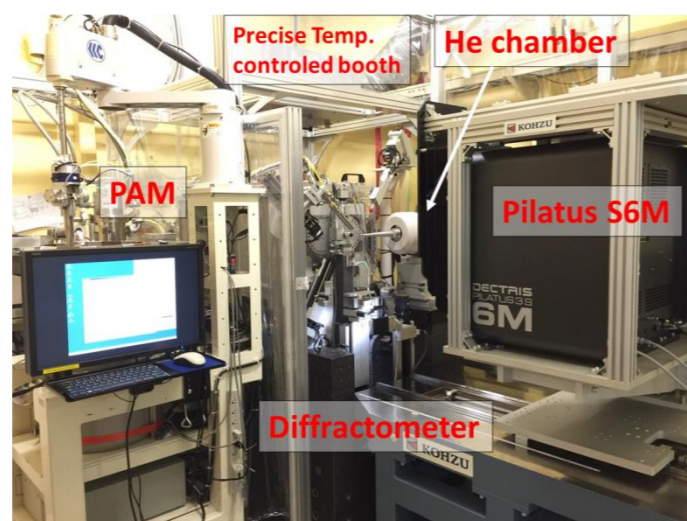


# Photon Factory タンパク質結晶学ビームライン

## [技術の概要]

Photon Factoryでは、結晶のサイズや構造解析の手法に適したビームラインを選び、共通化されたインターフェースで効率的に回折データ収集を行うことができます。

経験者に対してはビームタイム供給、初心者・希望者に対しては実験から解析までサポートします。また、リモートアクセスによる実験も可能です。



BL-17A 実験ステーション

## 支援に供する設備名

高エネルギー加速器研究機構・タンパク質結晶学ビームライン (BL-1A、BL-5A、BL-17A、AR-NW12A、AR-NE3A)

## [技術の利用例]

- 10ミクロン程度の微小結晶からの回折データ収集
- 低エネルギーX線を用いたS-SAD位相決定
- 超低エネルギーX線による異常分散シグナルを利用した分子中の軽原子の同定
- 結晶化プレートからの回折スクリーニング、回折データ収集
- オンライン分光測定 (予定)
- 大強度ビームによるハイスループットデータ測定およびスクリーニング
- 全自動回折データ収集・データ処理

## 連絡先

[所属] 高エネルギー加速器研究機構

[名前] 松垣直宏、山田悠介

[E-mail] naohiro.matsugaki@kek.jp  
yusuke.yamada@kek.jp

# 低エネルギーSAD法

## [技術の概要]

強力かつ高品質な低エネルギーX線を利用し、ヘリウム環境下での回折データ収集を行うことで、天然タンパク質結晶からの微弱な異常散乱シグナルを用いて位相決定を行います。



完全ヘリウム環境下での実験が可能なBL-1Aの回折計

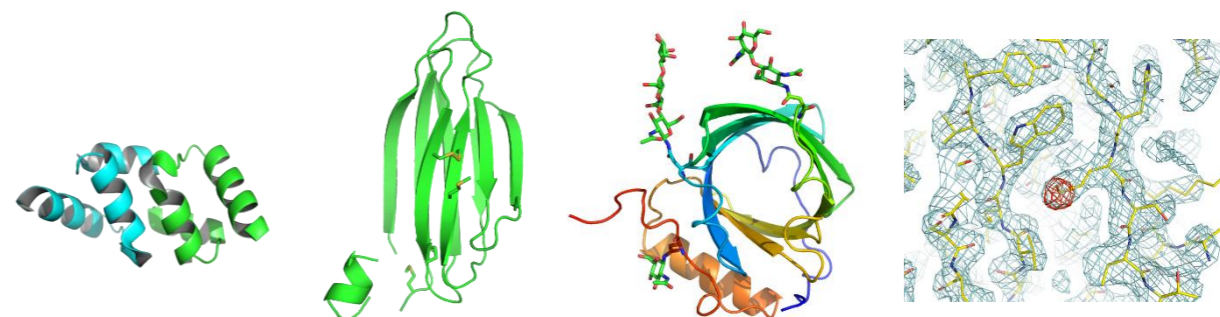
試料のマウントからデータ収集、データ処理/解析までサポートします。

**支援に供する設備名**

ビームラインBL-1A、BL-17A

## [技術の利用例]

- 重原子ラベルの困難な高難度タンパク質の構造解析
- 迅速構造決定
- 原子種の同定
- 低分解能データでの主鎖トレースの確認



BL-1Aにて構造決定されたタンパク質

## 連絡先

[所属] 高エネルギー加速器研究機構

[名前] 松垣直宏、山田悠介

[E-mail] naohiro.matsugaki@kek.jp  
yusuke.yamada@kek.jp

# Photon FactoryにおけるBioSAXS実験

## [技術の概要]

### 生体高分子の溶液散乱実験 (BL-6A、10C、15A2)

溶液状態での低分解能性状・構造解析

- 構造状態(分子のサイズ、分子量、会合状態)推定・評価
- ab initioモデリングによる構造解析
- ドメイン配置の決定
- 結晶構造などと組み合わせた相関構造解析
- エキスパートのビームタイム利用
- 初心者向け講習会・テスト測定のカ開催

### サンプルチェンジャーによるハイスループット測定

試料分注機能を備えた自動測定システムを構築  
16 sample/hour (現状)、192 sampleを連続測定可能

### HPLC/MALSを組み合わせた高精度溶液試料解析システム

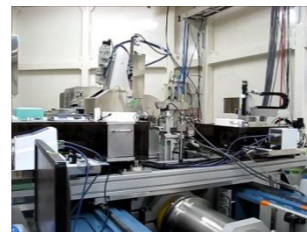
HPLC(SEC)による画分で連続的にSAXS測定を行う  
SEC-MALSによる絶対分子量決定と組み合わせ、従来より不安定、複雑な系での解析を可能にする。



BL-15A2



HPLC & MALS

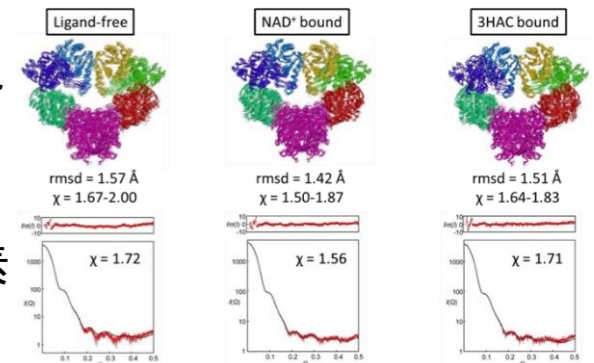


サンプルチェンジャー

## [技術の利用例]

### 相関構造解析

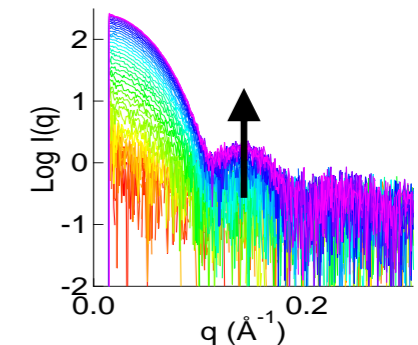
結晶構造解析とSAXSを組み合わせ、脂肪酸β酸化酵素複合体のリガンド結合状態の異なる四次構造モデルを構築し、酵素反応中の構造変化を可視化。



Tsuchiya & Shimizu *et al. Structure* (2006)

### SEC-SAXS

標準試料(Glucose isomerase)によるテストデータ。  
SECの溶出にしたがって散乱強度が増加していく。



## 連絡先

[所属] 高エネルギー加速器研究機構

[名前] 西條慎也、清水伸隆

[E-mail] shinya.saijo@kek.jp

nobutaka.shimizu@kek.jp

# SPring-8遠隔自動実験支援システム

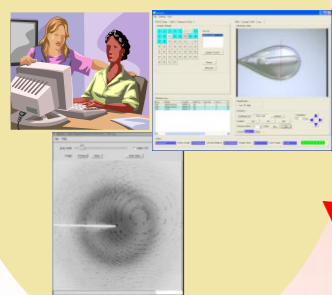
## [技術の概要]

- SPring-8に出張せずにデータ収集が可能。
- 凍結試料をビームラインに宅配便で送付。
- 実験条件はWEBで指定、測定データはネットワーク経由でダウンロード。
- BL26B1&B2を利用した自動データ収集。

### システム概念図

①凍結結晶試料送付

利用者(サイト外)



②インターネット経由で実験

認証サーバー

ビームライン

SPring-8

機器制御サーバー



③データダウンロード

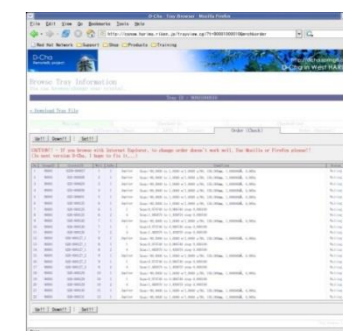
試料データベース

2種の実験形態をサポート

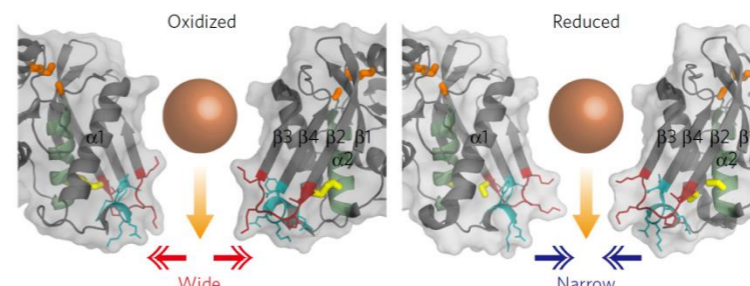
- 1) メールイン・データ収集→オペレータ介助による実験代行
- 2) 遠隔実験→より柔軟かつリアルタイムに実験を実施

## [技術の利用例]

メールインデータ収集では、多数のタンパク質結晶試料を高効率でスクリーニングし、良質な結晶について自動データ収集を実行できます。下記の例では得られたデータから構造解析を行った結果、異なる状態にある分子の立体構造変化をとらえることに成功しました。



上) WEBデータベースD-Cha  
実験条件や試料情報を管理



左) 酸化型および還元型Lon  
プロテアーゼの分子内チャ  
ンバー出口付近の結晶構造

参考文献:

"A Redox Switch Shapes the Lon Protease Exit Pore to Facultatively Regulate Proteolysis," Nishii Wataru et al., Nature Chemical Biology, 11, (2015) 46-51

## 連絡先

[所属] 理化学研究所

[名前] 上野 剛

[E-mail] ueno@spring8.or.jp

# SPring-8高難度タンパク質結晶構造解析

## [技術の概要]

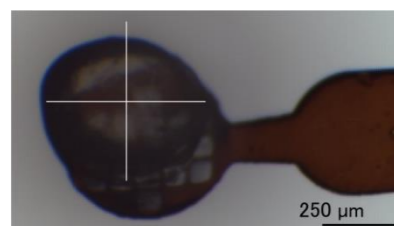
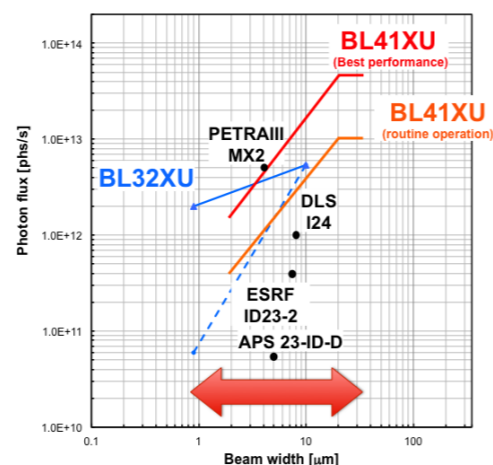
SPring-8では、あらゆるサイズの試料結晶に対して世界最高強度のマイクロビームを用いた回折データ収集が可能

### 支援メニュー

- ・ ビームライン利用、測定支援

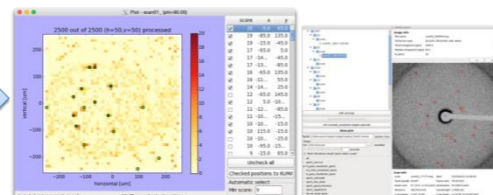
### 支援に供する設備名

- ・ BL32XU(高輝度微小ビーム)
- ・ BL41XU(広いビームサイズ領域)

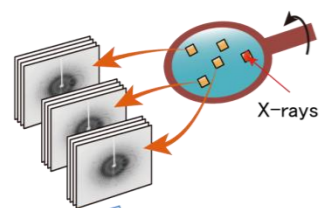


多数の微小結晶がマウントされたループ

高速スキャン

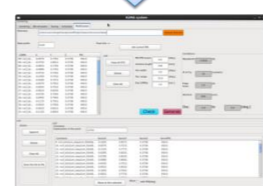


結晶位置の自動決定



マージして構造解析

高輝度ビームを利用するための測定ツール



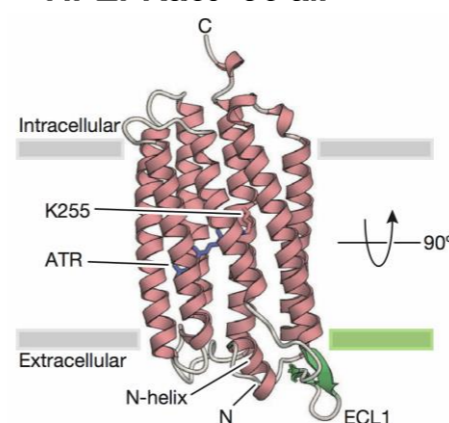
測定条件決定

1. タンパク質微小結晶を高速検出器で探索
2. 放射線損傷を考慮した高効率・高精度・迅速データ収集

## [技術の利用例]

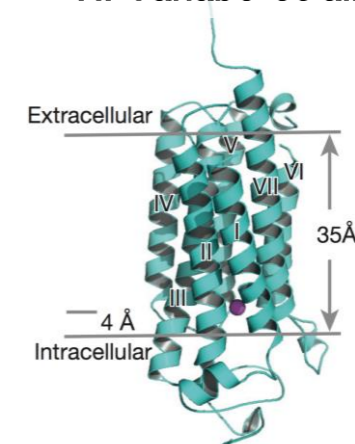
高難度タンパク質結晶構造解析では、LCP法等により結晶化した数十マイクロン以下の膜タンパク質微小結晶から、高分解能構造解析に成功しています。

**KR2**  
(光駆動型Na<sup>+</sup>ポンプ)  
H. E. Kato *et al.*



*Nature*, 521, 48–53 (2015)

**AdipoR1/R2**  
(アディポネクチン受容体)  
H. Tanabe *et al.*



*Nature*, 520, 312–6 (2015)

## 連絡先

- [所属] 1. 理化学研究所  
2. 高輝度光科学研究センター

[名前] 平田邦生<sup>1</sup>、長谷川和也<sup>1,2</sup>

[E-mail] hirata@spring8.or.jp

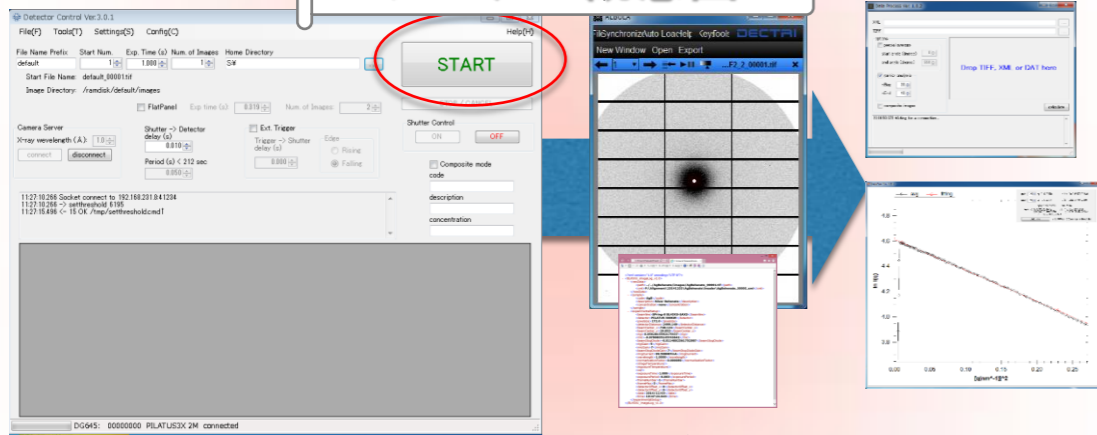
kazuya@spring8.or.jp

# SPring-8タンパク質溶液散乱測定

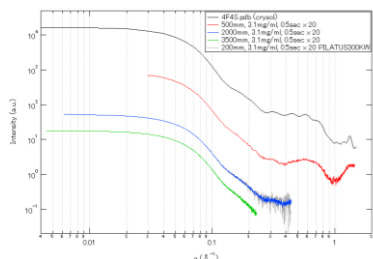
## [技術の概要]

- BL45XUの高輝度ビームを用いた小角散乱測定
- 測定からギニエ解析までの自動化システム
- 大型2次元検出器を用いた短時間、精密測定
- オンラインHPLCによる精製困難な試料の散乱測定
- ストップフロー装置などを用いた時分割測定

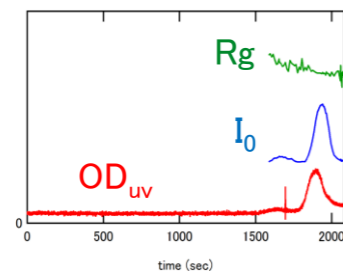
### システム概念図



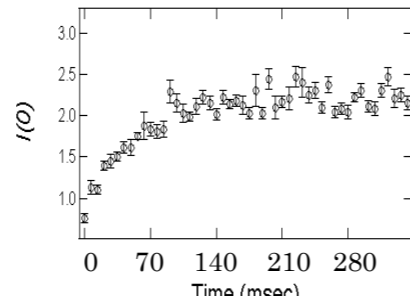
1クリックで測定からギニエ解析



ワイドqレンジでの測定  
( $0.005 < q \text{ (Å}^{-1}\text{)} < 1.5$ )



ゲルろ過による  
OD<sub>UV</sub>、I<sub>0</sub>、Rg同時測定

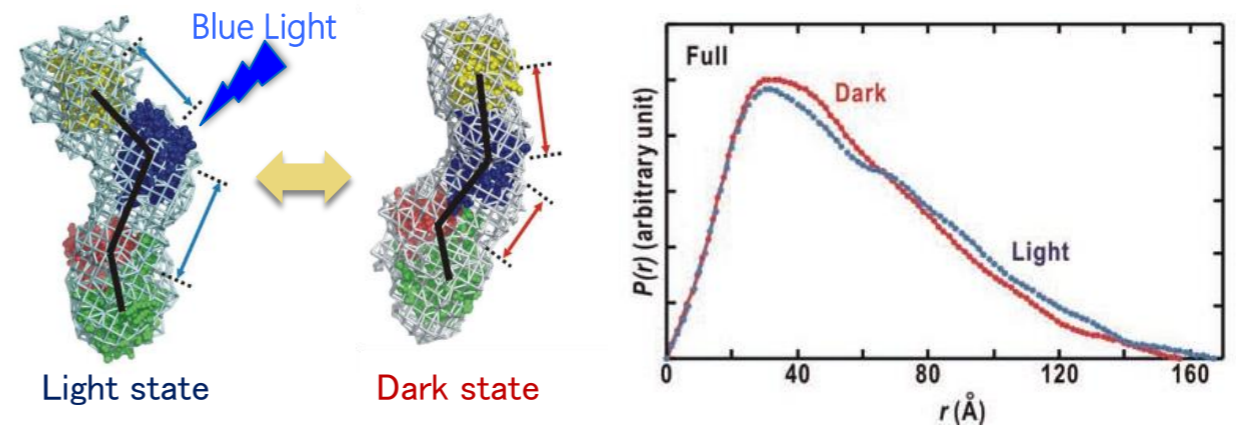


5ミリ秒からの時分割測定

## [技術の利用例]

高輝度放射光を用いた短時間精密測定により、溶液中での光反応タンパク質の構造変化を観察

光照射による溶液中でのPhototropinの可逆的な構造変化



参考文献

Okajima K. et al., J. Biol. Chem., **289**(1), (2014) 413–22

## 連絡先

[所属] 理化学研究所

[名前] 引間孝明

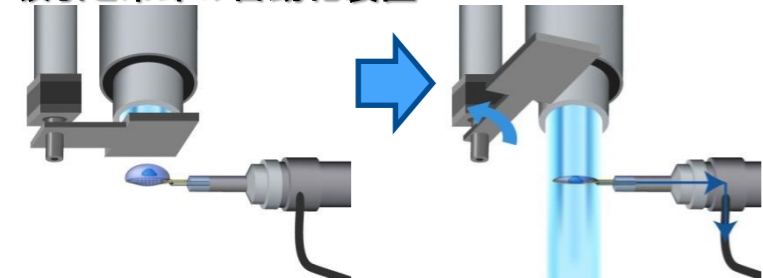
[E-mail] hikima@spring8.or.jp

# 非標識タンパク質構造解析 (S-SAD法)

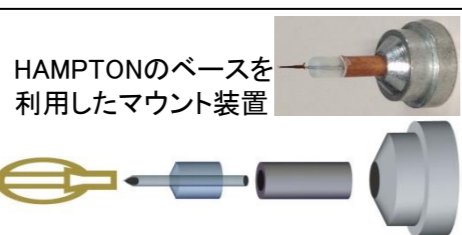
## [技術の概要]

S-SAD法は、イオウの異常散乱を利用して構造解析を行う方法である。タンパク質を標識する必要がないので重原子置換ができない結晶に対し、特に有効である。この方法では異常散乱シグナルを強めるために長波長X線を使うが、その際に、結晶周りの溶液による吸収を抑える必要がある。S-SAD法用に開発した「溶液フリー結晶マウント装置」、「自動吸引冷却装置」は、いずれも放射光施設に設置済みであり、これを利用した回折データ収集および構造解析の支援を行う。

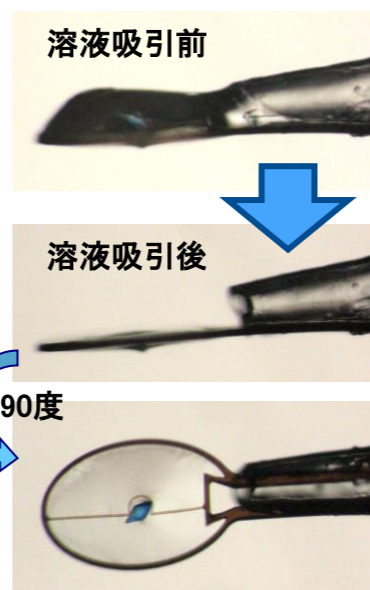
### 吸引と冷却の自動化装置



自動吸引装置



HAMPTONのベースを利用したマウント装置



溶液吸引前

溶液吸引後

90度

## 支援に供する設備

- ・S-SAD用溶液フリー結晶マウント装置 (PF、SPring-8)
- ・S-SAD用自動吸引冷却装置 (PF、SPring-8)
- ・あいちシンクロトロン光センター ビームラインBL2S1
- ・Crターゲット回折装置 (北海道大学大学院先端生命科学研究院)

## [技術の利用例]

S-SAD法による構造解析例  
(PF長波長ビームラインBL1A)

SmDG

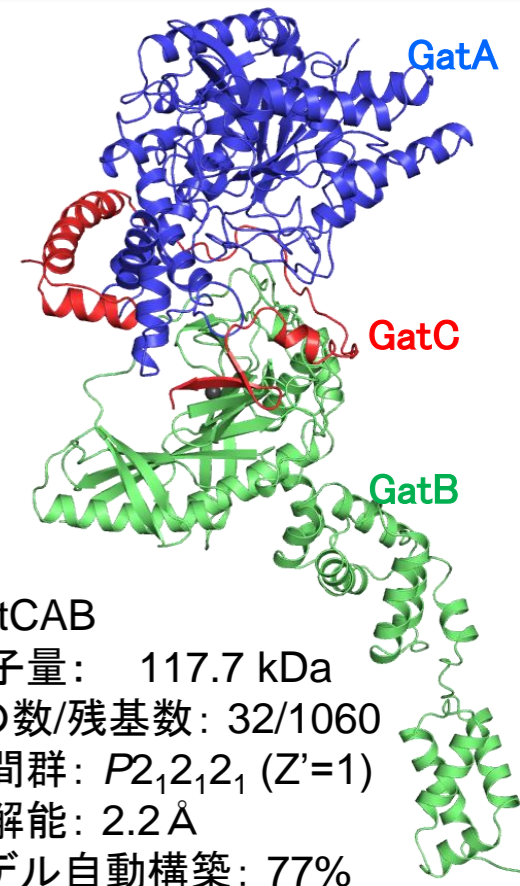
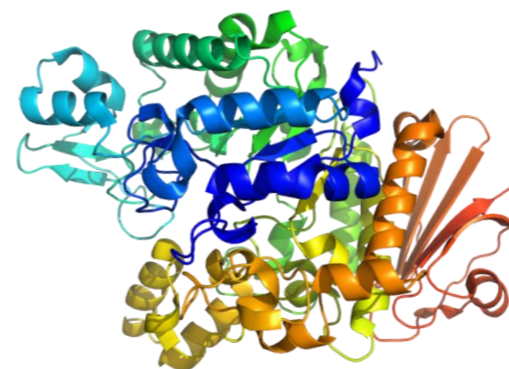
分子量: 56.2 kDa

Sの数/残基数: 22/543

空間群:  $P2_12_12_1$  ( $Z'=1$ )

分解能: 2.4 Å

モデル自動構築: 79%



GatCAB

分子量: 117.7 kDa

Sの数/残基数: 32/1060

空間群:  $P2_12_12_1$  ( $Z'=1$ )

分解能: 2.2 Å

モデル自動構築: 77%

## 連絡先

- [所属] 1. 北海道大学大学院先端生命科学研究院  
2. 名古屋大学シンクロトロン光研究センター

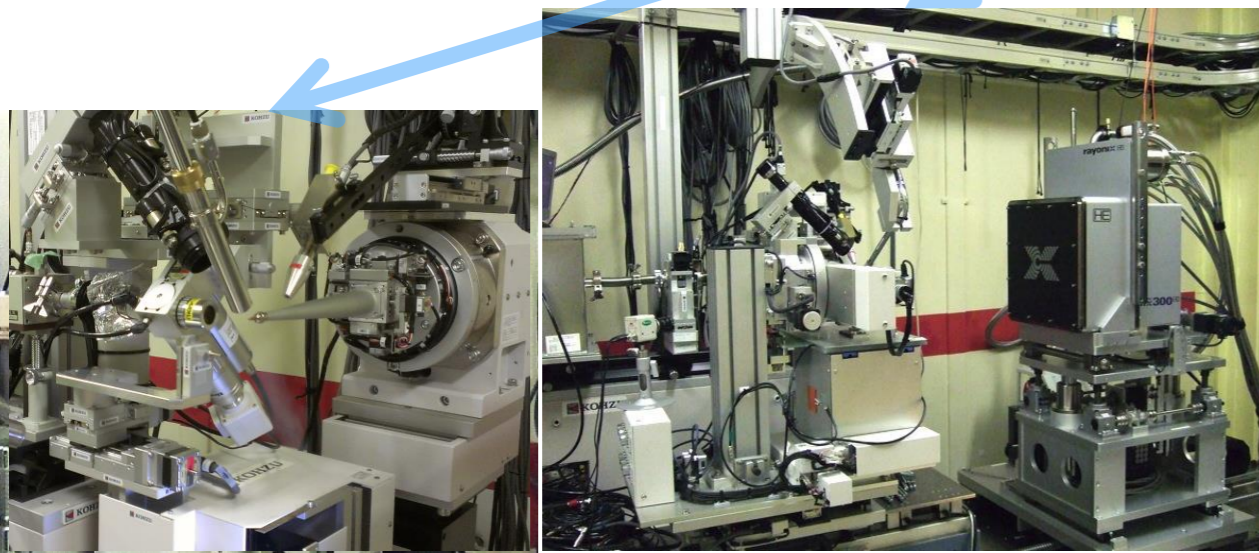
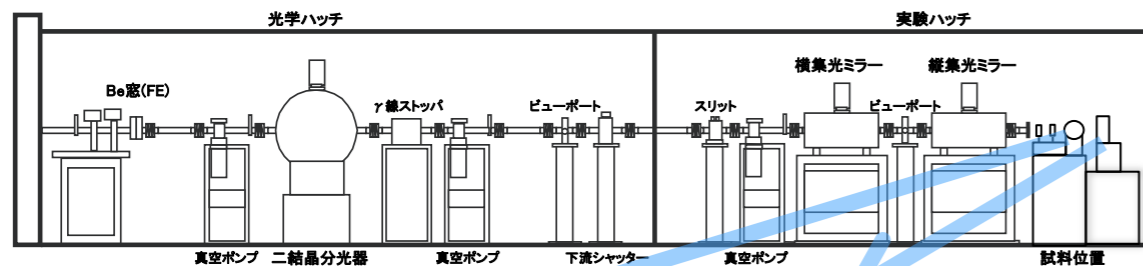
[名前] 田中 勲<sup>1</sup>、姚 閔<sup>1</sup>、渡邊信久<sup>2</sup>

[E-mail] tanaka@castor.sci.hokudai.ac.jp  
yao@castor.sci.hokudai.ac.jp  
nobuhisa@nagoya-u.jp

# 生体超分子複合体構造解析ビームライン

## [技術の概要]

SPring-8 生体超分子複合体構造解析ビームライン  
(BL44XU) (蛋白研ビームライン)

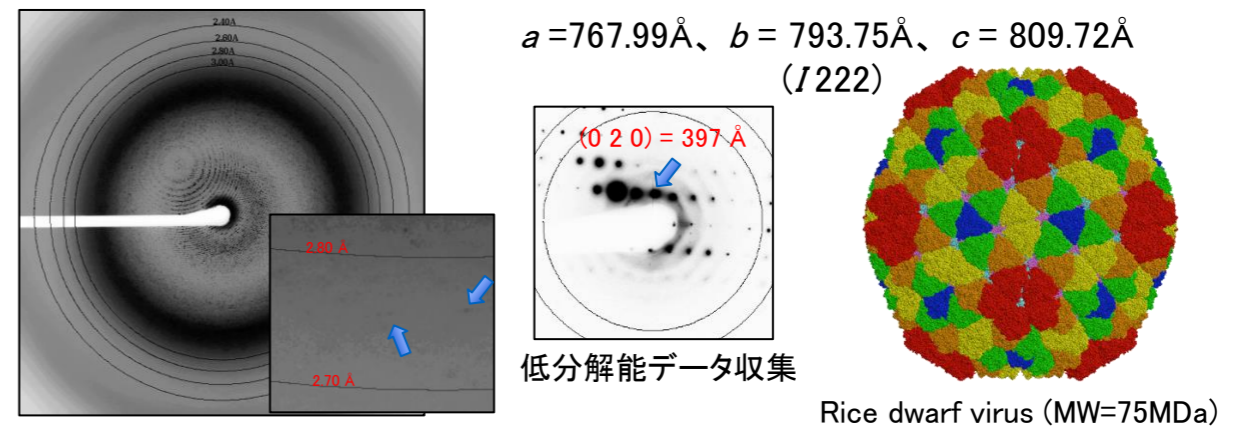


500Åを超える長格子定数結晶や分解能の低い結晶、膜蛋白質結晶などからの高精度な回折強度データ収集と構造解析(超高分解能データ収集も可能)

- 2000Åの格子定数の結晶から3.7Å分解能のデータ収集が可能
- 光学系のレイアウト変更なしで0.7Å以上の高分解能データ収集が可能

## [技術の利用例]

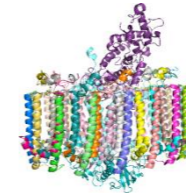
巨大なウイルス結晶からの回折強度データ収集



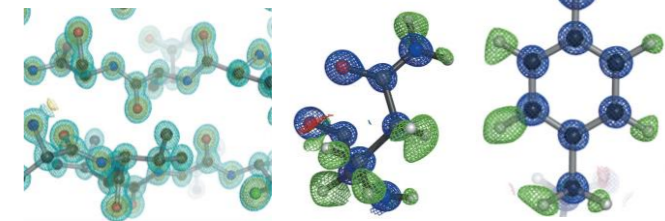
高分解能データ収集

膜蛋白質複合体の構造解析

LH1-RC 複合体  
(MW=393KDa)



超高分解能データ収集



## 連絡先

[所属] 大阪大学蛋白質研究所

[名前] 中川敦史

[E-mail] [bladmin@protein.osaka-u.ac.jp](mailto:bladmin@protein.osaka-u.ac.jp)

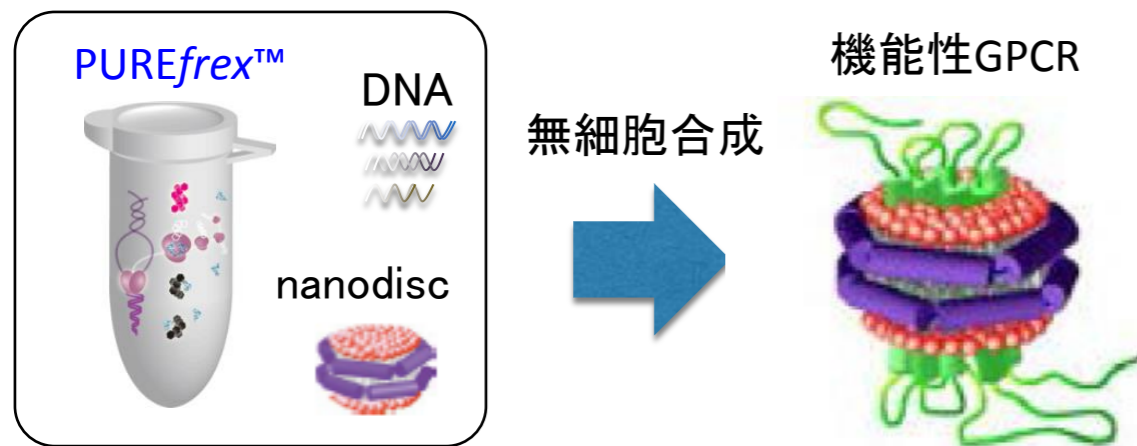


# PURE systemの効率化による膜タンパク質合成

## [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

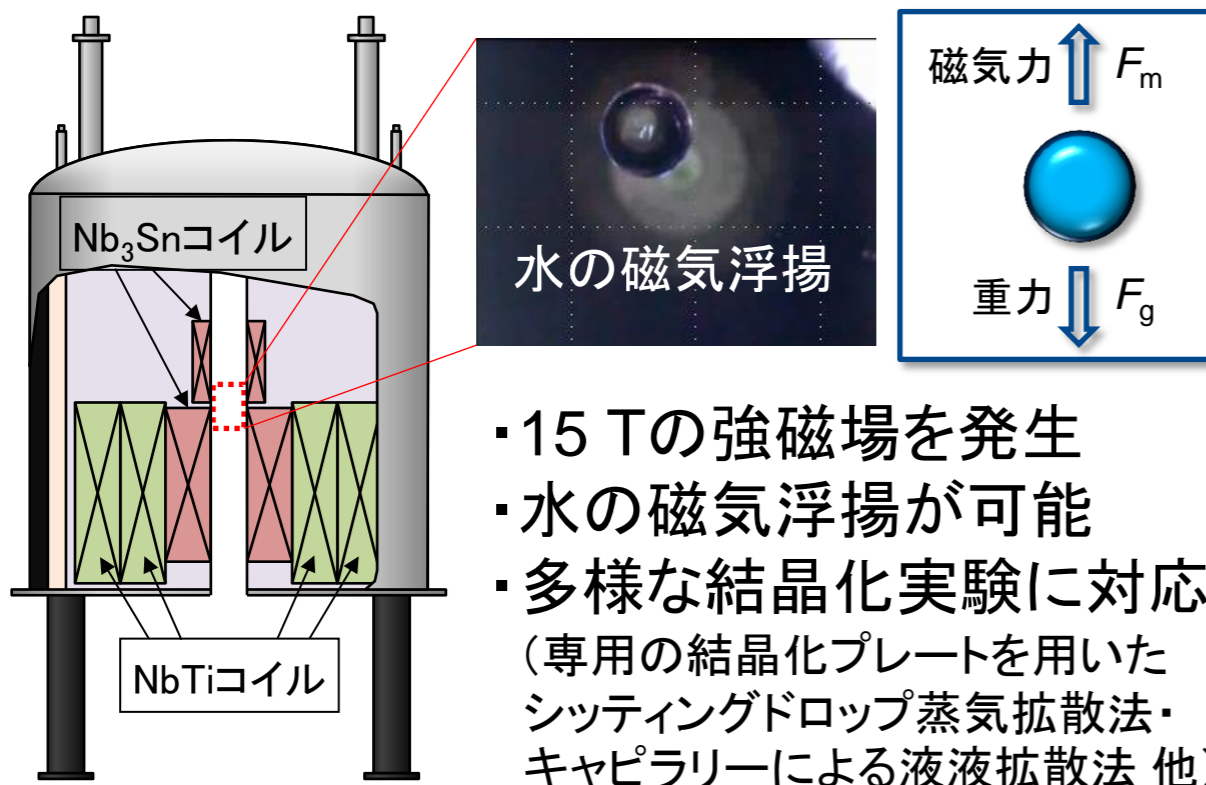
[名前] 上田卓也

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

# 磁気力場中での結晶化

## [技術の概要]

磁気力場とは、超伝導磁石などによる強磁場 ( $B$ ) とその磁場勾配 ( $\text{grad}B$ ) の積に比例した磁気力が発生している空間のことを指します。本支援に供する装置では、水に対する重力を相殺するほどの強い磁気力を発生させることができ、自然対流が抑えられる擬似微小重力環境を各種実験に利用することが可能です。



## [技術の利用例]

- 擬似微小重力環境を利用した高品質タンパク質結晶の取得
  - 用途
    - ・初期条件スクリーニング
    - ・結晶化条件最適化
  - 手法
    - ・シッティングドロップ蒸気拡散法
    - ・バッチ法
    - ・液液拡散法
- 強磁場を利用した磁場配向結晶の取得

## 連絡先

[所属] 東京大学大学院農学生命科学研究科

[名前] 田之倉 優

[E-mail] [amtanok@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp](mailto:amtanok@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp)

# 高圧環境を利用したタンパク質の巻き戻し技術

## [技術の概要]

高圧環境では、水素結合が保持されたまま、静電的相互作用や疎水性相互作用が軽減されます。本支援に供する装置では、封入体として発現したタンパク質を、変性剤を添加することなく加圧操作により可溶化し、減圧と共に正しいフォールドを取った可溶性タンパク質を抽出することができます。

一度に200条件のスクリーニングが可能な高圧処理槽

天然構造への巻き戻し



> 16 h  
加圧 (約2000気圧)  
→ 減圧 (常圧)



天然構造の救出



> 16 h  
加圧 (約2000気圧)  
→ 減圧 (常圧)



## [技術の利用例]

- 高圧環境を利用した、凝集したタンパク質の可溶化
  - 用途
    - 封入体からの可溶性タンパク質の調製
    - アポ型タンパク質の取得
  - 手法
    - ハイスループットな巻き戻し条件スクリーニング
    - 最適な巻き戻し条件での大量調製
- 膜タンパク質の可溶化

## 連絡先

[所属] 東京大学大学院農学生命科学研究科

[名前] 田之倉 優

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

# タンパク質の大規模結晶化スクリーニング

## [技術の概要]

タンパク質の結晶構造解析を行うには、結晶化条件を見出すことが必須である。現在のところ、数多くの条件を試してみるしか有効な方法はなく、少しでも少ないサンプルを少しでも多くの結晶化条件で試すことが求められている。

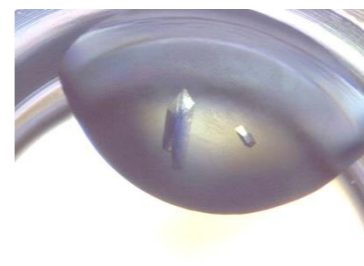
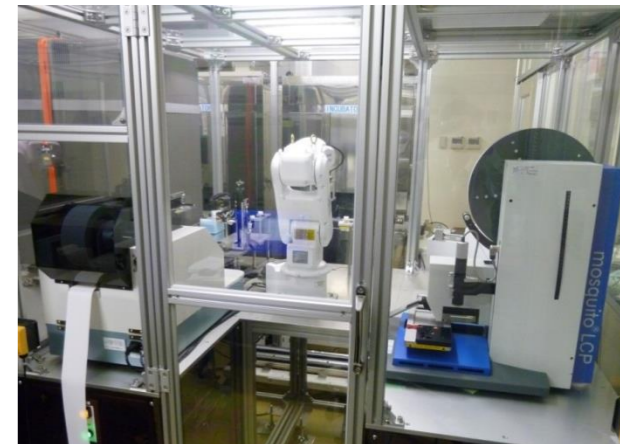
本課題では、大規模全自動結晶化観察システムを開発しこれを支援に供する。本システムは、0.1-0.5  $\mu\text{L}$ の分注が可能で、必要なサンプル量を減らすことを可能にしている。結晶化沈殿剤は、現在1056種類を常備している。

結晶化ドロップの観察はスケジュールに従って全自動で行われ、複数のスライス画像から自動生成される観察画像はネットワーク経由で所外からもアクセス可能である。また、通常の可視光観察に加え、紫外線蛍光および第2次高調波による観察も可能である。

## [技術の利用例]

[右図] 全自動結晶化観察システム

[下図] 3つの観察モードによるタンパク質結晶の画像。UV蛍光および第2次高調波により、タンパク質と塩の結晶を簡易判別することができる。



可視光



UVによる蛍光



第2次高調波

## 連絡先

[所属] 高エネルギー加速器研究機構

[名前] 加藤龍一

[E-mail] ryuichi.kato@kek.jp

# 高分解能結晶取得システム

## [技術の概要]

結晶の品質が低い原因のひとつとして、タンパク質分子表面の結晶パッキング部位におけるリジン残基の存在が挙げられます。タンパク質分子表面のリジン残基を実験的に検出できればタンパク質結晶の高品質化につながります(図1)。我々は化学修飾によるタンパク質の分子表面リジン残基の簡便な検出法を開発しています(図2)。

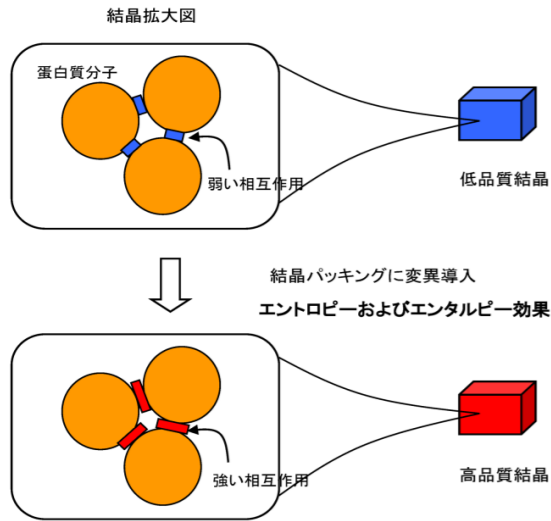


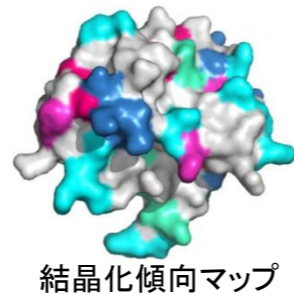
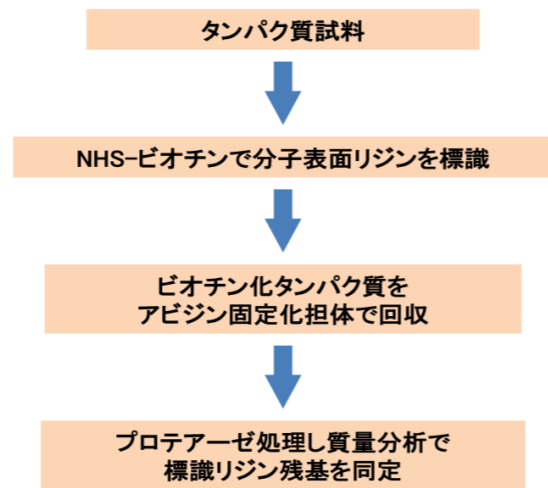
図1 結晶パッキング部位への変異導入による結晶品質の向上

パッキング部位の表面リジン残基は弱い相互作用の原因となるので、そこに変異導入を行う。

実験的に検出された分子表面リジン残基を結晶化傾向の高いアミノ酸残基に置換する変異体設計を行い、解析目的タンパク質の初期結晶を取得します。

図2 分子表面リジン残基の特定手順

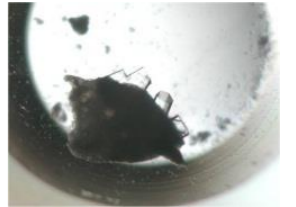
最終的にペプチドマッピングを行って、標識された分子表面リジン残基を特定する。



## [技術の利用例]

左記の技術で得られた変異体の初期結晶に当グループで開発した下記の要素技術を適用することで、解析目的タンパク質の高分解能結晶を効率的に取得できます。

1. ゼオライトによるタンパク質の結晶化制御  
ヘテロエピタキシャル成長を促進する鉱物を用いてタンパク質を結晶化します。

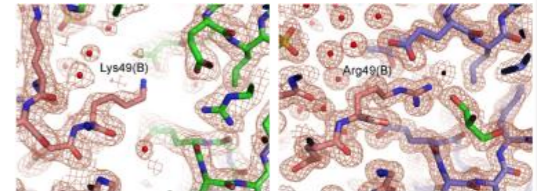


ゼオライト表面に析出したタンパク質結晶

Sugahara *et al.* (2008) *Acta Cryst. D* **64**, 686-695  
Sugahara *et al.* (2011) *Crystal Growth & Design* **11**, 110-120

2. 変異導入によるタンパク質結晶の品質改善

結晶パッキングを強化する変異導入によりタンパク質結晶のX線回折能を改善します。



野生型 変異型

Mizutani *et al.* (2008) *Acta Cryst. D* **64**, 1020-1033

## 連絡先

[所属] 理化学研究所  
放射光科学総合研究センター

[名前] 国島直樹

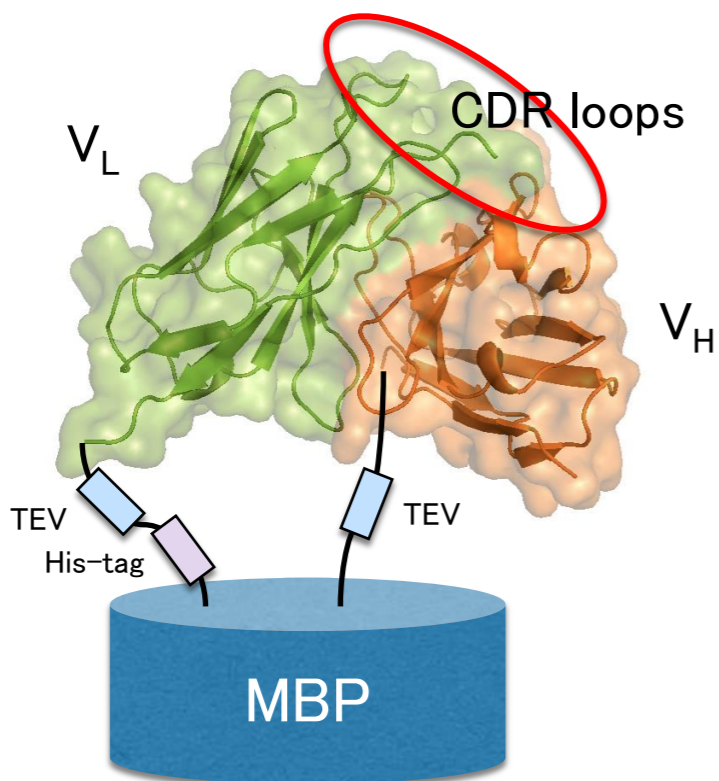
[E-mail] kunisima@spring8.or.jp

# 結晶化シャペロンとして用いる Fvフラグメントの大量生産技術:IRAT法

## [技術の概要]

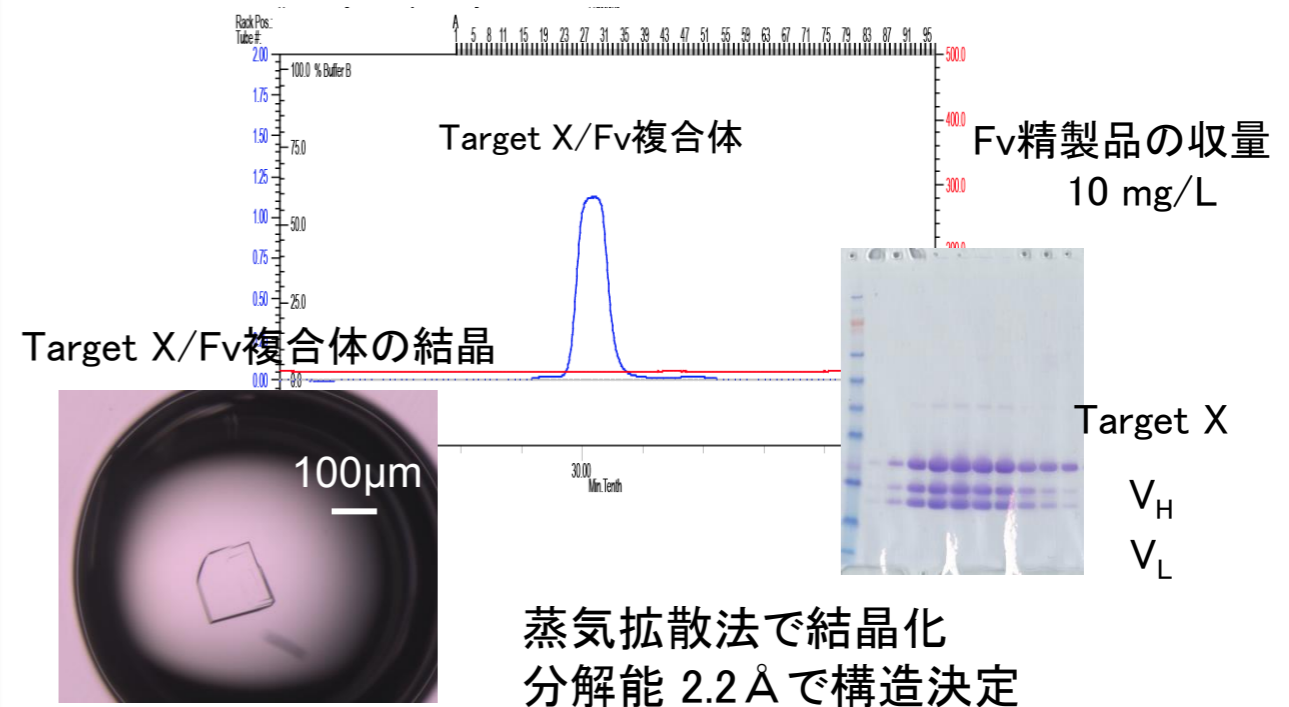
IRAT法 (Intervening Removable Affinity Tag法)

- 膜タンパク質の結晶化用のFv生産法として開発
- 抗体医薬のFv部分 ( $V_L$ 、 $V_H$ ) をMBPを介在させてグラム陽性細菌 (*Brevibacillus*) で分泌発現
- リンカーにTEVサイトとHisタグが挿入
- 簡便・迅速にFvの精製が可能 (5-10 mg/L以上)
- ターゲット分子/Fvを共結晶化することが可能
- 抗体医薬の結合様式・作用機序を解明
- 立体構造を基に低分子リガンド設計に寄与



## [技術の利用例]

- 市販の抗体医薬のFv部分とターゲット分子Xの共結晶化



## 連絡先

[所属] 京都大学

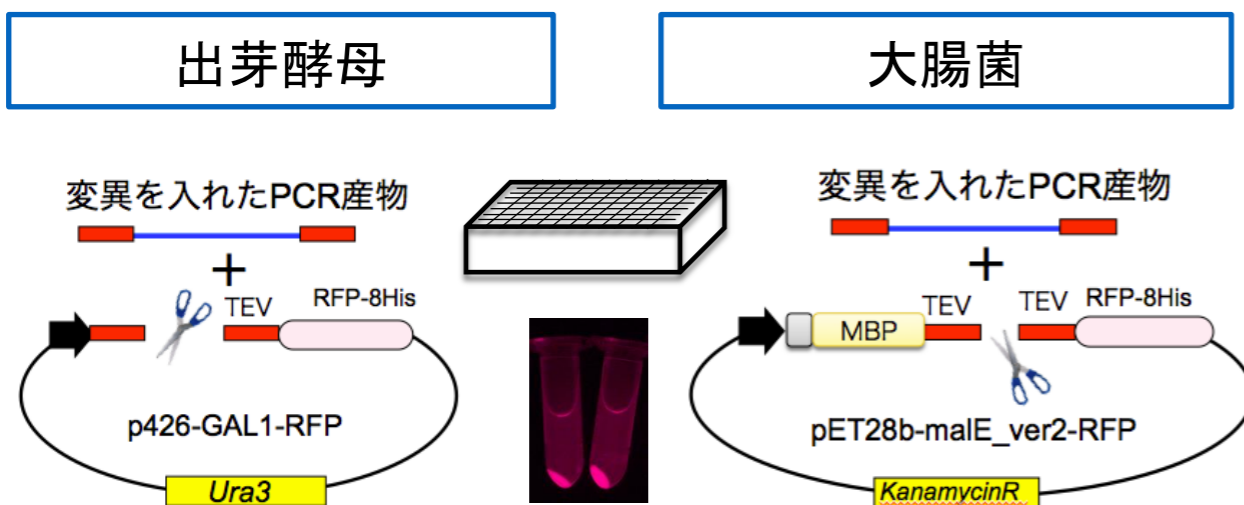
[名前] 小林拓也

[E-mail] t-coba@mfour.med.kyoto-u.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

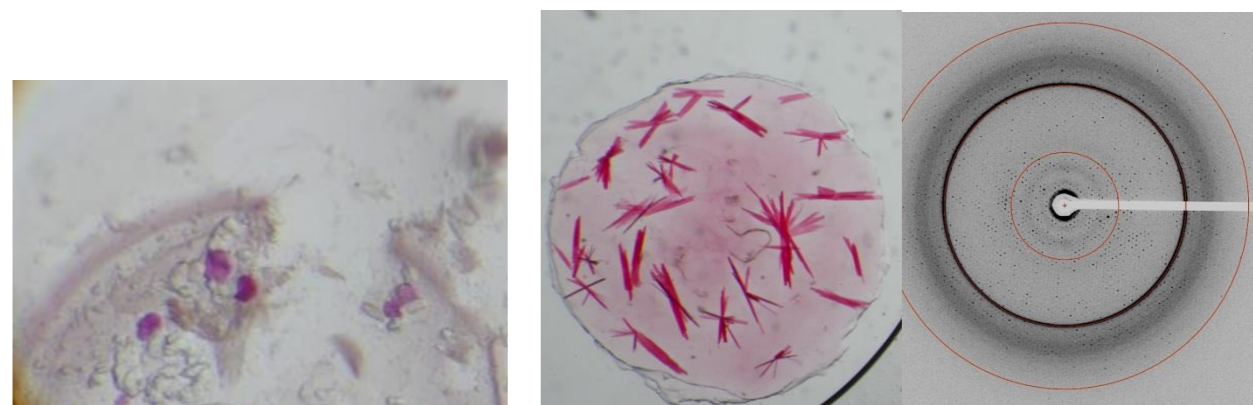
- 1) エラープローンPCR
- 2) 理論的熱安定化予測法
- 3) 融合タンパク質による熱安定化

#### 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

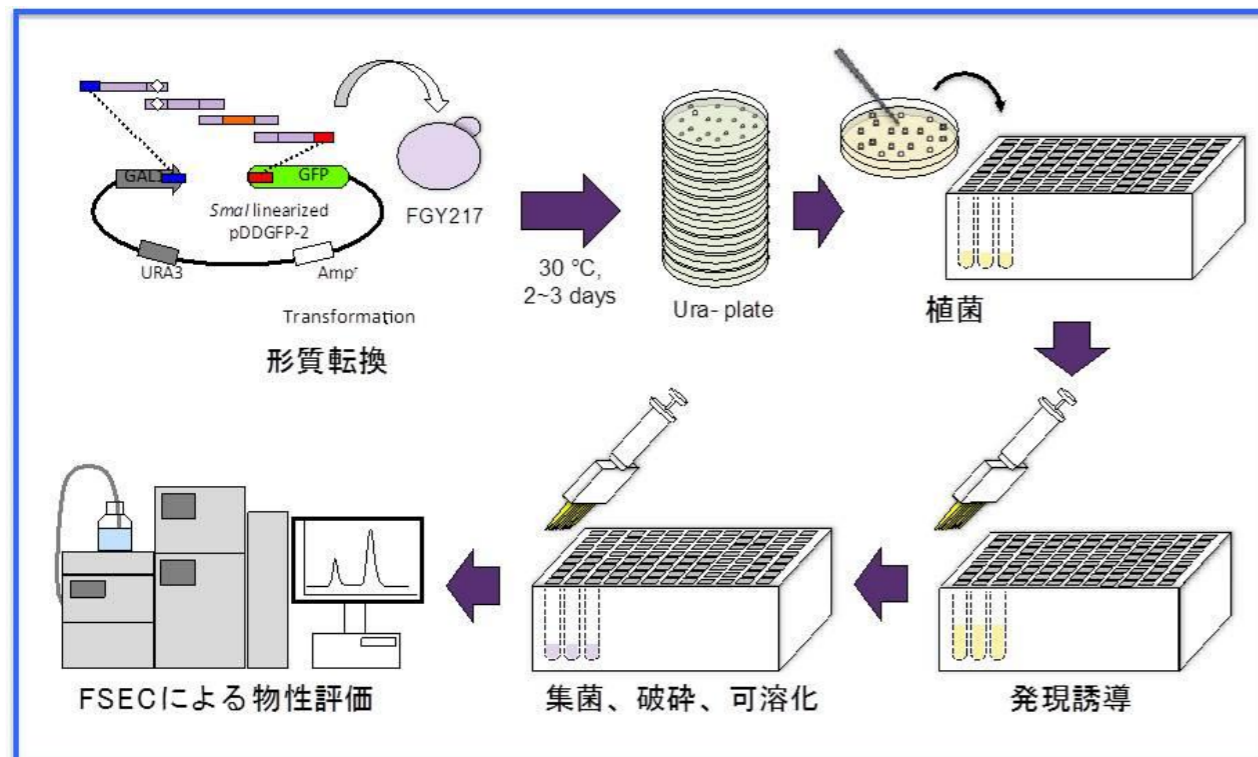
[名前] 村田武士

[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

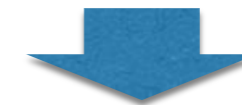
FSEC分析におけるウェル間誤差: ±15%以内。

## [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 (エラープロオン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



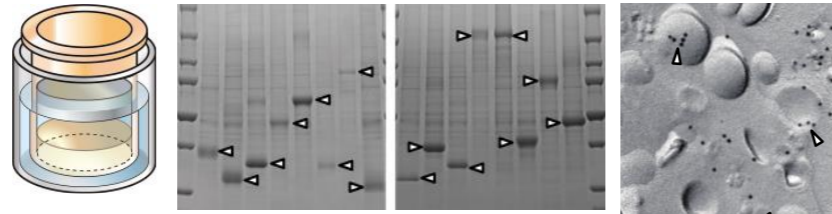
# コムギ無細胞合成系による 蛋白質生産支援・高親和抗体構築技術開発

## [技術の概要]

コムギ無細胞タンパク質合成系を用いた  
合成難タンパク質の生産

膜タンパク質生産

GPCRなど2~14回膜貫通タンパク質をプロテオリポソーム/ミセル  
として合成。数mgの生産に対応。



複合体生産

タンパク質複合体あるいはタンパク質-DNA複合体の合成。

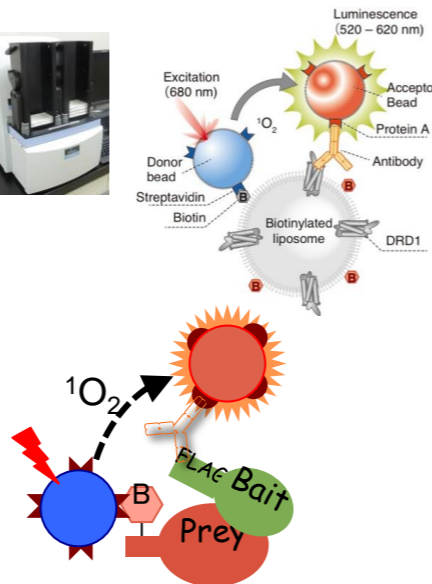
プロテインアレイ

プロテインキナーゼやE3ユビキチンリガーゼなど数百種を個別のウェルに  
搭載したアレイ。プロテオームスケールに拡充中。タンパク質-タンパク質  
相互作用解析や薬剤ターゲット探索を1対1の総当たりで実施可能。



タンパク質間相互作用解析技術

無細胞合成タンパク質とAlphaScreenを用い、高  
感度かつハイスループットな生化学的解析を実  
施。可溶化タンパク質だけでなく、膜タンパク質  
でも実施可能。制御領域が支援する化合物ライ  
ブラリとともに、相互作用を指標とした化合物ス  
クリーニングを支援。



## [技術の利用例]

生化学的解析、抗体作製や結晶化のためのタ  
ンパク質生産

膜タンパク質、プロテインキナーゼ、  
タンパク質複合体、タンパク質-DNA複合体

相互作用パートナー探索

ベイトタンパク質生産・アッセイ系構築  
プロテインアレイスクリーニング

薬剤スクリーニング支援

ベイトタンパク質生産・HTSアッセイ系構築・  
コアライブラリー次スクリーニング

連絡先

[所属] 愛媛大学プロテオサイエンスセンター

[名前] 澤崎達也

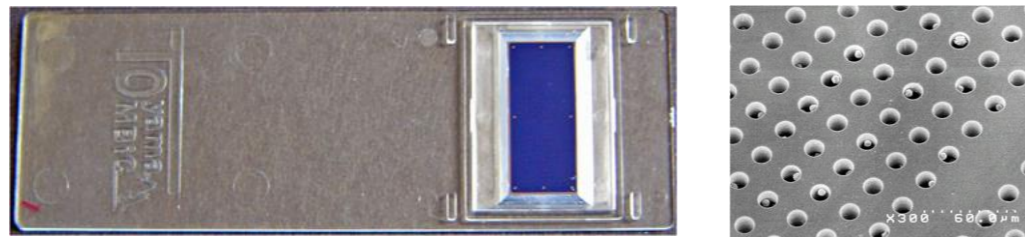
[E-mail] sawasaki@ehime-u.ac.jp

# ISAAC法を用いたモノクローナル抗体単離

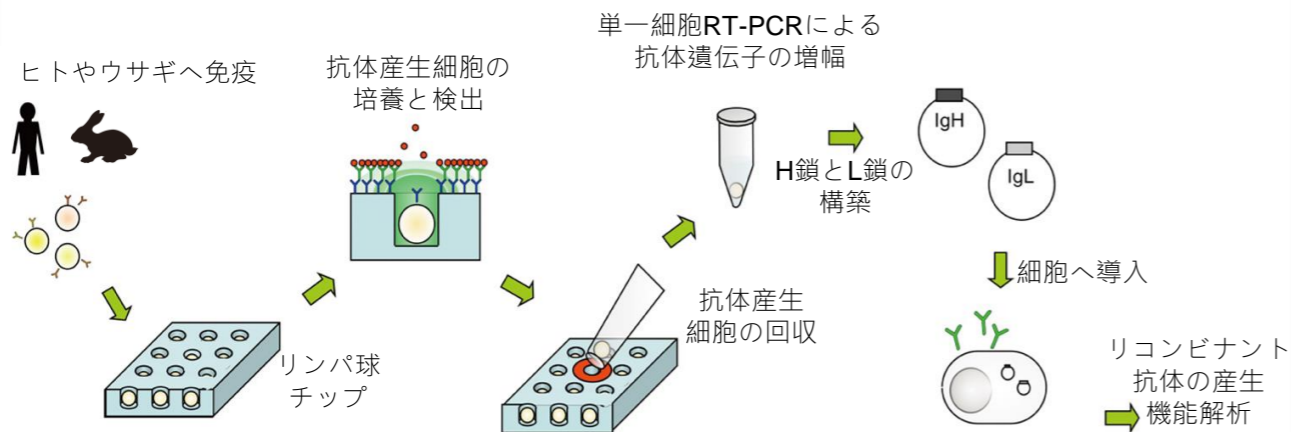
## [技術の概要]

ヒトやウサギのモノクローナル抗体を  
ISAAC法を用いて迅速かつ網羅的に単離

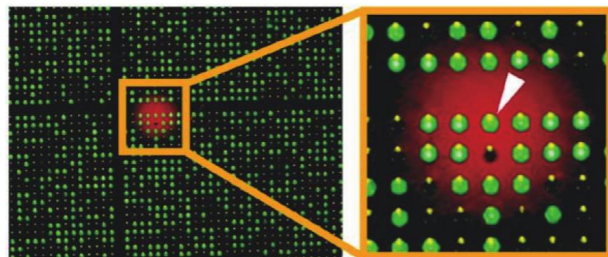
リンパ球チップ



ISAAC法の概要



ISAAC法による検出例



## [技術の利用例]

今まで単離した抗体及び可能な支援例

ウイルス(ヒト)

自己抗原(ヒト)

ガン抗原(ヒト、ウサギ)

GPCR(ウサギ)

タンパク質複合体(ウサギ)

リン酸化ペプチド(ウサギ)

## 連絡先

[所属] 富山大学医学部免疫学

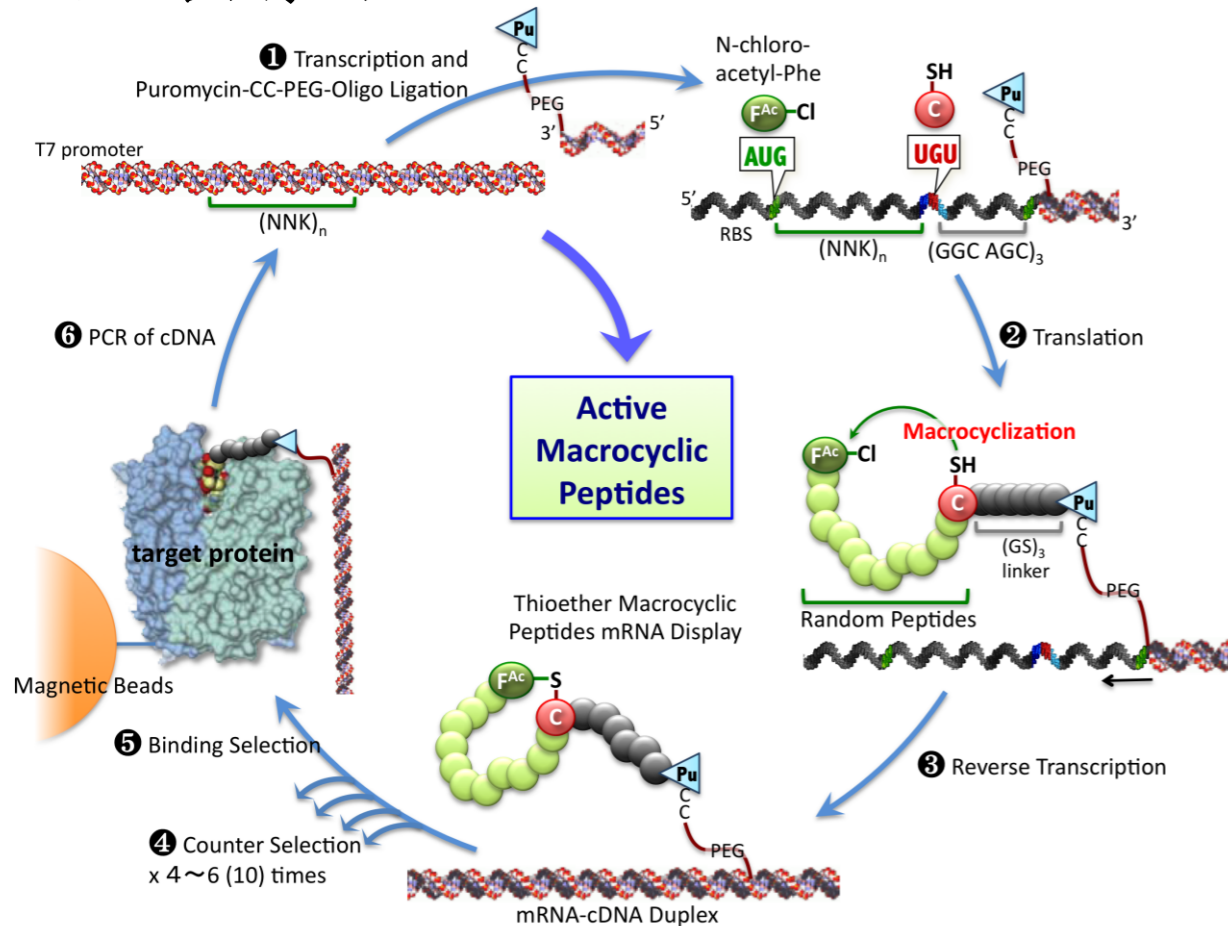
[名前] 村口 篤

[E-mail] gucci@med.u-toyama.ac.jp

# RaPIDシステム：特殊ペプチドリガンドの発見

## [技術の概要]

### 支援研究：標的特異的な特殊ペプチドリガンド(阻害剤)の発見 RaPIDシステム

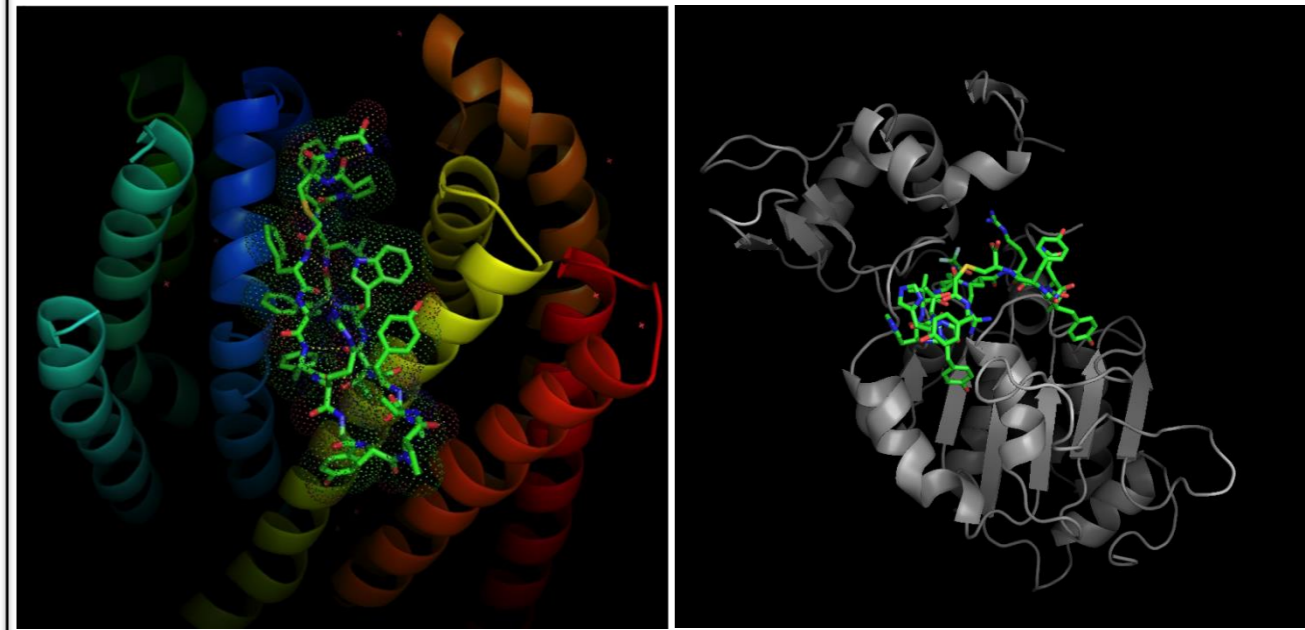


RaPIDシステムは、標的のタンパク質に対し、迅速且つ確実に高親和性・高特異性をもつ短鎖の特殊ペプチドリガンドを発見するプラットフォーム技術である。本支援では、このRaPID技術を駆使して、様々なタンパク質(膜タンパク質・酵素他)に特異的に結合する特殊ペプチドを発見し、その特殊ペプチドを化学合成して共同研究者に提供する。共同研究者は、特殊ペプチドを阻害剤として生物学的研究に役立てたり、特殊ペプチドと標的タンパク質を共結晶化することで解像度の高いX線結晶構造解析を行う。

## [技術の利用例]

MATE薬剤輸送体膜タンパク質と特殊ペプチドの共結晶化によるX線構造解析の解像度の向上

アイソフォーム選択的な「SIRT2阻害剤の発見」



## 連絡先

[所属] 東京大学大学院理学系研究科

[名前] 菅 裕明

[E-mail] hsuga@chem.s.u-tokyo.ac.jp

# 動物細胞発現系を用いた 高難度タンパク質の生産と精製

## [技術の概要]

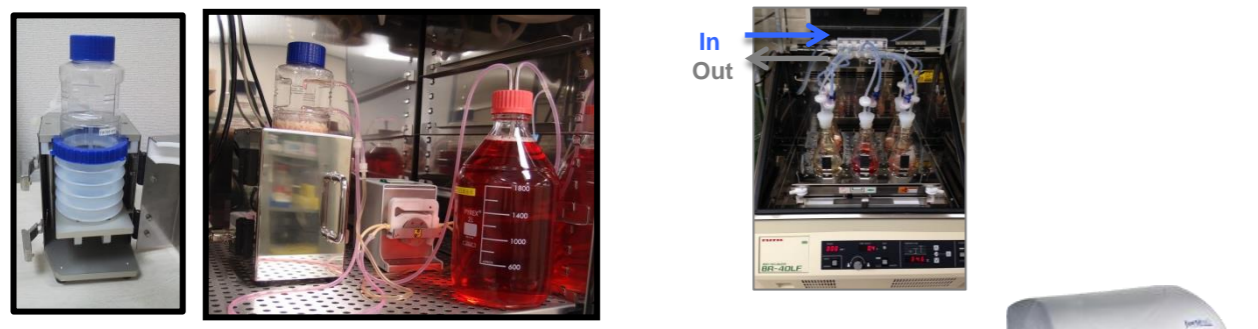
☆高コスト、低収率、しかし高品質の創薬関連ターゲット生産には最適な動物細胞発現系を、豊富なノウハウでパイプライン化！

### 支援メニュー

- ・分泌タンパク質や膜タンパク質などの動物細胞を用いた発現支援<sup>1,2</sup>
  - 安定発現株の樹立と高密度培養
  - 浮遊細胞を用いた一過性大量発現
- ・タグ抗体システムを活用した微量タンパク質の精製支援<sup>1,2</sup>
- ・組換え抗体の大量発現と調製<sup>2</sup>
- ・独自樹立したHEK由来糖転移酵素変異株 (PDIS株シリーズ) で結晶化品質の糖タンパク質を生産<sup>1,2</sup>

### 支援に供する設備

- ・高密度培養装置(付着系)
- ・振盪培養装置(浮遊系)

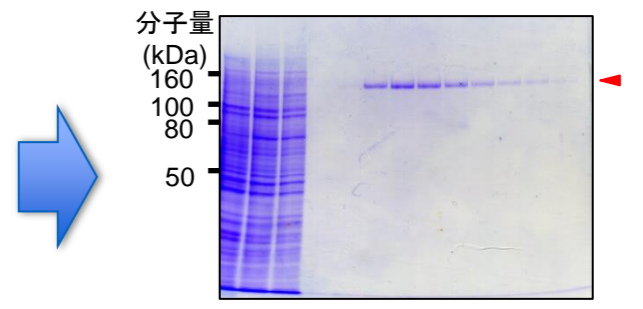
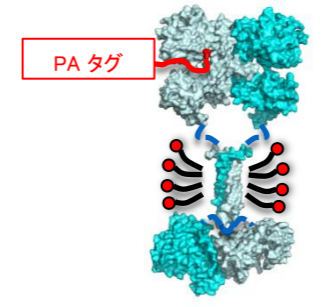


- ・相互作用解析装置 (Biacore、Octet、ITC)

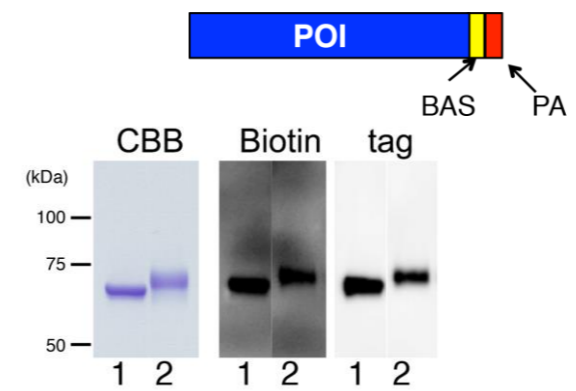


## [技術の利用例]

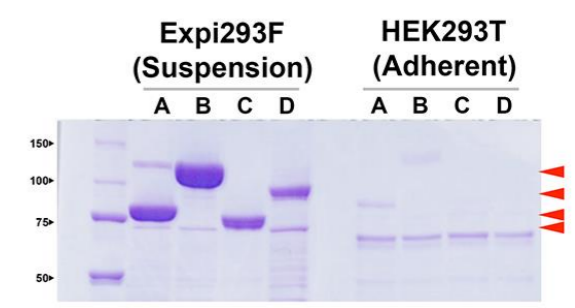
- ・1回膜貫通型タンパク質を動物細胞に発現させ、抗体カラムのみで高純度に精製



- ・ビオチン化タンパク質を動物細胞で迅速生産



- ・浮遊系の一過性発現で受容体断片の生産量を10倍に！



...and many more applications!

## 連絡先

- [所属] 1. 横浜市立大学大学院生命医科学研究科
- 2. 大阪大学蛋白質研究所

[名前] 禾 晃和<sup>1</sup>、高木 淳一<sup>2</sup>

[E-mail] [nogi@tsurumi.yokohama-cu.ac.jp](mailto:nogi@tsurumi.yokohama-cu.ac.jp)  
[takagi@protein.osaka-u.ac.jp](mailto:takagi@protein.osaka-u.ac.jp)

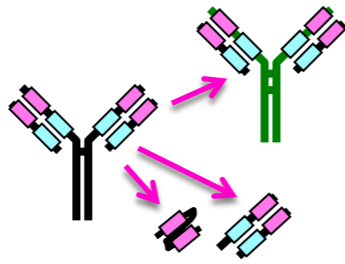
# 高付加価値抗体作製とその包括的エンジニアリング

## [技術の概要]

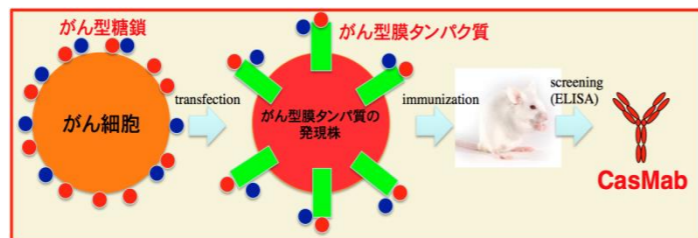
☆マウスモノクローナル抗体作製の膨大な経験に基づき、高難度ターゲットに対する抗体取得とその改変、組換え生産を支援。

### 支援メニュー

- ・手持ちハイブリドーマからの抗体遺伝子の高速クローニング<sup>1</sup>。
- ・医薬化、生物活性賦与等のためのキメラ抗体、サブクラス変換抗体、抗体フラグメントの作製<sup>1,2</sup>。



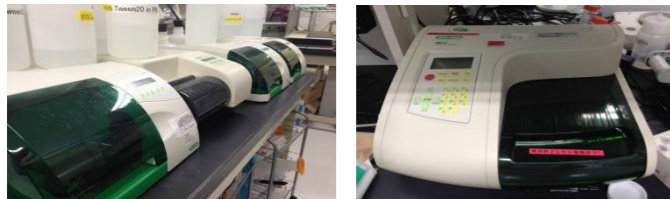
- ・特殊糖鎖つき抗原の利用を基盤とした抗鎖抗体、抗糖ペプチド抗体の作製<sup>1</sup>。



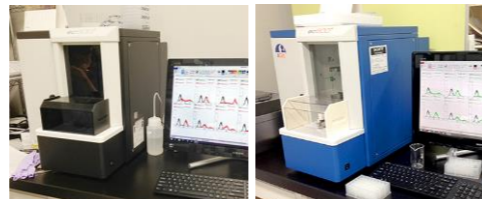
- ・RESET法による休眠ハイブリドーマの賦活化<sup>1</sup>。
- ・コンフォーメーション依存抗体、活性阻害抗体などの高付加価値抗体の取得<sup>1,2</sup>。

### 支援に供する設備

- ・高速抗体スクリーニング装置 (プレートウォッシャー、プレートリーダー)

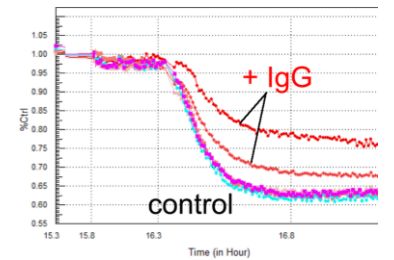
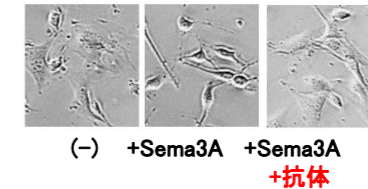


- ・細胞アナライザー (フローサイトメーター)

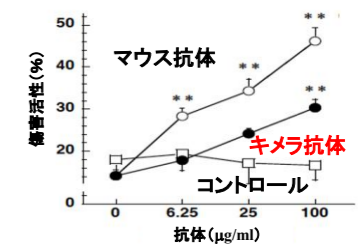
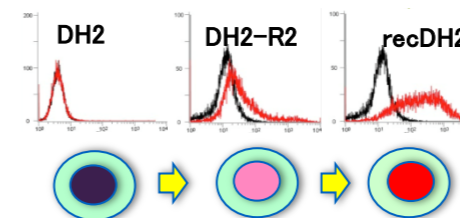


## [技術の利用例]

- ・アトピー性皮膚炎、免疫難病などの疾患鍵分子であるセマフォリン3Aに対する阻害抗体を開発。



- ・がん悪性化に関わる肝細胞成長因子(HGF)の活性化型のみを認識する抗体の作製に成功。
- ・RESET法で貴重なガングリオシド抗体産生ハイブリドーマを救済！
- ・抗体医薬として期待されるマウス抗体をヒトキメラ化し、ADCC/CDC活性を賦与。



## 連絡先

- [所属] 1. 東北大学医学部  
2. 大阪大学蛋白質研究所

[名前] 加藤幸成<sup>1</sup>、高木淳一<sup>2</sup>

[E-mail] yukinarikato@med.tohoku.ac.jp  
takagi@protein.osaka-u.ac.jp

# PAタグを用いた複合的構造解析toolboxの提供

## [技術の概要]

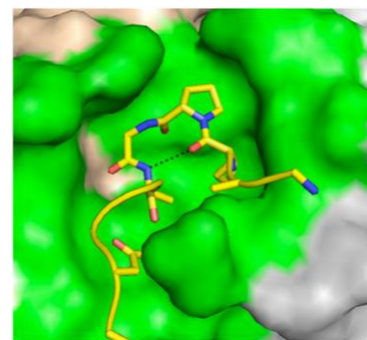
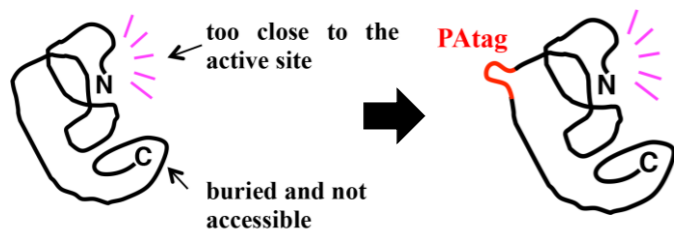
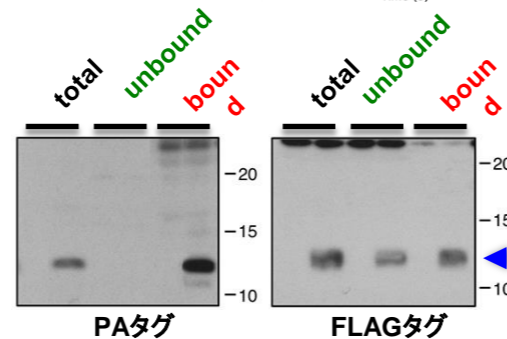
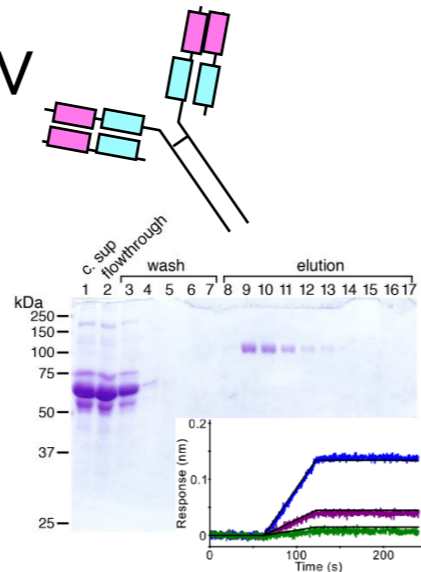
“PAタグ” = GVAMPGAEDDVV

超高親和性抗体NZ-1により認識

1. 超高親和性でペプチド溶出、しかも何回でも再生可能。  
⇒微量タンパク質の迅速一段階精製。しかも経済的。

2. 抗体レジン市販のどのシステムよりも高効率でキャプチャー可能。  
⇒プロテオミクス研究に威力。

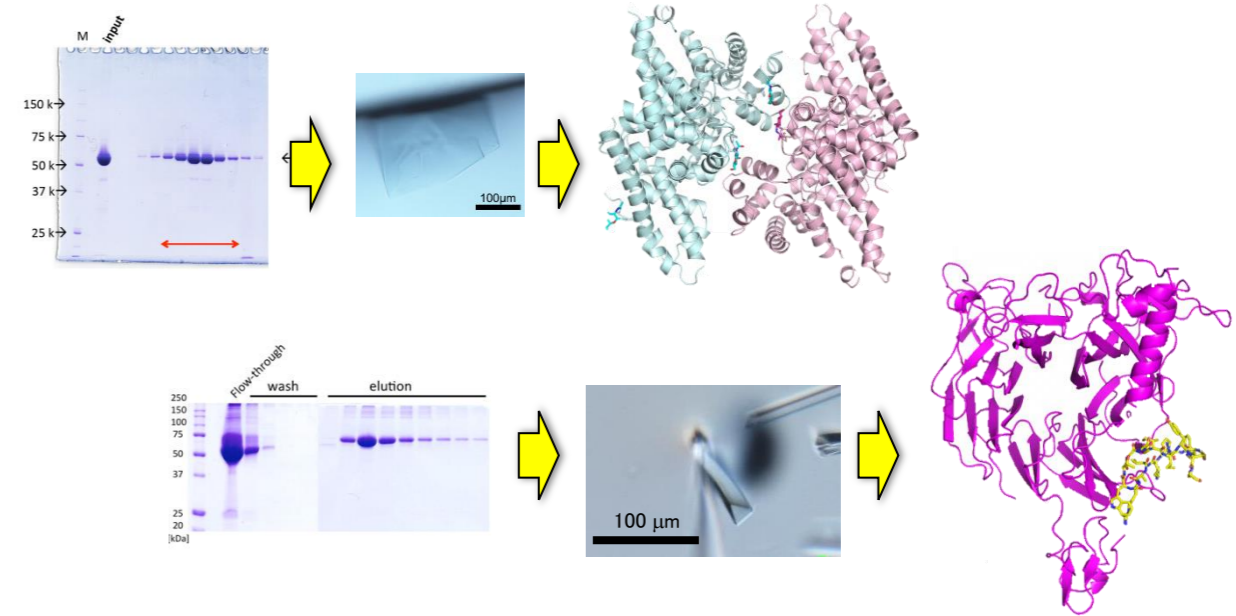
3. N、C末端だけでなく、どこにでも挿入可能  
⇒“portable epitope”としてイメージング、結晶化などの用途に。



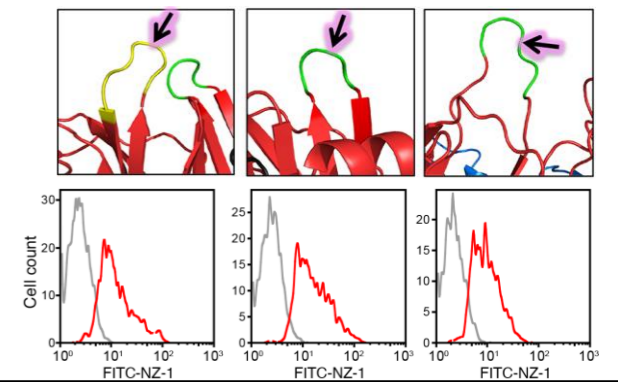
☆チャレンジングなアプリケーションの提案  
に対しタグシステムを供与

## [技術の利用例]

すでに多くの創薬ターゲットの迅速精製と結晶化に成功。



受容体の望みの部位の  
ループへ挿入し、構造変化  
レポーターとして利用。



## 連絡先

[所属] 大阪大学蛋白質研究所

[名前] 高木淳一

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

# 構造解析用核内タンパク質等の生産と評価[NMR]

## [技術の概要]

NMR用タンパク質の生産: タンパク質発現系の選択を行い安定同位体ラベルタンパク質を生産する。  
創薬標的に向けた種々の安定同位体ラベルしたタンパク質構成因子を大量調製しタンパク質複合体を再構成する。  
リン酸化などタンパク質修飾とそれに伴う結合変化をリアルタイムに検出する。

## 支援に供する設備

950MHzNMR

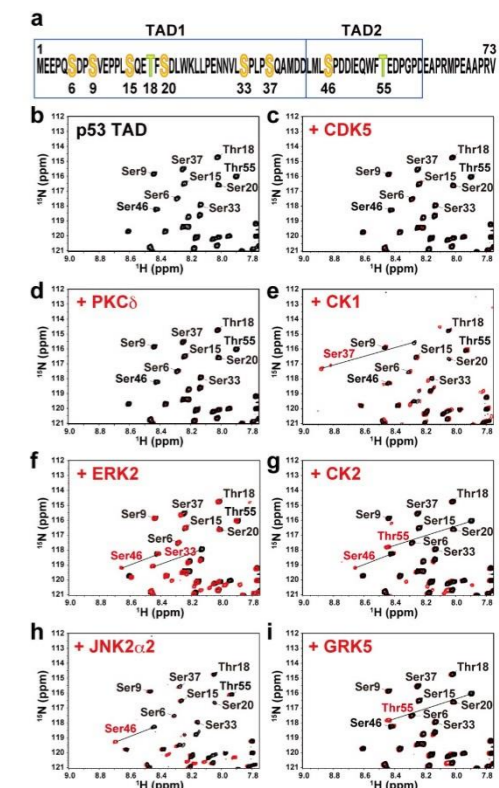
900MHzNMR

800MHzNMR



## [技術の利用例]

がん抑制タンパク質p53の転写活性化ドメインはリン酸化部位が9箇所存在するが、今まで部位特異的なリン酸化酵素として報告されていた酵素の特異性をリアルタイムに追跡し、全く新たに酵素の特異性を発見し、リン酸化により標的タンパク質結合する様子もリアルタイムに追跡した。



## 連絡先

[所属] 横浜市立大学

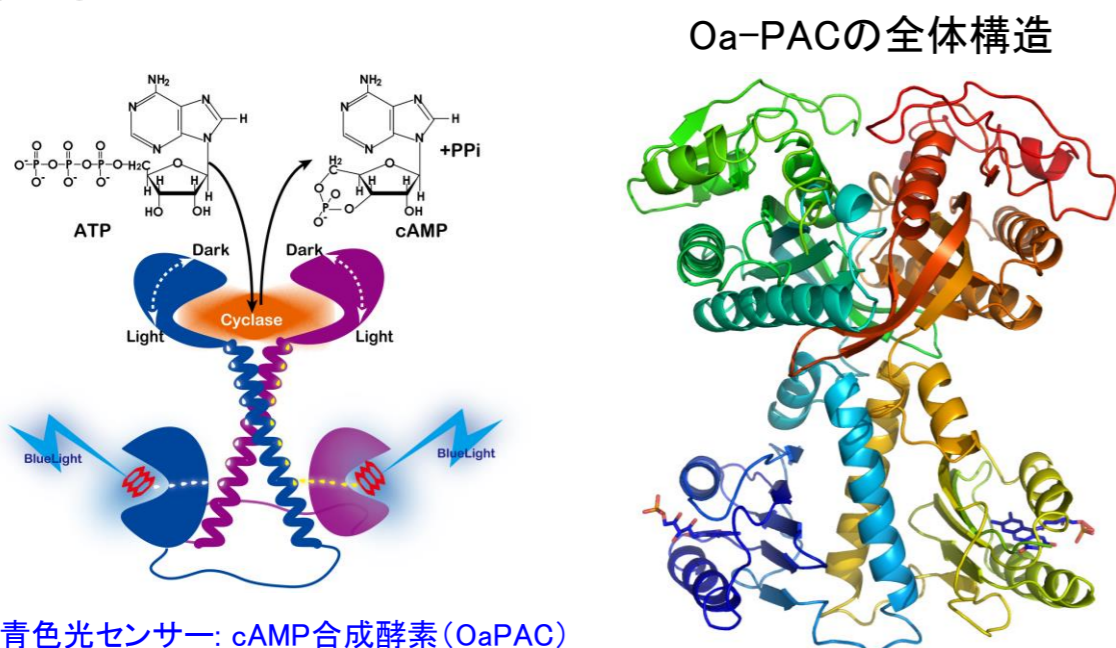
[名前] 西村善文

[E-mail] [nisimura@tsurumi.yokohama-cu.ac.jp](mailto:nisimura@tsurumi.yokohama-cu.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

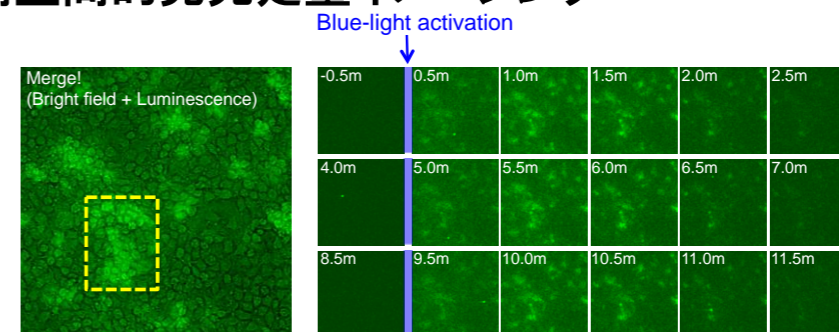
生産された試料溶液にX線を照射し、散乱されるX線の強度分布からタンパク質(複合体)の分散度(分子量)やフォールディングの有無、揺らぎの程度を見積もり、結晶化の可能性を定量的に判断する。また、X線解析されたタンパク質の原子構造から界面活性剤ミセル(膜タンパク質)や電子密度が観測されない揺らいだ領域の構造情報を求める。

### 設備名

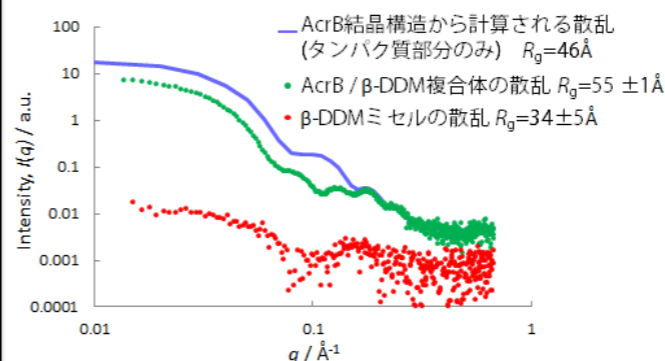
Bio-SAXS1000 (RIGAKU)

## [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



# 構造解析用核内タンパク質等の生産と評価 [ネイティブ質量分析]

## [技術の概要]

### ネイティブ質量分析とは

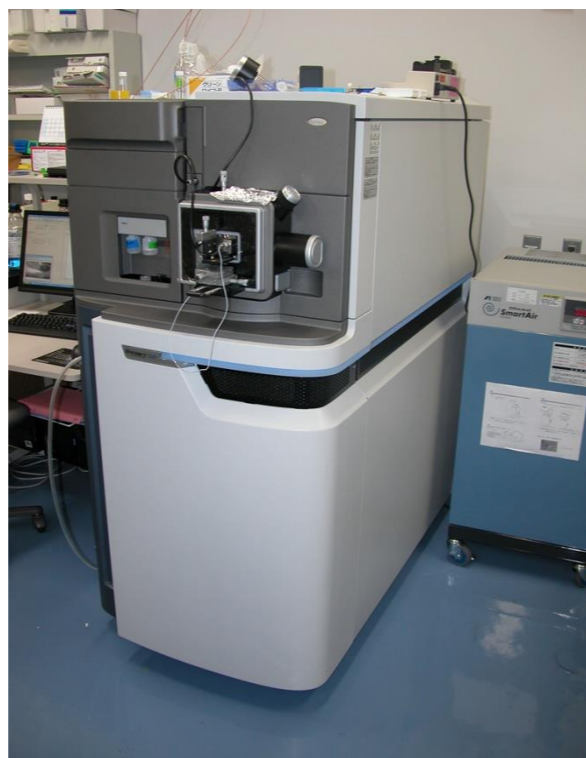
タンパク質複合体を、ネイティブに近い状態で解離させずにイオン化・質量測定する手法で、これにより複合体のストイキオメトリー(化学量論)を決定することができる。

さらに、イオンモビリティ分析を組み合わせることで、その衝突断面積を求めることが可能となり、X線小角散乱(SAXS)などの分析手法で構造モデルを構築する際、有用な情報を提供できる。

### 設備名

NanoESI-Ion Mobility  
Q-TOF MS

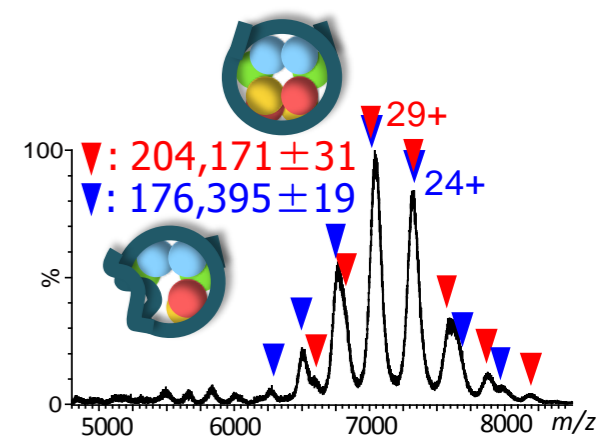
(Synapt G2 HDMS、  
Waters)



## [技術の利用例]

### 再構成したヌクレオソームコアのストイキオメトリーの決定

ヒストン八量体と146塩基対DNAから再構成して得られたヌクレオソームコア(NCP)には、カノニカルなオクタソームNCPと2分子のヒストンタンパク質が欠落したヘキサソームNCPが存在することを明らかにした。



### 連絡先

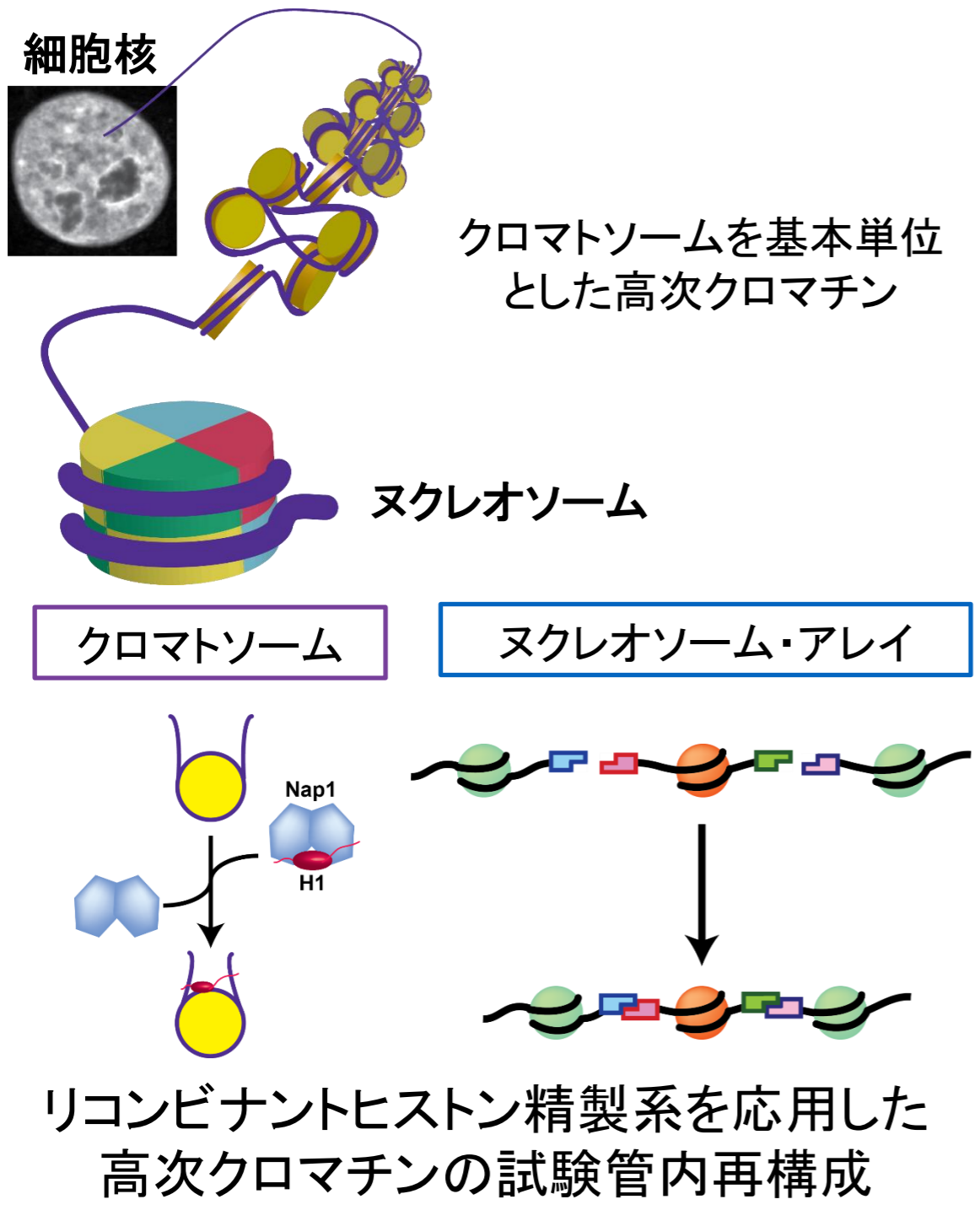
[所属] 横浜市立大学  
大学院生命医科学研究科

[名前] 明石知子

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

# 高次クロマチン構造・機能解析のための クロマチン再構成技術の開発と解析技術の高度化

## [技術の概要]



## [技術の利用例]

構造解析および生化学的解析のための  
リコンビナントヒストン、ヒストン複合体、  
ヌクレオソーム、クロマトソーム、  
ヌクレオソーム・アレイの提供



高次クロマチンの構造変換による  
DNA機能発現制御機構の解析

## 連絡先

[所属] 早稲田大学

[名前] 胡桃坂仁志

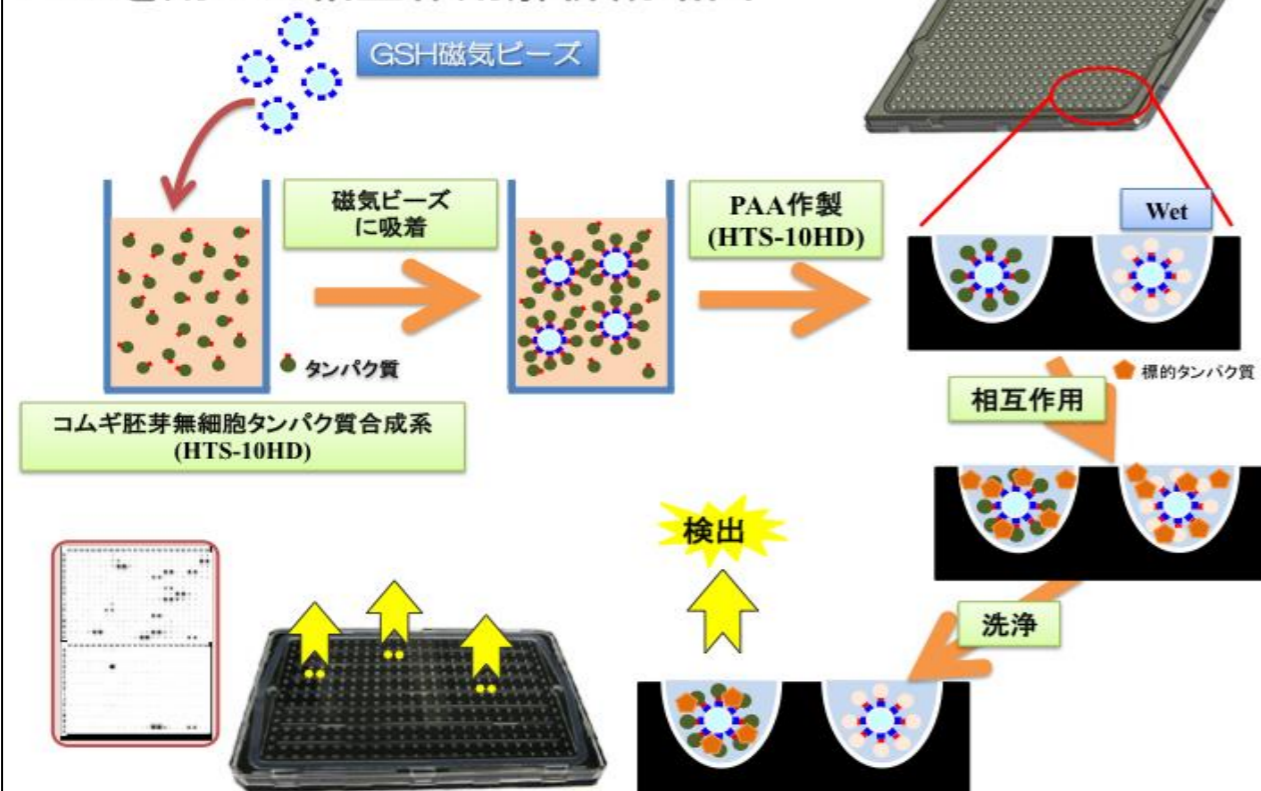
[E-mail] kurumizaka@waseda.jp

# コムギ胚芽無細胞合成系を活用した 新規複合体調製／検出技術開発

## [技術の概要]

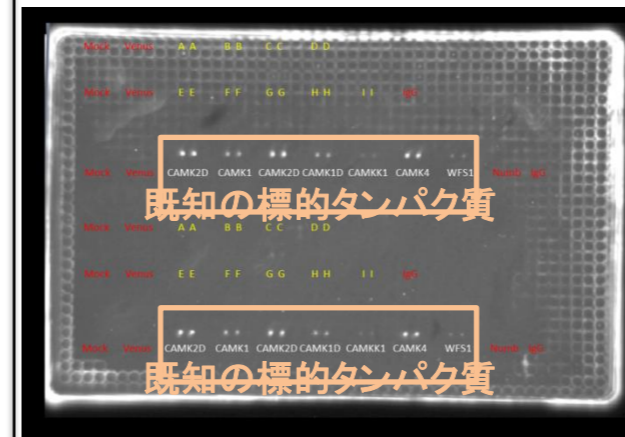
- ・自社独自製作の非変性条件でタンパク質を固定化したプレート(1,536 / プレート)を使用したタンパク質間相互作用検出
- ・約20,000個のヒト遺伝子タンパク質発現
- ・リソースとコムギ無細胞系を利用した網羅的なタンパク質発現プレート

### PAAを用いた相互作用解析概略図



## [技術の利用例]

- ・20,000タンパク質との相互作用解析
- ・特定タンパク質群との相互作用解析
- ・アレイ化(固定)せずに液相での精製相互作用解析についても可能



既知の標的分子を搭載したアレイによる相互作用検出例  
カルモジュリン(CaM)とその標的分子の特異的な結合が検出された

## 連絡先

[所属] 株式会社セルフリーサイエンス

[名前] 森下 了

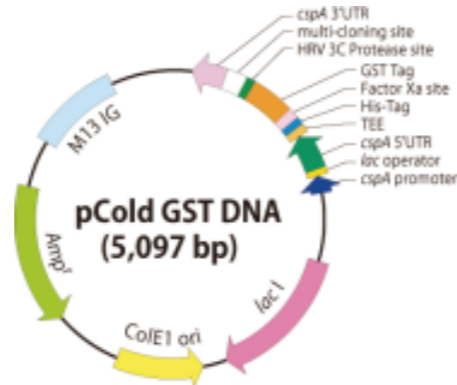
[E-mail] [rmorishita@cfsciences.com](mailto:rmorishita@cfsciences.com)

# NMR試料調製・安定同位体標識・NMR測定

## [技術の概要]

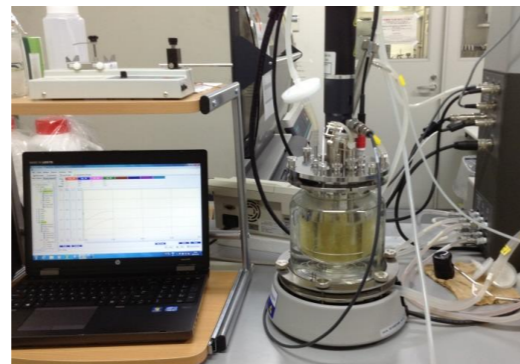
### 発現ベクターの構築・発現

- ・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



高性能ジャーフェーマンター

### 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  
 $^{19}\text{F}$ -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 $^{13}\text{C}$ 、 $^{15}\text{N}$ 標識、リジン残基の $^{13}\text{C}$ メチル化、グルタミン残基の $^{19}\text{F}$ 標識
- ・ $^{19}\text{F}$ 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](mailto: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

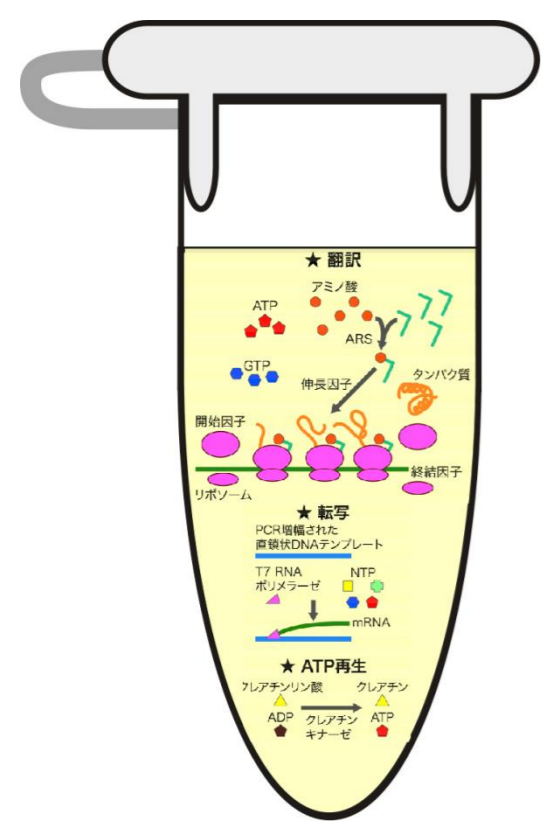
[名前] 児嶋長次郎

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

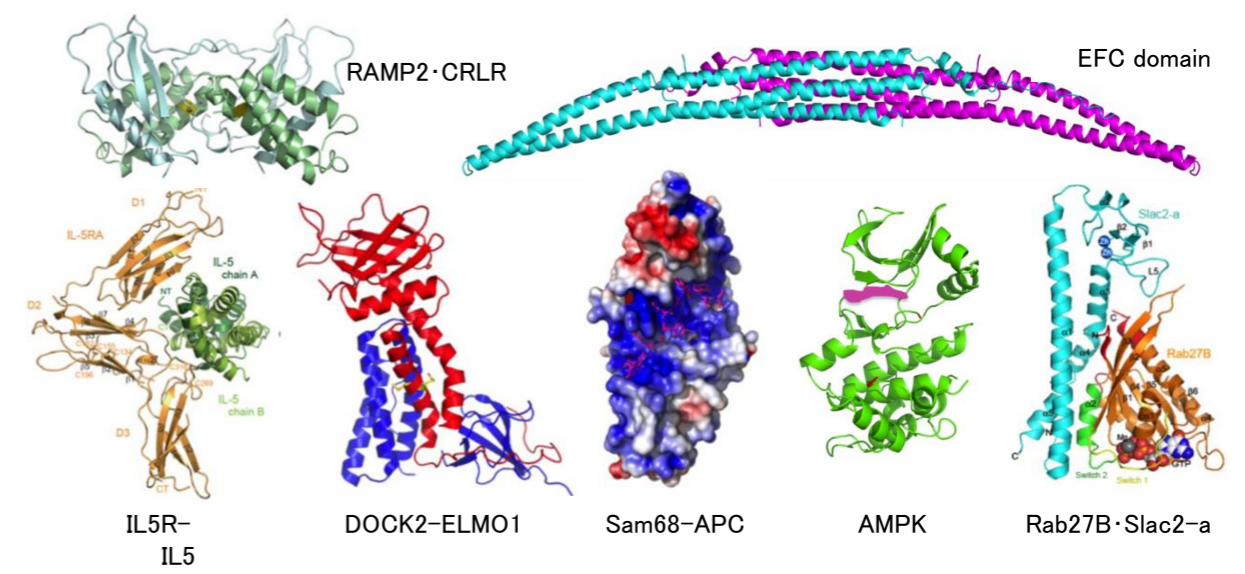
- 1) PCR増幅DNAからのタンパク質発現が可能 (ハイスループット)
- 2) タンパク質合成条件の変更・最適化が可能 (ハイスループット)
- 3) 細胞毒性を示すタンパク質の合成が可能 (非細胞毒性)
- 4) 高速タンパク質合成 (~3-6 hrs.)
- 5) 高収率 (>3-5mg / 9mL reaction)
- 6) 代謝による変換がない (Uniform)
- 7) タンパク質分解を防げる (Stable)
- 8) ロボット化が可能 (HTP)

#### 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

# 膜タンパク質結晶化技術 (脂質メソフェーズ結晶化法)

## [技術の概要]

### 脂質二重膜環境下で膜タンパク質を結晶化する技術

脂質 膜タンパク質溶液

膜タンパク質の再構成

湿度・温度制御環境下でサンドイッチセルを自動作成

ガラスプレート カバーガラス

結晶化へ

鎖長/親水基	C12	C13, C14	C15, C16	C17, C18
	HII	QII/HII	HII	(HII)
	QII	L $\alpha$ /QII	HII	(HII)
	L $\alpha$ /QII	L $\alpha$	QII/HII	QII/HII
	L $\alpha$	L $\alpha$	QII	L $\alpha$ /QII/HII
			S/QII/HII	QII/HII
			L $\alpha$	L $\alpha$

QII: キュービック相 HII: 逆ヘキサゴナル L $\alpha$ : ラメラ相

脂質メソフェーズ結晶化法による結晶化技術      新規マトリクス脂質ライブラリの構築

### 膜タンパク質の結晶化技術

- 「脂質メソフェーズ結晶化法」に関わる技術開発を行い、膜タンパク質結晶化の成功率を飛躍的に上げる技術の確立

### 不可能を可能にした「脂質メソフェーズ結晶化法」

- 脂質二重膜を保持したまま結晶化することで活性を保持した状態の膜タンパク質結晶が得られる
- 結晶化の成功率の向上を目指した新規脂質ライブラリの開発

(膜タンパク質構造研究(羊土社)第15章 図15.3より一部改変)

## [技術の利用例]

### 本技術を用い解析した真核生物膜タンパク質 ARII

転写・翻訳 無細胞反応

脂質

界面活性剤

on rotary shaker

保護

透析膜

無細胞タンパク質合成法を用いた膜タンパク質ARIIの合成

脂質メソフェーズ法による結晶化及びスクリーニング

Cytoplasmic side

R82 (BR)

R78 (ARII)

Extra-cellular side

バクテリオロドプシン (BR) とARIIのプロトン輸送機構に顕著な違いがあることが判明

ARIIの結晶構造

脂質メソフェーズ中のARIIの結晶

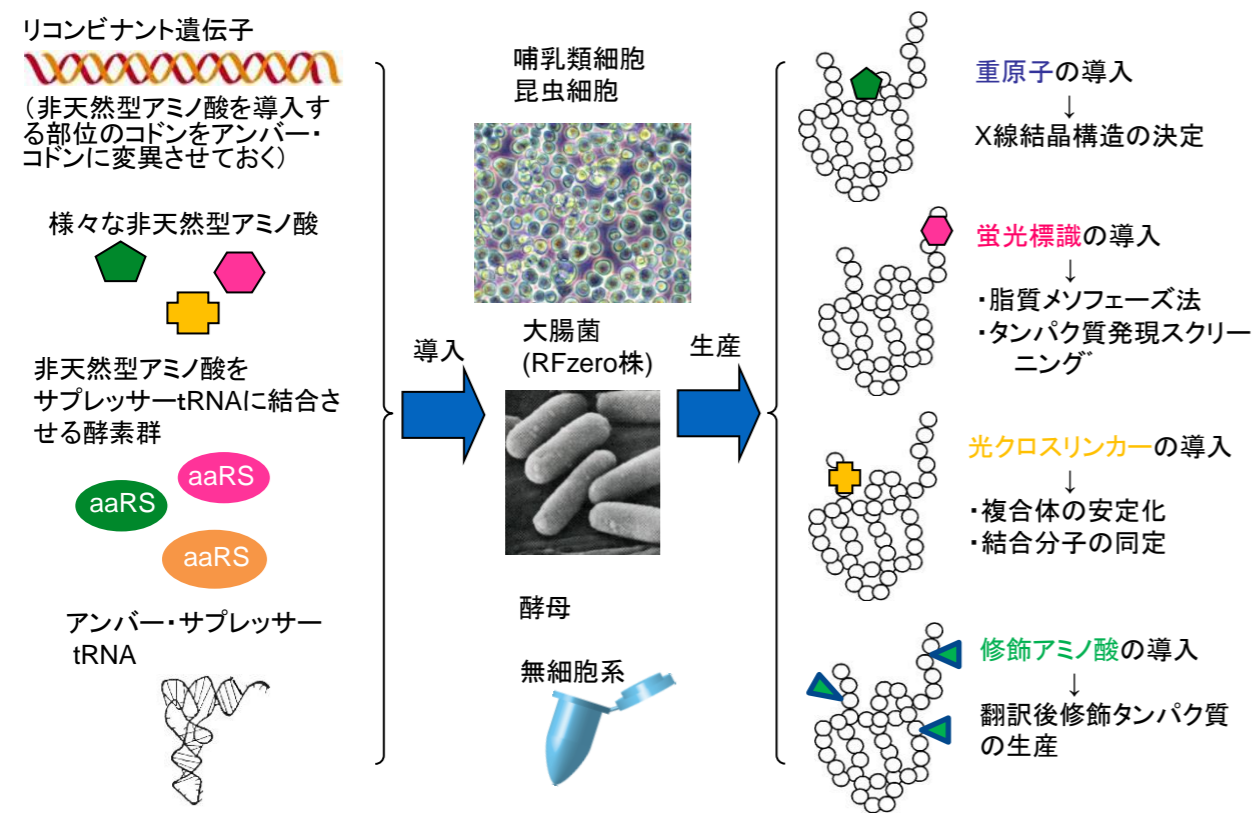
## 連絡先

[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

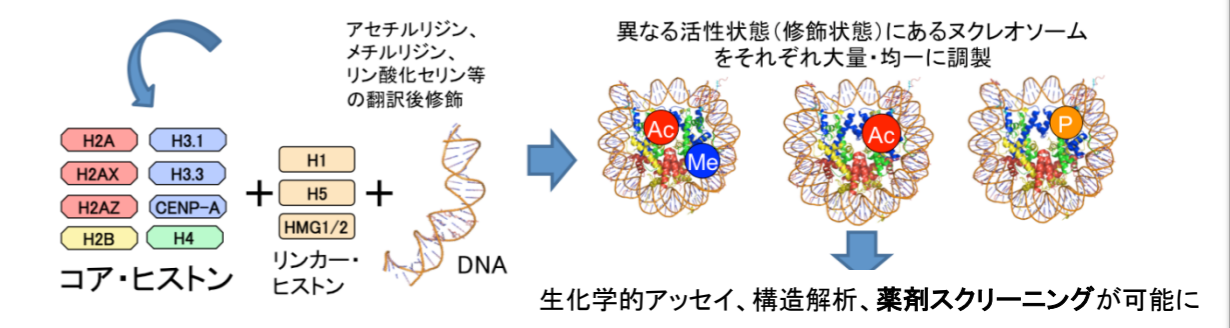


### 本技術の特徴

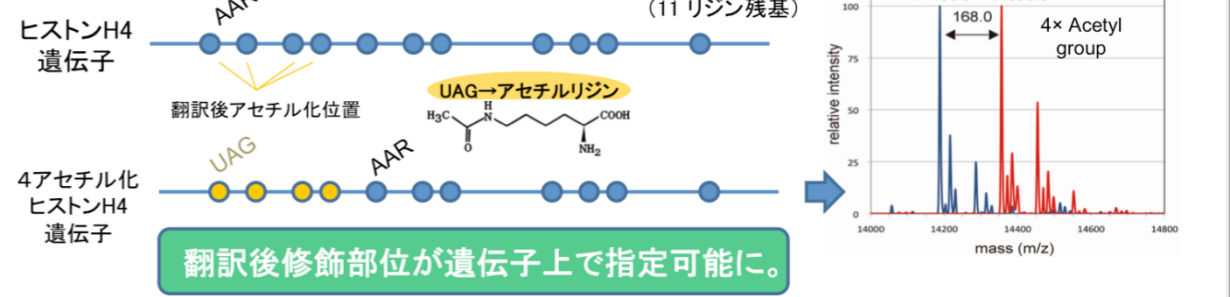
- ・ 部位特異性: 狙った部位に非天然型アミノ酸を導入することが可能
- ・ タンパク質の改変: 非天然型アミノ酸導入により、タンパク質に新たな特性や機能を付与する
- ・ 生物細胞の種類: タンパク質の生産細胞として、大腸菌、培養細胞等の生細胞及び無細胞タンパク質合成系も利用可能

## [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



# MD-SAXS法

## [技術の概要]

- マルチドメインタンパク質や天然変性タンパク質など、フレキシブルで結晶化しにくく、X線結晶構造解析が難しいタンパク質は数多く存在する。
- また、結晶構造と溶液構造が異なると想定される場合もある。
- そのような場合、低解像度ながら、溶液構造情報をX線小角散乱(SAXS)実験で得ることができる。
- そこで、バイオインフォマティクス技術を使ってモデリングした立体構造に対し、分子動力学(MD)シミュレーションとSAXS実験を連携させたMD-SAXS法を適用することにより、SAXS実験結果と一致した溶液構造モデルを得ることができる。

## [技術の利用例]

- 低分子結合などによって構造変化すると想定されるタンパク質があるが、片方の状態の構造しか分かっていない。
- 一方、SAXS実験にて、溶液構造が大きく異なることが示された。
- その場合、MD-SAXS法を用いることで、物理化学的に無理がなく、SAXS実験結果と一致した立体構造を得ることができ、それに基づき、構造変化メカニズムを推定することができる。

## 連絡先

[所属] 横浜市立大学生命医科学研究科

[名前] 池口満徳

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

# タンパク質の立体構造予測

## [技術の概要]

- タンパク質の配列から、立体構造を予測します。
- あらゆるレベルに応じた対応をします。
  - モデリング可能なもの  
高精度モデリングを行います。
  - モデリングが難しいもの  
技術の粋をこらして鑄型を探します。  
人工鑄型も作成します。
  - 構造がないもの  
天然変性領域を予測します。
- 支援に供する設備名など。
  - 832コアを有するクラスタマシン
  - 天然変性領域予測: DICHOT
- CASP(構造予測の世界大会)に参加して、技術向上に努めています。

## [技術の利用例]

- 立体構造は実験アイデアの源です。
  - 機能を類推したい。
  - 相互作用を検討したい。
  - リガンドを探索したい。
  - ミュータント実験をしたい。
  - 構造ドメインを知りたい。
- 全て、立体構造があってこそ！

## 連絡先

[所属] 名古屋大学情報科学研究科

[名前] 太田元規

[E-mail] mota@is.nagoya-u.ac.jp

# タンパク質の立体構造比較

## [技術の概要]

- タンパク質の立体構造を徹底的に比べて解析します。
  - トポロジー比較
  - 二次構造の空間配置比較
  - 部分構造比較
  - 複合体比較
  - 構造変化の記述
- 支援に供する設備名など。
  - 832コアを有するクラスタマシン
  - 構造比較法: MICAN
  - 複合体比較法: SCPC
  - 構造変化記述法: MotionTree
  - 構造変化データベース: PSCDB
- これだけ独自技術のあるグループは世界的にもまれだと自負しています。

## [技術の利用例]

- 立体構造は多くの機能情報をもたらします。
  - リガンドの結合ポケット比較
  - ドメインスワッピング
  - 結合モードの違い
  - フュージョン・フィッション
  - 構造と進化の関係
  - 構造変化と機能
- 実験計画のビジョンが拓けます。

## 連絡先

[所属] 名古屋大学情報科学研究科

[名前] 太田元規

[E-mail] mota@is.nagoya-u.ac.jp

# プロテオームのアノテーション

## [技術の概要]

- プロテオーム規模のデータに対し様々なアノテーションを提供します。
  - 配列ホモロジー
  - 構造ドメインアサインメント
  - 天然変性予測
  - ファミリー分類
- 支援に供する設備名など
  - プロテオームデータベース:GTOP
  - 天然変性領域予測:DICHOT
  - 天然変性データベース:IDEAL
- 比較ゲノム研究の経験を生かし、生物種特有のタンパク質情報と機能情報を提供します。

## [技術の利用例]

- ゲノムを決定した。
- 大量のプロテオーム情報がある。
- 大量の発現情報がある。

これら大規模データを解析して、生物種特有の現象をプロテオームの観点から探ります。

有害菌特有のタンパク質が見つければ  
有力な薬剤ターゲットになります。

## 連絡先

[所属] 前橋工科大学工学部

[名前] 福地佐斗志

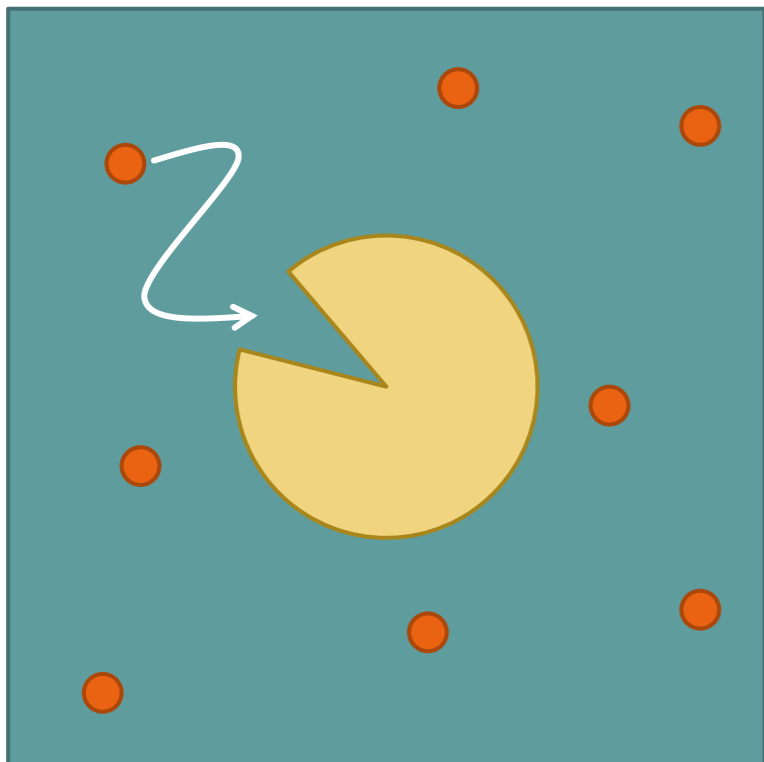
[E-mail] sfukuchi@maebashi-it.ac.jp

# 粗視化MDによるリガンド結合シミュレーション

## [技術の概要]

タンパク質の周囲にリガンドをランダムに配置した状態から、リガンドがタンパク質表面上のリガンド結合部位に結合する過程を粗視化分子動力学シミュレーションにより再現する。

数 $\mu$ s程度のシミュレーションを初速とリガンド初期配置を変えながら100回程度繰り返し実施し、リガンド結合部位、リガンド結合ポーズ、結合・解離速度定数、解離定数、リガンド結合パスウェイ等を予測する。

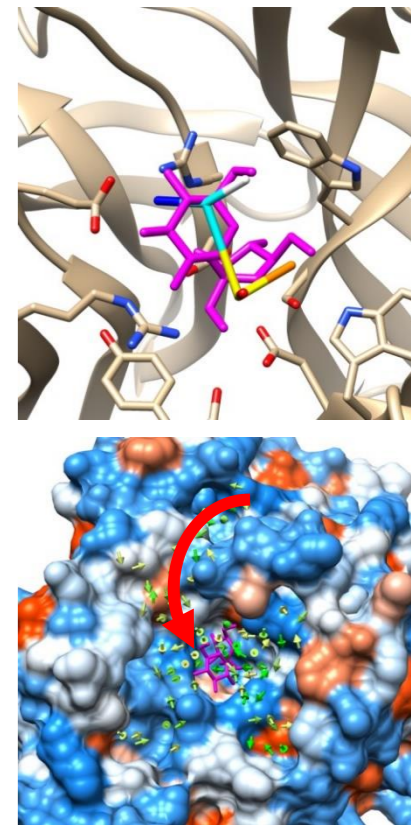


必要な情報:  
 タンパク質の立体構造 (ホモロジーモデル可)  
 リガンドの構造

## [技術の利用例]

酵素 levansucrase と sucrose との結合シミュレーションの結果を示す。右上図のように、結合ポーズは結晶構造 (紫色) とよく一致し、結合・解離速度定数、解離定数も実験値をよく再現した。また、リガンド流束から、リガンド結合パスウェイが明らかとなった (右下図)。

*J. Comput. Chem.* **35**, 1835–1845 (2014).



## 連絡先

[所属] 東京大学

[名前] 寺田 透、清水謙多郎

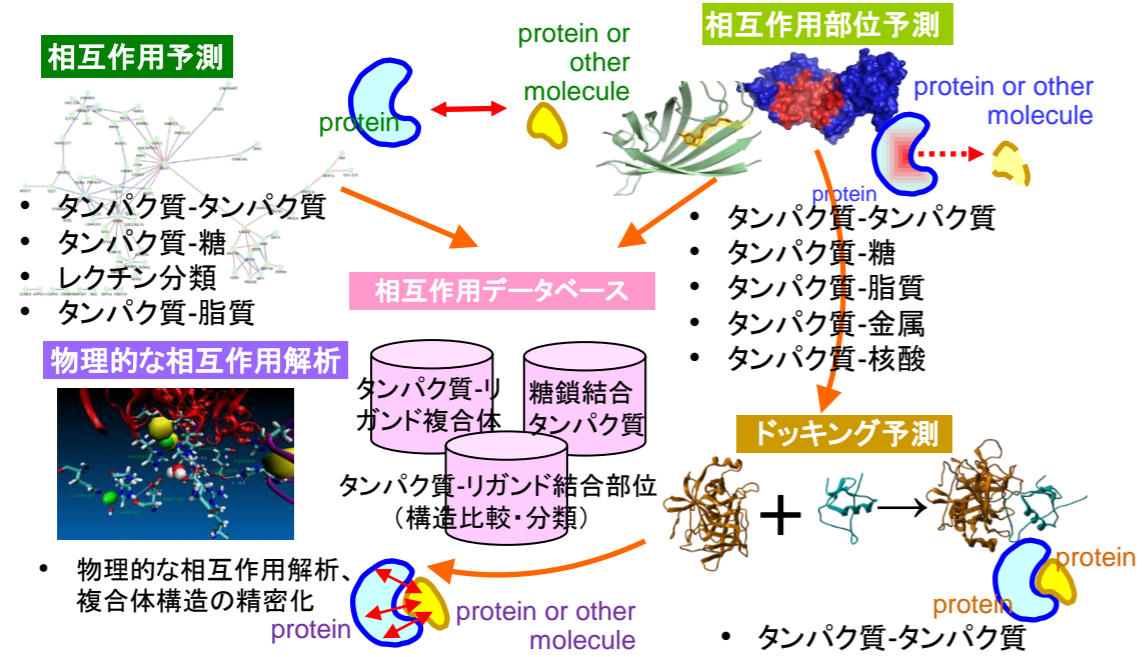
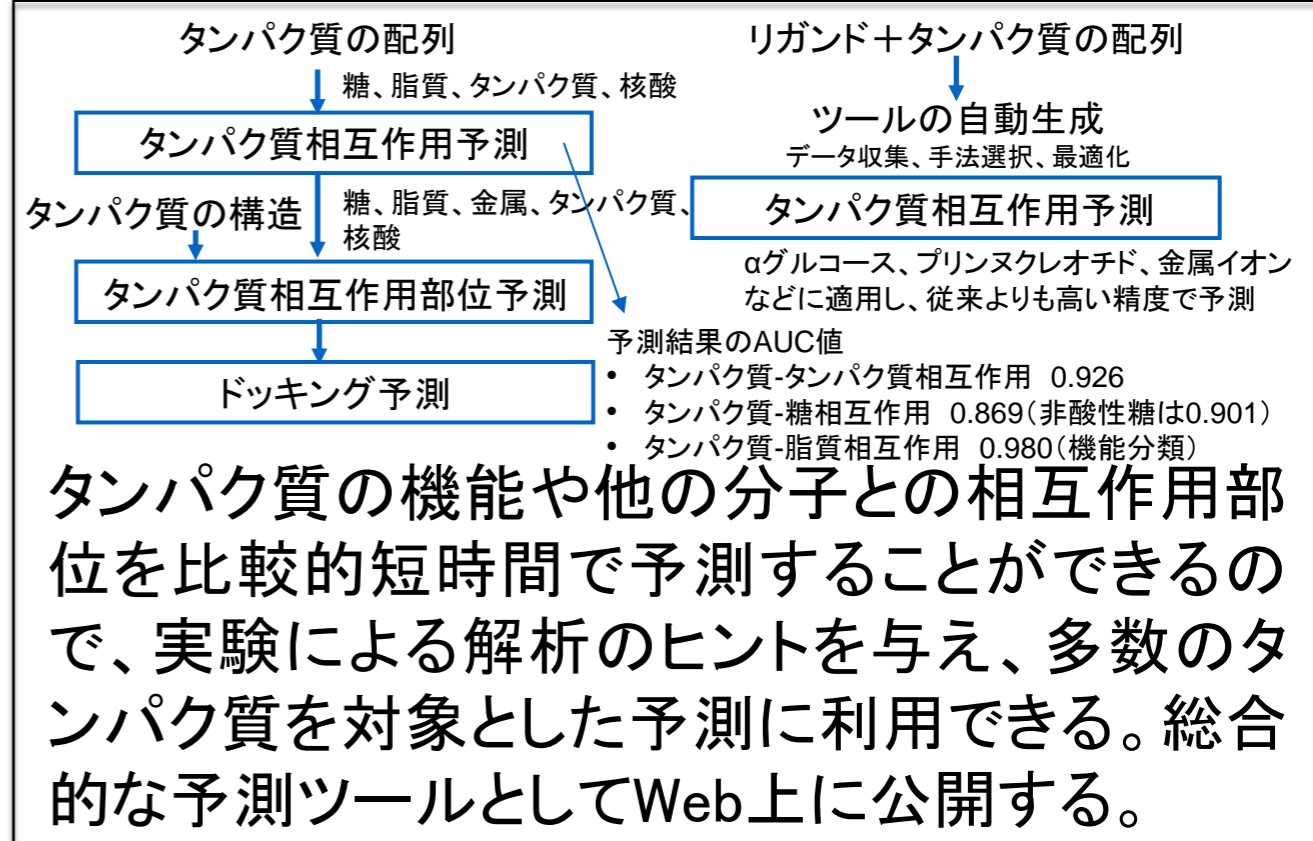
[E-mail] tterada@iu.a.u-tokyo.ac.jp

# タンパク質相互作用予測システム

## [技術の概要]

- タンパク質が他の分子と相互作用するかどうか、どの部位と相互作用するかを配列情報のみから予測する。また、さまざまな分子との相互作用を総合的に予測することができる。構造既知の場合は、構造情報を利用して、より高い精度で予測することができる。
- 利用者が指定する任意のリガンド分子に対して、その結合部位を予測する。データの収集、機械学習、パラメータの最適化を自動化し、複数の学習手法が選択できる。

## [技術の利用例]



## 連絡先

[所属] 東京大学

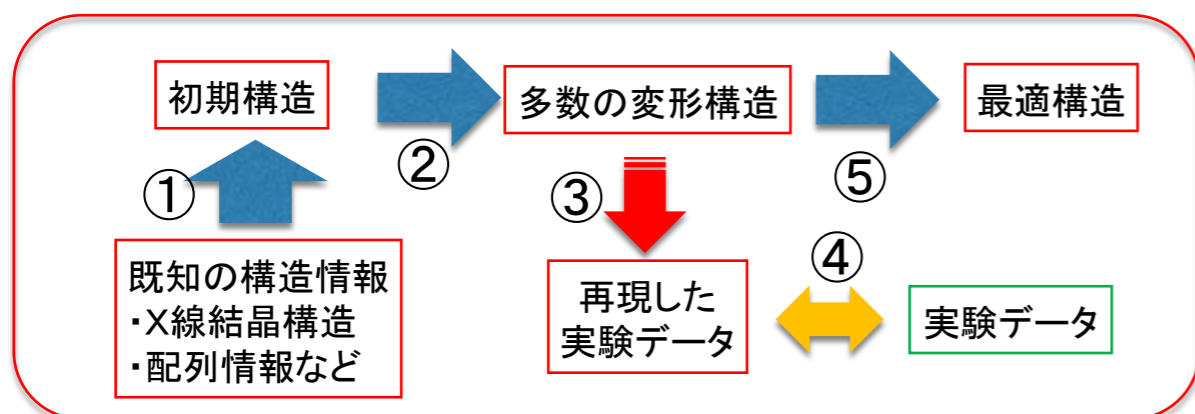
[名前] 清水謙多郎、寺田 透、角越和也

[E-mail] shimizu@bi.a.u-tokyo.ac.jp

# 低解像度立体構造情報を再現する原子モデル構造構築技術

## [技術の概要]

### 原子モデル構造構築の手順

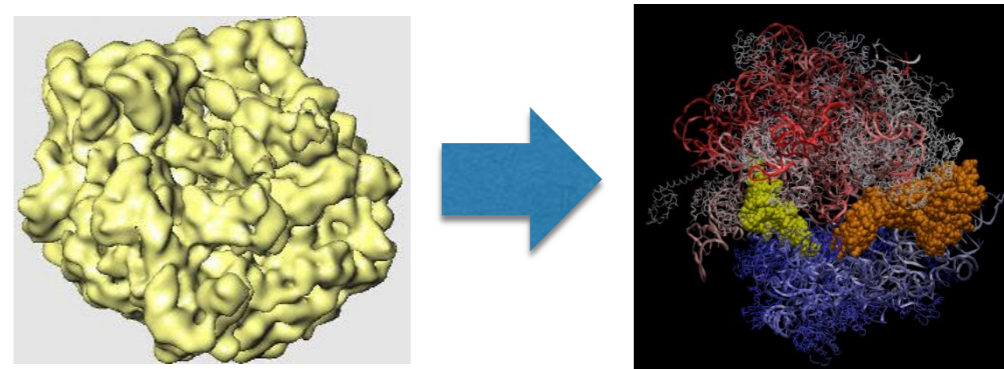


- ① 既知の構造情報をもとに、初期構造を構築します。
- ② 計算機手法を用いて、初期構造を変形し、多数の変形構造を構築します。
- ③ 各変形構造から実験データをシミュレートします。
- ④ 実験データとシミュレーション結果を比較します。
- ⑤ 実験データと最も類似度の高い変形構造を選びます。

### 支援に供する設備等

- ・計算機クラスター
- ・開発した計算機プログラム
- ・必要に応じてプログラム開発を行います。

## [技術の利用例]



3D-EM構造(左)をもとに、蛋白質合成途中の70Sリボソームの原子モデル構造(右)を構築しました。3D-EM構造に含まれる70Sリボソーム、tRNAおよびEF-GそれぞれのX線結晶構造を変形し、3D-EM構造が再現されるように全体構造を構築しました。

### 連絡先

[所属] 日本原子力研究開発機構

[名前] 松本 淳

[E-mail] matsumoto.atsushi@jaea.go.jp

# タンパク質結晶の品質改善及びDNA配列に依存した動構造解析

## [技術の概要]

### 1. タンパク質結晶の品質改善とパッキング改変

構造エネルギー計算にもとづき、結晶内分子パッキングを安定化及び、不安定化している残基を推定します。その部分に変異を入れることにより、結晶の分子パッキングの安定性を大きく変える残基を推定することにより、結晶の品質改善及び分子パッキング改変を提案します。

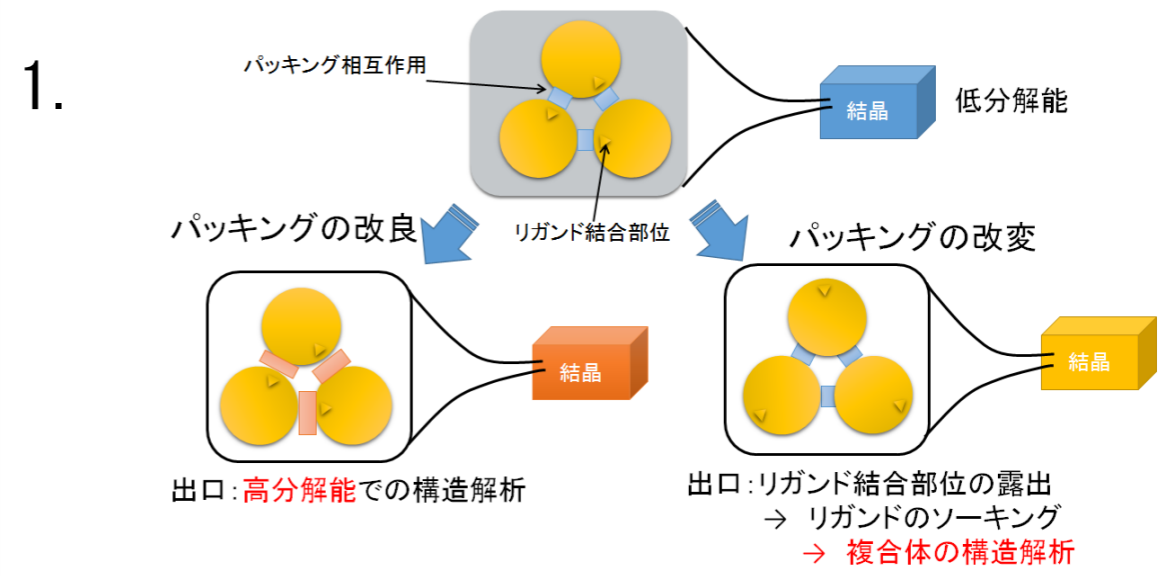
### 2. 塩基配列依存的な構造・ダイナミクス解析

構造インフォマティクス、機械学習、分子動力学計算を駆使して、DNAの配列に依存した構造・ダイナミクス特性の解析結果を提供します。

### 支援に供する設備

日本原子力研究開発機構・関西光科学研究所にある計算機クラスター

## [技術の利用例]



### 連絡先

[所属] 日本原子力研究開発機構  
 [名前] 河野秀俊  
 [E-mail] kono.hidetoshi@jaea.go.jp



# X線小角散乱情報の相関解析

## [技術の概要]

- X線小角散乱(SAXS)と他の構造情報を組み合わせて、拘束条件付き分子動力学計算を行うことにより、全ての入力情報を満足するタンパク質の立体構造を系統的かつ合理的に構築する。
- 特にSAXSとタンパク質の二次構造情報のみから、アミノ酸残基レベルの精度で立体構造を迅速かつ簡便に求めることができる。この際に必要な入力データは、実測SAXS曲線とアミノ酸残基毎の二次構造情報である。

### 提供するプログラム

SAXS\_MD (Webサイトにて公開)

## [技術の利用例]

- NMRにSAXSの束縛を加えることにより、NMR単独の場合よりも高精度の立体構造を構築した。
- 部分変性構造を有するタンパク質のSAXSデータと二次構造情報から、分子の立体構造アンサンブルを計算した。

### 連絡先

[所属] 東京薬科大学生命科学部

[名前] 小島正樹

[E-mail] mkojima@toyaku.ac.jp

# X線小角散乱から得られる構造の精密化

## [技術の概要]

- X線小角散乱(SAXS)データからab initio計算により得られたビーズモデルに対し、グラフ理論のアルゴリズムを用いて、主鎖候補をトレースする。
- N末端からC末端までトレースできなかった場合は、最長トレース経路を出力する。

## 提供するプログラム

TraceBeads (Webサイトにて公開)

なおプログラムは、近接ビーズどうしを辺で結んでグラフを作成するMakeEdgeと、作成したグラフからハミルトン路を探索するHamilton-Pathから成る。

## [技術の利用例]

- 同一の実測SAXSデータから、ab initio計算プログラムGASBORによりビーズモデルを多数構築し、各モデルに対してTraceBeadsを適用した。

## 連絡先

[所属] 東京薬科大学生命科学部

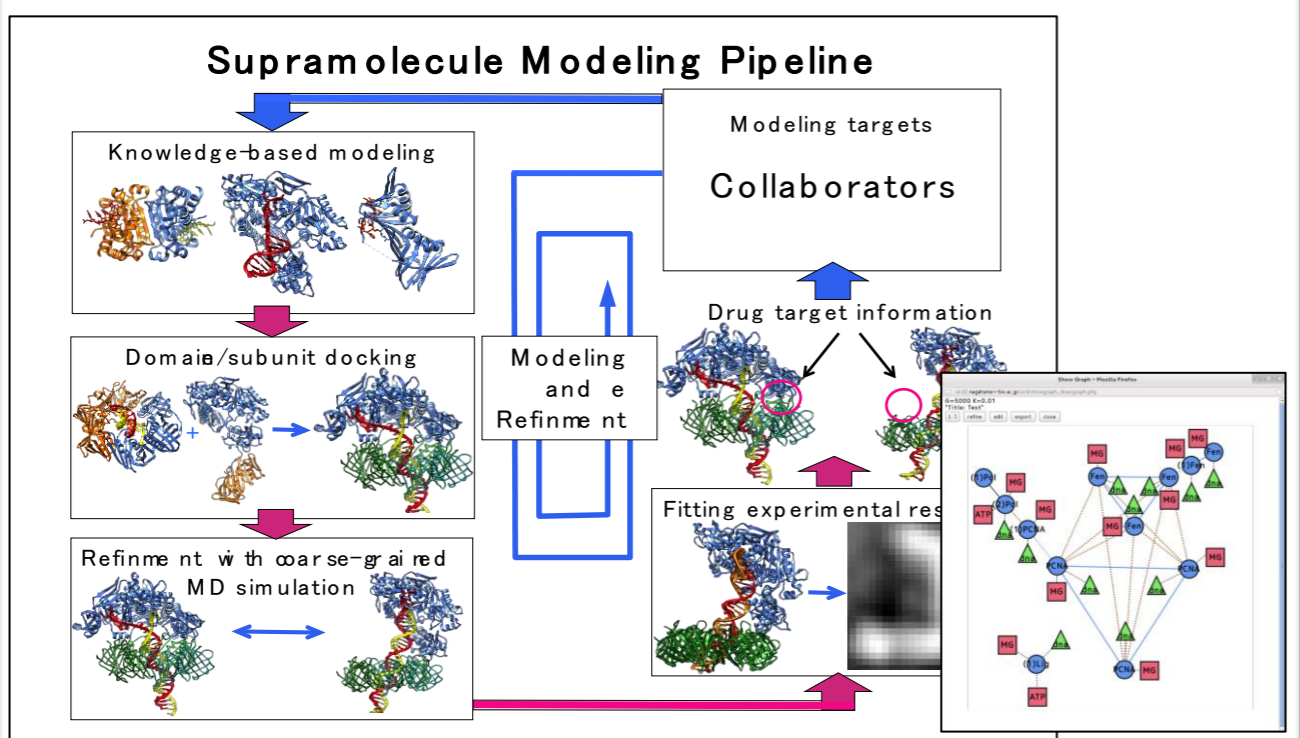
[名前] 小島正樹

[E-mail] mkojima@toyaku.ac.jp

# 超分子モデリングパイプライン

## [技術の概要]

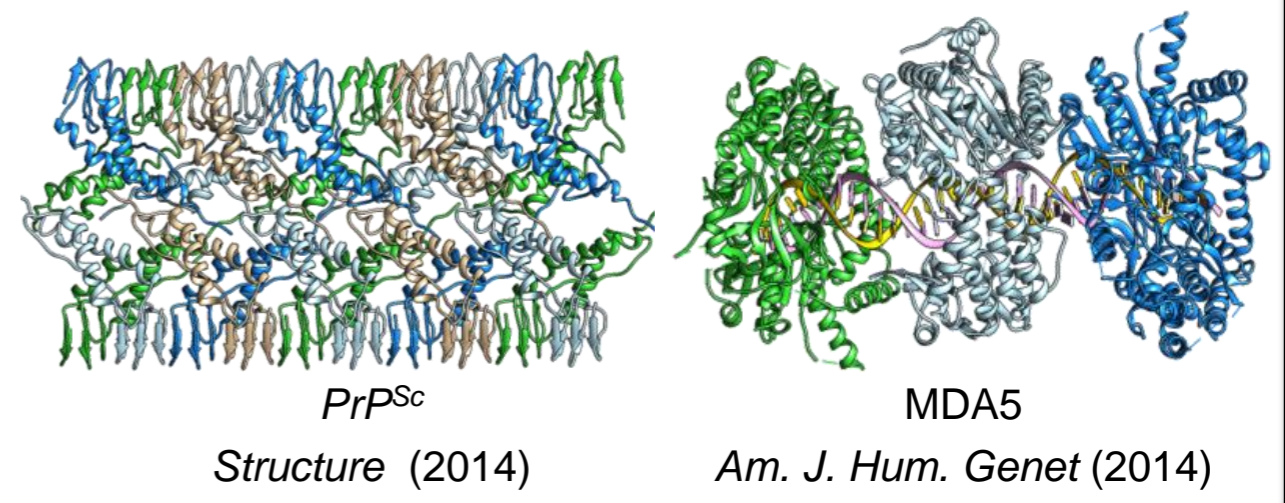
知識ベースモデリング(データベースからのモデリングテンプレート発見)・ドメイン=ドッキングスタディ・粗視化シミュレーション・複合体モデル可視化解析システムを組み合わせたパイプラインで、多面的+多角的(multi-discipline)に超分子複合体の立体構造モデルを構築します。



超分子モデリングパイプライン(左)とモデルグラフ(右)

## [技術の利用例]

プリオン病 (PrP<sup>Sc</sup>) やアイカルディ・ゴートイエ症候群 (MDA5) の原因となる超分子複合体のモデルを構築し、疾患原因変異の解析に貢献しています。



## 連絡先

[所属] 長浜バイオ大学

[名前] 白井 剛

[E-mail] t\_shirai@nagahama-i-bio.ac.jp

# 低分子化合物などのリガンド結合部位比較/予測

## [技術の概要]



- 低分子化合物などのリガンドと相互作用する部位と類似する局所構造を高速に列挙。リガンド側、レセプター側の双方から検索が可能。(PoSSuM)
- 承認済みの経口低分子化合物の結合部位と類似した部位、また類似部位に結合する分子を探索した結果を公開。(PoSSuMds)

創薬に重要な低分子化合物の解析支援を行う。PDBサイズのデータベースに対しても感度を損なうことなく、高速に検索を行うことが可能となっている。サーバーでは網羅的比較計算済みの結果を検索可能。

(PoSSuMサーバー)

<http://possum.cbrc.jp/PoSSuM/>

## [技術の利用例]

- 既知のリガンドの相互作用部位との類似性に基づく新規結合部位の検索。
- 研究対象のタンパク質の構造/構造モデルに対して、どのようなリガンドが結合する可能性があるか予測。
- 承認済みの経口低分子化合物と類似の化合物、またレセプター側の多様性をPDBスケールで解析した結果を公開(例: 化合物の結合様式の比較やファーマコフォアの推定などに利用可能)。

## 連絡先

[所属] 国立研究開発法人  
産業技術総合研究所

[名前] 富井健太郎

[E-mail] k-tomii@aist.go.jp

# 配列解析によるプロテオミクス解析技術

## [技術の概要]



- Caspase-3の基質とその切断部位を高精度に予測する手法。(ScreenCap3)
- ミトコンドリアターゲティング配列とその切断部位を高精度に予測する手法。(MitoFates)

既存手法に比べ、大規模データに対しても少ない擬陽性での予測が可能のため、caspase-3の基質やミトコンドリアタンパク質のスクリーニングの支援ツールとして最適。目的に応じ、創薬標的や疾患関連遺伝子の絞り込みにも利用可能。

(ScreenCap3サーバー)

<http://scap.cbrc.jp/ScreenCap3/>

(MitoFatesサーバー)

<http://mitf.cbrc.jp/MitoFates/>

## [技術の利用例]

- Caspase-3が関わる細胞制御機構(アポトーシスなど)における新規因子のスクリーニング支援
- ミトコンドリア関連疾患に関わる新規ミトコンドリア局在遺伝子のスクリーニング支援
- 高精度の局在化シグナル配列領域の予測によるN末端の決定の支援

## 連絡先

[所属] 国立研究開発法人  
産業技術総合研究所

[名前] 富井健太郎

[E-mail] k-tomii@aist.go.jp

# タンパク質立体構造予測／類縁関係検索技術

## [技術の概要]

**FORTE** a profile-profile comparison tool for protein fold recognition. **DELTA-FORTE**

- プロファイル比較による高感度・高精度なアラインメント技術 (FORTE、DELTA-FORTE)
- 高感度な遠縁類似配列検索に適したアミノ酸置換行列 (MIQS)

立体構造予測や機能解析などに重要となる高精度なアラインメントを提供可能な技術。近年、急激に増大する配列データを最大限利用し、遠縁タンパク質や構造類似タンパク質を高感度で検索可能。一般向け(非営利目的)に、以下のwebサーバを用意している。

(プロファイル比較による類似性検索)

<http://forteprtl.cbrc.jp/forte/>

(MIQSを用いた配列検索システム)

<http://csas.cbrc.jp/Ssearch/>

## [技術の利用例]

- 構造未知タンパク質のアミノ酸配列を問い合わせとして、構造既知データベース中の類似タンパク質を検索。また高精度なアラインメントを計算 (例: 比較モデリングなどに利用可能)。
- BLASTなどの検索では見つからない遠縁の類縁タンパク質を高感度に検索可能 (例: 近縁種のゲノムがないなど、類似配列を見つけにくい生物種の遺伝子などの解析に有効)。

## 連絡先

[所属] 国立研究開発法人  
産業技術総合研究所

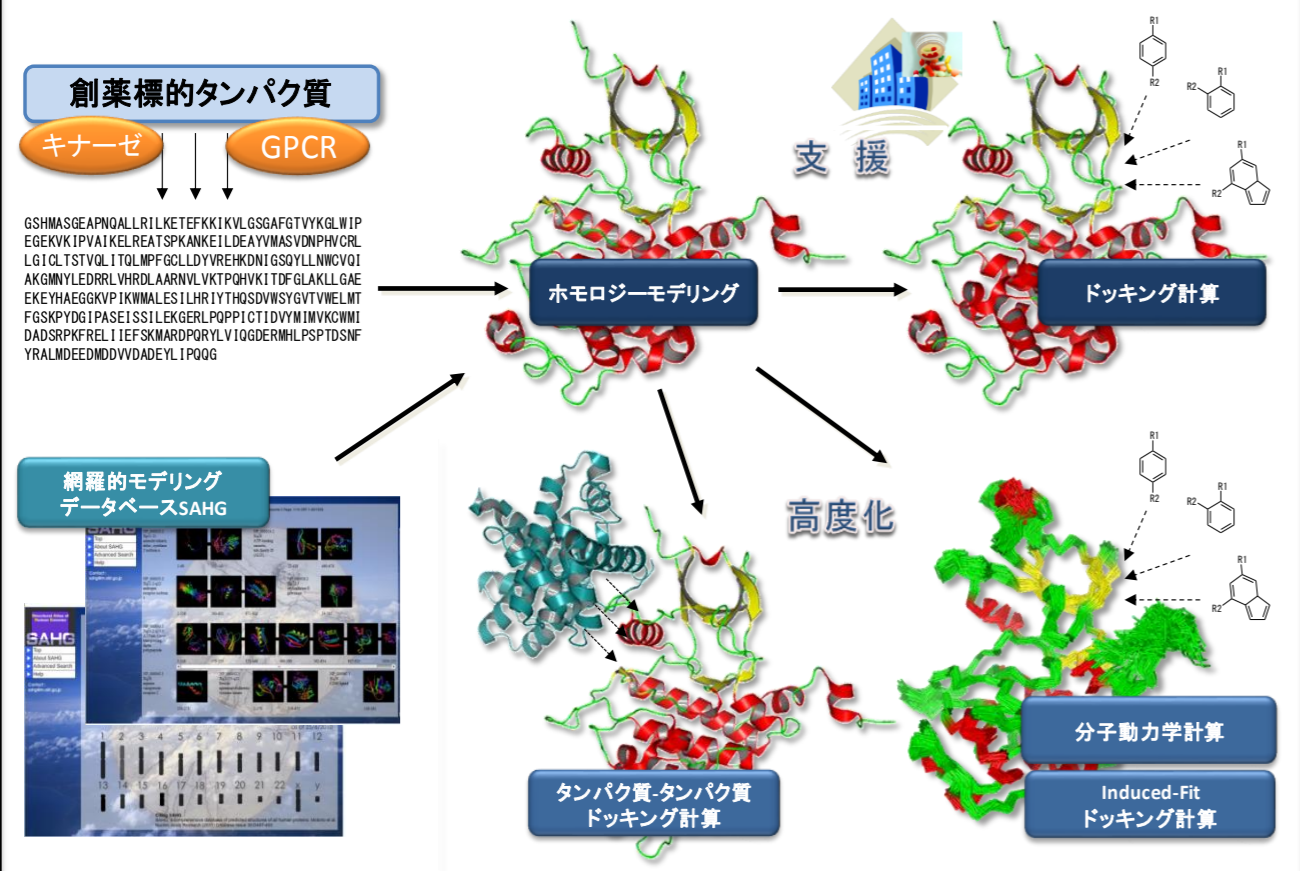
[名前] 富井健太郎

[E-mail] k-tomii@aist.go.jp

# 分子モデリングによる高度創薬支援

## [技術の概要]

- 創薬を目的とした、標的タンパク質のモデリング、タンパク質-タンパク質相互作用モデリング、化合物ドッキング、化合物設計、分子動力学計算を統合支援。
- 製薬企業との共同研究実績を生かし、標的タンパク質ファミリーに特化したモデリングやドッキング計算技術による支援、高度化研究を実施。



## [技術の利用例]

- インシリコスクリーニングのための高精度GPCRモデリング技術の開発。**  
ここがポイント GPCRに特化した、網羅的なハイブリッドモデリング、化合物ドッキングテスト、化合物結合コンセンサス評価等、創薬に特化したモデリング評価基準の適用
- 中分子創薬を目指した、マイクロ抗体のモデリングおよびファルマコフォアの低分子化。**  
ここがポイント 分子動力学計算を利用した、マイクロ抗体モデリングの精密化、標的タンパク質との結合予測。動的ファルマコフォアに基づくペプチドからの低分子化技術、合成支援
- タンパク質-タンパク質相互作用阻害に着目した抗インフルエンザ薬の開発。**  
ここがポイント 分子動力学計算を利用した、タンパク質-タンパク質相互作用ファルマコフォアと薬剤作用点の予測。タンパク質-タンパク質相互作用ファルマコフォアに基づく化合物ドッキングスクリーニングおよびヒット最適化

## 連絡先

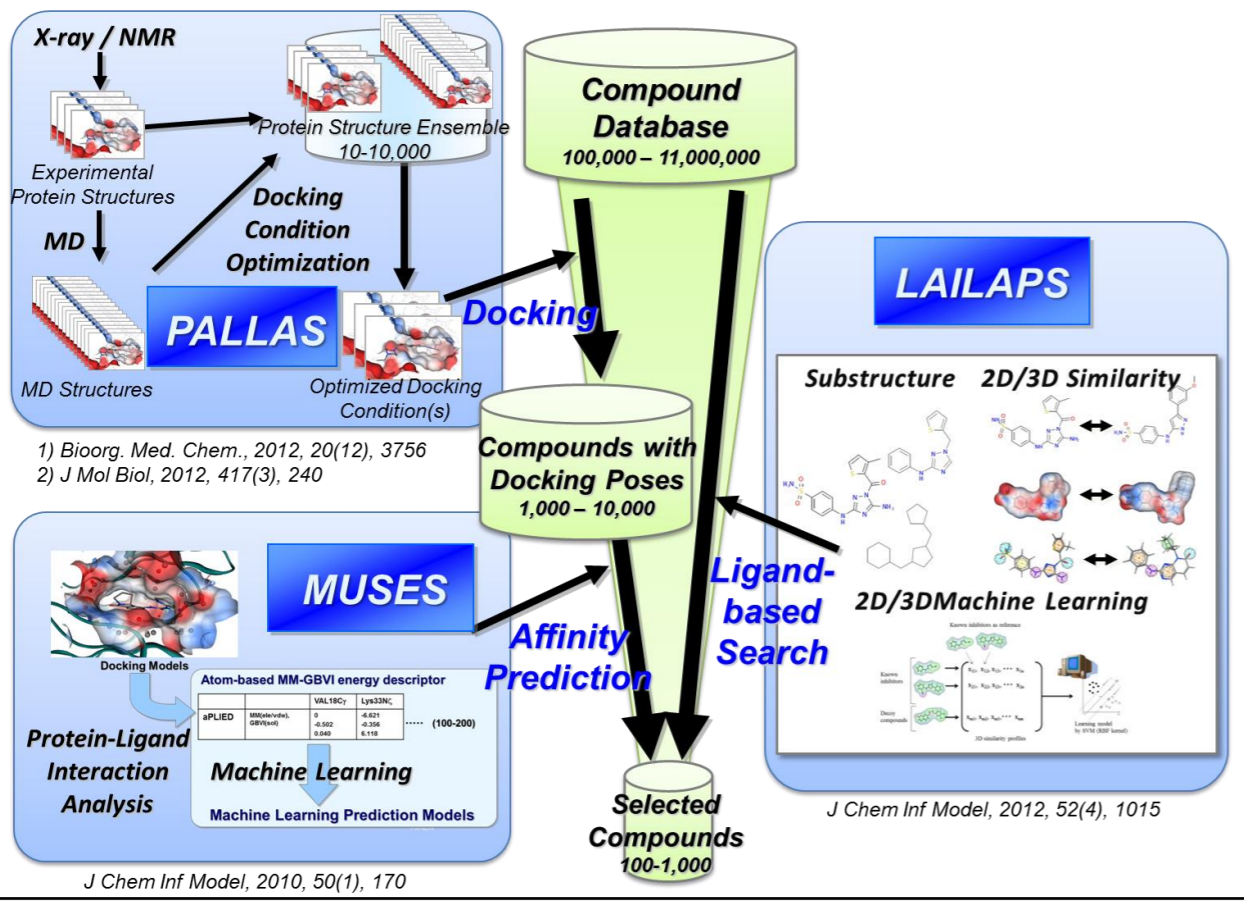
[所属] 産業技術総合研究所  
 創薬分子プロファイリング研究センター  
 [名前] 広川貴次  
 [E-mail] t-hirokawa@aist.go.jp

# PALLAS/MUSES/LAILAPSによる インシリコスクリーニングと最適化設計

## [技術の概要]

以下の3種類のシステムを組み合わせることでインシリコスクリーニングとヒットした化合物の活性向上などの設計を行うものです。

- 半自動ドッキング条件最適化 PALLAS
- 相互作用記述子による機械学習活性予測 MUSES
- 多面的類似・機械学習予測 LAILAPS



## [技術の利用例]

以下の代表例を含めて、20以上のターゲットへの適用例があります。

**Hck**

**AdipoR**

LAILAPS

Nature, 503, 493-499, (2013).

**DHOD**

**Pim1**

**DOCK2**

## 連絡先

[所属] 理化学研究所  
制御分子設計研究チーム

[名前] 本間光貴

[E-mail] honma.teruki@riken.jp



# FMO-PBSAによる親和性評価

## [技術の概要]

フラグメント分子軌道法(FMO法)による量子化学計算と溶媒効果を連続体モデルで表現するPBSA項を組み合わせた結合親和性予測方法です。

### 特徴

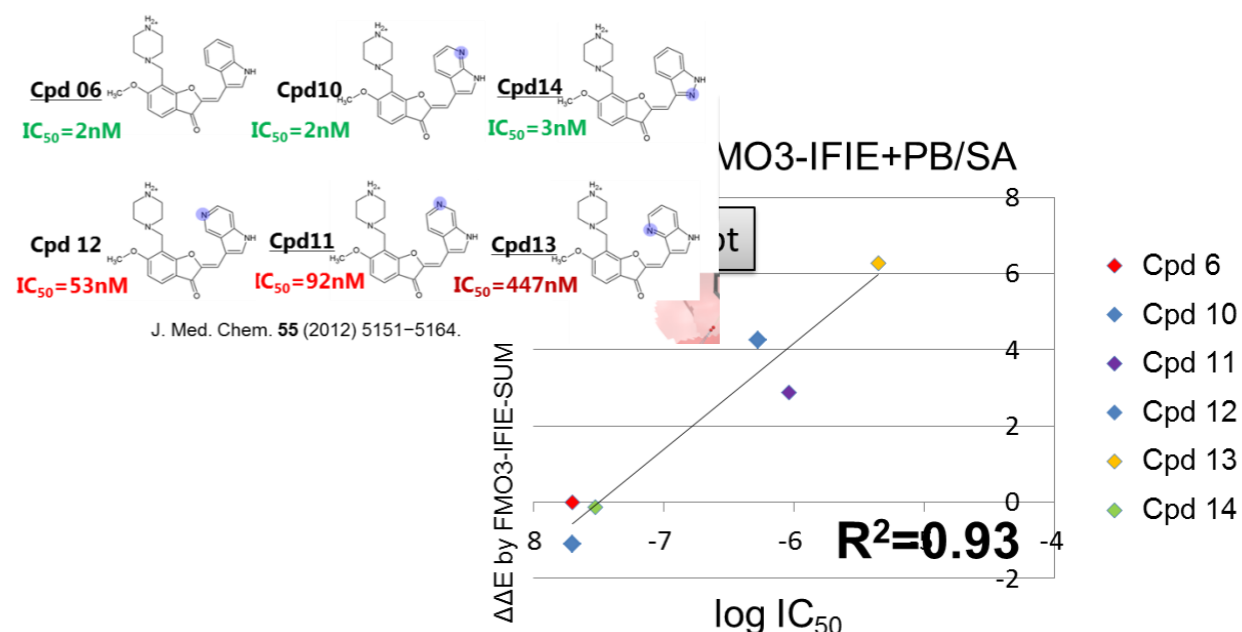
- 分子力学法(MM)では表現できない $\pi$ 相互作用等の分散力・電荷移動などを正確に予測できます。
- 従来のドッキングスコアや、分子動力学計算は、MMに基づいたスコアを用いており、それらで予測できない場合に有効です。

### 今後の展開

- 現在、製薬企業12社、IT企業1社、アカデミア7機関が集まって、FMO創薬コンソーシアムを結成し、この手法を含むFMO法の創薬利用の方法論の開発を行っています。理研の計算機その他、HPCIの課題としても採択されていますので、京を利用することもできます。  
(その場合、結果の公開が必要)

## [技術の利用例]

Pim1阻害剤の小さな構造変化による活性の違いを精密に予測することに成功



### 連絡先

[所属] 理化学研究所  
制御分子設計研究チーム

[名前] 本間光貴

[E-mail] honma.teruki@riken.jp

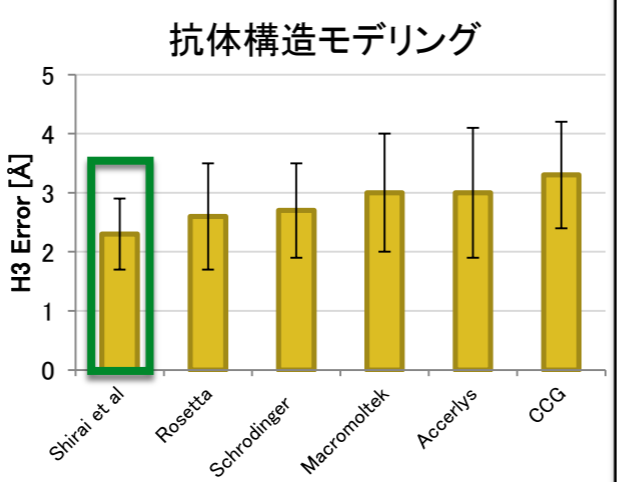
# 免疫レパトアのone-stop解析

## [技術の概要]

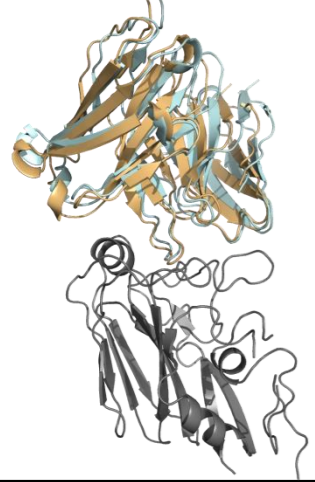
最近盛んに行われるようになった免疫レパトア(B細胞、T細胞)次世代シーケンシングの配列解析から構造解析までをone-stopで行う。

配列解析としてV(D)Jアサイメント、クローン解析等が行える。さらに配列データから抗体Fv構造を作成し、データを構造上にマップしたり、統計解析、機械学習を利用した結合部位予測、ドッキングシミュレーションによる複合体予測が行える。

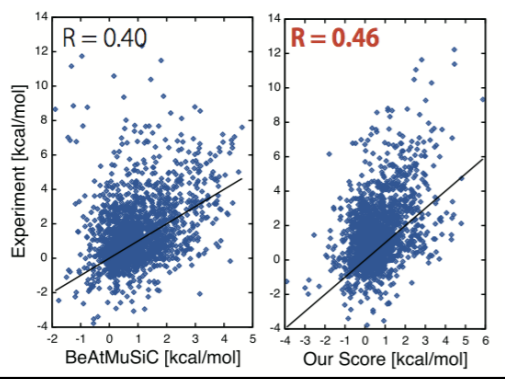
配列解析のためのソフトウェアとして多重配列アライメントソフトウェアMAFFTを開発した。抗体構造モデリングソフトウェアは、ブラインドコンテストAMA-IIにて最も精度の良い予測に成功した。タンパク質デザイン、ドッキング手法も非常に精度の高いアルゴリズムを開発・保有している。さらに、現在抗体構造から抗原を予測するアルゴリズムの開発を進めている。



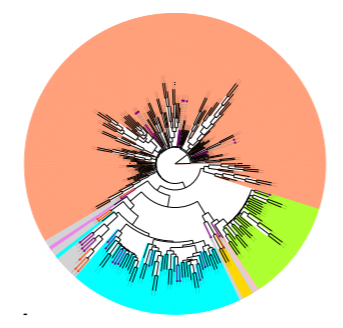
ドッキングシミュレーション



タンパク質デザイン

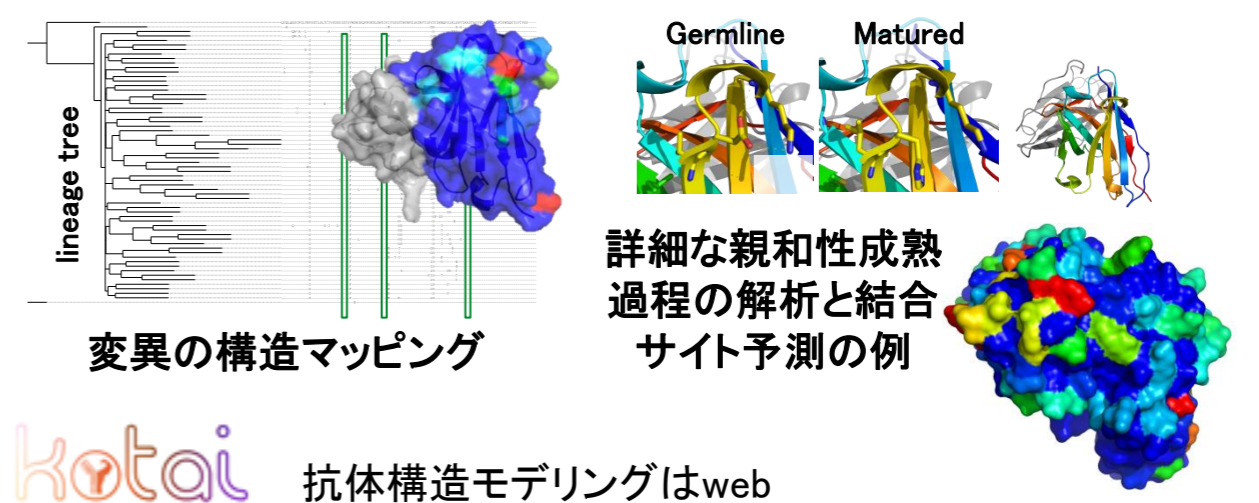


V遺伝子の系統樹解析



## [技術の利用例]

本技術は配列解析、抗体モデリング、ドッキング、タンパク質デザイン等各モジュール単位でも利用可能である。本研究室で開発している他のモジュール(RNA/DNA結合予測等)や分子動力学シミュレーションを組み合わせることでさらに多様な解析も可能である。



抗体構造モデリングはwebサーバーからも利用可能

## 連絡先

[所属] 大阪大学

[名前] Daron M Standley

[E-mail] standley@ifrec.osaka-u.ac.jp

# RNA/DNA結合サイト予測

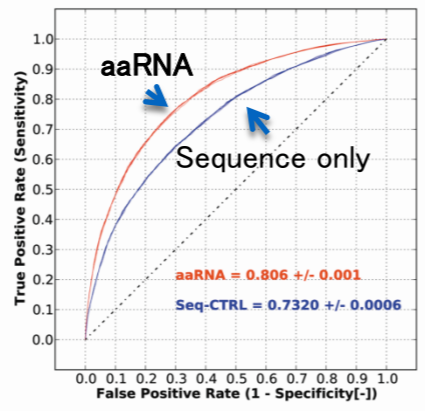
## [技術の概要]

RNA/DNA結合タンパク質上の結合サイトを予測するアルゴリズム(aaRNA/aaDNA)を開発した。配列情報に構造情報を組み合わせることで、非常に精度が高く、かつ頑強な予測が可能である。

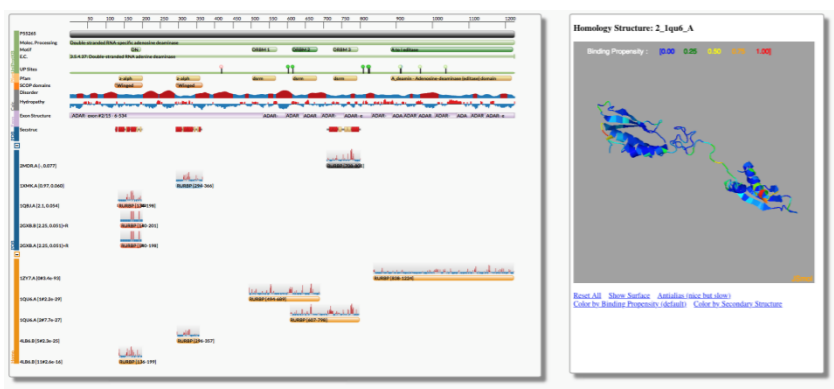
さらにこの技術の拡張として、現在ゲノムワイドなRNA/DNA結合タンパク質結合サイト予測サーバー(ruRBP/ruDBP)を開発している。

配列情報しか分からない場合でも、ホモロジーモデリングによって作られた構造を用いて予測が行える。構造モデルを用いても配列情報のみの場合に比べて精度向上は明らかであった。

予測結果をドッキング構造の評価に使えば、精度良く複合体構造を評価できる。また現在、このアルゴリズムを拡張し、ゲノムワイドに結合サイトを予測するサーバーを開発している。本サービスで、より簡単にRNA/DNA結合タンパク質やその結合サイトを見つけることが可能になる。



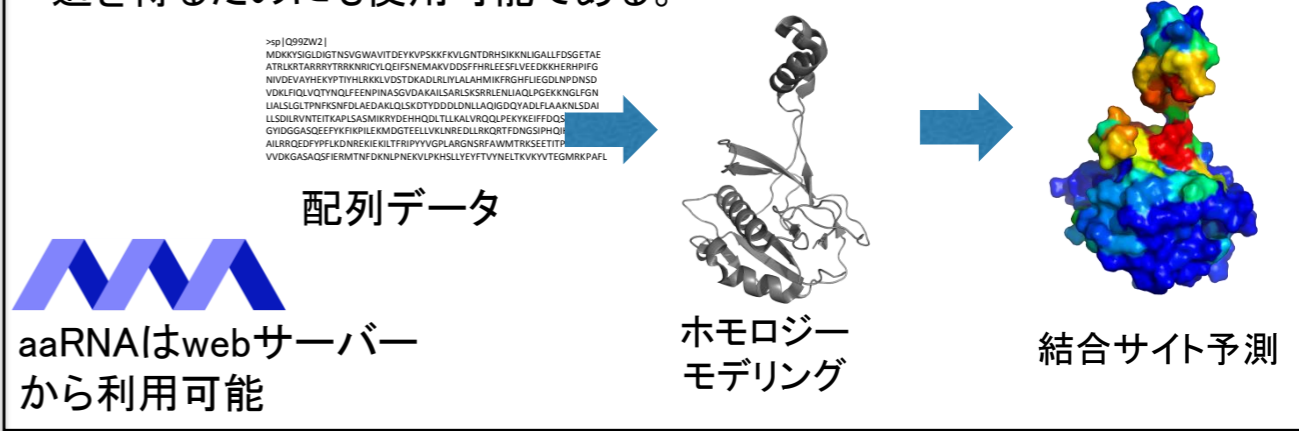
構造情報を取り入れて精度を向上



ゲノムワイドな結合サイト予測(開発中)

## [技術の利用例]

構造の分からないタンパク質のホモロジーモデリングを行い、各残基のRNA/DNA結合確率を予測する。支援利用者は結合サイトの変異実験等により実際に結合サイトが結合に寄与しているか確認することで目的タンパク質の機能評価を行える。さらに、ゲノムワイドの結合予測サービスを利用すれば、質量分析等で得られた一群のタンパク質の中から実際に目的RNA/DNAに結合しているタンパク質を選び出すことができる。また、これらの予測はタンパク質-核酸構造を得るためにも使用可能である。



## 連絡先

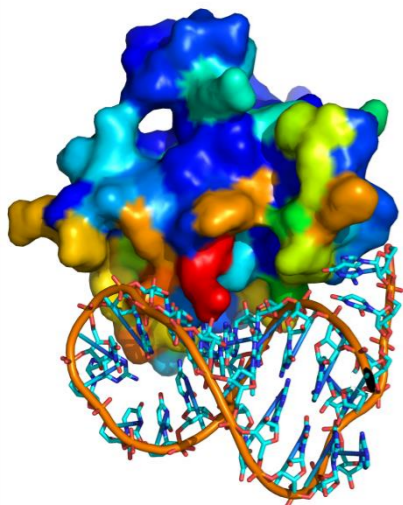
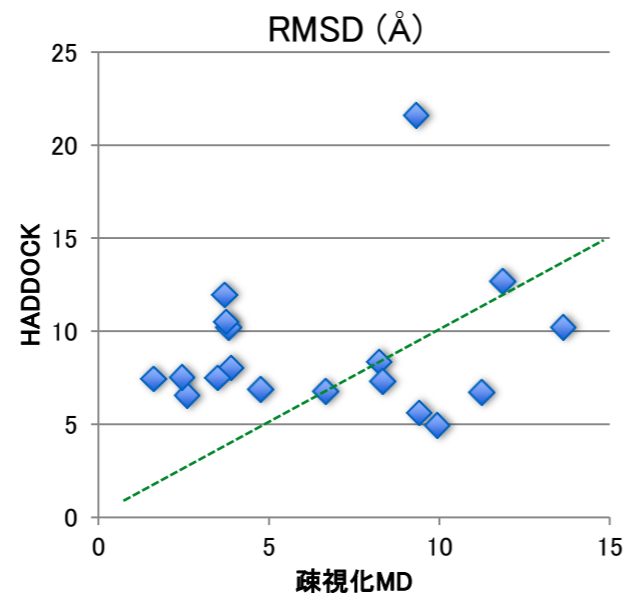
- [所属] 大阪大学
- [名前] Daron M Standley
- [E-mail] standley@ifrec.osaka-u.ac.jp

# 疎視化MDを用いたドッキングシミュレーション

## [技術の概要]

疎視化分子動力学シミュレーション(MD)による非常に高速な構造サンプリングと、我々が開発したRNA/DNA結合サイト予測をポテンシャルエネルギーとして用いた力場を組み合わせることで既存のドッキング手法では予測が難しかったフレキシブルな一本鎖RNAとの結合構造を精度良く予測することができる。

右図に示したように、RNA/DNA-タンパク質ドッキングを行えるHADDOCKと比較すると、疎視化MDは低RMSDの構造をサンプリングできることが分かる。計算に必要な時間も10分程度であり、高精度であるだけでなく、非常に高速に構造サンプリングが可能である。現在、全原子MDを組み合わせるさらに詳細に構造を評価するアルゴリズムを開発中である。

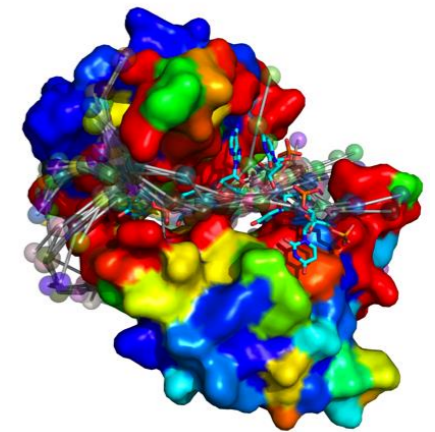


我々は構造を持ったRNA/DNA(ステムループ構造等)に対するドッキングアルゴリズムも開発している。これらアルゴリズムを組み合わせることで、様々なターゲットに対応することができる。

## [技術の利用例]

本技術で複合体構造を絞った後で、変異体実験等で結合サイトを確認すればより妥当なモデルを用いて複合体構造の議論が可能になる。転写後制御等に関わるRNA結合タンパク質は、タンパク質複合体として機能することがあるが、そのような場合には我々の持つタンパク質ドッキングパイプラインとの併用も可能である。また、疎視化構造を全原子モデルに変換し、より精度良いシミュレーションを行うことも可能である。複合体モデルを用いて結晶化に必要なRNA/DNAの長さや配列評価もできるだろう。

DNA結合タンパク質に対するサンプリング結果。全原子モデル(Stick)も同時に示す。タンパク質表面の色はaaDNAでの結合確率を表す。



## 連絡先

[所属] 大阪大学

[名前] Daron M Standley

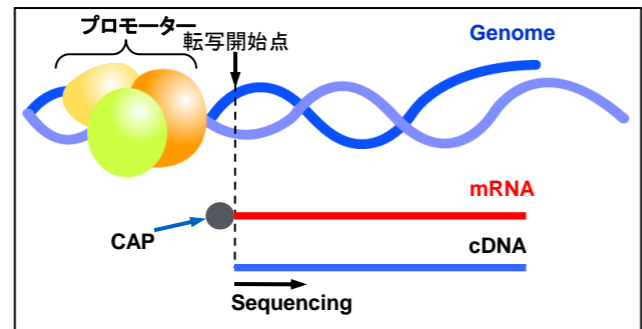
[E-mail] standley@ifrec.osaka-u.ac.jp

# 微量転写開始点解析技術 (CAGE)

## [技術の概要]

- 何が分かるのか:ゲノム上のエンハンサーやプロモーターの位置と活性、転写開始点毎の転写産物発現量を測定できます。このデータからガンや疾患特異的プロモーターを見つけることができます。また、薬物標的タンパク質の同定など疾患、創薬研究の様々な分野へ応用出来ます。
- 原理:total RNAの中から5'末端にCap構造を有するRNAのみを取り出してシーケンスを読み、得られた配列をゲノム上に配置することで位置を、配置された配列の数から発現量を測ります。この方法をCap Analysis of Gene Expressionの頭文字を取ってCAGE法といいます。
- 解説:この方法でタンパク質をコードするmRNA以外にも、5'末端にCap構造を持つRNAが数多く発見され非コード(nc)RNAと呼ばれています。今では、mRNAよりncRNAの方が種類が多くなりました。国際ポストゲノムプロジェクトENCODEやFANTOMで採用され成果を挙げています。

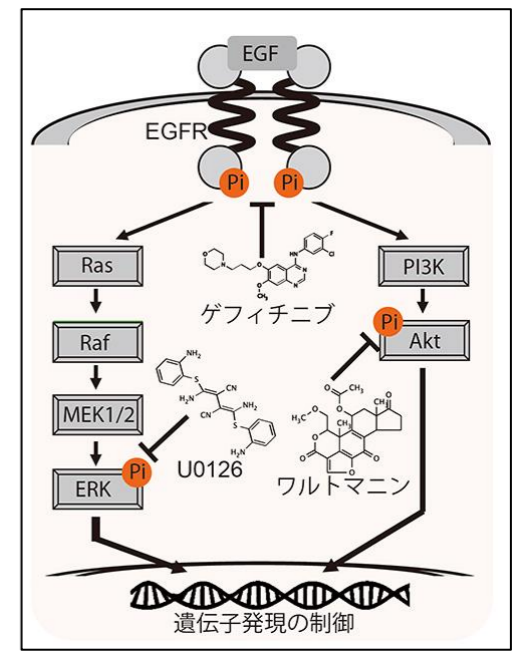
CAGE法の概念図



## [技術の利用例]

- CAGE法を使った定量的プロモータ活性測定による薬物標的研究の例。

CAGE法とマイクロアレイで薬剤投与前後の転写産物を解析。マイクロアレイでは見つけることが出来なかった薬物毎の情報伝達経路阻害部位を同定することが出来た。



Kazuhiro Kajiyama, Mariko Okada-Hatakeyama, Yoshihide Hayashizaki, Hideya Kawaji, Harukazu Suzuki. "Capturing drug responses by quantitative promoter activity profiling." CPT Pharmacometrics and Systems Pharmacology, 2013, doi: 10.1038/psp.2013.53

## 連絡先

[所属] 理化学研究所

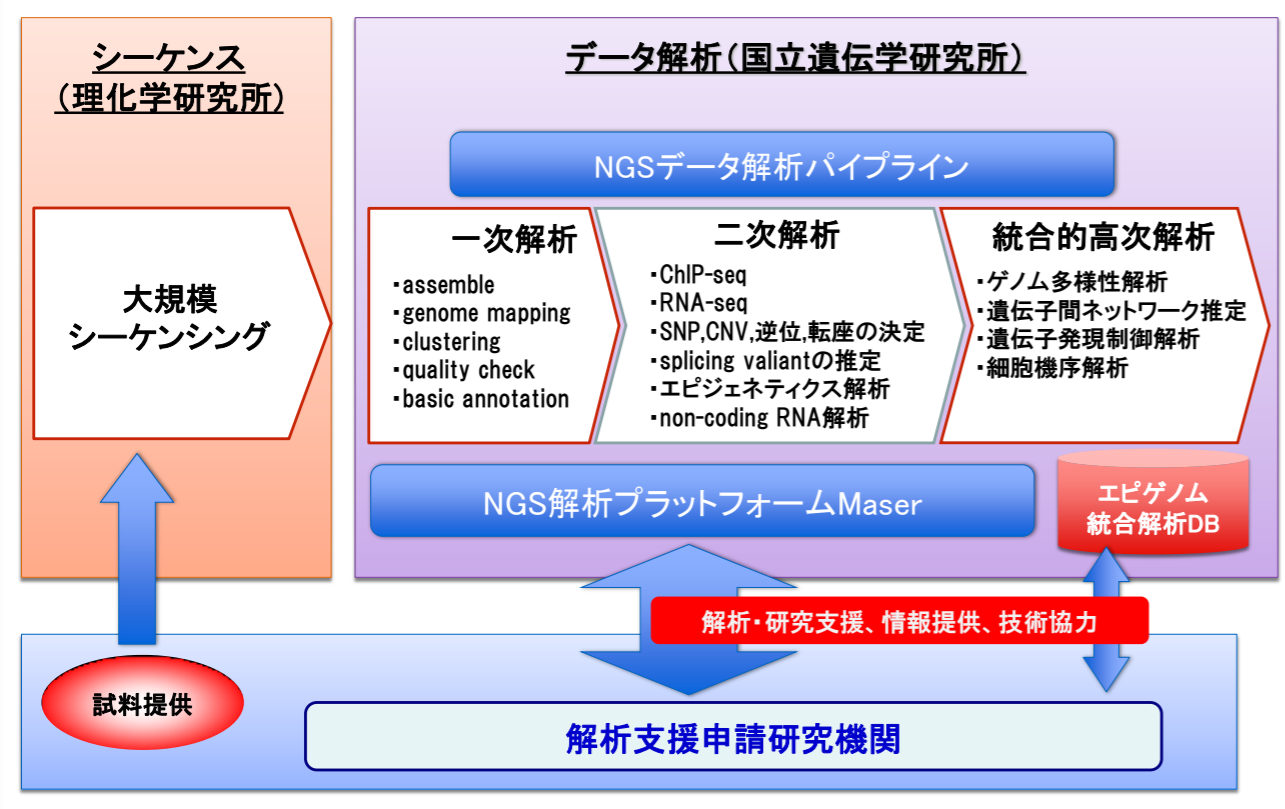
[名前] 近藤直人

[E-mail] pdis.genome\_analysis@riken.jp

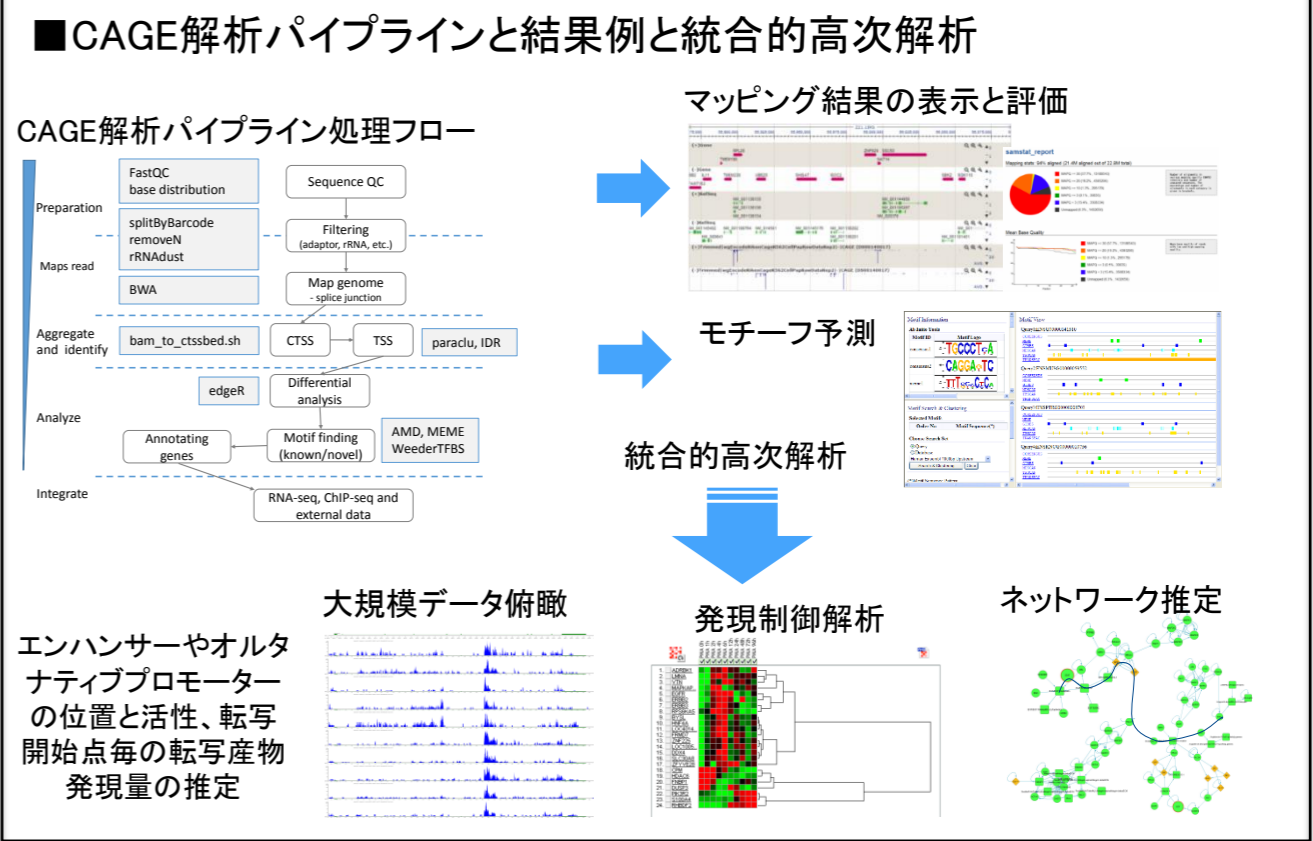
# エピゲノミクス高度化データベース構築

## [技術の概要]

- 分担機関の国立遺伝学研究所では次世代シーケンス(NGS)のCAGEを含めたデータ解析用プラットフォームMaserを構築しました。
- Maserでは150本以上の解析ツールが利用可能な1,500本以上の多様な解析メニュー(パイプライン)を構築し、その内433本を一般利用に公開中です。



## [技術の利用例]



## 連絡先

[所属] 情報・システム研究機構  
国立遺伝学研究所

[名前] 池尾一穂

[E-mail] kikeo@nig.ac.jp

# PBAT法による高感度メチローム解析

## [技術の概要]

Post-Bisulfite Adaptor Tagging (PBAT)とは、ゲノム全域のDNAメチル化状態を一塩基解像度で解明する全ゲノムバイサルファイトシーケンシング(WGBS)を高感度に行うために我々が開発したライブラリ作製法で、一細胞解析にも応用されています。通常30ngのゲノムDNAがあればPCRフリーで哺乳類ゲノムを30Xでカバーできますが、それよりも微量の場合でも対応致しますのでご相談下さい。

WGBSは、理想的なメチローム解析法ですが、相当のコストを要します。そこでターゲットエンリッチメントによって濃縮した領域に対する標的ゲノムバイサルファイトシーケンシング(TGBS)が試みられてきましたが、その感度に問題がありました。我々が開発したPBATによるTGBSは、従来の1/100量(30ng)からの解析やPCRフリーの解析も可能なので、希少サンプルの多検体比較に最適です。

## [技術の利用例]

- マウスやヒトの卵子・受精卵・始原生殖細胞等の極微量試料のWGBS解析
- 国際ヒトエピゲノムコンソーシアムにおける正常消化管上皮および子宮・胎盤由来細胞のWGBS解析
- iPS細胞由来分化細胞のWGBS解析
- 遺伝子改変・変異細胞およびマウスのWG/TGBS解析
- 腫瘍内多様性のWG/TGBS解析
- 先天性異常症のTGBS解析
- etc.

## 連絡先

[所属] 九州大学大学院医学研究院

[名前] 伊藤隆司

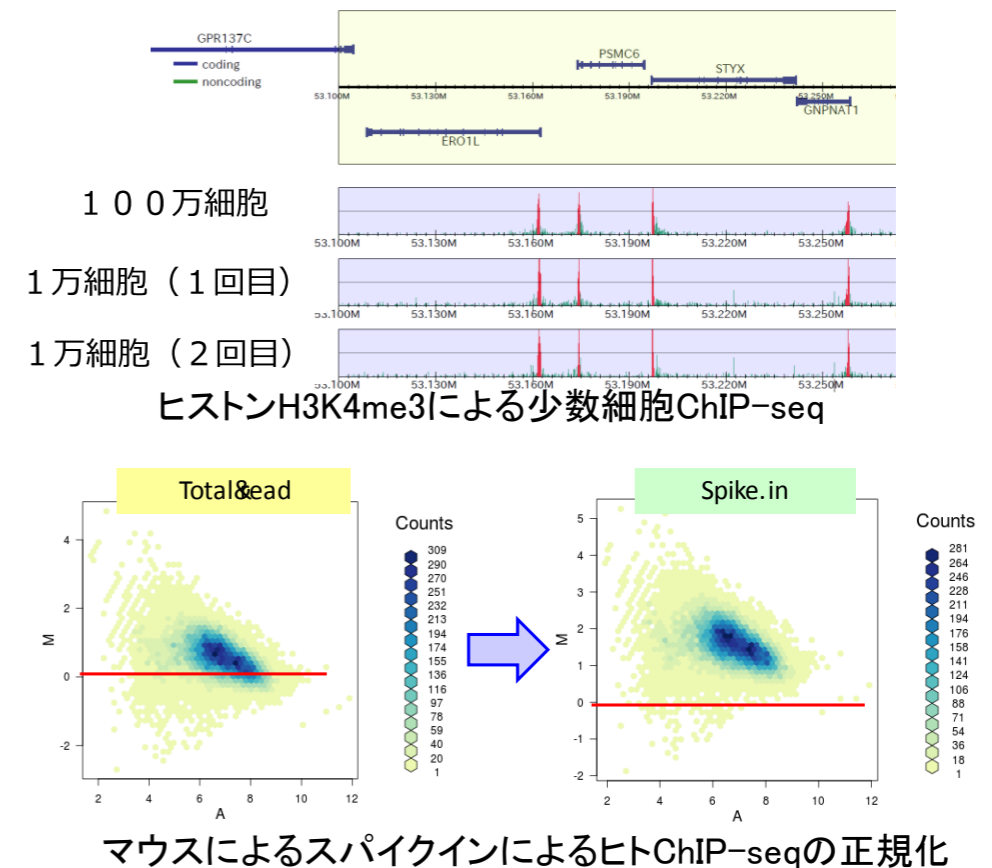
[E-mail] tito@med.kyushu-u.ac.jp

# ChIP-seq技術の微量化及び定量化

## [技術の概要]

- 微量化ChIP-seq解析(1万細胞)技術支援。
- 定量化ChIP-seq解析技術支援。
- 微量化対象: ヒストン修飾、RNAポリメラーゼに限定。
- 定量化: 生物種、対象タンパクにより要相談。
- その他、ChIP-seqのトラブルシューティング。
- 東大分生研の設備一式、ChIP-seq解析パイプラインDROMPAAIIを使用。  
東工大の抗体リソースを使用。

## [技術の利用例]



## 連絡先

- [所属] 1. 東京大学分子細胞生物学研究所  
2. 東京工業大学生命理工学研究科

[名前] 白髭克彦<sup>1</sup>、木村 宏<sup>2</sup>

[E-mail] kshirahi@iam.u-tokyo.ac.jp  
hkimura@bio.titech.ac.jp



# 1細胞および微小組織片の遺伝子発現解析

## [技術の概要]

### 支援メニュー

#### • 1細胞遺伝子発現解析

1細胞からのRNA-seqライブラリ作製を支援。必要に応じデータ解析(各遺伝子の相対発現量、変動係数、細胞間の遺伝子発現相関、変動遺伝子の抽出、細胞のグルーピング)も支援する。

#### • 微小組織片の分取と遺伝子発現解析

組織切片等から部位選択的に微小領域(直径100 $\mu$ m)を回収する。そこからRNAを抽出し、上記の解析を支援する。

### 支援に供する設備

- 96試料自動調製ロボット
- 微小組織片自動採集装置
- 1細胞からのRNA-seqライブラリ作製にはBead-seq法<sup>\*</sup>を利用

<sup>\*</sup>Kambara et al. (2015) *Anal. Biochem.*

## [技術の利用例]

- 細胞間、組織間、組織内部位間の遺伝子発現の比較(Heterogeneityの解析)
- 従来法では解析困難な希少細胞の遺伝子発現解析
- 各種マーカー遺伝子の探索

浮遊細胞、接着細胞、組織片など形態を問わず幅広い試料に対応

(これまでの実績: 各種がん細胞、免疫細胞、幹細胞(iPS、造血幹細胞)、ゼブラフィッシュ脳、ホヤ初期胚、分裂酵母など)

### 連絡先

[所属] 早稲田大学

[名前] 神原秀記、竹山春子、細川正人

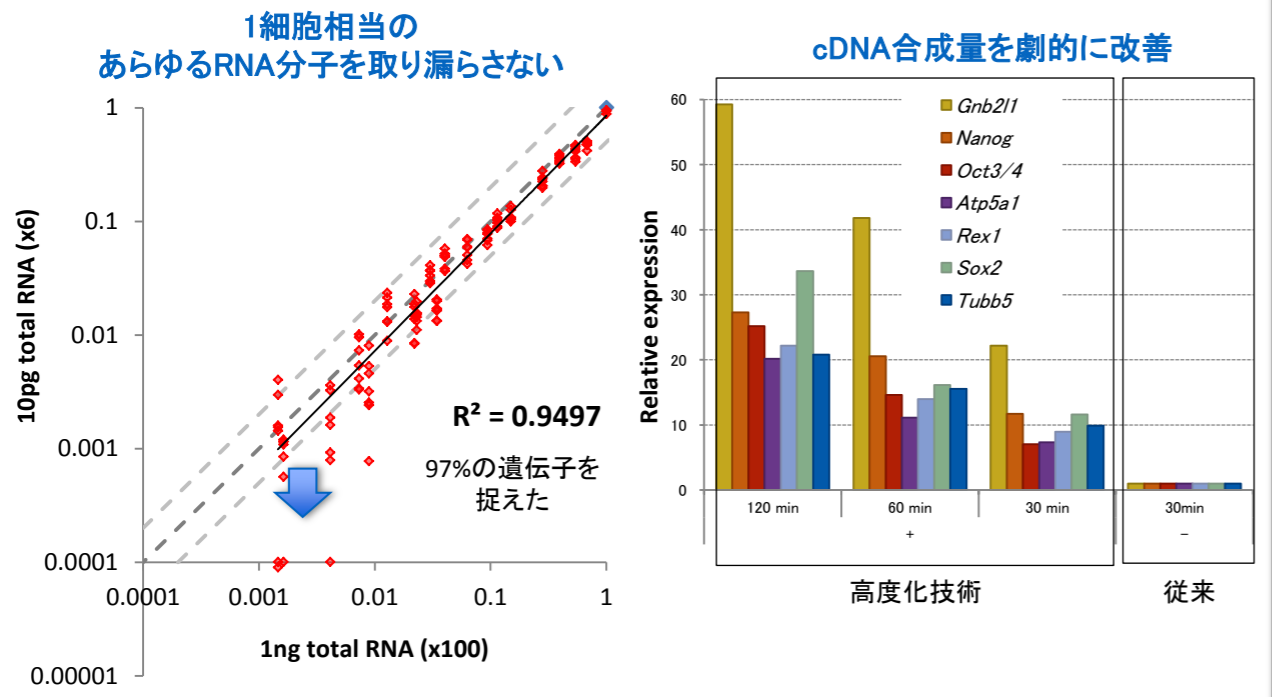
[E-mail] h.kanbara@kurenai.waseda.jp

m.hosokawa@aoni.waseda.jp

# 超微量RNAシーケンス技術の高度化

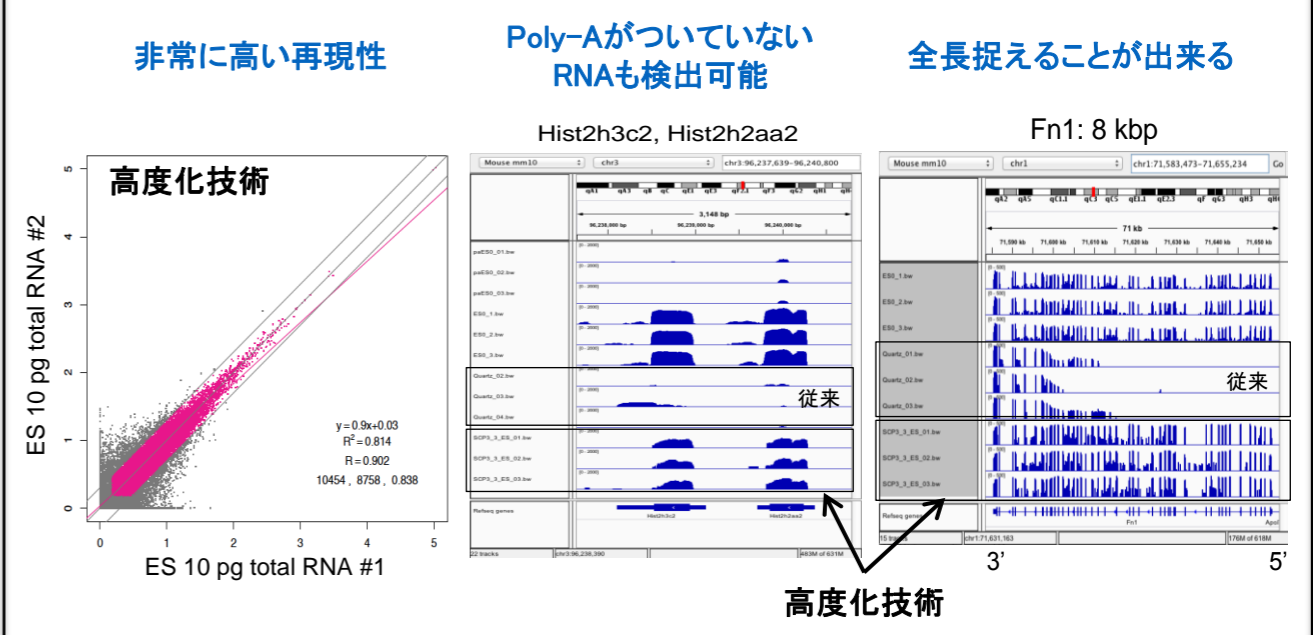
## [技術の概要]

### 超微量RNAからのcDNA作製技術

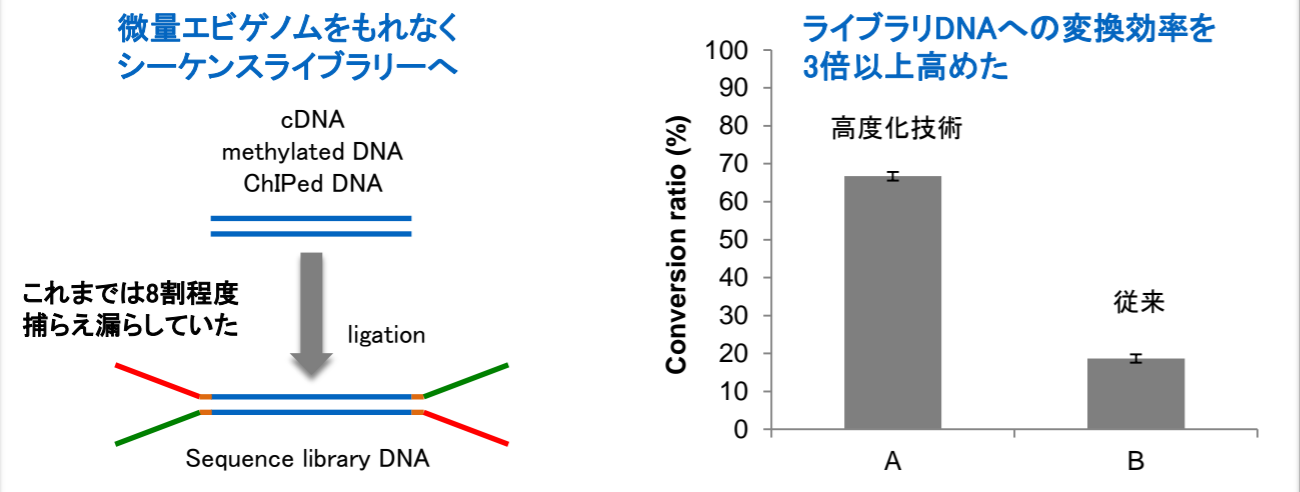


## [技術の利用例]

### 1細胞RNA-seqへの応用



### 高感度シーケンスライブラリ作製技術



### 連絡先

[所属] 理化学研究所情報基盤センター  
 バイオインフォマティクス研究開発ユニット

[名前] 二階堂 愛

[E-mail] support-bit@riken.jp

# 包括的1細胞トランスクリプトーム解析

## [技術の概要]

高度化支援技術では、数千～数万細胞の包括的な遺伝子発現を同時に解析する方法を確立することで、細胞集団の階層性を明らかにし、真の細胞状態を把握することを目的とする。

本技術はバーコード化されたマイクロビーズと直径25–35 $\mu$ mのマイクロウェルを用い、1細胞由来のmRNAをビーズにトラップし、バーコード化cDNAを合成する技術である。個々の細胞由来のRNAのバーコード化により～数万細胞の遺伝子発現解析が可能となる。

### 支援に供する設備名など

小型遠心機、振盪機、顕微鏡

## [技術の利用例]

組織における細胞の多様性の解析  
がんマーカー、分子マーカーの同定  
がん微小環境の解析(浸潤免疫細胞、上皮、内皮、線維芽細胞等)  
—それに伴う新しい分子診断

ES細胞、神経細胞等の細胞発生、分化と疾患での細胞間相互作用

### 連絡先

[所属] 金沢大学医薬保健研究域医学系

[名前] 橋本真一

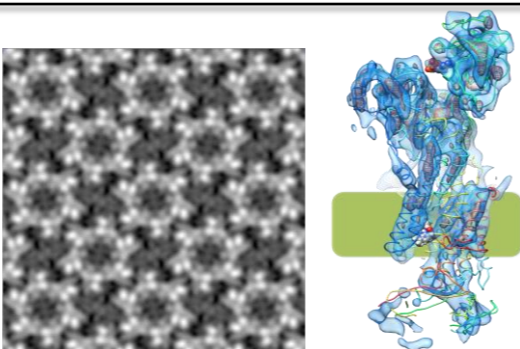
[E-mail] hashimoto@med.kanazawa-u.ac.jp

# 多様な顕微鏡技術による膜タンパク質複合体の多階層での機能構造研究

## [技術の概要]

### 電子線結晶学

- 二次元結晶及び氷包埋サンプル作製の技術支援
- 電子線結晶学による構造解析支援

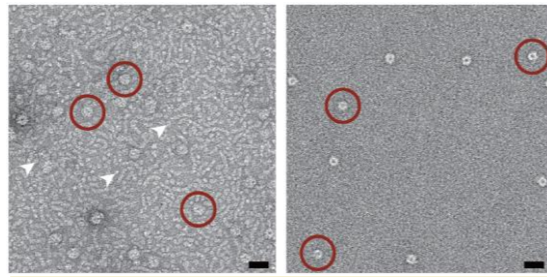
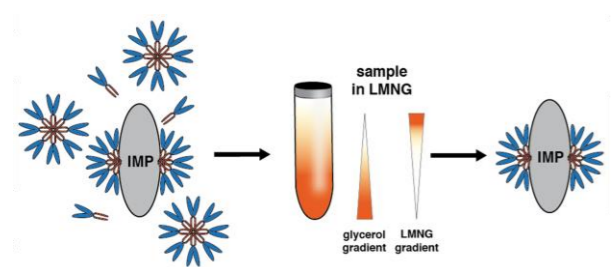


Gap Junction Channelの二次元投影像(左)とH<sup>+</sup>、K<sup>+</sup>-ATPaseの立体構造(右)

### 単粒子解析

- 膜タンパク質単粒子解析の為の界面活性剤除去法による技術支援

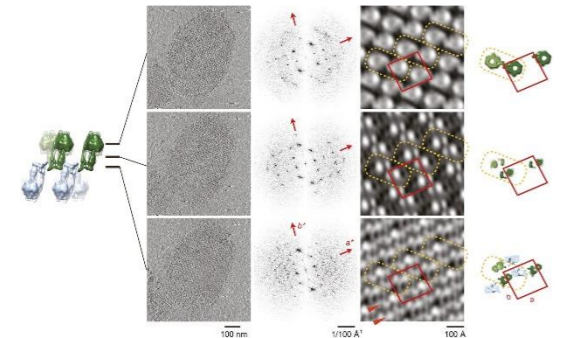
**GraDeR: Gradient-based Detergent Removal for single particle cryo-EM**



Gap Junction Channel (○) の負染色像。GraDeR処理前(左) 処理後(右)においてミセル(矢尻)が除去できていることが分かる。

### 電子線トモグラフィー

- TomeX: トモグラフィーを利用した電子線結晶構造解析による支援



ウシ心筋ATP合成酵素の脂質膜再構成ベシクルのトモグラフから、厚さ方向を含めた興味領域を切り出し、電子線結晶学により解析することで、定法では解析できない小さな二次元結晶であっても構造解析が可能になる。

## [技術の利用例]

### 電子線結晶学

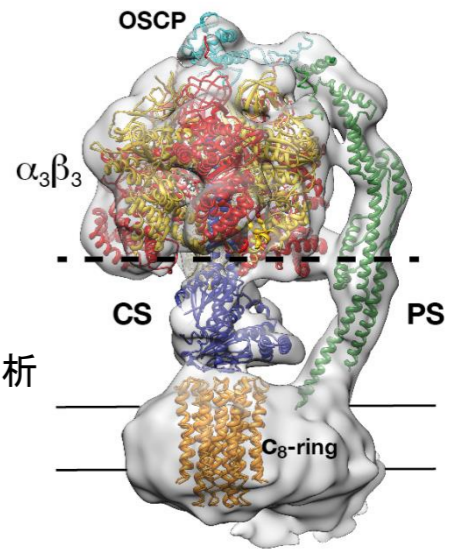
- H<sup>+</sup>、K<sup>+</sup>-ATPaseの構造解析 (Abe et al., 2012, PNAS 他)
- Gap Junction Channelの構造解析 (Oshima et al., 2007, PNAS 他)
- カーボンサンドウィッチ法による二次元結晶の分解能向上 (Yan and Abe et al., 2013, Microscopy)

### 単粒子解析

- ウシ心筋F-ATPaseの立体構造解析
- GraDeR法の確立 (Hauer and Gerle et al., 2015, Structure)

### 電子線トモグラフィー

- TomeXによる脂質再構成F-ATPaseの構造解析 (Jiko et al. and Gerle, 2015, eLife)



## 連絡先

- [所属] 1. 兵庫県立大学  
2. 名古屋大学

[名前] Christoph Gerle<sup>1</sup>、大嶋篤典<sup>2</sup>、阿部一啓<sup>2</sup>

[E-mail] gerle.christoph@gmail.com  
atsu@cespi.nagoya-u.ac.jp  
kabe@cespi.nagoya-u.ac.jp

# 分子複合体全体構造への電顕イメージング法の活用 ～電子直接検出器を用いた高分解能解析等～

## [技術の概要]

### 支援メニュー

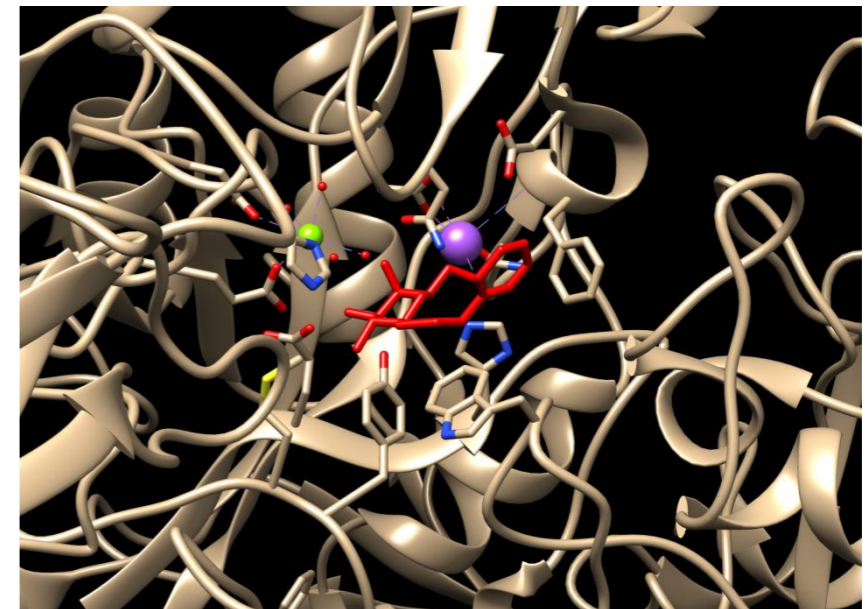
- 分子量10万Da以上のタンパク質および薬剤等とのタンパク質複合体の3D電子顕微鏡解析
- フレキシブルなタンパク質や、抗体等との複合体分子の2D電子顕微鏡解析

### 支援に供する設備等

- 電子直接検出カメラを備えた超高性能クライオ電子顕微鏡(実際の操作はオペレーターが行います)
- 凍結装置、クライオミクローム等の試料作製装置
- 電顕画像解析計算機

## [技術の利用例]

### 標的タンパク質と薬剤複合体の 電顕近原子分解能解析



### 連絡先

[所属] 大阪大学蛋白質研究所

[名前] 岩崎憲治

[E-mail] [ikenji@protein.osaka-u.ac.jp](mailto:ikenji@protein.osaka-u.ac.jp)

# 2Dハイブリッド解析

## [技術の概要]

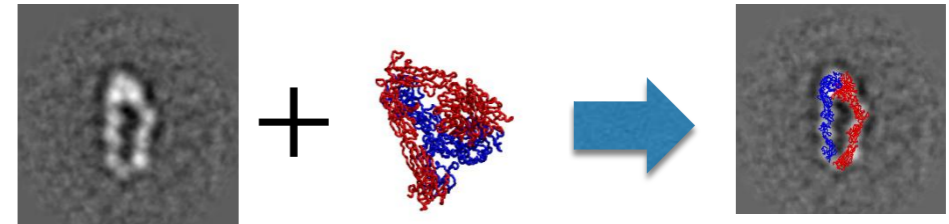
### 支援メニュー

- 提供された生体分子の2D電子顕微鏡画像の取得、およびそれを再現するような立体構造モデルの構築
- それに付随したコンフォメーション変化等の構造情報

### 支援に供する設備等

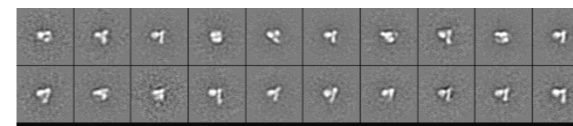
- 大阪大学蛋白質研究所の電子顕微鏡施設
- 日本原子力研究開発機構関西光科学研究所の計算機クラスター
- 開発した計算機プログラム
- 必要に応じてプログラム開発も行います。

## [技術の利用例]

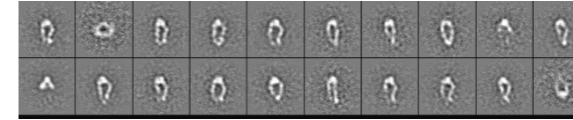


結晶構造を変形して電顕画像を再現するモデルを構築します。

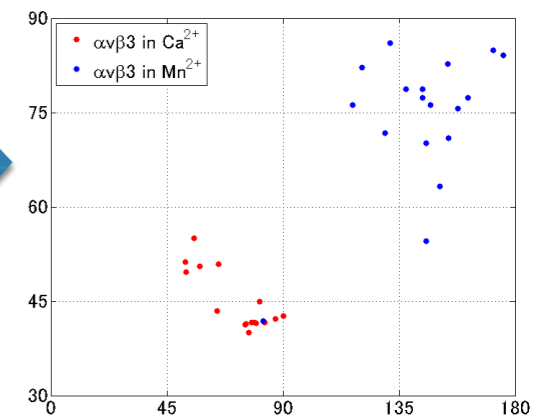
Ca<sup>2+</sup>溶液中の構造



Mn<sup>2+</sup>溶液中の構造



多数の電顕画像から構造分布情報を得ることができます。



### 連絡先

[所属] 日本原子力研究開発機構

[名前] 松本 淳

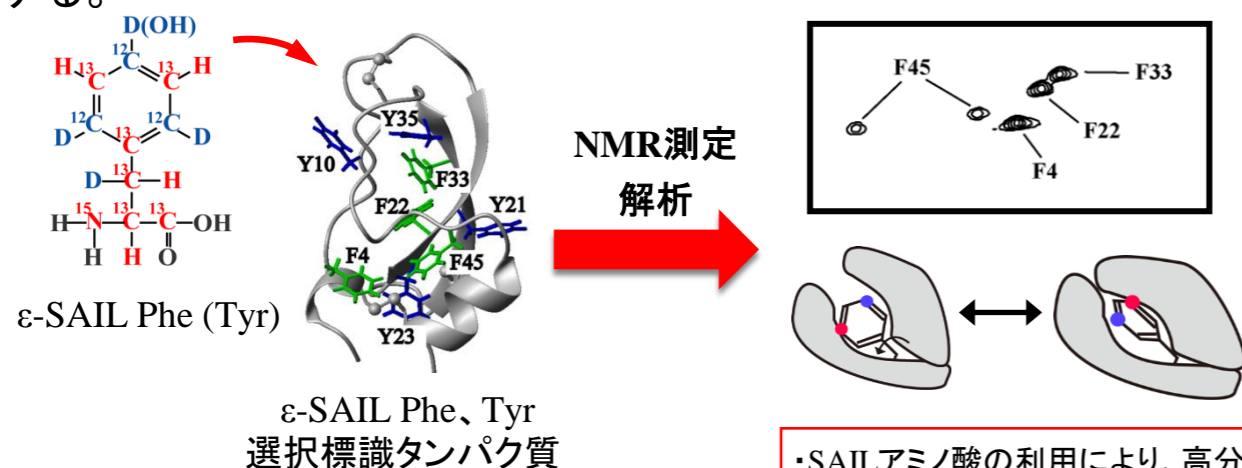
[E-mail] matsumoto.atsushi@jaea.go.jp

# SAILアミノ酸選択標識体を利用したNMRプローブ実験

## [技術の概要]

### SAILアミノ酸選択標識体を利用したNMRプローブ実験

タンパク質-リガンド間の相互作用に伴うタンパク質の動態変化(芳香環の反転運動、ジスルフィド結合の異性化、側鎖官能基の水素交換速度など)を、SAIL法をはじめとする多様な安定同位体標識技術と核磁気共鳴(NMR)法を駆使して明らかにする。



- ・相互作用、動態解析に最適な安定同位体標識の提案。
- ・生産領域(代表:大阪大学、分担:SAILテクノロジーズ)との連携による高度な安定同位体標識試料の調製

- ・SAILアミノ酸の利用により、高分子量タンパク質でも、高感度かつ先鋭的なシグナルが得られる。
- ・リガンド認識等に関連する過渡的な大振幅動態変化を捉える。

### 支援に供する設備名

高磁場核磁気共鳴装置

(名古屋大学構造生物学研究センター)

・Bruker 社製

(900MHz、600MHz x 2台、500MHz x 2台)

・極低温プローブ装備



## [技術の利用例]

- ・トリプシンとの複合体形成に伴う、BPTI タンパク質上のP1Lys 残基側鎖アミノ基の水素交換速度変化の解析。BPTI タンパク質のジスルフィド結合の配座異性化の解析。TyrおよびPhe 残基側鎖芳香環の反転運動の解析。
- ・FKBP12蛋白質の各種免疫抑制剤との複合体界面に位置するPhe、Tyr残基側鎖芳香環の反転運動に基づいた界面揺らぎの解析。
- ・抗リゾチーム抗体によるリゾチーム認識に伴う動態変化の解析。

その他、膜タンパク質や高分子量タンパク質複合体についてリガンド結合に伴う動態変化を、様々なアミノ酸をプローブとして解析する。

## 連絡先

[所属] 名古屋大学大学院理学研究科附属  
構造生物学研究センター

[名前] 宮ノ入洋平、武田光広

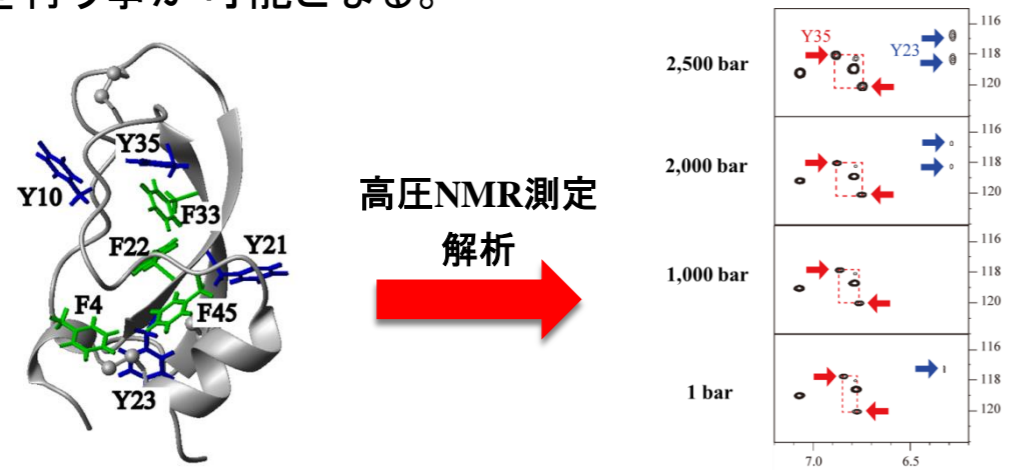
[E-mail] miyanoiri.youhei@h.mbox.nagoya-u.ac.jp

# タンパク質高圧NMR実験

## [技術の概要]

### タンパク質高圧NMR実験

タンパク質の分子認識を理解するには、遊離状態、リガンド結合状態において生じるタンパク質の構造揺らぎを理解する必要があります。高度安定同位体標識技術を利用した高感度観測技術と極低温高圧NMR実験を融合する事で、従来不可能であった、過渡的揺らぎに伴う体積変化の定量解析や構造平衡の制御を行う事が可能となる。



- ・相互作用、動態解析に最適な安定同位体標識の提案。
- ・生産領域(代表:大阪大学、分担:SAILテクノロジーズ)との連携による高度な安定同位体標識試料の調製

- ・芳香環の反転運動等の圧力依存性を調べ、各動態の活性化体積を調べる。

### 支援に供する設備名

- 高磁場核磁気共鳴装置  
(名古屋大学構造生物学研究センター)
- ・Bruker 社製 (900MHz、600MHz x 2台、500MHz x 2台)
- ・極低温プローブ装備
- ・DAEDALUS社製 高圧NMR装置



## [技術の利用例]

- ・FKBP12タンパク質—免疫抑制剤等、薬剤と標的タンパク質との複合体の相互作用面に生じる揺らぎの大きさを、界面に位置するPhe、Tyr 残基の芳香環反転運動の圧力応答から解析する。

その他、タンパク質—ペプチド複合体において生じる2状態間平衡の加圧による制御や、膜タンパク質や抗体-抗原複合体等の高分子量タンパク質についても、薬剤等のリガンド結合に伴う芳香環反転運動やアミノ酸側鎖の回転異性体間の交換運動等の定量的解析が可能。

## 連絡先

[所属] 名古屋大学大学院理学研究科附属  
構造生物学研究センター

[名前] 宮ノ入洋平、武田光広、楊 淳竣

[E-mail] miyanoiri.youhei@h.mbox.nagoya-u.ac.jp

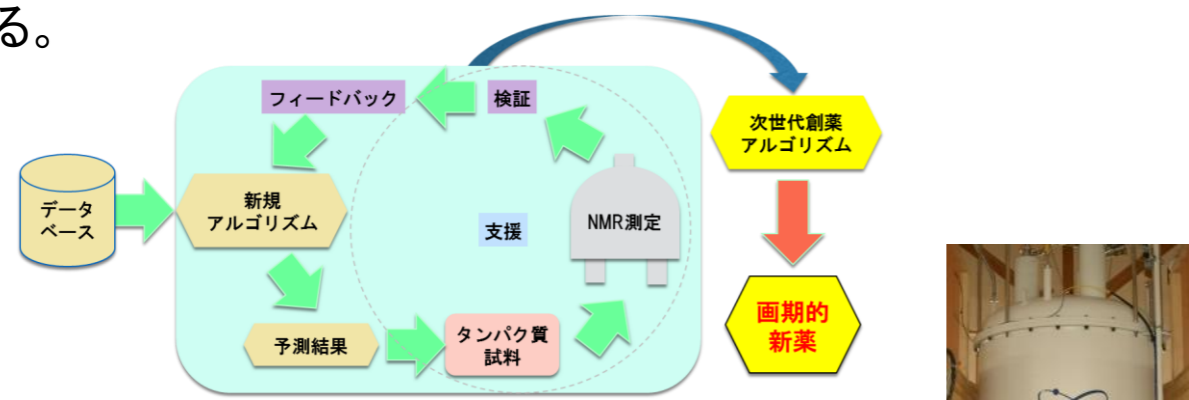


# インシリコ創薬技術の新規アルゴリズム開発支援

## [技術の概要]

### インシリコ創薬技術の新規アルゴリズム開発支援

革新的新薬の創成には、新規の創薬標的の発見やシーズの発見、相互作用予測や分子設計など、新たなアルゴリズムが必要である。特に創薬標的中に含まれる天然変性タンパク質の予測や、標的ポケット部位の類似性の予測など、予測法の精度向上には、開発過程における実証実験によるフィードバックが必須である。そこで、拠点が保有するノウハウである「NMR試料の発現系迅速構築法(PRESAT-vector法)」、「天然変性タンパク質に特化した発現系」、「インバース標識技術」、「アミノ酸選択的標識技術」、「非線形サンプリングによる高速NMR測定」、「NMRデータのPCA解析」などの手法を組み合わせ、創薬に資する新規の数値アルゴリズム開発を支援する。



### 支援に供する設備名

- 高磁場核磁気共鳴装置  
(名古屋大学構造生物学研究センター)
- ・Bruker 社製 (900MHz、600MHz x 2台、500MHz x 2台)
- ・極低温プローブ装備



## [技術利用例]

情報拠点・東北大学木下教授らの開発したeF-Site/eF-Seek(タンパク質表面の類似性比較検索アルゴリズム)が新規のシード化合物探索ならびにファーマコフォア探索に有用なことを網羅的試料調製・NMR相互作用実験を組合せて実証。更に同法を応用してPDZドメインに結合する共通のファーマコフォアの発見につなげた。

解析拠点(インフォマティクス領域)名古屋大学太田教授・前橋工科大学福地准教授らの開発した天然変性タンパク質データベースIDEALおよび予測アルゴリズムDICHOTの実用性を検証した。並行して天然変性タンパク質がバイオ医薬品の新規の添加剤(安定化剤)として創薬に応用可能なことを実証して特許を出願した。

### 連絡先

[所属] 名古屋大学大学院理学研究科附属  
構造生物学研究センター

[名前] 廣明秀一

[E-mail] hiroaki.hidekazu@f.mbox.nagoya-u.ac.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 エピゲノム関連タンパク質と低分子化合物のスクリーニング法の開発と支援

## [技術の概要]

### 支援メニュー

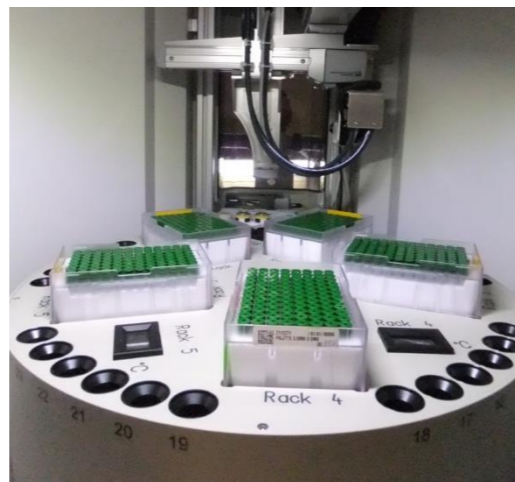
- エピゲノム関連タンパク質のように柔らかくて結晶化が困難な天然変性タンパク質の相互作用部位の同定と認識構造の解明
- 自動測定による標的タンパク質結合化合物の大量スクリーニング
- 世界最高感度950MHz LC-NMRによる代謝化合物の同定
- 900MHz 固体NMRによるタンパク質の測定

### 支援に供する設備

フロー型TCI  
クライオ  
プローブ付  
950MHz  
LC-NMR、  
700MHz  
LC-NMR



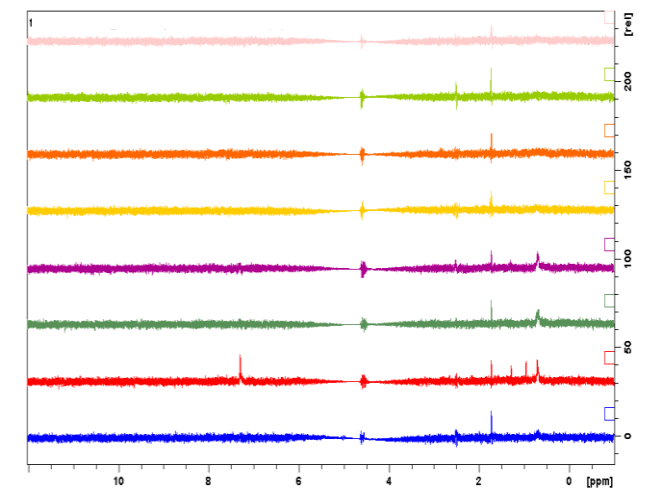
自動測定: 10cm  
の試料管が480本



## [技術の利用例]

LC-MSで同定できなかった化合物のLC-NMR装置の利用による分子構造の同定  
標的タンパク質結合化合物のスクリーニング

Sample Jet(480本)と自動測定ソフトを用いて3,328化合物の標的タンパク質との結合の有無を23日でNMR測定により判定



### 連絡先

[所属] 横浜市立大学大学院  
生命医科学研究科

[名前] 西村善文

[E-mail] [nisimura@tsurumi.yokohama-cu.ac.jp](mailto:nisimura@tsurumi.yokohama-cu.ac.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

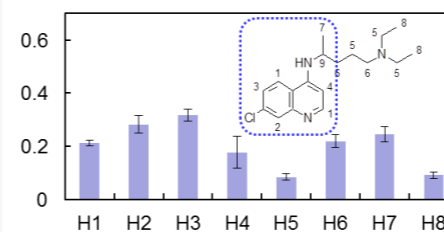
## [技術の概要]

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