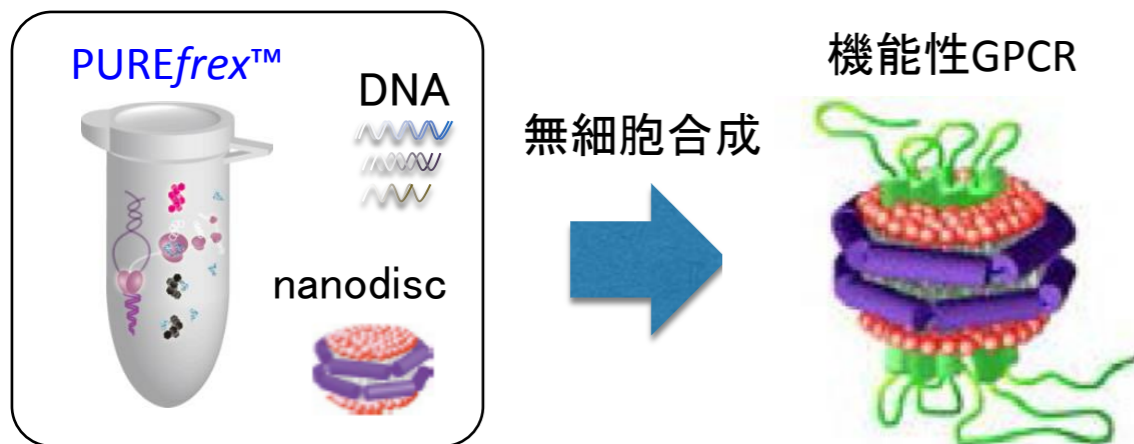


PURE systemの効率化による膜タンパク質合成

[技術の概要]

当研究室で開発されたPURE systemの効率化により、膜タンパク質などの高難易度タンパク質の合成が可能になりました。

また、酵母由来のPURE systemの開発にも成功しており、広範囲のヒト・病原菌由来遺伝子の無細胞発現が可能です。



PURE systemでnanodiscに挿入された
機能性GPCRの合成に成功

[技術の利用例]

〈PURE systemによるGPCR合成〉

- mg単位合成→精製、結晶化
- ナノディスクやリポソームを併用した機能性GPCRの取得→リガンド結合定数など物性測定
- PURE ribosome display法によるGPCRバインダーの取得→GPCRアゴニスト、アンタゴニストの開発

連絡先

[所属] 東京大学大学院
新領域創成科学研究科

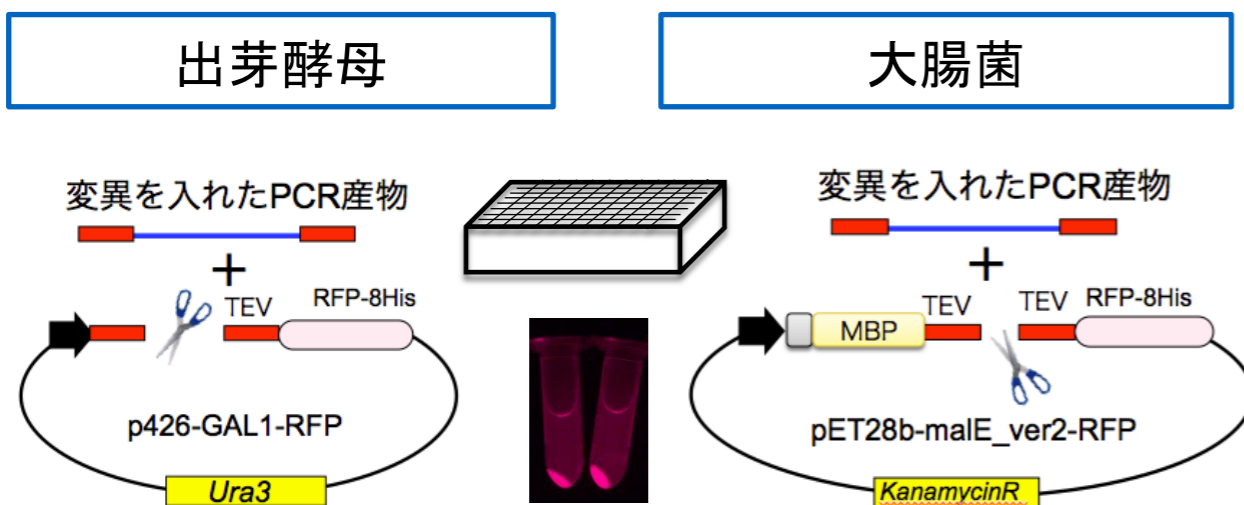
[名前] 上田卓也

[E-mail] ueda@k.u-tokyo.ac.jp

高発現変異ヒト膜タンパク質の生産技術

[技術の概要]

出芽酵母および大腸菌を用いた高発現変異ヒト膜タンパク質の発現システム



各種変異導入法

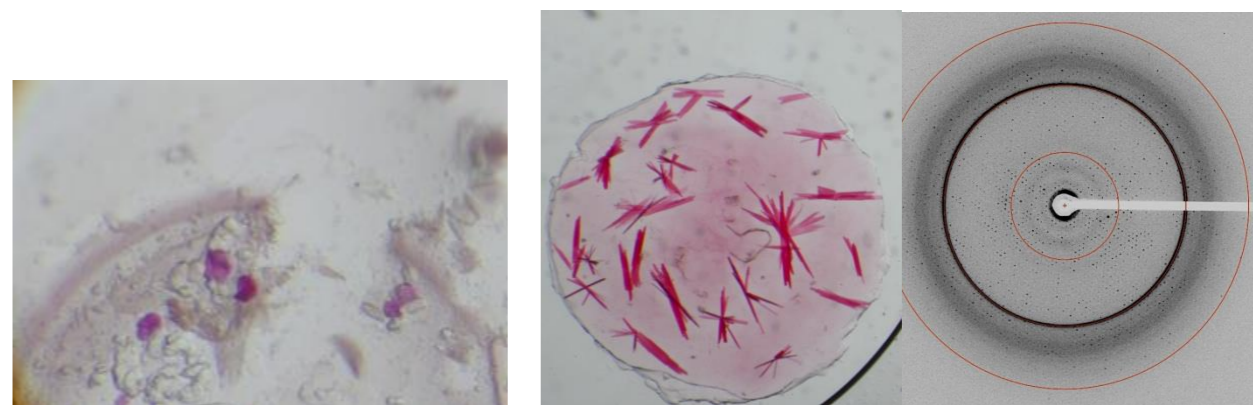
- 1) エラープロードンPCR
- 2) 理論的熱安定化予測法
- 3) 融合タンパク質による熱安定化

支援概要

- ヒト膜タンパク質等の生産方法の支援
- ヒト膜タンパク質等の熱安定化の支援
- ヒト膜タンパク質等の結晶化の支援

[技術の利用例]

- 発現量が低い膜タンパク質を大量生産したい場合
- 安定性が低い膜タンパク質を熱安定化したい場合
- 膜タンパク質の色々な結晶化方法を試したい場合



Protein Aの結晶化に成功。

Protein Bの結晶と回折像
分解能2.8 Åで構造を決定。

連絡先

[所属] 千葉大学大学院理学研究科

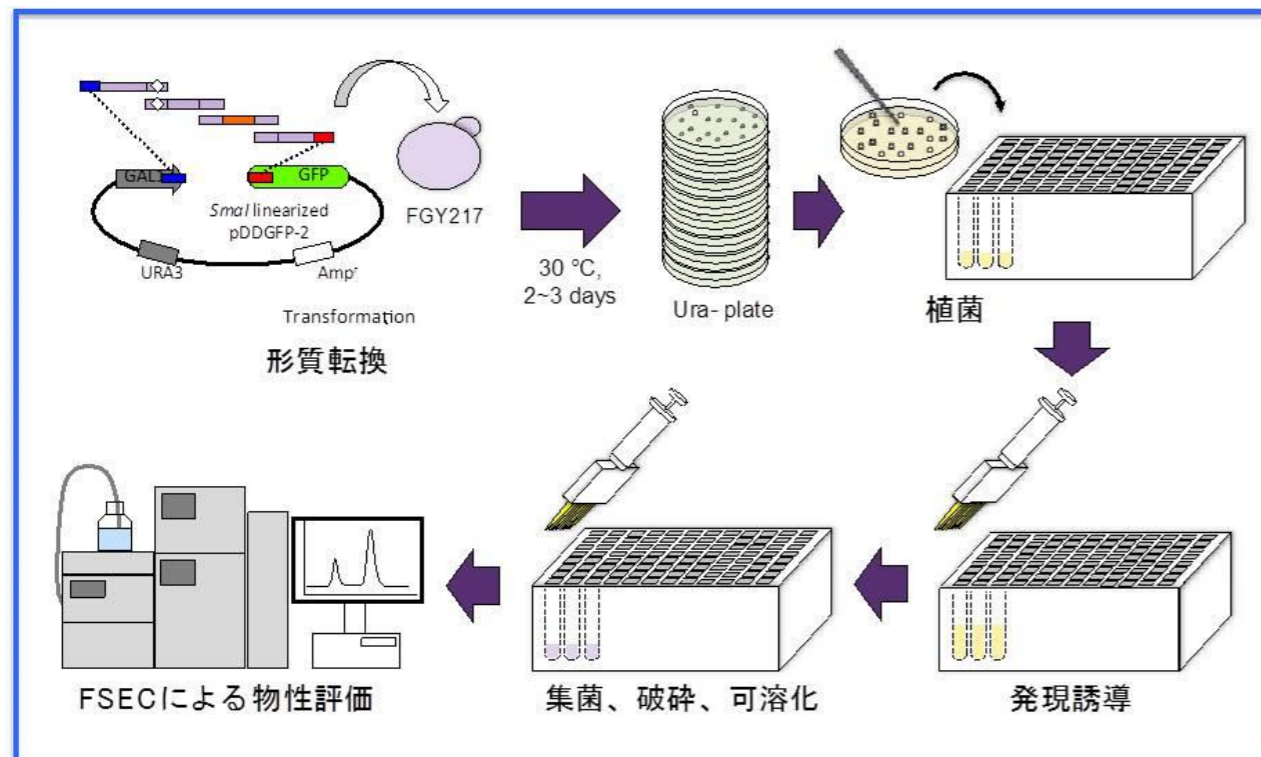
[名前] 村田武士

[E-mail] t.murata@faculty.chiba-u.jp

出芽酵母を用いた安定化ヒト膜タンパク質の ハイスループット作製・評価システム

[技術の概要]

出芽酵母を用いた安定化ヒト膜タンパク質の ハイスループット作製・評価システム



低コスト

培養量 1 ml。小スケールでの処理、分析可能。

ハイスループット

植菌から蛍光ゲル濾過 (FSEC) までの工程を96ウェル形式で行う。FSECはオートサンプラーによる自動分析。現状で最大384[個/週]の解析が可能。

高正確性

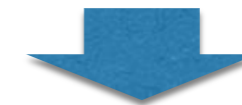
FSEC分析におけるウェル間誤差: ±15%以内。

[技術の利用例]

高難度膜タンパク質の安定化

改変モジュール (部位特異的変異、N末端及びC末端、ループの切除、安定化タンパク質の融合など) 導入時の最適化。

ランダム変異導入 (エラープローンPCRなど) による安定化変異体の高速スクリーニング。



構造解析に利用、機能性抗体作製の抗原として使用、バイオセンサーなどに応用。

連絡先

[所属] 九州大学

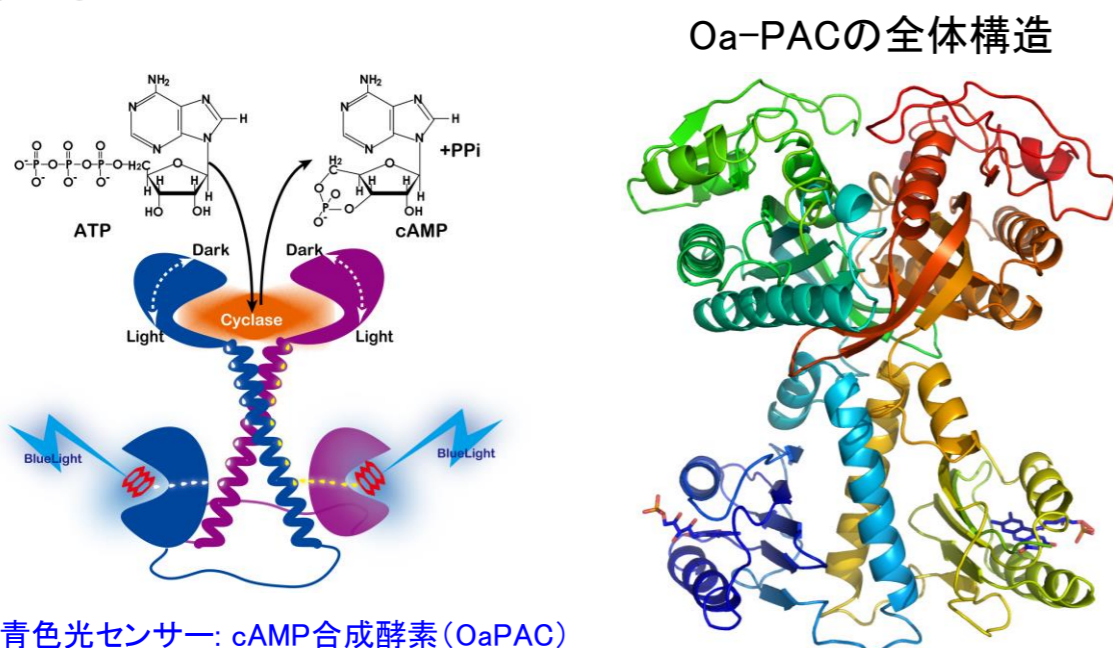
[名前] 白石充典

[E-mail] shiroish@phar.kyushu-u.ac.jp

構造解析用核内タンパク質等の生産と評価 [X線、SAXS]

[技術の概要]

光活性化アデニル酸シクラーゼOa-PAC構造解析と Optogeneticsの応用研究



SAXSによるタンパク質の性状評価

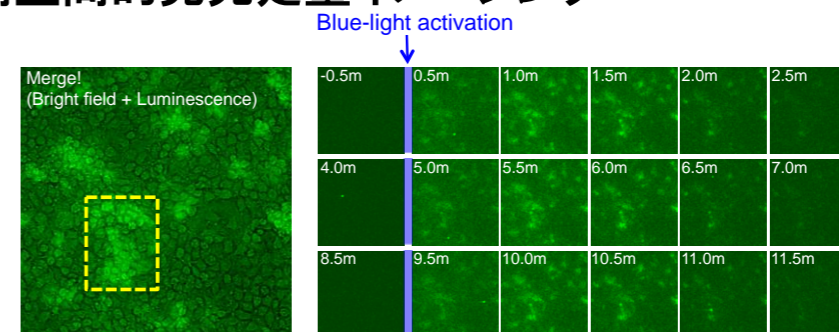
生産された試料溶液にX線を照射し、散乱されるX線の強度分布からタンパク質(複合体)の分散度(分子量)やフォールディングの有無、揺らぎの程度を見積もり、結晶化の可能性を定量的に判断する。また、X線解析されたタンパク質の原子構造から界面活性剤ミセル(膜タンパク質)や電子密度が観測されない揺らいだ領域の構造情報を求める。

設備名

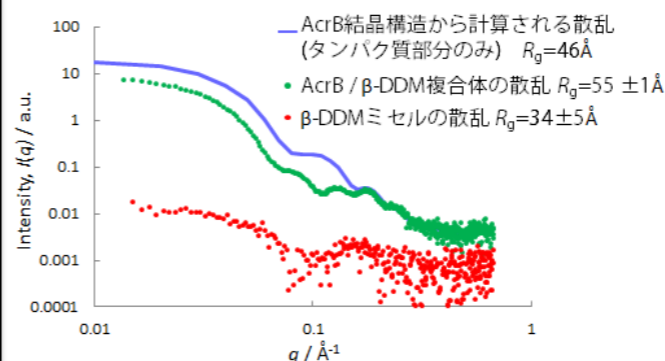
Bio-SAXS1000 (RIGAKU)

[技術の利用例]

Optogeneticsへ応用: 細胞内シグナル分子(cAMP)生成光制御と時間空間的発光定量イメージング



膜タンパク質-界面活性剤ミセル複合体への応用



膜タンパク質AcrB-DDM複合体の慣性半径は結晶構造のタンパク質部分のみから計算される半径より大きく、界面活性剤ミセルの寄与が観測できることが確認できた。また空のミセルに由来する散乱も確認できた。

連絡先

[所属] 横浜市立大学
大学院生命医科学研究科

[名前] 佐藤 衛、朴 三用

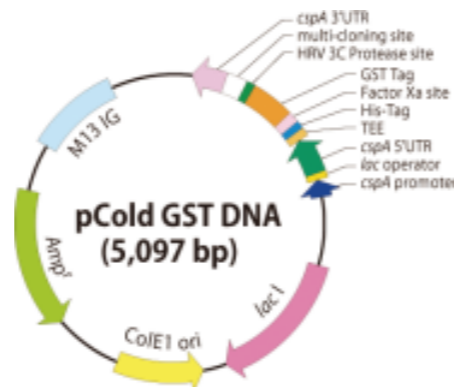
[E-mail] msato@tsurumi.yokohama-cu.ac.jp
park@tsurumi.yokohama-cu.ac.jp

NMR試料調製・安定同位体標識・NMR測定

[技術の概要]

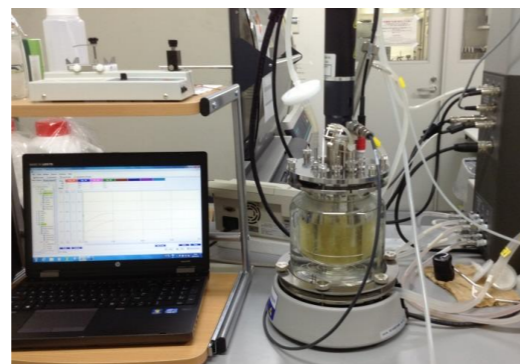
発現ベクターの構築・発現

- ・pCold-GSTシステム(大腸菌)
児嶋らによって開発
タカラバイオより市販
大腸菌で最も効率の良い発現系
- ・蛋白質発現の確認



NMR用安定同位体標識

- ・培養、発現条件の最適化
- ・アミノ酸、部位選択的な安定同位体標識試料の調製



高性能ジャーフェルメンター

NMR装置群

- ・世界最高クラスの超高感度測定
400、500、600、800、950 MHz
- ・目的、標識に応じた多様な測定法
 $^1\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ 多次元NMR測定
 ^{19}F -NMR、スクリーニング



950 MHz + 高感度極低温プローブ

[技術の利用例]

- ・キナーゼなど、大腸菌での発現が困難な蛋白質の発現と安定同位体標識
- ・各種NMR測定に必要な安定同位体標識
- ・安定同位体標識蛋白質のNMR測定、小さな蛋白質(分子量2万以下)の全自動構造解析
- ・高分子量蛋白質など、信号の重なりを解消するアミノ酸選択的 ^{13}C 、 ^{15}N 標識、リジン残基の ^{13}C メチル化、グルタミン残基の ^{19}F 標識
- ・ ^{19}F 化合物ライブラリを用いたNMRスクリーニング、リガンド結合部位の同定、複合体の構造解析

連絡先

[所属] 大阪大学蛋白質研究所

[名前] 児嶋長次郎

[E-mail] kojima@protein.osaka-u.ac.jp

in-cell・in situ NMR

[技術の概要]

in-cell NMR用の試料調製

大腸菌
昆虫細胞
哺乳動物細胞 (HeLa等)

安定同位体標識蛋白質の発現、導入



蛋白質細胞導入装置

- 安定同位体標識蛋白質の発現、導入条件の最適化

in-cell NMR 測定

- 標識、目的に応じた多様なNMR装置、測定法
400、500、600、800、950MHz (溶液)
500、600(DNO)、700(DNP) (固体)



500 MHz + 高感度極低温プローブ (多核対応)



700 MHz + DNP超高感度プローブ

[技術の利用例]

- 大量発現による細胞内蛋白質の安定同位体標識、安定同位体標識蛋白質の細胞内導入
- 大腸菌および動物細胞内の特定蛋白質のNMR計測 (in-cell NMR)
- 超高感度固体NMRによるインタクト細胞のNMR (in situ NMR)
- 細胞内異核種のNMR検出 (リン、ナトリウム、セシウム、水銀、フッ素など)
- 細胞内で蛋白質の構造情報を得るための還元耐性スピンラベル標識、ランタニドキレート導入

連絡先

[所属] 大阪大学蛋白質研究所

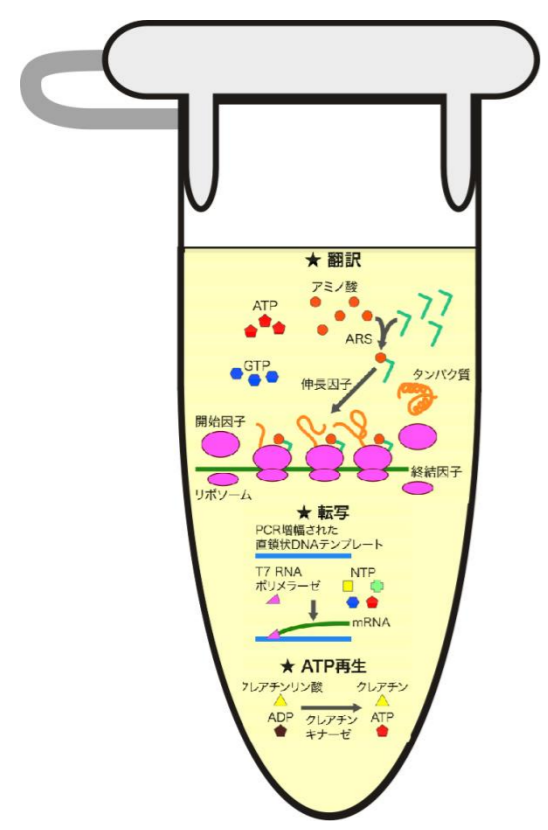
[名前] 児嶋長次郎

[E-mail] kojima@protein.osaka-u.ac.jp

無細胞タンパク質合成技術 (膜タンパク質、高分子量複合体の調製を含む)

[技術の概要]

試験管の中でタンパク質を合成する技術



本技術の優位性

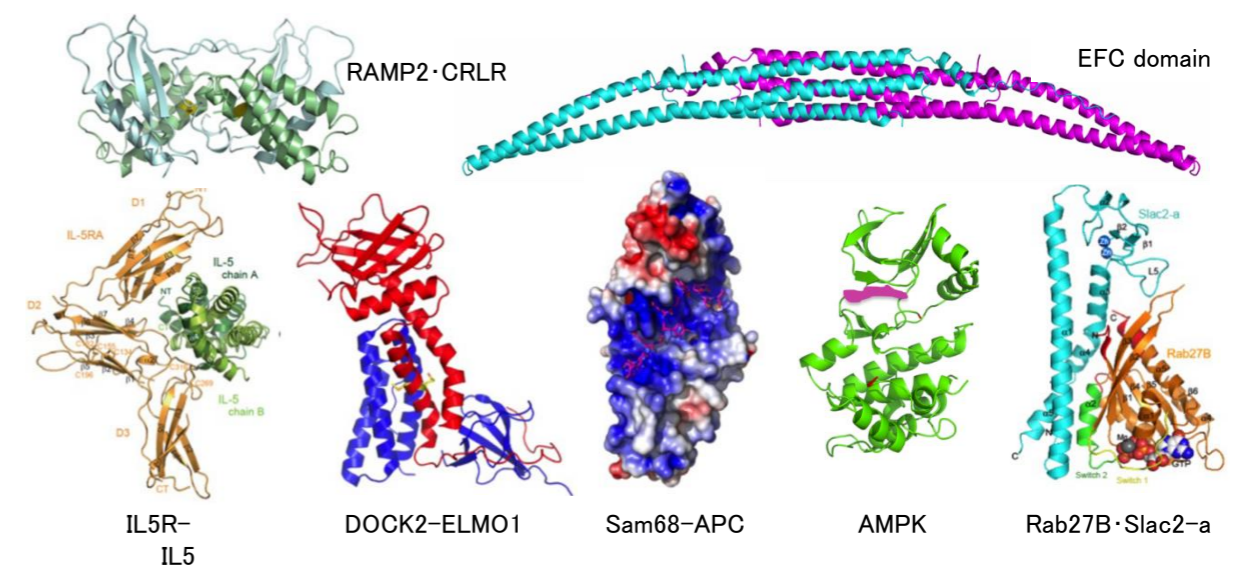
- 1) PCR増幅DNAからのタンパク質発現が可能 (ハイスループット)
- 2) タンパク質合成条件の変更・最適化が可能 (ハイスループット)
- 3) 細胞毒性を示すタンパク質の合成が可能 (非細胞毒性)
- 4) 高速タンパク質合成 (~3-6 hrs.)
- 5) 高収率 (>3-5mg / 9mL reaction)
- 6) 代謝による変換がない (Uniform)
- 7) タンパク質分解を防げる (Stable)
- 8) ロボット化が可能 (HTP)

本技術の適用・応用

- 1) 微生物、ヒト及び動物細胞由来の無細胞系を用いるタンパク質合成
- 2) 天然構造を保持した膜タンパク質の調製
- 3) エピジェネティック修飾を有するヌクレオソームの再構築
- 4) 多種類の構成要素からなる高分子量複合体の調製

[技術の利用例]

本技術により合成され、構造解析されたタンパク質の例



結晶構造解析可能な品質のタンパク質が調製可能

連絡先

[所属] 理化学研究所横山構造生物学研究室

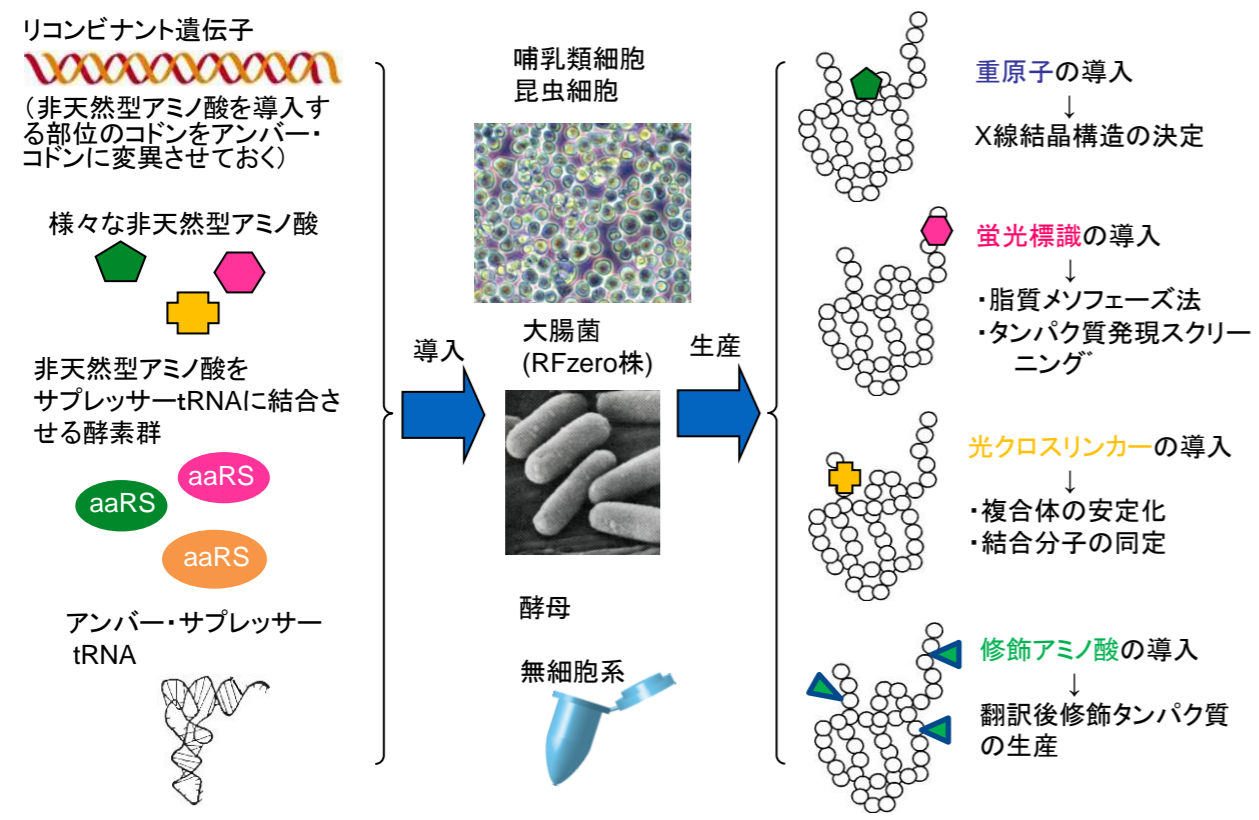
[名前] 横山茂之

[E-mail] TPPT.ssbc@riken.jp

非天然型アミノ酸導入技術 (翻訳後修飾タンパク質の生産を含む)

[技術の概要]

機能性のある非天然型アミノ酸を部位特異的にタンパク質に導入する技術

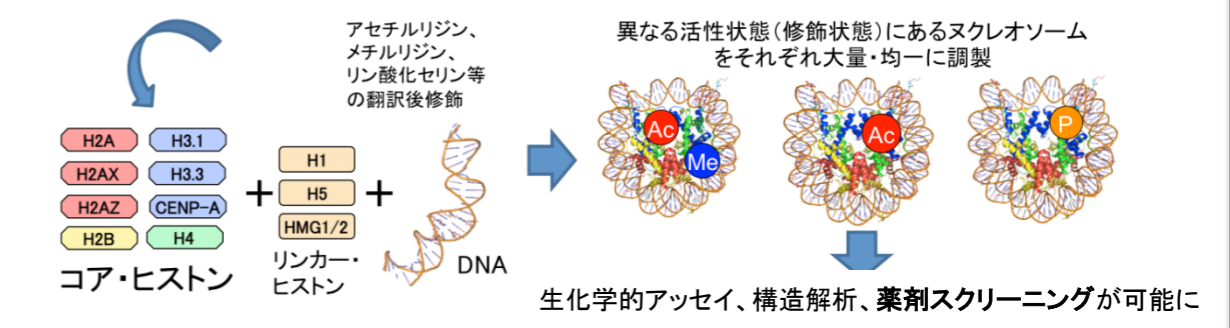


本技術の特徴

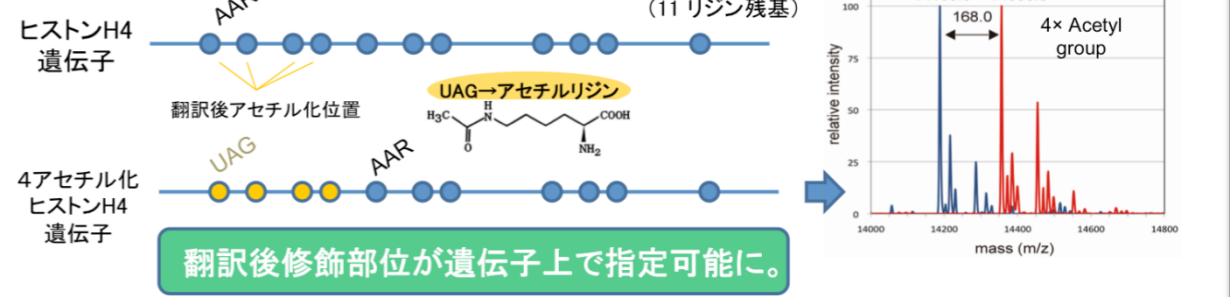
- ・ 部位特異性: 狙った部位に非天然型アミノ酸を導入することが可能
- ・ タンパク質の改変: 非天然型アミノ酸導入により、タンパク質に新たな特性や機能を付与する
- ・ 生物細胞の種類: タンパク質の生産細胞として、大腸菌、培養細胞等の生細胞及び無細胞タンパク質合成系も利用可能

[技術の利用例]

本技術を用いた修飾ヌクレオソームの再構成



4アセチル化ヒストンH4(11kDa)の生産



連絡先

[所属] 理化学研究所横山構造生物学研究室

[名前] 横山茂之

[E-mail] TPPT.ssbc@riken.jp

相関構造解析法のためのNMR相互作用による創薬基盤技術の開発 創薬標的膜タンパク質等を対象としたNMRによる相互作用解析アプローチ

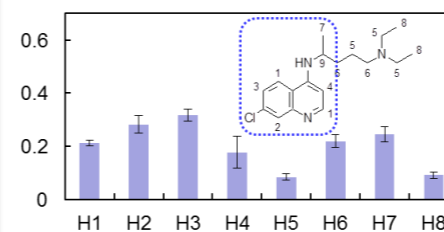
[技術の概要]

結晶構造解析が容易ではない、膜タンパク質などの創薬標的タンパク質を対象として、これまで開発に携わってきた独自のNMR測定法を含む、各種NMR相互作用解析手法を駆使した支援を行います。

- 高精度な相互作用界面同定法である各種交差飽和法を活用した、結晶構造解析が困難な標的タンパク質複合体の相互作用解析の支援。
- 汎用性の高いリガンド観測NMR手法による、化合物バリデーション、ファーマコフォア同定などの支援。
- NMR構造解析・相互作用解析を指向した創薬標的膜タンパク質等の試料調製に関する支援についても応相談。
- 950MHz NMRをはじめとする、最先端NMR装置群を使用。

[技術の利用例]

最新型NMR装置を活用した高精度NMR相互作用解析



DIRECTION法によるリガンドエピトープ同定

酵母発現系を活用したNMR測定用膜タンパク質試料調製



連絡先

[所属] 横浜市立大学大学院
生命医科学研究科

[名前] 高橋栄夫

[E-mail] hid@tsurumi.yokohama-cu.ac.jp

創薬コンサルティング

[技術の概要]

専門家との創薬ブレインストーミング

最初から出口を踏まえて創薬開発を行うため、北大病院臨床開発研究センターとの連携による製薬企業OB等の専門家が加わったディスカッション、Brain storming (BS)ミーティング、創薬シーズ発掘を進めている。

- ・創薬標的とその競合状況等に関するアドバイス
- ・ハイスループット化に関するアドバイス



シーズ探索・ 創薬BSミーティング

標的タンパク質発現系と結晶化の相談

糖鎖修飾が不要な場合



大腸菌

糖鎖修飾が必要な場合



HEK293S GnTI-細胞



カイコ
バキュロウイルス

発現系

結晶化

細胞表面受容体・高等動物由来標的タンパク質・
化合物複合体の結晶構造解析の実績あり

発現系構築・結晶化技術指導

[技術の利用例]

➤ スクリーニングへの展開

2015年3月までに38件の相談会を実施し、12件がスクリーニングを実施。3件は評価系構築中。
このうち、北大病院との連携による事前評価を受けた4件について、全てスクリーニングを展開している。

➤ タンパク質発現と結晶化

- 大腸菌封入体発現およびリフォールディング、ヒト培養細胞、カイコバキュロウイルス発現系など複数の技術を使い、標的タンパク質を調製した。
- 基質・細胞表面受容体の共結晶解析から、その阻害剤化合物合成の方針を決定した。

連絡先

[所属] 北海道大学薬学研究院
創薬科学研究教育センター

[名前] 前仲勝実

[E-mail] machine_info@pharm.hokudai.ac.jp

高圧下での膜タンパク質の細胞膜からの可溶化

[技術の概要]

高圧処理による膜タンパク質の可溶化

膜タンパク質の細胞膜からの可溶化(抽出)は、通常、膜画分を界面活性剤を含む緩衝液中で分散させることにより行われます。

一方で高圧処理による可溶性タンパク質の封入体からの可溶化や巻き戻しが報告され、高圧条件がタンパク質の立体構造形成に有利に働く場合が知られています。

本技術では、上記2つの方法を組合せ、膜タンパク質の界面活性剤による可溶化を高圧(~200 MPa)下で行うことで、活性を保持したまま、高効率で膜タンパク質を可溶化させることを目的としています。

高圧処理装置→
(Barofold社製)

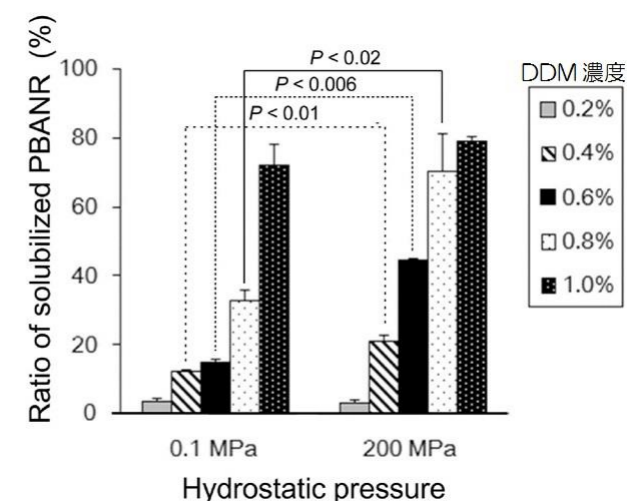


[技術の利用例]

□ GPCR(クラスA)の可溶化への応用

・ 0.6% (w/v) DDM存在下、200 Mpa、室温、1 h 処理により、常圧の場合の2.5倍量の可溶化GPCRが得られました。

・ この高圧処理で得られたGPCRはリガンド結合能を保持していました。
(論文投稿中)



連絡先

[所属] 東京大学大学院農学生命科学研究科

[名前] 永田宏次

[E-mail] aknagata@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp