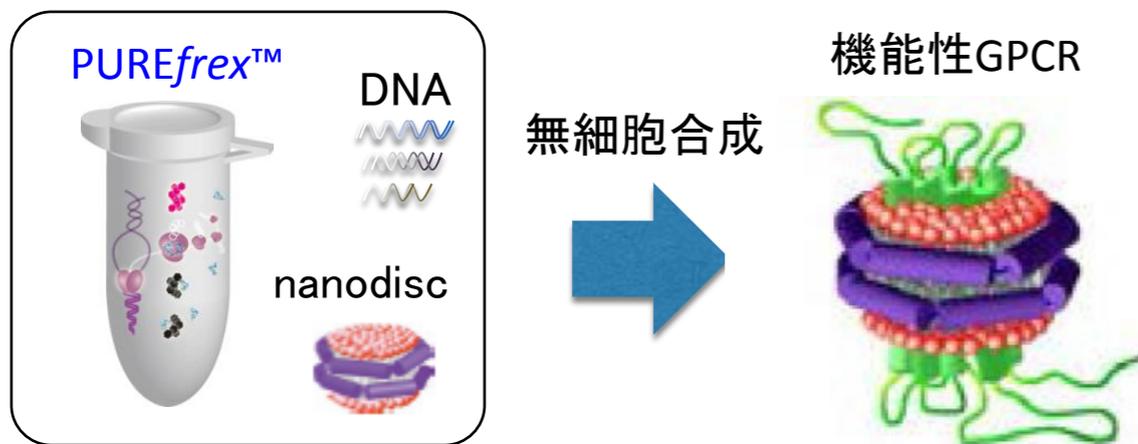


PURE systemの効率化による膜タンパク質合成

[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

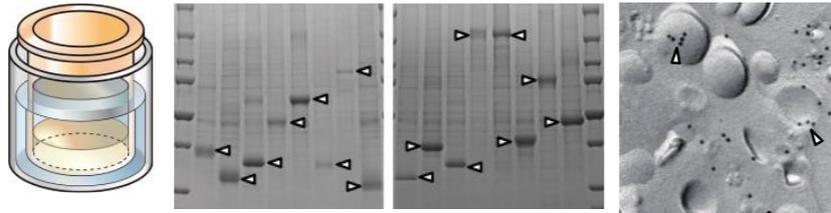
コムギ無細胞合成系による 蛋白質生産支援・高親和抗体構築技術開発

[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。

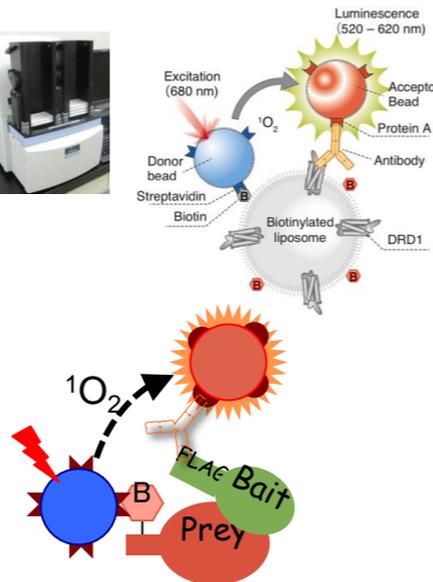
プロテインアレイ

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

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。

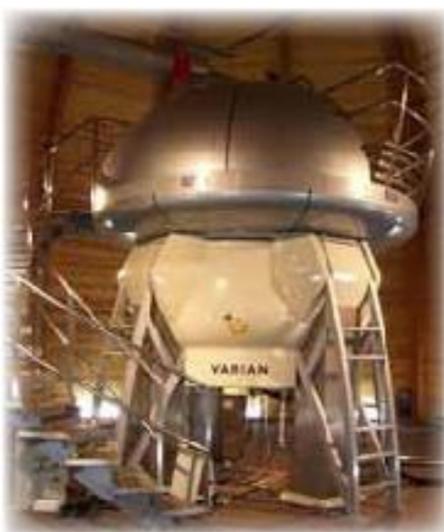
リン酸化などタンパク質修飾とそれに伴う結合変化をリアルタイムに検出する。

支援に供する設備

950MHzNMR

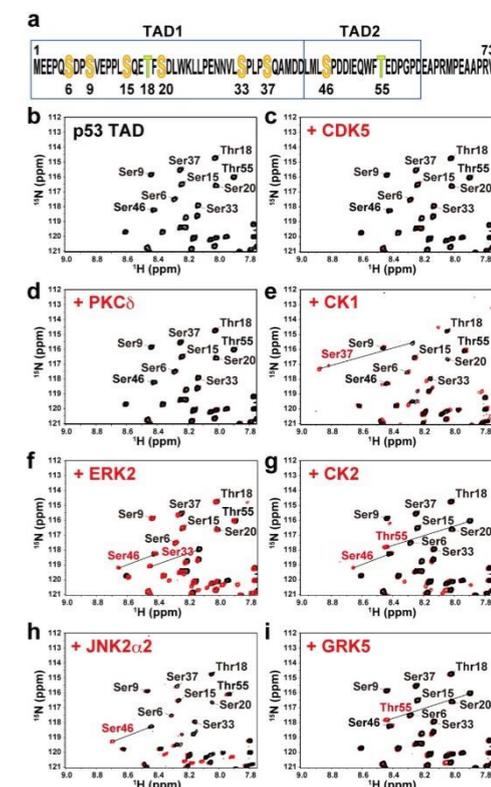
900MHzNMR

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

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

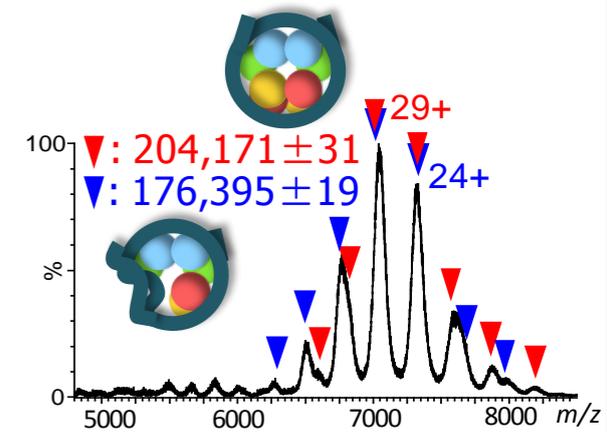
NanoESI-Ion Mobility
Q-TOF MS
(Synapt G2 HDMS、
Waters)



[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

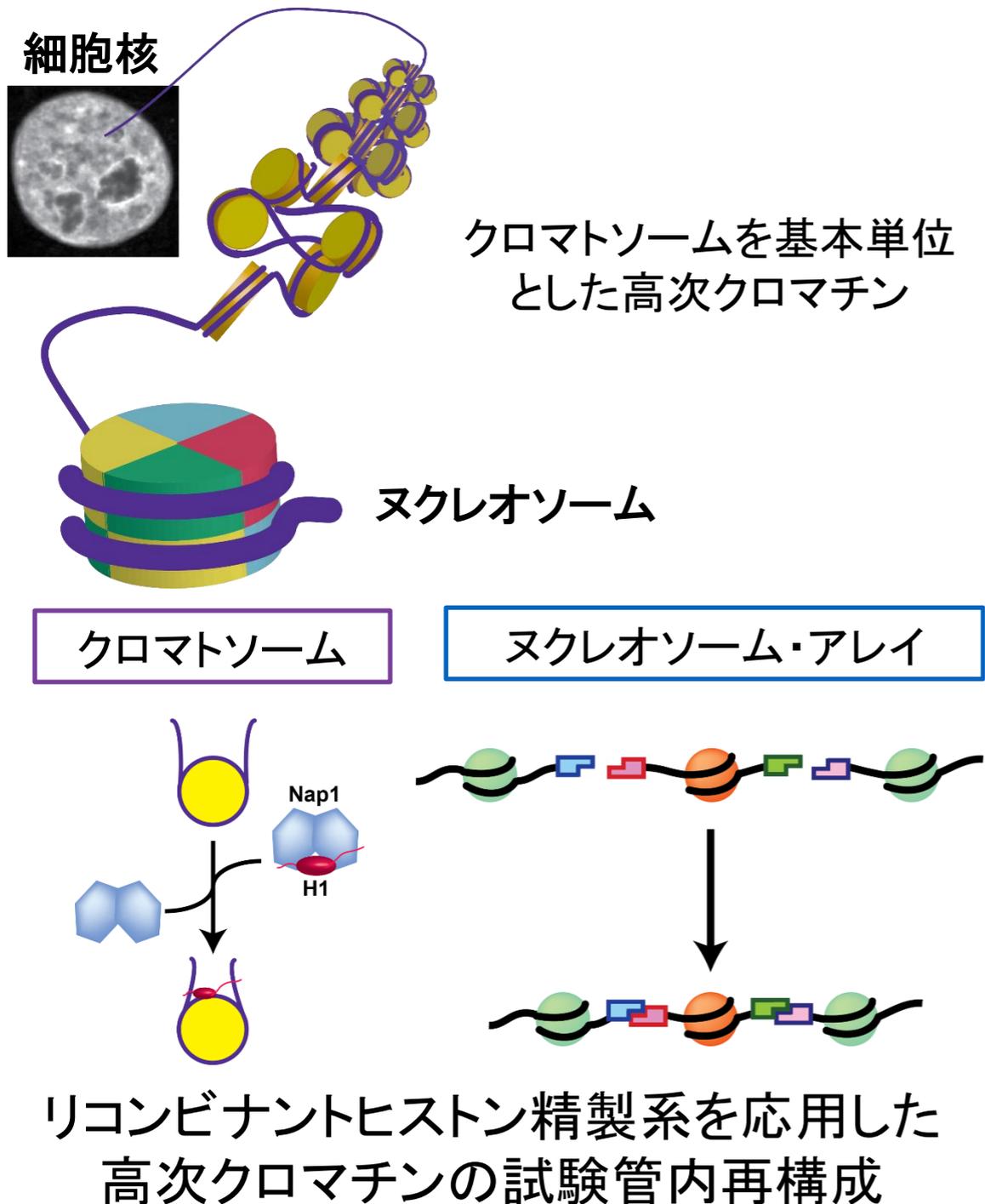
[所属] 横浜市立大学
大学院生命医科学研究科

[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

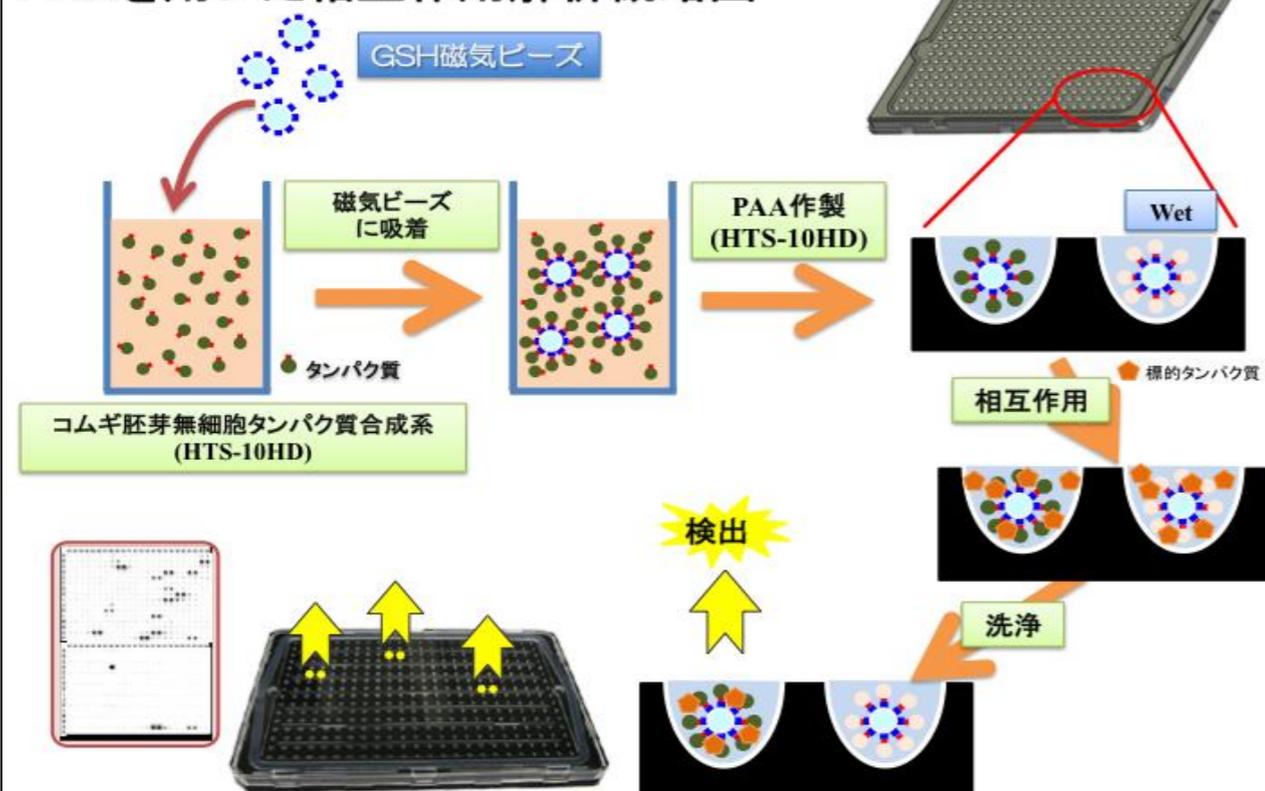
[E-mail] kurumizaka@waseda.jp

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

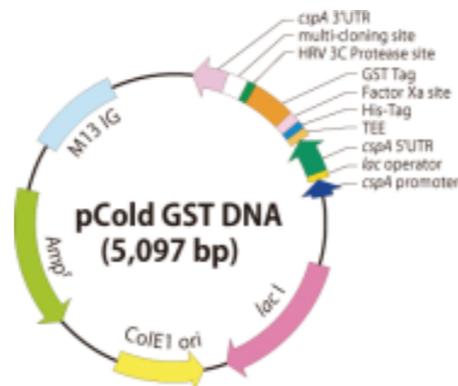
[E-mail] rmorishita@cfsciences.com

NMR試料調製・安定同位体標識・NMR測定

[技術の概要]

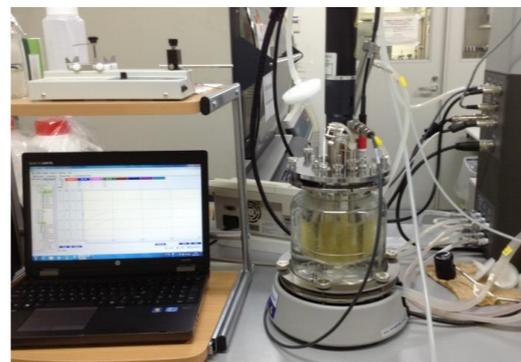
発現ベクターの構築・発現

- ・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

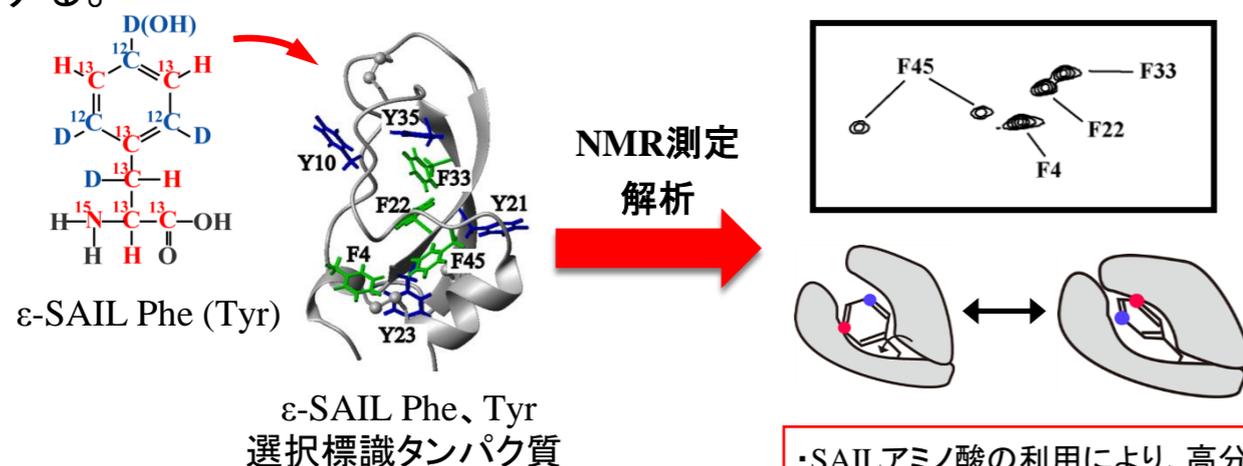
[E-mail] kojima@protein.osaka-u.ac.jp

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

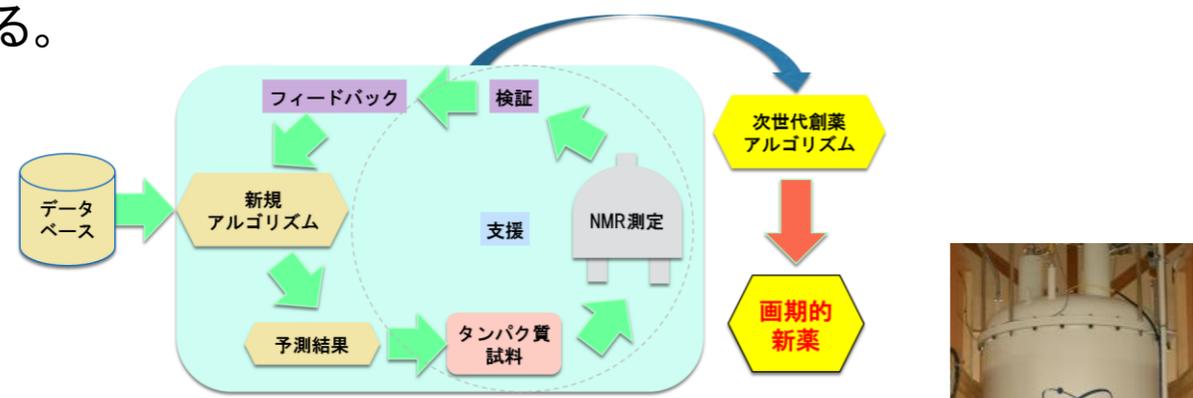
[E-mail] miyanoiri.youhei@h.mbox.nagoya-u.ac.jp

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 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

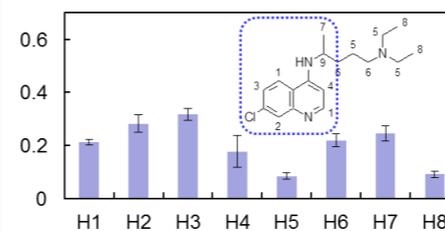
[技術の概要]

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

光を使った化合物スクリーニング技術

[技術の概要]

当機構では様々なアッセイ方法の支援を行っているが、特に吸光、蛍光、発光などの光を利用する多検体高速アッセイ法の支援に実績がある。

各種酵素による基質の変化やルシフェラーゼを用いるレポーター遺伝子アッセイ、タンパク質間相互作用検出、細胞内カルシウム濃度変化測定など用途は多岐にわたる。

特に、糖転移酵素やキナーゼに関し、低コストで行えるアッセイ方法を開発[※]し、技術提供可能である。

※熊谷ら 和光純薬時報、83(2)、14-17 (2015)

利用機器の例:

プレートスタッカー付のプレートリーダー

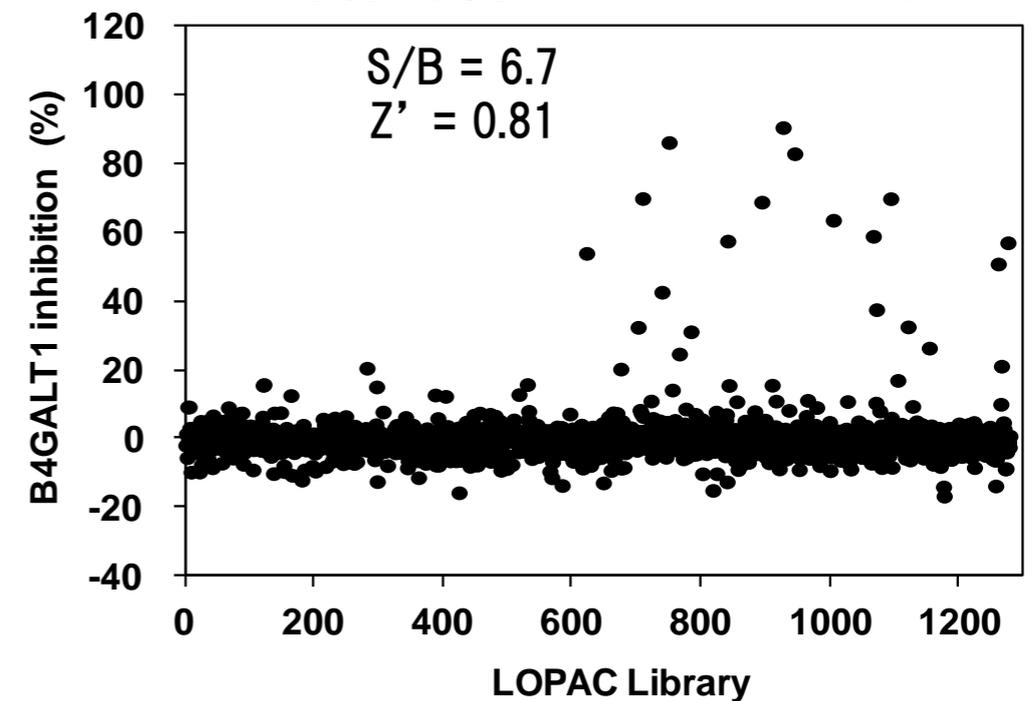
プレートイメージャー (FDSS7000)

細胞イメージャー (ArrayScan VTI)

LabChipシステム (EZ Reader II)

[技術の利用例]

既知薬理活性化合物ライブラリー(LOPAC)を用いた糖転移酵素B4GALT1の蛍光HTS



連絡先

[所属] 東京大学創薬機構

[名前] 小島宏建

化合物ライブラリー

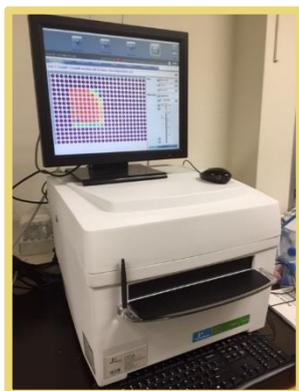
検索

<http://www.ddi.u-tokyo.ac.jp/> をご参照下さい

物理化学的アプローチによる低分子スクリーニング

[技術の概要]

標的とする分子(タンパク質、核酸など)に対するin vitroでの直接的な結合を基にした低分子スクリーニングの技術支援を致します。さらに、物理化学的な指標に基づくヒットバリデーションを実施し、ヒット化合物選抜のための低分子化合物の“質”に関する評価をサポートいたします。



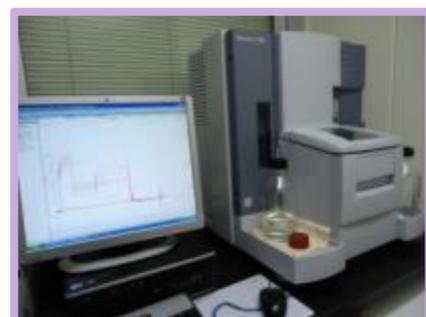
RWG



DSC



ITC



SPR

[技術の利用例]

- フラグメントスクリーニング
- PPIスクリーニング
- ITC、SPRを活用したヒットバリデーション

連絡先

[所属] 東京大学創薬機構

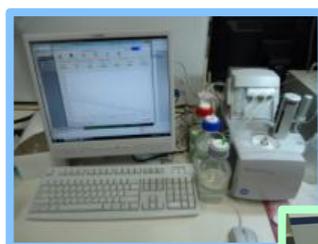
[名前] 津本浩平

[E-mail] tsumoto@bioeng.t.u-tokyo.ac.jp

標的分子と低分子薬剤の物理化学的な結合評価

[技術の概要]

スクリーニングより得られてきたヒット候補化合物、メドケムで最適化中のリード候補化合物などに関して、標的とする分子(タンパク質、核酸など)との物理化学的(ITC、DSCによる熱力学的、SPR、BLIによる速度論的)な結合解析を実施できる技術支援を致します。これより、構造活性相関(SAR)を熱力学的・速度論的な観点から評価することができ、構造情報と組み合わせることにより精密な分子設計の評価と、さらなる親和性向上へつながる提案をサポート致します。



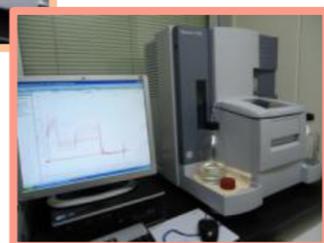
ITC



DSC



BLI



SPR

[技術の利用例]

- 低分子薬剤のITCによる熱力学的な相互作用評価
- 低分子薬剤のDSCによる熱力学的な熱安定性評価
- 低分子薬剤のSPR、BLIによる速度論的な相互作用評価

連絡先

[所属] 東京大学創薬機構

[名前] 津本浩平

[E-mail] tsumoto@bioeng.t.u-tokyo.ac.jp

物理化学測定によるスクリーニング支援

[技術の概要]

物理化学測定 SPR、ITC、DSC、DSF

1. 表面プラズモン共鳴 (SPR) 法は、分子間相互作用をリアルタイムに検出する方法であり化合物と標的タンパク質の結合親和性、結合速度定数、解離速度定数を算出することが可能である
2. 等温滴定型熱量測定 (ITC) は、結合定数に加えて結合に伴う熱力学パラメータを得ることができるため、化合物の結合能の複合的な解析・比較・設計を可能とする。
3. 示差走査型熱量測定 (DSC) では、化合物存在下における標的タンパク質との親和性の有無を変性温度のシフトを基準として判断することが可能である。
4. 示差走査型蛍光定量法 (DSF) は、DSCと同様にタンパク質の変性温度を指標に化合物の親和性を解析するが、より短時間・低サンプル量で可能であるミディアムスルーput解析に利用可能である。



表面プラズモン共鳴
Biacore T200



等温滴定型熱量測定
Auto iTC T200



示差走査型熱量測定
VE-Capillary DSC

測定系構築に関する技術補助

[技術の利用例]

➤ 化合物ライブラリースクリーニング支援

SPRをin silicoスクリーニングと組み合わせ、効率良くスクリーニングを行った。

DSFを1次スクリーニングに用いて、1万化合物の結合能解析を行うと共に、SPRを用いて特異性解析を行った。

➤ 相互作用タンパク質間結合能解析支援

ITCにて誘導体化合物との相互作用解析を行い、親和性、 $\Delta S/\Delta H$ の変化を解析した。

➤ 抗体のキャラクタリゼーション支援

その他、各種アッセイ系の構築支援

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

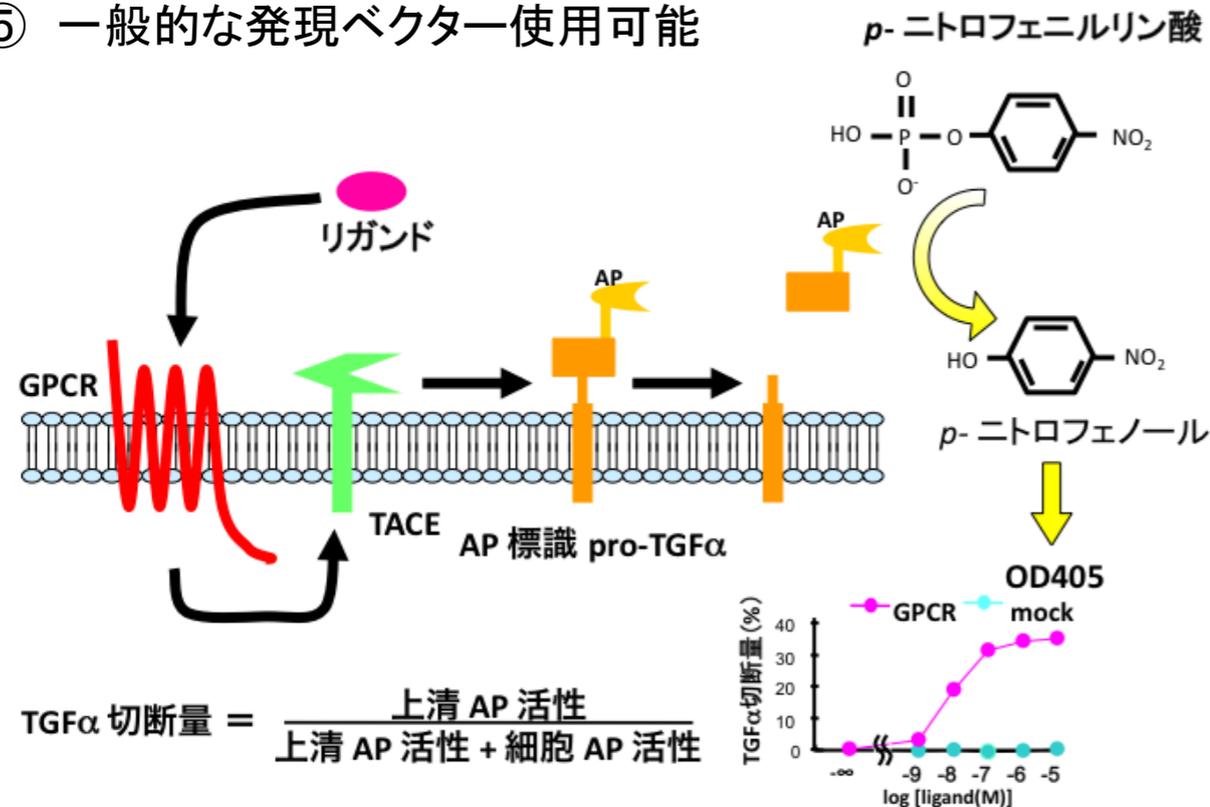
GPCRスクリーニング法 (TGF α 切断assay)

[技術の概要]

TGF α (トランスフォーミング増殖因子 α)

切断活性を指標に広範囲なGPCR活性を評価

- ① リガンド既知GPCRのうち約90%の活性化を検出可能
- ② 一般的なGPCRアッセイでは検出が困難な、
G $\alpha_{12/13}$ シグナルを高感度・高精度で検出できる
- ③ 汎用機器(プレート対応吸光度測定機)と
安価な検出試薬の利用 (約90円/96ウェルプレート)
- ④ HTSに応用可能(384ウェル、自動化アッセイ)
- ⑤ 一般的な発現ベクター使用可能



[技術の利用例]

GPCR のアゴニスト・アンタゴニスト探索

目的受容体発現細胞



化合物ライブラリーのスクリーニング

受容体特異性について同一のアッセイ系で評価
容量反応曲線から既存薬との活性を比較

GPCR のデオーファニング

リガンド未知(オーファン) GPCR発現細胞



生体抽出物、受容体未知リガンド

生理活性物質ライブラリーなどをテスト

連絡先

[所属] 東北大学大学院薬学研究科
分子細胞生化学分野

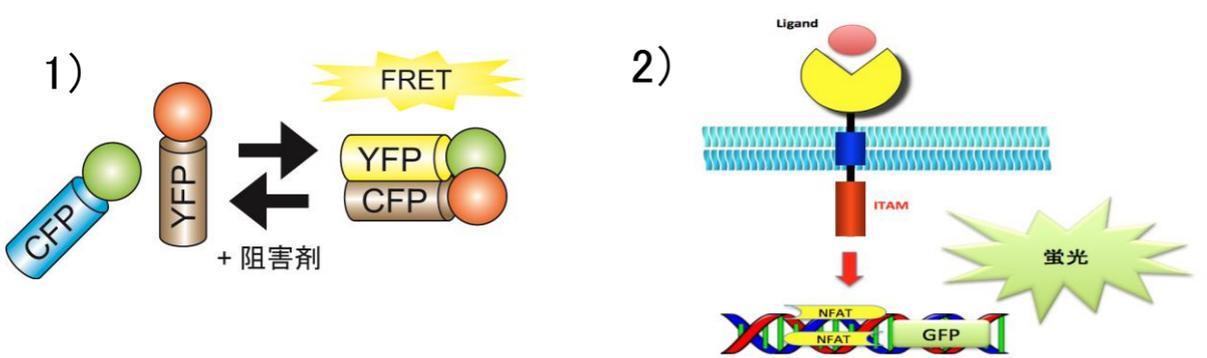
[名前] 青木淳賢

[E-mail] jaoki@m.tohoku.ac.jp

FRETを利用した蛋白質相互作用検出系および 蛍光蛋白質レポーターアッセイ系の開発

[技術の概要]

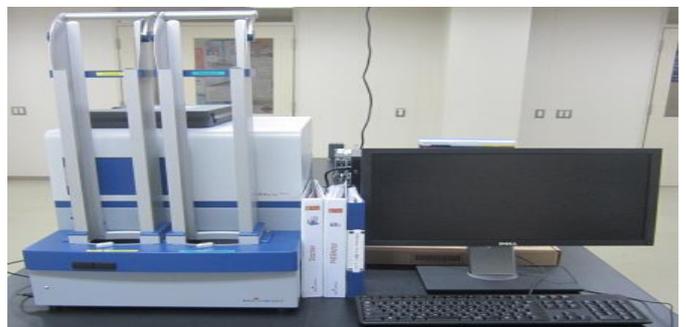
- 1) FRETを利用した蛋白質相互作用検出系の開発
 - ・ 蛍光蛋白質や時間分解蛍光物質標識モノクローナル抗体等を用いて、蛋白質相互作用検出系を作成する。
- 2) 蛍光蛋白質レポーターアッセイ系の開発
 - ・ 各種プロモーター制御下で蛍光蛋白質を発現させるレポーターアッセイを作成する。



使用機器

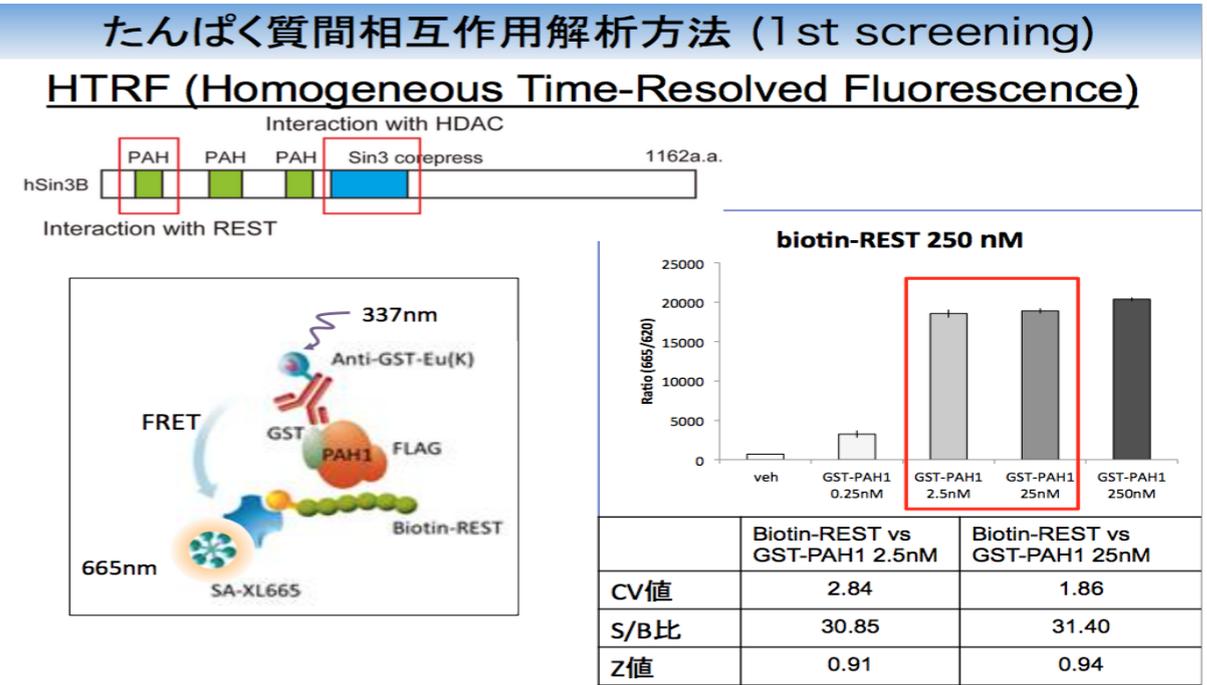
PHERASTAR FS (BMG LABTECH) (左写真)

In Cell Analyzer 2000 (GE Healthcare) (右写真)



[技術の利用例]

時間分解蛍光を用いたTR-FRETによる転写因子-転写共役因子結合阻害剤のHTS系を樹立した。



連絡先

[所属] 長崎大学創薬研究教育センター

[名前] 出口雄一、植田弘師

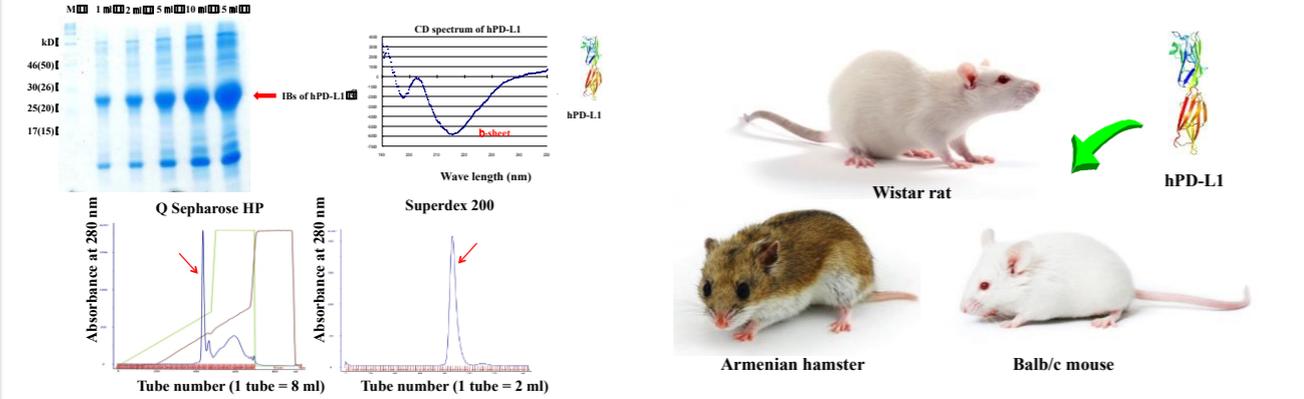
[E-mail] y-deguchi@nagasaki-u.ac.jp
ueda@nagasaki-u.ac.jp

組換え体およびモノクローナル抗体作製 分子間相互作用検出系開発

[技術の概要]

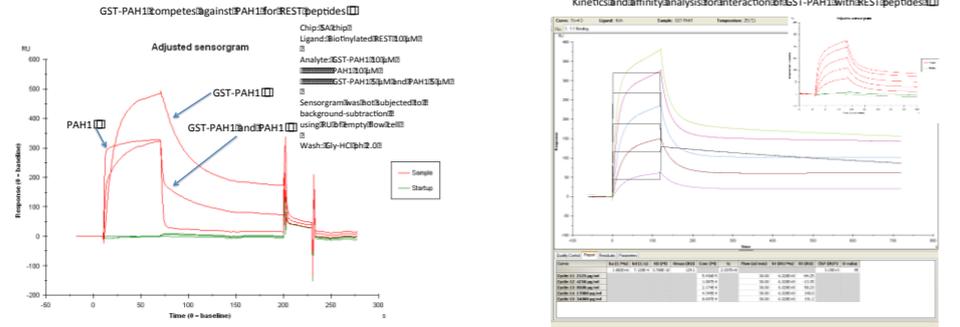
1) 組換え体およびモノクローナル抗体作製

各種宿主を用いた組換え体作製および精製 精製 マウス、ラットおよびヒムスタスを用いたMab作成



2) 分子間相互作用検出系開発

ビアコアT200を用いて、分子間相互作用検出系を樹立し、速度論を用いて親和性を定量



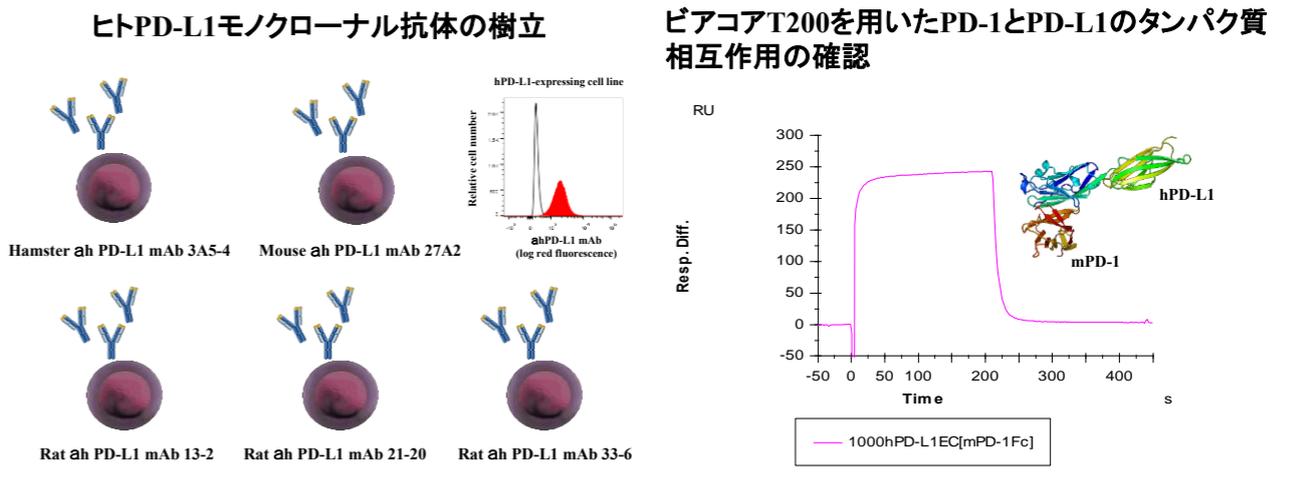
使用機器

AKTA explorer 10S (GE Healthcare) (左写真)
Biacore T200 (GE Healthcare)(右写真)



[技術の利用例]

ビアコアT200を用いて作製した組換え体PD-L1のPD-1への結合能を検証し、組換え体を抗原とし、ヒトPD-L1特異的Mabの樹立に成功した。



連絡先

[所属] 長崎大学創薬研究教育センター
[名前] 米澤 朋、田中義正、植田弘師
[E-mail] yonet@nagasaki-u.ac.jp
ystanaka@nagasaki-u.ac.jp
ueda@nagasaki-u.ac.jp