

2. 事業実施報告

(1) 事業の取り組み状況（総括）

事業総括は各テーマ毎の実施計画にそった研究の進捗状況の把握、研究成果達成への課題、困難度の把握、事業化の可能性検討など種々な角度から研究内容をチェックし、研究交流促進会議を主宰し、事業の方向性及び事業計画等の意志決定を行った。これに基づき、PM会議において事業の方向性及び研究成果の達成等に向け事業を主導した。同時に、フェーズⅢへの展開を図るため、積極的に横浜市当局との連携を図った。

研究統括は事業総括の意向を踏まえ、チームリーダーとの連携・調整や財団雇用研究員、企業研究員の共同研究を指導するとともに、共同研究推進委員会において研究課題への対応方法、事業化へのアドバイス等研究全体の方向性をリードした。

新技術エージェントは年1～2回の全研究員へのヒアリングを実施し研究動向の把握をきめ細かく把握するとともに、横浜産業振興公社との連携や研究成果報告会、各種展示会等の場を活用し、新たな参加企業の獲得や技術移転の実現などに積極的に取り組んだ。

横浜市は中核機関である（財）木原記念横浜生命科学振興財団への市職員の派遣や財政的支援等を行うとともに、横浜市立大学による積極的な共同研究への参加や経済局、横浜プロモーション推進事業本部によるライフサイエンス都市横浜を目指した事業展開、バイオベンチャーの育成・誘致、関連する国家プロジェクトへの参加等積極的に本事業を支援した。

(2) 他機関との連携状況

PM会議に行政担当者（横浜市経済局）に出席してもらい、市当局との情報交換を密に行政施策との連携を図りながら事業を展開した。

また、共同研究の中核を担う横浜市立大学とはコア研究室の管理運営、共同研究の推進等について、同大学所属の研究統括を中心に連携を図り事業を進めた。

横浜市経済局の外郭団体である横浜産業振興公社とは同公社のリエゾンプロデューサーに木原財団常務が就任してアドバイザーを勤めるなど、本事業への市内企業の参加促進、研究成果の市内中小企業への移転等において連携を図った。

さらに、本事業の成果を活用しフェーズⅢへの展開を進めるため、横浜市経済局や横浜プロモーション推進事業本部と連携し、「地域新生コンソーシアム研究開発事業」、「都市エリア産学官連携促進事業」の採択を受けるなど積極的に新たな国家プロジェクトへの継承を図った。

(3) 基本計画に対する達成度

① 地域COEの構築状況

基本計画に記載した地域COE構築計画は、様式3及び様式5により示したように、殆ど各項目に亘り目標を達成し、フェーズⅢにおける地域COE形成が確実に期待される構造が構築された。（様式3参照）

② 研究開発による独自技術の確立と新技術・新産業創出に向けての進捗状況

様式4参照

(4) 今後の予定と展望（総括）

共同研究事業が順調に進展し、本事業開発の「機能性タンパク質の解析評価システム」の主要3技術「回収フロー型NMR」・「プロテオーム解析技術」（平成16年度より地域新生コンソーシアム研究開発事業）・「DNA結合タンパク質同定技術」を基盤技術とする「新技術システムを用いた疾患細胞動態プロテオミクスの応用」プロジェクトが、「都市エリア産学官連携促進事業」に採択（平成17年度）され、本事業の主要部分を継承し、医療・医薬・機能性食品開発に向けステップアップした。コア研究室も本事業を継承して横浜市立大学連携大学院内に置き、中核機関も木原財団が担当する。

また、成果の一部が、科学技術振興機構の戦略的創造研究推進事業（CREST）の「磁気共鳴法による生体内分子動態の非侵襲計測」プロジェクト（平成16年度）とバイオインフォマティクス推進事業の「タンパク質の構造・機能予測法の開発とヒトゲノム配列への適用」プロジェクト（平成17年度）、文部科学省のゲノムネットワーク事業の「新技術を基盤とした革新的遺伝子解析システムの開発」プロジェクト（平成16年度）及びNEDOの産業技術助成

事業の「small RNAの選択的・網羅的検出を思考した人工RNAプローブの開発」（平成17年度）の一部として採択され、継続して研究開発が進められている。

上記を除く各テーマについても、総て夫々の実施機関により継続推進され、技術開発・商品化・事業化が進められ、既に実現したものに加えて逐次新商品・新事業の誕生が期待される。

本事業を継承するこれらの活動は、共同研究推進委員会構成員をメンバーとし中核機関木原財団を事務局とする「Y-CREATE研究会」によってフォローする。

既に商品化・事業化が実現或は推進されている基盤技術は、「機能性タンパク質の解析評価システム」開発のための要素技術又は基盤研究の成果を基に開発されたものであるが、フェーズⅢでは本事業において開発された「機能性タンパク質の解析評価システム」を駆使して得られる新技術・新産業の創生が期待される。

これらフェーズⅢにおいて推進される新技術・新産業の創生に向けての活動とその成果は、他の横浜市立大学のこの分野における活動（タンパク3000プロジェクト、21世紀COEプロジェクトなど、或は理化学研究所や製薬協タンパク質構造解析コンソーシアムとの提携など）とその成果と共に、プロテオミクス分野におけるCOE形成を促進し、別掲の横浜市の推進する「ライフサイエンス都市横浜構想」実現にそのモデル5事業の展開と相俟って大きく貢献するものと期待される。

本年度、木原財団を中核機関として受託した「横浜・神奈川バイオビジネスネットワーク強化事業」（経済産業省補助事業）の活動も、地域における関係組織間のネットワーク緊密化を通じて地域のバイオクラスター化が進み、地域COE形成に寄与しよう。

①地域COEの構築状況

基本計画の目標・構想 (箇条書きで)	目標・構想達成状況	未達の場合の原因
① コア研究室の整備 フェーズⅠ・Ⅱの目標 生命科学研究の拠点化に向けた整備…コア研究室の始動 コア研究室の本格的活動	横浜市立大学連勝大学院内に開設。フロー型自動NMR、MSなど主要設備を設置し、解析システム開発の中心として機能。	目標達成 (引続き都市エリア事業のコア研究室として継続)
② 産学官ネットワークの構築 フェーズⅠ・Ⅱの目標 共同研究の始動、既存ネットワークとの連携 研究コンソーシアムの形成、新たな地域ポテンシャルの発掘	共同研究参加大学3～4校、企業16社(内中小企業2社)・中核機関・横浜市立大学・横浜市区間に緊密なネットワーク完成。 地域ポテンシャルは共同研究企業参加の形で発掘。	目標達成 (地域規模では、「横浜・神奈川バイオビジネスネットワーク強化事業」により推進)
③ スキルバンクの整備 フェーズⅠ・Ⅱの目標 スキルバンク整備	4特許事務所を登録して活用。 国際特許を含め46件の特許出願に反映。	目標達成 (今後も各テーマで活用)
④ 研究成果の移転方法 フェーズⅠ・Ⅱの目標 技術移転計画の策定調査 研究成果の本格的移転	大部分は、大学・企業共同研究体制内で円滑に移転。	目標達成 (今後も必要に応じて移転)

<p>⑤ 自治体の役割 フェーズⅠ・Ⅱの目標 地域科学技術庁内連絡会議設 置と情報交換 研究成果の移転支援</p>	<p>ライフサイエンス都市横浜構想実現に向け、担当部局の明確化・強化を終了、モデル 5事業を発足、木原財団の使命・管轄も明確化された。</p>	<p>目標達成：当初の期待レベルを超える生命科学COE 形成が推進された。 (更に強力に展開)</p>
<p>⑥ 中核機関の機能構築 フェーズⅠ・Ⅱの目標 機構の改革・人的支援強化等 中核機関の機能構築 研究支援機能の強化</p>	<p>木原財団は横浜市立大学の公立大学法人化に伴い、横浜市経済局バイオ産業推進課の 管轄になり、機能を強化しバイオ関係の産学官連携の中核的推進機能を担当すること が明確化された。</p>	<p>目標達成：木原財団は、Y-CREATE)に続いて地域新 生コンソーシアム、都市エリア、ネットワーク強化事 業などの中核機関を担当。 (上記中核機関並びにY-CREATE研究会事務局を担 当すると共に産学官連携の中核的推進を担当)</p>
<p>⑦ 理化学研究所ゲノム総合科学 研究センター等との連携 フェーズⅠ・Ⅱの目標 研究者間の意見・情報交換の場 の設置 新センターを含めた理化学研 究所との共同研究、本格的連携</p>	<p>理研-横浜市大連携大学院発足と共に両者間のネットワーク構造は構築され、4年余 の間に強化・緊密化。</p>	<p>目標達成 (両者間基本契約締結などにより更に強化)</p>

②新技術・新産業創出に向けての達成状況

基本計画の目標・構想 (簡条書きで)	目標・構想達成状況	未達の場合の原因
<p>研究テーマⅠ 薬物候補低分子化合物とタンパク質の相互作用を網羅的かつ迅速に解析する新技術の開発</p>		
<p>○研究項目Ⅰ-Ⅰ タンパク質回収フロー型自動NMR解析技術の開発 フェーズⅠ・Ⅱの目標 フロー型（オンフロー/ストップフロー）自動NMR測定技術の開発 スペクトル自動解析技術の開発 相互作用タンパク質（15Nラベルタンパク質）の自動回収技術の開発 フロー型自動NMR測定とタンパク質自動回収との接続検討 インターフェースを介した自動回収技術の接続 スペクトル自動解析手法の開発</p>	<p>タンパク質と個々の低分子化合物を自動混合し、フローしてNMRを測定し結合の有無を確認後、タンパク質を自動回収し再度別の低分子化合物と混合し測定する。</p> <ul style="list-style-type: none"> ・コア研究室に設置されたフロー型 700MHz NMR を用いて、ストップフロー法により自動でNMRを測定できるシステムを開発した。 ・安定同位体ラベルしたタンパク質を用いて、リガンドが結合した場合と結合しない場合を自動解析するソフトウェアを開発した。 ・タンパク質回収用の処理装置とシステム制御用ソフトを開発した。またモデルタンパク質を用いた回収確認実験を行った。 ・フロー型自動NMR測定とタンパク質自動回収装置を接続し、実際に安定同位体でラベルした DHFR タンパク質と 100 種類の化合物からなる薬物ライブラリーを用いて実験を行い、標的化合物を同定することが出来た。 	
<p>フェーズⅢの目標 タンパク質回収型自動NMR技術の評価</p>	<ul style="list-style-type: none"> ・フェーズⅢでは、いくつかのタンパク質を標的的にして実際に薬物候補化合物を同定していく。 	

<p>○研究項目 1-2 アフィニティー型キャピラリー 電気泳動質量分析技術の開発</p> <p>フェーズ I・II の目標 多次元電気泳動技術のマイクロロ チップ化</p> <p>マイクロチップCEと質量分析計 との接続検討 (フェーズ II の計画とフェーズ I の計画と入れ替えて実施)</p>	<p>マイクロチップ上に集積したタンデム電気泳動により、任意の物質と相互作用するタ ンパク質を微量で選択、分離し MS により高感度かつ迅速に解析する。</p> <p>・ESI のイオン化のためのデバイスを取り付けた 1 流路型マイクロチップCEを製作 し、コア研究室に設置の ESI/Q-TOF MSに取り付け、タンパク質の分離のための条 件検討を行った。流路に塩基性ポリマーのコロテーティングを施すことで、塩基性の高い タンパク質でも分離・検出・断片化することに成功した。これにより混合物からある タンパク質を分離し、微量で同定するための要素技術を確立することができた。</p> <p>・このシステムを用いて、17種類のアミノ酸誘導体を迅速に分離し検出することに 成功し、荷電性低分子化合物の分離・検出に有効な方法であることを明らかにした。</p> <p>・アフィニティー分離機能については、ビーズを充填した Weir 型チップの試作・評 価を行った。逆相ビーズを充填したチップで、標識化タンパク質を脱塩・回収できる ことを実証した。このチップは他の分離手段の前処理デバイスとしても利用可能なも のである。</p>	<p>多次元の分離機能を一つのチップに集積はできて いないが、二つのμデバイスを用いてそれぞれ別の 機能を有するものを構築することができた。</p>
<p>フェーズ III の目標 多次元マイクロチップCE/MS の評価・応用</p>	<p>・荷電性低分子化合物の分離・検出にも本システムが有効な方法であることを証明で きたことから、微量試料の迅速分析で、多くの系に応用できるものと期待できる。</p>	

<p>○研究項目 1-3 DNA 結合タンパク質固定技術の開発</p> <p>フェーズ I・II の目標 プロモーターのマイクロアレイの作成条件の検討</p>	<p>DNA 結合タンパク質がすべてトラップできるようにオ리고二重鎖 DNA を固定化したチップを作成する。</p> <p>・ 13mer で二本鎖を形成することから、13mer でのプローブ 16 種類を搭載したチップを作成し TRF 2 タンパク質の固定を行った。読み取り用リダーを開発した。</p>	
<p>4096 スポットマイクロアレイを作成し種々の転写因子で評価</p> <p>解析ソフト及びデータベースソフトの作成</p>	<p>・ 4096 種類の配列の異なる DNA をスポット化しマイクロアレイを作成した。ただし長さが 13 mer だと二重鎖 DNA の安定性の配列依存性が大きいことが判った。二重鎖 DNA を安定化するための末端保護法を開発した。</p> <p>・ 4096 種類の配列の DNA に対する読みとり技術と表示法を開発した。</p>	<p>網羅的な DNA 結合タンパク質固定のためには 13 mer では不十分で、もっと長い DNA で二本鎖 DNA チップを作成する。</p>
<p>フェーズ III の目標 解析ソフト及び読取技術の評価・改良</p>	<p>・ 二重鎖 DNA を安定化した条件では網羅的解析が可能になってきたので、今後は DNA の長さを長くしたマイクロアレイを作成してタンパク質の結合配列を網羅的に同定していく。</p>	

<p>研究テーマ2 細胞機能上重要なタンパク質を網羅的にかつ迅速的に同定する新技術の開発</p>		
<p>○研究項目2-1 分泌タンパク質マッピング技術の開発</p> <p>フェーズⅠ・Ⅱの目標</p> <p>1) 無血清培養液による各種細胞の培養</p> <p>2) 分泌タンパク質の効果的な調製法の開発</p> <p>3) 分泌タンパク質を効果的に分離する二次元電気泳動法の確立</p> <p>4) 分離タンパク質の活性を検出するプロテインマッピング技術の開発</p> <p>フェーズⅢの目標</p> <p>1) ガン、表皮、神経などの細胞が分泌するタンパク質のプロテインマッピングの作成と機能解析</p>	<p>・ヒト由来の種々のがん細胞、正常上皮細胞、正常表皮細胞などの分泌タンパク質を分析するための無血清培養技術を確立した。</p> <p>・無血清培養液上清を調製し、そこに含まれるタンパク質を凍結乾燥によって濃縮する方法で、微量の分泌タンパク質を効率よく回収する方法を確立した。</p> <p>・微量の分泌タンパク質を二次元電気泳動法 (TDE) で分離した後膜に転写し、さらに質量分析機で効率よく同定する技術を確立した。</p> <p>・TDEで分離したタンパク質をゲル内で再生し、活性を検出する活性プロテインマッピング技術を確立した。しかし、分離したタンパク質を膜に転写した後再生する技術は達成できなかった。</p> <p>・上記の方法を用いて表皮細胞の老化に伴い顕著に変動するタンパク質27種を同定した。この内1種 (keratin 15) については老化マーカーとしてヒト皮膚の加齢度の判定に使用できることが確認された。化粧品のカウンセリングに使用する予定である。</p> <p>・アトピー性皮膚炎モデルマウスの皮膚組織およびボランティアによるアトピー性皮膚炎患者の皮膚組織の分析から、炎症により変化するタンパク質約20種を同定した。今後アトピー性皮膚炎の診断マーカーとして使用できるかどうかを検討する。</p>	<p>膜上に固定化した状態でタンパク質を再生することとは不可能と判断された。</p>

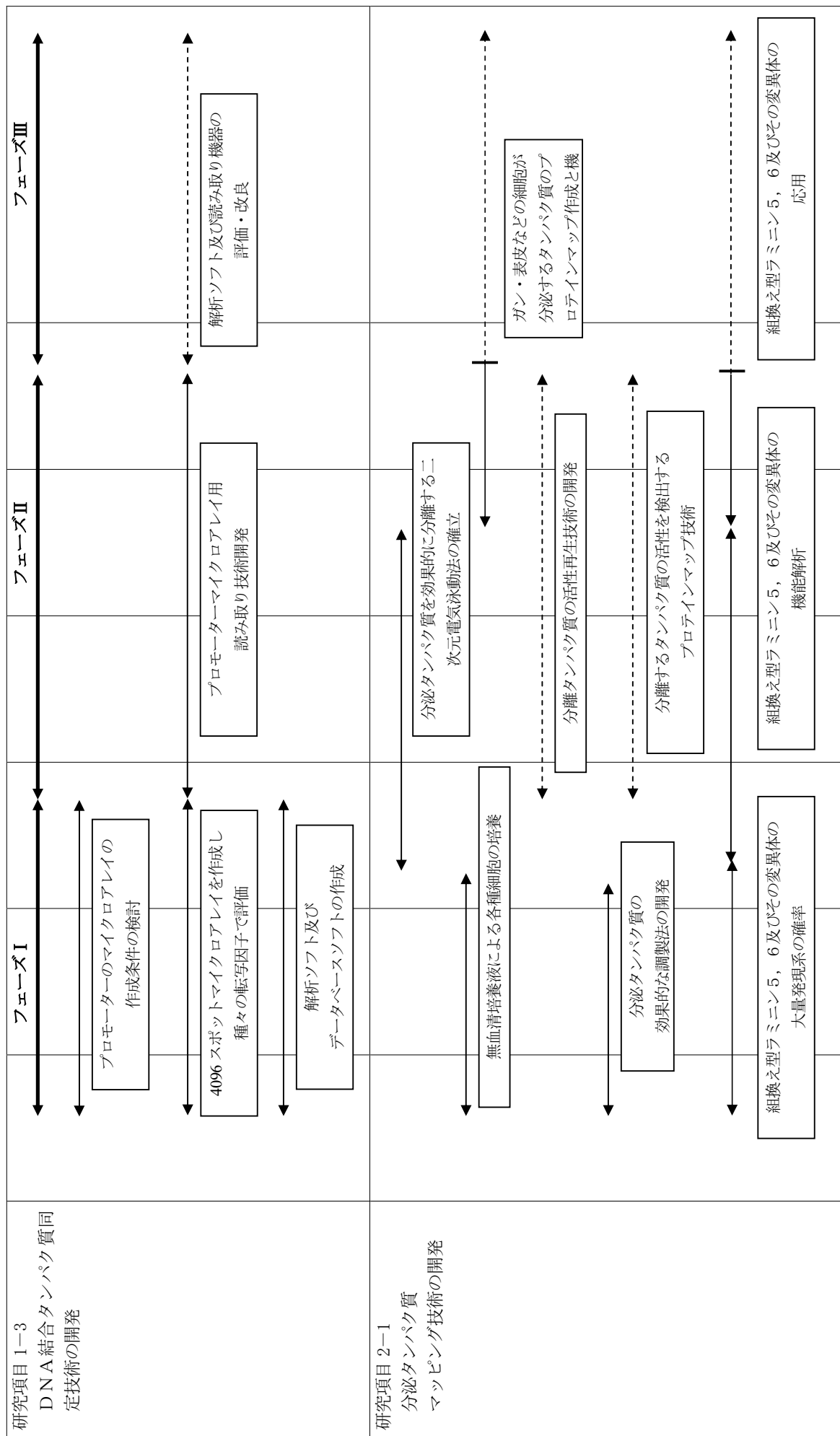
<p>2) 動物細胞の接着、移動、増殖を促進する、組換え型ラミネン5、ラミネン6、およびその変異体の大量発現系の確立、機能解析、およびその応用。</p>	<p>・多くのヒト癌細胞が特異的に分泌するタンパク質8種類を腫瘍マーカーの候補として決定した。今後癌患者の検体（血清・尿）を用いた分析により、腫瘍マーカーとしての有用性を明らかにする予定である。</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ラミネン5A ($\alpha 3A\beta 3\gamma 2$)とラミネン5B ($\alpha 3B\beta 3\gamma 2$)の安定大量発現系を確立した。ラミネン6 ($\alpha 3\beta 1\gamma 1$)の発現系もほぼ確立した。 ・上記ラミネンの生理活性、機能ドメインおよび作用機構を明らかにした。 ・ラミネン5 (5Aおよび5B)が、再生医療への応用が期待されているヒト骨髄間葉系幹細胞の増殖を分化能を維持したまま促進することを発見した。今後骨髄間葉系幹細胞の無血清培養の成分として、ラミネン5を応用することができる。 	
--	--	--

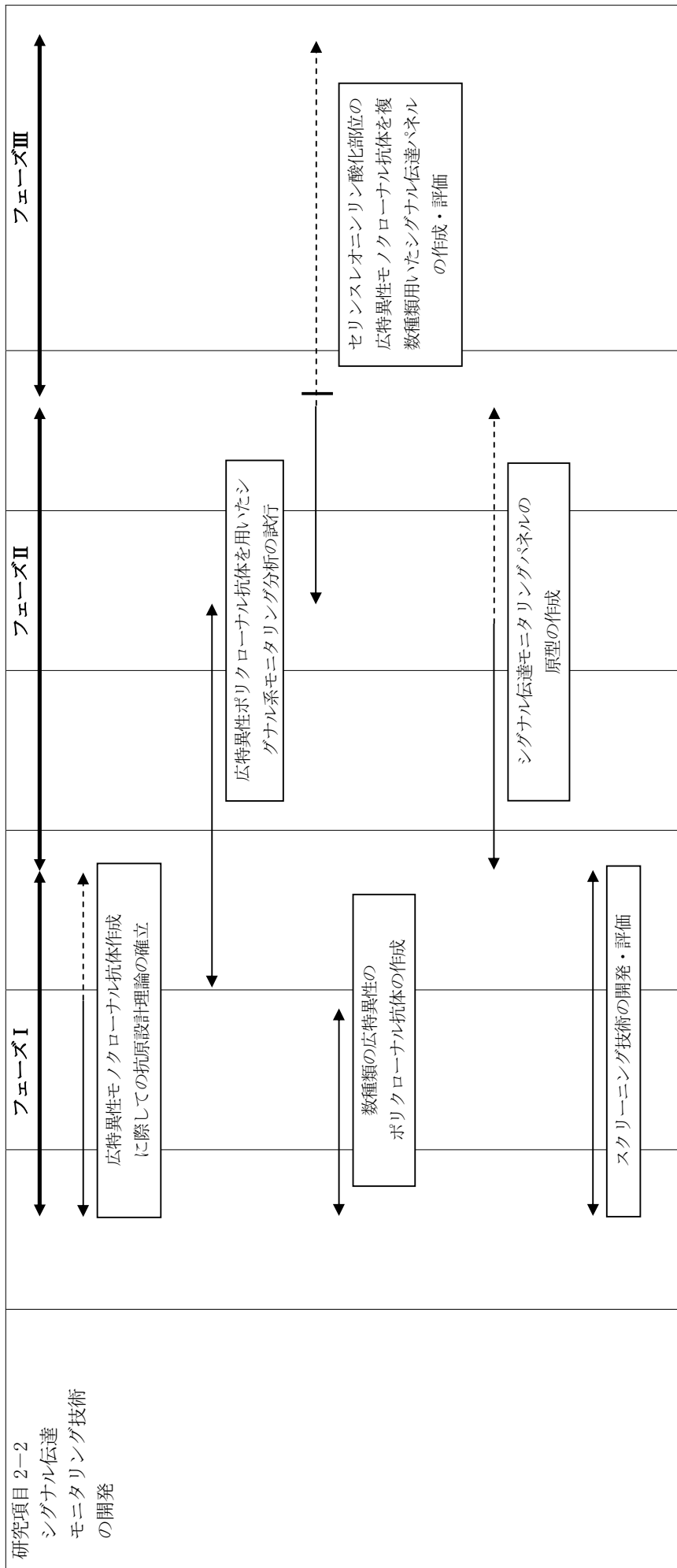
<p>○研究項目 2-2 シングナル伝達モニタリング技術の開発</p> <p>フェーズⅠ・Ⅱの目標 広特異性モノクローナル抗体作成に際しての抗原設計理論の確立</p> <p>スクリーニング技術の開発・評価</p> <p>数種類の広特異性のポリクローナル抗体を作成</p>	<p>本研究では、「広特異性のリン酸化セリンスレオニン抗体」を、モノクローナル抗体として作成する技術を開発する。また、得られる複数の抗体を利用してリン酸化のブロードオーム像を一挙に解析する「シングナル伝達モニタリングパネル」の原型を作成し、その有用性を評価する。</p> <p>リン酸化部位周辺の数個のアミノ酸残基のみを抗原として認識させる為の、抗原の設計技術の確立に成功していない。</p> <p>スクリーニングの多検体化は確立した。しかし、抗原の設計理論が確立していないため、どうしても試行錯誤を繰り返すこととなり、人と資金の両面で限界がある。そこで、既に得られたモノクローナル抗体の中から、「広」特異性を示すものを選択し、数種について特異性を決定した。</p> <p>リン酸化部位を識別するポリクローナル抗体を数種類の抗原について行い、特異性を確認した。一定程度広特異性のクローンを見出したが、応用性を考えると、目的とする汎用に利用可能な広特異性の抗体の獲得には成功していない。</p>	<p>当初期待していた抗原の設計によるスクリーニングの結果、リンカーとして用いることを予定していた残基に説明のつかない非特異的な抗原性があることが判明したために、既存の方法でリン酸化モノクローナル抗体を作成し、そのクローンの中から広特異性のクローンを選択する戦略に切り替えた為。</p>
<p>広特異性ポリクローナル抗体を用いたシングナル系モニタリング分析の試行</p> <p>シングナル伝達モニタリングパネルの原型を作成</p> <p>フェーズⅢの目標 セリンスレオニンリン酸化部位の広特異性モノクローナル抗体を複数種類用いたシングナル伝達パネルを作成し、評価する。</p>	<p>得られたリン酸化部位を識別するポリクローナル抗体及びモノクローナル抗体を用いて、キナーゼを欠損した細胞株やノックアウトマウス組織についてその利用性を確認した。一部は市販の予定である。</p> <p>目的とする汎用に利用可能な広特異性の抗体が得られていないために、個別の特異性を示すモノクローナル抗体を用いた解析にとどまっている。</p> <p>個別の解析に用いる目的で、数種のモノクローナル抗体を市販する。</p>	<p>(中間評価の時の評価委員の意見も参考にして、) 目的とする汎用に利用可能な広特異性の抗体が得られていないために、個別の特異性を示すモノクローナル抗体を用いた解析に重点をシフトした為。</p> <p>具体的には、mRNA サーベイランス系の解析に利用し大きな成果を上げることができた。ナンセンスコドン認識の分子機構をほぼ解明した。</p>

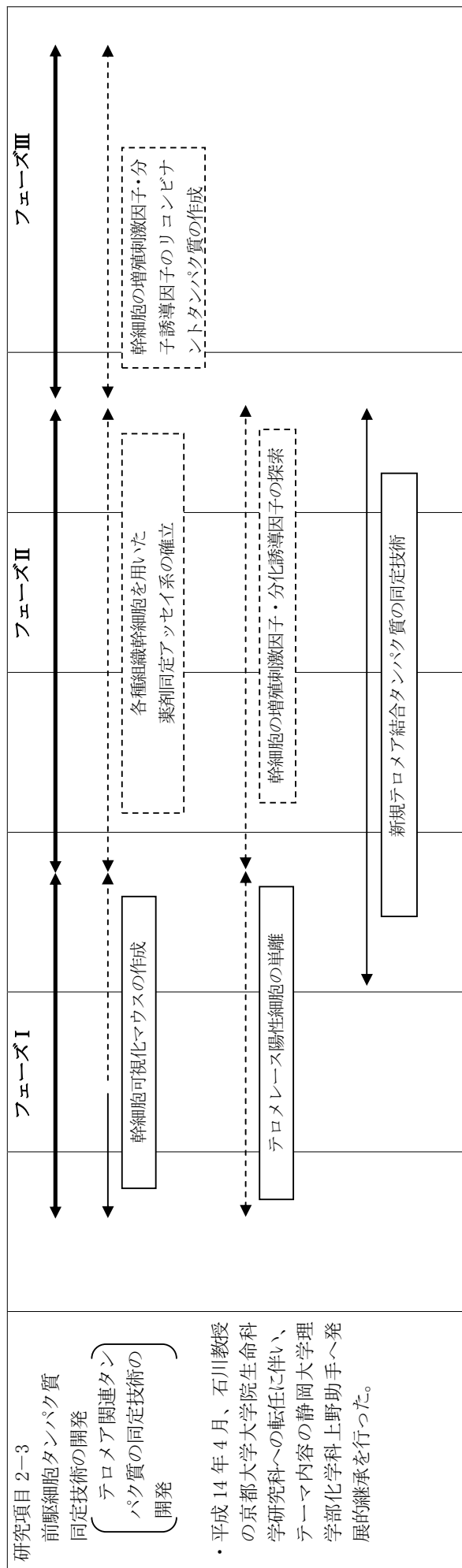
<p>○研究項目 2-a 前駆細胞タンパク質同定技術の開発</p> <p>テロメア関連タンパク質の同定技術の開発</p> <p>フェーズ I・II の目標 幹細胞可視化マウスの作成 テロメレース陽性細胞の単離</p>	<p>各種組織幹細胞のマーカーとしてテロメレースを想定し、その活性を指標に各種組織の幹細胞を同定する技術を開発する。</p> <p>テロメレース触媒サブユニット TERT のプロモーターに、レポーター遺伝子をつけたものを導入したトランスジェニックマウスを得た。</p> <p>トランスジェンがメチル化修飾を受け安定したレポーターとして機能しなかった。</p> <p>平成 14 年度より「テロメア関連タンパク質同定技術の開発」として実施することとした。</p> <p>レポーターとしての機能が不安定のため未着手。</p> <p>平成 14 年 4 月、石川教授の京都大学大学院生命科学研究所への転任に伴い、テーマ内容を静岡大学理学部上野助手へ発展的継承を行った。</p>
--	---

基本計画スケジュール表に対する達成状況

		平成12年度	平成13年度	平成14年度	平成15年度	平成16年度	平成17年度	将来の展開計画
1 ネットワーク型地域COEの構築に関する計画		<p>フェーズⅠ</p> <p>フェーズⅡ</p> <p>フェーズⅢ</p>						
項目	内容	<p>ネットワーク型COE形成の準備</p> <p>コア研究室の開始</p> <p>共同研究の開始</p> <p>⑥ 中核機関の機能構築</p> <p>⑦ 理研との本格的連携</p> <p>⑤ 横浜市の支援</p> <p>ネットワーク型COEの核の形成</p> <p>コア研究室の本格的活動</p> <p>研究コンソーシアムの形成</p> <p>③ スキルバンク整備</p> <p>④ 研究成果の本格的形転</p> <p>本格的な地域COEの形成とグローバルネットワークの構築</p> <p>横浜生命科学研究所 COEの構築</p>						
事業全体における位置づけ		<p>----- 計画</p> <p>_____ 実施</p>						
①コア研究室 (位置づけ)		<p>----- 計画</p> <p>_____ 実施</p>						
②産学官ネットワーク (位置づけ)		<p>----- 計画</p> <p>_____ 実施</p>						
その他		<p>----- 計画</p> <p>_____ 実施</p>						







事業費概算 (百万円)	H12	H13	H14	H15	H16	H17	計
事業団	171	318	266	225	231	137	1,348
地域	536	328	183	129	128	92	1,395
合計	707	646	449	354	359	229	2,742

四捨五入の関係で合計があわないところがある