

## 研究課題別事後評価結果

1. 研究課題名： ゲノム蛋白質の高効率・高精度NMR解析法の開発

2. 研究代表者名及び主たる研究参加者名(研究機関名・職名は研究参加期間終了時点)

研究代表者

甲斐荘 正恒 (首都大学東京 客員教授)

主たる共同研究者

阿久津 秀雄 (大阪大学蛋白質研究所 教授)(平成 13年12月～)

西山 幸三郎 (東海大学開発工学部 教授)(平成 14年 4月～)

3. 研究内容及び成果:

NMR 法は蛋白質の溶液中での精密な立体構造決定法として唯一の手法であり、様々な条件下における立体構造変化や揺らぎの検出を通じて、蛋白質の立体構造と生物機能を直接に関連づける有用な知見をもたらす。しかしながら、立体構造決定法としての NMR はわずか十数年の歴史を持つに過ぎず、大規模な構造・機能ゲノム科学に有効なタンパク質構造情報を取得するための中核的手法として利用するためには、更なる基盤技術開発が不可欠であった。

本研究課題が達成目標とする要素技術は次の 3 項目に集約される:

①立体整列同位体標識(stereo-array isotope labeled: SAIL)アミノ酸の合成法の開発

②無細胞蛋白質合成系を用いた SAIL 蛋白質調製手法の開発

③SAIL 蛋白質の利点を生かした NMR 測定・解析、及び立体構造決定技術の開発

これらは、何れも SAIL 法による蛋白質構造解析技術を次世代世界標準として発信するためには不可欠な要素技術である。平成 13 年から開始した本課題における最大の目標を、幾つかのモデル蛋白質を対象として、構成アミノ酸残基を全て“SAIL アミノ酸”に置換したタンパク質、即ち“SAIL 蛋白質”を調製し、それらを試料として NMR 法により構造決定を行うことにより SAIL 法の基本技術の有効性を実証することにおいた。SAIL 法を用いて立体構造解析を行った“歴史上“最初のタンパク質はカルシウム結合タンパク質として重要なカルモジュリン(calmodulin)であった。本タンパク質は 17.2kDa とそれほど大きな分子量ではないものの、高精度且つ迅速な立体構造決定が SAIL 法により可能であることが明白に示された。さらに、第二のターゲットとして従来の NMR 解析技術によっては精密構造決定が困難な 41kDa の分子量を持つ MBP(マルトース結合タンパク質)を選択し、短時間に残基側鎖の立体配座を含めた精密立体構造決定が可能であることを示した。この結果は Nature 誌に Article として掲載され国際的に大きな反響を呼んだ[Kainosho, M. *et al.*, *Nature*, **440**, 52-57(2006)、 Opella, S.J., *Nature*, **440**, 40(2006); Borman, S., *Chem. & Eng. News*, **84** (March 6), 15(2006)].

以上の研究は主として代表者甲斐荘が率いるグループの総合的な成果であるが、本技術の最大の難関である SAIL アミノ酸の合成法の開発に当たっては東海大学開発工学部西山グループとの密接な共同研究が行われた。同グループは標識アミノ酸の合成に有用な数々の新規反応を開発し、SAIL 法の実現に大きな寄与を果たし、現在においても SAIL 法の実用化に重要な、より経済性の高い合成法の開発に共同研究を継続している。

SAIL 法の展開は従来の NMR 技術の適用が困難とされて来た分子量 25-50kDa 領域の高分子量タンパク質の溶液内構造決定技術の開発に留まらない。膜タンパク質や超分子複合体のような、生物学的、医学的に興味を集められているにも関わらず立体構造の取得が困難な、いわゆる難易度の高いタンパク質へと

拡大することは、本研究の開始当初から重視してきた点である。本課題においては、大阪大学蛋白質研究所の阿久津グループと協力し、SAIL法の固体NMR技術への応用、及び同グループで開発が進んでいるセグメント標識法を組み入れたSAIL法の高分子量タンパク質構造解析への展開に関しても様々な試みを行った。

#### 4. 事後評価結果:

##### 4-1. 外部発表(論文、口頭発表等)、特許、研究を通じての新たな知見の取得等の研究成果の状況

論文数: 国内:21件、海外: 79件; 口頭発表、国内: 78件、海外:101件; 特許、国内: 4件、海外: 7件

特記すべき論文: “Optimal Isotope Labelling for NMR Protein Structure Determinations”, M. Kainosho, T. Torizawa, Y. Iwashita, T. Terauchi, A. M. Ono, and P. Güntert, *Nature*, **440**, 52-57(2006):SAIL法に関する最初の総合的論文

口頭発表: Masatsune Kainosho, “SAILing to Larger Proteins: A Strategy for Optimal Isotope Labeling for Protein NMR Spectroscopy”, Plenary Lecture at The 5th International NCCR Symposium on New Trends in Structural Biology (2006/9/15-16, Zürich, Switzerland)

重要な特許: “Stable isotope-labeled amino acid and method for incorporating same into protein”, Inventor Masatsune Kainosho and Tsutomu Terauchi Assignee: Agency of Industrial Science and Technology, US 7,022,310 B2 (2006/4/4)、Priority 2001/12/19 JP2001286823 and 2002/01/30 JP2002022446:SAIL法の基本的アイデアに関する特許

##### 4-2. 成果の戦略目標・科学技術への貢献

独自性、新規性の高いタンパク質高次構造解析技術の開発に成功したので、世界的に大きな注目を集めている。今後、タンパク質構造解析の世界の標準の手法となるようSAIL法の普及に更なる努力を重ねるものと期待している。

##### 4-3. その他の特記事項

SAIL法の開発は平成8年度から開始された生命活動プログラムにおける課題から連綿と続けられてきた、安定同位体利用NMR技術のいわば究極の成果である。この10年の間、本研究に携わった研究者の中から教授2名(広島大学、立命館大学)、助教授2名(奈良先端大学院大学、北陸先端大学院大学)の指導的立場に立つ研究者が育った。