

# 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

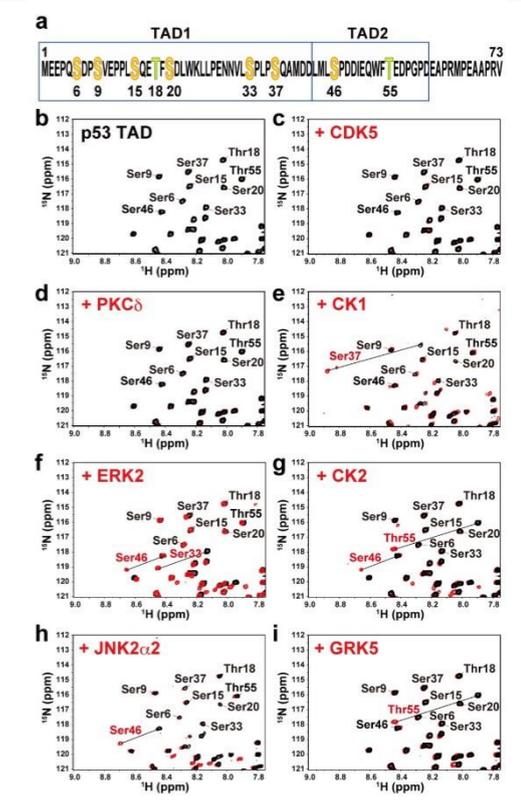
900MHzNMR

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

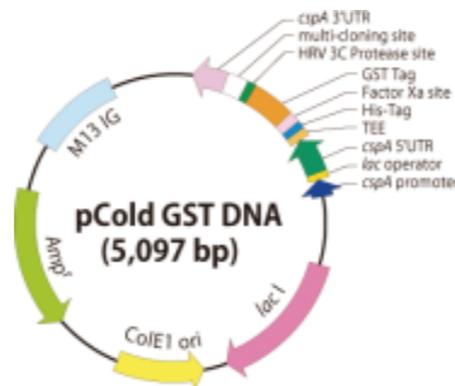
[E-mail] nisimura@tsurumi.yokohama-cu.ac.jp

# NMR試料調製・安定同位体標識・NMR測定

## [技術の概要]

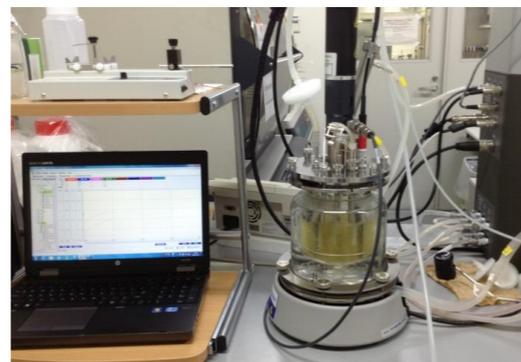
### 発現ベクターの構築・発現

- ・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  
 $^{19}\text{F}$ -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

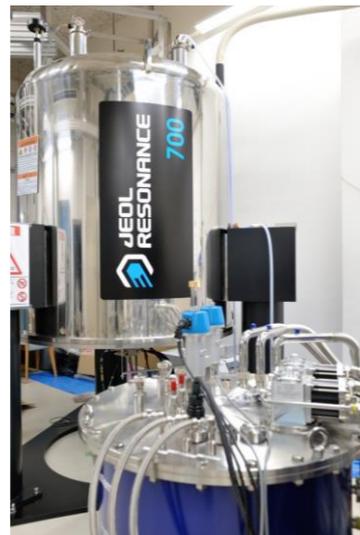
- 安定同位体標識蛋白質の発現、導入条件の最適化

### 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

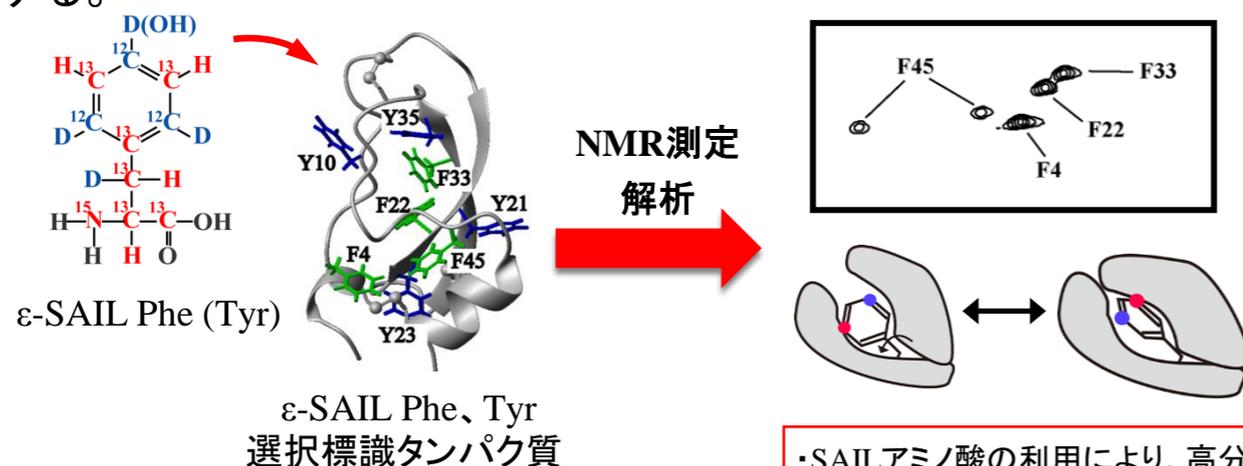
[E-mail] [kojima@protein.osaka-u.ac.jp](mailto:kojima@protein.osaka-u.ac.jp)

# 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

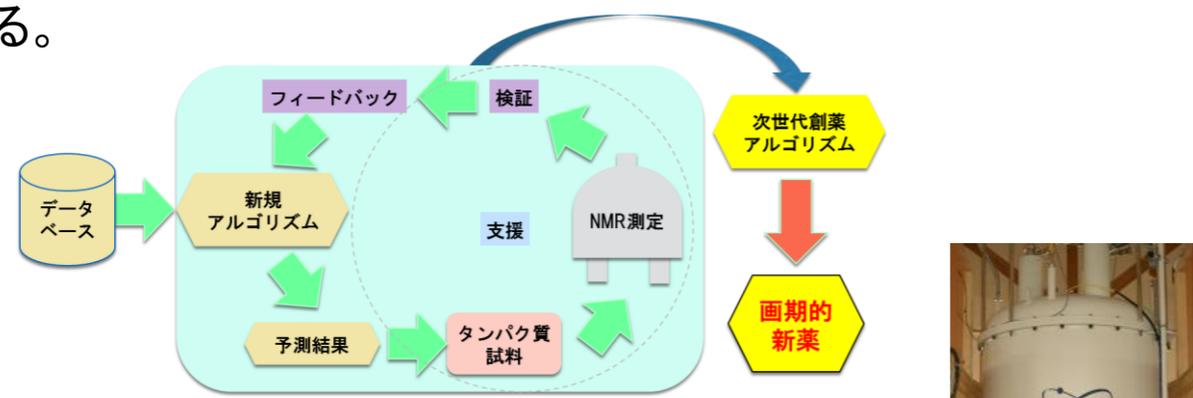
[E-mail] miyanoiri.youhei@h.mbox.nagoya-u.ac.jp

# 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理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

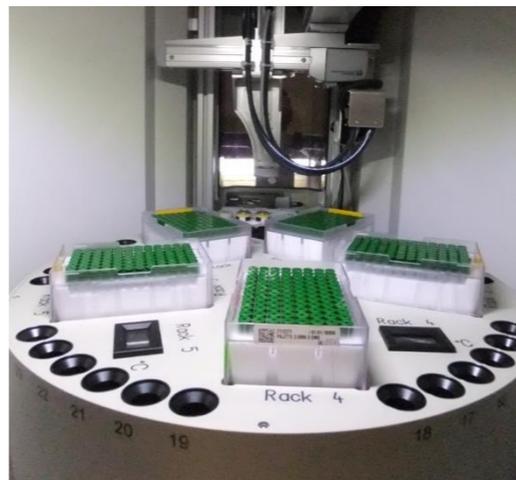
- エピゲノム関連タンパク質のように柔らかくて結晶化が困難な天然変性タンパク質の相互作用部位の同定と認識構造の解明
- 自動測定による標的タンパク質結合化合物の大量スクリーニング
- 世界最高感度950MHz LC-NMRによる代謝化合物の同定
- 900MHz固体NMRによるタンパク質の測定

### 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



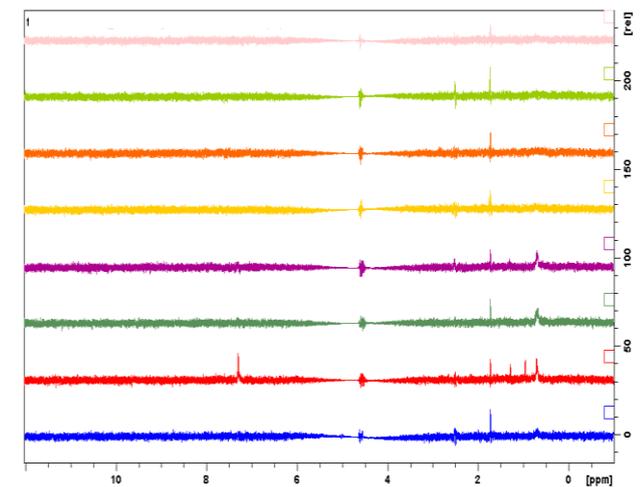
自動測定: 10cm  
の試料管が480本



## [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

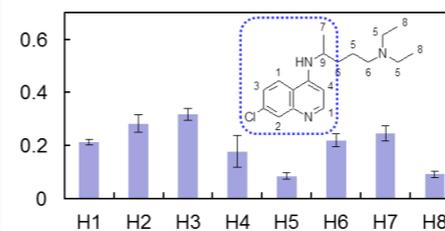
## [技術の概要]

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