

独立行政法人**科学技術振興機構**
創造科学技術推進事業
追跡評価用資料
(追跡調査報告書)

横山情報分子プロジェクト(1996～2001)

総括責任者 横山 茂之

目次

1. はじめに	1
2. 研究成果の継続の状況	
2.1 プロジェクトのねらいとプロジェクト期間中の成果	
2.1.1 有機化学による新規非天然型(人工)情報分子の合成	3
2.1.2 構造生物学に基づく論理的な分子設計とエンジニアリング	4
2.1.3 進化分子工学による新規な分子認識特異性を有する情報分子の創製	6
2.1.4 遺伝情報と細胞情報を組み合わせたシステムの設計	6
2.2 研究期間終了後、研究はどのような形で基礎的研究として継続・発展したか	
2.2.1 非天然型核酸塩基対創製の展開	6
2.2.2 非天然型アミノ酸を特異的に取り込むアミノアシル tRNA 合成酵素の創製とその応用	7
2.2.3 種々の機能性 RNA 分子の創製の展開	8
2.2.4 ErbB receptor family の機能構造の解析からの展開	8
3. 研究成果から生み出された科学技術的、社会的及び経済的な効果・効用及び波及効果について	
3.1 科学技術の進歩に貢献する成果	
3.1.1 学術上の新発見	9
3.1.2 新領域・潮流の創出	9
3.1.3 世界のトップレベルの研究	11
3.2 プロジェクトの成果はプロジェクト終了後、応用に向けて発展したか	
3.2.1 技術の実証・再現ならびに応用に向けての体系化	12
3.2.2 革新的技術の開発とその応用展開	13
3.2.3 機能性 RNA 分子の創製	13
3.2.4 ベンチャー企業設立	14
3.2.5 企業との共同研究	14
3.3 人材育成の面から参加研究者の活動状況はどうか	
3.3.1 参加研究者の動向	14
3.3.2 ERATO プロジェクトが総括責任者の研究活動に与えたインパクト	15
4. 引用論文及び特許	
4.1 論文リスト	17
4.2 特許リスト	21

1. はじめに

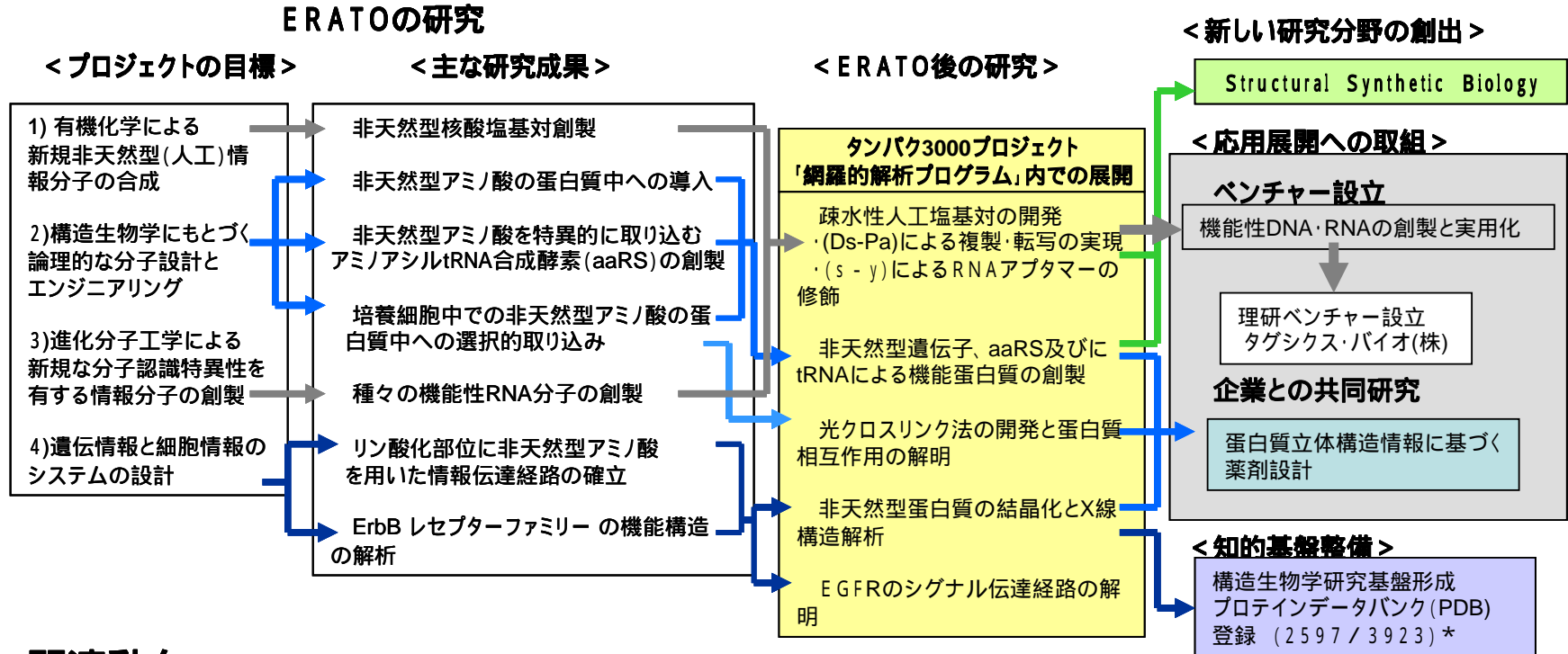
新しい科学技術の流れをつくる基礎研究として発足した創造科学技術推進事業(ERATO)のひとつのプロジェクトとして、横山情報分子プロジェクトは1996年10月から2001年9月まで研究を実施した。様々な生命現象は、核酸(主にDNA)や蛋白質などの分子が担っている情報が処理される過程と考えられる。DNAの遺伝情報が細胞内で、mRNAに転写された後、tRNAを介して翻訳され蛋白質が作り上げられる過程や、成長因子などの細胞外からの刺激(シグナル)が、細胞表面のレセプターを通じて細胞内へ伝達されて、細胞応答が誘導されたりする過程は典型的な例としてあげられる。

本プロジェクトでは、核酸や蛋白質などの情報処理が分子の高次構造変化を起点に引き起こされていることに着目し、生体分子の立体構造を人為的に改変して、生体における情報処理の分子機構の手掛かりを得るとともに、新たな人工分子群による情報伝達の可能性をねらった。ここでは細胞内で遺伝情報担う分子DNAと、mRNAやtRNAなどの核酸および関連の蛋白質で遺伝情報を処理する分子を「遺伝情報分子」と定義し、細胞外から細胞へシグナル伝える経路に関わる分子を「細胞情報分子」と定義した。この両分子を合わせて「情報分子」と定義し、新たな情報分子の人工的な設計・合成を試みた。この試みにより、蛋白質工学研究への道筋を切り開くとともに、生体物質とは異なる分子を用いて、情報伝達の仕組みの解明も手がけた。

本プロジェクト終了と同時期にヒトの全遺伝情報が解明され、時代は遺伝子主体のゲノム研究から蛋白質全体を捉えるプロテオーム研究に移行しつつあった。そんな中で、本プロジェクトの研究成果は蛋白質の構造や機能の解明をする素材あるいは要素技術としての役割を担うことになった。

横山情報分子プロジェクトの展開状況

1996 . 10 ← ERATOの研究 → 2001 . 9 2002 . 4 → 2007 . 3



関連動向

← 2001 . 1 2002 . 4 2007 . 4 →

ヒトゲノム・ドラフト塩基配列表(2001.2)

文部科学省「タンパク3000プロジェクト」発足(2002.4)
「網羅的解析プログラム」理研
「個別的解析プログラム」東大、北大、横浜市大、高エネ研、京大、阪大、

文部科学省
「ターゲットタンパク研究プロジェクト」
発足(2007.4)

* 2007年3月末

2. 研究成果の継続の状況

2.1 プロジェクトのねらいとプロジェクト期間中の成果

本プロジェクトは新しい人工の情報処理システムを構築するために、

- 1) 有機化学による新規の非天然型情報分子の合成
- 2) 構造生物学に基づく論理的な分子設計とエンジニアリング
- 3) 進化分子工学による新規な分子認識特異性を有する情報分子の創製
- 4) 遺伝情報と細胞情報を組み合わせたシステムの設計

を基本方針として、遺伝情報分子グループ、細胞情報分子グループの2グループを構成し、研究を実施した。プロジェクト期間中、両グループの共同体制が充実し、下記の注目すべき研究成果を挙げた。

- (1) 非天然型核酸塩基対創製の実現
- (2) 試験管内転写-翻訳システムによる非天然型アミノ酸の蛋白質中への導入
- (3) 非天然型アミノ酸を特異的に取り込むアミノアシル tRNA 合成酵素の創製
- (4) 培養細胞中での非天然型アミノ酸の蛋白質中への選択的取り込み
- (5) 種々の機能性 RNA 分子の創製
- (6) リン酸化部位に非天然型アミノ酸を用いた情報伝達経路の確立
- (7) ErbB receptor family の機能構造の解析

2.1.1 有機化学による新規非天然型(人工)情報分子の合成

研究成果の(1)非天然型核酸塩基対創製の実現において、核酸合成酵素によって選択的に認識される新規塩基対(x-y)が創製された。さらにこのDNAを用いたRNA合成酵素の転写反応により、xに相補的なyが取り込まれたRNAが合成された(論文リストNo. 8、9)。また、この新規塩基対(x-y)に比べて、RNAへの取り込み効率の良い更なる新規塩基対(s-y)の合成にも成功し、当初の目標である新規人工情報分子の合成を達成した(x: 2-amino-6-dimethyl amino purine、y: pyridin-2-one、s: 2-amino-6-(2-thienyl)purine) (論文リストNo. 15)。

図1は新規塩基対の構造およびDNAからRNAへの転写と蛋白質への翻訳の経路を模式的に示している。新規塩基対が合成できたことで、人工コドン(yAG)と人工アンチコドン(CUs)等の遺伝情報の拡張システムとしての機能が期待された。プロジェクト終了後、「非天然型塩基対」に代わって、2003年には「人工塩基対」という新たな用語が創出され、「現代用語基礎知識」(自由国民社)に紹介されている。

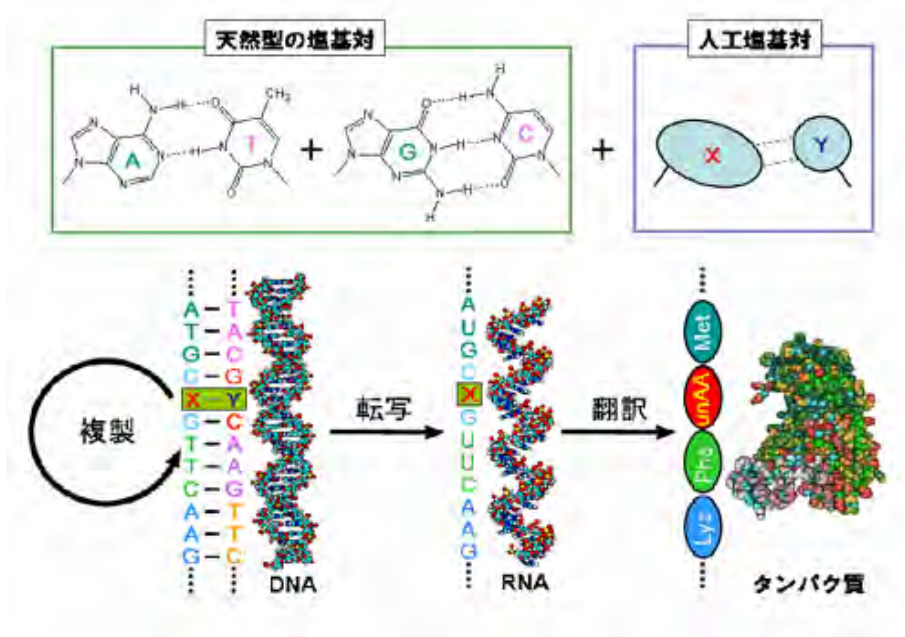


図 1 人工塩基対による遺伝情報の拡張システム

DNA 中に人工塩基対(x - y)を組み込み、この塩基対が複製・転写・翻訳過程のそれぞれで機能すれば、RNA 中に新たな機能性の構成成分(X)や蛋白質中に非天然型アミノ酸(unAA)を組み込んで、新たな機能を持たせることができる(理研ニュース No.36 December 2006)

2.1.2 構造生物学に基づく論理的な分子設計とエンジニアリング

図 1 に示した翻訳過程では、20 種類のアミノアシルtRNA 合成酵素(aaRS)が、天然の 20 種類のアミノ酸それぞれに対応したtRNA を結合させる反応を触媒として働いている。そのため、新規塩基対から得られる新たな遺伝暗号に対しては新規tRNA とそれに対応する aaRS の改変体を創製する必要がある。

研究成果の(2)試験管内転写-翻訳システムによる非天然型アミノ酸の蛋白質中への導入では、研究成果の(1)非天然型核酸塩基対創製の実現で合成した(s-y)塩基対に対応する新たな遺伝暗号である人工コドン(yAG)に対して、非天然型アミノ酸 3-クロロチロシンを結合した人工アンチコドンを持つ酵母チロシンtRNA(CUs)を使い、試験管内翻訳系(無細胞蛋白質合成系)で Ras 蛋白質中に 3-クロロチロシンを取り込ませることに成功した(論文リストNo.14)。

また、研究成果の(3)非天然型アミノ酸を特異的に取り込むアミノアシル tRNA 合成酵素の創製では、非天然型アミノ酸(3-ヨードチロシン)に選択的に結合する大腸菌由来のtRNA 合成酵素の改変体の創製に成功した。

さらに、研究成果の(4)培養細胞中での非天然型アミノ酸の蛋白質中への選択的取り込みでは、大腸菌等の原核細胞由来のtRNA やaaRS が、真核細胞由来のtRNA やaaRS と交差しないことを利用し、これらの遺伝子から構築したDNAベクターと標的蛋白質の遺伝子を培養細胞に導入する

ことで、蛋白質の任意の場所に非天然型アミノ酸を取り込ませることに成功した。このように新たな情報分子の創出技術を用いて、無細胞蛋白質合成系と細胞系で非天然型の遺伝情報分子と細胞情報分子が稼働できたことで、ねらいは達成できた。

図2は細胞系における天然型のアミノ酸チロシンと非天然型のアミノ酸 3-ヨードチロシンについて、チロシルtRNA ($tRNA^{Tyr}$) およびチロシルtRNA合成酵素 (TyrRS) について、天然型と非天然型の経路を模式的に示している。

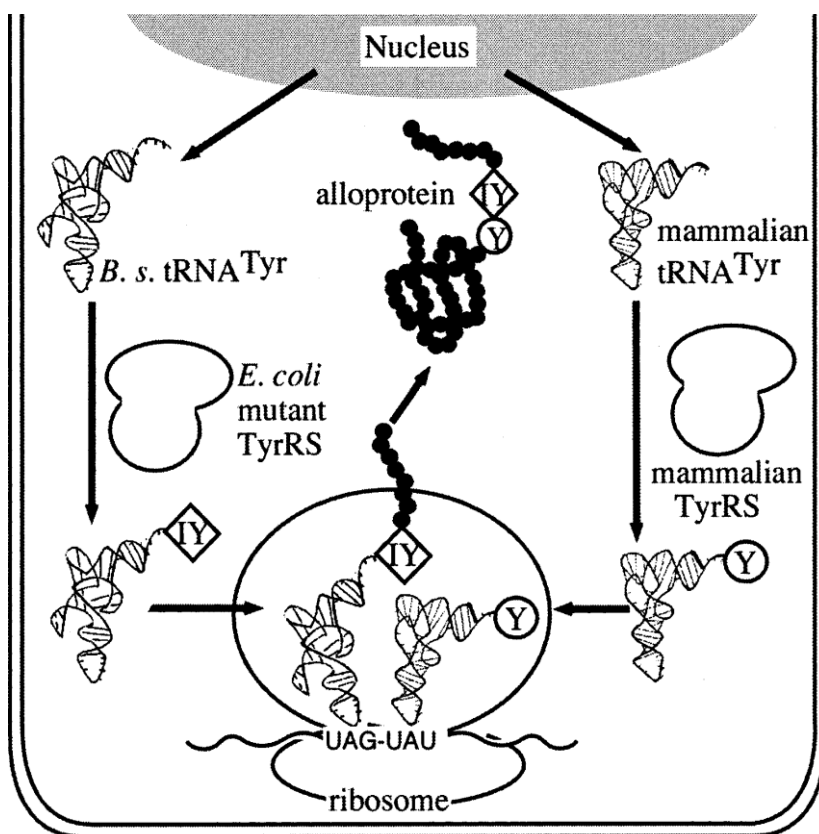


図2 . 哺乳動物細胞におけるアンバーコドンによる3-ヨードチロシンの蛋白質への取込み
 培地に添加した3-ヨードチロシン(IY)は細胞に取り込まれて後、大腸菌由来変異チロシルtRNA合成酵素 (*E. coli* mutant TyrRS) により、*B. stearothermophilus* (*B. s.*) 由来サプレッサーチロシルtRNA (*B. s.* tRNA^{Tyr}) に付加される。一方、L-チロシン(Y)は内在性のチロシルtRNA合成酵素 (mammalian TyrRS) により、哺乳動物細胞由来のチロシルtRNA (mammalian tRNA^{Tyr}) に付加される。これらのtRNAはリボソーム上で、mRNAのアンバーコドンに対合した非天然型アミノ酸ならびにチロシンコドンに対合したチロシンが、蛋白質に取り込まれ、アロプロテイン(alloprotein)*が合成される (Nucleic Acids Research, 30, 4692-4699, 2002論文リストNo.18)。

*非天然型アミノ酸を含む新種の蛋白質をアロプロテインと名付けた (Koide H, Yokoyama S, Kawai G, Ha JM, Oka T, Kawai S, Miyake T, Fuwa T, Miyazawa T. Proc Natl Acad Sci U S A. 85, 6237-6241, 1988)

2.1.3 進化分子工学による新規な分子認識特異性を有する情報分子の創製

研究成果の(5)種々の機能性 RNA 分子の創製では、蛋白質の特異的な構造部位に結合する RNA 分子である RNA アプタマーを *In vitro* セレクション法により探索し、大腸菌に毒性のあるコリシン E3 蛋白質あるいはファージ MS2 に結合する RNA 分子や蛋白質相互作用を阻害する新規 RNA 分子を創製した(論文リスト No. 2, 3, 5)。

従来の *In vitro* セレクション法を最適化し、多様な高次構造を形成する RNA と標的蛋白質に結合する事例が得られたことにより、当初のねらいは達成された。

2.1.4 遺伝情報と細胞情報を組み合わせたシステムの設計

研究成果の(6)リン酸化部位に非天然型アミノ酸を用いた情報伝達経路の確立では、研究成果の(3)非天然型アミノ酸を特異的に取り込むアミノアシル tRNA 合成酵素の創製の技術を用いて、非天然型アミノ酸 3-ヨードチロシンを導入した非天然型蛋白質を作製した。この蛋白質は天然のリン酸化チロシン結合蛋白質では認識されない非天然型蛋白質であることを確認した。研究成果の(7) ErbB receptor family の機能構造の解析では上皮成長因子(EGF)レセプター(EGFR)である ErbB-1 とそのファミリーメンバーの ErbB-4 の細胞外領域のキメラを作成し、リガンドの結合特異性と細胞外領域のドメインの役割を解明した(論文リスト No. 16)。また、ErbB-1 の細胞外領域と EGF との複合体の結晶化に成功し、構造解明を試みた。これらの技術を用いて、細胞外から細胞内へのシグナルの伝達の仕組みを解明する道具立てが構築でき、ねらいの第一歩は達成された。

上述の4つのねらいとその研究成果はいずれも、プロジェクト開始当初は全く予想できなかったが、5年という短期間に世界最先端の技術に成長し、当初のねらいは達成されたといえる。

2.2 研究期間終了後、研究はどのような形で基礎的研究として継続・発展したか

上記のプロジェクトの研究成果は 2002年4月に発足した文部科学省の「タンパク3000プロジェクト」の中で、「網羅的解析プログラム」に組み込まれて、基礎研究として継続・発展し、更なる展開をみている。

研究成果の(1)から(7)のうち、(1)は世界のトップレベルまで研究が発展しているので、2.2.1にその展開を記載する。研究成果の(2)、(3)、(4)のそれぞれの技術は非天然型アミノ酸を導入した蛋白質を創出するため必須であり、これらを用いて作られた蛋白質は機能解明の材料として使われていることを2.2.2に記載する。また、研究成果の(1)の新規塩基対の技術が新たな RNA 分子の創製に繋がり、研究成果の(5)の新しい機能を持った RNA 分子が創製されているので、2.2.3に記載する。さらに研究成果の(6)と(7)はシグナルの細胞内での情報伝達系の展開に寄与しているので、2.2.4として記載する。

2.2.1 非天然型核酸塩基対創製の展開

「非天然型核酸塩基対」の創製は、プロジェクト発足時には世界的にもチャレンジングな新たな課題であったが、現在では「人工塩基対」(non-standard base pair)として、「非天然型核酸塩基対」(unnatural base pair)と区別され(分子細胞生物学事典第2版)、本邦発の研究に育っている。終了時の研究成果では 2.1.1に記載したように転写と翻訳の可能な2種類の新規塩基対(x-y)、(s-y)の開発に成功しているが、これらの塩基対は複製には至らなかった。

た。

プロジェクト終了後、試行錯誤の結果、Ds-Pa (Ds7-2-thienyl)-imidazo[4,5-b]pyridine、Pa: pyrrole-2-carbaldehyde)の組み合わせにたどりつき、この塩基対を含むDNAはPCR (Polymerase Chain Reaction)により増幅が可能となったことが2006年8月公表された(論文リストNo. 34)。これらの人工塩基対が複製・転写されることを利用して、2.2.3に記述するように機能性RNA分子が創出され、新規RNAアプタマー分子の創製にも寄与している。

人工塩基対は「水素結合様式」・「シェイプフィッティング」・「疎水性塩基対」の3つの概念に基づいてデザインされる。天然型塩基対:A-T、G-Cは水素結合様式とシェイプフィッティングによって高い選択性がもたらされている。本プロジェクトの基盤となる人工塩基対に関する基礎・応用研究は1990年頃から米国で先進的に進められ、Bennerら^{1,2}が天然型の塩基対で形成される水素結合の様式に着目し、これらの水素結合様式とは異なるisoG-isoCなどの人工塩基対を開発した(isoG:isoguanine、isoC:isocytosine)。

1998年Koolら^{3,4}は塩基対内で水素結合を作らない疎水的なZ-F塩基対を合成し、さらに、ポリマーゼの認識を高めるQ-F塩基対を創出したが、天然型塩基対A-Tとの互換塩基であるため、排他的に選択性を有する人工塩基対としては利用できなかった(Z:4-methylbenzimidazole、F:2,4-difluorotoluene、Q:9-methyl-1-H-imidazo[(4,5)-b]pyridine)。また、同時期にRomesbergら^{5,6,7}は、シェイプフィッティングの概念を導入して種々の疎水性塩基対を合成したが、人工塩基が取り込まれた後の複製の伸長反応は停止した。

本プロジェクト初期に設計された人工塩基対(x-y)および(s-y)は天然型塩基対とは異なる水素結合様式を持っている。転写においては(s-y)塩基対のほうが(x-y)塩基対に比して、高い選択性を示すため、(s-y)塩基対を用いて、特異的部位に光感受性の分子をRNAに導入したRNAの転写物を創製することも可能となった(論文リストNo. 24)。さらにDs-Pa塩基対では、複製と転写のどちらにおいても、非常に高い選択性(複製においては99.8%以上、転写においては95%以上の選択性)を示すことが分かり、いまや他の追従を許さない状況である(論文リストNo. 33, 34, 39)。

2.2.2 非天然型アミノ酸を特異的に取り込むアミノアシル tRNA 合成酵素の創製とその応用

プロジェクト終了時には2.1に記載したサプレッサーtRNAに3-ヨードチロシンを選択的に結合させる大腸菌由来のtRNA合成酵素改変体を得た。この技術を利用して、無細胞蛋白質合成系ならびに動物細胞において、非天然型アミノ酸であるヨードチロシンを蛋白質へ導入する基本技術が確立され、プロジェクト終了後に公表された(論文リストNo. 18, 19, 22)。これらの変異蛋白質はヨウ素を重原子として利用できるため、SAD法(単波長異常分散法)の

¹ J. A. Piccirilli, T. Kranach, S. E. Moroney & S. A. Benner, Nature 343, 33, 1990.

² A. M. Sismour & S.A. Benner, Nucleic Acid Res., 33, 5640, 2005.

³ J. C. Morales & E. T. Kool, Nature Struct. Biol., 5, 950, 1998

⁴ J. C. Morales & E. T. Kool, J. Am. Chem. Soc., 121, 2323, 1999.

⁵ D. L. McMinn, A. K. Ogawa, Y. Wu, J. Liu, P. G. Schultz & F. E. Romesberg, J. Am. Chem. Soc., 121, 11585, 1999.

⁶ A. K. Ogawa, Y. Wu, D. L. McMinn, J. Liu, P. G. Schultz & F. E. Romesberg, J. Am. Chem. Soc., 122, 3274, 2000.

⁷ M. Fa., A. Radeghieri, A. A. Henry & F. E. Romesberg, J. Am. Chem. Soc., 126, 1748, 2004.

位相決定による蛋白質のX線結晶構造解析を可能とした。これらの技術は「タンパク 3000 プロジェクト」の中で利用され、蛋白質構造決定に寄与している。

非天然型アミノ酸の導入技術をさらに展開し、動物細胞内の蛋白質間相互作用解析が捉えることのできる光クロスリンク法を開発した(論文リストNo. 26、27)。具体的には、光照射により共有結合を形成する人工的なアミノ酸 パラベンゾイルフェニルアラニン(pBpa)を動物細胞内で Grb2(Growth factor receptor binding protein2)に組み込み、EGFR との共有結合による架橋蛋白質を創製した。これらの架橋蛋白質は安定に回収できるため、蛋白質間相互作用の解析に有用な画期的な手法として注目され、機能解析に利用されている。

さらに、2006年蛋白質構造研究の成果として、aaRSの1種であるグルタミルtRNA合成酵素(GluRS)とRNA複合体のX線結晶解析によって、両者が結合して複合体を形成すると、GluRSは認識可能な立体構造に変化するという遺伝暗号の翻訳メカニズムを分子レベルで説明したことが発表された(論文リストNo. 35)。GluRSによるtRNAに依存したアミノ酸認識メカニズムに関する成果は、基質認識・反応機構にもとづく創薬や生物学への応用展開が期待できる。

2.2.3 種々の機能性 RNA 分子の創製の展開

研究成果の(5)種々の機能性 RNA 分子の創製ではプロジェクト期間中には特定の蛋白質を標的とする RNA アプタマーとしてコリシンE3の活性を阻害する RNA 分子やプロトオンコジーンのひとつである Raf1 に結合して Ras との相互作用を阻害する抗 Raf-1 RNA アプタマー分子を発見した(論文リストNo. 2、3、5、13)。その後、上記2.2.1の技術展開に伴い、人工塩基対(s-y)を利用し、転写により RNA 分子に蛍光標識やビオチン標識が可能となった(論文リストNo. 28、29、38)。また、抗 Raf-1 RNA アプタマー分子に光架橋が可能なヨード体を導入し、特異的な部位へのクロスリンクも可能とした(論文リストNo. 24)。これら進化学の手法は RNA アプタマーとその標的蛋白質の相互作用解析に役立つばかりでなく、新規 RNA 分子の構築にも有力なツールとなることを示している。RNA アプタマーの実用的な応用展開については3.2.3に記載する。

2.2.4 ErbB receptor family の機能構造の解析からの展開

プロジェクト終了時には、リガンドのシグナル情報がレセプターを介してどのように伝えられるかを解明することを目指し、細胞の情報伝達系に非天然型アミノ酸を導入して、新規細胞情報伝達系を構築した。また、EGF とそのレセプターである ErbB1の細胞外領域の複合体の結晶化を成功させ、構造からのからの解明にも着手した(論文リストNo. 4、17、特許リストNo. 11、2、13、14)。その後、レセプターの細胞外領域ドメインのキメラを系統的に作成して各ドメインのリガンド結合に対する役割と特異性を、X線回折による構造解析から解明することに成功した(論文リストNo. 21)。

プロジェクトの研究成果により細胞内の蛋白質の任意の位置にヨード置換チロシンを導入出来る技術が確立したため、EGF レセプターなどのキナーゼの活性に必須なチロシンの置換体の導入も可能となり、さらにリン酸化されることが確認された。また、この情報伝達系下流のアダプター蛋白質である Grb に存在する Src Homology (SH) 2ドメインについても改変した改変体を創製し、人工的な新規細胞内情報伝達経路を構築した(特許リスト No. 10)。この系は

基礎研究において細胞の情報伝達の解明の進展に寄与すると同時に、後述するように抗がん剤開発などの臨床研究等の応用研究にも貢献するものと考えられる。

3. 研究成果から生み出された科学技術的、社会的及び経済的な効果・効用及び波及効果について

3.1 科学技術の進歩に貢献する成果

3.1.1 学術上の新発見

本プロジェクトの成果は学術論文として、プロジェクト期間中には、16 報公表され(内 2 報はプロジェクト終了後に公表)、終了後にも 24 報が公表されている。

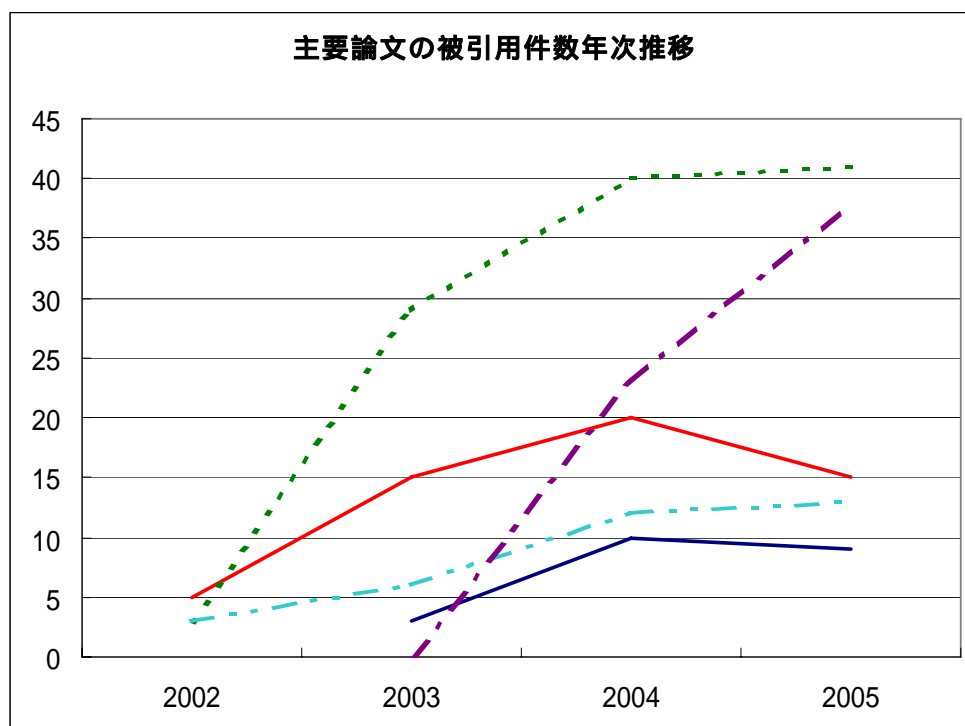
プロジェクト期間中の論文の内容の内訳は非天然型核酸塩基対創製に関する論文 7 報、非天然型アミノ酸を用いた蛋白質の創製に関する論文 2 報、機能性 RNA 分子の創製に関する論文 4 報、細胞情報伝達に関する論文 3 報となっている。

プロジェクト終了後の論文の年次推移は 2002 年 3 報、2003 年 3 報、2004 年 3 報、2005 年 7 報、2006 年 5 報、2007 年 3 報となっている。また内容の内訳は、人工塩基対に関する論文 6 報、非天然型アミノ酸を用いた蛋白質の創製に関する論文 7 報、機能性 RNA 分子の創製に関する論文 5 報、細胞情報伝達に関する論文 2 報に加え、tRNA の構造解析に関する論文 1 報、未知機能の蛋白質の立体構造と機能予測に関する論文 3 報となっている。これはプロジェクト終了後にプロジェクトの研究成果が進展していることを示すと同時に、新たな研究が展開していることをも示唆している(5.1 論文リスト参照)。

3.1.2 新領域・潮流の創出

(1) 主要論文の被引用件数からの検討

研究成果を計る指標のひとつとして、論文が他の研究者にいかん引用されたかを示す論文の被引用件数が用いられる。上述の研究成果の中から、代表的な論文 5 報について被引用件数年次推移を調べたところ、図 3 に示されるように細胞情報伝達に関する ErbB-1 の細胞外領域と EGF との複合体の結晶化および ErbB 受容体と EGF 活性化に関する論文の被引用件数が伸びていることが分かる。これは ErbB 受容体が細胞の増殖や分化を制御しており、この受容体に異常が生じると癌を引き起こすことにも関連が有ると考えられる。すなわち、肺癌に有効な「イレッサ」はこの受容体を標的とした抗ガン剤として注目され、基礎研究ばかりでなく臨床研究も盛ん行われていることとも関連している。本プロジェクトの研究成果である細胞内の情報伝達系の蛋白質の構造機能解析手法は、創薬研究にも新しい潮流を創出していることを示唆しているものと思われる。



(検索日:2006年12月18日)。

図 3 主要論文の被引用件数年次推移

代表的論文5報について

新規塩基対を用いたアミノ酸の蛋白質への取り込み

「Hirao, I *et al.* Nat Biotechnol., 20, 177-182 (2002) (論文リス No.14)」

ErbB-1 の細胞外領域と EGF との複合体の結晶化

「H. Ogiso *et al.*, Cell, 110, 775-787 (2002). (論文リスト No. No.17)」

非天然型アミノ酸を真核細胞に特異的に取り込むチロシル tRNA 合成酵素

「D. Kiga, *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci., 99, 9715-9720 (2002). (論文リスト No.19)」

人工塩基対の創製

「T. Mitsui *et al.* J. Am. Chem. Soc., 125, 5298-5307(2003). (論文リスト No.20)」

ErbB 受容体と EGF 活性化

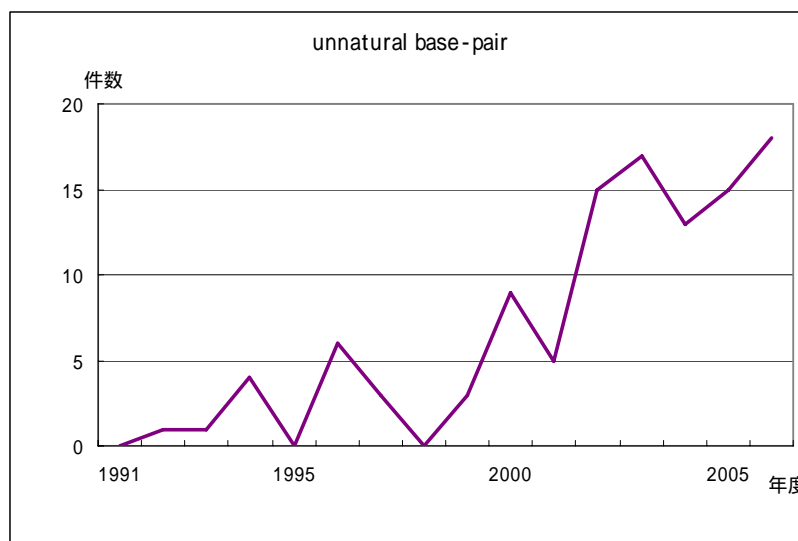
「A. W. Burgess *et al.*, Molecular Cell, 12, 541-552, (2003). (論文リスト No.21)」

(2) 新たな用語ならびに研究分野

上述の被引用論文数では 人工塩基対の創製は増加傾向にはあるが大きな伸びは見られなかった。これに対して図4に示されるように、「unnatural base-pair」に関する論文自体はプロジェクト当初は 5 報未満であるが、プロジェクトの進展とともに伸び、プロジェクト終了後の2002年以降は15報以上となっている。

プロジェクト期間中には非天然型核酸塩基対「unnatural base-pair」として用いられた用語が、プロジェクト終了時には、人工塩基対として用いられていることから示唆されるように、本

邦発の新たな潮流となっている。因みに、英文論文では「unnatural base-pair」が一般的に用いられている。



(検索日:2006年12月26日)

図 4 unnatural base-pair(s)がキーワードになっている論文の発表数の年次推移

また、「人工塩基対」の研究は、先にも記したように、日本より欧米が先行していたが、本プロジェクトの進展の後、ようやくアメリカ化学会に新分野が設立された。フランスのARS 2008 (Aminoacyl tRNA Synthetase)では、「遺伝暗号の拡張という新分野」が設けられ、平尾グループリーダーは座長を依頼されている。また、チェコスロバキアの第16回「Chemistry of nucleic acid components」では招待講演を依頼されている。さらに構造に基づいた化学合成の概念を生物学に取り入れた「Structural Synthetic Biology」という新規研究分野の創出に繋がっているとプロジェクト関係者は考えている。

3.1.3 世界のトップレベルの研究

(1)人工塩基対合成

プロジェクト期間中に、人工的な塩基対が形成される可能性を示した研究成果が、その後大きく展開し、最近では応用面でも使用可能な人工塩基対 Ds-Pa の開発に至り、細胞内で複製・転写・翻訳の全てにおいて完全に機能する人工塩基対の開発に成功した。競合相手である Romesberg がこのことを2006年のNature MethodsのNews & Viewsに取り上げられて高く評価している⁸。米国では1990年から研究が先行しており、本プロジェクトは1996年と開始が遅かったにも拘らず、世界に先駆けて成果を遂げたのは日本人の根気強さと器用さの賜と考えられる。

⁸ A.M. Leconte & F.E. Romesberg, Nature Methods, 3, 667-678(2006).

この分野の先駆者で競合相手であるKoolは、プロジェクト後の展開を、この分野における世界の研究成果であると賞賛している。また、Romesbergも人工塩基対をシステムティックに研究開発したことに着目し、特に人工塩基対を含むDNAのPCRによる増幅という最近の成功は、実用的な価値をもたらすと多大な評価をしている。これらは本プロジェクトの成果がプロジェクト終了後に世界トップレベルに達したことを示している(各人へのメールインタビューの回答より引用)。

プロジェクト関係者は、人工塩基対合成技術は従来の遺伝子組換え技術に代わる新たなバイオテクノロジーと位置付けられ、新規技術分野が開拓され、新たな潮流を創出したと考えている。

(2) 非天然型アミノ酸利用技術開発と発展

動物細胞内で、蛋白質の特定の場所に非天然型アミノ酸 3-ヨードチロシンを導入するためには、チロシンに対するサブレッサー由来のtRNAとTyrRSが細胞内で、うまく機能する必要がある(図2参照)。そのために、改変したtRNAの遺伝子を組込んだプラスミドベクターとTyrRS遺伝子を組込んだプラスミドベクター並びに、標的となる蛋白質の遺伝子DNAとともに細胞内に導入し、細胞内で発現させる系を用いた。プロジェクトで構築したtRNAの遺伝子を発現させるためのプラスミドDNAおよびTyrRS遺伝子発現させるためのプラスミドDNAは、2005年に本法を発表した後(論文リストNo.27)、国内外の研究者から30件以上の供与申込みがあり、個別にMTA(Material Transfer Agreement)を締結後、供与している。これは内外の研究の発展に大きく貢献している事例である。プラスミド構築・導入法はNature ProtocolsのWeb siteで2006年公表された(論文リストNo.37)。

また、これらの技術に関する基本特許は「非天然型アミノ酸組込み蛋白質の発現方法」として、2003年に本邦を初め、米国、ヨーロッパ、カナダに出願されており、世界をリードする技術として応用展開が期待される(特許リストNo.22、23、24、25)。

(3) 国際的な知的基盤整備

本プロジェクトの研究成果から波及した技術を用い、「タンパク3000プロジェクト」の「網羅的解析プログラム」の中で、多数の蛋白質の構造解析が実施された(論文リストNo.37、39、40)。このプロジェクトに先駆けて、世界中のグループの研究の国際協調を推進するため、「構造ゲノム科学国際機構 International Structural Genomics Organization(ISGO)」が2001年4月に設立された。本プロジェクトの横山プロジェクトリーダーは設立準備委員会ならびに委員会の委員として参画し、国際的な取り決めの策定に大きく貢献した。ISGOの取り決めに従い、Protein Data Bank(PDB)に登録された蛋白質の数は2007年3月末までに、2,597に達し、「タンパク3000プロジェクト」全体の登録数3,923の66%に値する。この数は一研究室としては世界のトップであり、シグナル伝達系解明の構造生物学研究に大きく寄与している。

3.2 プロジェクトの成果はプロジェクト終了後、応用に向けて発展したか

3.2.1 技術の実証・再現ならび応用に向けての体系化

特許の出願ならびに登録状況からプロジェクトの成果を分析してみると、プロジェクト終了時

には本プロジェクトに関連した特許は、科学技術振興機構単独あるいは理化学研究所と共同で、ファミリーとして7件出願されている。延べ数は国内特許数7件、外国特許数14件で合計21件となっている。その内容は Ras標的蛋白質に結合し得る核酸、新規な核酸塩基対、チロシルtRNA合成酵素改変体、Grb2のSHドメイン改変体、EGF/EGFR複合体、新規なヌクレオチド若しくはヌクレオチド誘導体及びその利用、非天然型アミノ酸組込み蛋白質の発現方法である。2007年時点の登録数は と の2ファミリーの4件である。

プロジェクト終了後、理化学研究所が主体となり、新たに5ファミリーの特許を出願している。その内容は 抗がん剤、真核生物においてリジン誘導体を部位特異的に蛋白質に導入する方法、リン酸化された非天然型アミノ酸を認識する抗体およびその利用、修飾ポリペプチドの製造方法、チロシルtRNA合成酵素の改変体及びその作製方法となっている。これらよりプロジェクトの成果が、抗がん剤の開発、抗体の作出、酵素の作製等の応用に向けて、展開されていることが分かる(4.2 特許リスト参照)。

3.2.2 革新的技術の開発とその応用展開

プロジェクト終了後、「タンパク3000プロジェクト」の「網羅的解析プログラム」の中で、蛋白質のX線結晶構造解析から蛋白質の3次元構造が予測できるようになったため、機能の未知な標的蛋白質に対して、立体構造をもとに機能を探索する技術が新たに開発された。すなわち蛋白質の標的部位と考えられる場所に結合するリガンド候補化合物を1)コンピューター上(*in silico*)で絞込み、2)ハイスルーブットシステムにより候補化合物を調製し、3)表面プラズモン共鳴(SPR)により候補化合物の親和性評価をするというものである(論文リストNo.32)。*in silico*スクリーニングはバーチャルスクリーニングとも呼ばれ、蛋白質と化合物の立体構造情報からドッキングシミュレーションを計算機上で行い、活性の予測される化合物の探索が行える点で有用である。

また、蛋白質立体構造情報に基づく薬剤設計(Structure based Drug Design:SBDD)では、特定の疾患関連蛋白質と化合物から合理的な設計が可能となり、短期間に低コスト化を実現できる創薬探索の新たな取り組みとして期待されている。

3.2.3 機能性RNA分子の創製

RNAアプタマーは標的蛋白質の立体構造を認識して特異的に結合するため、蛋白質の一部のアミノ酸配列だけを認識する抗体とは異なり、中には抗体よりも1000倍以上の結合力を持つ分子も存在する。しかし、天然のRNAは医薬品として扱うには安定性に問題がある。本プロジェクトから出発した人工塩基対の技術は2.2.3にも記したように転写を介して、修飾可能な新たなRNA分子の創製に至っている。新規人工塩基対を用いたアプタマーライブラリーから新たなRNAアプタマーを探索することは、非天然型の分子である点で、新規医薬品の開発にブレイクスルーをもたらすものとして、今後大いに期待される。

因みに、世界初のRNAアプタマー治療薬として、2004年12月にアメリカのEyeteck社とPfizer社によって、血管内皮新生因子(VEGF)に対するRNAアプタマーを用いた加齢黄斑変性症の治療薬(Macugen)が、FDAの認可を得て市場に登場している。

国内では、東京大学医科学研究所中村義一教授の研究室で確立された基盤技術を用いて、2003年8月にリボミック社が設立された。同社では既に10種類を超えるRNAアプタマーの創製

に成功しており、自社開発に加えて、そのいくつか重要なものに関しては、医薬品への研究開発を進めている。

3.2.4 ベンチャー企業設立

本プロジェクトで開発された技術はプロジェクト終了後も地道に展開し、その技術を基に理研ベンチャー タグシクス・パイオ(株) (TagCyx Biotechnologies) が2007年2月設立された。本ベンチャー企業は 独創的な基礎研究(人工塩基対の創製)に基づいて、従来の遺伝子操作技術に代わる革新的なバイオテクノロジーを創出するために、本人工塩基対技術の基盤産業を確立する、人工塩基対テクノロジーを用いて、高機能バイオポリマー(人工核酸や人工蛋白質)を作製することにより、材料・医療・診断分野への応用を進め社会福祉に貢献するという2つの企業理念を掲げている。事業内容は 高機能マテリアル事業 試薬・キット事業 診断薬・核酸医薬事業としている。

現在はDNAに人工塩基対を組み込んだ認証システムの実用化の取り組みが進んでいる。人工塩基対技術によるDNA情報タグとしての利点は、6塩基の組み合わせを用いることにより、天然塩基の4塩基の組み合わせでは得られない情報の拡張が実現できる 外部からDNAを挿入するため、天然DNAのコンタミネーションによる誤った情報が排除出来る 新たな検出システムの開発が可能である 複雑な偽造防止技術が可能である等である。

DNA認証に関しては欧米では関心が高く、防犯スプレーや原油の産地特定などに実際に使われているため、人工塩基対技術は、海外からも注目され、実用化が期待される。

3.2.5 企業との共同研究

「タンパク 3000 プロジェクト」の「網羅的解析プログラム」の中では、産業界と連携して共同研究を行い、その成果を速やかに企業に移転する仕組みが作られている。この仕組みにより、企業がその後、研究を展開しやすくしているのが特徴である。そのため、企業はプロジェクトで作製された蛋白質試料や構造情報を利用し、共同研究の成果として得られた蛋白質とそれに結合する化合物等に関しては、企業の特許として出願できる。このような斬新な取り組みは、学术界と産業界との連携のきっかけを提供するもので、研究の活性化を図るものとして注目されている。実際には癌関連蛋白質、免疫・炎症関連蛋白質、遺伝性疾患関連蛋白質などの研究が開始され、新しい創薬のシーズの探索に繋がる技術として今後の展開が期待されている。10-20年の時を経て、疾患の蛋白質から絞り込まれた新しいコンセプトの薬剤が登場するものと考えられる。

3.3 人材育成の面から参加研究者の活動状況はどうか

3.3.1 参加研究者の動向

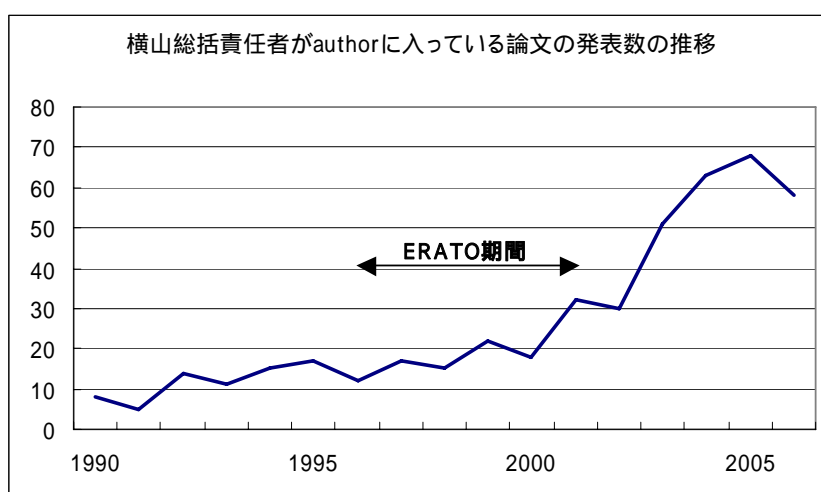
本プロジェクトに参加した研究員は学位取得者が主であったため、プロジェクト研究からの学位取得者はなかった。プロジェクト終了後、横山総括責任者および平尾遺伝情報分子グループリーダー等の主力メンバーは文部科学省の2002年からの新規プロジェクトである「タンパク 3000 プロジェクト」に参画した。その中で、本プロジェクトの研究成果は、さらにレベルアップし、研究者も世界のトップレベルへと成長している。また、新たに大学の研究室や民間企業で職

を得た研究者は、それぞれ新しい職務に着き、活躍をしている。

特に、木賀大介氏は平成 17 年 4 月に東京工業大学 大学院総合理工学研究科 知能システム科学専攻 助教授に就任し、「構成的生物学 = 創ることで初めてわかる生物学」をキーワードに生体高分子の組み合わせによって構成される、研究者の望みの特性を持つシステムを創生することを研究手段とし、生物学という「科学」に対して、様々な考察を与え、新たな学問に挑戦している。

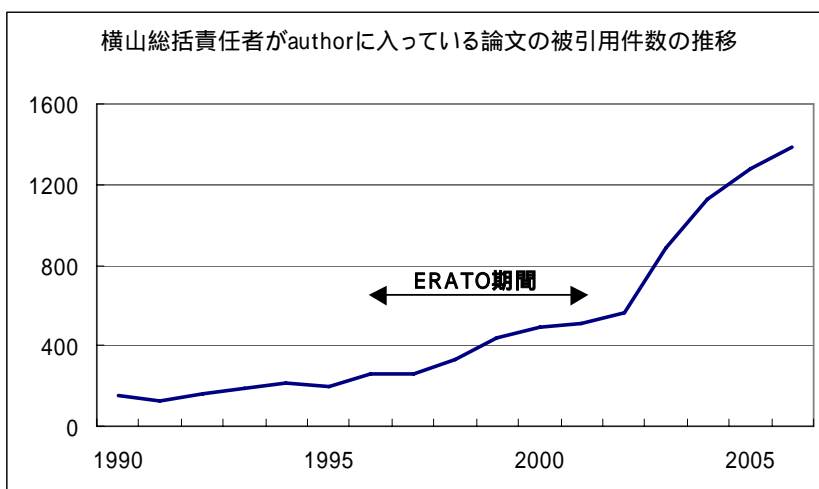
3.3.2 ERATO プロジェクトが総括責任者の研究活動に与えたインパクト

本プロジェクトの総括として、活躍された横山総括責任者の名前が著者に入っている論文について、ERATO 期間を挟んで、発表数と被引用件数を検索した。図 5 に示すように、発表数と被引用件数のいずれにおいても、ERATO プロジェクトをきっかけに増加して、終了後の 2003 年の以降が急激に増大している。被引用件数は 2001 年に 500 件を超え、2006 年には 1384 件に及んでいる。これらの検索結果には「タンパク 3000 プロジェクト」の成果も含まれているが、ERATO プロジェクトを起点に始まった研究が原動力となって、総括責任者は、より大きなプロジェクトのリーダーとして采配をふるい、研究者を育成した結果として、研究成果に反映されていることが分かる。個々の論文を調べるとプロジェクト参加者が共著者となっている例も多く、参加研究者がプロジェクト終了後も一線の研究者として活躍していることは明白である。



(検索日:2007 年 1 月 20 日)

図 5-1 横山総括責任者の author に入っている論文の発表数の推移



(検索日:2007年1月20日)

図 5-2 横山総括責任者が author に入っている論文の被引用件数の推移

4 引用論文及び特許

4.1 論文リスト

No.	書誌事項	出版年	被引用 件数	備考
1	Hirao, I., Koizumi, M., Ishido, Y. and Andrus, A. "1, 1, 3, 3-Tetraisopropyl-3-(2-(triphenylmethoxy)ethoxy)disiloxane-1-yl group, a potential 5'-O-protecting group for solid-phase RNA synthesis" Tetrahedron Lett., 39, 2989-2992, 1998	1998	2	終了報告書記載
2	Kimoto, M., Sakamoto, K., Shirouzu, M., Hirao, I. and Yokoyama, S. "RNA aptamers that specifically bind to the Ras-binding domain of Raf-1" FEBS Lett., 441, 322-326, 1998	1998	12	終了報告書記載
3	Hirao, I., Spingola, M., Peabody, D. and Ellington, A. D. "The limits of specificity: an experimental analysis with RNA aptamers to MS2 coat protein variants" Mol. Divers., 4, 75-89, 1999	1999	18	終了報告書記載
4	Sato, C., Kim, J. H., Abe, Y., Saito, K., Yokoyama, S. and Kohda, D. "Characterization of the N-oligosaccharides attached to the atypical Asn-X-Cys sequence of recombinant human epidermal growth factor receptor" J. Biochem., 127, 65-72, 2000	2000	8	終了報告書記載
5	Hirao, I., Madin, K., Endo, Y., Yokoyama, S. and Ellington, A. D. "RNA aptamers that bind to and inhibit the ribosome-inactivating protein, pepocin" J. Biol. Chem., 275, 4943-4948, 2000	2000	12	終了報告書記載
6	Ishikawa, M., Hirao, I. and Yokoyama, S. "Synthesis of 3-(2-deoxy-β-ribofuranosyl)pyridin-2-one and 2-amino-6-(N,N-dimethylamino)-9-(2-deoxy-β-ribofuranosyl)purine derivatives for an unnatural base pair" Tetrahedron Lett., 41, 3931-3934, 2000	2000	15	終了報告書記載
7	Hirao, I., Ohtsuki, T., Mitsui, T. and Yokoyama, S. "Dual Specificity of the Pyrimidine Analogue, 4-Methylpyridin-2-one, in DNA Replication" J. Am. Chem. Soc., 122, 6118-6119, 2000	2000	9	終了報告書記載
8	Ohtsuki, T., Kimoto, M., Ishikawa, M., Mitsui, T., Hirao, I. and Yokoyama, S. "Unnatural base pairs for specific transcription" Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 98, 4922-4925, 2001	2001	28	終了報告書記載
9	Fujiwara, T., Kimoto, M., Sugiyama, H., Hirao, I. and Yokoyama, S. "Synthesis of 6-(2-thienyl)purine nucleoside derivatives that form unnatural base pairs with pyridin-2-one nucleosides" Bioorg. Med. Chem. Lett., 11, 2221-2223, 2001	2001	12	終了報告書記載
10	Fujioka, T., Kim, J. H., Adachi, H., Saito, K., Tsujimoto, M., Yokoyama, S. and Ui, M. "Further evidence for the involvement of insulin receptor substrates in epidermal growth factor-induced activation of phosphatidylinositol 3-kinase" Eur. J. Biochem., 268, 4158-4168, 2001	2001	6	終了報告書記載

No.	書誌事項	出版年	被引用 件数	備考
11	Hirao, I., Nojima, T., Mitsui, T. and Yokoyama, S. "Synthesis of DNA Templates Containing the Fifth Base, 2-Amino-6-(dimethylamino)purine, for Specific Transcription Involving Unnatural Base Pairs" Chemistry Lett., 30, 914 -915, 2001	2001	0	終了報告書記載
12	Kiga, D., Sakamoto, K., Sato, S., Hirao, I. and Yokoyama, S. "Shifted positioning of the anticodon nucleotide residues of amber suppressor tRNA species by <i>Escherichia coli</i> arginyl-tRNA synthetase" Eur. J. Biochem., 268, 6207-6213, 2001	2001	2	終了報告書記載
13	Kimoto, M., Shirouzu, M., Mizutani, S., Koide, H., Kaziro, Y., Hirao, I. and Yokoyama, S. "Anti-(Raf-1) RNA aptamers that inhibit Ras-induced Raf-1 activation" Eur. J. Biochem., 269, 697-704, 2002	2002	16	終了報告書記載
14	Hirao, I., Ohtsuki, T., Fujiwara, T., Mitsui, T., Yokogawa, T., Okuni, T., Nakayama, H., Takio, K., Yabuki, T., Kigawa, T., Kodama, K., Yokogawa, T., Nishikawa, K. and Yokoyama, S. "An unnatural base pair for incorporating amino acid analogs into proteins" Nat. Biotechnol. .20, 177-182, 2002	2002	62	終了報告書記載
15	Hirao, I., Kimoto, M., Yamakage, S., Ishikawa, M., Kikuchi, J. and Yokoyama, S. "A unique unnatural base pair between a C analogue, pseudoisocytosine, and an A analogue, 6-methoxypurine, in replication" Bioorg. Med. Chem. Lett., 12, 1391-1393, 2002	2002	3	終了報告書記載
16	Kim, J.H., Saito, K. and Yokoyama, S. "Chimeric receptor analyses of the interactions of the ectodomains of ErbB-1 with epidermal growth factor and of those of ErbB-4 with neuregulin" Eur. J. Biochem., 269, 2323-2329, 2002	2002	11	終了報告書記載
17	Ogiso, H., Ishitani, R., Nureki, O., Fukai, S., Yamanaka, H., Kim, J.-H., Saito, K., Sakamoto, A., Inoue, M., Shirouzu, M. and Yokoyama, S. "Crystal structure of the complex of human epidermal growth factor and receptor extra cellular domains" Cell, 110, 775-787, 2002	2002	154	終了報告書以降
18	Sakamoto, K., Hayashi, A., Sakamoto, A., Kiga, D., Nakayama, H., Soma, A., Kobayashi, T., Kitabatake, M., Takio, K., Saito, K., Shirouzu, M., Hirao, I. and Yokoyama, S. "Site-specific incorporation of an unnatural amino acid into proteins in mammalian cells" Nucleic Acids Res., 30, 4692-4699, 2002	2002	39	終了報告書以降
19	Kiga, D., Sakamoto, K., Kodama, K., Kigawa, T., Matsuda, T., Yabuki, T., Shirouzu, M., Harada, Y., Nakayama, H., Takio, K., Hasegawa, Y., Endo, Y., Hirao, I. and Yokoyama, S. "An engineered <i>Escherichia coli</i> tyrosyl tRNA synthetase for site-specific incorporation of an unnatural amino acid into proteins in eukaryotic translation and its application in a wheat germ cell-free system" Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 99, 9715-9720, 2002	2002	41	終了報告書以降
20	Mitsui, T., Kitamura, A., Kimoto, M., To, T., Sato, A., Hirao, I. and Yokoyama, S. "An unnatural hydrophobic base pair with shape complementarity between pyrrole-2-carbaldehyde and 9-methylimidazo[4,5-b]pyridine" J. Am. Chem. Soc., 125, 5298-5230, 2003	2003	30	終了報告書以降

No.	書誌事項	出版年	被引用 件数	備考
21	Kobayashi, T., Nureki, O., Ishitani, R., Yaremchuk, A., Tukalo, M., Cusack, S., Sakamoto, K. and Yokoyama, S. "Structural basis for orthogonal tRNA specificities of tyrosyl-tRNA synthetases for genetic code expansion" Nat. Struct. Biology, 10, 425-432, 2003	2003	98	終了報告書以降
22	Kobayashi, T., Nureki, O., Ishitani, R., Yaremchuk, A., Tukalo, M., Cusack, S., Sakamoto, K. and Yokoyama, S. "Structural basis for orthogonal tRNA specificities of tyrosyl-tRNA synthetases for genetic code expansion" Nat. Struct. Biology, 10, 425-432, 20	2003	43	終了報告書以降
23	Hirao, I., Harada, Y., Kimoto, M., Mitsui, T., Fujiwara, T. and Yokoyama, S. "A two-unnatural base pair system toward the expansion of the genetic code." J. Am. Chem. Soc., 126, .13298-13305, 2004	2004	10	終了報告書以降
24	Kimoto, M., Endo, M., Mitsui, T., Okuni, T., Hirao, I. and Yokoyama, S. "Site-specific incorporation of a photo-crosslinking component into RNA by T7 transcription mediated by unnatural base pairs" Chem. Biol., 11, 47-55, 2004	2004	12	終了報告書以降
25	Hirao, I., Harada, Y., Nojima, T., Osawa, Y. Masaki, H. and Yokoyama, S. "In vitro selection of RNA aptamers that bind to colicin E3 and structurally resemble the decoding site of 16S ribosomal RNA" Biochemistry, 43, 3214-3322, 2004	2004	3	終了報告書以降
26	Hino, N., Okazaki, Y., Kobayashi, T., Hayashi, A., Sakamoto, K. and Yokoyama, S. "Protein photo-cross-linking in mammalian cells by site-specific incorporation of a photoreactive amino acid" Nat. Methods, 2, 201-206, 2005	2005	8	終了報告書以降
27	Kobayashi T., Sakamoto, K., Takimura, T., Sekine, R., Vincent, K., Kamata, K., Nishimura, S. and Yokoyama, S. "Structural basis of nonnatural amino acid recognition by an engineered aminoacyl-tRNA synthetase for genetic code expansion." Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 102, 1366-1371, 2005	2005	5	終了報告書以降
28	Kawai, R., Kimoto, M., Ikeda, S. Mitsui, T., Endo, M., Yokoyama, S. and Hirao, I. "Site-specific fluorescent labeling of RNA molecules by specific transcription using unnatural base pairs" J. Am. Chem. Soc., 127, 17286-17295, 2005.	2005	4	終了報告書以降
29	Moriyama, K., Kimoto, M., Mitsui, T. Yokoyama, S. and Hirao, I. "Site-specific biotinylation of RNA molecules by transcription using unnatural base pairs" Nucleic Acids Res., 33, e129, 2005	2005	6	終了報告書以降
30	Mitsui, T., Kimoto, M., Harada, Y., Yokoyama, S. and Hirao, I. "An efficient unnatural base pair for a base-pair-expanded transcription system" J. Am. Chem. Soc., 127, 8652-8658, 2005	2005	6	終了報告書以降

No.	書誌事項	出版年	被引用 件数	備考
31	Kobayashi, T., Takimura, T., Sekine, R., Vincent, K., Kamata, K., Sakamoto, K., Nishimura, S. and Yokoyama, S. "Structural snapshots of the KMSKS loop rearrangement for amino acid activation by bacterial tyrosyl-tRNA synthetase" J. Mol. Biol. 346, 105-11	2005	10	終了報告書以降
32	Yoshitani, N., Satou, K., Saito, K., Suzuki, S., Hatanaka, H., Seki, M., Shinozaki, K., Hirota, H. and Yokoyama, S., "A structure-based strategy for discovery of small ligands binding to functionally unknown proteins: Combination of in silico screening and surface plasmon resonance measurements" Proteomics, 5, 1472-1480, 2005	2005	0	終了報告書以降
33	Hirao, I. "Unnatural base pair systems for DNA/RNA-based biotechnology." Curr. Opin. Chem. Biol., 10, 662-667, 2006	2006		終了報告書以降
34	Hirao, I., Kimoto, M., Mitsui, T., Fujiwara, T., Kawai, R., Sato, A., Harada, Y. and Yokoyama, S. "An unusual hydrophobic base pair system: site-specific incorporation of nucleotide analogs into DNA and RNA" Nat. Methods, 3, 729-735, 2006	2006	2	終了報告書以降
35	Sekine, S., Shichiri, M., Bernier, S., Chenever, R., Lapointe, J. and Yokoyama, S. "Structural bases of transfer RNA-dependent amino acid recognition and activation by glutamyl-tRNA synthetase" Structure, 14, 1791-1799, 2006	2006	-	終了報告書以降
36	Hino, N., Hayashi, A., Sakamoto, K. and Yokoyama, S. "Site-specific incorporation of non-natural amino acids into proteins in mammalian cells with an expanded genetic code" Nat. Protocols, 1, 2957-2962, 2006	2006	-	終了報告書以降
37	Yanagisawa, T., Ishii, R., Fukunaga, R., Nureki, O. and Yokoyama, S. "Crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of the catalytic domain of pyrrolysyl-tRNA synthetase from the methanogenic archaeon Methanosarcina mazei" Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun., 62, 1031-1033, 2006	2006	-	終了報告書以降
38	Kimoto, M., Mitsui, T., Harada, Y., Sato, A., Yokoyama, S. and Hirao, I. "Fluorescent probing for RNA molecules by an unnatural base-pair system" Nucleic Acids Res., 35, 5360-5369, 2007	2007	-	終了報告書以降
39	Kimoto, M., Moriyama, K., Yokoyama, S. and Hirao, I. "Cytostatic evaluations of nucleoside analogs related to unnatural base pairs for a genetic expansion system" Bioorg. Med. Chem. Lett., 17, 5582-5585, 2007	2007	-	終了報告書以降
40	Fukunaga, R. and Yokoyama, S. "Structural insights into the first step of RNA-dependent cysteine biosynthesis in archaea" Nat. Struct. Mol. Biol., 14, 272-279, 2007	2007	-	終了報告書以降

4.2 特許リスト

特許番号	発明の名称	出願国	出願番号	出願日	発明者	出願人	公開番号	公開日	登録番号	登録日	
1	E04801-1	NUCLEIC ACID CAPABLE OF BINDING SPECIFICALLY TO Ras TARGET PROTEIN (Rasの標的蛋白質に特異的に結合し得る核酸)	JP	特願2000-565121	1999/8/13	横山茂之、平尾一郎、坂本健作	科学技術振興事業団	無し	無し	P3655550	2006/2/1
2	E04801-2	同上	US	09/529,397	1999/8/13	YOKOYAMA SHIGEYUKI (JP); HIRAO ICHIRO (JP); SAKAMOTO KENSAKU (JP)	JAPAN SCIENCE & TECH CORP	WO2000/009684	200/2/24	US6995249	2006/2/7
3	E04801-3	同上	EP	EP99937069.5	1999/8/13	YOKOYAMA SHIGEYUKI (JP); HIRAO ICHIRO (JP); SAKAMOTO KENSAKU (JP)	JAPAN SCIENCE & TECH CORP			EP1026243	
要約		本発明は、Rasの標的蛋白質に特異的に結合する新規な核酸(アプタマー)に関する。より好ましくは、本発明は、Raf-1に特異的に結合する新規なRNAアプタマーに関する。また、本発明は、本発明の核酸を使用する細胞の増殖や分化をひきおこすシグナル伝達の制御、及び、これを用いた医薬組成物に関する。									
4	E04802-1	Nucleic acid capable of binding specifically to Ras target protein (新規な核酸塩基対)	US	09/787,196	2000/7/14	Hirao; Ichiro (Asaka, JP), Ishikawa; Masahide (Wako, JP), Fujihara; Tsuyoshi (Wako, JP), Yokoyama; Shigeyuki (Tokyo, JP)	JAPAN SCIENCE & TECH CORP	2005/0191689	2005/9/1	US7101992	2006/9/5
5	E04802-2	同上	EP	EP009463411.8	2000/7/14	HIRAO ICHIRO (JP); ISHIKAWA MASAhide (JP); FUJIHARA TSUYOSHII (JP); YOKOYAMA SHIGEYUKI (JP)	JAPAN SCIENCE & TECH CORP	1114827	2001/7/11	無し	無し
6	E04802-3	同上	JP	特願2001-511459	2000/7/14	平尾一郎、石川正英、藤原健志、横山茂之	科学技術振興事業団	無し	無し	P3893057	2206/12/15
要約		本発明は、立体障害を利用した選択的な新規人工核酸塩基対の形成に関する。また、本発明は、本発明の新規人工核酸塩基対を使用した核酸の複製、転写、および、これを用いたタンパク質合成システムあるいは機能性核酸に関する。より詳細には、本発明は、立体障害を利用した選択的な塩基対を形成させることができる、好ましくは立体障害及び静電的な反発並びにスタッキング作用を利用した選択的な塩基対を形成させることができる新規人工核酸、その製造方法、それを含有してなるコンドン、それを含有してなる核酸分子、これを用いた非天然型の遺伝子の製造方法、前記核酸分子又は非天然型の遺伝子を用いた新規な蛋白質の製造方法などに関する。									

№	特許番号	発明の名称	出願国	出願番号	出願日	発明者	出願人	公開番号	公開日	登録番号	登録日
7	E04803-1	TYROSYL-TRNA SYNTHASE VARIANTS (チロシルtRNA合成酵素変異体)	JP	特願2003-519483	2002/1/11	木賀大介、坂本健作、平尾一郎、横山茂之	科学技術振興事業団	無し	無し	無し	無し
8	E04803-2	同上	US	10/483,636	2002/1/11	Kiga, Daisuke; (Wako-shi, JP); Sakamoto, Kensaku; (Tokyo, JP); Hirao, Ichiro; (Asaka-shi, JP); Yokoyama, Shigeyuki; (Tokyo, JP)	JAPAN SCIENCE & TECH CORP	1424395A1	2004/6/2	無し	無し
9	E04803-3	同上	EP	EP02794635.9	2002/1/11	Kiga, Daisuke; (Wako-shi, JP); Sakamoto, Kensaku; (Tokyo, JP); Hirao, Ichiro; (Asaka-shi, JP); Yokoyama, Shigeyuki; (Tokyo, JP)	JAPAN SCIENCE & TECH CORP	2005-0084856	2005/4/21	無し	無し
要約		<p>[課題] (J)チロシルtRNA合成酵素のアミノ酸配列を改変して、元の天然のチロシルよりも非天然型の3位置換チロシンを高効率で取り込めるアミノ酸配列が改変されたチロシルtRNA合成酵素の変異体を提供する。Eバリン、ロイシン、イソロイシン、アラニン、システイン、セリン、アスパラギン、大腸菌</p> <p>[解決手段] 37位及び/または195位のアミノ酸が改変されたチロシルtRNA合成酵素に開し、また、チロシル合成酵素とこの酵素が結合するアミノ酸のAMP複合体の3-D構造に基づいて改変すべきアミノ酸の位置を決定するチロシルtRNA合成酵素の改変方法を提供する。アミノ酸配列が改変されたチロシルtRNA合成酵素は、例えば3-ヨ-ドチロシンをより効率良く取り込むことができ、非天然のアミノ酸を選択的に、かつ位置選択的に含有する蛋白質(アロタンパク質)を高効率で製造できる。</p>									
10	E04808	Grb2のSH2ドメイン変異体	JP	特願2001-0268000	2001/9/4	齋藤一樹、横山茂之、キムゼフン	科学技術振興事業団	2003-70479	2003/3/11		
要約		<p>[課題] リン酸化された非天然アミノ酸であるリン酸化置換チロシンを含む配列を結合できるSH2ドメインを提供し、レセプターの自己リン酸化部位に置換チロシンを導入し、該変異体SH2ドメインを用いることにより、細胞内にその非天然チロシンアナログのリン酸化の有無をスイッチとした新たな人工情報伝達経路を構築する。</p> <p>[解決手段] アダプタータンパク質のSH2ドメインのリン酸化アミノ酸と結合する部位のアミノ酸配列を、リン酸化された天然のアミノ酸よりもリン酸化された非天然アミノ酸を含有するペプチド又はタンパク質とより強く結合し得るように改変されたSH2ドメイン変異体、及びその製造方法に関する。本発明のアダプタータンパク質は新規な人工的な細胞内情報伝達系を提供することができる。前記したアダプタータンパク質を用いた新規な細胞内情報伝達系、及びそれを構築方法に関する。</p>									
11	E04804-1	EGF/EGFR COMPLEX (EGF / EGFR複合体)	JP	2002-566048	2002/9/12	横山茂之、小木曾英夫、白水美香子、濡木理、石谷隆一郎、齋藤一樹、松末朋和、中尾直樹、村松裕行、篠崎幹彦	科学技術振興事業団、理化学研究所、持田製薬(株)	無し	無し	無し	無し
12	E04804-2	同上	EP		2002/9/12	横山茂之、小木曾英夫、白水美香子、濡木理、石谷隆一郎、齋藤一樹、松末朋和、中尾直樹、村松裕行、篠崎幹彦	科学技術振興事業団、理化学研究所、持田製薬(株)	1479693	2004/11/24	無し	無し
13	E04804-3	同上	CA		2002/9/12	横山茂之、小木曾英夫、白水美香子、濡木理、石谷隆一郎、齋藤一樹、松末朋和、中尾直樹、村松裕行、篠崎幹彦	科学技術振興事業団、理化学研究所、持田製薬(株)	無し	無し	無し	無し
14	E04804-4	同上	US		2002/9/12	横山茂之、小木曾英夫、白水美香子、濡木理、石谷隆一郎、齋藤一樹、松末朋和、中尾直樹、村松裕行、篠崎幹彦	科学技術振興事業団、理化学研究所、持田製薬(株)	2007/0032637	2007/2/8	無し	無し
要約		<p>[課題] (J)上皮増殖因子(EGF)と上皮増殖因子受容体(EGFR)の複合体の結晶に関する。</p> <p>[解決手段] EGF・EGFR複合体の結晶は、EGFとEGFRが1:1で結合し、EGF結合EGFRが二量体を形成している。また、EGFRとEGFR活性調節物質の複合体の結晶、それらの構造座標、該構造座標を用いたEGFR活性調節物質のスクリーニング方法および設計方法、EGFR変異体・EGF変異体の設計方法および製造方法、ならびに該製造方法により得られるEGFR変異体・EGF変異体、EGF / EGFR複合体の構造座標を用いてエピト-プを設計する方法、抗EGFR抗体・抗EGF抗体の製造方法および該方法により得られる抗体、EGFR二量体部位を形成する領域を含むポリペプチドまたはその塩などを開示する。</p>									

公開番号	特許番号	発明の名称	出願国	出願番号	出願日	発明者	出願人	公開番号	公開日	登録番号	登録日
15	E04805-1	NUCLEOSIDE OR NUCLEOTIDE HAVING NOVEL UNNATURAL BASE AND UTILIZATION OF THE SAME(新規なヌクレオチド若しくはヌクレオチド誘導体及びその利用)	JP	特願2004-521123	2003/2/28	平尾一郎 横山茂之 平尾路子 三井雅雄	科学技術振興事業団、理化学研究所 東大TLO	無し	無し	無し	無し
16	E04805-2	同上	EP	03707180.0	2003/2/28	HIRAO ICHIRO (JP); YOKOYAMA SHIGEYUKI (JP); HIRAO MICHIKO (JP); MITSUI TSUNEO (JP)	RIKEN (JP); JAPAN SCIENCE & TECH AGENCY (JP); TOUDAI TLO LTD (JP)	1544294	2005/6/22	無し	無し
17	E04805-3	同上	US	10/521454	2003/2/28	HIRAO ICHIRO (JP); YOKOYAMA SHIGEYUKI (JP); HIRAO MICHIKO (JP); MITSUI TSUNEO (JP)	JAPAN SCIENCE & TECH AGENCY (JP)	2006/0263771	2006/11/23	無し	無し
要約		<p>【課題】非天然型塩基を有することにより、アプタマ - 等の新規機能性分子の創製等に有用なヌクレオチド又はヌクレオチドを提供する。組み込、核酸 アンチセンス、DNA、RNA、リボザイム</p> <p>【解決手段】ヌクレオチド又はヌクレオチドは、5位置換 - 2 - オキソ(1H) - ピリジン - 3 - イル基を塩基として有する。好ましくは、塩基の5位が、以下の1)ヨウ素、臭素から選択される光反応性基、2)アルケニル基、アルキニル基若しくはアミノ基、又はその誘導体、3)ピオチン又はその誘導体、あるいは4)フルオレセイン、6 - カルボキシフルオレセイン、テトラメチル - 6 - カルボキシロ - ダミン、及びそれらの誘導体から選択される蛍光分子、からなるグル - プから選択される置換基によって置換されている。尚、6位置換された2 - アミノ - プリン - 9 - イル基を塩基として有するヌクレオチドを含む核酸を鋳型として転写、複製又は逆転写を行い、6位置換された2 - アミノ - プリン - 9 - イル基を塩基として有するヌクレオチドの相補的な位置に、ヌクレオチドを組み込むことにより、ヌクレオチドが組み込まれた、核酸を調製する。</p>									
18	A048-01	抗がん剤	日本国特許庁	特願2004-43377	2004/2/19	平尾一郎 横山茂之	理化学研究所 東大TLO	2005-232079	2005.9.2	無し	無し
要約		<p>【課題】高い抗がん活性を有し、副作用が少ない抗がん剤を提供すること。</p> <p>本発明は、特定の(6 - ヘテロアリアルプリン)ヌクレオチド化合物を有効成分として含有する抗がん剤及び抗がん剤組成物に関する。</p>									
19	A048-03	真核生物においてリジン誘導体を部位特異的にタンパク質に導入する方法	日本国特許庁	特願2005-224638	2005/8/2	横山茂之、坂本健作、小林隆嗣、柳沢達男	理化学研究所	2007-037445	2007.2.15	無し	無し
要約		<p>【課題】アミノアシルtRNA合成酵素、アミノアシルtRNAを用い、真核細胞中で、非天然型アミノ酸組み込み蛋白質を製造する方法の提供；かかるアミノアシルtRNAを真核細胞中で合成する方法の提供；tRNA、かかるtRNAの合成に用いる核酸の提供。</p> <p>【解決手段】アミノアシルtRNA合成酵素と、アミノアシルtRNA合成酵素の存在下で非天然型アミノ酸と結合可能なtRNAの核酸配列の5'末端に、真核生物由来tRNA核酸配列を結合させた配列を含む核酸と、非天然型アミノ酸と、所望の位置にナンセンス変異を受けた所望の蛋白質遺伝子と、を真核細胞中で発現させ、前記蛋白質のナンセンス変異の位置に前記非天然型アミノ酸を取り込ませて非天然型アミノ酸組み込み蛋白質を発現させることを特徴とする非天然型アミノ酸組み込み蛋白質の製造方法。</p>									
20	A048-06	リン酸化された非天然型アミノ酸を認識する抗体及びその利用	日本国特許庁	特願2004-337267	2004/11/22	坂本健作 横山茂之	理化学研究所	2006-143669	2006.6.8		
要約		<p>【課題】タンパク質の所望の位置のアミノ酸が細胞内でリン酸化を受けるか否かを検出する方法及びそのための抗体を提供する。</p> <p>【解決手段】タンパク質中のホスホチロシン残基及び3 - ハロゲン化チロシン残基とは結合せず、3 - ハロゲン化ホスホチロシン残基と結合することを特徴とするモノクローナル抗体、及び当該抗体を用いてタンパク質の所望の位置に導入されたチロシン誘導体が哺乳動物細胞内のチロシンキナーゼによってリン酸化されるか否かを検出する。</p>									

特許番号	発明の名称	出願国	出願番号	出願日	発明者	出願人	公開番号	公開日	登録番号	登録日
21 A048-07	修飾ポリペプチドの製造方法	日本国特許庁	特願2003-097283	2003/3/31	坂本健作 横山茂之 児玉 公一 部	理化学研究所	2006-180709	2006.7.13		
要約	<p>【課題】ポリペプチド内の位置特異的に、所望の分子を導入する方法であって、他の位置が修飾されることなく、ポリペプチドの分解や変性を防ぐことができる、修飾ポリペプチドの製造方法を提供する。 【解決手段】炭素-炭素不飽和結合又は該結合とクロスカップリング反応可能な官能基の一方を有する非天然型アミノ酸を含有するポリペプチドと、炭素-炭素不飽和結合又は該結合とクロスカップリング反応可能な官能基の他方を末端に有する分子とを、金属触媒の存在下、前記ポリペプチドの分解又は変性を抑制する条件において反応させ、前記非天然型アミノ酸に前記分子を付加することを特徴とする、修飾ポリペプチドの製造方法。</p>									
22 E048-06-1	METHOD OF EXPRESSING PROTEIN HAVING UNNATURAL AMINO ACID INTEGRATED THEREINTO (非天然型アミノ酸組み込みタンパク質の発現方法)	JP	特願2004-548112		横山茂之 白水美香子 坂本 恵香 坂本健作	理化学研究所 科学技術振興機構				
23 E048-06-2	同上	CA	CA2503749	2003/10/31	SHIROUZU MIKAKO (JP); YOKOYAMA SHIGEYUKI (JP); SAKAMOTO AYAKO (JP); SAKAMOTO KENSAKU (JP)	RIKEN (JP); JAPAN SCIENCE & TECH AGENCY (JP)				
24 E048-06-3	同上	EP	03809875.2	2003/10/31	SHIROUZU MIKAKO (JP); YOKOYAMA SHIGEYUKI (JP); SAKAMOTO AYAKO (JP); SAKAMOTO KENSAKU (JP)	RIKEN (JP); JAPAN SCIENCE & TECH AGENCY (JP)	1557469	2005/7/27		
25 E048-06-4	同上	US	10/532,948	2003/10/31	SHIROUZU MIKAKO (JP); YOKOYAMA SHIGEYUKI (JP); SAKAMOTO AYAKO (JP); SAKAMOTO KENSAKU (JP)	RIKEN (JP); JAPAN SCIENCE & TECH AGENCY (JP)	2006/0234339	2006/10/19		
要約	<p>【課題】(J)動物細胞内における、非天然アミノ酸組み込みタンパク質の発現方法、並びに上記タンパク質を発現させるために用いるDNA、発現ベクター、及び動物細胞を提供する、Eステアロサ-モウイルス、制御配列、クロニ化、CHO細胞、アンバ-変異、ウエスタンプロット 【解決手段】(A)大腸菌由来のチロシルRNA合成酵素の変異体であつて、チロシンに対する特異性に比べて非天然型のチロシン誘導体に対する特異性が高められた変異チロシルRNA合成酵素と、(B)変異TyrRSの存在下でチロシン誘導体と結合可能な、パチルス属、マイコプラズマ属、又はスタフィロコッカス属真性細菌由来のサブレッサー-tRNAと、(C)所望の位置にナンセンス変異を受けた所望のタンパク質遺伝子とを動物細胞中で発現させて、タンパク質のナンセンス変異の位置にチロシン誘導体を取りこませることを特徴とする、非天然型アミノ酸組み込みタンパク質の発現方法である。</p>									
26 A048-08	チロシルRNA合成酵素の変異体及びその作製方法	JP	特願2003-032932	2003/2/10	高橋正裕,小林隆嗣,坂本健作,横山茂之,瀧木理	理化学研究所	2006-180701	2006.7.13		
要約	<p>【課題】チロシン誘導体に対する基質特異性又はアンバーサブレッサー-tRNAに対する反応速度が高められたTyrRSの提供。 【解決手段】特定アミノ酸配列において、Tyr32、His70、Asp158,のうちの1以上、又はTyr32、Asp158、His177,のうちの1以上のアミノ酸残基を別のアミノ酸残基で置換した配列からなり、かつチロシンを基質とするアミノアシルRNA合成酵素活性よりも3-ヨードチロシンを基質とするアミノアシルRNA合成酵素活性が高められた変異TyrRS、又はAsp286が別のアミノ酸残基で置換された配列を有する変異TyrRSであつて、上記アミノ酸配列からなるTyrRSに比べて、アンバーサブレッサー-tRNAに対するアミノアシル化反応速度が高められた変異TyrRS。</p>									