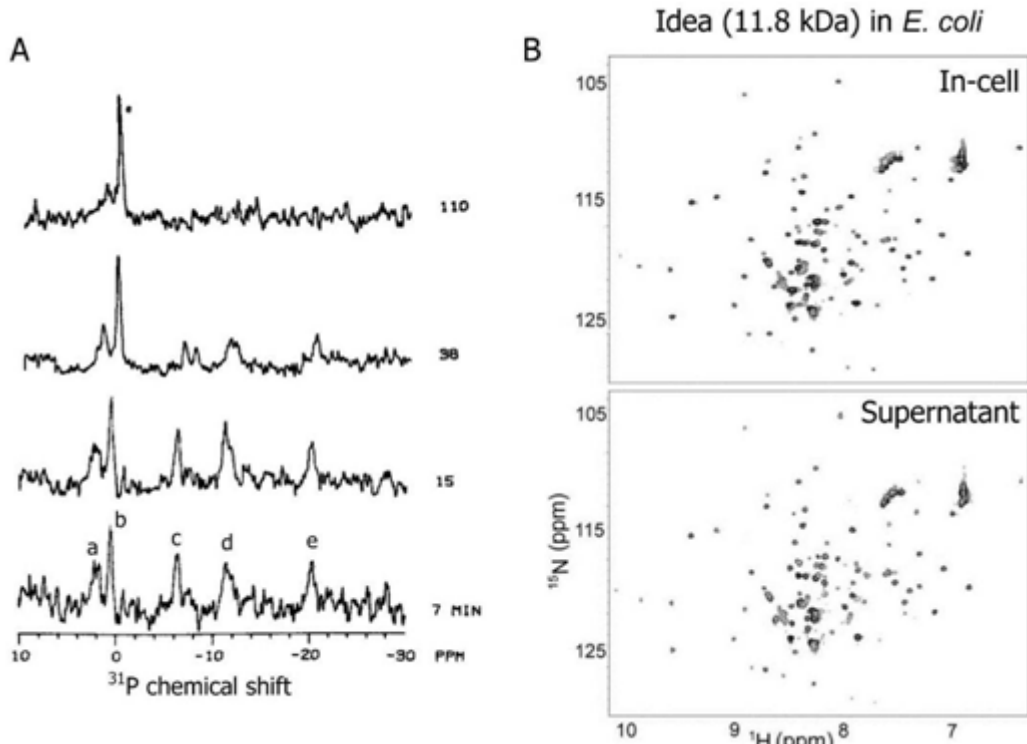


図 19 細胞内 ATP 濃度の経時的変化と細胞内タンパク質の漏出

(A) ヒト由来の細胞である CHLF 細胞を ^{31}P -NMR によって連続的に測定した。図中 c, d, e が細胞内 ATP のリンに由来するシグナルである。(B) In-cell NMR 測定において細胞内タンパク質が細胞外へ漏出すると、測定後の細胞上清から目的タンパク質のシグナルが観測される。

観測対象とする相互作用系：CG1

本研究では、微小管結合タンパク質 CLIP-170 の微小管結合ドメインである CG1 (分子量 9.4 k) を観測対象とし、細胞内の内在性微小管との相互作用の検出を試みることにした。CG1 は大腸菌による大量発現・精製を行ない (図 20A)、これまでに開発した SLO を用いた手法により、HeLa S3 細胞に導入した。得られた CG1 導入細胞の割合を Flow cytometry によって調べたところ、85.4% の割合で CG1 導入細胞が得られていることが分かった (図 20B)。また、CG1 導入細胞の lysate から観測される CG1 の NMR シグナル強度から細胞内 CG1 濃度を見積もったところ、細胞内濃度は $180\ \mu\text{M}$ であることが示された。さらに、共焦点顕微鏡による解析から、導入した CG1 は細胞内に均一に分布していることが示された (図 20C)。

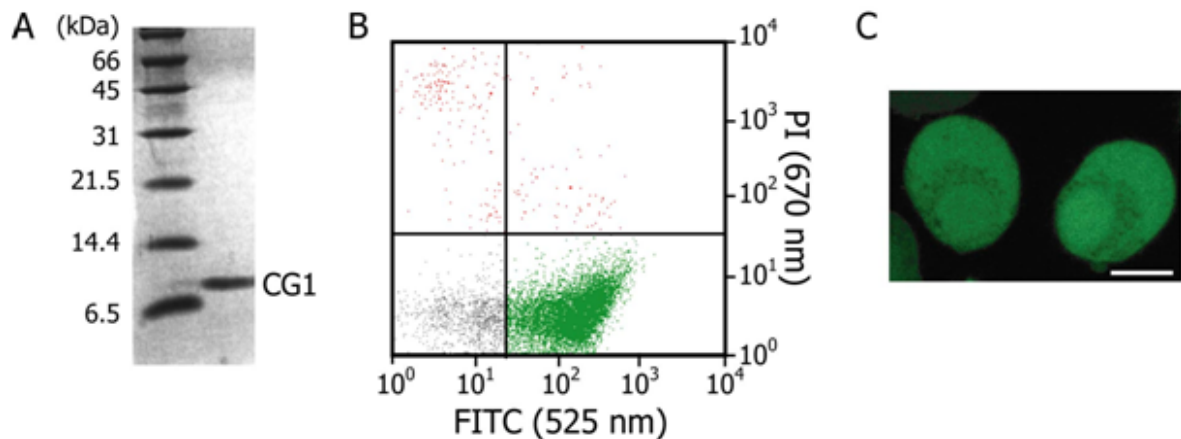


図 20 SLO 処理による CG1 の HeLa 細胞への導入

(A) 大腸菌発現系を用いて発現・精製した CG1 の SDS-PAGE 解析結果。(B) SLO 処理の際に FITC 標識 CG1 を用いて CG1 導入細胞を蛍光染色し、SLO 処理後に PI を用いて死細胞を蛍光染色した細胞を FCM によって解析した。(C) FITC 標識 CG1 を導入した細胞を、共焦点顕微鏡によって解析した (Scale bar = 10 μm)。

バイオリアクターを用いた in-cell NMR 法

本研究にて開発したバイオリアクターでは、外径 1 mm のチューブの先端に接続したガラスキャピラリーを介して、NMR サンプル管の底部に 50 μl/ml で DMEM (25 mM HEPES-NaOH (pH 7.4), 20% D₂O) を常時供給した。DMEM はよく脱気した後に CO₂ インキュベーター内で 1 時間攪拌し、細胞の生存に必要な O₂, HCO₃⁻ を溶存させて用いた。サンプル管の中部には外径 2 mm のテフロンチューブを挿入し、アスピレーターを用いて余剰の DMEM を吸引した (図 21A, B)。

バイオリアクターで培地灌流時にも細胞を NMR サンプル管底部に保持するため、細胞懸濁液は温度可塑性のポリマーである Mebiol gel と混合し、ゲル内に封入した。Mebiol gel はおよそ 20°C を境界に高温ではゲル化、低温ではゾル化するポリマーであり、細胞の 3 次元培養などに実績があり細胞毒性を有さない。また、ゲル化後も DMEM 培地の流路を保ち、効率よく培地成分を交換するため、細胞懸濁液は NMR サンプル管内においてコイル状にゲル化した (図 21C)。

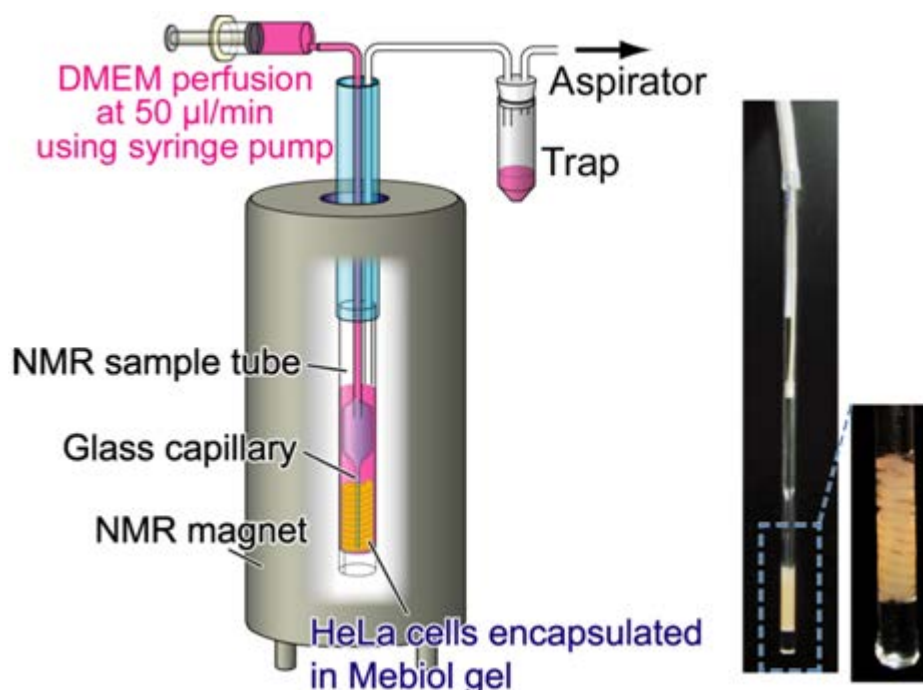


図 21 本研究で開発したバイオリアクターの模式図

(A) バイオリアクターに用いた各チューブ類とその接続方法を模式図で示した。(B) 細胞懸濁液を Mebiol gel を用いてコイル状にゲル化した写真(左)と、そこにチューブを底部に直接挿入した後の写真(中央)、およびガラスキャピラリーを底部に挿入した後の写真(右)。

バイオリアクターの有効性の検証

(細胞内 ATP 濃度の時間変化)

まず、開発したバイオリアクターを用いることで、NMR サンプル管内において細胞内 ATP 濃度が一定に保たれるかどうか調べた。細胞内 ATP 濃度は、 ^{31}P NMR 測定を 30 分ごとに行い、観測される細胞内 ATP に由来するシグナル強度によって測定した。まず、バイオリアクターを用いずに測定を行ったところ、測定後 30 分で ATP βP のシグナルが消失し、細胞内 ATP が枯渇してしまうことが示された(図 22A, C)。一方、バイオリアクターを用いた場合は、22 時間経過後も、初期濃度の 80% 程度に保たれていた(図 22B, C)。よって、バイオリアクターを用いることで、細胞内 ATP 濃度の低下を顕著に抑制できる事が示された。

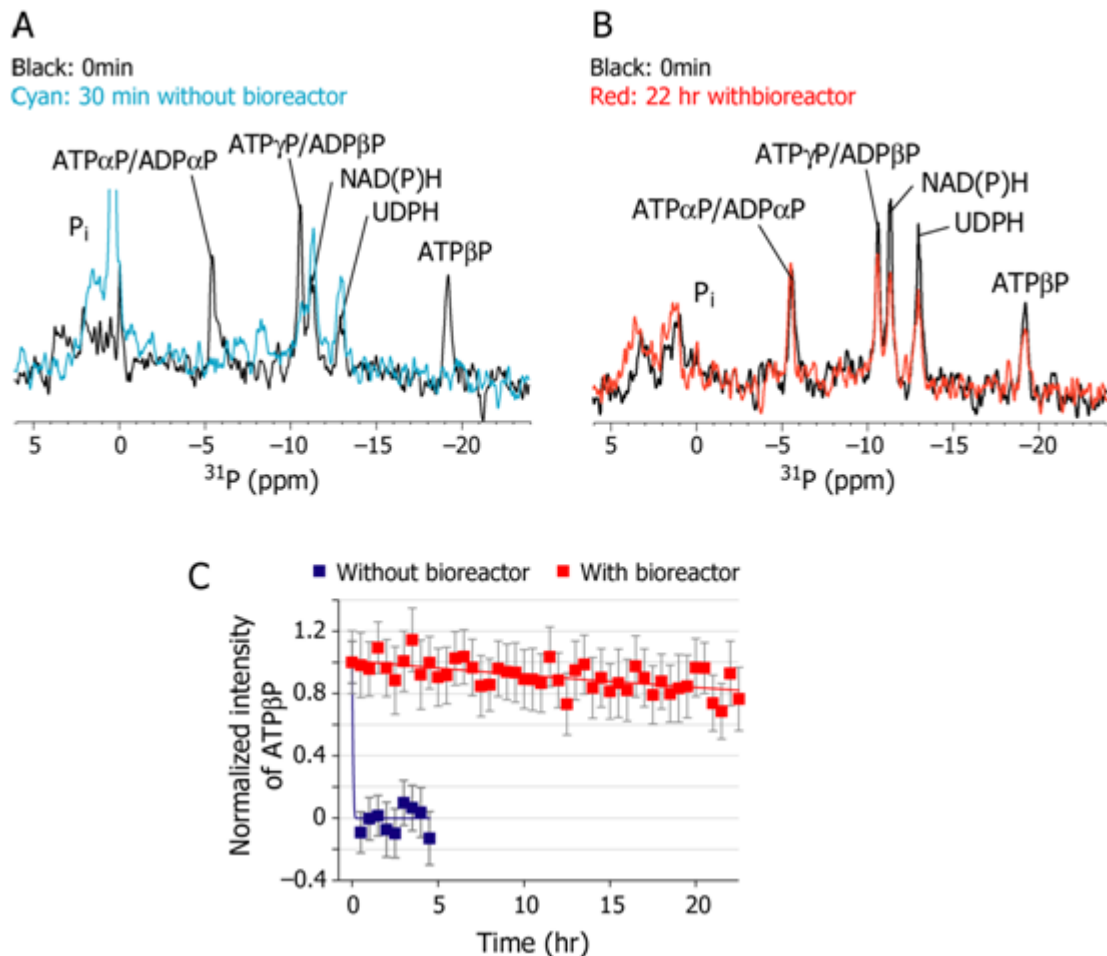


図 22 細胞内 ATP 濃度の経時的変化

(A) バイオリアクターを用いずに測定した ^{31}P NMR スペクトル。黒で測定開始直後、シアンで測定開始後 30 分のスペクトルを示した。(B) バイオリアクターを用いて測定した ^{31}P NMR スペクトル。黒で測定開始直後、赤で測定開始後 22 時間のスペクトルを示した。(B) ^{31}P -NMR スペクトルにおける ATPβP のシグナル強度をプロットした。青にてバイオリアクターを用いない場合、赤にてバイオリアクターを用いた場合を示す。エラーバーは各 ^{31}P NMR スペクトルにおける ATPβP 由来シグナルの S/N 値より計算した。

(NMR サンプル管内における細胞死と細胞増殖)

次に、バイオリアクターを用いることで、NMR サンプル管内における細胞死を抑制できるかどうかについて調べた。NMR サンプル管内の細胞を、バイオリアクターを用いた状態と用いない状態で、それぞれ 15 時間インキュベーションし、生じた死細胞を PI を用いて染色してフローサイトメーターで検出した。その結果、バイオリアクターを用いない場合は、死細胞は 81.4% 分増大したが(図 23A)、バイオリアクターを用いた場合は 1.9% 分しか死細胞が増大せず、死細胞を顕著に抑制できていることが分かった(図 23B)。さらに、培地に 10% FCS を加え、 2.5×10^7 cells/ml の細胞密度にて、細胞をバイオリアクター内で 3 日間インキュベーションしたところ、生細胞数が 2.2 倍に増大した。以上より、バイオリアクターを用いることで、サンプル管内の細胞を生理的環境下に保持できていると判断した。

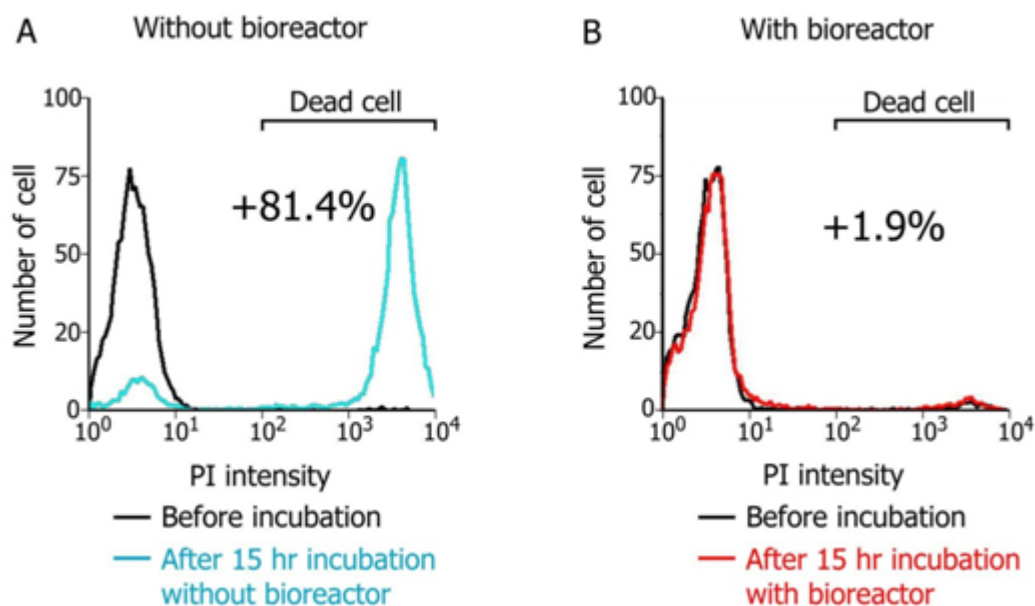


図 23 バイオリアクターを用いることによる細胞死の抑制

バイオリアクターあり (A)、バイオリアクターなし (B) の条件で細胞を NMR サンプル管内でインキュベーションし、生じた死細胞を PI を用いて染色しフローサイトメーターで検出した。黒でインキュベーション前、赤で 15 時間インキュベーション後の結果を示した。

(漏出したタンパク質による影響)

次に、in-cell NMR 測定中に漏出するタンパク質による影響を、バイオリアクターを用いることで排除できるかどうかについて調べた。まず、バイオリアクターを用いない条件で、漏出した CG1 による影響がどの程度生じるかについて調べるため、DMEM 培地に懸濁した状態で、NMR サンプル管内で 37°C にてインキュベーションし、細胞上清を回収して上清に含まれる CG1 を NMR によって観測した。NMR 観測は Ile, Leu, Val の側鎖メチル基を選択的に ^1H , ^{13}C 標識した CG1 (ILV-CG1) の側鎖メチル基を観測対象とし、methyl-TORSY 法による NMR 測定を行った。

実験の結果、インキュベーション時間が 15 分の場合には細胞上清から観測されたシグナルは培地由来のシグナルのみであり、CG1 に由来するシグナルはほとんど観測されなかった(not shown)。しかし、インキュベーション時間を 1 時間とした場合の細胞上清からは、CG1 に由来する強いシグナルが観測された (図 24A)。これは、従来法にて CG1 の in-cell NMR 測定を 1 時間以上行くと、細胞外に漏出した CG1 による影響が及んでしまうことを示している。

次に、バイオリアクターを用いた場合について調べるため、CG1 導入細胞をバイオリアクター内で 37°C にてインキュベーションした後、氷上で Mebiol gel を溶解して上清に含まれる CG1 を NMR によって検出した。その結果、18 時間のインキュベーションを行ったにも関わらず、上清から漏出した CG1 に由来するシグナルは観測されなかった (図 24B)。これは、バイオリアクターを用いることで、細胞死が抑制されたことに加え、細胞から漏出したタンパク質を常時希釈できたためと考える。

以上、バイオリアクターを用いることで漏出タンパク質による影響を排除できることが示された。

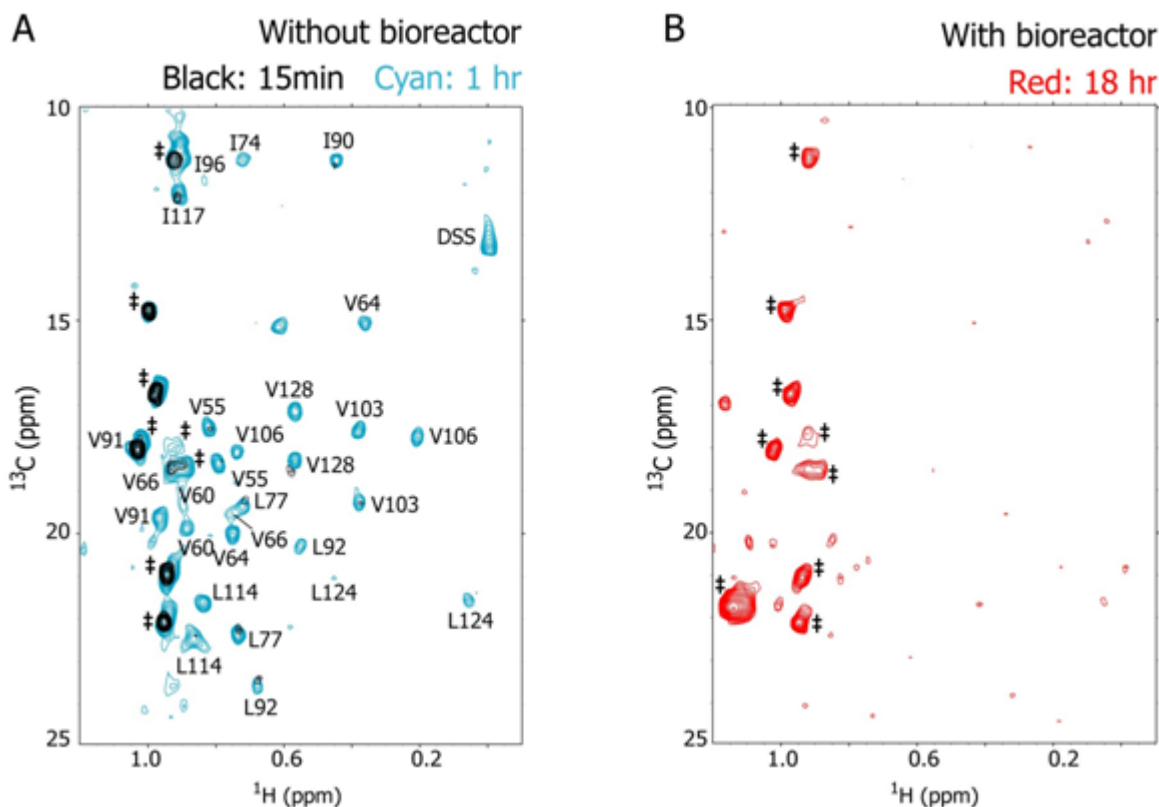


図 24 漏出タンパク質による影響

(A) バイオリアクターを用いずに CG1 導入細胞を DMEM 培地に懸濁した状態で、NMR サンプル管内で 15 分 (黒)、1 時間 (シアン) インキュベーションし、細胞上清に含まれる CG1 を NMR によって観測した。(B) バイオリアクター内で CG1 導入細胞を 18 時間インキュベーションし、その後、Mebiol gel を氷上で融解して細胞上清に含まれる CG1 を NMR によって検出した。細胞内分子や培地由来のシグナルと帰属したシグナルには * を記した。

細胞内における 転移交差飽和 (TCS) 実験 (in-cell TCS 実験)

開発したバイオリアクターを用いることにより、細胞を生理的環境に保ちながら in-cell NMR 測定を行うことが可能になった。そこで次に、細胞内環境における導入タンパク質と内在性タンパク質との相互作用を転移交差飽和法 (TCS) 法によって解析することを試みた。TCS 法は相互作用相手の分子量に寄らず、観測対象タンパク質の相互作用界面を同定することが可能な NMR 測定手法であり、細胞内の内在性微小管と CG1 との相互作用解析にも適用可能であると考えた。

TCS 法では、ラジオ波によって相互作用相手のプロトンを飽和すると、結合界面を介して 5 Å 以内に近接する観測対象タンパク質のプロトンに飽和が伝播し、NMR シグナル強度を減弱させる。よって、このラジオ波照射時の解離状態における NMR シグナル強度の減少を指標とすることで、結合界面の同定することが可能である (図 25)。本研究のようにメチル基のみが選択的にプロトン化されたタンパク質を観測対象としている場合は、メチル基以外のプロトンを対象にラジオ波を照射することで、相互作用タンパク質のプロトンを選択的に飽和させて解析を行う。細胞内における TCS 法 (in-cell TCS 法) では、ラジオ波によって細胞内に存在する分子全てを対象にラジオ波を照射することで、細胞内における CG1 の相互作用界面を同定することが可能である。

TCS 法は、ラジオ波の照射と FID 取得後の磁化回復時間に数秒を要するため、少なくとも数時間単位の測定が必要である。しかし、前述のように従来の in-cell NMR 条件では 1 時間程度で細胞外に漏出した CG1 由来のシグナルが観測されていた。よって、in-cell TCS 法を実現するためにはバイオリアクターの使用による測定時間の延長が必須である。

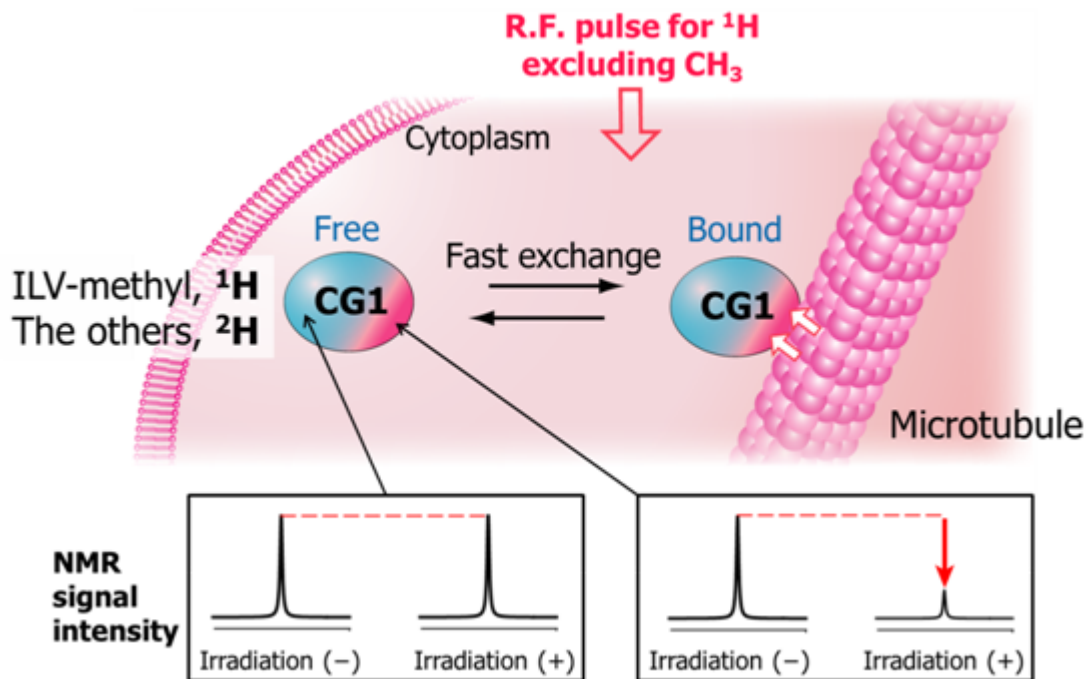


図 25 In-cell TCS 実験の模式図

ラジオ波に照射による影響をマゼンタで示している。CG1 上のメチル基は細胞内分子と相互作用による交差飽和現象によってシグナル強度が減少する。ラジオ波照射あり、なしの NMR シグナル強度の減少の比較から、細胞内における CG1 の相互作用部位を同定する。

In-cell TCS 実験の結果、観測されたシグナル強度減少比をシグナルごとにプロットしたところ、L77, I90, L92, V103, I117 において 0.5 以上の強度減少比が観測された (図 26A)。これらの残基は CG1 の立体構造上において一定の面を形成していた (図 26C)。さらに、観測された相互作用が内在性微小管との特異的な相互作用に由来することを確かめるため、安定同位体標識 CG1 と同時にその 10 倍量の非標識 CG1 を細胞内に導入して、in-cell TCS 実験を行った。過剰量の非標識 CG1 を細胞内に導入することにより、微小管上の CG1 結合部位が非標識 CG1 によって占有されるため、特異的な相互作用を抑制し、細胞内分子との非特異的な相互作用の影響のみを観測することができると考えた。その結果、すべてのシグナル強度減少率は、0.5 以下に抑制された (図 26B)。さらに、in-cell TCS 実験によって同定された相互作用部位と、*in vitro* における CG1 の立体構造解析や、類縁体における変異体解析から得られた微小管との相互作用部位はほぼ一致していた (図 26D)。これは、in-cell TCS 実験において同定された相互作用界面が、内在性微小管との相互作用によるものであることを支持している。以上の結果より、in-cell TCS 法を用いて 細胞外から導入した CG1 と内在性微小管との相互作用界面を同定することができたと結論した。

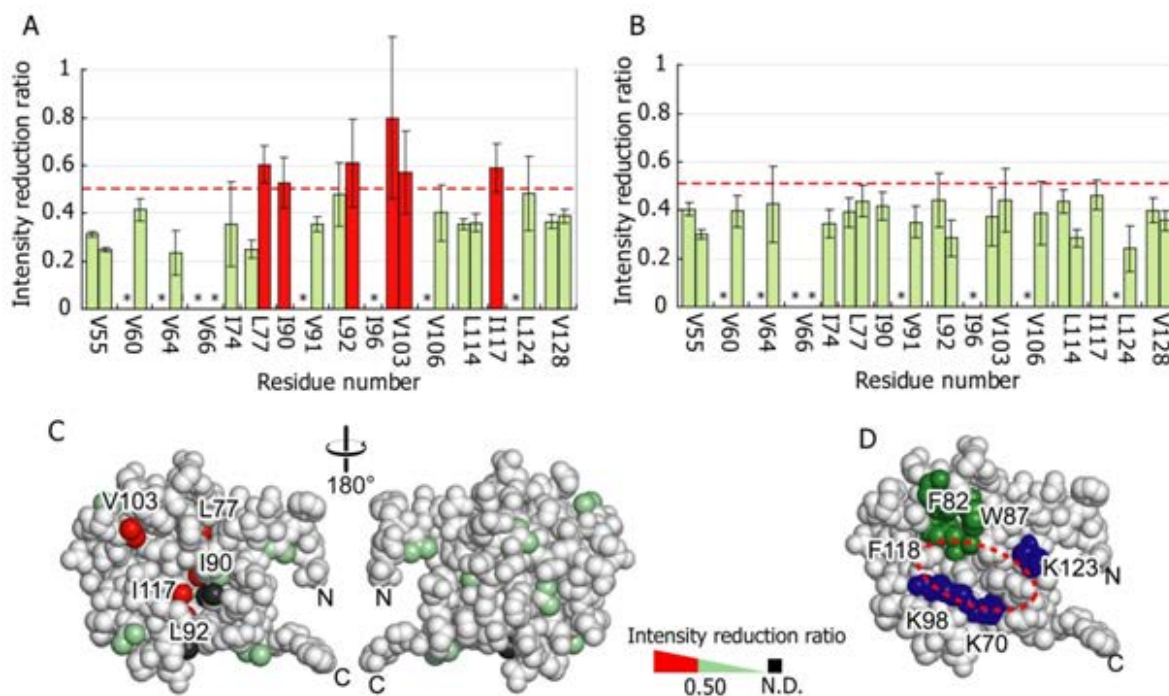


図 26 In-cell TCS 実験とコントロール実験の比較

(A, B) ILV-CG1 のみ (A)、およびその 10 倍量の非標識 CG1 を細胞内に導入して行った in-cell TCS 実験結果。赤の点線で 0.38 の threshold を示し、エラーバーを含めて 0.38 以上のシグナル強度減少を示した残基を赤で示す。(C) A の結果を CG1 の立体構造上にマッピングした。(D) in vitro における解析から報告されている CG1 の微小管との相互作用界面。

本研究により、生理的条件下に近い環境において in-cell NMR 測定を行うことが可能になり、in-cell TCS 法による細胞内のタンパク質間相互作用解析が可能であることが示された。本手法は、細胞内のみ安定に存在する、膜タンパク質やタンパク質複合体を相互作用相手とした TCS 実験に適用できると考えている。また、Mebiol gel は細胞の 3 次元培養にも適用可能なため、本手法は接着状態の細胞を対象とした解析にも応用することが出来る。これによって、細胞の接着や神経細胞の軸索の延長において機能を発揮するタンパク質などを解析対象とし、足場依存的に起こる相互作用を対象とした解析が実現できると考える。今後、バイオリクターによって生理的条件下においた細胞を用いて、細胞周期の進行に伴うタンパク質の相互作用変化や、翻訳後修飾の変化などを研究対象とした、in-cell NMR 法による原子レベルでの解析が展開されると期待する。

③ ケモカイン受容体 CCR5—リガンド間相互作用に関する構造生物学的解析法の確立 (東大分室)

CC-chemokine receptor 5 (CCR5) は、G タンパク質共役型受容体 (GPCRs) ファミリーに属する膜タンパク質である。CCR5 とそのリガンド (MIP1- α , MIP1- β , and RANTES など) 間相互作用は、G タンパク質を介したシグナル伝達を介して CCR5 を発現した白血球の遊走を引き起こす。加えて、CCR5 は HIV-1 の共受容体であることが報告されている。したがって、CCR5—リガンド間の相互作用機構を構造生物学的に解明することは、抗 HIV 薬の開発において重要である。しかし、その重要性にもかかわらず、CCR5 の構造生物学的解析は困難である。その原因は、CCR5 が生体膜から可溶化した状態において非常に不安定であり、生体内における機能を保った状態における大量調製法が確立していないためである。

CCR5 は可溶化した状態では不安定であるが、可溶化した状態から脂質二重膜中に再構成することにより安定性が向上する可能性がある。脂質二重膜再構成法の一つとして、近年報告された再構成 HDL (rHDL) がある。rHDL は、直径約 10 nm の脂質二重膜の周囲を、両親媒性 α -helix に富む apolipoprotein A-I (Apo A-I) 2 分子により囲まれた構造を持ち、脂質二重膜の内部に膜タンパク質を再構成することができる。rHDL は水溶性であり粒子径が均一であるという特徴から、構造生物学的解析にも適用可能であると考えられる。本研究では、rHDL を用いて溶液 NMR 解析に適した膜タンパク質再構成法の確立を行い、TCS 法を用いて CCR5 とそのリガンド間相互作用解析法の確立を目指した。

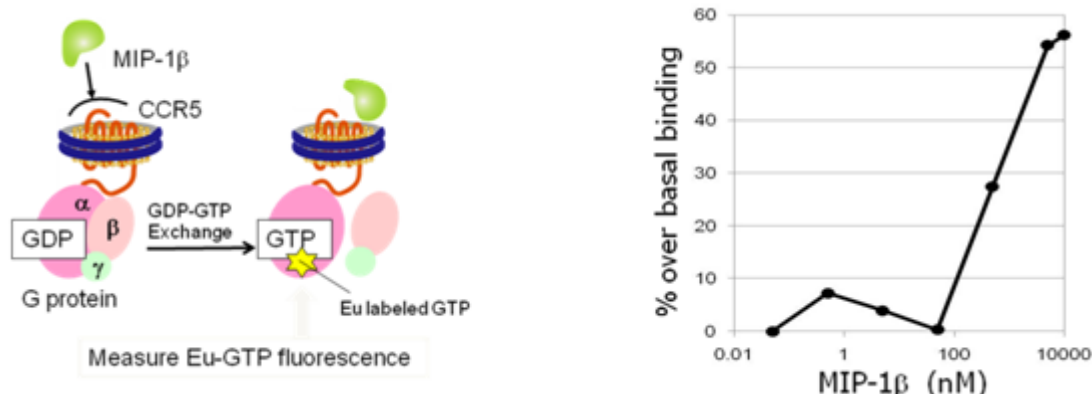


図 27 rHDL に再構成した CCR5 のシグナル伝達活性に関する評価 (GDP-GTP 交換アッセイ)

(左) 実験概念図 : MIP-1β 刺激を受けた CCR5 からのシグナル伝達により GTP 結合型となった $G_{i\alpha}$ サブユニット量を、Eu 標識した GTP の蛍光強度をもとに評価した。(右) MIP-1β 濃度に対して、Eu 標識 GTP 蛍光強度の変化をプロットした。MIP-1β 濃度の増加に伴う、Eu-GTP 蛍光強度の増加を観測した。

rHDL 中に再構成した CCR5 の大量調製および性状解析

CCR5 はバキュロウイルス-昆虫細胞発現系を用いて Sf9 細胞により発現した。CCR5 を発現した細胞を超音波破碎した後、ショ糖密度勾配遠心を用いて細胞膜画分を調製した。

CCR5 は、可溶化状態において急速に失活するため、可溶化した状態での精製は困難である。そこで、CCR5 が可溶化状態にある時間を短縮するため、rHDL による脂質二重膜再構成を導入し、以下の新規試料調製法を考案した (図 28)。まず、CCR5 を発現した昆虫細胞膜画分を 1% n-dodecyl-β-D-maltopyranoside (DDM) により可溶化した。これに Apo A-I を加え、DDM を除去することにより、CCR5 を脂質二重膜を含む rHDL 粒子中に再構成した。CCR5 を含む rHDL は、Ni アフィニティークロマトグラフィーおよび 1D4 抗体クロマトグラフィーにより精製した。

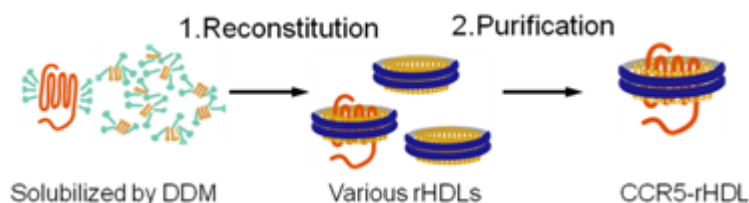


図 28 rHDL 中に再構成した CCR5 新規調製法の概念図

界面活性剤による可溶化の直後に脂質二重膜再構成を行い、その後精製するという方法を考案した。

rHDL に再構成した CCR5 の純度は、SDS-PAGE 解析からおよそ 80% であった (図 29)。また、rHDL に含まれる CCR5 の収量は、昆虫細胞 1L 培養あたり約 10μg であった。

再構成した CCR5 がリガンド結合活性を持つことを確認するため、プルダウンアッセイを行った。CCR5-rHDL を固定したカラム上に、MIP-1β が保持されたことから、CCR5-rHDL が MIP-1β 結合活性を持つことがわかった (図 30)。さらに、再構成した CCR5 が精製した G_i タンパク質と共役することを確認するため、GDP-GTP 交換アッセイを行った。その結果、MIP-1β の濃度依存的に $G_{i\alpha}$ サブユニット上における GDP-GTP 交換が促進されることがわかった。

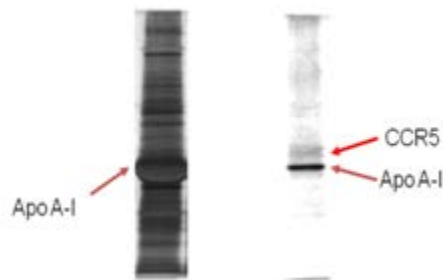


図 29 CCR5-rHDL の精製前後の純度比較 (SDS-PAGE/銀染色)

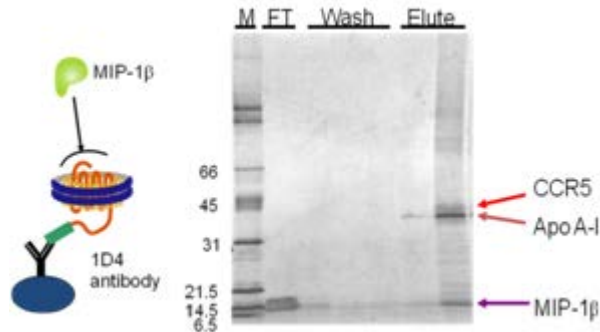


図 30 CCR5-rHDL と MIP-1b を用いた pull down assay
(左) 実験概念図 (右) 各溶出フラクションに対する SDS-PAGE 解析 (銀染色)

加えて、rHDL の脂質二重膜中に再構成した CCR5 の安定性について、構造認識抗体 2D7 に対する結合活性を指標とした評価を行った。まず、昆虫細胞膜画分から 1% DDM を用いて可溶化したミセル状態の CCR5 の安定性を調べたところ、4 °C 24 時間後で 2D7 結合活性が 10% 未満に低下した。これに対し、rHDL 中に再構成した CCR5 では、4 °C 24 時間後にもとの活性の 85% を保持していた (図 31)。

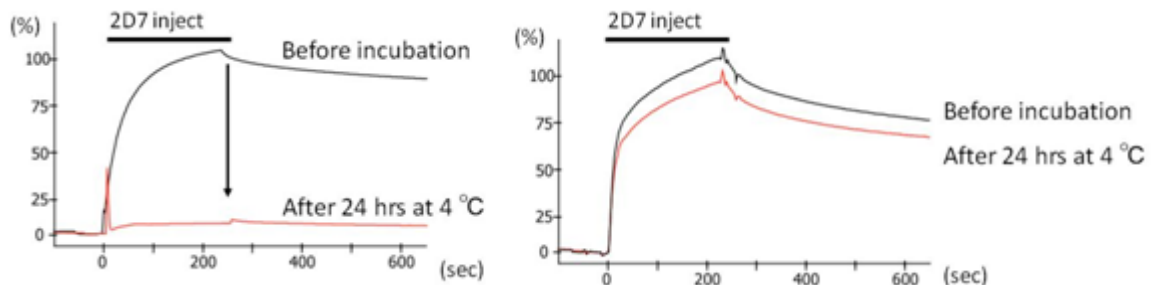


図 31 DDM ミセルおよび rHDL 中における CCR5 の安定性比較

センサーチップ上に CCR5 を固定し、2D7 抗体をアナライトとした際のレスポンスを示す。

左) DDM ミセルにおける CCR5 は 24 時間後の 2D7 抗体結合量が 10% 以下に減少した。右) rHDL 脂質二重膜中に再構成した CCR5 は 24 時間後に約 85% の 2D7 抗体結合量を保持していた。

CCR5-rHDL と MIP-1 α 変異体を用いた TCS 実験

CCR5—MIP-1 α 間相互作用に関する構造生物学的知見を得るため、TCS 実験を行った (図 32)。低濃度の CCR5-rHDL を用いて結合界面を同定するために、高感度のメチル検出型 TCS 実験を適用した。Ile · Leu · Val のメチル基に選択的に ^1H , ^{13}C が導入された重水素化 MIP-1 α (P8A/F13Y/E67Q) 10 μM に対し、約 1 μM の非標識の CCR5-rHDL を添加した試料を調製した。CCR5-rHDL の芳香族プロトンラジオ波照射した場合に、CCR5-rHDL との結合に起因する MIP-1 α 変異体のシグナル強度減少率を調べた。rHDL への非特異的結合の影響を見積もるコントロール実験として、CCR5 を含まない rHDL を用いた TCS 実験も行った。その結果、MIP-1 α V59 の H_γ シグナルにおいて、ラジオ波照

射時に顕著なシグナル強度減少が観測された。この結果は、コントロール実験と比較して有意であり、V59 が CCR5 との結合界面に存在することを示している (図 33)。

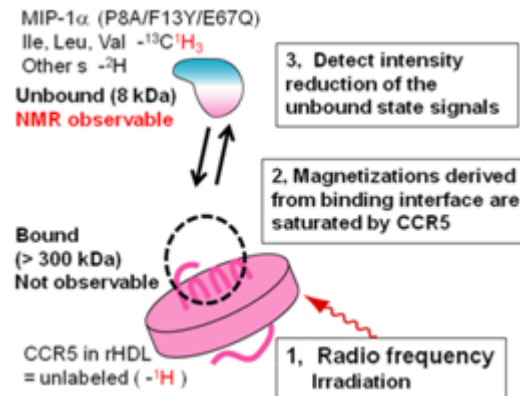


図 32 CCR5-rHDL—MIP-1α 間相互作用解析における TCS 実験の概念図

ラジオ波の照射を照射した非標識の CCR5-rHDL に結合することにより、飽和が伝播し、MIP-1α の NMR シグナル強度が減少する。

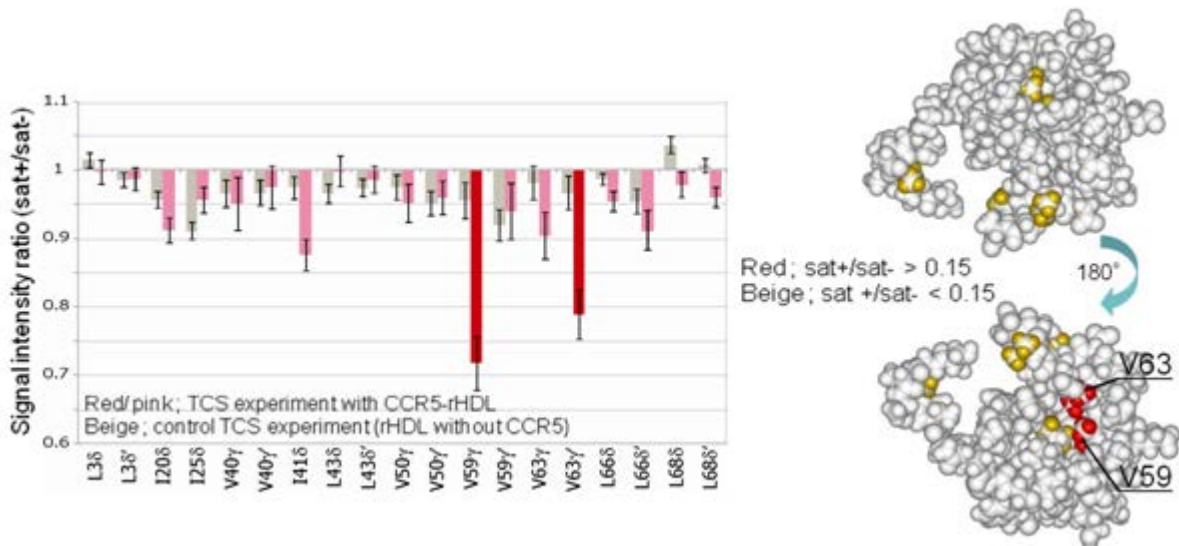


図 33 TCS 実験結果

(左) 観測対象としたメチルプロトンの、ラジオ波照射によるシグナル強度減少比のプロット

(右) MIP-1α 分子構造上における、シグナル強度減少が観測されたメチルプロトン (V59・V63) のマッピング

本研究では、CCR5 の Sf9 細胞による大量発現および rHDL 脂質二重膜中への再構成を行った。rHDL に再構成した CCR5 は、リガンド結合活性およびシグナル伝達活性を持つことを示した。したがって、rHDL に再構成した CCR5 は生体膜中と同様の環境にあるといえる。

TCS 実験の結果から、MIP-1α の V59 が CCR5 との結合界面に含まれることが新たに示唆された。この領域については、CCR5 との相互作用に関する変異体解析が報告されていない。TCS 実験は、変異体解析が困難な疎水性領域に対して相互作用情報を得る手段としても有効であると考えられる。

以上から、本研究で確立した試料調製法と TCS 実験を組み合わせることにより、CCR5 とリガンド間の相互作用において構造生物学的解析が可能となった。この手法は、他の様々な GPCR においても、リガンドおよび細胞内エフェクター分子との相互作用解析へと応用が期待できる。

(4) 細胞膜複合体相互作用解析のための NMR 解析法の開発

① HR-MAS を用いた膜蛋白質複合体における分子間相互作用の新規構造生物学的解析法の開発 (東大分室)

膜タンパク質の機能発現メカニズムを明らかにするためには、膜タンパク質・リガンド相互作用の

解明が必要である。従来の構造生物学的手法では、膜タンパク質は界面活性剤により可溶化された状態で解析されてきた。しかし、膜タンパク質は界面活性剤ミセル中でしばしばその高次構造が不安定化することが知られており、活性を保持した状態での試料調製法が必要とされる。

これまでに、膜タンパク質をアフィニティビーズに固定化した状態で脂質二重膜中に再構成する“bead-linked proteoliposome (BPL)”を開発し、NMRを用いた相互作用解析法である転位交差飽和(TCS)法との併用により、カリウムチャンネルとその阻害毒素の複合体解析に成功した(Yokogawa M. et al. *J. Am. Chem. Soc.* 2005)。しかし、ビーズなどの不溶性成分の混在により局所磁場が不均一となり、NMRシグナルが大きく広幅化するため、観測対象タンパク質は40残基程度に制限されていた。また、脂質二重膜中の膜タンパク質のように運動性の低下した分子においては双極子-双極子(DD)相互作用が亢進しており、TCS法において結合界面に観測される交差飽和がその周辺に拡散し、結合界面が明確に同定できない可能性が懸念されていた。

このような問題に対し、局所磁場の不均一性を解消しDD相互作用を減弱するマジック角高速回転(MAS, 図34左)の適用により、スペクトルを高分解能・高感度化すると同時に、スピンドiffusionの抑制による明確な結合界面の同定が可能になると考えた。

そこで本研究では、MAS条件下においてビーズに固定化したタンパク質と溶液中のタンパク質の間(固液界面)における相互作用解析を可能とするNMR手法を確立することを目的とし、試料調製法の開発および交差飽和プロファイルに対するMASの効果の評価を行なった。

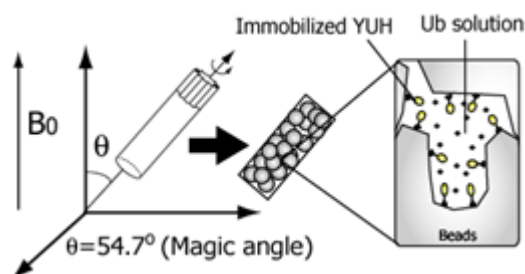


図34 MASおよびMAS試料内部の模式図

左：マジック角高速回転(MAS)とは、静磁場に対し、約54.7°傾けた軸の周りに試料を高速回転することにより高分解能化を図るNMR手法である。

右：YUH(黄色楕円)を固定化した多孔性シリカビーズをUb(黒丸)溶液に懸濁し、MAS試料管に詰めた。

解離定数(10 μ M)および複合体の立体構造が明らかとなっている Yeast ubiquitin (Ub : 8.6kDa)と Yeast ubiquitin hydrolase 1(YUH : 26kDa)の相互作用系を用いた。

固定化担体・固定化方法の検討

固定化担体の材質として膨潤性セファロースと多孔性シリカ、固定化方法として His タグを介した Zn アフィニティビーズへの固定化法と、担体上のカルボキシメチル(CM)基に対してアミノ基を介して共有結合させる固定化法を検討し、担体の空隙率、非特異吸着の有無、YUHの固定化量、固定化されたYUHのUb結合活性を解析した。

MASによる高感度・高分解能化の評価

ビーズとUbの懸濁液の¹H-¹⁵N HSQC スペクトルをMAS適用時・非適用時に取得し、Ub溶液単独の¹H-¹⁵N HSQC スペクトルと比較することで、感度と分解能を評価した。

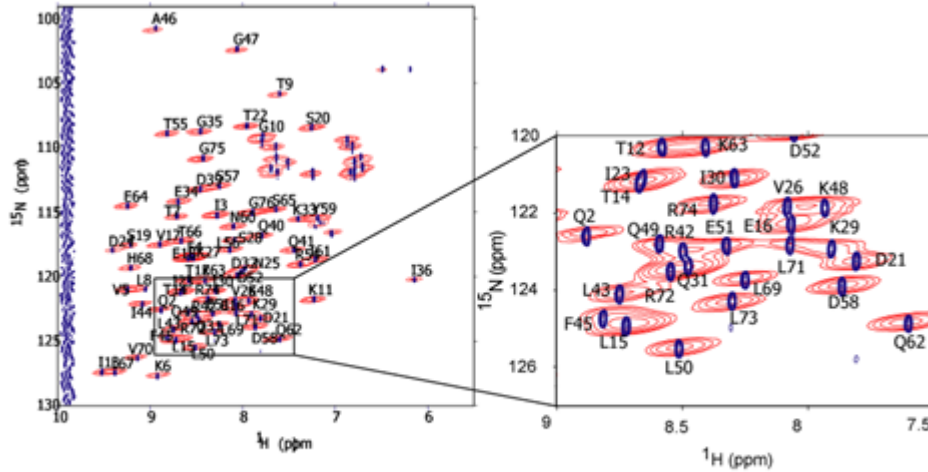
MAS条件下のTCS実験

2mM 均一²H,¹⁵N 標識 Ub 溶液 (50mM NaCl, 50mM NaPi, pH6.5, 80%D₂O) にて YUH 固定化ビーズを平衡化し、NMR 試料とし、25°C、回転速度 7000Hz にて TCS 実験を行ない、交差飽和プロファイルを取得した。

固定化担体に関して、セファロースビーズはその膨潤性のために MAS の遠心力により円筒状の固相と Ub 溶液からなる内腔に分離した。一方、シリカビーズは MAS 回転後も均一に充填された状態を保持していた。さらに大きな比表面積により相互作用の場が確保されること、および 80% の高い空隙率により高感度測定が可能であることを見出し、固定化担体として多孔性シリカを採択した。

固定化方法に関して、Zn に対する His タグを介した固定化法では、YUH の Ub 結合活性の低下や Ub が Zn に対して非特異吸着することによる測定感度の低下および TCS 結果にアーティファクトが見られたのに対し、CM 基と YUH を共有結合させる固定化法によりこれらの問題が克服できることを見出し、固定化法として後者を採択した。

Ub の ^1H - ^{15}N HSQC スペクトルは、Ub 単独では ^1H 方向の線幅は 13Hz 程度であるのに対し、MAS 非適用時のシリカビーズ混在下では、局所磁場が不均一になることで ^1H 方向の線幅が 108Hz 程度まで広幅化し、観測可能な 72 残基中 42 残基が縮重していた (図 35 赤)。一方、MAS の適用によりシグナルの ^1H 方向の線幅が 18Hz にまで先鋭化し、感度・分解能が約 6 倍向上した結果、縮重したシグナルは 6 残基にまで減少した (図 35 青)



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

図 35 silica beads 中の Ub の ^1H - ^{15}N HSQC スペクトルの重ね合わせ
MAS の適用により ^1H 方向にシグナルが先鋭化し、縮重が解消されたことがわかる。
(赤：非 MAS 条件下 青：MAS 条件下)

7000Hz の回転速度で TCS 実験を行ったところ、Ub の YUH 結合界面に顕著な交差飽和が観測され (図 36 左)、Ub 上の YUH 結合界面を同定することに成功した (図 36 右)。一部、結合界面周辺の残基への交差飽和も観測されている。蛋白質のビーズへの固定化に伴う YUH の運動性低下により、複合体形成時に分子間での DD 相互作用が亢進しスピン拡散による強度減少が結合界面周辺残基に及んだと考えている。

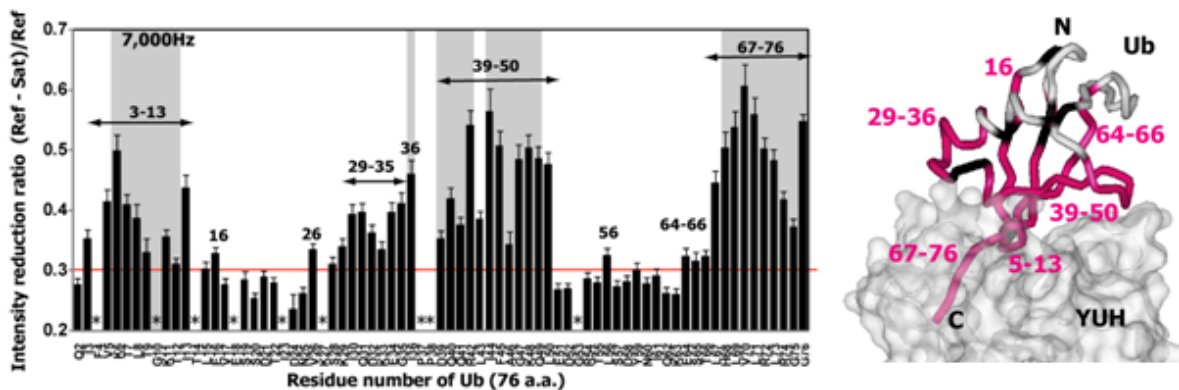


図 36 MAS 回転速度 7kHz における交差飽和プロファイルと、大きな交差飽和が観測された残基の Ub-YUH 複合体の立体構造上へのマッピング

左：横軸は Ub の残基番号、縦軸は YUH 非飽和時に対する YUH 飽和時の Ub のシグナル強度を表しており、理論上、交差飽和が観測される YUH から 5Å 以内に存在する Ub の残基をグレーの背景で示した。bar が長いほど、YUH からの交差飽和が大きいことを表している。(*は解析対象外の残基)

右： Ub-YUH 複合体の結晶構造に対するマッピング。Ub を主鎖 tube 表示、YUH を表面表示にて示し、35%以上のシグナル強度減少を示した残基をマゼンタで示した。Ub の YUH に近接した残基が適切に同定されたことが分かる。(黒は解析対象外の残基)

本研究により、固液界面の TCS 実験に対して MAS を適用することで、スペクトルが高感度・高分解能化するとともに、相互作用界面が明確に同定できることが示された。本手法は、BPL として再構成した膜蛋白質の相互作用系に適用可能であり、脂質二重膜中の膜蛋白質の分子認識機構を解明する手法として期待される。

7000Hz の MAS 条件下の TCS 実験にて相互作用界面に特異的な交差飽和の観測に成功した一方で、MAS が DD 相互作用に与える影響に関してはより詳細に解析する必要がある。今後、静止条件下やより高速の回転速度にて TCS 実験を行ない、回転速度が DD 相互作用に与える影響を解析する。

(5) 創薬標的タンパク質の個別解析例

① 転移交差飽和法を用いたケモカイン SDF-1 とその受容体 CXCR4 との相互作用解析 (東大分室)

ケモカインの1つである SDF-1 とその受容体 CXCR4 は、白血球の動態制御、造血、器官形成などの生理機能を有しており、また、ガンの転移や HIV-1 の感染など、多くの病態にも関係している。CXCR4 と SDF-1 との相互作用を特異的に阻害する薬剤を合理的に設計するには、両者の認識機構に関する原子レベルでの知見が必要となる。

先行研究における SDF-1 の変異体解析からは、SDF-1 の N 末端がシグナル伝達活性に必須である一方、受容体の親和性には SDF-1 の N 末端を除くコア領域が重要であることがわかっている。また、CXCR4 については、細胞外領域がリガンドとの親和性に重要である一方、膜貫通 (TM) 領域がシグナル伝達に関与すると考えられている。このことから、CXCR4 と SDF-1 の間には、結合のみを担う相互作用 (SDF-1 コア領域-CXCR4 細胞外領域) と、シグナル伝達を担う相互作用 (SDF-1 N 末端-CXCR4 TM 領域) の、2つの独立した相互作用が存在するという、2段階仮説が提唱されている。しかし、この2種類の結合状態を示した知見はなく、これらの相互作用に関する原子レベルでの情報も得られていない。さらに、CXCR4 の N 末端に相当するペプチドと SDF-1 との相互作用解析はなされているものの、CXCR4 全長を用いた構造生物学的知見は皆無である。これは、CXCR4 が7回膜貫通構造をもつ G タンパク質共役型受容体 (GPCR) の1つであり、リコンビナント発現系や精製法の確立および結晶化がいずれもきわめて困難であることによる。

そこで、本研究では、SDF-1 上の CXCR4 相互作用部位の同定を行い、さらに、SDF-1 と CXCR4 との間に2つの独立した相互作用が存在するかを、構造生物学的に解明することを目的とした。

CXCR4 の発現・精製と性状解析

CXCR4 はバキュロウイルス-昆虫細胞発現系により発現し、ドデシルマルトシド (DDM) による可溶化後、C 末端に付加したエピトプタグを利用した抗体アフィニティー精製により精製した。SDS-PAGE 解析から、得られた CXCR4 の純度は 80 % 以上と見積もった。表面プラズモン共鳴 (SPR) 法による構造認識抗体 12G5 結合活性の解析から、得られた CXCR4 のうち約 50 % が正しくフォールドしていることを明らかとした。12G5 の結合量から見積もった、正しくフォールドした CXCR4 量は、1.5 L 培養あたり約 100 μ g であった。得られた CXCR4 が SDF-1 結合活性を有していることは、プルダウンアッセイにより確認した。さらに、SPR 法における 12G5 結合活性の解析から、低温に保持し、かつ glycerol を添加することが CXCR4 の安定性に必須であることが判明した。

転移交差飽和法を用いた SDF-1 の CXCR4 相互作用部位同定

SDF-1 の CXCR4 相互作用部位を同定するため、安定同位体標識 SDF-1 (100 μ M) に対し、非標識 CXCR4 (10 μ M) を添加した条件で、転移交差飽和 (TCS) 法による解析をおこなった。低濃度の試料、低温、glycerol 存在下での解析を可能とするため、高感度検出に適したイソロイシン・ロイシン・バリンのメチル基を選択的に 1 H, 13 C 標識してプローブとする、methyl-TCS 法を採用した。結合・解離の交換を促進し、解離状態の SDF-1 へ飽和を効率よく伝播させるため、シグナル伝達活性を保持している一方、野生型よりも CXCR4 に対する親和性が低い SDF-1 R8A/R12A 変異体を利用した。さらに、コントロール実験として、活性のある CXCR4 とほぼ等量の均一 2 H 標識野生型 SDF-1 を加え、特異的な相互作用のみを阻害した条件で TCS をおこなった。得られた結果をもとに、変性した CXCR4・DDM ミセル・不純物に由来する非特異的相互作用の影響を見積もった。

TCS 実験の結果、非特異的相互作用の影響を除いたシグナル強度減少幅 ($\Delta_{\text{reduction ratio}}$) が大きかった残基を SDF-1 構造上にマッピングした (図 37)。シグナル強度減少幅が大きかった残基は、SDF-1 の N 末端 (V3, L5) に加えて、コア領域の半周にもおよぶ帯状の広い範囲 (V18, V23, L26, I28, L29, V39, V49, L55) に分布していた。したがって、この領域が SDF-1 の CXCR4 相互作用部位であると結論した。

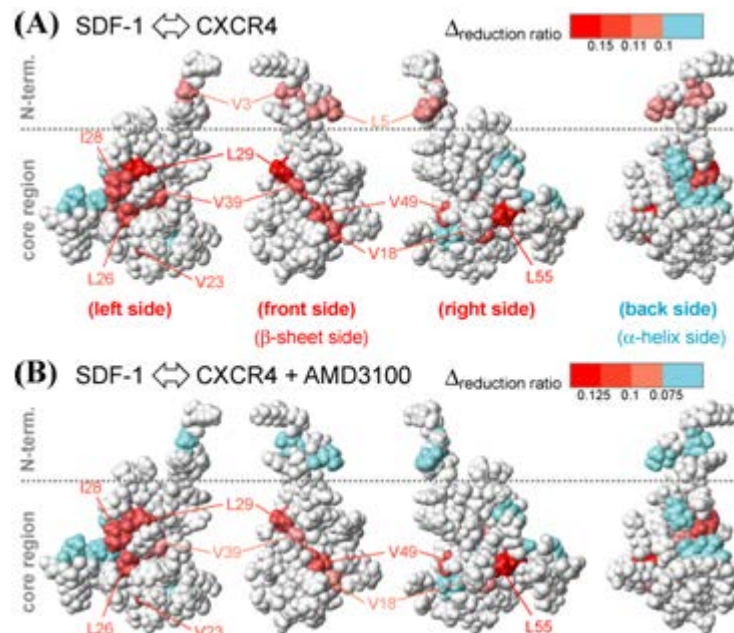


図 37 TCS 解析の結果

- (A) SDF-1 の CXCR4 結合部位同定を目的としておこなった TCS 解析の結果。SDF-1 の構造を CPK 表示し、シグナル強度減少幅 ($\Delta_{\text{reduction ratio}}$) が大きいものを濃い赤～薄い赤、小さいものを青にて、残基ごとに色付けした。いずれも N 末端を上側に向け、コア領域の β -sheet を手前に向けたものを正面側、それとは逆の C 末端 α -helix を手間に向けたものを背面側とした。正面側から、左右に 90 度ずつ回転したものをそれぞれ、右面側および左面側とした。
- (B) 1 mM AMD3100 存在下での TCS 解析の結果。(A) と同様に、SDF-1 の構造上に色付けして表示した。

SDF-1 の変異体解析

上述の TCS 解析結果は、先行研究における変異体解析から推測された領域に加え、コア領域の L55 を含むより広い範囲が、CXCR4 結合部位を形成することを示している。そこで、あらたに同定された結合部位の 1 つである L55 の近傍に変異導入し、THP-1 細胞を用いたケモタキシスアッセイにより評価した。その結果、L55 の近傍に位置する D52 への変異体 (D52A, D52S) は、受容体に対する親和性が低下していることが示された。

AMD3100 の SDF-1-CXCR4 相互作用に与える影響

さらに、SDF-1 と CXCR4 との相互作用様式を明らかにするため、CXCR4 の特異的なアンタゴニストである AMD3100 を用いた解析をおこなった。AMD3100 は CXCR4 の TM 領域に結合することが示されており、その SDF-1-CXCR4 相互作用に与える影響を解析することで、CXCR4 TM 領域をブロックした状態でも SDF-1 が結合しうるかを解析することができる。

まず、AMD3100 存在下にて上述と同様の TCS 解析をおこなった (図 37B)。その結果、SDF-1 のコア領域では AMD3100 添加前と同等のシグナル強度減少が観測されたものの、N 末端 (L3, V5) のシグナル強度減少はほとんど観測されなくなった。このことは、AMD3100 存在下では SDF-1 N 末端は CXCR4 から解離しているものの、SDF-1 コア領域は依然として CXCR4 に結合しうることを意味する。

さらに、過剰量の CXCR4 存在下で SDF-1 の NMR 測定をおこない、AMD3100 の影響を解析した。ロイシン・バリンのみを選択的に ^1H , ^{13}C 標識した遊離の SDF-1 の ^1H - ^{13}C HMQC スペクトル上では、13 個のロイシン・バリン残基に由来する 26 個のシグナルが観測された (図 38A)。これに過剰量の CXCR4 を添加したところ、すべてのシグナルが著しく強度減少した (図 38B)。このスペクトル変化は、SDF-1 が CXCR4 との複合体形成にともない、高分子量化したことを示している。さらに AMD3100 を添加したところ、N 末端 (V3, L5) に由来するシグナルのみ強度が回復して観測された (Fig.2C)。こ

のことは、AMD3100 の添加にともない、SDF-1 の N 末端が CXCR4 から解離し運動性が上昇したことを示している。一方で、SDF-1 の N 末端を除くコア領域のシグナルは十分な強度で観測されず、実際に AMD3100 添加後も SDF-1 のコア領域は CXCR4 と相互作用していることが明らかとなった。

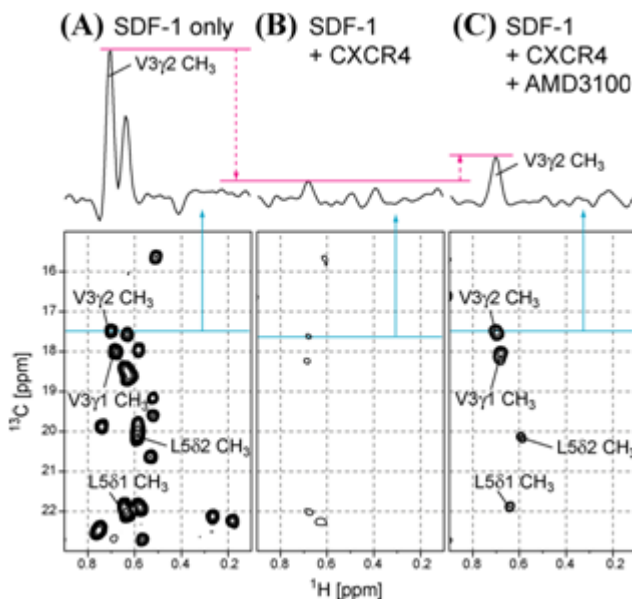


図 38 過剰量 CXCR4 存在下での SDF-1 の NMR 解析

単独 (A)、過剰量 CXCR4 (20 μ M) 存在下 (B)、過剰量 CXCR4 および 1 mM AMD3100 存在下 (C) のロイシン・バリン選択的 ^1H , ^{13}C 標識 SDF-1 (10 μ M) の ^1H - ^{13}C HMQC スペクトル。スペクトルの上部には、それぞれのスペクトルの青線にて示した 1 次元の切り出しを示す。

SDF-1 上の CXCR4 相互作用部位

TCS 解析の結果から、SDF-1 の CXCR4 相互作用部位として、コア領域の広い範囲が寄与していることが明らかとなった。これらの領域には、塩基性残基 (R12, R47 など)、酸性残基 (E15, D52)、疎水性残基 (L29, V39, V49, L55 など) が分子表面に側鎖を向ける形で存在している。SDF-1 は他の多くのケモカインと異なり、受容体選択性が高いことが知られている。CXCR4 は、これら異なる性質をもつ多くの残基を組み合わせて認識することで高い特異性を発揮していると考えた。

2 段階結合モデル

今回の NMR 解析からは、AMD3100 は、SDF-1 の N 末端を CXCR4 から解離させるものの、SDF-1 コア領域の CXCR4 への結合への影響は小さいことが示された。AMD3100 が CXCR4 の TM 領域に結合することを考慮すると、SDF-1 の N 末端が CXCR4 の TM 領域に、SDF-1 のコア領域が CXCR4 の細胞外領域に、それぞれ独立に結合すると考えることが妥当である。この結果は、先行研究にて推測された 2 段階の相互作用が実際に存在していることを、明確に示す知見といえる。

近年、複数の GPCR の X 線結晶構造が報告されており、低分子リガンドは、GPCR の TM 領域に存在する入り口の制限された cavity に結合することが示されている。同様の cavity 構造は、CXCR4 においても存在することが推測できるが、このような構造はケモカインのような比較的分子量の大きいリガンドの結合には不利である。上述の 2 段階の相互作用は、このような性質をもつケモカイン-ケモカイン受容体の相互作用に適しているといえる (図 39)。SDF-1 コア領域のみの独立した相互作用は、CXCR4 細胞外領域への迅速な結合とともに、効率よく SDF-1 を CXCR4 上につなぎとめておくことを可能とする。SDF-1 の N 末端は、この状態においても運動性が高く、効率よく結合空間を探索し、比較的狭い TM 領域の cavity への結合を促進する。

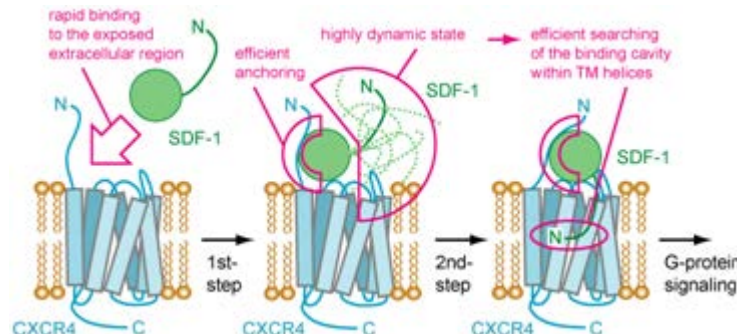


図 39 SDF-1 と CXCR4 の 2 段階相互作用

2 段階相互作用モデルにおいては、まず SDF-1 のコア領域が CXCR4 の細胞外領域に結合する (1 段階目)。この後、運動性の高い SDF-1 の N 末端が、CXCR4 TM 領域に存在する cavity へ結合する (2 段階目)。さらに、TM 領域に構造変化が起こり、細胞内の G タンパク質へとシグナルが伝達される。

② 白血球のローリングにおける CD44 リガンド結合ドメインの構造平衡 (東大分室)

CD44 は細胞外マトリックスを構成するヒアルロン酸 (HA) に対する主要な受容体で、HA との相互作用を介して、内皮細胞上におけるローリングなどのリンパ球の動態制御に重要な役割を果たしている。CD44 は一回膜貫通型のタンパク質で、細胞外 N 末端側にある HA 結合ドメイン (HABD) を介してヒアルロン酸を認識する。HABD は、ヒアルロン酸結合タンパク質の間で保存された LINK モジュールとその N および C 末端に位置する付加配列領域からなり、その立体構造が NMR および X 線結晶構造解析から明らかとなっている (Teriete et al, *Mol Cell* 2004)。我々は HA 結合に伴う HABD の構造変化を解析し、HABD は C 末端領域が一定の構造を形成しない partially disordered (PD) form へと変化することを示した (図 40b, Takeda et al, *J Biol Chem* 2006)。しかし、2007 年に発表された HA 結合状態の X 線結晶構造では、C 末端領域が一定の構造を形成した ordered (O) form を形成しており (Fig.1a, Benerji et al, *Nat Struct Mol Biol.*, 2007)、HA 結合に伴って CD44 に構造変化が起こるか否かは不明である。そこで、本研究では CD44 の HA 結合に伴う構造変化についてさらなる解析を行い、CD44 の細胞接着能および血流下のローリング活性の制御機構を HABD の HA 認識に基づいて明らかにすることを目的とした。

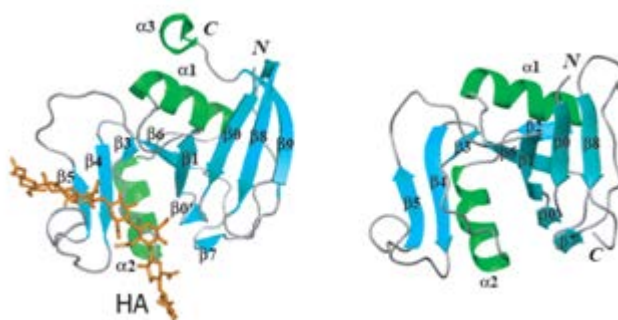


図 40 HA 結合状態の CD44 HABD の立体構造

(a) HA8 が結合した状態の HABD の結晶構造 (PDB code: 2JCR)。 (b) HA6 が結合した状態の NMR 構造 (PDB code: 2I83)。

HA 非結合時の CD44 HABD の 1H-15N HSQC スペクトルには、O form に由来するシグナルに加え、PD form に対応するマイナーなシグナルも同時に観測された (図 41a)。逆に HA 存在下の HABD のスペクトル上には PD form 由来のシグナルに加え、ordered form 由来のシグナルが観測された (図 41b)。さらに、2 状態間の交換をクロスピークとして観測する NZZ exchange 実験において、両シグナル間にクロスピークが観測された (図 41c)。よって、CD44 HABD は、リガンド非結合時において 2 状態間の平衡にあり、HA の結合は 2 状態間の平衡を PD form へシフトさせることが明らかとなった。以上の結果より、HA 結合状態の HABD の結晶構造は、溶液中にわずかに存在する O 状態を反映しており、生理的条件下の HABD は主に NMR 構造にて明らかとなった PD form を形成することが明らかとなった (図 41d)。

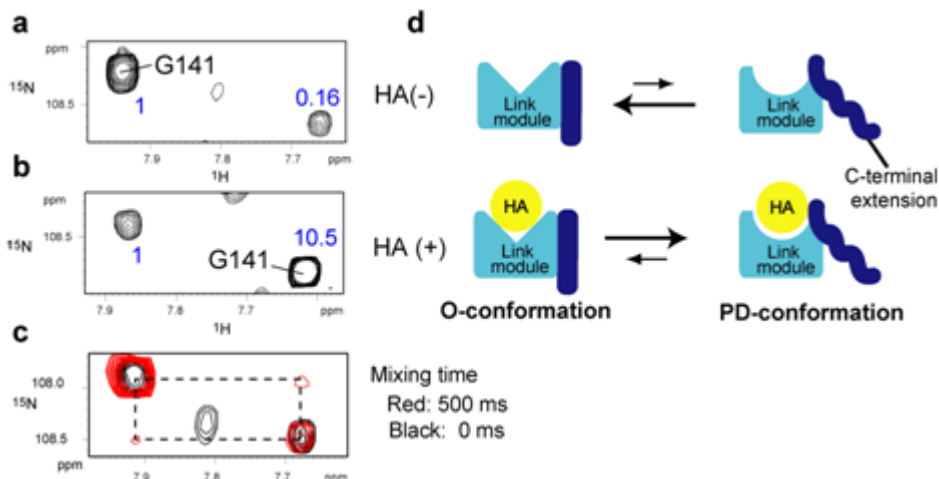


図 41 溶液中における HABD の 2 状態間の構造平衡

(a) リガンド非存在状態および(b)存在状態の HABD の G151 由来シグナル (c) Nzz exchange 実験 (d) CD44 の HA 存在・非存在状態における構造平衡

O 状態の結晶構造には、リガンド結合部位から PD form でランダムコイル化する C 末端領域にかけて、水素結合のネットワークが形成されている (図 42a)。そこで、この相互作用の維持に特に重要な役割を果たすと予測される Y161 をアラニンに置換した変異体を作製し、その構造平衡がどのように変化するか調べた。HA 非存在下の Y161A の 1H-15N HSQC スペクトルは、野生型と比較し大きな変化が観測されたことから、Y161A では分子全体にわたる構造変化が生じていることが明らかとなった (図 42b)。また、HA 存在下の野生型のスペクトルに観測される PD 状態由来のシグナルと Y161A のシグナルはよく一致した (図 42c)。また、Y161A のスペクトルには O 状態由来のシグナルが観測されないことから、平衡が完全に PD form にシフトしていると結論した。

次に Y161A HABD と野生型 HABD の HA 結合活性を SPR 法により解析した結果、Y161A は、野生型と比較して、7 倍高い HA 結合活性を有することが明らかとなった。野生型は、2 状態の平衡として存在するのに対して、Y161A 変異体は PD 状態としてのみ存在することから、O 状態よりも PD 状態の方が HA に対する親和性が高いことが示された。

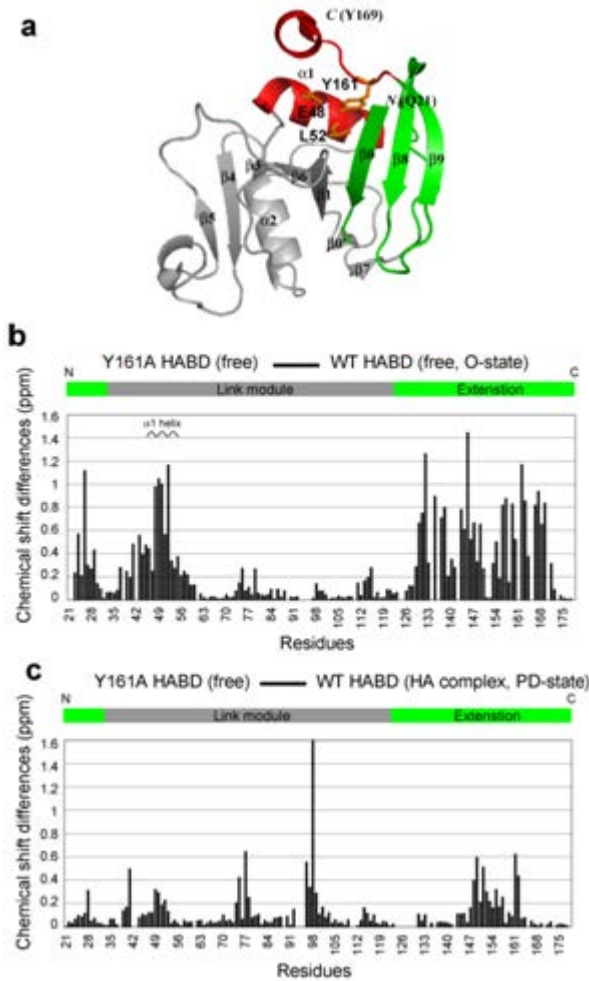


図 42 Y161A 変異体の構造

(a) 0 状態の HABD における Y161A の位置 (b) リガンド非存在下および (c) 存在下の野生型 HABD と Y161A のシグナルの化学シフト変化

CD44 の構造平衡の生理的意義を明らかにするため、野生型 CD44 および Y161A CD44 の安定形質転換株を VMRC-LCD 細胞 (肺癌由来) を用いて調製した。フローサイトメトリーにより、同程度の発現量の細胞集団を選別し (図 43a)、ウェスタンブロッティングにより野生型と Y161A CD44 で糖鎖修飾などがほぼ同一であることを確認した (図 43b)。次に蛍光標識を施した HA との親和性を調べたところ、野生型、Y161 変異体ともに同程度の HA 結合能を示した (図 43c)。また、HA を固定化したプレートに対する、野生型および Y161A 変異体 CD44 発現細胞の接着を調べたところ、両者に有意な差は観測されなかった。よって、野生型と Y161A 変異体を発現する細胞の HA 接着能は、Static な条件では同等であると結論した (図 43d)。

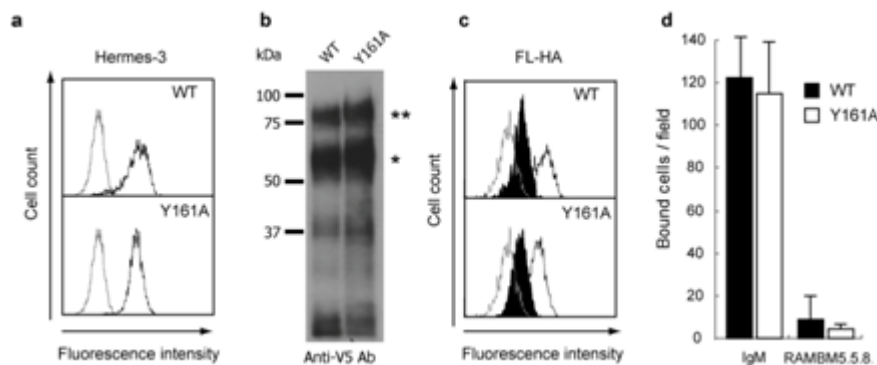


図 43 CD44 発現細胞の性質

(a) VMRC-LCD 細胞における野生型および Y161A 変異体 CD44 の発現量の比較。(b) ウェスタンブロットによる解析 (c) CD44 発現細胞の蛍光標識 HA に対する親和性。(d) HA 固定化プレートに対する CD44 発現細胞の接着能。

CD44 の構造平衡が、shear stress が存在する条件における細胞のローリング活性に影響を及ぼすか調べた。様々な shear stress 下において、HA を固定化したキャピラリーに CD44 発現細胞を還流させ、HA との相互作用によって生じる細胞のローリングの振る舞い（ローリング速度・細胞数）を調べた（図 44a）。その結果、野生型 CD44 発現細胞では、細胞のローリングが観測されたのに対し、Y161A 発現細胞では、ほとんどの細胞は接着後にローリングを示さず強い接着（Firm adhesion）のみを示した。また、ローリングや強い接着を示す細胞数は、すべての shear stress において Y161A 変異体よりも野生型 CD44 を発現する細胞のほうが多いことも明らかとなった（図 44a）。

次に、細胞上の 1 分子の CD44 と HA との相互作用を調べるため、Transient tethering 実験を行った。Transient tether 実験では、低濃度の HA を固層化した条件において細胞を還流させるため、ローリングが観測されず、細胞上の 1 分子の CD44 と HA との相互作用に由来する一過的な接着の形成（transient tether）が観測される。一定時間における Tether 形成頻度を調べた結果、Y161A と比較して野生型の方が有意に tether 形成頻度が高いことが明らかとなった（図 44b）。また、tethering を示した細胞の滞在時間を tethering 細胞数の自然対数に対してプロットして、一次の解離速度定数を算出した。その結果、野生型と比較して Y161A 変異体では cellular off rate が低下していることが示された（図 44c）。野生型が主に形成する O 状態は、shear stress 下における新しい tether 形成に有利であり、また HA 結合状態においてもローリングに必要な速やかな解離に有利であると考えられる。O 状態を形成しない Y161A でローリングが観測されなかったことから、HA 結合状態における O 状態と PD 状態間の平衡が CD44 のローリングに重要な役割を果たしている結論した。

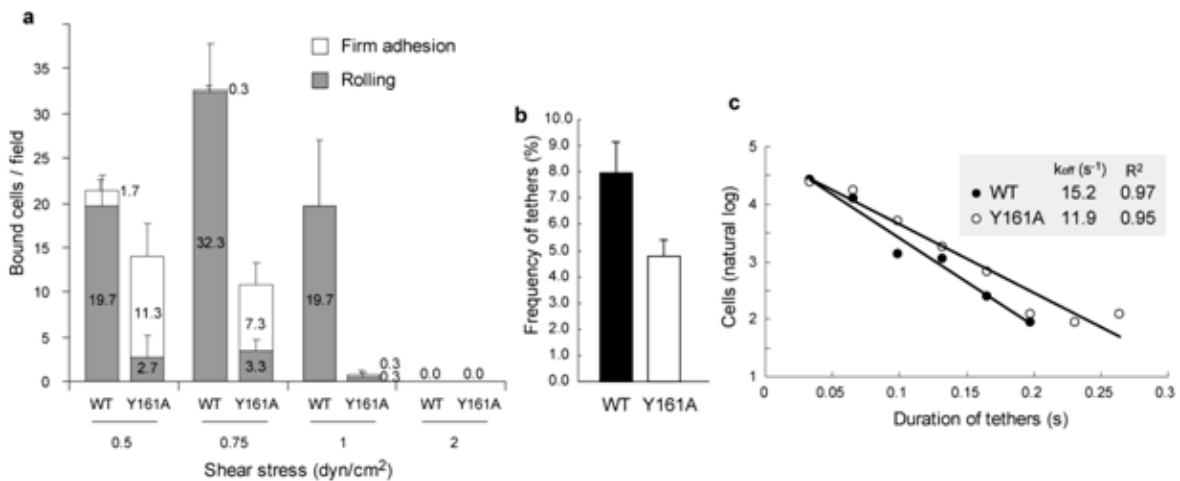


図 44 CD44 発現細胞のローリング活性の比較

(a) 野生型および Y161A 変異体 CD44 発現細胞のローリング活性とその shear 依存性。(b) Transient tether の形成頻度。(c) Transient tether の滞在時間に基づいた cellular off rate の見積もり。

③ Discoidin domain receptor 2 (DDR2) によるコラーゲン認識と活性化機構の解明（東大分室）

Discoidin domain receptor 2 (DDR2) は、細胞外マトリックスの主要な構成成分であるコラーゲン線維をリガンドとする受容体型チロシンキナーゼ (RTK) であり、細胞の増殖、遊走などの生理機能や腫瘍細胞の転移、アテローム性動脈硬化などの疾患に関与している。DDR2 の活性化は、細胞外のディスコイディン (DS) ドメインとリガンドであるコラーゲンが結合することで誘起される（図 45）。これまでの研究において、DS ドメインの立体構造を解明し、転移交差飽和 (TCS) 法によりコラーゲン線維に対する結合残基を明らかとすることに成功した。しかしながら、DDR2 のコラーゲン結合様式を理解するためには、これらの知見に加えて DDR2 とコラーゲン複合体構造の解明が不可欠である。

また、DS ドメインへのコラーゲン結合により細胞内へとシグナルが伝達される機構は不明である。DDR2 は一般的な RTK とは異なり、リガンド非結合状態で膜貫通領域 (TM) が二量体を形成していることが報告されているため（図 45）、DDR2 の活性化機構の解明にはコラーゲン結合に伴う TM の構造

情報を得ることが必要である。

本研究では、NMR 法により DDR2 とコラーゲンの複合体構造を解明し、システインスキャニング法により DDR2 の TM の二量体構造の解析を行った。

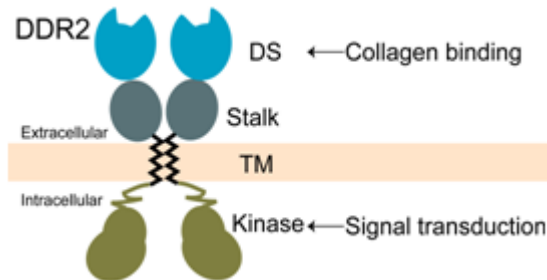


図 45 DDR2 ドメイン構造の模式図と各ドメインの機能

DDR は DS ドメイン（アミノ酸番号：30-185）によりコラーゲンと結合する。また、膜貫通領域（TM）はコラーゲン非結合状態で二量体を形成している。

コラーゲン模倣ペプチドを用いたコラーゲン結合様式の解析

DDR2 はコラーゲンタイプ II の $^{394}\text{G}-^{405}\text{O}$ (O: 4-水酸化プロリン) 領域を認識することが報告されている。DDR2 の複合体構造解析には DDR2 結合配列を GPO の繰り返し配列で挟むことによりトリプルヘリックス構造を形成させたコラーゲン模倣ペプチド(GPO)₄- $^{394}\text{GPRGQOGVMGF}^{405}\text{O}-(\text{GPO})_4$ を用いた。SPR 法により DDR2-DS ドメインとの結合活性を解析したところ、野生型コラーゲンタイプ II と同程度の解離定数 29 μM を得た。また、TCS 法により同定した合成ペプチドに対する DS ドメインの結合界面は野生型コラーゲンタイプ II に対する結合界面とよく一致した。以上の結果から、DS ドメインはコラーゲン線維のうち一本のトリプルヘリックス鎖を認識することが判明した。そこで、ペプチドを用いて複合体の解析を以降行うこととした。

DS ドメインとコラーゲン複合体における距離情報の抽出

コラーゲンに対して DS ドメインが結合する配向を常磁性緩和促進 (PRE) 実験により決定した。DDR2 結合配列を含むコラーゲンペプチドの C 末端に、三量体構造を安定化させる foldon を付加したコンストラクト (FFCP: foldon fusion collagen peptide) を大腸菌にて調製後、Cys 残基へスピンラベル試薬 MTSL を導入した。スピンラベルなどのラジカル分子は近接する核スピンの緩和を促進し、周囲およそ 15Å 以内に位置する原子の NMR シグナル強度を減少させる。DDR2 結合配列よりも N 末端側にスピンラベルを導入した場合にシグナル強度が減少した残基は、図 46A 下側の領域に集中して存在した。一方、C 末端側にスピンラベルを導入した場合には、図 46B 上側に存在する残基のシグナルが強度減少した。以上の結果から、DS ドメインの W52-G70 領域に対してコラーゲンが N 末端側に向けた配向で結合することが明らかとなった。

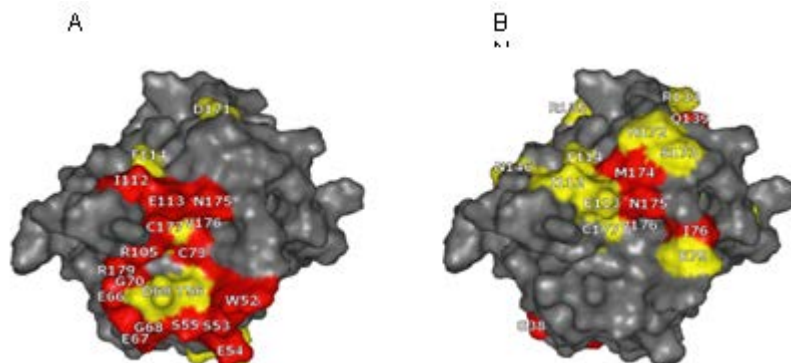


図 46 A. N 末端側に MTSL 修飾した FFCP を用いた PRE 実験の結果。アスコルビン酸による還元前後のシグナル強度比に基づき DS ドメインの表面構造にマッピングした。赤：強度比 0.74 以下，黄：0.74-0.8。B. C 末端側に MTSL 修飾した FFCP を用いた PRE 実験の結果。赤：強度比 0.8 以下，黄：

0.8-0.9.

続いて、コラーゲンと DS ドメインの近接残基対をアミノ酸選択的転移交差飽和 (ASTCS) 法により決定した。ASTCS 法では、特定のアミノ酸のみに ^1H 標識を施した FFCP を用いて TCS 実験を行うことにより、当該アミノ酸からおよそ 5 \AA 以内に存在する DS ドメイン上の残基を決定することが可能である。Arg, Val, Met, Phe についてアミノ酸選択的に ^1H 標識を施した FFCP を調製後、ASTCS 実験を行った。その結果、Arg 標識体については顕著な強度減少を示す残基は観測されなかったものの、Val 標識体では、W52 側鎖、A57、R105、R105 側鎖、A107、E113 が、Met 標識体では W52、W52 側鎖、S53、C73 が、Phe 標識体では R105 側鎖、N175 側鎖、C177 が 20%以上顕著に強度減少した (図 47)。 ^1H 標識したアミノ酸ごとに別々のコラーゲン結合残基のシグナルが強度減少したことから、アミノ酸選択的な距離情報を抽出できたと判断した。

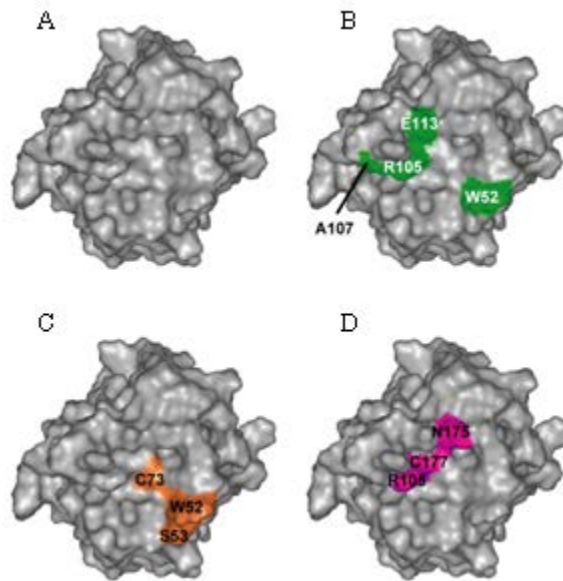


図 47 Arg (A), Val (B), Met (C), Phe (D) 選択的 ^1H FFCP を用いた ASTCS 実験の結果
DS ドメインの表面構造に 0.2 以上のシグナル強度減少率を示した残基を色付けて示した。

DS ドメインとコラーゲンの複合体モデルの構築

次に、得られた実験結果に基づいて DS ドメインとコラーゲンの複合体モデル構造を中村チームによって開発されたドッキングプログラムにて作製した。DDR2 の 20 構造に対して、コラーゲンペプチドをドッキングさせ、各 300 の複合体構造を作成した。この 20x300 構造から ASTCS 実験の結果と定性的に合致する 119 構造を選び、疑似エネルギー項 Esat を加えた分子動力学計算を行った。119 個の計算でサンプルされた構造のうち、Esat が小さく磁化変化 η が実験値とよく一致する構造を最終的な複合体構造とした。

得られた複合体構造において (図 48)、DDR2 結合への重要性が示されているコラーゲンの Met が、W52 と C73 で形成される疎水性領域と相互作用している。W52 に Ala 変異を導入すると、コラーゲンに対する結合親和性が 30 分の 1 に低下するため、W52 と Met の疎水性相互作用は重要であると考えた。同じく、相互作用に重要な Phe の側鎖が R105、C177 などの疎水性残基で形成されるくぼみに位置しており、嵩高で疎水性の芳香環が相互作用するのに適している。

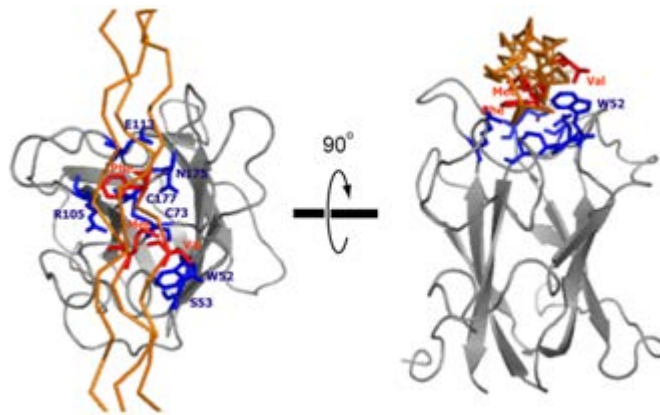


図 48 DS ドメインとコラーゲンペプチド複合体のモデル構造
相互作用に重要な残基について側鎖を表示した。

膜貫通領域の二量体構造解析

膜貫通領域 (TM) の近接残基対は全長の DDR2 を用いて脂質二重膜中で解析する必要があるため、DDR2 を 293T 細胞に発現させ、システインスキャニング法により解析した。システインスキャニング実験では、DDR2 の特定の残基に Cys を導入し、SH 基を介したジスルフィド結合形成の有無をみることで、二量体中で当該残基が近接しているかを調べる。まず、DDR2 の内在性の遊離 Cys 残基に Ser 変異を導入した C288S/C404S 変異体に対して、TM とその近傍の残基について一残基ずつ Cys 変異を導入し、コラーゲン刺激によるリン酸化活性を確認した。コラーゲン非存在下におけるシステインスキャニング実験の結果、細胞外領域(P389-T398)、細胞内領域(Q423-W425) に関しては、K392C を除きすべての変異体がジスルフィド結合を形成した一方で、TM 領域の変異体は周期的にジスルフィド結合を形成した。これらの残基は TM ヘリックスモデル構造上で片側の面に局在したため、この面で二量体を形成すると考えた (図 49)。一方、リガンド存在下において同様にシステインスキャニング実験を行うと、TM 領域における周期性が消失した。この結果は、コラーゲン結合に伴って DDR2 の TM 領域に構造変化が生じていることを示し、コラーゲン非存在下において形成される TM 領域の二量体構造は、DDR2 の活性化を抑制していることが示唆される。

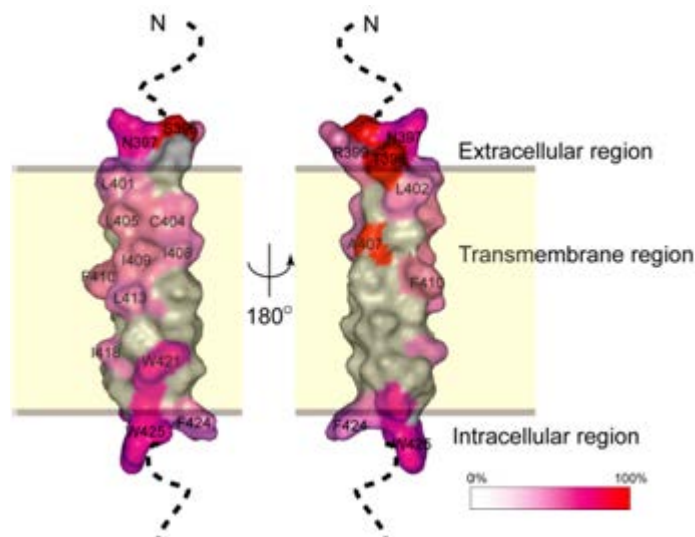


図 49 DDR2 の TM とその近傍領域のシステインスキャニング実験結果
 α -ヘリックスモデル構造上に、ジスルフィド形成効率が高い残基ほど濃い赤色にて示した。

本研究では、NMR 法を用いた常磁性緩和促進実験およびアミノ酸選択的転移交差飽和実験により、コラーゲンと DDR2 の複合体構造を解明した。また、不活性状態における DDR2 膜貫通領域の二量体構造情報とコラーゲン結合に伴う構造変化を抽出することに成功した。今後、本研究において明らか

となった複合体構造に基づくコラーゲン結合阻害剤の設計や、TM 領域の二量体構造を安定化する薬剤の探索により、DDR2 活性化を阻害する抗腫瘍薬の開発へとつながっていくことを期待する。

④ イオンチャネルの動作機構の解明（東大分室）

膜タンパク質はヒトゲノムのコードするタンパク質のうち 25-30% を占め、細胞内外へのシグナル伝達や細胞内の恒常性の維持といった機能を担う。また現在使用されている薬のうち 30-50% は膜タンパク質に作用すると言われ、膜タンパク質は創薬のターゲットとしても重要である。したがって、膜タンパク質の構造と動作機構を明らかとすることは、生物学的にも医学・薬学的にも重要な課題であるが、膜タンパク質の構造生物学はサンプル調製の困難さなどの理由により可溶性タンパク質と比較すると立ち遅れているのが現状であり、新たな方法論の確立が望まれている。

膜タンパク質には7回膜貫通型の G タンパク質共役型受容体 GPCR やイオンチャネル、トランスポーターなどが含まれるが、このうちカリウムチャネルはほぼ全ての細胞上に発現して細胞内 K⁺濃度の調節を担うイオンチャネルであり、特に神経細胞では活動電位の調節、心筋細胞ではその周期的な拍動の制御に寄与する。そのため、その動作機構の解明は神経疾患・心臓疾患・高血圧の治療薬や麻酔薬の開発などにつながると期待されるが、未だ不明な点が多い。

NMR 法は、タンパク質の構造および運動性の情報を原子レベルの分解能で取得することができる分光法である。タンパク質を結晶化して単一の構造に固定する必要がある X 線回折法とは異なり、NMR 法ではタンパク質を溶液中で、運動性を保ったままの状態、かつ部位特異的に観測することができるため、より生体内での環境に近い状態における解析が可能である。このような特長により、NMR 法では複数の構造間の動的平衡状態にあるタンパク質を捉えたり、タンパク質とリガンドの弱い相互作用を観測したりすることが可能であり、創薬への応用との親和性は特に高い。

しかしながら、NMR 法の膜タンパク質の解析への応用には、これまで大きく分けて2つの問題点が存在した。1つ目は、室温で長時間安定なサンプルを大量に調製することが困難であることが多い点である。これは、本来脂質二重膜中に存在する膜タンパク質を、溶液中に単分散の状態に安定に存在させるための可溶化が必要であることに起因する。可溶化には界面活性剤ミセルが用いられることが多いが、これが脂質二重膜中での構造および運動性を正しく反映しているかについては個々のケースについて検証が必要である。従来はミセル中での構造や運動性を脂質二重膜中と直接比較することは困難であったが、当研究室では再構成高密度リポタンパク質 (reconstituted high density lipoprotein, rHDL) 1) に着目し、この中に膜タンパク質を再構成して NMR 解析を行っている。rHDL 中に再構成された膜タンパク質は生体膜と同等の脂質二重膜に囲まれているため、より生体環境に近い状態での NMR 測定が可能である (図 50)。

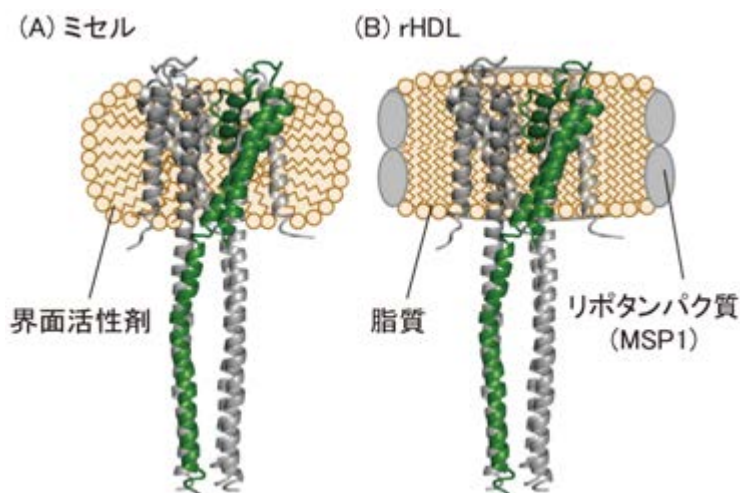


図 50 ミセルと rHDL

膜タンパク質はミセル再構成状態 (A) では界面活性剤に囲まれているが、rHDL 再構成状態 (B) では脂質に囲まれているため、より生体に近い環境での解析が可能である。

2つ目の問題点は、NMR シグナルの感度が、観測対象分子の分子量が大きくなるほど低下する点である。上述したように膜タンパク質はミセルまたは rHDL 中に再構成した状態で解析する必要がある

ため、見かけの分子量はこれらの膜模倣環境の分子量を加えたものとなり、同程度の分子量を有する可溶性タンパク質よりも解析が困難となる事が多い。これに対し、近年開発されたメチル TROSY 法では、観測対象はタンパク質中の Leu, Val, Ile のメチル基由来のシグナルに限定されるものの、NMR 法の宿命であった分子量の限界を打ち破って 1 MDa にもおよぶ高分子量タンパク質の解析が可能となっている。

本研究では、膜タンパク質の NMR 解析のモデルケースとして、これらの手法を放線菌由来カリウムイオンチャンネル KcsA を対象とした動作機構の解析に適用した。KcsA は 160 残基からなるポリペプチド鎖が対称な 4 量体を形成し、細胞内 pH に応答して開閉するカリウムチャンネルである。中性では巨視的電流が観測されない closed 状態をとるが、pH 5 以下の酸性刺激を与えると、一過性のピーク電流を示した後 1-3 秒にて減衰し、ピーク電流の 15 % 程度の電流を流す open 状態に達する (図 51)。また、単一チャンネル解析の結果から、open 状態では K^+ を透過する permeable 状態と、透過しない impermeable 状態の間の平衡にあることが示唆されている (図 51)。これらの電気生理活性の特徴は真核生物の膜電位の制御に関わる電位依存性カリウムチャンネル (Kv) にも共通しており、KcsA をプロトタイプとしてカリウムチャンネルの分子機構を理解することは、生命現象を理解する上で重要である。

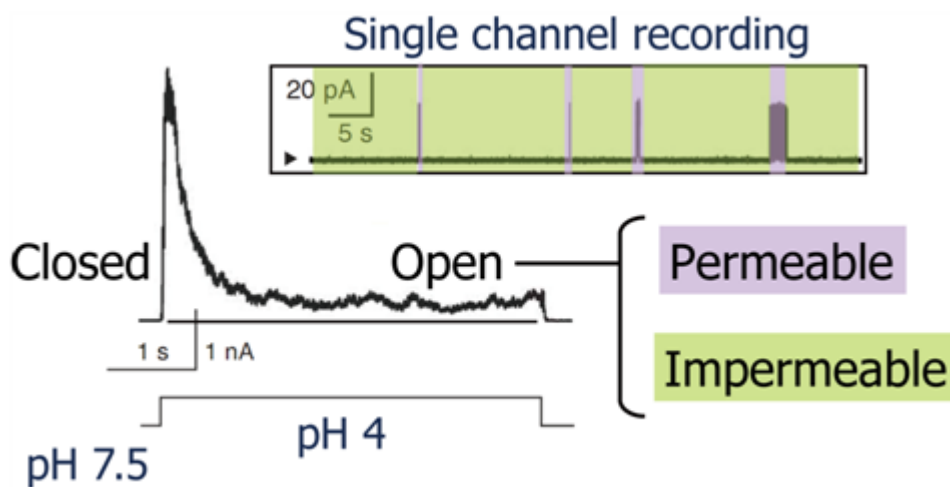


図 51 KcsA の電気生理解析

(左下) 巨視的電流。縦軸は電流、横軸は時間を表す。中性では K^+ を透過しない closed 状態にあるが、酸性刺激により一過性のピーク電流を流し、その後数秒で減衰し定常状態 (open 状態) に達する。

(右上) 単一チャンネル電流。個々の KcsA は酸性条件下において電流を通す permeable 状態と通さない impermeable 状態の間の動的平衡にある。

これまでに、closed 状態を取る中性での KcsA の結晶構造が明らかとされ、膜貫通領域に形成される K^+ 透過路上に K^+ の透過を阻む helix bundle crossing と、その選択性を担う selectivity filter の 2 つのイオンゲートが存在することが示されている (図 52)。また、変異体を用いた解析などから、open 状態では helix bundle crossing が開くことが示唆されており、当研究室での解析から pH センサーとして H25 が同定されている。酸性刺激の直後に観測されるピーク電流は、permeable 状態と impermeable 状態の間の平衡が permeable 状態から開始するためであると想定されるが、その構造機構は不明であった。

そこで本研究では、高分解能での解析が可能なミセル再構成状態にて、(1) permeable 状態と impermeable 状態を区別する構造的要因は何か、(2) なぜ helix bundle crossing が開いているにもかかわらず impermeable 状態において K^+ が透過しないのか、(3) permeable 状態と impermeable 状態の間の平衡はなぜ permeable 状態から開始するのか、というカリウムチャンネルの動作機構を理解する上で重要な 3 つの問題を解明することを目的とした。さらに、KcsA を rHDL に再構成することによって、KcsA の不活性化速度を規定する permeable 状態と impermeable 状態の間の構造平衡に膜環境が及ぼす影響について解析した。

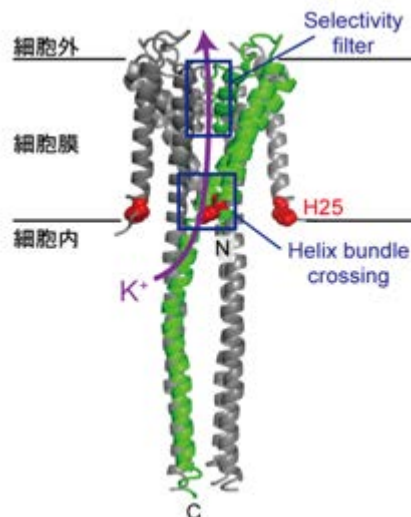


図 52 Closed 状態 KcsA の結晶構造 (PDB ID: 3EFF)

KcsA は対象な 4 量体を取り、その中央に K⁺透過路を有する。K⁺透過路上には Selectivity filter と helix bundle crossing と呼ばれる 2 つの構造モチーフが存在し、K⁺透過性を制御している。

メチル選択的安定同位体標識を施した KcsA の調製

Leu, Val, Ile のメチル基を選択的に ¹H, ¹³C 標識し、その他を重水素化した KcsA は、対応する安定同位体標識を施した 2-ケト酪酸および 2-ケトイソ吉草酸を前駆体として、重水素化最小培地中、大腸菌発現系にて N 末端に His タグを付加させたコンストラクトとして発現させた。誘導後の菌体を遠心にて回収し超音波破碎した後、界面活性剤ドデシルマルトシド (n-dodecyl-β-D-maltoside, DDM) にて可溶化し、Ni-NTA レジンを用いて精製した。精製後の KcsA は HRV-3C プロテアーゼによる限定分解にて His タグを除去し、再度 Ni-NTA レジンを通過させて最終精製サンプルとした。

KcsA の rHDL への再構成

rHDL を取り囲む membrane scaffold protein 1 (MSP1) は、大腸菌発現系にて N 末端に His タグを付加したコンストラクトとして発現させた。誘導後の菌体を遠心にて回収、超音波破碎した後、不溶画分を Triton-X100 にて可溶化して Ni-NTA レジンにて精製した。得られた MSP1 の His タグを TEV プロテアーゼによる限定分解にて除去し、再度 Ni-NTA レジンを通過させて最終精製サンプルとした。

KcsA の rHDL への再構成は、MSP1, dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC), DDM ミセル再構成状態の KcsA を混合した後、DDM を Biobeads[®]にて除去することで行った。再構成後のサンプルはサイズ排除クロマトグラフィーにて精製し、NMR 測定に用いた。

NMR 測定

NMR 測定は磁場強度 800 MHz の分光器とクライオプローブを用いて行った。メチル TROSY スペクトルは磁場勾配による磁化選択を組み込んだ ¹H-¹³C HMQC スペクトルとして測定し、¹³C_{zz} exchange スペクトルは ¹⁵N について報告されているものを ¹³C 用書き換えて測定した。測定結果から、多変数非線形最小二乗法を用いて各パラメータに対するフィッティングを行い、得られた値の誤差をモンテカルロ法にて推定した。

電気生理解析

単一チャンネル解析は、DDM ミセル再構成状態として精製した KcsA を 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine (POPE) :

1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphoglycerol (POPG) = 3 : 1 のリポソームに再構成した後、同一の脂質組成を有する平面膜に再構成して行った。Cis 側と trans 側のチャンバーの pH をそれぞれ 7.5, 4.0 とし、cis 側に対して trans 側が +200mV となるように電圧を印加して電流を観測した。解析には pCLAMP ソフトウェアを用いた。

ミセル再構成状態における解析

(KcsA のメチル TROSY スペクトル)

最初に、DDM ミセルに再構成した KcsA のメチル TROSY スペクトルを、45°C、120 mM K⁺存在下、pH 6.7 および 3.2 にて測定した (図 53)。スペクトル中には KcsA のメチル基由来の NMR シグナルが十分な強度および分散にて観測され、精製したサンプルが一定の立体構造を保持していることが確認された。各 NMR シグナルがどのメチル基に由来するかを帰属するため、KcsA 中に存在する 24 残基の Leu を Ile に、16 残基の Val を Ile に、3 残基の Ile を Val にそれぞれ置換した 43 種類の変異体を調製し、pH 6.7 および 3.2 にてメチル TROSY スペクトルを測定した。これらのスペクトルを野生型と比較することによって、観測対象となる 83 個のメチル基のうち、pH 6.7 において 61 個の、pH 3.2 において 66 個のシグナルを帰属することに成功した (図 53A, B)。興味深いことに、酸性条件下において、一部のシグナルの近傍に強度の弱いマイナーシグナルが観測された。両状態間の化学交換を確認する ¹H-¹H EXSY スペクトルを測定したところ、両状態の交換を示す交差ピークが確認され、KcsA が酸性条件下において 2 つのコンフォメーション間の平衡状態にあることが示された (図 53C)。

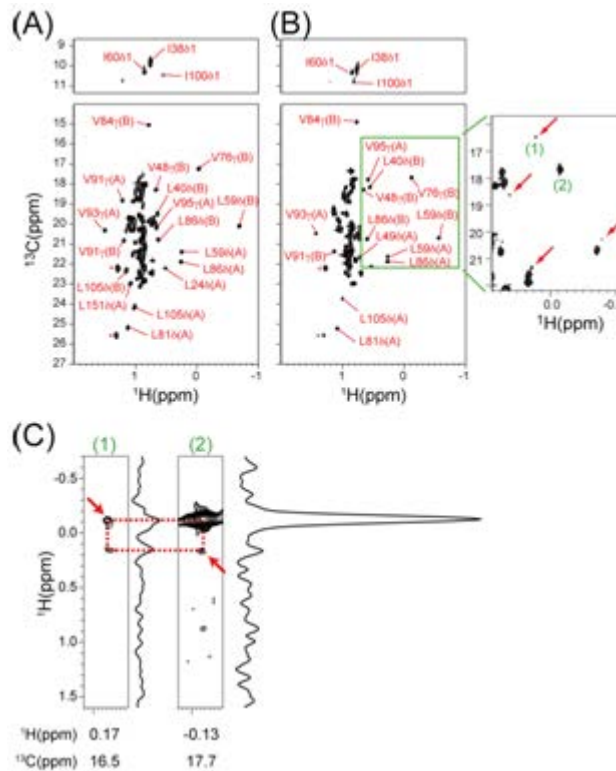


図 53 KcsA のメチル TROSY スペクトル

120 mM K⁺, 45°C における、(A) closed 状態を取る pH 6.7, (B) open 状態を取る pH 3.2 におけるスペクトル。アスタリスクは DDM に由来するシグナルを示す。pH 3.2 においては、マイナーシグナルが観測された (B 右、赤矢印)。このマイナーシグナルとメジャーシグナルとが化学交換することは、¹H-¹H EXSY スペクトルにより確認された (C)。

(酸性条件下における 2 状態間平衡の検出)

酸性条件下において観測されたこれら 2 つのコンフォメーションが permeable 状態と impermeable 状態に対応するのではないかと考え、変異体を用いてこれを検証することとした。これに先立ち、測定条件を電気生理解析と合わせるために温度を pH 3.2 にて温度を 45°C から 5°C 刻みで低下させたところ、45°C で観測されたマイナーシグナルの強度は測定温度の減少とともに増大し、30°C ではメジャーシグナルと同程度となり、25°C では逆転した (図 54A)。この結果は、酸性条件下における構造平衡に強い温度依存性があることを示している。

次に、報告された電気生理解析が行われた 25°C において、野生型と E71A, Y82A 両変異体のスペクトルを比較した。E71A 変異体は開確率がほぼ 100% でほぼ permeable 状態のみを取る変異体、Y82A 変異体は開確率が 3% でほぼ impermeable 状態のみを取る変異体である。これら変異体のメチル TROSY スペクトルを野生型と比較した結果、2 つのコンフォメーションの存在比がそれぞれの開確率と対応したことから、これらがそれぞれ permeable 状態と impermeable 状態に対応することが強く支持された (図

54B)。以上の解析により、pH および温度を変化させることによって、closed 状態、permeable 状態、impermeable 状態に対応するメチル TROSY スペクトルをそれぞれ選択的に観測できることが明らかとなった (図 54C)。

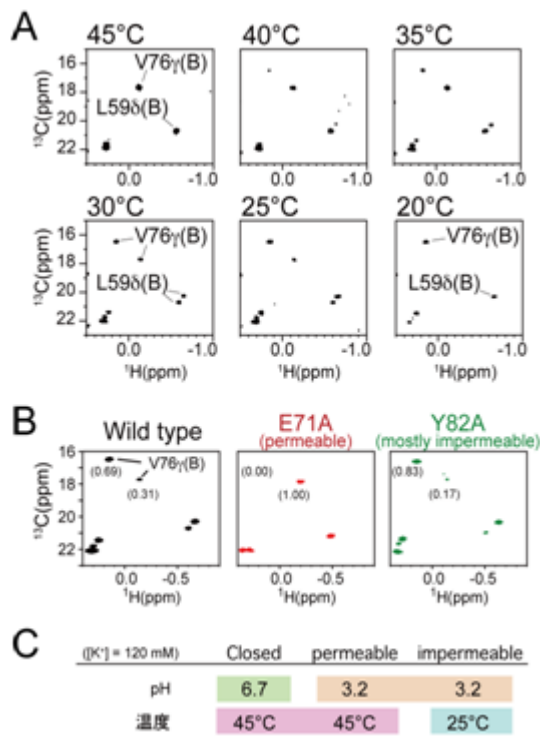


図 54 酸性条件下における動的平衡の解析

(A) メチル TROSY スペクトルの温度依存性。pH 3.2, 120 mM K⁺存在下、温度を 45, 40, 35, 30, 25, 20°C と変化させて測定したメチル TROSY スペクトル。温度低下にもなると平衡にある 2 つのシグナルの強度比が変化する。
 (B) pH 3.2, 25°C, 120 mM K⁺存在下におけるメチル TROSY。野生型、E71A 変異体、Y82A 変異体を比較した。2 状態のシグナル強度比は、各コンストラクトの開確率に対応して変化した。
 (C) NMR 解析から明らかとなった、各状態を選択的に観測するための条件。120 mM K⁺存在下において、pH と温度を変化させる事によって各状態を選択的に観測することができる。

(化学シフト変化を指標とした各状態間の構造変化部位の同定)

以上の解析から、closed, permeable, impermeable の各状態を選択的に観測できる条件が明らかとなったため、各状態におけるメチルシグナルの化学シフトを比較し、各状態において KcsA のどの部位の構造が異なるのかを解析した。

まず、45°C, 120 mM K⁺存在下において、closed 状態に対応する pH 6.7 と permeable 状態に対応する pH 3.2 の化学シフトを比較した (図 55A, B)。0.2 ppm より大きな化学シフト変化を示したものの多くはいずれも酸性残基から 10 Å 程度以上離れて存在しており、観測された化学シフト変化は隣接する残基のプロトン化ではなく、構造変化を反映していると考えるのが妥当である。L24, V95, L105 は helix bundle crossing の近傍に存在する残基であり、これらに大きな化学シフト変化が観測されたことは、closed 状態から permeable 状態への移行に伴って helix bundle crossing が開くというこれまでの知見と矛盾しない。一方で L59, V70, V76 は selectivity filter またはその近傍に存在する残基であり、closed 状態から permeable 状態への移行に伴ってこの領域にも構造変化が起きることを示している。

次に、120 mM K⁺存在下、45°Cにて pH 滴定実験を行い、closed 状態と permeable 状態の構造平衡の pH 依存性を解析した (図 55C)。その結果、膜貫通領域に存在するシグナルの、closed 状態と permeable 状態のポピュレーションは、pH 5.0 でほぼ等しくなることが明らかとなった。この結果は、電気生理解析から求められた KcsA の活性化の pH 依存性と対応し、DDM ミセル中に再構成された KcsA が脂質膜中と同等の機能を保持していることを示している。

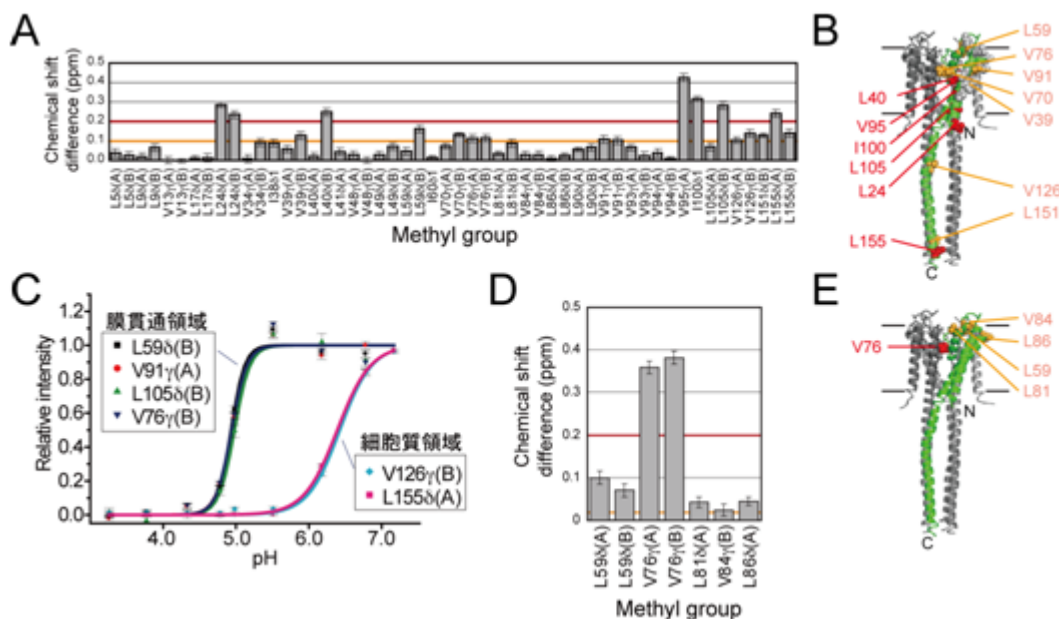


図 55 化学シフト変化量の解析

(A, B) Closed 状態と permeable 状態の化学シフト差のプロットおよび結晶構造上へのマッピング。0.2 ppm 以上の大きな化学シフト差が見られた残基を赤で、0.1-0.2ppm の化学シフト変化が見られた残基をオレンジでマッピングした。(C) pH 滴定実験の結果。45°C, 120 mM K⁺存在下において pH を変化させた際の closed 状態のシグナル強度を pH に対してプロットした。膜貫通領域の化学シフト変化は協同的に起こり、pH 5 において closed 状態と permeable 状態のポピュレーションがほぼ等しくなった。(D, E) Permeable 状態と impermeable 状態の化学シフト差のプロットおよび結晶構造上へのマッピング。0.2 ppm 以上の大きな化学シフト差が見られた残基を赤で、0.02-0.2ppm の化学シフト変化が見られた残基をオレンジでマッピングした。

次に、pH 3.2, 120 mM K⁺存在下にて、permeable 状態に対応する 45°C と impermeable 状態に対応する 25°C における化学シフトを比較した (図 55D, E)。両状態で帰属が得られたメチル基のうち、0.2 ppm 以上の化学シフト差が観測されたのは selectivity filter を構成する V76 のみであった。化学シフト差が 0.2 ppm 以下のメチル基も selectivity filter の近傍に集中しており、permeable 状態と impermeable 状態の間で主に selectivity filter の構造が異なることが示された。

(K⁺滴定実験と H₂O との NOE 検出)

前節の解析より、KcsA が取る 3 つの状態において selectivity filter の構造が異なることが示された。中性での結晶構造解析より、closed 状態において selectivity filter が K⁺ と相互作用することが明らかとされていることから、各状態における selectivity filter と K⁺ との相互作用について調べることにした (図 56)。

最初に、pH 3.2, 45°C において K⁺濃度を変化させてメチル TROSY スペクトルを測定した。その結果、K⁺非存在下では impermeable 状態に対応するシグナルのみが観測され、K⁺濃度が増大すると impermeable 状態のシグナルが減弱、permeable 状態のシグナルが出現することが明らかとなった (図 56A)。この結果は、permeable 状態と impermeable 状態がそれぞれ酸性条件下において selectivity filter に K⁺ が結合した状態と解離した状態に対応することを示している。さらに、K⁺濃度に対する両状態のポピュレーションから open 状態における見かけの解離定数を計算したところ、30 mM と算出された (図 56B)。

次に、pH 6.7, 45°C において K⁺濃度を変化させてメチル TROSY スペクトルを測定した。K⁺濃度に対する K⁺結合状態のシグナル強度を解析した結果、closed 状態における見かけの解離定数は 3 mM と算出された (図 56B)。以上の結果は、open 状態において、selectivity filter の K⁺に対する親和性が closed 状態より 10 倍程度減弱することを示している。

Impermeable 状態において K⁺を失った selectivity filter の内部は、真空状態ではなく、代わりに何かを取り込むはずである。我々はそれが水分子ではないかと考え、selectivity filter に存在する V76 のメチル基と水分子との間の NOE シグナルの検出を試みた。Closed, permeable, impermeable の各状態において

軽水中で NOESY スペクトルを取得した結果、impermeable 状態においてのみ V76 と水分子との間に NOE が観測された。この結果は impermeable 状態において selectivity filter 近傍に 300 ps 以上留まる水分子が存在することを示しており、我々の仮説を強く裏付けるものである。

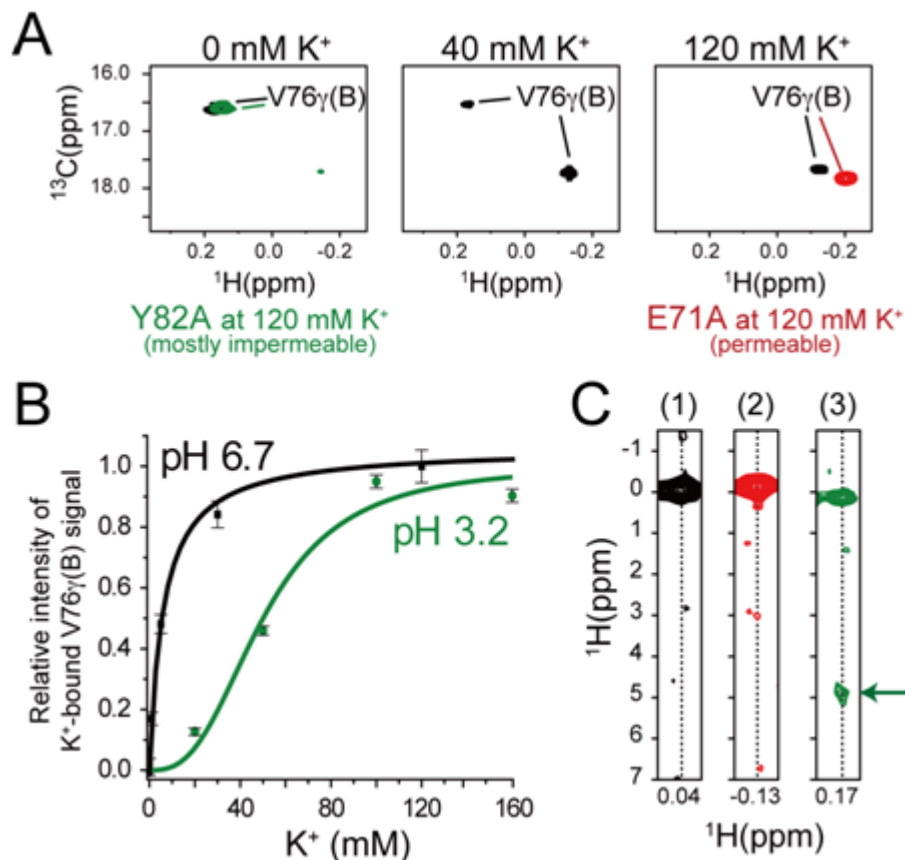


図 56 Selectivity filter と K⁺, H₂O との相互作用解析

- (A) pH 3.2, 45°C における K⁺ 滴定実験。K⁺ 非存在下におけるシグナルは impermeable 状態のシグナルと、120mM K⁺ 存在下のシグナルは permeable 状態のシグナルと一致したことから、両状態がそれぞれ K⁺ 非結合状態と結合状態に対応することが明らかとなった。
- (B) 中性および酸性条件下における K⁺ 親和性の比較。pH 6.7 における解離定数は 3 mM, pH 3.2 における解離定数は 30 mM と算出され、酸性条件下においては親和性が 10 倍程度減少することが明らかとなった。
- (C) 各状態における H₂O との NOE 検出。Closed, permeable, impermeable の各状態において selectivity filter に存在する V76 と H₂O との NOE の検出を試みた結果、impermeable 状態においてのみ NOE シグナルが観測された(緑矢印)。

(KcsA の機能発現の分子機構)

以上の知見を統合すると、KcsA の巨視的電流、すなわち刺激による一過性のピーク電流とその後の減衰は、次のように説明できる (図 57)。Closed 状態では selectivity filter は K⁺ に結合しているため、H25 への H⁺ 付加により helix bundle crossing が開く瞬間には、K⁺ が結合したままの permeable 状態に選択的に移行する。このため、全ての KcsA は一斉に helix bundle crossing と selectivity filter を開口し、最大 K⁺ 電流を生じる。また、酸性条件下においては、K⁺ の親和性の低下により、selectivity filter から次第に K⁺ が解離して水が結合した impermeable 状態の割合が増大し、秒のオーダーで定常状態に達する。冒頭で述べた機能および構造上の類似性から、感受する刺激は異なるものの、この機構は哺乳動物の神経細胞に存在し活動電位の制御を担う Kv チャネルにも適用可能である。

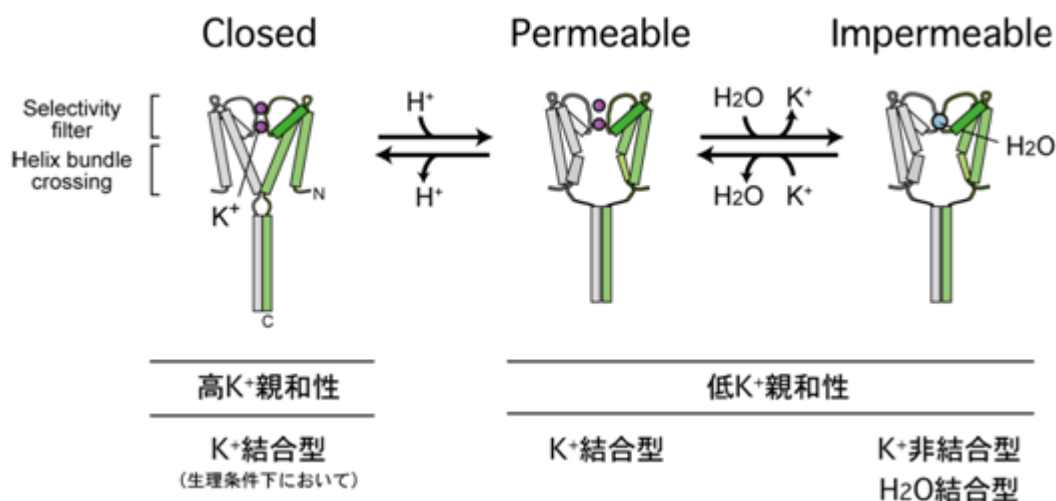


図 57 KcsA の動作機構

本研究より明らかとなった、KcsA の動作機構を模式的に表した。

4 量体の不安定性が構造平衡に及ぼす影響の解析

(C 末端細胞内領域欠失による 4 量体の不安定化と permeable 状態のポピュレーション変化)

以上で明らかとなった不活性化の分子機構より、不活性化の速度および定常状態電流の強さは、permeable 状態と impermeable 状態の間の構造平衡の遷移速度によって規定されることが示された。そこで次に、両状態間の構造平衡がどのような因子の影響を受けるのかを解析することとした。

カリウムチャネルと同様の 4 量体を取ることが知られている原核生物由来ナトリウムチャネル NavSulP では、4 量体の会合を弱めるような変異導入によって不活性化速度が増大することが示唆されている。このことと上述の研究結果を合わせ、我々は permeable 状態と impermeable 状態の間の構造平衡に 4 量体の安定性が関係していると考えた。KcsA の細胞内領域を切除すると、膜貫通領域の構造には大きな変化を及ぼさないものの、その不活性化速度が増大することが知られている。そこで、細胞内領域の切除に伴って酸性条件下での 4 量体安定性が変化するのか、するのであればその時同時に permeable 状態と impermeable 状態の構造平衡に変化が見られるかを調べた。

最初に、細胞内領域の長さを様々に変化させたコンストラクト KcsA134, KcsA132, KcsA130, KcsA128, KcsA125 (数字はそれぞれ残基数を表す) を調製し、全長 KcsA (KcsA160) と共に熱安定性を SDS-PAGE にて比較した。その結果、細胞内領域の鎖長を変化させることによって 4 量体の熱安定性が変化することが明らかとなった (図 58)。次に、これらのコンストラクトのメチル TROSY スペクトルを pH 3.2, 50 mM K⁺ 存在下、40°C にて測定した (図 59)。その結果、selectivity filter の V76 のシグナルの化学シフトは、細胞内領域の切断によって permeable, impermeable 状態ともに変化しなかったものの、両状態のポピュレーションは大きく異なることが明らかとなった。4 量体の熱安定性と permeable 状態のポピュレーションの相関を取ったところ、4 量体が安定なコンストラクトほど permeable 状態のポピュレーションが大きいことが明らかとなり、4 量体の安定性が酸性条件下における構造平衡と関係することが示唆された (図 60)。

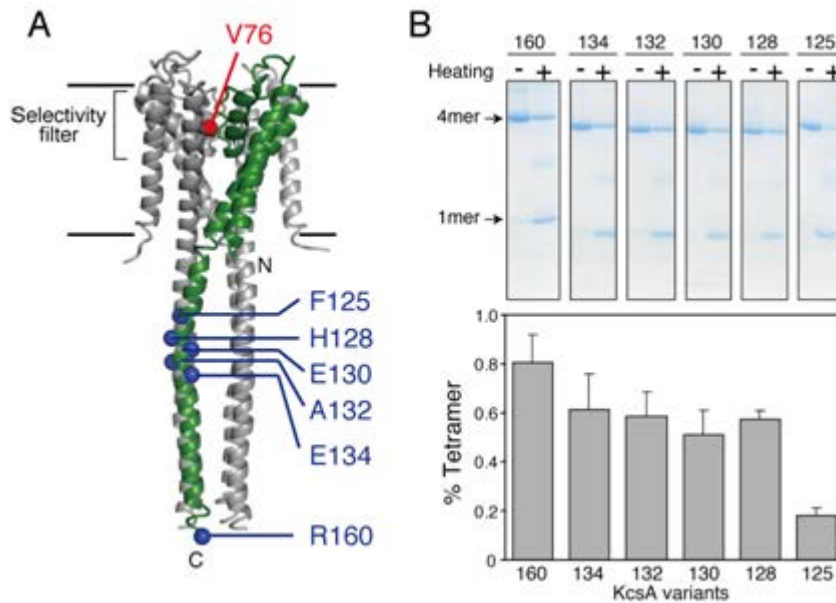


図 58 細胞内領域の欠失と 4 量体安定性の変化

(A) 細胞内領域を欠失したコンストラクトの作成。細胞内領域の各残基を終止コドンに置換した変異体を調製し、細胞内領域が短くなったコンストラクトを調製した。
 (B) 各コンストラクトの 4 量体の熱安定性の比較。各コンストラクトを pH 3.2, 90°C にて 10 分間加熱し、その 4 量体安定性を SDS-PAGE にて比較した (上)。4 量体に対応するバンドが加熱後にどれだけ保持されているかを比色定量し、4 量体の安定性としてプロットした (下)。

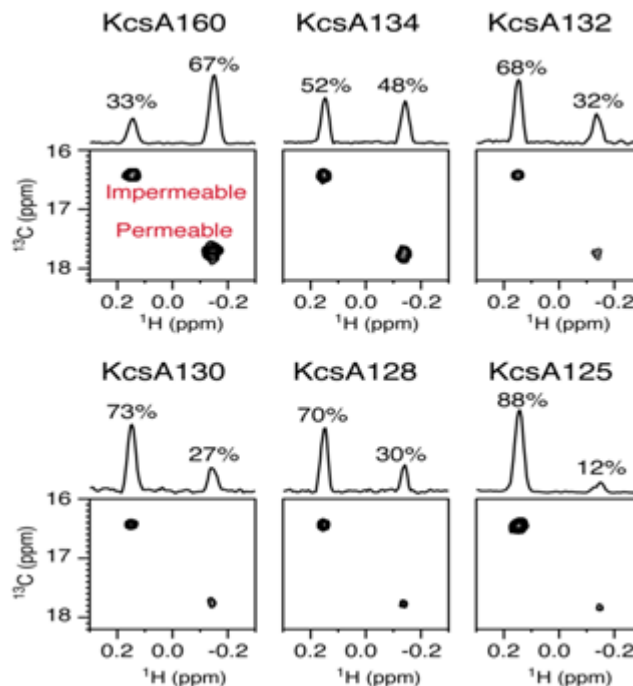


図 59 細胞内領域の欠失と permeable 状態のポピュレーション変化

全長 KcsA (KcsA160) および細胞内領域欠失コンストラクト KcsA134, KcsA132, KcsA130, KcsA128, KcsA125 のメチル TROSY スペクトルを pH 3.2, 40°C, 50 mM K⁺ 存在下にて測定し、selectivity filter に存在する V76 のシグナルを比較した。Permeable 状態と impermeable 状態のポピュレーションはコンストラクトによって異なることが明らかとなった。

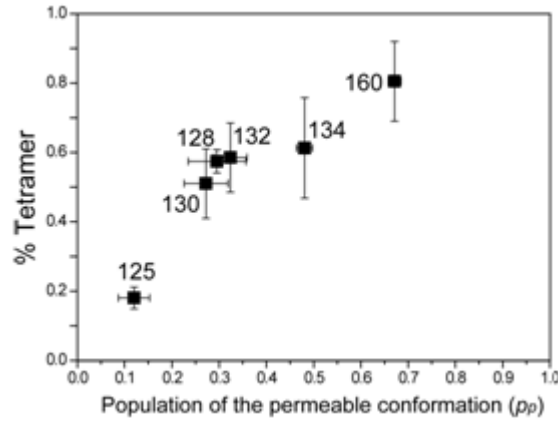


図 60 Permeable 状態ポピュレーションは 4 量体の安定性と相関する

細胞内領域欠失コンストラクトの 4 量体安定性 (Fig. 9) と permeable 状態のポピュレーション (図 59) の相関プロット。相関係数 R2 は 0.82 であり、4 量体が安定なコンストラクトほど permeable 状態のポピュレーションが大きい傾向が示された。

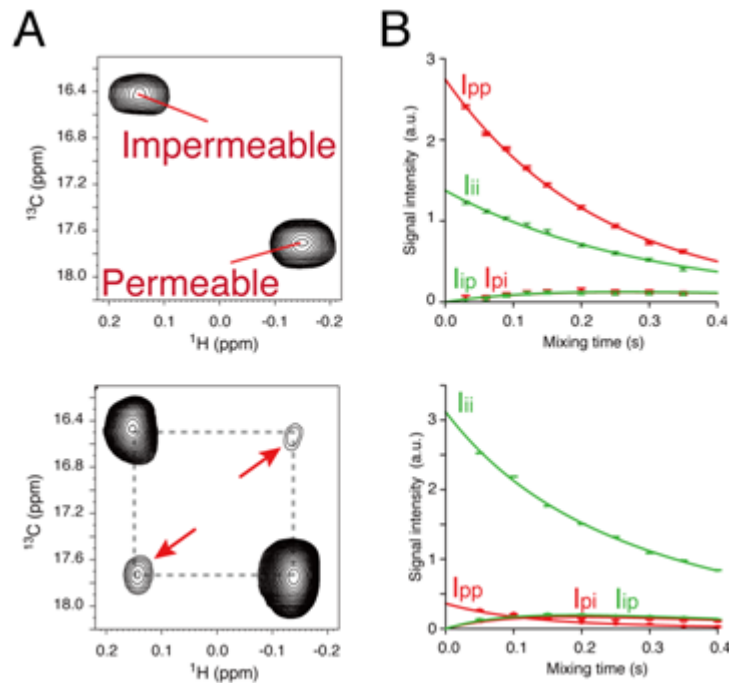


図 61 $^{13}\text{C}_{zz}$ exchange 解析

(A) pH 3.2, 40°C, 50mM K+存在下における KcsA160 のメチル TROSY スペクトル (上) および $^{13}\text{C}_{zz}$ exchange スペクトル (下)。 $^{13}\text{C}_{zz}$ exchange スペクトルにおいては、permeable 状態と impermeable 状態間の交換を示す交差ピーク (矢印) が観測された。

(B) フィッティングによる交換速度の決定。混合時間を様々に変更した際のピーク強度の変化を理論式に対してフィッティングした結果を実践で示した。

前節にて、C 末端細胞質領域の欠失によって permeable 状態のポピュレーションが減少することが明らかとなった。このことは、C 末端細胞質領域の欠失により permeable 状態が不安定化する可能性、impermeable 状態が安定化する可能性、あるいはその両方が同時に起きている可能性を示す。そこで次に、 $^{13}\text{C}_{zz}$ exchange 解析を行い、permeable 状態から impermeable 状態への遷移速度定数 k_{pi} と impermeable 状態から permeable 状態への遷移速度定数 k_{ip} を、KcsA160 と KcsA125 で比較した (図 61)。その結果、pH 3.2, 50mM K+, 40°Cにおいて、KcsA160 の k_{pi} は $0.46 \pm 0.02 \text{ s}^{-1}$, k_{ip} は $0.94 \pm 0.04 \text{ s}^{-1}$, KcsA125 の k_{pi} は $7.1 \pm 0.1 \text{ s}^{-1}$, k_{ip} は $0.96 \pm 0.02 \text{ s}^{-1}$ と算出され、 k_{ip} は KcsA160 と KcsA125 で同程度であるものの、 k_{pi} は KcsA125 の方が KcsA160 の 10 倍以上大きいことが明らかとなった。遷移速度定数は各状態への平均滞在時間の逆数であるから、この結果は KcsA125 では KcsA160 より permeable 状態の安

定性が低いことを示しており、C 末端細胞内領域の切除によって permeable 状態が選択的に不安定化されることが明らかとなった。前節の 4 量体安定性との相関 (図 60) と合わせて考えると、この結果は、open 状態において 4 量体が安定な状態が permeable 状態、不安定な状態が impermeable 状態であることを示唆する。

膜環境が構造平衡に及ぼす影響の解析

(rHDL とミセル中でのメチル TROSY スペクトルの比較)

次に、KcsA を取り巻く膜環境が open 状態における構造平衡に及ぼす影響を解析した。まず、KcsA を rHDL に再構成してそのメチル TROSY スペクトルを DDM ミセル再構成状態のものと比較した (図 62)。その結果、両状態のスペクトルは膜貫通領域全体にわたって化学シフトがわずかに異なり、DDM ミセル中の構造は脂質膜中での構造を良く模倣しているものの、膜貫通領域についてはわずかながら構造変化があることが示唆された。一方で、rHDL 中と DDM ミセル中の最も大きな違いは permeable 状態と impermeable 状態のポピュレーションに現れ、rHDL 中では DDM ミセル中より permeable 状態のポピュレーションが小さいことが明らかとなった (図 62)。この結果は、膜環境の違いによって KcsA の動的平衡が影響を受けることを示している。

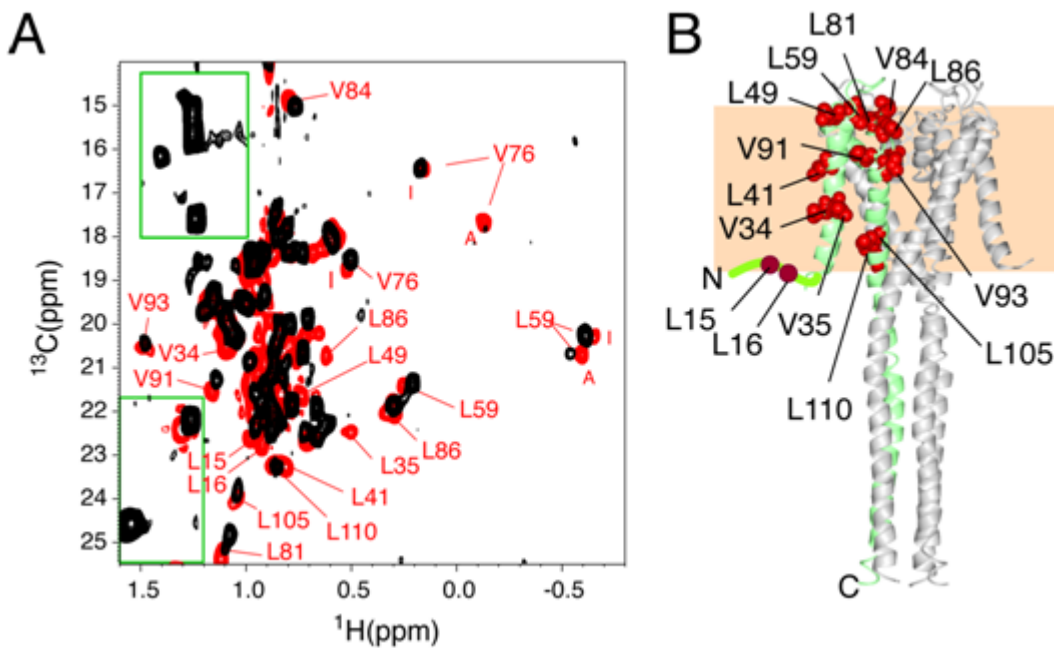


図 62 rHDL と DDM ミセルのメチル TROSY スペクトルの比較

(A) pH 3.2, 200 mM K⁺存在下における、DDM ミセル (25°C, 赤) と rHDL (45°C, 黒) のメチル TROSY スペクトル。両者は全体的にはよく一致したが、わずかながら化学シフト変化が見られたシグナルも多い。緑枠内のシグナルは脂質分子または DDM 由来である。

(B) rHDL 再構成状態と DDM ミセル再構成状態で化学シフト変化が見られた残基のマッピング。化学シフト変化が見られた残基は膜貫通領域全体に広く分布した。

(2,2,2-trifluoroethanol (TFE) による膜環境の擾乱が構造平衡に及ぼす影響)

次に、膜環境の変化が KcsA の構造平衡に及ぼす影響をさらに詳細に解析することを目的として、2,2,2-trifluoroethanol (TFE, 図 63A) の滴定実験を行った。TFE は短鎖アルコールの 1 種であり、脂質膜に分配して KcsA の 4 量体を不安定化させることが知られている。また、TFE を含むハロゲン化アルコールは膜に分配してイオンチャネルの機能を変調することによって麻酔作用を示すことが示唆されており、TFE が KcsA に及ぼす影響を解析することは、麻酔薬の作用機序の解明にも役立つと期待される。

rHDL に再構成した KcsA に対し、TFE を 0, 1, 2, 3, 4% 加えてメチル TROSY スペクトルを測定した。その結果、2% までは impermeable 状態のポピュレーションの低下と permeable 状態のポピュレーションの増大が観測された。さらに興味深いことに、3, 4% TFE 存在下では impermeable 状態が完全に消失し、

酸性条件であるにもかかわらず closed 状態に対応するシグナルが出現した (図 63B)。この結果は、TFE の脂質膜への分配に伴う膜環境の変化によって KcsA の構造平衡がシフトすることを明確に示すものである。

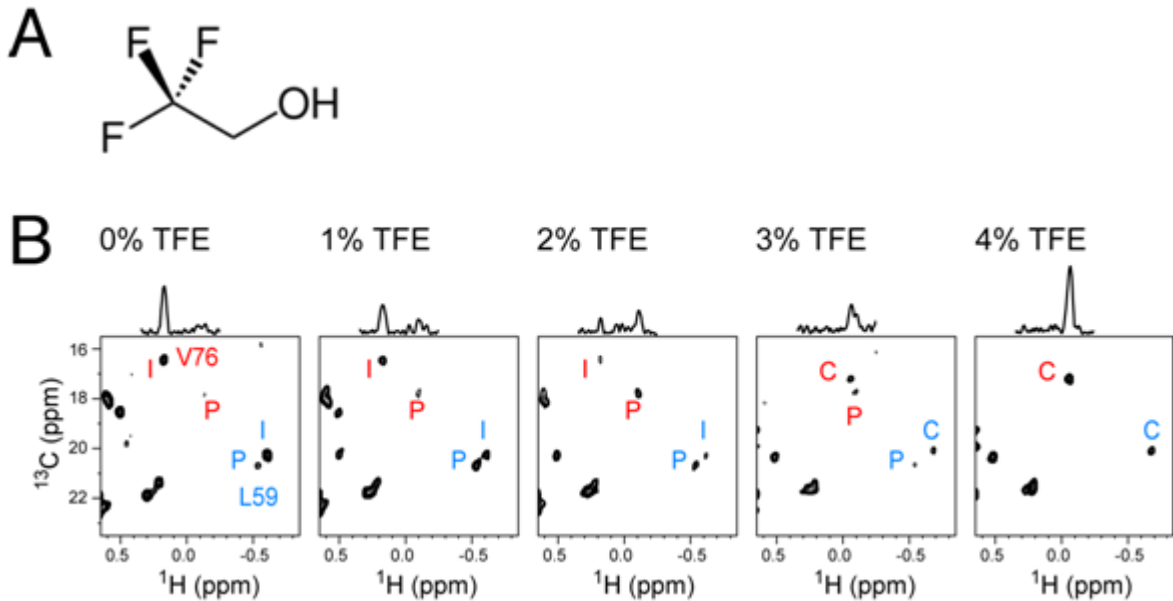


図 63 TFE 滴定実験

(A) TFE の分子構造

(B) pH 3.2, 45°C, 200 mM K⁺存在下における、rHDL 再構成状態 KcsA に対する TFE 滴定実験の結果。TFE 濃度の上昇とともに、構造平衡が impermeable 状態 (I) から permeable 状態 (P)、さらには closed 状態 (C) に移行する様子が観測された。

(TFE が KcsA のチャネル活性に及ぼす影響)

NMR にて観測された TFE による構造平衡のシフトが、脂質二重膜中でのチャネル活性を正しく反映したものであることを確認するため、単一チャネル解析による開確率の解析を行った。KcsA を再構成した平面膜に +200mV の膜電位を印加し、カリウムの透過に伴う電流を観測した結果、TFE 濃度の増大に伴って開確率が增大することが明らかとなった (図 64)。高濃度 TFE 存在下での平面膜の不安定性のため 3% より高い TFE 濃度での解析は行えず、closed 状態への移行を反映した開確率の低下を観測することはできなかったものの、TFE の添加に伴って permeable 状態のポピュレーションが増え開確率が增大するという、NMR 解析より予想された通りの結果が観測された。このことは、rHDL 中で行った NMR 解析が脂質二重膜中でのチャネル活性を正しく反映したものであることを強く支持する。

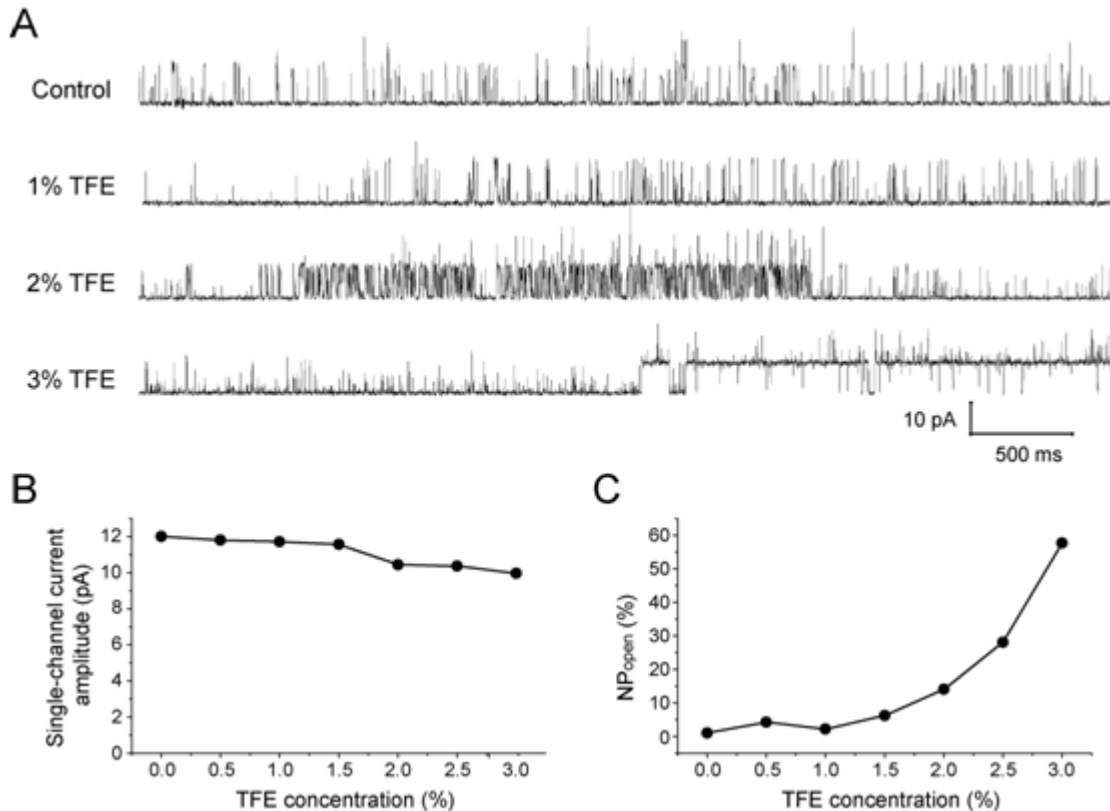


図 64 KcsA の単一チャネルプロファイルの TFE 依存性解析

- (A) KcsA の単一チャネルプロファイル。縦軸は電流値、横軸は経過時間を示す。TFE 濃度を増大するのにもなって K⁺ を透過する permeable 状態が増大する。
 (B) 単一チャネルの電流値の TFE 濃度に対するプロット。電流値は TFE 濃度によって大きくは変化せず、TFE が KcsA の構造そのものに及ぼす影響は小さいことが示唆された。
 (C) 開確率 (NP_{open}) の TFE 濃度に対するプロット。TFE 濃度の上昇に伴って開確率が増大することが示された。

本研究においては、高分子量タンパク質の観測に適したメチル TROSY 法と、膜タンパク質を脂質二重膜中に再構成した状態で可溶化できる rHDL という 2 つの手法を用いて、放線菌由来カリウムチャネルである KcsA の NMR 解析を行った。

DDM ミセル再構成状態では、高感度かつ高分解能のメチル TROSY スペクトルが得られた (図 53)。観測された NMR シグナルをタンパク質中の各メチル基に帰属するためには、変異体による解析が一般に用いられるが、多種類のサンプルを大量に調製する必要があるため、感度の高い DDM ミセル中での解析が有効であった。また、分子全体を対象とした構造変化の解析 (図 55) には、より多くのシグナルが分離して観測される DDM ミセルでの解析が必要であった。さらに、¹³C_z exchange 実験のような運動性解析 (図 61) も、感度が高く正確にシグナル強度が定量できる DDM ミセルでなくては困難であった。

以上の DDM ミセルにおける解析の妥当性は、観測されたスペクトルが rHDL 中でのスペクトルとよく一致したことから担保された。rHDL 中で得られたスペクトルは DDM ミセルと比較すると感度および分解能の点では劣るものの、それ自身十分に解析可能な質のものであり、rHDL は単にミセルと比較するためだけではなく、生体内により近い環境での解析を行うために有効であった (図 62, 63)。GPCR などの一部の膜タンパク質はミセル再構成状態では不安定であることが知られているが、rHDL 中では安定性が向上することがある。このような場合においては、rHDL 再構成状態での膜タンパク質の NMR 解析が十分可能であり、有力な解析手段となるであろう。

本研究からは、カリウムチャネルの機能発現の分子機構 (図 57) が明らかとなった上、運動性の解析から 4 量体の安定性と脂質膜環境がその機能を変調する因子であることを見出すことにまで成功した (図 60, 63)。この結果は、4 量体を安定化または不安定化させるような化合物や脂質二重膜に分配する化合物によって、カリウムチャネルの構造平衡をシフトさせることが可能であることを示している。現在知られているチャネル作動薬のほとんどは、イオン透過路や膜電位を感受するセンサードメ

インなどの機能上重要な部位に直接結合してその活性を変化させる。これに対し本研究の成果は、構造平衡をシフトさせることにより機能を制御するという作用機序をもつ、全く新しいタイプのチャネル作動薬の開発に指針を与えるものである。このような作用機序を有するチャネル作動薬は、機能上重要な部位に直接影響を与えず、構造平衡のみを間接的かつ連続的にシフトさせるため、より副作用が小さく、細かい薬効調節が可能なものとなると期待される。

以上のように、メチル TROSY 法と rHDL を組み合わせた NMR 解析によって、膜タンパク質の構造と運動性に関する情報を得られることが示された。冒頭で述べたように、このような情報は他の手法では得られない NMR 法に独自のものであり、今後より多くの膜タンパク質の機能解析にこの手法が適用され、新薬創製の基盤となることが期待される。

⑤ $G\alpha_{i/o}$ による GIRK 制御の構造機構の解明 (東大分室)

G タンパク質 α サブユニット ($G\alpha$) は、結合する GDP を GTP に交換することにより、細胞膜上の GPCR へのリガンド刺激を細胞内のシグナルに変換する最初の段階を担う。GDP 結合型の $G\alpha$ は、G タンパク質 $\beta\gamma$ サブユニット ($G\beta\gamma$) とヘテロ三量体を形成しているが、GPCR へのリガンド刺激に伴い、GTP 結合状態となった $G\alpha$ は $G\beta\gamma$ を解離し、 $G\alpha$ と $G\beta\gamma$ のそれぞれが下流のエフェクターに結合して活性を制御する。

$G\beta\gamma$ のエフェクターの一つに、G 蛋白質共役型内向き整流性カリウムイオン (K^+) チャネル (G protein-activated inwardly rectifying potassium channel, GIRK) が知られている。GIRK は、内向き整流性 K^+ チャネル (Kir) ファミリーのひとつであり、心臓や脳に高発現し、心拍数の制御や抑制性の神経伝達などの機能を担う。生体内において、 K^+ は細胞内に高濃度 (~ 150 mM)、細胞外に低濃度 (~ 5 mM) と、膜内外において大きな濃度差が存在するため、GIRK の開口は、 K^+ を濃度勾配に従い細胞内から細胞外に流出させる。その結果、心拍数の低下が引き起こされる。GIRK の機能不全により、たとえば不整脈が誘発されることが知られている。このように、GIRK の正常な機能が、生体機能の維持に重要である。

GIRK は、哺乳類において、GIRK1, GIRK2, GIRK3 および GIRK4 という 4 つのサブタイプからなる。GIRK は、ムスカリン性アセチルコリン受容体 (mAChR) のサブタイプ 2 (m2AChR) など、 i/o ファミリーの $G\alpha$ ($G\alpha_{i/o}$) に共役した GPCR へのリガンド刺激に伴って、GTP 結合状態の $G\alpha_{i/o}$ から遊離した $G\beta\gamma$ が、GIRK の細胞内領域に結合する結果、開口が誘起され、 K^+ を透過する。一方で、 $G\alpha_{i/o}$ 上の GTP が、自身の GTPase 活性により加水分解され GDP 結合状態となると、 $G\beta\gamma$ と再び会合して GIRK から $G\beta\gamma$ を回収することにより、GIRK は閉口する (図 65)。 $G\beta\gamma$ の結合による GIRK の開口の構造機構については、当研究室の先行研究において、GIRK 細胞内領域と $G\beta\gamma$ との相互作用の構造生物学的な解析が行われており、GIRK 上の $G\beta\gamma$ 結合部位ならびに $G\beta\gamma$ の結合に伴う構造変化部位が明らかとなっている。

GIRK は、 $G\beta\gamma$ の結合・解離により開閉が制御される、 $G\beta\gamma$ のエフェクターである。一方で近年、以下に示すように、 $G\alpha_{i/o}$ は、活性化因子である $G\beta\gamma$ を解離・回収するドナーおよびアクセプターとしての役割だけでなく、GIRK と相互作用し、迅速なチャネルの開閉を達成する役割を担っている可能性が示唆されてきた。

GIRK の活性化において、チャネルの開口は GPCR の刺激から数百ミリ秒後と素早く起こり、刺激終了に伴うチャネルの閉口も迅速に起こる。例えば、m4AChR と GIRK を強制発現させた HEK (human embryonic kidney) 細胞にリガンド刺激を与えて GIRK 活性を調べた実験において、 $G\alpha_{i2}$ を共発現させることによって GIRK チャネルの閉口が促進されることが報告されており、 $G\alpha_{i/o}$ の存在により GIRK の閉口が促進されることが示された (図 66)。

上述の $G\alpha_{i/o}$ 共存下での GIRK 閉口の迅速化は、 $G\alpha_{i/o}$ と GIRK との直接の相互作用により担われていることが想定されている。両者の相互作用を示す知見として、免疫共沈実験やプルダウン実験により、 $G\alpha_{i/o}$ と GIRK との *in vivo*, *in vitro* における相互作用が報告されている。しかしながら、両者の相互作用様式は不明であり、GIRK の迅速な閉口のメカニズムは未解明であった。

そこで本研究では、GPCR へのリガンド刺激終了に伴う GIRK の閉口の迅速さを担う構造基盤を明らかにするため、GTP の非加水分解アナログである GTP γ S 結合状態の $G\alpha_{i3}$ ($G\alpha_{i3} \cdot GTP\gamma S$) と、GIRK 細胞内領域との相互作用を、NMR 法により解析した。

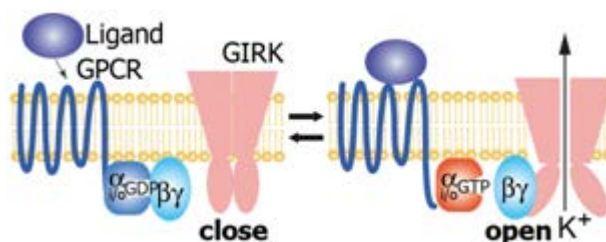


図 65 GIRK 開閉機構の模式図

m2AChR など、 $G_{\alpha_{i/o}}$ に共役した GPCR にリガンドが結合すると、細胞内で GPCR と共役した 3 量体 G 蛋白質 ($G_{\alpha_{i/o}\beta\gamma}$) が活性化され、 $G_{\alpha_{i/o}}$ において結合している GDP が GTP へと交換される。すると GTP 結合状態の $G_{\alpha_{i/o}}$ は $G\beta\gamma$ を解離し、遊離した $G\beta\gamma$ が GIRK の細胞内領域に結合することにより GIRK は開口する。やがて $G_{\alpha_{i/o}}$ の GTP が GDP に加水分解されると GDP 結合状態の $G_{\alpha_{i/o}}$ は $G\beta\gamma$ を回収し、GIRK が閉口する。

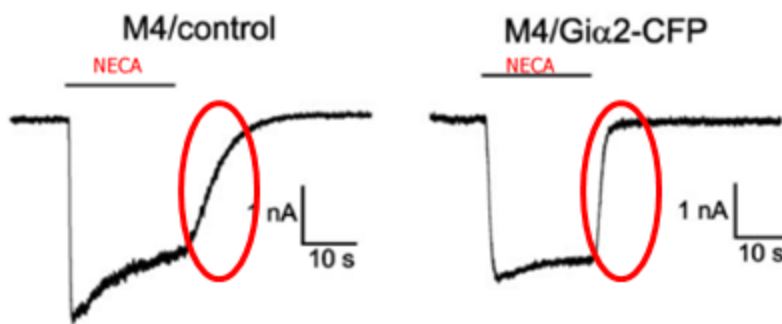


図 66 $G_{\alpha_{i2}}$ の共発現による GIRK チャンネル閉口の促進

HEK 細胞に m4AChR、GIRK1 および GIRK2 を共発現させ、 $G_{\alpha_{i2}}$ 非共発現下(左)および $G_{\alpha_{i2}}$ 共発現下(右)における GIRK 電流 (macroscopic 電流) を測定した。上部のバーは、GPCR 刺激 (m4AChR のリガンドである NECA (5'-(N-ethyl)carboxamido-adenosine)) を与えた期間を示している。NECA により M4 ACh 受容体を活性化すると、GIRK が開口して f を透過し、活性化電流が流れる。NECA を除去すると、GIRK は閉口し、徐々に透過する K^+ 量を減少させる。 $G_{\alpha_{i2}}$ の共発現によって、赤丸にて示したように、GIRK チャンネルの閉口が促進されている。

まず、 $G_{\alpha_{i3}} \cdot GTP\gamma S$ の主鎖アミドシグナルの帰属を確立し、 $G_{\alpha_{i3}} \cdot GTP\gamma S$ のアミノ酸残基レベルでの解析を行う基盤を確立した。次に、転移交差飽和 (transferred cross-saturation, TCS) 法により、 $G_{\alpha_{i3}} \cdot GTP\gamma S$ 上の $GIRK_{CP-L}$ 結合残基を同定した。また、 $G_{\alpha_{i3}} \cdot GTP\gamma S$ を観測対象として $GIRK_{CP-L}$ を添加した際に観測されたスペクトル変化を、帰属に基づいて解析した。TCS 実験により同定した残基の変異体における $GIRK_{CP-L}$ との結合を調べ、同定した残基が、 $GIRK_{CP-L}$ との結合に寄与していることを確認した。一方、 $GIRK_{CP-L}$ を観測した TCS 実験を行い、 $GIRK_{CP-L}$ 上の $G_{\alpha_{i3}} \cdot GTP\gamma S$ 結合残基を正確に同定した。

GTP γ S 結合状態の $G_{\alpha_{i3}}$ の主鎖アミドシグナルの帰属の確立

$GIRK_{CP-L}$ との結合に関する $G_{\alpha_{i3}} \cdot GTP\gamma S$ のアミノ酸残基レベルでの情報を得るため、GTP γ S 結合状態の $G_{\alpha_{i3}}$ の主鎖アミドシグナルの帰属を行った。GDP 結合状態の解析と同様、主に、N 末端 30 残基を欠失した ΔN - $G_{\alpha_{i3}}$ を用いて解析を行い、N 末端の残基の帰属ならびに帰属の確認のため、全長の $G_{\alpha_{i3}}$ を用いた解析を行った。

0.3 mM の均一 2H , ^{13}C , ^{15}N 標識した ΔN - $G_{\alpha_{i3}} \cdot GTP\gamma S$ および $G_{\alpha_{i3}} \cdot GTP\gamma S$ 、また、50% 2H , ^{13}C , ^{15}N 標識を施した ΔN - $G_{\alpha_{i3}} \cdot GTP\gamma S$ を調製し、一連の三重共鳴測定を行った。用いた三重共鳴測定は、HNCA, HN(CO)CA, HNCACB, HN(CO)CACB, HNCO, HN(CA)CO である。いずれも TROSY-type の実験を行った。積算回数を増大するため、HNCO 測定以外の測定には、NUS を適用して測定し、これを最大エントロピー法にて再構成することによりスペクトルを得た。また、GTP γ S 結合状態の $G_{\alpha_{i3}}$ 単独の立体構造は明らかとなっていないが、同じファミリーに属し、 $G_{\alpha_{i3}}$ とのアミノ酸配列の同一性が 94% である $G_{\alpha_{i1}}$ において、GTP γ S 結合状態の単独の X 線結晶構造が明らかとなっている (PDB ID: 1GIA) ため、 ^{15}N edited NOESY-HSQC を測定し、結晶構造上近接した残基間の NOE も参考に帰属を進めた。また、アミノ酸選択標識体の 1H - ^{15}N TROSY スペクトルを測定し、帰属の起点とした。アミノ酸配列から一義的な帰属を可能とする 1 - ^{13}C / ^{15}N 標識体としては、タンパク質を 2H 標識したバックグラウンド

において、 $1\text{-}^{13}\text{C Ala}/^{15}\text{N Met}$, $1\text{-}^{13}\text{C His}/^{15}\text{N Cys}$, $1\text{-}^{13}\text{C Arg}/^{15}\text{N Lys}$, $1\text{-}^{13}\text{C Lys}/^{15}\text{N Arg}$, $1\text{-}^{13}\text{C Met}/^{15}\text{N His}$ 標識を施したサンプルを調製した。また、分子内部に存在し、H/D 交換速度が遅いためシグナル強度が小さい Ile 残基の帰属のため、タンパク質に ^2H 標識を施さず、 ^{15}N Ile 標識を施したサンプルを調製した。これらアミノ酸選択標識体により得られる情報も利用して帰属を進めた結果、GTP γ S 結合状態の $\text{G}\alpha_{i3}$ について、帰属可能な 353 残基中、334 残基の帰属を確立した (図 67)。

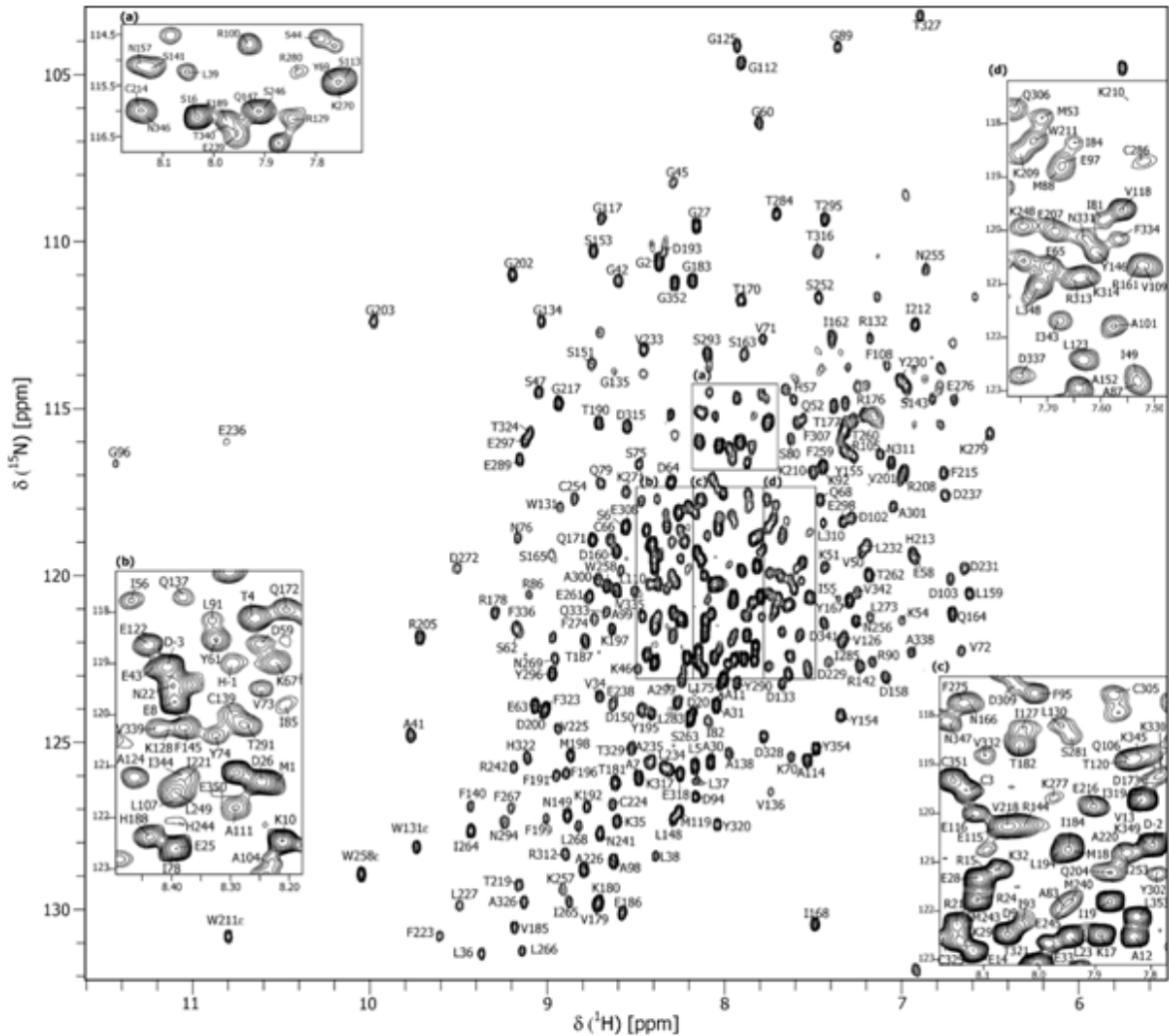


図 67 GTP γ S 結合状態の $\text{G}\alpha_{i3}$ の主鎖アミドシグナルの帰属

GTP γ S 結合状態の $\text{G}\alpha_{i3}$ の $^1\text{H}\text{-}^{15}\text{N}$ TROSY スペクトルを示し、三重共鳴測定に基づく主鎖連鎖帰属により確立した帰属をラベルした。枠にて囲ったスペクトル中央のシグナルが縮重した領域は、拡大図を示した。

TCS 実験による $\text{G}\alpha_{i3} \cdot \text{GTP}\gamma\text{S}$ 上の $\text{GIRK}_{\text{CP-L}}$ 結合残基の同定

NMR シグナルの帰属に基づき、 $\text{G}\alpha_{i3} \cdot \text{GTP}\gamma\text{S}$ 上の $\text{GIRK}_{\text{CP-L}}$ 結合残基を同定することを目的として、TCS 実験を行った。

均一 ^2H , ^{15}N 標識を導入した $\text{G}\alpha_{i3} \cdot \text{GTP}\gamma\text{S}$ と非標識の $\text{GIRK}_{\text{CP-L}}$ とを混合したサンプルにおいて、 $\text{GIRK}_{\text{CP-L}}$ のみに存在する非交換性のプロトンに対し、選択的なラジオ波照射を行うと、 $\text{GIRK}_{\text{CP-L}}$ 上の非交換性のプロトンが飽和され、 $[\text{U}\text{-}^2\text{H}, ^{15}\text{N}] \text{G}\alpha_{i3} \cdot \text{GTP}\gamma\text{S}$ 上において $\text{GIRK}_{\text{CP-L}}$ と空間的に近接 (本解析条件においては 5 \AA 以内) した領域に交差飽和現象を生じ、対応する NMR シグナルの強度減少が観測される (図 68)。図 69A には、A99 および W258 のシグナルを例に示した。W258 においては、A99 よりもラジオ波照射に伴う強度減少が顕著に観測されている。このように、ラジオ波照射の有無の各条件においてシグナル強度を比較することにより、 $\text{G}\alpha_{i3} \cdot \text{GTP}\gamma\text{S}$ 上の $\text{GIRK}_{\text{CP-L}}$ 結合残基を同定することができる。

なお、 $\text{G}\alpha_{i3}$ の分子量は 41K と大きいことから、 $\text{G}\alpha_{i3} \cdot \text{GTP}\gamma\text{S}$ 分子内の僅かな僅かな残余プロトンに直接照射することによる、分子内の飽和の伝播の影響が大きく観測されてしまう。そこで、 $[\text{U}\text{-}^2\text{H}, ^{15}\text{N}]$

$G\alpha_{13} \cdot GTP\gamma S$ に対し均一 2H 標識を施した $GIRK_{CP-L}$ を混合したサンプルを用いてコントロール実験を行った (図 69B)。非標識 $GIRK_{CP-L}$ を混合したサンプルにおけるラジオ波照射に伴うシグナル強度減少率から、コントロール実験における強度減少率を差し引くことにより、 $G\alpha_{13} \cdot GTP\gamma S$ の分子内の残余プロトンの直接照射に由来する飽和の影響を排除して解析を行った。

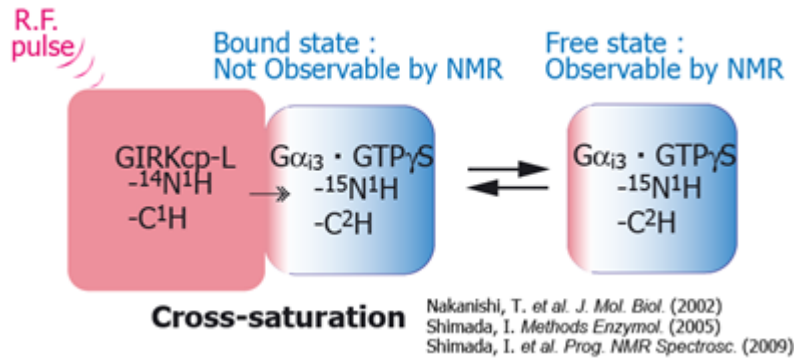


図 68 TCS 実験の模式図

$[U-^2H, ^{15}N]$ $G\alpha_{13} \cdot GTP\gamma S$ と非標識の $GIRK_{CP-L}$ の混合サンプルに対して、非交換性のプロトンに選択的なラジオ波照射を行う。これにより $GIRK_{CP-L}$ のプロトンが選択的に飽和を受け、 $G\alpha_{13} \cdot GTP\gamma S$ 分子上において $GIRK_{CP-L}$ と空間的に近接した領域のみ交差飽和現象を生じる (図中 $G\alpha_{13} \cdot GTP\gamma S$ の赤にて示した部分)。この結合状態における交差飽和は、結合・非結合状態間の可逆的平衡により非結合状態に移行して観測できる。

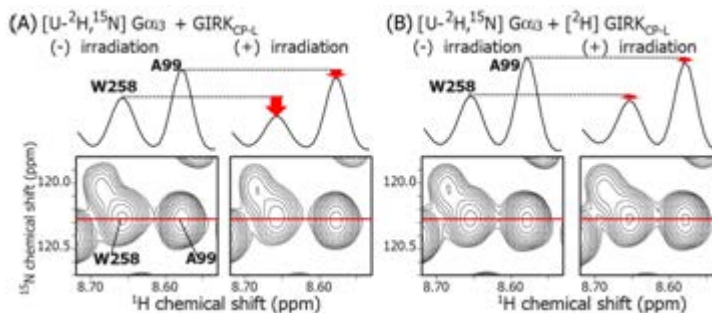


図 69 TCS 実験における $[U-^2H, ^{15}N]$ $G\alpha_{13} \cdot GTP\gamma S$ の $^1H-^{15}N$ TROSY スペクトルの一部

$[U-^2H, ^{15}N]$ $G\alpha_{13} \cdot GTP\gamma S$ と (A) 非標識 $GIRK_{CP-L}$ もしくは (B) $[U-^2H]$ $GIRK_{CP-L}$ の混合サンプルの、TCS 実験における、照射あり (+ irradiation) および照射なし (- irradiation) の $^1H-^{15}N$ TROSY スペクトルの一部を示す。スペクトル上部には、二次元スペクトル中にて赤線にて示した、 ^{15}N の化学シフト値 120.3 ppm の一次元の切り出しを示した。A99 のシグナルは、非標識、 $[U-^2H]$ $GIRK_{CP-L}$ 混合サンプルにて照射に伴う強度減少率がほぼ等しかったのに対し、W258 のシグナルは、非標識 $GIRK_{CP-L}$ 混合サンプルにおいて、 $[U-^2H]$ $GIRK_{CP-L}$ 添加サンプルよりも強度減少率が大きかった。このことは、W258 の主鎖アミド基が $GIRK_{CP-L}$ の残基の 5 Å 以内に近接していることを示している。

0.3 mM の $[U-^2H, ^{15}N]$ $G\alpha_{13} \cdot GTP\gamma S$ に対して、4 量体として 0.25 mM の非標識 $GIRK_{CP-L}$ あるいは $[U-^2H]$ $GIRK_{CP-L}$ を添加した混合サンプルを用いて TCS 実験を行った。WURST パルススキームにより 0.83 ppm を中心としたラジオ波照射を行い、照射時間 1.5 秒、緩和回復のための待ち時間 2.5 秒の条件にて測定を行った。非標識 $GIRK_{CP-L}$ を添加した実験及びコントロール実験におけるラジオ波照射に伴う強度減少率を、各残基に対してプロットしたグラフを図 70 に示す。いずれの実験においても、ラジオ波照射に伴い、8 割程度の残基が、0.1-0.4 の強度減少を示していた。非標識 $GIRK_{CP-L}$ を添加した実験の強度減少率からコントロール実験の強度減少率を差し引いた値 ΔRR のプロットを図 71 に示す。 $G\alpha_{13} \cdot GTP\gamma S$ のシグナルに、残基特異的な強度減少が観測されていた。

ΔRR が有意に 0.08 以上であった残基は、G89, G112, A114 (以上 αA ヘリックス上), E186 ($\beta 2$ ストランド), R208, K209, W211, I212, H213, E216, G217 ($\alpha 2$ ヘリックス $\sim \alpha 2/\beta 4$ ループ), M240, K248, L249, I253, N256 および W258 ($\alpha 3$ ヘリックス $\sim \alpha 3/\beta 5$ ループ) であった。これら強度減少を示した残基を、 $G\alpha$ の立体構造上にマッピングした (図 72)。強度減少を示した残基は、GTPase ドメイン上の主に $\alpha 2$ ヘリックスおよび $\alpha 3$ ヘリックス上において連続面を形成していた。よって、この面が $GIRK_{CP-L}$ との結合界面である、と結論した。なお、E186 は、 $\alpha 2$ ヘリックスおよび $\alpha 3$ ヘリックスから構成される連続面から

離れて位置しているが、E186 と結合面を隔てている F199 の主鎖アミド基は、分子内部に埋もれ、分子表面から 6 Å 以上離れて位置している (図 73)。したがって、分子表面の側鎖において $\text{GIRK}_{\text{CP-L}}$ と直接の相互作用を形成していても、主鎖アミド基を観測する TCS 実験において検出されない可能性が高い。一方で、ヘリカルドメインにおける 3 残基、G89, G112 および A114 も、有意な強度減少を示していた。

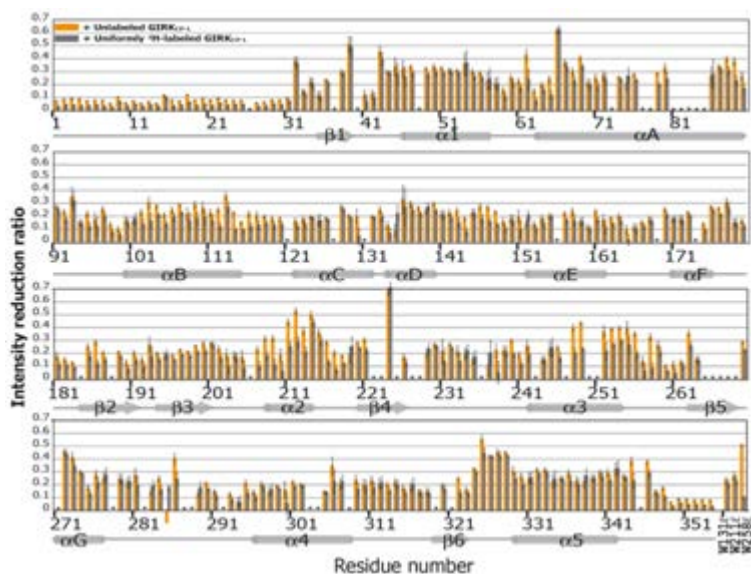


図 70 [U- ^2H , ^{15}N] $\text{G}\alpha_{13} \cdot \text{GTP}\gamma\text{S}$ を観測対象とした TCS 実験におけるラジオ波照射に伴う各条件下の強度減少率

非標識(グレー)あるいは[U- ^2H] $\text{GIRK}_{\text{CP-L}}$ を混合したサンプルにおける、[U- ^2H , ^{15}N] $\text{G}\alpha_{13} \cdot \text{GTP}\gamma\text{S}$ の各残基における、ラジオ波照射に伴うシグナル強度減少率をプロットした。アスタリスクは、未帰属/Pro もしくは縮重のため解析対象外とした残基である。残基番号の下に二次構造を示した。エラーバーは、1 回の測定における S/N 比に基づいて算出した。

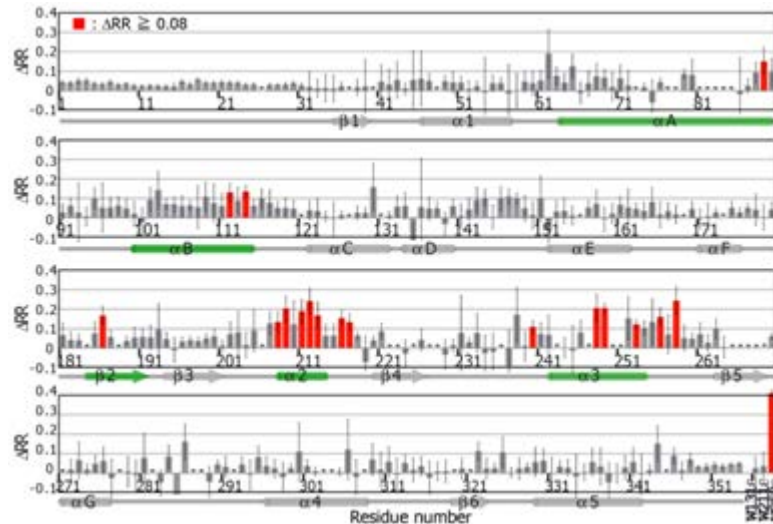


図 71 [U-²H, ¹⁵N] Gα_{i3} · GTPγS を観測対象とした TCS 実験におけるラジオ波照射に伴う強度減少率の各条件間の差

[U-²H, ¹⁵N] Gα_{i3} · GTPγS の各残基について、Fig. 6 に示した非標識 GIRK_{OP-L} 混合時の TCS 実験における強度減少率から [U-²H] GIRK_{OP-L} 混合時の強度減少率を差し引いた差 (ΔARR) をプロットした。アスタリスクは、未帰属/Pro もしくは縮重のため解析対象外とした残基である。ΔARR が有意に 0.08 以上であった残基を赤にて色付けし、ラベルした。残基番号の下に二次構造を示し、検出された残基が存在する二次構造を緑にて色づけた。

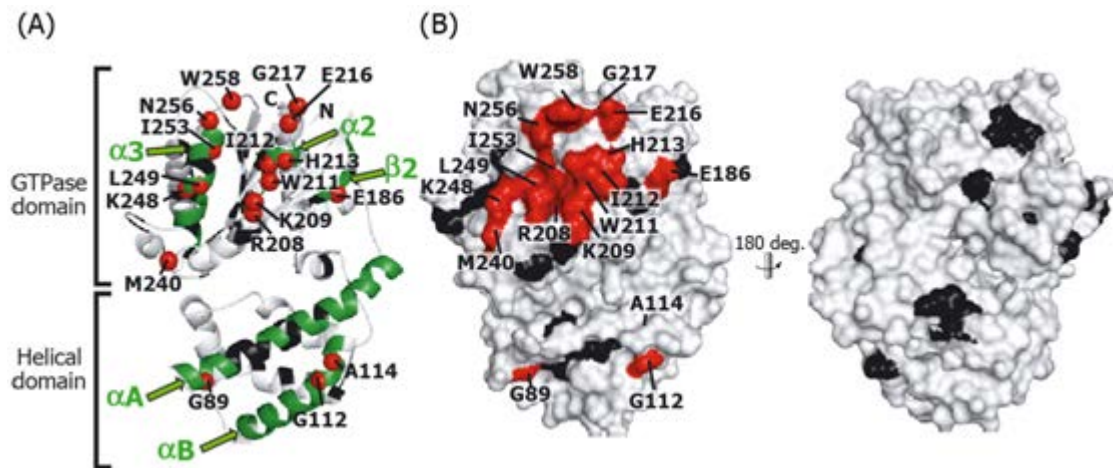


図 72 [U-²H, ¹⁵N] Gα_{i3} · GTP を観測対象とした TCS 実験結果のマッピング

(A) Gα_{i3} の立体構造 (PDB ID : 1G1A) をリボン表示し、TCS 実験において ΔARR が有意に 0.08 以上であった残基の主鎖アミド窒素原子を赤の球にて示した。また、検出された残基が存在する二次構造を緑にて色づけ、ラベルした。黒は Pro/未帰属またはシグナルの縮重により解析対象外とした残基を示す。

(B) Gα_{i3} の立体構造を表面表示し、TCS 実験において検出された残基をラベルし、赤にて色づけた。右には、180 度回転した図を示した。

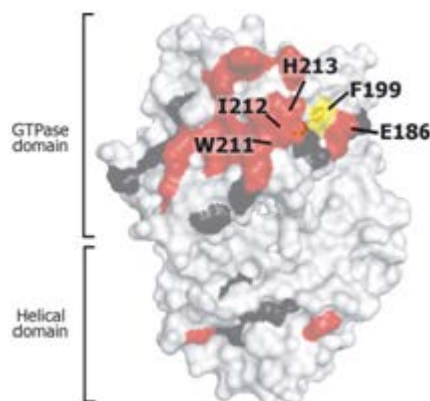


図 73 $G\alpha_{i3} \cdot GTP\gamma S$ 上の $GIRK_{CP-L}$ 結合領域と F199 の位置

$G\alpha$ の立体構造 (PDB ID : 1G1A) を表面表示し、TCS 実験により明らかとなった $GIRK_{CP-L}$ 結合残基を赤、TCS 実験にて解析対象外であった残基を黒にてマッピングした。 $\alpha 2$ および $\alpha 3$ ヘリックスから形成される連続面と E186 とを隔てる位置には、黄色にて色づけた F199 が存在している。

$G\alpha_{i3} \cdot GTP\gamma S$ に対して $GIRK_{CP-L}$ を滴定した際に観測されるスペクトル変化

0.28 mM の $[U-^2H, ^{15}N] G\alpha_{i3} \cdot GTP\gamma S$ に対して、4 量体として 0, 0.25, 0.5, 0.75 および 1 mM の非標識 $GIRK_{CP-L}$ を添加した際の、 $G\alpha_{i3} \cdot GTP\gamma S$ の $^1H-^{15}N$ TROSY シグナルに観測される化学シフト変化を、(3-2-1) にて確立した主鎖 NMR シグナルの帰属に基づいて解析した。

図 10 には、 $GIRK_{CP-L}$ 非添加時および 4 量体として 0.75 mM の $GIRK_{CP-L}$ ($[U-^2H, ^{15}N] G\alpha_{i3} \cdot GTP\gamma S$ に対して 2.7 等量) 添加時の $[U-^2H, ^{15}N] G\alpha_{i3} \cdot GTP\gamma S$ の $^1H-^{15}N$ TROSY スペクトルの重ね合わせを示した。

$GIRK_{CP-L}$ の添加に伴い、 $[U-^2H, ^{15}N] G\alpha_{i3} \cdot GTP\gamma S$ のシグナルには全体的な強度減少が観測された。この、 $GIRK_{CP-L}$ の添加に伴う全体的なシグナル強度減少は、 $GIRK_{CP-L}$ の結合による見かけの分子量の増大を反映している。また、図 75 に示すように、G45 など、複数のシグナルにおいては、他の残基よりも顕著な強度減少が観測されていた。また一方で、W258 など、特定の amino 酸残基には、連続した化学シフト変化が観測されていた。

(化学シフト変化についての解析)

$GIRK_{CP-L}$ の添加に伴って $G\alpha_{i3} \cdot GTP\gamma S$ のシグナルに連続的に観測された化学シフト変化を解析した。このような化学シフト変化は、 $G\alpha_{i3} \cdot GTP\gamma S$ と $GIRK_{CP-L}$ との結合・解離の交換が、NMR のタイムスケールにおいて、fast exchange regime にて生じていることを示している。

図 76 には、4 量体として 0.75 mM の $GIRK_{CP-L}$ 添加時の $[U-^2H, ^{15}N] G\alpha_{i3} \cdot GTP\gamma S$ の化学シフト変化量 $\Delta\delta$ を、各残基についてプロットしたグラフを示す。 $\Delta\delta$ が有意に 0.008 ppm 以上であった残基は、GTPase ドメインの E207, K209, W211, H213, F215, E216 ($\alpha 2$ ヘリックス $\sim \alpha 2/\beta 4$ ループ)、S246, W258 ($\alpha 3$ ヘリックス $\sim 3/\beta 5$ ループ)、R312 および T316 ($\alpha 4/\beta 6$ ループ) であった。

また、 $GIRK_{CP-L}$ の添加に伴う見かけの化学シフト変化量が大きかった、K209 および W258 のシグナルの、 $GIRK_{CP-L}$ の添加に伴う化学シフト変化量の滴定曲線を図 77 に示す。これを理論式にフィッティングすることにより、 $G\alpha_{i3} \cdot GTP\gamma S$ と $GIRK_{CP-L}$ との見かけの親和性を算出したところ、それぞれ解離定数 K_d 値が 0.6 ± 0.2 mM, 1.1 ± 0.5 mM、と算出された。

(強度減少についての解析)

また、上述の化学シフト変化を示す残基よりも大きな化学シフト変化量を有する残基においては、化学シフト変化がシグナルの強度減少として観測される。そこで、 $GIRK_{CP-L}$ の添加に伴う、 $G\alpha_{i3} \cdot GTP\gamma S$ のシグナル強度減少を調べた。

4 量体として 0.75 mM の $GIRK_{CP-L}$ 添加時には、強度が減少して消失し、解析対象外となるシグナルが多く存在したことから、4 量体として 0.5 mM の $GIRK_{CP-L}$ 添加時の実験を解析した。 $GIRK_{CP-L}$ 添加時の $[U-^2H, ^{15}N] G\alpha_{i3} \cdot GTP\gamma S$ のシグナル強度の、非添加時の強度に対する比 R を、残基ごとにプロットしたグラフを Fig. 15 に示す。なお、強度の解析は、 $GIRK_{CP-L}$ との結合による見かけの分子量増大に伴うシグナル強度減少を補正して解析を行った (図 79 レジエント参照)。

強度比は残基ごとに異なっていた。R 値が有意に 0.42 以下であった $G\alpha_{i3} \cdot GTP\gamma S$ 上の残基は、A41, S44, G45, K46, S47 ($\beta 1/\alpha 1$ ループ $\sim\alpha 1$ ヘリックス), T177 ($\alpha F/\beta 2$ ループ), G203 ($\beta 3/\alpha 2$ ループ) および I253 ($\alpha 3$ ヘリックス) であった。これらの残基は、 $GIRK_{CP-L}$ の添加に伴って、上述の化学シフト変化が観測された残基よりも、大きな化学シフト変化を生じていることが分かった。

(化学シフト変化および強度減少率の立体構造へのマッピング)

$GIRK_{CP-L}$ の添加に伴う、化学シフト変化量が大きい $G\alpha_{i3} \cdot GTP\gamma S$ 上の残基、ならびに強度減少率が大きい残基を、 $G\alpha$ の立体構造上にマッピングした (図 78)。化学シフト変化量が大きい残基は、主に $\alpha 2$ ヘリックスおよび $\alpha 3$ ヘリックス上に集中していた一方、強度減少を示した残基は、 $GTP\gamma S$ のリン酸基結合部位近傍に集中していた。

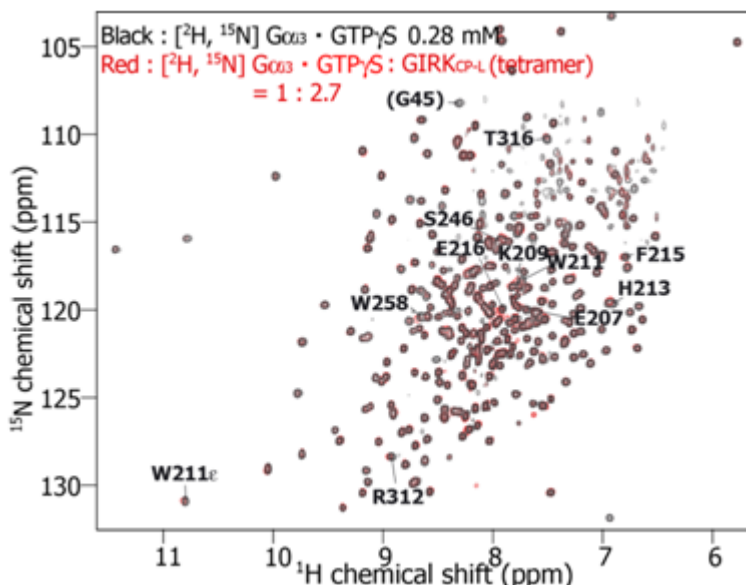


図 74 [U- 2H , ^{15}N] $G\alpha_{i3} \cdot GTP\gamma S$ の $GIRK_{CP-L}$ の添加に伴う 1H - ^{15}N TROSY スペクトル変化

0.28 mM の [U- 2H , ^{15}N] $G\alpha_{i3} \cdot GTP\gamma S$ 単独の 1H - ^{15}N TROSY スペクトルを黒、4 量体として 2.7 等量 (0.75 mM) の $GIRK_{CP-L}$ 添加時のスペクトルを赤にて重ね合わせて示した。 $GIRK_{CP-L}$ 添加時の化学シフト変化量 $\Delta\delta$ が有意に 0.008 ppm 以上であった残基をラベルした。

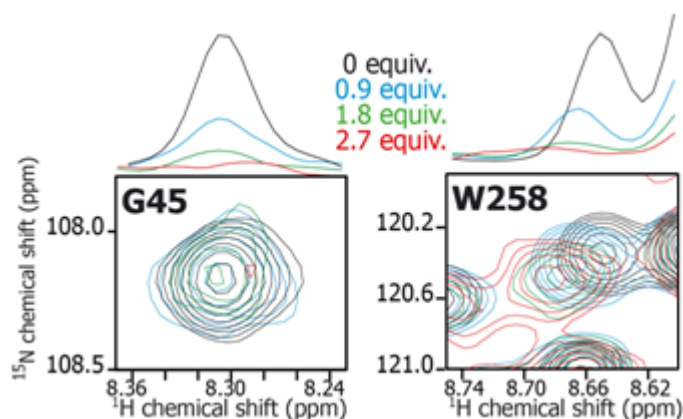


図 75 [U- 2H , ^{15}N] $G\alpha_{i3} \cdot GTP\gamma S$ の $GIRK_{CP-L}$ 滴定に伴う強度減少および化学シフト変化

顕著な強度減少を示した [U- 2H , ^{15}N] $G\alpha_{i3} \cdot GTP\gamma S$ の G45、および化学シフト変化を示した W258 について、4 量体として 0, 0.9, 1.8 および 2.7 等量の $GIRK_{CP-L}$ を添加時のスペクトルをそれぞれ黒、青、緑および赤にて重ね合わせた。二次元の拡大図の上部には、 1H 方向の一次元の切り出しを示した。

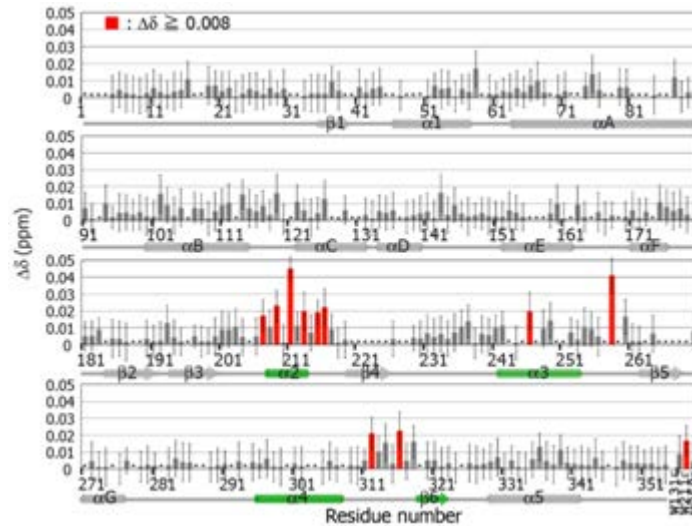


図 76 [U-²H, ¹⁵N] Gα_{i3} · GTPγS の GIRK_{CP-L} の添加に伴う化学シフト変化量

4 量体として 0.75 mM の GIRK_{CP-L} 添加時の [U-²H, ¹⁵N] Gα_{i3} · GTPγS の、非添加時との化学シフト変化量 Δδ を、残基番号に対してプロットした。アスタリスクは Pro/未帰属またはシグナルの縮重により解析対象外とした残基を示す。Δδ が有意に 0.008 ppm 以上であった残基を赤にて色づけた。残基番号の下には二次構造を示し α2, α3, α4 ヘリックスおよび β6 ストランドを緑にて色づけた。

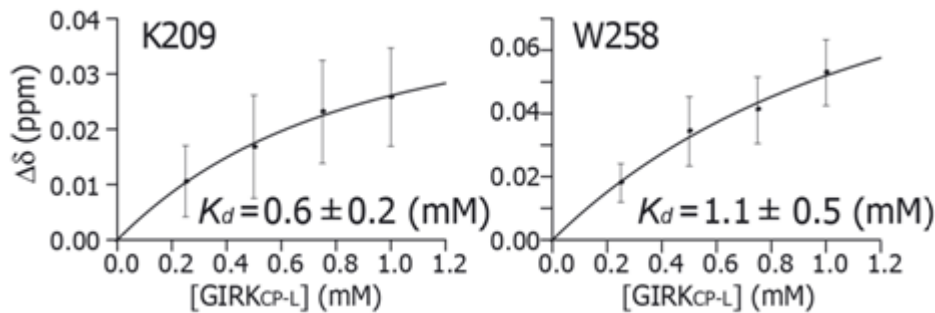


図 77 K209 および W258 の、GIRK_{CP-L} 添加に伴う化学シフト変化量の滴定曲線

GIRK_{CP-L} の滴定に伴い顕著な化学シフト変化を示した K209 および W258 のシグナルについて、滴定に伴う化学シフト変化量をプロットした。これを以下の理論式にフィッティングすることにより見かけの解離定数を算出した。

$$\Delta\delta = \Delta\delta_{\text{sat}} \frac{[\text{GIRK}_{\text{CP-L}}]_{\text{tot}} + [\text{G}\alpha_{i3}]_{\text{tot}} + K_d - \sqrt{([\text{GIRK}_{\text{CP-L}}]_{\text{tot}} + [\text{G}\alpha_{i3}]_{\text{tot}} + K_d)^2 - 4[\text{GIRK}_{\text{CP-L}}]_{\text{tot}} [\text{G}\alpha_{i3}]_{\text{tot}}}}{2[\text{G}\alpha_{i3}]_{\text{tot}}}$$

Δδ : 化学シフト変化量 (ppm), Δδ_{sat} : 結合飽和時の化学シフト変化量 (ppm), [GIRK_{CP-L}]_{tot} : GIRK_{CP-L} 濃度 (M), [Gα_{i3}]_{tot} : Gα_{i3} 濃度=0.00028 (M), K_d : 解離定数 (M)

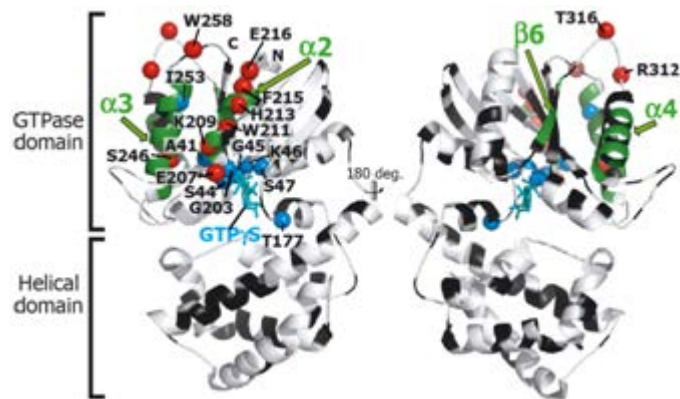


図 78 [U-²H, ¹⁵N] Gα_{i3} · GTPγS への GIRK_{CP-L} 滴定実験の結果のマッピング

Gαの立体構造 (PDB ID : 1G1A) 上に、4 量体として 0.75 mM の GIRK_{CP-L} 添加時のΔδが有意に 0.008 ppm 以上の残基および 0.5 mM の GIRK_{CP-L} 添加時の R 値が有意に 0.42 以下の残基の主鎖アミド窒素原子をそれぞれ赤、青にてマッピングした。GTPγS を青にてスティック表示している。黒は、Pro/未帰属もしくはシグナルの縮重により解析対象外とした残基を表す。

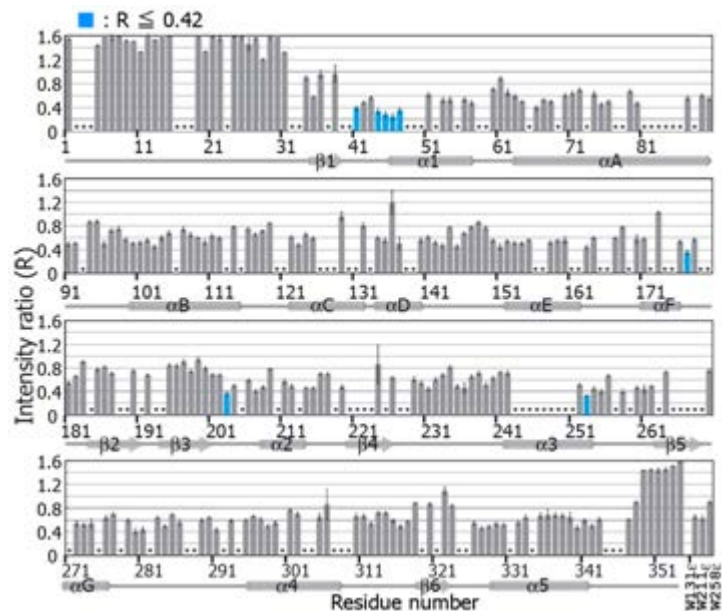


図 79 [U-²H, ¹⁵N] Gα_{i3} · GTPγS の各残基における GIRK_{CP-L} の添加に伴う強度減少率

4 量体として 0.5 mM の GIRK_{CP-L} 添加時の [U-²H, ¹⁵N] Gα_{i3} · GTPγS のシグナル強度の、Gα_{i3} · GTPγS 単独時の強度に対する比 R を残基番号に対してプロットした。アスタリスクは、未帰属/Pro もしくはシグナルの縮重により解析対象外とした残基を表す。R 値が有意に 0.42 以下であった残基を青にて色づけて示した。

TCS 実験による GIRK_{CP-L} 上の Gα_{i3} · GTPγS 結合残基の同定

Gα_{i3} · GTPγS を観測対象とした実験と同様に、コントロールサンプルに、[U-²H] Gα_{i3} · GTPγS を添加したサンプルを用い、照射パルススキームに、iBurp パルススキームよりも広い照射帯域を有する WURST パルススキームを用いて、GIRK_{CP-L} を観測対象とした TCS 実験を行った。

4 量体として 0.25 mM の [U-²H, ¹⁵N] GIRK_{CP-L} に対して、0.4 mM の非標識 Gα_{i3} · GTPγS あるいは [U-²H] Gα_{i3} · GTPγS を添加したサンプルを用いて、TCS 実験を行った。なお、残余プロトンの直接照射の影響を抑制するため、変性・巻き戻しによる H/D 交換を行わずに調製することにより、分子内部のアミド基の水素原子の ²H から ¹H への置換率が低い [U-²H, ¹⁵N] GIRK_{CP-L} を用いて実験を行った。WURST パルススキームにより 0.83 ppm を中心としたラジオ波照射を行い、照射時間 3.0 秒、緩和回復のための待ち時間 2.0 秒の条件にて測定を行った。非標識 Gα_{i3} · GTPγS 添加時の実験およびコントロール実験におけるラジオ波照射に伴う強度減少率を、各残基に対してプロットした (図 80)。いずれの実験においても、解析対象とした残基のうちおよそ 6 割が、0.1-0.2 の強度減少率を示した。非標識 Gα_{i3} · GTPγS

を添加した実験の強度減少率からコントロール実験の強度減少率を差し引いた値 ΔRR のプロットを図81に示す。

ΔRR が有意に 0.02 以上であった残基は、E242 ($\beta D/\beta E$ ループ), V358, L365, L366, M367, S368, S369, L371, I372 および A373 (αA ヘリックス \sim C 末端)であった。これらの残基を、 $GIRK_{CP-L}$ の立体構造上にマッピングした (図 82)。強度減少を示した残基は、主に $GIRK_{CP-L}$ の C 末端 αA ヘリックス近傍に集中していたことから、修士課程までに得られている結果と同様に、 $GIRK_{CP-L}$ の αA ヘリックス近傍の領域が、 $G\alpha_{i3} \cdot GTP\gamma S$ との直接の結合に主に寄与していると結論した。一方で、E242 は、 $GIRK 4$ 量体のサブユニット界面に位置している。 $G\alpha_{i3} \cdot GTP\gamma S$ との結合には、 $GIRK 4$ 量体のサブユニット界面も関与していることが示された。

以上の、実験条件を最適化して行った本研究における TCS 実験にて検出された残基を、 $GIRK_{CP-L}$ 上の $G\alpha_{i3} \cdot GTP\gamma S$ 結合残基とする。

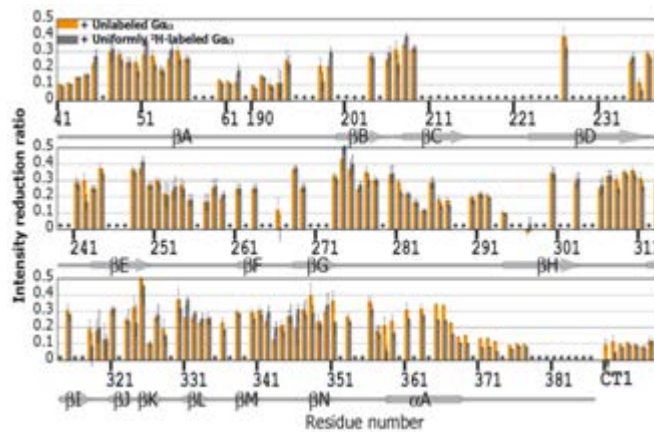


図 80 $[U-^2H, ^{15}N]$ $GIRK_{CP-L}$ を観測対象とした TCS 実験におけるラジオ波照射に伴う各条件下の強度減少率

非標識(グレー)あるいは $[U-^2H]$ $G\alpha_{i3} \cdot GTP\gamma S$ (橙)を混合したサンプルにおける、 $[U-^2H, ^{15}N]$ $GIRK_{CP-L}$ の各残基におけるラジオ波照射に伴う強度減少率をプロットした。アスタリスクは、未帰属/Pro もしくは縮重のため解析対象外とした残基である。CT1 以降は、C 末端のアミノ酸残基番号 378-386 の未帰属残基を示す。残基番号の下に二次構造を示した。エラーバーは、1 回の測定における S/N 比に基づいて算出した。

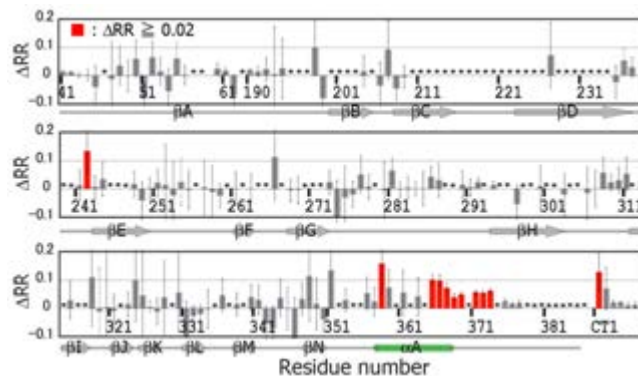


図 81 $[U-^2H, ^{15}N]$ $GIRK_{CP-L}$ を観測対象とした TCS 実験におけるラジオ波照射に伴う強度減少率の各条件間の差

$[U-^2H, ^{15}N]$ $GIRK_{CP-L}$ の各残基について、図 80 に示した、非標識 $G\alpha_{i3} \cdot GTP\gamma S$ 混合時の強度減少率から $[U-^2H]$ $G\alpha_{i3} \cdot GTP\gamma S$ 混合時の強度減少率を差し引いた差 (ΔRR) をプロットした。 ΔRR が有意に 0.02 以上であった残基を赤にて色付け、ラベルした。アスタリスクは、未帰属/Pro もしくは縮重のため解析対象外とした残基である。CT1 以降は、C 末端のアミノ酸残基番号 378-386 の未帰属残基を示す。残基番号の下に二次構造を示し、検出された残基が集中した αA ヘリックスを緑にて色付けた。

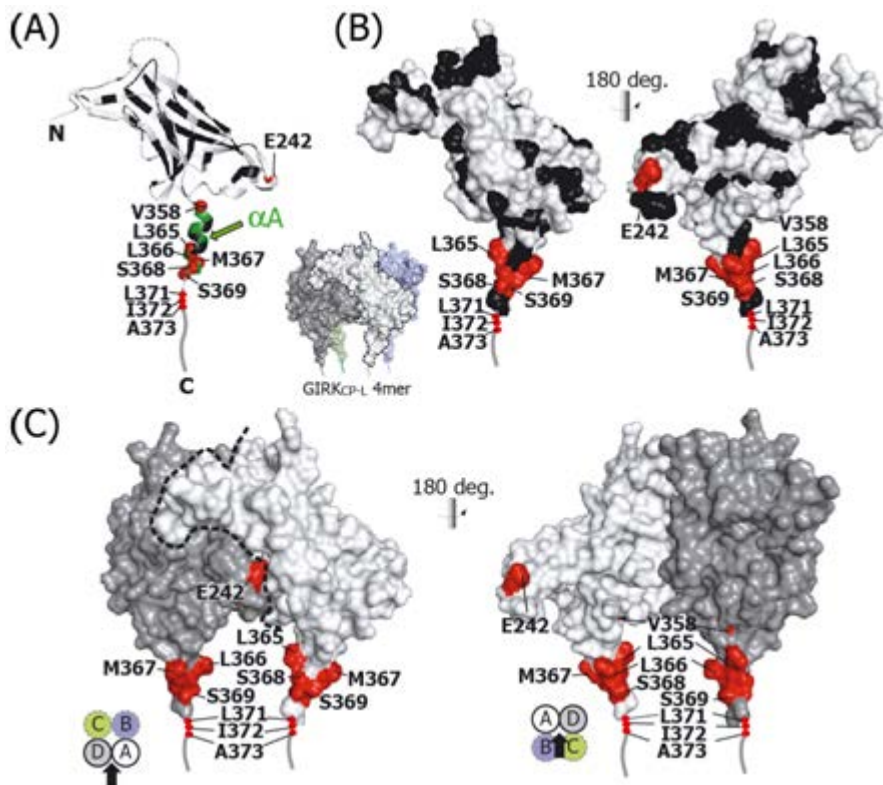


図 82 [U-²H, ¹⁵N] GIRK_{CP-L} - Gα₁₃ · GTPγS TCS 実験結果のマッピング

- (A) GIRK1 細胞内領域の 2 つのサブユニットの立体構造 (PDB ID : 1N9P) をリボン表示し、TCS 実験において検出された残基の主鎖アミド窒素原子を赤の球にてマッピングした。黒は、解析対象外の残基を示す。C 末端のアミノ酸残基番号 371-386 は模式的に示した。
- (B) GIRK1 細胞内領域の 2 つのサブユニットを表面表示し、TCS 実験にて検出された残基を赤にてマッピングした。左下には、GIRK4 量体の表面表示をサブユニットごとに色分けして示し、同じ向きから見たサブユニットを点線にて囲った。黒は、解析対象外を示す。
- (C) GIRK1 細胞内領域の隣り合う 2 つのサブユニットをグレーおよび白にて示し、TCS 実験にて検出された残基を赤にてマッピングした。サブユニット界面を黒の点線にて示した。4 つのサブユニットにより形成されるポアの外側(左)および内側から見た図(右)を示した。

本研究では、Gα₁₃ · GTPγS 上の GIRK_{CP-L} 結合部位ならびに結合に伴い化学シフト変化を示す部位をアミノ酸残基レベルにて同定することにより、GIRK_{CP-L} との結合における Gα₁₃ · GTPγS 側の情報をアミノ酸残基レベルにて明らかとした。

Gα_{i/o} · GTP と GIRK 細胞内領域との複合体モデル構築

(Gα₁₃ · GTPγS -GIRK_{CP-L} 複合体モデルの構築)

TCS 実験により明らかとなった、Gα₁₃ · GTPγS および GIRK_{CP-L} 上の結合残基の情報に基づき、Gα₁₃ · GTPγS と GIRK_{CP-L} との複合体モデルを構築した。

複合体の構築は、HADDOCK (high ambiguity driven protein-protein docking) プログラムによる、rigid body docking により行った。GTP 結合状態の Gα₁₃ の立体構造は明らかでないため、まず、MODELLER プログラムを用いることにより、Gα₁₁ の GTPγS 結合状態の結晶構造 (PDB ID : 1GIA) を鋳型として、GTPγS 結合状態の Gα₁₃ の立体構造を構築した。この Gα₁₃ · GTPγS の立体構造と GIRK1 細胞内領域 (PDB ID : 1N9P) 4 量体の結晶構造を用いて、HADDOCK により両者の複合体を構築した。

HADDOCK において、相互作用界面に存在する残基として指定することができる、active residues としては、以下を指定した。Gα₁₃ 上の残基には、TCS 実験により同定された残基のうち GTPase ドメインの α2 ヘリックスおよび α3 ヘリックス上の残基を選択した。また、GIRK 上の残基としては、TCS 実験にて検出された残基のうち、複合体構築に用いた構造に含まれない、L371, I372 および A373 を除いた C 末端 αA ヘリックスの残基を選択した。

HADDOCK により、10 個の複合体の立体構造が得られた。van der Waals エネルギーや静電エネルギーなどを考慮した HADDOCK スコアが良好であった複合体構造を図 83 に示している。この複合体構

造が、TCS 実験結果を満足するか否かを確認した。前述のように、 $G\alpha_{i3} \cdot GTP\gamma S$ を観測対象とした TCS 実験においては、 $GIRK_{CP-L}$ と 5 Å 以内、 $GIRK_{CP-L}$ を観測対象とした TCS 実験においては、 $G\alpha_{i3} \cdot GTP\gamma S$ と 6 Å 以内に近接するアミド基が、それぞれ検出されるはずであることから、複合体構造中において、 $GIRK$ 細胞内領域と 5 Å 以内、 $G\alpha_{i3} \cdot GTP\gamma S$ と 6 Å 以内に存在する $G\alpha_{i3} \cdot GTP\gamma S$ および $GIRK$ 細胞内領域の主鎖アミド基を調べた。その結果、複合体モデルは、TCS 実験結果を概ね満たしていることが分かった。TCS 実験で検出され、複合体モデル構造構築の拘束条件として入力したが上述の距離を満たしていない残基としては $G\alpha_{i3} \cdot GTP\gamma S$ の 14 残基中 7 残基、 $GIRK_{CP-L}$ の 7 残基中 2 残基が該当した。複合体モデル構築には rigid body docking を行っており、複合体の形成に伴う構造変化や、溶液中における構造の揺らぎを考慮していないこと、また、ドッキングに用いた $GIRK$ の構造には、L371, I372, A373 の $G\alpha_{i3} \cdot GTP\gamma S$ 結合残基が含まれていないことをふまえると、構築した複合体モデル構造は、TCS 実験結果を概ね満足する、と結論し、この複合体モデル構造を、 $G\alpha_{i/o} \cdot GTP-GIRK$ 細胞内領域の相互作用のモデル構造とした。

このモデルにおいては、 $G\alpha_{i/o} \cdot GTP$ は、GTPase ドメイン上の $\alpha 2$ ヘリックスおよび $\alpha 3$ ヘリックスにおいて $GIRK$ 細胞内領域の C 末端 αA ヘリックスと直接相互作用しており、このとき、 $G\alpha_{i/o} \cdot GTP$ のヘリカルドメイン上の残基が、 $GIRK$ 細胞内領域の隣接するサブユニットの C 末端に近接して存在している。一方で、修士課程までに行った PRE 実験から、 $G\alpha_{i3} \cdot GTP\gamma S$ の I82 が、 $GIRK$ 細胞内領域の C 末端の残基と半径 20 Å 以内に近接することが示されている。HADDOCK の計算においては、TCS 実験結果のみ用い、PRE 実験結果を拘束条件として用いなかったが、構築した複合体モデルが PRE 実験結果を満たしていることから、このモデル構造の妥当性が支持される。

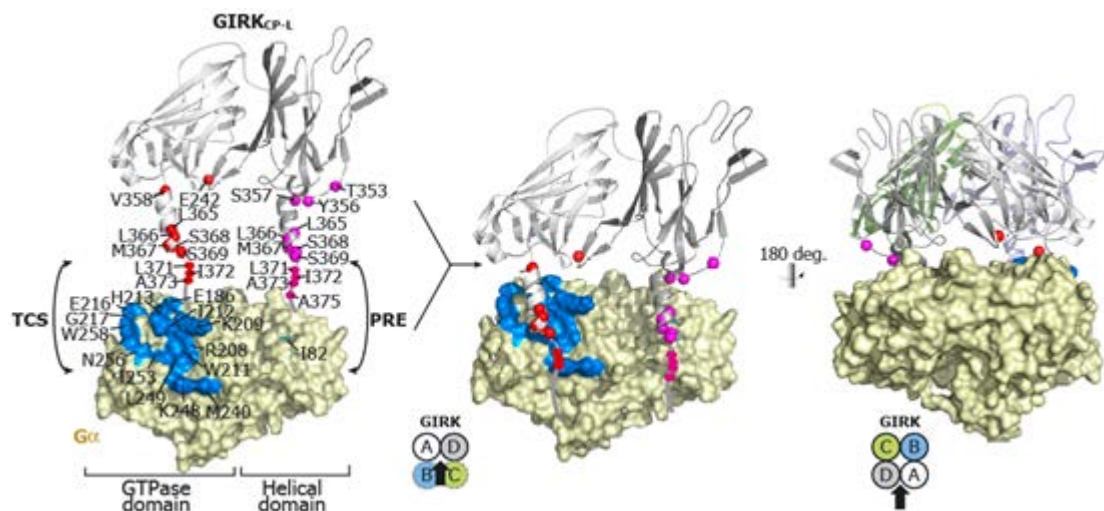


図 83 $G\alpha_{i/o} \cdot GTP-GIRK$ 細胞内領域 複合体モデル構造

(左) $GIRK$ 細胞内領域の隣り合う 2 つのサブユニット (PDB ID : 1N9P) を、ポアの内側から見た配置にてリボン表示し、 $GTP\gamma S$ 結合状態の $G\alpha_{i3}$ の立体構造を表面表示した。TCS 実験より示された $GIRK_{CP-L}$ 上の $G\alpha_{i3} \cdot GTP\gamma S$ 結合残基の主鎖アミド窒素原子を赤い球、 $G\alpha_{i3} \cdot GTP\gamma S$ 上の $GIRK_{CP-L}$ 結合残基を青にてマッピングした。また、 $G\alpha_{i3} \cdot GTP\gamma S$ 上の I82 を緑にて色づけ、PRE 実験により I82 と近接することが示された $GIRK$ 上の残基の主鎖アミド窒素原子をマゼンタの球にて示した。

(中央) $GIRK$ 細胞内領域と GTP 結合状態の $G\alpha_{i/o}$ との複合体モデル。

(右) $GIRK$ を 4 量体にて示し、中央に示した配置から 180 度回転させた図を示した。

($G\alpha_{i/o} \cdot GTP-GIRK$ 細胞内領域複合体と細胞膜との相対配置)

生体内において、 $G\alpha_{i/o}$ は、N 末端が脂質修飾を受けることにより、細胞膜にアンカーして存在している。本研究により提示したこの $G\alpha_{i/o} \cdot GTP-GIRK$ 細胞内領域の複合体モデル構造は、生体内における $G\alpha_{i/o} \cdot GTP$ の膜との配置を説明しうる。本複合体モデル構築に用いた $G\alpha_{i3} \cdot GTP\gamma S$ の構造中で最も N 末端側に存在する V34 は、 $GIRK$ の配置から細胞膜の位置を仮定した際に、細胞膜から約 35 Å 離れて位置している。一方で、 $G\alpha_{i/o}$ の N 末端 1-33 の残基は、 $G\alpha_{i1} \cdot GDP \cdot \beta\gamma$ 3 量体の構造 (PDB ID : 1GP2) において、約 40 Å の α ヘリックスを形成しているが、 GTP を結合し、 $G\beta\gamma$ を解離した単独状態においては構造を形成しておらず、40 Å よりも長い可能性が高い。よって、本研究により提示した $G\alpha_{i/o} \cdot GTP-GIRK$ 細胞内領域の複合体モデルは、脂質修飾を受けた $G\alpha_{i/o}$ の N 末端が細胞膜にアンカーした状

態においても十分に取りうる配置である。

複合体モデルから示される $G\alpha_{i/o}$ と GIRK 細胞内領域との分子認識様式

($G\alpha_{i3} \cdot GTP\gamma S$ -GIRK_{CP-L} の結合における疎水性残基間の相互作用)

図 84 には、GIRK 細胞内領域と $G\alpha_{i/o} \cdot GTP$ との複合体モデルの open-book モデルを示した。 $G\alpha_{i3} \cdot GTP\gamma S$ の $\alpha 2$ ヘリックスおよび $\alpha 3$ ヘリックスは、疎水性の高い溝を形成している一方、GIRK_{CP-L} の C 末端 αA ヘリックスは疎水性のアミノ酸残基に富んでいる。よって、 $G\alpha_{i3} \cdot GTP\gamma S$ と GIRK 細胞内領域との結合においては、これら疎水性残基同士の形状の相補性が重要であることが示唆された。 $G\alpha_{i3} \cdot GTP\gamma S$ の $\alpha 2$ ヘリックス上の I212 および $\alpha 3/\beta 5$ ループ上の W258 を Ala に置換した変異体において、GIRK_{CP-L} との結合親和性が低下していたことから、これら疎水性残基の重要性が確認された。

なお、 $G\alpha$ の $\alpha 2$ ヘリックスおよび $\alpha 3$ ヘリックスは、 $G\alpha$ のファミリー間で保存性が高く、GTP 結合状態の $G\alpha$ におけるエフェクター相互作用界面として知られている。GIRK は、細胞内領域に対する $G\beta\gamma$ の結合により開閉が制御される $G\beta\gamma$ のエフェクターであり、 $G\alpha$ のエフェクターではないが、 $G\alpha$ におけるエフェクター認識と同様の様式にて、認識されていることが明らかとなった。

(他のサブタイプの GIRK と $G\alpha_{i/o}$ との相互作用について)

GIRK1 における $G\alpha_{i3} \cdot GTP\gamma S$ 結合領域である GIRK の C 末端領域は、図 85 に示すように、サブタイプ間で保存性が低い領域であり、本研究にて解析対象とした GIRK1 は、他のサブタイプよりも疎水性に富んでいる。上記のように、 $G\alpha_{i3} \cdot GTP\gamma S$ と GIRK1 細胞内領域との結合においては、疎水性側鎖同士の相互作用が重要であることが示されていることから、疎水性残基の少ない他のサブタイプの GIRK においては、 $G\alpha_{i/o}$ に対する親和性が異なっている可能性がある。

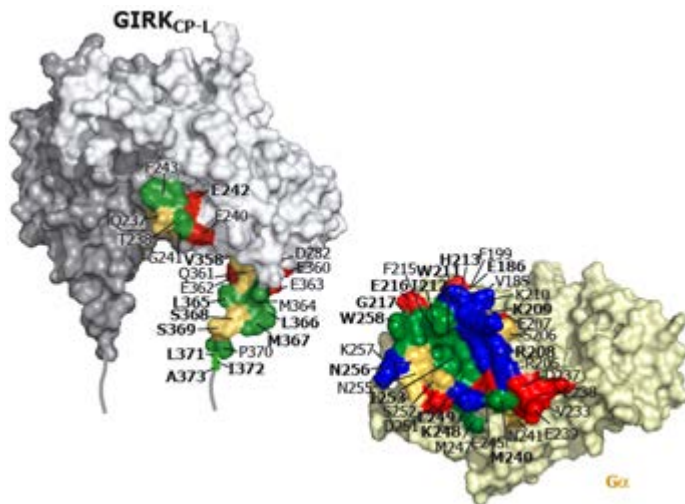


図 84 $G\alpha_{i/o} \cdot GTP$ -GIRK 細胞内領域複合体の open-book モデル

図 83 右にて示した $G\alpha_{i/o} \cdot GTP$ と GIRK 細胞内領域との複合体構造の open-book モデルを表面表示した。GIRK_{CP-L} 上の $G\alpha_{i3} \cdot GTP\gamma S$ 結合残基および、 $G\alpha_{i3} \cdot GTP\gamma S$ の $\alpha 2$, $\alpha 3$ ヘリックス上の GIRK_{CP-L} 結合残基から、 $C\alpha$ 間の距離が 6 Å 以内に存在する残基について、側鎖の酸性、塩基性、疎水性、親水性の性質に基づいて、それぞれ赤、青、緑および黄色にて色づけて示した。

GIRK1	239	GEF	357	S	VKEQEEMLLMS	SPLIAPAI	■ : Acidic	■ : Basic
GIRK2	250	GEF	368	S	AKELAEELANRAE	VPLSWSV	■ : Hydrophobic	
GIRK3	216	GEF	334	S	ARELAEAAARL	DAHLYWSI	Others: Hydrophilic	
GIRK4	245	GEF	363	C	AKELAE	MKRSGRLLQYLPS	* : $G\alpha_3$ -binding residues	
		*	*		*****	***		

図 85 GIRK_{CP-L} 上の $G\alpha_{i3}$ ・GTP γ S 結合領域の GIRK のサブタイプ間のアミノ酸配列のアラインメント
 本研究により明らかとした、GIRK_{CP-L} (GIRK1) 上の $G\alpha_{i3}$ ・GTP γ S 結合領域の残基 (*) について、GIRK1-4 の各サブタイプ間でのアミノ酸配列のアラインメントを示した。側鎖の性質に基づいて、酸性・塩基性・疎水性残基を赤・青・緑にて色づけて示した。

迅速な GIRK 閉口の構造基盤を与える $G\alpha_{i/o}$ ・GTP-GIRK-G $\beta\gamma$ 3 者複合体

本研究により、GTP 結合状態の $G\alpha_{i/o}$ と GIRK 細胞内領域とが、それぞれ $\alpha 2, \alpha 3$ ヘリックスからなる界面ならびに C 末端 αA ヘリックス近傍の領域において、直接結合することが示された。図 86A には、 $G\alpha_{i/o}$ ・GTP-GIRK 細胞内領域複合体モデル構造上に、G $\beta\gamma$ 結合残基をマッピングした。GIRK 上の $G\alpha_{i/o}$ ・GTP 結合部位と、G $\beta\gamma$ 結合部位とは重複していないことから、G $\beta\gamma$ が結合して活性化された状態の GIRK に対して、同時に GTP 結合状態の $G\alpha_{i/o}$ が結合し、図 86B に示すような $G\alpha_{i/o}$ ・GTP-GIRK-G $\beta\gamma$ 3 者複合体が形成されることがわかる。よって、本研究により示した $G\alpha_{i/o}$ ・GTP-GIRK-G $\beta\gamma$ 3 者複合体が、 $G\alpha_{i/o}$ が、GTP の加水分解後に、近傍に存在する G $\beta\gamma$ を素早く回収することを可能とし、GPCR 刺激終了に伴う GIRK の迅速な閉口を達成する構造基盤であると提唱する。

以上の結果は、Journal of Biological Chemistry 誌に報告した。

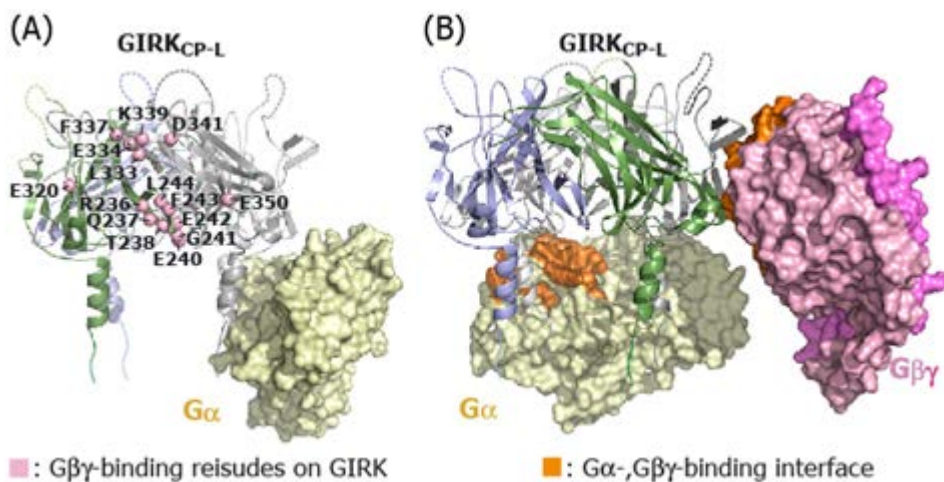


図 86 $G\alpha_{i/o}$ ・GTP-GIRK 細胞内領域-G $\beta\gamma$ 3 者複合体モデル

(A) 図 83 にて示した $G\alpha_{i/o}$ ・GTP-GIRK 複合体モデルの立体構造上に、G $\beta\gamma$ 結合残基の主鎖アミド窒素原子をマゼンタにてマッピングした。GIRK 上の $G\alpha_{i/o}$ ・GTP 結合残基と、G $\beta\gamma$ 結合残基とは重複していない。
 (B) $G\alpha_{i/o}$ ・GTP-GIRK-G $\beta\gamma$ 複合体モデル構造。GIRK 細胞内領域-G $\beta\gamma$ の複合体モデルを HADDOCK により構築し、(A) にて示した $G\alpha_{i/o}$ ・GTP-GIRK 複合体モデルと、GIRK を基準に重ね合わせるにより構築した。 $G\alpha_{i/o}$ ・GTP および G $\beta\gamma$ の立体構造上に、 $G\alpha_{i1}$ ・G $\beta\gamma$ の立体構造 (PDB ID : 1GP2) において、 $G\alpha_{i1}$ ・GDP と G $\beta\gamma$ との非水素原子間距離が 4 Å 以内である残基をそれぞれ橙にて色づけている。

$G\alpha_{i/o}\beta\gamma$ 3 量体と GIRK との直接的相互作用が、GIRK 活性化における *i/o* ファミリー特異性を達成している可能性が指摘されている。また $G\alpha_{i/o}\beta\gamma$ 3 量体が GIRK と直接相互作用することにより、GPCR へのリガンド刺激非存在時における GIRK の電流、基底電流を抑制し、GPCR へのリガンド刺激により流れる活性化電流の相対的な大きさを増大させることでシグナルの S/N 比を増大させるという、priming 機構と呼ばれる働きを担っていることが指摘されている。したがって、 $G\alpha_{i/o}\beta\gamma$ 3 量体と GIRK との相互作用様式を明らかとすることにより、GTP 結合状態の $G\alpha_{i/o}$ および G $\beta\gamma$ による GIRK 制御の構造機構と併せて、 $G_{i/o}$ タンパク質による GIRK 開閉制御の構造機構の全貌を解明することが期待できる。明らかとした相互作用の重要性は、結合残基の変異体を用いた電気生理実験を行い、活性を検出することにより検証することができる。

⑥ GPCR のシグナル伝達機構の解明 (東大分室)

G タンパク質共役型受容体 (GPCR) は、共通の 7 回膜貫通構造をもつ、膜タンパク質ファミリーの 1 つであり、創薬のターゲットとして注目されている。GPCR に結合するリガンドは、G タンパク質などのエフェクターを介したシグナル伝達を活性化または不活性化するが、その程度はリガンドによって異なる。これを efficacy と呼び、リガンドは efficacy の違いによって、full agonist (完全作動薬)、partial agonist (部分作動薬)、neutral antagonist (阻害剤)、inverse agonist (逆作動薬) に分類される。このような efficacy の違いは薬効に影響することが知られており、例えば、 β_2 -アドレナリン受容体 (β_2 AR) の場合には、full agonist は partial agonist よりも急性の喘息に対してより有効である。

これまでに様々なリガンドに結合した GPCR の結晶構造が明らかになっているにもかかわらず、リガンドごとに efficacy が異なる機構は明らかではない。そこで、 β_2 AR を解析対象とし、シグナル伝達に直接関与する膜貫通領域の構造を、様々なリガンド存在下で解析することで、efficacy の違いが生じる機構を明らかにすることを目的として、研究をおこなった。

β_2 AR は、バキュロウイルス発現系を用い、昆虫細胞 expresSF+ により発現した。メチオニンメチル基選択的 ^{13}C 標識は、バキュロウイルス感染直前にメチオニン欠乏培地に交換し、感染後 16 時間で 200 mg/L の [methyl- ^{13}C] メチオニンを添加することによりおこなった。膜画分を調製した後、界面活性剤ドデシルマルトシドにて可溶化し、コバルトアフィニティーカラムおよびリガンドアフィニティーカラムにより精製した。このようにして調製した [methyl- ^{13}C -Met] β_2 AR を用いて、inverse agonist (carazolol)、neutral antagonist (alprenolol)、partial agonist (tulobuterol, clenbuterol)、full agonist (formoterol) 存在下で、 ^1H - ^{13}C SOFAST-HMQC スペクトルを測定した。

β_2 AR の調製

上述のように調製した β_2 AR を、SDS-PAGE により解析したところ、精製度は 95 % 以上、収量は約 0.5 mg/L culture であった。RI リガンド結合アッセイにより解析したところ、活性割合は 80 % 以上であった。活性化にともない大きく構造変化することが知られている第 3 細胞内ループ (ICL3) の C265 を蛍光修飾した β_2 AR を用いて、リガンド依存的な蛍光スペクトルの変化を解析した。その結果、先行報告と同様に full agonist 結合にともなう蛍光強度の低下と蛍光波長のシフトが観測された (図 87)。このことから、調製した β_2 AR が full agonist 結合にともない、シグナル伝達に必要な細胞内の構造変化を引き起こすことがわかった。以上により、リガンド依存的な構造変化を NMR により解析する上で、十分な純度および活性を保持した β_2 AR を調製することができたと結論した。

NMR 解析をおこなう間の β_2 AR の安定性を解析するため、full agonist を含む様々なリガンド存在下で、インキュベートした前後の試料を SDS-PAGE および RI リガンド結合アッセイにより解析した (図 88)。その結果、full agonist (formoterol) 存在下にて、25 °C で 24 時間インキュベートした後も、デグラデーションはほとんど観測されず、RI リガンド結合活性もインキュベート前の 90 % 程度であった。他のリガンド存在下においても、ほぼ同様の結果が得られたことから、調製した β_2 AR は、NMR 解析をおこなうに十分な安定性を有していると結論した。

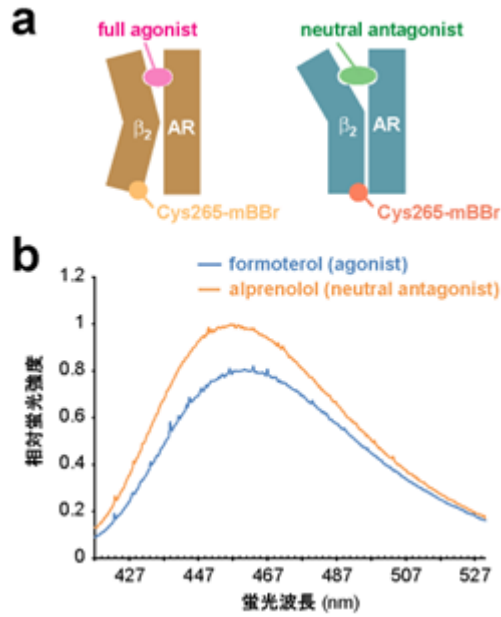


図 87 蛍光プローブを用いた β_2 AR の性状解析

- (a) 蛍光プローブを用いた解析の模式図
 (b) C265 を monobromobimane (mBBR) で標識した β_2 AR の formoterol および alprenolol 結合状態の蛍光スペクトル

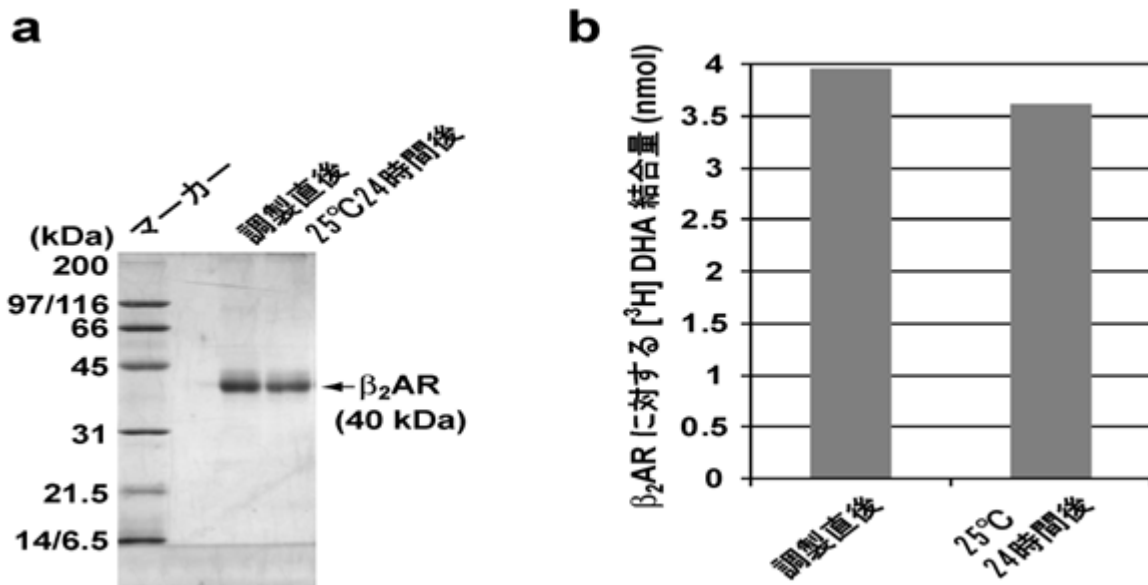


図 88 β_2 AR の安定性の解析

- (a) 調製直後および 25°C、24 時間インキュベーション後の SDS-PAGE
 (b) 調製直後および 25°C、24 時間インキュベーション後の RI リガンド結合活性の解析

β_2 AR には、9 残基のメチオニンが広く分布しており、そのうち、M82、M215、M279 は活性化にともない大きく構造変化することから (図 89)、メチオニンメチル基をプローブとして NMR 解析をおこなうこととした。チオレドキシンをモデルタンパク質として、昆虫細胞発現系において、90% 程度の標識率でメチオニンのメチル基を選択的に ^{13}C 標識する方法を確立した。

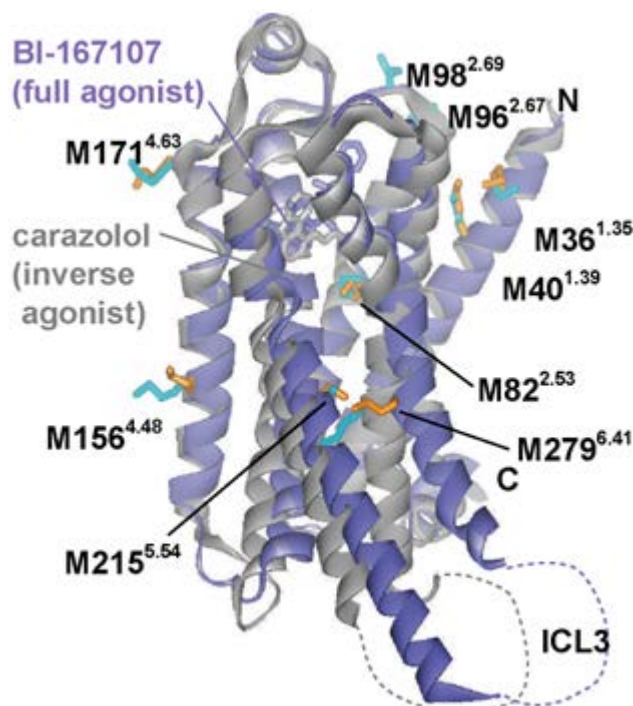


図 89 β_2 AR の構造におけるメチオニンの分布

inverse agonist (carazolol) 結合状態の構造 (灰・シアン) 3) と full agonist (BI-167107) および G タンパク質結合状態の構造 (青・オレンジ) 4) の重ね合わせ。

Inverse agonist および full agonist 結合状態の β_2 AR のスペクトル

Carazolol (inverse agonist) 結合状態の [methyl- ^{13}C -Met] β_2 AR のスペクトルでは、概ねメチオニン 9 残基に対応する数のシグナルが観測された (図 90a)。このことは、 β_2 AR のメチオニンが、膜貫通領域を含めて観測可能であることを示している。一方、formoterol (full agonist) 結合状態のスペクトルでは、carazolol 結合状態と比較して、いくつかのシグナルの化学シフト変化および消失が観測された (図 90b)。

著しいシグナルの重なりを解消するため、溶媒または膜に面した 4 残基のメチオニンを同時に変異した、M96T/M98T/M156L/M171S 変異体 (以降 4Met 変異体) を作成した。この 4Met 変異体の carazolol および formoterol 結合状態のスペクトルでは、強度の大きい 4 個のシグナルが消失した (図 90c,d)。一方で、変異を導入した 4 残基以外のシグナルについては、変異前後で化学シフトに変化はなかった。このことは、変異導入による β_2 AR の構造への影響はほとんどないことを意味している。この 4Met 変異体を用いることにより、各シグナルが分離して観測することが可能となり、リガンド依存的なシグナルの化学シフト変化および消失が明確に観測可能となった。

シグナルの帰属は、4Met 変異体をベースに、さらにメチオニンを変異することによりおこなった。例えば、M82 由来のシグナルの帰属には、4Met/M82V 変異体のスペクトルを取得し、4Met 変異体のスペクトルと比較することによりおこなった。carazolol 結合状態の 4Met/M82V 変異体のスペクトルでは 2 個のシグナルが消失していたことから、M82 は carazolol 結合状態で、2 個のシグナルを与えることがわかった (図 90e)。以降、これらのシグナルを、M82D および M82U と呼ぶ。一方、formoterol 結合状態の 4Met/M82V 変異体のスペクトルでは、1 個のシグナルが消失していた (図 90f)。このことから、M82 は formoterol 結合状態において、carazolol 結合状態とは異なる化学シフトに、1 個のシグナルを与えることがわかった。以降、このシグナルを M82A と呼ぶ。

M82 以外のメチオニンについても、同様に 1 残基ずつ変異をおこなうことによりシグナルを帰属した (図 90)。各メチオニンのシグナルの特徴について表 4 にまとめる。

各メチオニンについて、carazolol 結合状態と formoterol 結合状態の化学シフト差をプロットすると、M82、M215、M279 でリガンド依存的に大きな化学シフト変化、またはシグナルの広幅化による消失が観測されることがわかった (図 91)。M82、M215、M279 は結晶構造解析において、活性化にともない大きく構造変化する領域に位置する残基である (図 89)。このことは、今回観測されたリガンド依存的なスペクトル変化が、活性化にともなう β_2 AR の構造変化を反映することを意味している。このうち、

M82 は formoterol 結合状態でも、高感度でシグナルが観測されたことから、まず M82 に注目することとした。

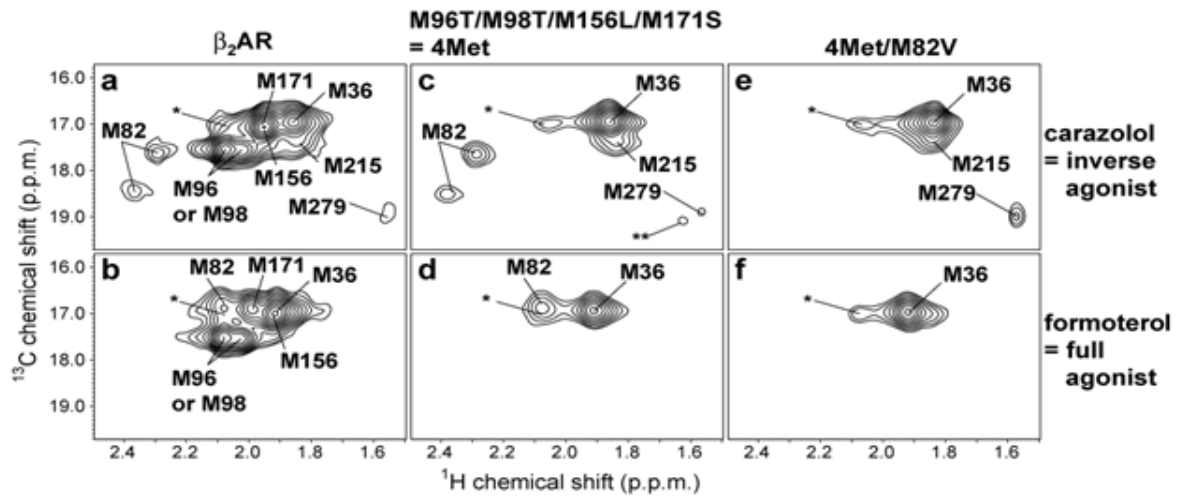


図 90 メチオニンメチル基を選択的に ^{13}C 標識した $\beta_2\text{AR}$ の ^1H - ^{13}C HMQC スペクトル (a, b) 野生型、(c, d) M96T/M98T/M156L/M171S (=4Met) 変異体、(e, f) 4Met/M82V 変異体、(a, c, e) inverse agonist (carazolol) 結合状態 (b, d, f) full agonist (formoterol) 結合状態 (*は不純物由来)

表 4 $\beta_2\text{AR}$ のメチオニンシグナルの挙動

	N38	N40	N82	N98	N98	N158	N171	N215	N279
$\beta_2\text{AR}$ の構造上の位置									
2次構造ユニット	TN1	TN1	TN2	TN2	EGL1	TN4	TN4	TN5	TN8
細胞外側 (E)	E	E	E	E	E	I	E	I	I
または細胞内側 (I)									
活性化による構造変化	No	No	Yes	No	No	No	No	Yes	Yes
観測されたシグナル数									
carazolol	1	0	2	1	1	1	1	1	1
alprenolol	1	0	2	1	1	1	1	1	1
tulobuterol	1	0	1	1	1	1	1	1	1
clenbuterol	1	0	1	1	1	1	1	1	1
formoterol	1	0	1	1	1	1	1	0	0
efficacy 依存的な変化									
化学シフト	No* ¹	-	Yes	No* ¹	No* ¹	No* ¹	No* ¹	Yes	Yes
シグナル強度	No	-	Yes* ²	No	No	No	No	Yes* ³	Yes* ³

*¹ 化学シフト変化 < 0.1 p.p.m.

*² 平衡に依存した複雑な変化

*³ carazolol > alprenolol > tulobuterol > clenbuterol

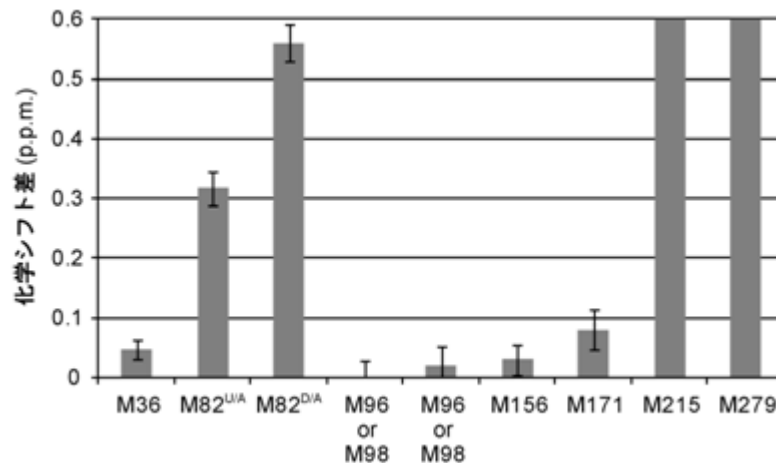


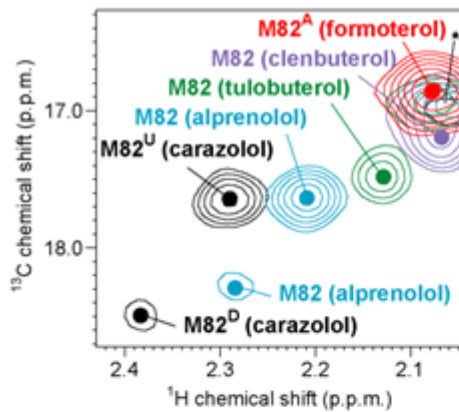
図 91 Full agonist 結合状態と inverse agonist 結合状態の化学シフト差

Full agonist (formoterol) 結合状態と inverse agonist (carazolol) 結合状態の各メチオニンメチルシグナルの化学シフト差を $\Delta\delta = \{(\Delta\delta_{1H})^2 + (\Delta\delta_{13C}/3.5)^2\}^{0.5}$ で算出した。M215 と M279 は full agonist 結合状態で観測されなかったが、inverse agonist と partial agonist (clenbuterol) 結合状態の化学シフト差は 0.1 p. p. m. 以上であった。

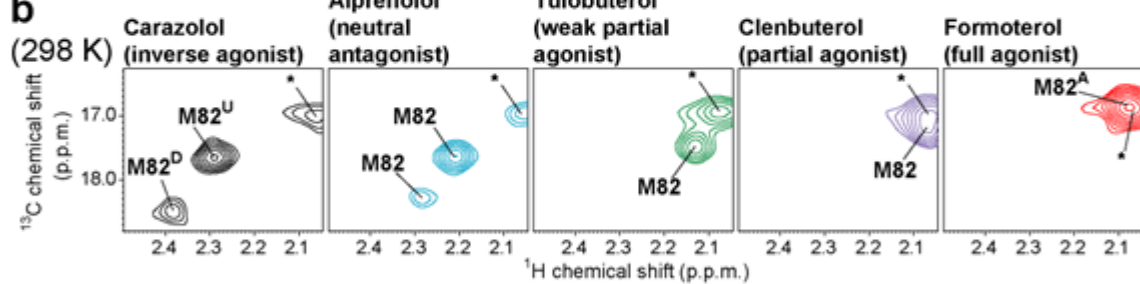
Neutral antagonist および partial agonist 結合状態の M82 由来シグナルの変化

リガンドにより efficacy が異なる機構を明らかにするため、さらに alprenolol (neutral antagonist)、tulobuterol、clenbuterol (いずれも partial agonist) 結合状態について、M82 のシグナルの変化を解析した (図 92a,b)。その結果、これらの状態では、carazolol 結合状態と formoterol 結合状態の中間的な化学シフトに、シグナルが観測された。また、今回解析したリガンドの efficacy の順は、carazolol < alprenolol < tulobuterol < clenbuterol < formoterol であるが、M82 のシグナルもこの順に連続的な化学シフトを与えることがわかった。

a (298 K)



b



c

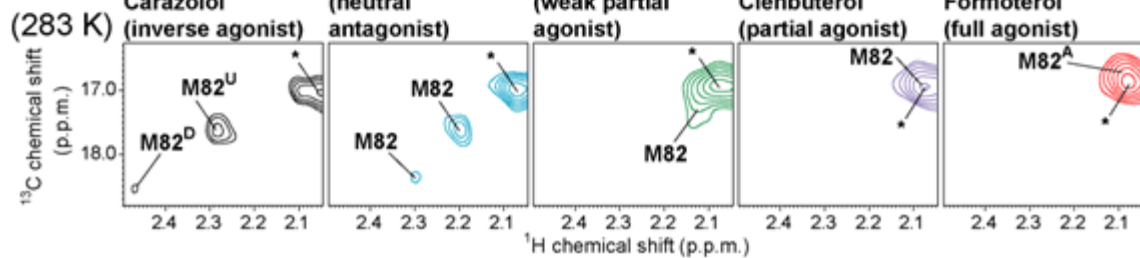


図 92 様々な efficacy を有するリガンド結合状態での M82 のシグナルの変化

(a, b) 298 K および (c) 283 K における各リガンド存在下での 4Met 変異体の ^1H - ^{13}C HMQC スペクトル (M82 を含む領域のみ、(a) は各リガンドスペクトルの重ね合わせ) (*は不純物由来) (黒) carazolol (シアン) alprenolol (緑) tulobuterol (紫) clenbuterol (赤) formoterol

この M82 のリガンド依存的なシグナル変化は、4Met 変異体を入れていない $\beta_2\text{AR}$ においても観測された (図 93)。このことから、観測されたシグナル変化に対する 4Met 変異の影響はなく、野生型 $\beta_2\text{AR}$ の efficacy を反映して M82 の化学シフトが変化すると結論した。

このような M82 のリガンド依存的なシグナル変化が、化学シフトの異なる複数の状態の交換により生じている可能性について解析するため、測定温度を 298 K から 283 K に下げて、各リガンド結合状態の NMR スペクトルを測定した。その結果、特に partial agonist 結合状態について、温度依存的な M82 の化学シフト変化が顕著に観測された (図 92c)。このことは、少なくともこれらの状態において、M82 のシグナルが化学シフトの異なる複数の状態の交換の影響を受けていることを示している。

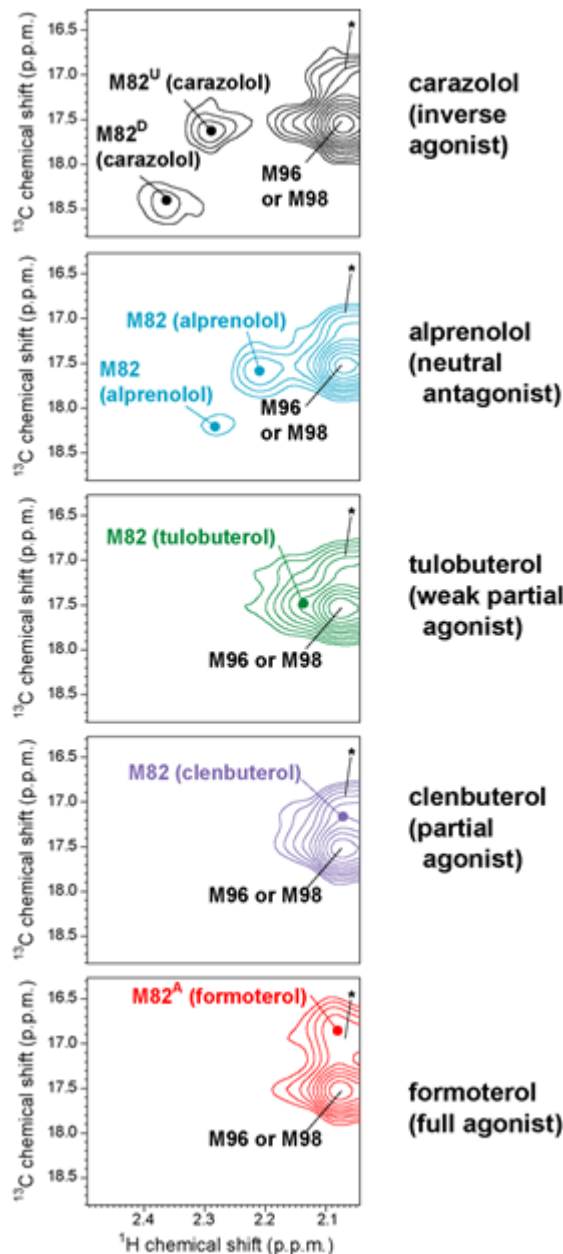


図 93 4Met 変異を有さない β_2 AR のスペクトル 298 K における $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ HMQC スペクトル
 (M82 を含む領域のみ) (*は不純物由来) (黒) carazolol (シアン) alprenolol (緑) tulobuterol (紫) clenbuterol (赤) formoterol

M215 および M279 由来シグナルのリガンド依存的な変化

細胞内側に近い領域に存在する M215 は、carazolol、alprenolol、tulobuterol、clenbuterol 結合状態では 1 個のシグナルを与える一方で、formoterol 結合状態では、広幅化により観測されなかった (図 94a,b)。観測されたシグナルは、efficacy の順に連続的な化学シフトを与えており、また、efficacy が高いほど、そのシグナル強度は低かった (carazolol > alprenolol > tulobuterol > clenbuterol)。温度を 298 K から 283 K に下げるにともない、carazolol および alprenolol 結合状態の M215 のシグナルが有意に化学シフト変化したことから (図 95)、M215 のシグナルについても、化学シフトの異なる複数の状態間の交換が影響していることが示唆された。

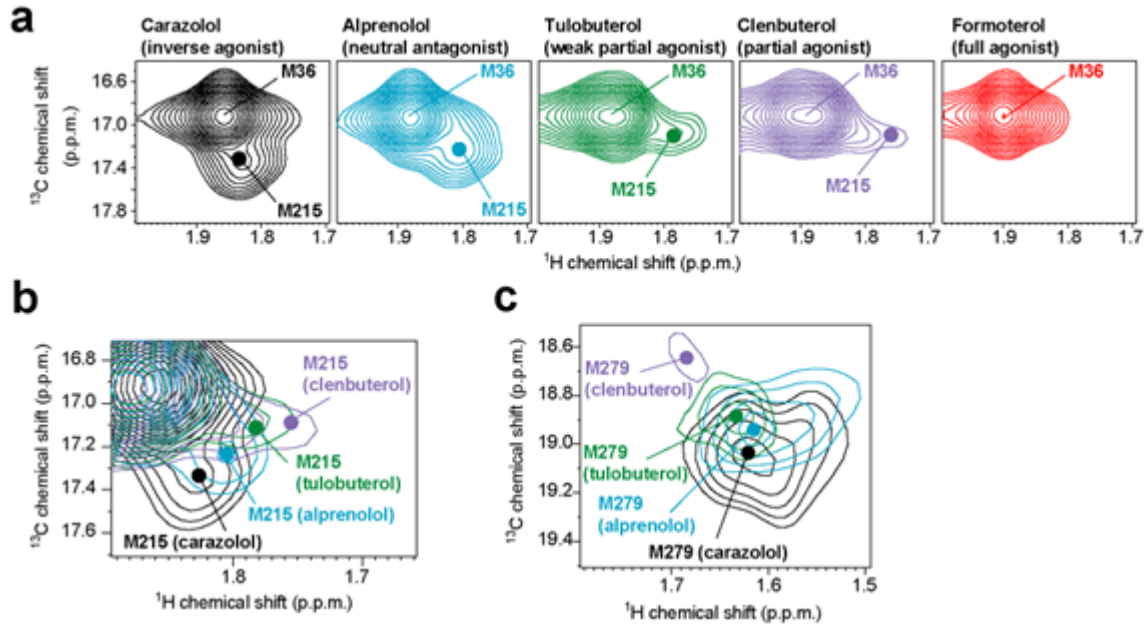


図 94 様々な efficacy を有するリガンド結合状態での M215・M279 のシグナルの変化

(a, b) 298 K における各リガンド存在下での 4Met 変異体の ^1H - ^{13}C HMQC スペクトル (a, b) M215 を含む領域 (c) M279 を含む領域 ((a) は formoterol を除く各リガンドスペクトルの重ね合わせ) (黒) carazolol (シアン) alprenolol (緑) tulobuterol (紫) clenbuterol (赤) formoterol

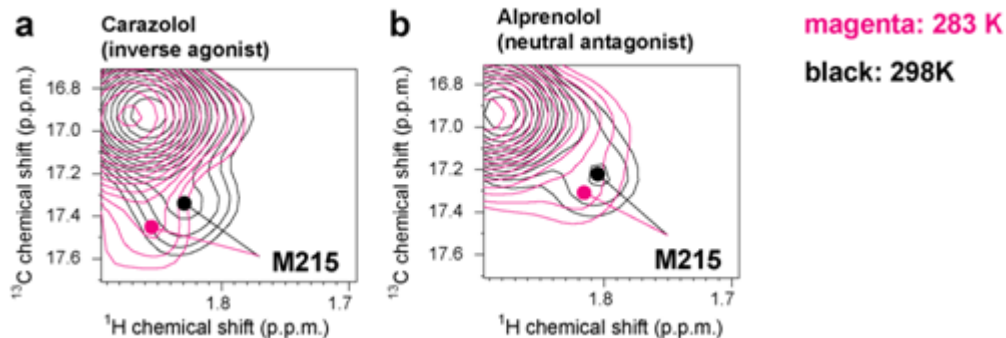


図 95 M215・M279 由来 NMR シグナルの温度依存的な変化

(a) carazolol (b) alprenolol 結合状態の 4Met 変異体の ^1H - ^{13}C HMQC スペクトル (黒) 298 K (マゼンタ) 283 K のスペクトルの重ね合わせ

$\text{M82}^{\text{D}} \cdot \text{M82}^{\text{U}} \cdot \text{M82}^{\text{A}}$ の化学シフトに対応する $\beta_2\text{AR}$ の conformation

メチオニン methyl の ^1H の化学シフトは、環電流効果を含む周囲の環境と、 χ^3 -二面角に強く依存することが知られている。一方で、メチオニン methyl の ^{13}C の化学シフトは、 χ^3 -二面角に強く依存し、 χ^3 が約 ± 60 度 (gauche) のときは約 16 p.p.m.、 χ^3 が約 180 度 (trans) のときは約 19 p.p.m.、両方をとりうる場合はその量比に応じて中間的な化学シフトをとることが知られている。今回、観測された M82 の ^1H および ^{13}C の化学シフトの特徴を、既知の結晶構造と比較すると、 M82^{U} は inverse agonist である carazolol 結合状態の結晶構造の特徴に、 M82^{D} は別の inverse agonist である timolol 結合型の結晶構造の特徴に、それぞれよく一致することがわかった (表 5 の 2,3 列目)。一方、 M82^{A} の化学シフトの特徴は、full agonist および G タンパク質結合状態の結晶構造のに対応することがわかった (表 5 の 4 列目)。このことから、 M82^{D} および M82^{U} は G タンパク質を活性化できない不活性化状態に、 M82^{A} は G タンパク質を活性化できる活性化状態に対応すると結論した。

表 5 β_2 AR の結晶構造における M82 周辺の特徴と観測された M82 の化学シフトの対応

	β_2 AR/timolol	β_2 AR/carazolol	β_2 AR/BI-167107/Gs
PDB code	3D4S (文献8)	2RH1 (文献3)	3SN8 (文献4)
リガンド	inverse agonist	inverse agonist	agonist
conformation	inactive	inactive	active
M82 の ϕ 二面角(度)	185 (<i>trans</i>)	-95 (<i>gauche</i>)	83 (<i>gauche</i>)
M82 メチル基の相互作用残基	D113 ^S ** (O ·), Y117 ^S ** (H ·), W288 ^E ** (H ·), Y318 ^T ** (H ·, H ·)	Y318 ^T ** (H ·, H ·), S319 ^T ** (H ·)	G118 ^S ** (O, Hp), S319 ^T ** (H ·, O ·)
構造から計算した M82 の ¹ H 化学シフト値* ¹	2.88 p.p.m.	2.35 p.p.m.	2.25 p.p.m.
対応する M82 由来シグナルの観測された ¹ H 化学シフト値	2.4 p.p.m. (M82 ^D)	2.3 p.p.m. (M82 ^U)	2.1 p.p.m. (M82 ^A)
対応する M82 由来シグナルの観測された ¹³ C 化学シフト値	18.5 p.p.m. (主に <i>trans</i>)	17.8 p.p.m. (<i>gauche/trans</i> の両方)	16.8 p.p.m. (主に <i>gauche</i>)

*¹ 環電流効果の影響をメチオニンの標準的な化学シフト (2.13 p.p.m.) に加えたもの

M82 由来シグナルのリガンド依存的な変化と β_2 AR の構造平衡

今回、解析した efficacy の異なる 5 種類のリガンドについて、膜貫通領域中央部の M82 の methyl シグナルの化学シフトは、efficacy 依存的に連続的に変化した (図 92a,b)。また、partial agonist 結合状態について、温度依存的な化学シフト変化が観測された (図 92c)。このことを合わせると、M82^D、M82^U、および M82^A に対応する 3 つの conformation の間に平衡が存在し、その平衡が、リガンド依存的に変化していると考えるのが妥当である。

そこで、M82^D、M82^U、および M82^A に対応する 3 つの conformation 間の交換を仮定した上で、今回観測されたスペクトルが再現できるかを、シミュレーションすることとした。その結果、リガンド依存的な変化 (図 96) および温度依存的な変化 (図 97) について、シミュレーションのスペクトルの特徴は、実際に観測されたスペクトルと非常によく一致した。このことは、観測された M82 由来シグナルのリガンド依存的、温度依存的な変化が M82^D、M82^U、および M82^A に対応する 3 つの conformation 間の平衡を反映していることを強く支持する。

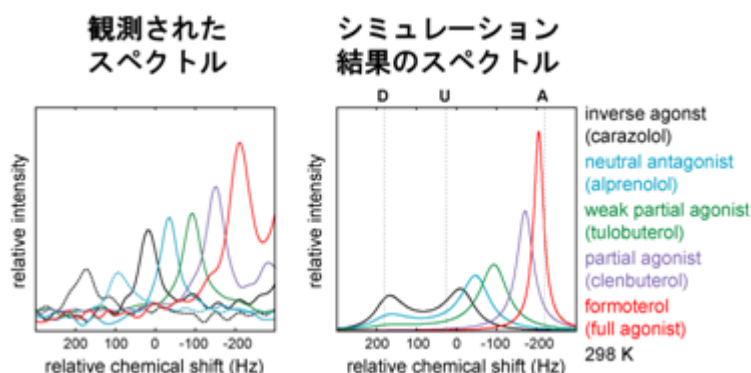


図 96 M82 由来シグナルのリガンド依存的な変化のシミュレーション(左パネル) 実際に観測された 4Met 変異体の ¹H-¹³C HMQC の切り出し (¹H と ¹³C の両方の化学シフトを反映するように表示した) (右パネル) M82^D、M82^U、M82^A に対応する conformation の平衡を仮定してシミュレーションしたスペクトル (黒) carazolol (シアン) alprenolol (緑) tulobuterol (紫) clenbuterol (赤) formoterol

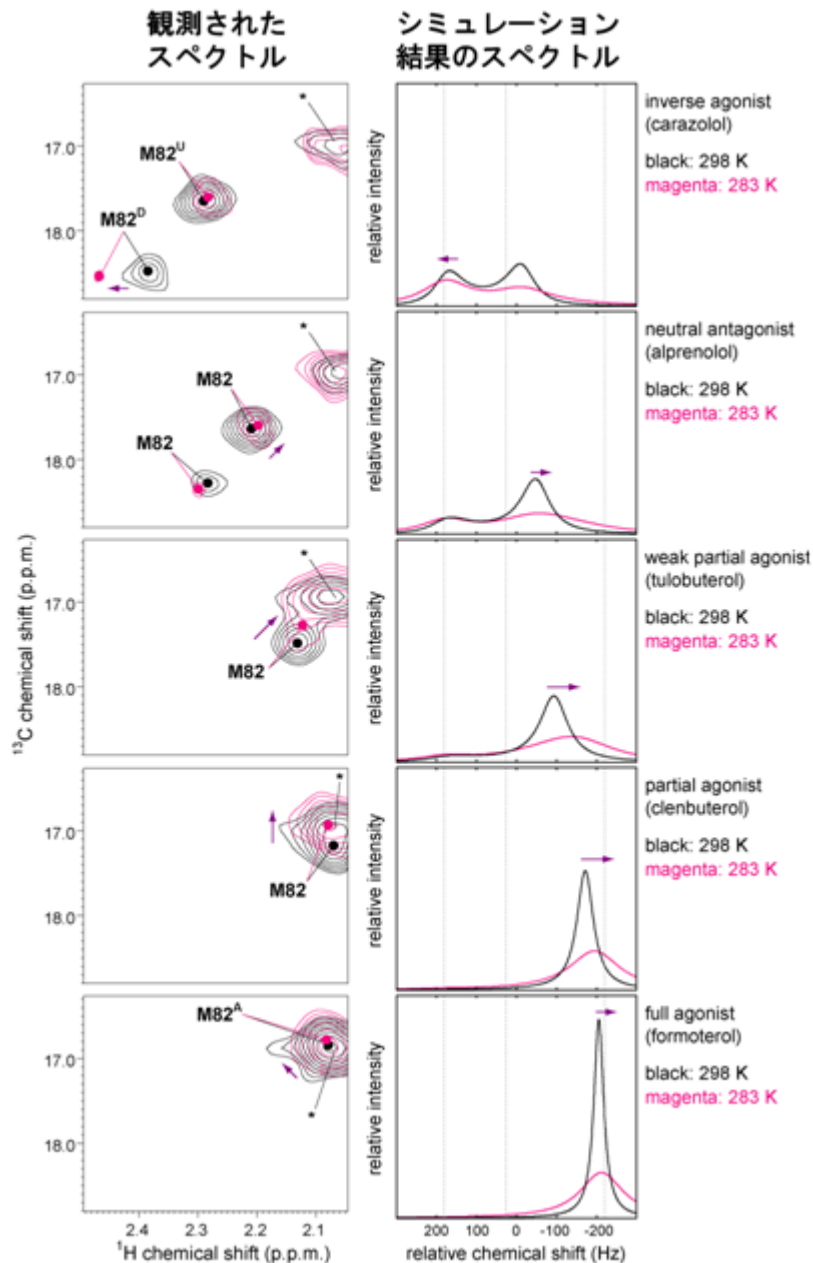


図 97 M82 由来シグナルの温度依存的変化のシミュレーション(左パネル) 実際に観測された 4Met 変異体の ^1H - ^{13}C HMQC(右パネル) M82^D、M82^U、M82^Aに対応する conformation の平衡を仮定してシミュレーションしたスペクトル各リガンド結合状態における(黒) 298 K (マゼンタ) 283 K のスペクトルの重ね合わせ矢印は温度を低下させたときの化学シフト変化の方向を示す

M215・M279 由来シグナルのリガンド依存的な変化と $\beta_2\text{AR}$ の構造平衡

細胞内側に近い領域に存在する M215 および M279 についても、efficacy 依存的な化学シフト変化およびシグナル強度変化が観測されていること、また、M215 に温度依存的な化学シフト変化が観測されていることから、細胞内領域にも M82 近傍と同様な複数の conformation 間の平衡が存在するといえる。

そこで、上述の M82 由来シグナルのシミュレーションと同じパラメータを仮定した上で、M215 のシグナルのシミュレーションをおこなった。その結果、リガンド依存的な変化(図 98)および温度依存的な変化(図 99)の特徴は、いずれも実際に観測されたスペクトルとよく一致した。このことは、M215 のリガンド依存的、温度依存的なシグナル変化も、M82^D、M82^U、および M82^A に対応する 3 つの conformation 間の平衡で説明可能であることを意味する。したがって、M82 のシグナルで観測されたこの平衡は、M82 周辺領域だけでなく、シグナル伝達に重要な細胞内領域を含めた $\beta_2\text{AR}$ 分子全体にわたると考えるのが妥当である。

M215 および M279 は inverse agonist 結合状態で 1 個のシグナルのみを与えることから、M82^D および M82^U に対応する conformation の違いは、M82 周辺を含む β_2 AR 分子の一部に限られている。一方で、M215 および M279 のシグナルは full agonist 結合状態で観測されていないことから、M82A に対応する活性型の conformation においては、細胞内側にミリ秒スケールで運動する複数の状態間の交換が存在することがわかる。 β_2 AR を含む GPCR は、細胞内側において、G タンパク質、G タンパク質受容体キナーゼ、アレスチンなどの複数のシグナル伝達タンパク質と相互作用することが知られている。この活性型 conformation における細胞内側の運動性は、様々なシグナル伝達タンパク質と相互作用する上で重要な役割を果たしていると考えられることができる。

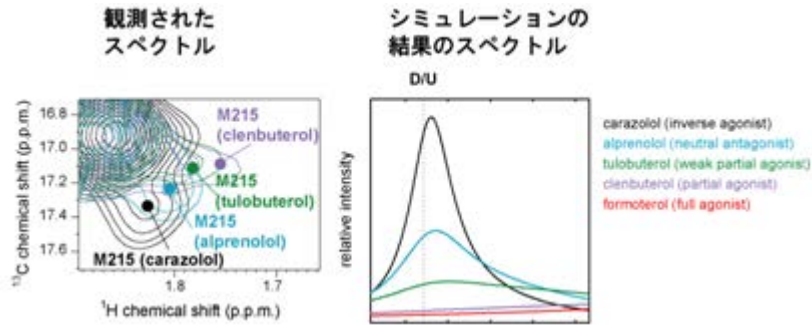


図 98 M215 由来シグナルのリガンド依存的変化のシミュレーション

(左パネル) 実際に観測された 4Met 変異体の ^1H - ^{13}C HMQC (右パネル) M82^D、M82^U、M82^A に対応する conformation の平衡を仮定してシミュレーションしたスペクトル (黒) carazolol (シアン) alprenolol (緑) tulobuterol (紫) clenbuterol (赤) formoterol

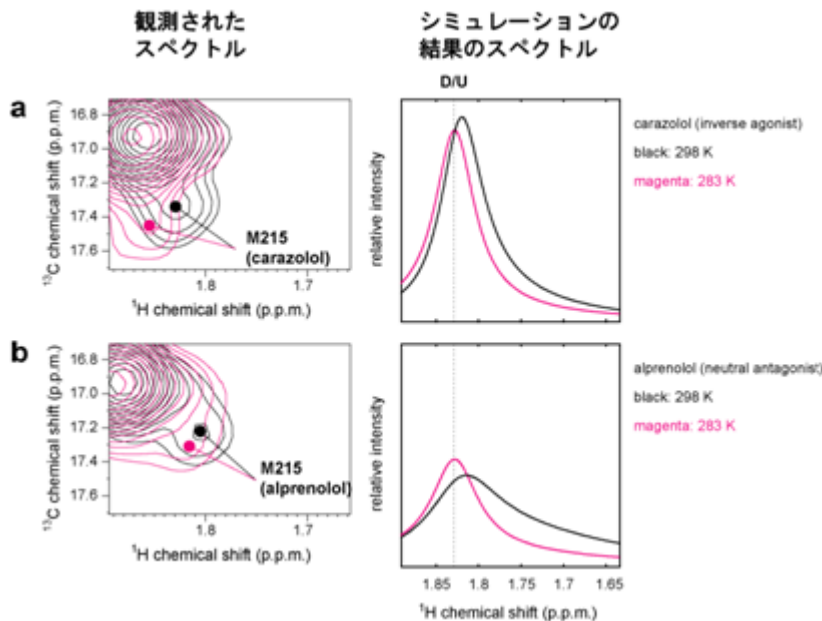


図 99 M215 由来シグナルの温度依存的変化のシミュレーション

(左パネル) 実際に観測された 4Met 変異体の ^1H - ^{13}C HMQC (右パネル) M82^D、M82^U、M82^A に対応する conformation の平衡を仮定してシミュレーションしたスペクトル 各リガンド結合状態における (黒) 298 K (マゼンタ) 283 K のスペクトルの重ね合わせ

リガンドごとに efficacy が異なる機構

今回の NMR 解析の結果から、リガンドごとに efficacy が異なる機構を、以下のように説明することができる。full agonist 結合状態では、 β_2 AR はほぼ M82^A に対応する活性型 conformation にあり、最大のシグナル伝達活性を示す (図 100a)。Partial agonist 結合状態では、主に M82^U に対応する不活性型 conformation と、M82^A に対応する活性型 conformation の平衡にあり、後者の割合が高いほど、より高いシグナル伝達活性を示す (図 100b)。neutral antagonist 結合状態では、M82^D、M82^U、M82^A に対応す

る3つの conformation の平衡にあり、わずかに存在する活性型 conformation によって、basal 活性と呼ばれる弱いシグナル伝達活性が発揮される (図 100c)。Inverse agonist 結合状態では主に M82^D、M82^U に対応する不活性型 conformation をとり、ほとんどシグナル伝達活性を示さない (図 100d)。実際に上述のシミュレーション解析により見積もられた、各リガンド結合状態における M82^A に対応する活性型 conformation の割合は、実験的に求められたシグナル伝達活性 (9) とよく相関していた (図 101)。このことは、M82^A に対応する活性型 conformation の割合により、各リガンドの efficacy が決定されていることを示している。

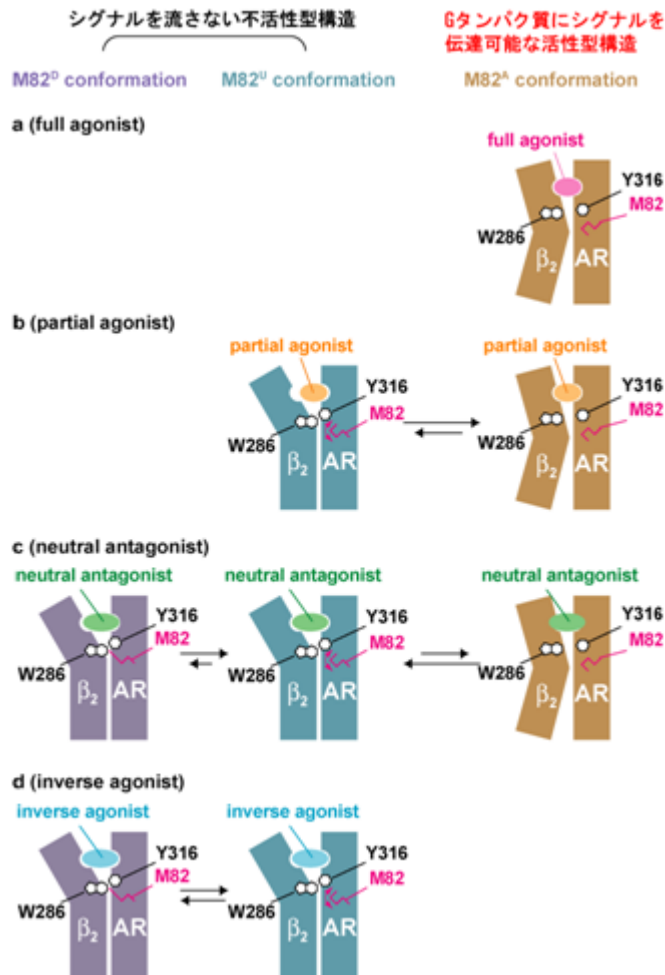


図 100 リガンドごとに efficacy が異なる機構

(a) full agonist (b) partial agonist (c) neutral antagonist (d) inverse agonist 結合状態の β_2 AR における M82^D、M82^U、M82^A に対応する conformation の平衡を模式図で示した。

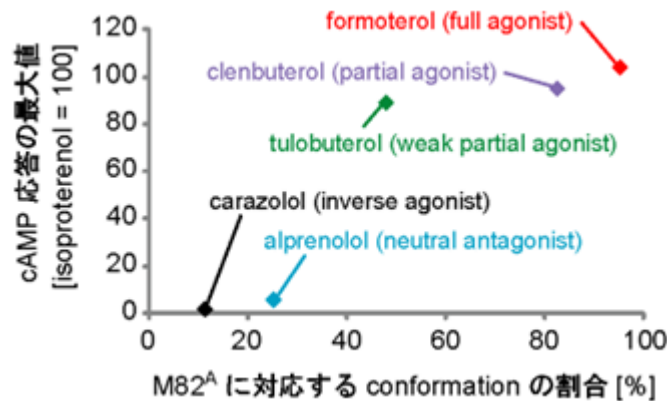


図 101 M82^A に対応する conformation とシグナル伝達活性の相関横軸にシミュレーションから見積も

られた M82^A に対応する conformation の割合を、縦軸に細胞を用いたアッセイで見積もられたシグナル伝達活性の強度をプロットした。

これまでに、partial agonist および neutral antagonist 結合状態で、inverse agonist と full agonist の中間のシグナル伝達活性が発揮される機構として、(1) 活性化状態と不活性化状態の平衡と (2) partial agonist 結合状態などに特有の conformation の存在、の 2 とおりの機構が提唱されていた。本研究は、β₂AR の膜貫通領域の運動性を NMR により直接解析することにより、β₂AR が M82^D、M82^U に対応する不活性化状態と、M82^A に対応する活性化状態の間の平衡にあることを示した。これにより、inverse agonist、neutral antagonist、partial agonist、full agonist のシグナル伝達活性の違いは、平衡における活性化状態の割合の違いに起因することが明らかとなった。

今回、M82・M215・M279 をプローブとして解析した膜貫通領域の構造変化様式は、アデノシン A_{2A} 受容体やロドプシンなど、他の GPCR でも共通していることが結晶構造解析により明らかとされている。したがって、本研究で明らかにした、不活性型および活性型 conformation の平衡により、efficacy が決定される機構は他の多くの GPCR についても共通していると考えるのが妥当である。本研究では、昆虫細胞発現系を用いてメチオニンメチル基選択的な ¹³C 標識をおこない、β₂AR の膜貫通領域のメチオニンメチル基を NMR により観測する方法を確立した。メチオニン残基は、GPCR において活性化にともない大きく構造変化する第 3/5/6 膜貫通ヘリックスに多く存在しており (図 102)、例えば、M215 に対応するメチオニンは、嗅覚受容体を除いた 293 個のクラス A GPCR のうち、約 30 % で保存されている。このようなプローブを利用して、同様の方法により解析をおこなうことで、他の GPCR についても、efficacy 依存的な conformation の違いを解析することや、未知のリガンドの efficacy を定量的に解析することが可能となると期待できる。

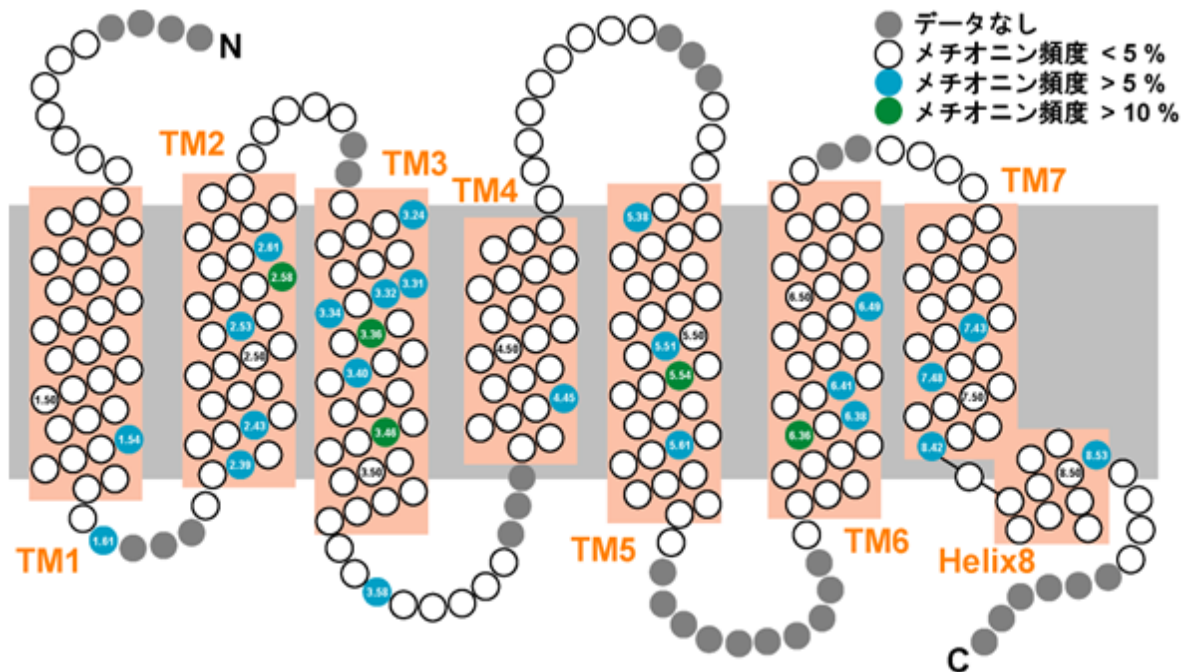


図 102 GPCR におけるメチオニンの出現頻度

嗅覚受容体を除く 293 個のクラス A GPCR について、各位置のメチオニンの出現頻度を解析し、5 % 以上で出現する位置を青、10 % 以上で出現する位置を緑で示した。数字は Ballousteros-Wenistein 番号 (各ヘリックスで最も保存された残基を x50 で表したものを) を示す。データは GMOS web interface (<http://lmc.uab.cat/gmos>) にて算出。

(6) 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 (三菱化学分室)

① 最適な NMR 測定溶液条件の検討法の確立

本タンパク質 NMR 溶液条件スクリーニング系の概要と特徴を図 103 に記す。本スクリーニング系は、1) タンパク質の巨視的沈殿の有無を観察する 2 段階のマイクロプレートスクリーニング、2) 分子凝

集の有無を動的光散乱で確認、3) 選択された溶液条件で NMR スペクトルを測定、という 3 段階の作業から成る。

第 1 段階のプレートスクリーニングには、タンパク質の結晶化条件検討用に設計された装置類を巨視的沈殿の観察に使用した。多品種調液装置により 100 種類のストック溶液から 0.5–100 μL の任意の量を 0.1 μL 刻みで分注・混合でき、例えば、96 種類の異なる条件の溶液を 96 穴マイクロプレートに 50 μL ずつ調製するのに要する時間は約 15 分であった。また、微量分注装置でタンパク質溶液 100nL と 96 条件の試験溶液 900nL をそれぞれ混合するのに要する時間は約 3 分であった。さらに、自動観察装置で数時間おきにマイクロプレートのウェル写真を撮影した。上記のように、多品種のタンパク質試験溶液を短時間で調製し、それら溶液の経時変化を観察する工程は自動化されており、人が介入する必要が殆どない。一方、しばしば NMR シグナルのブロードニングの原因となる分子凝集は、第 1 段階の巨視的沈殿の観察では検出できない。そこで、NMR 測定の前に、第 2 段階として分子凝集の有無を動的光散乱測定により評価した。

文献情報等を基に暫定ワークフローを構築し、ヒト ZIPK をテスト試料としてスクリーニング溶液条件、自動観察装置に対応したプレート種類、インキュベーション温度、インキュベーション中の蒸発防止対策、プレート観察方法、動的光散乱結果の判定基準値等を詳細に検討し、スクリーニングのワークフローを下記のように決定した。

- ・ 濃縮タンパク質溶液 100nL を 96 ウェルプレートの各ウェルへ撒き、pH 4.5-8, 様々なバッファース種と塩の種類、塩濃度のリザーバー溶液 900nL/well と混合する。
- ・ プレートを遠心し、ウェル内の液滴を均一な形状にした後、蒸発防止のため液面へシリコンオイル 10cst を 5 μL 重層する。
- ・ プレートを 25°C から段階的に昇温し、自動観察装置を用いて沈殿の有無を観察する。判断が困難な場合は光学顕微鏡により目視観察する (図 104)。
- ・ 1st プレートスクリーニングの結果から、より詳細に条件検討するための 2nd プレートスクリーニング条件を決定し、同様の方法でスクリーニングする。
- ・ 沈殿が見られなかった条件で動的光散乱を測定する。
- ・ 動的光散乱測定の結果良好な単分散 (%PD15% 以下、強度 80% 以上、多量体形成率 %Mass で 0%) が得られた条件で HSQC 測定を行う。



図 103 タンパク質 NMR 溶液条件スクリーニング系

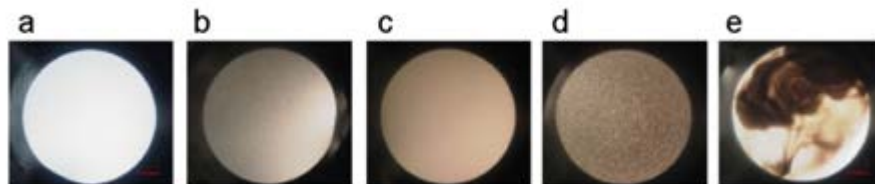


図 104 マイクロプレートのウェル写真

(a) 沈殿なし、(b)–(e) タンパク質の沈殿量に応じて光の透過量が減少する。
ウェルの直径は 1.5 mm。

上記ワークフローに従い、分泌タンパク質 Lysozyme, Ribonuclease A, Pepsin, TNF α のスクリーニングを実施した。これらのタンパク質は熱安定性が高く、30°C 近辺では全てのスクリーニング条件で沈殿

形成はみられなかったが、60℃まで昇温してスクリーニングを行うと良好な単分散を与える溶液条件が見出せることが判明した。非分泌蛋白である ZIPK および PTP1B では 30℃のスクリーニングにより良好な分散性を与える溶液条件を見出し、その条件下での HSQC を測定したところ、良好なスペクトルが得られた (図 105)。

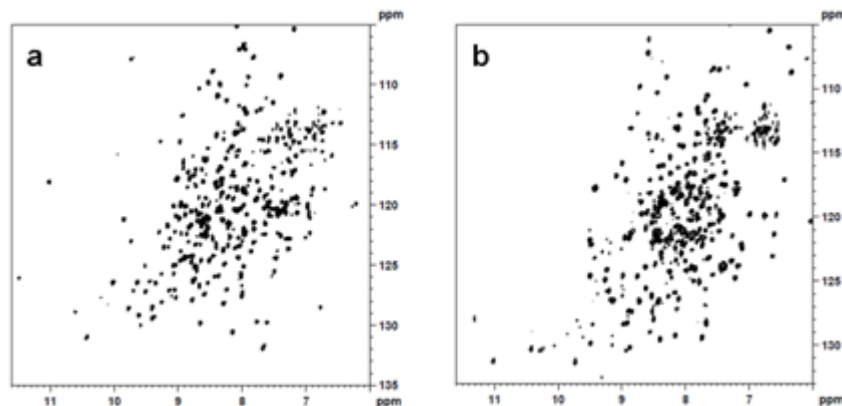


図 105 ^{15}N , ^2H -均一標識 ZIPK の ^1H - ^{15}N 相関スペクトル
(a) ZIPK、(b) PTP1B

② リガンド観測 NMR 測定用重水素化ヒト ZIP kinase (ZIPK) 及びアミノ酸選択水素化 ZIPK 調製法の確立

小麦胚芽無細胞タンパク質合成系による非ラベル ZIPK の合成検討を行った結果、アフィニティ精製タグとして GST タグを用いた場合、N 末端 His10 タグに比べて精製収量が約 3 倍高かったため、重水素化 ZIPK 合成系として GST タグ付加に決定した (図 106)。

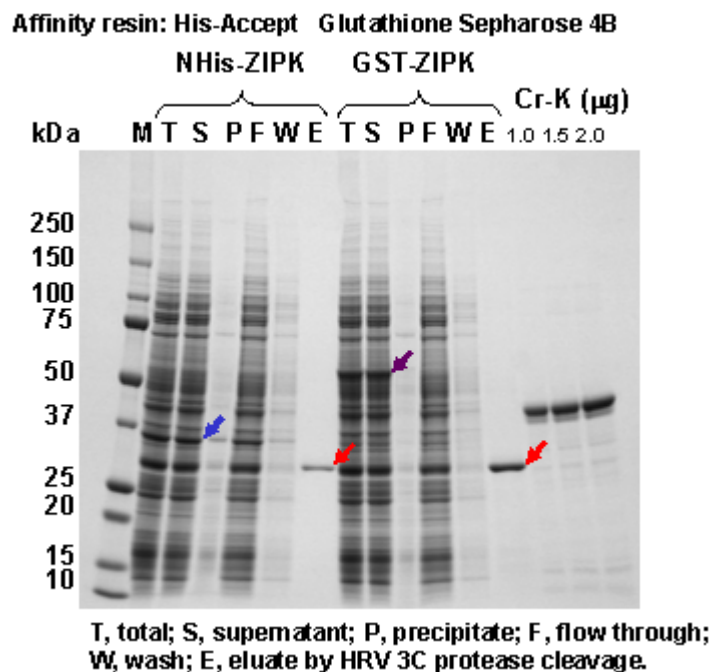


図 106 小麦胚芽無細胞タンパク質合成系による非ラベル ZIPK の合成及び精製検討

青矢印は His10-ZIPK、紫矢印は GST-ZIPK、
赤矢印はオンカラムでの HRV3C プロテアーゼ切断によりレジンから溶出した ZIPK を示す。

クロレラ工業製重水素化 Algal アミノ酸ミックス (D-Algal AA Mix) に不足分の重水素化 Asn, Gln, Cys, His, Trp, Tyr を添加して重水素化 GST-ZIPK を 20 mL スケールで大量合成及び精製を行った結果、高純

度の重水素化 ZIPK を得ることに成功し、MALDI-TOF MS による精密質量分析により重水素化率は 95.4%であった。ところが、一次元 $^1\text{H-NMR}$ 測定の結果、クロレラ工業製 D-Algal AA Mix を用いて合成した ZIPK の重水素化率は約 90%に止まった。陽性化合物 NL060456 の STD-NMR スペクトルの S/N 比は 1/4 程度の減弱に止まり不十分な結果であった。

そこで、原料の重水素化率が比較的高い Spectra 製 D-14AA Mix (95%) を用いて合成した場合、ZIPK の重水素化率は 93%に向上し、さらに原料の重水素化率 97%の CIL 製 D-16AA Mix を用いて合成した場合、ZIPK の重水素化率は 96%まで向上し、化合物の STD-NMR スペクトルはほとんど観測されないという良好な結果が得られた (図 107)。Cell-free 合成用 D-20AA Mix (>95%) を用いて合成した場合、ZIPK の重水素化率は 93%に止まったことから ZIPK の重水素化率は原料アミノ酸の重水素化率に依存することが判明した。

大腸菌生細胞発現系による 100%重水培地 (Spectra 9-d) を用いた重水素化 ZIPK の調製についても並行して行った結果、1 L の培養菌体から得られる重水素化 ZIPK の収量は $50\ \mu\text{g}$ と少なく、重水素化率は 92%であった。以上の結果より、重水素化率とタンパク合成コストを勘案して重水素化 ZIPK 発現系は小麦胚芽無細胞合成系に決定した。CIL 製 D-16AA Mix に 15N, D-二重標識 Asn, Gln, Cys, Trp, His を添加したものを D-AA Mix とし、各種非ラベルアミノ酸 (Val, Leu, Ile, Met, Lys, Ala) をそれぞれ終濃度 20 mM となるように無細胞タンパク質合成反応液に添加して重水素バックグラウンドの選択水素化 ZIPK の合成及び精製を行った結果、非ラベルアミノ酸無添加の場合と同等の合成量を確認し、10 mL の合成反応液から精製標品が 0.7~0.8 mg 得られた。

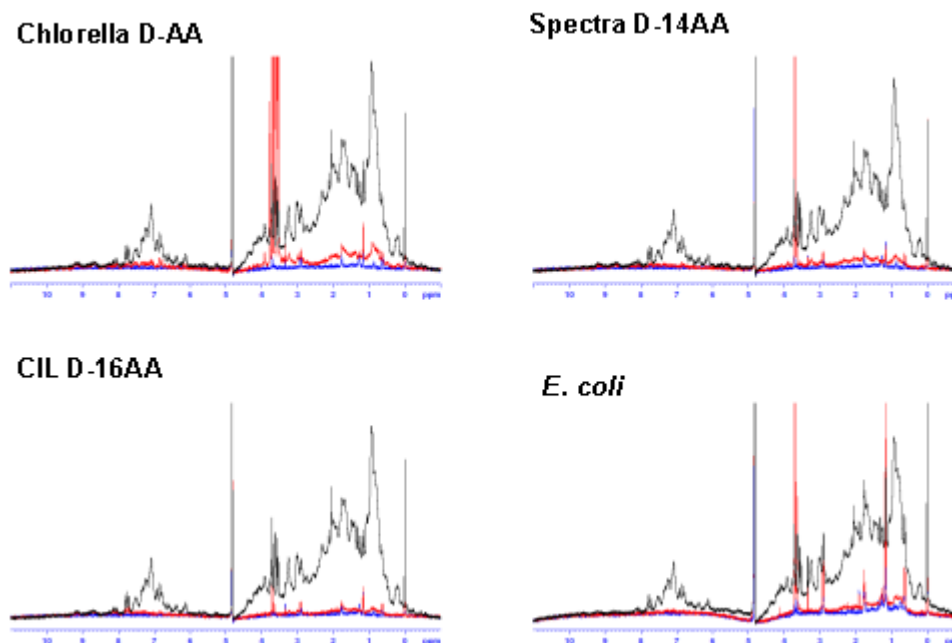


図 107 重水素化 ZIPK の $^1\text{H-NMR}$ スペクトル
黒が非ラベル ZIPK、赤が重水素化 ZIPK、青がバッファーのみの $^1\text{H-NMR}$ スペクトル

③ アミノ酸選択水素化タンパク質の調製

複合体結晶構造から阻害剤との相互作用が明らかな ZIPK のアミノ酸残基種として Val, Leu, Ile, Met, Lys, Ala を選択した。CIL 製重水素化 16 アミノ酸混合物 (D-16AA Mix) に重水素化 Asn, Gln, Cys, Trp, His (His のみ ^{15}N , D-二重標識) を添加したものを D-AA Mix とし、各種非ラベルアミノ酸をそれぞれ終濃度 20 mM となるように小麦胚芽無細胞タンパク質合成反応液に添加してアミノ酸選択水素化 ZIPK を合成・精製した (図 108)。その結果、アミノ酸選択水素化 ZIPK の精製収量は完全重水素化 ZIPK (D-ZIPK) および非ラベル ZIPK (H-ZIPK) の場合と同等であった (10 mL の反応液から精製標品 0.6~0.8 mg)。一方、アミノ酸選択水素化 ZIPK 調製の過程でアフィニティタグとして用いたグルタチオン S-トランスフェラーゼ (GST) についても、HRV3C プロテアーゼによる切断後、Resource Q カ

ラムにより精製し、10 mL の小麦胚芽無細胞タンパク質合成反応液から精製標品 1.4~1.8 mg を得た(図 109)。なお、GST の基質 (還元型グルタチオン) や阻害剤 (プラジカンテル) と相互作用していることが明らかなアミノ酸残基として Arg, Tyr, Trp を選択し、これらのアミノ酸選択水素化 GST も追加で合成・精製した。

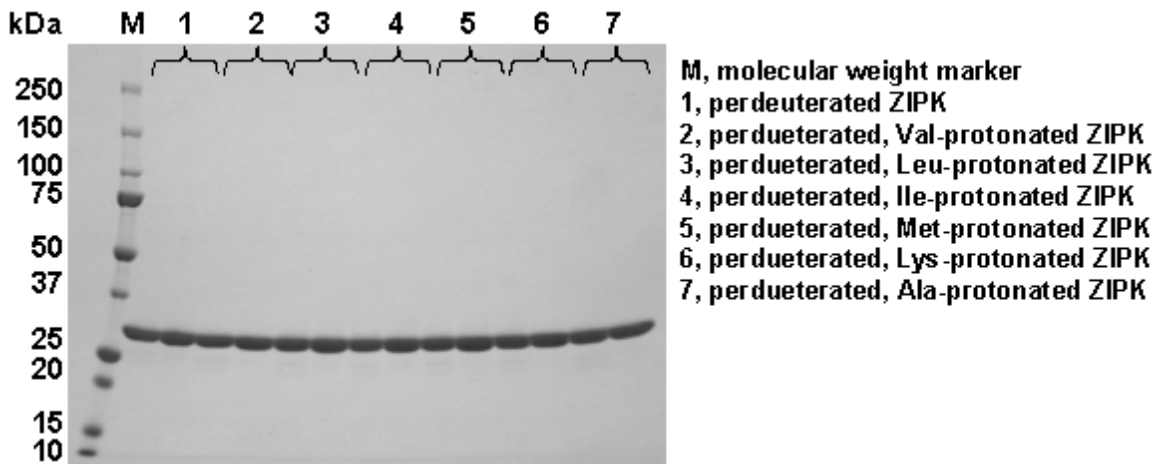


図 108 アミノ酸選択水素化 ZIPK の調製

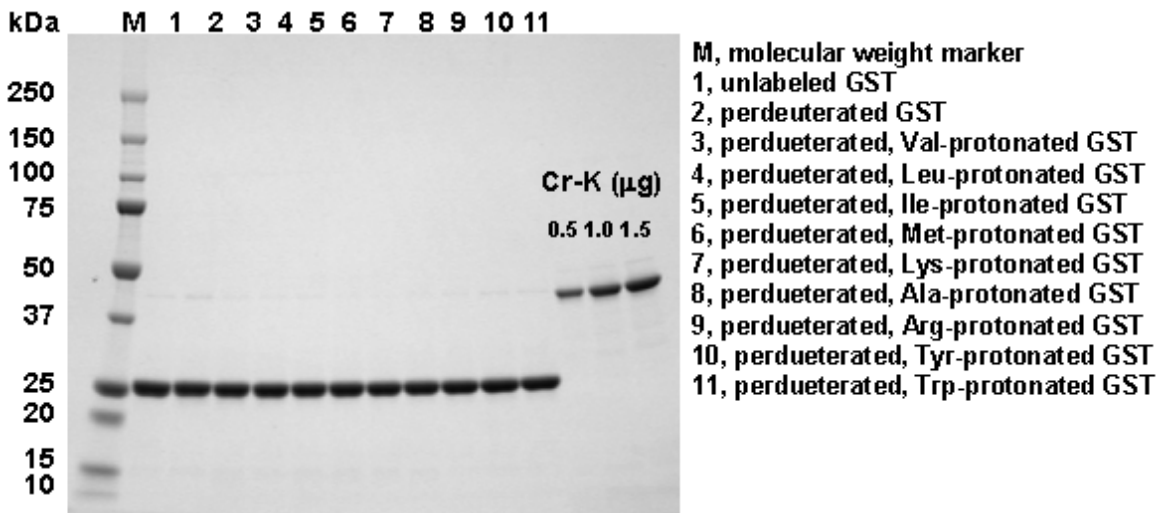


図 109 アミノ酸選択水素化 GST 調製

④ アミノ酸選択水素化タンパク質の $^1\text{H-NMR}$ 測定

6 種類のアミノ酸選択水素化タンパク質と、重水素化タンパク質および非ラベルタンパク質について、 $^1\text{H-NMR}$ スペクトルを測定した。その結果、アミノ酸選択水素化 ZIPK において、それぞれのアミノ酸に対応するプロトンのシグナルが確認され、目的通りのアミノ酸選択水素化タンパク質が合成されていることが判明した (図 110)。

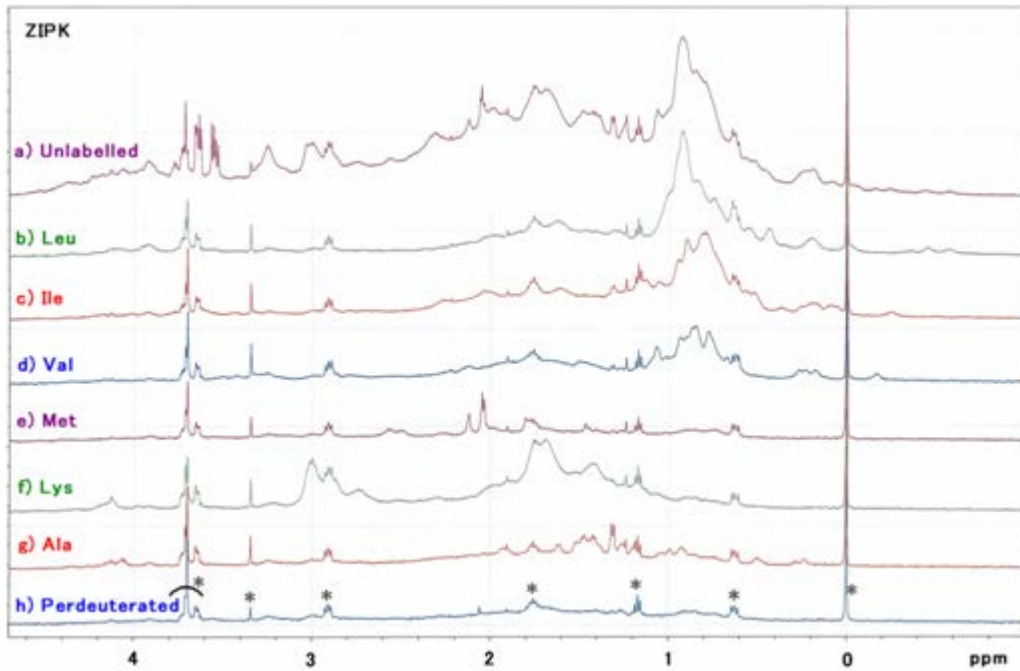


図 110 アミノ酸選択水素化 ZIPK の $^1\text{H-NMR}$ スペクトル

(a) 非ラベル ZIPK、(b) Leu 選択水素化 ZIPK、(c) Ile 選択水素化 ZIPK、(d) Val 選択水素化 ZIPK、(e) Met 選択水素化 ZIPK、(f) Lys 選択水素化 ZIPK、(g) Ala 選択水素化 ZIPK、(h) 重水素化 ZIPK
 * : バッファー由来、水消しは Watergate (3-9-19) 法を採用

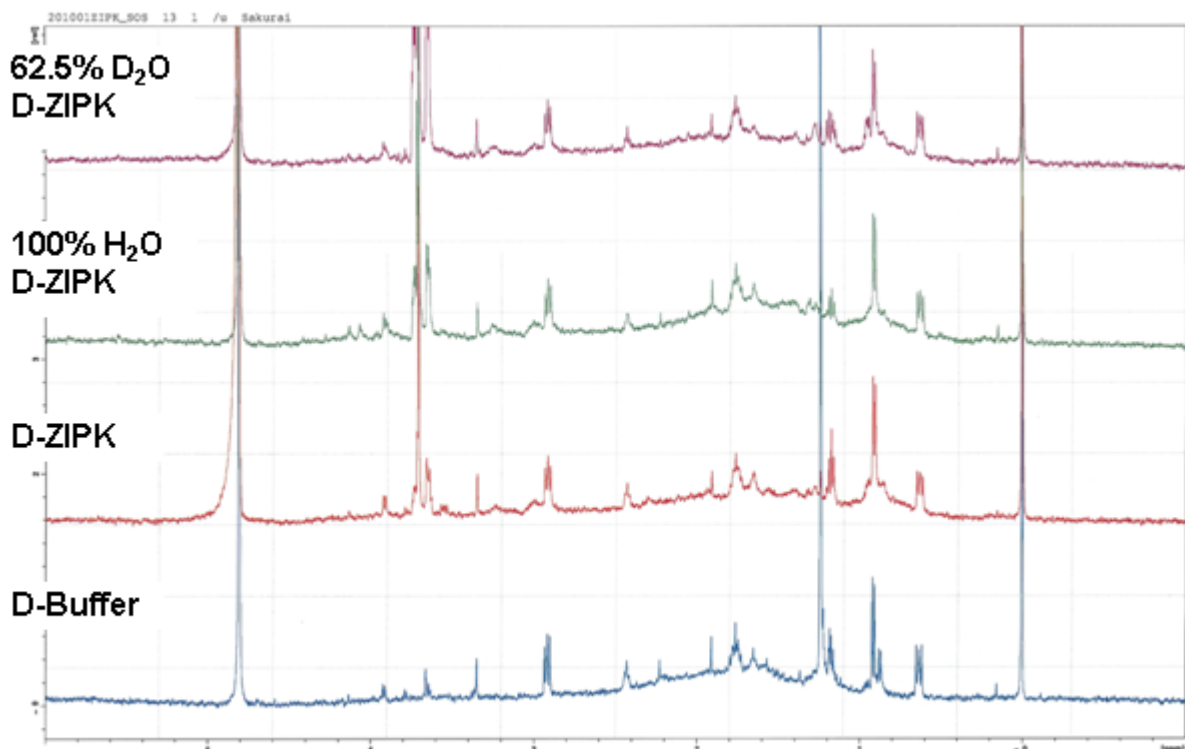


図 111 $^1\text{H-NMR}$ スペクトルによる重水中で無細胞合成した D-ZIPK の D 化率測定

⑤ 合成条件の異なるタンパク質の重水素化率 (D 化率) 測定

軽水中で無細胞タンパク質合成を行うことにより、一部の重水標識アミノ酸の H^α と H^β が back-protonation により ^1H に変わってしまうことが大腸菌無細胞タンパク質合成系で報告されており、

D 化率が低い原因と考えられた。そこで、小麦胚芽無細胞系でタンパク質を合成する際に、添加する MilliQ 水（軽水）を重水に変え（重水 62.5%）、軽水中で合成した ZIPK と D 化率を比較した。試料はいずれも Resource Q カラムクロマトグラフィーにより低イオン強度で溶出される P1 画分を用いた。なお、精密質量分析の結果、Resource Q の P1 画分は 2 リン酸化体（モノマー）、P2 画分は 1 リン酸化体（ダイマー）であることが判明している。

¹H-NMR 測定により D 化率を求めた結果、62.5% 重水および軽水で合成した重水素化 ZIPK は、両者ともに D 化率が 95% となり、明確な差はなかった（図 111）。重水中ではタンパク質の収量が低下するため、アミノ酸選択水素化 ZIPK の合成は軽水中で行うことにした。なお、これまでもバッファー由来のシグナルが複数検出されていたので、重水や塩類のスペクトルを測定し、これらバックグラウンドの由来を確認した。

⑥ SOS-NMR 測定法の検証

H-ZIPK、D-ZIPK および Val, Leu, Ile, Met, Lys, Ala の 6 種類のアミノ酸選択水素化 ZIPK の計 8 種類を用いて予備実験を行った。H-ZIPK（大腸菌由来の P1）、D-ZIPK の P1（モノマー）、P2（ダイマー）、P1+P2 および 6 種類のアミノ酸選択水素化 ZIPK（P1+P2）の計 10 種類（重水素化バッファー中、約 12 μM）について、化合物（NL060456、DMSO-d₆ 溶液）を最終濃度 0.5 mM となるように添加して STD-NMR を測定した。前回と同様に D-ZIPK にも STD シグナルがそれなりの強度で検出され、また、P1 と P2 で差が見られた。そこで、D-ZIPK には P1+P2（約 1 : 1 の混合物）の値を用い、積分の絶対値を用いて解析したところ、文献と比べて H-ZIPK の STD 強度が相対的に弱く、SOS の評価結果でマイナスの値がでるなどの問題が生じた。原因として、タンパク質の由来（大腸菌か小麦胚芽抽出液か）や P1 と P2 の違いなどが考えられたので、すべての試料を小麦胚芽無細胞合成由来の ZIPK P1 画分に揃えて再度測定した。

Leu および Ile のアミノ酸選択水素化 ZIPK、H-ZIPK、D-ZIPK のそれぞれの P1 画分に、同一日に化合物を添加して測定したところ、STD 強度の解析結果では、マイナス値や 100% を大きく越える値などの異常値は出なかった。また、DAPK と NL060456 との複合体 X 線結晶構造解析の結果とも概ね一致する傾向が見られた。以上の結果より、SOS-NMR 法では、少なくとも ZIPK の場合は発現系の違いや会合状態（モノマーとダイマー）の違いに留意する必要があると思われる。

H-ZIPK、D-ZIPK および Val, Leu, Ile, Met, Lys, Ser（陰性対照）の 6 種類のアミノ酸選択水素化 ZIPK の計 8 種類（すべて P1 画分）（重水素化バッファー中 9.6 μM）について、ZIPK 溶液に化合物（NL060456、DMSO-d₆ 溶液）を最終濃度 0.5 mM となるように添加して STD-NMR を測定したところ、過去の測定と同様に D-ZIPK にも STD シグナルがそれなりの強度で検出された。

文献の方法にしたがい SOS-NMR の評価値“*I*(SOS)”を計算した結果、理論上は 0~100% の値となるべきところが 100% を大幅に超える数値やマイナス値などの異常値が見られた。異常値の原因として考えられることは、たとえば D-ZIPK にも残存水素があることから各アミノ酸選択水素化タンパク質の残存水素の種類が試料により異なる可能性も考えられる。実際にタンパク質だけの ¹H-NMR スペクトルを測定すると、試料間で残存水素のパターンが一部異なることがわかった。また、測定面では、原因のひとつとしてタンパク質の飽和度が各アミノ酸選択水素化タンパク質で異なることが考えられた。この場合には、照射条件を変更する必要がある。

⑦ STD シミュレータ

シミュレータの計算値と比較するための実験値として、解離定数が異なるリガンドについて STD 強度を比べる。実際には解離定数が既知の化合物は少ないので、STD 実験によりタンパク質と種々の低分子化合物との解離定数を求めることとした。低分子化合物は、Peakdale 社“Fragment Library”および ZIPK の阻害剤として文献に記載の化合物を用いた。タンパク質は Aldolase（Rabbit muscle SIGMA 社 A2714）および ZIPK を用い、重水素化リン酸バッファー中でタンパク質濃度 10 μM または 2 μM に対し、化合物濃度を 10 mM から 50 μM まで変えながら STD-NMR を測定した。

Aldolase と複数のフラグメント化合物との STD-NMR では、解離定数が数 mM から数十 mM という結果が得られた。ただし、化合物の溶解度が低いため、解離定数の計算に本来必要な濃度範囲（一桁上から一桁下までの範囲）のデータを十分に揃えることができなかった。一方、タンパク質に ZIPK を用いた場合は、含窒素複素環を有する 4 つのフラグメント化合物について 1 mM 前後の解離定数が得

られた (図 112)。また、カルボン酸を有するフラグメント化合物や阻害剤 CGP74514A については 0.1 mM オーダーの解離定数が得られた。一桁 mM からサブ mM オーダーであれば、STD-NMR で解離定数を決定できることを確認できた (図 112)。

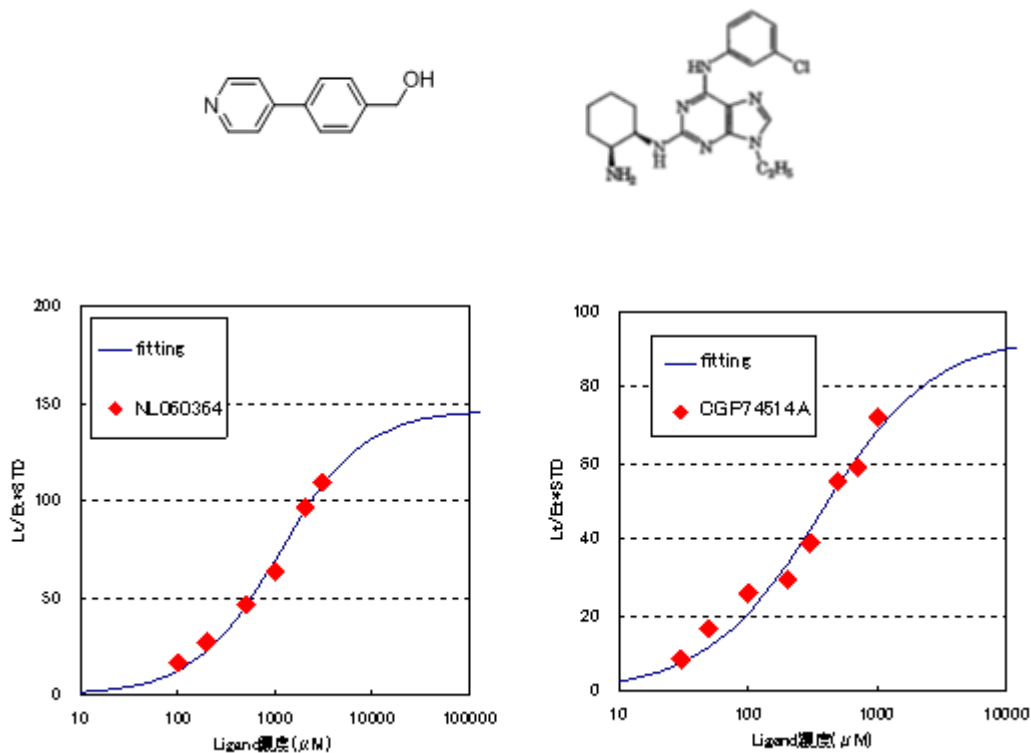


図 112 STD-NMR による ZIPK と化合物との解離定数の測定例

シミュレータの計算値と比較するための実験値として、解離定数が異なるリガンドについて STD 強度を測定した。実際には解離定数が既知の化合物は少ないので、昨年度に STD 実験によりタンパク質と結合する低分子化合物をスクリーニングし、結合が確認された化合物について解離定数を求めた。タンパク質には human ZIPK (zipper interacting protein kinase のキナーゼドメイン: 自社製) を、低分子化合物には Peakdale 社 “Fragment Library” に記載の化合物および ZIPK の阻害剤 CGP74514A (CALBIOCHEM 社、カタログ No.217696) を用いて、STD-NMR により一桁 mM からサブ mM オーダーの解離定数を決定した。Kd が得られた 6 種類の化合物について、測定条件をそろえて STD-NMR を測定し、STD 強度を比較した。

ZIPK 約 2 μM の重バッファー溶液 (Na-Pi : 20 mM、NaCl : 150 mM、pD : 7.5) に対し、化合物の重 DMSO 溶液を化合物の最終濃度 0.5 mM、重 DMSO 10 vol% となるように加え、20°C で 256 回 (80 分) 積算した。STD 強度を求める際、従来は照射スペクトルとレファレンススペクトルの差スペクトルで得られたシグナルの S/N で比べていたが、分解能の変動による影響が大きく、化合物間の強度比較が困難とであった。そこで、照射スペクトル、およびレファレンススペクトルそれぞれについて化合物ピークの積分値 (絶対値) を求め、両スペクトルの面積での差を用い評価することとした。また、一部の化合物は DMSO 溶液の保存安定性が低かったため、化合物溶液は用時調製とした。現在、STD 強度の評価方法について検討中である。

⑧ 摂食抑制に関与する Leptin とその受容体の NMR による構造、相互作用解析

Leptin の構造解析

Leptin-LR の NMR による結合部位構造情報取得のための基本情報として、ヒト Leptin 単独の溶液中での構造解析を試みた。Leptin の残基 22~167 (W100E アミノ酸置換) からなるトランケーション配列の N 末端にメチオニンを付加した大腸菌発現用ベクターを構築した。このベクターにより大腸菌宿主 Rosetta(DE3) を形質転換し、Leptin を発現する組換え大腸菌を取得した。この組換え大腸菌を ¹⁵NH₄Cl

もしくは $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ と ^{13}C -glucoseを含むM9培地中で培養することで ^{15}N -、 ^{13}C 、 ^{15}N -安定同位体標識 Leptin を発現した。Leptin は不溶性タンパク質として得られ、文献情報に従って尿素変性後にリフォールディングした。得られたリフォールディングサンプルを遠心分画し、その上清を陰イオン交換クロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィー、陽イオン交換クロマトグラフィーにより精製した。精製タンパク質の純度は SDS-PAGE と等電点電気泳動により確認した。精製した Leptin をセンサーチップ CM5 へ固定化し、BIACORE3000 を用いた表面プラズモン共鳴法により LR との結合活性を測定した。その結果、図 113 に示したセンサーグラムが得られ、KD は $5.4 \pm 4 \text{ nM}$ を示した。この値は文献値と同等であり、得られた Leptin が十分な結合活性を有することが明らかとなった。

Leptin の NMR 測定条件を選択するため、様々な溶液条件で ^1H - ^{15}N HSQC スペクトルを測定したところ、25mM 酢酸バッファー pH 5.0, 50 mM NaCl, 測定温度 303K において検出シグナル数、測定感度共に良好なスペクトルが得られた。確定した条件下において主鎖帰属を行うため CBCA(CO)NH, HNCACB, HNCO, HN(CA)CO, HNCA, HN(CO)CA を測定し、CARA を用いて解析したところ、帰属可能な 140 アミノ酸残基全てを帰属することに成功した (図 114)。

得られた ^{13}C の化学シフト値と chemical shift index(CSI)から、その二次構造は X 線結晶構造とほぼ同じであると推定された (図 115)。

主鎖に続いて、現在 Leptin の側鎖帰属を試みている。これまでに H(CCCO)NH, (H)CC(CO)NH, HBHANH, HBHA(CO)NH, HCCH-TOCSY, HCCH-COSY, (HB)CB(CGCD)HD, NOESY, NOESY-HSQC, HNHA, HNHB, HNCOHBA, constant time HNCA and HNCOCA を測定し、現在解析中である。NMR 測定は主として三重共鳴クライオプローブを装備した Bruker Avance 500MHz NMR を用いて行った。

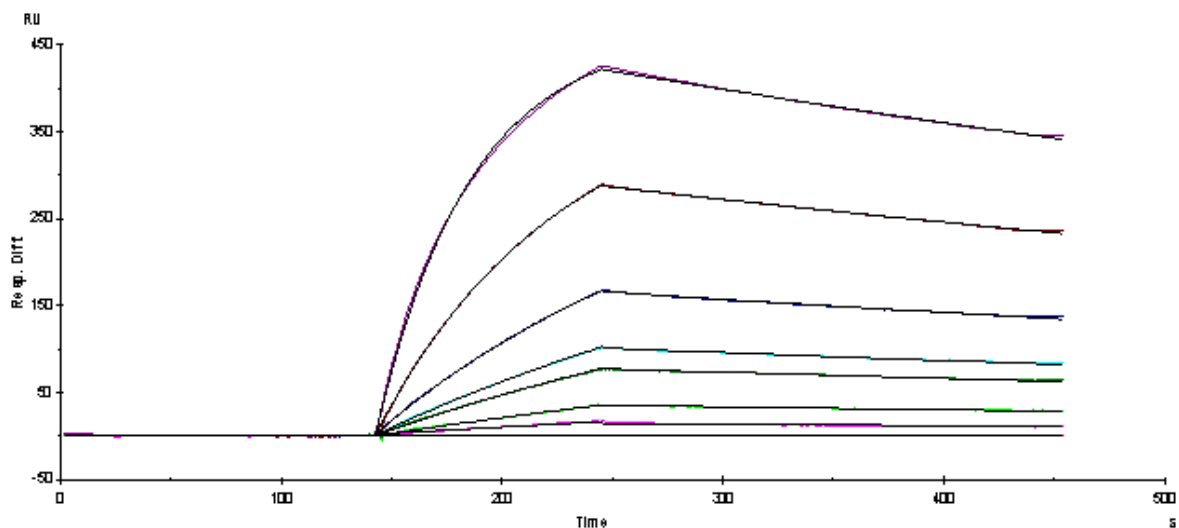


図 113 Leptin-LR の BIAcore3000 センサーグラム

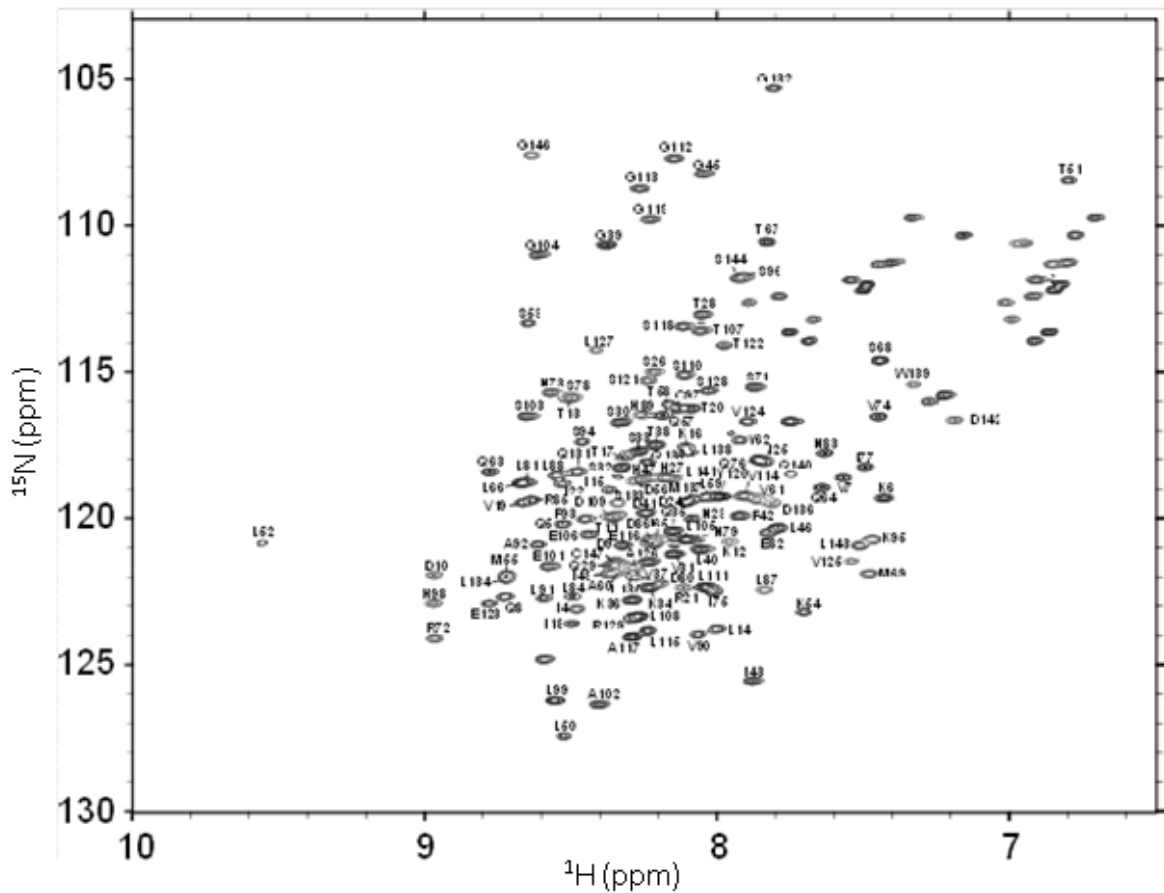


図 114 Human Leptin の ^1H - ^{15}N 主鎖帰属 HSQC スペクトル

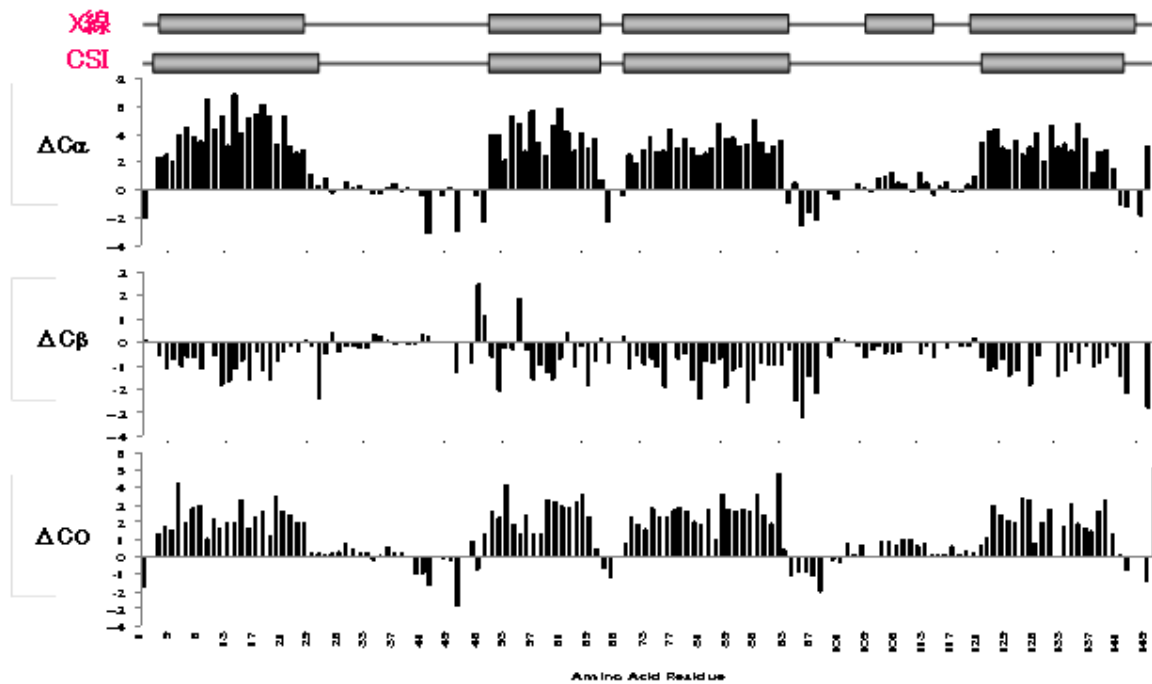


図 115 Leptin の CSI

Leptin receptor (LR)の調製

LR はこれまでに構造解析し得る発現系が確立されていない。ここでは LR の NMR 構造解析を目的

とし、安定同位体標識 LR 調製のための発現系確立を目指す。

LR 構造解析のための安定同位体標識を目的とした場合、動物、昆虫細胞発現系は発現量、コスト共に適していない。そこで、他の候補として大腸菌、小麦胚芽無細胞、*Brevibacillus choshinensis* (*B. choshinensis*)、*Kluyveromyces lactis* (*K. lactis*)、*Pichia pastoris* (*P. pastoris*) による LR 発現検討を行った。発現配列は LR 全長 1165 アミノ酸の細胞外ドメインのうち Leptin Binding Domain と呼ばれる 428-635 アミノ酸トランケート体を用いた。

(大腸菌発現系)

可溶化タグ付加、菌株、培養条件等の検討を行ったが、何れも LR は不溶化タンパク質として得られたため、尿素もしくはグアニジン塩酸塩による変性とリフォールディングの検討を行った。その結果、6M グアニジン塩酸塩により変性した C 末 6His タグ付加 LR を Ni-NTA を用いてアフィニティ精製し、4.5M 尿素へ置換した後にアルギニン塩酸塩添加によって尿素濃度希釈する方法が最も可溶性回収率の高い手法であることがわかった。しかし、得られた可溶性画分の多くが二量体以上の多量体を形成していたためリフォールディング時の酸化還元制御、pH、添加剤等の詳細条件検討が必要と考えられた。

(小麦胚芽無細胞合成系)

PCR により直鎖状鋳型を作製して様々な可溶化タグ付加検討を行ったところ、N 末 MBP タグ付加 LR の可溶性へのタンパク質合成が確認されたが、プロテアーゼによる MBP タグ切断ができなかった。このことから分子量の大きい MBP によって全体が可溶性として得られているものの、LR 自体は適切にフォールドしていない可能性が示唆された。

(*B. choshinensis* 発現系)

本発現系は目的遺伝子の由来に関わらず S-S 結合を有するタンパク質の活性型での発現成功例が高い。今回は本発現系で実績のある FLAG タグを中心に N 末 FLAG、N 末 3FLAG、N 末 HisFLAG、C 末 His タグ付加 LR の発現検討を行った。その結果、N 末 3FLAG タグ、N 末 HisFLAG タグ付加 LR において最大で 2 mg/L の可溶性への発現が確認された (図 116)。しかしコロニーや培養のロットによる発現量の差が著しい上、菌体グリセロールストックからの発現に再現性が得られず、安定した発現が得られなかった。また、アフィニティ精製による回収率・精製純度が悪いことや、SPR による Leptin との親和性解析結果から、可溶性へ発現した LR の多くが適切にフォールドしていない可能性が考えられた。

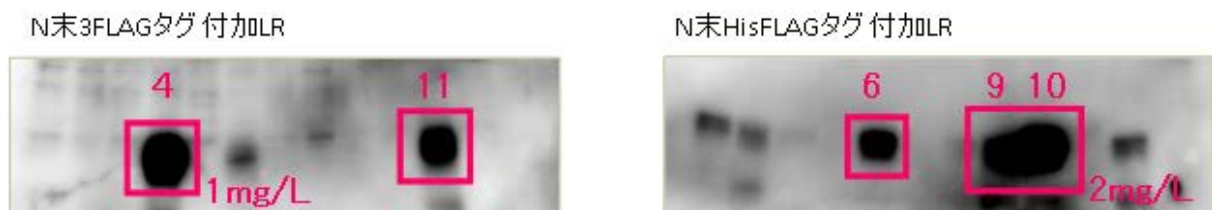


図 116 プレビバチルス発現系による LR の抗 FLAG 抗体によるウエスタンブロットティング
4, 11, 6, 9, 10: それぞれのコロニー ID No.

(*K. lactis* 発現系)

本発現系は *Pichia* 発現系とは異なり galactose 資化性であるため methanol 毒性の心配が無くより安価に安定同位体標識できる可能性がある。今回は N 末 His、N 末 FLAGHis、N 末 HisFLAG、C 末 His、N 末 MBPHis、N 末 MBP-C 末 His タグ付加 LR の発現検討を行った。その結果、N 末 His、N 末 FLAGHis、N 末 HisFLAG、C 末 His タグ付加 LR はほとんど発現が確認できなかったが、N 末 MBPHis、N 末 MBP-C 末 His タグ付加 LR において可溶性画分への発現が見られた (図 117)。現在発現量、再現性の確認、アフィニティ精製条件検討を実施している。

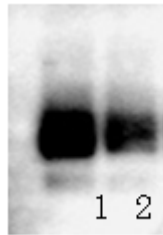


図 117 *K. lactis* 発現系による LR の抗 MBP 抗体によるウエスタンブロッティング
1: N 末 MBPHis タグ付加 LR, 2: N 末 MBP-C 末 His タグ付加 LR

(*P.pastoris* 発現系)

本発現系は安定同位体標識法が確立しており、高密度培養も可能である。今回は計 8 種類の分泌シグナル配列について C 末 His タグ付加 LR の発現検討を行った。その結果、どのシグナル配列においても C 末 His タグ付加 LR はほとんど発現が確認できなかった。そこで、分泌発現量が向上するという報告のある MBP タグを N 末に付加した N 末 MBP-C 末 His タグ付加 LR の発現検討を行った。その結果、分泌発現量は 1~2 mg/L 培養液まで向上した (図 118)。現在培養条件および精製条件の検討を実施している。



図 118 *P. pastoris* 発現系による LR の抗 His 抗体によるウエスタンブロッティング

Leptin の構造解析

Leptin-LR の NMR による結合部位構造情報取得のための基本情報として、ヒト Leptin 単独の溶液中での構造解析を試みた。前年度に引き続き、Leptin の側鎖プロトン NMR シグナルを帰属するため、¹³C, ¹⁵N-安定同位体標識された Leptin トランケート体 (22~167 (W100E アミノ酸置換)) を用い、測定した H(CCCO)NH、(H)CC(CO)NH、HCCH-COSY、HCCH-TOCSY の各 スペクトルの解析を行った。この時点で 90%以上の側鎖プロトンシグナルの帰属を完了した。残りの側鎖プロトンのシグナル帰属を行うための測定は、産総研・臨海副都心センターの 600 MHz NMR 装置を使用した。重水バッファー中の ¹³C/¹⁵N 標識の Leptin の hCCH- TOCSY、HcCH-COSY、HcCH-TOCSY の各スペクトル測定を行った。また、Leu、Val のメチル基プロトンのシグナルの立体特異的帰属を行うため、10% ¹³C グルコース培地で調製した Leptin を用い、重水バッファー中でメチル領域の ¹H-¹³C HSQC および constant-time ¹H-¹³C HSQC スペクトルを測定した。さらに、Tyr、Phe 残基の側鎖の δ および ε プロトンのシグナル帰属を行うために、重水バッファー中の ¹³C/¹⁵N 標識 Leptin の (HB)CB(CGCD)HD、(HB)CB(CGCDCE)HE の各スペクトルを測定した。これらすべてのスペクトル解析を行い、97%以上の側鎖プロトンシグナルの帰属を完了した。

この帰属結果を基に、立体構造計算用の距離情報を得るために、¹H-¹⁵N NOESY-HSQC スペクトルの解析を行い、ほぼすべてのアミドプロトン由来のシグナルを帰属した。さらに、重水バッファー中で ¹H-¹³C NOESY-HSQC スペクトルの測定を、産総研・臨海副都心研究センターの 600MHz 装置にて行い、NOE シグナルの解析を行っている。

Leptin receptor (LR) の調製

LR はこれまでに構造解析し得る発現系が確立されていない。ここでは LR の NMR 構造解析を目的とし、安定同位体標識 LR 調製のための発現系確立を目指す。

(*P.pastoris* 発現系による LR の発現)

本発現系は安定同位体標識法が確立しており、高密度培養も可能である。分泌発現量が向上すると

この報告のある MBP タグを N 末に付加した N 末 MBP-C 末 His タグ付加 LR の発現検討を行い、分泌発現量は 1~2 mg/L 培養液まで向上した。ここで分泌発現させた LR は糖鎖修飾により高分子量化していたことから、糖鎖修飾部位と予想される N433、N516、N624 を置換した変異体計 5 種類の LR 変異体 (M1 : N433D/N516D/N624D、M2 : N433Q/N516Q/N624Q、M3 : N433D/N516D、M4 : N433D/N624D、M5 : N516D/N624D) の発現ベクターをそれぞれ作製した。これらのベクターにより形質転換した *P.pastoris* により発現検討を行った。その結果、M1 については野生型と同等の発現量であったが、M2 については発現量が大きく低下した。M3~M5 は M1、M2 と比較して SDS-PAGE で検出されたバンドの高分子量化が確認された。

このことから、*P.pastoris* では LR の N433、N516、N624 はすべて糖鎖修飾され、N433D/N516D/N624D という変異導入が適していることが明らかとなった。変異体 M1 を分泌発現させ、培養上清からアフィニティ精製後、ResourceQ (陰イオン交換) 精製を実施した。ResourceQ 精製では 2 本のピーク (P1、P2) が得られ (図 119)、それぞれにつき Superdex75 10/300 を用いたゲルろ過精製を実施した。P1 はモノマー位置、P2 はオリゴマー位置にそれぞれ溶出した (図 120)。また、P1、P2 について Leptin との相互作用を Biacore により測定した。P1 の解離定数は 12.1 nM であり、昆虫細胞で発現・精製した LR (8.59 nM) と同等の相互作用を確認したが、P2 はシグナル値が低く、Leptin とは正常な相互作用を呈しなかった。本発現系では精製収量が低いことからこれ以上の検討は中断した。

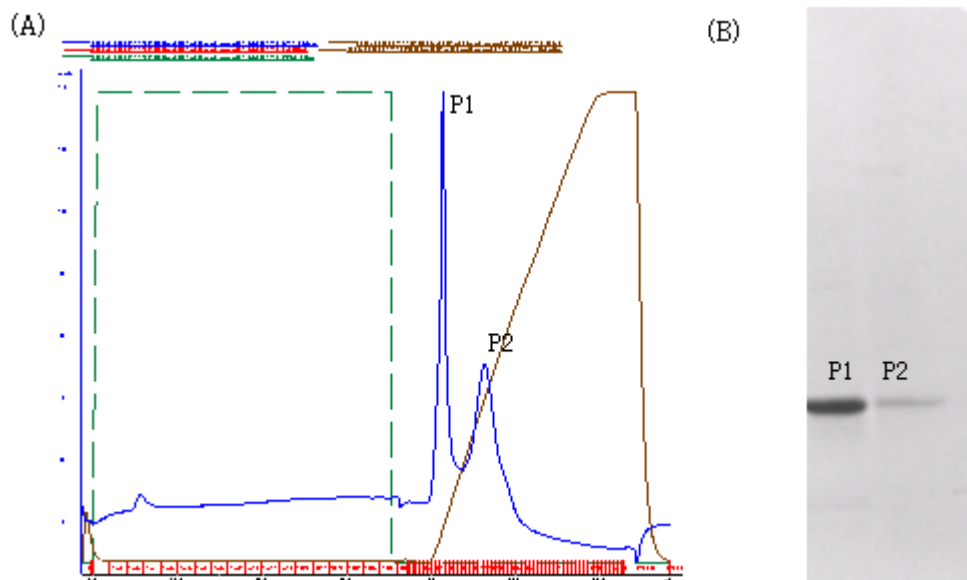


図 119 Resource Q 精製

- (A) His タグアフィニティ精製サンプルを ResourceQ 精製。2 本のピークを検出 (P1、P2)。
 (B) ResourceQ 精製サンプルの SDS-PAGE。P1、P2 ともに LR をメインバンドとして検出。

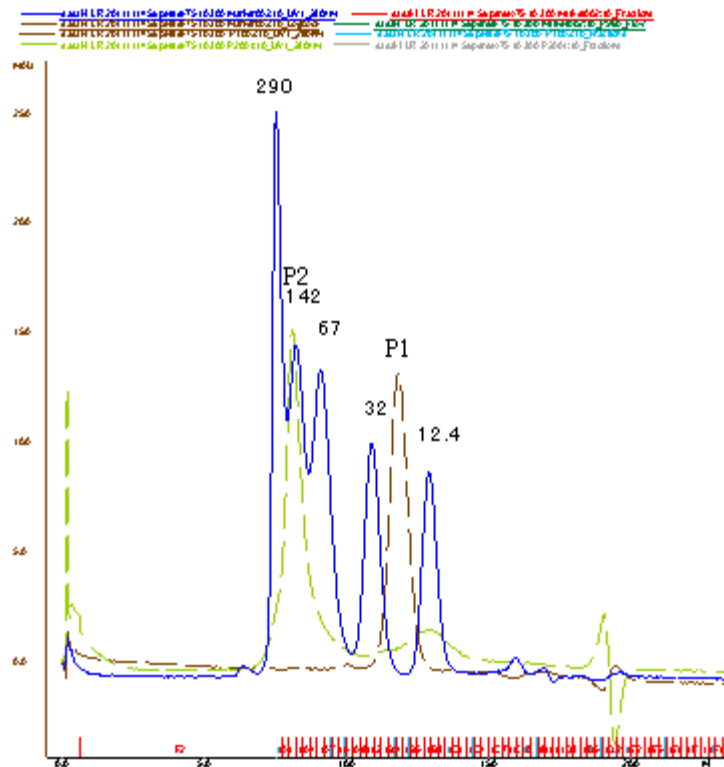


図 120 Superdex75 10/300 精製

ResourceQ 精製により得られた P1、P2 を Superdex75 10/300 によりそれぞれ精製。
P1 はモノマーの位置、P2 はオリゴマーの位置に検出。

(哺乳類細胞発現系による LR の発現)

本発現系は哺乳類細胞由来のタンパク質を発現させる場合、立体構造や修飾が天然型に近い状態で得ることが出来、安定同位体標識も可能である。また、近年では安定株取得によるタンパク質の生産だけではなく、一過性発現による短期間での蛋白質の大量生産についても報告されている。今回、LR の糖鎖修飾部位と予想される N433、N516、N624 を置換した変異体を一過性発現系により分泌発現させるため、シグナル配列を付加したベクター5種類を構築 (Leptin receptor シグナル配列、BM40 シグナル配列、Murine Ig κ chain V-J2-C シグナル配列、Preprotrypsin シグナル配列、SEAP シグナル配列) した。これらのシグナル配列を付加したベクター5種類を FreeStyle 293-F 細胞に導入し、一過性発現を実施したが、培養時間を 120 時間まで延ばしたが、LR の分泌発現は確認されなかった。本発現系では発現量が低いことからこれ以上の検討は中断した。

(昆虫細胞・バキュロウイルス発現系による LR の発現)

LR の糖鎖修飾部位と予想された N433、N516、N624 の 3 残基を Asp へ置換した変異体(LR_M1)の昆虫細胞・バキュロウイルス発現系による分泌発現を検討した。分泌発現条件は最適化の結果、High Five 細胞 (細胞密度 2×10^6 cells/mL) に組換えバキュロウイルスを MOI 1 でトランスフェクションし 48 時間後に培養上清を回収する条件を選択した。培養上清への LR_M1 発現量は約 1.5 mg/L であった。Ni-NTA を用いた His アフィニティ、ResourceQ を用いたイオン交換、Superdex75 を用いたゲルろ過クロマトグラフィーにより精製した。イオン交換では Peak が 3 つに分離し、低塩濃度溶出の主要ピーク 2 つ(低塩濃度から Peak 1, Peak 2)は共に単量体であり、高塩濃度溶出の Peak 3 には単量体と二量体が混在していた。BIACORE による Leptin 親和性評価の結果、3 つの Peak は全て文献値と同等の KD 5-10 nM の Leptin 親和性を有することが明らかとなった。Peak 1 と 2 はイオン交換での溶出塩濃度差が僅か 8 mM であり、且つ、その量比は培養 lot によって様々だった。また、共に単量体で同等の Leptin 親和性を有することや、少ない発現量からタンパク質を稼ぐためにも、この 1, 2 両 Peak を今後の検討に使用することとした。

(7) タンパク質-タンパク質相互作用部位の同定および複合体モデル構造の構築を迅速に行う手法

の開発（味の素分室）

タンパク質間相互作用は、生体の代謝やシグナル伝達をはじめとした種々の現象に関与していることから、相互作用界面に関する情報の迅速な取得は、創薬研究などを効率的に展開していく上で極めて重要となる。しかしながら、それらの情報を得るためには、例えば X 線結晶構造解析においては結晶化の作業、NMR 解析においては NMR シグナルを帰属するための測定、解析作業が必要となり、多大な時間と労力を要することになる。そこで我々は、対象とする個々のタンパク質の立体構造が既知であれば、NMR シグナルを帰属することなく、1 サンプルに対する実験結果のみを基に、タンパク質複合体の相互作用部位を迅速に同定できる手法を開発した。

開発した相互作用部位同定法の概要は、以下の通りである。 ^1H - ^{13}C 相関スペクトル上におけるシグナルの分布は、由来するアミノ酸残基の原子団ごとに局在している。従って、原子団ごとにシグナルがとり得る化学シフト値の分布が重ならないよう安定同位体標識を施したタンパク質を調製することで、化学シフト値から、各シグナルがどのアミノ酸残基種に由来しているか同定することができる。さらに、この試料を用いた相互作用実験を行い、化学シフト変化を観測することで、相互作用界面に存在するアミノ酸残基の種類とその個数を知ることができる。タンパク質の表面を探索し、この実験結果を最もよく満たす箇所が相互作用界面であると同定できることから、立体構造が既知であれば、相互作用界面の同定が可能となる。このような構想のもと、我々は、特定のアミノ酸残基種の特定原子のみを特異的に標識し、さらに本手法に適したパルスシーケンスを開発することで、高分子量のタンパク質についても解析を可能にした。さらに、得られる結果が解析者の主観に影響されないよう、化学シフト変化量の大小を判断するための閾値を一意的に決める方法を確立し、Stanford 大の共同研究者と解析用ソフトウェアを開発することで、相互作用界面を形成するアミノ酸残基群を自動で決定できるようにした。

次に、本手法が正しく機能することを、複合体の立体構造が既知である、分子量 26.4k の yeast ubiquitin hydrolase (YUH) と 8.6k の yeast ubiquitin (Y-Ub) を用いて実証した。まず、図 121 に記載の原子が標識された YUH を調製し、今回開発したパルスシーケンスを用いて NMR スペクトルを取得したところ、想定通り、化学シフト値から各シグナルがどのアミノ酸残基種であるか判別が可能であった (図 121)。続いて Y-Ub を滴定し、滴定前後の NMR スペクトルから、化学シフト変化が起きたシグナルの個数を得た。この実験結果と YUH の立体構造情報を解析用ソフトウェアで処理することで、相互作用界面を構成するアミノ酸残基の同定に成功した (図 122A)。また、複数の既知のタンパク質複合体構造を用いて本手法のシミュレーションを行い、その汎用性を確認した。さらに、得られた相互作用界面の情報を拘束条件として、HADDOCK1 を用いて YUH-ubiquitin 複合体構造の再構築を試みたところ、タンパク質複合体構造予測の国際コンテスト CAPRI の基準にて、fraction of native contacts=0.7、interface RMSD=1.8 Å と高い精度で複合体構造の再構築に成功した (図 122B)。

実験結果に基づく複合体モデル構造を迅速に構築できるため、例えば構造情報に指南された創薬、特にタンパク質間相互作用阻害剤の開発における初期段階において、今回開発した手法は有用である。以上の成果は、*J. Struct. Biol.* に投稿し採択された。

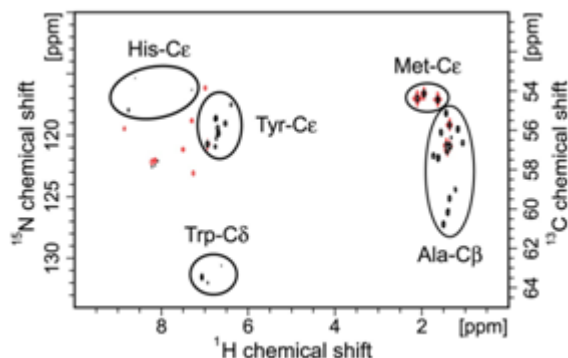


図 121 標識された YUH の $[^1\text{H}, ^{13}\text{C}_{\text{aromatic}}/^{15}\text{N}] - \omega_1 - \text{TROSY-HSQC} / [^1\text{H}, ^{13}\text{C}_{\text{methyl}}] - \text{HSQC}$ スペクトル $2\text{-}^{15}\text{N-Arg}$ 由来の $[^1\text{H}, ^{15}\text{N}]$ 相関シグナル (赤) は、位相が 180° 異なるため $[^1\text{H}, ^{13}\text{C}]$ 相関シグナルとの区別が可能である。

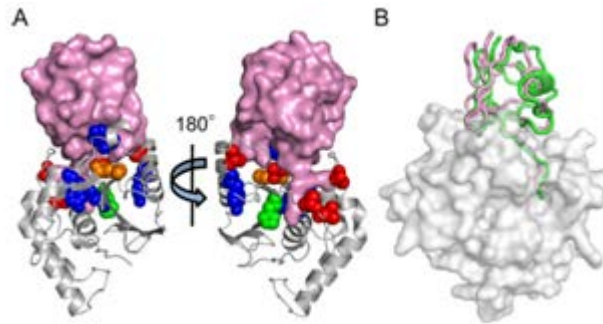


図 122 (A) 本手法により同定された相互作用界面の残基を CPK (赤 : Ala、橙 : Met、緑 : His、青 : Tyr) で、YUH、ubiquitin をそれぞれ ribbon、surface 表示で示す。(B) 本手法により再構築された YUH-ubiquitin 複合体構造と結晶構造の比較。YUH、ubiquitin をそれぞれ surface、tube (緑 : 再構築構造、紫 : 結晶構造) 表示で示す。

(8) 低分子相互作用部位を迅速に同定する手法の開発 (味の素分室)

創薬において、近年の high-throughput screening 技術、*in silico* screening 技術の進展により、活性を有する化合物を迅速かつ効果的に取得できるようになったものの、ターゲットタンパク質との相互作用に関するバリデーションについては、依然として別の実験にて行う必要がある。この目的において、NMR は、溶液状態での相互作用を原子レベルの分解能で直接観測できるため有用な技術であるが、NMR シグナルを帰属するための測定、解析作業において、多大な時間と労力を要していた。そこで、既に関連したタンパク質-タンパク質相互作用部位の迅速同定法の概念を応用し、NMR シグナルを未帰属のままでも、低分子相互作用部位を迅速に同定できる手法を開発した。

手法の基本概念は、タンパク質-タンパク質相互作用部位の迅速同定法と同様である。しかしながら、タンパク質と低分子とでは、相互作用面積や相互作用の様式が大きく異なるため、タンパク質-タンパク質相互作用部位の同定で用いた、相互作用界面のアミノ酸残基を決定する解析プログラムを適用できない。そこで、周囲のアミノ酸残基の種類と数が、実験結果と最もよく一致する“空間”を探索する新たなプログラムを開発し、適用した (図 123A)。また、一般に NMR 解析において、観測対象の運動性等に起因する化学交換により、一部のシグナルが広幅化し観測されないケースがあるが、そのような場合においてもバイアスがかからずに解析するアルゴリズムを考案し、上記プログラムに実装した。

本手法が正しく機能することを、創薬ターゲットとして知られている分子量 41 k の p38 α 、およびそれとの複合体構造が既知である阻害剤 2-amino-3-benzoyloxy pyridine を用いて確認した (図 123B)。また、既報の結果から、デカン酸が p38 α のアロステリックエフェクターであると予想し、本手法により両者が特異的に相互作用し、その相互作用部位が MAPK insert region と呼ばれる箇所であることを初めて明らかにした (図 123C)。以上の成果については、特許を出願した (出願番号 : 特願 2012-281823) 他、国際科学誌へ投稿する予定である。

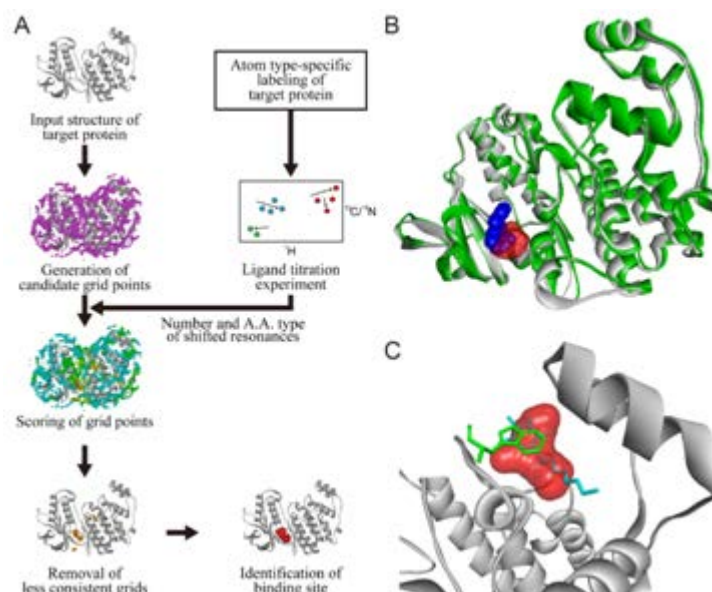


図 123 (A) 本手法のフローチャートを示す。(B) 阻害剤との複合体構造 (緑: p38 α 、青: 阻害剤) と apo 構造 (灰) を重ね合わせた。本手法により同定された阻害剤の結合部位を赤で示す。(C) p38 α の MAPK insert region 付近の拡大図。赤: 本手法により同定されたデカン酸結合部位。緑: デカン酸との結合に関与する Trp197。シアン: 結晶構造解析にて同位置への結合が確認されている *n*-Octyl- β -D-Glucopyranoside。

(9) 標的親和性分子と標的タンパク質の相互作用および立体構造解析 (協和発酵キリン分室)

抗体は医薬品開発に応用できるため意欲的に研究が進められ、これまでに 20 を超える抗体医薬品が上市され、臨床開発品も多く存在する。一方、より小さなタンパク質のほうが、抗体より固形癌への浸透性が高く、細胞内部まで透過していくという例もある。近年はより分子量が小さく生産性が良い擬似抗体の研究が盛んに進められている。そこで、本研究では、抗体よりも固形癌への浸透性が高い分子の作製を目指して、ターゲットに対して親和性のあるペプチドを分子量の小さなヒト由来タンパク質スカフォールドにグラフィディングすることで、ターゲットに対して親和性を持つ組換えタンパク質の作製を試みた。

① 高親和性ペプチド及び分子量の小さなヒト由来タンパク質スカフォールドの選択

分子量が小さい擬似抗体の多くはタンパク質の一部の配列をランダム化したものであり、標的親和性の選択はファージディスプレイやイーストディスプレイなどによりおこなわれている。これらの方法は任意の標的に対して親和性のある組換えタンパク質をスクリーニングできるというメリットがある。しかし、リードコンストラクトが無い状態でスクリーニングを開始するため、高親和性の組換えタンパク質を取得するには時間と労力がかかる。そこで、ヒト由来タンパク質をスカフォールドとすることで抗原性を抑制し、ターゲットに対して親和性のあるペプチドをスカフォールドにグラフィディングすることで、ターゲットに対して親和性を持つ組換えタンパク質の作製を試みた。我々が高親和性ペプチドとして選んだのは、ラクダ一本鎖抗体 VHH の CDR3 ループである。ラクダ科動物は重鎖のみからなる一本鎖抗体を持ち、その抗原結合ドメインである VHH はシングル Ig ドメインで抗原と結合する。重鎖と軽鎖からなる二本鎖抗体では重鎖可変領域 (VH) と軽鎖可変領域 (VL) それぞれの CDR1, 2, 3、計 6 つのループを介して抗原との結合が達成される。一方、ラクダ一本鎖抗体 VHH では 3 つのループで抗原と結合するため、VH や VL の CDR と比べて CDR ループ (特に CDR1 と CDR3) が長いものも存在する。特にラクダ科動物の VHH では CDR3 が長く、CDR1 と CDR3 間で SS 結合形成を持つ VHH が存在し、この SS 結合が長いループの構造維持に寄与していると考えられている。VHH と抗原との複合体の X 線構造より求めた相互作用部位の表面積における CDR3 部分の寄与は 60-80% である。それゆえ、ラクダ VHH の CDR3 はそれ単独で抗原との強い結合活性を有することが可能で、それには CDR1-3 間 SS 結合によるループ構造の維持が重要であると考えた。そこで、CDR1-3 間 SS 結合を再現した状態で CDR3 ループをグラフィティングできるデザイン手法を考え、そのデザインを基に作製した組換え蛋白質が標的親和性を保持しているのかを検証した。

② CDR3 グラフティングヒト由来タンパク質のデザイン、検証

本研究では、VHH の CDR3 をグラフティングすることでヒト由来タンパク質への親和性付与を試みた。グラフティングのデザインにおいては VHH の保存された構造に着目し、特に CDR3 ループの根元構造及び CDR1-3 間の SS 結合位置に着目した。VHH の CDR3 をグラフティング可能なヒトタンパク質として PDF の中からユビキチンを選択した。最初に、抗原結合能がある VHH の CDR3 を抗原結合のない VHH へグラフティングすることで、CDR3 の抗原結合能を確認した。CDR3 をグラフティングした 1F2X-(1R18)は KD 値で 10^6 M 抗原結合能を有することを確認した。ユビキチンに CDR3 をグラフティングした Ubi-1R18 は、抗原結合能を保持していたが、標的親和性はオリジナル VHH である 1R18 や CDR3 をグラフティングした 1F2X-(1R18)と比較して大きく減少していた。一方で、Ubi-1R18 は構造的に十分安定であること、デザインどおりに H68C と導入した CDR3 中のシステイン残基間で SS 結合を形成していることを確認した。Ubi-1R18 の標的親和性低下の原因を探るために NMR により HD 交換解析実験を行った。その結果、Ubi-1R18 ではグラフティングの根元構造に揺らぎが生じ、部分的構造が不安定になっていることが分かった。これが、Ubi-1R18 の標的結合能が低下した理由であろう。次に同じ CDR3 配列をもつ 1R18、1F2X-(1R18)、Ubi-1R18 で抗原との結合様式をピアコア T100 の Thermodynamics 解析で検証した。1R18 がエンタルピー駆動型の相互作用であり、VHH 間 CDR3 グラフティング体 (1F2X-(1R18)) はエンタルピー・エントロピー両駆動型の相互作用になっていた。面白いことにユビキチンへの CDR3 グラフティング体 (Ubi-1R18) ではエントロピー駆動型の相互作用になっていた。本結果は、CDR1,2 は親和性だけでなく結合様式決定にも非常に大きな影響があることを示している。

CDR3 グラフティングにより本来の親和性や結合様式を再現するには、グラフティング先の根元構造を強固なものとし、更に CDR1,2 相当の機能をスカフォールドに付与することが必要であり、その実現には更なる研究が必要である。

③ 親和性のグラフティングに必要な構造的要素の解明にむけて

ラクダ科動物が持つ一本鎖抗体の抗原結合ドメインである VHH はシングル Ig ドメインであり、これのみで標的と結合する。我々は VHH の CDR3 をヒトタンパク質であるユビキチンへグラフティングすることによる標的親和性移植に成功したが、その標的親和性は弱かった。そこで本研究では、VHH 間で CDR グラフティングを行い、親和性のグラフティングに必要な構造的要素を、NMR を用いて解析した。

VHH 間の CDR3 グラフティング体では、標的抗原親和性は KD 値で 10^6 M 程度であり、ドナー VHH の 10^9 M 程度と比較して大きく低下した。一方、CDR2,3 をグラフティングしたスカフォールド VHH はドナー VHH と同等の抗原親和性を有した。このことから、CDR2 の有無が CDR3 グラフティング VHH の標的親和性に大きな影響を与えることが分かった。

CDR2 のどのアミノ酸が高親和性に寄与しているのかを変異体を作製し解析したところ、CDR2 のアミノ酸の中で標的にも、CDR3 にも直接相互作用しない部位の 1 アミノ酸の長さが高親和性のカギとなっていることがわかった。この 1 アミノ酸の長さがどのように標的親和性へ影響しているかを NMR による解析をおこなったところ、この 1 アミノ酸長の違いが CDR1, CDR3 の標的親和性に重要な領域に影響し、構造が変化していることが示唆された。更に HD 交換実験により、1 アミノ酸の欠失により、CDR ループにおいて揺らぎの構造が遅い部分がはやくなっている部位が存在した。さらに、抗原ニワトリ卵白リゾチーム (HEWL) を添加し ^1H - ^{15}N HSQC スペクトルの測定からも、1 アミノ酸の欠失体は CDR2, CDR3 に揺らぎが生じていることを示唆された。以上の結果から、1 アミノ酸の欠失が CDR1,2,3 の不安定化を伴う構造的変化、CDR3 のダイナミクス的变化を引き起こし、それによって抗原との結合状態が変わり親和性が低下したと考えられた。

VHH のもつ高い抗原親和性を維持した CDR グラフティングを実現するためには、基本的には抗原と直接相互作用する残基を移植することが必要である。しかし、その親和力を完全に発揮させるためには元の抗体の持つ構造の維持が重要であり、その維持のためには抗原とは直接相互作用しない部位が重要となる可能性が示唆された。

(10) Small G タンパク質とエフェクターとの分子間相互作用解析 (エーザイ分室)

タンパク質間相互作用は必ずしも 1 対 1 の関係にあるわけではなく、1 種類のタンパク質の異なる部位に複数のタンパク質が結合し、それぞれの場合で異なる作用を誘起することがある。そのような標

的に対し、特定のタンパク質間相互作用でのみ使用されている部位を作用点とする薬剤は、副作用の少ない特異的な薬理作用を発揮することが期待される (図 124)。そのようなコンセプトで創薬を行う場合、タンパク質間相互作用界面情報の取得が必須となる。そこで本プロジェクトでは、Small G タンパク質と複数のエフェクター分子を解析対象とし、その相互作用界面決定を NMR で行い、その差異を明らかにすることを目的として研究を行った。



図 124 Small G 研究のコンセプト

当初、当社保有技術である酵母 genetics 研究を活かすべく、観測対象として酵母 RhoI を選択し大腸菌を用いた発現系の構築を試みた。レアコドン対応型である Rosetta2 株を用いることにより、封入体ではあるが充分量の発現が認められた。さらに、シャペロン共発現型である pCold-TF や Nus タグ付加により可溶性画分への発現が確認された。しかし、高純度に精製することができなかつたため、以後の検討を断念することとした。

そこで方針を変更し、哺乳類の Small G タンパク質である Rac1 を解析対象にすることとした。GST 融合体として大腸菌にて発現を試みたところ、可溶性画分への発現が確認された。グルタチオンカラムで精製後、GST タグをトロンビンにて切断し、さらにゲルろ過カラムで精製することにより、高純度の Rac1 を得た。¹⁵N 標識した Rac1 の ¹H-¹⁵N HSQC スペクトルパターンは、報告されているものとはほぼ一致したことから、得られた Rac1 は正しく折りたたまれていると判断した。

エフェクターとして、Rac1 非選択的なエフェクターである PAK1 を選択した。Intein タグ融合体として可溶性画分に発現させ、定法どおりに精製した。得られた PAK1 を ¹⁵N 標識した Rac1 に添加したところ、Rac1 のスペクトルパターンが大きく変化した (図 125)。また、PAK1 濃度依存的なスペクトル変化パターンは Slow exchange であった。このことから、Rac1/PAK1 相互作用は比較的強い (sub μM より強い) と推定された。そこで、Rac1/PAK1 複合体について、三重共鳴測定やアミノ酸選択的ラベルによるシグナル帰属を行ない、HSQC スペクトルの 90%以上のシグナルを帰属した。PAK1 添加によって化学シフト変化したシグナルから、大まかな結合界面を推定することに成功した (化学シフト摂動法)。さらに、Cross Saturation 法を用いて PAK1 選択的ラジオ波照射により強度減少するシグナルを同定し、既に報告されている Rac3/PAK1 の X 線結晶構造上に両者をマッピングし比較を行った (図 126)。その結果、Cross Saturation 法を用いた場合の方が、X 線結晶構造情報から予想される Rac1 上の相互作用部位をより正確に反映し、本法の有用性が再確認された。

PAK1 以外のエフェクターとして、Rac1 選択的なエフェクターとして POSH を選択し発現系の構築を行った。POSH の Rac1 バインディングドメイン (256-393a.a.) については種々検討の結果、Intein 融合発現系をコールドショック発現系に導入した新発現系を用いることにより可溶性画分に発現することが確認された。得られた POSH を ¹⁵N 標識した Rac1 に添加したところ、Slow exchange を示すスペクトルが得られた。PAK1 の場合と同様に POSH 結合状態 Rac1 のシグナル帰属を行い、化学シフト摂動法や Cross saturation 法を用いて結合界面を同定した。その結果、POSH との相互作用界面は PAK1 とほぼ同等であることが明らかとなった。しかし、Rac1 の一部領域については、POSH 添加時のみ対応するシグナルが消失した (図 127)。このことは、本領域の運動性が PAK1 結合時と POSH 結合時

で異なることを意味する。この領域に結合するエフェクター側の配列は相同性が低いことも、上記結果を支持する (図 128)。この相同性の低い部位と相互作用する領域に結合する化合物は各エフェクターに対する選択性を有する可能性がある。

以上、Small G タンパク質とそのエフェクターを題材としたタンパク質間相互作用については、Cross saturation 法をはじめとした NMR 情報を用いることにより有益な結果を得ることができた。

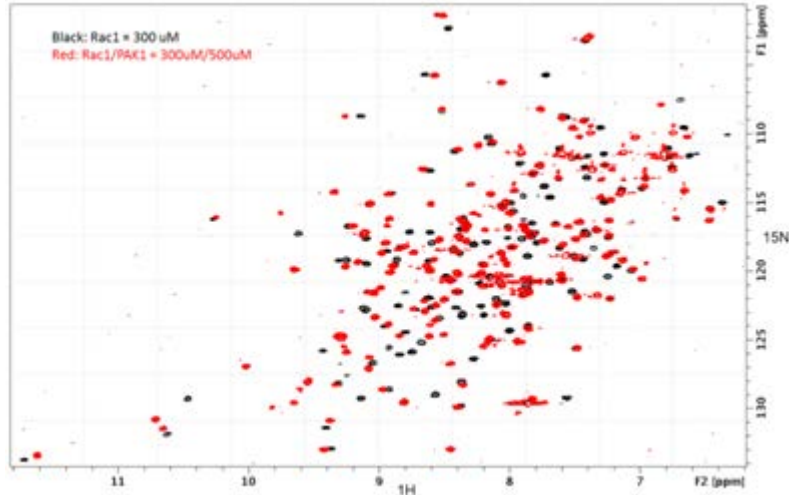


図 125 Rac1 の HSQC スペクトル、PAK1 との相互作用

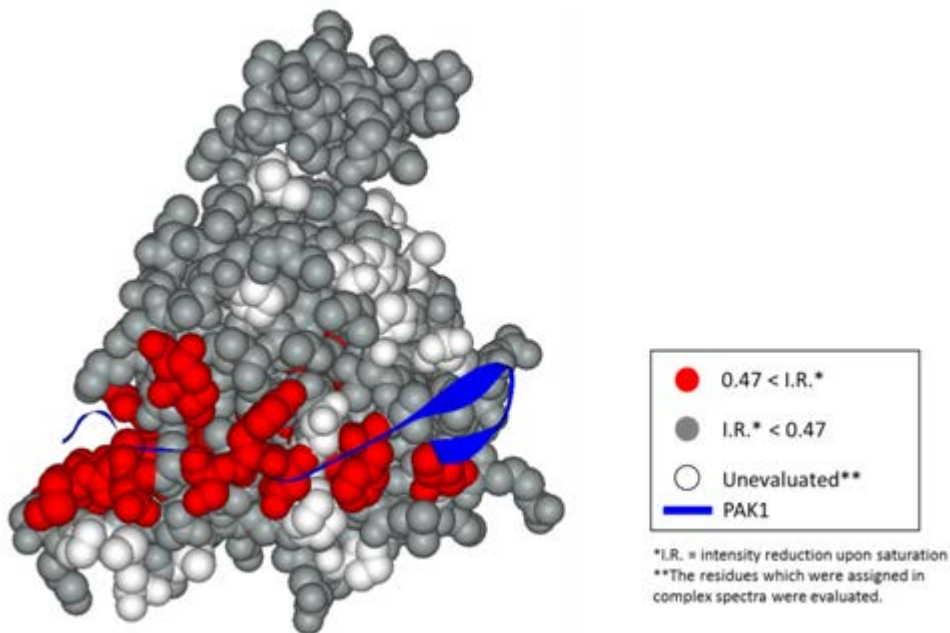


図 126 Rac1/PAK1 Cross saturation 実験の結果

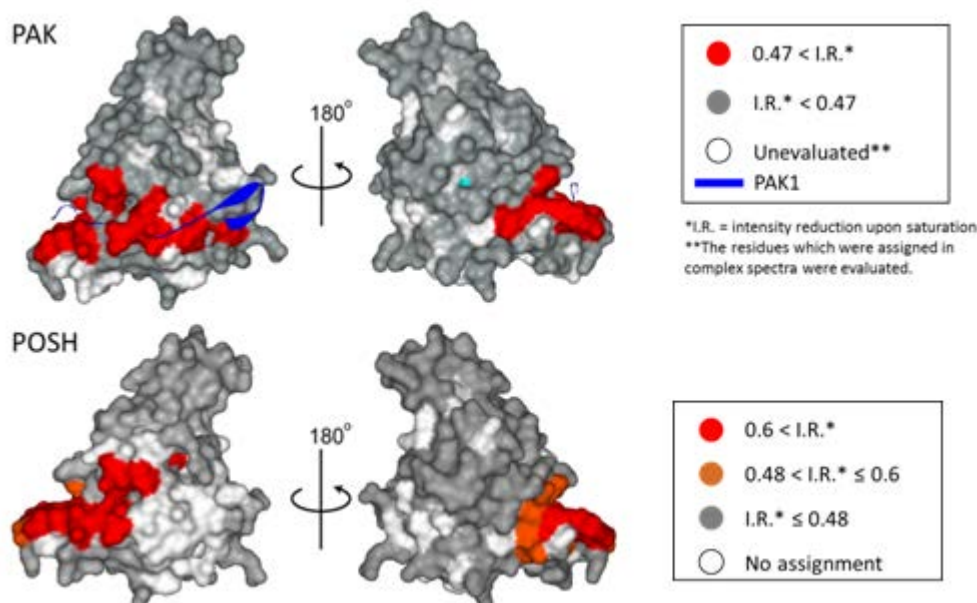


図 127 Rac1/PAK1、Rac1/POSH Cross saturation 実験の結果比較

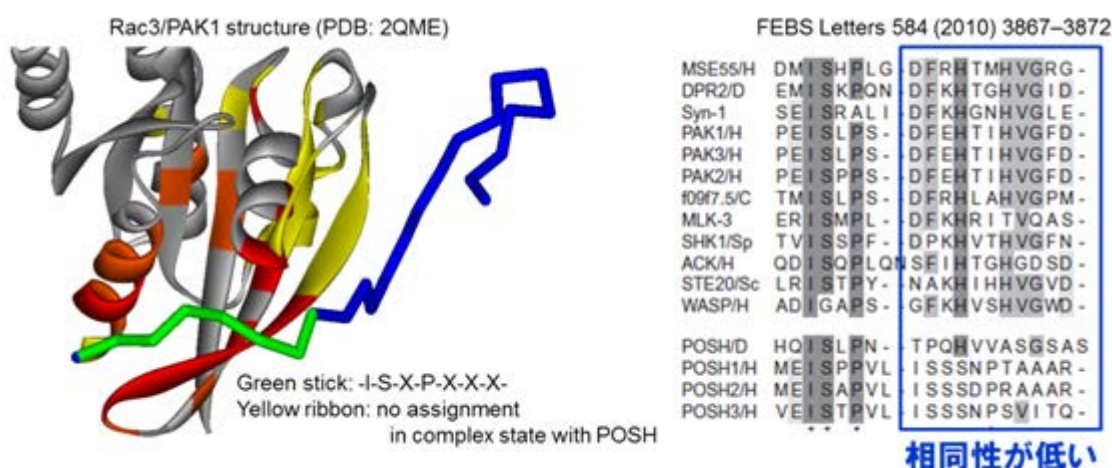


図 128 エフェクター間の相同性

(1 1) TRAF6/TNF 受容体相互作用阻害剤の TRAF6 との相互作用様式の解明 (エーザイ分室)

TRAF6 は細胞内膜近傍に存在し、TNF 受容体などを通じたシグナル伝達を仲介するアダプタータンパク質である。TRAF6 と受容体の結合は、最終的に免疫応答や炎症反応を誘起する。弊社では、TRAF6 に相互作用することにより受容体との結合を阻害し、さらにマウス骨髄細胞の破骨細胞への分化を抑制する、化合物 A を見出した。本研究では TRAF6 と化合物 A の相互作用様式を原子レベルで解明することを目的とした。

タンパク質・化合物双方の可溶性の低さから分子間 NOE を用いた解析は困難であった。そこで、複数の手法を組み合わせて結合様式の解明を試みた。

はじめに、化合物 A の結合部位決定を行った

① 化学シフト摂動法

TRAF6 に化合物 A を添加した際に化学シフト変化した残基は、受容体由来ペプチド (以下、RANK) 結合領域以外にも存在した。

② 化合物からタンパク質への飽和移動を利用した実験

化合物の芳香族プロトンからタンパク質のアミドプロトンへの飽和移動を観測することにより、原

理的には化合物の配向を決定することが可能となる。また、結合に伴う構造変化の影響を受けないため、相互作用界面を直接的に決定できる。しかし、本ケースにおいては、タンパク質側のシグナル帰属が不完全であったため、解析段階でタンパク質分子内プロトン間の飽和移動を完全に除外することができない。そこで、化学シフト摂動法の結果と組み合わせ、両手法において結合界面とされた領域を抽出した。

上記2実験から、化合物Aの結合部位は3つに絞られた(図129)。そのうちの1つはループ領域であるため、化合物の結合は難しいと考えられた。そこで、残りの2つの領域(Site1およびSite2とする。)中の残基に変異導入し、化合物Aの結合能を評価することとした。

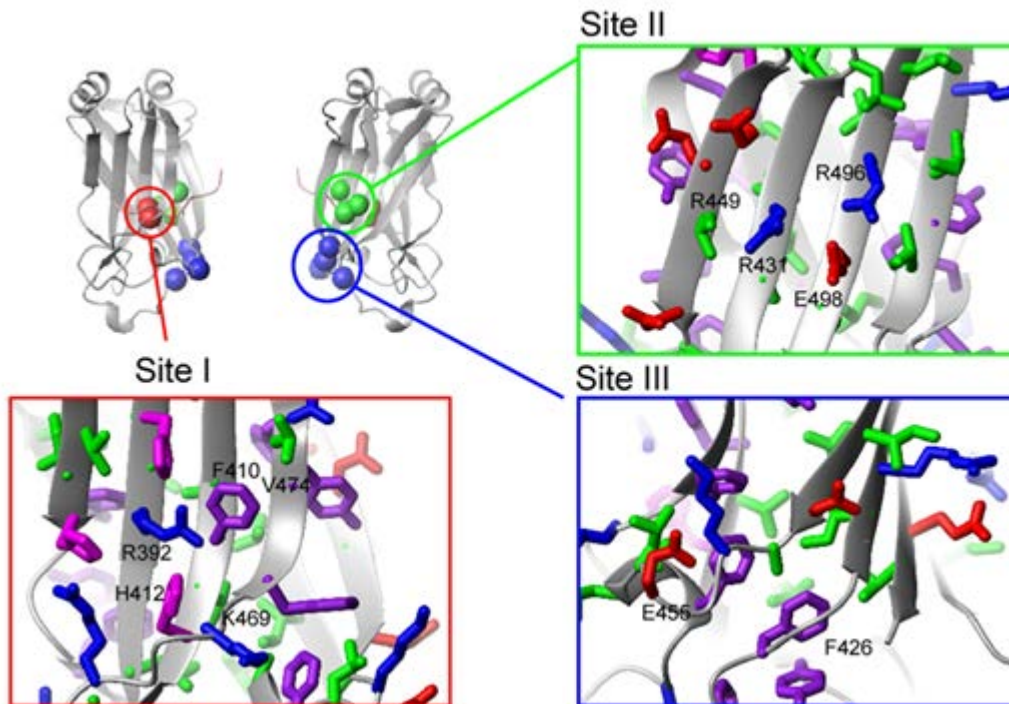


図 129 化学シフト摂動法および飽和移動実験から絞り込まれた化合物結合部位

③ 変異体実験

Site1のR392もしくはV474にAla変異を導入することにより、化合物Aに対する結合能は低下した。一方、Site2のR496もしくはE498のAla変異では、結合能はほとんど変化しなかった。このことから、化合物AはSite1に結合することが示唆された。

④ RANK との競合実験

TRAF6添加により、化合物Aのシグナルに対して広幅化および化学シフト変化が誘起された。この変化は、RANK濃度依存的に解消され、最終的には遊離の化合物シグナルに復帰した(図130)。このことは、RANK添加により化合物が結合サイトから追い出されることを意味し、化合物Aの結合部位がRANK結合部位(=Site1)と同様であることを支持する。

以上の複数の実験結果から、化合物Aの結合部位がRANKと同様であると結論した。

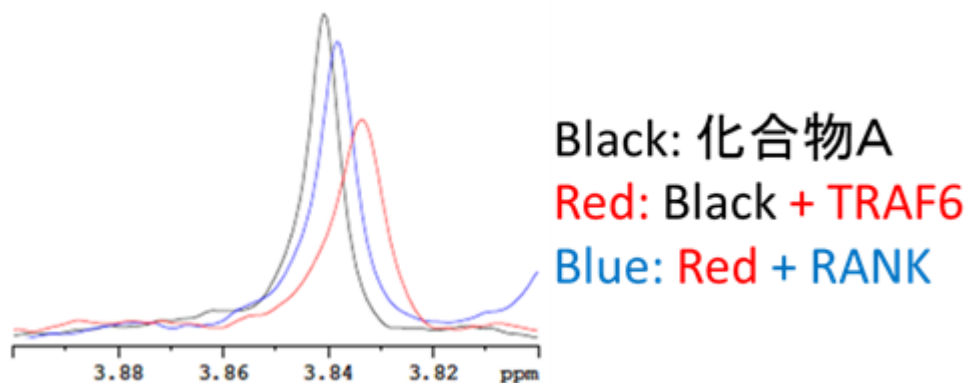


図 130 RANK による化合物の TRAF6 結合サイトからの追い出し実験

⑤ ドッキングシミュレーション

化合物 A の結合部位が明らかとなったので、この結合領域に対して化合物のドッキングシミュレーションを行った。その結果、化合物の向きが正反対である 2 種類の複合体構造が得られた。

⑥ DIRECTION

DIRECTION 法を用いて、上記シミュレーションの精密化を試みた。DIRECTION データに基づいて再度ドッキングシミュレーションを行ったところ、⑤で示された 2 種類の構造のうち、一方の配向のみが安定に存在した。

⑦ INPHARMA

INPHARMA 実験を行い、化合物 A と RANK の相対配置決定を試みた。その結果、化合物 A の 1 つの芳香環プロトンと RANK のプロリン残基プロトン間に INPHARMA ピークが観測された (図 131)。この結果は、DIRECTION 結果を含んだドッキングシミュレーションによって安定であった複合体構造を支持する。

以上の実験結果から、確度の高い TRAF6/化合物 A 複合体構造が明らかにされつつある。これらのデータをまとめ、論文化を行う。

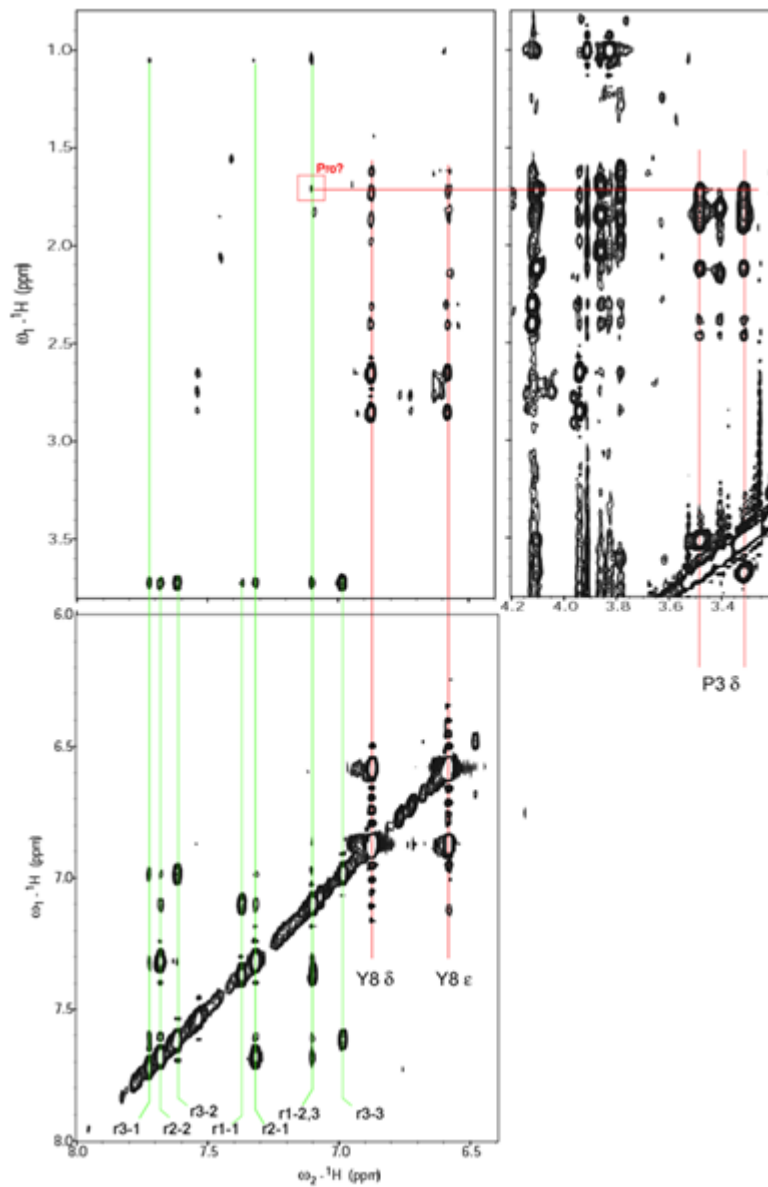


図 131 化合物 A と RANK の INPHARMA 実験結果

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」

本研究開発においては、structure-based drug screening (SBDS)と ligand-based drug screening (LBDS)の全体がつながるように、新規アルゴリズムに基づく計算機ソフトウェアやGPUを利用した高速分子動力学ソフトウェアの開発を行う一方、実験データと理論計算の融合による双方の長所を生かしたタンパク質-化合物複合体予測方法やタンパク質-タンパク質複合体予測手法などを新たに開発した。これらの手法は、2008年3月から2013年2月末まで、myPresto version 4.2として継続的に一般に公開した。化合物データベースとしては、2000万化合物の3次元構造モデルのデータベース化を行い、さらに自ら開発した水溶解度推定手法を適用して、各化合物について、溶解度、非特異的相互作用をする確率、発がん性データを加え、LigandBoxとして公開・配布すると同時に、独自の手法による高速の類似化合物検索機能を持つウェブサイトも公開した。 μ オピオイド受容体を初めとする医薬や農薬の標的となる膜タンパク質に対して、これまでに開発した計算手法を適用した実証研究を行い、多くの新規活性化合物を発見した。

(1) *In silico* ドッキング計算の高精度化

① タンパク質のリガンド結合ポケットの予測 (MolSite 法) (バイオメディカル情報研究センター集中研)

化合物データベースを用いて標的タンパク質のリガンド結合ポケット位置の予測と、期待される活性を予測する手法 (MolSite) を開発した。MolSite では、ランダムライブラリーの多数の化合物をタンパク質の全表面にドッキングし、各化合物のもっとも安定な複合体構造を求める。これら多数の複合体構造での化合物の平均座標を、予測ポケット中心とするが、90種類のタンパク質に適用し、98%の確率でポケットを正しく予測でき、市販ソフトでの50~70%の予測確率に対し有意に優れていた。

また、これらランダムライブラリーの化合物の平均スコアは、そのタンパク質のリガンド結合自由エネルギーと比例することから、タンパク質のリガンドが不明であっても、事前に、薬物の示しうる活性を大ざっぱに知ることができる。弱い活性の化合物しか作れないと最初から分かっていたら、その標的を捨てることができる。

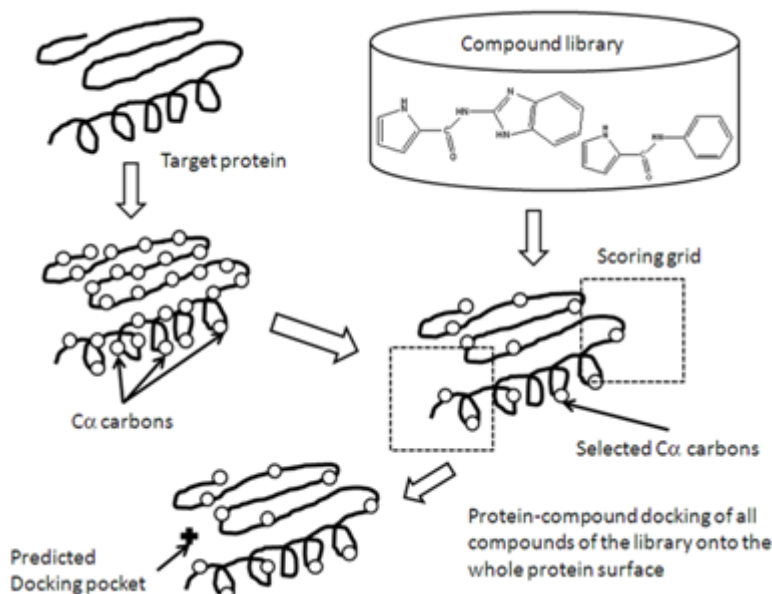


図1 MolSite 法のご概念図

② 多数のスクリーニング結果・タンパク質構造から信頼性の高い結果・構造を選抜する方法 (Universal Active Probe) (バイオメディカル情報研究センター集中研)

SBDS は、数十~数百化合物購入時のヒット率が数%あれば成功とされる。しかし、生のドッキングスコアだけで活性を評価する従来方法では、この甘い定義においてさえ成功するのは半数の場合に限られることが、よく知られている。タンパク質は揺らいでおり、induced-fit も起こすため、通常、タン

タンパク質構造を1つの構造に固定する SBDS の成功は、不確実である。タンパク質の構造ゆらぎに対応する複数の構造を MD など生成し、複数の薬物スクリーニング結果を求めること（アンサンブルドッキング）が近年のはやりだが、複数得られたスクリーニング結果に良いスクリーニング結果が含まれる割合は10~20%なので、どの結果を採用するかが最大の問題である。

我々は、drug-like な化合物の集団（Universal Active Probe:UAP）という概念を提唱し、この問題を解決した。UAPとして、分子量が小さめの既知活性化合物が300種類程度選んだ。UAPは標的タンパク質の活性化合物ではないが、UAPが上位にランクされるスクリーニング結果は、信頼性の高い結果であることが多くのタンパク質で確かめられた。この相関係数は、約0.7と強い相関である。UAPを用いることで、タンパク質の構造ゆらぎも考慮したスクリーニング計算が可能となった。これは、水溶性タンパク質にもGPCRのような膜タンパク質にも適用可能であった。

③ ドッキングスクリーニング法の改良:MTS法の改良(バイオメディカル情報研究センター集中研)

今までに、タンパク質-化合物ドッキングソフト、複数の *in silico* スクリーニング手法を開発してきた。これらスクリーニング手法は、タンパク質-化合物相互作用行列に基づく手法であり、標的タンパク質の3D構造をもとにした Multiple target screening (MTS) 法、標的の構造を用いずに、活性化合物の情報のみを用いる Docking score index (DSI) 法である。ドッキングスコアの精度そのものを改善する手法も提案してきた。1つは、タンパク質-化合物相互作用行列に基づく手法である Direct score modification (DSM) 法、もうひとつは、活性化合物の情報を用いる Machine-learning score modification (MSM) 法である。

標的タンパク質の3D構造が既知であり、かつ活性化合物の情報もあれば、Machine-learning score modification method と MTS 法を組み合わせることで、安定して高いヒット率を出すことができる (MSM-MTS 法)。しかし、活性化合物の情報がない場合、DSM と MTS 法を組み合わせることになるが (DSM-MTS 法)、標的タンパク質の種類によってヒット率にばらつきがあり、またヒット率は、MSM-MTS 法に比べてかなり低いのが問題だった。

Sequence-based DSM 法の開発

DSM-MTS 法の欠点を修正し、標的タンパク質の3D構造が既知である場合、従来より高いヒット率を、標的タンパク質の種類に関わらずに安定して高いヒット率を出すことを目指す。スコアの修正を下記の式で行う。つまりタンパク質 a、化合物 i のドッキングスコア $s_a^{mod,i}$ は、タンパク質 b、化合物 i のドッキングスコア s_b^i の線形結合で近似する。 M_a^b は、パラメータである。

$$s_a^{mod,i} = \sum_b s_b^i M_a^b \quad \text{eq. 1}$$

DSM法では、タンパク質-化合物相互作用行列に基づいてタンパク質 a-b の相関係数 R_{ab} を計算し、これを M_a^b として用いる。

$$s_a^{DSM,i} = \frac{\sum_b s_b^i R_{ab}}{\sum_b R_{ab}} \quad \text{eq. 2}$$

我々は、新たに sequence-based score modification を考案し、 M_a^b をタンパク質 a-b のアミノ酸配列相同性でみるもことにした。

$$R_a^b = S_a^b \frac{1}{1 + e^{-c(x-0.5)}} \quad \text{eq. 3}$$

に置く。 S_a^b は、fasta version 3.4 での相同性 (%)、c はパラメーターで、x は、(a-b の重複する配列の長さ)/(標的タンパク質 a の全長)である。Fasta34 は、部分配列の相同性を計算するようになっている。そのため、数残基 (5 残基以下) で 100%相同性といった部分配列を検出してしまふ。相同性がやや低

くても、全長で 50–60%の相同性があれば同じ構造のタンパク質である。したがって、fasta34 使用時には、タンパク質の相同性を考えるとき、相同性と重複配列の長さの両方を考える必要がある。そこで、配列相同性だけでなく、アミノ酸配列の相同性が見られる領域の長さも考慮するように式を構成した(分母の $1+e^{-c(x-0.5)}$ の部分)。

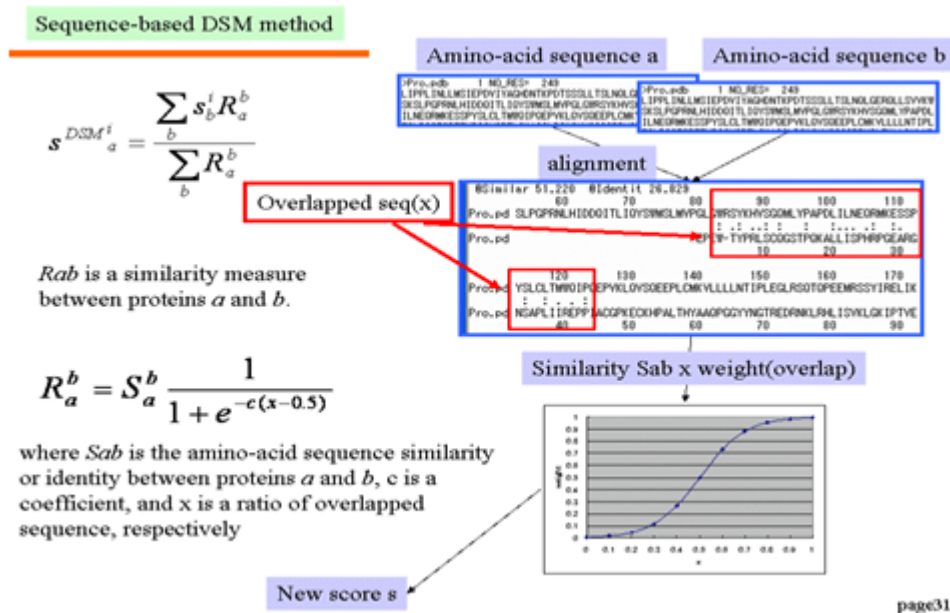
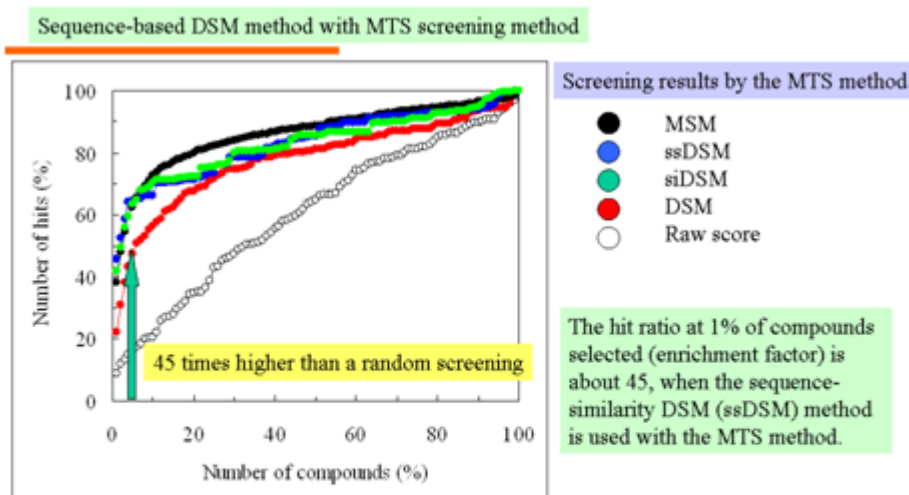


図2 sequence-based DSM 法の模式図

上式において、 S_a^b をたんぱく質 a,b の similarity で置き換えたものを sequence-similarity DSM (ssDSM), identity で置き換えたものを sequence-identity DSM (siDSM)と呼ぶことにした。

ssDSM/siDSM を既存のオリジナルの MTS,DSM-MTS, MSM-MTS と比較してみた。標的タンパク質として、COX-2, サーマライシン, MIS, グルタチオン-S-転移酵素, HIV プロテアーゼ 1 の 5 種を選び、これらの活性化化合物を文献より収集、さらに、約 1 万化合物をランダムライブラリーより不活性化化合物として収集した。180 タンパク質 x 約 1 万化合物の相互作用行列を Sievgene を用いて作成し、ssDSM/siDSM, オリジナルの MTS,DSM-MTS, MSM-MTS を適用して、データベースエンリッチメント曲線を計算したのが下図である。MSM-MTS 法は、既知活性化化合物が発見される確率を最大化するようにパラメータを調整する手法なので、事実上の上限を与えている。ssDSM/siDSM は、オリジナルの MTS, DSM-MTS 法の結果を大きく上回り、MSM-MTS 法に近い結果を与えた。上位 1% の化合物を採択した場合のヒット率は 45% に達し、ヒット率を向上させる初期の目的は果たされている。

ただし、ssDSM/siDSM は、通常の MTS 法でヒット率が高かった標的に対し、より高いヒット率を示す反面、通常の MTS 法でヒット率が低かった標的に対しては、より低いヒット率を与えてしまう。平均すれば、ヒット率を完全しているが、標的による結果のばらつきが大きくなるのが欠点であることが分かったので、適用に際しては注意が必要である。



page32

図3 sequence-based DSM法でのヒット率の各種手法との比較

④ NMR 実験情報と理論計算の融合によるタンパク質-化合物複合体予測手法の開発 (バイオメディカル情報研究センター集中研)

NMR 実験情報とドッキング計算を組み合わせたタンパク質-化合物複合体を予測する手法を開発し、p38MAPK に適用し、従来のドッキング計算の精度を上回ることを確認した。本手法では、NMR チームで開発された、タンパク質-化合物相互作用を溶液 NMR で観測する DIRECTION 法の情報を利用する。DIRECTION 法では、タンパク質-化合物の混合溶液を試料とし、NMR によってタンパク質と接触する水素原子を同定する。しかし、DIRECTION 法の情報だけでは、タンパク質-化合物複合体の座標は求められない。一方、ドッキング計算では、正しいタンパク質-化合物複合体の座標を再現できる確率は 25%にとどまる。そこで、ドッキング計算によって、NMR 情報が再現されるように、化合物をタンパク質表面上で動かす、もっともらしいタンパク質-化合物複合体座標を割り出す。計算では、DIRECTION の情報の絶対値を算出することはできず、その相対値のみが計算される。そこで、DIRECTION の情報と計算から算出する理論値の相関係数と、タンパク質-化合物相互作用の和が最大となるように、化合物に力が働くようにした。

この技術によって、タンパク質と薬物の複合体構造を、結晶化をせずに予測することができ、活性化合物の合成展開すべき部位の予測や物性予測など、リード創製を支援することができる。

NMR実験と理論計算の融合による蛋白質・リガンド複合体モデリング

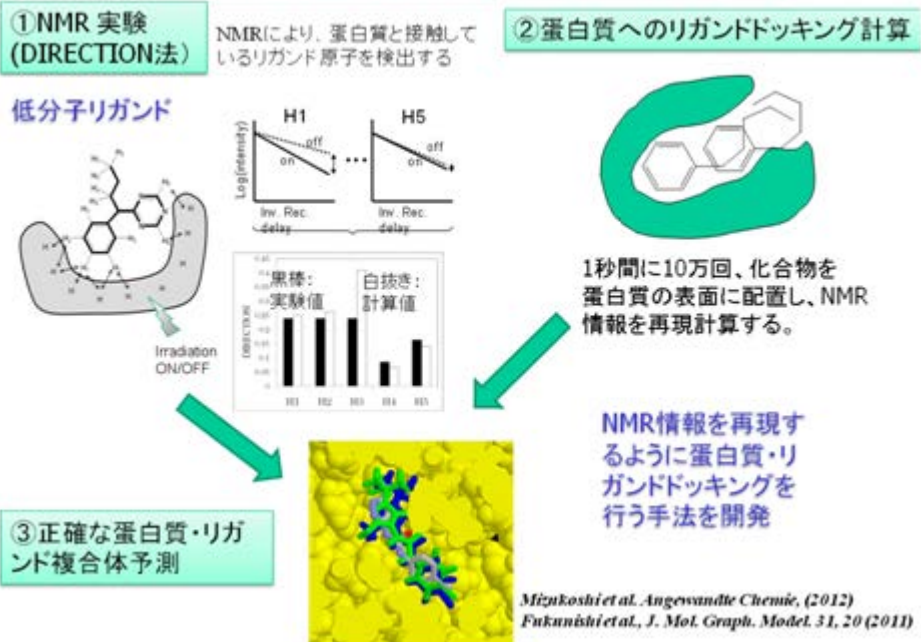
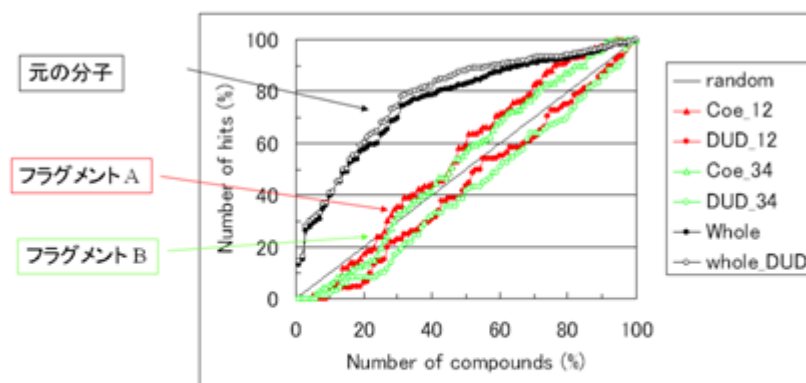


図4 NMR実験とドッキング計算の融合手法の概念図

- ⑤ Fragment-based drug development のための *in silico* スクリーニング手法 (バイオメディカル情報研究センター集中研)

分子量 300Da 程度の小さな分子をスクリーニングに用いる Fragment-based drug development は近年、有力な創薬手法となってきた。従来の分子量 500Da 以下の大きめの分子のスクリーニングでは、必要な機能を足すために分子に官能基を加えると同時に、必要性の低い部分を削らねばならなかったが、分子を削るのは、官能基を足すのに比べてはるかに困難なためである。しかし、分子量が小さくなると計算によるドッキングスクリーニングが困難となる。この状況を示したのが図5である。ドッキングスクリーニングでは、薬物分子を発見できるが、分子を半分に切ったフラグメントを見出すことはできない。

In silico screeningの結果



計算ではフラグメントは見出せない。
元の活性化合物は見出せる。

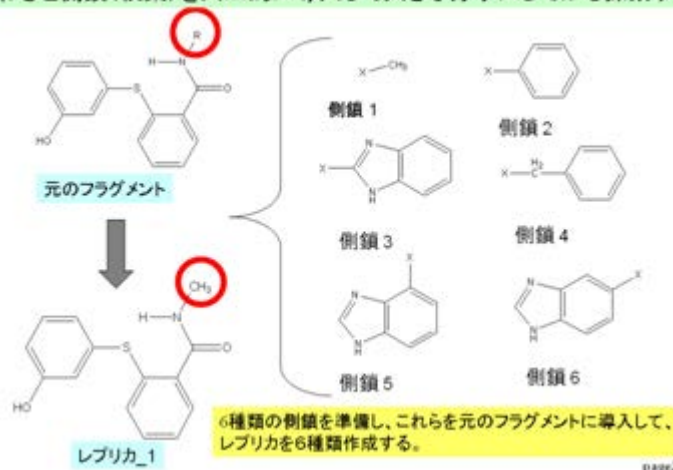
page1

図5 *In silico*スクリーニングでのデータベースエンリッチメント曲線

本来の活性化合物である元の分子（白黒）は、発見できるが、元の分子をフラグメントに分割したものは発見できない（赤、緑の線が対角線に近い）。カーブが2本ずつあるのは、化合物集団を変えて2回のテスト計算を行ったため。

この *in silico* スクリーニングの欠点を改良したのが、我々の開発した Fragment Screening bu Replica Generation (FSRG)法である。FSRG 法（図6）は、フラグメントに対して、人工的に側鎖を導入することで、分子を大きくし、*in-silico* スクリーニングで扱いやすくする。計算機上で、Fragment evolution を行い、活性を増してドッキングスクリーニング計算をするのである。

レプリカ分子の準備: 小さな分子をそのまま探すのではなく、わざと側鎖（枝葉）を人工的に導入して大きな分子にしてから探索する。

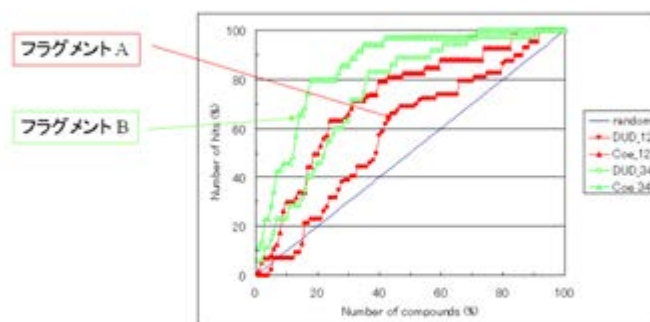


page2

図6 FSRG 法（図6）は、元のフラグメントに対し、6種類の側鎖を人工的に導入し、6種類のレプリカ分子を作成し、これらレプリカ分子をドッキング計算に用いる。

FSRG 法を、数標的タンパク質に対して適用すると、データベースエンリッチメント曲線は、以前の対角線上から、上に立ち上がるように改善され（図7）、効果が確かめられた。

In silico screening の結果
:レプリカフラグメント生成法



レプリカ分子のヒット率は、非常に改善した。

page3

図7 FSRG 法によるデータベースエンリッチメント曲線

フラグメントに側鎖を導入する方法は、化学反応によって異なるので2種類想定したが（緑及び赤）、いずれも効果があることが分かった。カーブが2本ずつあるのは、化合物集団を変えて2回のテスト計算を行ったため。

⑥ ドッキングソフトと分子動力学 (MD) シミュレーションの融合手法の開発 (バイオメディカル情報研究センター集中研)

タンパク質と化合物の複合体が1つ X 線結晶構造解析ないし、丁寧なモデリング計算によって得られた場合、この複合体の構造を利用して、高精度な薬物ドッキングスクリーニングを行う手法 (sievgene-MVO 法)を開発した。我々の開発した高精度な類似化合物探索ソフト molecular dynamics maximum volume overlap (MD-MVO)法と、高速な薬物ドッキングソフト sievgene を融合させた。MD-MVO 法とは、既知活性化化合物に対して、データベースから選んだ化合物を、原子電荷も考慮しながら2化合物の体積重なりが最大になるように MD 計算によって、分子の配座探索と同時に分子重ね合わせをする手法である。Sievgene-MVO 法では、既知活性化化合物を、標的タンパク質に結合していると期待される構造に固定して、データベースから選んだ化合物を、標的タンパク質にドッキングさせながら、タンパク質と結合したまま運動させて2分子の重ね合わせを行う。これにより、多くの種類の分子・標的で、高く安定したヒット率を出せるようになった。 μ オピオイドに対して、エンドモルフィンを既知化合物としたスクリーニング計算を行い、塩野義製薬でアッセイを行った。

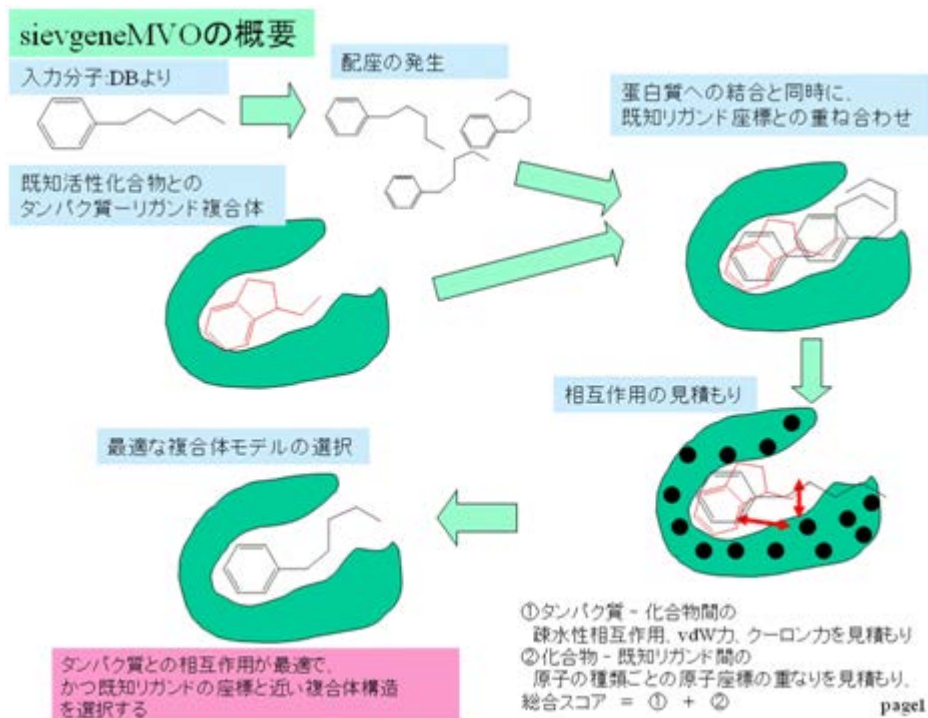


図 8 Sievene-MVO 法概念図

(2) 構造生理学アプローチによるタンパク質間相互作用解析

① 膜タンパク質の分子動力学計算による動的性質の抽出 (大阪大学分室)

創薬プロセスにおける *in silico* ドッキング計算において、タンパク質の動的性質を正しく評価し動的性質を抽出するため、分子動力学計算結果におけるタンパク質分子の各原子のトラジェクトリーから、主成分解析(PCA: Principal Components Analysis)を行って動的構造を解析する手法を開発・確立した。また、主鎖原子間をバネでつなぐモデルである弾性ネットワーク・モデル(ENM: Elastic Network Model)についても、その解析法を開発し、上記 PCA 解析と同様に利用できる仕組みとした。

まず、膜タンパク質であるモノアミン酸化酵素-A (MAO-A) の膜分子と水分子をあわらに取り扱った計 81,647 原子からなる系 (水分子: 17125, POPC (1-Palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine) リン脂質分子: 163, Na⁺: 76, Cl⁻: 78) に対し、myPresto/cosgene を用いて NPT アンサンブル (Nosé-Anderson 法) による 1 気圧、310K での分子動力学計算を、1 step = 2 fs として、20 ns の長さで 3 回初期速度を変えて行った (周期境界条件: 72 Å x 94 Å x 124 Å)。同様に、膜貫通ヘリックスを削除し、膜分子のない水溶液系 (計 63,605 原子, 周期境界条件: 72 Å x 92 Å x 96 Å) も同時に 3 回の分子動力学計算を行い、トータル 6 々のトラジェクトリーを比較・解析した。

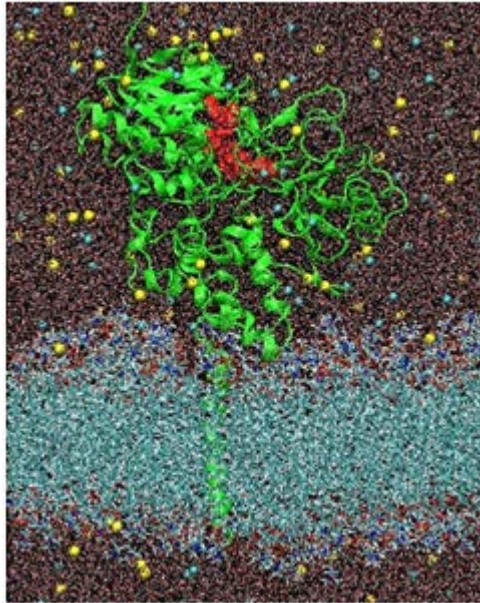


図9 膜タンパク質 MAO-A に対するシミュレーション計算の系
MAO-A (緑のリボン) と、膜分子 (POPC:水色)、溶媒の水 (赤)、Na⁺イオン (黄色)、Cl⁻イオン (水色の球)。

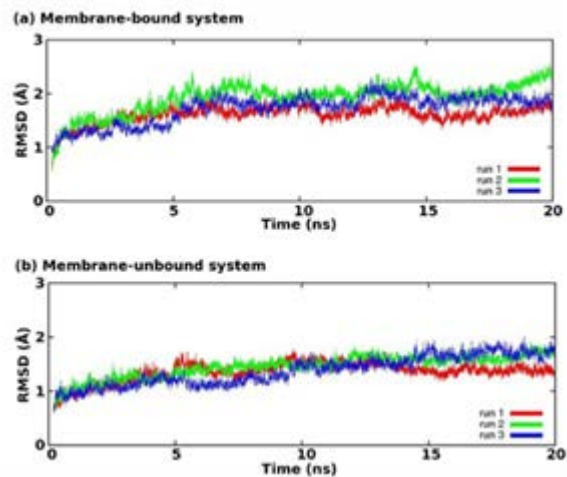


図10 (a)膜貫通ヘリックスがある場合のトラジェクトリにおける初期構造からのズレ。(b)水溶液系のシステムにおけるトラジェクトリ。

この時、特に、MAO-A の内部のドメイン構造の動的性質を明らかにするため、ゆらぎの相関を、

$$Corr_{ij} = \frac{\langle (\bar{r}_i - \langle \bar{r}_i \rangle) \cdot (\bar{r}_j - \langle \bar{r}_j \rangle) \rangle}{\sqrt{\langle (\bar{r}_i - \langle \bar{r}_i \rangle)^2 \rangle \langle (\bar{r}_j - \langle \bar{r}_j \rangle)^2 \rangle}} \quad (\bar{r}_i: i\text{番目の残基の} C_{\alpha}\text{原子の座標})$$

と定義して、全ての 60 ns ずつのトラジェクトリを計算し、膜貫通ヘリックスが膜にアンカーしている状態のもの (左上) と、膜貫通ヘリックスを含まず水溶液中のもの (右下) とを比較した。

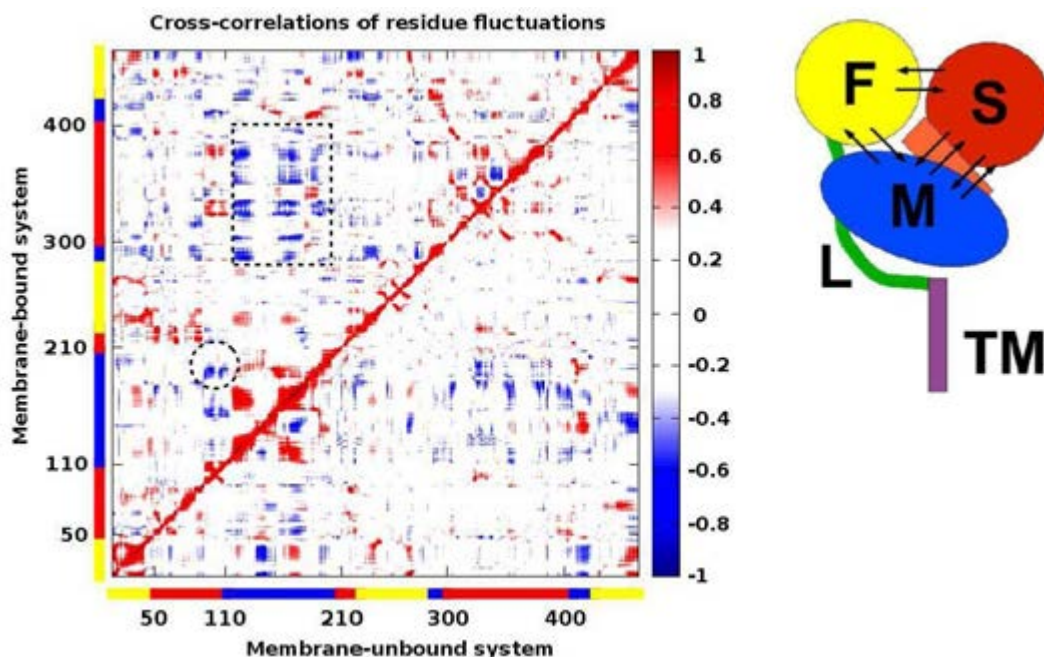


図 11 i 番目の残基と j 番目の残基お C_{α} 原子間のゆらぎの相関 $Corr_{ij}$

左上は膜貫通ヘリックスを含む系であり、右下は水溶液系。残基部分の色は、右の概略図におけるドメインに対応する。オレンジ色はリガンド結合部位。

明らかに、点線で囲む負の相関（青色で示される領域）が、膜貫通ヘリックスを持つ場合には明瞭であるのに対し、水溶液中のトラジェクトリーには見られないのがわかる。これらは、図 11 で示す S ドメインと M ドメイン間の負の相関であり、リガンド結合部位の開閉が、膜貫通ヘリックスがある場合には拡大されることがわかる。

さらに、どのような運動かを詳細にみるため、主成分解析と ENM 解析とを比較した（図 12）。

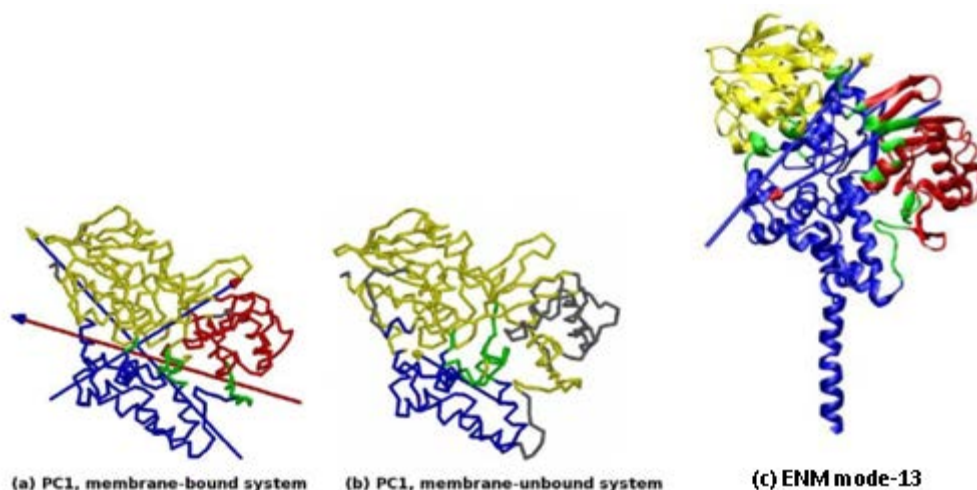


図 12 膜貫通ヘリックスがある場合 (a) と削除した場合 (b) の 2 つの場合の主成分解析の第 1 成分(PC1)の比較

(a) では運動の方向とドメインが同期していることがわかる。(c) ENM による基準振動解析で得られた 13 番目のモード（それ以下の低振動モードは、膜貫通ヘリックスの運動に関わるもの）は、PC1 に良く一致していた。

ENM 解析で得られる基準振動で、主成分解析で得られる主な運動が再現されていることがわかり、分子動力学計算と主成分解析によって得られる振動モードは、このタンパク質分子がもともと持っている運動であることがわかる。すなわち、リガンド結合に関係すると思われるドメインの開閉運動は、もともとの MAO-A 分子が持っている振動モードであったが、膜貫通ヘリックスが膜にアンカーリン

グすることによって、テコのように働き、このドメイン間の開閉運動がさらに強調されたものと考えられる。これから、図 13 のようなリガンドの入出に伴う道筋（トンネル）が推測される。特に右側のピンク色のトンネルについては、リガンド選択性をつかさどるアミノ酸がそのトンネル中に位置することから、この推測の正当性が示唆されている。

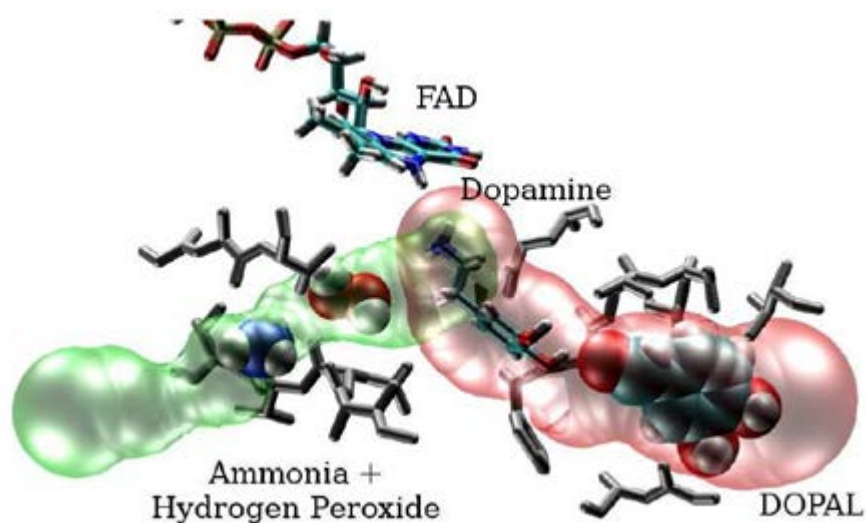


図 13 動的なリガンド結合の道筋

トンネルの径の大きなピンクの道筋と、若干小さい緑の道筋が可能なものとして考えられる。

以上、MAO-A の静止状態の構造からはリガンド結合の道筋が不明であったのが、このようなシミュレーション計算によって、ダイナミックなリガンド結合の仕組みを明らかにすることができた。

② 新しいリガンド結合エネルギー計算手法（Smooth Reaction Path Generation 法）の開発（バイオメディカル情報研究センター集中研）

医薬分子の標的への結合活性は、結合自由エネルギーで測ることができる。医薬品の最高活性は、結合自由エネルギーで最大 15 kcal/mol 程度であるとされている。通常、医薬品の平均活性は $IC_{50} = 30$ nM であり、70%の化合物が IC_{50} が 50 nM より強い活性をしめす。 IC_{50} が nano-, pico-M である場合、結合自由エネルギーは 12.6 - 16.8 kcal/mol となる。

結合自由エネルギー (ΔG) の計算は、計算化学の究極の目的の一つだが、計算は難しい。タンパク質-化合物ドッキングソフトによる見積もりでは、様々なソフトが開発されてきたものの、実測 ΔG と計算値の相関は、相関係数 0.6~0.7、平均誤差 2.5 kcal/mol となる。この誤差は、ヒット化合物（シードレベル）の ΔG に相当するエネルギーで、その結果、計算によるヒット化合物探索の精度は低い。MMPBSA、MMGBSA、LIE(Linear Interaction Energy)、COMBINE 法などいろいろな半経験的 ΔG 推算方法が開発されてきたが、精度がドッキングソフトに比べて飛躍的に高いわけでもなく、既知活性化化合物の ΔG がないと推算ができなかつたりする欠点があった。 ΔG の推算誤差を 1 kcal/mol 程度にすることができれば、活性の推算は、従来の 10 倍程度に改善されたといえるので、この値を最終目標とする。なお、実験での pH、塩濃度によって活性値は 10 倍程度変化するので、誤差 1kcal/mol 以上の精度は、期待できない。

分子動力学シミュレーションで ΔG が計算できれば、既知の ΔG を必要とせず、理想的であるが、その計算は、極めて計算量が多く、困難である。我々は、2003 年に filling potential(FP)法を開発した。FP 法では、タンパク質-化合物複合体から、人為的なポテンシャルを用いて、化合物を解離させ、その経路に沿った自由エネルギー面を計算することで、少ない計算時間で ΔG を求める。しかし、FP 法は、化合物が水中ではなかなか解離しない、ヒストグラム法を使うため、慎重な計算が必要で、計算 5 回~10 回に 1 回しか成功しない取扱いの難しい方法だった。そこで、我々は、より簡便に、高い確率で ΔG が計算できる方法を開発することにした。

開発した計算手法：Smooth Reaction Path Generation (SRPG) 法

タンパク質と化合物の複合体構造を最初に準備し、タンパク質から化合物を、真空中で簡単に解離させ、その解離の経路をルジャンドル多項式を用いて滑らかな経路で近似する。この滑らかな経路に沿って、化合物が様々な位置に存在する状態を作り、タンパク質、水、イオンと合わせて系を作り、各系でMDを行い、リガンドの対象原子に働く平均力を計算する。滑らかな経路に沿って、力を積分することで自由エネルギー面を計算し、結合状態と解離状態の存在確率を求めて、その比率から ΔG を計算する。各状態を平行に計算することができることで計算時間を大きく短縮させることができるという利点がある。

SRPG 法による ΔG 計算では、

$$\Delta G = -k_B T \ln \frac{P_B}{P_U} \quad \text{eq. 4}$$

結合状態の規格化されていない確率 P_B と非結合状態の規格化されていない確率 P_U を用いて ΔG を計算する。このとき、

$$P_B = \int_{R_B} \exp(-\beta G(r)) dr \quad \text{eq. 5}$$

$$P_U = \int_{R_U} \exp(-\beta G(r)) dr \quad \text{eq. 6}$$

ここで $G(\mathbf{r}) \cdot \beta$, R_B , and R_U は、座標 \mathbf{r} 、での自由エネルギー(PMF), $1/k_B T$, リガンドの結合状態の領域、リガンドの非結合状態の領域である。

もし、結合状態の確率 P_B が、PMF の最安定座標の周辺(\mathbf{r}_0)に限定され、 $G(\mathbf{r})$ がパラボラポテンシャルで式7のように近似されるなら、

$$G(\vec{r}) = G(\vec{r}_0) + \left(\frac{k_x}{2} \Delta x^2 + \frac{k_y}{2} \Delta y^2 + \frac{k_z}{2} \Delta z^2 \right) \quad \text{eq. 7}$$

ここで、

$$\vec{r} = \vec{r}_0 + \vec{\Delta r}, \quad \vec{\Delta r} = (\Delta x, \Delta y, \Delta z) \quad \text{eq. 8}$$

結合状態の確率 P_B は、式9 で与えられる。

$$P_B = \int_{V_B} \exp\left(-\beta\left(G(r_0) + \frac{k_x}{2} x^2 + \frac{k_y}{2} y^2 + \frac{k_z}{2} z^2\right)\right) dx dy dz \quad \text{eq. 9}$$

PMF の原点を解離状態に置く ($G(\infty) = 0$). もし $G(\mathbf{r})$ の値が、0 kcal/mol に近いなら、

$$P_U = \int_0^{\infty} 4\pi r^2 \exp(-\beta G(r_\infty)) dr = \frac{4\pi}{3} R^3 \exp(-\beta G(r_\infty)) = V_0 \exp(-\beta G(r_\infty)) \quad \text{eq. 10}$$

化合物の密度が 1M density だと、1 個の化合物分子の占める体積 V_0 は 1661 \AA^3 となる。以上、まとめると、 ΔG は式 11 で与えられる。

$$\Delta G = G(r_0) - G(r_\infty) - k_B T \ln \frac{\int_{-\infty}^{\infty} \exp(-\beta \frac{k_x}{2} x^2) dx \int_{-\infty}^{\infty} \exp(-\beta \frac{k_y}{2} y^2) dy \int_{-\infty}^{\infty} \exp(-\beta \frac{k_z}{2} z^2) dz}{V_0}$$

eq. 11

式8の第3項の分子は、ガウス積分なので、解析的に解くことができる。

$$\Delta G = G(r_0) - G(r_\infty) - k_B T \ln \frac{\frac{\sqrt{\pi}}{\sqrt{\beta k_x / 2}} \frac{\sqrt{\pi}}{\sqrt{\beta k_y / 2}} \frac{\sqrt{\pi}}{\sqrt{\beta k_z / 2}}}{1661}$$

eq. 12

解離の経路 $p(t)$ は、ルジャンドル多項式として、

$$\begin{cases} p_x(t) = \sum_{i=0}^L c_x^i P_i(t) \\ p_y(t) = \sum_{i=0}^L c_y^i P_i(t) \\ p_z(t) = \sum_{i=0}^L c_z^i P_i(t) \end{cases}$$

eq. 13

FP法で解離させた経路 p^0 に対して、 S を最小化するように、係数 c をモンテカルロ計算で最適化するように決定した。

$$S = \sum_m^M \sum_n^N D(p(n/N), p^0(m))^2$$

eq. 14

タンパク質-化合物の ΔG の計算：ストレプトアビジンとビオチンの系について計算を行った。

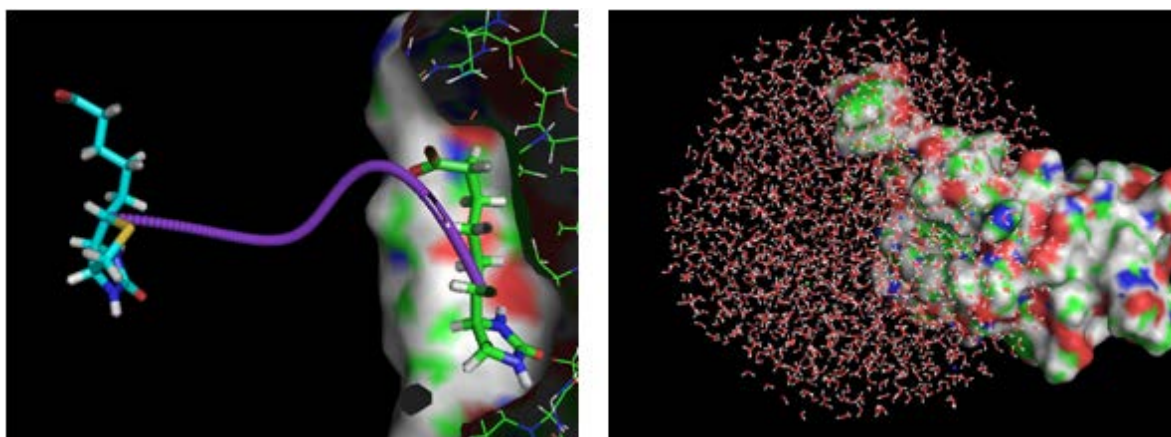


図14 ストレプトアビジンからビオチンが解離していく経路

左のように、真空中で解離させ、右のように、後から溶媒水を加えて、経路にそって、150個の系を作成した。

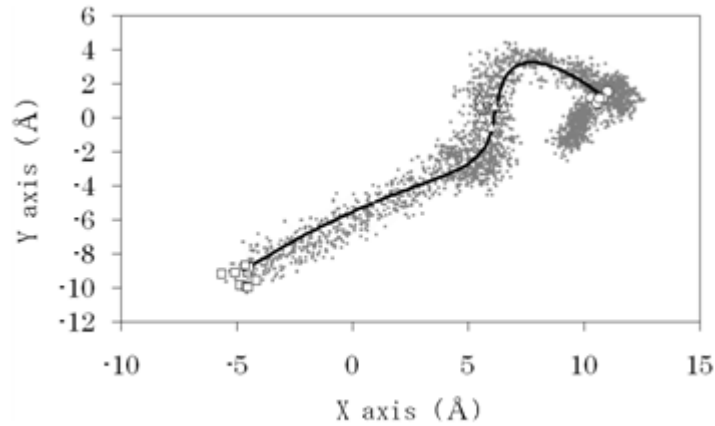


図 15 FP 法によって、生成した解離していくリガンドの座標を点で表したものの座標点に対してルジャンドル多項式で生成した滑らかな経路を実線で示す。

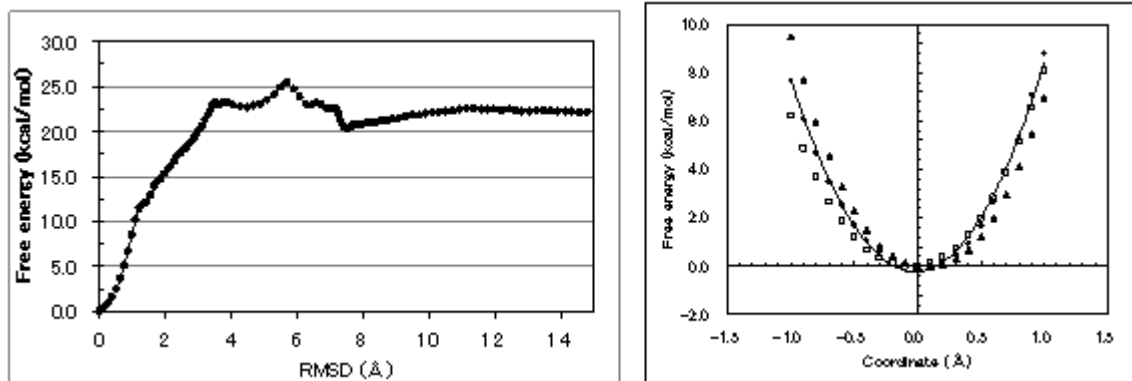


図 16 Potential of mean force

この経路に沿った自由エネルギー面は図 16 となった。リガンドの結合状態周辺の自由エネルギー面は、上右図のようであり、2 次曲線で近似でき、理論が適用できることが示された。

表 1 実験値と計算値の比較

	SRPG法	実験値
$\Delta G(\text{kcal/mol})$	-16.5	-18.27

こうして SRPG 法では、誤差 1.8kcal/mol (9.8%) という高い精度で、 ΔG を計算することができた。一例に過ぎないが、ドッキングソフトでの ΔG 平均誤差を 1kcal/mol 近く上回り、活性値で 10 倍の精度に達している、ともいえる。

③ Direct Interaction Approximation 法の開発 (バイオメディカル情報研究センター集中研)

タンパク質と化合物の結合自由エネルギー (活性) を計算するのは、厳密には非常に時間がかかるが、ドッキングスコアのような簡便な方法では誤差が大きすぎて分子設計に使えない。そこで MD シミュレーションを用い、簡便かつ分子設計に使える程度の精度で推算できる方法を開発した。この手法では、タンパク質と薬物分子の複合体構造の MD を行い、タンパク質と薬物分子の直接の相互作用のうち、タンパク質残基 i と van der Waals 相互作用 ($\langle E^{\text{vdw}}(i) \rangle$) と静電相互作用 ($\langle E^{\text{ele}}(i) \rangle$) のトラジェクトリー平均値を、残基ごとに重みを付けて、線形近似する。van der Waals 相互作用は、タンパク質-薬

物間の原子の接触を表し、疎水性相互作用を近似する項であり、オリジナルの意味の van der Waals 力ではない。このとき、タンパク質の2面角ないし ASA のトラジェクトリーでの揺らぎの値 S_x を加えることで、多くの種類のタンパク質に、同一のパラメーター α 、 β 、 τ によって対応できるようにしている。

$$\Delta G_{DIAV} = \alpha \sum_i \langle E^{vdW}(i) \rangle \times e^{-\alpha 2 \times S_{vdW}(i)} + \beta \sum_i \langle E^{ele}(i) \rangle \times e^{-\beta 2 \times S_{ele}(i)} + \tau \times S_x$$

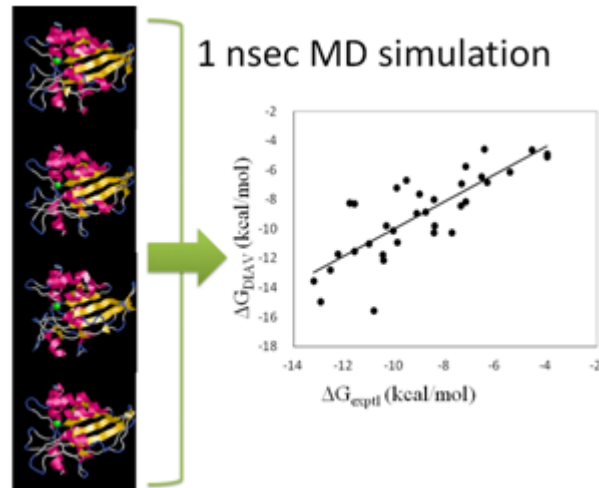


図 17 DIA 法の概念図と、精度

この DIA 法では、1~2nsec の MD 計算で、約 1.3 kcal/mol 程度の ΔG 推算誤差で、 ΔG を見積もることができる。

④ McMD (マルチカノニカル分子動力学法) 計算法によるタンパク質-阻害剤の結合自由エネルギー計算 (大阪大学分室)

結合自由エネルギーを高い精度で算出するため、溶媒をあらわな水分子モデルで扱った系における、長時間のマルチカノニカル計算によるドッキング・シミュレーション手法を開発した。この手法により、リゾチームタンパク質とその阻害分子 (NAG(N-acetyl-D-glucosamin) trimer) との結合についての、*ab initio* 的なシミュレーションを行った。643 の TIP3P 水分子を CAP 境界として部分的に付加し、マルチカノニカル分子動力学 (McMD) 計算法によって、700K から 300K までをカバーするアンサンブルを得た (図 18)。この時、タンパク質側は距離拘束条件を付加することによって、高い温度でも大きな構造変化がおきないように工夫した (図 19)。

最終的に 72 ns (7.2×10^7 steps) の McMD ランを行い、その後、300K、500K、700K のカノニカル・アンサンブルを再構築し、阻害剤(NAG)₃ の中心位置の分布をプロットした (図 20)。面白いことに、図 18 の(a)700Kや(b)500K では、阻害剤の位置はタンパク質から離れているのに対し、(c) 低温(300K)になるとタンパク質に近い所の存在確率が大きくなっている。

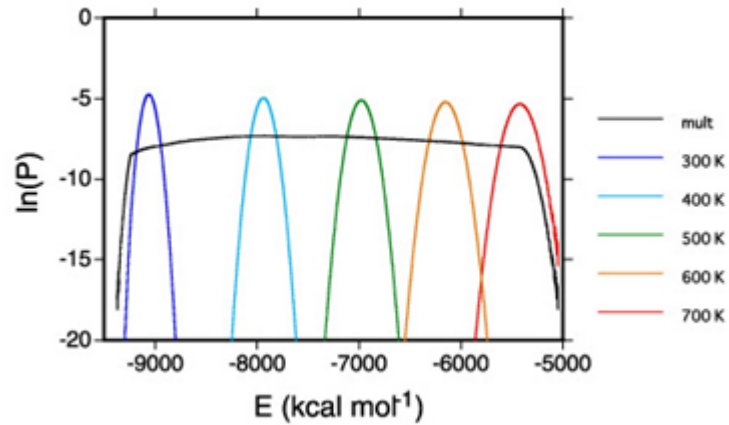
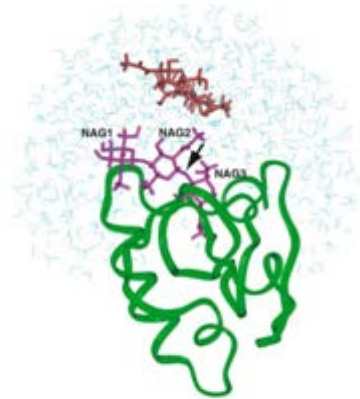


図 18 McMD アンサンブルと再構築したカノニカル・アンサンブルのエネルギー分布



Kamiya et al. Figure 1

図 19 対象としたリゾチームとその阻害剤 ((NAG)3) および CAP の水分子。阻害剤は、初期の位置を赤で示し、紫は結晶構造

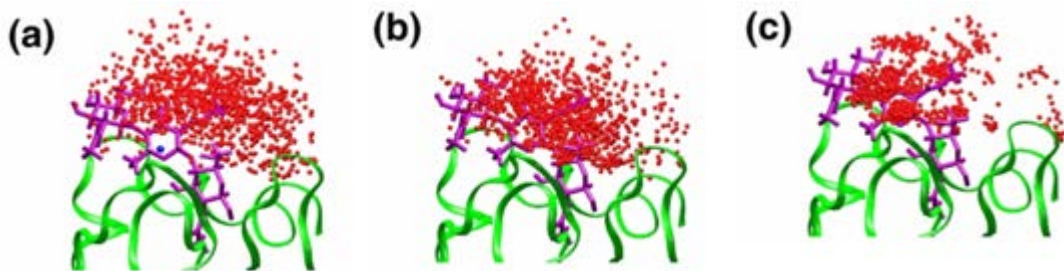


図 20 (a) 700K, (b) 500K, (c) 300K として再構築した系のカノニカル・アンサンブル中の、リゾチーム (緑のリボンで示される主鎖構造) に対する阻害剤の重心の位置の分布
紫の棒モデルは、この阻害剤のリゾチームとの複合体の X 線結晶構造中の構造を参照構造として示している。

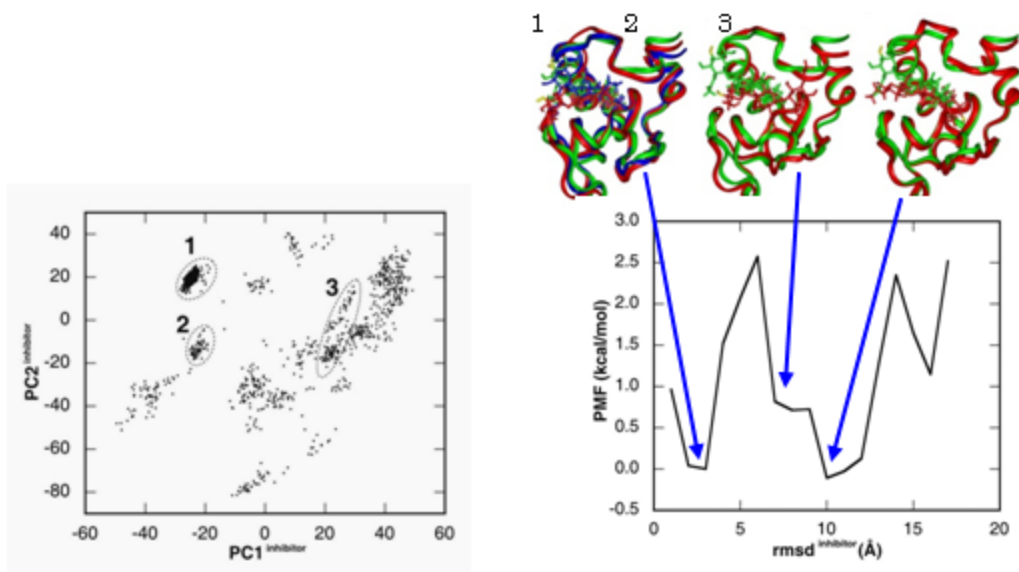


図 21 自由エネルギー地形（左と右）と、リゾチームと阻害剤(NAG)3との複合体構造（右上）
 （緑：X線結晶構造，青と赤とは典型的なクラスター1，2，3中の構造）

このカノニカル・アンサンブルから、阻害剤の座標に対する主成分解析を行って、自由エネルギー地形を描いた（図 21）。複数の結合様式の中で、天然に観測される結合状態が安定となることが理解された。

⑤ 天然変性タンパク質の構造形成メカニズム（大阪大学分室）

マルチカノニカル MD を用いた *ab-initio* な複合体の構造予測法の研究を行って **Coupled folding and binding** の問題にアプローチし、ハンチントン舞踏病原因タンパク質である **NBRF** を例とし、単体では決まった構造を取らず、**mSin3** タンパク質と複合体になって初めて決まった立体構造を取る天然変性タンパク質の構造形成メカニズムを明らかにした。マルチカノニカル MD は、当研究チームが中心になって開発してきた分子シミュレーションの手法であって、分子が偽の安定な構造にとらわれることなく、幅広い構造を高精度・高効率で探索できる手法であるが、大きな系への適用は困難だった。複数の並列に行う計算結果を統合することで計算効率を高めるなどの工夫により、タンパク質のような大きな系に適用することに成功した。

水中では安定な構造を取らないタンパク質（ドメイン）が、水中で会合したときに起こる構造変化による安定な複合体構造を、第一原理的なシミュレーション計算で同定し、実験との一致をみた。また、従来、単体の場合に複合体構造が用意されているという **population shift** メカニズムと、複合体を形成してから特異的な構造変化が起こるといふ **induced fitting** メカニズムの2つが、**Coupled folding and binding** のメカニズムとして別々に提唱されていたが、本シミュレーションによって、両方のメカニズムが存在することを明らかにすることができた。

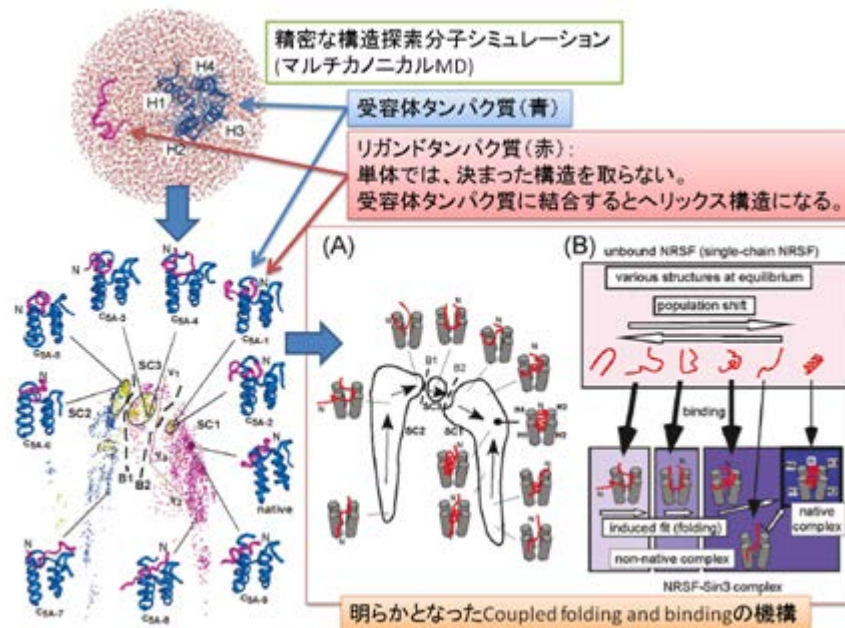


図 22 McMD 法によって予測された天然変性タンパク質の構造形成メカニズム

⑥ タンパク質複合体構造予測法の開発 (バイオメディカル情報研究センター集中研、大阪大学分室)
 タンパク質複合体構造予測法の開発を行い、複合体構造予測のブラインド・コンテストである CAPRI(Critical Assessment of Predicted Interactions)に参加してその性能を評価した。構造プロテオミクスの発展に伴い、多くのタンパク質の立体構造が公開されるようになったが、それらからタンパク質の複合体構造を予測することは、タンパク質の機能を理解し制御するために重要であるが、尚困難な課題の一つである。

タンパク質複合体構造の予測においては、1) タンパク質間相互作用部位の予測、2) 候補構造の発生と評価、が重要なポイントである。我々は進化系統樹を利用した機能部位予測法である ET(Evolutionary Trace)法とタンパク質形状の相補性を利用した独自の構造探索エンジン・構造評価関数を組み合わせた手法を開発した。

本手法を CAPRI の問題に適用し、いくつかの例で、高精度の複合体構造をサンプルすることができた。下図は予測結果の一例である、ARF-1 と ARF-BD の複合体の予測(T25)では、44 番目の候補として、結晶構造との RMSD=2.59 Å の構造が得られた。また、TolB と Pal の複合体の予測(T26)では 14 番目の候補として、結晶構造との RMSD=2.55 Å の構造を得ることができた。

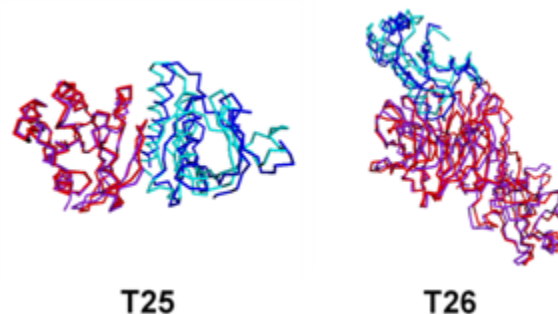


図 23 予測結果の例

結晶構造のサブユニットを赤及び青、予測構造を紫及び薄青で示す。

さらに、図に示す surFit と呼ぶ複合体構造を構築するパイプラインを作り、<http://sysimm.ifrec.osaka-u.ac.jp/surFit/>から公開した。

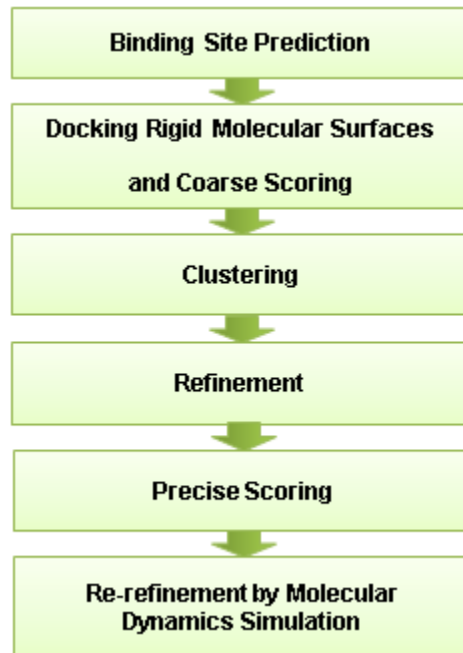


図 24 タンパク質複合体予測のパイプライン

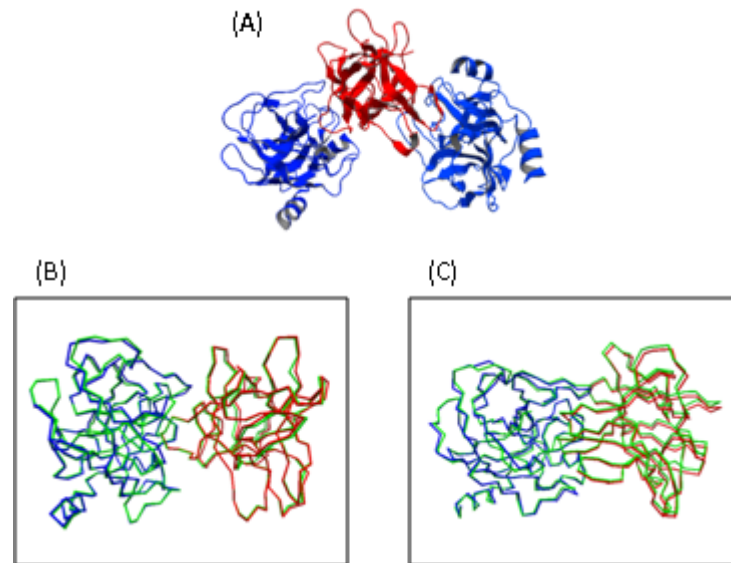


図 25 CAPRI コンテスト T40 におけるタンパク質複合体予測の例
(緑がモデル構造で、赤と青は X 線結晶構造)

このパイプラインはマルチステージのアプローチであり、最初にインターフェース部位を推定後、分子表面同士のドッキングをハッシュ表を用い高速に行い、1 時間に 100 万ヶほどの可能な複合体構造候補を作成する。その後、類似の複合体構造をクラスタリングによって選択して 1000 ヶほどの代表構造とし、構造エネルギーの極小化を行って分子内の歪を取り除く。この構造に対して、さらに分子表面における静電相互作用、疎水相互作用、表面形状の 3 つの相補性をスコア化し、50 ヶほどの予測複合体構造に絞り込む。さらに、水中で分子動力学計算を行い、溶媒分子も含めたタンパク質複合体構造予測を行うこのパイプラインを利用して、さらに CAPRI コンテストに臨み、以下のように、良い成績をえることができた。

T40 では、図 25A のように中央の阻害剤タンパク質が、同時に 2 つのトリプシンと結合し、その働きを阻害するという興味深い分子が対象であった。2 つの結合モードが可能であるが、我々のグループの提案した構造は、(B) の結合モードについては、類似の結合モードが既知であり多くの参加グルー

ブが正しい複合体構造提出した中でも、全 368 構造中 7 番目に X 線結晶構造に近い (RMSD=1.0 Å) ものであった。一方、(C) の結合モードは、これまでに全く知られていない複合体構造であったが、我々は、提案された全 368 構造中、最も X 線結晶構造に近い構造 (RMSD=0.67 Å) を提案することができた。

T42 では、人工的に変異を導入した TPR モチーフが作るホモダイマー構造の予測であり、自然界に既知の複合体様式が無い難問であった。我々の提案した 10 ケの構造中、1 つは、コンテスト参加者から提案された全 278 構造中最も X 線結晶構造に近い構造 (RMSD=1.3 Å) であった。

T47 では、E2 (DNase domain of colicin E2) と Im2 (immunity protein 2) との複合体構造の推定が問題であったが、2 つのインターフェース間に存在する水分子の位置までも推定せよ、という困難な問題も同時に提出された。E2 と Im2 の複合体構造そのものは、既知のホモログ同士の複合体構造として比較的容易にモデルを構築できた。一方、水分子の推定のため、我々は水分子をあらわに含んだ分子動力学計算を実施し、水分子を含む 10 ケの複合体構造を提案した。その結果、我々の提案した複合体構造はもとより、水分子の位置も 10 ケ中 7 ケまでが excellent の評価が得られた正しい予測であり (残りの 3 ケも good の評価で悪くないもの)、他に excellent の評価が得られたのは 2 グループからの 4 ケの構造だけであった。

以上のブラインド・コンテストの評価を行う国際会議において、我々のグループの構造予測手法は、主催者である S. Wodak と M. Lensink から高く評価された。

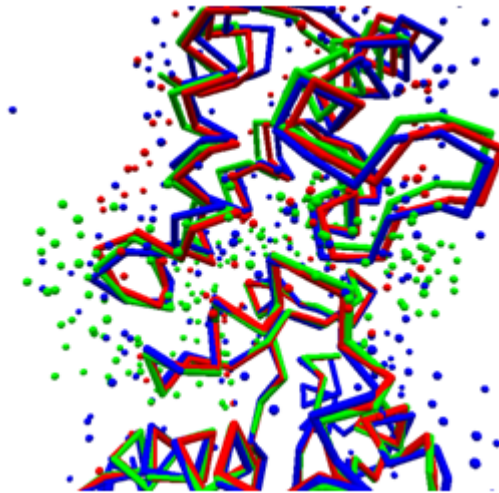


図 26 CAPRI コンテスト T47 におけるタンパク質複合体予測の例 (緑がモデル構造で、赤と青は X 線結晶構造)

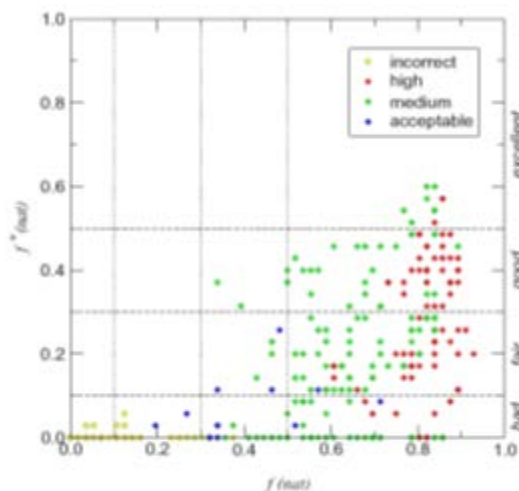


図 27 複合体構造の精度 (縦軸) と 2 つのタンパク質間に存在する水分子の位置の予測のスコア (縦軸)。点線の円内の緑が我々の予測構造。

このように、surFitのような情報科学的手法によって、ある程度の精度で複合体構造モデル候補を挙げることは可能となってきたが、基本的に硬い2つのタンパク質構造の複合体構造のモデル構築であり、複合体形成によって起きる構造変化の推定は困難である。また、複合体形成においてモノマー同士が結合する強さの評価も全くできていない。このような限界を超えるためには、より「定量的な」複合体予測手法が必要である。

この問題を解決するため、我々は新たに、マルチカノニカル MD(McMD)法よりもさらに強力な構造探索性能を有する V-McMD (Virtual-system coupled McMD: Higo et al. (2013) J. Chem. Phys. in press)を開発し、18 残基のペプチド (エンドセリン-1 の変異体) のホモダイマー形成のシミュレーションに成功した。

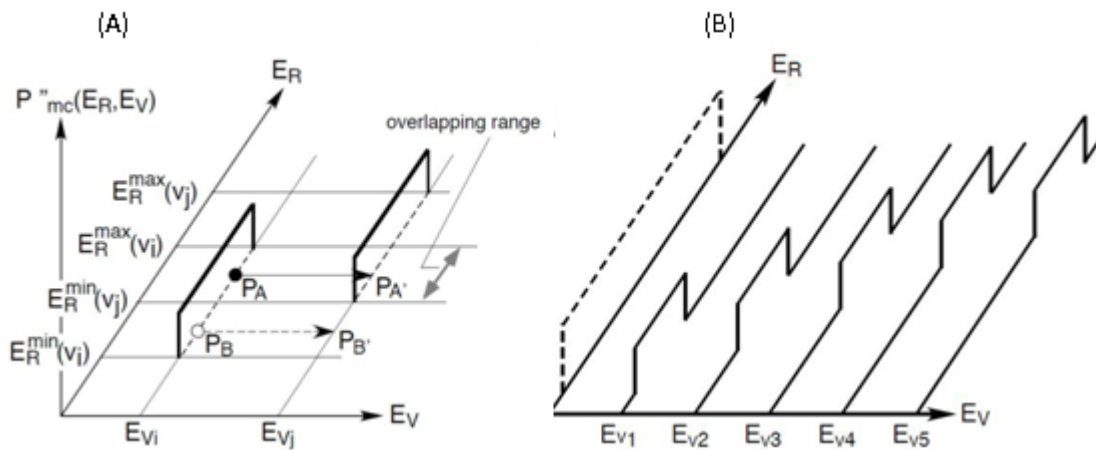


図 28 V-McMD 法の概念図

- (A) E_{Vi} と E_{Vj} の2つの軸上でオーバーラップするエネルギー帯域では直ちに転移できる。
- (B) 仮想エネルギー軸 $E_{V1} \sim E_{V5}$ における狭帯域のマルチカノニカル分布をまとめ広帯域のマルチカノニカル分布を構築。

V-McMD 法では、図 28 のように複数のジョブを走らせて狭帯域でのマルチカノニカル分布を仮想エネルギー軸上でまず構築し、一定時間後に隣り合う軸の分布でオーバーラップしている場合には強制的に隣の軸へ移動させる措置を取る。この仕組みを繰り返して、複数の仮想軸における狭帯域のエネルギー分布を重ね合わせることで、広い帯域をカバーするマルチカノニカル分布を構築する。



図 29 KR-GSH-ET1 ペプチドの配列

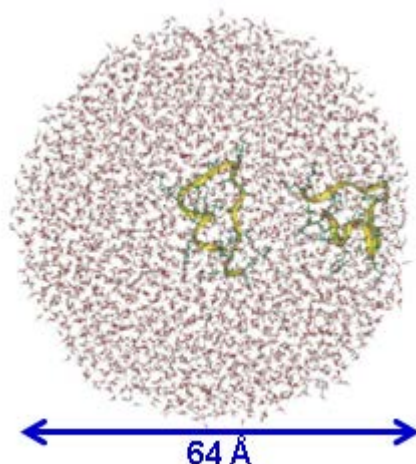


図 30 系の模式図

図 29 に示すエンドセリン-1 の配列において、N 末端にリジンとアルギニンを付加し、逆に C 末端の疎水性アミノ酸 5 残基を削除した KR-CSH-ET1 と呼ばれるペプチドは、内部に 2 つのジスルフィド結合をもち、安定なホモダイマーを形成することが知られている。

図 30 のように中心に一つのペプチドを置き、もう一つのペプチドを 7 Å 以上離れた場所に置いて、全体をあらわな水分子で取り囲む。この直径 64 Å の球場の系に対し、V-McMD 法を適用した。この際、高温時にペプチド構造が大幅に壊れる可能性があるため、ペプチド分子内に、弱い距離拘束の力を導入し、高温でもペプチド構造が大きく破壊されないように注意をした。その結果、以前よりも容易にマルチカノニカル・アンサンブルを取得し、自由エネルギー地形を描いた。

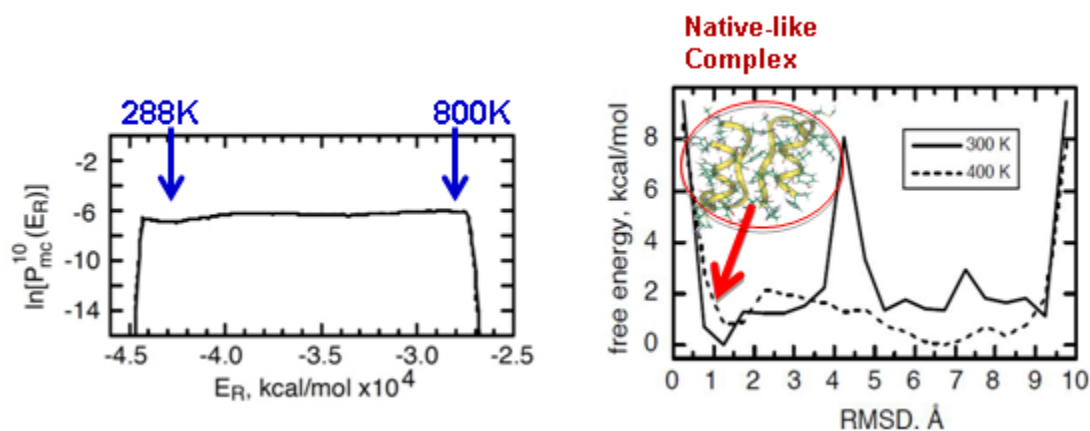


図 31 McMD でのエネルギー分布（左）と、自由エネルギー地形（右）

図 31 のように、288K から 800K にわたるフラットなエネルギー分布となるマルチカノニカル分布が得られ、横軸をホモダイマーの X 線結晶構造からのずれ (RMAD) とした一次元の自由エネルギー図では、室温 (300K) においてホモダイマーが自由エネルギー的に最小の値を持つ一方、高温 (400K) では離れた構造がより安定となった。このように、ホモダイマー形成において構造変化をすることを取り入れる一方、ダイマー形成における自由エネルギーを評価できるため、定量的な複合体形成の解析ができたと言える。

本手法は極めて一般的であり、別途開発した高速の分子動力学計算手法と組み合わせることで、一般的な大きさのタンパク質同士の複合体形成の解析に直ちに応用が可能である。

- ⑦ 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 (バイオメディカル情報研究センター集中研)

タンパク質-タンパク質間の相互作用は、シグナルの伝達など生体内で重要な役割を果たす。近年、タンパク質複合体の形成を妨げることで効果を発揮する医薬品の研究開発にも重点が置かれるようになってきている。このような医薬品の開発において、タンパク質の複合体の立体構造を知ることは、薬剤を結合させる部位を決定するために重要であるが、X線結晶構造解析等の手法を用いて実験的に構造を決定することは、単体の状態の立体構造を決定するよりもさらに困難である。

そこで、嶋田グループが開発した、NMRによる実験手法である、アミノ酸選択的交差飽和法(ASCS法)の実験データと、MD計算とを組み合わせることにより、それぞれのタンパク質の単体の構造が既知の場合に、それらが形成するタンパク質複合体の立体構造を高精度に構築する方法を開発した。

ASCS法は、一方のタンパク質の特定のアミノ酸種を標識して(交差飽和ドナー)、他方のタンパク質での交差飽和(η)を観測する実験手法で(図32)、強い交差飽和が観測された残基の近傍に、標識したアミノ酸種が存在するという情報が得られる。

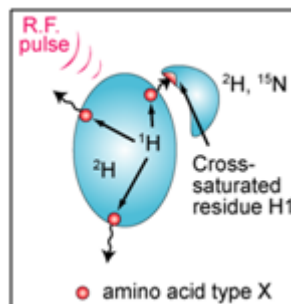


図32 Cross saturationの概念図

複数種のアミノ酸を標識したデータを組み合わせることで、ドナー側の残基とアクセプター側の残基の位置関係のある程度特定できるが、原子レベルでの立体構造を構築することはできない。そこで、この実験データにMD計算を組み合わせることで複合体構造を構築することを試みた。実験データを再現するほどエネルギーが低下する、次の疑似エネルギー項を加えたMD計算を行う。

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

ここで W_{sat} : 重み、 η_{calc} : 計算値、 η_{exp} : 実験値である。

Ubiquitin(Ub)とYUHの複合体構造構築における本手法の検証

計算には嶋田グループで実施した5種類のアミノ酸を標識した実験データを用いた。当該タンパク質複合体の立体構造は、PDBコード:1cmxとして結晶構造が知られているものであり、UbとYUHを分離した状態から、本方法を用いて結晶構造と同様の構造を得ることを試みた。

(初期構造)

交差飽和が観測された残基と交差飽和源の残基が近接するという条件から、初期構造(2つのタンパク質の相対位置)を作成した。可能性の高い42構造を初期構造として各初期構造につき2例ずつ(初期速度の乱数が異なる)MD計算を実行した。

(計算条件)

MD計算条件を表2のとおりとし、真空中で構造を維持するためにUbとYUHの双方に、原子間の距離拘束を適用した。

表 2 計算条件

time step	1.0 fsec
shake	H only
time	150 psec
温度コントロール	500K->100K (150psecで一定の割合で冷却)
誘電率	4.0R
カットオフ長	20 Å (テーブル更新10step)

42 x 2 個の計算のうち最終構造の RMSD (結晶構造と YUH 側で重ね合わせた際の Ub 側の主鎖の RMSD。以下同じ) が 5 Å 以下の構造となったものは 9 個であった。

42x2 個の MD 計算中に、サンプルした構造の RMSD と Esat をプロットすると(図 33)、Esat が小さい構造 (実験データをよく説明する構造) を選択すると RMSD が小さい構造を選択できた。

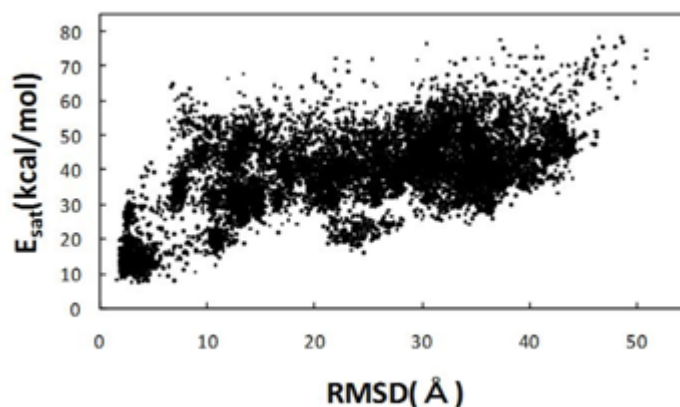


図 33 ペナルティー関数 Esat と構造のずれ (RMSD) の相関

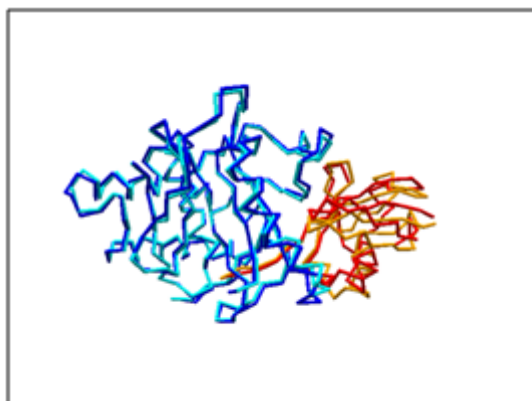


図 34 Esat の最小構造 (青: YUH1、赤: Ub) (Esat=7.88kcal/mol、RMSD=3.05 Å)
参照構造 (シアン: YUH1、オレンジ: Ub)

また本構造をサンプルした際の Esat と RMSD の時間変化は以下の通りであった。

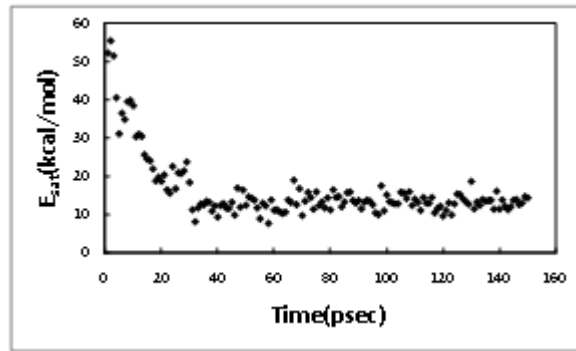


図 35 Esat の時間変化図

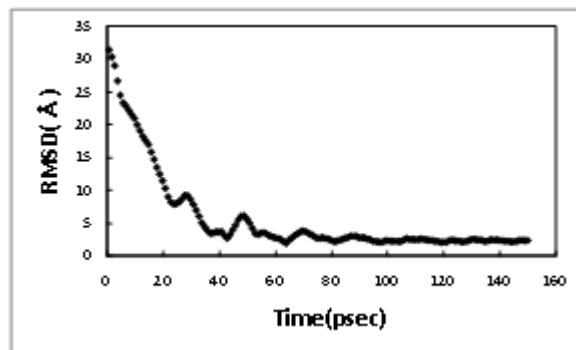


図 36 RMSD の時間変化

Esat 最小構造での η の計算値と実験値を比較すると図 37 (LEU 標識データ) のようになり、 η_{exp} と η_{calc} (Esat 最小構造) が十分一致していることがわかる。

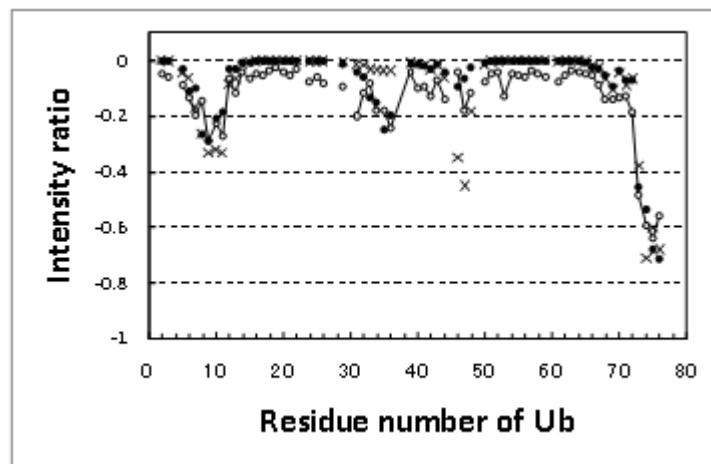


図 37 実験と計算の比較

○・実線 : η_{exp} 、● : η_{calc} (Esat 最小構造)、× : η_{calc} (結晶構造)

さらに、本構造を CAP 水中で Esat 項を外して再度 simulated annealing を行うと、RMSD は、 0.67 \AA まで改善される。これは、真空中で Esat 項を用いて計算したことにより生じた構造のゆがみが解消されたためと考えられる。

DDR2(Disocoidin domain receptor2)-コラーゲン複合体モデル構築

それぞれの単体構造として、DDR2については嶋田チームが NMR で決定した (pdb code:2z4f) 20 構造を使用し、コラーゲンペプチドについてはテンプレートとして、PDB データベースに登録されているコラーゲンの X 線結晶構造 (pdb code:1k6f) に基づくホモロジー・モデルを用いた。

DDR2 の 20 構造に対して、我々が開発したドッキングソフト (上記「タンパク質複合体構造予測法の開発」参照) を用いてコラーゲンペプチドをドッキングさせ、各 300 の複合体構造を作成した。嶋田チームがこの系に対して得た ASCS 実験の観測値を用い、この 20x300 構造から ASCS 実験結果と定性的に合致する 119 構造を選び、疑似エネルギー項 Esat を加えた分子動力学計算を行った。

119 個の計算でサンプルされた構造のうち、Esat が小さく磁化変化 η が ASCS 実験値とよく一致する構造の 1 つが図 38 の構造であった。

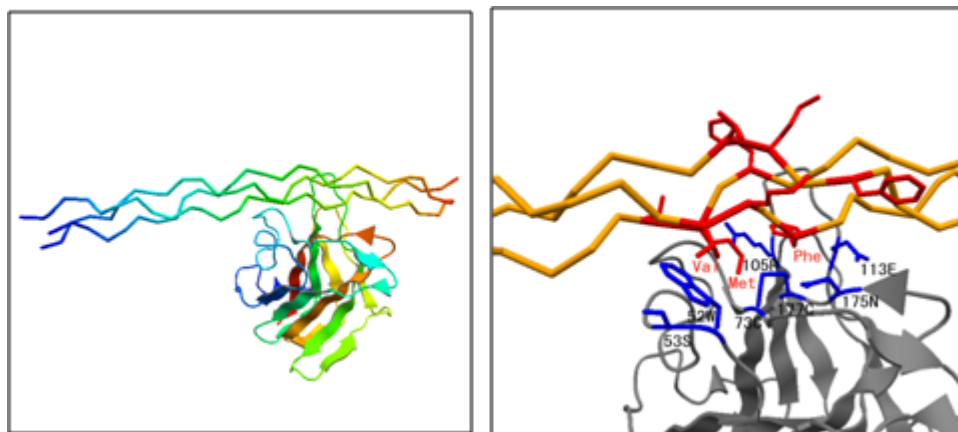


図 38 コラーゲンと DDR2 の予測複合体構造

本構造の磁化変化 η の計算値は、主要なピークのほとんどについては実験値とよい整合性を示した。実験値と一致しない点については、側鎖の精密なモデリングの必要性や、複数の複合体ポーズの存在などが考えられる。

以上の結果から、今回開発した ASCS の実験データを活用した MD 計算は、それぞれの単体の立体構造が既知の場合に、それらが形成するタンパク質複合体構造を高精度に構築する手法として、極めて有用であることが示唆された。これは、界面という 2 次元の情報を与える ASCS 実験データから、複合体という 3 次元の情報を得ることができることを示している。

本手法は、NMR の実験データを利用する方法であるため、複合体の結晶が得られない場合や、相互作用が弱い場合にも適用可能な手法である。また、ASCS 実験では、同位体ラベルした残基の界面情報しか得られないが、本手法では、複合体という 3 次元の情報を得ることで、ラベルされていない残基も含めたタンパク質界面の情報を得ることができる。これにより、タンパク質複合体化を阻害する物質を設計する部位を探索することができる。

今回の研究は、嶋田チームの発表前の NMR 実験値を利用することができ、手法の検証に加えて新たな構造解析にも適用し、その有効性を示すことができた。チームを越えた協力研究としての成果を挙げることができたと考えている。

- ⑧ 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 (バイオメディカル情報研究センター集中研、塩野義製薬分室)

G タンパク質共役受容体 (GPCR) は重要な創薬標的であるが、その立体構造はほとんど解明されていない。そのため、GPCR を標的として *in silico* スクリーニングを行うにはホモロジーモデリングにより標的タンパク質の立体構造を作成する必要がある。また、induced-fit やタンパク質の動的挙動を考慮するには MD 計算を適用することにした。

GPCR は、アミノ酸の相同性が低く、ホモロジーモデリングに必要なマルチプルアラインメントが困難である。本研究では、GPCR に標的を絞り、GPCR 特有の立体構造や、保存残基に注目し、GPCR のアミノ酸配列のマルチプルアラインメントが、ほぼ自動で行えるシステムを開発した。次いで、膜

タンパク質のモデル構造を自動的に生体膜系に埋め込み、溶媒水を付加、膜系の構造を緩和し、生体膜中での膜タンパク質の MD シミュレーションをほぼ自動で行えるシステムの開発を行った。このシステムを 10 種類以上の GPCR に適用し、1 タンパク質当たり 100 構造をサンプルすることに成功した。

タンパク質の構造を多数発生させても、それらの構造のうち、薬物スクリーニング計算に用いて良いヒット率を出せるものは 1 割程度である。その構造選別方法として、drug-like な化合物群: Universal Active Probe (UAP) を提唱した。今まで、水溶性タンパク質用に UAP を開発してきたが、GPCR についても、アゴニスト探索用・アンタゴニスト探索用にそれぞれ分けて、UAP を開発した。その結果、GPCR でも、安定したヒット率が出せることがわかり、GPCR での薬物ドッキングスクリーニングが行えるシステムが組めることが分かった。

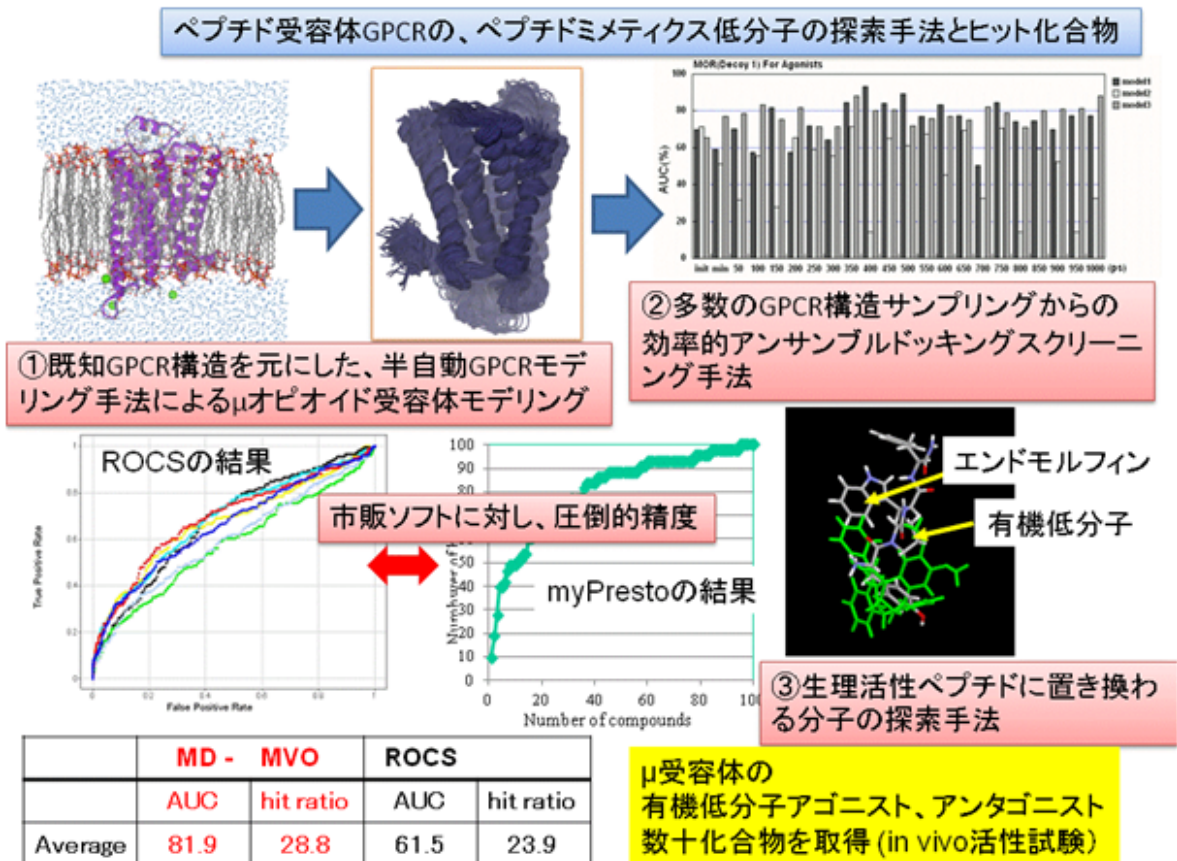


図 39 *In silico* ペプチドミメティクスの概要

新規で高精度な類似化合物探索ソフトウェアの開発 (バイオメディカル情報研究センター集中研)
(Molecular dynamics maximum volume overlap (MD-MVO)法の開発と実施)

類似化合物探索ソフト molecular dynamics maximum volume overlap (MD-MVO)法を、開発し薬物スクリーニングを開始した。

MD-MVO 法とは、既知活性化合物に対して、データベースから選んだ化合物を、原子電荷も考慮しながら 2 化合物の体積重なりが最大になるように MD 計算によって、分子の配座探索と同時に分子重ね合わせをする手法である。この分子重ね合わせでは、周辺の環境である標的タンパク質を考慮した計算を行うこともできる。また、既知活性化合物を、標的タンパク質に結合していると期待されるもっともらしい構造に固定して、データベースから選んだ化合物のみを自由に運動させて 2 分子の重ね合わせを行うこともできる。

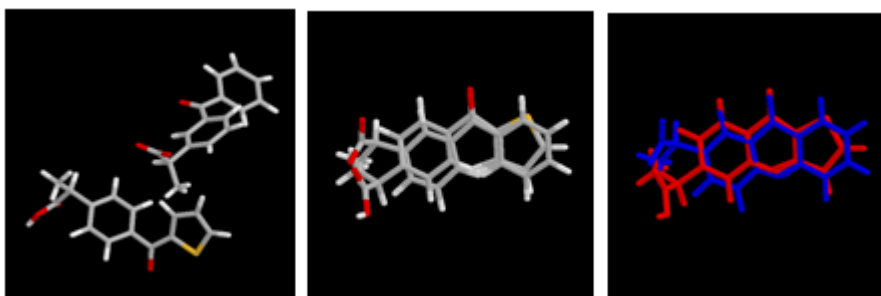


図 40 MD-MVO での概念図。左：2 分子の初期座標、右：MD-MVO 法による重ね合わせの結果

μ オピオイド受容体のペプチド性リガンドであるエンドモルフィン(EM-1)を既知活性化合物として選択した。 μ オピオイド受容体について、既知の低分子リガンド（モルヒネ類など）を 11 種類文献より収集した。そして、EM-1 を既知活性化合物として、1 万化合物を含む化合物データベースに既知の低分子リガンド 11 種類を混ぜ、これらの既知の低分子リガンドを発見できるかテストしてみた。その結果が、下のデータベースエンリッチメントカーブである。我々が以前に開発した、ドッキングソフトを用いた ligand-based drug screening 法である Docking score index (DSI)法と、今回の MD-MVO 法の結果を比較した。

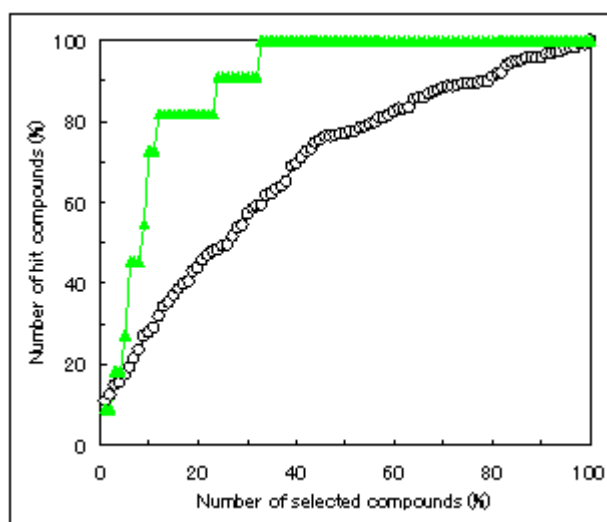


図 41 MD-MVO 法でのヒット率

▲が MD-MVO 法の結果、○が DSI 法の結果である。ペプチドを活性化合物とするスクリーニングは困難であり、DSI 法の結果がランダムスクリーニングに近くなっていることから、その困難さが伺える。明らかに、MD-MVO 法はペプチドを活性化合物とする場合も、優れたスクリーニング結果を示している。また、世界でもっとも広く使われている類似化合物探索ソフト ROCS や ChemFinder との比較テストを複数の標的で行ったが、いずれも MD-MVO 法がヒット率において、より優れていることが示された。

表3 計算手法のヒット率比較

		MD-MVO 法		ROCS	
		AUC	ヒット率	AUC	ヒット率
COX2	1cx2	85.8	28.6	52.8	23.1
	1pxx	98.5	50.0	64.5	30.8
	3pgh	85.3	33.3	64.8	30.8
	4cox	74.0	33.3	68.5	15.4
HIV	1aid	59.8	5.0	29.2	4.5
	1bv7	93.3	40.0	75.8	36.4
	1hte	70.3	5.0	59.3	13.6
	1mes	88.2	35.0	77.0	36.4
	Average	81.9	28.8	61.5	23.9
	上位	MD-MVO	ChemFinder		
COX2	9%	38.20%	9.80%		
HIV	22%	51.40%	47.50%		

MD-MVO 法と ROCS によるデータベースエンリッチメントカーブの下の面積(AUC)と、上位 1%化合物を採択したときのヒット率を表3に示す。AUC が 80%以上が緑色、ヒット率で 30 倍以上を空色で示したが、MD-MVO 法が ROCS に対し優位であることが分かる。また、ChemFinder との比較では、COX2 阻害剤について上位 9%、HIV プロテアーゼ 1 阻害剤に対し上位 22%の化合物を採取したときのヒット率を表にしたが、やはり MD-MVO 法は ChemFinder に対しても優位性を示した。

MD-MVO 法は、既知活性化合物とクエリー化合物の重ね合わせにおいて、周辺の環境である標的タンパク質を考慮した計算を行うこともできることは、従来の構造重ね合わせ手法と全く異なる優れた点である。シクロオキシゲナーゼ 2 (COX-2) に、MD-MVO 法を適用して、その効果を見た。まず、PDB ID:4cox のリガンドである活性化合物 compound a と、非活性化合物である compound b を用意した。COX-2 タンパク質として PDB ID:1cx2 の構造と、既知活性化合物として 1cx2 のリガンドを選んだ。この結果を表にまとめた。

1cx2 に対して compound a/b を我々のタンパク質—化合物ドッキングソフト sievene でドッキングし、スコア上位の構造 5 つを選んだ。これらのスコア上位 5 構造に対して、1cx2 の構造を考慮した MD-MVO 法を適用した。Compound a の MD-MVO 法のスコア(MVOscore)は、compound b のスコア 0.46 より大きく、活性化合物 a が非活性化合物 b より予測活性が高いという合理的な結果になった。また、化合物 a のドッキング構造を正解の構造である 4cox の構造に重ね合わせてみると、ドッキング予測構造 (タンパク質—リガンド複合体構造) が、極めて正しく予測されることがわかった。Sievene によるドッキングでは、compound a の予測複合体構造の座標の誤差は、2~6 Å と大きかったが、MD-MVO 法での最終座標では、正解の 4cox 結晶構造に 0.2~1.5 Å とほぼ一致した。このように、標的タンパク質構造を環境として考慮することは、ドッキングソフトによる予測複合体構造の精度向上に貢献することが示された。

表4 ドッキング精度の比較

ドッキングスコアでの順位	compound a				compound b	
	ドッキングスコア	RMSD (ドッキング計算) Å	RMSD (MD-MVO) Å	MVOscore	ドッキングスコア	MVOscore
1	-3.57	2.25	1.06	0.47	-3.53	0.45
2	-3.50	2.40	0.26	0.45	-3.48	0.45
3	-3.43	1.97	0.99	0.45	-3.46	0.46
4	-3.38	2.59	1.13	0.44	-3.40	0.45
5	-3.34	6.78	1.56	0.40	-3.38	0.37

MD-MVO法は、MD計算の一種であるため、計算時間が長い。タンパク質を考慮しない状態でも1CPUで、1日に約300化合物しかスクリーニングすることができない。従って、タンパク質を考慮しない状態で運用するしかない。300コアを使用すると、2週間で100万化合物をスクリーニングすることができる。

タンパク質の動的構造を反映した薬物スクリーニングー GPCRを標的としたドッキングシミュレーション (バイオメディカル情報研究センター集中研)

Gタンパク質共役受容体 (GPCR) は重要な創薬標的であるが、その立体構造が解明されたのはまだ十数種類にすぎない。そのため、GPCRを標的として *in silico* スクリーニングを行うにはホモロジーモデリングにより標的タンパク質の立体構造を作成する必要がある。また、*induced-fit* やタンパク質の動的挙動を考慮するには分子動力学 (MD) 計算を利用した構造サンプリングが有効である。さらに、構造アンサンブル中から化合物スクリーニングに最適な標的構造を抽出するために、*drug-like* な化合物群: Universal Active Probe (UAP) の概念を応用した。これら、一連の作業をほぼ自動的に実行するためのツール群を myPresto システムに準備し、GPCRに特化した統合スクリーニングシステムのプロトタイプを開発した。

(GPCR専用マルチプルアライメントツール)

GPCRの膜貫通領域をおおよそ特定することは容易であるが、実際はファミリー間のアミノ酸の相同性が低く、ホモロジーモデルを精度よく構築するためのマルチプルアライメントを得ることは簡単ではない。そこで、GPCR特有の立体構造におけるアライメントや保存残基の位置を考慮した配列ギャップペナルティ値を設定したり、リガンドとの結合に重要な膜外ループの配列アライメントも極力配慮した知識ベースの情報も駆使することで、GPCRのアミノ酸配列のマルチプルアライメントを、ほぼ自動で行えるシステムを開発した。

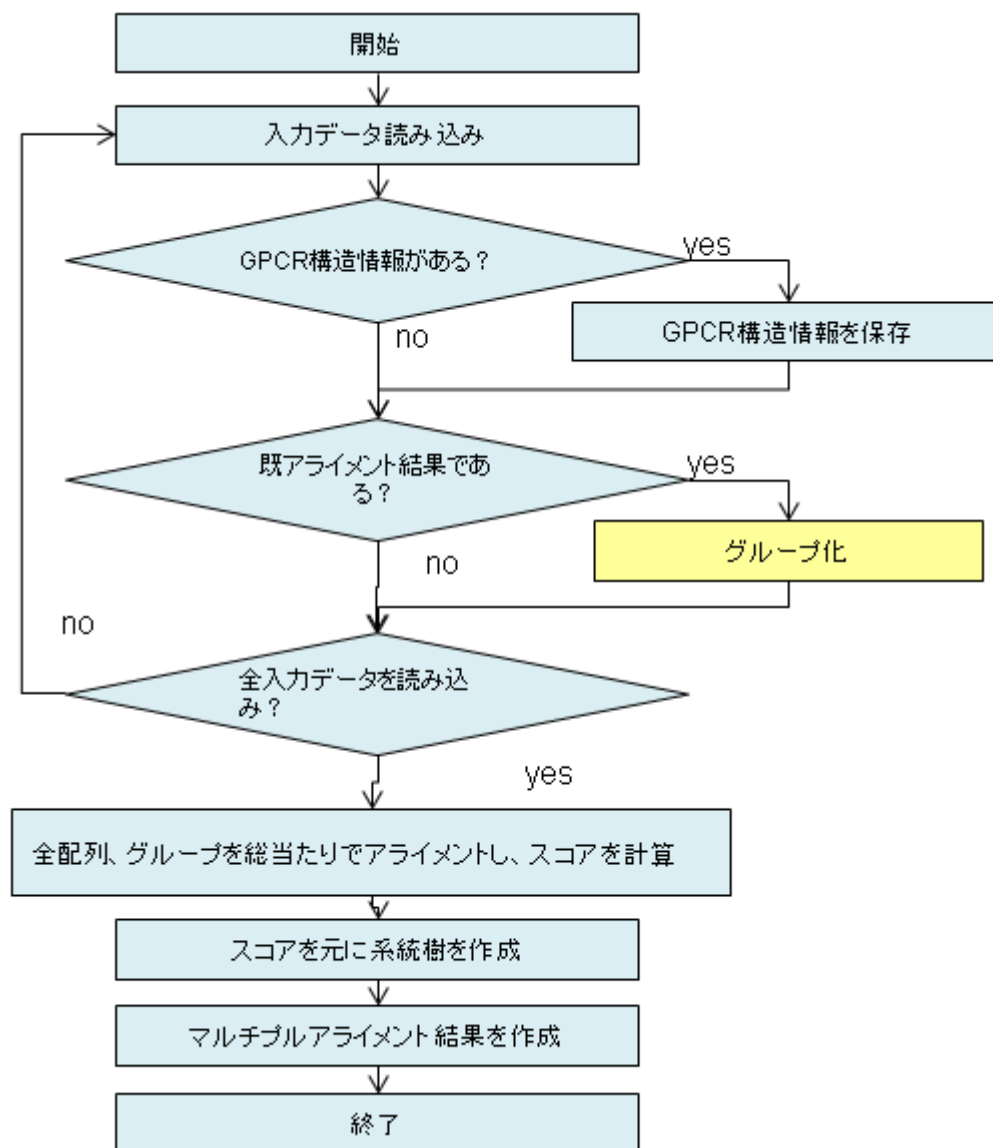


図 42 GPCR 配列アライメント自動化ツールのアルゴリズム

(GPCR 分子動力学計算の自動化)

脂質二重膜を顕に考慮した膜タンパク質のMD計算を行うにはノウハウと熟練が必要であった。膜タンパク質と脂質の間隙をできるだけ狭めないで計算が容易に破綻するためである。あらかじめ平衡化した脂質二重膜座標を準備し、その中にタンパク質を埋め込む方法が一般的であるが、この方法だと脂質と膜タンパク質との重なりを排除する際に広い領域の間隙を生じやすく、膜の密度を一定に保つのが難しい。我々の開発した方法では、規則的に配置した脂質二重膜に GPCR を埋め込む方法をとる。GPCR にリガンドを結合させたり、膜中にコレステロールを配置、パルミチル化システインなどの修飾アミノ酸の導入、水層厚やイオン濃度の調整も自動化できるツール群を開発した。また、こうして作成した初期座標からMD計算による構造サンプリングを実行するための標準プロトコルも準備している。膜タンパク質MD計算自動化ルーツは GPCR だけでなく、アクアポーリン4など他の膜タンパク質計算にも利用できる。



図 43 膜タンパク質のMD計算標準プロトコル

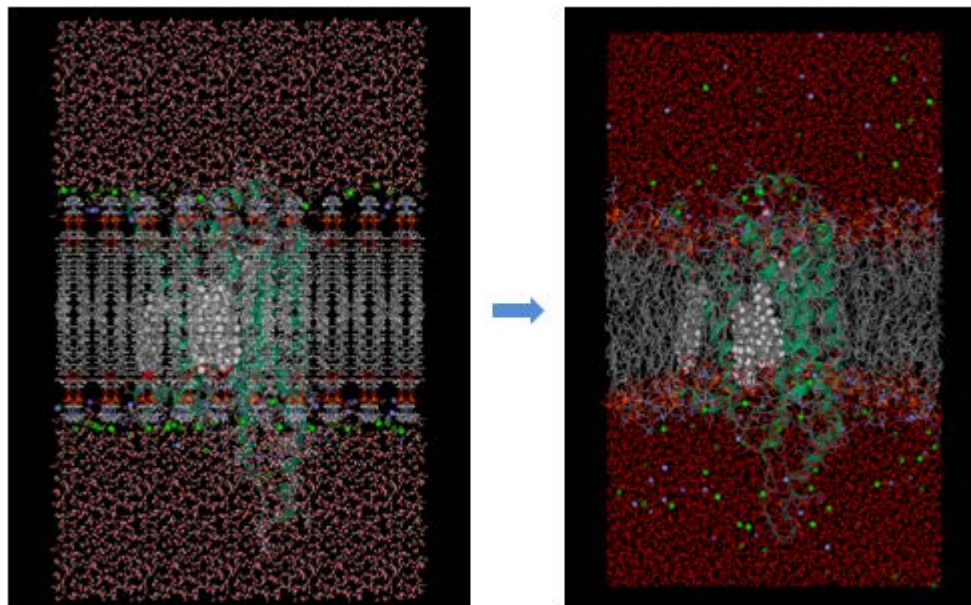


図 44 生体膜中の GPCR の図: 左: 初期構造 右: MD 計算による平衡化後の構造
(β_2 アドレナリン受容体+カラザゾール+コレストロール+POPC+パルミチル化システイン+Na⁺+Cl⁻)

(GPCR スクリーニング結果の評価方法)

前述のように MD でタンパク質の構造を多数発生させても、それらの構造のうち、薬物スクリーニング計算に用いて良いヒット率を出せるもの必ずしも多くはない。

結晶構造が解かれている 3 種類の GPCR とホモロジーモデリングによって構造を構築した 9 種類の GPCR に対して、それぞれ、MD 計算により 66 の構造アンサンブルを作成し、ドッキング/スクリーニング計算によって既知リガンド（アゴニストとアンタゴニストの両方を評価）の AUC（データベースエンリッチメントカーブの下の面積）値を算出した。デコイセットは Coelacanth 社の化合物ライブラリから抽出した 11,013 分子を用い、Sievene によるドッキング計算後、MTS 法により化合物のスクリーニングを行った。

表 5 Maximum, Minimum, and Average AUC Values with the Corresponding Hit Ratios at 1% Compounds for Twelve GPCRs

		AUCmax	AUCmin	AUC average	hit ratio max	hit ratio average
ADRB2	antagonists	96.0	42.0	77.7±11.5	33.3	7.5±8.7
	agonists	95.6	57.0	80.2±14.9	70.6	18.1±20.0
A2A	antagonists	73.7	21.9	45.0±13.6	11.8	0.4±1.8
	agonists	78.9	15.9	39.2±16.1	0.0	0.0±0.0
D3	antagonists	75.5	38.6	55.7±8.6	10.5	2.2±2.6
	agonists	86.0	30.8	70.0±11.6	20.0	7.0±6.4
ADRB1	antagonists	79.6	35.7	57.5±10.6	29.2	3.0±5.1
	agonists	92.2	31.5	67.3±17.9	29.4	9.1±10.6
ADRB3	antagonists	83.6	26.3	62.6±13.9	18.2	2.5±4.9
	agonists	75.3	35.8	56.2±9.7	15.8	2.7±4.4
H2	antagonists	90.5	17.4	61.3±18.7	26.8	7.8±6.6
	agonists	98.6	2.9	63.5±24.1	57.1	10.6±11.8
H3	antagonists	76.5	15.5	47.4±13.3	22.0	2.6±3.7
	agonists	95.8	1.8	57.1±27.0	80.0	19.9±25.3
D2	antagonists	72.7	43.9	59.6±6.7	13.2	2.4±3.2
	agonists	88.5	30.1	66.1±11.3	23.5	2.5±4.5
5-HT1A	antagonists	75.8	36.9	58.1±9.7	14.7	2.9±4.0
	agonists	77.9	34.3	59.2±11.6	20.4	3.9±4.7
5-HT2A	antagonists	74.0	38.7	58.5±7.1	8.0	2.1±2.0
	agonists	86.0	43.4	70.0±9.9	42.9	11.3±12.9
M1	antagonists	85.4	36.9	56.9±10.4	14.3	1.9±3.7
	agonists	97.0	24.5	65.2±19.6	75.0	11.5±17.7
MOR	antagonists	93.7	4.5	64.1±22.9	36.4	6.9±10.9
	agonists	93.4	14.2	67.2±18.4	45.5	10.2±12.2

AUC の最大値(AUC_{max})は、ここで評価した 12 種類の GPCR のアゴニストとアンタゴニストの双方ともに 70%を超えており、サンプリングした構造の中にはスクリーニングに適した標的構造が含まれていることがわかる。活性化化合物がある程度分かっている場合には、構造アンサンブルを作成し、デコイセットを用いた小規模スクリーニングによって AUC 値あるいはヒット率を算出して最適な標的構造を選択してそれを本格的な大規模スクリーニングに利用すればよい。しかし、AUC の最小値

(AUC_{min}) はどの場合も 50%以下であることから、活性化化合物がわかっていない場合には、ランダムスクリーニングよりも悪い結果しか得られない構造を選択してしまう可能性もある。

水溶性タンパク質のアンサンブルドッキングの際の構造選別方法として、drug-like な化合物群:Universal Active Probe (UAP)を提唱してきたことはすでに述べたが、この考え方を GPCR についても拡張し、アゴニスト探索用 (UAP_GPCR1)・アンタゴニスト探索用 (UAP_GPCR1) にそれぞれ分けて GPCR に特化した UAP を開発した。

表 6 Correlation Coefficients (R) between AUC_{true} and AUC_{UAP} Values

target		UAP_GPCR1	UAP_GPCR2
ADRB1	agonist	0.925	0.651
	antagonist	0.658	0.707
ADRB2	agonist	0.864	0.486
	antagonist	0.582	0.462
ADRB3	agonist	0.709	0.796
	antagonist	0.739	0.669
H2	agonist	0.867	0.829
	antagonist	0.867	0.905
H3	agonist	0.847	0.597
	antagonist	0.664	0.793
D2	agonist	0.839	0.733
	antagonist	0.737	0.734
D3	agonist	0.906	0.806
	antagonist	0.803	0.919
5-HT1A	agonist	0.801	0.911
	antagonist	0.658	0.801
5-HT2A	agonist	0.931	0.676
	antagonist	0.628	0.825
M1	agonist	0.910	0.748
	antagonist	0.713	0.596
MOR	agonist	0.654	0.603
	antagonist	0.696	0.601
A2A	agonist	0.892	0.879
	antagonist	0.888	0.879
averaged R for all ligands		0.741	0.723
averaged R for agonists		0.849	0.771
averaged R for antagonists		0.608	0.728

上の表は、真のリガンドの AUC 値 (AUC_{true}) と UAP の AUC 値 (AUC_{UAP}) の相関係数をまとめたものである。特に下の赤字で示しているように、アゴニスト AUC 値と UAP_GPCR1 の相関係数 0.849 で、アンタゴニストのそれは 0.728 となっており強い相関がみられる。したがって、既知活性化化合物情報がない場合でも、GPCR 用に開発したプローブ分子群を用いれば、スクリーニングに適した標的構造を構造アンサンブルの中から効率よく選択できる。

(3) 創薬開発への応用促進に向けた技術開発

計算の高効率化と高速性が発揮できるアルゴリズムとプログラムの実装法の開発、専用ボードの利用、リガンド・データベースや計算結果を整理したデータベース等の開発を行った。

我々の開発してきたソフトウェア一式は、大阪大学、及び、経済産業省ライフサイエンス統合データベースポータルサイト「medals」において、一般に公開している。公開を始めた 2008 年 3 月から 2013 年 2 月末までのダウンロード数は、大阪大学と medals のページを合わせて総計 2,429 件（日本語ページ：2,131 件、英語ページ：298 件）であった。

具体的な創薬実証研究を、本研究の他のチーム、大学、創薬企業等と協力して実施した。 μ 受容体 (GPCR) のアゴニストの探索を行い、有望なアゴニスト及びアンタゴニストを多数発見した。また、農薬、GP-VI、その他の GPCR などを対象として、実証研究のためにヒット化合物探索を行なった。hERG 阻害活性を予測するために COMBINE 法を改良し、myPresto に組み込んだ。



図 45 myPresto 公開サイト : medals (<http://medals.jp/myPresto/>) と大阪大学蛋白質研究所 (<http://presto.protein.osaka-u.ac.jp/myPresto4/>) におけるウェブページ

① 分子シミュレーション高速化技術の開発 (バイオメディカル情報研究センター集中研、大阪大学分室、情報数理研分室)

GPGPU などのアクセラレーターを活用した、計算の高効率化と高速性が発揮できるプログラムの開発を進め、生体膜に埋め込まれた GPCR の系や、水チャンネルの系 (膜や溶媒分子を含んで 10 万原子以上からなる) へ適用し、10 nsec に及ぶ MD 計算を従来の約 30 倍の速度で行うことに成功した。原子間の相互作用計算には、GPGPU と、空間を分割し、分割された部分空間ごとに計算機を割り当て、計算を効率的に分散処理する手法を開発した。

これまで CPU の高速化はクロックアップで実現してきたが、既に原理的な限界に近づいてきている。そこで浮動小数点演算に優れたコアを複数持つ (マルチコアの) APs (Accelerator Processors) が登場した。APs は特定の数値計算においては 100 倍の高速化を実現し、GPU (Graphics Processing Unit) の様な家庭向けゲーム機により低価格化を実現している。

その一方で、APs のアプリケーションは新しいノウハウと新しいアーキテクチャに合わせたプログラム開発を要求する。GPGPU (General Purpose GPU) への移植における既存アプリケーションのリファクタリング (コードの並列化対応) は多大なコストがかかるが、今後 CPU 等のマルチコア化が進むにつれて並列対応アプリケーション数も増加するものと予想される。したがって、今後シングル CPU では到達できない高速環境が実現する事が期待できる。

新薬の開発には多大なコストが掛かり失敗も多い為、コンピュータによる薬物候補探索の省力化は利益が大きい。数ある手法の中でも、分子ダイナミクスや熱力学的性質の計算が可能な分子シミュレーションは最も有用な手法である。例えば、数百のタンパク質—リガンド系の結合自由エネルギーを低コストで計算できる事は、創薬への応用に大きな利益をもたらす。

本研究では、APs の利用による分子シミュレーションの高速化を目標として、超並列計算機向けに開発している空間分割 MD プログラム psygene に対して APs の導入し、分子シミュレーションの更なる加速を検討・実施した。導入した APs は汎用アクセラレータである GPGPU (NVIDIA 社製 GeForce, Tesla シリーズ) である。

psygene-G (GPGPU 版空間分割 MD)

psygene-G は、myPresto/cosgene の派生版として、NVIDIA 社製 GPU をアクセラレータとした超並列計算機向けに開発された GPU・MPI 複合型の並列プログラムである。このプログラムは、系を構成する原子を座標空間で分割し、その部分空間 (Cell) に所属する原子の MD 計算を並列計算機の構成要素 (MPI プロセス) に割り当てる。割り当てた MD 計算のうち非結合項の近距離二体相互作用計算は GPU によって計算される。また、二体相互作用計算に必要な隣接する部分空間の原子情報の相互伝達、部分空間を跨る原子の移動、および温度・圧力制御に必要なデータの伝達は MPI 通信で実現されている。これらによって、数百万以上の原子からなる系に対し、GPGPU で加速された数百台以上の並列実行が可能となっている。

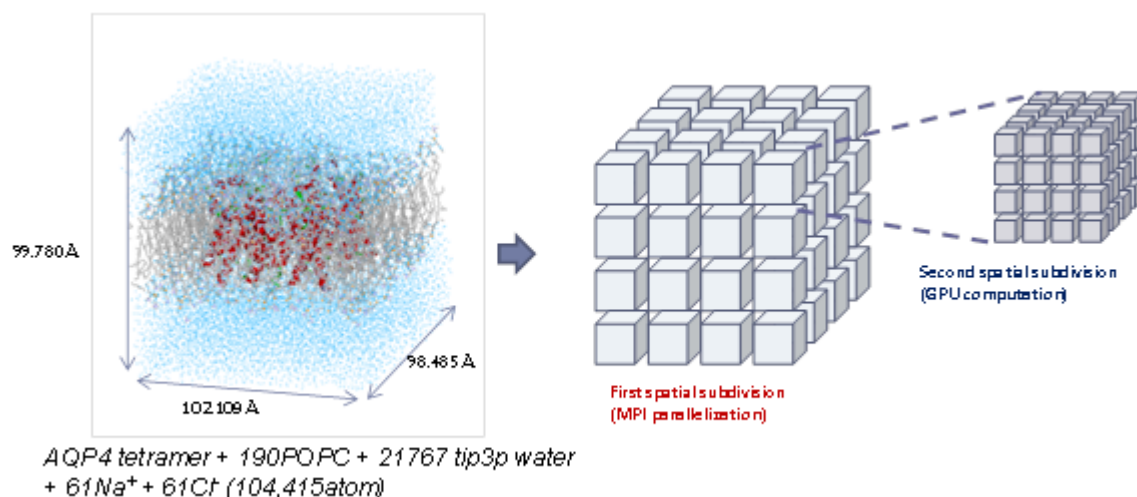


図 46 psygene-G における空間分割の概要

GPGPU への二体相互作用計算の移植

psygene-G の GPU 関連実装は、NVIDIA 社製 GPU および並列計算アーキテクチャである CUDA を前提に実装されている。GPU により加速される計算は、計算時間の大半を占める非結合相互作用計算であり、計算では CPU より渡された Cell の原子情報を更に空間分割して近傍探索を行う、二重の空間分割法を採用している (Hashed Uniform Grid)。GPU による二体相互作用計算では、CUDA の API によって原子情報を GPU へ転送し、GPU 上で van der Waals 力項および静電力項の単精度計算を実行し、計算結果を再び API によって回収する処理が行われる。

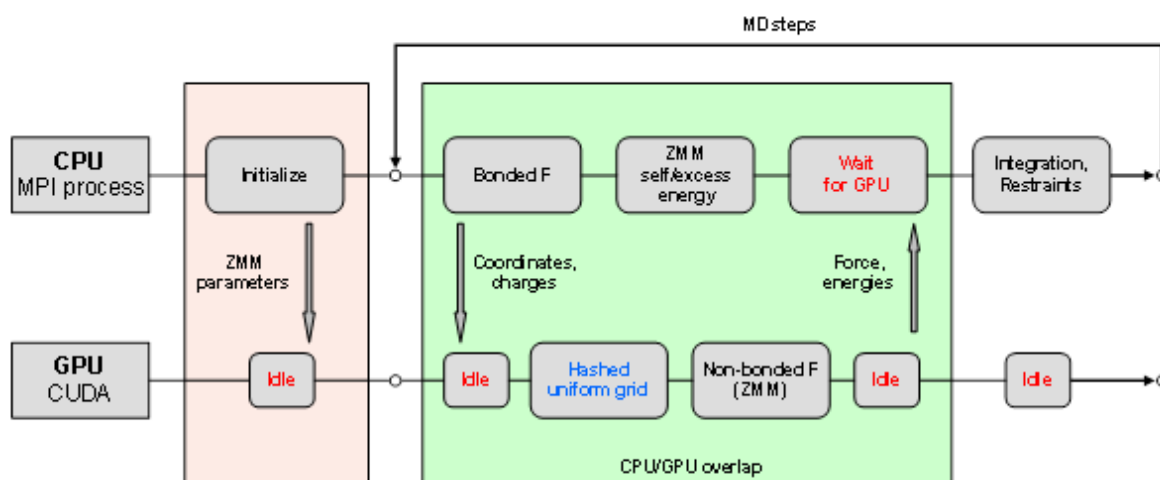


図 47 psygene-G における MPI/GPU 計算の概要

Zero dipole summation (ZD) 法の導入

静電力項の計算では、ZD 法を使って力の計算を行っている。最近我々が開発した ZD 法は、ある範囲内での中性条件 (total monopole = 0, total dipole = 0) を仮定し、長距離相互作用の効果を近似的にイメージ電荷を導入して繰り返すことにより、Ewald 法における逆格子空間項を使わずにカットオフ球内の静電相互作用項だけの計算により、低コストかつ高精度な計算が可能である。この方法は、静電相互作用計算のアルゴリズムが簡略化される上、静電相互作用項が GPU (汎用グラフィックボード) への高い移植性を持つ。ZD 法のポテンシャル関数 (eq.15) は、ダンピングファクタ $\alpha > 0$ の場合には補誤差関数・指数関数を含む形で表現されるが (eq.16)、 $\alpha = 0$ の場合には簡単な四則演算に表現が単純化される (eq.17)。それに加えて、 $\alpha = 0$ の場合が最も計算精度が良いことが示されている。したがって、 $\alpha = 0$ 専用の GPU カーネルを用意して GPU 上で直接計算する様に実装した。

$$E_{total} \approx E_{total}^{ZD} = \frac{1}{2} \sum_n \sum_i \sum_{\substack{(j \neq i, \\ r_{ij} < r_c)} q_i q_j [u(r_{ij}) - u(r_c)] - \left[\frac{u(r_c)}{2} + \frac{\alpha}{\sqrt{\pi}} \right] \sum_i q_i^2$$

eq. 15

$$u(r) = \frac{erfc(\alpha r)}{r} + \left[\frac{erfc(\alpha r_c)}{2r_c} + \frac{\alpha}{\sqrt{\pi}} \exp(-\alpha^2 r_c^2) \right] \frac{r^2}{r_c^2}$$

eq. 16

$$u(r) = \frac{1}{r} \left[1 + \frac{r^3}{2r_c^3} \right]$$

eq. 17

処理速度および計算精度

評価として、処理速度および計算精度の計測を実施した。Epidermal growth factor receptor (EGFR, 38453 原子)・aquaporin 4 (AQP4 tetramer, 104415 原子)・Dynein(1004847 原子)を評価系として準備し、NVT 計算を実行して速度・精度計測を行った。

各計測の結果は以下の通り。

EGFR: 38453atoms, PDBID=1m17, 68.2884 Å × 76.0471 Å × 63.8416 Å

1EGFR + 1erlotinib + 11195 tip3p water + 30Na⁺ + 32Cl⁻

AQP4: 104415atoms, PDBID=2zz9, 98.485 Å × 102.109 Å × 99.780 Å

1AQP4 tetramer + 2,660POPC + 21,767 tip3p water + 61Na⁺ + 61Cl⁻

Dynein: 1004847atoms, PDBID=3vkg/3vkh, 196.791 Å × 318.680 Å × 159.983 Å

1Cytoplasmic dynein motor domain + 4ATP + 317371 tip3p water + 531Na⁺ + 588Cl⁻

表 7 処理速度 (EGFR, AQP4, Dynein)

	EGFR (38453atoms)	AQP4 (104415atoms)	Dynein(1004847atoms)		
cells/system	8	8	27	27	64
atoms/cell	4806.6	13051.9	3867.2	37216.6	15700.7
atoms/ref. area	20293.3	33359.8	18368.5	60231.4	37627.8
GPU ms/step	5.99	15.57	5.79	26.78	13.35
comm. ms/step	2.57	5.39	2.68	15.75	7.14
step total ms/step	8.52	22.10	14.27	82.02	44.04
total ns/day	15.25	6.23	10.06	1.76	3.36
total ns/day (GPU)	0.38	0.09	0.47	0.02	0.06
GPU acceleration factor	40.27	65.87	21.44	97.68	51.79

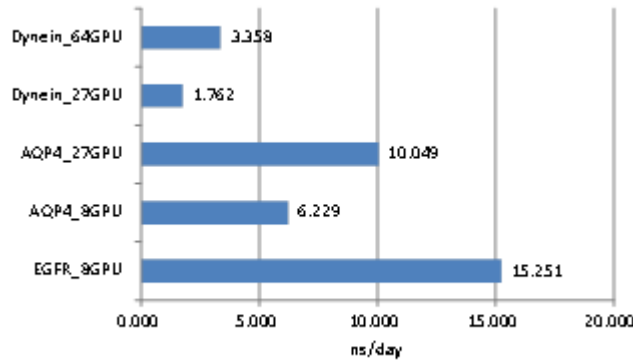


図 48 評価系と処理速度 (EGFR, AQP4, Dynein)

全体の処理速度のパフォーマンスは、8分割EGFRが15.3ns/day、8分割AQP4が6.23ns/day、27分割AQP4が10.0ns/day、27分割Dyneinが1.76ns/day、64分割Dyneinが3.36ns/dayであった。また、これらはCell数(GPU数)の面でスケラブルな拡大が可能な事を示している。なお、CPUとの比較では、8分割EGFRが40.27倍、8分割AQP4が65.87倍、27分割AQP4が21.44倍、27分割Dyneinが97.68倍、64分割Dyneinが51.79倍高速であった。

表 8 計算精度 (EGFR, AQP4, Dynein)

HA-PACS: 4xTesla M2090, 2xIntel E5(8cores, 2.6GHz), 128GB(DDR3, 1600MHz)
 RHEL6.1 (64bit), Cuda4.1, intel compiler12.1, intel MPI4.03
 Condition: 1000step, NVT, 300K, SHAKE, 2.0fs/step, 12Å cutoff, periodic boundary,

ZD method($\alpha=0$), 6Å grid size

Relative RMS force error (F^* :CPU vs. F :GPU): $\Delta F = \sqrt{\frac{\sum_i \sum_{\alpha \in x,y,z} [F_{i,\alpha} - F_{i,\alpha}^*]^2}{\sum_i \sum_{\alpha \in x,y,z} [F_{i,\alpha}^*]^2}}$

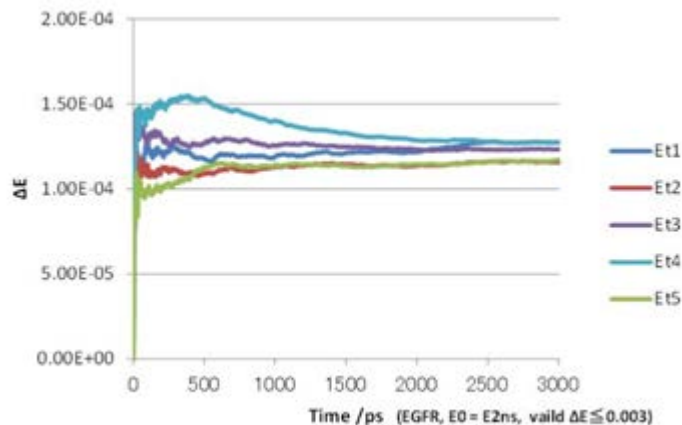


図 49 Energy drift の評価 (total energy fluctuation)

OLABB: 4xTesla M2050/M2070, 2xintel Xeon5600 (6cores, 2.4GHz), 24GB(DDR3, 1600MHz)

CentOS5.6 (64bit), CUDA4.0, intel compiler11.1, intel MPI4.0.2
Condition: 5ns, NVE, 300K (5 initial velocity), 1.0fs/step, 12 Å cutoff, periodic boundary,
ZD method($\alpha=0$), 6 Å grid size

Total energy fluctuation (suggested by Shan et al) $\Delta E = \frac{1}{N_t} \sum_{i=1}^{N_t} \left| \frac{E_0 - E_i}{E_0} \right|$

※ Y. Shan, J. Klepeis, M. Eastwood, R. Dror, and D. Show, Gaussian split Ewald: A fast Ewald mesh method for molecular simulation, J. Chem Phys. vol. 122, no. 4, 2005.

各系・各分割数の平均 relative RMS force error は $10^{-6} \sim 10^{-5}$ の桁であり、十分な精度が得られていると考えられる。なお、平均 relative RMS force error は系の全原子数に比例して増大している。各エネルギーの平均 relative error も $10^{-8} \sim 10^{-7}$ の桁であり、十分な精度が得られている。静電相互作用エネルギーの平均 relative error は van der Waals エネルギーのそれよりも 1 桁が低い。ZD 法の GPU 実装 ($\alpha=0.0$) は、van der Waals 項の GPU 実装よりも単純な為、高い精度が得られたものと考えられる。

全エネルギー安定性の評価では、初期速度を与える為の乱数シードを変更する事により、初期の原子速度分布を変えた 5 通りの NVE 計算を実施した。2ns 平衡化後の 3ns の期間、Total energy fluctuation は基準値 ($\Delta E=0.003$) ※を 1 桁下回っている。したがって、長時間計算でもエネルギーのドリフトが発生しない精度を保っていると言える。

分子シミュレーションプログラム: psygene の非結合項の近距離二体相互作用計算を専用計算機 (マルチコアアクセラレータ) である GPGPU に移植し、高速性能を発揮することができた。近距離二体相互作用計算の GPU 実装は CPU 実装と高い精度で一致し、Dynein の様な大規模系においても力計算・エネルギー計算の両面において十分な精度を保っていた。また、全エネルギーの安定性に関しても、長時間計算でエネルギーのドリフトが発生しない精度を保っていた。GPU 版の ZD 法を導入した psygene-G は十分な計算速度を実現し、更にスケーラブルな拡大を可能とする事が確認された。

② データベースの構築と標準化、高度化 (バイオメディカル情報研究センター集中研、大阪大学分室)

リガンド・データベースや計算結果を整理したデータベースの開発・作成を継続し、市販化合物約 500 万種類に加え、合成可能なバーチャルな 1600 万化合物の 3 次元モデル化されたデータベース開発を行い、公開サイト LigandBOX を開設した。このデータベースには、独自に開発した溶解度予測計算法による溶解度予測データや、計算予測による発がん性予測データなど化合物の物性予測データを付加して、化合物情報の価値を高めた。リガンド・データベース(LigandBox)中の低分子化合物の類似性検索を、高い精度で高速に実施できる新たなアルゴリズム (TD-MCS: Topologically constrained Disconnected Maximum Common Substructure method)を開発し、この分野のデファクト的なソフトウェア (ROCS) とほぼ同等の性能を発揮することを確認できた。このシステムを、LigandBox サーバとして公開した (<http://ligandbox.protein.osaka-u.ac.jp/ligandbox/>)。

③ 創薬の為の水溶解度予測 (バイオメディカル情報研究センター集中研、アステラス製薬分室)

化合物情報で重要なものは、溶解度(log S)と、水-オクタノール平衡定数 (logP) である。薬物は水に溶けなければ、体に吸収できず、排泄できず、また水に溶けにくく脂溶性の極度に高いものは、毒性・副作用を示す可能性が高い。水-オクタノール平衡定数も、吸収を左右する要素である。logS の予測計算手法は、数多く提案されているが、その予測値の精度は、低い。これは、通常の有機化合物は常温で結晶なのだが、結晶構造の予測は極端に困難なためである。そのため、多くのソフトウェアでは、分子の構造を部分構造に分割し、各部分構造の logS への寄与を実験値から統計的に決めてお

て、部分構造の寄与を加算することで logS を推算する。我々は、この手法を基本にして、より物理化学的根拠に基づいて、推算値を補正することを試みた。

本研究では、BIRC 集中研、アステラス製薬分室で、下記のように役割を分担しながら連携して行った。

- 溶解度(log S)データの収集、入力分子に対し、類似の化合物の logS データを推算の学習セットとして用いる手法(SimQSSR)をアステラス製薬分室で開発した。
- 物理化学的記述子の開発、SimQSSR 法を発展させ、入力分子に対して化合物の類似性に応じて logS データに重みをつけて学習セットとして用いる手法を BIRC 集中研で開発した。この手法はアステラス製薬分室で、実地に検証、問題点を BIRC 集中研にフィードバックしながら手法の改良を行った。
- 非特異的に相互作用する分子(アグリゲーター)のデータ収集、logS を用いたこれらの解析を BIRC 集中研で行った。

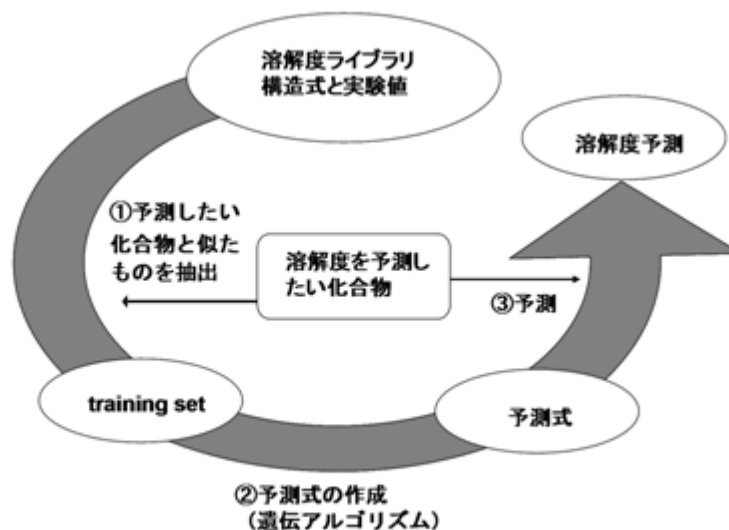
創薬現場で有効な水溶解性の新規予測手法 (SimQSSR 法) の開発 (アステラス製薬分室)

創薬を指向する以上、化合物は薬剤として機能できる物性条件を満たす必要がある。物性条件の中でも重要な溶解度に関し、医薬品に求められる測定域での予測技術を開発した。

創薬の現場では、「10ug/L 以上の水溶解性の有無を確実に予測する」か、「1ug/L~100ug/L 付近の溶解性を持つ化合物について、溶解度の相対比較を行う」ことが必要である。上記を満たす予測計算のアルゴリズムを考案し、有効性を確認、実用化する。

(SimQSSR 法の考案)

一般的な QSPR (Quantitative Structure Property Relationship) アプローチでは、上記に必要とした予測精度は得られない。QSPR をベースに化学構造上似ている化合物群で予測式を作成することが有効と考え、Similarity Quantitative Structure Solubility Relationship = SimQSSR 法を考案した。



SimQSSR法の概念図

図 50 SimQSSR 法概念図

(SimQSSR 法の有効性)

溶解性予測の方法のうち、Hou, T.J ら(2004)の簡易計算式や一般的な QSPR 式による予測精度との比較を行った。一例として Hou らの方法 (MOE に実装) との比較結果を示す。SimQSSR 法は、予測式の立式に十分な実験値が得られるケースにおいては、有意に優れた予測結果を示した。

(SimQSSR 法のプログラム実装)

CCG 社の MOE 環境上に、SimQSSR 計算の実装を行った。予測式作成に用いる化合物セットは、閾値を与えることで自動抽出され、化合物記述子は遺伝的アルゴリズムで選択する。また、アルゴリズムの性質上、予測式を作成するトレーニングセットの数、予測対象化合物との相同性分布、実験値の幅により、予測精度が大きく変動することから、アプリケーションプログラムの開発に於いては、トレーニングセットの内容を簡便に確認するための機能を実装した。

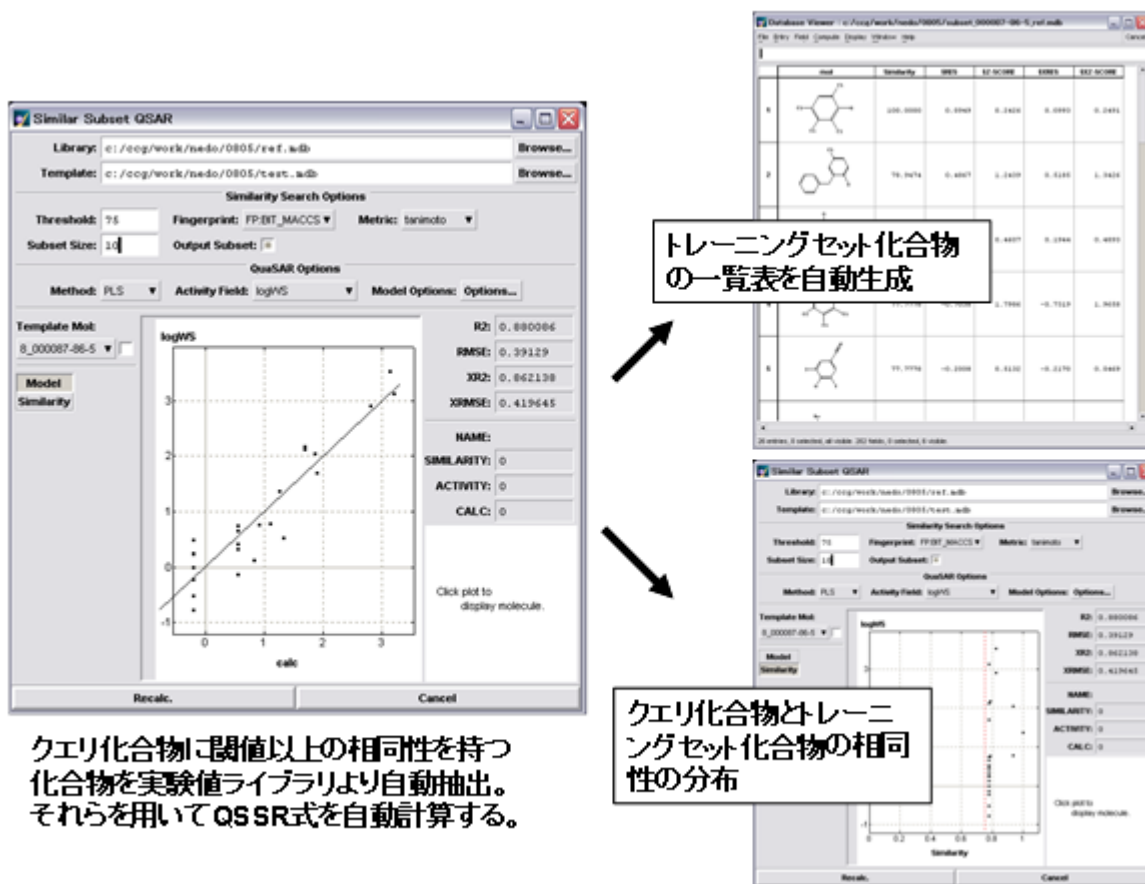


図 51 実装された SimQSSR 法のプログラム

化学構造上の関連が深い化合物の実測値データが豊富にあれば、それを自動検索して精度の高い溶解性予測を行うことが出来るようになった。また、このアルゴリズムは化合物の構造式との関連が予想される物性値予測にも応用が可能である。つまり、SimQSPR (Similarity Quantitative Structure Property Relationship)法として拡張が可能なアルゴリズムを実用化することができた。

溶解度予測技術の開発を終了し、本法を化合物データベースの充実に活用した。

化合物の水への溶解度の予測 (バイオメディカル情報研究センター集中研)

固体から水へ溶ける過程を、固体から有機溶媒へ解ける過程と、有機溶媒から水へ溶ける過程に分割し、これらの過程でのエネルギー変化を、原子電荷の計算と myPresto に組み込んだ GBSA 法によって、物理化学的に計算し、このエネルギーで、従来手法の推算値を補正するようにした。我々の補正により、logS の推算値の精度の向上と、最大誤差の大幅な減少が見られ、実用性の向上が見られている。薬物スクリーニングを行うと、10~30%の化合物が、非特異的にタンパク質に結合することが見出される。そのため、活性測定は、濃度依存性、他のタンパク質への結合性などを測定しなければならない。これら非特異的結合活性を示す化合物は、frequent hitter/aggregator と呼ばれるが、近年、水中でミセルを形成することが報告された。この実験的事実から、我々は、非特異的結合活性を示す化合物は水への溶解度が低いのではないかと、逆に溶解度から、非特異的結合活性を示す化合物を予測・除外できるのではないかと考えた。溶解度 (LogS) は Bioavailability や ADME-Tox property に係る重要な指標でもある。

溶解度の予測は一般的に経験的手法—分子記述子に基づくある種の回帰 (重回帰、PLS、NN 等) —によって行われている。現存する予測ソフトの精度は決定係数 0.8-0.9 程度に達しているが、医薬品となる分子の殆どが水に難溶性であり、溶け難い分子の間でのわずかな溶解度の違いが問題となる為、創薬現場では更に高い推算精度が要求されている。そこで精度の高い溶解度推算法として、ニューラルネットを使った新しい予測法 (分子記述子および学習法) を開発した。

通常、溶解度は、化合物にどのような官能基が含まれるかを数え上げて、これら官能基からの寄与を足し算することで分子全体の溶解度を推算する (原子団寄与法)。しかし、原子団寄与法の推算限界は、

既に明らかとなっており、我々はこの限界を超えなければならない。溶解は、物理的な現象だから、物理的なプロセスに分解できる。結晶を個々の分子にばらばらにする場合、同じ体積の分子であっても分子表面積の大きい分子は、結晶が安定である。ばらばらの分子を水に溶かす場合、その溶解の自由エネルギーは分子シミュレーションで計算可能である。そこで、分子シミュレーションで計算できるエネルギー項を原子団寄与法に追加した新しい分子記述子を開発した。また、エネルギーなどの非整数となる記述子を加えたことで、それに適した推算アルゴリズムも新しく開発した。新しい分子記述子と推算法（学習法）の開発は、MolWorks (Beyond Computing Co. Ltd.) をベースに実施した。MolWorks は、分子記述子として Joback 記述子（原子団寄与法）を使用し、ニューラルネットワーク (NN) を使って推算を行うシステムである。また、学習データセットとして 1300 分子の LogS データを用意した。

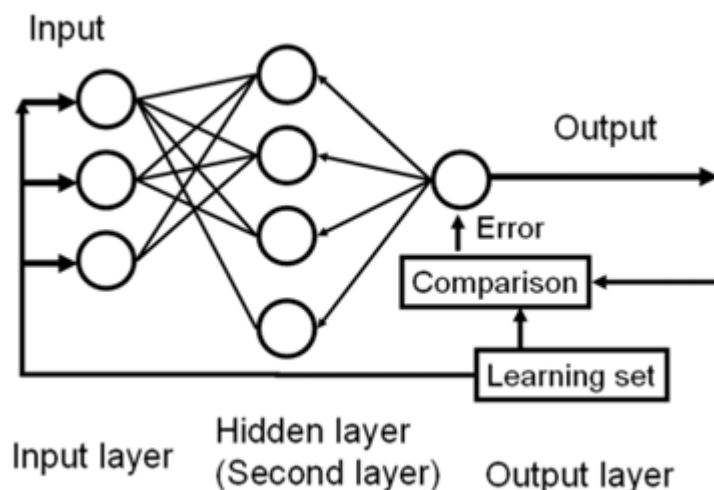
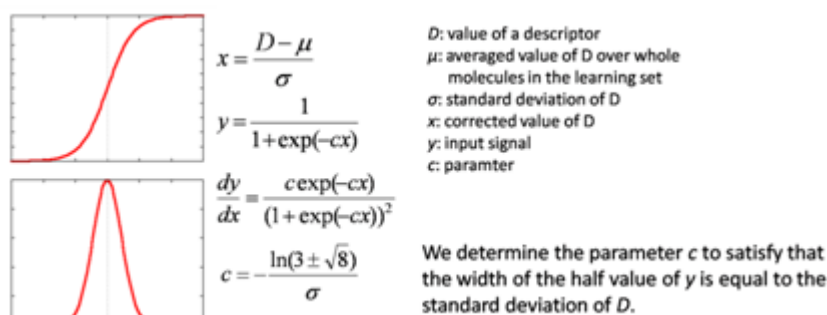


図 52 機械学習法

表9 エラーバックプロパゲーション(左)および新しい分子記述子

ID	Name	Description
1	MW	Mass weight of molecule
2	Ar	Number of aromatic atoms
3	DeIO_H	Number of dissociated H atoms, which bind O
4	AddN_H	Number of additional H atoms, which bind N
5	Ra	Number of atoms in ring
6	Charge(-)	Number of negatively charged atoms (atomic charge is < -0.3)
7	Charge(0)	Number of nearly neutral atoms (-0.3 < atomic charge < 0.3)
8	Charge(+)	Number of positively charged atoms (atomic charge is > 0.3)
9	dASA_o	Accessible surface area per unit volume (in octanol)
10	dG_o	Solvation free energy evaluated by the GBSA method (in octanol)
11	dASA_wd	Accessible surface area per unit volume (in water, ion form)
12	dG_wd	Solvation free energy evaluated by the GBSA method (in water, ion form)
13	dASA_w	Accessible surface area per unit volume (in water)
14	dG_w	Solvation free energy evaluated by the GBSA method (in water)
15	ddG_o	dG_o / Accessible surface area (in octanol)
16	ddG_wd	dG_wd / Accessible surface area (in water, ion form)
17	ddG_w	dG_w / Accessible surface area (in water)
18	-CH ₃ , CH ₄	Number of -CH ₃ fragments or CH ₄ s
		... Joback-like sub-structure descriptors (18 - 63) ...
63	>N-GinR	>N- group in ring which binds the atom with πelectron.

開発した新しい学習法は、学習入力信号の非線形スケーリング (Sigmoid scaling method) 及び重み付き学習法 (Weighted learning(WL) method) である。学習入力信号の非線形スケーリングは、sigmoid scaling curve を使う事により $-\infty \sim +\infty$ の外部入力値を $0 \sim 1$ の NN 入力値にスケールし、学習効率を向上する。これと上記新記述子により、既存システムでは医薬様分子について決定係数 0.4-0.5 程度であったものが、0.8-0.9 程度まで精度向上した。

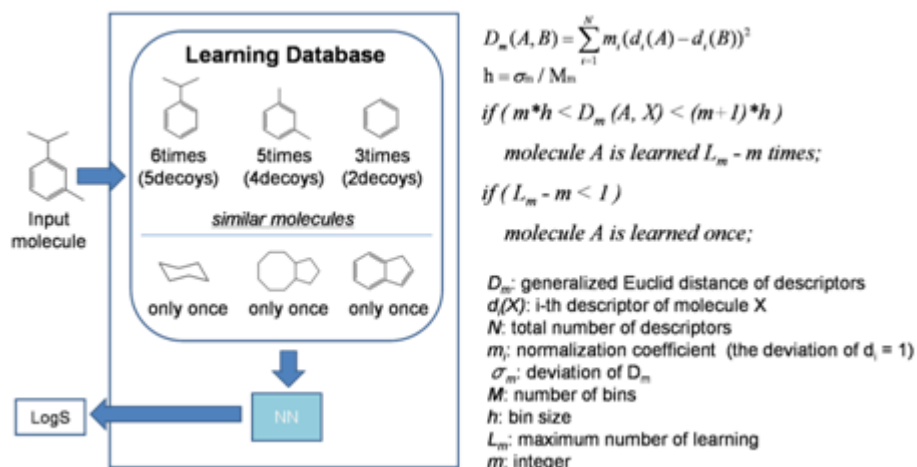


Prediction accuracies for the learning set and the test set (non-WL)

	All descriptors		Joback only (18-63)		no-Joback (1-17)	
	learning	test	learning	test	learning	test
R ²	0.949	0.906	0.938	0.888	0.912	0.811
Ave. Err	0.458	0.629	0.472	0.670	0.599	0.913
Max. Err	1.880	3.363	1.812	5.093	2.702	9.120

図53 Sigmoid scaling(上)および JackKnife-test: [100tests / 1200learnings] x 10trials(下)

溶解度を計算したい分子に対し、構造が類似の分子の溶解度データは、参考になるはずである。そこで、計算したい分子に類似の分子の溶解度データに重みをつけて学習する手法を開発した。重み付き学習法は、推算対象との類似度を計算して類似度に応じて学習回数を増やす(似ていなくても1回は学習する)という推算法である。なお、類似度は分子記述子の一般ユークリッド距離で計算する。これにより、推算精度を決定係数 0.8-0.9 程度から 0.92-0.93 程度(ほぼ予測限界)に引き上げる事に成功した。



Prediction accuracies for the learning set and the test set (WL)

	Without WL		WL
	learning	test	$L_m = 6, M_m = 15$
R^2	0.965	0.899	0.934
Ave. Err	0.265	0.480	0.545
Max. Err	0.445	0.583	0.665

図 54 Weighted learning 法

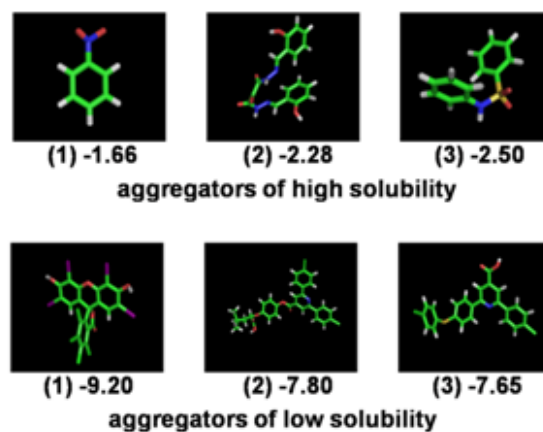
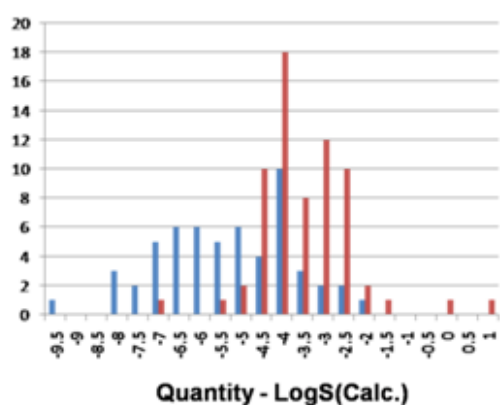


図 55 アグリゲーターと溶解度分布

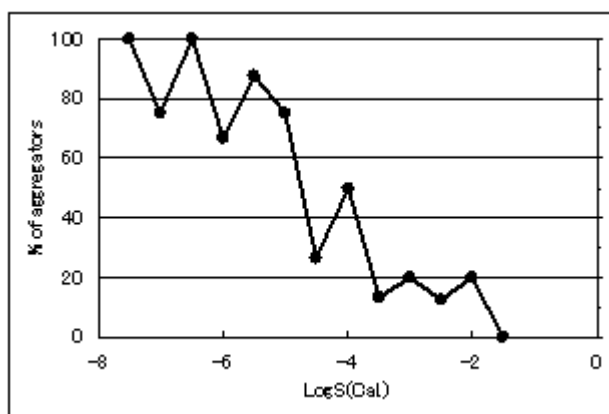


図 56 アグリゲーター確率と溶解度の関係

学習データセット（1300 分子の構造データ及び LogS 実験値）を使用して、アグリゲータ 56 分子及び非アグリゲータ 67 分子の溶解度推算を重み付き学習法で行った。アグリゲータは、スクリーニングにおいて非特異的にヒットする低分子化合物の事である。溶解度を横軸としたときのアグリゲータ・非アグリゲータの分布と、割合を図 5 5 に示す。アグリゲータを除外できればスクリーニング精度の更なる向上・選択性向上が期待できる。推算の結果、アグリゲータと非アグリゲータは、溶解度によって判別することが可能で、その閾値は LogS = -5 程度と見積もる事ができた。

最後に、代表的な市販ソフト MOE、PipelinePilot と、本手法（重み付き学習なし）の比較を示すが、我々の手法は市販ソフトに対して優位である。

表 10 各手法の精度の比較

手法	R ²	average error	maximum error
線形重回帰	0. 863	0. 765	2. 48
MOE	0. 884	2. 26	5. 54
PipelinePilot	0. 847	2. 12	4. 97
本手法	0. 900	0. 637	2. 87

④ COMBINE 法を用いた薬物の *in silico* hERG 阻害活性予測モデルの確立（東レ分室）

膜タンパク質である hERG チャンネルの構造モデルに基づき、薬物の hERG チャンネル阻害活性を合理的に予測する新手法を開発した。

近年、医薬品の開発において薬物の心室再分極および催不整脈リスクに及ぼす影響の評価が活発な研究対象となっている。その背景には、一般に使用されている非循環器用薬剤を服用中に患者が失神もしくは突然死する報告が知られ、その症候は薬剤による致命的な不整脈の惹起が原因であることが明らかにされてきている。さらにその原因となる生体内タンパク質は hERG と呼ばれる心臓の K⁺チャンネルであることが分かっている。その結果、催不整脈作用の因果関係が明らかになり承認後に市場から撤退を余儀なくされる、或いは開発が中止されるケースもある。それに対し ICH によるガイドラインが作成されており、今後は新規化合物の開発、或いは既知薬剤の適用拡大において非臨床的評価による催不整脈リスク回避、即ち化合物の hERG 阻害活性の検証は不可避である。現在、化合物の hERG 阻害活性検証の実験的手法は幾種類か存在するものの、throughput 性や信頼性に問題がある。

一方、計算化学的手法を用いた分子設計においても hERG に関する問題提起はまだ新しく、徐々に報告が増えてきている状況である。これまで ADMET 予測のための方法論は多数展開されてきたが、特定の毒性に関する評価ではなく、経験則に基づく総合的な評価方法がほとんどである。まして催不整脈リスクの回避、hERG 阻害活性の低減という命題は分子設計の世界では非常に少ない。即ち現状では、適切な hERG 阻害活性検証法は、実験的手法、計算科学的手法の両者ともに充実しているとはいえない。

従って薬剤開発における分子設計の方針決定やライブラリデザインに際して、計算化学的手法は **cost-effective** であり果たすべき役割は大きい。このような方法論の開発は急務である。これまでに我々は社内で市販ソフトウェアによる **hERG** 阻害活性のドッキングシミュレーションによる予測法を確立している。**hERG** は X 線結晶座標が存在しないため、**hERG** 分子のモデルを用いている。しかし精度及び計算コストの点において問題があると考えている。そこで、本プロジェクトにおいてその問題点を解決すべく、新手法の開発に取り組むものである。

事前調査

プロジェクトでのディスカッションにより、モデルを用いたドッキングシミュレーションによる予測法は、精度において限界に達しているとの指摘を受けた (図 5 7)。それはモデルの精度の限界によると考えられる。そこで我々は予測法の精度向上のためには、モデルの精度を補完することが必要であると考え、ドッキングシミュレーション以外の種々の方法を導入を検討した結果、**COMBINE** 法に着目しその検討を開始することとした。

COMBINE 法(Comparative Binding Energy Analysis)はドッキングソフト等を用いて作成した化合物-タンパク質複合体のポーズにおいて、両者の間の相互作用エネルギーを力場計算に基づいて算出し、それを注目するタンパク質の残基毎に振り直し、各値を記述子として定量的構造活性相関(QSAR)解析を行う方法である。所謂 QSAR 解析は、共通骨格を有する化合物群に対して適用するが、本法は共通骨格がない化合物群に対しても適用可能であることと、副次的に複合体ポーズの妥当性を評価できること、という利点があると考えられた。**COMBINE** 法は活性値を以下の式で定義され、

$$\text{bioactivity} = \sum_i w_i^{\text{vdw}} u_i^{\text{vdw}} + \sum_i w_i^{\text{ele}} u_i^{\text{ele}} + C$$

(u_i^{vdw} 、 u_i^{ele} はそれぞれ化合物と i 番目のアミノ酸残基との vdw 相互作用エネルギー、静電相互作用エネルギー)

それぞれの係数 w_i^{vdw} 、 w_i^{ele} 、 C を PLS 回帰によって求める。これらの係数を比較することで、どのアミノ酸残基との相互作用が活性発現に重要であるかが特定でき、またその情報は新たな分子設計の指標となる。

モデルケースによる **COMBINE** 法の実施

将来的に **myPresto** の機能として **COMBINE** 法を組み込むことを見据えて、適用可能な複数の市販プログラムを用いて **COMBINE** 法の理解を深める。併せて、市販プログラムよりも精度の高いものを追及する。まず始めに、**COMBINE** 法の計算科学的手法としての有用性を確認するために、文献を参照し、**AchE** とその阻害剤をモデルケースとして計算を行った。

(計算の実行)

文献にあるタンパク質と化合物群を参照し、以下のフローに従って計算を試行した。(図 58)。まず、図 58B の化合物を三次元化し電荷を付与後、ドッキングし化合物-タンパク質複合体を作成した。次に複数個のドッキングポーズの候補から適切なポーズを各化合物から一つ選び、複合体の相互作用エネルギーを計算した。さらに PLS 解析による回帰分析を行った。各々の工程は図 58A に示すプログラムで実行した。

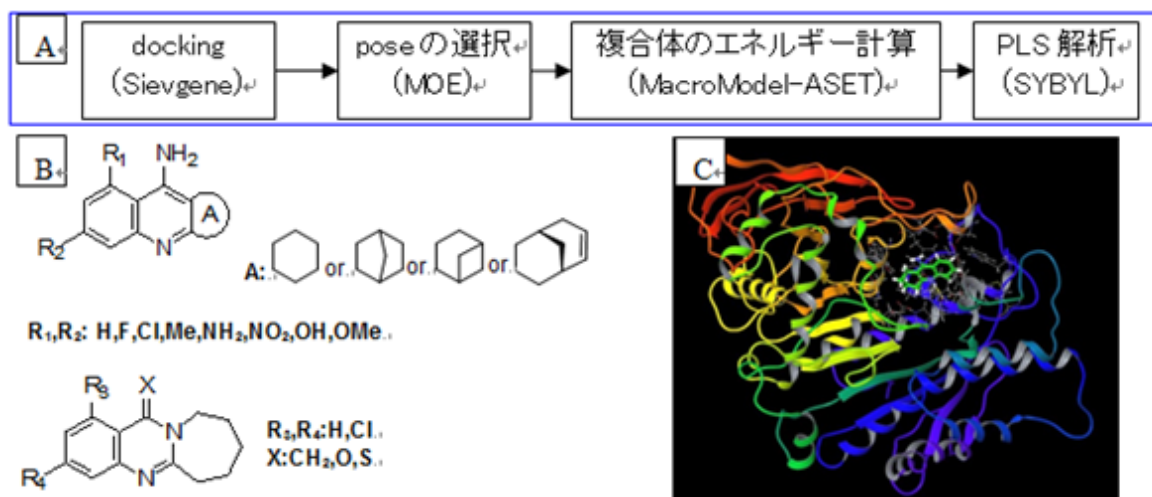


図 58 A 計算のフロー、B 化合物群の一般式、C AChE の X線共結晶 (1ACJ)

1ACJ の X線共結晶中の化合物から半径 5.0 Å 以内にあるアミノ酸残基 (一部でも) との相互作用エネルギーを計算し各残基の寄与へ breakdown した。力場は OPLS2005 を用いた。対象残基は以下の 19 残基である。TYR 130、ILE 444、SER 200、HIS 440、TYR 330、SER 122、LEU 333、TYR 334、PHE 331、MET 436、ASP 72、GLY 119、TYR 442、SER 81、PHE 288、GLY 441、PHE 290、GLY 118、PHE 120。

6 個の化合物についてはポーズ全てが共結晶の結合モードとは大きく異なったため除外し、残り 29 化合物について相互作用を計算した。その後、各残基毎の相互作用エネルギーを記述子として pIC_{50} に対して PLS 解析を行った。その結果、 $q^2=0.921$ 、 $r^2=1.000$ という非常に高い相関が得られた。また回帰式の規準化した係数を図 59 に示す。

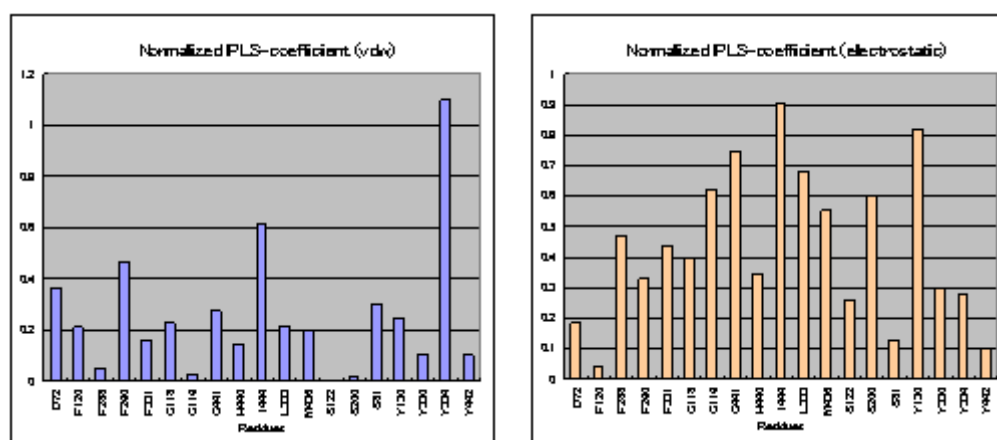


図 59 各アミノ酸残基の各エネルギー項の係数 (規準)

(COMBINE 法の特性と効果について)

sievgene によるドッキングポーズから得られた相互作用エネルギー計算値を用いて COMBINE 法を試行した。水分子や脱溶媒和を考慮する方法、また各複合体についてタンパク質残基の側鎖を動かして最適化している方法の報告があるが、今回は溶媒や水分子を考慮せず、またタンパク質は rigid のまま pose を作成し、最もシンプルな系で計算を行った。その結果 QSAR として非常に高い相関が見られた。本ケースでは、用いたタンパク質の結合サイトが比較的狭いものであったことと、用いた化合物が平面的かつ類似性の高いものであったため、考慮すべき対象アミノ酸残基が効率よく網羅され、高い相関が得られたと思われる。図 59 において、高い値を示す残基は化合物から空間的に比較的近い位置にあるが、それらよりもさらに空間的に近い残基も存在する (図 60A)。このことは、必ずしも空間的に近い残基のみを考慮すべきではなく、かつ計算結果から相互作用を考慮する上で重要なアミノ酸残基を抽出されたことを示している。また、 pIC_{50} 値とドッキングスコアとの相関係数 r^2 は約 0.4 であ

り (図 60B)、COMBINE 法を適用することではるかに高い相関が得られること分かった。このことから、COMBINE 法によりドッキングポーズの再評価が行われ、活性予測の精度を向上させることができると期待される。通常ドッキングスコアは無次元の離散的な値であり、エネルギー値から直接導かれるものではない。従って生物活性の値とドッキングスコアとの間に極めて高い相関が見出される必然性はない。しかし、化合物がどのように標的タンパク質に結合するかを推定する必要度は高く、両者の間の相関は高い方が望ましい。そのためにはドッキングポーズのモデルの精度や妥当性の判断を行う方法論が必須である。その点において、今回検証した COMBINE 法はモデルの精度・妥当性を判断する有用な方法論である。

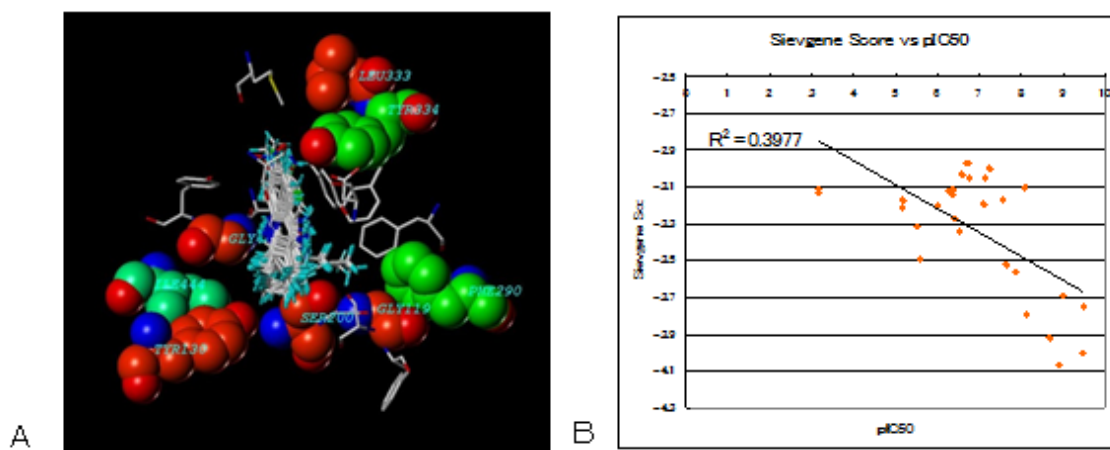


図 60 A (左) 緑 : vdw 項の相互作用の大きい残基。赤 : electrostatic 項の相互作用の大きい残基。青緑 : 両者の相互作用の大きい残基、B (右) : ドッキングスコアと活性値のプロット

(他の方法論との比較—CoMFA との比較—)

CoMFA (Comparative Molecular Field Analysis) は、化合物分子の立体構造を直接反映した QSAR 解析を行うために開発された計算手法であり、Tripos 社 SYBYL[®]の QSAR 手法として最も汎用されているものである。化合物のみを取り扱い、標的となるタンパク質は扱わない。前項の COMBINE 法との比較を行うために、同じ化合物群を用いて CoMFA の計算を行った。結果の比較を表 11 に示す。

表 11 COMBINE 法と CoMFA との比

	q ²	r ²	SE
COMBINE	0.921	1.000	0.000
CoMFA	0.874	0.991	0.163

両者の q²、r²、SE の値を比較すると、COMBINE 法の統計上の妥当性は CoMFA と同等以上に高いことが分かった。このことから、COMBINE 法は汎用されている QSAR である CoMFA 以上の予測精度を有すると考えられる。

以上の検討から、COMBINE 法は myPresto に組み込むことで機能向上を図ることが期待される有用な方法論である。

COMBINE 法による、hERG 立体構造モデル (ホモロジーモデル) を用いた化合物の阻害活性予測法の確立

タンパク質は社内でホモロジーモデリングにより既に構築済みの hERG の立体構造モデルを利用した。化合物は文献調査により、なるべく構造が偏らないように、かつ、pIC₅₀ 値が確定しているもの (文

献によってばらつきがない) を 100 個選定した。作業は可能ならば市販プログラムを用いて行った。計算全体の流れを図 61 に示す。

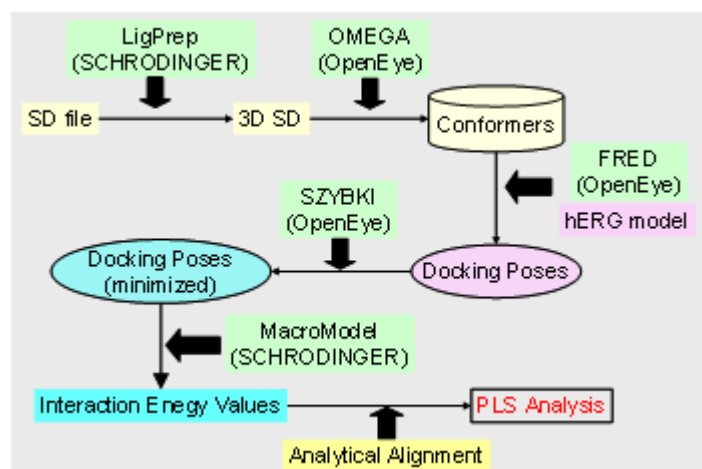


図 61 計算全体の流れ

矢印は作業の流れを示す。緑色囲いは市販プログラム名を示す。

(hERG 立体構造モデル)

構築したモデルを図 62 に示す。hERG は 4 回対称の四両体から成るが、ホモロジーモデリングにより構築した単量体を回転・並進行列処理により四両体を構築した。

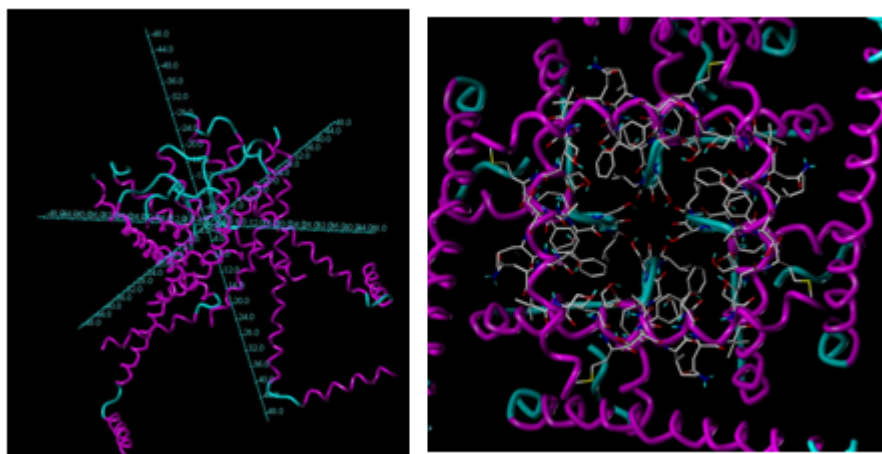


図 62 右：構築した hERG モデル。中心を原点とし xyz 座標軸上に表示した。左：同モデルを z 軸負側から見た図。

(化合物の準備)

文献から収集した 100 化合物を市販プログラム LigPrep にて三次元化し、適宜電荷を振った。阻害活性値 pIC_{50} は 1.59~9.00、分子量は 180~750 の範囲である。構造式と阻害活性値は章末の付表 1 にまとめた。さらに OpenEye-OMEGA(2.3.2)TM にてコンフォーマーDB 作成した(MMFF 力場)。各化合物のコンフォーマーは最大で 400 個生成するようにした。

(ドッキングシミュレーションによる化合物-hERG・化合物複合体の作成)

市販プログラム FRED により、上記 hERG モデルを用いてドッキングシミュレーションを行った。ドッキングの際のグリッドは、4 つの各 chain の S621~S660 のループの近傍に設定した。また複合体は、市販プログラム SZYBKI を用いて、構造最適化を行った (MMFF94 力場)。構造最適化は、複合体中の化合物及び化合物から半径 6 Å 以内に含まれるアミノ酸残基について行った。

(化合物-タンパク質間の相互作用エネルギーの計算)

前章と同様、Macromodel-ASET を用いて相互作用エネルギーを計算した。計算対象としたアミノ酸残基は以下の 14 残基とした。

S621, L622, T623, S624, V625, S649, L650, Y652, A653, S654, I655, F656, G657, S660

これらのアミノ酸残基の位置関係について図 63 に示す。

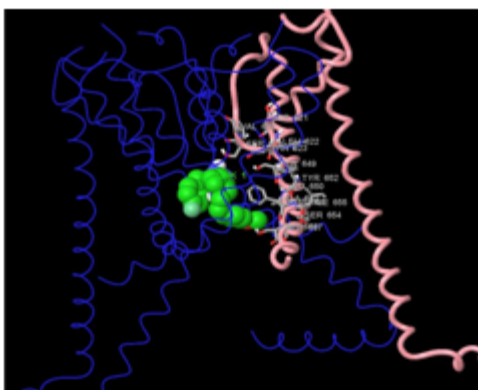


図 63 計算対象とした残基の位置関係

4 つの chain のうち一つを赤色で表した。中央の緑色は Astemizole。

(Broken Symmetry Treatment について)

化合物と残基あたりの相互作用エネルギー値の偏差平方和が最大となる chain を『chain A』とし、hERG モデルの Z 軸負側から見て右回りに chain B、C、D とした (図 64)。

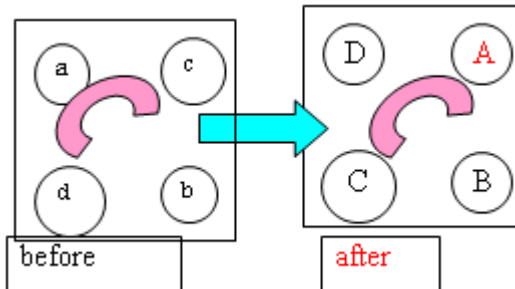


図 64 丸印アルファベットは各 chain、中央の曲線は化合物を示す。計各々の化合物-hERG 複合体において、便宜上付した chain 名 a, b, c, d について各 chain の相互作用エネルギーを計算し、その偏差平方和を求めてその値が最大の chain を新たに chain A とする。次に、モデルを Z 軸負側から見て右回りに chain B、C、D とする。

(PLS 回帰について)

各残基毎の相互作用エネルギーを記述子として pIC_{50} 値に対して PLS 解析を行った。記述子は、対象残基 14 残基 \times chain 数 4×2 (vdw 項、electrostatic 項) = 112 個になる。また、100 化合物中、任意に選んだ 80 化合物を訓練セット、残り 20 化合物をテストセットとして各々の 5 組を計算に付した。

(PLS 解析結果について)

各残基毎の相互作用エネルギーを記述子として PLS 解析を行った。5 組の訓練セットから得られた回帰モデルを用いてテストセットに適用した (表 12、図 65)。

表 12 PLS 解析結果

Set	トレーニングセット			テストセット	
	q^2	r^2	SE	r^2	SE
1	0.641	0.862	0.617	0.829	0.923
2	0.601	0.839	0.691	0.814	0.696
3	0.637	0.839	0.691	0.864	0.576
4	0.577	0.809	0.739	0.809	0.877
5	0.620	0.828	0.694	0.811	0.846
Average	0.617	0.835	0.686	0.824	0.769

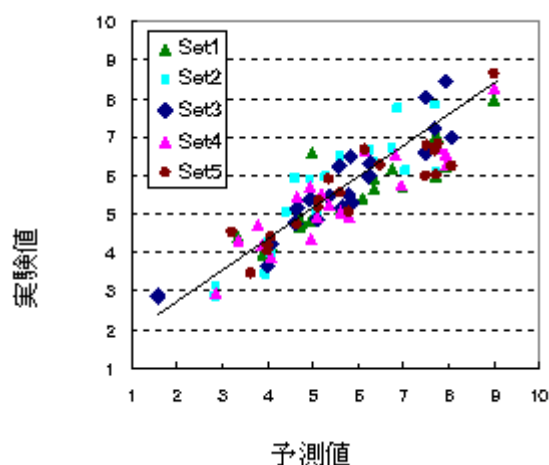


図 65 テストセットの実験値-予測値のプロット

いずれの訓練セットにおいても、 $q^2 > 0.57$ 、 $r^2 > 0.8$ であり、高い統計的妥当性と高い相関を有する回帰モデルが得られた。また、5組全てのテストセットにおいても $r^2 > 0.8$ であり、高い汎用性と予測能を有するモデルであることが分かった。

(社内化合物への応用)

知財上構造は明らかにできないが、前項で得られた回帰モデルを hERG 阻害活性値の分かっている社内化合物をテストセットとして 5 組の回帰モデルから阻害活性値の予測を試みた。5 組のモデルから得られた予測値の平均値と実験値のプロットを図 66 に示す。社内化合物においても、上記モデルは $r^2 = 0.73$ と良好な予測能を示した。

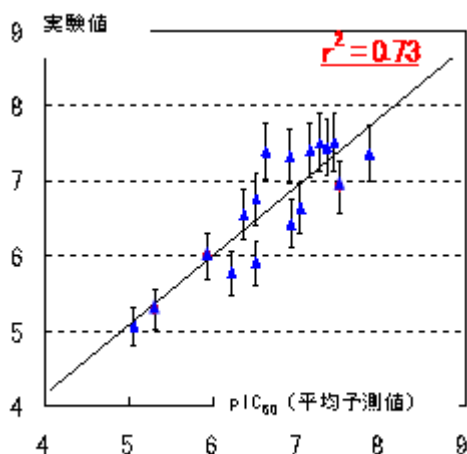


図 66 社内化合物をテストセットとしたときの実験値—予測値のプロット

(COMBINE 法の効果)

ドッキングスコア (市販プログラム) と pIC_{50} 値を以下にプロットする (図 67)。図に示すように、 $r^2=0.282$ であり、ドッキングスコアと阻害活性値の相関は低く、活性値の予測は困難である。即ち、COMBINE 法は X 線結晶ではない hERG モデルの場合でも、生物活性の予測を可能にし、精度向上に大きな効果を有すると考えられる。

COMBINE 法は複合体モデル自身の座標を調整するのではなく、ある一定の精度を有するモデルのエネルギーを計算し、統計処理することによりモデルの再評価を行っている。即ち、モデル自身の精度を向上させるために計算資源をかけるのではなく、複数のモデル間の有意な関係を見出すことによる構造活性相関解析である。市販プログラムの中には、ドッキングシミュレーションの工程とその評価の工程に多大な計算資源を投入するものがあるが、COMBINE 法をドッキングに組み合わせる本法の方がコストパフォーマンスが高いと考えられる。

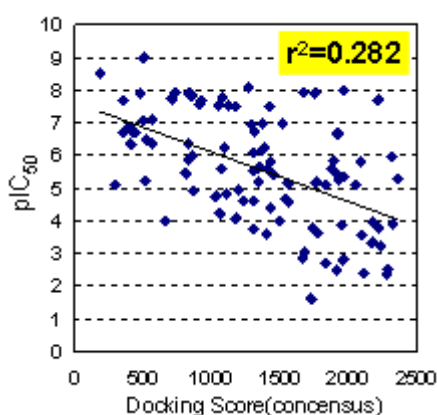


図 67 スコアと阻害活性値のプロット

(市販プログラムとのパフォーマンスの比較)

COMBINE 法と市販プログラムとの活性予測法としてのパフォーマンス比較のために、前章の 5 組のテストセット (各セット 20 化合物) について両者の方法における、Sensitivity (感度; 真の陽性率) と Specificity (特異性; 真の陰性率) を算出し、それらからパフォーマンスの指標である陽性尤度比 (LR) を求めた。Sensitivity と Specificity は以下で定義される。

Sensitivity (%) = A / (A+C), Specificity (%) = D / (B+D)

ただし、

実験値での陽性の化合物数 = A

実験値での陰性の化合物数 = B

予測値での陽性の化合物数 = C

予測値での陰性の化合物数 = D

今回は hERG 阻害活性値 $pIC_{50} > 5.0$ を陽性とし、市販プログラムから計算されたドッキングスコアについては、スコア > 1250 を予測値での陽性とした。5 セットの結果の平均値を表 13 に示す。

表 13 Sensitivity と Specificity の比較 (5 セットの平均)

	Sensitivity (%)	Specificity (%)	陽性尤度比
COMBINE 法	94%	95%	18.8
市販プログラム	51%	62%	1.18

以上のように、COMBINE 法は市販プログラムに比較して、Sensitivity、Specificity とともに大幅に上回っていることが分かった。さらに陽性尤度比を比較すると、COMBINE 法は市販プログラムの 18 倍高いパフォーマンスを示すことがわかった。即ち、COMBINE 法は検査法として市販プログラムよりも優れた方法であると言える。

(他の hERG 阻害活性予測法との比較)

hERG の阻害活性予測の方法論はいくつか報告があるが、現在その多くは IC_{50} 値が $1\mu M$ 以上か以下か、といったバイナリー型のものである。バイナリー型の予測法は一度に多くの化合物の処理が可能であるが、汎用性に課題があると思われる。また、創薬の現場において、主活性については有望であるが、hERG 阻害活性が高いため構造変換をして類縁化合物を作る必要がある、といった局面がある。そのような場合は、バイナリー型の予測値よりは本法のように具体的な値を予測できる方が有用である。このように複数の観点から見て、COMBINE 法は優れた方法論であると言える。

表 14 hERG 阻害活性予測法の比較

方法	計算時間	汎用性	予測精度	学習能力	分子設計指針
精密ドッキング	×	△	○	×	×
化合物の 3D-QSAR	△	×	◎	△	◎
COMBINE 法	○	○	◎	○	△
ニューラルネット	△	○	○*	○	×
決定木	○	△	△*	○	×

*バイナリー型の予測法

(PLS 解析から得られる情報)

PLS 解析では、Loading Plot により回帰モデルにおける critical な項を抽出することが可能である。即ち、本法においては、hERG 内の阻害活性に対する影響の大きいアミノ酸残基を見出すことが可能である。図 68 に Loading Plot を示す。Loading Plot においては原点からの距離が大きいものが影響の大きい項である。図 68 のように、vdw 項、electrostatic 項それぞれについて、活性に影響の大きいアミノ酸残基が見出されることが分かる。この値を hERG モデルにマッピングしたものを図 69 に示す。図 69 に示したアミノ酸残基は、文献で活性発現に重要であることが報告されているものと一致していることが分かった。即ち、本法における PLS 解析から見出された情報は妥当であると言える。

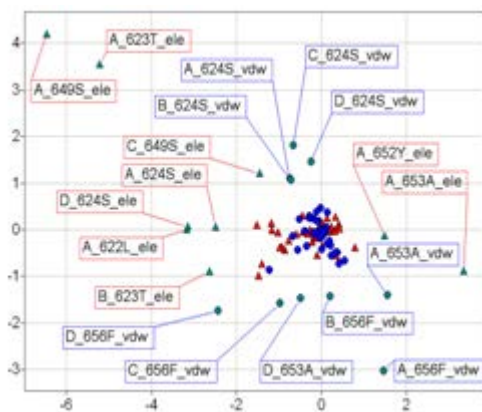


図 69 PLS Loading plot

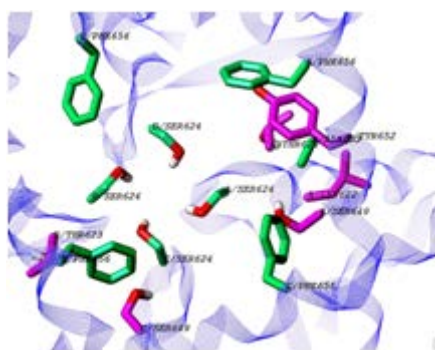


図 69 Loading Plot により抽出された残基

緑色：vdw 項の影響の大きい残基、赤色：electrostatic 項の影響が大きい残基

(Broken Symmetry Treatment の効果について)

統計処理を行う以上、記述子となるアミノ酸残基は全ての複合体モデルにおいて統一されていないとはならない。しかし化合物の構造がバラエティに富んでおり、さらにタンパク質側鎖を含めて構図最適化しているため、側鎖の座標が複合体ごとに異なる。また、用いたモデルは4回対称の四量体であるため、化合物と複雑な関係が生じている。そのため、計算対象の残基を化合物からの一定距離内にあるもの、といった方法では、対象残基の組合せが統一されない。そこで、何らかの方法で全ての複合体モデルでの対象アミノ酸残基を統一しなくてはならない。はじめに複合体モデルを *geometric* にアライメントを試みたが、残基を統一することはできなかった。次に、あらかじめ各 *chain* における同じ組合せのアミノ残基を計算対象とし、相互作用エネルギー値の偏差平方和を回帰分析上の情報量として考え、基準となる *chain* を決めることで記述子を一致させることを試みた (Broken Symmetry Treatment)。その効果を表 15 に示す。

表 15 Broken Symmetry Treatment の効果

	Q^2	R^2	SE
アライメント後	0.637	0.839	0.691
アライメント前	0.198	0.615	0.933
chain を区別しないとき	0.367	0.537	1.024

Broken Symmetry Treatment を行わない場合は統計的に妥当な回帰モデルは確立できないことが分かった。また4本の *chain* を区別せず、同じ配列番号の4残基を一つの残基述子とした場合も有意なモデルは見出されなかった。即ち、Broken Symmetry Treatment は極めて重要かつ有効な考え方であると言

える。またこの方法は四量体に限らず、四次構造をとる全てのタンパク質に適用可能であると考えられる。

ホモロジーモデリングにより構築した hERG 立体構造モデルのドッキングシミュレーションと COMBINE 法の適用により、実用的な hERG 阻害活性予測モデルを確立した。また、エネルギー値に基づく analytical な alignment は、四次構造を有するタンパク質の化合物複合体に対して応用可能である。活性値の範囲が広い場合は、ドッキングスコアのみでは相関関係を見出すには困難であり、その際 COMBINE 法はドッキングポーズの再評価法としての可能性を有している。さらに、立体構造が明らかになっていないタンパク質のモデルを用いたドッキングシミュレーションの有用性が広がることが期待される。

以上の検討から、COMBINE 法は myPRESTO に組み込むことで機能向上を図ることが期待される有用な方法論であると言える。

複数の化合物-hERG 複合体を用いた手法への展開

一般にドッキングシミュレーションにおいて、詳細な立体構造情報が利用可能なタンパク質を対象とした場合のスコア値と ΔG との相関の程度は、決定係数 $r^2 \sim 0.44$ と言われている。前報にて用いている hERG ホモロジーモデルの場合は r^2 は 0.28 程度まで低下するが、COMBINE 法を用いることにより $r^2 \sim 0.7$ 程度に向上する。即ち、統計処理により空間サンプリングにおける不確実性を補い、相関を見出すことによりその実用性を担保している。

しかし、今後の hERG における研究の進展や化合物の試験データの増加に伴い、精度の向上が必要となると予想される。ところが、精度向上のためには空間サンプリングの精度であるドッキングポーズそのものの精度を上げる必要があるものの、スコアの精密化において、計算資源的観点とモデリング精度の観点から技術的な限界に到達していると考えられ、現状よりも正しいドッキングポーズの生成は困難と思われる。特に、hERG のような四次構造を有するイオンチャネルや GPCR などの膜タンパク質を標的とする場合、タンパク質の動的性質の近似精度が方法論の精度に大きく影響を与えることが知られており、技術的な限界に加えて困難な課題が存在する。これに対して最近では、複数のタンパク質構造を分子動力学計算により発生させ、それら複数の構造（アンサンブル）に対してドッキングスタディを行うアンサンブルドッキングが空間サンプリングの精度向上に効果があることが報告されている。

(アンサンブルドッキングと最適化問題)

アンサンブルドッキングの精度向上に対する有用性が報告されてから、種々の標的タンパク質に対する適用例が増えてきている。酵素タンパク質にとどまらず、核内受容体、GPCR、抗原-抗体相互作用、タンパク質-タンパク質間相互作用にも適用されている。そこで、前報で確立した COMBINE 法による hERG 阻害活性予測の方法論に対してアンサンブルドッキングを組み込むことにより、空間サンプリングの精度向上による方法論としてのグレードアップが可能であると考え、検討を開始した。

また、アンサンブルドッキング後に複数生成される hERG-化合物複合体から、予測モデルに用いる複合体を 1 つ選択する必要がある。即ち、統計的に有意なモデルの構築のために複数の学習セットの中から最適なものを選び出す必要がある。このことは、ある目的変数に対する統計モデルの相関係数の値が最大になる要素の組み合わせを探索する最適化問題と考えることができる。探索空間における最適化問題は、その制約条件によって線形計画問題、二次計画問題、非線形計画問題、組み合わせ最適化問題など、いくつかに分類されそれぞれに対する解法が知られている。今回の検討の場合、化合物毎に複数の複合体モデルが作製されている集合から、化合物あたり 1 つの複合体モデルの最適な組み合わせを見出すことになるため、組み合わせ最適化問題に相当する。この組み合わせ最適化問題に対する解法としては、無作為探索、貪欲法、焼きなまし法、遺伝的アルゴリズム、ニューラルネットワークなどが知られている。今回のケースでは、複数個の解の候補があらかじめ与えられていることと、組み合わせの数が膨大であり多項式的に解くことが困難である事例であるため、最も一般的に使われている遺伝的アルゴリズムを検討することとした。

(遺伝的アルゴリズム(Genetic Algorithm; GA)について)

近年の情報技術の発達に伴い、コンピュータを利用した知識情報処理が注目されている。知識情報処理とは、人間の知識をコンピュータ上に仮想的に造り出し、コンピュータの有効性を向上させる技

術である。知識情報処理は、最近注目を集めている知的ロボットや、家電製品やエレベータなどの制御、言葉の構文解析などの様々な分野で利用されている。具体的な技術例としては、生物の進化を基に準最適解を算出する遺伝的アルゴリズムや、コンピュータ上で「あいまいさ」を表現するためのファジ理論、人間の脳の仕組みを基にコンピュータに学習させるニューラルネットワークなどが挙げられる。その一種である遺伝的アルゴリズムは、1975年にミシガン大学の John Henry Holland によって提案された生物の進化を模倣した学習的アルゴリズムであり、近似解を探索するメタヒューリスティックアルゴリズムとして最も一般的に用いられている。その特徴として、多量のデータを扱う組み合わせ問題の解法や、非線形問題の最適解などに非常に優れている点が挙げられる。さらに、基本概念が受け入れやすいため、数学や工学、生物学、医学、遺伝子学など様々な分野で応用されている。

生物の進化過程においては、ある世代を形成している個体の集合、個体群の中で環境への適応度の高い個体が高い確率で生き残るように選択される。さらにある確率で生じる交叉や突然変異を経て、次の世代の個体群が形成される。このような生物進化の態様をコンピュータ上で真似たものが遺伝的アルゴリズムである。その概念では、個体群の中に含まれる個体の数(Population)を個体群サイズ(Population size)とよび、各個体(Individual)はそれぞれ、染色体(Chromosome)によって特徴づけられている。染色体は一定の長さのコードを有し、それぞれの位置(遺伝子座)には対立遺伝子(Allele)とよばれる値の候補のいずれかが入る。染色体はそれ全体で適応度が決定される。遺伝的アルゴリズムは上記概要を簡略化したかたちで構成される(図70)。

- ①初期化：最初に染色体の集まりである個体群(母集団)の初期化をランダムに行う。初期化とは、最初の世代(第一世代)を作り出す作業であり、個体の数は事前に決定されている。
- ②評価：ここで個体の遺伝子の並びから、環境に対する適応度(問題に対する解の良さに相当)を求め、各個体を評価して評価値を付与する。
- ③選択：自然淘汰をモデル化した部分。各個体の評価値から次世代への生き残りやすさを決める。この残りやすさを適応度と呼ぶ。適応度が高ければ次世代に残りやすい。
- ④交叉：生物の繁殖をモデル化した部分。個体の遺伝子情報の一部を入れ替え、新しい個体を生成する。
- ⑤突然変異：遺伝子のコピーミスモデル化した部分。個体の遺伝子情報の一部が変化し、異なる情報を持つ。個体の多様性維持に使われる。
- ⑥終了：上記作業を繰り返し、次第に問題に適した個体を残していく。終了条件を満たしたとき、処理を終えて解を得る。

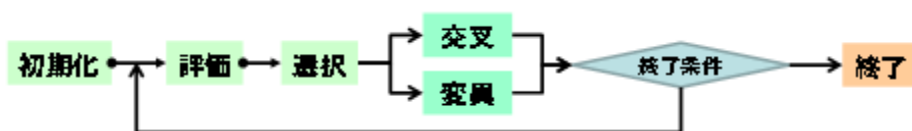


図70 GAのフローチャート

(GA-COMBINE法の計算概念の構築)

上述の考えの下、hERG ホモロジーモデルを用いたアンサンブルドッキングに対する GA-COMBINE法の適用による、化合物のhERG 阻害活性法の確立に着手した。今回の検討では、特にアンサンブルドッキング後の最適な複合体モデルの選定に取り組むことで、最良な学習セットの構築を中心に検討した。

前項記載の手法に対してアンサンブルドッキング及びGA-COMBINE法を適用するに際し、その概念を以下のように構築した。即ち、学習セットのM個の化合物C1, C2, C3, ……CMのそれぞれにアンサンブルドッキングによる docking pose が10種類用意されているとする。

化合物 C₁ : docking pose {C_{1_1}, C_{1_2}, C_{1_3}, . . . C_{1_10}}

化合物 C₂ : docking pose {C_{2_1}, C_{2_2}, C_{2_3}, . . . C_{2_10}}

.

.

.

化合物 C_M : docking pose {C_{M_1}, C_{M_2}, C_{M_3}, . . . C_{M_10}}

目的変数に対する適合が最大になる docking pose の組合せ (例えば $C_{1_2}, C_{2_1}, \dots, C_{M_5}$ など) を、遺伝的アルゴリズムで最適化問題として決めればよい。今回の検討を行った計算全体の流れを図 71 に示す。

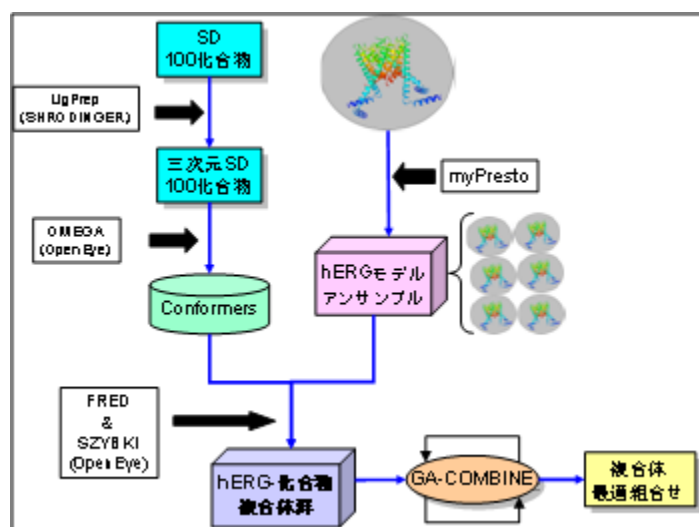


図 71 計算全体のフローチャート

(アンサンブルドッキングの準備—分子動力学シミュレーションによる複数の hERG モデルの作製—)
myPresto-cosgene を用いて、上述の hERG ホモロジーモデル (図 62) を初期構造として分子動力学シミュレーションを行い、複数の hERG モデルを作製することとした。

また、分子動力学シミュレーションの計算条件は以下のように設定した。

- ①構造最適化
- ②MD-1 (50K→1000K, 2.0fs×2500 = 5.0ps)
- ③MD-2 (1000K, 2.0fs×2500×600 = 3.0ns)
- ④CAP 拘束 ; COMBINE 法で用いる相互作用エネルギー計算の対象とする以下の指定アミノ酸残基、S621,L622,T623,S624,V625,S649,L650、Y652,A653,S654,I655,F656,G657,S660 から 19Å 以内の水分子 160 個のみ
- ⑤置拘束 ; 上記指定アミノ酸残基の主鎖、及びその他の残基の全原子を MASS により拘束

なおパラメータ等に関する詳細情報は本文末尾に添付した。

指定残基の側鎖重原子の RMSD は 0.42~0.89Å であった。得られたトラジェクトリーから、RMSD 値について幅広く 9 個の構造を選び、それぞれ構造最適化を行い、初期構造を含めて合計 10 個の hERG モデルからなるアンサンブルを作製した。

(化合物の準備)

化合物は、前項の検討で用いたものと同じものを使用した。化合物は SD ファイルを作成後、市販プログラム SCHRÖDINGER-LigPrep™ で三次元化し電荷を付与した。

次に OpenEye-OMEGA™ にて、MMFF94 力場によりコンフォーマーを発生させ、各化合物のコンフォーマーデータベースを作成した。この際、発生させるコンフォーマーの上限数は 400 個、RMSD>0.5Å とした。

(アンサンブルドッキングによる複合体作製)

前項で作製した 10 個の hERG モデルのアンサンブルを用いて、前項の 100 化合物を含むコンフォーマーデータベースに対して OpenEye-FRED™ によりドッキングシミュレーションを行った。ドッキングポーズの評価には、以下のスコア関数、chemscore, chemgauss3, plp, screenscore, ZAP の各スコア関数からのコンセンサススコア (ランキング) が最上位のものを採用し、各アンサンブルの複合体構造とした。得られた各複合体構造は、OpenEye-SZYBKITM にて、化合物から半径 5.0Å 以内のアミノ酸残基

と化合物を MMFF94 力場に従い構造最適化した。これにより、100 化合物×10 hERG モデルで、合計 1000 個の複合体構造ができた。

(相互作用エネルギー計算と Broken Symmetry Treatment)

前項で作製した 1000 個全ての hERG-化合物複合体における化合物と hERG 間の相互作用エネルギーを計算した。hERG 立体構造モデルは 4 回対称の四量体であり、4 つの同一の chain を有する。各単独の chain ごとに、以下の 14 残基を計算対象とし、相互作用エネルギーを MacromodelTM-ASET を用いて計算した。対象残基は、以下の 14 残基とした。

S621, L622, T623, S624, V625, S649, L650, Y652, A653, S654, I655, F656, G657, S660

次に chain 毎の相互エネルギー値の偏差平方和の値に基づく Broken Symmetry Treatment を行い、全複合体における値を記録した。

(GA-COMBINE のプログラムの作製準備)

前項で作製した複合体モデル群の中から、各々の化合物毎に 1 つずつを選び、全化合物の複合体の最適な組合せを構築することにより、最適化問題の解となる。

COMBINE 法では、得られたアミノ酸残基毎の相互作用エネルギー値を説明変数、化合物の hERG 阻害活性値 pIC₅₀ を目的変数として PLS 計算により以下の式に基づいた回帰を行う。

$$pIC_{50} = w_{ivdw}u_{ivdw} + w_{iele}u_{iele} + c$$

表 16 MSS の一部抜粋。化合物毎に色分けした。第 1 列に複合体の構造情報、第 2 列に阻害活性値、第 3 列以降に相互作用エネルギー値。同じ化合物の複合体であっても、相互作用エネルギー値が異なることが分かる。

	pIC50	A 621S ele	B 621S ele	C 621S ele	C_660S_vdw	D_660S_vdw
2-hydroxymethylOLANZAPIN-a	4.94	-3.31	-0.58	*****	0	0
2-hydroxymethylOLANZAPIN-b	4.94	-4.01	-0.87	*****	0	0
2-hydroxymethylOLANZAPIN-c	4.94	-2.59	-1.31	*****	0	0
2-hydroxymethylOLANZAPIN-d	4.94	-0.2	-0.54	*****	0	0
2-hydroxymethylOLANZAPIN-e	4.94	-0.28	-0.6	*****	0	0
2-hydroxymethylOLANZAPIN-f	4.94	-2.04	-4.7	*****	0	0
2-hydroxymethylOLANZAPIN-g	4.94	-3.79	-1.36	*****	0	0
2-hydroxymethylOLANZAPIN-h	4.94	-1.97	-3.69	*****	0	0
2-hydroxymethylOLANZAPIN-i	4.94	-4.12	-1.02	*****	0	0
2-hydroxymethylOLANZAPIN-j	4.94	-1.29	-3.81	*****	0	0
ALFLZOSIN-a	4.08	-1.01	-0.65	*****	0	0
ALFLZOSIN-b	4.08	-0.43	-0.5	*****	0	0
ALFLZOSIN-c	4.08	-0.72	-0.86	*****	0	0
ALFLZOSIN-d	4.08	-0.22	-0.27	*****	-0.03	0
ALFLZOSIN-e	4.08	0.24	-0.51	*****	0	-0.02
ALFLZOSIN-f	4.08	-0.62	-0.24	*****	0	0
ALFLZOSIN-g	4.08	0.13	-0.09	*****	-0.01	0
ALFLZOSIN-h	4.08	0.07	0.06	*****	0	0
ALFLZOSIN-i	4.08	0.11	-1	*****	0	0
ALFLZOSIN-j	4.08	-0.04	-0.2	*****	0	0
AMBASILIDE-a	5.44	-1.72	-2.26	*****	0	0
AMBASILIDE-b	5.44	-1.78	-1.19	*****	0	0
AMBASILIDE-c	5.44	-1.77	-0.63	*****	0	0
AMBASILIDE-d	5.44	-1.75	-1.82	*****	0	0
AMBASILIDE-e	5.44	-1.1	-2	*****	0	0
AMBASILIDE-f	5.44	-2.14	-1.07	*****	0	0
AMBASILIDE-g	5.44	-2.71	-1.76	*****	0	0
AMBASILIDE-h	5.44	-1.33	-1.58	*****	0	0
AMBASILIDE-i	5.44	-1.6	-2.64	*****	0	0
AMBASILIDE-j	5.44	-1.15	-2.67	*****	0	0

PLS 回帰により算出される決定係数 r^2 の値が大きいほどその回帰モデルの相関が強く、統計的妥当性が高いと言える。従って、 r^2 の値が最も大きくなるような複合体の組合せを見出す作業を GA で行うことにより解を見出すことができる。前項では、PLS 計算には市販プログラム SYBYL-Molecular Spreadsheet(MSS)TM を用いたが、MSS では表の中で行選択と列選択を行うことにより、非常に多くのパラメータの中から目的のパラメータを指定することが可能であるため、データの取り回しが便利である。また、SYBYL はプログラム言語 SPL(Sybyl Programming Language)で動作しており、データの I/O が 1 種類のプログラム上で実行可能である。そこで、SPL を用いて GA-COMBINE のプログラムを作成することとした。まず、前項までに作製した相互作用エネルギーを含む複合体構造を取り込んだ MSS を作製した。

GA-COMBINE のプログラムの作製

図 71 において、10 個ずつの複合体構造が化合物毎に規則的に並べてあるので、各化合物の複数の複合体から 1 つずつ、全化合物について選んだ行番号の配列を個体として定義する。1 化合物につき複数の複合体の行番号を要素とする配列 A[i]を決めるとすると、表の上から、

```
A[1]=(1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10)
A[2]=(11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20)
. . . . .
. . . . .
A[100]=(991, 992, 993, 994, 995, 996, 997, 998, 999, 1000)
```

のようになる。この各配列から要素を任意の一つずつ 100 化合物について選択した行番号を要素とする配列を B[j]とすると、

```
B[1]=(2, 13, 22, 37, . . . 998)
```

B[2]=(3, 17, 25, 33, . . . 993)

 B[100]=(1, 19, 27, 31, . . . 995)

となる。これが PLS 計算の対象であり、GA おける 1 つの個体となる。

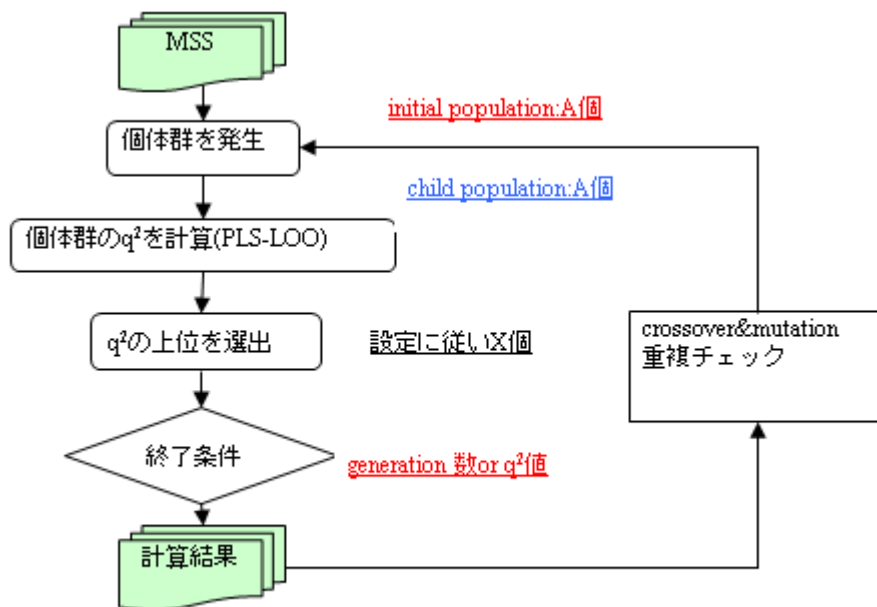


図 72 GA プログラムのフロー

100 個の行番号の配列は算術的に出力も可能だが、複合体構造の数や化合物数の増減などに対し、なるべく柔軟な構成にするために、MSS から化合物あたりの複合体数と化合物数の情報を取り出して利用することとした。評価は PLS-Crossvalidation の決定係数である q^2 を用いた。

SYBYL 上のソフトウェアの動作としては、GA の個体に相当する行を複数行 MSS 上で選択し、それらに対して PLS 計算を実行することにより q^2 が算出される。

さらに、計算資源を節約するために、統計的な検定法を PLS 計算に適用して高速化した SAMPLS アルゴリズムを用いることとした。以下に計算の概要を示す(図 72)。交叉(crossover)と突然変異(mutation)については、両者を融合した構成とした(図 73)。

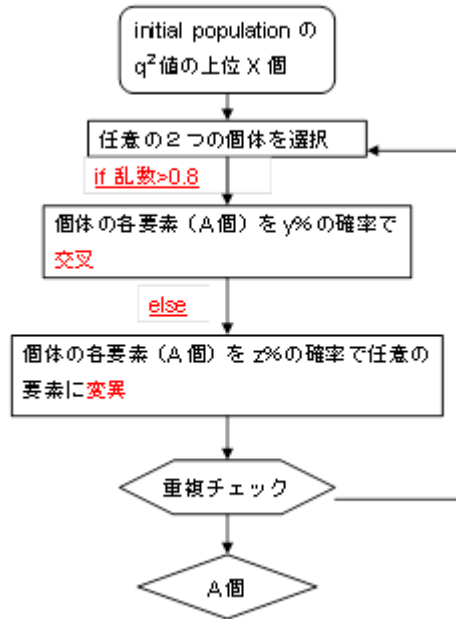


図 73 交叉と突然変異の構成

また評価・選択について、第 1 世代の選択については、 q^2 の値のランキング上位を採用した（エリート選択）。その後の世代については、local minimum に落ちることを避けるために、ランキングに基づいたルーレット選択を採用した。生存確率（採用確率）は、線形式、非線形式等、数式の定義により自由に決めることができる構成とした（図 74）。図 74 から分かるように、評価値が高いもの、即ち適合度の高いものが選択される確率は高く、評価値が低いもの、即ち適合度の低いものは選択される確率が低くなる。

ルーレット選択の概念を数式で表すと、個体 i を選ぶ確率を p_i 、 f_i を個体 i の適応度と置いたとき、

$$p_i = \frac{f_i}{\sum_{k=1}^N f_k}$$

と表すことができる。

(GA のパラメータ設定)

今回の検討における、前項で作製したプログラムのパラメータを以下のように設定した。

- 第 1 世代の個体数：100 個
- 子孫の個体数：100 個
- エリート選択条件：上位 20 位まで
- ルーレット選択： $y=100-(1002-(x-100)^2)/2$ に従う
- 交叉確率：0～1 までの乱数を発生させ、その値が 0.8 以上（確率 20%）のとき、要素の 20% を交叉。即ち $20\% \times 20\% = 4\%$
- 突然変異の確率：上記の乱数が 0.8 未満（確率 80%）のとき、さらに別の 0～1 までの乱数を発生させ、その値が 0.0625 以下のとき、突然変異。即ち $80\% \times 6.25\% = 5\%$

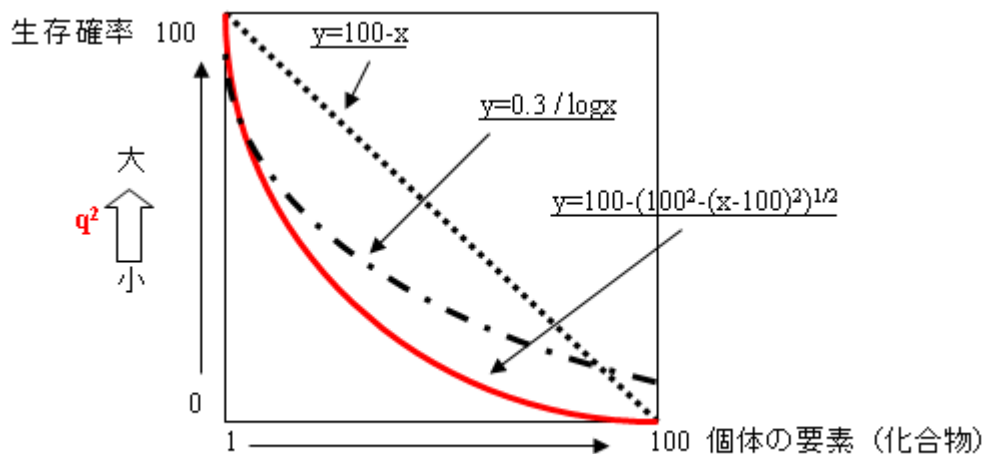


図 7 4： 選択段階の基準の構成

図 74 選択段階の基準の構成

GA による PLS-Crossvalidation の決定係数である q^2 の変化を図 75 に示す。

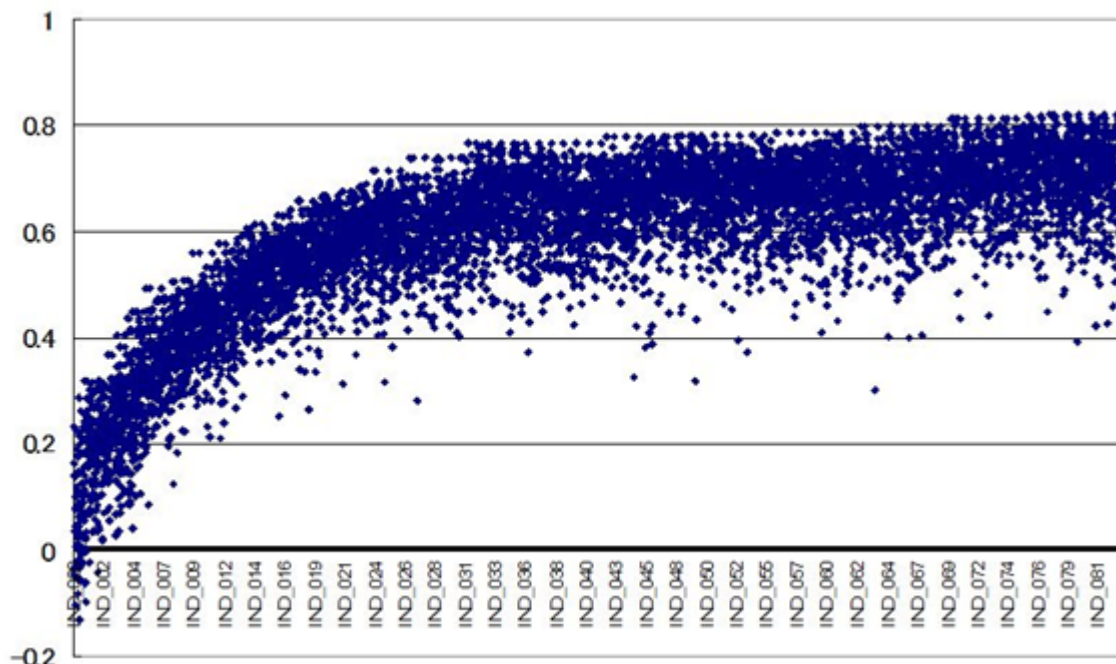


図 75 GA による q^2 の変化。横軸は世代。本データでは 83 世代まで表示している。世代における q^2 値の平均値としては、第 1 世代で 0.148、第 83 世代が 0.694 となった。

上図から分かるように、GA により世代を経るごとに q^2 の値が上昇、即ち統計的な妥当性が向上している。本検討では、およそ 15 世代目で平均 $q^2 > 0.5$ となり、統計的に有意な回帰モデルが得られ、また 100 世代に達する前に平均 $q^2 \sim 0.7$ となり非常に高い相関を示す回帰モデルが得られることが分かった。また計算速度としては、Intel Xeon E5410 2.33GHz L2Cache 12MHz MainMemory 4GB、1Core 使用の条件で、1 世代あたりおよそ 30 秒であり、かなり効率的な最適化問題のプログラムと言える。

(分子動力学シミュレーションによる複数の hERG モデルの作製)

本検討では、分子動力学シミュレーションにより得られたトラジェクトリーから、RMSD 値について幅広く 9 個の構造を選び、それぞれ構造最適化を行い、初期構造を含めて 10 個の hERG モデルを作製した。図 76 にそれらを重ね合わせたものを示す。化合物の結合領域において、hERG の特徴的な残基

である Y652、F656 について側鎖二面角が比較的大きく変化した構造群であることが分かる。トラジェクトリーからの構造の選定が GA 結果に及ぼす影響については、今後詳細な解析を重ねる必要があるが、GA での決定係数の向上の効率には多少の影響があることが予想されるが、最終的に得られる回帰モデルの妥当性にはさほど影響しないと推察している。

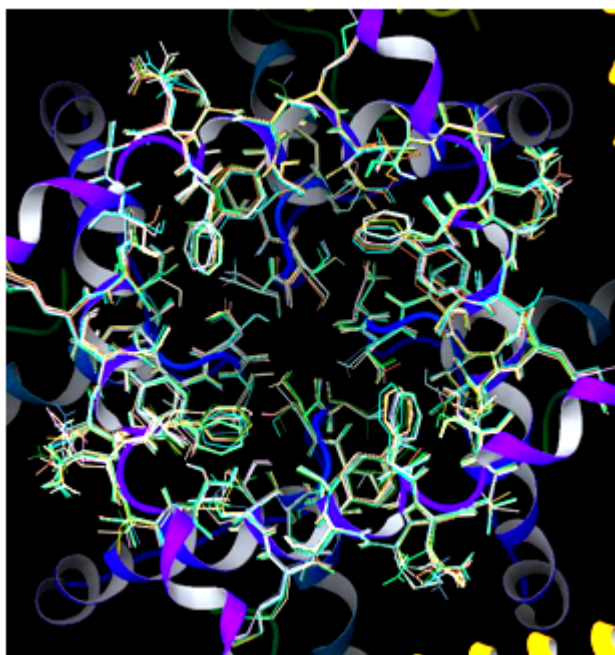


図 76 10 個の hERG モデルの重ね合わせ。図 62 の座標の Z 軸負側から見たもの。表示されているアミノ酸残基は、相互作用エネルギー計算の対象とした 14 種の残基。

(GA-COMBINE の効果)

本検討では、10 個の hERG モデルと 100 個の化合物で複合体を作成し、相互作用エネルギー値を説明変数、 pIC_{50} 値を目的変数として SAMPLS アルゴリズムを組合せて leave-one-out による q^2 を算出し、GA 評価関数とした。複合体の学習セットの組合せ数は 10100 個であるから、ランダムに選択して 1 秒間に 3 億通りの計算をこなしたとしても、宇宙誕生から現在までよりも長い時間を要する。即ち GA により、非常に効率的に統計的に有意な複合体の組合せを見出すことができると言える。

前報の COMBINE 法により得られた回帰モデルの q^2 の平均値は 0.62 であるのに対し、今回の検討では 0.69 であった。GA の世代数を増やすかまたはパラメータの最適化により、より高い q^2 を示す回帰モデルが得られることが推察されるが、学習セットのみの検討であり、今後学習外セットの取扱いを考える必要がある。即ち、単に高い q^2 を求めるだけではその回帰モデルが over-fitting であるリスクが生じてしまうため、回帰分析に入れない群を設定する必要がある。ところが、今回は空間サンプリングに精度向上を目的としてアンサンブルドッキングを適用することにより、ある一定以上の精度を有する複合体を複数用意している。学習セットにおいてはこの考え方は矛盾を生じないが、では学習外セットにおける空間サンプリングの精度は、実際に回帰モデル構築の際に、どのような影響を及ぼし、またどのように考えるのが適切なのか、一義的には決まらなると考える。つまり、統計的手法による空間サンプリングの補完は、空間サンプリングが不十分であるという前提に立っているため、空間サンプリングが不十分か十分かを問題としない学習外セットに対しては直接結びつかない。それらの二つを結び付ける論理や概念については、今後の検討課題である。

一方、今回作製した GA プログラムは他の構造活性相関の計算、例えば CoMFA 等にも応用可能であるため、LBDD(Ligand-base-Drug Design)への展開の可能性も秘めている。今後、LBDD での応用についても検討していきたい。

本章において、前章で確立した COMBINE 法による化合物の hERG 阻害活性予測法の精度向上を目的として、アンサンブルドッキングによる空間サンプリングの精度向上と GA を組み込んだ手法を考案し、その効果を検証した。その結果、膨大な数の組合せ最適化問題を非常に効率よく解き、高い相

関を有する学習セットの回帰モデルが得られることが分かった。今後の課題として、回帰モデルの応用性及び *over-fitting* の検証のために、学習外セットをどのように設定するかが挙げられる。

- ⑤ 開発した手法によるヒット化合物の取得（バイオメディカル情報研究センター集中研、三井化学アグロ分室、アステラス製薬分室、塩野義製薬分室）

上述したように、 μ 受容体に対する *in silico* スクリーニング法によって 200 万化合物から選択された 348 化合物に対する *in vitro* 親和性試験の結果、50%以上阻害する化合物 21 ヶ(6%)が見出されている。さらに、下記に示すように、膜タンパク質に対する新規阻害剤が、信頼性におけるモデル構造のあるターゲットAについて、187 ヶの評価化合物中 23 ヶ (12.3%) 見出されている。このヒット率は、通常の HTS(ハイスループットスクリーニング)実験における 0.1%~1%のオーダーのヒット率に比較すると、少なくとも 10 倍以上のスクリーニング効率となっている。

さらに、大学等のアカデミアとの共同研究も積極的に行っており、下記で示すように、新型インフルエンザウィルスにも適用が可能な RNA ポリメラーゼ PA-PB1 複合体形成を阻害する試薬候補の発見等、多くのヒット化合物を見出している。

膜タンパク質をターゲットとした実証研究（三井化学アグロ分室）

(In silico スクリーニング技術の実証研究)

本プロジェクトで開発された *in silico* スクリーニングソフト(*sievgene*)を殺虫剤のターゲットになり得るタンパク質 5 種類に対して適用し、有用性を検証した。全てのターゲットにおいて、*in vitro* 評価では高いヒット率を得ることが出来た（計 121 ヶのヒット化合物と平均 14%のヒット率）。更に、基礎殺虫活性試験 (*in vivo* 評価)では、*in silico* スクリーニングから選抜した 2 化合物が市販殺虫剤と同等の活性を示した。以上の結果から、農薬用途においてもターゲットタンパク質への *in silico* スクリーニング技術の適用が有効であることが分かった。

一方、市販ソフトと精度・速度の比較を検討したところ、計算速度と活性化合物を見つけ出す精度に関しては市販ソフトより優れていることが確認された。

三井化学アグロ分室では、同時に参加している「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」にて膜タンパク質の機能的発現を確認するための評価系(*in vitro*)を構築している。平成 20 年~23 年に、*in vitro* 評価系が構築された 5 つの膜タンパク質に対して *sievgene* を活用して有用化合物が得られるか検討を進めた。*sievgene* を用いて選抜した化合物を購入し *in vitro* 評価と *in vivo* 評価を行ってきた。平成 24 年度は、平成 23 年度までに検討した 5 つの膜タンパク質の中から、*in vivo* 活性が期待される作用点 2 個を選抜して *in silico* スクリーニングからの選抜を進めた。同時に、今後のソフト開発方針へのフィードバックを目的に、プロジェクト開発ソフトと市販ソフトの精度・スピードなどの基本性能の比較を行った。

表 17 に平成 23 年度までに選抜した化合物の評価結果を示す。平成 24 年度は、平成 23 年度に *sievgene* により選抜した化合物の *in vitro*, *in vivo* 評価を実施した。

表 17 平成 23 年度までの選抜化合物の評価結果

実施年	ターゲット ¹	購入数	in vitro ヒット数 ²	in vitro ヒット率 (%)	in vivo ヒット数 ³	in vivo ヒット率 (%)
H20	A	187	23	12.3	12	6.4
H21	B	120	5	4.2	0	0
H22	C	75	7	9.3	1	1.3
H22	D	69	9	13.0	1	1.9
H23	B	117	10	8.5	3	2.6
H23	E	112	37	33.0	0	0
H23	D	18	3	16.7	1	5.6
総計	A-E	698	94	-	18	-
平均	A-E	-	-	13.5	-	2.6

1 農薬の標的になり得るターゲットタンパク質 5 種類 (A~E)

2 *in vitro* ヒットの定義 : $IC_{50} \leq 10 \mu M$ 、または、 $EC_{50} \leq 10 \mu M$

3 *in vivo* ヒットの定義 : 死虫率 $\geq 80\%$ (@10ppm)

ターゲット A は多くの既知活性物質が存在し、モデルの妥当性を十分に検証出来たため、*in vitro* にて高いヒット率を示した。更に、*in vivo* 評価でも市販農薬と同程度の活性を示す化合物を 1 個見出すことに成功した。比較的モデル信頼性の低い B~E については、ここでは参考データとして記載する。ターゲット B は平成 21、23 年度に化合物選抜を実施した。平成 21 年度の結果を活用してタンパク質の立体モデルを改良したところ、*in vitro*、*in vivo* ともにヒット率が改善した。ターゲット C、D は、*in vitro*、*in vivo* 共に活性化合物も見出すことが出来たため、後述するように平成 24 年も引き続き検討した。ターゲット E は、近い種族にてリガンドとの複合体構造が解明されているため、計算に適用した膜タンパク質の立体構造の中で最も信頼性が高い。期待通り *in vitro* 評価ではヒット率 33% と最も高い値が得られた。残念ながら *in vivo* で活性を有する化合物は存在しなかった。昆虫の作用点活性と致死性に関しては、今後の検討課題である。

平成 23 年までの実証研究より以上の結果から、次に示す結論を得られた。

- ① 前回の情報を活用することでヒット率が向上 (モデル改良、機械学習法の活用)
- ② タンパク質の立体構造が正確なら *sievegene* を活用して高いヒット率が得られる

平成 23 年度までの結果から、*in vivo* 活性が期待できるターゲット C、D を選定した。ターゲット C は前回の選抜において *in vivo* ヒット化合物が、*in vivo* 評価で市販農薬より 10 倍高い活性を示した。更に、異なる種族にて X 線結晶構造が解かれたため (シーケンス一致率 60%)、立体モデルの精度向上が期待される (図 77)。既存活性化合物として文献情報及び自社評価系で IC_{50} 値が $10 \mu M$ 以下の 29 個を、不活性化合物としてナミキ商事 2010 年度ライブラリー 1 万化合物をそれぞれ選抜した結果、予測性が高いモデルが得られた。

ターゲット D は、過去 2 回の選抜で *in vivo* 活性が見出されている。ターゲット D と相同性が高いタンパク質にて既存リガンドとの X 線共結晶構造が解かれた。この結晶構造を鋳型に、ホモロジーモデリングにより複数のモデルを作成した。11 個の既存リガンドと、不活性化合物 (平成 23 年度ナミキ商事ライブラリー 1 万化合物) を用いたドッキングを実施した。リード適正の有る化合物を見出すため、**Ligand Efficiency (LE=ドッキングスコア/重原子数)** を指標とし最も高いエンリッチメントカーブを得る事ができたモデルを化合物選抜に採用した。実際のスクリーニングにおいても、LE を指標として選抜を実施した。

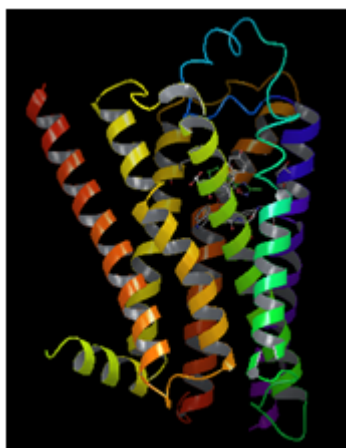


図 77 ターゲット C の立体モデル

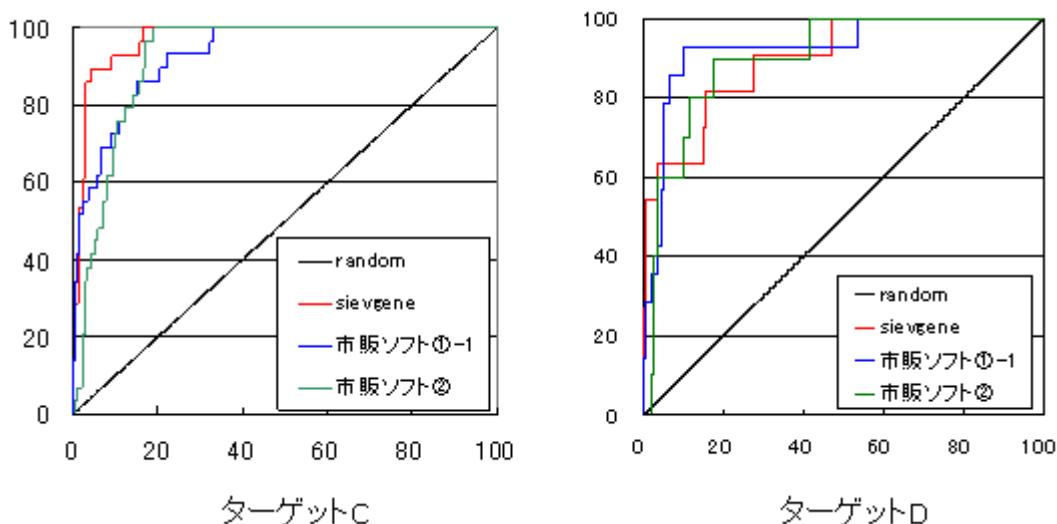


図 78 Enrichment カーブ (横軸 : No of Compounds (%), 縦軸 : No of Hits (%))

平成 24 度に Sievgen により選抜した化合物数、及び *in vitro* 評価結果を表 18 に示す。

実施年	ターゲット	購入数	<i>in vitro</i> ヒット数 ¹	<i>in vitro</i> ヒット率 (%)
H24	C	112	18	16.1
H24	D	55	9	16.4

¹ *in vitro* ヒットの定義 : $IC_{50} \leq 10 \mu M$ 、または、 $EC_{50} \leq 10 \mu M$

表 18 のようにターゲット C,D 共に *in vitro* では高いヒット率を得ることが出来た (計 27 件のヒット化合物、平均のヒット率 16.2%)。今後は、*in vivo* 評価を社内にて検討する予定である。

ソフト開発へのフィードバックを目的に、sievgene と市販ソフトの性能比較調査を行った。性能比較項目は、①ドッキングポーズの予測性能、②活性化化合物を同定する性能、③計算速度、を調査した。比較ソフトとしては創薬研究において広く使用されている市販ソフト①を中心に進めた。
(ドッキングポーズの予測性能)

市販ソフト 3 個と sievgene にて、132 個のタンパク質—リガンド複合体結晶構造を用いてセルフドッキングを実施した。求めたドッキングポーズと結晶構造との間での水素原子以外の平均二乗偏差 (RMSD (Å)) 値を表 19 に示す。

表 19 セルフドッキング(132 個)でのリガンド結合ポーズ再現率 (%)

RMSD (Å)	Sievgene (Fast)		Sievgene (Extensive)		市販ソフト①-1		市販ソフト①-2		市販ソフト②		市販ソフト③	
	1位	10位以内	1位	10位以内	1位	10位以内	1位	10位以内	1位	10位以内	1位	10位以内
1Å以内	15.9	30.3	41.7	54.5	26.3	35.6	64.4	69.5	47.6	57.3	16.8	36.6
2Å以内	57.6	79.5	62.9	80.3	55.1	68.6	78.8	83.1	73.9	81.9	35.6	57.4
3Å以内	65.2	87.1	66.7	87.9	76.3	86.4	83.1	86.4	80.1	88.7	45.5	71.3

1 位 : スコア 1 位のポーズと結晶構造の RMSD 値
10 位以内 : スコア 10 位以内のポーズで結晶構造との RMSD が最小なるポーズの RMSD 値

速度を重視した sievgene(Fast)と市販ソフト③を比較すると、速度・精度共に sievgene の方が優れた結果であり、sievgene が競争力の高いソフトで有ることが確認できた。精度を重視した sievgene(Extensive)、市販ソフト①-2、市販ソフト②を比較すると、スコア 10 位以内に結晶構造と近いポーズを探索する能力はほぼ同等だったが、スコア 1 位のポーズでは市販ソフト①-2、②の方が良かった。このため、sievgene では正しいポーズと間違っただけのポーズを区別するためのスコア関数に改良の余地が有ることが分かった。

(活性化化合物を同定する性能)

検討したターゲット 5 種類の AUC 値と 1%での EnrichmentFactor を表 20 に示す。

表 20 各ターゲットでの AUC 値と 1%EnrichmentFactor の比較

実施年度	ターゲット	Sievgene		市販ソフト①-1	
		AUC	1%EF	AUC	1%EF
H20	A	0.84	15.2	0.70	2.7
H23	B	0.97	72.0	0.82	52.0
H24	C	0.97	28.4	0.93	34.2
H24	D	0.90	54.5	0.93	28.6
H23	E	1.00	100.0	1.00	100.0

多くのターゲットで AUC 値、1%での EnrichmentFactor 共に sievgene の方が良くなった。MTS 法を活用することで、活性化化合物を同定する性能が高くなっていると推測される。

(計算速度)

ターゲット A でデコイ化合物(1 万個)の平均計算時間を sievgene と市販ソフトで比較した。

表 21 化合物当りの計算時間 (秒/化合物)

ソフト	Sievgene	市販ソフト①-1	市販ソフト①-2
平均時間	1.52	10.5	185

Sievgene は市販ソフトに比べて 7 倍~185 倍速くなっていた。

以上から、プロジェクト開発ソフト (sievgene) は、市販ソフトに対して、活性化化合物の同定と計算速度に関して優れていた。一方、ドッキングポーズの予測精度に関しては、sievgene、市販ソフト共に正確な予測は難しく、誘導体の設計にそのまま使用するには注意が必要なことが分かった。

生理活性ペプチドから非ペプチド性化合物 (低分子化合物) を探索・設計する手法の開発 (塩野義製薬分室)

PDB より、タンパク質と複合体を形成しているペプチドと、同じドッキングポケットに結合している他の低分子のデータを約 20 対収集した。このデータを用い生理活性ペプチドから非ペプチド化合物

が探索できるか、ドッキング計算を基にした類似化合物探索手法 (DSI 法 : Fukunishi et al. (2006) *J. Med. Chem.*, 49, 523-533.) で探索する実験をしてみたが、ヒット率はランダムスクリーニングと大差なかった。理由としては、ペプチドは自由度が大きく docking 計算に向かないので DSI 法が使いにくいと考えられる。そこで新しい類似化合物探索手法を開発することで、生理活性ペプチドから非ペプチド低分子化合物が探索できるかどうか検討を進めた。

生理活性ペプチドから非ペプチド性化合物を探索・設計する手法の開発の一環として、内在性の μ -オピオイドの一種である Endomorphine-1 (Tyr-Pro-Trp-PheNH₂ : 以下、EM-1 と略す) をターゲットとした創薬実証研究を行った。EM-1 は、Mu Opioid Receptor (MOR) に対する高い親和性 ($K_i = 360$ pM) およびアゴニスト活性を有し、in vivo でも高い疼痛抑制効果を持つ。このペプチドから同等のプロファイルを有する非ペプチド化合物に変換することができれば、新規な疼痛抑制薬として高い価値を持つものと期待される。

研究方針として、EM-1-MOR 複合体を構築することで、EM-1 の結合配座およびファーマコフォアを推定し、それらの情報を基に低分子化合物の探索を行うこととした。内容としては、大きく分けて以下 2 つの研究を行った。

研究① : MOR のホモロジーモデルを構築後、cosgene による構造サンプリングおよび MTS/DSI 法スクリーニングを実施。この検討を行うことで、作成したモデルの精度を確認すると共に、EM-1 のモデリングへの適応を試みた。

研究② : F.B.McMD, cosgene, MD-MVO 法を活用し、EM-1-MOR 複合体モデルを構築。得られたモデルを基に EM-1 の非ペプチド化を試みた。

(研究成果)

研究① : β_2 AR を鋳型にしたホモロジーモデリングおよび cosgene による構造サンプリングにより 132 個の MOR モデルを発生した後、既知リガンドを用いた小規模 MTS 法スクリーニングを実施。その結果、既知リガンドを効率よくスクリーニングできる MOR モデルを得た。そして、このモデルを用いて市販化合物を対象とした MTS/DSI 法スクリーニングを行ったところ、MOR に対して結合活性を示す 48 個の低分子化合物を見出した (ヒット率 12%)。内、4 化合物がアゴニスト活性を示した。このことから、良好な MOR モデルが得られたと推測される。一方で、EM-1 とのモデリングを試みたが、実験情報を満たすような複合体モデルは得られなかった。

研究② : EM-1 および先行研究で報告されている活性型の MOR モデルについて、分子シミュレーション (F.B.McMD, cosgene) を実施。得られた構造集団 (EM-1 : 2318 配座, MOR モデル : 200 構造) を用いて網羅的なドッキングを行った結果、実験情報と一致する複合体モデルを構築することができた。そして、このモデルを基に、市販化合物を対象とした MD-MVO スクリーニングを実施。その結果、MOR に対して結合活性を示す 21 個の低分子化合物を見出した (ヒット率 6%)。さらに、得られたヒット化合物について最適化検討を行ったところ、高活性なアゴニストリガンドを 3 個見出すことができ (活性値 : $K_i = 2.91$ nM, 3.24 nM, 6.58 nM)、EM-1 の低分子化に成功した。

以下に、各研究の詳細な内容について示す。

研究①

(MOR ホモロジーモデルの構築)

human β_2 adrenergic G-protein-coupled receptor (β_2 AR) の結晶構造 (2rh1.pdb) を鋳型として、以下のアミノ酸アライメントを基に MOE (CCG 社) と Prime (SCHRODINGER 社) を用いて、計 11 個の MOR モデルを構築した。なおこの際、EL2 (Extracellular Loop2, TMH4 と 5 の間にあるループ構造) 部分については、MOR と β_2 AR 間で相同性が低く且つ非常に長いループ構造となっていることから、モデリングが困難であったので除外した。

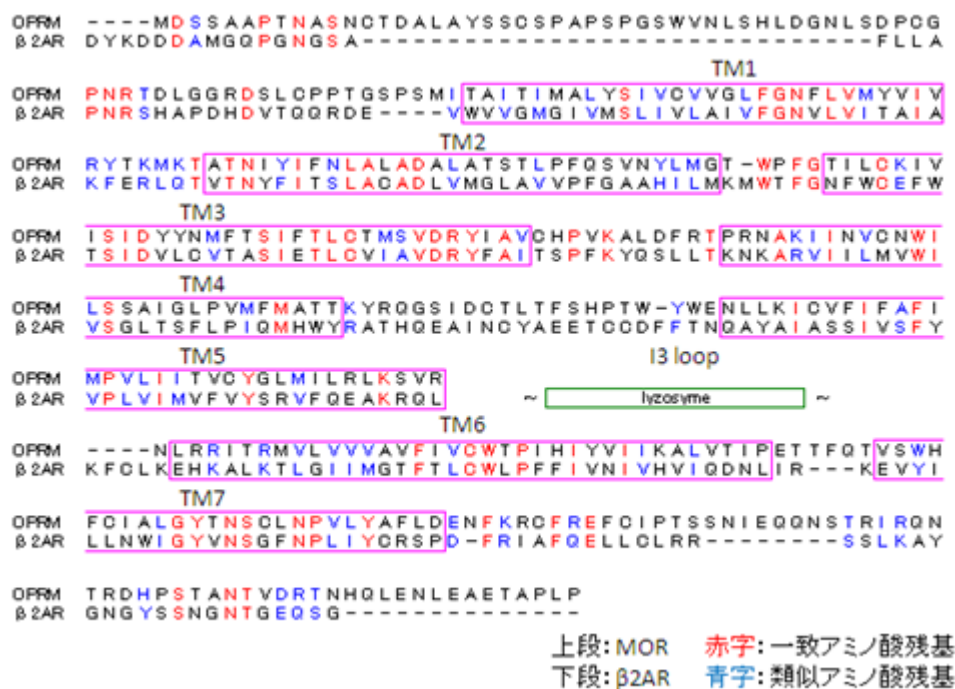
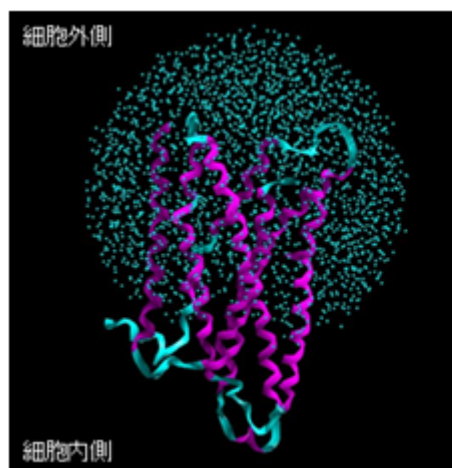


図 79 アミノ酸アライメント

(myPresto/cosgene による構造サンプリング)

得られた 11 個の MOR モデルを出発構造として、myPresto/cosgene によるエネルギー極小化および MD シミュレーションによる構造サンプリングを行った。結合ポケット近傍に図 80 のように CAP 水をあらわに配置し、また、構造が崩れるのを防ぐために主鎖に position restraint をかけて計算を行った。詳細な設定については、以下の通り。



System
 Method : canonical(NVT)
 11362 atoms(264 protein residues, water)
 Cut off : 10Å
 CAP : 30Å
 Time step : 1.0fs SHAKE(H only)
 Temperature : 300K
 Position Restraint : 10(main chain)

図 80 MD シミュレーションの設定条件

各モデルにおいて 4nsec のシミュレーションを実施。その結果、最終的に 132 個のサンプリング構造を得た。サンプリングの方法は次の通り。

初期構造 : 1 個

エネルギー極小化構造 : 1 個

MD サンプリング構造 : 10 個 (構造が平衡化した 2nsec~4nsec 間で 200psec 毎にサンプリング)

(MTS/DSI 法スクリーニング)

得られた MOR の 132 個の構造集団を用いて、まず小規模 MTS 法スクリーニング (Fukunishi et al. (2005) *J. Mol. Graphics and Modelling*, 25, 61-70) による検証を行った。検証セットとしては、以下に示す既知 MOR リガンド (アゴニスト) 11 個とデコイリガンド 11,479 個を用いた。デコイリガンドについては、LigandBox (Namiki, 約 200 万化合物) の中から、MOR リガンドと構造類似性は低い、物理化学的特性 (AlogP、MW、H_Donor、H_Acceptor) の類似度が高い化合物集団を選抜した。

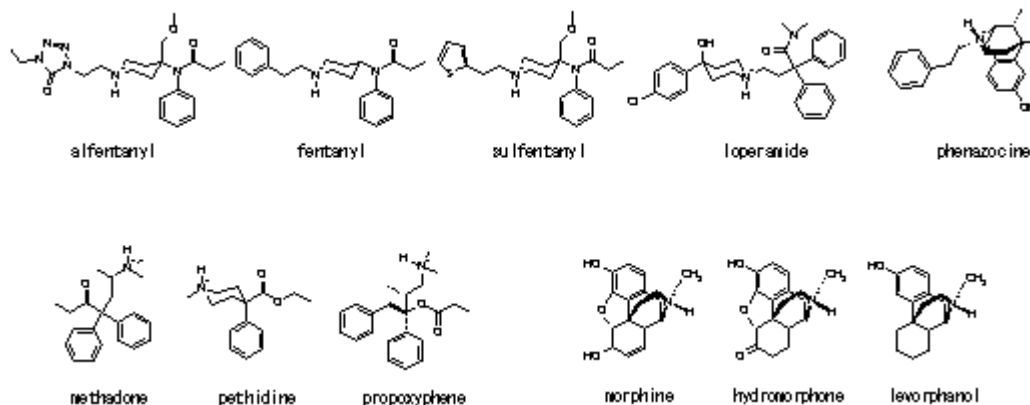


図 81 既知の MOR リガンド

以下に検証結果を示す。スクリーニング精度の指標としては、データベースエンリッチメントカーブにおける AUC (the Area Under the Curve) を用いた。AUC は、データベースエンリッチメントカーブ下の面積に相当するもので、0%~100%の範囲の値をとり、ランダムスクリーニングでは 50%となり、値が高い程スクリーニング精度が良いことを示す。

	moe										prime
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
ini	79.2	63.3	47.6	62.6	56.5	50.5	64.3	47.7	35.5	63.3	49.3
min	54.3	48.0	50.1	65.6	64.4	69.2	60.7	47.7	51.6	71.9	62.3
2100 ps	76.6	69.4	61.8	59.1	56.1	60.0	60.1	45.7	65.0	73.4	59.2
2300 ps	66.7	63.2	35.2	57.2	50.2	49.2	82.8	34.9	66.7	48.7	60.3
2500 ps	68.8	71.1	51.9	66.2	64.8	36.2	75.6	54.7	65.8	63.9	59.7
2700 ps	48.8	60.3	44.5	62.7	65.8	47.5	63.0	61.2	60.9	54.1	58.0
2900 ps	74.2	64.8	56.7	62.2	71.9	56.9	53.6	57.2	62.4	37.3	50.7
3100 ps	87.7	65.4	70.9	57.2	60.1	63.7	67.3	53.3	53.0	58.6	46.3
3300 ps	73.7	68.8	57.9	52.6	56.8	59.1	65.2	54.3	41.2	64.6	60.3
3500 ps	64.7	40.4	36.8	57.8	58.0	58.2	57.1	53.2	55.7	49.0	60.6
3700 ps	76.9	61.9	48.9	56.1	57.5	37.3	70.0	60.9	66.2	32.5	55.2
3900 ps	75.8	64.3	54.6	45.0	52.2	49.3	69.6	47.3	63.3	44.9	60.4

iniは初期構造, minはエネルギー極小構造, xxxpsはMDの実行時間を表す。赤枠の部分だけ色分けした。

図 82 小規模 MTS 法スクリーニングによる検証結果

上記検証の結果、132 個の構造の中で、moe model1 の 3100ps の MOR モデルが最も精度良く既知 MOR リガンドを抽出できることが分かった。そこで、この構造を用いて LigandBox (Namiki, 200 万化合物) を対象とした MTS/DSI 法スクリーニングを実施した。その結果、399 化合物を選抜し、購入を行った。購入化合物を評価するために、MOR に対する結合親和性試験を実施した。測定条件としては、diprenorphine をトレーサーとした競合阻害実験を化合物濃度 50uM、1 点の測定で行った。その結果、以下に示すように複数の活性化化合物が確認された。仮に、試験条件である化合物濃度 50uM にお

る%inhibition \geq 50をヒット化合物とすれば、ヒット率は12%（48個）であった。また、ヒット化合物について、GTP- γ Sを用いた機能試験を実施したところ、4化合物についてアゴニスト活性が認められた。以上の結果から、検証で抽出されてきたMORモデルについては、良好なモデル構造であると考えられる。

表 22 結合親和性試験の結果

%inh@50uM	化合物数
$90 \leq X \leq 100$	8
$80 \leq X < 90$	7
$70 \leq X < 80$	12
$60 \leq X < 70$	11
$50 \leq X < 60$	10
$X < 50$	351
計	399

} 活性化化合物: 48個

(EM-1のモデリングへの適応)

得られたMORモデルを用いて、EM-1との複合体の構築を試みた（EM-1の配座としては後述の解析で得られた2318配座を使用）。その結果、これまでに得られている実験情報を満たすような複合体モデルを構築することができなかった。その要因としては、次の2つが考えられた。

- ・要因1：不活性型の鋳型（ β_2 ARの結晶構造）を基にモデリングしたため、EM-1が結合すると想定される活性型のモデルにはなっていない。
- ・要因2：EM-1と比べ、検証に用いた既知リガンドはいずれも小さい分子であり、抽出されたモデルのポケットがEM-1のサイズに適していない。

以上の結果から、EM-1のモデリングに当たっては、活性型モデルを用いる、多様なポケットを用いた網羅的なドッキング検討を行うことが肝要であることが考えられた。そこで、次の研究②の検討を進めることとした。

研究②

(myPresto/cosgeneによる構造サンプリング)

先行研究により報告されているMosberg等のMOR活性型モデルを用いて、myPresto/cosgeneによるエネルギー極小化およびMDシミュレーションによる構造サンプリングを行った。シミュレーションの内容としては、前述のものと同条件（研究①-2）で実施した。構造が平衡化した2nsecから4nsecの間で10psec毎にサンプリングを行い、計200構造をサンプリングした。

(F.B.McMDシミュレーションによる配座解析)

F.B.McMDシミュレーションによるEM-1の配座解析を実施した。その結果、以下に示すように高いエネルギーから低いエネルギーを持つ配座までのマルチカノニカル分布を示す配座集団が得られた。そして、これらの集団についてmyPrestoのreweightFBツールを用いて解析を行ったところ、以下に示すような各温度に対応するカノニカル分布を示す配座集団を得ることができた（50K毎に表示）。そして、これらの結果の内、300Kに該当する配座集団を抽出したところ、2318個のEM-1の立体配座が得られた。

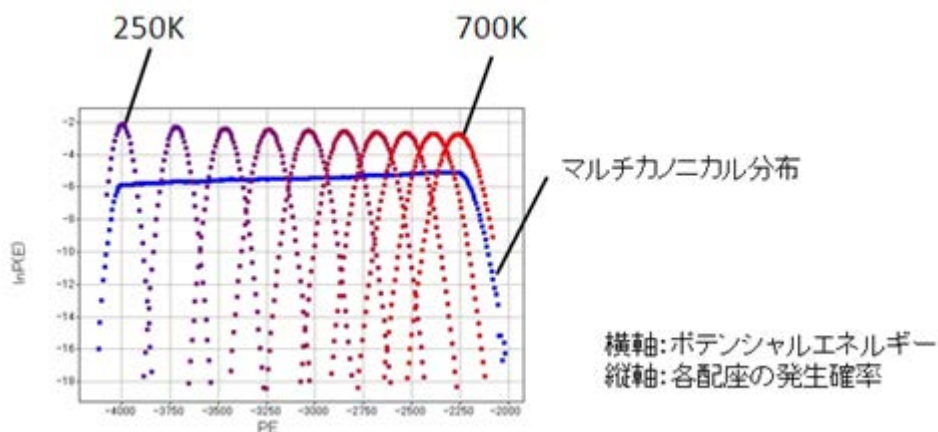


図 83 F. B. McMD シミュレーションの結果

(EM-1-MOR 複合体モデルの構築)

得られた MOR モデルの構造集団 (200 個) と EM-1 の配座集団 (2318 個) を用いて、総当たりのなドッキングシミュレーションの検討を行った。この検討には、CCDC 社の GOLD を使用し、リジッドドッキングの設定で実施した (すなわち、ドッキング中に EM-1 の配座サンプリングは行わなかった)。その結果、2,657,042 個のドッキングポーズが得られた。そして、これらの中から、既知情報 (SAR や mutation 実験) を満たすポーズの抽出を試みたところ、以下に示すような、EM-1-MOR 複合体モデルを得ることができた。

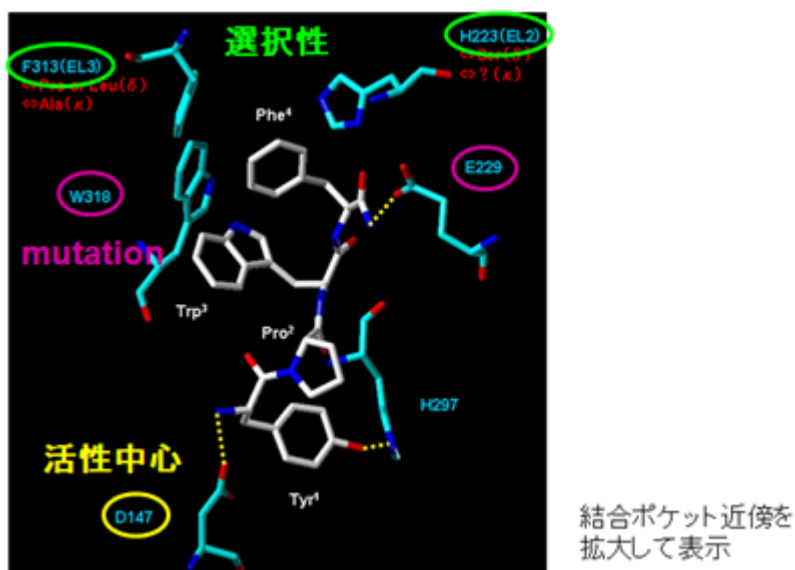


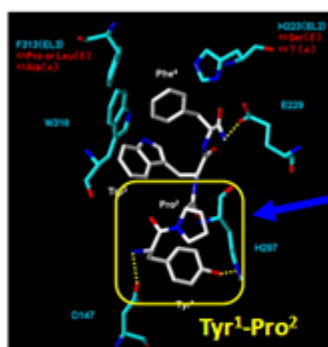
図 84 EM-1-MOR 複合体モデル

この複合体モデルが得られたことにより、EM-1 の結合配座およびファーマコフォアを推定することが可能となった。しかし、一度に全ての条件を満たす低分子化合物を見出すことは困難であることが予想された。そこで、まずは部分的な置換を行い、徐々に分子を伸長させていくことで、EM-1 の低分子化を図ることにした。

(MD-MVO スクリーニングによる低分子化合物の探索)

まずは、EM-1 の N 末端側の 2 残基 (Tyr1-Pro2) を低分子化合物で置換することを目標とし、MD-MVO スクリーニングを実施した。作業の流れとしては以下の要領で行い、その結果、MD-MVO スコアが上位の 348 化合物を選抜し、購入を行った。

EM-1-MOR複合体モデル



LigandBox (200万化合物) から分子量等でフィルタリングし、DBを作成

177,559化合物

MD-MVO screening:

- EM-1のTyr¹-Pro²を参照分子として、DB中の化合物を重ね合わせ。
- 「形状」や「性質」が類似している化合物を抽出。

図 85 MD-MVO スクリーニングまでの流れ

購入化合物を評価するために、MOR に対する結合親和性試験を実施した。測定条件としては前述と同様、但し、化合物濃度は 10 μ M に設定した。その結果、化合物濃度 10 μ M における %inhibition \geq 50 をヒット化合物とすれば、ヒット率は 6% (21 個) であった。さらに、これらヒット化合物の詳細な活性値を知るために、濃度依存性試験を実施した。結果を以下に示す。

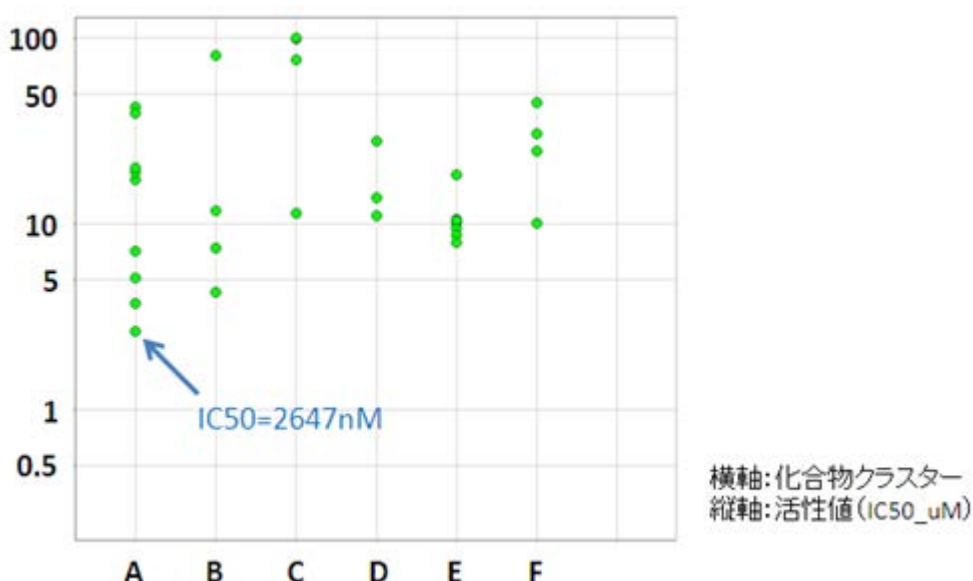


図 86 濃度依存性試験の結果

上図において、横軸の化合物クラスターは、ヒット化合物 21 個を構造的特徴によって分類した結果で、A~F の 6 つの化合物群があることを示している。この時点で、最も高活性だったものは、クラス A 群の化合物で、IC₅₀=2,647nM であった。続いて、これらのヒット化合物を起点として、モデリングの情報を基に化合物のデザイン方針を立て、周辺化合物の購入やライブラリー合成の検討を実施した。以降では、最も高活性な低分子のアゴニストリガンドが得られたクラス B 群の検討結果について示す。

(最適化検討の結果 (クラス B 化合物))

以下に、検討を行ったクラス B 化合物の SAR 展開例を示す (具体的な構造式を表示することができないので検討の流れのみを示す)。

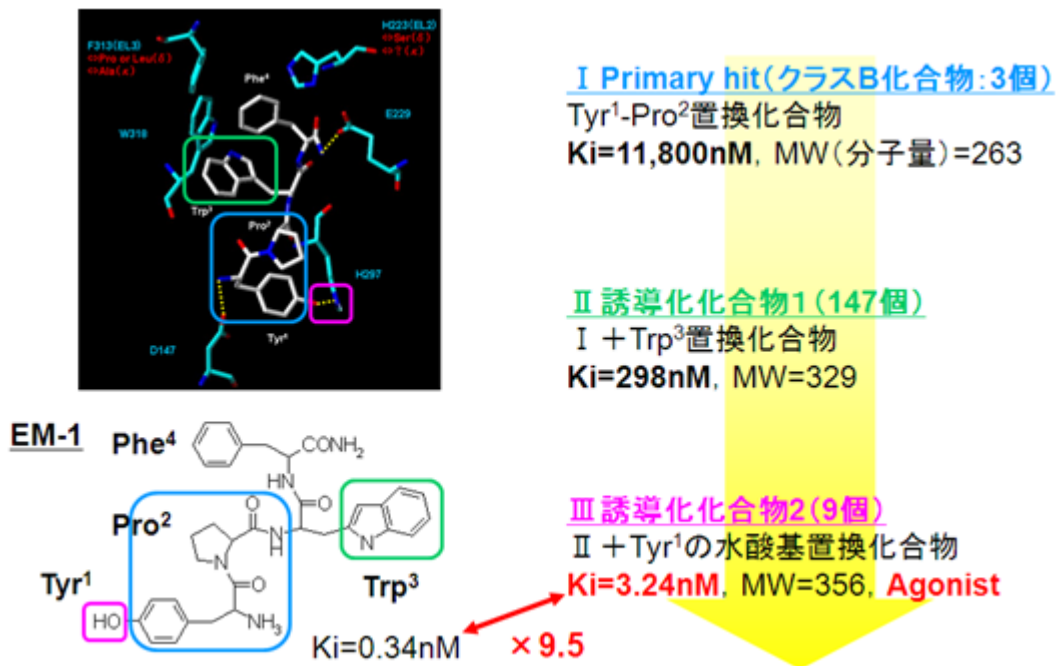


図 87 クラス B 化合物の SAR 展開例

まず、この化合物群では、EM-1 の Tyr¹-Pro² を置換していると想定されるヒット化合物が、MD-MVO スクリーニングにより 3 個見出されていた。代表的な化合物の活性値は、Ki=11、800nM。次に、活性向上を図るために、EM-1 の Trp³ を置換する化合物の展開を行った。147 個の誘導化化合物を合成し、評価を行った結果、Ki=298nM の良好な活性を示す化合物が得られてきた。そこで、さらなる活性向上を図るべく、今度は、EM-1 の Tyr¹ の水酸基を置換する化合物の展開を行った。その結果、Ki=3.24nM の値を示す高活性な化合物が得られた。さらに機能試験を行ったところ、この化合物については、目標とするアゴニスト活性を有することも確認できた。最後に、クラス B 化合物 全 275 個の結果を以下に示す。

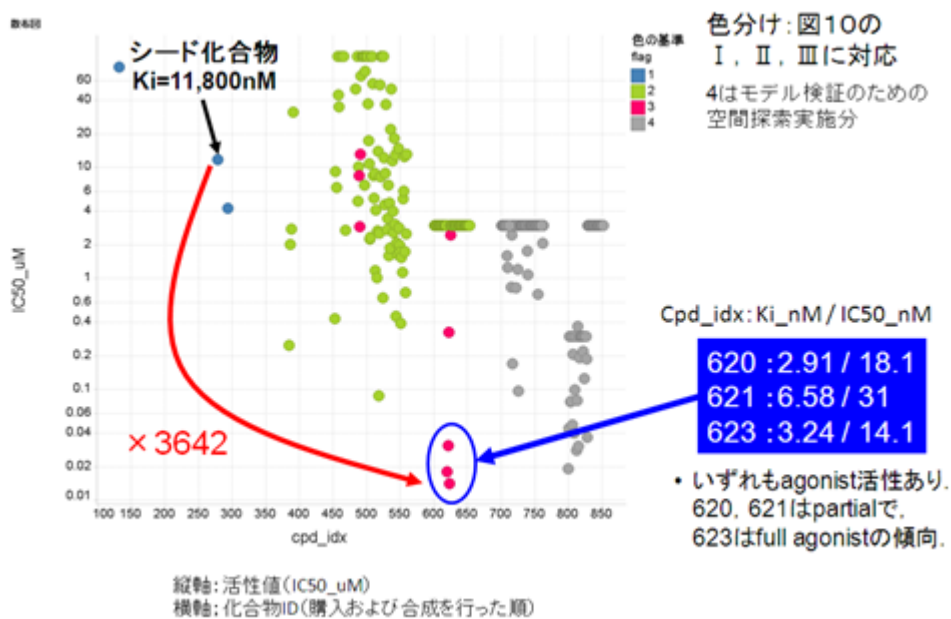


図 88 クラス B 化合物の評価結果

図 88 で示されるように、EM-1 に近い活性およびアゴニスト作用を有する低分子化合物として、最終的に 3 個見出すことができた。

本研究では、プロジェクト内で開発されてきた技術を活用し、EM-1 の非ペプチド化のための創薬実証研究を実施した。その結果、以下に示す成果が得られた。

研究①

- ・ MTS/DSI 法スクリーニングにより 4 個のアゴニストリガンドを得た。

研究②

- ・ EM-1-MOR 複合体モデルを構築。
- ・ MD-MVO スクリーニングにより、EM-1 の N 端の 2 残基を mimic する低分子化合物を探索。複数骨格のヒットを見出した。さらに化合物の最適化検討により、高活性の agonist リガンドを 3 個見出すことができ、EM-1 の非ペプチド化に成功した。

In silico スクリーニングの実施によるヒット化合物の取得 (バイオメディカル情報研究センター集中研)

大学等外部との共同研究を通じて、我々の開発してきた手法の実証研究を行った。

横浜市立大学・朴教授との共同研究では、横浜市大で構造決定した RNA ポリメラーゼ PA-PB1 複合体の情報を元に、PA-PB1 複合体阻害剤の *in silico* スクリーニングを新規開発した sievgene と MTS 法、MD-MVO 法、化合物データベース : LigandBox を用いて行った。複合体界面をねらい目として化合物を選出、アッセイ実験の結果、PA-PB1 複合体阻害剤 15 化合物を発見することに成功した。



図 89 RNA ポリメラーゼ PA-PB1 複合体とドッキングポケット (緑)

その他、大阪大学 (2 標的タンパク質)、金沢大学 (1 標的タンパク質、タンパク質複合体化阻害剤)、東京大学先端研 (1 標的タンパク質) などとの共同研究で、ヒット率 3%–10% 程度で、54 活性化化合物を発見した。これらの実証研究では、毎年、改良を重ねて更新される化合物データベース LigandBox, MD 計算による複数のタンパク質構造の生成、sievgene、MTS/DSI 法、機械学習を用いた MTS/DSI 法、MD-MVO 法やこれらのコンセンサスコアなどが、入手可能なデータに合わせて組み合わせて用いられた。発見した化合物を元に、合成展開が検討されたとき、合成可能な 200~300 の化合物を、*in silico* スクリーニングの手法で予測される活性の高い順番を示し、高活性の期待される分子の合成も行われた。

大学との共同研究では、HTS の実験系ができていない、ないし HTS 系の構築が困難な場合が多く、*in silico* スクリーニングによる化合物の絞込みと 100 化合物程度の少数の化合物購入が適している場合が多かった。HTS はメガファーマでしかできないものとも言われてきたが、我々が開発してきた手法を活用することにより、100 程度のオーダーの試薬によるスクリーニング実験でも、多くの場合にヒット化合物を見出すことが可能となり、大学や小規模の研究機関においても容易に試みるのが可能になったことが実証されたと言える。

オーファン GPCR (標的 A) に対する化合物探索 (バイオメディカル情報研究センター集中研、アステラス製薬分室)

GPCR は創薬標的分子として最も魅力的な標的クラスの 1 つであり、既存の医薬品の中で GPCR を標的とするものは数多い。標的 A はアステラスで独自に見出した創薬標的分子であり、様々な疾患に対する魅力的な創薬標的分子であると考えられている。しかし、標的 A に対するリガンドは未知であり (=標的 A はオーファン GPCR)、評価系の構築やさらなるコンセプト検証のために標的 A に作用する化合物取得が切望されていた。

標的 A に対して 3 種類の *in silico* スクリーニングを実施した。まず、従来法との比較のために、Bayse 法を活用した *in silico* スクリーニングを実施した。具体的には、287 化合物を購入・評価し、活性のある化合物の類縁化合物 129 個を評価した。結果、活性・選択性のある化合物を取得することはできなかった。次に、human rhodopsin の構造をテンプレートとした標的 A のモデル構造に対して、MTS 法を活用した *in silico* スクリーニングを実施した。具体的には、153 化合物を購入・評価し、活性のある化合物の類縁化合物 511 個を評価した。結果、活性・選択性のある化合物を取得することはできなかった。最後に、human β_2 の構造をテンプレートとした標的 A のモデル構造に対して、MTS 法を活用した *in silico* スクリーニングを実施した。具体的には、568 化合物を購入・評価した。結果、活性・選択性のある化合物の取得に成功した (以下、化合物 a)。その後、化合物 a の類縁化合物 92 個、並びに、選択性のない活性化化合物の類縁化合物 1,815 個を評価したものの、活性・選択性のある化合物を取得することはできなかった。以上まとめると、3 種類の *in silico* スクリーニングとそのヒット化合物の類縁体探索によって、合計で 3,589 個の化合物評価を実施し、活性・選択性のある化合物 a を見出した。化合物 a の詳細なプロファイルは表 23 にまとめた。化合物 a については、Ligand Efficiency、%LE、LLEn 等、結合の効率を測定する指標は高く、「化合物 a は GPCR A に効率が良く結合している」ことが示唆された。また、Rule of Five、Rule of Three も満たしており、物性面での懸念はない。ただし、「周辺化合物がヒットしていないこと」、「活性・選択性が不十分であること」が課題であった。

表 23 ヒット化合物のプロファイル

項目	値
IC ₅₀	1.9 μ M
選択性比	10
Ligand Efficiency	0.52
%LE	70.2%
LLE	2.98
Molecular Weight	217
logP	2.74
Number of Hydrogen Bond Acceptors	3
Number of Hydrogen Bond Donors	0
Number of Rotatable Bonds	2
TPSA	46

オーファン GPCR の探索は創薬研究の中で最も難易度の高い課題の一つであるが、本プロジェクトで開発された *in silico* スクリーニングにおいて、標的 A に対して活性・選択性のある化合物の取得に成功した。また、従来法(Bayes)、human rhodopsin をテンプレートとした MTS 法ではヒットを得ることができなかったことから、本プロジェクトで開発したソフトウェアを精度の高いモデル構造に適用することにより、従来では *in silico* スクリーニングでヒットを見つけることが困難であった標的についてヒット化合物を得ることができる可能性を示唆した。一方、得られた化合物の活性は充分ではなく、類縁体評価でも活性増強した化合物を見出すことはできなかった。このことは、オーファン GPCR に対する *in silico* スクリーニングを実施する際には、GPCR 結晶構造解析、物理化学的測定結果等が重要であることを示唆している。そのことから、「創薬加速に向けたタンパク質機能解析基盤技術開発」で実施している構造生物学の進展の創薬における重要性が再確認された。

業界標準のソフトとの比較による技術的優位性の調査 (アステラス製薬分室)

現在、製薬会社では日常的に *in silico* スクリーニングが実施されるようになっている。一部のメガファーマを除けば、製薬会社はデファクトスタンダードの *in silico* スクリーニングソフト (GOLD, Glide) を活用している。したがって、新規の *in silico* スクリーニングソフトには、デファクトスタンダードと同等以上の精度をもつことが期待されている。

(比較評価)

ADRB3 を例として、本プロジェクトで開発された *in silico* スクリーニングソフトと業界標準のソフトウェア (MOE/GOLD) を比較した。具体的な *in silico* スクリーニングの手順としては、分子動力学シミュレーションで多数の構造を予め発生させ、既知のアンタゴニストに対する予測性能の高いモデルに対してドッキング計算を実施する方法を採用した。結果、本研究プロジェクトで開発した *in silico* スクリーニングソフトでは、スコア上位 1% のヒット率は 66 % にものぼり、MOE/GOLD の 3.3% を大幅に上回った。性能比は 20 倍であった。

タンパク質立体構造解析 NEDO 特別講座

京都大学大学院理学研究科（平成 24 年 3 月 31 日まで）、名古屋大学細胞生理学研究センター（平成 24 年 4 月 1 日から）、東京大学大学院薬学系研究科、大阪大学蛋白質研究所において、以下を目標として「タンパク質立体構造解析 NEDO 特別講座」を開講した。NEDO 特別講座については、人材育成、産学の人的交流および成果普及を目的に、平成 25 年度も継続している。

- 立体構造解析、機能・相互作用解析及び計算科学並びにそれらの周辺技術を習得し、それらを融合させて、従来にない視点から創薬に貢献する先進的、総合判断ができる人材の輩出。
- 産学の間で、新しい知見、観点、情報がダイナミックに交流し、相互メリットを享受できるシステムの構築。
- 異分野の立場、視点、観点に関する情報の「混合」と、情報の「化学変化」を誘起することによる市場、製品、研究テーマなどへの新しいコンセプトの創出。

(1) 概要

生体高分子立体構造情報解析プロジェクト及び創薬加速に向けたタンパク質構造解析基盤技術解析技術開発プロジェクトの成果普及と、その基幹技術の産業界への展開を図るため、それぞれの基幹技術に即した以下の「蛋白質立体構造解析 NEDO 特別講座」を大学に設置し、①人材育成事業、②人的交流の促進事業、および③周辺研究を共同で実施した。

○「構造生物学講座」/「タンパク質立体構造解析 NEDO 特別講座」

- 設置大学： 京都大学（平成 24 年 3 月まで）
名古屋大学細胞生理学研究センター（平成 24 年 4 月～）
- 講座代表者： 京都大学大学院理学研究科 藤吉好則教授（平成 24 年 3 月まで）
名古屋大学細胞生理学研究センター 藤吉好則教授（平成 24 年 4 月～）
- 講座の内容： 極低温電子顕微鏡による立体構造解析基礎技術、膜生物学

○「分子認識解析講座」/「タンパク質立体構造解析 NEDO 特別講座」

- 設置大学： 東京大学
- 講座代表者： 東京大学大学院薬学系研究科 嶋田一夫教授
- 講座の内容： NMR 法を用いたタンパク質相互作用解析技術

○「タンパク質計算科学講座」/「タンパク質立体構造解析 NEDO 特別講座」

- 設置大学： 大阪大学
- 講座代表者： 大阪大学蛋白質研究所 中村春木教授
- 講座の内容： 計算科学による分子シミュレーションと高分子系への展開

① 人材育成事業

産業界で働く社会人等を対象として、基幹技術に関する専門的知識や技術の習得を目的とした講義や実習を実施した。



講義風景

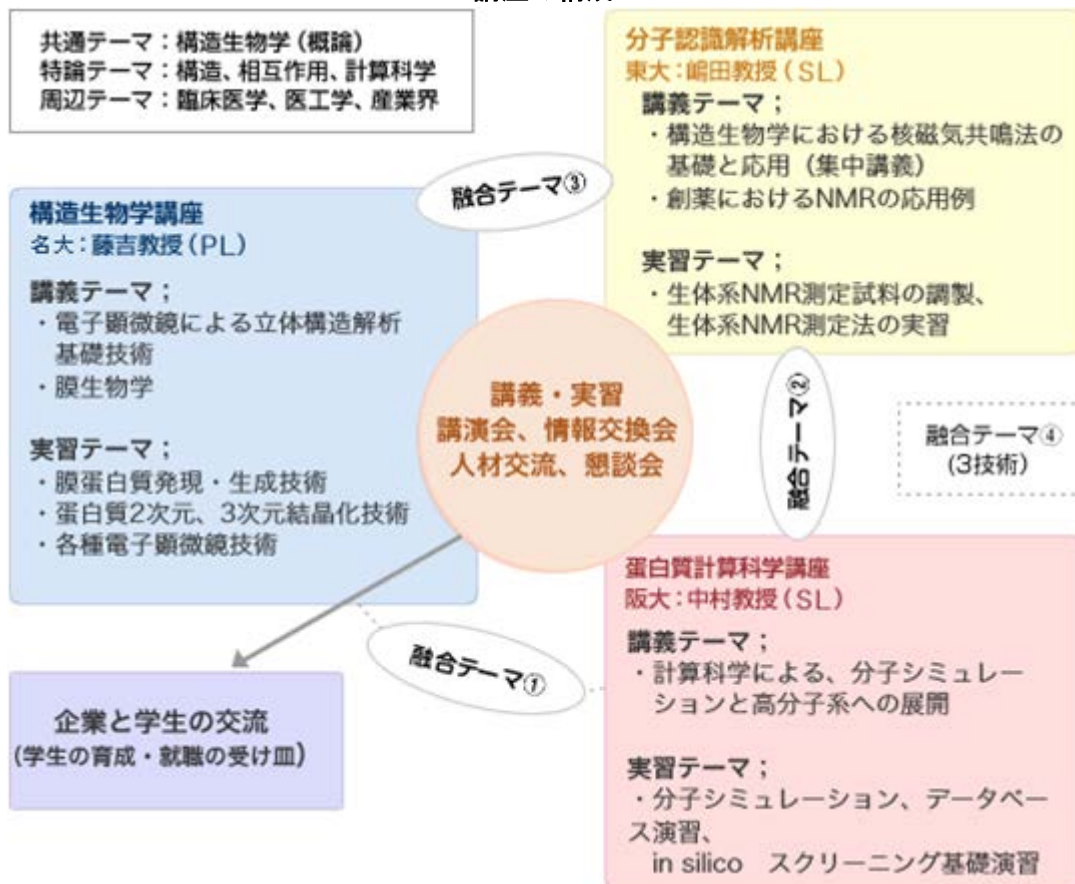
② 人的交流の促進事業

基幹技術を中心に関連技術も含めた研究者、技術者等の人的ネットワークを構築するために、生体高分子関連分野、臨床系、ナノ技術など工学系、IT系、産業界など異分野を含む講師3~4名/回による共同講義・シンポジウム等を開催した。その他、個別に業界団体との交流などもNEDOと共同で実施した。

③ 周辺研究

基幹技術に関連する基礎的研究や、その成果の普及や発展に資する派生的研究を実施した。

講座の構成



(2) 実績および成果

① 人材育成事業

平成 20 年度参加者数

講座	講義	登録者数	参加者数	その他 (学生等)
構造生物学講座	基礎講義	21	12	
	集中講義	12	5	
	テーマ別講義	20	10	
	テーマ別実習	15	9	
分子認識解析講座	基礎講義	23	15	68
	集中講義	7	4	50
	テーマ別講義	45	19	92
	テーマ別実習	23	15	
蛋白質計算科学講座	基礎講義	52	44	
	集中講義	14	6	4
	基礎実習	14	13	
	テーマ別講義+実習	76	62	
	発展実習	66	45	
	合計	388	259	214

平成 21 年度参加者数

講座	講義	登録者数	参加者数	その他 (学生等)
構造生物学講座	基礎講義	9	8	
	テーマ別実習	6	4	
分子認識解析講座	基礎講義	20	18	65
	テーマ別講義	56	31	88
	テーマ別実習	20	14	0
蛋白質計算科学講座	基礎講義	36	34	
	テーマ別実習	9	9	
	テーマ別講義+実習	56	39	
	集中講義	6	4	
	合計	218	161	153

平成 22 年度参加者数

講 座	講 義	登録者数	参加者数	その他 (学生等)
構造生物学講座	基礎講義	46	34	
	テーマ別実習	24	15	
分子認識解析講座	基礎講義	24	20	37
	テーマ別講義	64	41	102
	基礎実習	9	6	
	テーマ別実習	9	7	
蛋白質計算科学講座	基礎講義	78	68	
	テーマ別講義+実習	140	93	
	合計	394	284	139

平成 23 年度参加者数

講 座	講 義	登録者数	参加者数	その他 (学生等)
構造生物学講座	基礎講義	17	10	
	実習	6	1	
分子認識解析講座	基礎講義	16	14	43
	テーマ別講義	23	10	106
	基礎実習	9	8	
	テーマ別実習	10	8	
蛋白質計算科学講座	基礎講義	48	46	
	テーマ別講義+実習	120	75	4
	合計	249	172	153

平成 24 年度参加者数

講 座	講 義	登録者数	参加者数	その他 (学生等)
構造生物学講座	基礎講義	5	2	5
	テーマ別講義	35	23	2
	テーマ別実習	2	0	0
分子認識解析講座	基礎講義	12	9	41
	テーマ別実習	6	6	0
蛋白質計算科学講座	基礎講義	36	30	0
	特別講義	3	2	0
	テーマ別講義+実習	60	60	20
	合計	159	132	68

② 人的交流の促進事業

NEDO「生体高分子立体構造情報解析」及び「創薬加速に向けたタンパク質構造解析基盤技術開発」プロジェクトの基幹技術を主テーマとし、共同講義・創薬シンポジウム・国際シンポジウムを、名古屋大学（平成 23 年度までは京都大学）、東京大学、大阪大学で実施することにより、関連技術を含めた研究者や技術者等の参加を得て、人的ネットワークの構築と人的交流において成果を得ることができた。

世界の著名な研究者を招いての国際シンポジウムでは、ノーベル化学賞受賞者など、世界をリードする研究者との人的交流ができた。

○ 国際シンポジウム（開催日：平成 21 年 1 月 26 日、開催場所：東京大学）

聴講人数：100 名（一般、学生）

講演内容/講演者：

- Structural Studies of Protein Aggregates/ Roland Riek (ETH)
- NMR studies of protein-RNA complexes in the regulation of gene expression/ Michael Sattler (Technische Universität München)
- Tom20 recognizes mitochondrial presequences through dynamic equilibrium among multiple bound states/ 神田 大輔 (九州大学)
- Protein recognition by NMR/ 嶋田 一夫 (東京大学)
- Structure of the microtubule-binding domain of flagellar dynein/ 八木 俊樹 (京都大学)
- Structural and function of Adhennels (Cell adhesive channels)/ 藤吉 好則 (京都大学)
- Fragment Screening by Replica Generation (FSRG) method: In Silico Fragment Screening/ 福西 快文 (産総研)
- Protein Functional Annotation from Structures/ 中村 春木 (大阪大学)

○ 創薬シンポジウム（開催日：平成 22 年 3 月 9 日、開催場所：東京大学）

聴講人数：121 名（一般、学生）

講演内容・講演者：

- 構造に基づいた AIDS に対する抗ウイルス剤の研究と開発/ 満屋 裕明 (米国国立癌研究所 / 熊本大学)
- インフルエンザウイルスゲノム複製の構造基盤による疾病制御/ 永田 恭介 (筑波大学)
- 機能抗体のデザインと創製/ 岡部 尚文 (中外製薬)
- 機能抗体のデザインと創製/ 河原 英治 (ノバルティスファーマ)
- 創薬基盤技術としての電顕：膜タンパク質の構造機能研究/ 藤吉 好則 (京都大学)
- 計算科学によるタンパク質間相互作用の予測と解析/ 中村 春木 (大阪大学)
- 創薬研究における NMR/ 嶋田 一夫 (東京大学)

○ 名古屋国際シンポジウム（開催日：平成 25 年 1 月 22 日～24 日、開催場所：名古屋大学）

聴講人数：1,500 名以上

G タンパク質共役型受容体の構造解析及び G タンパク質との複合体の解析に成功した功績により 2012 年ノーベル化学賞を受賞した Brian Kobilka 教授、2003 年にノーベル化学賞を受賞した RodMacKinnon 教授をはじめとして、構造生理学分野における代表的な研究者 31 名（海外 21 名、国内 10 名）の講演と 130 以上の発表により、本プロジェクトの成果を世界に発信するとともに、これら研究者との人的交流ができた。

③ 周辺研究

構造生物学講座では、電子線結晶学を中心とする基幹技術研究を展開して膜タンパク質の構造解析に関して多くの学術成果を得るなど、所定の成果を得ることができた。

分子認識解析講座では、膜タンパク質とリガンド相互作用解析をおこなうため NMR 手法開発等の基幹技術の延長として抗血栓薬開発を目指した研究において、血小板凝集に関与するタンパク質や阻害タンパク質の構造や機能メカニズムの解明等、所定の成果を得ることができた。

タンパク質計算科学講座では、分子シミュレーション計算法の高度化とその手法を用いたタンパク質相互作用の研究において、分子シミュレーション計算法の高度化、タンパク質及びタンパク質複合体構造構築、企業との共同研究等、所定の成果を得ることができた。企業との共同研究では、タンパク質の構造モデリングと *in silico* 薬物探索、抗体工学および抗体医薬への応用のためのタンパク質およびタンパク質複合体モデリング技術の開発を 3 社と進めた。

IV. 実用化に向けての見通し及び取り組みについて

1. 実用化に向けての見通し及び取り組みについて

研究開発項目①で開発した極低温電子顕微鏡・結晶解析用プログラム等を用いた解析により、創薬標的となり得る複数の膜タンパク質の構造情報を取得し、この構造情報を活用した企業による創薬研究が開始された。

研究開発項目②で開発した NMR 測定法（アミノ酸特異的交差飽和法、DIRECTION 法等）により、タンパク質複合体の結合界面における構造情報の取得が可能になった。

研究開発項目③で開発したシミュレーションソフトウェア myPresto[®] version 4.2 においては、研究開発項目②で得られる結合界面構造情報を分子動力学計算に組み入れることにより、タンパク質複合体構造を高精度に予測可能となった。本ソフトウェアは大阪大学および経済産業省ポータルサイトにて一般に公開されており、2013 年 2 月現在の累計ダウンロード数は 2,429 件（日本語版：2,131 件、英語版：298 件）にのぼる。

本プロジェクトの研究開発成果は、創薬標的タンパク質の立体構造に基づく医薬品リード化合物設計（構造創薬）を理論段階から実用段階に押し上げるものとなる。また、あらゆる創薬標的タンパク質に適用可能な大量発現系、試料調整法の確立をはじめ、研究開発項目①～③で開発した個々の要素技術は、構造創薬のみならず、従来の創薬手法においても極めて有用であり、創薬プロセス全般の効率向上に資するものと言える。

本プロジェクトで開発した創薬基盤技術の実用化に向けた取り組みの一環として、「構造生物学講座」、「分子認識解析講座」および「タンパク質計算科学講座」から成る NEDO 特別講座を、京都大学、名古屋大学、大阪大学および東京大学にて開講し、研究開発成果の普及を図っている。平成 20 年度から平成 24 年度までの参加者は、大学院生および社会人を中心とした延べ 1,008 名にのぼる。

なお、NEDO 特別講座については、平成 25 年度も継続するものとした。

添付資料

- 健康安心イノベーションプログラム基本計画
- プロジェクト基本計画（研究開発項目＜2＞「有用天然化合物の安定的な生産技術開発」を除く）
- 特許・文献・外部発表等リスト
- 事前評価関連資料

健康安心イノベーションプログラム基本計画

健康安心イノベーションプログラム基本計画

平成22年4月1日
産業技術環境局
製造産業局

1. 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、創業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、およ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。

2. 政策的位置付け

○新成長戦略（基本方針）（2009年12月30日）

強みを活かす成長分野として「グリーン・イノベーション」分野と「ライフ・イノベーション」分野を策定、人材育成や技術開発を後押しするほか、需要を創造すると同時に利用者の立場に立った社会ルールの変更に取り組む。また、政府は新たな分野に挑戦する人々を支援するとしている。

○革新的医薬品・医療機器創出のための5か年戦略（2009年2月12日改訂）

内閣府、文部科学省、厚生労働省および経済産業省の間において革新的な医薬品・医療機器の創出に向け、研究資金の集中投入、ベンチャー企業の育成、臨床研究・治験環境の整備、アジアとの連携、薬事法における審査の迅速化・質の向上、イノベーションの適切な評価、官民対話等、研究から上市に至る過程の一貫かつ集中的な支援を実施することとしている。

○「ドリームBTジャパン」（2008年12月11日BT戦略推進官民会議）

2002年に策定した「バイオテクノロジー戦略大綱」以降、バイオテクノロジーをめぐる状況が変化してきたことを背景に、新産業の育成・創出、食糧問題解決、バイオマス活用等の課題に対処すべく、イノベーション強化11項目や官民が協働で取り組むべき最重点課題を策定した。

○新経済成長戦略のフォローアップと改訂（2008年9月19日閣議決定）

2006年6月に経済産業省がとりまとめた「新経済成長戦略」を、資源価格の高騰等の構造変化を踏まえフォローアップと改訂を行った。「資源生産性競争」時代における経済産業構造の構築、世界市場獲得と持続的発展のためのグローバル戦略の再構築、地域・中小企業・農林水産業・サービスの未来志向の活性化を3つの柱として、「新経済成長戦略」を強化した。

○「iPS細胞研究の推進について（第一次とりまとめ）」（2008年7月3日総合科学技術会議 iPS細胞研究WG）

iPS細胞研究の成果がもたらす医療への波及効果や新しいバイオインダストリーの進展等について検討を行い、iPS細胞研究を推進するための研究推進体制、国の支援の在り方、知的財産戦略、国際化協力の在り方等を取りまとめた。

○「イノベーション25」（2007年6月閣議決定）

生涯健康な社会形成に向けて中長期的に取り組むべき課題として、治療重点の医療から予防・健康増進を重視する保健医療体系の転換、生命倫理・安全性と医療技術促進政策の調和などをとりあげ、再生医療および在宅医療・介護に係る社会還元加速プロジェクトを実施すると

ともに、臨床研究・臨床への橋渡し研究をはじめとする研究開発ロードマップの提示により所要の措置を講じていくこととしている。

○がん対策推進基本計画（２００７年６月閣議決定）

がん対策基本法に基づき、国、地方公共団体および関係者等が、がん対策を総合的かつ計画的に推進するために策定された基本方針であり、取り組むべき施策の一つとして「がん研究」が取り上げられている。具体的には、現状、診断薬・診断機器の開発、治療薬・治療機器の開発等が推進されているが、さらに、有用な早期診断技術についての研究開発の推進等に取り組むことが提示されている。

○新健康フロンティア戦略（２００７年４月新健康フロンティア戦略賢人会議）、同アクションプラン（２００７年１２月）

健康寿命の延伸や生活の質の向上を図ることを目的として策定された新健康フロンティア戦略および新健康フロンティア戦略アクションプランの中で、「人間の活動領域の拡張に向けた取組」および「医療・福祉技術のイノベーション」において、「先進的予防・診断・治療技術の開発」や「医薬等ベンチャー・基盤産業支援対策」等の施策が提示されている。

3. 達成目標

- ①医薬品開発の成功確率の向上に資する技術開発や、基礎研究から臨床への橋渡し研究等を通じた、医薬品の上市期間の短縮や開発コストの低減を図る。
- ②再生医療の早期実現を目標とし、産業化を促進する。
- ③医療機器¹など先進的な技術開発等の推進による国際競争力の強化、厚生労働省との連携事業（医療機器開発ガイドラインの策定など）による開発から製品に至るまでの期間の短縮等を達成する。
- ④高齢者・障害者の自立促進や介護者の負担軽減等のため、優れた技術や創意工夫のある福祉機器の実用化支援を行う。

4. 研究開発内容

I. 創薬・診断

I-1. 革新的医薬品の創出

(1) 糖鎖機能活用技術開発（運営費交付金）

①概要

我が国が強みを持つ糖鎖工学分野において、これまでに取得・開発した「糖鎖遺伝子ライブラリー」「糖鎖構造解析技術」「糖鎖合成技術」を活用し、癌や感染症など様々な疾病に關与する糖鎖の機能を解析する基盤技術を確立し、我が国の優位性を維持するとともに、創薬・診断等の分野における糖鎖機能の産業利用の促進を図る。

②技術目標および達成時期

2010年度までに、糖鎖や糖タンパク質などの機能を分子レベルで効率的に解明するための基盤技術、糖鎖の機能解析・検証技術、および、有用性が認められた糖鎖機能を産業利用するための基盤技術を開発する。

③研究開発期間

2006年度～2010年度

(2) ゲノム創薬加速化支援バイオ基盤技術開発（化合物等を活用した生物システム制御基盤技術開発）（運営費交付金）

①概要

¹ 医療機器は、画像診断システムなどの「診断機器」、内視鏡下手術支援システムなどの「治療機器」、その他家庭用医療機器、歯科材料、眼科用品を含む。

我が国が強みとする完全長のDNAライブラリーやタンパク質相互作用解析技術等を最大限に活用し、重要なタンパク質ネットワーク解析等により創薬の対象となるタンパク質の効率的な絞り込みを行うとともに、疾患等の生物現象を制御する化合物の探索まで、一貫した技術開発を行う。

②技術目標および達成時期

2010年度までに、超高速・高感度にタンパク質の相互作用を解析する技術や疾患を制御する化合物の探索・評価技術を開発する。

③研究開発期間

2006年度～2010年度

(3) ゲノム創薬加速化支援バイオ基盤技術開発（創薬加速に向けたタンパク質構造解析基盤技術開発）

①概要

創薬上重要な膜タンパク質は複合体を形成していることも多く、その構造解析および相互作用の情報を取得することは創薬研究において重要であるが、その解析は非常に困難である。そこで、膜タンパク質やその複合体の構造情報を取得する新たな技術等の開発に向けて、タンパク質の立体構造およびその構造変化や膜タンパク質複合体の構造情報等の解析および構造情報を基にした高精度なシミュレーション技術を開発する。

②技術目標および達成時期

2011年度までに生体内に近い状態での膜タンパク質およびその複合体の構造解析手法、リガンド分子との相互作用解析手法を確立するとともに、当該技術から得られた情報に基づく *in silico* スクリーニング手法を確立する。

③研究開発期間

2007年度～2011年度

(4) 新機能抗体創製技術開発（運営費交付金）

①概要

ポストゲノム研究や診断・創薬等において重要となっている機能を有する抗体を創製するため、創薬標的として産業利用上重要だが、解析が困難な膜タンパク質やタンパク質複合体を特異的に認識できる抗体を系統的に作成する技術や抗体の分離・精製を高効率に行うための技術の開発を行う。

②技術目標および達成時期

2010年度までに、産業上有用と考えられるタンパク質やその複合体を特異的に認識する抗体を創製するための基盤技術、および、製造コスト低減に向けた抗体の分離・精製等を高効率に行う技術を開発する。

③研究開発期間

2006年度～2010年度

(5) 基礎研究から臨床研究への橋渡し促進技術開発（運営費交付金）

①概要

がん対策等の国民医療高度化を目指し、急速に発展している多様なバイオ技術の融合と医療現場への円滑な橋渡しによるイノベーションの創出・加速のため、総合科学技術会議のもと文部科学省および厚生労働省と連携し、橋渡し研究の強化に一体的に取り組む。具体的には、民間企業と臨床研究機関（文部科学省や厚生労働省が整備する橋渡し研究拠点等）が一体となって行う、医薬品、医療機器、診断ツール等の開発を推進する。

②技術目標および達成時期

2011年度までに医療現場および臨床研究からのフィードバックに基づく研究開発により、医薬品、医療機器、診断ツール等の研究開発成果を円滑に実用化につなげる仕組みを確立する。

③研究開発期間

2007年度～2012年度

(6) 幹細胞産業応用促進基盤技術開発（運営費交付金）

①概要

創薬プロセス効率化や再生医療への応用が期待される i P S 細胞等幹細胞について、産業応用に不可欠な基盤技術の開発や、i P S 細胞に関連した産業応用事例創出の促進を行う。

②技術目標および達成時期

2013年度までに、安全で効率的な i P S 細胞の作製技術を開発するとともに、産業応用に繋げるために必要となる i P S 等幹細胞の選別・評価・製造技術を開発し、産業上利用可能な創薬スクリーニングシステムを確立する。

③研究開発期間

2009年度～2013年度

(7) 後天的ゲノム修飾のメカニズムを活用した創薬基盤技術開発

①概要

がんや生活習慣病などの後天的疾患の原因として重要な因子である「後天的な遺伝子の変化（後天的ゲノム修飾）」を解析する技術や疾患との関連づけにより診断の指標を特定する手法の開発等を実施する。

②技術目標および到達時期

2014年度までに、後天的ゲノム修飾解析技術開発として、極微量サンプルに対応した解析技術の高精度・高感度化、システム化を行うとともに、開発した技術やモデル動物等を活用し、後天的ゲノム修飾と疾患との関連づけを行う。また、探索的実証研究として、制御因子の探索・同定、制御に関する検証を行う。

③研究開発期間

2010年度～2014年度

I-2. 診断ツールの開発

(1) 個別化医療実現のための技術融合バイオ診断技術開発（運営費交付金）

①概要

我が国が有する微細加工技術・表面処理技術といったナノテク等の強みを活かし、染色体異常を高感度、高精度かつ迅速、安価で非コード領域までを検出するゲノムアレイや解析基盤技術開発を行うとともに、診断への応用を可能とする全自動解析システムの開発を行う。

②技術目標および達成時期

2010年度までに、BACを用いた非コード領域を含むゲノム全領域を検出できる高精度ゲノムアレイを開発する。さらに、臨床現場において、微量サンプル（数ナノグラム）から、12時間以内に染色体異常（増幅、欠失、コピー数多型等）を、低コストかつ定量性・再現性を確保して検出ができる自動染色体異常解析システムのプロトタイプを開発する。

③研究開発期間

2006年度～2010年度

(2) 糖鎖機能活用技術開発（運営費交付金）【再掲】

(3) 基礎研究から臨床研究への橋渡し促進技術開発（運営費交付金）【再掲】

I-3. 創薬・診断に係る基盤整備

(1) 統合データベースプロジェクト

①概要

ライフサイエンス分野では、自身の研究成果と既存の研究成果と対比することにより、自身の研究成果の仮説を考案する手がかりが得られたり、新しい実用化の発想が得られたりする可能性があるため、国家プロジェクト等により産生された研究データを一括して活用できるデータベースが、産業界や社会から要望されている。

このため、政府全体の“生命科学データベース統合化の取組”の一環として、経済産業省関連の公的資金研究から産出される研究データを、産業上の有用性を評価のうえ、統合化し、産業界等に提供する。

②技術目標および達成時期

2010年までに経済産業省関連機関により実施されたライフサイエンス分野の研究開発プロジェクトの成果に関する情報提供サイトを構築・運用する。また、ヒト遺伝子に関連した各種研究成果に関しては、平性17～19年度に実施したゲノム情報統合プロジェクトにおいて構築した「ヒト全遺伝子のアノテーション統合データベース (H-Invitational)」を基礎として、経済産業省関連の研究成果を連携して利用できるシステムを構築する。

③研究開発期間

2008年度～2010年度Ⅱ. 再生医療

Ⅱ. 再生医療

Ⅱ-1. 再生医療の実用化

(1) 次世代機能代替技術研究開発事業（うち、次世代再生医療技術研究開発）（運営費交付金）

①概要

生体内で自己組織の再生を促すセルフリー型再生デバイスや、少量の細胞により生体内で自律的に成熟する自律成熟型再生デバイスの実用化を促進するとともに、これら再生デバイスにおける有効性・安全性の評価技術等を確立する。

②技術目標および達成時期

2014年度までに、生体内で自己組織の再生を促進するための細胞外マトリクス、幹細胞誘導・分化促進因子等の再生医療技術を確立し、工学的技術との組み合わせにより、セルフリー型再生デバイスおよび自律成熟型再生デバイスを作製する。また、それらを用いて再生した組織等の有効性・安全性に関して、低侵襲で高精度な評価技術の標準化に取り組む。さらに、開発する再生デバイスを低侵襲に植込む技術を確立する。

③研究開発期間

2010年度～2014年度

(2) 基礎研究から臨床研究への橋渡し促進技術開発（運営費交付金）【再掲】

Ⅱ-2. 再生医療に係る基盤整備

(1) 医療機器開発ガイドライン策定事業

①概要

医療機器産業への投資、新規企業参入、医療機器研究開発の促進および薬事法審査の円滑化・迅速化にも資する「医療機器開発ガイドライン」を厚生労働省との連携の下、産学の協力を得て、個別の機器ごとに策定し、国内での機器開発促進の環境整備を図るとともに、医療機器産業に製品として、または部品・部材の供給として参入しやすい環境を整備するための方策を検討し、医療機器分野の活性化・国際競争力の強化を図る。

②技術目標および達成時期

2010年度までに、今後実用化が期待される先進的な医療機器について、工学的安定性や生物学的安定性等に関する詳細な評価基準を策定し、開発ガイドラインとして取りまとめる。また、平成21年度事業において検討・整理された医療機器産業への参入を促す方策や部材供給の活性化方策の具体化を図るため、様々なマッチング機会をコーディネートする人材育成や事業者の海外展開支援策並びに部材供給取引契約にかかるガイドラインの作成およびPL保険のあり方や普及

方法等についてさらに検討を加え、医療機器産業の活性化に資するものとする。

③研究開発期間

2008年度～2010年度

Ⅲ. 医療機器

Ⅲ-1. 医療機器の開発

がん超早期診断・治療機器総合研究開発プロジェクト（運営費交付金）

概要

がんの診断・治療の革新を一体の課題として捉え、多様な治療法選択が可能となり早期のステージのがんに対して、治療方針を決定するために必要ながん性状、並びに位置に関する正確な情報を確実に取得し、得られた診断情報に基づく侵襲性の低い治療を可能とすることで、患者のQOLを向上させる。

技術目標および到達時期

診断機器システムとしては、分子プローブ等の薬剤並びにそれらの薬剤を用いる高感度・高解像度な画像診断システム、病理診断の効率・信頼性を向上させる病理画像等診断支援システム、遺伝子診断の信頼性を向上させる検体前処理技術を備えた血中がん分子・遺伝子診断システム等を開発する。

治療機器システムとしては、より侵襲性の低い外科的治療を実現する内視鏡下手術支援システム並びに高精度で容易なオペレーションを可能とするX線治療機器を開発する。

研究開発期間

2010年度～2014年度

（うち、内視鏡下手術支援システムは 2007年度～2011年度）

（2）基礎研究から臨床研究への橋渡し促進技術開発（運営費交付金）【再掲】

（3）次世代機能代替技術研究開発事業（うち次世代心機能代替治療技術研究開発）（運営交付金）

①概要

小柄な体格にも適用可能な小型の製品で、血栓形成や感染を防ぎ、長期在宅使用が可能な植込み型補助人工心臓を開発する。

②技術目標および達成時期

2014年度までに、小児を含めた小柄な患者への適用を可能とする、長期使用可能な小型の植込み型補助人工心臓を作製するとともに、有効性および機械的・電氣的・生物学的な安全性の評価を行う。

③研究開発期間

2010年度～2014年度

Ⅲ-2. 医療機器の開発に係る基盤整備

（1）医療機器開発ガイドライン策定事業【再掲】

①概要

医療機器産業への投資、新規企業参入、医療機器研究開発の促進および薬事法審査の円滑化・迅速化にも資する「医療機器開発ガイドライン」を厚生労働省との連携の下、産学の協力を得て、個別の医療機器ごとに策定し、国内での機器開発促進の環境整備を図るとともに、医療機器産業に製品として、または部品・部材の供給として参入しやすい環境を整備するための方策を検討し、医療機器分野の活性化・国際競争力の強化を図る。

②技術目標および達成時期

2010年度までに、今後実用化が期待される先進的な医療機器について、工学的安定性や生物学的安定性等に関する詳細な評価基準を策定し、開発ガイドラインとして取りまとめる。また、平成21年度事業において検討・整理された医療機器産業への参入を促す方策や部材供給の活性化

方策の具体化を図るため、様々なマッチング機会をコーディネートする人材育成や事業者の海外展開支援策並びに部材供給取引契約にかかるガイドラインの作成およびPL保険のあり方や普及方法等についてさらに検討を加え、医療機器産業の活性化に資するものとする。

③研究開発期間

2008年度～2010年度

IV. 福祉機器

IV-1. 福祉機器の開発

(1) 福祉用具実用化開発推進事業（運営費交付金）

①概要

「福祉用具の研究開発および普及の促進に関する法律」（福祉用具法）に基づき、高齢者・障害者および介護者の生活の質の向上を目的として、生活支援分野、社会活動支援分野を中心とした福祉用具の実用化開発を行う民間企業等に対し、研究開発費用の2/3以内を補助することで、多様な福祉ニーズに対応するとともに、当該分野における新産業の創出、成長の促進に資する。

②技術目標および達成時期

高齢者、障害者の生活支援、社会参加支援に資する福祉用具の実用化開発を促進することにより、高齢者等の生活における負担の軽減を図り、安全で安心のできる生活を実現する。より具体的な目標として、各々の補助対象事業終了後3年経過した時点で50パーセント以上を製品化する。

③研究開発期間

1993年度～

IV-2. 福祉機器の開発に係る基盤整備

(1) 福祉機器情報収集・分析・提供事業

①概要

福祉用具法に基づき、民間による福祉機器の実用化のための研究開発を促進するため、福祉機器に関する産業技術に係る情報の収集・分析・提供事業を実施することで、当該分野における福祉機器の普及や新規産業の創出・成長の促進を図る。

②技術目標および達成時期

各年において福祉機器に係るニーズ等の調査の実施および福祉用具実用化推進事業で開発された福祉機器の各種展示会等への出展による情報収集・分析・情報の提供を実施する。

③研究開発期間

1993年度～

5. 政策目標の実現に向けた環境整備（成果の実用化、導入普及に向けた取組）

[標準化]

- ・各プロジェクトで得られた成果のうち、標準化すべきものについては、適切な標準化活動（国際規格（ISO/IEC）、日本工業規格（JIS）、その他国際的に認知された標準の提案等）を実施する。具体的には、統合データベースの情報やインターネットに公開されている情報資源等を相互運用するために、必要なデータ形式、フォーマット等の標準化を推進する。
- ・高齢者等支援機器については、関係省庁との緊密な連携の下、標準化等の手法による実用化および普及の方策を検討する。

[導入普及促進]

- ・ゲノム研究の進展は、個人遺伝情報を用い、情報技術を駆使した幅広い医療・健康サービスに

よる人々の健康や福祉の向上、さらには新しい医療・健康サービス産業の育成に重要な役割を果たそうとしているが、その際、人権を尊重し、社会の理解と協力を得て、個人遺伝情報の厳格な管理の下で適正に事業を実施することが不可欠である。そのため、個人遺伝情報を安全に保護するために作成した事業者が遵守すべきルール「経済産業分野のうち個人遺伝情報を用いた事業分野における個人情報保護ガイドライン（2004年12月17日告示）」（個人遺伝情報保護ガイドラインという）を適切に運用する。

[産業間連携]

・バイオベンチャーは商品を市場に送り出すまでに長期間を要する、研究開発のために多額の資金調達を必要とする、事業を行うために様々な規制・審査を経る必要がある等、他業種のベンチャー企業と比較して困難な問題を抱えていることが多い。そのため、バイオベンチャーの様々な問題に対して施策への反映を検討し、補助金等の施策の紹介を通じてバイオベンチャー振興を図る。

・「産業クラスター計画」に基づき、全国のバイオクラスターにおいて、企業間のネットワーク形成の支援、産学連携による研究開発プロジェクトの支援、地域系ベンチャーファンドによる資金調達支援等を実施していく。

・医療の進歩・国民の健康に貢献する医療機器・用具の産業技術力向上および国際競争力強化を目指し、研究開発から市場化までのすべてのプロセスにおけるマクロな戦略の検討と、医療機器の重要性について社会的認知の向上を実現するための仕組みおよび個別プロジェクトの形成をはかることを使命とした「医療技術産業戦略コンソーシアム（METIS）」が平成13年に設立され、平成21年10月より第4期に入っている。

[プロジェクト等間の連携について]

・ゲノム創薬加速化支援バイオ基盤技術開発（化合物等を活用した生物システム制御基盤技術開発）については、タンパク質機能解析・活用プロジェクトの成果を活用することで、超高速・高感度にタンパク質の相互作用を解析する技術を開発する。

・ゲノム創薬加速化支援バイオ基盤技術開発（創薬加速に向けたタンパク質構造解析基盤技術開発）については、「生体高分子立体構造情報解析」の成果を活用することで、膜タンパク質やその複合体の構造情報を取得する新たな技術等の開発に向けて、タンパク質の立体構造およびその構造変化や膜タンパク質複合体の構造情報等の解析および構造情報を基にした高精度なシミュレーション技術を開発する。

・糖鎖機能活用技術開発については、糖鎖合成関連遺伝子ライブラリー構築、糖鎖エンジニアリングプロジェクトの成果を活用することで、糖鎖の機能を効率的に解析するための基盤技術を開発する。

・ゲノム創薬加速化支援バイオ基盤技術開発の「化合物等を活用した生物システム制御基盤技術開発」、「創薬加速に向けたタンパク質構造解析基盤技術開発」については、必要に応じ、各々の成果を活用し、効率的、効果的な研究開発を図る。

[関係機関との連携]

・総合科学技術会議が推進する基本政策推進専門調査会 分野別推進総合PT ライフサイエンスPTおよび科学技術連携施策（「生命科学の基礎・基盤」、「臨床研究・臨床への橋渡し研究」）の下、各プロジェクトについて、関係府省との適切な連携を図る。

[その他]

・一段と激化する特許戦争の中、成果実用化・効率的な研究開発を推進するため、プロジェクト企画段階から、研究テーマ周辺の論文および特許状況のサーベイ実施やプロジェクト実施段階における特許出願後の事業化構想等、特許に関する戦略的取組（プロパテントアプローチの導入）を実施する。

・医療機器の審査体制の強化による薬事法審査の迅速化の観点から、2004年より独立行政法

人産業技術総合研究所の工学系研究者を独立行政法人医薬品医療機器総合機構へ派遣しているところである。

・福祉機器においても、中小企業等産業側の観点を福祉政策に活かすため2008年より独立行政法人産業技術総合研究所の職員を厚生労働省に派遣中である。

6. 研究開発の実施に当たっての留意事項

事業の全部又は一部について独立行政法人の運営費交付金により実施されるもの(事業名に(運営費交付金)と記載したものは、中期目標、中期計画等に基づき、運営費交付金の総額の範囲内で、当該独立行政法人の裁量によって実施されるものである。

なお、適切な時期に、実用化・市場化状況等について検証する。

7. 改訂履歴

平成12年12月28日付けがん・心疾患等対応高度医療機器プログラム制定。

平成14年2月26日付け健康維持・増進のためのバイオテクノロジー基盤研究プログラム基本計画制定。

平成14年2月28日付け健康寿命延伸のための医療福祉機器高度化プログラム基本計画制定。

がん・心疾患等対応高度医療機器プログラム(平成12・12・27工総第13号)は、廃止。

平成15年1月27日付け健康維持・増進のためのバイオテクノロジー基盤研究プログラム基本計画制定。健康維持・増進のためのバイオテクノロジー基盤研究プログラム基本計画(平成14・02・25産局第4号)は、廃止。

平成15年3月10日付け健康寿命延伸のための医療福祉機器高度化プログラム基本計画制定。健康寿命延伸のための医療福祉機器高度化プログラム基本計画(平成14・02・05産局第2号)は、廃止。

平成16年2月3日付け制定。健康維持・増進のためのバイオテクノロジー基盤研究プログラム基本計画(平成15・01・23産局第4号)および健康寿命延伸のための医療福祉機器高度化プログラム基本計画(平成15・03・07産局第17号)は、本プログラム基本計画に統合することとし、廃止。

平成17年3月31日付け制定。健康安心プログラム基本計画(平成16・02・03産局第12号)は、廃止。

平成18年3月31日付け制定。健康安心プログラム基本計画(平成17・03・25産局第1号)は、廃止。

(9)平成19年4月2日付け制定。健康安心プログラム基本計画(平成18・03・31産局第2号))は、廃止。

(10)平成20年4月1日付け制定。健康安心プログラム基本計画(平成19・03・20産局第5号))は、廃止。

(11)平成21年4月1日付け制定。健康安心プログラム基本計画(平成20・03・25産局第6号)は廃止。

(12)平成22年4月1日付け制定。健康安心プログラム基本計画(平成21・03・26産局第3号)は廃止。

プロジェクト基本計画
(研究開発項目<2>「有用天然化合物の安定的な生産技術開発」を除く)

(健康安心イノベーションプログラム)
「ゲノム創薬加速化支援バイオ産業基盤技術開発」基本計画

バイオテクノロジー・医療技術部

1. 研究開発の目的・目標・内容

(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、個別化医療・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「健康安心イノベーションプログラム」の一環として実施する。

近年、製薬企業の研究開発費は増大の一途であるものの、承認される薬剤の数は増えていない。研究開発費の増大分は、主として臨床開発費に充てられ、探索研究に回せるリソースは相対的に減少している状況にあることもその理由の一つであるが、創薬ヒット化合物の発見につながる新たなスクリーニング手法の技術革新と技術実証の不足により、新規医薬品候補化合物の探索効率が大幅に低下している可能性も指摘されている。このため、最先端の知識と分析技術を組み合わせ、創薬開発のより早い段階から適切な医薬品候補物質の取得を可能とする、標的蛋白質の立体構造をベースとした *in silico* スクリーニングや探索対象となる化合物空間の拡大など、創薬の効率化に繋がる新たな技術の開発が求められている。

こうした状況のもと欧米における創薬研究では、タンパク質の立体構造に基づいた薬剤の開発による創薬研究の効率化への取り組みが進みつつある。このため、今後の医薬品産業の国際競争力の強化に向けて、タンパク質の立体構造解析技術や計算科学による創薬候補化合物探索技術等の基盤技術の構築が重要となっている。特に市販薬剤のターゲット（作用点）として、ほぼ 50% を占めている膜タンパク質は、生命現象の解明や創薬開発において重要な標的タンパク質である。また、膜タンパク質は細胞膜上における複合体形成や構造変化等により機能を発現していることから、細胞表層における膜タンパク質及びその複合体の立体構造解析技術や膜タンパク質とリガンドの相互作用解析技術、その構造情報に基づいた計算科学的解析技術を構築し、創薬ヒット候補化合物を効率よく絞り込むための基盤技術を開発することで、「タンパク質立体構造に指南された創薬戦略 (SGDD: Structure Guided Drug Development)」を実現し、創薬研究を効率化することが重要である。

他方、創薬ヒット化合物の探索については、近年、製薬企業を中心に、コンビナトリアルケミストリーによる化合物合成とそのライブラリーを用いたハイスループットスクリーニングが盛んに行われたが、必ずしも期待された成果が出ておらず、豊富な生物活性と大きなケミカルスペースを持った天然化合物が再注目されている。微生物は、天然化合物のリソースとして最も有望なものの一つであるが、培養抽出物として安定的かつ大量に取得できないなど、そのままではスクリーニングの効率化に様々な問題点がある。そこで、これまでに無い新しい骨格を持った化合物も含め、微生物の持つ天然化合物の生合成遺伝子を取り出して別の宿主菌株で発現させるなど、目的とする天然化合物を安定的かつ効率よく発現させる手法を開発することが重要である。

本プロジェクトは、ポストゲノム研究の産業利用が期待される「ゲノム創薬」を加速するため、以下の2つの技術開発を実施する。

〈1〉創薬加速に向けたタンパク質構造解析基盤技術開発

我が国の強みである世界最高レベルの膜タンパク質構造解析技術、タンパク質間相互作用解析技術、高度な計算科学技術等の研究ポテンシャルを最大限活用し、膜タンパク質及びその複合体の細胞表層上における立体構造解析、相互作用解析、計算科学を用いた創薬候補化合物の効率的な探索と更に実用性の高いリード化合物への展開等の創薬基盤技術の開発を行う。

〈2〉 有用天然化合物の安定的な生産技術開発

我が国の強みとする微生物ライブラリーや、天然物化学に対する知識基盤等を最大限に活用し、創薬リード化合物候補となりうる広いケミカルスペースを持った天然化合物を生産する生合成遺伝子とそれを応用した化合物生産を効率的に行う技術開発により、安定生産技術としての汎用性を見極める。

これにより、構造情報を基にした新しい観点からの画期的な新薬の創出、さらには膜タンパク質及びその複合体の機能、機構を説明する新しい概念の構築、天然物化学情報基盤の強化等により、ゲノム情報を活用した創薬技術の高度化による我が国バイオ産業の競争力強化、新産業の創出・育成を通じて、国際的優位性を確保することが期待できる他、個別化医療への応用とともに、健康維持・増進などを含めた幅広い分野への展開が期待できる。

(2) 研究開発の目標

〈1〉 創薬加速に向けたタンパク質構造解析基盤技術開発

標的とするタンパク質の「立体構造に指南された創薬戦略 (SGDD: Structure Guided Drug Development)」を実現し、創薬研究を効率化する基盤技術を確立する。

〈2〉 有用天然化合物の安定的な生産技術の開発

放線菌を対象に、新規の医薬品開発につながる有望な天然化合物の合成に必要な生合成遺伝子クラスターを体系的に取得し、安定生産に適したホスト放線菌、導入ユニットの構築及び導入技術を確立する。

(3) 研究開発内容

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、別紙の研究開発計画に基づき研究開発を実施する。

〈1〉 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 20 年度～平成 24 年度)

- 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
- 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
- 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

各項目は相互に連携し、GPCR (G タンパク質共役受容体) など創薬ターゲットとして重要な共通膜タンパク質に対して、①で構造データを、②で相互作用・機能データを取得し、③の動的特性、ドッキング解析に反映させるとともに、③で得られた結果を①、②にフィードバックしながら効率的なリード化合物スクリーニング手法に展開し、具体的な創薬実証研究に応用していく。

〈2〉 有用天然化合物の安定的な生産技術開発 (平成 23 年度～平成 24 年度)

2. 研究開発の実施方式

(1) 研究開発の実施体制

- ① 創薬加速に向けたタンパク質構造解析基盤技術開発は、経済産業省により、企業、民間研究機関、独立行政法人、大学等 (委託先から再委託された研究開発実施者を含む) から公募によって研究開発実施者が決定され、共同研究契約等を締結する研究体が構築され、平成19年度より委託して実施されている。平成20年度より、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」という。) が本事業を運営・管理するに当たっては、外部有識者から構成される技術評価委員会等を設置し、平成19年度の進捗状況を踏まえた事業内容・計画及び実施体制の妥当性についての審議に基づいた評価を行った上で委託して実施する。
- ② 本研究開発では、「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」、「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」、「高精度 in silico スクリーニング等のシミュレーション技術」を連携させながら一体的に進めることが必要であり、適切な実施体制を構築する。
- ③ 共同研究に参加する各研究開発グループの有する研究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、NEDOが指名する研究開発責任者 (プロジェクトリーダー) を研究開発項目毎に設置し、その下で効果的な研究開発を実施する。研究開発項目①「創薬加速

に向けたタンパク質構造解析基盤技術開発」については、国立大学法人京都大学大学院理学研究科教授 藤吉好則氏を研究開発責任者とする。研究開発項目②「有用天然化合物の安定的な生産技術開発」については、独立行政法人産業技術総合研究所バイオメディシナル情報研究センター 新家一男氏を研究開発責任者とする。

(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 は、経済産業省及びプロジェクトリーダー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 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

本研究開発の実施期間は、平成20年度から平成24年度までの5年間とする。

本研究開発は平成 19 年度に経済産業省が実施した「創薬加速に向けたタンパク質構造解析基盤技術開発」事業について、平成 20 年度より NEDO の事業として実施するものである。

4. 評価に関する事項

NEDO 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、成果の技術的意義並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 21 年度、事後評価を平成 25 年度に実施する。また、中間評価結果を踏まえ必要に応じプロジェクトの加速・縮小・中止等見直しを迅速に行う。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) 研究開発成果の取り扱い

① 共通基盤技術の形成に資する成果の普及

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

- a) 膜タンパク質の発現・精製、結晶化技術と極低温高分解能電子顕微鏡の高速化と精密化、及びそれらを駆使したタンパク質構造解析とそのデータベースなど、本技術開発を通じて得られる有用な情報。
- b) 膜タンパク質複合体における分子間相互作用解析法のノウハウ、本技術開発を通じて得られる有用な情報。
- c) 化合物データベース、in silicoスクリーニング用計算プログラム等、本技術開発を通じて得られる有用な情報。
- d) 有望な天然化合物の合成に必要な生合成遺伝子クラスターのライブラリーとそのデータベース、ホスト放線菌とユニット遺伝子導入技術、発現させた天然化合物。

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、知的基盤整備事業又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 知的財産権の帰属

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。

④ 成果の産業化

- a) 受託者は、本研究開発から得られる研究開発成果の産業面での着実な活用を図るため、本研究開発の終了後に実施すべき取り組みのあり方や研究開発成果の産業面での活用のビジネスモデルを立案するとともに、立案した取り組みのあり方とビジネスモデルについて、研究開発の進捗等を考慮して、研究開発期間中に必要な見直しを行う。
- b) 受託者は、上記a)で立案した取り組みとビジネスモデルを本研究開発終了後、実行に移し、成果の産業面での活用に努めるものとする。

(2) 基本計画の変更

NEDOは、研究開発内容の妥当性を確保するため、社会・経済状況、国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。

(4) 関連指針の厳守

当該プロジェクトの実施にあたっては、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」(平成13年度文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第1号)等、研究開発関連の指針を厳守しなければならない。また、本研究開発成果の事業化においては、「経済産業分野のうち個人情報を用いた事業分野における個人情報保護ガイドライン」(平成16・12・24製局第1号)を厳守しなければならない。

6. 基本計画の改訂履歴

- (1) 平成20年3月、制定。
- (2) 平成22年3月、中間評価で高い評価を受け、最終目標達成のため期間延長を行う事により、改訂。
- (3) 平成23年2月、新規技術開発の追加による研究開発項目の整理に伴い改訂。
- (4) 平成23年8月、研究開発項目<2>の研究開発責任者の決定により改訂。

(別紙) 研究開発計画

研究開発項目<1> 創薬加速に向けたタンパク質構造解析基盤技術開発

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」

1. 研究開発の必要性

日本における創薬研究を加速するには、多方向からの基礎的な研究が必要であるが、膜タンパク質及びその複合体の構造と機能解析は最も基礎に存在する必須の研究・開発課題であると考えられる。細胞の表層にあって、各種シグナルの伝達において中心的な機能を担う膜タンパク質の構造研究の重要性は、世界的にもますます強く認識されてきており、欧米では、タンパク質の立体構造に基づいた薬剤の開発が進もうとしている。この点に関して、我が国の不十分な現状を変えて「タンパク質立体構造に指南された創薬戦略」を進めるには、創薬分野においてその構造情報が必要とされている膜タンパク質などの構造を解析できる有力な技術の開発が不可欠である。

これまで NEDO で実施されてきた「生体高分子構造情報プロジェクト」での極低温電子顕微鏡などを用いた膜タンパク質構造解析法の先見性は、国内のみならず世界的にも認められつつある。このような高いポテンシャルを活かし、生理的に機能を発揮している膜タンパク質及びその複合体の生体内に近い状態での構造を効率よく解析出来る基盤技術を構築する必要がある。特に、解析が困難なヒトや哺乳類由来の膜タンパク質及びその複合体の構造解析技術を更に発展させて、創薬において非常にニーズの高い膜タンパク質及びその複合体の構造を解析することができる技術を開発し、実際にそれらの構造解析を行う必要がある。本研究開発項目では、研究開発項目①-2「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」と研究開発項目①-3「高精度 in silico スクリーニング等のシミュレーション技術」という重要な2つの研究分野に情報を供与するとともに、これらと密接に協力して創薬を加速する基盤技術を開発する。さらに、電子線とX線を用いた膜タンパク質などの構造解析技術の発展により、革新的かつ生物学的に重要な発見や膜タンパク質及びその複合体の機能、機構を説明できる新しい概念構築等によるイノベーションを実現することで、我が国のバイオ産業の競争力強化や新産業の創出に貢献することを目標とする。

2. 具体的な研究開発内容

(1) 膜タンパク質及びその複合体の構造解析に供する発現・精製、結晶化技術の開発

解析に必要な膜タンパク質等の発現・精製技術、2次元結晶化技術の開発を実施する。

①膜タンパク質及びその複合体の大量発現

ヒト等真核生物由来の膜タンパク質及びその複合体に関して、組み換え遺伝子技術と昆虫細胞等を用いた発現系の開発を進めて、解析に必要な膜タンパク質の発現・精製法の確立を行う。特に水チャンネル、イオンチャンネル、GPCR など、創薬分野から期待されている膜タンパク質の構造解析を目指して大量発現・精製の研究を進める。

②膜タンパク質及びその複合体を細胞内に局在させて発現する方法の開発

任意の膜タンパク質及びその複合体を細胞内に局在させて発現する方法など、立体構造解析を行うために必要な発現技術の開発を進める。

③解析に必要な膜タンパク質及びその複合体の精製・結晶化

解析が求められている膜タンパク質などの結晶化を行う。

(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

①電子線トモグラフィー用極低温電子顕微鏡の開発

細胞に存在する生体内に近い状態の構造を解析することを実現するために、電子線トモグラフィー用極低温電子顕微鏡の開発を行い、これを用いた分解能 50 Å 程度の解析を行う。

②2次元結晶化したヒト由来(発現系)の試料について、構造解析(分解能 2 Å を超える精度)を可能にする電子線結晶学用プログラムを開発し、水分子や脂質分子を直接観察できる高分解能での解析を行う。

③結晶化できない分子や複合体の構造解析を 8 Å の分解能で解析可能な単粒子解析用プログラム開発を行う。さらに、細胞に存在する自然な状態での膜タンパク質及びその複合体の解析のために、高分解能の電子線トモグラフィー用コンピュータープログラムの開発を行う。

④2次元結晶化用自動電子顕微鏡の開発

2次元結晶化条件の検査を従来に比べ2倍以上の効率で行うための、2次元結晶化条件検査用自動電子顕微鏡の開発を行う。これにより、2次元結晶を作製する速度を飛躍的に向上させ、構造解析の加速を図る。

(3) 電子顕微鏡とX線によるタンパク質構造解析

上記で開発した技術を用いた膜タンパク質、及びその複合体の構造解析を行う。X線結晶構造解析を用いて迅速に解析できるタンパク質複合体については、X線による構造解析を進める。3次元結晶化が困難な膜タンパク質の構造解析は電子線結晶学と単粒子解析を用いた構造解析を行い、細胞に存在する状態で電子線トモグラフィーの解析も行うことで、膜タンパク質及びその複合体の自然な状態の構造解析を目指す。

3. 達成目標

① 最終目標（平成24年度末）

細胞膜内での生体内に近い状態での膜タンパク質及びその複合体の立体構造を解析するため、以下の技術を確立する。また、これらの技術と既存の技術を活用し、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。

- a) 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次元構造解析する技術、細胞膜内において自然な構造の状態での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。
- b) 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）を確立する。
- c) a)、b)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確立する。

② 中間目標（平成21年度末）

細胞膜内での生体内に近い状態での膜タンパク質及びその複合体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。

- a) 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次元構造を解析する技術、細胞に存在する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。
- b) 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。
- c) a)、b)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。

研究開発項目<1> 創薬加速に向けたタンパク質構造解析基盤技術開発

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」

1. 研究開発の必要性

創薬標的タンパク質とリガンド分子との相互作用解析は、新規薬物の創製において重要な知見を与える。核磁気共鳴法（NMR）は生理的条件下でタンパク質など生体高分子の構造解析、相互作用解析が可能であるため、他の構造生物学的手法と比較し優位性があるものの、安定同位体を試料に取りこませ、かつ凝集のない状態で測定しなければならないなどの制約がある。そのため、必ずしも全ての標的タンパク質を NMR 測定に供することはできず、効率的な発現系の確立や変性状態からの巻き戻し法などが求められている。

さらに、いくつかの膜タンパク質は、細胞表層でリガンド分子のみならず、複数分子と複合体を形成し、機能発現していることが知られている。したがって、従来の可溶性膜タンパク質を対象として解析するのみではなく、細胞膜中における膜タンパク質複合体を保持した状態で、リガンド相互作用解析を行うことが可能であるならば、膜タンパク質の機能発現機構を解明でき、さらに新規作用機序に基づく創薬開発が期待される。

しかしながら、このような細胞表層、細胞自身など不均一超分子系における相互作用様式を NMR により研究する場合、適切な NMR 試料調製法、NMR 測定法が確立されていないことにより、十分な成果を挙げることができていない。

本研究開発項目では、上記課題を解決するため、以下の項目を実施する。

2. 具体的な研究開発内容

(1) 安定同位体標識タンパク質調製系の確立

タンパク質の安定同位体標識において、試料調製法を系統化し、効率的に目的のタンパク質に適した試料調製法を探索するシステムの構築を目指す。具体的には、1) 安定同位体標識が可能なタンパク質発現系を系統的に選別する方法の確立、2) 不溶性画分でのみ発現されるタンパク質についての系統的なタンパク質巻き戻し法の探索システムの確立、3) 得られたタンパク質（複合体）試料の溶液条件を検討し、NMR 測定に最適な溶液条件を高精度でかつ従来法に比べ 5 倍以上迅速に選別する手法を開発することにより、効率的な安定同位体標識タンパク質調製法の確立を行う。

(2) 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

構造解析へ適応可能なリガンドライブラリスクリーニングシステムなどの開発・高度化を進めるとともに、本システムに適応するため、及び結合力の弱いリガンド分子の標的タンパク質結合部位を同定するための原子レベルでの相互作用解析法を開発を行なうことにより、リガンドベースの創薬デザインを加速する情報を得るための技術開発を行う。また、本システムを疾患関連タンパク質複合体系に適用し、低分子リガンド及びリガンドタンパク質と標的タンパク質の相互作用解析を行い、合理的創薬開発に供する構造情報を取得する。

(3) 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

従来の膜タンパク質の構造生物学的研究では、膜タンパク質を可溶化剤により可溶化するなど、実際に膜タンパク質が機能する場とは異なる状態での解析が主流で、細胞表層に着目した研究は立ち遅れている。そこで、実際に細胞膜中で膜タンパク質が機能している状態を保持した、あるいはその状態を再構成した NMR 測定用試料作成法を開発する。

(4) 細胞膜複合体相互作用解析のための NMR 解析法の開発

細胞表層、細胞自身などを NMR 研究対象として取り上げるために、1) 高分子量超分子から高感度に精密な構造情報を取り出すこと、2) 高分子量化及び液相・固相混合試料の不均一な磁化率に伴う NMR 線幅の増大を抑えることの 2 点を克服する技術を開発する。具体的には、NMR 測定装置及び NMR 測定法の改良を行い、細胞表層に存在する膜タンパク質の相互作用様式が解明できる NMR 解析法の開発を行うと同時に、この手法の有効性を実証する。

3. 達成目標

① 最終目標（平成 24 年度末）

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、以下の技術を構築する。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 \sim μ M と結合力が弱いリガンド分子の結合構造の解析技術の確立を行う。
- 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を従来法に比べ3倍の高感度の解析技術を確立する。
- 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。

② 中間目標 (平成 21 年度末)

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 \sim μ M 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を従来法に比べ3倍の高感度の解析技術を開発する。

研究開発項目<1> 創薬加速に向けたタンパク質構造解析基盤技術開発

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」

1. 研究開発の必要性

近年、「ゲノム創薬」として医薬品のターゲットタンパク質をゲノム情報から同定し、疾病に対する全く新たなアプローチ法が提案されているものの、ターゲットタンパク質を制御する医薬品のスクリーニング・分子設計技術が進んでいないため、「ゲノム創薬」が必ずしも有効な手法とは一般に認知されていない。この問題を解決するためには、ターゲットタンパク質の精緻な立体構造を解明し、その分子機構を理解し、それを制御する医薬品開発を行う新たな技術が切望されている。

このため、我が国で開発された世界最高レベルの電子顕微鏡技術・相互作用界面構造解析技術から得られる有用な情報を活用し、in silico スクリーニングの精度及び高速性の向上を図る新たな計算アルゴリズムとプログラムを開発し、さらに、その技術の具体的な創薬開発への応用することで、開発した計算科学手法による創薬加速の効果を検証することが必要である。

また、データに基づくタンパク質の動的シミュレーション解析結果を、構造解析、相互作用解析にフィードバックし、タンパク質-タンパク質、リガンド、化合物相互作用、信号伝達におけるダイナミカルな現象に切り込み、新規知見を得て、スクリーニング、及び創薬ターゲット選択にも新しい展開をもたらすことも期待される。

2. 具体的な研究開発内容

(1) in silico ドッキング計算の高精度化

創薬プロセスにおける in silico ドッキング計算において、①タンパク質の動的性質を正しく評価するため、動的性質を抽出する手法の開発及び動的構造のデータベースの設計・試作を行い、②ドッキングのスコアの精度を高めるため、タンパク質及び低分子リガンドの動的構造、及び各種相互作用を考慮した複合体の構造予測法及び結合エネルギー算出法の開発を行う。

(2) 構造生理学アプローチによるタンパク質間相互作用解析

タンパク質は、タンパク質間の相互作用とそれに基づく超分子複合体として高度な生命現象を維持しているため、タンパク質間相互作用及び超分子複合体の構造情報まで含めた詳細な解析「構造インタラクトーム」に踏み込み、タンパク質間相互作用の阻害等の創薬において有用な機能を有するものの活性の維持等の観点から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低分子化合物等へ展開するため、ペプチドと同様あるいはそれ以上の強い結合性を有する非ペプチド性化合物（低分子化合物等）を探索・設計する新しい手法の開発を行う。

(3) 創薬開発への応用促進に向けた技術開発

計算の効率化と高速性が発揮できるアルゴリズムとプログラムの実装法の開発、専用ボードの利用、リガンド・データベースや計算結果を整理したデータベース等の開発を推進する。また、本開発研究のチーム間だけでなく、創薬メーカーと研究協力を行って具体的な創薬実証研究を実施する。また、上記開発するプログラムやデータベースを公開し、研究開発成果を広く社会に還元し、Web site から最新のプログラム、データ、情報を与えられる仕組みとする。

3. 達成目標

① 最終目標（平成 24 年度末）

高精度の in silico スクリーニングを実現するため、以下の技術を確立する。さらに、①、②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。

- 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、in silico スクリーニングの効率を従来法に比べ 10 倍程にあげる。
- 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。
- タンパク質間相互作用及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。

② 中間目標（平成 21 年度末）

高精度の *in silico* 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、①、②の技術との連携により、産業上有用な化合物を 5 個以上取得する。

- a) 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の開発し、*in silico* スクリーニングの効率を従来法に比べ 5 倍程にあげる。
- b) 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
- c) 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。

特許・文献・外部発表等リスト

【特許】

番号	出願者	出願番号	国内 外国 PCT	出願日	状態	名 称	発明者
1	独立行政法人 産業技術総合 研究所、社団法人 バイオ産業 情報化コンソ ーシアム	第 4184907 号	国内	2008/9/12	登録	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
2	The university of Tokyo	WO/2011/010715	PCT	2010/7/23	登録	Pr-Set7 阻害剤	Kodama Tatsuhiko, Tanaka Toshiya, Kawamura Takeshi, Wada Yoichiro, Sugiyama Akira, Fukunishi Yoshifumi

【文献（論文、総説等）】

1. S. Hayakawa, M. Mori, A. Okuta, A. Kamegawa, Y. Fujiyoshi, Y. Yoshiyama, K. Mitsuoka, K. Ishibashi, S. Sasaki, T. Hattori and S. Kuwabara. Neuromyelitis optica and anti-aquaporin-4 antibodies measured by an enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Neuroimmunol.* 196, 181-187, 2008
2. H. Suzuki, M. Kurooka, Y. Hiroaki, Y. Fujiyoshi and Y. Kaneda. Sendai virus F glycoprotein induces IL-6 production in dendritic cells in a fusion-independent manner. *FEBS Lett.* 582, 1325-1329, 2008
3. A. Oshima, K. Tani, Y. Hiroaki, Y. Fujiyoshi and G. E. Sosinsky. Projection Structure of a N-terminal Deletion Mutant of Connexin 26 Channel with Decreased Central Pore Density. *Cell Commun. Adhes.* 15, 85-93, 2008
4. T. Sakisaka, Y. Yamamoto, S. Mochida, M. Nakamura, K. Nishikawa, H. Ishizaki, M. Okamoto-Tanaka, J. Miyoshi, Y. Fujiyoshi, T. Manabe and Y. Takai. Dual inhibition of SNARE complex formation by tomosyn ensures controlled neurotransmitter release. *J. Cell Biol.* 183, 323-337, 2008
5. K. Iwasaki, N. Miyazaki, L. Hammar, Y. Zhu, T. Omura, B. Wu, F. Sjöborg, K. Yonekura, K. Murata, K. Namba, D. L. Caspar, Y. Fujiyoshi and R. H. Cheng. Pleomorphic configuration of the trimeric capsid proteins of *Rice dwarf virus* that allows formation of both the outer capsid and tubular crystals. *J. Mol. Biol.*, 383, 252-265, 2008
6. K. Mio, T. Ogura, T. Yamamoto, Y. Hiroaki, Y. Fujiyoshi, Y. Kubo and C. Sato. Reconstruction of the P2X₂ Receptor Reveals a Vase-Shaped Structure with Lateral Tunnels above the Membrane. *Structure.*, 17, 266-275, 2009
7. Y. Tanimura, Y. Hiroaki and Y. Fujiyoshi. Acetazolamide reversibly inhibits water conduction by aquaporin-4. *J. Struct. Biol.*, 166, 16-21, 2009
8. S. Maeda, S. Nakagawa, M. Suga, E. Yamashita, A. Oshima, Y. Fujiyoshi and T. Tsukihara. Structure of the connexin-26 gap junction channel at 3.5 Å resolution. *Nature*, 458, 597-602, 2009
9. Jegerschöld, C., Pawelzik, S. C., Purhonen, P., Bhakat, P., Gheorghe, K. R., Gyobu, N., Mitsuoka, K., Morgenstern, R., Jakobsson, P. J., Hebert, H. Structural basis for induced formation of the inflammatory mediator prostaglandin E₂. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 105, 11110-11115, 2008
10. Hayakawa, S., Mori, M., Okuta, A., Kamegawa, A., Fujiyoshi, Y., Yoshiyama, Y., Mitsuoka, K., Ishibashi, K., Sasaki, S., Hattori, T., Kuwabara, S. Neuromyelitis optica and anti-aquaporin-4 antibodies measured by an enzyme-linked immunosorbent assay. *J Neuroimmunol.* 196, 181-187, 2008

11. N. Adachi, M. Senda, R. Natsume, T. Senda and M. Horikoshi. Crystal structure of Methanococcus jannaschii TATA box-binding protein. *Genes Cells* 13, 1127-1140, 2008
12. M. Senda, S. Muto, M. Horikoshi and T. Senda. Effect of leucine-to-methionine substitutions on the diffraction quality of histone chaperone SET/TAF-I β /INHAT crystals. *Acta Crystallogr.* F64,960-965, 2008
13. Kimura Y. Morita S. Matsuo M. Ueda K. Mechanism of multidrug recognition by MDR1/ABCB1 *Cancer Science.* 98 (9), 1303-1310, 2007
14. Kimura Y, Kodan A, Matsuo M, Ueda K. Cholesterol fill-in model: mechanism for substrate recognition by ABC proteins. *J Bioenerg Biomembr* 39 (5-6), pp. 447-452, 2007
15. Hirai, T., Mitsuoka, K., Kidera, A. & Fujiyoshi, Y. Simulation of charge effects on density maps obtained by high-resolution electron crystallography. *J. Electron Microsc.* 56(4) 131-40, 2007
16. K. Tani, T. Mitsuma, Y. Hiroaki, A. Kamegawa, K. Nishikawa, Y. Tanimura and Y. Fujiyoshi. Mechanism of Aquaporin-4's Fast and Highly Selective Water Conduction and Proton Exclusion. *J. Mol. Biol.*, 389, 694-706, 2009
17. K. Abe, K. Tani, T. Nishizawa and Y. Fujiyoshi. Inter-subunit interaction of gastric H⁺,K⁺-ATPase prevents reverse reaction of the transport cycle. *EMBO J.*, 28, 1637-1643, 2009
18. Y. Kuwahara, S. Unzai, T. Nagata, Y. Hiroaki, H. Yokoyama, I. Matsui, T. Ikegami, Y. Fujiyoshi and H. Hiroaki. Unusual thermal disassembly of the SPFH domain oligomer from *Pyrococcus horikoshii*. *Biophys. J.*, 97, 2034-2043, 2009
19. K. Noma, K. Kimura, K. Minatohara, H. Nakashima, Y. Nagao, A. Mizoguchi and Y. Fujiyoshi. Triple N-Glycosylation in the Long S5-P Loop Regulates the Activation and Trafficking of the Kv12.2 Potassium Channel. *J. Biol. Chem.*, 284., 33139-33150, 2009
20. A. Inutsuka, M. Goda and Y. Fujiyoshi. Calyculin A-induced neurite retraction is critically dependent on actomyosin activation but not on polymerization state of microtubules. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 390, 1160-1166, 2009
21. K. Irie, K. Kitagawa, H. Nagura, T. Imai, T. Shimomura and Y. Fujiyoshi. Comparative study of the gating motif and C-type inactivation in prokaryotic voltage-gated sodium channels. *J. Biol. Chem.*, 285, 3685-3694, 2010
22. K. Abe, K. Tani and Y. Fujiyoshi. Structural and functional characterization of H⁺,K⁺-ATPase with bound fluorinated phosphate analogs. *J. Struct. Biol.*, 170, 60-68, 2010
23. Kanno, R., Koike-Takeshita, A., Yokoyama, K., Taguchi, H., Mitsuoka, K. Cryo-EM structure of the native GroEL-GroES complex from thermus thermophilus encapsulating substrate inside the cavity. *Structure.* 17, 287-293, 2009
24. Y. Hayashi, T. Senda, N. Sano and M. Horikoshi. Theoretical framework for the histone modification network: modifications in the unstructured histone tails form a scale-free network. *Genes Cells.*, 14, 789-806, 2009
25. T. Senda, M. Senda, S. Kimura and T. Ishida. Redox control of protein conformation in flavoproteins. *Antioxid. Redox Signal.* 11, 1741-1766, 2009
26. Y. Hayashi, T. Senda, N. Sano and M. Horikoshi. Theoretical framework for the histone modification network: modifications in the unstructured histone tails form a robust scale-free network. *Genes Cells*, 14, 789-806, 2009
27. K. Sugimoto, Y. Yamamoto, S. Antoni, M. Senda, D. Kasai, E. Masai, M. Fukuda and T. Senda. Crystallization and preliminary crystallographic analysis of gallate dioxygenase DesB from *Sphingobium* sp. SYK-6. *Acta Crystallogr.* F65, 1171-1174, 2009
28. M. Senda, T. Hatta, K. Kimbara and T. Senda. Crystallization and preliminary crystallographic analysis of manganese(II)-dependent 2,3-dihydroxybiphenyl 1,2-dioxygenase from *Bacillus* sp. JF8. *Acta Crystallogr.* F66, 282-285, 2010
29. Hozoji, M., Kimura, Y., Kioka, N. and Ueda, K. Formation of two intramolecular disulfide bonds is necessary for apoA-I-dependent cholesterol efflux mediated by ABCA1. *J. Biol. Chem.* 284, 11293 - 11300, 2009
30. Nagao, K. Zhao, Y., Takahashi, K., Kimura, Y., and Ueda, K. Sodium taurocholate-dependent lipid efflux by ABCA1-Effects of W590S mutation on lipid translocation and apoA-I dissociation. *J. Lipid Res.* 50, 1165-1172, 2009
31. Hirai T & Subramaniam S. Protein conformational changes in the bacteriorhodopsin photocycle: comparison of findings from electron and X-ray crystallographic analyses. *PLoS ONE* 4(6): e5769, 2009
32. Yamaguchi T, Fujii T, Abe Y, Hirai T, Kang D, Namba K, Hamasaki N & Mitsuoka K. Helical image reconstruction of the outward-open human erythrocyte band 3 membrane domain in tubular crystals. *J. Struct. Biol.* 169: 406-412, 2009

33. Hirai T, Lanyi J K & Subramaniam S. Structural snapshots of conformational changes in a seven-helix membrane protein: lessons from bacteriorhodopsin. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 19(4): 433-439, 2009
34. Y. Kuroda, M. Kitada, S. Wakao, K. Nishikawa, Y. Tanimura, H. Makinoshima, M. Goda, H. Akashi, A. Inutsuka, A. Niwa, T. Shigemoto, Y. Nabeshima, T. Nakahata, Y. Nabeshima, Y. Fujiyoshi and M. Dezawa. Unique multipotent cells in adult human mesenchymal cell populations. *PNAS*, 107, 8639-8643, 2010
35. H. Nagura, K. Irie, T. Imai, T. Simomura, T. Hige and Y. Fujiyoshi. Evidence for lateral mobility of voltage sensors in prokaryotic voltage-gated sodium channels. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 399, 341-346, 2010
36. D. Matsuse, M. Kitada, M. Kohama, K. Nishikawa, H. Makinoshima, S. Wakao, Y. Fujiyoshi, T. Heike, T. Nakahata, H. Akutsu, A. Umezawa, H. Harigae, J. Kira and M. Dezawa. Human Umbilical Cord-Derived Mesenchymal Stromal Cells Differentiate into Functional Schwann Cells that Sustain Peripheral Nerve Regeneration. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 69, 973-985, 2010
37. T. Mitsuma, K. Tani, Y. Hiroaki, A. Kamegawa, H. Suzuki, H. Hibino, Y. Kurachi and Y. Fujiyoshi. Influence of the Cytoplasmic Domains of Aquaporin-4 on Water Conduction and Array Formation. *J. Mol. Biol.*, 402, 669-681, 2010
38. A. Oshima, K. Tani, M. M. Toloue, Y. Hiroaki, A. Smock, S. Inukai, A. Cone, B. J. Nicholson, G. E. Sosinsky and Y. Fujiyoshi. Asymmetric configurations and N-terminal rearrangements in connexin26 gap junction channels. *J. Mol. Biol.*, 405, 724-735, 2011
39. K. Abe, K. Tani and Y. Fujiyoshi. Conformational rearrangement of gastric H⁺,K⁺-ATPase induced by an acid suppressant. *Nature Commun.*, 2, 155 pp1-7, 2011
40. T. Simomura, K. Irie, H. Nagura, T. Imai and Y. Fujiyoshi. Arrangement and mobility of the voltage sensor domain in prokaryotic voltage-gated sodium channels. *J. Biol. Chem.*, 286, 7409-7417, 2011
41. Mitsuoka, K. Obtaining high-resolution images of biological macromolecules by using a cryo-electron microscope with a liquid-helium cooled stage. *Micron* 42, 100-106, 2011
42. Yamaguchi, T., Fujii, T., Abe, Y., Hirai, T., Kang, D., Namba, K., Hamasaki, N., and Mitsuoka, K. Helical image reconstruction of the outward-open human erythrocyte band 3 membrane domain in tubular crystals. *J Struct Biol.* 169, 406-412, 2010
43. Y. Akai, N. Adachi, Y. Hayashi, M. Eitoku, N. Sano, R. Natsume, N. Kudo, M. Tanokura, T. Senda and M. Horikoshi. Structure of the histone chaperone CIA/ASF1-double bromodomain complex linking histone modifications and site-specific histone eviction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 107, 8153-8158, 2010
44. Z. Prokop, Y. Sato, J. Brezovsky, T. Mozga, R. Chaloupkova, T. Koudelakova, P. Jerabek, V. Stepankova, R. Natsume, J. G. E. van Leeuwen, D. B. Janssen, J. Florian, Y. Nagata, T. Senda and J. Damborsky. Enantioselectivity of haloalkane dehalogenases and its modulation by surface loop engineering. *Angew. Chem. Int.* 49, 6111-6115, 2010
45. N. Kamimura, K. Takamura, H. Hara, D. Kasai, R. Natsume, T. Senda, Y. Katayama, M. Fukuda and E. Masai. Regulatory system of the protocatechuate 4,5-cleavage pathway genes essential for lignin downstream catabolism. *J. Bacteriol.* 192, 3394-3405, 2010
46. Mio K, Mio M, Arisaka F, Sato M, Sato C. The C-terminal coiled-coil of the bacterial voltage-gated sodium channel NaChBac is not essential for tetramer formation, but stabilizes subunit-to-subunit interactions. *Prog Biophys Mol Biol.* 103(1):111-21, 2010.
47. Yap ML, Mio K, Ali S, Minton A, Kanamaru S, Arisaka F. Sequential assembly of the wedge of the baseplate of phage T4 in the presence and absence of gp11 as monitored by analytical ultracentrifugation. *Macromol Biosci.* 10(7):808-13, 2010
48. Mio K, Maruyama Y, Ogura T, Kawata M, Moriya T, Mio M, Sato C. Single particle reconstruction of membrane proteins: a tool for understanding the 3D structure of disease-related macromolecules. *Prog Biophys Mol Biol.* 103(1):122-30, 2010
49. Nishiyama H, Suga M, Ogura T, Maruyama Y, Koizumi M, Mio K, Kitamura S, Sato C. Atmospheric scanning electron microscope observes cells and tissues in open medium through silicon nitride film. *J Struct Biol.* 169(3):438-49, 2010
50. Yukutake Y. and Yasui M. Regulation of water permeability through aquaporin-4. *Neuroscience.* 168(4): 885-91, 2010
51. Hirano Y, Okimoto N, Yasuoka K, Taiji M, Suematsu M. and Yasui M. Molecular Mechanisms How Mercury Inhibits Water Permeation of Aquaporin-1: Understanding by Molecular Dynamics Simulation. *Biophys J.* 21; 98(8): 1512-9, 2010
52. Yamaguchi T, Ikeda Y, Abe Y, Kang D, Hamasaki N & Hirai T. Structure of membrane domain of human erythrocyte anion exchanger 1 revealed by electron crystallography. *J. Mol. Biol.* 397: 179-189, 2010

53. K. Yakata, K. Tani and Y. Fujiyoshi. Water permeability and characterization of aquaporin-11. *J. Struct. Biol.*, 174, 315-320, 2011
54. Y. Ohta, K. Nishikawa, Y. Hiroaki and Y. Fujiyoshi. Electron tomographic analysis of gap junctions in the lateral giant fibers of crayfish. *J. Struct. Biol.*, 175, 49-61, 2011
55. M. Goda, M. Ohata, H. Ikoma, Y. Fujiyoshi, M. Sugimoto and R. Fujii. Integumental reddish-violet coloration owing to novel dichromatic chromatophores in the teleost fish, *Pseudochromis diadema*. *Pigment Cell Melanoma Res.*, pp11-4, 2011
56. M. Senda, H. Tanaka, T. Ishida, K. Horiike and T. Senda. Crystallization and preliminary crystallographic analysis of D-serine dehydratase from chicken kidney. *Acta Crystallogr.* F67, 147-149, 2011
57. H. Tanaka, M. Senda, N. Venugopalan, A. Yamamoto, T. Senda, T. Ishida and K. Horiike. Crystal structure of a zinc-dependent D-serine dehydratase from chicken kidney. *J. Biol. Chem.* 286, 27548-27558, 2011
58. K. Ishikawa, T. Ohsumi, S. Tada, R. Natsume, L. R. Kundu, N. Nozaki, T. Senda, T. Enomoto, M. Horikoshi and M. Seki. Roles of histone chaperone CIA/Asf1 in nascent DNA elongation during nucleosome replication. *Genes Cells.* 16, 1050-1062, 2011
59. Gipson, B. R., Masiel, D. J., Browning, N. D., Spence, J., Mitsuoka, K., and Stahlberg, H. Automatic recovery of missing amplitudes and phases in tilt-limited electron crystallography of two-dimensional crystals. *Phys. Rev. E* 84, 011916, 2011
60. Sawada, N., Nagahara, N., Arisaka, F., Mitsuoka, K., and Minami, M. Redox and metal-regulated oligomeric state for human porphobilinogen synthase activation. *Amino Acids.* 41, 173-180, 2011
61. Tamakoshi, M., Murakami, A., Sugisawa, M., Tsuneizumi, K., Takeda, S., Saheki, T., Izumi, T., Akiba, T., Mitsuoka, K., Toh, H., Yamashita, A., Arisaka, F., Hattori, M., Oshima, T., Yamagishi, A. Genomic and proteomic characterization of the large Myoviridae bacteriophage ϕ TMA of the extreme thermophile *Thermus thermophilus*. *Bacteriophage* 1, 152-164, 2011
62. Miyashita H, Maruyama Y, Isshiki H, Osawa S, Ogura T, Mio K, Sato C, Tomita T, Iwatsubo T. Three-dimensional structure of the signal peptide peptidase. *J Biol Chem.* 286:26188-97, 2011
63. Venturi E, Mio K, Nishi M, Ogura T, Moriya T, Pitt SJ, Okuda K, Kakizawa S, Sitsapesan R, Sato C, Takeshima H. Mitsugumin 23 forms a massive bowl-shaped assembly and cation-conducting channel. *Biochemistry.* 50:2623-32, 2011
64. Murai T, Maruyama Y, Mio K, Nishiyama H, Suga M, Sato C. Low Cholesterol Triggers Membrane Microdomain-dependent CD44 Shedding and Suppresses Tumor Cell Migration. *J Biol Chem.* 286(3):1999-2007, 2011
65. Ibata K, Takimoto S, Morisaku T, Miyawaki A. and Yasui M. Analysis of Aquaporin-Mediated Diffusional Water Permeability by Coherent Anti-Stokes Raman Scattering Microscopy. *Biophys J.* 101(9): 2277-2283, 2011
66. T Hirai, N Hamasaki, T Yamaguchi and Y Ikeda. *Biochemistry and Cell Biology*, 89(2):148-156, 2011
67. K. Irie, T. Shimomura and Y. Fujiyoshi. The carboxy-terminal helical bundle of the tetrameric prokaryotic sodium channel accelerates the inactivation rate. *Nature Commun.*, 3, 793 pp1-8, 2012
68. N. Unwin and Y. Fujiyoshi. Gating movement of acetylcholine receptor caught by plunge-freezing. *J. Mol. Biol.*, 422, 617-634, 2012
69. K. Abe, K. Tani T. Friedrich and Y. Fujiyoshi. Cryo-EM structure of gastric H⁺,K⁺-ATPase with a single occupied cation binding site. *PNAS*, 109, 18401-18406, 2012
70. H. Suzuki, Y Ito, Y Yamazaki, K Mineta, M Uji, K. Abe, K. Tani, Y. Fujiyoshi and_ S. Tsukita. The four-transmembrane protein IP39 of *Euglena* forms strand by a trimeric unit repeat. *Nature Commun.*, (in press)
71. A. Oshima, T Matsuzawa, K. Nishikawa and Y. Fujiyoshi. Oligomeric structure and functional characterization of *C. elegans* innexin-6 gap junction channels. *J. Biol. Chem.* (in press)
72. M. Goda, Y. Fujiyoshi, M. Sugimoto and R. Fujii. Novel dichromatic chromatophores in the integument of mandarin fish *Synchiropus splendidus*. *Biol. Bull.*224, 14-17, 2013
73. K. Mintoehara, S. Ichikawa, T. Seki, Y. Fujiyoshi and T. Doi. Ligand binding of PDZ domains has various roles in the synaptic clustering of SAP102 and PSD-95. *Neuroscience letters* 533, 44-49, 2013
74. K. Tani, C. P. Arthur, M. Tamakoshi, K. Yokoyama, K. Mitsuoka, Y. Fujiyoshi and C. Gerle. Visualization of two distinct states of disassembly in the bacterial V-ATPase from *Thermus thermophilus*. *Microscopy* 62, (in press), 2013
75. M. Senda, A. Yamamoto, H. Tanaka, T. Ishida, K. Horiike and T. Senda. Crystallization and preliminary crystallographic analysis of D-aspartate oxidase from porcine kidney. *Acta Crystallogr* F68, 644-646, 2012

76. T. Hayashi, M. Senda, H. Morohashi, H. Higashi, M. Horio, L. Nagase, D. Sasaya, T. Shimizu, N. Venugopalan, H. Kumeta, N. Noda, F. Inagaki, T. Senda and M. Hatakeyama. Tertiary structure and functional analysis of the *Helicobacter pylori* CagA oncoprotein. *Cell Host Microbe*, 12, 20-33, 2012
77. Y. Maruyama, T. Ebihara, H. Nishiyama, Y. Konyuba, M. Senda, T. Numaga-Tomita, T. Senda, M. Suga and C. Sato. Direct Observation of Protein Microcrystals in Crystallization Buffer by Atmospheric Scanning Electron Microscopy. *Int. J. Mol. Sci.* 13, 10553-10567, 2012
78. S. Aizawa, M. Senda, A. Harada, N. Maruyama, T. Ishida, T. Aigaki, A. Ishigami and T. Senda. Structural basis of the γ -lactone-ring formation in ascorbic acid biosynthesis by the senescence maker protein-30/gluconolactonase. *PLoS One* 8, e53706, 2013
79. Tokunaga F, Nishimasu H, Ishitani R, Goto E, Noguchi T, Mio K, Kamei K, Ma A, Iwai K, Nureki O. Specific recognition of linear polyubiquitin by A20 zinc finger 7 is involved in NF- κ B regulation. *EMBO J.* 31:3856-70, 2012
80. Mitsuoka K. Processing of electron diffraction patterns with the XDP program. *Methods Mol. Biol.* 955, 539-550, 2013
81. Novel Convergence-Oriented Approach for Evaluation and Optimization of Workflow in Single Particle 2D Averaging of Electron Microscope Images. Moriya T, Mio K, Sato C. *Microscopy* (in press)
82. Nagao K, Takahashi K, Azuma Y, Takada M, Kimura Y, Matsuo M, Kioka N, Ueda K. ATP hydrolysis-dependent conformational changes in the extracellular domain of ABCA1 are associated with apoA-I binding. *J. Lipid Res.* 53,126-36, 2012
83. Nagao K, Kimura Y, Ueda K. Lysine residues of ABCA1 are required for the interaction with apoA-I. *Biochim Biophys Acta* 1821,530-5, 2012
84. Hirayama H, Kimura Y, Kioka N, Matsuo M, Ueda K. ATPase activity of human ABCG1 is stimulated by cholesterol and sphingomyelin. *J. Lipid Res.* 54, 496-502, 2013
85. Ishigami M, Tominaga Y, Nagao K, Kimura Y, Matsuo M, Kioka N, Ueda K. ATPase activity of nucleotide binding domains of human MDR3 in the context of MDR1. *Biochim Biophys Acta* 1831(4):683-90, 2013
86. Hidehito Takayama & Shigetoshi Sugio. Functional expression of milligram quantities of the synthetic human serotonin transporter gene in a tetracycline-inducible HEK293 cell line. *Protein Expression and Purification* 76, 211-220, 2011
87. T. Nakao, A. Naoi, N. Kawahara, K. Hirase. Mutation of the GABA receptor associated with fipronil resistance in the whitebacked planthopper, *Sogatella furcifera*. *Pestic. Biochem. Physiol.* 97, 262–266 , 2010
88. T. Nakao, A. Kawase, A. Kinoshita, R. Abe, M. Hama, N. Kawahara, K. Hirase. The A2'N Mutation of the RDL GABA receptor conferring fipronil resistance in *Laodelphax striatellus* (Homoptera: Delphacidae). *J. Econ. Entomol.* 104, 646–652, 2011
89. T. Nakao, M. Hama, N. Kawahara, K. Hirase, K. Fipronil resistance in *Sogatella furcifera*: Molecular cloning and functional expression of wild-type and mutant RDL GABA receptor subunit. *J. Pestic.Sci.* 37, 37–44, 2012
90. T. Nakao, A. Naoi, M. Hama, N. Kawahara, K. Hirase. Concentration- dependent effects of GABA on insensitivity to fipronil from fipronil-resistant *Oulema oryzae* Kuwayama (Coleoptera: Chrysomelidae) *J. Econ. Entomol.* 105, 1781-1782, 2012
91. T. Nakao, S. Banba, M. Nomura, K. Hirase. Meta-diamide insecticides acting on distinct sites of RDL GABA receptor from those for conventional noncompetitive antagonists. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 43, 366-375, 2012
92. K.Mio, M.Mio, F.Arisaka, M.Sato, C.Sato. The C-terminal coiled-coil of the bacterial voltage-gated sodium channel NaChBac is not essential for tetramer formation, but stabilizes subunit-to-subunit interactions. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 103,111-121, 2010
93. K.Mio, Y.Maruyama, T.Ogura, M.Kawata, T.Moriya, M.Mio, C.Sato. Single particle reconstruction of membrane proteins : A tool for understanding the 3D structure of disease-related macromolecules. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 103,122-130,2010
94. H.Miyashita, Y.Maruyama, H.Isshiki,S.Osawa, T.Ogura, K.Mio,C.Sato, T.Tomita, T.Iwatsubo. Three-dimensional structure of the signal peptide peptidase. *J. Biol. Chem.* 286(29), 26188-26197, 2011
95. E.Venturi, K.Mio, M.Nishi, T.Ogura, T.Moriya, S.J.Pitt, K.Okuda, S.Kakizawa, R.Sitsapesan, C.Sato, H.Takeshima. Mitsugumin. 23 Forms a Massive Bowl-Shaped Assembly and anion-Conducting Channel. *Biochemistry.* 50(13),2623-2632, 2011
96. Kimura Y. Morita S. Matsuo M. Ueda K. Mechanism of multidrug recognition by MDR1/ABCB1. *Cancer Science* 98 (9), 1303-1310, 2007

97. Kimura Y, Kodan A, Matsuo M, Ueda K. Cholesterol fill-in model: mechanism for substrate recognition by ABC proteins. *J Bioenerg Biomembr* 39 (5-6), pp. 447-452, 2007
98. 木村泰久、構造解析が明らかにした ABC タンパク質の基質輸送メカニズム、ファルマシア、44、76-77, 2008
99. Hozoji, M., Kimura, Y., Kioka, N. and Ueda, K. Formation of two intramolecular disulfide bonds is necessary for apoA-I-dependent cholesterol efflux mediated by ABCA1. *J. Biol. Chem.* 284, 11293 – 11300, 2009
100. Nagao, K. Zhao, Y., Takahashi, K., Kimura, Y., and Ueda, K. Sodium taurocholate-dependent lipid efflux by ABCA1-Effects of W590S mutation on lipid translocation and apoA-I dissociation. *J. Lipid Res.* 50, 1165-1172, 2009
101. 木村泰久、植田和光、ABC タンパク質の機能とメカニズム、薬物トランスポーター活用ライブラリー 122-6 頁, “MDR1” 127-30 頁, 2009
102. Nagao K, Kimura Y, Mastuo M, Ueda K. Lipid outward translocation by ABC proteins. *FEBS Lett.* 584, 2717-23, 2010
103. Nagao K, Takahashi K, Azuma Y, Takada M, Kimura Y, Matsuo M, Kioka N, Ueda K. ATP hydrolysis-dependent conformational changes in the extracellular domain of ABCA1 are associated with apoA-I binding. *J. Lipid Res.* 53,126-36, 2012
104. Nagao K, Kimura Y, Ueda K. Lysine residues of ABCA1 are required for the interaction with apoA-I. *Biochim Biophys Acta.* 1821,530-5, 2012
105. Hirai, T., Mitsuoka, K., Kidera, A. & Fujiyoshi, Y. Simulation of charge effects on density maps obtained by high-resolution electron crystallography. *J. Electron Microsc.* 56(4) 131-40, 2007
106. Hirai T & Subramaniam S. Protein conformational changes in the bacteriorhodopsin photocycle: comparison of findings from electron and X-ray crystallographic analyses. *PLoS ONE* 4(6): e5769, 2009
107. Yamaguchi T, Fujii T, Abe Y, Hirai T, Kang D, Namba K, Hamasaki N & Mitsuoka K. Helical image reconstruction of the outward-open human erythrocyte band 3 membrane domain intubular crystals. *J. Struct. Biol.* 169: 406-412, 2009
108. Yamaguchi T, Ikeda Y, Abe Y, Kang D, Hamasaki N & Hirai T. Structure of membrane domain of human erythrocyte anion exchanger 1 revealed by electron crystallography. *J. Mol.Biol.* 397: 179-189, 2010
109. 平井照久、MF S 輸送体の構造とその輸送機構、生物物理 47(5) 317-322 , 2007
110. Hirai T, Lanyi J K & Subramaniam S. Structural snapshots of conformational changes in a seven-helix membrane protein: lessons from bacteriorhodopsin. *Curr. Opin. Struct.Biol.* 19(4): 433-439, 2009
111. T Hirai, N Hamasaki, T Yamaguchi and Y Ikeda. *Biochemistry and Cell Biology* 89(2):148-156, 2011
112. 平井照久、電子線結晶学による膜輸送タンパク質の構造と動作機構の観察、ナノイメージング エヌ・ティー・エス, 2008
113. Ibata K, Takimoto S, Morisaku T, Miyawaki A. and Yasui M. Analysis of Aquaporin-Mediated Diffusional Water Permeability by Coherent Anti-Stokes Raman Scattering Microscopy. *Biophys J.* 101(9): 2277-2283, 2011
114. Yukutake Y. and Yasui M. Regulation of water permeability through aquaporin-4, *Neuroscience.* 168(4): 885-91, 2010
115. Hirano Y, Okimoto N, Yasuoka K, Taiji M, Suematsu M. and Yasui M. Molecular Mechanisms How Mercury Inhibits Water Permeation of Aquaporin-1: Understanding by Molecular Dynamics Simulation. *Biophys J.* 21; 98(8): 1512-9, 2010
116. Keisuke Maenuma, Masayoshi Sakakura, Kaori Denda-Nagai, Makoto Tsuiji, Ichio Shimada, Sachiko Nakamura-Tsuruta, Jun Hirabayashi, Nicolai V. Bovin and Tatsuro Irimura Sarawut Oo-puthinan. The amino acids involved in the distinct carbohydrate specificities between macrophage galactose-type C-type lectins 1 and 2 (CD301a and b) of mice. *Biochim. Biophys. Acta.* 1780, 89-100, 2008
117. Shunsuke Igarashi, Masanori Osawa, Koh Takeuchi, Shin-ichiro Ozawa, and Ichio Shimada. Amino acid selective cross-saturation method for identification of proximal residue pairs in a protein-protein complex. *J. Am. Chem. Soc.* 130, 12168-12176, 2008
118. Masayoshi Sakakura, Sarawut Oo-Puthinan, Chifumi Moriyama, Tomomi Kimura, Jun Moriya, Tatsuro Irimura, and Ichio Shimada. Carbohydrate binding mechanism of the macrophage galactose-type C-type lectin 1 revealed by saturation transfer experiments. *J. Biol. Chem.* 283, 33665-33673, 2008
119. Kazuki N. Sugahara, Takako Hirata, Toshiyuki Tanaka, Shinji Ogino, Mitsuhiro Takeda, Hiroaki Terasawa, Ichio Shimada, Jun-ichi Tamura, Gerdy B. ten Dam, Toin H. van Kuppevelt, and Masayuki Miyasaka. Chondroitin sulfate E fragments enhance CD44 cleavage and CD44-dependent motility in tumor cells. *Cancer Res.* 68, 7191-7199, 2008
120. Toshihiko Sugiki, Ichio Shimada, and Hideo Takahashi. Stable isotope labeling of protein by *Kluyveromyces lactis* for NMR study *J. Biomol. NMR* 42, 159-162, 2008

121. Toshihiko Sugiki, Chie Yoshiura, Yutaka Kofuku, Takumi Ueda, Ichio Shimada and Hideo Takahashi. A High-throughput Screening of Optimal Solution Conditions for Structural Biological Studies with Fluorescence Correlation Spectroscopy. *Protein Sci.* 18, 1115-20, 2009
122. Kozue Kato-Takagaki, Yumiko Mizukoshi, Yoshitaka Yoshizawa, Daisuke Akazawa, Yuichi Torii, Katsuki Ono, Ryuji Tanimura, Ichio Shimada, and Hideo Takahashi. Structural and Interaction analysis of glycoprotein VI-binding peptide selected from phage display library. *J. Biol. Chem.* 284, 10720-7, 2009
123. Mariko Yokogawa, Takahiro Muramatsu, Koh Takeuchi, Masanori Osawa, and Ichio Shimada. Backbone resonance assignments for the cytoplasmic regions of G protein-activated inwardly rectifying potassium channel 1 (GIRK1). *Biomolecular NMR Assignments*, 3, 125-128, 2009
124. Jun Moriya, Masayoshi Sakakura, Yuji Tokunaga, R. Scott Prosser, Ichio Shimada. An NMR Method for the Determination of Protein Binding Interfaces using TEMPOL-Induced Chemical Shift Perturbations. *Biochim. Biophys. Acta*, 1790, 1368-76, 2009
125. Shingo Nakada, Masayoshi Sakakura, Hideo Takahashi, Suguru Okuda, Hajime Tokuda & Ichio Shimada. Structural investigation of the interaction between the periplasmic chaperone LolA and the outer membrane receptor LolB using NMR. *J. Biol. Chem.* 284, 24634-43, 2009
126. Shinji Ogino, Satoshi Kubo, Ryo Umemoto, Shuxian Huang, Noritaka Nishida, Ichio Shimada. Observation of NMR signals from proteins introduced into living mammalian cells by reversible membrane permeabilization using a pore-forming toxin, Streptolysin O. *J. Am. Chem. Soc.* 131, 10834-5, 2009
127. Masanori Osawa, Mariko Yokogawa, Takahiro Muramatsu, Tomomi Kimura, Yoko Mase, and Ichio Shimada. potassium channel. *J. Biol. Chem.* 284, 26117-26, 2009
128. Ichio Shimada, Takumi Ueda, Masahiko Matsumoto, Masayoshi Sakakura, Masanori Osawa, Koh Takeuchi, Noritaka Nishida, Hideo Takahashi. "Cross-saturation and transferred cross-saturation experiments" *Prog. Nuc. Magn. Reson. Spect.* 54, 123-140, 2009
129. 西田紀貴、嶋田一夫、コラーゲン結合タンパク質を介した生命プロセスの活性化機構、生化学, 80, 483-92, 2008
130. 松本昌彦、上田卓見、嶋田一夫、NMR によるソフトな分子間相互作用解析法の開発と光合成明反応電子移動タンパク質間相互作用への応用、生化学 80, 959-71, 2008
131. 西田紀貴、嶋田一夫、不溶性の細胞外マトリックスとの相互作用を解明する新しい NMR 測定法、生体の科学, 59, 358-59, 2008
132. 高橋栄夫、嶋田一夫、創薬開発における NMR 法の活用“実験医学増刊・分子標的薬開発への新たな挑戦、羊土社, 27, 771-776, 2009
133. Ichio Shimada, Takumi Ueda, Masahiko Matsumoto, Masayoshi Sakakura, Masanori Osawa, Koh Takeuchi, Noritaka Nishida, Hideo Takahashi. Cross-saturation and transferred cross-saturation experiments. *Biological Studies with Fluorescence Correlation Spectroscopy. Prog. Nuc. Magn. Reson. Spect.* 54, 123-140.2009
134. Toshihiko Sugiki, Chie Yoshiura, Yutaka Kofuku, Takumi Ueda, Ichio Shimada and Hideo Takahashi. A High-throughput Screening of Optimal Solution Conditions for Structural. *Protein Sci.* 18, 1115-20, 2009
135. Kozue Kato-Takagaki, Yumiko Mizukoshi, Yoshitaka Yoshizawa, Daisuke Akazawa, Yuichi Torii, Katsuki Ono, Ryuji Tanimura, Ichio Shimada, and Hideo Takahashi. Structural and Interaction analysis of glycoprotein VI-binding peptide selected from phage display library. *J. Biol. Chem.* 284, 10720-7.2009
136. Mariko Yokogawa¹, Takahiro Muramatsu¹, Koh Takeuchi¹, Masanori Osawa¹, and Ichio Shimada. Backbone resonance assignments for the cytoplasmic regions of G protein-activated inwardly rectifying potassium channel 1 (GIRK1). *Biomolecular NMR Assignments*, 3, 125-128. 2009
137. Jun Moriya, Masayoshi Sakakura, Yuji Tokunaga, R. Scott Prosser, Ichio Shimada. An NMR Method for the Determination of Protein Binding Interfaces using An NMR Method for the Determination of Protein Binding Interfaces using TEMPOL-Induced Chemical Shift Perturbations. *Biochim. Biophys. Acta*, 90, 1368-1376. 2009
138. Shingo Nakada, Masayoshi Sakakura, Hideo Takahashi, Suguru Okuda, Hajime Tokuda & Ichio Shimada. Structural investigation of the interaction between the periplasmic chaperone LolA and the outer membrane receptor LolB using NMR. *J. Biol. Chem.* 284, 24634-24643.2009
139. Shinji Ogino, Satoshi Kubo, Ryo Umemoto, Shuxian Huang, Noritaka Nishida, Ichio Shimada. Observation of NMR signals from proteins introduced into living mammalian cells by reversible membrane permeabilization using a pore-forming toxin, Streptolysin O. *J. Am. Chem. Soc.* 131,10834-10835. 2009
140. Masanori Osawa, Mariko Yokogawa, Takahiro Muramatsu, Tomomi Kimura, Yoko Mase, and Ichio Shimada. Evidence for the direct interaction of spermine with inwardly rectifying potassium channel. *J. Biol. Chem.* 284, 26117-26126. 2009

141. Yutaka Kofuku, Chie Yoshiura, Takumi Ueda, Hiroaki Terasawa, Takahiro Hirai, Sae Tominaga, Masako Hirose, Yoshitake Maeda, Hideo Takahashi, Yuya Terashima, Kouji Matsushima & Ichio Shimada. Interaction between chemokine SDF-1 and its GPCR CXCR4 investigated by NMR. *J. Biol. Chem.* 284, 35240-35250. 2009
142. Hideo Takahashi and Ichio Shimada. Production of isotopically labeled heterologous proteins in non-E.coli prokaryotic and eukaryotic cells. *J. Biomol. NMR*, 46, 3-10. 2010
143. Toshihiko Sugiki, Hideo Takahashi, Michiko Nagasu, Kentaro Hanada, and Ichio Shimada. Real-time assay method of lipid extraction activity. *Anal. Biochem.* 399, 162-167. 2010
144. Katsuki Ono, Hiroshi Ueda, Yoshitaka Yoshizawa, Daisuke Akazawa, Ryuji Tanimura, Ichio Shimada, and Hideo Takahashi. Structural Basis for Platelet Anti-aggregation by AT1-Receptor Antagonist Losartan via Glycoprotein VI. *J. Med. Chem.* 53, 2087-93. 2010
145. Akefumi Nakamura, Hideo Takahashi, Mitsuo Takahashi, Nobuhisa Shimba, Ei-ichiro Suzuki, and Ichio Shimada. Direct determination of the insulin-insulin receptor interface using transferred cross-saturation experiments. *J. Med. Chem.* 53, 2087-2093. 2010
146. Shunsuke Imai, Masanori Osawa, Koh Takeuchi, and Ichio Shimada. Structural basis underlying the dual gate properties of KcsA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 107, 6216-21. 2010
147. Shinji Ogino, Noritaka Nishida, Ryo Umemoto, Miho Suzuki, Mitsuhiro Takeda, Hiroaki Terasawa, Joji Kitayama, Masanori Matsumoto, Haruko Hayasaka, Masayuki Miyasaka, Ichio Shimada. Two-state conformational equilibrium of the hyaluronan-binding domain regulates adhesiveness of CD44 under flow condition. *Structure*, 18, 649-56. 2010
148. Yumiko Mizukoshi, Michiko Nagasu, Ichio Shimada, and Hideo Takahashi. Precise structural determination of weakly binding peptides by utilizing dihedral angle constraints. *J. Biomol. NMR*, 46, 299-305 2010
149. Hideo Takahashi and Ichio Shimada. Production of isotopically labeled heterologous proteins in non-E.coli prokaryotic and eukaryotic cells. *J. Biomol. NMR*, 46, 3-10, 2010
150. Toshihiko Sugiki, Hideo Takahashi, Michiko Nagasu, Kentaro Hanada, and Ichio Shimada. Real-time assay method of lipid extraction activity. *Anal. Biochem.* 399, 162-167, 2010
151. Katsuki Ono, Hiroshi Ueda, Yoshitaka Yoshizawa, Daisuke Akazawa, Ryuji Tanimura, Ichio Shimada, and Hideo Takahashi. Structural Basis for Platelet Anti-aggregation by AT1-Receptor Antagonist Losartan via Glycoprotein VI. *J. Med. Chem.* 53, 1917-1922, 2010
152. Takefumi Nakamura, Hideo Takahashi, Mitsuo Takahashi, Nobuhisa Shimba, Ei-ichiro Suzuki, and Ichio Shimada. Direct determination of the insulin-insulin receptor interface using transferred cross-saturation experiments. *J. Med. Chem.* 53, 2087-2093, 2010
153. Shunsuke Imai, Masanori Osawa, Koh Takeuchi, and Ichio Shimada. Structural basis underlying the dual gate properties of KcsA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 107, 6216-21, 2010
154. Shinji Ogino, Noritaka Nishida, Ryo Umemoto, Miho Suzuki, Mitsuhiro Takeda, Hiroaki Terasawa, Joji Kitayama, Masanori Matsumoto, Haruko Hayasaka, Masayuki Miyasaka, Ichio Shimada. Two-state conformational equilibrium of the hyaluronan-binding domain regulates adhesiveness of CD44 under flow condition. *Structure*. 18, 649-56, 2010
155. Yumiko Mizukoshi, Michiko Nagasu, Ichio Shimada, and Hideo Takahashi. Precise structural determination of weakly binding peptides by utilizing dihedral angle constraints. *J. Biomol. NMR* 46, 299-305, 2010
156. Chie Yoshiura, Yutaka Kofuku, Takumi Ueda, Yoko Mase, Mariko Yokogawa, Masanori Osawa, Yuya Terashima, Kouji Matsushima, and Ichio Shimada. NMR analyses of the interaction between CCR5 and its ligand using functional reconstitution of CCR5 in lipid bilayers. *J. Am. Chem. Soc.* 132, 6768-77, 2010
157. Masahiko Matsumoto, Takumi Ueda, Ichio Shimada. Theoretical analyses of the transferred cross-saturation method. *J. Magn. Reson.* 205, 114-24, 2010
158. Igarashi S, Osawa M, Ozawa S, Shimada I. Backbone resonance assignments for the ligand binding subunit of the histidine permease complex (HisJ) from Escherichia coli, under histidine-bound and unbound states. *Biomol NMR Assign.* 4, 7-20, 2010
159. Ryo Umemoto, Noritaka Nishida, Shinji Ogino, and Ichio Shimada. NMR structure of the calponin homology domain of human IQGAP1 and its implications for the actin recognition mode. *J. Biomol. NMR* 48, 59-64, 2010
160. Lin Ruan, Masanori Osawa, Nao Hosoda, Shunsuke Imai, Asako Machiyama, Toshiaki Katada, Shin-ichi Hoshino, and Ichio Shimada. Quantitative characterization of the Tob interactions provides the thermodynamic basis on the translation termination-coupled deadenylase regulation. *J. Biol. Chem.* 285, 27624-31, 2010

161. Eiji Kanamori, Shunsuke Igarashi, Masanori Osawa, Yoshifumi Fukunishi, Ichio Shimada, and Haruki Nakamura. Structure determination of a protein assembly by amino acid selective cross-saturation. *Proteins* 79, 179-90, 2011
162. Mariko Yokogawa, Masanori Osawa, Koh Takeuchi, Yoko Mase, and Ichio Shimada. The G $\beta\gamma$ binding and conformational changes of G protein-gated inwardly rectifying potassium channel. *J. Biol. Chem.* 286, 2215-23, 2011
163. Koh Takeuchi, Maayan Gal, Hideo Takahashi, Ichio Shimada, and Gerhard Wagner. HNCA-TOCSY-CANH experiments with alternate ¹³C-¹²C labeling: a set of 3D experiment with unique supra-sequential information for mainchain resonance assignment. *J. Biomol. NMR* 49, 17-26, 2011
164. Kim ST, Touma M, Takeuchi K, Sun ZY, Dave VP, Kappes DJ, Wagner G, Reinherz EL. Distinctive CD3 Heterodimeric Ectodomain Topologies Maximize Antigen-triggered Activation of $\alpha\beta$ T Cell Receptors. *J. Immunol.* 185,2951-2959, 2010
165. Takeuchi K, Heffron G, Sun ZY, Frueh DP, Wagner G. Nitrogen-detected CAN and CON experiments as alternative experiments for main chain NMR resonance assignments. *J. Biomol. NMR* 47, 271-82, 2010
166. Takeuchi K, Sun ZY, Park S, Wagner G. Autoinhibitory interaction in the multidomain adaptor protein Nck: possible roles in improving specificity and functional diversity. *Biochemistry*, 49, 5634-41.
167. Takeuchi K, Frueh D, Sun ZY, Hiller S and Wagner G. CACA-TOCSY with alternate ¹³C-¹²C labeling: a ¹³C α direct detection experiment for mainchain resonance assignment, dihedral angle information, and amino acid type identification. *J. Biomol. NMR*, 47, 55-63.
168. Takeuchi K, Frueh D, Hyberts S, Sun ZY, and Wagner G. High-resolution 3D CANCA NMR experiments for complete mainchain assignments using C α direct-detection. *J. Am. Chem. Soc.*, 132, 2945-51.
169. Hyberts, SG., Takeuchi, K., and Wagner, G. Poisson-gap sampling and forward maximum entropy reconstruction for enhancing the resolution and sensitivity of protein NMR Data. *J. Am. Chem. Soc.*, 132, 2145-7.
170. Katsuki Ono, Hiroshi Ueda, Yoshitaka Yoshizawa, Daisuke Akazawa, Ryuji Tanimura, Ichio Shimada, Hideo Takahashi. Structural basis for platelet antiaggregation by angiotensin II type 1 receptor antagonist losartan (DuP-753) via glycoprotein VI. *J. Med. Chem.*, 2010, 53 (5), pp 2087–2093, 2010
171. Gal M, Edmonds KA, Milbradt AG, Takeuchi K. Speeding up direct (¹⁵N) detection: hCaN 2D NMR experiment. *J Biomol NMR.* 51, 497-504, 2011
172. H. Inoue, A. Iihara, H. Takahashi, I. Shimada, I. Ishida, and Y. Maeda. Affinity transfer to a human protein by CDR3 grafting of camelid VHH. *Protein Sci.*, 20, 1971-1981, 2011
173. Sugiki T, Ichikawa O, Miyazawa-Onami M, Shimada I, Takahashi H. Isotopic Labeling of Heterologous Proteins in the Yeast *Pichia pastoris* and *Kluyveromyces lactis*., *Methods Mol Biol.*, 831,19-36, 2011
174. Fukunishi Y, Mizukoshi Y, Takeuchi K, Shimada I, Takahashi H, Nakamura H. Protein-ligand docking guided by ligand pharmacophore-mapping experiment by NMR., *J Mol Graph Model.*, 31, 20-7, 2011
175. Kodama Y, Reese ML, Shimba N, Ono K, Kanamori E, Dötsch V, Noguchi S, Fukunishi Y, Suzuki E, Shimada I, Takahashi H. Rapid identification of protein-protein interfaces for the construction of a complex model based on multiple unassigned signals by using time-sharing NMR measurements., *J Struct Biol.*, 174, 434-42, 2011
176. Milbradt AG, Kulkarni M, Yi T, Takeuchi K, Sun ZY, Luna RE, Selenko P, Näär AM, Wagner G., Structure of the VP16 transactivator target in the Mediator. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 18, 410-5, 2011
177. Sasaki AT, Carracedo A, Locasale JW, Anastasiou D, Takeuchi K, Kahoud ER, Haviv S, Asara JM, Pandolfi PP, Cantley LC., Ubiquitination of K-Ras enhances activation and facilitates binding to select downstream effectors., *Sci. Signal.*, 4, ra13, 2011
178. Ichio Shimada. Cross Saturation/transferred Cross Saturation, *Encyclopedia of Biophysics*, GCR. Roberts (ed.) , 2011
179. Noritaka Nishida, Ichio Shimada. An NMR method to study protein-protein interaction. *Methods Mol. Biol.* 757, 129-37., 2012
180. Eiji Kanamori, Shunsuke Igarashi, Masanori Osawa, Yoshifumi Fukunishi, Ichio Shimada, and Haruki Nakamura. Structure determination of a protein assembly by amino acid selective cross-saturation. *Proteins* 79, 179-90, 2011
181. Mariko Yokogawa, Masanori Osawa, Koh Takeuchi, Yoko Mase, and Ichio Shimada. NMR analyses of the G $\beta\gamma$ binding and conformational changes of G protein-gated inwardly rectifying potassium channel. *J. Biol. Chem.* 286, 2215-23, 2011
182. Yumiko Mizukoshi, Aya Abe, Takeshi Takizawa, Hiroyuki Hanzawa, Yoshifumi Fukunishi, Ichio Shimada, and Hideo Takahashi. An Accurate Pharmacophore Mapping Method by NMR. *Angew. Chem. In Ed Engl.* 51, 1362-5, 2012

183. Y. Kodama, M. L. Reese, N. Shimba, K. Ono, E. Kanamori, V. Dötsch, S. Noguchi, Y. Fukunishi, E. Suzuki, I. Shimada and H. Takahashi. Rapid identification of protein–protein interfaces for the construction of a complex model based on multiple unassigned signals by using time-sharing NMR measurements. *J. Struct. Biol.*, 174, 434-442, 2011
184. Y. Fukunishi, Y. Mizukoshi, K. Takeuchi, I. Shimada, H. Takahashi, and H. Nakamura, Protein–ligand docking guided by ligand pharmacophore-mapping experiment by NMR. *J. Mol. Graph. Mod.*, 31, 20-27, 2011
185. H. Inoue, A. Iihara, H. Takahashi, I. Shimada, I. Ishida, and Y. Maeda. Affinity transfer to a human protein by CDR3 grafting of camelid VHH. *Protein Sci.*, 20, 1971–1981, 2011
186. T. Sugiki, O. Ichikawa, M. Miyazawa-Onami, I. Shimada, and H. Takahashi. Isotopic labeling of heterologous proteins in the yeast *Pichia pastoris* and *Kluyveromyces lactis*. *Methods in Molecular Biology (Protein NMR techniques 3rd edit.)*, 831, 19-36, 2012
187. Kodama Y, Reese ML, Shimba N, Ono K, Kanamori E, Dötsch V, Noguchi S, Fukunishi Y, Suzuki EI, Shimada I, Takahashi H. Rapid identification of protein-protein interfaces for the construction of a complex model based on multiple unassigned signals by using time-sharing NMR measurements. *J Struct Biol.* 174 434-442, 2011
188. Inoue H, Iihara A, Takahashi H, Shimada I, Ishida I, Maeda Y. Affinity transfer to a human protein by CDR3 grafting of camelid VHH. *Protein Sci.* 2011 Dec; 20(12):1971-81, 2011
189. Noritaka Nishida, Ichio Shimada. An NMR method to study protein-protein interaction. *Methods Mol. Biol.* 757, 129-37, 2012
190. Toshihiko Sugiki, Osamu Ichikawa, Mayumi Miyazawa-Onami, Ichio Shimada, and Hideo Takahashi. Isotopic labeling of heterologous proteins in the yeast *Pichia pastoris* and *Kluyveromyces lactis*. *Methods Mol. Biol.* 831, 19-36, 2012
191. Yumiko Mizukoshi, Aya Abe, Takeshi Takizawa, Hiroyuki Hanzawa, Yoshifumi Fukunishi, Ichio Shimada, and Hideo Takahashi. An Accurate Pharmacophore Mapping Method by NMR. *Angew. Chem. In Ed Engl.* 51, 1362-5, 2012
192. Yuichi Minato, Takumi Ueda, Asako Machiyama, Ichio Shimada, and Hideo Iwai. Segmental isotopic labeling of a 140 kDa dimeric multi-domain protein CheA from *Escherichia Coli* by Expressed Protein Ligation and Protein Trans-Splicing. *J. Biomol. NMR* 53, 191-207, 2012
193. Tatsuro Maruyama, Shunsuke Imai, Masanori Osawa, Motoyuki Hattori, Ryuichiro Ishitani, Osamu Nureki, Ichio Shimada. Backbone resonance assignments for the cytoplasmic region of the Mg²⁺ transporter MgtE in the Mg²⁺-unbound state. *Biomol. NMR Assign.* (in press), 2012
194. Pavlos Stampoulis, Takumi Ueda, Hiroaki Terasawa, Hideki Sumimoto, and Ichio Shimada. Atypical membrane-embedded PI(3,4)P2 binding site on p47phox PX domain revealed by NMR. *J. Biol. Chem.* 287, 17848-59, 2012
195. Yoko Mase, Mariko Yokogawa, Masanori Osawa, and Ichio Shimada. Backbone resonance assignments for G protein $\alpha(i3)$ subunit in the GTP-bound state. *Biomol. NMR Assign.*, 6, 217-20, 2012
196. Yoko Mase, Mariko Yokogawa, Masanori Osawa, and Ichio Shimada. Structural basis for the modulation of the gating property of G protein-gated inwardly rectifying potassium ion channel (GIRK) by G protein α subunit in the *i/o*-family (*Gai/o*). *J. Biol. Chem.* 287, 19537-49, 2012
197. Takuo Onizuka, Hiroyuki Shimizu, Yuka Moriwaki, Takayuki Nakano, Shozo Kanai, Ichio Shimada and Hideo Takahashi. NMR study of ligand release from asialoglycoprotein receptor under solution conditions in early endosomes. *FEBS J.* 279, 2645-56, 2012
198. Shunsuke Imai, Tatsuro Maruyama, Masanori Osawa, Motoyuki Hattori, Ryuichiro Ishitani, Osamu Nureki, and Ichio Shimada. Spatial distribution of cytoplasmic domains of the Mg²⁺-transporter MgtE, in a solution lacking Mg²⁺, revealed by paramagnetic relaxation enhancement. *Biochim Biophys Acta* 1824, 1129-35, 2012
199. Masanori Osawa, Nao Hosoda, Tamiji Nakanishi, Naoyuki Uchida, Tomomi Kimura, Shunsuke Imai, Asako Machiyama, Toshiaki Katada, Shin-ichi Hoshino, and Ichio Shimada. Biological Role of the Two Overlapping Poly(A)-binding Protein Interacting Motifs 2 (PAM2) of a Eukaryotic Releasing Factor, eRF3, in mRNA Decay. *RNA* 18, 1957-67, 2012
200. Masanori Osawa, Koh Takeuchi, Takumi Ueda, Noritaka Nishida, and Ichio Shimada. Functional dynamics of proteins revealed by solution NMR. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 22, 660-9, 2012
201. Yutaka Kofuku, Takumi Ueda, Junya Okude, Yutaro Shiraiishi, Keita Kondo, Masahiro Maeda, Hideki Tsujishita, and Ichio Shimada. Efficacy of the β 2-adrenergic receptor is determined by conformational equilibrium in the transmembrane region. *Nature Commun.* 3, 1045, doi: 10.1038/ncomms2046, 2012

202. Toshihiko Sugiki, Koh Takeuchi, Yuji Tokunaga, Hiroaki Terasawa, Keigo Kumagai, Miyuki Kawano, Masahiro Nishijima, Kentaro Hanada, Hideo Takahashi, and Ichio Shimada. Structural basis of ER to Golgi ceramide transport driven by the pleckstrin homology domain of CERT. *J. Biol. Chem.* 287, 33706-18, 2012
203. Takumi Ueda, Naoko Nomoto, Masamichi Koga, Hiroki Ogasa, Yuuta Ogawa, Masahiko Matsumoto, Pavlos Stampoulis, Hiroshi Sode, Hiroaki Terasawa, Ichio Shimada. Structural basis of the efficient electron transport between photosynthetic membrane proteins and plastocyanin using transferred cross-saturation method. *Plant Cell* 10, 4173-86, 2012
204. Shunsuke Imai, Masanori Osawa, Kenichiro Mita, Shou Toyonaga, Asako Machiyama, Takumi Ueda, Koh Takeuchi, Shigetoshi Oiki, and Ichio Shimada. Functional Equilibrium of the KcsA Structure Revealed by NMR. *J. Biol. Chem.* 287, 39634-41, 2012
205. Satoshi Kubo, Noritaka Nishida, Yuko Udagawa, Osamu Takarada, Shinji Ogino, Ichio Shimada. NMR observation of protein-protein interactions in living mammalian cells using the gel encapsulated bioreactor system. *Angew. Chem. In Ed Engl.* 52, 1208-1211, 2013
206. Katsumi Omagari, Daisuke Mitomo, Satoru Kubota, Haruki Nakamura, Yoshifumi Fukunishi. A method to enhance the hit ratio by a combination of structure-based drug screening and ligand-based screening. *Computational Biology and Chemistry: Advances and Applications* 1, 19-28, 2008
207. 井上豪、安達宏昭、村上聡、高野和文、松村浩由、森勇介、福西 快文、中村 春木、木下誉富、仲西功、奥野恭史、南方聖司、下条真司、坂田恒昭、膜タンパク質の結晶化技術の新展開及び創薬バリューチェーンの紹介、*YAKUGAKU ZASSHI*, 128, 497-505, 2008
208. 福西快文、中村春木ら、タンパク質結晶の新展開—新しい育成技術から構造解析・応用研究へ—(高野和文監修)、シーエムシー出版, 2008
209. Yoshifumi Fukunishi. Structure-Based Drug Screening and Ligand-Based Drug Screening with Machine Learning. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening* 12 (4), 397-408, 2009
210. Yoshifumi Fukunishi, Tadaaki Mashimo, Masaya Orita, Kazuki Ohno, Haruki Nakamura. In-silico fragment screening by replica generation (FSRG) method for fragment-based drug design. *Journal of Chemical Information and Modeling* 49 (4), 925-933, 2009
211. Kenichi Koizumi, Kizashi Yamaguchi, Haruki Nakamura, Yu Takano. Hybrid-DFT study on electronic structures of the active site of sweet potato purple acid phosphatase –The origin of stronger antiferromagnetic coupling than other purple acid phosphatase-. *Journal of Physical Chemistry A* 113 (17) 5099-5104, 2009
212. Yoshifumi Fukunishi, Yuusuke Sugihara, Yoshiaki Mikami, Kohta Sakai, Hiroshi Kusudo, Haruki Nakamura. Advanced in-silico drug screening to achieve high hit ratio-development of 3D-compound database. *Synthesiology* 2, 60-68, 2009
213. Yoshifumi Fukunishi, Haruki Nakamura. A new method for in-silico drug screening and similarity search using molecular-dynamics maximum-volume overlap (MD-MVO) method. *Journal of Molecular Graphics and Modeling* 27, 628-636, 2009
214. 福西快文、中村春木、タンパク質構造に指南された活性化合物評価—近年の薬物スクリーニング—、*実験医学* 27, 151-158, 2009
215. Yoshifumi Fukunishi, Tadaaki Mashimo, Masaya Orita, Kazuki Ohno, Haruki Nakamura. In-silico fragment screening by replica generation (FSRG) method for fragment-based drug design. *Journal of Chemical Information and Modeling* 49, 925-933, 2009
216. Yoshifumi Fukunishi. Structure-based drug screening and ligand-based drug screening with machine learning. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening* 12 (4), 397-408, 2009
217. Yoshifumi Fukunishi, Haruki Nakamura. A similarity search using molecular topological graphs. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 1-8, 2009
218. Yoshifumi Fukunishi, Daisuke Mitomo, Haruki Nakamura. Protein-ligand binding free energy calculation by the smooth reaction path generation (SRPG) method. *J. Chem. Inf. Model.*, 49, 1944-1951, 2009
219. 神谷成敏、肥後順一、福西快文、中村春木、タンパク質計算科学—基礎と創薬への応用—、共立出版, 2009
220. 福西快文ほか、コンピューターで薬を創ろう、化学同人, 2009
221. 福西快文、インシリコスクリーニングの精度向上に向けて、遺伝子医学 MOOK 「次世代創薬テクノロジー 実践：インシリコ創薬の最前線」、14, 90-94, 2009
222. Daisuke Mitomo, Yoshifumi Fukunishi, Junichi Higo, Haruki Nakamura. Calculation of protein-ligand binding free energy using smooth reaction path generation (SRPG) method; comparing the explicit water model, GB/SA model and docking score function. *Genome Informatics*, 23, 85-97, 2009

223. Kenichi Koizumi, Kizashi Yamaguchi, Haruki Nakamura, Yu Takano. Hybrid-DFT study on electronic structures of the active site of sweet potato purple acid phosphatase –The origin of stronger antiferromagnetic coupling than other purple acid phosphatase. *J. Phys. Chem. A* 113 (17) 5099-5104, 2009
224. Junichi Higo, Narutoshi Kamiya, Takanori Sugihara, Yasushige Yonezawa, Haruki Nakamura. Verifying trivial parallelization of multicanonical molecular dynamics for conformational sampling of a polypeptide in explicit water. *Chem. Phys. Lett.* 473, 4-6, 326–329, 2009
225. Rossen Apostolov, Yasushige Yonezawa, Daron M. Standley, Gota Kikugawa, Yu Takano, Haruki Nakamura. Membrane attachment facilitates ligand access to active site in Monoamine oxidase A. *Biochemistry* 48 (25), 5864-5873, 2009
226. Takanori Sugihara, Junichi Higo, Haruki Nakamura. Parallelization of Markov Chain Generation and its Application to the Multicanonical Method. *J. Phys. Soc. Jpn.* 78 (7), 074003, 2009
227. Yu Takano, Kenichi Koizumi, Haruki Nakamura. Theoretical studies of the magnetic couplings and the chemical indices of the biomimetic models of oxyhemocyanin and oxytyrosinase. *Inorganica Chim Acta* 362, 4578-4584, 2009
228. Tadaaki Mashimo, Yoshifumi Fukunishi, Masaya Orita, Naoko Katayama, Shigeo Fujita, Haruki Nakamura. Quantitative analysis of aggregation-solubility relationship by in-silico solubility prediction. *International Journal of High Throughput Screening*, 1, 99-107, 2010
229. Yoshifumi Fukunishi. Structural ensemble in computational drug screening. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol*, 6 (7), 1-15, 2010
230. Yoshifumi Fukunishi. Post processing of protein-compound docking for fragment-based drug discovery (FBDD): in-silico structure-based drug screening and ligand-binding pose prediction. *CURRENT TOPICS IN MEDICINAL CHEMISTRY*, 10(6), 680-694, 2010
231. Fukunishi, Yoshifumi. Lintuluoto, Masami, Development of Chemical Compound Libraries for In Silico Drug Screening. *Current Computer - Aided Drug Design*, 6(2), 90-102, 2010
232. Fukunishi, Yoshifumi; Ono, Kazuki; Orita, Masaya; Nakamura, Haruki. Selection of in-silico drug screening result by using universal active probes (UAPs). *Journal of Chemical Information and Modeling*, 50, 1233-1240, 2010
233. Tadaaki Mashimo, Yoshifumi Fukunishi, Masaya Orita, Naoko Katayama, Shigeo Fujita, Haruki Nakamura. Quantitative analysis of aggregation-solubility relationship by in-silico solubility prediction. *International Journal of High Throughput Screening*, 1, 99-107, 2010
234. Yoshifumi Fukunishi. Structural ensemble in computational drug screening. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol*, 6 (7), 1-15, 2010
235. Yoshifumi Fukunishi. Post processing of protein-compound docking for fragment-based drug discovery (FBDD): in-silico structure-based drug screening and ligand-binding pose prediction. *CURRENT TOPICS IN MEDICINAL CHEMISTRY* 10 (6), 680-694, 2010
236. Fukunishi, Yoshifumi; Lintuluoto, Masami. Development of Chemical Compound Libraries for In Silico Drug Screening. *Current Computer - Aided Drug Design* 6 (2), 90-102, 2010
237. Fukunishi, Yoshifumi; Ono, Kazuki; Orita, Masaya; Nakamura, Haruki. Selection of in-silico drug screening result by using universal active probes (UAPs). *Journal of Chemical Information and Modeling* 50, 1233-1240, 2010
238. Eiji Kanamori, Shunsuke Igarashi, Masanori Osawa, Yoshifumi Fukunishi, Ichio Shimada, Haruki Nakamura. Structure determination of a protein assembly by amino acid selective cross-saturation. *Proteins* 79, 179-190, 2011
239. Yoshifumi Fukunishi, Haruki Nakamura. Prediction of ligand-binding sites of proteins by molecular docking calculation for a random ligand library. *Protein Science* 20, 95-106, 2011
240. Shuso Takeda, Akari Hirayama, Shino Urata, Nobutaka Mano, Eiko Fukunaga, Midori Imamura, Ayumi Irii, Satomi Kitajima, Tomoko Masuyama, Mai Nomiyama, Sachiko Tatei, Saari Tomita, Taichi Kudo, Momoko Noguchi, Yasuhiro Yamaguchi, Yoshiko Okamoto, Toshikai Amamoto, Yoshifumi Fukunishi, Kazuhito Watanabe, Curtis J. Omiecinski, Hironori Aramaki. Cannabidiol-2',6'-dimethyl ether as an effective protector of 15-lipoxygenase-mediated low-density lipoprotein oxidation in vitro. *BIOLOGICAL & PHARMACEUTICAL BULLETIN* 34, 1252-1256, 2011
241. Yuya Kodama, Michael Reese, Nobuhisa Shimba, Katsuki Ono, Eiji Kanamori, Volker Dotsch, Shuji Noguchi, Yoshifumi Fukunishi, Ei-ichiro Suzuki, Ichio Shimada, Hideo Takahashi. Rapid identification of protein-protein interface for the construction of a complex model based on multiple unassigned signals by using time-sharing NMR measurements. *Journal of Structural Biology* 174, 434-442, 2011
242. Yoshifumi Fukunishi, Yumiko Mizukoshi, Koh Takeuchi, Ichio Shimada, Hideo Takahashi, Haruki Nakamura. Protein-ligand docking guided by ligand pharmacophore-mapping experiment by NMR. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 31, 20-27, 2011

243. Yasuhide Takashima, Seika atanaka, Eiichi Mizohata, Nanae Nagata, Yoshifumi Fukunishi, Hiroyoshi Matsumura, Yoshihiro Urade, Tsuyoshi Inoue. Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of mouse prostaglandin F_{2α} synthase, AKR1B3. *Structural Biology and Crystallization Communications*. F67, 1630-1632 , 2011
244. Mitsuhiro Wada, Eiji Kanamori, Haruki Nakamura, Yoshifumi Fukunishi. Selection of in-silico drug screening results for G-protein-coupled receptors by using universal active probe. *Journal of Chemical Information and Modeling*. 51 (9) 2398-2407 , 2011
245. Yoshifumi Fukunishi. Prediction of positions of active compounds makes it possible to increase activity in fragment-based drug development. *Pharmaceuticals*. 4, 758-769 , 2011
246. Yoshifumi Fukunishi, Haruki Nakamura. Definition of drug-likeness for compound affinity. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 51, 1012-1016, 2011
247. Nanae Nagata, Yukiko Kusakari, Yoshifumi Fukunishi, Tsuyoshi Inoue and Yoshihiro Urade. Catalytic mechanism of the primary human prostaglandin F_{2α} synthase, aldo-keto reductase 1B1 – prostaglandin D₂ synthase activity in the absence of NADP(H). *FEBS journal*, 278, 1288-1298 , 2011
248. 福西快文、計算機によるタンパク質—薬物複合体予測、生物物理 51 ,252-255, 2011
249. Yoshifumi Fukunishi. OMICS: Biomedical Perspectives and Applications. *OMICS: Biomedical Perspectives and Applications CRC Press*, 2011
250. 井上豪、松村浩由、安達宏昭、森勇介、高野和文、村上聡、福西快文、中村春木、木下誉富、仲西功、奥野恭史、南方聖司、三上義明、佐久間俊広、北島正人、福岡良忠、高田俊和、坂田恒昭、創薬バリューチェーンのインシリコ技術を活用した阻害剤開発の試み、日本結晶学会誌、52,89-94, 2011
251. 福西快文、インシリコ創薬ソフト myPresto を用いたドラッグスクリーニング、最新創薬インフォマティクス活用マニュアル、86-90, 2011
252. Sarel J. Fleishman, Timothy A. Whitehead, Eva-Maria Strauch, Jacob E. Corn, Sanbo Qin, Huan-Xiang Zhou, Julie C. Mitchell, Omar N. A. Demerdash, Mayuko Takeda-Shitaka, Genki Terashi, Iain H. Moal, Xiaofan Li, Paul A. Bates, Martin Zacharias, Hahnbeom Park, Jun-su Ko, Hasup Lee, Chaok Seok, Thomas Bourquard, Julie Bernauer, Anne Poupon, Jérôme Azé, Seren Soner, Şefik Kerem Ovalı, Pemra Ozbek, Nir Ben Tal, Türkan Haliloglu, Howook Hwang, Thom Vreven, Brian G. Pierce, Zhiping Weng, Laura Pérez-Cano, Carles Pons, Juan Fernández-Recio, Fan Jiang, Feng Yang, Xinqi Gong, Libin Cao, Xianjin Xu, Bin Liu, Panwen Wang, Chunhua Li, Cunxin Wang, Charles H. Robert, Mainak Guharoy, Shiyong Liu, Yangyu Huang, Lin Li, Dachuan Guo, Ying Chen, Yi Xiao, Nir London, Zohar Itzhaki, Ora Schueler-Furman, Yuval Inbar, Vladimir Potapov, Mati Cohen, Gideon Schreiber, Yuko Tsuchiya, Eiji Kanamori, Daron M. Standley, Haruki Nakamura, Kengo Kinoshita, Camden M. Driggers, Robert G. Hall, Jessica L. Morgan, Victor L. Hsu, Jian Zhan, Yuedong Yang, Yaoqi Zhou, Panagiotis L. Kastiris, Alexandre M. J. J. Bonvin, Weiyi Zhang, Carlos J. Camacho, Krishna P. Kilambi, Aroop Sircar, Jeffrey J. Gray, Masahito Ohue, Nobuyuki Uchikoga, Yuri Matsuzaki, Takashi Ishida, Yutaka Akiyama, Raed Khashan, Stephen Bush, Denis Fouches, Alexander Tropsha, Juan Esquivel-Rodríguez, Daisuke Kihara, P. Benjamin Stranges, Ron Jacak, Brian Kuhlman, Sheng-You Huang, Xiaoqin Zou, Shoshana J. Wodak, Joel Janin and David Baker. Community-wide assessment of protein-interface modeling suggests improvements to design methodology., *J Mol Biol*. 414(2):289-302 , 2011
253. Junichi Higo, Yoshifumi Nishimura, Haruki Nakamura. A Free-Energy Landscape for Coupled Folding and Binding of an Intrinsically Disordered Protein in Explicit Solvent from Detailed All-Atom Computations., *Journal of American Chemical Society* 133, 10448-10458 , 2011
254. Bhaskar Dasgupta, Haruki Nakamura, Akira R. Kinjo. Distinct Roles of Overlapping and Non-overlapping Regions of Hub Protein Interfaces in Recognition of Multiple Partners., *Journal of sMolecular Biology* 411, 713-727 , 2011
255. Eiji Kanamor, Shunsuke Igarashi, Masanori Osawa, Yoshifumi Fukunishi, Ichio Shimada, Haruki Nakamura. Structure determination of a protein assembly by amino acid selective cross-saturation, *Proteins* 79, 179-190 , 2011
256. Yoshifumi Fukunishi, Haruki Nakamura. Prediction of ligand-binding sites of proteins by molecular docking calculation for a random ligand library, *Protein Science*. 20, 95-106, 2011
257. Junichi Higo, Jinzen Ikebe, Narutoshi Kamiya, Haruki Nakamura. Enhanced and effective conformational sampling of protein molecular systems for their free energy landscapes., *Biophysical Reviews* 4(1), 27-44 , 2012
258. Koji Umezawa , Jinzen Ikebe , Mitsunori Takano , Haruki Nakamura, Junichi Higo. Conformational Ensembles of an Intrinsically Disordered Protein pKID with and without a KIX Domain in Explicit Solvent Investigated by All-Atom Multicanonical Molecular Dynamics., *Biomolecules* 2(1), 104-121 , 2012

259. Yoshifumi Fukunishi, Haruki Nakamura. Integration of Ligand-Based Drug Screening with Structure-Based Drug Screening by Combining Maximum Volume Overlapping Score with Ligand Docking., *Pharmaceuticals* 5(12), 1332-1345, 2012
260. Yumiko Mizukoshi, Aya Abe, Takeshi Takizawa, Hiroyuki Hanzawa, Yoshifumi Fukunishi, Ichio Shimada, Hideo Takahashi. An accurate pharmacophore mapping method by NMR spectroscopy., *Angewandte Chemie*. 124 (6), 1391-1394, 2012
261. Yasuhide Takashima, Eiichi Mizohata, Sudaratana R. Krungkrai, Yoshifumi Fukunishi, Takayoshi Kinoshita, Tsuneaki Sakata, Hiroyoshi Matsumura, Jerapan Krungkrai, Toshihiro Horii, Tsuyoshi Inoue. The *in silico* screening and X-ray structure analysis of the inhibitor complex of *Plasmodium falciparum* orotidine 5'-monophosphate decarboxylase., *The Journal of Biochemistry (J. Biochem.)*. 152 (2) , 133-138, 2012
262. Yoshifumi Fukunishi, Saki Hongo, Masami Lintuluoto, Hiroshi Matsuo. Free Energy Profile of APOBEC3G Protein Calculated by a Molecular Dynamics Simulation., *Biology* 1(2), 245-259, 2012
263. Yoshifumi Fukunishi, Haruki Nakamura. Statistical Estimation of the Protein-Ligand Binding Free Energy Based On Direct Protein-Ligand Interaction Obtained by Molecular Dynamics Simulation. *Pharmaceuticals* 5(10), 1064-1079 , 2012
264. Kenichi Koizumi, Yasuteru Shigeta, Orio Okuyama, Haruki Nakamura, Yu Takano. Coordination effects on the electronic structure of the CuA site of cytochrome c oxidase. *Chem. Phys. Lett.* 531, 197-201, 2012
265. Hideki Yamasaki, Haruki Nakamura, Electron density based interaction energy estimation of the special pair in the photosynthetic reaction center. *Chem. Phys. Lett.* 536, 129-135, 2012
266. Akira Kinjo, Haruki Nakamura. GIRAF: a method for fast search and flexible alignment of ligand binding interfaces in proteins at atomic resolution. *Biophysics* 8, 79-94, 2012
267. Ikuo Fukuda, Haruki Nakamura. Non-Ewald methods: Theory and Applications to Molecular Systems. *Biophysical Reviews*, 4 (3), 161-170, 2012
268. Daisuke Kuroda, Hiroki Shirai, Matthew P. Jacobson, Haruki Nakamura. Computer-aided antibody design. *Protein Engineering, Design & Selection*. 25 (10) 507-521 , 2012
269. Ikuo Fukuda, Narutoshi Kamiya, Yasushige Yonezawa, Haruki Nakamura. Simple and Accurate Scheme to Compute Electrostatic Interactions: Zero-dipole Summation Technique for Molecular System and Application to Bulk Water. *J. Chem. Phys.* 137, 054314 , 2012
270. Daigo Shiga, Yasuhiro Funahashi, Hideki Masuda, Akihiro Kikuchi, Masanori Noda, Susumu Uchiyama, Kiichi Fukui, Kenji Kanaori, Kunihiko Tajima, Yu Takano, Haruki Nakamura, Misato Kamei, and Toshiki Tanaka. Creation of a Binuclear Purple Copper Site within a de Novo Coiled-Coil Protein. *Biochemistry* , 51 (40), 7901-7907, 2012
271. Bhaskar Dasgupta, Haruki Nakamura, Akira R Kinjo. Counterbalance of ligand- and self-coupled motions characterizes multispecificity of ubiquitin. *Protein Science* 22 (2), 168-178 , 2012
272. Narutoshi Kamiya, Ikuo Fukuda, Haruki Nakamura. Application of zero-dipole summation method to molecular dynamics simulations of amembrane protein system. *Chem. Phys. Lett.* 568-569, 26-32 , 2013
273. Kanamori, E., Murakami, Y., Sarmiento J., Liang, S., Standley, D. M., Shirota, M., Kinoshita, K., Tsuchiya, Y., Higo, J., Nakamura, H. Biomolecular Forms and Functions: A Celebration of 50 years of the Ramachandran Map (Eds. Manju Bansal & N. Srinivasan) "Prediction of Protein-Protein Complex Structures". *World Scientific Publishing*, pp. 160-172, 2013
274. Yoshifumi Fukunishi, Haruki Nakamura. Improved Estimation of Protein-Ligand Binding Free Energy by Using the Ligand-Entropy and Mobility of Water Molecules. *Pharmaceuticals* 6, 604-622, 2013
275. Junichi Higo, Koji Umezawa, H. Nakamura. A virtual-system coupled multicanonical molecular dynamics simulation: Principles and applications to free-energy landscapes of protein-protein interaction with an all-atom model in explicit solvent. *J. Chem. Phys.* 2013, in press.
276. Yumiko Mizukoshi, Aya Abe, Takeshi Takizawa, Hiroyuki Hanzawa, Yoshifumi Fukunishi, Ichio Shimada, and Hideo Takahashi. An Accurate Pharmacophore Mapping Method by NMR, *Angew. Chem. In Ed Engl.* 51, 1362-5, 2012 (in press)
277. 夏目亮、栄徳勝光、赤井祐介、佐野徳彦、堀越正美、千田俊哉、ヒストンシャペロン CIA による スクレオソーム構造変換とエピジェネティクス、生物物理、48 巻 2 号, p 108-113, 2008 年
278. 木村泰久、構造解析が明らかにした ABC タンパク質の基質輸送メカニズム、ファルマシア、44,76-77, 2008 年
279. 平井照久、MF S 輸送体の構造とその輸送機構、生物物理 47(5) 317-322, 2007 年
280. 平井照久、電子線結晶学による膜輸送タンパク質の構造と動作機構の観察、ナノイメージング エヌ・ティー・エス、2008 年

281. 木村泰久、植田和光、ABC タンパク質の機能とメカニズム 薬物トランスポーター活用ライブラリー、羊土社 122-6 頁,“MDR1”127-30 頁、2009 年
282. 佐藤優花里、Zbynek Prokop, Jan Brezovsky, 夏目亮、Radka Chaloupkova、永田裕二、Jiri Damborsky、千田俊哉、ハロアルカン脱ハロゲン酵素 DbjA の鏡像異性体選択性機構の解明、日本結晶学会誌 53. 124-129, 2011 年
283. 赤井祐介、複合体試料の結晶化 ～ヒストンシヤペロン CIA/ASF1-プロモドメイン複合体をモデルとして～、蛋白質科学会アーカイブ 4, e61, 2011 年

【研究発表、学会】

1. 藤吉好則、Structure and function of channels., Symposium ‘Frontiers in Microscopy’ on the occasion of the Titan Krios Inauguration (Apr 2008, Munich)
2. 藤吉好則、電子顕微鏡法の現状と展望、Biological Seminar (2008 年 5 月、静岡)
3. 藤吉好則、電子顕微鏡を機軸とした構造生理学 (特別講演)、日本顕微鏡学会第 64 回学術講演会 (2008 年 5 月、京都)
4. 藤吉好則、Structural Physiology of Multifunctional Channels、The 1st International Conference of the Grand Challenge to Next-Generation Integrated Nanoscience (Jun 2008, Tokyo)
5. 藤吉好則、多機能性チャンネルの構造生理学、特別講演会「今をときめく生命科学：如何にして新しい概念を提唱するか」(2008 年 6 月、宮城)
6. 藤吉好則、多機能性チャンネルを中心とした構造生理学研究 (特別講演)、第 5 回 K MU 研究推進セミナー (2008 年 6 月、金沢)
7. 藤吉好則、Structure and Function of Multifunctional Channels (Special Lecture)、Neuroscience2008 (The 31st Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society) (Jul 2008, Tokyo)
8. 藤吉好則、Membrane protein structure (Session X. Electron crystallography and structural studies of membrane proteins (Part B)), Beijing Workshop of Cryo-Electron Microscopy in Structural Biology (Jul 2008, Beijing)
9. 藤吉好則、Stability improvement of prokaryotic voltage-gated sodium channel by cysteine mutations., Beijing Workshop of Cryo-Electron Microscopy in Structural Biology (Jul 2008, Beijing)
10. 藤吉好則、電子顕微鏡を機軸とした構造生理学、講演会 (2008 年 7 月、京都)
11. 藤吉好則、Structure of gastric H⁺, K⁺-ATPase at 8-Å resolution、P-ATPase 2008, Structures, Mechanisms, and Disease (Aug 2008, Aarhus, Denmark)
12. 藤吉好則、Structure and function of Multifunctional channels (Keynote lecture)、IUCr2008 (Aug 2008, Osaka)
13. 藤吉好則、チャンネルの構造生理学、東京大学大学院医学系研究科医学共通講義「神経科学入門」(2008 年 9 月、東京)
14. 藤吉好則、チャンネルの構造と機能 Structure and function of channels、日本学術振興会回折構造生物学第 169 委員会 第 27 回研究会 (公開シンポジウム) 回折構造生物の新機軸：脳科学と電子顕微鏡法 Innovation in Diffraction Structural Biology: Neuroscience and electron microscopy (2008 年 10 月、京都)
15. 藤吉好則、Structure and function of water and ion channels、150th anniversary of Japan-France relationship 日仏友好 150 周年記念「水と生体機能」シンポジウム Workshop on WATER & CELL PHYSIOLOGY (Nov 2008, Kyoto)
16. 藤吉好則、多機能性チャンネルの構造生理学 (関連分野セミナー)、第 38 回日本免疫学会総会・学術集会 (2008 年 12 月、京都)
17. 藤吉好則、Structure and function of Multifunctional Channels、BMB2008 (第 31 回日本文政生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会合同大会) (2008 年 12 月、兵庫)
18. 藤吉好則、Structure and function of Multifunctional Channels (招待講演)、神戸大学グローバル C O E プログラム「統合的膜生物学の国際教育研究拠点」シンポジウム International Symposium on Integrative Membrane Biology (2008 年 12 月、兵庫)
19. 藤吉好則、これからの生命科学、数学に求めること (基調講演)、RIMS 共同研究「離散力学系の分子細胞生物学への応用数理」(2009 年 1 月、京都)

20. 藤吉好則、多機能性チャンネルを中心とした構造生理学（特別講演）、生命機能研究科第46回研究交流会フロンティアバイオサイエンスコロキウム（2009年1月、大阪）
21. 藤吉好則、膜タンパク質の構造を機能研究の現状、三井化学株式会社講演会（2009年1月、茂原）
22. 藤吉好則、Structure and function of adhenells: adhesive channels (Invited lecture)、Network of Excellence-3D-EM Final Meeting (Feb 2009, Brdo, Slovenia)
23. 藤吉好則、構造生理学研究のための見る技術（特別講演）、マイクロビームアナリシス第141委員会 第135回研究会（2009年3月、東京）
24. 藤吉好則、多機能性チャンネルの構造と機能 Structure and Function of Multifunctional Channels (特別講演)、日本薬学会第129年会（2009年3月、京都）
25. Yusuke Akai, Naruhiko Adachi, Yohei Hayashi, Masamitsu Eitoku, Norihiko Sano, Masaru Tanokura, Masami Horikoshi, Toshiya Senda., Structure and function of the human histone chaperone CIA/ASF1 complexed with the double bromodomain from TFIID, The 22nd Symposium of The Protein Society, (Jul 2008, San Diego, California)
26. Yusuke Akai, Naruhiko Adachi, Yohei Hayashi, Masamitsu Eitoku, Norihiko Sano, Masaru Tanokura, Masami Horikoshi, Toshiya Senda., Structure and function of the human histone chaperone CIA/ASF1 complexed with the double bromodomain from TFIID, The 60th International Union of Crystallography (IUCr) (Aug 2008, Osaka)
27. Miki Senda, Shigenobu Kimura, Tetsuo Ishida, Toshiya Senda., Molecular mechanism of the redox-dependent interaction between ferredoxin and ferredoxin reductase, XXI Congress of the IUCr (Aug 2008, Osaka)
28. 赤井祐介、安達成彦、林陽平、栄徳勝光、佐野徳彦、夏目亮、工藤紀雄、田之倉優、堀越正美、千田俊哉、ヒストンシャペロン CIA/ASF1-CCG1 ブロモドメイン複合体の構造と機能、第31回日本分子生物学会（2008年12月、神戸）
29. 佐藤優花里、夏目亮、赤井祐介、安達成彦、堀越正美、千田俊哉、ヒストンシャペロン CAF-1 と HIRA の大量発現系の構築、生体超分子の構造形成と機能制御の原子機構（2008年12月、つくば）
30. 赤井祐介、安達成彦、林陽平、栄徳勝光、佐野徳彦、夏目亮、工藤紀雄、田之倉優、堀越正美、千田俊哉、ヒストンシャペロン CIA/ASF1-CCG1 ブロモドメイン複合体の構造と機能、第26回 PF シンポジウム（2009年3月、つくば）
31. 光岡薫、極低温電子顕微鏡によるタンパク質複合体の立体構造解析、第8回日本蛋白質科学会年会
32. 光岡薫、Structure of the GroEL-GroES-ADP-substrate protein complex from *Thermus thermophilus* by cryo-electron microscopy、The 9th Asia-Pacific Microscopy Conference (Nov 2008, Jeju, Korea)
33. 光岡薫、Structural analysis of membrane proteins and complexes by electron crystallography、The 39th NIPS International Symposium (Nov 2008, Okazaki)
34. 安井正人、Regulation, structure and function of brain aquaporins(講演)、第1回 Brain Aquaporin 9-10 国際会議 (Jun 2008, Norway)
35. Yasuhisa Kimura, Michinori Matsuo, Noriyuki Kioka, Kazumitsu Ueda., Mechanism of multidrug recognition by MDR1 - cholesterol fill-in model, 2nd FEBS Special Meeting on ABC Proteins, ABC2008 (Mar 2008)
36. 金岡怜志、木村泰久、中川好秋、植田和光、赤松美紀、薬物排出に関わる P-糖タンパク質の基質認識機—さまざまな農薬の構造と ATPase 活性との関係—、日本農薬学会第33回大会(2008年3月)
37. 木村泰久、平山裕士、浅見成美、木岡紀幸、松尾道憲、加藤博章、植田和光、ヒト培養細胞を用いたヒト ABC トランスポーターの大量発現系の構築および精製条件スクリーニング手法の開発、BMB2008 (第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会 合同大会) (2008年12月)
38. 佐藤友美、小段篤史、木村泰久、植田和光、中津亨、加藤博章、多剤排出トランスポーターP 糖タンパク質のリンカー領域の薬物輸送における役割、日本薬学会 第129回年会（2009年3月）
39. 平山裕士、木村泰久、松尾道憲、木岡紀幸、植田和光、ヒト ABCG1 の大量培養系の構築・安定化条件の探索、日本農芸化学会 2009年度大会（2009年3月）
40. 金岡怜志、木村泰久、植田和光、赤松美紀、P-糖タンパク質と Gramicidin S 類縁体との相互作用、日本農芸化学会 2009年度大会（2009年3月）
41. 長尾耕治郎、趙禹、木村泰久、植田和光、ABCA1 による HDL 形成における4つのステップ、日本農芸化学会 2009年度大会（2009年3月）

42. 宝蔵寺賢子、木村泰久、松尾道憲、木岡紀幸、植田和光、コレステロール恒常性に關与する ABCA1 の分子内ジスルフィド結合の解析、日本農芸化学会 2009 年度大会 (2009 年 3 月)
43. 木村泰久、平山裕士、松尾道憲、木岡紀幸、加藤博章、植田和光、ヒト培養細胞を用いた ATP 感受性カリウムチャネル複合体の大量生産、高純度精製、日本農芸化学会 2009 年度大会 (2009 年 3 月)
44. 山口知宏、藤井高志、安部義人、平井照久、難波啓一、康東天、濱崎直孝 & 光岡薫、ヒト赤血球膜蛋白質 Band3 膜貫通ドメインの極低温電子顕微鏡構造解析、日本顕微鏡学会第 64 回学術講演会 (2008 年 5 月)
45. 太田安美、小林一美、廣明洋子、平井照久 & 藤吉好則、極低温電子線トモグラフィによるシナプス結合部位の三次元構造解析、日本顕微鏡学会第 64 回学術講演会 (2008 年 5 月)
46. 池田洋平、清水哲哉 & 平井照久、シュウ酸イオントランスポータの原子分解能の構造解析に向けて、第 48 回生物物理若手の会夏の学校、(2008 年 7 月)
47. 山口知宏、廣明洋子、康東天、濱崎直孝、藤吉好則 & 平井照久、ヒト赤血球膜蛋白質バンド 3 膜貫通ドメインの電子線結晶構造解析、日本生物物理学会第 46 回年会 S141 (2008 年 12 月)
48. 藤吉好則、知る楽しさ 分子レベルからヒトを理解するために、岐阜北高校文化講演会 (2009 年 5 月、岐阜)
49. 藤吉好則、構造生理学 (講義) ・多機能性チャネルの構造と機能研究 (セミナー)、名古屋大学生命農学研究科大学院特別講義&セミナー (2009 年 6 月、名古屋)
50. 藤吉好則、Structural physiology of multifunctional channels (Special Lecture)、IUPS2009 (36th International Congress of Physiological Sciences) (Jul 2009, Kyoto)
51. 藤吉好則、Workshop: Structural biology, Chairperson with Da-Neng Wang、IUPS2009 (36th International Congress of Physiological Sciences) (Jul 2009, Kyoto)
52. 藤吉好則、Recent advancements in structural analysis of AQP4 water channels and Cx26 gap junction channels、CMBN guest lecture (Sep 2009, Oslo, Norway)
53. 藤吉好則、Structural physiology based on electron crystallography (Plenary Lecture)、AsCA'09 (Joint Conference of the Asian Crystallographic Association & Chinese Crystallography Society) (Oct 2009, Beijing)
54. 藤吉好則、脳の代表的水チャネル：アクアポリン-4 の構造と機能、第 39 回慶應ニューロサイエンス研究会『アクアポリン-4 と神経疾患 -新たな病態メカニズムの展開と治療への戦略-』(2009 年 10 月、東京)
55. 藤吉好則、多機能性チャネルの構造生理学 (招待講演)、第 14 回ハイテク・リサーチセンター研究発表会 (2009 年 11 月、神奈川)
56. 藤吉好則、Structural and functional study of membrane proteins by Cryo-electron microscopy、JEOL/CURIE institute Meeting (クライオワークショップ) (Nov 2009, Orsay)
57. 藤吉好則、電子線結晶学は膜タンパク質の構造を機能研究のための 1 つの良い手法、ターゲットタンパク研究プログラム第 3 回研究交流会 (2010 年 3 月、東京)
58. 藤吉好則、創薬基盤技術としての電顕：膜タンパク質の構造機能研究、NEDO 特別講座シンポジウム (2010 年 3 月、東京)
59. 藤吉好則、Structural Physiology Based on Electron Crystallography、International Symposium Fifty Years of Biophysics Research at Nagoya University (Mar 2010, Nagoya)
60. 藤吉好則、膜タンパク質の構造と機能研究のための極低温電子顕微鏡技術、京都大学低温物質科学研究センター第 8 回講演会・研究交流会「構造生物学の現状と未来」(2010 年 3 月、京都)
61. 赤井祐介、安達成彦、林陽平、栄徳勝光、佐野徳彦、夏目亮、工藤紀雄、田之倉優、堀越正美、千田俊哉、ヒストンシャペロン CIA/ASF1-CCG1 ブロモドメイン複合体の構造と機能、第 9 回蛋白質科学学会 (2009 年 5 月、熊本)
62. 佐藤優花里、夏目亮、赤井祐介、安達成彦、堀越正美、千田俊哉、ヒストンシャペロン HIRA の精製系の確立、生体超分子の構造形成と機能制御の原子機構 (2009 年 7 月、湘南)
63. Toshiya Senda, Ryo Natsume, Yusuke Akai, Naruhiko Adachi, Yohei Hayashi, Masamitsu Eitoku, Norihiko Sano and Masami Horikoshi., Crystal structure of CIA/ASF1-histone-H3-H4 and CIA/ASF1-bromodomain complexes involved in nucleosome structural change, Annual meeting of American crystallographic association (Jul 2009, Toronto, Canada)

64. Naruhiko Adachi, Yusuke Akai, Yohei Hayashi, Masamitsu Eitoku, Norihiko Sano, Ryo Natsume, Norio Kudo, Masaru Tanokura, Toshiya Senda, Masami Horikoshi., Recruitment of histone chaperone CIA/ASF1 by TFIID induces histone eviction, Cold Spring Harbor Laboratory meeting: Mechanisms of eukaryotic transcription (Aug 2009, Cold Spring Harbor, NY)
65. 千田俊哉、Molecular mechanism of site-specific nucleosome disassembly in transcription. French-Japanese Workshop on Life Science (Sep 2009, Paris, France)
66. 千田俊哉、Molecular Mechanism of the Site-specific Histone Eviction at Active Promoter Regions. Structural Biology on Nuclear Proteins (Nov 2009, Yokohama)
67. 千田俊哉、Molecular Mechanism of the Site-specific Histone Eviction at Active Promoter Regions Taiwan-Japan Symposium on Crystallography (Dec 2009, Osaka)
68. 佐藤優花里、夏目亮、永田裕二、Jiri Damborsky、千田俊哉、ハロアルカン脱ハロゲン酵素の結晶化における Serial microseeding の効果、PF シンポジウム (2010年3月、つくば)
69. 光岡薫、刑部伸彦、ミクロソーム型プロスタグランジン E 合成酵素 1 の電子線結晶構造解析、日本顕微鏡学会第 65 回学術講演会 (2009年5月、仙台)
70. 光岡薫、遠藤紘子、糟屋大介、刑部伸彦、電子線結晶構造解析による水チャネル AQP1 の高分解能構造解析、日本生物物理学会第 47 回年会 (2009年10月、徳島)
71. Yasuhisa Kimura, Hiroaki Kato, Kazumitsu Ueda., Large scale production and purification of KATP channel in mammalian cells, タケダシンポジウム (May 2009)
72. 菅野亮、木村泰久、光岡薫、植田和光、単粒子解析法を用いた ATP 感受性カリウムチャネルの構造研究、第 82 回 日本生化学会大会 (2009年10月)
73. 平山裕士、木村泰久、松尾道憲、木岡紀幸、植田和光、ヒト ABCG1 の大量培養・精製系の構築、第 82 回 日本生化学会大会 (2009年10月)
74. 木村泰久、平山裕士、木岡紀幸、松尾道憲、加藤博章、植田和光、ヒト培養細胞を用いた ATP 感受性カリウムチャネルの大量発現・精製手法の開発、第 82 回 日本生化学会大会 (2009年10月)
75. 宝蔵寺賢子、木村泰久、松尾道憲、木岡紀幸、植田和光、コレステロール恒常性に関与する ABCA1 の分子内ジスルフィド結合の解析、第 82 回 日本生化学会大会 (2009年10月)
76. Yasuhisa Kimura, Ryo Kanno, Michinori Matsuo, Hiroaki Kato and Kazumitsu Ueda., Large scale production and purification of ATP-sensitive potassium channels in cultured human cells, 3rd FEBS special meeting "ATP-Binding Cassette (ABC) Proteins: From Multidrug Resistance to Genetic Diseases" (Feb 2010)
77. 平山裕士、木村泰久、松尾道憲、木岡紀幸、植田和光、ヒト培養細胞を用いたヒト ABCG1 の大量培養および高純度精製、日本農芸化学会 2010 年度大会 (2010年3月)
78. 木村泰久、菅野亮、松尾道憲、光岡薫、加藤博章、植田和光、ヒト浮遊培養細胞を用いた K_{ATP} チャネル複合体の精製および機能評価、日本農芸化学会 2010 年度大会 (2010年3月)
79. 山口知宏、廣明洋子、康東天、濱崎直孝、藤吉好則 & 平井照久、ヒト赤血球膜蛋白質バンド 3 膜貫通ドメインの電子線結晶構造解析、日本顕微鏡学会第 65 回学術講演会 (2009年5月)
80. 太田安美、西川幸希、小林一美、廣明洋子、平井照久 & 藤吉好則、電子線トモグラフィによる電気シナプス結合部位の三次元構造の観察、日本顕微鏡学会第 65 回学術講演会 (2009年5月)
81. 山口知宏、廣明洋子、池田洋平、康東天、濱崎直孝、藤吉好則 & 平井照久、電子線結晶解析によって明らかになったヒト赤血球膜蛋白質バンド 3 膜貫通ドメインの立体構造、日本生物物理学会第 47 回年会 (2009年10月)
82. 三尾和弘、単粒子構造解析法 - 結晶を使わない電子顕微鏡タンパク質構造解析 - CBI 学会研究講演会 (2010年5月)
83. 光岡薫、極低温電子顕微鏡による生体高分子構造解析の多様な試料への応用、グローバル COE 「細胞運命決定」第 5 回 構造生物学・先端技術講演会 (2010年9月)
84. Kazuhiro Mio, Toshihiko Ogura, Yuusuke Maruyama, Muneyo Mio and Chikara Sato., Depiction of 3D structure and assignment of functional subunits of membrane proteins using a transmission electron microscopy, World Congress on Advances in Oncology and International Symposium on Molecular Medicine (Oct 2010)
85. 三尾和弘、電子顕微鏡で見るタンパク質の世界、日本赤十字社中央血液研究所第 4 回講演会(2010年11月)
86. 光岡薫、Three-dimensional reconstruction of the chaperonin native complex from Thermusthermophilus, GCOE/Structural Biology Research Center International Symposium (Nov 2010)

87. 三尾和弘、小椋俊彦、大村彰、野田亮、佐藤主税、Single particle analysis of the membrane-anchored protease inhibitor RECK、第 48 回日本生物物理学会年会 (2010 年 9 月)
88. 大熊康夫、光岡薫、佐伯泰、安永卓生、Single particle analysis of 26S proteasome by high resolutional cryo electronmicroscopy and advanced image analysis、第 48 回日本生物物理学会年 (2010 年 9 月)
89. 三尾和弘、小椋俊彦、大村彰、野田亮、佐藤主税、細胞外マトリックス制御因子 RECK タンパク質の単粒子構造解析、第 32 回日本分子生物学会年会 (2010 年 12 月)
90. 千田俊哉、CIA を中心としたヌクレオソーム構造変換機構、構造エピゲノム研究会発足記念シンポジウム (2010 年 4 月)
91. 赤井祐介、安達成彦、林陽平、栄徳勝光、佐野徳彦、夏目亮、工藤紀雄、田之倉優、堀越正美、千田俊哉、ヒストンシャペロン CIA-ブロモドメイン複合体の構造と機能、第 10 回日本蛋白質科学学会年会 (2010 年 6 月)
92. 夏目亮、千田俊哉、高分子量型クロマチン因子の生産を指向したコリネ型細菌を宿主とする組み替えタンパク質発現系の開発、第 10 回日本蛋白質科学学会年会 (2010 年 6 月、札幌)
93. 千田美紀、西澤明人、木村成伸、福田雅夫、石田哲夫、千田俊哉、フェレドキシン還元酵素 BphA4 の pH に依存した構造変化の違い、第 10 回日本蛋白質科学学会年会 (2010 年 6 月、札幌)
94. 佐藤優花里、Prokop Zbynek、Brexovsky Jan、夏目亮、永田裕二、Damborsky Jiri、千田俊哉、ハロアルカン脱ハロゲン酵素 DbjA のエナンチオ選択性分子機構の解明、第 10 回日本蛋白質科学学会年会 (2010 年 6 月、札幌)
95. 千田俊哉、FAD の構造変化とフェレドキシン還元酵素の構造機能制御、第 10 回日本蛋白質科学学会年会 (2010 年 6 月、札幌)
96. 千田美紀、田中裕之、Venugopalan Nagarajan、石田哲夫、堀池喜八郎、千田俊哉、D-セリンデヒドラターゼの X 線結晶構造解析、BMB2010 (2010 年 12 月、神戸)
97. 佐藤優花里、Zbynek Prokop、Jan Brexovsky、夏目亮、永田裕二、Jiri Damborsky、千田俊哉、ハロカルカン脱ハロゲン酵素 DbjA の鏡像異性体選択性機構の解明、BMB2010 (2010 年 12 月、神戸)
98. 安達成彦、長澤貴俊、糟谷大介、光岡薫、石田哲夫、堀越正美、千田俊哉、TATA ボックス結合因子 TFIID 複合体による転写開始及び制御機構の解析、BMB2010 (2010 年 12 月、神戸)
99. 夏目亮、千田俊哉、高分子量型クロマチン因子の生産を指向したコリネ型細菌を宿主とする組替えタンパク質発現系の開発、BMB2010、(2010 年 12 月、神戸)
100. 千田俊哉、ヒストンシャペロン複合体の結晶構造解析、BMB2010 (2010 年 12 月、神戸)
101. 千田俊哉、Structure-Based Model of the Biological Signaling from Histone Modifications to Structural Change of the Nucleosome、International symposium on the physicochemical field for genetic activities (招待) (Jsn 2011, Awajishima)
102. 佐藤優花里、夏目亮、津田雅孝、永田裕二、千田俊哉、Optimization of the packing in the haloalkane dehalogenase crystal by seeding、26th European Crystallographic Meeting (Aug 2010, Darmstadt, Germany)
103. 千田美紀、木村成伸、石田哲夫、千田俊哉、Crystallization and structure determination of a transient electron transfer complex、2010 Annual Meeting of American Crystallographic Association ((Jul 2010, Chicago, USA)
104. 千田俊哉、千田美紀、木村成伸、石田哲夫、Redox-dependent conformational changes of NADH-dependent ferredoxin reductase under various conditions、2010 Annual Meeting of American Crystallographic Association (Jul 2010, Chicago, USA)
105. 安達成彦、千田俊哉、工藤紀雄、田之倉優、林陽平、佐野徳彦、堀越正美、赤井祐介、夏目亮、Structure of the histone chaperone CIA/ASF1-double bromodomain complex linking histone modifications and site-specific histone eviction、9th EMBL Conference Transcription and Chromatin (Aug 2010, Heidelberg, Germany)
106. Y. Fujiyoshi., Structural physiology of channels based on electron crystallography, Cold Spring Harbor Conference Asia (Membrane Protein: Structure & Function meeting) (May 2010, Suzhou, China)
107. Y. Fujiyoshi., Structural physiology of water and ion channels studied by electron crystallography (Plenary lecture), SCANDEM2010 (Jun 2010, Kista, Sweden)
108. Y. Fujiyoshi., Development of cryo-electron microscopes for high resolution electron crystallography, Seminar (Jun 2010, Stockholm, Sweden,)
109. Y. Fujiyoshi., Structural physiology of water and ion channels, Seminar (Jun 2010, Stockholm, Sweden)

110. 藤吉好則、(脳の分子レベルからの理解を目指した) 構造生理学の現状と展望、生体機能関連若手サマースクール (2010年7月、亀山)
111. Y. Fujiyoshi, Structural physiology based on electron crystallography (The Christian B. Anfinsen Award), The 24th Annual Symposium of The Protein Society, (Aug 2010, La Jolla, USA)
112. Y. Fujiyoshi., Structural physiology of ion and water channels based on electron crystallography, The Third K. H. Kuo Summer School of Electron microscopy and Crystallography “International Workshop of 3D Molecular Imaging Cryo-Electron Microscopy” (Aug 2010, Beijing, China)
113. 藤吉好則、創薬加速に向けたタンパク質構造解析基盤技術開発「電子線、X線により創薬加速技術開発の成果」、J B I C 2010 プロジェクト研究成果報告会 (2010年10月、東京)
114. Y. Fujiyoshi., Seeing is joy of discovering something new, JSPS Sweden-Japan Joint Colloquium “Direct Imaging in Bio/Medical Science” (Jan 2011, Lund, Sweden)
115. 藤吉好則、多機能性チャネルの構造と機能、自然科学研究機構岡崎統合バイオサイエンスセンター「10周年記念シンポジウム」 (2011年2月、岡崎)
116. Y. Fujiyoshi., Structure and function of water and ion channels, International Symposium on Bioimaging and Surface Sciences (Mar 2011, Hyogo)
117. 藤吉好則、電子線結晶学による構造生理学研究、構造生物シンポジウム (2011年3月、大阪)
118. 前田宜丈、納得! 膜タンパク質の精製方法とそれを用いた相互作用解析、BIA シンポジウム 2010、(2010年7月)
119. 木村泰久、松尾道憲、木岡紀幸、植田和光、ヒト多剤トランスポーター (MDR1) の基質認識におけるコレステロールの寄与: コレステロール充填モデル、第5回トランスポーター研究会年会 東京医科大学 (2010年7月)
120. Ryo Kanno, Yasuhisa Kimura, Kaoru Mitsuoka, Kazumitsu Ueda., Structural study of ATP-sensitive potassium channel using the electron microscopy., BMB2010 (Dec 2010, Kobe)
121. 菅野亮、木村泰久、松尾道憲、光岡薫、加藤博章、植田和光、KATP チャネル複合体の精製および単粒子構造解析、日本農芸化学会 2011 年度大会 (2011年3月、京都)
122. 石神正登、木村泰久、松尾道憲、植田和光、ヒト浮遊培養細胞を用いたヒト MDR3 の大量発現および精製、日本農芸化学会 2011 年度大会 (2011年3月、京都)
123. 竹田知世、木村泰久、植田和光、核内受容体 Liver X receptor の精製系の構築、日本農芸化学会 2011 年度大会 (2011年3月、京都)
124. T Hirai., Structure of the membrane domain of human AE1 revealed by electron crystallography, CSBMCB2010 (Canadian Society of Biochemistry, Molecular & Cellular Biology 53rd Annual Meeting on Membrane Proteins in Health and Disease) (Apr 2010, Banff, Canada)
125. 平井照久、赤血球膜輸送体 AE1 の電子線結晶構造解析、日本顕微鏡学会生体構造解析分科会 X (2010年12月、新潟)
126. Ikeda, T Yamaguchi, H Kuma, D Kang, N Hamasaki and T Hirai., Purification and two-dimensional crystallization of membrane domain of human erythrocyte AE1, CSBMCB2010 (Apr 2010, Banff, Canada)
127. 山口知宏、池田洋平、阿部義人、隈博幸、康東天、濱崎直孝 & 平井照久、ヒト赤血球 Anion exchanger1 膜貫通度ドメインの電子顕微鏡結晶構造解析、日本顕微鏡学会第 66 回学術講演会 2010 年 5 月、名古屋)
128. T Yamaguchi, Y Ikeda, Y Abe, H Kuma, D Kang, N Hamasaki and T Hirai., Three-dimensional structure of membrane domain of AE1 revealed by electron crystallography, Gordon Research Conference (Ligand Recognition and Molecular Gating) (May 2010, Il Ciocco, Italy)
129. 安井正人、アクアポリンの基礎と臨床、特に脳浮腫との関連において、第 52 回日本小児神経学会総会 (2010年5月、福岡)
130. 安井正人、神経科学の最先端 (2010年6月、高坂)
131. 安井正人、神経科学の最先端の知見、(2010年6月、新潟)
132. 安井正人、中枢神経系における水チャネル、アクアポリンの役割、第 12 回日本ヒト脳機能マッピング学会シンポジウム (2010年6月、東京)
133. 安井正人、尿濃縮機構の分子メカニズム、第 21 回日本夜尿症学会学術集会 (2010年6月、大阪)
134. 安井正人、上皮バリア機能の分子機構、BMB2010 (第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会) (2010年12月、神戸)
135. 安井正人、アクアポリン: 生体細胞膜における水透過性の制御、ARL forum 2010 環境分野におけるこれからの基礎研究 (2010年12月)

136. 藤吉好則、多機能性チャネルの構造生理学、京都大学再生医科学研究所 田畑研究室セミナー (2011年5月、京都)
137. 藤吉好則、遠くを見ると研究は楽しい、第64回社会と科学 (2011年5月、名古屋)
138. 藤吉好則、極低温電子顕微鏡による膜蛋白質や細胞接着蛋白質の構造、第11回日本蛋白質科学会年会 (2011年6月、大阪)
139. Y. Fujiyoshi., Strong Points of Electron Crystallography Shown in Water and Ion Channels, Gordon Research Conferences (Three Dimensional Electron Microscopy) (Jun 2011, New London, USA)
140. 藤吉好則、構造に導かれた創薬を目指す構造生理学の現状、創薬を目指した融合領域サマーセミナー2011～最先端メディスナルサイエンスの未来～ (2011年9月、名古屋)
141. 藤吉好則、構造に指南された創薬を目指す構造生理学の現状と展望-遠くを見ると研究は楽しい-、京都薬科大学第1回K P Uシンポジウム (2011年9月、京都)
142. 藤吉好則、電子線結晶学による膜タンパク質の構造解析に基づく機能研究、第84回日本生化学会大会 (2011年9月、京都)
143. 藤吉好則、膜タンパク質の生理機能を観る、理研A S I細胞システム研究コロキウム「細胞を観る・読む・計る」 (2011年12月、和光)
144. Y. Fujiyoshi., Take a long-term view (Early Bird Seminar), 第34回日本分子生物学会 (Dec 2011, Yokohama)
145. 藤吉好則、“ヒトの分子構造を観る、東京大学&京都大学グローバルCOEジョイント一般公開シンポジウム『生き物の個性を紐とく：かたち、かかわり、こころ』 (2011年1月、東京)
146. 三尾和弘、光岡薫、電子顕微鏡を用いたタンパク質立体構造解析 - 単粒子解析法と二次元結晶化法 -、第11回産総研・産技連LS-BT合同研究発表会 (2012年1月)
147. 三尾和弘、Structure of Intramembrane-cleaving proteases, Joint seminar_ National University of Singapore and Structural biology division of Japan EM (2012年1月、シンガポール)
148. 光岡薫、Structural analysis and functional implications from projection structures of membrane proteins, Joint seminar_ National University of Singapore and Structural biology division of Japan EM (2012年1月、シンガポール)
149. 三尾和弘、岸川淳一、中西温子、小笠原諭、岩田想、光岡薫、横山謙、好熱菌V型ATPaseのサブユニット再構成に関する研究、第37回生体エネルギー研究会討論会 (2011年12月)
150. 三尾和弘、松田知栄、三尾宗代、核内ラミンネットワークの電子顕微鏡構造解析、第34回日本分子生物学会年会 (2011年12月)
151. 光岡薫、低温電子顕微鏡による多様な試料の構造解析、生理研研究会「電子顕微鏡機能イメージングの医学・生物学への応用」 (2011年12月)
152. 光岡薫、電子線結晶構造解析による投影像から見た膜タンパク質の機能、第1回名古屋大学反応化学超高压電子顕微鏡ワークショップ (2011年11月)
153. Kazuhiro Mio, Toshihiko Ogura, Yuusuke Maruyama, Muneyo Mio and Chikara Sato., Depiction of 3D structure and assignment of functional subunits of membrane proteins using a transmission electron microscopy, 16th World Congress on Advances in Oncology and 14th International Symposium on Molecular Medicine (Jun 2011, Rhodos, Greek)
154. 三尾和弘、三尾宗代、有坂文雄、佐藤雅彦、佐藤主税、The C-terminal coiled-coil stabilizes subunit-to-subunit interactions of the bacterial voltage-gated sodium channel, NaChBac、第49回日本生物物理学会年会 (2011年9月)
155. 刑部伸彦、光岡薫、Projection Structure of Aquaporin-3、第49回日本生物物理学会年会 (2011年9月)
156. 三尾和弘、核内ラミンネットワークの電子顕微鏡構造解析、第11回日本蛋白質科学会年会 (2011年6月)
157. 三尾和弘、電子顕微鏡を用いた核内ラミンネットワークの構造解析、日本分子生物学会第11回春季シンポジウム (2011年5月)
158. 青山佳敬、近藤行人、光岡薫、単粒子解析によるシャペロンの構造観察、日本顕微鏡学会第67回学術講演会 (2011年5月)
159. 光岡薫、佐伯泰、田中啓治、糟屋大介、GraFixによる26Sプロテアソームの単粒子解析試料作製、日本顕微鏡学会第67回学術講演会 (2011年5月)

160. 三尾和弘、核内ラミンネットワークの電子顕微鏡構造解析、日本顕微鏡学会第 67 回学術講演会 (2011 年 5 月)
161. 佐藤優花里、Molecular bases of enantioselectivity of haloalkane dehalogenase DbjA、2011 Annual meeting of American Crystallographic Association、(2011 年 5 月、ニューオリンズ、米国)
162. 千田俊哉、クライオ条件と変異体を用いた結晶の質の改善、第 11 回日本蛋白質科学会年会 (2011 年 6 月、大阪)
163. 安達成彦、長澤貴俊、糟屋大介、光岡薫、石田哲夫、堀越正美、千田俊哉、TATA ボックス結合因子 TFIID による転写活性化の分子機構の解析、第 11 回日本蛋白質科学会年会 (2011 年 6 月大阪)
164. 千田美紀、田中裕之、ベヌゴパラン・ナガラジャン、山本篤、石田哲夫、堀池喜八郎、千田俊哉、D-セリンデヒドラターゼの X 線結晶構造解析、第 11 回日本蛋白質科学会年会、(2011 年 6 月大阪)
165. 千田俊哉、夏目亮、赤井祐介、安達成彦、林陽平、栄徳勝光、佐野徳彦、堀越正美、-20- Crystal structures of histone chaperone CIA/ASF1-containing complexes.、IUCr2011 (2011 年 8 月、マドリッド、スペイン)
166. 千田美紀、田中裕之、ベヌゴパラン・ナガラジャン、山本篤、石田哲夫、堀池喜八郎、千田俊哉、Crystal structure of a Zinc-dependent D-serine dehydratase from chicken kidney.、IUCr2011 (2011 年 8 月、マドリッド、スペイン)
167. 原田彩佳、千田美紀、杉山敬亮、西澤明人、福田雅夫、木村成伸、千田俊哉、フェレドキシン還元酵素 BphA4 の NADH/NADPH 特異性変換の構造的基盤、第 84 回日本生化学会大会 (2011 年 9 月京都)
168. 千田美紀、西澤明人、木村成伸、石田哲夫、福田雅夫、千田俊哉、フェレドキシン還元酵素 BphA4 の反応サイクルの解析、第 84 回日本生化学会大会 (2011 年 9 月京都)
169. 田中裕之、千田美紀、ベヌゴパラン・ナガラジャン、山本篤、千田俊哉、石田哲夫、堀池喜八郎、第 84 回日本生化学会大会 (2011 年 9 月、京都)
170. 杉本敬祐、千田美紀、小笠原望巳、笠井大輔、政井英司、福田雅夫、千田俊哉、リグニン分解菌由来 extradiol 型二原子酸素添加酵素 DesB の触媒反応機構、第 84 回日本生化学会大会 (2011 年 9 月、京都)
171. 長澤貴俊、安達成彦、千田俊哉、転写基本因子 TAF7 の結晶化に向けた精製、第 84 回日本生化学会大会 (2011 年 9 月、京都)
172. 千田俊哉、ヒストンシャペロン複合体の結晶構造とヌクレオソーム構造変換、日本結晶学会年会 (2011 年 11 月、札幌)
173. 千田美紀、千田俊哉、結晶化スクリーニングのスピードアップに有効な観察方法「すぐ見る法」、日本結晶学会年会 (2011 年 11 月、札幌)
174. 安達成彦、長澤貴俊、糟谷大介、光岡薫、石田哲夫、堀越正美、千田俊哉、Analysis of the mechanisms of transcriptional activation by TFIID、第 34 回日本分子生物学会年会 (2011 年 12 月、横浜)
175. 千田美紀、タンパク質の結晶化における一工夫、構造エピゲノム研究会第 6 回ワークショップ (2012 年 3 月、横浜)
176. 杉尾成俊、重水素化蛋白質の調製、平成 23 年度生物構造学研究会 (2011 年 12 月)
177. 中尾俊史、浜まさ子、平瀬寒月、A2'変異型 Drosophila RDL GABA 受容体に対するアンタゴニストの作用、日本農薬学会第 37 回大会 (2012 年 3 月、岡山)
178. 木村泰久、菅野亮、松尾道憲、木岡紀幸、光岡薫、加藤博章、植田和光、ヒト培養細胞による哺乳類膜タンパク質の大量発現系、トランスポーター研究会年会 (2011 年度)
179. 石神正登、富永優子、木村泰久、植田和光、キメラタンパク質を用いたヒト MDR1 および MDR3 の基質認識機構の解析、日本生化学会大会 (2011 年度)
180. 木村泰久、菅野亮、松尾道憲、木岡紀幸、光岡薫、加藤博章、植田和光、ヒト培養細胞による哺乳類膜タンパク質の大量発現系構築、日本生化学会大会 (2011 年度)
181. 市川尚文、山下寛、木村泰久、植田和光、木岡紀幸、ビネキシンはビンキュリン-21- とアクチン繊維の複合体形成を促進する、日本生化学会大会 (2011 年度)

182. 長尾耕治郎、高橋圭、吾妻佑哉、木村泰久、松尾道憲、木岡紀幸、植田和光、ATP加水分解に依存した ABCA1 の細胞外領域の構造変化が apoA-I との結合に必須である、日本生化学会大会 (2011 年度)
183. 平山裕士、木村泰久、松尾道憲、木岡紀幸、植田和光、ヒト ABCG1 の精製・活性評価系の構築、日本生化学会大会 (2011 年度)
184. 菅野亮、木村泰久、光岡薫、植田和光、KATP チャネル複合体の精製および単粒子電子顕微鏡解析、日本生化学会大会 (2011 年度)
185. 永岩耕太、長尾耕治郎、木村泰久、松尾道憲、木岡紀幸、植田和光、ABCA1 の C 末端領域ロイシンジッパー様モチーフによる機能制御、日本生化学会大会 (2011 年度)
186. 竹田知世、木村泰久、木岡紀幸、植田和光、大腸菌発現系による核内受容体 Liver X receptor の発現・精製、日本生化学会大会 (2011 年度)
187. 木村泰久、菅野亮、松尾道憲、木岡紀幸、光岡薫、加藤博章、植田和光、ヒト培養細胞を用いた哺乳類膜タンパク質大量発現系の構築-KATP チャネル複合体の精製、第 37 回 日本生体エネルギー研究会
188. 長尾耕治郎、木村泰久、松尾道憲、木岡紀幸、植田和光、高密度リポタンパク質(HDL)産生機構の解析① ABCA1 の ATP に依存した構造変化と apoA-I 結合、日本農芸化学会 関西・中部支部合同大会 (2011 年度)
189. 大貫元、木村泰久、松尾道憲、木岡紀幸、植田和光、昆虫細胞を用いたヒト ABCB6 の大量発現および精製、2012 年度日本農芸化学会 (2012 年 3 月)
190. 木村泰久、菅野亮、松尾道憲、木岡紀幸、光岡薫、加藤博章、植田和光、ヒト培養細胞を用いた哺乳類膜タンパク質大量生産系-KATP チャネル複合体の精製、2012 年度日本農芸化学会 (2012 年 3 月)
191. 平山裕士、木村泰久、松尾道憲、木岡紀幸、植田和光、ヒト ABCG1 の精製および活性評価、2012 年度日本農芸化学会、(2012 年 3 月)
192. Ryo Kanno, Yasuhisa Kimura, Kaoru Mitsuoka, Kazumitsu Ueda., Structural analysis of ATP-sensitive potassium channel using the single particle analysis, Gordon Research Conferences 「Three Dimensional Electron Microscopy」 (2011, USA)
193. Yasuhisa Kimura, Ryo Kanno, Michinori Matsuo, Noriyuki Kioka, Kaoru Mitsuoka, Hiroaki Kato, Kazumitsu Ueda., Expression, purification and structural analysis of KATP channel, 4th FEBS Special Meeting on ABC Proteins - ABC2012 (Innsbruck, Austria)
194. Hiroshi Hirayama, Yasuhisa Kimura, Michinori Matsuo, Noriyuki Kioka, Kazumitsu Ueda, Purification and functional analysis of human ABCG1 expressed in human cultured cells, 4th FEBS Special Meeting on ABC Proteins - ABC2012 (Innsbruck, Austria)
195. Hirai T., Gordon Research Conference (Red Cell) "Three-Dimensional Structure of AE1 Membrane Domain Revealed by Electron Crystallography", Proctor Academy, - 2 2 - NH, US (Jul 2011)
196. 安井正人、Perinatal dynamism of water balance and role of aquaporin、11th Asian Congress of Pediatric Nephrology、The 46th Annual Meeting of Japanese Society for Pediatric Nephrology (Jun 2011)
197. 安井正人、AQP と脳水腫、北京大学医学部特別講演会 (2011 年 8 月)
198. 安井正人、Water Biology、International Conference "Water and Nanomedicine" Academy of Sciences and Arts of Republic of Srpska Banja Luka Roles of aquaporins in water dynamics of the cells (Aug 2011)
199. 安井正人、Water Biology:水分子ナノ動態から高次脳機能に迫る、創薬薬理フォーラム第 19 回シンポジウム (2011 年 9 月)
200. 安井正人、Water Biology:水分子ナノ動態から高次脳機能に迫る、第 5 回トランスポーター研究会九州部会 (2011 年 9 月)
201. 安井正人、Roles of AQP4 in brain disorders, The First World Congress on Water Channel Proteins (Aquaporins and Relatives) Celebrating the 25th Anniversary of the Discovery of the First Water Channel Protein (Later Called Aquaporin 1) (Oct 2011)
202. 藤吉好則、イオンと水チャネルの構造と機能、大学院講義医学共通講義Ⅶ神経科学入門 (2012 年 5 月、東京)
203. 藤吉好則、水チャネルの構造と機能、理事長ファンド指定型 「水科学」 ワークショップ 『水の多様性を極める』 -水科学の現在と未来- (2011 年 5 月、和光)
204. 藤吉好則、チャネルの構造と機能、第 7 回トランスポーター研究会年会 (2011 年 6 月、京都)

205. 藤吉好則、分子構造からヒトを理解するために、第 11 回先端医療センターMonthly Lecture (2011 年 6 月、神戸)
206. 藤吉好則、個性や能力を分子レベルから観る、生きるちからとわざ (2011 年 7 月、名古屋)
207. Miki Senda, Toshiya Senda., Improve the efficiency and reproducibility of protein crystallization, American Crystallographic Association (ACA) 2012 (Jul 2012, Boston, MA)
208. 藤吉好則、膜タンパク質の形と働きを観る、日本生物物理学会 (2011 年 9 月、名古屋)
209. 藤吉好則、水とイオンチャネルの構造生理学、レオロジー学会 (2012 年 9 月、名古屋)
210. 藤吉好則、Structural Physiology of channels、プレナリーレクチャー・動物細胞工学会 (2012 年 11 月、名古屋)
211. 藤吉好則、分子構造からヒトを理解するために、生物物理若手の会 (2012 年 12 月、名古屋)
212. 藤吉好則、Key technology for structure-guided drug development、Nagoya Symposium (2013 年 1 月、名古屋)
213. 千田美紀、千田俊哉、「すぐ見る法」による蛋白質の結晶化 ～スクリーニングの効率と再現性の向上に向けて、蛋白質科学会 (2012 年 6 月、名古屋)
214. 安達成彦、相沢恭平、長澤貴俊、糟屋大介、光岡薫、石田哲夫、堀越正美、千田俊哉、転写基本因子 TFIID を中心とした転写活性化の分子機構の解析、第 12 回日本蛋白質科学会年会 (2012 年 6 月、名古屋)
215. 千田俊哉、Structure and function analysis of CagA from *Helicobacter pylori*. Dept. of Internal Medicine, Division of Hematology/Oncology Special Seminar (Aug 2012, Cincinnati, OH)
216. Naruhiko Adachi, Kyohei Aizawa, Masami Horikoshi, Toshiya Senda, Purification and crystallization of TAF subunits of general transcription initiation factor TFIID., Cold Spring Harbor Laboratory Meeting: Epigenetics & Chromatin (Sep 2012, Cold Spring Harbor, NY)
217. 千田俊哉、Structure and function analysis of CagA from *Helicobacter pylori* (2012 年 9 月、京都)
218. 千田美紀、クライオプロテクトメントを用いた「結晶工学的処理」による *Helicobacter pylori* 由来 CagA 結晶の改善、蛋白研セミナー (2012 年 9 月、吹田)
219. 千田俊哉、Tertiary structure and functional analysis of the *Helicobacter pylori* CagA oncoprotein., The 3rd international symposium on drug discovery and design by NMR (Oct 2012, Yokohama)
220. 佐藤優花里、千田俊哉、タンパク質の結晶化におけるシーディングの効果、第 85 回日本生化学会大会 (2012 年 12 月、福岡)
221. Yukari Sato, Yusuke Akai, Toshiya Senda., Expression and purification of histone chaperone HIRA, Nagoya Symposium Frontiers in Structural Physiology (Jan 2013, Nagoya)
222. 光岡薫、糟屋大介、佐伯泰、安永卓生、極低温電子顕微鏡による 26S プロテアソームの単粒子解析、第 50 回日本生物物理学会 (2012 年 9 月、名古屋)
223. 三尾和弘、杉木俊彦、三尾宗代、松田知栄、林由起子、Electron microscopy of oligomerization function of nuclear lamin A and the laminopathic mutants、第 50 回日本生物物理学会 (2012 年 9 月、名古屋)
224. 大和田尚、金子萌、松本千恵子、三尾和弘、内田茂治、佐竹正博、田所憲治、Establishment of Culture System for Hepatitis E Virus (HEV) Genotypes 3 and 4 Originating from Human Blood, and Application of this System to the Assessment of HEV Infectious Titer、AABB Annual Meeting & CTTXPO 2012 (Oct 2012, Boston, USA)
225. 大和田尚、金子萌、松本千恵子、三尾和弘、松林圭二、五十嵐正志、内田茂治、佐竹正博、田所憲治、異なる密度を有する 2 種類の E 型肝炎ウイルス (HEV) について、そのウイルス学的違いの検討、第 60 回日本ウイルス学会学術集会 (2012 年 11 月、大阪)
226. 三尾和弘、山下隼人、杉木俊彦、三尾宗代、松田知栄、相馬義郎、林由起子、電子顕微鏡と高速 AFM により明らかになった核ラミンの動的構造変化、第 35 回日本分子生物学会年会 (2012 年 12 月、福岡)
227. 木村泰久、菅野亮、松尾道憲、木岡紀幸、光岡薫、加藤博章、植田和光、K_{ATP} チャネル複合体の単粒子解析、日本顕微鏡学会第 68 回研究会 (招待講演) (2012 年 5 月、筑波)
228. Yasuhisa Kimura, Ryo Kanno, Michinori Matsuo, Noriyuki Kioka, Kaoru Mitsuoka, Hiroaki Kato, Kazumitsu Ueda., Purification and single particle analysis of K_{ATP} channel expressed in human cultured cells, "Membrane Transport Proteins" Gordon Research Conference (Jul 2012, Le diablerets, Switzerland)
229. Hiroshi Hirayama, Yasuhisa Kimura, Michinori Matsuo, Noriyuki Kioka, Kazumitsu Ueda., Functional analysis of purified ABCG1 expressed in human cultured cells, ASBMB: Frontiers in Lipid Biology (Sep 2012, Banff, Canada)

230. Yasuhisa Kimura, Ryo Kanno, Michinori Matsuo, Noriyuki Kioka, Kaoru Mitsuoka, Hiroaki Kato, Kazumitsu Ueda, ATP 感受性カリウムチャンネル複合体の精製と単粒子解析によるサブユニット構造決定, Purification of ATP sensitive potassium channel complex and determination of subunit structure by single particle analysis, 第 35 回日本分子生物学会年会ワークショップ (Dec 2012, Fukuoka)
231. 大貫元、木村泰久、松尾道憲、木岡紀幸、植田和光、ヒト ABCB6 の精製と機能解析、Purification and functional analysis of human ABCB6、第 85 回日本生化学会大会 (2012 年 12 月、福岡)
232. 井上修一、木村泰久、木岡紀幸、松尾道憲、植田和光、 K_{ATP} チャンネル複合体のサブユニット間相互作用部位の探索、Analysis of interaction site between K_{ATP} channel subunits.、第 85 回日本生化学会大会 (2012 年 12 月、福岡)
233. Yasuhisa Kimura, Ryo Kanno, Michinori Matsuo, Noriyuki Kioka, Kaoru Mitsuoka, Hiroaki Kato, Kazumitsu Ueda, Development of the production system of K_{ATP} channel for structural studies., Nagoya Symposium - Frontiers in Structural Physiology (Jan 2013, Nagoya)
234. 中尾俊史、昆虫 RDL GABA 受容体アンタゴニストとその抵抗性機序医薬品候補、NIAS シンポジウム「ポストゲノム時代の害虫防除研究のあり方」第 5 回殺虫剤抵抗性問題の最前線 (招待講演) (2012 年 11 月、東京)
235. 中尾俊史、浜まさ子、平瀬寒月、A2'変異型 *Drosophila* RDL GABA 受容体に対するアンタゴニストの作用、日本農薬学会 (学会発表) (2012 年 3 月、岡山)
236. 木村泰久、平山裕士、浅見成美、木岡紀幸、松尾道憲、加藤博章、植田和光、ヒト培養細胞を用いたヒト ABC トランスポーターの大量発現系の構築および精製条件スクリーニング手法の開発、BMB2008 (第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会合同大会) (2008 年 12 月)
237. 佐藤友美、小段篤史、木村泰久、植田和光、中津亨、加藤博章、多剤排出トランスポーター P 糖タンパク質のリンカー領域の薬物輸送における役割、日本薬学会 第 129 回年会 (2009 年 3 月)
238. 平山裕士、木村泰久、松尾道憲、木岡紀幸、植田和光、ヒト ABCG1 の大量培養系の構築・安定化条件の探索、日本農芸化学会 2009 年度大会 (2009 年 3 月)
239. 金岡怜志、木村泰久、植田和光、赤松 美紀、P-糖タンパク質と Gramicidin S 類縁体との相互作用、日本農芸化学会 2009 年度大会 (2009 年 3 月)
240. 長尾耕治郎、趙禹、木村泰久、植田和光、ABCA1 による HDL 形成における 4 つのステップ、日本農芸化学会 2009 年度大会 (2009 年 3 月)
241. 宝蔵寺賢子、木村泰久、松尾道憲、木岡紀幸、植田和光、コレステロール恒常性に関与する ABCA1 の分子内ジスルフィド結合の解析、日本農芸化学会 2009 年度大会 (2009 年 3 月)
242. 木村泰久、平山裕士、松尾道憲、木岡紀幸、加藤博章、植田和光、ヒト培養細胞を用いた ATP 感受性カリウムチャンネル複合体の大量生産、高純度精製、日本農芸化学会 2009 年度大会 (2009 年 3 月)
243. Yasuhisa Kimura, Hiroaki Kato, Kazumitsu Ueda., Large scale production and purification of K_{ATP} channel in mammalian cells, タケダシンポジウム (May 2009)
244. 菅野亮、木村泰久、光岡薫、植田和光、単粒子解析法を用いた ATP 感受性カリウムチャンネルの構造研究、第 82 回日本生化学会大会 (2009 年 10 月)
245. 平山裕士、木村泰久、松尾道憲、木岡紀幸、植田和光、ヒト ABCG1 の大量培養・精製系の構築、第 82 回日本生化学会大会 (2009 年 10 月)
246. 木村泰久、平山裕士、木岡紀幸、松尾道憲、加藤博章、植田和光、ヒト培養細胞を用いた ATP 感受性カリウムチャンネルの大量発現・精製手法の開発、第 82 回日本生化学会大会 (2009 年 10 月)
247. 宝蔵寺賢子、木村泰久、松尾道憲、木岡紀幸、植田和光、コレステロール恒常性に関与する ABCA1 の分子内ジスルフィド結合の解析、第 82 回日本生化学会大会 (2009 年 10 月)
248. Yasuhisa Kimura, Ryo Kanno, Michinori Matsuo, Hiroaki Kato and Kazumitsu Ueda., Large scale production and purification of ATP-sensitive potassium channels in cultured human cells, 3rd FEBS special meeting "ATP-Binding Cassette (ABC) Proteins: From Multidrug Resistance to Genetic Diseases" (Feb 2010)
249. 平山裕士、木村泰久、松尾道憲、木岡紀幸、植田和光、ヒト培養細胞を用いたヒト ABCG1 の大量培養および高純度精製、日本農芸化学会 2010 年度大会 (2010 年 3 月)
250. 木村泰久、菅野亮、松尾道憲、光岡薫、加藤博章、植田和光、ヒト浮遊培養細胞を用いた K_{ATP} チャンネル複合体の精製および機能評価、日本農芸化学会 2010 年度大会 (2010 年 3 月)

251. 木村泰久、松尾道憲、木岡紀幸、植田和光、ヒト多剤トランスポーター (MDR1) の基質認識におけるコレステロールの寄与：コレステロール充填モデル、第5回トランスポーター研究会年会 招待講演 (2010年7月)
252. Ryo Kanno, Yasuhisa Kimura, Kaoru Mitsuoka, Kazumitsu Ueda., Structural study of ATP-sensitive potassium channel using the electron microscopy., BMB2010 (2010年12月)
253. 菅野亮、木村泰久、松尾道憲、光岡薫、加藤博章、植田和光、KATP チャネル複合体の精製および単粒子構造解析、日本農芸化学会 2011 年度大会 (2011年3月、京都)
254. 石神正登、木村泰久、松尾道憲、植田和光、ヒト浮遊培養細胞を用いたヒト MDR3 の大量発現および精製、日本農芸化学会 2011 年度大会 (2011年3月、京都)
255. 竹田知世、木村泰久、植田和光、核内受容体 Liver X receptor β の精製系の構築、日本農芸化学会 2011 年度大会 (2011年3月、京都)
256. 木村泰久、菅野亮、松尾道憲、木岡紀幸、光岡薫、加藤博章、植田和光、ヒト培養細胞による哺乳類膜タンパク質の大量発現系、第6回トランスポーター研究会年会 (2011年6月、仙台)
257. Ryo Kanno, Yasuhisa Kimura, Kaoru Mitsuoka, Kazumitsu Ueda., Purification and single-particle structural analysis of KATP channel complexes, Gordon Research Conferences on Three Dimensional Electron Microscopy (2011年6月、New London NH United States)
258. 石神正登、富永優子、木村泰久、植田和光、Analysis of substrate recognition mechanism of human MDR1 and MDR3 using a chimera protein、第84回日本生化学会大会 (2011年9月、京都)
259. 木村泰久、菅野亮、松尾道憲、木岡紀幸、光岡薫、加藤博章、植田和光、Large scale production and purification of mammalian membrane proteins in human cells、第84回日本生化学会大会 (2011年9月、京都)
260. 平山裕士、木村泰久、松尾道憲、木岡紀幸、植田和光、Purification and functional analysis of human ABCG1 in cultured human cells、第84回日本生化学会大会 (2011年9月、京都)
261. 竹田知世、木村泰久、木岡紀幸、植田和光、2 Purification of liver X receptor β expressed in E. coli、第84回日本生化学会大会、(2011年9月、京都)
262. Masato Ishigami, Yuko Tominaga, Yasuhisa Kimura, Kazumitsu Ueda., Analysis of substrate recognition mechanism of human MDR1 and MDR3 using a chimera protein, Kakenhi Kiban(s)/iCeMS Joint International Symposium"ABC2011 in Kyoto-ABC Proteins/Membrane Meso-domains/ES-iPS cells" (Nov 2011, Kyoto)
263. 木村泰久、菅野亮、松尾道憲、木岡紀幸、光岡薫、加藤博章、植田和光、Large scale production and purification of mammalian membrane proteins in human cells – a case study of KATP channel complex –, 第37回 日本生体エネルギー研究会 (2011年12月、京都)
264. Yasuhisa Kimura, Ryo Kanno, Michinori Matsuo, Noriyuki Kioka, Kaoru Mitsuoka, Hiroaki Kato, Kazumitsu Ueda., Expression, purification and structural analysis of KATP channel, 4th FEBS Special Meeting on ABC Proteins - ABC2012 (Mar 2012, Innsbruck, Austria)
265. 大貫元、木村泰久、松尾道憲、木岡紀幸、植田和光、Large scale expression and purification of human ABCB6 in insect cells、2012 年度日本農芸化学会 (2012年3月、京都)
266. 木村泰久、菅野亮、松尾道憲、木岡紀幸、光岡薫、加藤博章、植田和光、ヒト培養細胞を用いた哺乳類膜タンパク質大量生産系-KATP チャネル複合体の精製-、Large scale production and purification of mammalian membrane proteins in human cells – purification of KATP channel complex –, 2012 年度日本農芸化学会 (2012年3月、京都)
267. 平山裕士、木村泰久、松尾道憲、木岡紀幸、植田和光、ヒト ABCG1 の精製および活性評価 Purification of human ABCG1 and its functional analysis、2012 年度日本農芸化学会 (2012年3月、京都)
268. Hirai T., Structure and transport mechanism of the bacterial oxalate transporter, ISDSB2007 (2nd International Symposium on Diffraction Structural Biology 2007) (Sep 2007, Tokyo)
269. 平井照久、電子顕微鏡による生体高分子の立体構造解析、生理学研究所 (2009年9月、岡崎) Yamaguchi Y., Helical image reconstruction of the membrane domain of human AE1 in tubular crystals, CSBMCB2010 (Canadian Society of Biochemistry, Molecular & Cellular Biology 53rd Annual Meeting on Membrane Proteins in Health and Disease) (Apr 2010, Banff, Canada)
270. Hirai T., Structure of the membrane domain of human AE1 revealed by electron crystallography, CSBMCB2010 (Canadian Society of Biochemistry, Molecular & Cellular Biology 53rd Annual Meeting on Membrane Proteins in Health and Disease) (Apr 2010, Banff, Canada)

271. 平井照久、X 赤血球膜輸送体 AE1 の電子線結晶構造解析、日本顕微鏡学会 生体構造解析分科会 (2010 年 12 月、新潟)
272. Hirai T., Three-Dimensional Structure of AE1 Membrane Domain Revealed by Electron Crystallography, Gordon Research Conference (Red Cell) (Jul 2011, NH, US)
273. 山口知宏、藤井高志、安部義人、平井照久、難波啓一、康東天、濱崎直孝 & 光岡薫、ヒト赤血球膜蛋白質 Band3 膜貫通ドメインの極低温電子顕微鏡構造解析、日本顕微鏡学会第 64 回学術講演会 (2008 年 5 月、京都)
274. 太田安美、小林一美、廣明洋子、平井照久 & 藤吉好則、極低温電子線トモグラフィによるシナプス結合部位の三次元構造解析、日本顕微鏡学会第 64 回学術講演会 (2008 年 5 月、京都)
275. 池田洋平、清水哲哉 & 平井照久、シュウ酸イオントランスポータの原子分解能の構造解析に向けて、第 48 回生物物理若手の会夏の学校 (2008 年 7 月、東京)
276. 山口知宏、廣明洋子、康東天、濱崎直孝、藤吉好則 & 平井照久、ヒト赤血球膜蛋白質バンド 3 膜貫通ドメインの電子線結晶構造解析、日本生物物理学会第 46 回年会 S141 (2008 年 12 月)
277. 山口知宏、廣明洋子、康東天、濱崎直孝、藤吉好則 & 平井照久、ヒト赤血球膜蛋白質バンド 3 膜貫通ドメインの電子線結晶構造解析、日本顕微鏡学会第 65 回学術講演会 (2009 年 5 月、仙台)
278. 太田安美、西川幸希、小林一美、廣明洋子、平井照久 & 藤吉好則、電子線トモグラフィによる電気シナプス結合部位の三次元構造の観察、日本顕微鏡学会第 65 回学術講演会 (2009 年 5 月、仙台)
279. 山口知宏、廣明洋子、池田洋平、康東天、濱崎直孝、藤吉好則 & 平井照久、電子線結晶解析によって明らかになったヒト赤血球膜蛋白質バンド 3 膜貫通ドメインの立体構造、日本生物物理学会第 47 回年会 (2009 年 10 月、徳島)
280. Ikeda Y, Yamaguchi T, Kuma H, Kang D, Hamasaki N & Hirai T., Towards structural elucidation of human erythrocyte anion exchanger 1 (AE1), CSBMCB2010(Canadian Society of Biochemistry, Molecular & Cellular Biology 53rd Annual Meeting on Membrane Proteins in Health and Disease) (Apr 2010, Banff, Canada)
281. 山口知宏、池田洋平、阿部義人、隈博幸、康東天、濱崎直孝 & 平井照久、ヒト赤血球 Anion exchanger1 膜貫通ドメインの電子顕微鏡結晶構造解析、日本顕微鏡学会第 66 回学術講演会 (2010 年 5 月、名古屋)
282. T Yamaguchi, Y Ikeda, Y Abe, H Kuma, D Kang, N Hamasaki and T Hirai., Three-dimensional structure of membrane domain of AE1 revealed by electron crystallography, Gordon Research Conference (Ligand Recognition and Molecular Gating) (May 2010, Il Ciocco, Italy)
283. Hirai T., Structure and transport mechanism of the bacterial oxalate transporter, ISDSB2007 (2nd International Symposium on Diffraction Structural Biology 2007), (Sep 2007, Tokyo)
284. 平井照久、電子顕微鏡による生体高分子の立体構造解析、生理学研究所 (2009 年 9 月、岡崎)
285. Yamaguchi Y., Helical image reconstruction of the membrane domain of human AE1 in tubular crystals, CSBMCB2010 (Canadian Society of Biochemistry, Molecular & Cellular Biology 53rd Annual Meeting on Membrane Proteins in Health and Disease) (Apr 2010, Banff, Canada)
286. Hirai T., Structure of the membrane domain of human AE1 revealed by electron crystallography, CSBMCB2010 (Canadian Society of Biochemistry, Molecular & Cellular Biology 53rd Annual Meeting on Membrane Proteins in Health and Disease) (Apr 2010, Banff, Canada)
287. 平井照久、X 赤血球膜輸送体 AE1 の電子線結晶構造解析、日本顕微鏡学会 生体構造解析分科会 (2010 年 12 月、新潟)
288. Hirai T., Three-Dimensional Structure of AE1 Membrane Domain Revealed by Electron Crystallography, Gordon Research Conference (Red Cell) (Jul 2011, NH, US)
289. 山口知宏、藤井高志、安部義人、平井照久、難波啓一、康東天、濱崎直孝 & 光岡薫、ヒト赤血球膜蛋白質 Band3 膜貫通ドメインの極低温電子顕微鏡構造解析、日本顕微鏡学会第 64 回学術講演会 (2008 年 5 月、京都)
290. 太田安美、小林一美、廣明洋子、平井照久 & 藤吉好則、極低温電子線トモグラフィによるシナプス結合部位の三次元構造解析、日本顕微鏡学会第 64 回学術講演会 (2008 年 5 月、京都)
291. 池田洋平、清水哲哉 & 平井照久、シュウ酸イオントランスポータの原子分解能の構造解析に向けて、第 48 回生物物理若手の会夏の学校 (2008 年 7 月、東京)
292. 山口知宏、廣明洋子、康東天、濱崎直孝、藤吉好則 & 平井照久、ヒト赤血球膜蛋白質バンド 3 膜貫通ドメインの電子線結晶構造解析、日本生物物理学会第 46 回年会 S141 (2008 年 12 月)

293. 山口知宏、廣明洋子、康東天、濱崎直孝、藤吉好則 & 平井照久、ヒト赤血球膜蛋白質バンド3膜貫通ドメインの電子線結晶構造解析、日本顕微鏡学会第65回学術講演会（2009年5月、仙台）
294. 太田安美、西川幸希、小林一美、廣明洋子、平井照久 & 藤吉好則、電子線トモグラフィによる電気シナプス結合部位の三次元構造の観察、日本顕微鏡学会第65回学術講演会（2009年5月、仙台）
295. 山口知宏、廣明洋子、池田洋平、康東天、濱崎直孝、藤吉好則 & 平井照久、電子線結晶解析によって明らかになったヒト赤血球膜蛋白質バンド3膜貫通ドメインの立体構造、日本生物物理学会第47回年会（2009年10月、徳島）
296. Ikeda Y, Yamaguchi T, Kuma H, Kang D, Hamasaki N & Hirai T., Towards structural elucidation of human erythrocyte anion exchanger 1 (AE1), CSBMCB2010(Canadian Society of Biochemistry, Molecular & Cellular Biology 53rd Annual Meeting on Membrane Proteins in Health and Disease) (Apr 2010, Banff, Canada)
297. 山口知宏、池田洋平、阿部義人、隈博幸、康東天、濱崎直孝 & 平井照久、ヒト赤血球 Anion exchanger1 膜貫通度ドメインの電子顕線結晶構造解析、日本顕微鏡学会第66回学術講演会（2010年5月、名古屋）
298. T Yamaguchi, Y Ikeda, Y Abe, H Kuma, D Kang, N Hamasaki and T Hirai., Three-dimensional structure of membrane domain of AE1 revealed by electron crystallography, Gordon Research Conference (Ligand Recognition and Molecular Gating) (May 2010, Il Ciocco, Italy)
299. 安井正人、アクアポリンの基礎と臨床、特に脳浮腫との関連において、第52回日本小児神経学会総会（2010年5月、福岡）
300. 慶応大学、上皮バリア機能の分子機構：上皮組織による生体フロントラインバリア構築、BMB2010第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会合同大会ワークショップ（2010年12月、神戸）
301. 慶応大学、Perinatal dynamism of water balance and role of aquaporin, 11th Asian Congress of Pediatric Nephrology・The 46th Annual Meeting of Japanese Society for Pediatric Nephrology (Jun 2011, Fukuoka)
302. 慶応大学、Regulation, structure and function of brain aquaporins, 第1回 Brain Aquaporin (2008年6月、オスロ、ノルウェー)
303. 慶応大学、The First World Congress on Water Channel Proteins (Aquaporins and Relatives) Celebrating the 25th Anniversary of the Discovery of the First Water Channel Protein (Later Called Aquaporin 1), CLUJ-NAPOCA, ROMANIA, Roles of AQP4 in brain disorders (Oct 2011)
304. 嶋田一夫、核磁気共鳴法を用いた相互作用解析法、生体有機セミナー（2008年4月、東京）
305. 嶋田一夫、NMR approach for interaction analysis of larger proteins、XXII Paulo foundation symposium: INPEC 2008 (Jun 2008, Naantali, Finland)
306. 嶋田一夫、NMR approach for interaction analysis of larger proteins, Structural Biology Seminar i (Jun 2008, Helsinki, Finland)
307. 嶋田一夫、核磁気共鳴法を用いた高分子量タンパク質複合体の相互作用解析、日本生化学会関東支部例会（2008年6月、群馬）
308. 嶋田一夫、NMR approach for interaction analysis of larger proteins、IARU-Global Summer Program (Jul 2008 Tokyo)
309. 嶋田一夫、NMRによる細胞膜表層系構造生物学、蛋白研セミナー「先端磁気共鳴がもたらす生体系研究の新展開」（2008年7月、大阪）
310. 嶋田一夫、NMR approach for interaction analysis of larger proteins、ICMRBS (Aug 2008, San Diego, California, USA)
311. 嶋田一夫、Protein-protein interaction by NMR、EMBO WS (Sep 2008, Beijing, China)
312. 嶋田一夫、NMR Study on Protein Ligand Interaction、The 22nd Naito Conference on“Chemical Biology” (Sep 2008, Sapporo)
313. 嶋田一夫、Theoretical Analysis of Transferred Cross-saturation Methods and Model Building of Protein Complexes by using NMR、The 8th KIAS - Yonsei Conference on Protein Structure and Function (Oct 2008, Seoul, Korea)
314. 嶋田一夫、NMR approach for interaction analysis of larger proteins、The 2nd Taiwan-Japan Young Science Researchers Conference on Computation and Systembiology (Nov 2008, Odaiba)

315. 嶋田一夫、NMR によるタンパク質複合体の相互作用解析、立命館大学理工学研究所シンポジウム (2008 年 11 月、京都)
316. 嶋田一夫、Protein recognition by NMR -ligand recognition mechanism and cell rolling of CD44、International Symposium in NEDO special course (Dec 2008, Tokyo)
317. 嶋田一夫、交差飽和法を用いたタンパク質・リガンド相互作用解析、BMB2008 (2008 年 12 月、神戸)
318. 嶋田一夫、核磁気共鳴法を用いた高分子量タンパク質複合体の相互作用解析法、日本薬学会薬学
研究ビジョン部会、第 10 回創薬ビジョンシンポジウム (2008 年 12 月)
319. 嶋田一夫、Protein recognition by NMR -ligand recognition mechanism and cell rolling of CD44”、
Molecular Soft Interaction International Symposium (Jan 2008, Osaka)
320. 嶋田一夫、Interaction Analyses between Membrane Proteins and Ligands、Keystone Symposium (Feb 2009,
Santa Fe, US)
321. 嶋田一夫、Frontier in Structural Biology and Drug Discovery、Nanyang Technological University,
Singapore、2009 年 2 月 27 日
322. 高橋栄夫、NMR による蛋白質-リガンド相互作用解析と創薬への応用、ゲノム創薬フォーラム第
19 回談話会、(2008 年 6 月、東京)
323. 高橋栄夫、A comprehensive analysis of interactions between thrombosis-related protein and its ligands by
NMR、Yokohama NMR International Symposium (Oct 2008, Yokohama)
324. 高橋栄夫、巨大分子と相互作用するペプチドリガンドの構造解析、大阪大学蛋白質研究所セミナ
ー (2009 年 3 月、大阪)
325. 嶋田一夫、NMR によるリガンド・受容体相互作用解析、第一回シグナルネットワーク研究会 (2009
年 5 月、東京)
326. 嶋田一夫、創薬研究と構造生物学、EMP (2010 年 1 月、東京)
327. 嶋田一夫、NMR による膜タンパク質の機能解明、構造と機能を基盤とした膜蛋白質研究から覗く
未来への展望 (2010 年 1 月、大阪)
328. 久保智史、荻野新治、西田紀貴、嶋田一夫、An NMR method to observe protein-protein interactions in
living mammalian cells、日本薬学会第 130 年会 (2010 年 3 月、岡山)
329. 嶋田一夫、Functional analyses of membrane proteins by NMR 、COLD SPRING HARBOR ASIA
CONFERENCES (May 2010, Suzhou, China)
330. 嶋田一夫、過渡的複合体が関わる生命現象の統合的理解、第 10 回日本蛋白質科学会年会 (2010
年 6 月、札幌)
331. 嶋田一夫、Structural bases of the interactions between chemokines and their G-protein-coupled receptors 、
EUROMAR/ISMAR (Jul 2010, Florence, Italy)
332. 嶋田一夫、Structural bases of the interactions between chemokines and their G-protein-coupled receptors ,
Symposium on Structure and Folding of Disease Related Proteins (Jul 2010, Korea)
333. 嶋田一夫、NMR による膜タンパク質の機能解析、日本学術振興会、回折構造生物学第 169 委員会、
第 32 回研究会 (2010 年 7 月)
334. 嶋田一夫、一超高磁場が拓く生体系 NMR : 最新技術と応用—膜タンパク質のダイナミックスと機
能、大阪大学蛋白質研究所セミナー (2010 年 7 月、大阪)
335. 嶋田一夫、NMR によるケモカイン受容体・ケモカイン相互作用解析、第 34 回阿蘇シンポジウム、
(2010 年 7 月、熊本)
336. 嶋田一夫、Dynamical aspects of membrane proteins、ICMRBS (Aug 2010, Cairns, Queensland, Australia)
337. 嶋田一夫、Dynamical aspects of membrane proteins、Frankfurt University seminar (Sep 2010, Frankfurt,
Germany)
338. 嶋田一夫、NMR を用いた膜タンパク質の機能解明、日本分光学会 NMR 分光部会シンポジウム
(2010 年 9 月、東京)
339. 嶋田一夫、Functional analyses of membrane proteins by NMR、The 2nd International Symposium on Drug
Discovery and Design by NMR (Sep 2010, Yokohama)
340. 嶋田一夫、Dynamical aspects of membrane proteins by NMR 、INPEC2010 (Oct 2010, Uppsala, Sweden)
341. 嶋田一夫、Dynamical aspects of membrane proteins、Technische Universität München/Helmholtz Zentrum
München seminar (Oct 2010, München, Germany)

342. 嶋田一夫、Dynamical aspects of membrane proteins、Max Planck Institute seminar (Oct 2010, Gottingen, Germany)
343. 黄淑嫻、梅本良、上田太郎、西田紀貴、嶋田一夫、NMR 法による actin と actin 結合タンパク質との相互作用解析法の開発、第 33 回日本分子生物学会年会、第 83 回日本生化学会大会合同大会 (Dec 2010、神戸)
344. 竹内恒、高橋栄夫、嶋田一夫、Gerhard Wagner、高分子量蛋白質の構造解析に適した安定同位体ラベル法および測定法の開発、第 49 回 NMR 討論会 (2011 年 11 月、東京)
345. 竹内 恒、高橋 栄夫、嶋田 一夫、ゲルハルト・ワグナー、高分子量蛋白質の NMR 解析に適した安定同位体標識法および測定法の開発、日本分光学会 年次講演会、(2011 年 11 月、京都)
346. 杉木俊彦、高橋栄夫、竹内恒、寺沢宏明、熊谷圭悟、花田賢太郎、嶋田一夫、細胞内セラミド輸送タンパク質 CERT と Golgi 体の相互作用の構造生物学的解析、第 32 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム、(2011 年 11 月、富山)
347. Koh Takeuchi, Sun Taek Kim, Maki Touma, Zhen-Yu J Sun, Carlos E. Castro, Amr Fahmy, Ichio Shimada, Vibhuti P. Dave, Ellis L. Reinherz, and Gerhard Wagner., A dynamic but coordinated T-cell receptor quaternary structure change is important for T cell activation, 第 33 回日本分子生物学会年会/第 83 回日本生化学会大会合同大会 (Dec 2010, Kobe)
348. 鈴木美穂、西田紀貴、荻野新治、早坂晴子、宮坂昌之、嶋田一夫、CD44 リガンド結合ドメインの構造平衡が細胞のローリング活性に与える影響の解明、第 10 回蛋白質科学会 (2010 年 6 月、札幌)
349. 吉浦知絵、幸福裕、上田卓見、間瀬瑤子、横川真梨子、大澤匡範、寺島裕、松島綱治、嶋田 一夫、脂質二重膜中に再構成した CCR5 とリガンド間相互作用に関する NMR 解析、第 10 回日本蛋白質科学会年会 (2010 年 6 月、札幌)
350. 鈴木美穂、西田紀貴、荻野新治、早坂晴子、宮坂昌之、嶋田一夫、CD44-mediated cell rolling regulated by two-state conformational equilibrium of the hyaluronan-binding domain、第 14 回 ICMRBS (2010 年 8 月、ケアンズ、オーストラリア)
351. 今井駿輔、大澤匡範、竹内恒、嶋田一夫、Structural basis underlying the dual gate properties of KcsA、第 14 回 ICMRBS (2010 年 8 月、ケアンズ、オーストラリア)
352. 豊永翔、大澤匡範、横川真梨子、嶋田一夫、Transferred Cross-Saturation Method under Magic Angle Spinning for Structural Analyses of Protein-Protein Interactions at the Solid-Liquid Interface、第 14 回 ICMRBS (2010 年 8 月、ケアンズ、オーストラリア)
353. 小澤新一郎、五十嵐俊介、鈴木勉、甲斐荘正恒、大澤匡範、嶋田一夫、Development of residue selective cross-saturation method for modeling a large protein-protein complex、第 14 回 ICMRBS (2010 年 8 月、ケアンズ、オーストラリア)
354. 鈴木美穂、西田紀貴、荻野新治、早坂晴子、宮坂昌之、嶋田一夫、CD44 リガンド結合ドメインの構造平衡が細胞のローリング活性に与える影響の解明、第 49 回 NMR 討論会 (2010 年 11 月、東京)
355. 宝田理、西田紀貴、久保智史、吉川雅英、嶋田一夫、Structural Mechanism for Affinity-Regulation of Cytoplasmic Dynein、第 49 回 NMR 討論会 (2010 年 11 月、東京)
356. 水越弓子、阿部綾、竹内恒、嶋田一夫、高橋栄夫、低分子リガンド-標的タンパク質の新規エピトープマッピング法、第 49 回 NMR 討論会 (2010 年 11 月、東京)
357. 杉木俊彦、高橋栄夫、竹内恒、花田賢太郎、嶋田一夫、細胞内セラミド輸送タンパク質 CERT の小胞体-Golgi 体間局在変化を制御するリン酸化依存的分子内相互作用の構造生物学的解析、第 49 回 NMR 討論会 (2010 年 11 月、東京)
358. Mayumi Ohnami, Toshihiko Sugiki, Koh Takeuchi, Ichio Shimada, Hideo Takahashi., Development of Isotope Labeling Strategy using Yeast Expression System -for a structural analysis of difficult to express large molecular weight proteins-, 第 49 回 NMR 討論会 (2010 年 11 月、東京)
359. 古川大祐、吉浦知絵、町山麻子、湊雄一、上田卓見、嶋田一夫、Major facilitator superfamily トランスポーター LacY の輸送機構の解明、第 49 回 NMR 討論会 (2010 年 11 月、東京)
360. 湊雄一、町山麻子、上田卓見、嶋田一夫、細菌の走化性における連鎖的なシグナル伝達機構の構造生物学的解明、第 49 回 NMR 討論会 (2010 年 11 月、東京)
361. 今井駿輔、大澤匡範、竹内恒、嶋田一夫、放線菌由来カリウムチャンネル KcsA のゲーティング機構の構造生物学的解析、第 49 回 NMR 討論会、(2010 年 11 月、東京)

362. 豊永翔、大澤匡範、横川真梨子、嶋田一夫、固液界面における蛋白質間相互作用解析に向けた、転移交差飽和法へのマジック角回転の適用、第 49 回 NMR 討論会 (2010 年 11 月、東京)
363. 小澤新一郎、五十嵐俊介、鈴木勉、甲斐荘正恒、大澤匡範、嶋田一夫、巨大タンパク質複合体のモデル構築を目的とした残基選択的交差飽和法の開発、第 49 回 NMR 討論会 (2010 年 11 月、東京)
364. 古川大祐、吉浦知絵、町山麻子、湊雄一、上田卓見、嶋田一夫、Major facilitator superfamily トランスポーターLacY の輸送機構の解明、平成 22 年度日本分光学会年次講演会 (2010 年 11 月、京都)
365. 杉木俊彦、高橋栄夫、竹内恒、花田賢太郎、嶋田一夫、細胞内セラミド輸送タンパク質 CERT の小胞体-Golgi 体間局在変化を制御するリン酸化依存的分子内相互作用の NMR 解析、平成 22 年度日本分光学会年次講演会 (2010 年 11 月、京都)
366. 宝田理、西田紀貴、久保智史、吉川雅英、嶋田一夫、細胞質ダイニンの微小管親和性制御機構の解明、第 33 回日本分子生物学会年会、第 83 回日本生化学会大会合同大会 (2010 年 12 月、神戸)
367. 古川大祐、吉浦知絵、町山麻子、湊雄一、上田卓見、嶋田一夫、Major facilitator superfamily トランスポーターLacY の輸送機構の解明、第 33 回日本分子生物学会年会、第 83 回日本生化学会大会合同大会 (2010 年 12 月、神戸)
368. 杉木俊彦、高橋栄夫、竹内恒、寺沢宏明、熊谷圭吾、花田賢太郎、嶋田一夫、細胞内セラミド輸送タンパク質 CERT/Golgi 体間相互作用の構造生物学的解析、第 33 回日本分子生物学会年会、第 83 回日本生化学会大会合同大会 (2010 年 12 月、神戸)
369. 小笠広起、上田卓見、嶋田一夫、過渡的相互作用に基づく、ユビキチンのユビキチン修飾酵素認識機構の解明、第 33 回日本分子生物学会年会、第 83 回日本生化学会大会合同大会 (2010 年 12 月、神戸)
370. 富永紗衣、幸福裕、上田卓見、嶋田一夫、Structural elucidation of the regulatory mechanism for the COPI vesicle formation by the transferred cross saturation method、第 33 回日本分子生物学会年会、第 83 回日本生化学会大会合同大会、(2010 年 12 月、神戸)
371. 湊雄一、町山麻子、上田卓見、嶋田一夫、細菌の走化性における連鎖的なシグナル伝達機構の構造生物学的解明、第 33 回日本分子生物学会年会、第 83 回日本生化学会大会合同大会、(2010 年 12 月、神戸)
372. 近藤啓太、幸福裕、上田卓見、嶋田一夫、アデノシン A2A 受容体の活性化機構の構造生物学的研究、第 33 回日本分子生物学会年会 第 83 回日本生化学会大会合同大会、(2010 年 12 月、神戸)
373. 黄淑嫻、梅本良、上田太郎、西田紀貴、嶋田一夫、NMR 法による actin と actin 結合タンパク質との相互作用解析法の開発、第 33 回日本分子生物学会年会、第 83 回日本生化学会大会合同大会 (2010 年 12 月、神戸)
374. Koh Takeuchi, Sun Taek Kim, Maki Touma, Zhen-Yu J Sun, Carlos E. Castro, Amr Fahmy, Ichio Shimada, Vibhuti P. Dave, Ellis L. Reinherz, and Gerhard Wagner., A dynamic but coordinated T-cell receptor quaternary structure change is important for T cell activation, 第 33 回日本分子生物学会年会、第 83 回日本生化学会大会合同大会 (Dec 2010)
375. 間瀬瑤子、横川真梨子、大澤匡範、嶋田一夫、Structural basis for the specificity and efficiency of the G-protein signaling in GIRK-gating、第 33 回日本分子生物学会年会、第 83 回日本生化学会大会合同大会 (2010 年 12 月、神戸)
376. 小玉優哉、Michael L. Reese、榛葉信久、Volker Dötsch、鈴木榮一郎、嶋田一夫、高橋栄夫、アサイメントフリーな NMR 相互作用解析による蛋白質複合体構造の迅速決定、第 48 回 NMR 討論会 (2009 年 11 月)
377. 小野克輝、上田寛、加藤一高垣こずえ、谷村隆次、竹内恒、嶋田一夫、高橋栄夫、Development of a low molecular weight inhibitor by NMR-based fragmentation and defragmentation strategy、第 49 回 NMR 討論会 (2010 年 11 月)
378. 竹内恒、高橋栄夫、嶋田一夫、原核生物多剤耐性トランスポーターの構造揺らぎと薬剤排出活性の NMR 解析、新学術領域「揺らぎが機能を決める生命分子の科学」合同班会議 (2011 年 6 月)
379. 竹内恒、嶋田一夫、T 細胞活性化のしくみ TCR はナノマシンか? -NMR および光ピンセット法による解析-、第 6 回構造生物学に関する先端技術講演会 (2011 年 9 月)
380. 竹内恒、嶋田一夫、T 細胞レセプターはダイナミックかつ協動的な 4 次元構造変化により活性化する -NMR および光ピンセット法による解析-、第 49 回日本生物物理学会年会 (2011 年 9 月)

381. 竹内恒、嶋田一夫、緩和の制御と NMR 実験のデザイン:炭素交互標識と異核直接観測実験を例に、蛋白質立体構造解析 NEDO 特別講座 (講演) (2011 年 10 月)
382. Koh Takeuchi¹, Maayan Gal, Hideo Takahashi, Gerhard Wagner, and Ichio Shimada., HNCA-TOCSY-CANH experiments with alternate ¹³C-¹²C labeling: a set of 3D experiment with unique supra-sequential information for mainchain resonance assignment, ISNMR2011 (Nov 2011)
383. Yuji Tokunaga, Koh Takeuchi, Hideo Takahashi, and Ichio Shimada., Dynamic functional regulation of p38 MAP kinase, ISNMR2011 (Nov 2011)
384. 大浪真由美、杉木俊彦、竹内恒、嶋田一夫、高橋栄夫、酵母発現系を用いたタンパク質の安定同位体標識法の開発—難発現高分子量タンパク質の NMR 立体構造解析に向けて—、平成 23 年度日本分光学会年次講演会 (2011 年 12 月)
385. 竹内恒、徳永裕二、高橋栄夫、嶋田一夫、NMR Analysis of Functional Fluctuation in Large Molecular Weight Protein、新学術領域「揺らぎが機能を定める生命分子の科学」国際シンポジウム (2012 年 1 月)
386. 高橋栄夫、核磁気共鳴(NMR)分光法と創薬研究、横浜市立大学・鶴見キャンパス一般公開 (2011 年 10 月、横浜)
387. M. Sakakura, A. Hadziselimovic, H. Takahashi, and C. R. Sanders., Use of NMR to show that the L16P Charcot-Marie-Tooth disease mutation results in a disrupted transmembrane helix in peripheral myelin protein 22, 第 50 回 NMR 討論会 (Nov 2011)
388. K. Takeuchi, M. Gal, H. Takahashi, G. Wagner, and I. Shimada., HNCA-TOCSY-CANH experiments with alternate ¹³C-¹²C labeling: a set of 3D experiment with unique supra-sequential information for mainchain resonance assignment, 第 50 回 NMR 討論会 (Nov 2011)
389. Y. Tokunaga, K. Takeuchi, H. Takahashi, and I. Shimada., Dynamic functional regulation of p38 MAP kinase, 第 50 回 NMR 討論会 (Nov 2011)
390. 坂倉正義、A. Hadziselimovic、高橋栄夫、C. R. Sanders、シャコー・マリー・トゥース病の原因遺伝子産物である 4 回膜貫通型蛋白質：末梢ミエリン蛋白質 22 の物理化学的性状解析、平成 23 年度社団法人日本分光学会年次講演会 (2011 年 12 月)
391. 小玉優哉、M. L. Reese、榛葉信久、小野克輝、金森英司、V. Dotsch、福西快文、鈴木榮一郎、嶋田一夫、高橋栄夫、アサインメントフリーな NMR 相互作用解析によるタンパク質間相互作用界面の迅速決定、平成 23 年度社団法人日本分光学会年次講演会 (2011 年 12 月)
392. 大浪真由美、杉木俊彦、竹内恒、嶋田一夫、高橋栄夫、酵母発現系を用いたタンパク質の安定同位体標識法の開発 —難発現高分子量タンパク質の NMR 立体構造解析に向けて—、平成 23 年度社団法人日本分光学会年次講演会 (2011 年 12 月)
393. 半沢宏之、SBDD/FBDD における NMR スクリーニング、生命分子相互作用研究の最前線セミナー (2011 年 6 月)
394. 小玉優哉、Michael L. Reese、榛葉信久、小野克輝、金森英司、Volker Dotsch、福西快文、鈴木榮一郎、嶋田一夫、高橋栄夫、アサインメントフリーな NMR 相互作用解析によるタンパク質間相互作用界面の迅速決定、平成 23 年度日本分光学会年次講演会 (2011 年 11 月) 中村春木、ホモロジー概念の拡張：配列→構造→電子状態→機能→相互作用、進化リアクターセルスタット 30 年と進化タンパク質工学の進展 (2008 年 5 月、さいたま市)
395. 中村春木、Development of protein structure databases and their applications to functional annotation, PRICPS2008 (Jul 2008, Cairns)
396. 福西快文、In Silico Drug Screening Based on a Protein-Compound Affinity Matrix, BIOTECHNO 2008 IARIA (Jul 2008, ブカレスト)
397. 福西快文、SBDD oriented software "myPresto" ver.4 -application to FBDD-、創薬情報研究会特別セミナー創薬情報研究会 (2008 年 8 月、大阪)
398. 中村春木、Protein functional annotation from pattern recognition for 3D structures、pattern recognition, Monash University (2008 年 10 月、メルボルン、オーストラリア)
399. 福西快文、Fundamental technology for in-silico drug screening and its applications、Drug discovery and design by NMR (2008 年 10 月、横浜)
400. 福西快文、Fragment Screening by Replica Generation (FSRG) method: In Silico Fragment Screening, タンパク質立体構造解析 NEDO 特別講座国際シンポジウム (2009 年 1 月、東京)
401. 中村春木、Protein Functional Annotation from Structures、タンパク質立体構造解析 NEDO 特別講座国際シンポジウム (2009 年 1 月、東京)

402. 福西快文、バーチャルスクリーニング手法の開発と公開ーFBDD も視野にいたる展開ー、三井情報バイオサイエンスセミナー、(2009年11月、東京)
403. 金森 英司、surFit: A Docking server of protein molecular surfaces、4th CAPRI Evaluation Meeting (2009年12月、バルセロナ、スペイン)
404. 中村春木、計算科学によるタンパク質間相互作用の予測と解析、タンパク質立体構造解析 NEDO 特別講座、創薬シンポジウム (2010年3月東京)
405. 中村春木、Bioinformatics and Computational Approaches to Structural Features in Protein Interactions for in-silico Drug Development、1st International Conference on Frontiers of Regenerative Medicine and Biomedical Science (2010年5月、広州、中国)
406. 福西快文、計算による薬物スクリーニングと活性予測、第10回日本タンパク質学会年会 (2010年6月、札幌)
407. 中村春木、大量データと大規模計算機によるタンパク質の構造・機能解析、第10回日本タンパク質学会年会シンポジウム (2010年6月、札幌)
408. 福西快文、New Usage of Protein-Compound Docking in Structure Based In-Silico Drug Screening、5th annual assay & drug discovery technologies、(2010年9月、SanDiego、米国)
409. Narutoshi Kamiya, Junichi Higo, Haruki Nakamura, Flexible docking multicanonical molecular dynamics simulation between antigen and antibody、第11回日本タンパク質学会年会 (2011年6月、大阪)
410. Junichi Higo, Yoshifumi Nishimura, Haruki Nakamura, Free Energy landscape of an intrinsically disordered protein in explicit solvent from all-atom computations、第11回日本タンパク質学会年会 (Jun 2011、大阪)
411. 池部仁善、池上貴久、肥後順一、中村春木、タンパク質シミュレーションにより得られた構造アンサンブルの評価～NMR 観測結果との比較～、第11回日本タンパク質学会年会 (2011年6月、大阪)
412. 梅澤公二、池部仁善、高野光則、中村春木、肥後順一、全原子マルチカノニカル分子動力学計算による天然変性タンパク質 pKID 単体と KIX ドメイン存在下での pKID 構造アンサンブルの相違点の解析、第11回日本タンパク質学会年会 (2011年6月、大阪)
413. Takeshi Kawabata, Yoshifumi Fukunishi, Haruki Nakamura, "Fast 2D chemical search based on maximum common substructure and molecular descriptors", 第49回日本生物物理学会年会 (Sep 2011, Hyogo)
414. Bhaskar Dasgupta, Akira R. Kinjo, Haruki Nakamura, Ligand-dependent conformational changes of the promiscuous protein: A case for Ubiquitin、第49回日本生物物理学会年会 (Sep 2011, Hyogo)
415. Junichi Higo, Yoshifumi Nishimura, Haruki Nakamura, Free Energy landscape for coupled folding and binding of an intrinsically disordered protein by all-atom simulation、第49回日本生物物理学会年会、(Sep 2011, Hyogo)
416. Narutoshi Kamiya, Junichi Higo, Haruki Nakamura, Flexible docking between antigen and antibody by multicanonical molecular dynamics simulation、第49回日本生物物理学会年会 (Sep 2011, Hyogo)
417. Takeshi Kawabata, KCOMBU: a chemical structure comparison tool using the build-up MCS algorithm、CBI/JSBi2011 シンポジウム : Biological and Chemical Databases: Application and Integration、(Nov 2011, Kobe)
418. Haruki Nakamura, Intrinsically Disordered Proteins and Development of Corresponding Drugs、CADD2011 (Plenary Lecture) (Dec 2011, Penang, Malaysia)
419. Junichi Higo, Free Energy Landscape: the road map for protein conformational changes、第34回日本分子生物学会年会シンポジウム (Dec 2011, Yokohama)
420. 福西快文、水中における分子間相互作用の基礎と応用、生命分子相互作用研究の最前線 (2011年6月、東京)
421. 金森英司、福西快文、Extension of the SBDD/LBDD software "myPresto"、JSST2011 International Conference on Modeling and Simulation Technology (2011年10月、東京)
422. 和田光人、福西快文、ドッキング、スクリーニングと周辺の課題、CBI/JSBi2011 (2011年11月、神戸)
423. 福西快文、GPCR に対するペプチド性リガンドの非ペプチド化の戦略 : 新規 Scaffold hopping の手法による活性化化合物の探索と合成、バイオグリッド研究会 2012 (2012年5月、大阪)
424. 福西快文、分子シミュレーションを利用した簡便な活性見積もりと複合体予測、第13回 IPAB シンポジウム (2012年12月、東京)

425. Haruki Nakamura., Prediction of protein-protein complex structures, International Conference on Biomolecular Forms and Functions, Indian Institute of Science (Jan 2013, Bangalore, India)
426. Haruki Nakamura., A new non-Ewald scheme: The zero-dipole summation method and its applications to molecular dynamics simulations for homogeneous and inhomogeneous biomolecular systems, National Symposium on Frontiers of Biophysics, Biotechnology & Bioinformatics and 37'th Annual Meeting of Indian Biophysical Society (Jan, 2013, India)
427. Haruki Nakamura., Computational Prediction and Analysis of Protein-Protein Interactions: Qualitative and Quantitative Approaches, Special Seminar at Academia Sinica (Jan, 2013, Shanghai)
428. 中村春木、Drug Development for a GPCR with in-silico screening、Nagoya symposium、(Jan 2013, Nagoya)
429. 中村春木、生命科学における情報科学・計算科学、第6回三大学連携シンポジウム、(2013年2月、神戸)
430. 中村春木、SGDDによるGPCRに対する非ペプチド性アゴニストの開発、「プロテイン・モールド関西」情報交流セミナー、(2013年3月、大阪)
431. 中村春木、ビッグデータ時代に向けた医療データベース、大阪大学蛋白質研究所セミナー(2013年3月、大阪)
432. Hidehito Takayama & Shigetoshi Sugio., Overexpression, purification and functional characterization of the human serotonin transporter, Biophysical Society 54th Annual Meeting (Feb 2010, San Francisco, CA, USA)

【受賞歴等】

1. 藤吉好則、極低温電子顕微鏡の開発による膜タンパク質の構造決定、平成20年 日本学士院賞
2. 藤吉好則、Christian B. Anfinsen Award (2009)
3. 赤井祐介、複合体試料の結晶化 ～ヒストンシャペロン CIA/ASF1-プロモドメイン複合体をモデルとして～、平成22年 第十回蛋白質科学会 若手奨励賞
4. 中尾俊史、浜まさ子、平瀬寒月、A2'変異型 *Drosophila* RDL GABA 受容体に対するアンタゴニストの作用、日本農薬学会第37回大会、日本農薬学会賞 [論文賞] 受賞、2012年3月14日
5. 望月喜多司記念賞受賞 (2013年3月)
6. 嶋田一夫、核磁気共鳴法を用いた高分子量淡白質複合体における相互作用解析法の開発と応用、平成20年度 日本薬学会賞 受賞
7. 真下忠彰、Quantitative analysis of aggregation-solubility relationship by in-silico solubility prediction, Computational Biology Research Center Workshop, 3rd POSTER AWARD (Jul 2010)
8. 真下忠彰、Quantitative analysis of aggregation-solubility relationship by in-silico solubility prediction, CBI Annual Meeting 2010, Award for the Excellent Poster (Sep, 2010)
9. 中村春木、大阪大学総長顕彰 (社会・国際貢献部門) 2012年8月1日

【プレス発表等】

1. 千田俊哉、必要時に“封印”解く DNA 働かせる仕組み解明、Business & Technology、日刊工業新聞、2010年3月23日
2. 千田俊哉、必要に応じ働く遺伝子 たんぱく質結合、作用、日経産業新聞、2010年3月23日
3. 千田俊哉、遺伝子活性化の構造解明 先端医療に応用へ、化学工業日報、2010年3月25日
4. 千田俊哉、ヌクレオソームの構造変化介した遺伝子発現 活性化する仕組み解明、科学新聞、2010年4月2日
5. 千田俊哉、東大・産総研、ピロリ菌由来の胃がん発症因子の立体分子構造を解明、日刊工業新聞、2012年7月19日
6. 平井照久、独創研究集団、理研の最前線 32、膜輸送のメカニズムを追及、放射光科学総合研究センター 構造生理学研究グループ 三次元顕微鏡法研究チームリーダー 平井照久、日刊工業新聞、2007年7月10日 (22面)
7. 平井照久、赤血球の調整たんぱく質 理研など立体構造解明、日刊工業新聞、2010年1月25日 (28面)

8. 平井照久、CO₂濃度検知 赤血球たんぱく 理研など構造を解析、日経産業新聞、2010年1月27日 (11面)
9. 平井照久、赤血球代謝センサー「バンド3」2次元結晶で構造を解析、科学新聞、2010年2月5日 (4面)
10. 薬事日報、2011年11月11日 (8面)
11. 「IT創薬」実用化へー従来に比べ100倍以上の効果ー、NEDOプレスリリース 2012年5月21日
12. 新薬候補ITで発見、読売新聞、2012年9月3日 (17面)
13. 平井照久、独創研究集団、理研の最前線 32、膜輸送のメカニズムを追及、放射光科学総合研究センター 構造生理学研究グループ 三次元顕微鏡法研究チームリーダー、日刊工業新聞 2007年7月10日 (22面)
14. 日刊工業新聞、赤血球の調整たんぱく質 理研など立体構造解明、2010年1月25日 (28面)
15. 日経産業新聞、CO₂濃度検知 赤血球たんぱく 理研など構造を解析、2010年1月27日 (11面)
16. 科学新聞、赤血球代謝センサー「バンド3」2次元結晶で構造説、2010年2月5日 (4面)

事前評価関連資料

- ・ 事前評価書

事前評価書（案）

作成日 平成 20 年 2 月 4 日

<p>1. 事業名称 (コード番号)</p>	<p>健康安心プログラム ゲノム創薬加速化支援バイオ基盤技術開発／創薬加速に向けたタンパク質構造解析基盤技術開発</p>
<p>2. 推進部署名</p>	<p>バイオテクノロジー・医療技術開発部</p>
<p>3. 事業概要</p>	<p>(1)概要：本プロジェクトでは、ポストゲノム研究の産業利用が期待される「ゲノム創薬」の加速を支援するため、我が国の強みとする世界最高レベルの膜タンパク質構造解析技術、タンパク質間相互作用解析技術、高度な計算科学技術等を最大限活用し、膜タンパク質およびその複合体の細胞表層上における立体構造解析、相互作用解析、計算科学を用いた創薬ヒット化合物の効率的な探索とリード化合物への展開などの創薬基盤技術を開発し、創薬等の研究開発を加速する。これによりバイオテクノロジーの産業化において有用な知見を蓄積し、バイオ産業の情報基盤を強化する。</p> <p>また、構造情報を基にした新しい観点からの画期的な新薬の創出や、それに基づく個別化医療への応用とともに、健康維持・増進などを含めた幅広い分野への展開も期待でき、我が国バイオ産業の競争力強化・新産業の創出を図り、国際的優位性を確保することを目的とする。</p> <p>(2)事業規模：20年度事業費 8.8億円</p> <p>(3)事業期間：平成20年度～23年度（4年間）</p> <p>本事業は平成19年度に経済産業省が実施した「創薬加速に向けたタンパク質構造解析基盤技術開発」事業を平成20年度よりNEDO技術開発機構で実施するものである。</p> <p>平成19年度の実施体制は別紙の通り。</p>
<p>4. 評価の検討状況</p>	
<p>(1)事業の位置付け・必要性</p> <p>①事業の位置付け</p> <p>本プロジェクトは、健康・安心プログラムの一環として実施される。我が国の遺伝子やタンパク質等の生体分子の機能・構造解析の分野において、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ックスの開発、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、個別化医療・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、プログラムの目標である「国民が健康で安心して暮らせる社会の実現」に資するものである。</p> <p>なお、本プロジェクトは、技術戦略マップ（平成17年3月経済産業省策定）の創薬・診断分野の技術マップにおいて、標的タンパク質探索効率化のうち「標的タンパク質構造解析技術」、標的タンパク質に最適な薬物設計のうち「ドッキングベースの in silico スクリーニング」「低分子・タンパク質親和性解析技術」に位置付けられ、更なる強化を図るべき重要技術として位置付けられる。</p>	

②事業の必要性

市販薬剤のほぼ 50%がターゲットにしている膜タンパク質の立体構造及びその相互作用情報は創薬上重要である。その解析手法として、膜タンパク質の立体構造を高精度で解析できる極低温電子顕微鏡や、リガンドとタンパク質の相互作用解析を可能とする NMR 解析技術、in silico スクリーニング技術等が開発されており、高度な創薬プロセス等への応用が期待されている。

しかし、創薬上重要な膜タンパク質は細胞膜上で複合体を形成し、その機能を発現しているが、適切な解析手法は開発されていない。そこで、膜タンパク質のよりリアルな状態における構造・機能情報を取得する新たな技術等を開発し、タンパク質の構造変化や膜タンパク質複合体の構造情報等を創薬研究に応用可能とする創薬支援技術を実現することが極めて重要であり、産業界のニーズも高い。

これにより、創薬研究の加速など、我が国のバイオ産業の競争力強化・新産業の創出において、国際的優位性の確保に寄与することが期待される。

(2)研究開発目標の妥当性

<目標>

- ① 目標値:ヒト由来(発現系)の膜タンパク質の構造を、2 Åを超える分解能で、不均一超分子系の相互作用を従来の 3 倍の感度で解析する技術を開発する。それらの情報と動的、結合特性を考慮し、従来法と比べ 10 倍の効率を持つ in silico スクリーニング技術を確立する。
- ② ヒトや哺乳類由来の受容体やチャネルなど膜タンパク質の構造、機能解析と in silico スクリーニングを用い、産業上有用な化合物を 10 個以上見いだす。

<妥当性>

世界最高レベルの解析精度・感度・速度を設定するとともに、それぞれの技術要素を統合した創薬支援システムとして機能させる点に留意した目標であることから産業上の効果も期待でき、妥当な目標設定と判断される。

NEDO POST3 で意見を収集し、妥当性について更なる検討を行った上で決定する。

(3)研究開発マネジメント

平成 20 年度より、NEDO 技術開発機構が本プロジェクトを運営・管理するにあたり、技術評価委員会を設置し、本プロジェクトの進捗状況等を踏まえた事業内容・計画及び実施体制の妥当性を評価した上で、最適な研究開発体制を構築し、委託して実施する。また、プロジェクトリーダーを選定し、プロジェクトリーダーと協議して研究管理を行う。また、研究開発委員会を年 2～3 回開催し、研究テーマ間の連携強化、進捗状況を踏まえた予算配分・事業計画の策定を行う。平成 21 年度に中間評価を行い、その評価結果を踏まえ事業全体を見直す。

(4)研究開発成果

市販薬のほぼ 50%がターゲットとしている膜タンパク質に関わる新薬開発への貢献はもとより、開発した技術を用いて取得されるデータを用いた論理的な候補化合物の設計支援を通じ、より有効性が期待できる創薬候補物質の創出や、標的タンパク質情報の活用による治験の効率化等、創薬プロセスの様々なフェーズの効率化に極めて大きな効果を及ぼすことが期待される他、個別化医療の実現など健康安心プログラムに定められた政策目標の達成に大きな貢献が期待される。

なお、技術開発項目毎に期待される具体的な研究開発成果は次のとおり。

- ①電子線、X線による創薬加速技術の開発：高度な結晶化技術の開発、極低温電子顕微鏡による、単粒子解析技術、電子線トモグラフィ技術の開発等を通して、膜タンパク質のリアルな系での立体構造解析データを取得することができる。
- ②核磁気共鳴法（NMR）による創薬加速技術の開発：転位交差飽和法を基礎とした高度な核磁気共鳴測定法の開発、及び試料調整法開発により、不均一系、リアルな系での膜タンパク質、及びその複合体などにおける分子相互作用データを取得する技術が開発される。
- ③ 計算科学による創薬加速技術の開発：データベースに基づいた、現実的なタンパク質動的特性評価を活用した高精度 insilico スクリーニング技術の開発と、超分子複合体の構造情報に基づく構造生理学、構造薬理学アプローチへの展開が期待できる。

(5)実用化・事業化の見通し

各項目①構造解析、②相互作用解析、③計算科学は相互に連携し、GPCR など創薬ターゲットとして重要な膜タンパク質に対して、①で構造データを、②で相互作用・機能データを取得し、③の動的特性、ドッキング解析に反映させると共に、③で得られた結果を①、②にフィードバックしながら効率的な化合物スクリーニング手法に展開することで、具体的な創薬加速を支援するツールを提供し、産業上有用な化合物を効率よく見いだすノウハウを構築するなどの技術レベルの向上効果が期待できる。このような技術をプロジェクト内で、産業界に普及、展開することにより創薬の一層の加速が期待でき、経済的、社会的な波及効果もたらされる。

さらに、各項目で取得したデータベース、計測技術、機器、及びそれを基にした解析ソフトは、創薬支援ツールとして機械、IT 関連分野にて実用化され、バイオ関連産業とその周辺産業の活性化も期待できる。

(6)その他特記事項

特になし。

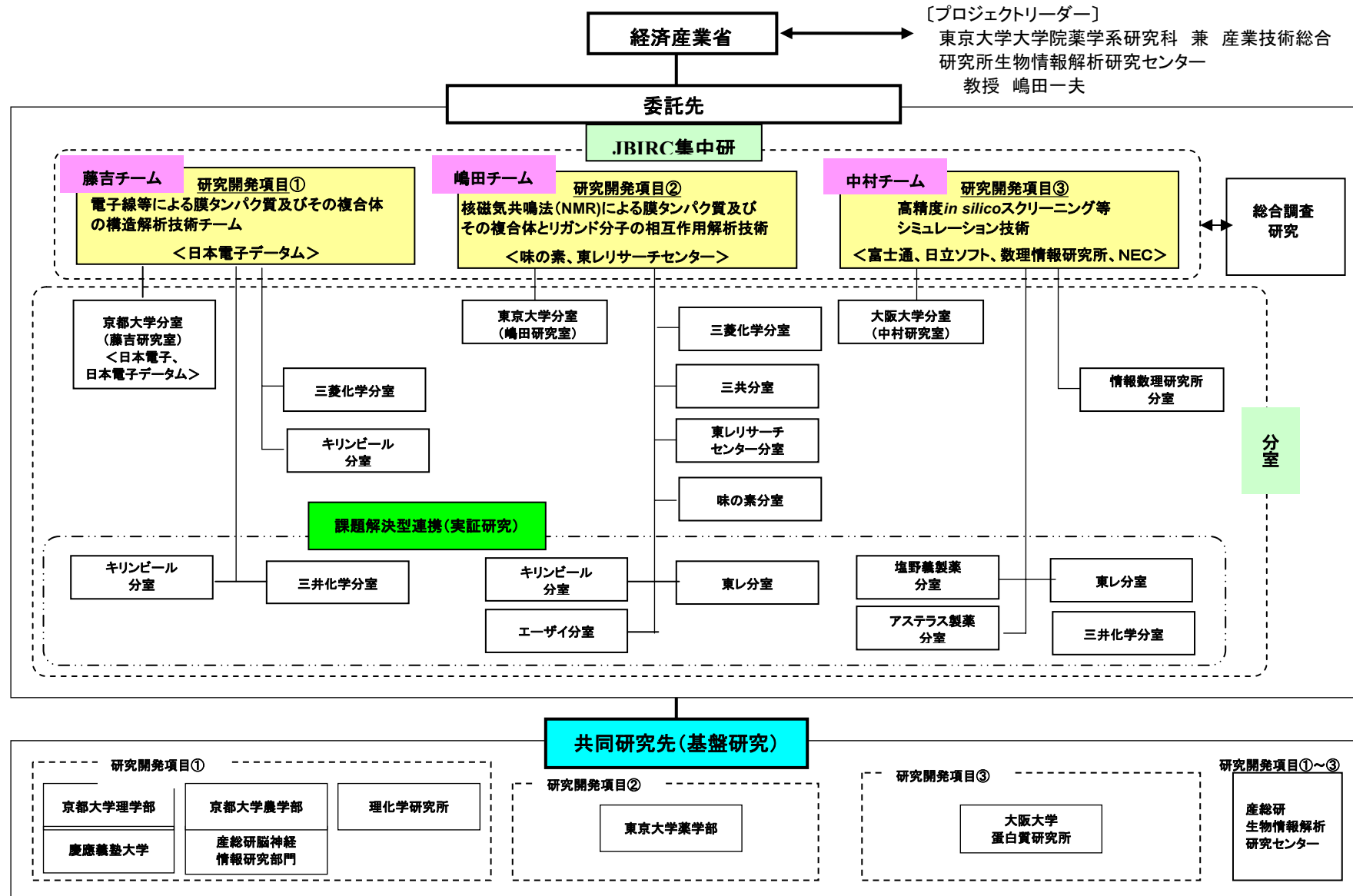
5. 総合評価

市販薬剤のほぼ50%が膜タンパク質を作用点としている事実からみて、膜タンパク質は、生命現象の解明においてのみならず、創薬開発の重要な標的タンパク質でもある。しかし、膜タンパク質の機能発現評価に重要な、構造情報を基にした適切な構造生物学的、計算科学的ツールは世界的に見ても、いまだ開発されていない状況にある。

世界最高レベルの膜タンパク質構造解析技術、タンパク質間相互作用解析技術、高度な計算科学技術等、これまでのプロジェクト成果を最大限活用し、膜タンパク質およびその複合体の細胞表層上における立体構造解析、相互作用解析、計算科学を用いた創薬上重要な化合物の効率的な探索技術の確立への展開を行う本プロジェクトの実施によって、ゲノム創薬の加速を支援する創薬基盤技術の開発が期待される。

これによりバイオテクノロジーの産業化において有用な知見が蓄積され、バイオ産業の情報基盤強化が期待される。また構造情報を基にした新しい観点からの画期的な新薬の創出が期待できるとともに、ターゲットタンパク質の立体構造情報をもとに論理的な候補化合物の設計支援を通じて、有効性が期待できる患者群を対象とした治験の実施等を通じた創薬プロセスの効率化や個別化医療の実現等により、健康維持・増進などを含めた幅広い分野への展開にもつながることから、我が国バイオ産業の競争力強化・新産業の創出を図り、もって国際的優位性の確保に寄与することが見込まれるため、NEDOが実施する事業として適切であると判断する。

平成19年度 創薬加速に向けたタンパク質構造解析基盤技術開発の体制案



以上