

3. タンパク3000プロジェクトで行った技術開発

●タンパク生産技術(26件)

カイコ蛹によるタンパク質発現	カイコ蛹を用いた効率的なタンパク質発現。ヒトタンパク質の場合では、大腸菌に比較して高い効率で発現が可能となった。
放線菌利用タンパク質発現系	放射菌を用いたタンパク質発現系。既存の発現系とは異なる生産環境を提供する事で既存の系では生産できないタンパク質の生産も可能となった。
新規タンパク質発現用ベクター	PCRにより遺伝子を取得後、新規開発したPRESAT発現ベクターに組み込む。このベクターは方向性クローニング効率を高めたベクターで、多数のベクター構築が同時進行で可能になるため、可溶性タンパク質の高速選別が可能となる。
菌体外分泌システム	タンパク質サンプルを大量に調製するための発現タンパク質の菌体外分泌系の開発を開発した。これにより大量のサンプルを発現させることが可能となった。
タンパク質合成・精製装置	本装置は、透析無細胞タンパク質合成法によるタンパク質発現と、アフィニティクロマトグラフィーによるタンパク質精製を組み合わせて、多品種の標識サンプルを、mgスケールで同時に調製するものである。
タンパク質多品種発現装置	大腸菌抽出液を用いた無細胞タンパク質合成系は、直鎖状のDNA断片を、クローニングすることなく、タンパク質発現の鑄型として直接利用できる。本装置は、無細胞タンパク質合成反応(バッチ法)と、PCRを用いた鑄型DNA断片の作成・増幅とを組み合わせ、クローニングライブラリーからタンパク質を短時間で発現するプロセスを、一貫して自動で多品種同時に処理する。
大腸菌無細胞タンパク質合成	大腸菌抽出液を用いた無細胞タンパク質合成系により、構造・機能解析などのためのタンパク質サンプルを大量に調製できるようになった。
小麦胚芽無細胞タンパク質合成システム	小麦胚芽抽出液を用いた無細胞タンパク質合成系により、構造解析や医薬品開発のためのタンパク質サンプルを大量に調製できるようになった。
アフリカツメガエル無細胞合成系	アフリカツメガエル細胞を用いた新規無細胞合成系の技術開発により合成困難なタンパク質の合成技術を改良した。
シロウジョウバエ無細胞合成系	シロウジョウバエ細胞を用いた新規無細胞合成系の技術開発により合成困難なタンパク質の合成技術を改良した。
ヒト細胞無細胞合成系	ヒトHeLa細胞を用いた新規無細胞合成系の技術開発(eIF添加など)により合成困難なタンパク質の合成技術を改良した。
膜タンパク質合成技術	大腸菌抽出液を用いた無細胞合成系によるGタンパク質共役受容体(GPCR)の可溶性技術開発。
巨大複合体合成技術	大腸菌抽出液を用いた無細胞合成系により合成し、複合体を得る発現系の基本形を作製。
マイナーコドンtRNA遺伝子高発現化	タンパク質発現の阻害要因となっているマイナーコドンを洗い出し、対応するtRNA分子種を無細胞翻訳系に添加する方法を開発

タンパク質可溶化のための巻き戻し技術	発現タンパク質の不溶化について、合成時に添加することによって可溶化させることのできる物質のスクリーニングとその条件の最適化を行うと共に、これにより可溶・フォールディングさせることのできたサンプルを迅速に判定する評価系の確立により構造解析の可能なサンプルを迅速に得ること
三重標識体(重水素標識導入試料)調製技術	無細胞技術によるNMR試料作成に関して、分子量に応じた最適な標識方法の検討(重水素標識率(50%, 80%, 100%), 13Cなしいは15N標識との組み合わせ, 等)を行い, 標識試料調製ワークフローを確立した。
人工塩基対によるタンパク質への人工コソポ一ネットの部位特異的導入法	転写・翻訳で選択的に機能する人工塩基対を利用して、鑄型DNAから転写・翻訳により非天然型アミノ酸をタンパク質中に部位特異的に導入した試料を作り出すことができる。タンパク質のX線結晶構造解析の重原子置換に応用することが可能
アミノアシルtRNA合成酵素(aaRS)の基質特異性の改変	実用的に使用可能な非天然型アミノ酸のバラエティーを飛躍的に増やすことができる
部位特異的な化学修飾部位を持つタンパク質の大量調製法の開発	非天然型アミノ酸を無細胞タンパク質合成系で生産されるタンパク質に部位特異的に導入するシステムを開発。非天然型アミノ酸を利用する部位特異的な化学修飾によるタンパク質薬効の改善を検証したり糖鎖の付加も人工的に行うことが可能
無細胞合成法を用いた非天然アミノ酸含有タンパク質の大量調製法の開発	アミノアシルtRNA, EF-Tuの利用による高効率アミノアシル化技術開発
メタノール資化性酵母によるタンパク質発現	メタノール資化性酵母を用い、大腸菌などでの発現が困難であったヒト糖タンパク質の大量発現系を構築した。
セレノメチオニン耐性酵母によるタンパク質発現	セレノメチオニンに耐性なメタノール資化性酵母の単離と、同株でのセレノメチオニン含有タンパク質の発現に成功した。
低温菌宿主-ベクター系によるタンパク質生産系の開発	低温菌を宿主として、産業的に有用なタンパク質を効率よく生産するとともに、低温で活性の高い産業用酵素の開発が可能
シャペロン融合による可溶性蛋白質発現法の応用技術の開発	大腸菌で不溶性である超好熱古細菌由来蛋白質をシャペロン融合蛋白質として可溶化させる技術
封入体からの活性型タンパク質再生	大腸菌で真核生物のタンパク質を生産すると多くの場合凝集体を形成する。この凝集体から効率よく活性型タンパク質を再生するシステムを構築し、10種類以上のタンパク質の活性型を得た。
ヒト膜タンパク質の発現系	酵母を宿主として、ヒトの7回膜貫通型受容体タンパク質の高発現に成功した。創薬において重要な基盤技術である。

●結晶化技術(16件)

大規模結晶化ロボット	一日あたり24万条件の結晶化を行える、結晶化・観察ロボットを開発し、数多くのタンパク質結晶を得ている。それまでの世界最高速度は1日13万8千条件。
実験室用結晶化ロボット	実験室レベルの結晶化用分注システムロボットを開発した。従来の結晶化ロボットに比べて、非常に安価で省スペースなものである。
結晶化自動観察装置	結晶化スクリーニングの結果を自動的に観察して記録して記録する実験室用装置。通常の規模の研究室でのニーズに対応するべく、コンパクトで安価な装置を開発した。低温室での結晶化の場合などに特に有効。

結晶評価プレート	結晶が成長したそのままの状態での結晶の回折能を評価できる装置を開発した。これにより、結晶化と回折実験とがリンクし、構造解析のハイスループット化が可能になった。
攪拌法を用いた新しい結晶化法	攪拌による対流制御を用い、従来の静置法では良質の結晶が得られなかったタンパク質で構造解析に適した良質な結晶が得られるようになった。
抗体を用いた結晶化	立体構造を認識する抗体を目的タンパク質に結合させることで、抗体分子で結晶格子の骨格を作って、目的タンパク質の結晶化を成功に導く。結晶化できなかったタンパク質を結晶化できる可能性を高めた。
タンパク質結晶化チップ	タンパク質結晶化のための溶液を予め組み込んであるチップを開発した。ワンタッチでの結晶化実験が可能になる。
結晶ハンドリングロボット	結晶化溶液から結晶を回収ロボット、ビームライン内で液体窒素中に保管された回折装置に自動的に装着するロボットの開発。288個の結晶の連続測定を可能にした。
タンパク質結晶加工技術	紫外線レーザーを使い、自由自在にタンパク質結晶を加工できるようになった。これにより結晶にダメージを与えることなくクラスタ結晶から単結晶を切り出したりすることができるようになった。
全自動タンパク質結晶化・観察システム	タンパク質の構造決定の為に必要な結晶化と成長状況の観察を自動で行う事ができる。72穴の結晶化プレート225枚をバーコードで管理し、プレートごとにpHや沈殿剤、添加剤の濃度条件を変えて結晶化ドロップを作成できる。人手で結晶を作るのに比べて作業効率率が5-10倍高まる。
迅速X線結晶評価装置	X線回折を指標に、結晶の評価を迅速に行う装置。
ロボットシステムによる結晶選択効率の向上技術開発	結晶マウントロボットとビームライン用結晶交換ロボットとの連携技術開発
シールカット装置	結晶化プレートに貼られたシールのうち、タンパク質結晶を取り出すために指定したウエルのシールを切り取る装置。
クライオプロテクト分注装置	沈殿剤と抗凍結剤との混合を行うための分注装置。2種類の容量のシリンジ、デキャパーを搭載しており、様々な種類のクライオプロテクトの作成が可能である。
結晶化プレート自動観察装置	結晶化プレートの各ドロップの画像を自動的に撮影し、画像サーバーに転送する装置。プレートスタッカーを有しているので、連続して20枚の結晶化プレートの画像を取得することができる。
疑似微小重力環境下での結晶化	地上で疑似無重力環境下での多検体結晶化実験を可能にする新型超伝導磁石の開発を進めている。実験回数に限られる宇宙での結晶化実験に取って代わる技術である。

●X線解析技術(26件)

構造ゲノムビームライン一括制御ソフトウェア	構造ゲノムビームライン(SPring-8のBL26B2)の一括制御のためのソフトウェア
構造ゲノムビームライン結晶自動マウントロボット	構造ゲノムビームラインのための結晶自動マウントロボット

構造ゲノムビームライン結晶自動センタリングソフトウェア	構造ゲノムビームラインのための結晶自動センタリングソフトウェア
構造ゲノムビームライン大量サンプル管理システム	サンプルチェンジャーを中心とした大量サンプル管理システムを導入して回折強度測定を自動化することにより、データ収集効率の最大化が可能となった。
自動回折強度データ収集システム	結晶交換ロボットと同様のサンプルトレイを使用したシステムの開発
自動マイクロ光学系開発	偏向磁石ビームライン用高輝度マイクロビーム光学系開発
高速X線検知システム開発	X線検出器の高速化技術開発
ハイスループット放射光ビームライン	データセットあたり10分から30分という世界最高性能のMADビームラインPF-AR NW12とBL5を開発し、タンパク3000個別解析プロジェクト参加チームに30%のビームタイムを供給している。
生体超分子構造解析ビームライン	SPRING-8タンパク質ビームライン(BL44XU)の高度化を行い、超分子複合体に最適化したビームラインとして整備した。600 Åを超える格子定数を持つ結晶の3.5 Å以上の分解能のデータ収集を行った。
次世代2次元検出器 X線HARP	アモルファスセレンのなだれ増幅を用いる次世代2次元X線検出器X線HARPのプロトタイプを開発。高感度、高速で、連続回折実験を可能を示した。
単波長異常分散構造解析システム	Crの特性X線を利用する構造解析システムを開発した。これにより、天然タンパク質のまま、かつ結晶化実験と同じ場所で、構造解析を実施することが可能になった。
タンパク質結晶フリーマウント技術	タンパク質結晶を溶媒フリーで凍結マウントする技術を開発した。これにより、特に長波長X線を利用するデータ収集精度が格段に向上した。
高エネルギーX線でのMAD法	SPRING-8での高エネルギーX線(35KeV程度)を用いて、Xeあるいはヨウ素の異常分散による多波長異常分散法(MAD法)に初めて成功。構造解析できる結晶の可能性を拓げることになった。
X線結晶構造解析用顕微分光装置	X線タンパク質単結晶の可視吸収スペクトルを測定する装置で、結晶中での機能発現機構を理解し、X線結晶構造解析の結果と対応させる事が可能となる。装置の性能は、波長800nm-400nm、OD=3までの範囲になっている。また、測定温度は室温から液体窒素温度まで広い幅広く測定可能な装置である。
結晶構造自動精密化ソフト	結晶構造構造解析で最も時間を要する「構造精密化過程」を自動化するプログラム(Lafire)を作成した。解析のハイスループット化を実現し、全自動構造解析に一歩近づいた。
ab initio構造解析法	ウイルスなどの対称性の高いタンパク質複合体に対して、重原子置換体や既知モデルを必要とせず、ネイティブデータのみの構造解析を可能とする方法論を確立し、構造解析に適用した。
結晶構造解析計算システム	構造解析と立体構造評価の高効率化計算システム開発

結晶凍結技術開発	クライオプロテクトタンク(クライオX、Z)の開発
位相決定技術開発	アミノ酸配列モチーフ検索による結合重原子予測法の開発
自動構造解析の標準スク립ト化	解析過程の自動スク립ト開発技術。重原子スクリーニング条件候補の提示から始まり、重原子データによる位相計算、自動モデル構築、構造精密化までを視野に入れたシステムで、標準化された解析手順を自動スク립ト化した。
構造評価データ自動作成プログラム	論文作成・特許出願に必要な構造評価基礎データの標準化をほぼ完了、解析された構造座標に基づき、主に構造比較と相互作用様式の標準データを自動作成してDBへ格納し、さらにこのデータをもとに論文等に直接利用できる資料を自動作成した。
ミクロン結晶用微小集光ビームライン	2.5GeVのPPリングに短周期アンジュレータを導入し、高輝度集光X線を利用できるミクロン結晶用ビームラインを開発した。また、低エネルギー領域での回折実験に特化したデザインを採用しており、多くの試料で天然結晶試料のみでの構造解析が可能にすることが期待される。
放射光ビームライン用小型回折計	狭小な放射光ビームラインBL-6Aに設置できる小型回折計を開発した。他のハイスループットビームライン(NW12A、BL-5A)と同様の操作性で、それらに迫る性能を持ちながらコンパクトな設計となっており、ビームライン使用方法的簡便化・共同利用を促進した。
BL制御STARSSシステムと統合GUI	TCP/IPをベースとした、コミュニケーションサーバー・クライアント方式を利用した新しい独自のBL制御システム、STARSSシステムを開発した。また、実験操作をGUI上で統合し、各操作間の連携・共通化を図った統合GUIを開発し、既存あるいは新設のビームラインに提供した。
高速ネットワークと統合的データ管理システム	ビームラインや研究室等の各実験拠点間を光ファイバケーブルで結合し、データ転送の高速化、LDAP/NFS/SAMBAを利用した統合的データ管理を実現した。また、放射光サイトにデータ解析用スペースを整備し、オンサイトで迅速構造解析が可能となるシステムを作り上げた。
自動ループセンタリングソフト	画像処理によってループの中心を計算し、自動でループのセンタリングを行うためのソフトウェアの開発を行った

●NMR解析技術(24件)

SAILタンパク質構造解析	SAILタンパク質CaMの構造解析をOliviaとの連携により可能とした。SAILを用いることにより、スペクトル解析の簡略化、構造解析の精度の向上が可能となった。3日程度の解析で構造が決定。
部位特異的同位体標識法	インデインを用いた部位特異的同位体標識法を開発した。これにより従来のNMR法で問題となっていた巨大なタンパク質におけるピークの重なりをなくし、NMR法での分子量の制限を大幅に緩和した。
無精製タンパク質試料のNMR測定	コムギ胚芽無細胞タンパク質発現系を利用して、目的タンパク質のみ、特定のアミノ酸のみの安定同位体標識が可能になった。無精製のままNMR測定できるため大幅な時間短縮を実現した。
NMR法による複合体の構造解析法	NMRを用いた双極子相互作用による複合体の構造解析法の開発を行い、タンパク質複合体の構造解析が迅速かつ容易に行えるようになった。
NMR法による常磁性金属を持つタンパク質の構造解析法	これまでNMRでの構造解析が困難であるとされていた常磁性金属を持つタンパク質の構造解析法の開発を行った。これにより金属タンパク質の構造解析の適用範囲を大きく広げることができた。
樹脂担体固定化NMR法	タンパク質を樹脂担体に固定し、NMR測定を行う技術を開発した。これにより溶解度の低いタンパク質でもNMR測定が行えるようになった。

NMR構造解析ソフトOlivia	NMRスペクトル変換, 帰属, 構造決定を一貫して行うプラットフォームの作製. 自動化を進め, 半自動構造解析を可能とした. 一般に公開している. また産学連携もしている.
NMR構造決定のための統合的解析環境 Kujira	NMRスペクトルデータを柔軟にかつ迅速に解析できるよう, 独自に開発された統合的解析環境である. 主な機能は多くの多次元スペクトルデータの統合的管理とシグナル帰属データの管理, CYANAなどのソフトウェアで計算された立体構造の解析, CYANAなどのソフトウェアで解析されたNOE帰属データの解析である.
構造解析自動化のための技術開発 CYANA	CANDIDアルゴリズムを用いる自動NOESY帰属と構造計算のためのソフトウェア「CYANA」の開発
構造解析自動化のための技術開発 JUBAKO/UNAJU	NOESYデータ解析ソフトウェア「JUBAKO/UNAJU」による自動化技術開発
構造解析自動化のための技術開発	帰属速度迅速化のためのQA法開発
構造解析自動化のための技術開発	帰属精度向上のためのSA法開発
920-930MHz NMR開発	コンソールとHCN3核プローブの開発, RFコイル構成の最適化技術開発, 磁石内層コイル線材における超伝導接続開発などによる超高磁場NMR装置開発
930MHz NMRプローブ	世界最強磁場装置向けの三重共鳴プローブ. TROSY法などの超高磁場向けのパルスプログラムを活用すれば, 30kDa以上の大きなタンパク質の構造解析を容易に実行できる. ????
930MHz超高感度極低温プローブ	世界最強磁場装置向けの超高感度極低温3重共鳴プローブ(タンパク構造解析用)の開発. ラジオ波送受信アンテナを4ケルヒンまで冷却するので, 熱ノイズが減り, 従来の4倍以上の感度を実現できる.
固体NMR法の開発	固体NMR法の安定同位体完全標識タンパク質の信号帰属法や1H間及び31P-1H間距離測定法の開発を行った. 複合体や膜タンパク質などの構造解析に固体NMR法が適用できる可能性を示した.
170NMR測定技術開発	170アミノ酸合成技術開発とアミノ酸の170酸素置換技術開発
タンパク質回収フロー型NMR装置	タンパク質に結合する薬物を網羅的にスクリーニングするための装置で, 化合物と結合した場合は複合体を別に収納し, 結合しない場合はタンパク質化合物を別々に回収再利用する.
高圧NMR法の開発	高圧によりタンパク質の存在状態を変えて測定する技術. アグリゲーションを起こすタンパク質を乖離することも可能.
アミノ酸特異的インバース同位体標識法	15N標識バックグラウンドで, 大腸菌のアミノ酸代謝経路のうち互換なアミノ酸の組合せを利用した, アミノ酸特異的同位体インバース標識法を開発した. これにより困難な試料の解析が容易になる.
新規H/D交換速度測定技術	蛋白質のアミド基の速い時間領域でのH/D交換速度を簡便に測定する方法を開発した. 蛋白質-脂質二重膜などの相互作用部位に応用可能である.

分子内・分子間水素結合の識別法の開発	水素結合をまたがったスピナーピン結合を検出する技術を応用する事で、ホモ多量体中における分子内水素結合と分子間水素結合を区別して識別する方法を開発し、構造決定に活かした。
アミノ基が関与した水素結合を検出する為のパルス系列の開発	励起帯域の広い整形パルスを適切に用いる事で、アミノ基が関与した水素結合を検出する為の単純でアーティファクトが生じないパルス系列を開発し、良好な結果を得た。
露わに水を入れた環境のもとでのディスプレイスジオメトリ計算	露わに水を入れて、高精度のシミュレーションをする環境でディスプレイスジオメトリ計算を行うことで、より高精度の構造解析が可能となった。

●その他(26件)

DNA結合タンパク質同定チップ	二重鎖オリゴDNAチップで二重鎖DNAに結合するタンパク質の塩基配列特異性と結合能を網羅的かつ迅速に同定できるチップである。
HPLCによる糖タンパク質糖鎖プロファイリング	3種類のHPLCデータを用いて糖タンパク質糖鎖のプロファイリングを行う方法を確立し、500種類におよぶ糖鎖のデータベースをウェブアプリケーションGALAXYとして、一般に公開している。
新規プロテオーム技術	ダイヤモンド様炭素基盤を利用したプロテインチップで固定化されたタンパク質と相互作用するタンパク質をMSを利用して同定する。
タンパク質間相互作用分析システム	Affinity Capture法による、タンパク質間相互作用をフェムトモルレベルで検出・同定できる分析システムを構築した。微量なタンパク質間相互作用を網羅的に解析することが可能となった。
マイクロチップ型質量分析装置	ESI質量分析装置にマイクロチップ電気泳動装置を付けごく微量のタンパク質を網羅的選別し同定する。
プロテインエクスポア	分子動力学計算専用LSIの開発・MDGRAPE-3の開発
MALDI型MS	試料/マトリックスの共結晶化条件最適化技術開発
表面プラズモン共鳴技術	タンパク質固定化技術開発、リガンド化合物溶液のロボティクスによる調製・親和性評価技術開発
DPI	エバネッセント光を利用したDPIによる膜タンパク質分子間相互作用解析技術開発
分子間相互作用探索のための蛍光相関分光法開発	DNA-タンパク質相互作用探索のための技術開発
インシリコスクリーニング	高速汎用分子比較法の開発と実用化、及び、同法の適用に基づくプロテオーム規模親和性フィンガープリンティング技術の開発を行うことで、従来困難であったプロテオーム規模での合理的親和性評価、すなわち特異性の合理的推定を通じて、タンパク質立体構造網羅的決定の成果をより効果的に創薬へ応用することに貢献する。

動物細胞内における非天然型アミノ酸導入法の開発と利用	これまでにタンパク質どうしを架橋するための“クロスリンカー”を剛鎖に持つ非天然型アミノ酸を、動物細胞内でタンパク質に部位特異的に導入し、相互作用するタンパク質どうしをin vivoでクロスリンクするシステムの開発に成功した。今後の技術展開とともに、タンパク質の機能や挙動を細胞内・個体内で観察・解析することが可能になり、機能未知タンパク質の機能解明も含めて、タンパク質研究の進展に大きく寄与する。
動物培養細胞におけるRNAi法の導入技術開発	培養細胞中での特定タンパク質発現を抑制するための技術開発
蛍光標識導入技術開発	無細胞合成系における人工塩基対によるRNA中の部位特異的蛍光標識技術開発
RNAアプタマーの高機能化技術開発	RNAアプタマーに人工コンポーネントを導入し、高機能化を図るための技術開発
ドメイン領域予測システム開発	アミノ酸組成統計解析やニューラルネットワーク予測法、タンパク質表面領域間類似性の高速検出システム開発などで構成された予測システム開発
機能未知タンパク質スクリーニング技術開発	96ウェルフォーマットによる微小管重合法やアポトーシス解析法の開発
効率的なタンパク質リン酸化修飾手法の開発	ドメインを利用してキナーゼと標的タンパク質を空間的に近接させることにより、大腸菌内でリン酸化効率を飛躍的に向上させ
二次構造ブレーカー予測プログラムの開発	結晶化の困難な試料について、そのドメイン単位での結晶化を支援するための、計算による二次構造ブレーカー予測プログラムを開発。
味覚修飾タンパク質の人工生産	酸っぱい物を甘く感じさせる植物タンパク質クルクリンの活性フォームの同定と人工生産技術の開発。糖尿病患者やダイエットなどのニーズに応える新しい甘味料の開発などへの応用が期待されている。
機能未知転写因子の制御標的遺伝子の探索法 (genomic SELEX法)	ゲノムDNA断片ライブラリーを利用してDNA結合転写因子の認識配列を探索する方法
プロモーター強度測定ベクターの開発	蛍光蛋白GFPとRFPの発現を試験プロモーターと標準プロモーターで制御し、GFP/RFP比で試験プロモーターの強度を正確に測定するベクターの開発
プロモーターチップの開発	転写因子機能同定の目的で利用する大腸菌全プロモーターをスポットしたチップの開発
細菌細胞の新規分画法の開発	パーコール密度勾配遠心法を利用した増殖相の異なる細菌細胞の分画法の開発
細菌単一細胞のプロモーター活性の測定法の開発	細菌液体培養の一部を固化しゲル中に捕捉された一細胞中のプロモーター活性の変動を長期に亘って観察するシステムの開発
HisTag ビーズ上に結合した酵素を用いた反応系の開発	同一バツプアール中で順次反応を行うことを目指した、HisTag ビーズに結合させた酵素を用いた反応系の開発