

平成 27 年度 全体研究開発報告書

1. 補助事業名：創薬等ライフサイエンス研究支援基盤事業（創薬等支援技術基盤プラットフォーム事業）
2. 補助事業課題名：創薬等支援のためのタンパク質立体構造解析に資する高品質タンパク質調製法および結晶生産技術による支援と高度化
3. 研究開発代表者：所属：国立大学法人東京大学 役職：教授 氏名：上田 卓也
4. 研究開発の成果

創薬等に重要なタンパク質の研究者に対し、遺伝子情報からスタートして高品質なタンパク質結晶を得るまでの一連のプロセスに関して総合的に支援を行ってきた。また、支援に供する技術の高度化を推進した。

<支援>

外部からの支援依頼に対して、12件の支援業務を行った。

① PURE system を用いた膜タンパク質の発現支援

PURE system により高効率・高品質な膜タンパク質を合成するため発現系の最適化を行った。支援課題 2033 における標的タンパク質についてコドンの最適化及び翻訳開始を促進する配列の挿入により PURE system での発現量を改善した。支援課題 2087 や支援課題 2113 に関しても PURE system で発現するためのコンストラクトを作製し、それぞれ大量発現することに成功した。支援課題 2033 や支援課題 2113 については人工脂質膜であるナノディスク上で PURE system による合成、可溶性タンパク質の精製に成功し、リガンド結合などの生化学的解析が可能なナノディスク-膜タンパク質複合体を提供した。

② 生細胞発現系を利用した組換え体タンパク質の大量発現から結晶化までのトータル支援

支援課題 1052 では、標的サイトカインとその疾病関連変異体の精製・結晶化を支援し、得られた結晶から結晶構造を決定することに成功した。支援課題 1053 では、腸球菌のクォーラムセンシングを制御する膜タンパク質の大腸菌を用いた発現支援を行い、従来よりも高感度の緑色蛍光タンパク質を利用した発現量検定系を確立し、発現条件の最適化や発現量を増大させる変異体取得に利用した。支援課題 1056 では、ウイルス由来 DNA ポリメラーゼ B の発現条件の検討を行い、高圧巻き戻し実験に供する試料を調製した。支援課題 1066 では、異なる活性をもつ 2 種類の分泌型ホスホリパーゼ A₂ (sPLA₂) の大量調製と結晶化スクリーニングを支援した。支援課題 1117-1 では、ヒト由来 FLT3 キナーゼドメインの発現条件の検討を行い、高圧巻き戻し実験に供する試料を調製した。支援課題 1250 では、薬剤耐性がん細胞に発現するチューブリンの結晶化を支援し、結晶構造の決定に成功した。支援課題 1252 では、高圧巻き戻し実験により可溶化した HIV-1 インテグラーゼをカラムクロマトグラフィーで精製することに成功した。支援課題 2078 では、*Desulfovibrio ferrophilus* strain IS5 株由来の外膜シトクロム遺伝子を大腸菌及び *Shewanella* で大量発現させるための発現系構築を支援した。また、共同研究課題において、産業上有用な酵素（ポリエチレンテレフタレート (PET) 分解酵素、R 体選択的アミノトランスアミナーゼ (R-TA)、エノン還元酵素、抗酸化酵素)、一本鎖特異的エキソヌクレアーゼ PhoExo I の大量発現・精製・結晶化を行い、各酵素の結晶構造の決定に成功した。

③ 高圧巻き戻し技術によるタンパク質試料調製支援

支援課題 1052 では、標的サイトカインとその疾病関連変異体を高圧巻き戻し技術により調製し、支援依頼者に供給した。支援課題 1056 では、ウイルス由来 DNA ポリメラーゼ B の大容量試料調製を目的とした高圧巻き戻し実験を行い、大容量調製を可能とした。支援課題 1066 では、4 種類の分泌型ホスホリパーゼ A₂ (sPLA₂) と各種変異体を高圧巻き戻し技術により調製し、酵素学的性状解析のために供給した。支援課題 1117-1 では、ヒト由来 FLT3 キナーゼドメインの大容量試料調製を目的とした高圧巻き戻し実験を行い、

大容量調製を可能とした。支援課題1252では、HIV-1インテグラーゼの大容量試料調製を目的とした高圧巻き戻し実験を行い、大容量調製を可能とした。また、共同研究課題において、蛾の性フェロモン生合成制御受容体膜タンパク質PBANRの高圧巻き戻し技術によるタンパク質試料調製支援を行い、高圧処理により活性型PBANRを昆虫細胞細胞膜から高効率で抽出することに成功した。

④ 磁気力場発生装置中での高品質結晶作製支援

支援課題1257-2において、磁気力場中でニワトリ卵白リゾチームの結晶化実験を行い、CP/MAS法を用いた固体NMR測定に供するための大型磁場配向結晶を得ることに成功した。

⑤ 凝集性等データ検索・予測システムの強化と最適コンストラクト設計等の支援

開発・公開している凝集性等予測システム pSOLUB を約 14 万個のヒト ORF に適用し、その結果を情報拠点の VaProS システムに掲載した（情報拠点・由良グループとの連携）。また liposome 存在下における膜タンパク質 solubility 予測システムを強化した（上田グループ、東工大・田口研、京大、秋吉研との連携）。これらを最適コンストラクト設計等の課題内支援のサポートに供した。

<高度化>

PURE systemの高度化、高圧巻き戻し技術および磁気力場での結晶化技術を発展させるとともに、タンパク質調製に向けてのコンサルティングに有用なデータベースを構築するために、蓄積するデータの種類やフォーマットについて課題参加者間で話し合い、調整を進めた。

⑥ 酵母PURE systemの開発

酵母の翻訳諸因子を精製し再構築した酵母無細胞タンパク質系の開発を進めた。これまでに伸長因子と終結因子の精製を行い、開始因子を必要としない I R E S 依存の無細胞翻訳システムを開発した。27年度は、システムの改善を進め、酵母由来の tRNA とアミノアシル tRNA 合成酵素を調製し、純粋な酵母由来の PURE system を構築することに成功した。

⑦ PURE systemによる膜タンパク質調製系の開発

汎用性の高い無細胞合成・解析系を目指して PURE system による膜タンパク質調製系の高度化を進めた。また、タンパク質膜透過チャンネルのトランスロコン依存的な膜タンパク質の合成系の開発にも成功しておりトポロジーの制御も可能になった。ヒト GPCR については発現用のライブラリーを整備し、ナノディスク上での網羅的発現を実施した。その中でヒト免疫不全ウイルス HIV のコリセプターCX3CR1 についてはナノディスクの脂質組成の条件検討を行い、発現レベル及び可溶化率を更に向上させることに成功した。また CX3CR1 とリガンドとの結合定数を決定することに成功した。

⑧ 膜タンパク質へのバインダーの単離

PURE systemを用いたリボソームディスプレイ法の開発を進めた。この手法はGPCRなど膜タンパク質のバインダー取得につながる。取得したバインダーは膜タンパク質の結晶化やペプチド性創薬に寄与することが期待できる。

⑨ 高圧巻き戻しシステムのハイスループット化のためのデバイス開発

限られた高圧処理空間での最適な可溶化条件の探索を可能とする、ハイスループット条件検討用デバイスの開発・改良を行い、最大200近い条件のスクリーニングが一度に行える環境を整えることができた。

⑩ 実験データ集積・検索システムの強化とデータ解析

タンパク質高圧巻き戻しデータを集積し、検索システムを構築した（田之倉グループとの連携）。また凝集性等予測システム pSOLUB を、少数のアミノ酸変異に対する solubility 変化（128 変異）などの eSOL 以外のデータに適用し、従来法と同等かそれ以上の精度が得られることを確認した。