

4-2 タンパク3000プロジェクト

タンパク3000プロジェクトは、産官学の最適な研究機関によって国家的・社会的課題に対応した研究開発プロジェクトに重点的に取り組む「新世紀重点研究創生プラン（RR2002）」の一環として、文部科学省が2002年度から2006年度まで実施した構造ゲノム科学プロジェクトである。世界最先端設備（大型放射光施設、NMR等）を駆使して、我が国の研究機関の総力を結集して約3000種のタンパク質の立体構造及びその機能を解析するとともに、成果の特許化まで視野に入れた研究開発を推進してきた。

タンパク3000プロジェクトは、大学等により実施されている個別的解析プログラムと、理化学研究所にて実施されている網羅的解析プログラムから構成される。2007年3月のプロジェクト終了までに、目標の3000種類を超えるタンパク質の立体構造が決定された。また、その過程でたくさんのタンパク質の構造を一気に解析する基盤が構築された。例えば、高効率のタンパク質結晶化を可能にする自動結晶化・観察ロボットシステム、SPRING-8の構造ゲノムビームラインBL26B1/B2における自動結晶回折データ測定システム、結晶学の知識がなくても正しい手順で解析できる自動構造解析ソフトウェアシステムなどが挙げられる。また、従来の発現系では調製が難しかったタンパク質を調製するための無細胞タンパク質合成技術、変異導入によるタンパク質結晶の性質改善技術、ゼオライトを用いた結晶化制御技術など、より解

析の難しいタンパク質の構造解析のための要素技術も開発された。これらの要素技術は、広い分野でのタンパク質試料を用いた今後のナノテクノロジー発展の基盤構築に貢献している。さらに、これらはタンパク質立体構造解析の新技術であるXFELと結晶構造解析との相補的發展を可能にすると期待される。

ここでは本プロジェクトの委託を受けた理化学研究所構造プロテオミクス研究推進本部 (RSGI: RIKEN Structural Genomics/Proteomics Initiative) が進める、播磨研究所放射光科学総合研究センターでの2006年度の活動を報告するとともに、タンパク3000プロジェクトに続く新たなプロジェクトの動きを紹介する。

1. 放射光システム生物学研究グループ

当グループはタンパク質を始めとする生体分子の立体構造を基にして、一つの細胞全体の生命現象を、原子レベル（物理化学的レベル）で理解することを目指している「高度好熱菌丸ごと一匹プロジェクト」を推進している。その目的に最も適したモデル生物として、「遺伝子操作系が存在する生物の中で、最も高温で生息する」という2つの条件を満たす高度好熱菌 *Thermus thermophilus* HB8 を選んだ。

その研究は図2に示す4段階で進行すると考えられる。
第1段階：ゲノムワイドなタンパク質の立体構造解析

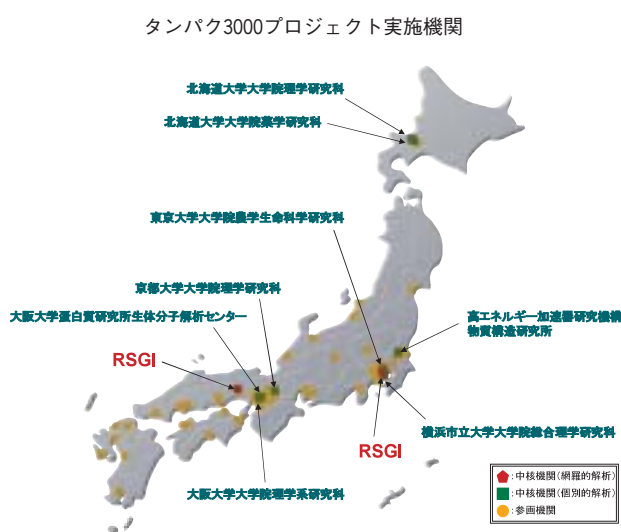


图1



図2 高度好熱菌丸ごと一匹プロジェクト

第2段階：ゲノムワイドなタンパク質の分子機能解析

第3段階：各細胞内システムの各論的個別解析

第4段階：予測可能なレベルのシステム生物学（シミュレーション）

これまでの、第1段階に重点を置きつつ、第2段階や第3段階の一部を進めてきたが、タンパク3000プロジェクトからの部分的なサポートにより、第1段階が加速された。このようにして、高度好熱菌でシステム生物学の学問基盤が整備でき、シミュレーションが生命現象の単なる説明ではなく、生命現象を予測できる段階に達するとすれば、「我々人類は、生命現象を理解できた」と言える時代に近づく。ヒトなどの場合には、さらに、組織レベル、個体レベルでの理解が必要となるが、高度好熱菌研究を利用した学問基盤の整備によって、ヒトの病気の治療や予防も大きく様変わりすると期待される。

これまでに、約360種類のタンパク質の立体構造が解析済みである。我々のグループ以外の106種類と合わせると、約470種類のタンパク質の立体構造が解析されたことになる。これは全タンパク質の21%に相当し、高度好熱菌のプロジェクトが始まって数年間で、大腸菌に対する解析率20%を抜いて、タンパク質の立体構造解析の割合が最も高い生物になりつつある。さらに、高度好熱菌の場合には、これに加えて3Å以上の良質なX線回折データが得られているタンパク質が現時点で100種類以上存在するので、本高度好熱菌が世界で最

もタンパク質の立体構造解析がなされ、細胞全体の生命現象を、分子の立体構造に基づいて理解できるモデル生物として位置づけることができる。

生命現象を実現しているタンパク質という分子の構造解析が一気に進んだことにより、化学や物理あるいは数学といった異分野の研究者が生命現象を研究対象にしやすいになった。これから新しい生命科学が始まると期待される。高度好熱菌の約2200種類のタンパク質のうち約21%の構造解析が完了した。我々はその構造がわかったタンパク質や精製したタンパク質をもとに、DNAを修復するシステム、転写翻訳システム、酸化ストレスからの防御システムなどの仕組みの研究を進めていく。高度好熱菌には他にも200種類くらいのシステムがある。我々はまずこれら3種類のシステムを解明して方法論のモデルを示したい。また、高度好熱菌のタンパク質の3割の機能はまだ解明されておらず、そのうち約500種類がさまざまな生物に共通する特に重要なタンパク質だと考えられる。これら500種類の構造と機能を解析するプロジェクトも今後検討したい。

2. 先端タンパク質結晶学研究グループ

当研究グループでは、タンパク3000プロジェクトの一環として、タンパク質結晶構造解析を手段として用いた研究及び基盤技術開発を行った。さらに開発した基盤技術を組み込んだ構造解析パイプラインを構築運用し、解析未経験者による効率的な構造決定プロセスについて標準化を完成した。また、得られた結晶構造をもとにタンパク質の会合や耐熱化について構造ゲノム的研究を行った。構造解析の基盤開発として、2006年度では、前年度までに開発した構造解析支援ソフトウェア（自動解析システム・構造評価システム・重原子検索システム）をさらに高度化するとともに、より解析困難なタンパク質（難解析性タンパク質）に対応するための新しい結晶化システムの開発を進めた。また、難解析性タンパク質の構造解析のための要素技術開発として、変異導入によるタンパク質の性質（試料安定性・結晶品質）改変技術の開発、合成ゼオライトを結晶化触媒として用いたタンパク質結晶化制御技術の開発（図3）、キャピラリーによる非接触X線回折能



図3 合成ゼオライトを用いたタンパク質結晶化の制御技術

評価技術の開発を行った。このうち変異導入によるタンパク質結晶の品質改善技術の開発では、2種類のモデルタンパク質を使って網羅的な変異導入と結晶構造解析を行い、明らかに分解能の改善した変異体（図4）や重原子の導入に成功した例を含む構造データを多数得た。

結晶性鉱物である合成ゼオライトを結晶化触媒として添加することで高分解能のタンパク質結晶を得ることが可能である（左：通常条件で得られる結晶 右：ゼオライト添加で得られる高分解能結晶）。どちらも同一タンパク質をゼオライト添加以外同一の条件で結晶化している。右図で黒く見えているものがゼオライトで、その表面から透明なタンパク質結晶が成長している。

結晶パッキングに関わるアミノ酸残基への変異導入により結晶の分解能改善が可能である（図4左：野生型2.1Å 分解能 右：T146R変異体1.6Å 分解能）。どちらも大局的に同一のパッキング様式を持つ結晶で、変異を導入した結晶パッキング部位を同じ方向から見ている。原子の位置を示すかご状の電子密度が変異体でよりはっきり見えている。

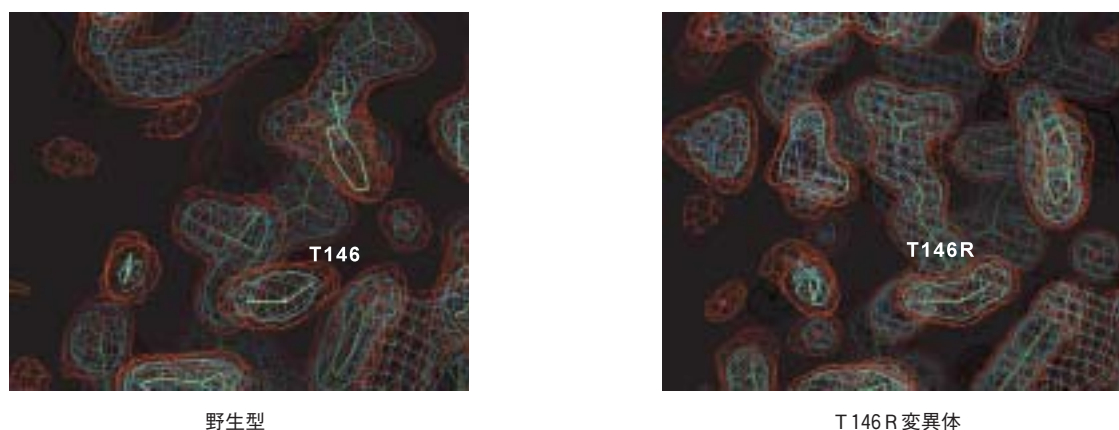
今後はこれらタンパク質3000で開発した基盤技術や構造データを生かし、将来的に以下の3つのブレークスルーにつなげ

ることで膜タンパク質や超分子複合体を含む難解析性タンパク質の構造決定に取り組みたい。1. 変異導入によるタンパク質結晶工学の確立、2. 網羅的な変異導入の結晶構造データベースを利用したバイオインフォマティクスの展開、3. X線自由電子レーザー（XFEL）との組み合わせによるXFELと結晶構造解析の相補的発展。また、プロジェクトで得られた実験データを統合データベースとしてまとめ、世界の研究者の共有財産として社会還元を図ることも検討している。

3. 研究技術開発室

SPring-8では、3本の共用ビームライン（大学等の個別的解析プログラム）と2本の理研ビームライン（理研の網羅的解析プログラム）を含めた合計5本の構造生物学ビームラインでの利用支援を行い、タンパク質3000プロジェクトの結晶構造解析成果に貢献した。当研究技術開発室は、理研ビームラインの自動化や利用支援により網羅的解析プログラムの開発に貢献している。

理研構造ゲノムビームライン（SPring-8 BL26B1 & BL26B2）ではビームライン制御ソフトウェアBSS（Beamline Scheduling Software）やサンプルチェンジャー SPACE（SPring-8 Precise Automatic Cryo-sample Exchanger）等、回折データ収集の



野生型

T146R変異体

図4 変異導入によるタンパク質結晶の改善技術

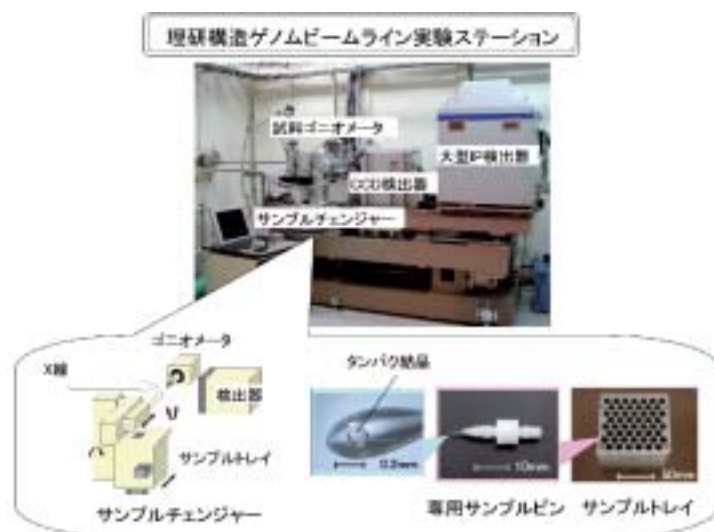


図5 理研構造ゲノムビームライン実験ステーションおよび自動サンプルチェンジャー

自動化及び迅速化を実現するための研究開発を行ってきた（図5）。これらの開発の結果、2003年10月より、BL26B2においてビームラインの自動運転が可能となった。さらに、ビームラインでの回折データ収集の効率化を図るため、インターネットを介して実験条件や測定データなどのやりとりを行うデータベースD-Cha（Database for Crystallography with Home-lab Arrangements）を開発した。BL26B2ではSPRing-8サイト外（主に理研横浜研究所）から宅配便で送付されたサンプルを受け付け、ビームラインオペレータがユーザに代わって実験を行う「メールインデータ収集」を開始している。ユーザは、専用サンプルトレイに凍結タンパク結晶をマウントしてビームラインに送付する。「メールインデータ収集」では、持ち込まれた全ての結晶についてビームラインでの結晶評価を昼間に行い、良質な結晶のみを選択して夜間に自動データ収集を行う。また、ユーザは、D-Chaが提供するユーザーインターフェースを利用して、インターネットを介して結晶評価の実験スケジュール登録、評価データの閲覧、自動データ収集のスケジュール登録、測定データのダウンロードを行うことができる。本システムによりビームラインに送付された全ての結晶をあらかじめスクリーニングすることにより、良質な結晶のみを選別した効率的な実験計画を立てることができる。これらのシステムは、研究室にいなからSPRing-8でのビームライン実験を可能にした。

本年度BL26B2では、137日間の運転期間中、3,500あまりの結晶試料を受け入れ、1日当たり最大79個の結晶を昼間のうちにスクリーニングし、夜間の自動運転では最大18個の結晶に対するデータ収集を行った。BL26B2における2006年度の運転実績を表1にまとめる。

さらに、次期プロジェクトでは重要な生命現象や疾病等に関わるタンパク質の高難度の立体構造解析が求められるが、これらの難解析タンパク質からは10ミクロン以下の微小結晶しか得られないことが多い。そこで、当開発室は「タンパク質解析要素技術開発プロジェクト」において、10ミクロン以下の微小結晶構造解析に最適化したマイクロビームビームラインの研究開発を進めている。

理化学研究所 構造プロテオミクス研究推進本部 副本部長
理化学研究所 播磨研究所 放射光科学総合研究センター
グループディレクター
横山 茂之

表1 2006年度 BL26B2自動運転実績

運転期間	137日
サンプル数（スクリーニング）	3,531（平均 26 samples/daytime、最大79 samples）
スクリーニング平均時間	6 min/sample
サンプル数（データ収集）	682（平均8.3 data sets/night、最大18 data sets）