

1-1-1 研究成果

中テーマ名：タンパク質回収フロー型自動NMR測定装置の開発	
サブテーマ名：DNA結合タンパク質の構造解析・結合能の条件検討及びNMR新技術の検証	
中テーマリーダー（所属、役職、氏名）	
横浜市立大学大学院国際総合科学研究科 教授	西村善文
研究従事者（所属、役職、氏名）	
横浜市立大学大学院国際総合科学研究科 助手	長土居有隆
横浜市立大学大学院国際総合科学研究科 準教授	廣明秀一
大陽日酸（株） 開発・エンジニアリング本部 つくば研究所	SI合成研究室 横山 順 福田健治
研究の概要、新規性及び目標	
①研究の概要	
(1) タンパク質の溶液NMR法の一つの利点は ¹⁵ N標識したタンパク質試料のHSQCスペクトルを指標に、医薬品候補となる低分子薬剤との相互作用の有無の情報を、短時間の測定でしかも原子レベルで取得することが可能なことである。フロー型自動NMR装置を用いることでこの手法は医薬スクリーニングに応用可能である。しかしそれを百万種以上の化合物を対象とした製薬会社レベルでのハイスループットスクリーニングに応用するためには、 ¹⁵ N標識したタンパク質のコストが非常に大きいという欠点があった。それを克服するために、更にタンパク質を回収するための装置と方法論の開発が重要である。それと同時に、フローNMR測定中にタンパク質が変性沈殿すると、タンパク質回収装置そのものの性能劣化を招くなどの問題点が派生する。したがって、溶解度が高く変性しにくいタンパク質ドメインをあらかじめ準備するための方法論の開発も併せて必要である。	
(2) NMR測定に必要な十分な数mgスケールの安定同位体標識核酸オリゴマーを効率的に調製する方法を確立し、受託合成可能な技術および体制を構築する。	
(3) ヒト遺伝子がコードする蛋白質のNMRによる立体構造を解析する。	
②研究の独自性・新規性	
(1) 事業期間中にヒトおよびマウスの全ゲノム配列の解析が終了したのを受けて、その成果を活用することにした。具体的にはヒトゲノム中のおよそ7割がマルチドメインタンパク質であるということ、そしてそのドメインの境界を高速に実験的に決定することで、溶解度が高く立体構造解析や薬物との相互作用解析に適した機能性タンパク質ドメインが得られること、更にその方法論自体が特許出願可能であり、バイオテクノロジー一般や創薬支援技術として事業化可能であることに気付いた。そこで、当該分野で汎用される大腸菌の組換えタンパク質発現技術の改良に焦点を絞り、方向性クローニングが可能なPCR産物のハイスループットクローニング技術を開発することとした。なお、この方法は新規かつ世界唯一のものである。	
(2) 藍藻培養による重炭酸ガス固定から、核酸オリゴマーまでの全工程一貫製造による低コスト化を計った。核酸オリゴマー調製時の変異導入、非鋳型依存的塩基付加反応の低減ができた。	
(3) フロー型自動NMR装置を使った、核内タンパク質の構造解析を迅速かつ網羅的に解析するためのシステム構築を目指す。	
③研究の目標	
フェーズⅠでは既存のPCRクローニング法の評価ならびにT-vector作成法を検討し新規の非対称T-vectorのプロトタイプを作成する。	
フェーズⅡでは新規非対称T-vector(PRESAT-vector)のうち、GST融合型、His-Tag融合型を完成し、その検証と特許出願を行う。	
フェーズⅢでは改良型PRESAT-vectorを開発し、GFP融合型、LBT融合型、PTD融合型などの新規のPRESAT-vectorの開発を通じた事業化支援を行う。	

研究の進め方及び進捗状況

- (1) これまでに、方向性を有するPCRクローニング技術、およびそれを可能とする非対称TA-vectorとその製法の総称である「PRESAT-vector法」の開発に成功した。特にタンパク質機能性ドメインの立体構造解析を加速することに特化した応用例として、三種類のGST融合タンパク質型PRESAT-vector、Trx融合型、His-Tag融合型、FLAG-Tag融合型など計10種類の作成を行った。また、このベクターを使って新規または既存のドメイン・ペプチドの発現系を5年間で約30個作成し、それによって得られた新規タンパク質ドメインを通じて本事業ならびに他の基礎研究に大きく貢献した。併せてJSTの特許出願支援制度の適用をうけ当該特許のPCT出願を行った。これにより当初の目的をほぼ達成できたと考えられる。
- (2) 横浜市立大学西村の指導のもと平成16年度までに安定同位体標識藍藻からの核酸抽出方法、ヌクレオチド (dNTP, rNTP) 製造方法および酵素による安定同位体標識核酸オリゴマーの効率的合成法等一連の方法を概ね確立できた。ただし、配列依存的な合成収率低下や、高次構造に起因する精製の困難性等の課題が発生した。平成17年度までに一部の合成量低下等課題を解決し、国内NMR研究者向けに安定同位体標識核酸オリゴマー受託合成事業を開始した。また、東京工業大学関根と清尾の指導のもと安定同位体標識アミダイト核酸の合成方法を習得し、製品化開発を開始した。
- (3) ヒト遺伝子クローン373個からDNA解析及び無細胞発現系により、完全な14個のcDNAを得ることができた。それからバイオインフォマティクスを利用したドメイン予測より、102個の大腸菌発現系を構築した。現在102個のうち、約30種類のタンパク質を新たに大腸菌系で発現させ試料調製を行った。

主な成果

具体的な成果内容：

- (1) PRESAT-vector法の開発に成功した。また、このベクターを使って新規または既存のドメイン・ペプチドの発現系を5年間で約30個作成した。そのうち既に2件は立体構造決定にも成功している。
- (2) 安定同位体標識核酸オリゴマーの受託合成事業を開始した。また、安定同位体標識dNTP、rNTP製品化完了およびアミダイトの製品化開発を開始した。
- (3) ^{15}N の安定同位体に標識したタンパク質を5種類精製し、そのNMRスペクトルを得た。構造解析に適したスペクトルを3種類得ることができた。

特許件数：4 論文数：26 口頭発表件数：87

研究成果に関する評価

1 国内外における水準との対比

- (1) 本技術による発現系の高速構築は、主に大学などの小規模の研究環境における立体構造解析に適した発現系高速構築技術の一つとして高い評価を受けている。現在、実用化のための実例収集を目的として限定的に試用許諾を付与して、大阪大学・京都大学(2件)・宮崎医大・奈良先端大学院大学・慶応大学・北海道大学・英国MRC・独国EMBLなどにおいて実用化検討されており、一部において良好な成績を得ている。このことから本技術の汎用性の水準は高いと考えられる。更に、本技術を応用した研究として、廣明ら横浜市大の研究グループの研究提案が、戦略的創造研究推進事業 - CREST(H16)とバイオインフォマティクス推進事業BIRD(H17)の二件に採択されており、技術水準は高いと評価を得ている。
- (2) 安定同位体メーカーは国内二社、海外数社あるが、他社と比較して核酸の品揃えや技術に関しては高い水準を保っている。本研究事業で習得した技術は、当社の安定同位体事業の特徴の一つとして極めて重要な技術である。

2 実用化に向けた波及効果

- (1) PRESAT-vector技術は、前述のように実験室レベルでは既に実用段階にある。大学などの研究機関における試用を通じて、その有用性が広く認知されれば、事業化につながると考えられる。事業化を間接的に支援する目的で、バイオJAPAN(2004)、リエゾンポート横浜(2005)などの産学連携関連イベントにおいても積極的な発表を行い、普及活動を行った。
- (2) 安定同位体標識核酸による国内研究者の研究促進及び用途拡大が期待される。

残された課題と対応方針について

- (1) 現在、本事業参加企業の一つ(株)エーシーバイオテクノロジーズを通じて、PRESAT-vectorを利用したタンパク質発現受託事業の事業化について検討中である。そのために、今後ニーズが更に広まると考えられる。1. 哺乳動物培養細胞におけるタンパク質発現ベクターのPRESAT技術の適用。2. 小麦胚芽無細胞系におけるタンパク質発現ベクターのPRESAT技術の適用。3. 昆虫細胞におけるタンパク質発現ベク

ターのPRESAT技術の適用。4. タンパク質導入実験用タグ融合タンパク質発現ベクターの開発などを順次
行い実証していく必要がある。

(2) 安定同位体標識核酸オリゴマーを製造する上で、配列依存的な合成量低下が大きな課題である。ま
た一部の品質保証方法等安定同位体標識固有の課題も残された。今後は、東京工業大学より技術導入し
た化学合成法を発展させ、上記課題を解決できるよう継続して開発を進める。

	JST負担分 (千円)							地域負担分 (千円)							合 計
	H 12	H 13	H 14	H 15	H 16	H 17	小計	H 12	H 13	H 14	H 15	H 16	H 17	小計	
人件費	0	0	0	0	0	0	0	0	925	5,044	2,790	4,900	3,519	17,178	17,178
設備費	0	0	0	0	0	0	0	0	22,400	0	0	0	0	22,400	22,400
その他研究費 (消耗品費、 材料費等)	0	0	0	0	0	0	0	0	6,620	7,997	6,669	7,856	7,044	36,186	36,186
旅費	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
その他	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
小 計	0	0	0	0	0	0	0	0	29,945	13,041	9,459	12,756	10,563	75,764	75,764

代表的な設備名と仕様 [既存 (事業開始前) の設備含む]

JST負担による設備:

地域負担による設備: NMR (900MHz)

※複数の研究課題に共通した経費については按分する