

戦略的創造研究推進事業 CREST

研究領域「たんぱく質の構造・機能と発現メカニズム」

研究課題「ゲノム蛋白質の高効率・高精度 NMR
解析法の開発」

研究終了報告書

研究期間 平成 13年 12月～平成19年 3月

研究代表者：甲斐荘 正恒

(東京都立大学大学院理学研究科名誉教授・
首都大学東京客員教授)

1 研究実施の概要

本研究課題の構想は、研究代表者甲斐荘が 30 余年にわたり連綿と続けてきた安定同位体利用 NMR 技術開発の流れの中から生まれたものである。平成 8 年度に採択された CREST 課題「安定同位体利用 NMR 法の高度化と構造生物学への応用」の提案時において、甲斐荘は構造生物学を基盤とする蛋白質・核酸など生体高分子物質の立体構造と機能に関する大規模プロジェクト時代の到来を予測し、その基盤技術として我が国が世界をリードする安定同位体利用 NMR 技術の更なる高度化を図ることの戦略的重要性を指摘した。この最初の CREST 課題が終了を迎えた平成 13 年において、予期したようにゲノム蛋白質の網羅的立体構造の解明が生命科学の重要課題として浮上し、我が国においては大規模な構造ゲノム科学プロジェクト“タンパク 3000”としてスタートした。”タンパク 3000”の際だった特徴に、既に方法的にほぼ確立している X 線解析法と並び、NMR 法が大きく取り入れられたことがあげられる。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、未だに発育途上にある若い技術であることを見逃してはならない。従って、大規模な構造・機能ゲノム科学に有効な中核的手法として利用するためには、先ずは基盤技術開発が不可欠である。このような国内外の専門家からの指摘は、“タンパク 3000”プロジェクト自体では取り上げられることは無かったが、本 CREST 課題「ゲノム蛋白質の高効率・高精度 NMR 技術の開発」として、開発途上にあった新規 NMR 解析技術の開発を継続できたことは幸運であった。

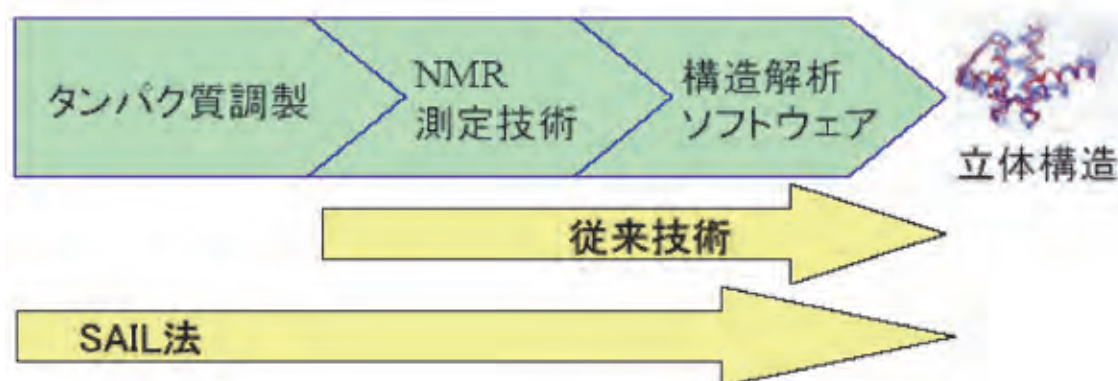


図-1 NMR 技術の基本的要素

NMR 解析技術開発は図-1 に示したように、3 段階の基本的要素から構成されている。従来の欧米を中心とする NMR 技術開発は、主として第二段階の NMR 測定関連技術、即ち多次元 NMR 測定技術、パルス・磁場勾配技術、測定機器関連技術開発（高磁場、高感度プローブ等）、及び第三段階の構造解析ソフトウェア関連技術、即ち NMR データの処理・解析技術、構造決定アルゴリズム開発等に向けられて来た。しかしながら、X 線解析法においては蛋白質試料の結晶化技術が最大の課題であるように、NMR 法においても NMR 測定・解析に至適化した試料調製技術の重要性は極めて高い。第一段階の蛋白質調製技術開発を埒外においた従来の NMR 技術開発はいわば、不完全な結晶を力任せに X 線構造解析するに等しく、基本的に誤った戦略であるとも言える。我々はこのような戦略によつては、NMR 手法開発は早晚限界を迎えることは明らかであり、蛋白質試料の最適化を含めた総合的な技術開発が重要であることを長年主張し続けてきた。要するに、蛋白質試料の持つどの要素が NMR 構造決定を複雑且つ困難にしており、構造精度や分子量限界を著しく不満足な段階に留めているのかを明らかにすることが何よりも重要である。問題点を明らかとすることができれば、それらを安定

同位体利用技術によりどのように解決、或いは軽減できるのかを見極め、蛋白質試料調製段階で解決することが我々の課題である。

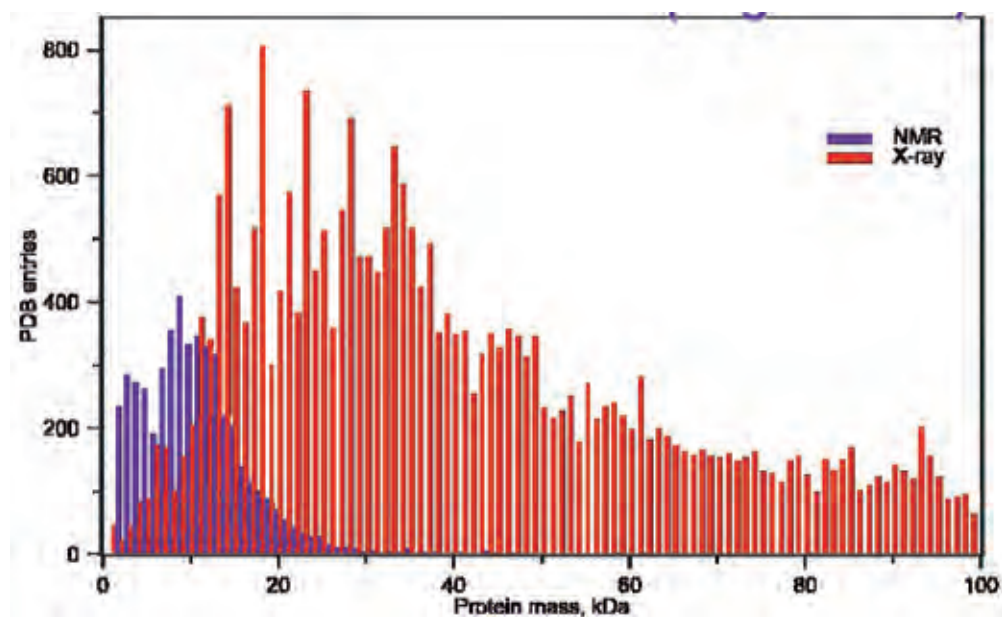


図-2 NMR と X 線解析により決定されたタンパク質の分子量分布

図-2 は PDB (Protein Data Bank) に登録された蛋白質の立体構造データを用いて、NMR と X 線解析により決定されたタンパク質の分子量分布を比較したものである。NMR 技術の開発で特に重要なポイントは限界分子量の拡大にあることは本図から明瞭であろう。X 線解析においては実質的に分子量限界が存在しないことから、NMR 構造の分布は方法的な限界から大きく低分子量に偏っていることがわかる。既存の蛋白質 NMR 解析技術を用いる限り、25kDa 以上のタンパク質は事実上、構造決定の対象とはならないのが現状であった。このことから、溶液中での動的状態を精密に解析できる唯一の手法として大きな期待を掛けられながら、NMR 法は、徐々に構造生物学における中心的構造解析手法から滑り落ちるのではないかという危機感を専門家は持っている。本課題において、NMR 手法開発が再び大きく前進するための道筋を明確に示すことができたことは誇るべき最も重要な成果である。次に簡潔に本研究の実施がどのように行われたのかを説明する。

本研究課題の達成に必要な要素技術は次の 3 項目に集約される：①立体整列同位体標識 (stereo-array isotope labeled: SAIL) アミノ酸類の合成技術の開発；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、何れも本研究の課題である 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技術要素である。平成 13 年から開始した本課題研究期間の前半 2-3 年間内における最大の目標は、幾つかの蛋白質を対象として全ての構成アミノ酸残基を全て SAIL アミノ酸に入れ替えた蛋白質、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い、SAIL 法の基本技術の有効性を実証することに向けられた。この目標に徹底的に集中できたことは 5 年間という長期に渡り基礎研究活動を助成する CREST の利点であり、実証試験は予想を上回る成功を収めた。初めて SAIL 法により立体構造解析を行った蛋白質はカルシウム結合蛋白質として極めて重要なカルモジュリン (calmodulin) であった。17.2kDa とそれほど大きな分子量ではないものの、通常の NMR 解析手法で得られる精度を上回る精密な立体構造が CYANA (NOE 自動帰属法) の利

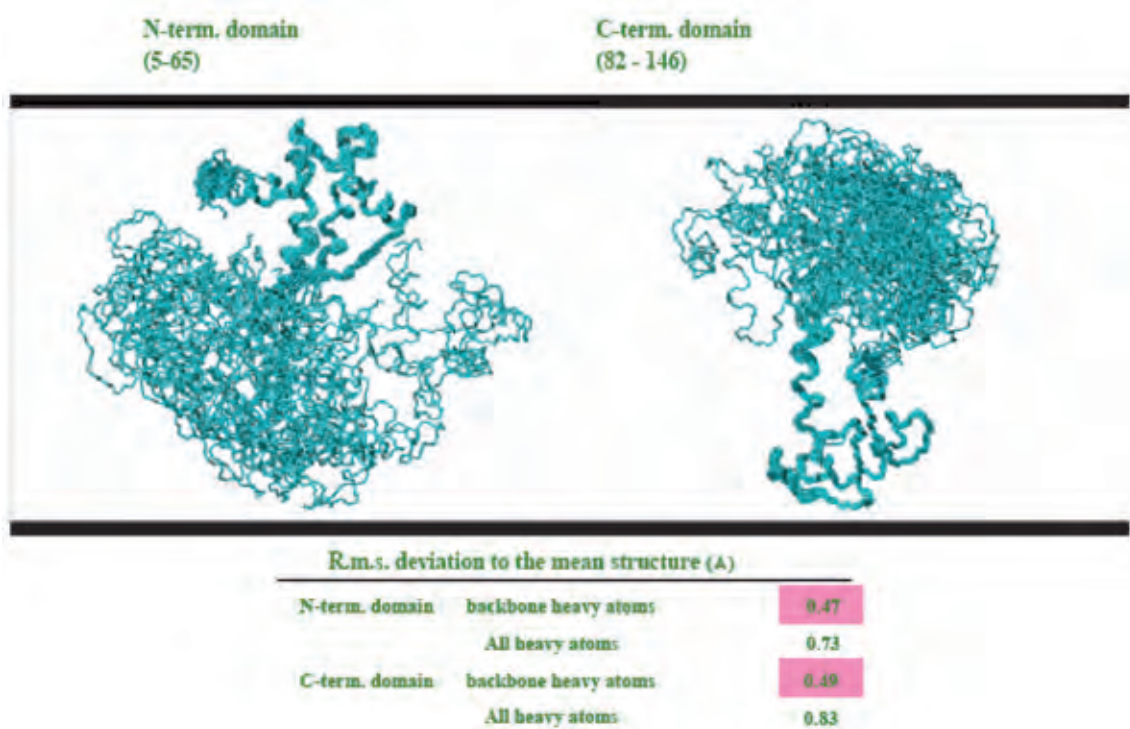


図-3 SAIL-CYANA 法により構造決定されたカルモジュリンの構造

用により極めて短時間で可能であることが示された(図-3)。この結果は Nature 誌に Article として掲載され大きな反響を呼んだ[Kainosho, M. *et al.*, *Nature*, 440, 52-57(2006)]。

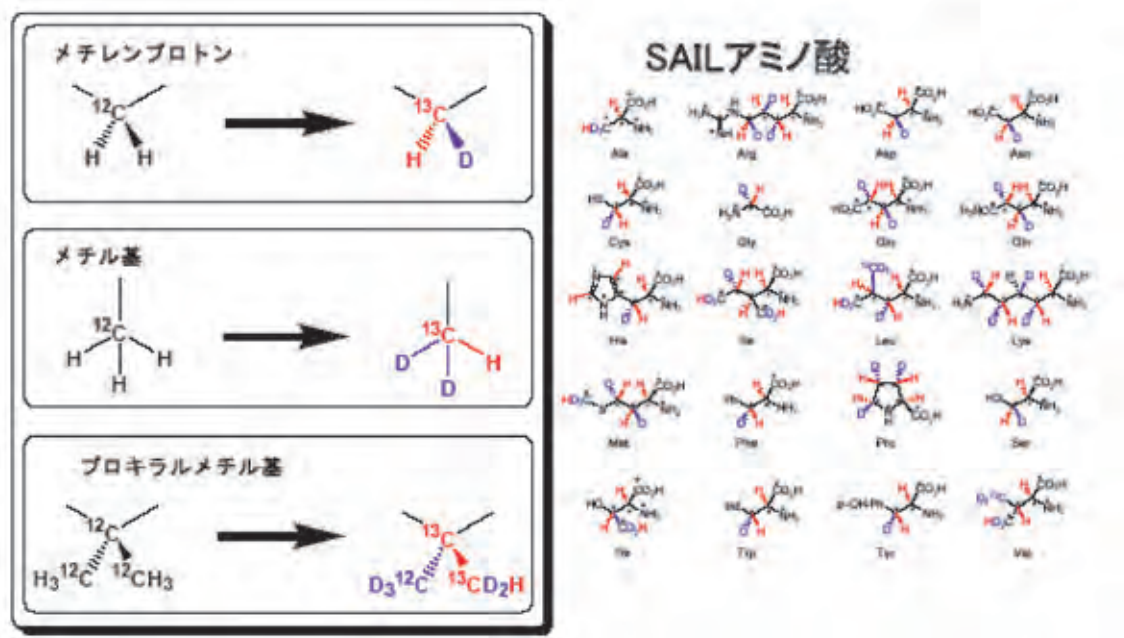


図-4 SAIL アミノ酸の基本設計と各アミノ酸の立体配置

図-4 に示したように、SAIL 法の基本的なアイディアは重複した NMR 構造情報の系統的な削減手法である。NMR 構造情報は水素核 (^1H) NMR によって得られるために、具体的にはメ

チレンのように同一炭素に二つの水素原子がある場合には、その一方を立体選択的に重水素化することにより、単にメチレン水素の NMR シグナル数を半減させるに留まらず、立体構造精度の向上、シグナル感度の増大など多くの利点が得られ、またその結果より高分子量のタンパク質の立体構造決定が、迅速且つ高精度に可能となることが実証された。

平成 13 年度からスタートした本課題の進行とともに、時代的背景もまた急速に変化しつつある。今後は、疾患関連蛋白質や膜蛋白質など難易度の高い蛋白質の構造解析構造解析への応用をめざした SAIL 技術の改良も重要課題として浮かび上がり、平成 16 年度からその取り組みも始めたが、明確な実証には至っていない。上述した SAIL 法を構成する三つの要素技術は広範な領域に渡り、また何れの技術に関して SAIL 技術が要求する水準は各領域における最先端技術であることを考慮すれば、一研究課題の枠内のみで全ての要素技術開発を包括的に開発するという戦略は、今後見直しが必要となろう。このような認識のもとに、本課題の提案当初より、多様な展開が期待される SAIL 技術の中で既に開発段階を乗り越えたと判断される部分に関しては、本課題とは別個に開発研究を進めてきた。特に、SAIL アミノ酸の供給体制の整備は SAIL 法の実用化にとって不可欠の開発事項ではあるものの、必ずしも本課題で扱い続けることは適当とは思えない。このことから、ベンチャー SAIL テクノロジーズを起業し多量供給体制の整備を図っている。この結果、本課題においては徐々にその中心課題を、SAIL 技術の将来の発展を目指した最先端部分への取り組みへと特化させ、限られた時間とリソースの有効利用を心がけた。

2 研究構想及び実施体制

(1) 研究構想

平成 8 年度に生体高分子の構造生物学基盤技術としての安定同位体利用 NMR 技術の高度化を CREST 課題として提案した当時と比べ、平成 13 年に本課題の開始時の時代背景は明らかに変化した。平成 8 年時においては、NMR 技術の高度化の目標として核酸と蛋白質を並列的に扱い、分子量限界の向上と精密構造情報の取得を同時に達成する新たな NMR 解析技術開発を全面に打ち出して研究に取り組み大きな成果を得た。しかしながら、この 5 年間の間に核酸関連の NMR 解析技術は成熟し大きな目標とはならなくなった。一方、時代の要請とともに蛋白質科学をゲノム科学の枠組みのなかで大きく旋回するなかで、従来は個別の蛋白質に固有な生物機能の解明を志向した構造生物学的研究が主な活躍の場であった NMR においても“high-throughput”構造決定のための技術開発の重要性・緊急性が際立って増すことになった。本課題の研究期間の平成 13 年から 2-3 年間においては、球状蛋白質の高効率・高精度蛋白質立体構造決定技術の完成に主力を注ぐのはこのためである。我が国の構造ゲノム科学における国際的寄与を、短時日の内に明瞭な形で示す必要がある以上、我が国を代表する生体系 NMR 研究グループである我々にとっては不可避の選択である。開始当初の年次計画書に詳細を述べたように、世界標準技術として従来の手法を一新する“high-throughput”構造決定技術として認知を受けるためには、以下に示す 3 基本要素技術の整合性のある開発が不可欠である：①高度な安定同位体標識アミノ酸の多量（グラムスケール）調製；②同位体標識アミノ酸類を無細胞蛋白質合成系により蛋白質試料に組み入れる技術の一般化；③高度選択的に同位体標識した蛋白質試料を用いる NMR 構造解析プロトコルの確立。特に十分な考慮を払うべき点は、本技術を利用する際のコストとアクセシビリティである。この問題を解決すれば、殆ど確実に全ての蛋白質 NMR 研究は本技術を基盤として利用し、次世代の世界標準として実用化が進むことになろう。

本技術は構造解析精度を向上させると同時に、立体構造決定の迅速化を達成できる夢の技術である。もう一つの重要な利点は従来 NMR 解析の対象とならなかった広範な蛋白質群がその守備範囲に含まれる可能性が出てきたことにある。例えば、全ゲノム蛋白質の 25-30%に及ぶとされる膜蛋白質の構造解析が SAIL 法により可能となれば、医薬開発を含めてゲノム情報の産業応用への弾みがつくであろう。固体 NMR においてはシグナルの線幅は蛋白質の分子量とは無関係である点、膜蛋白質や超分子複合系等巨大な分子量を持つ試料の構造情報の

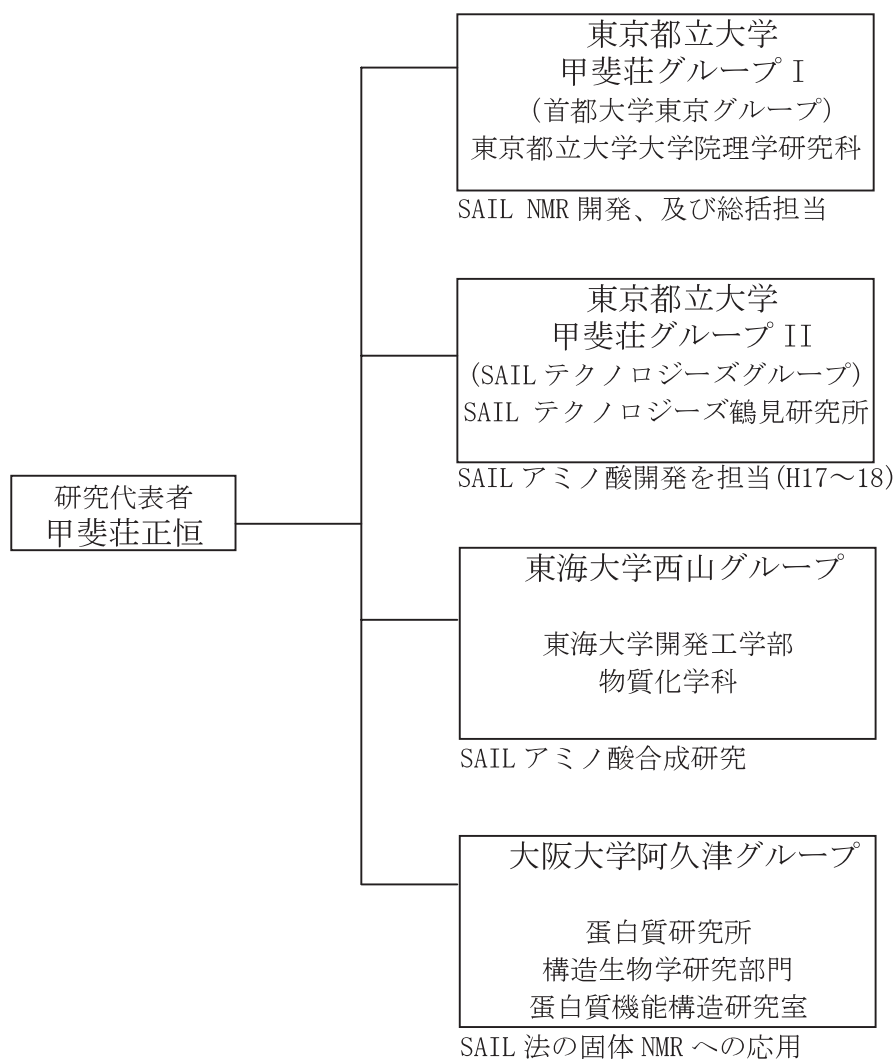
取得において優れている。しかしながら、従来の応力等を利用して一定方向に配向させた試料、或いは凍結乾燥試料に対するマジック角試料回転法の応用など測定技術を利用した高分解能測定によってもシグナルの線幅は広く、シグナル相互の分離は十分ではない。このように、固体 NMR の蛋白質への応用は本来の実力を発揮できない状況にある。本課題では、画期的な安定同位体標識試料調製技術と、次々と開発されつつある固体 NMR の新しい測定技術と組み合わせることにより、革新的な固体 NMR 構造解析法として結実させたい。これまで欧米が先鞭をつけてきた固体 NMR 分野において、我が国独自の安定同位体標識技術を手掛かりとして、我が国発の独創的構造解析技術を世界に向けて発信することの戦略的意義は極めて大きい。大阪大学蛋白質研究所の参加は今後の布石として幾つかの重要な成果を生んだ。

以上は、平成 13 年 11 月に全体計画として提出した原文とほぼ同文である。この当初の見通し通りに研究は進行し、平成 16 年初めには立体整列同位体標識 (Stereo-array isotope labeling : SAIL) 法、と我々自身が名付けた独創的な NMR 解析手法が一応の完成を見た。平成 17 年秋に Nature 誌に Note として投稿した SAIL 法の論文は高い評価を受け、editor からの指示により Article へと書き換えた後平成 18 年 3 月 6 日に公表された。蛋白質 NMR 解析技術の論文として Nature 誌の Article に掲載されることは異例であり、将来に渡って蛋白質科学の基盤解析技術として大きなインパクトを与える独創的技術として認められたことを意味する。平成 8 年度から CREST 研究を開始してから既に 8 年間、そもそもこの考えを 70 年代初めに発想してから 30 年を越える歳月の賜物である。このような、地味な解析基盤技術に長期にわたり多額な研究助成金が与えられることは、欧米においても稀でありこの成果を活かし、日本発の次世代世界標準として SAIL 法を発信することは我々に課せられた今後の最大の目標である。

研究組織の変遷に関して簡単に記す。組織は当初、都立大学で SAIL 法の実証例を示し、その後大阪大学で固体 NMR へと SAIL 法を拡張することを提案したために二つの拠点から構成されていた。これは、SAIL 法の実証試験により、我々の仮説を明確に裏付けることを最優先したためである。この為、SAIL 法の実用化においては極めて重要な要素技術である SAIL アミノ酸合成技術の開発体制が手薄となった。このために、平成 14 年から前の CREST 課題の共同研究グループである東海大学西山グループに再び参加を求めた。SAIL 技術の実用化は課題採択の際に強く求められた点でもあり、また平成 14 年度から 2 年余りの間、当時開始されたばかりの文部科学省の大学等発ベンチャー創出支援事業の助成により、SAIL アミノ酸のグラムスケールでの合成技術開発を実施できた。その事業の終了を待たず平成 16 年 10 月にベンチャー” SAIL テクノロジーズ社 “を横浜市鶴見の横浜市産学連携施設において立ち上げた。西山グループの参加は大いにこれらの開発研究の促進に役立った。

平成 16 年 3 月に代表者甲斐荘が停年退官をしたと同時に、東京都立大学が首都大学東京へと組織改編を行ったことによる組織上の混乱から、研究開始当初に予期した有機合成スペースの継続使用が適わず大幅な組織変更を余儀なくされた。幸いなことに、既に SAIL 社が立ち上がっていることを受けて、合成関係の職員は全て鶴見研究所に移動し、中断することなく研究開発を継続できた。次項の実施体制において当初同一の場所に存在した甲斐荘グループが二カ所に分かれたのはその理由である。平成 17 年頃より、急速に構造ゲノム科学から、より機能を重視した機能ゲノム科学を加えた研究方向が注目されるようになり、研究開始当初に比べ、より生物学的に重要な機能を持つ超分子複合系や膜蛋白質への SAIL 法の拡張が今後の課題として浮かび上がってきた。第二世代の SAIL 技術として SAIL 社に新たなデザインで SAIL アミノ酸を設計し、合成することを委託し道半ば迄漕ぎ着けている。この手法の実証試験には後 2 年程度の時間が掛かるが、残念ながら CREST 課題としてこの完成を見ることはできない。しかしながら、タンパク質解析基盤技術開発として新たなプロジェクトに SAIL 関連技術の開発が採択されており、平成 19 年度より次世代の SAIL 技術の開発を含め、CREST で端緒を切った SAIL 技術の展開と世界標準化は継続して進められる予定である。

(2)実施体制



(注)平成17年 3 月に代表者甲斐荘が停年退官し、また東京都立大学が組織改編とともに名称変更により首都大学東京となった。このことを受け、平成 17 年 4 月以降は、旧都立大グループは首都大学東京内の CREST 研究施設を利用する SAIL NMR 開発担当(グループ I =首都大学東京グループ)と SAIL アミノ酸開発担当(グループ II =SAIL テクノロジーズグループ)に分かれて研究を継続実施した。両グループは甲斐荘が統括した。

3 研究実施内容及び成果

3.1 SAIL 法の開発

(東京都立大学 甲斐荘グループ: I、首都大学東京 G; II、セイルテクノロジーズ G)

(1)研究実施内容及び成果

様々な生物種に関するゲノム情報の集積が進む一方、蛋白質構造情報をより迅速に得る手法の開発が求められる。現在、年間に 5,000 を越える数のタンパク質の立体構造データが世界で生み出され、国際的な機関に登録されていると推定される (図-5)。これらの解析データの内、約 85% は X 線結晶解析によるものである。残りの 15% 程度が NMR 法の寄与による。

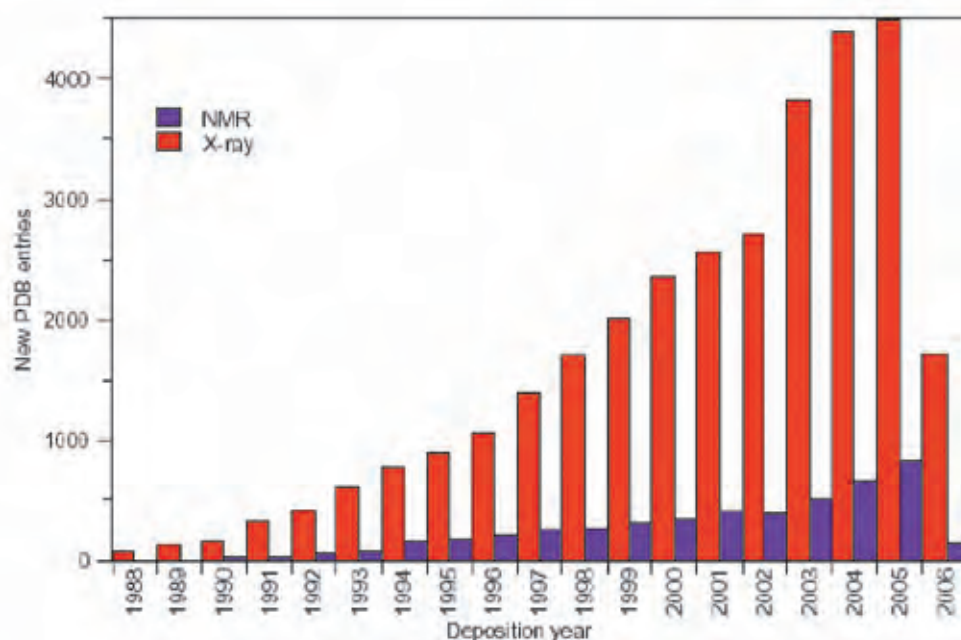


図-5 NMR と X-線解析で構造決定された蛋白質数の年次変化

NMR 法は結晶化を必要とせず、蛋白質が機能を発現する状況に近い、水溶液中での構造決定が可能であるために、立体構造と機能の関連を明らかにする構造生物学研究の中核的な研究手法として大きな期待が寄せられてきた。しかし、これまでの NMR 解析技術は図-2 の統計で示されたように、分子量上限が 25kDa と多くの生物学的に興味のある蛋白質に適用することができない上に、図-5 に示されたように構造決定の効率という観点においても X 線解析法には遥かに及ばない。このことは、従来の NMR 解析技術は幾つかの重大な方法論的制約を抱えており、それらの抜本的解決が図られなければ、立体構造決定手法としての NMR 法は徐々に表舞台から消えて行くことになろう。本グループの課題は、NMR 解析用に最適化した蛋白質試料調製技術を含めた総合的な観点から従来の NMR 解析技術を遥かに凌ぐ新技術の創出をめざしたものである。以下、我々が SAIL 法と命名した新技術をわかり易く説明し、如何にこの手法が従来の手法と比べて原理的に優れており、またこの技術を次世代の世界標準として発信する上でどのような問題が残されているのかを明らかにしたいと思う。

従来の NMR 法の問題点

蛋白質の構造決定手法としての NMR 法は 80 年代半ばから急速に発展した新しい手法であり、その開発の歴史は対象となる分子量限界の拡大に向けた飽くなき挑戦の歴史でもある。しかしながら、過去 20 年余の努力にも関わらず、現在においても NMR 法により構造決定可能な蛋白質の分子量は事実上 25kDa 程度である (図-2)。X 線解析法においては、分子量に

依存する構造解析限界は事実上存在しない。従って、PDB に登録されている蛋白質結晶構造データの分子量分布は、解析対象となる蛋白質そのものの分布を表すと考えられ、分子量 50kDa 程度迄を NMR 法の解析対象とすることができれば、現在 PDB に登録されている大多数のタンパク質がその中に含まれることになる。即ち、分子量限界を現在の 2 倍程度に拡大することが NMR 法を X 線解析法に伍して構造決定法として利用され続ける上での不可欠の条件ともいえよう。

NMR 法においては蛋白質水溶液を高い静止磁場中に置くことにより、構成元素 (^1H 、 ^{13}C 、 ^{15}N) の持つ核スピンを磁化させ、それらが共鳴吸収するラジオ波の周波数分布と吸収強度をスペクトルとして観測する。固有の立体構造を持つ蛋白質では、構成元素の置かれた局所的環境 (化学シフト) は全て微妙に異なることから、NMR スペクトルは極めて複雑となる。そこで、蛋白質の主要な構成元素である炭素と窒素を、天然同位元素比では僅か 1% 以下しか存在しない核スピン ($1/2$) を持つ ^{13}C や ^{15}N に置換した“同位体標識”蛋白質試料を調製し、直接観測する ^1H スピン軸以外にも複数の間接観測軸を導入した多核種多次元 NMR スペクトルを測定する。しかしながら、NMR スペクトルにおけるシグナル数は分子量に比例して増加するため、このような多次元 NMR スペクトルにおいても、個々のシグナルを分離観測し、それらの全てを帰属することは容易ではない。さらに大きな問題は、分子量の増大により、溶液内でのタンパク質の回転運動は次第に遅くなり、それにつれて個々の NMR シグナルの線幅が広がることにある。このような線幅の増大は、NMR 検出感度の極端な低下、延いては NMR 測定時間の増大につながり、スペクトル解析のみならずスペクトルの測定自体を困難にする。このような蛋白質試料そのものが持つ原理的な問題により、NMR 法の適用範囲が 25kDa 程度の分子量限界に留まっているのである。

ポストゲノム時代における NMR 構造解析技術に要求される条件としては、精密な立体構造が迅速に得られる手法であることは当然として、このような分子量限界の拡大こそ最も重要な要件である。

新たな視点からの NMR 技術開発

蛋白質の NMR による構造決定技術は、その誕生から今日に至る迄、激しい開発競争が繰り広げられ、過去 10 数年の間に本分野から 2 名のノーベル賞受賞者を生んでいる (1991 年、ETH Richard R. Ernst ; 2002 年、ETH Kurt Wüthrich)。前述したように、欧米を中心とした従来の NMR 構造解析手法の研究は、様々なパルス技術を駆使した高感度・高効率な多次元 NMR スペクトルの測定・解析技術の開発、及び多様な NMR パラメータを利用する溶液内中でのタンパク質の立体構造決定方法の開発、という二つの段階に集中してきた (図-1)。我々は、上述した NMR 解析上の問題点の本質的解決には全く別の視点からの取り組みが必要であると考えた。即ち、従来は調製が簡便であるという理由から、 ^{15}N や ^{13}C 、或いは ^2H (重水素) 等を用い均一に同位体標識した蛋白質試料の利用を前提条件として、その後の様々な技術要素の高度化に取り組んだことを見直し、蛋白質試料を NMR 解析に最適化するために安定同位体標識技術そのものの高度化を図る新しい視点から開発に取り組んだのである。解決困難な問題に力任せに取り組むかわりに、問題そのものを簡素化する方策を模索すべきではないか、と考えたのである。このために、特に重視した標識技術は、最近の多次元 NMR 法においては余り重視されてこなかった重水素の徹底的な利用である。

NMR 解析に最適化した蛋白質試料の設計

高分子量タンパク質においては ^1H シグナルの絶対数が増加するために、仮に ^{13}C 、 ^{15}N 等の異核種を間接観測軸に用いる多次元 NMR スペクトルにおいても、シグナルは相互に重なり合い、それらの分離観測・帰属の困難さは飛躍的に増すことは既に述べた。一方、特定のアミノ酸残基のみを同位体標識するアミノ酸選択標識法、ペプチド鎖の特定セグメントのみを選択的に同位体標識する区分標識法等、観測可能な NMR シグナルの絶対数を減少するためにサブスペクトルを測定する試みはこれまで数多く報告されてきた。これらの手法はスペクトルの単純化という観点からは、何れも極めて有効な手法であるが、高分子量化に伴う NMR

シグナルの広幅化（測定感度の低下）を避けることはできず、またこのような手法により得られる部分的構造情報の積み上げによる立体構造決定は容易ではない。

^1H シグナル数を減らし、スペクトル解析を容易にする伝統的なアプローチに蛋白質への ^2H （重水素）標識法の利用技術がある。その一つで、現在においても利用されている手法として部分重水素標識法があり、例えば蛋白質のメチル基や芳香環の ^1H のみを残し、その他の ^1H を全て重水素置換する手法などがそれである。 ^2H は ^1H のNMR周波数領域において共鳴シグナルを与えないため、部分重水素標識した蛋白質を試料とすれば、重水素化されずに残存したメチル基や芳香環の残存 ^1H のシグナルのみが観測される。このようなアプローチを用いれば、大幅なスペクトルの簡略化が実現する。一方、この方法では立体構造の精密化にとって不可欠な ^1H シグナルの多くが同時に失われることになり、決定できる構造の精度は低く、蛋白質の大まかな折りたたみ構造（global fold）のみが得られる。このような、重水素化による構造情報の極端な喪失を避ける方法としては、タンパク質中を50–80%程度の重水中で発現するなどの手段で、比較的簡便に調製できる“ランダム”重水素標識蛋白質の応用も一時試みられた。ランダム重水素標識体の利点は残余 ^1H のNMRシグナルの線幅が著しく鋭くなる点にある。このために、観測する水素核（ ^1H ）自身も重水素化され実効的な ^1H スピン濃度が低下するにも関わらず、測定感度はむしろ上昇し、シグナルの分離も向上するとされる。しかしながら、ランダム重水素化に伴い無数の同位元素異性体（isotopomer）が存在し、また重水素化による同位体シフトにより微妙に異なった化学シフトを持つシグナルが生じることから、シグナル数はむしろ大幅に増加する。これらの事実を考慮すれば、ランダム重水素化蛋白質は理想的なNMR試料からは掛け離れたものであることは自明であり、現在では殆ど利用されていない。

一方、重水素化していない通常の蛋白質試料においては、測定したNMRスペクトルには原理的には観測可能な全ての構造情報が含まれているものの、それらが全て観測できるわけではなく、また全てが構造決定に必要というものでもない。むしろ、それらの構造情報は互いに重複しており、或は立体構造決定にはさして意味を持たない情報である場合も多い。現実的には蛋白質の分子量が増せば増すほど、NMRシグナルの重なるのためにスペクトルから個別の距離情報として得られるものは少なくなる。もし、我々が重複した構造情報を与える水素を重水素化により徹底的に削減し、立体構造決定に有用な構造情報のみを残すような試料を調製できるならば、NMRスペクトルは必要な構造情報は一切失うことなく大幅に簡略化できるであろう。このような理想的なNMR試料を利用すれば、スペクトル解析に割く労力と時間が激減するだけでなく、従来の限界を越えた高分子量タンパク質の解析も可能になり、また得られる立体構造精度の大幅な改善も同時に達成されることになる。

SAIL(立体整列重水素化: stereo-array isotope labeling) 法

NMR構造解析にとって理想的な蛋白質試料とはどのようなものであるかを上述した。実際には、構造決定に必要なNMR情報を削減する方法は無数にある。しかしながら、ある一定の原則に従ってシステムティックに蛋白質を構成する20種類のアミノ酸について理想的な重水素置換体を設計することにより、それらから構成された蛋白質自体をNMR構造情報の取得に最適化することが可能である。位置、及び立体選択的な重水素化を徹底的に進めるとともに、多核種多次元NMRの利用を前提として、必要に応じてアミノ酸中の炭素や窒素原子を、 ^{13}C 、 ^{15}N に置換することが望ましい。これらの要件を満たすアミノ酸の設計指針は以下の4点にまとめられる：

- ① アミノ酸残基中のメチレン基に存在する2個のプロキラル水素は、必ずどちらか一方を立体選択的に重水素置換する（立体選択的重水素化）
- ② メチル基の3個の水素の内、2個を重水素化する（プロトン密度の最小化）
- ③ 芳香環水素を位置選択的に部分水素化する（位置選択的重水素化+プロトン密度の最小化）
- ④ Leu、Valの2個のプロキラルメチル基の内、一方のみを立体選択的に②のように残余水素が1個となるように標識し、他方のメチル基は全て重水素化する（立体選択的重水

素化+プロトン密度の最小化)

以上のような指針に従って設計するアミノ酸においては、図-4 に示したように、メチレン (CH_2) とメチル (CH_3) は、実質的には全てメチン (^{13}C - ^1H 対) となり、立体構造決定のみならず、従来の標識タンパク質試料を利用した場合と比較し、あらゆる NMR 実験が遥かに高感度、高精度、且つ迅速に可能となる仕掛けが合成段階で組み込まれているのである。このように、高度に選択的な [^2H , ^{13}C , ^{15}N]-三重標識をアミノ酸について施し、それらを蛋白質に組み込めばプロトン数は大幅に減少するものの、残存するプロトン密度は一切低下せず、全てのプロキラル基の立体特異的帰属は試料自体に組み込まれており、NMR 解析にとって理想的な手法である。このようにして得られる蛋白質試料は単一の isotopomer から構成されている点で、従来のランダム重水素化蛋白質と根本的に異なったものであり、その構造上の特長から立体整列同位体標識 (SAIL: stereo-array isotope labeling) 法と名づけた。このようなアミノ酸を SAIL アミノ酸、それらから構成される蛋白質を SAIL 蛋白質と呼んでいる。SAIL 法とは、SAIL 蛋白質を利用した NMR 解析手法全般を指している。

SAIL アミノ酸の殆ど全ては全く新規な安定同位体標識アミノ酸であり、二期 10 年に渡る CREST 課題において常に新たな、より優れた SAIL アミノ酸合成ルートを開拓し続けてきた。蛋白質を構成する 20 種類のアミノ酸に関して全て SAIL アミノ酸を合成するのに約 6 年の歳月を要した。合成ルートの開発は現在においても最重要課題の一つであり、SAIL 法という構造生物学の次世代世界標準が、合成化学に支えられていることは興味のある事実である。SAIL 法に利用するための SAIL アミノ酸の合成の難しさは、その光学純度の高さにも起因する。即ち、蛋白質構造決定に利用する NOE データの質を高めるためには、重水素化により新たに生じる不斉中心の全てに関して高い立体選択性 (95% d. e. 以上) を保ちつつ合成する必要があるからである。図-6 に SAIL アミノ酸合成の重要な鍵中間体となる SAIL グルタミン酸の合成ルートを示す。

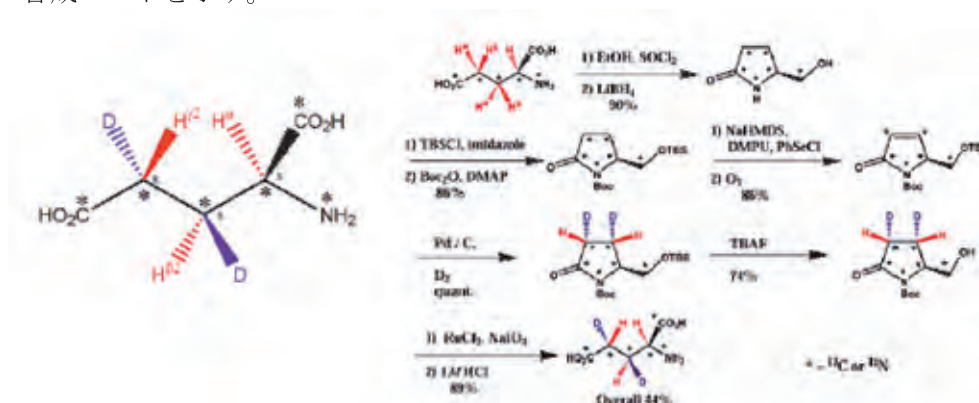


図-6 SAIL グルタミン酸の化学構造とその合成ルート

SAIL グルタミン酸は様々な合成反応を経て、他の SAIL アミノ酸へと誘導することができるため(図-7)、数グラムスケールでの合成実験を繰り返して行っており合成の各工程は十分な検討がなされている。しかし、幾つかの SAIL アミノ酸に関しては現時点においても安定して高い収率で合成することは依然として困難であり、これらの克服は今後の SAIL 法の実用化に当たっての問題点である。

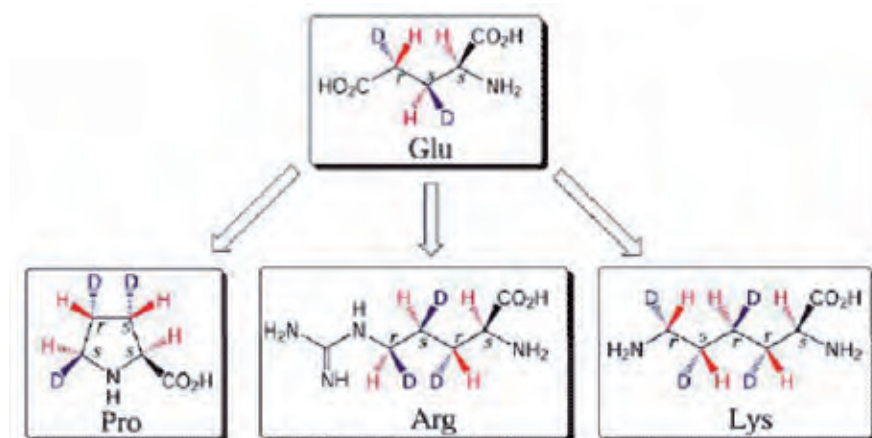


図-7 SAIL グルタミン酸 (Glu)から誘導される幾つかの SAIL アミノ酸

図-7 の SAIL Lys の構造を例にとり、SAIL アミノ酸の利点について説明する。Lys 側鎖の 4 組のメチレンの夫々が持つ二つのプロトンは、立体化学の言葉で diastereotopic な環境にあり、原理的にはそれぞれの化学シフトが異なった一対のシグナルとして生じる。これらの NMR シグナルをどちら側のプロトンに起因するのかわかることを立体特異的帰属と呼び、NMR により決定されたタンパク質の立体構造の精度を上げる上で重要なステップである。しかしながら、一対のシグナルはしばしば、ほぼ同一の化学シフトを持ち独立に観測できない場合が多く、また仮に観測できたとしても、それぞれが立体化学的にどちらのプロトンに帰属するのかが困難なために、Lys 側鎖の精密な立体配座を実験的に決定することは困難である。メチレンプロトンの各々は基本的には重複した構造情報をもたらすため、立体特異的に帰属されていれば、それらの一方の NMR 情報が得られれば精度良く構造決定が可能である。従って、SAIL Lys を用いれば立体構造情報を失うことなく NMR スペクトル上から重複した

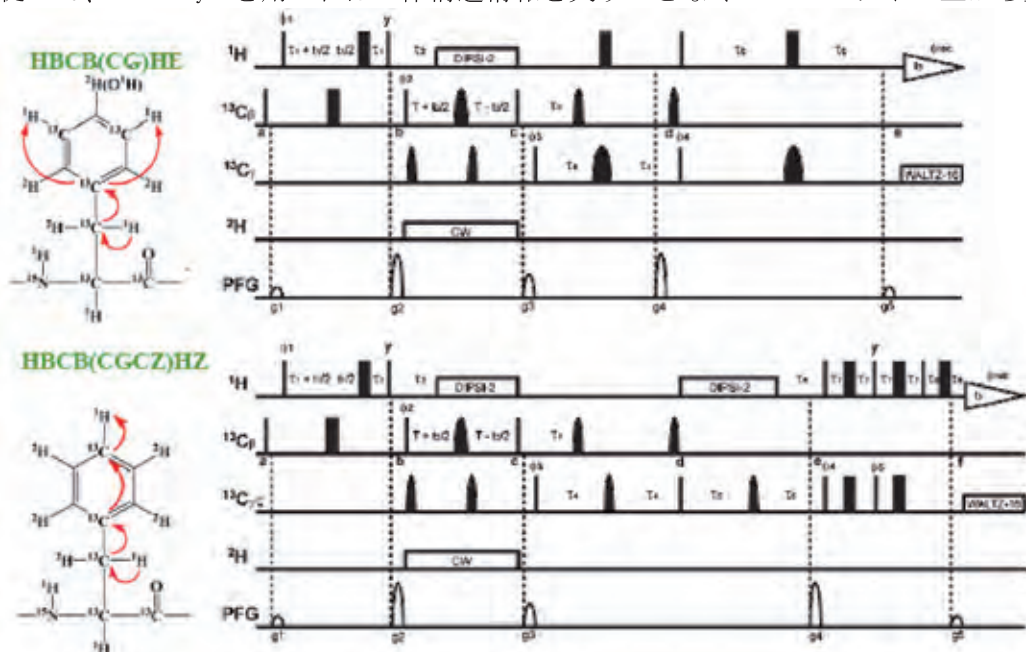


図-8 環部分を交互 ^{13}C 標識した SAIL-Phe, -Tyr の構造と環プロトン帰属パルス列 [Torizawa et al., J. Am. Chem. Soc., 127, 12620-12626 (2005)]

構造情報量 (シグナル数) を削減することができる。炭素に結合している (非交換性) 水素

は、通常の Lys では 9 個あったものが、SAIL Lys では僅か 5 個に減少する。このようにアルキル基側鎖を持つ SAIL アミノ酸は NMR 解析を著しく容易にし、且つ高精度な構造情報をもたらす。

これらの利点は得るために、芳香族アミノ酸においてはもう一工夫が必要であった。芳香族アミノ酸、即ち Phe、Tyr、Trp などは蛋白質内部の疎水性コア部分をアルキル側鎖のメチル基などとともに形成し、その部分の構造決定にはこれら芳香族アミノ酸側鎖の芳香環部分の NMR シグナルの観測と帰属は重要である。しかしながら、Phe などの芳香環の ^1H 、特に ^{13}C は複雑にスピン結合をしており独立したシグナルを観測し、帰属することは著しく困難である。この問題を解決するために、SAIL アミノ酸の芳香環部分は交互 ^{13}C 標識を併用した。図-8 に Phe、Tyr の二種類の交互 ^{13}C 標識をした SAIL 体の構造を示す。このデザインはスピン結合を帰属に利用するために考案したものであるが、このように NMR 解析の有効性を高めるように標識パターンを最適化することにより、従来の単純な同位体標識蛋白質を用いる NMR 技術の限界を遥かに超える新たな手法の開発につながる。

セルフリー系による SAIL タンパク質の調製

SAIL アミノ酸の製造は高度な不斉合成技術を含み、また高価な原料を用いるために経済的な多量合成プロセスの確立にあたっては今後も努力を続ける必要がある。しかしながら、全てのアミノ酸を全て SAIL アミノ酸に置き換えたタンパク質 (SAIL タンパク質) を実際に調製し、それらを NMR 試料として構造決定などを実施することにより、SAIL 技術の想定される利点を実証することは大きなインパクトとなる。このような観点から、我々は本課題研究の開始当初より、前の CREST 課題では合成にたどり着けなかった数種の SAIL アミノ酸の合成に取り掛かり、取り敢えず少量ではあるが全種類の SAIL アミノ酸を平成 15 年末には合成を終了し、直ちにそれらを用いて SAIL 法の実証実験に着手した。NMR 測定には、通常 1mM のタンパク質溶液を $250\ \mu\text{L}$

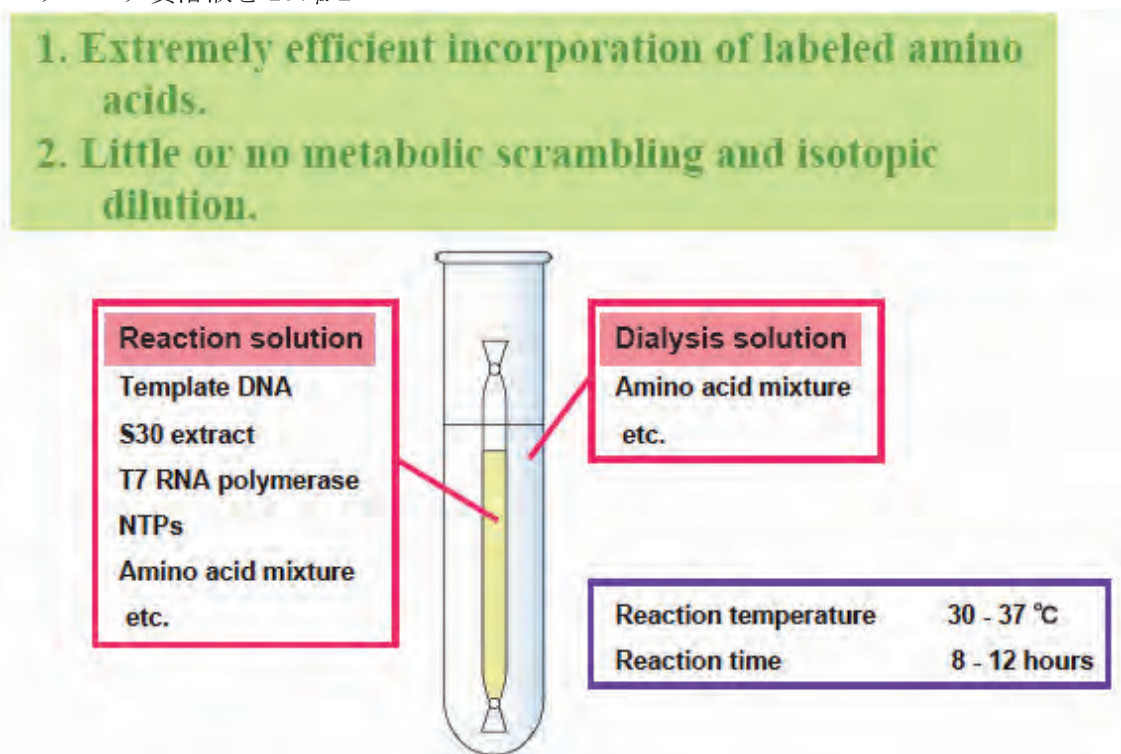


図-9 大腸菌セルフリー抽出液を用いる蛋白質調製 (概念図)

程度必要とする。このためには、分子量 17kDa のタンパク質であれば、4-5mg を調製しなく

てはならない。従って、SAIL アミノ酸のような貴重な標識アミノ酸を組み込んだタンパク質試料を発現する手段として、通常の大腸菌などの微生物を用いた高発現系の利用は、対アミノ酸収量が著しく低いという点からだけでも利用が困難である。SAIL タンパク質の調製に用いるタンパク質発現系は、対アミノ酸収量が高いだけでなく、アミノ酸相互の代謝変換による標識元素の拡散を抑制する必要がある。これら二つの要件を満たす唯一の手法は無細胞抽出液を用いたセルフリータンパク質合成系である。様々な生物細胞から活性を保ったままタンパク質合成系を調製する技術は古くから知られているが、NMR 試料で必要となるミリグラム・スケールでの発現が試みられるようになったのは比較的最近のことである。現在では、市販品を含めて、幾つかの研究室でセルフリー系の利用が試みられている。我々は前のCREST 研究開始時から大腸菌の無細胞抽出液を用いるセルフリー蛋白質発現に独自に取り組み、平成 10-11 年に掛けて既にいくつかのタンパク質の発現に成功している。その後、SAIL 法に必要な様々な要求を満たすプロトコルの改良に努め、平成 15-16 年には十分な基礎的検討を終了しており、少ない SAIL アミノ酸としては僅か数 mg に満たない微量であっても自信を持って SAIL 蛋白質の調製に着手することができた。

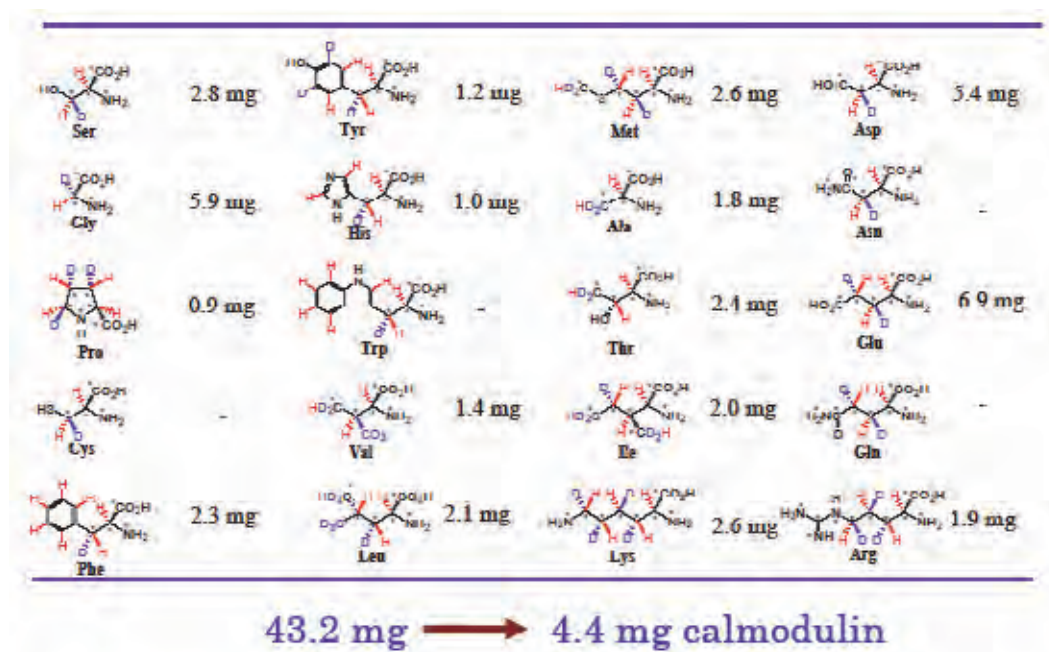


図-10 SAIL カルモジュリンの調製に使用した SAIL アミノ酸組成

SAIL 法による蛋白質の構造決定の最初の実証試験は分子量 17 kDa のカルシウム結合タンパク質、カルモジュリン (CaM) を対象に行った。SAIL 法は利用する SAIL アミノ酸の合成が容易では無いことから、そのコスト、ひいてはその実用性に疑念を持つ向きがある。しかしながら、図-10 のように CaM の構成アミノ酸のモル比に即して混合した SAIL アミノ酸 (44 mg) から無細胞タンパク質合成系を用いて、NMR 測定に十二分な量である 4.4 mg (収率 10%) の精製 CaM が得られたことはこの方法の実用性を裏付ける結果である。今後、SAIL アミノ酸の回収手法が確立されれば、更にコストがさがり実用性は高まるであろうが、そのためには幾つかの問題点を解決する必要がある。このようにして調製した SAIL CaM の理論的な重水素標識率は 56 %に達し (重水中で交換性水素は全て重水素化したとして算出)、アミノ酸側鎖のシグナル数は通常の CaM に比べ 48 %にまで減少する。当然のことながら、重水素化しない側の軽水素は元のままであり、ランダム重水素化では問題となる、軽水素濃度の低下は一切ない。我々の改良したプロトコルではセルフリー抽出液からの非標識アミノ酸の持込による希釈は、通常の場合と比べ十分低く抑えられれている [T. Torizawa, M. Shimizu, M. Taoka, H. Miyano, and M. Kainosho, *J. Biomol. NMR*, 30, 311-325 (2004)]。

SAIL-CYANA 法による蛋白質の立体構造決定

SAIL 法による立体構造決定の初めての試みは、セルフリー発現のモデル系としてしばしば利用してきたカルモジュリンを用いて行った。上述のようにして調製した SAIL CaM の NMR スペクトルが、 ^{13}C , ^{15}N -CaM と比べ、遥かに高感度で測定でき、またシグナル数の大幅な減少からスペクトルの重なりが大幅に減少する（図 - 11）

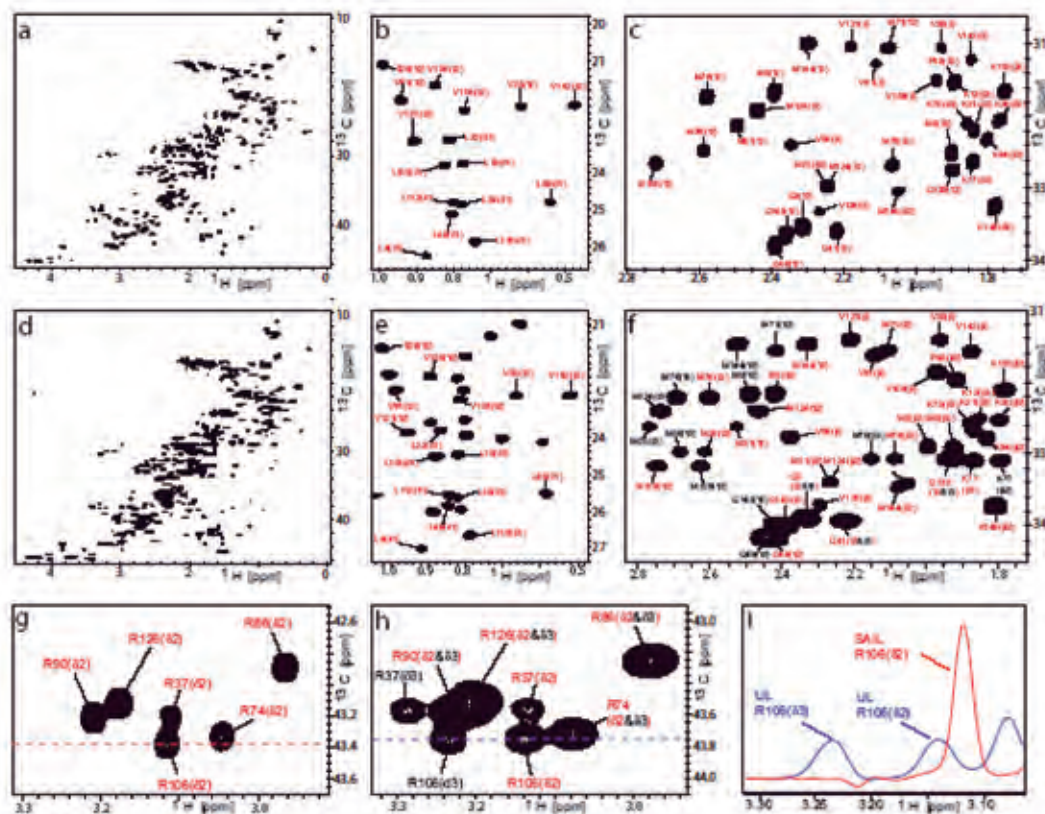


図-11 a-b-c と d-e-f がそれぞれ SAIL 及び $[\text{u1-}^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}]$ CaM の $\text{ct-}^1\text{H}$, ^{13}C -HSQC の脂肪族領域の全領域と部分拡大図を示している。g と h はその内で 6 残基含まれる Arg の H_δ - C_δ 領域を更に拡大したものである。また、i は感度の上昇を示すために Arg106 の H_δ - C_δ クロスピークの ^{13}C 方向のスライスを示したものである。

ことがわかる。この特徴を利用することにより、各残基の側鎖の炭素 (^{13}C)、窒素 (^{15}N)、及び水素 (^1H) 核の NMR シグナルの全帰属が容易に達成できる。因みに、全シグナルの観測・帰属は、従来の二重標識 ^{13}C , ^{15}N -CaM を用いては、本来は分離観測できるはずのシグナルの偶然の重なりが多く、達成することは不可能である (Arg の H_δ - C_δ 領域を参照)。また、特にメチレン水素の線幅は SAIL 蛋白質においては、geminal 位のプロトンによる dipole 緩和、スピン結合が失われるために著しく狭くなりその結果、シグナルの感度は数倍向上する。

NMR によるタンパク質の立体構造決定は、核間距離が 5Å 以内の水素原子対に現れる NOE (核オーバーハウザー効果; nuclear Overhauser effect) ピークを測定し、それらを生じさせる水素原子の帰属を基にして、集積された膨大な近距離にある水素原子対を全て満足する立体構造を計算して求めることにより行われる。実際には、NOE ピークの帰属は分子量が大きくなるにつれ大変な作業となり、数ヶ月に及ぶことも普通である。しかしながら、SAIL タンパク質を用いて得られる完全な化学シフトデータ表を利用すれば、既に関連されている CYANA などのソフトウェアを利用すれば、NOE ピークの帰属を自動的に行いつつ立体構造を計算することができる。本課題においては、CYANA の開発者 Peter Güntert 博士 (ETH、現理研) との緊密な共同研究により SAIL 法により得られたデータから CYANA を用いて立体構造計算を行っている。図-3 に示したカルモジュリンの立体構造はそのようにして得られた

ものである。なおこの構造は NOE を用いて決定された溶液内のカルモジュリンの構造としては初めてのものであり、X 線構造解析データと各ドメインの構造は極めて良く一致する(図-12)。

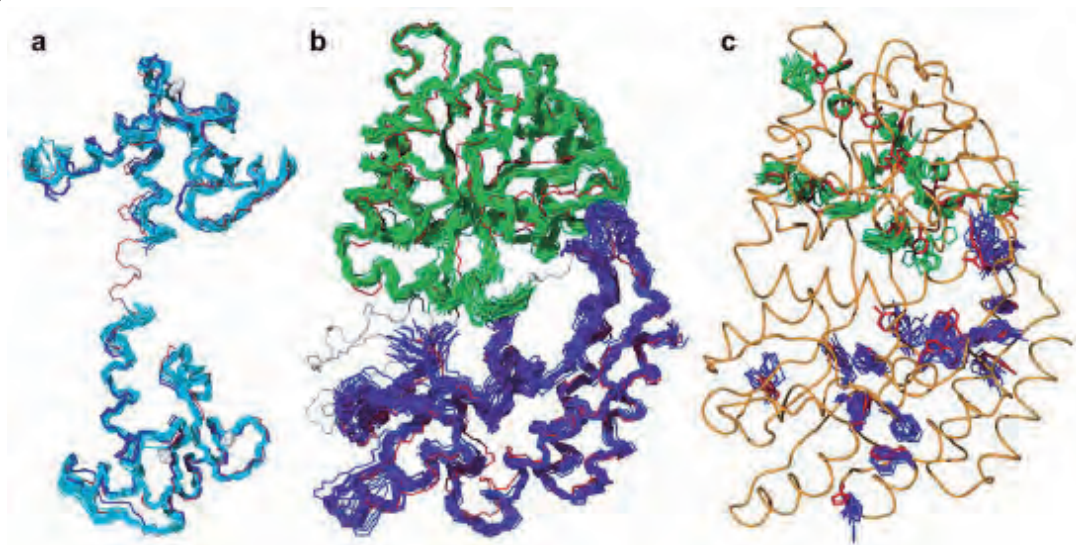


図-12 SAIL 法で決定された二つの蛋白質。カルモジュリン (17kDa)、マルトース結合蛋白質 MBP (41kDa)。a, カルモジュリン (青が SAIL NMR 構造、紺が RDC を用いて結晶構造から溶液構造を推定したモデル、赤が X 線結晶構造)。b, c が SAIL MBP の主鎖、及び側鎖(芳香族環部分のみ示す)の立体構造。赤は X 線結晶構造。

SAIL 法による立体構造決定が高精度且つ迅速に可能であることが実証されたことを受けて、従来手法では極めて困難な分子量 41kDa のマルトース結合蛋白質(MBP)の立体構造に着手した。SAIL MBP と ^{13}C , ^{15}N MBP のスペクトルを比較すればその利点は分子量が増加するにつれより大きくなることが明らかとなろう。一連のスペクトルを測定し、側鎖を含めて

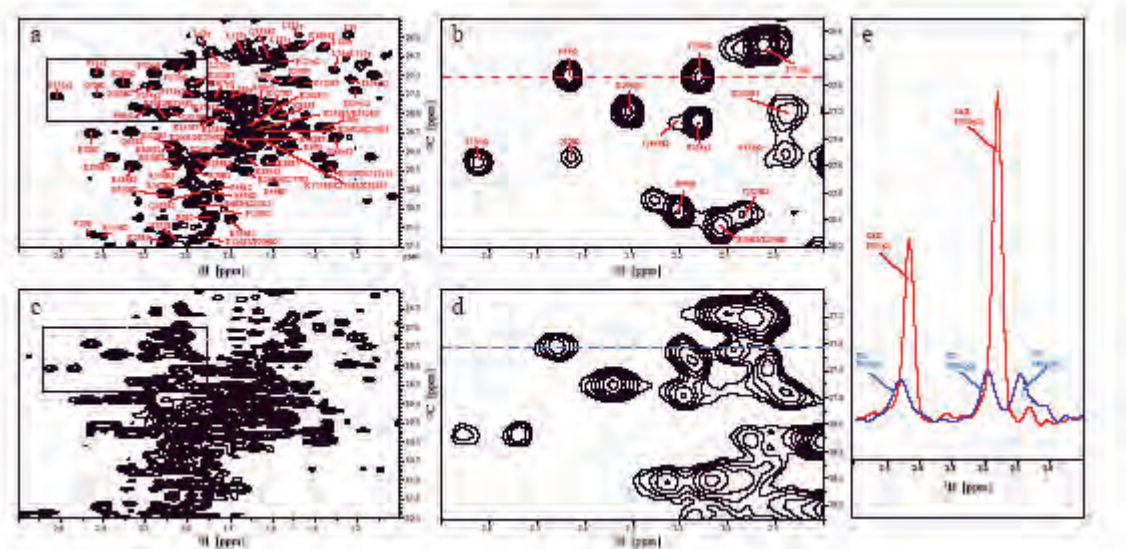


図-12 41 kDa マルトース結合蛋白質(MBP)の ^1H , ^{13}C HSQC スペクトルのメチレンプロトン領域の拡大図。a-b, SAIL MBP; c-d, ^{13}C , ^{15}N MBP

90%を越える高い帰属達成率が得られたことから CYANA を用いて NOE データを自動帰属させ、同時に立体構造決定を行った。CaM、MBP の主鎖は何れも溶液内においては N 末端と C

末端の二つのドメインから成り立っており、両ドメインは柔軟なリンカー部分を持っている構造である。このように、蛋白質の立体構造決定が迅速且つ精密に可能であることが実証されたことから、SAIL 法は少なくとも従来の分子量上限を二倍程度まで押し上げ、しかも側鎖の立体配座を含めた精密構造決定が半自動的に可能とすることが画期的な手法であることが明らかとなった。これらの結果は Nature 誌に掲載され大きな反響を呼んでいることは先に述べた通りである[Kainosho et al., Nature 440, 52-57(2006)]。

(2)研究成果の今後期待される効果

立体整列同位体標識 (SAIL) 技術は、従来のタンパク質の NMR 構造決定技術がパルス技術や立体構造決定アルゴリズムの改良に偏ってきたなかで、系統的な研究が乏しかったタンパク質試料の調製技術の抜本的改良に視点を移したことから生まれた基盤技術である。あたかも、X 線構造解析にとって最大の課題がタンパク質の結晶作成技術にあるように、NMR 構造解析にとってもタンパク質試料の最適化が重要であることが確認された。SAIL 技術の普及により、高度な専門知識を持たない研究者が NMR 法によりタンパク質の立体構造を解くことができるようになる。また、従来の分子量限界を遥かに越えた 50kDa 程度のタンパク質の高精度構造解析、或いはタンパク質の特定アミノ酸残基側鎖の精密な構造情報の取得など、SAIL 技術は様々な発展の可能性を持っている。生体系 NMR の研究領域は、タンパク質の構造・機能相関の研究から、低分子リガンドとの分子間相互作用解析を通じたドラッグデザインへの応用まで、タンパク質科学の幅広い分野に及んでいる。近年における NMR 測定装置の急速な高感度化・高磁場化、或いは SAIL 技術に適応させた NMR 測定・解析技術の発展と相まって、本技術はタンパク質科学における次世代の世界標準として大きな可能性を秘めている。平成 19 年度より開始予定の「タンパク質解析基盤技術開発」課題として「SAIL 法を基盤とした次世代タンパク質 NMR 解析技術の開発と応用」が取り上げられる予定であり、既にその準備となる研究は平成 18 年 10 月にスタートした。

このプロジェクトは当初 3 年の計画で進められるが、その期間内で SAIL 法を中核技術として従来の上限を大幅に上回る 100k 超の高分子量タンパク質複合体、及び膜タンパク質までを視野に入れた、迅速・高精度、且つ専門的知識を要しない全自動構造解析手法の開発を行うことは十分可能である。さらに、SAIL 法の応用領域を更に拡大し、ドラッグスクリーニングに有用な弱いタンパク質-リガンド相互作用の検出等を含め日本発の次世代の世界標準 NMR 基盤技術としての我が国が大きく国際社会に貢献するとともに、ゲノム科学の産業応用の観点からも大きな寄与を果たせることと信じる。

3. 2 新規安定同位体標識アミノ酸の合成手法の開発

(東海大学 西山グループ)

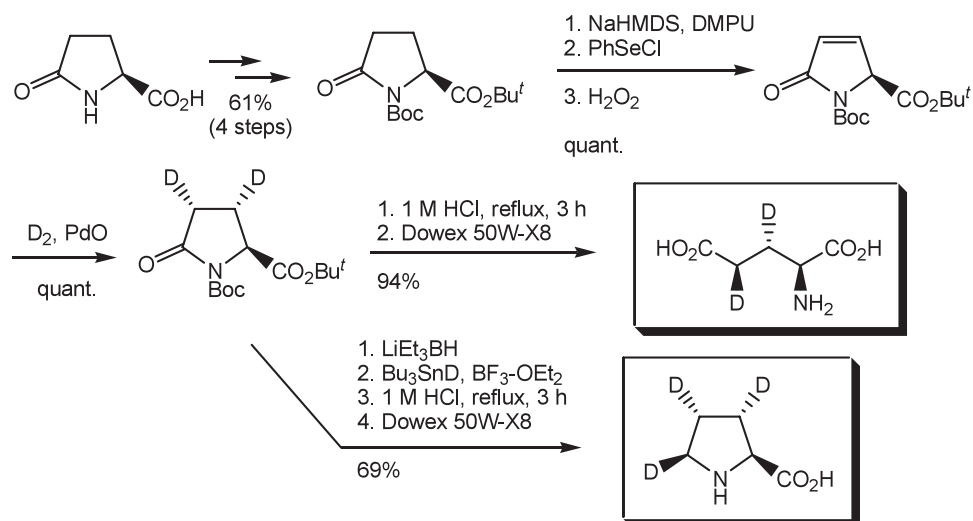
(1)研究実施内容及び成果

一方のみを立体選択的に重水素標識し、必要な位置に ^{13}C や ^{15}N を導入した多重標識アミノ酸の合成を行い蛋白質構造解析のプロープを提供することを目的としている。

これまで我々はピログルタミン酸誘導体をキラルテンプレートとする位置・立体選択的安定同位体標識アミノ酸の合成検討を行ってきた。ピログルタミン酸は C_5 ユニットの有することから標識グルタミン酸のみならずプロリン、ロイシン、イソロイシン、バリン等にも容易に変換可能であるが、 ^{13}C や ^{15}N を導入する場合、非常に高価な標識グルタミン酸を出発原料として用いなければならないため反応の総収率がコスト面での大きな問題点であった。これまでの合成法は不飽和ピログルタミノールの重水素添加を経由するためカルボキシル基の還元-酸化過程を経る必要があり、反応の多段階化、総収率の低下の原因となっていた。そこで今回、我々は不飽和ピログルタミン酸エステルの重水素添加を経由する重水素標識グルタミン酸、プロリン、ロイシンの簡便・大量合成法の確立を検討した。

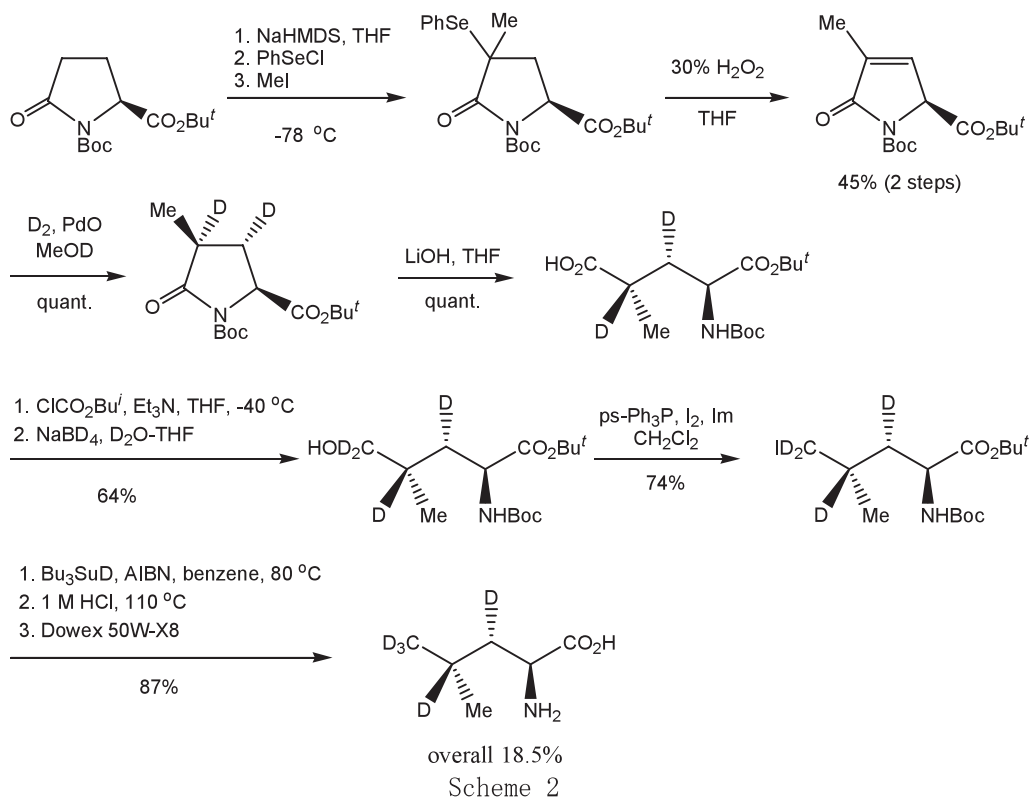
不飽和ピログルタミン酸エステルを経由する重水素標識アミノ酸の合成経路を Scheme 1 に示した。現在までのところ $[3, 4\text{-D}_2]$ グルタミン酸および $[3, 4, 5\text{-D}_3]$ プロリンについてはピログルタミン酸を基準として総収率 57% および 42% で合成することに成功し、グ

ラムスケールでの供給も可能となった。



Scheme 1

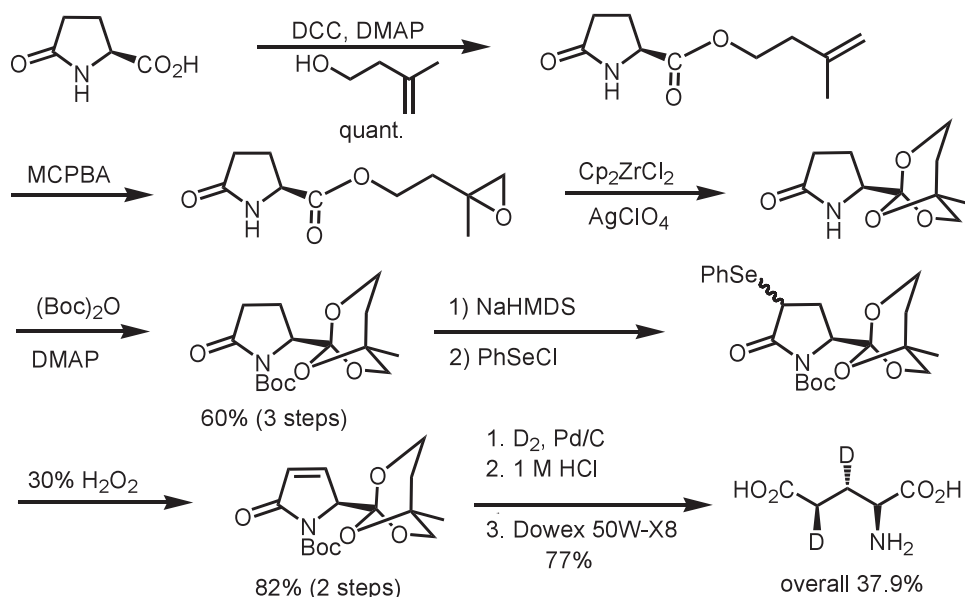
一方、オレフィンを合成する際にメチル基を導入することにより、従来法と比較して短行程で重水素標識ロイシンを合成することも可能となった。現段階ではまだ総収率が低く引き続き検討が必要である (Scheme 2)。



Scheme 2

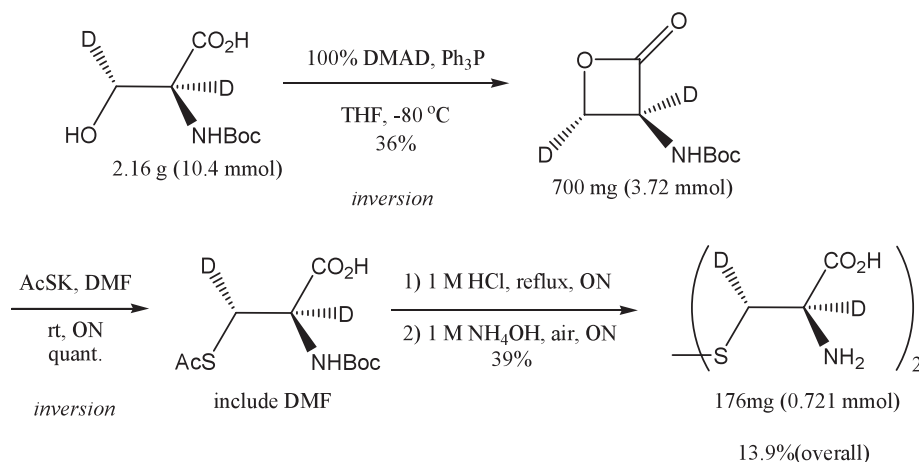
上記の手法は比較的短行程で立体選択的重水素標識アミノ酸を合成できる利点を有するが、光学的に純粋なオレフィンの合成が非常に困難であるためラセミ体の標識アミノ酸しか得ることができない。そこで、ピログルタミン酸のカルボキシル基をオルトエステルで保護した不飽和オルトピログルタミン酸エステルを用いる標識アミノ酸の合成について検討を

行った。現在、カルボキシル基を ABO エステルで保護した不飽和体の合成に成功しており、重水素添加によって光学的に純粋な[3, 4-D₂]グルタミン酸に誘導し得ることを確認した (Scheme 3)。



Scheme 3

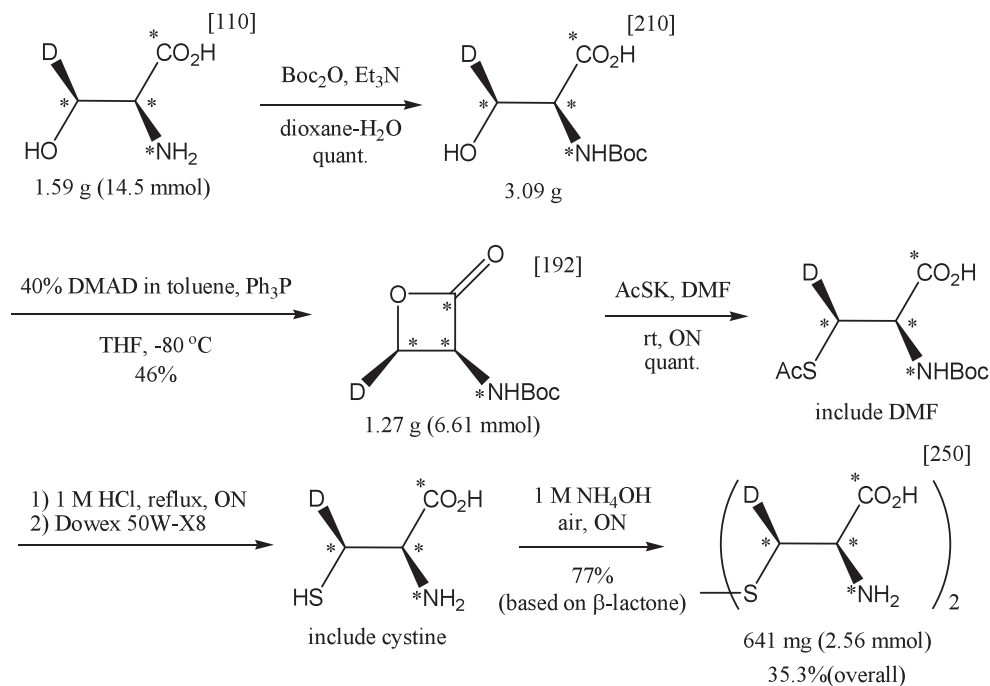
次にグルタミン酸同様、標識体が比較的容易に合成可能なセリンに着目し、β-ラクトンを経由する β 位水酸基の官能基変換による標識シスチン、標識アラニンの合成検討を行った。



Scheme 4

Scheme 4 に (2*S*, 3*R*)-Boc-[2, 3-D₂]Ser を出発原料とする標識シスチンの合成経路を示した。初めに Mitsunobu 型の分子内環化反応を用いて β-ラクトンを合成した後、AcS 基の導入、加水分解、空気酸化を一挙に行い (2*R*, 3*R*)-[2, 3-D₂]cystine を単離した。β-ラクトン合成の際、蒸留した 100%DMAD を用いたが収率を改善することはできなかった。一般に DMAD は DEAD に比べて高い反応性を持つことが知られているため、市販の 98%DEAD を用いる検討は行っていない。β-ラクトンからシスチンを合成する過程では、副生物の生成は殆ど見られないことから実験技術の向上と共に収率の向上も期待できる。得られた標識シスチンの NMR スペクトルでは α 位および 3 R 位に若干シグナルが観測されるが、比較的高い選択性で (2*R*, 3*R*) 体が合成できた。一般に光延反応は inversion で進行することが知られているので 3 R 体が得られたことから AcS 基の導入も inversion で進行して

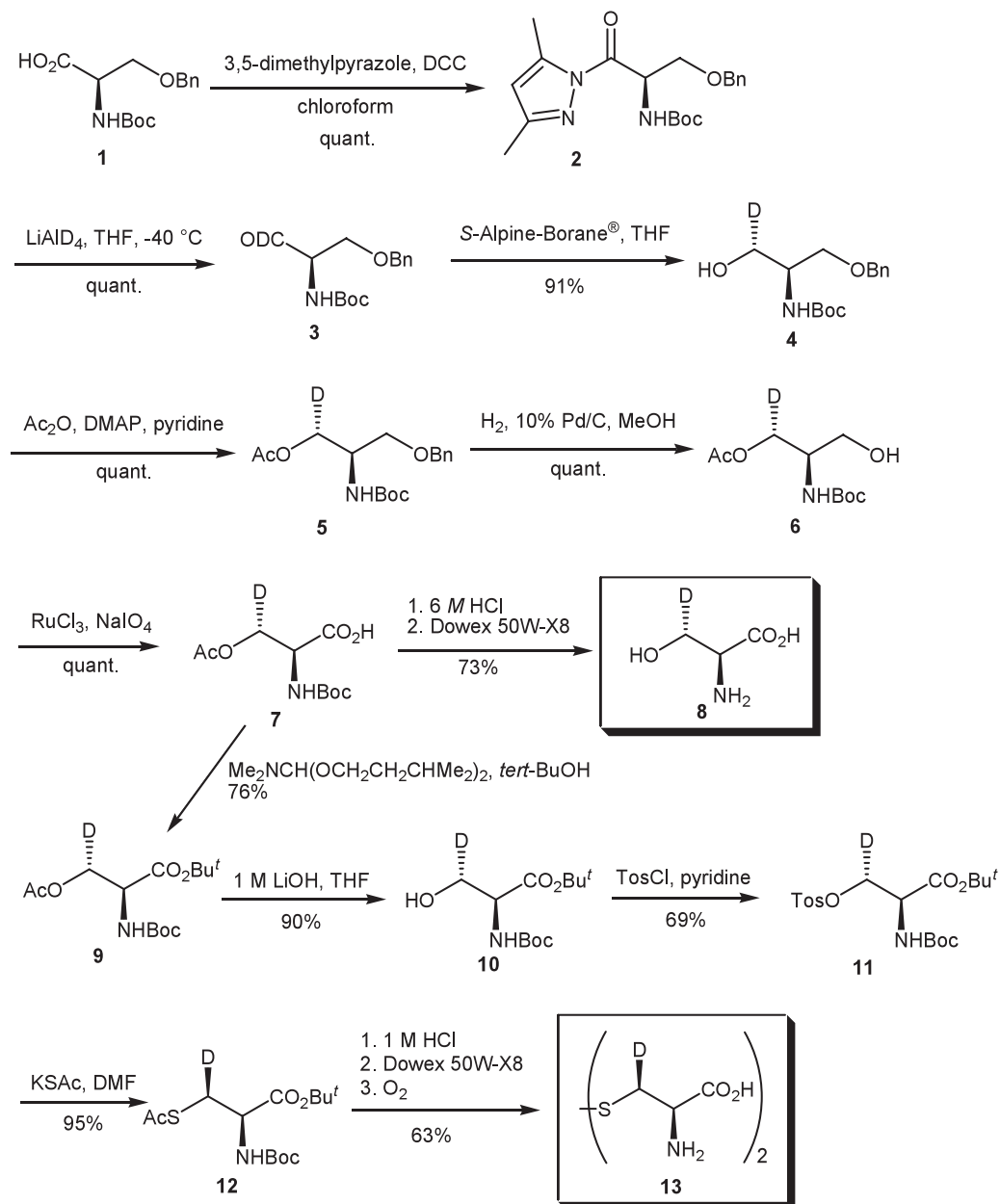
いると考えられる。



Scheme 5

得られた知見をもとにして (2*R*,3*S*)-[3-D; u1-¹³C, ¹⁵N]cystine の合成検討を行った (Scheme 5)。(2*S*,3*S*)-[3-D; u1-¹³C, ¹⁵N]Ser を出発原料として購入直後の 40%-DMAD を用いて Mitsunobu 反応を行い、46%の収率で β-ラクトンを得た。AcS 基の導入、加水分解の後、イオン交換カラムを用いて精製を行いシステインとシスチンの混合物を得た。混合物を 1M-NH₄OH 中で空気酸化し (2*R*,3*S*)-[3-D; u1-¹³C, ¹⁵N]cystine を単離した。β-ラクトンからシスチンへの変換が 3 段階で 77%に向上したため、総収率も 35.3%と実用的なレベルに改善された。

β-ラクトンの合成収率を改善することは非常に困難なため β-ラクトンを経由しない新規合成ルートの開発を行った。初めに (2*R*)-Boc-Ser (Bn) を出発原料とする立体選択的重水素標識セリンおよびシスチンの合成検討を行った (Scheme 6)。



Scheme 6

(2*R*)-Boc-Ser(Bn) (1) から得られる新規な重水素化セリナール 3 を *S*-Alpine-Borane[®] で不斉還元し、立体選択的重水素標識セリノール 4 を合成した。水酸基をアセチル基で保護したのち、ベンジルエーテルの水素化分解とそれに引き続くルテニウム酸化によって側鎖をカルボキシル基に変換し、脱保護を行って(2*S*, 3*R*)-[3-²H]セリン(8)を合成した。得られた重水素標識セリン 8 の ¹H NMR スペクトルを Figure 1 に示した。(3*R*)-プロトンのシグナルがほぼ完全に消失しており、重水素が立体選択的に導入されていることが明らかである。

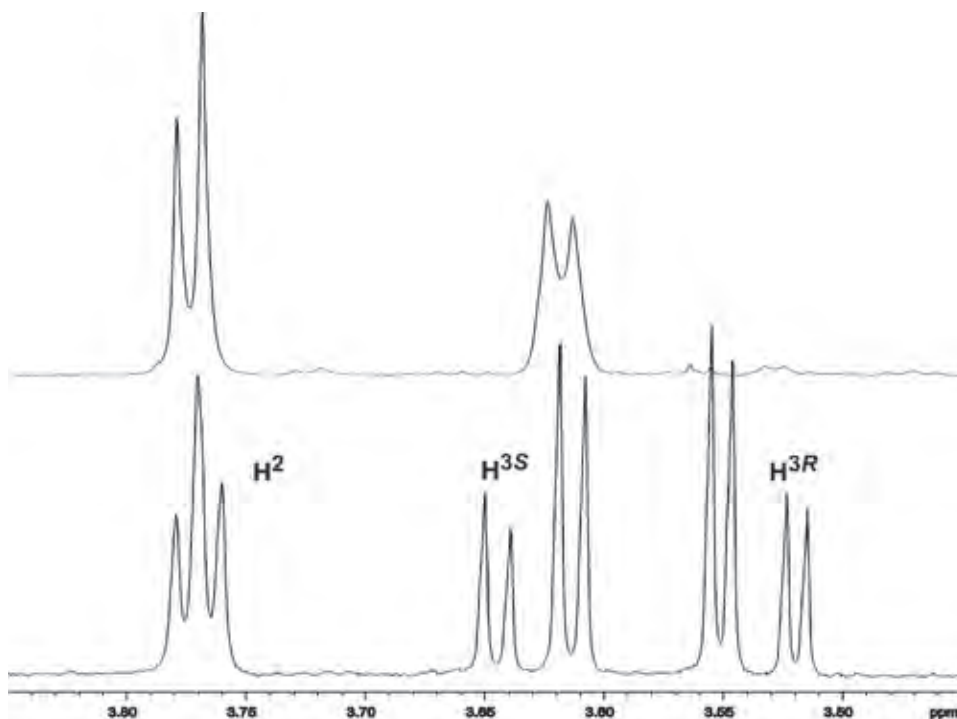


Figure 1. 400 MHz ^1H NMR spectra of $(2S, 3R)$ - $[3\text{-}^2\text{H}]$ serine (8, upper) and unlabeled serine (lower) in 10% $\text{DCl-D}_2\text{O}$

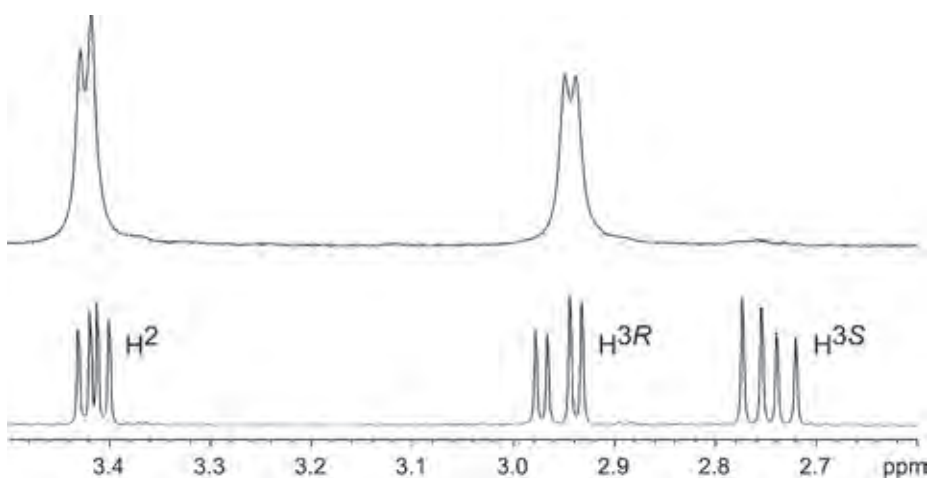


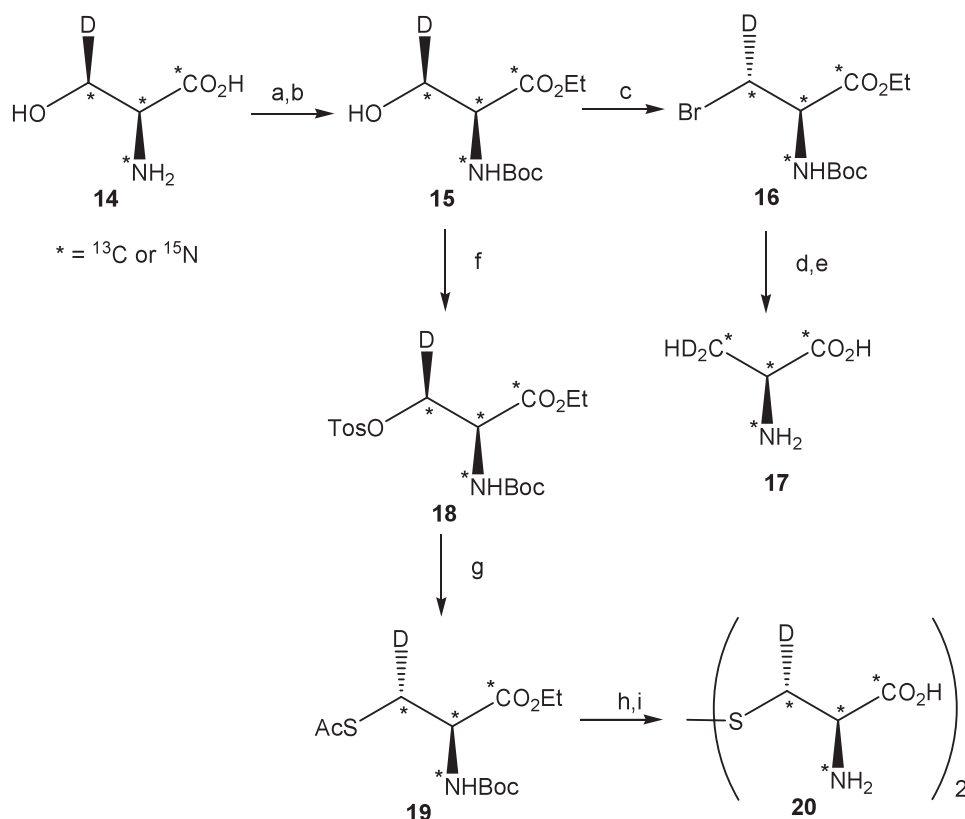
Figure 2. 400 MHz ^1H NMR spectra of $(2R, 2' R, 3S, 3' S)$ - $[3, 3' \text{-}^2\text{H}_2]$ cystine (13, upper) and unlabeled cystine (lower) in 2.5% $\text{NaOD-D}_2\text{O}$

一方、化合物7のカルボキシル基を *tert*-ブチル基で保護したのち、アセチル基を除去してトシラート11を合成した。化合物11にAcS基を $\text{S}_{\text{N}}2$ 反応を用いて導入したのち脱保護と同時に空気酸化を行うことによって $(2R, 2' R, 3S, 3' S)$ - $[3, 3' \text{-}^2\text{H}_2]$ シスチン(13)を合成した。得られた重水素標識シスチン13の ^1H NMRスペクトルをFigure 2に示した。 $(3S)$ -プロトンのシグナルが消失しており、AcS基の導入が完全に立体反転で進行したことが明らかである。

上記の検討で得られた知見をもとに、 ^{13}C 、 ^{15}N 、重水素3重標識シスチン、アラニンの合成検討を行った (Scheme 7)。別途合成した ^{13}C 、 ^{15}N 、重水素3重標識セリン14を

常法に従って保護したのち、水酸基を臭素化してブロモアラニン誘導体 **16** を合成した。得られた臭化物 **16** を Bu_3SnD を用いてラジカル還元し、脱保護することによって $(2S)$ -[1, 2, 3- $^{13}\text{C}_3$; 2- ^{15}N ; 3, 3'- $^2\text{H}_2$]アラニン(**17**)を合成した。

一方、保護セリン誘導体 **15** をトシラート **18** としたのち、AcS 基を導入し、脱保護と同時に空気酸化することによって $(2R, 2' R)$ -[1, 1', 2, 2', 3, 3' - $^{13}\text{C}_6$; 2, 2' - $^{15}\text{N}_2$; 3, 3' - $^2\text{H}_2$]シスチン(**20**)を合成した。



Scheme 7. Reagents and conditions: (a) SOCl_2 , EtOH, 87%; (b) $(\text{tert-BuOCO})_2\text{O}$, DMAP, DMF, 97%; (c) ps-PPh_3 , CBr_4 , CH_2Cl_2 ; (d) Bu_3SnD , BPO, benzene; (e) 1 M HCl, then, Dowex 50W-X8, 64% (3 steps); (f) TosCl , pyridine, 84%; (g) AcSK , DMF, 95%; (h) 1 M HCl, then, Dowex 50W-X8; (i) O_2 , 1 M NH_4OH , 46% (2 steps).

(2)研究成果の今後期待される効果

本サブテーマは SAIL 法の実用化という意味では極めて重要な安価、且つ多量の SAIL アミノ酸の供給システムの開発に資する基礎的な合成技術の開発に焦点を当てたものである。限られたリソースのなかから幾つもの有用な合成プロトコルが開発され、SAIL 法の実用化に今後大きく貢献するものと期待される。例えば、多重標識セリンを出発原料とする標識シスチンおよびアラニンの合成に関しては実用的なレベルに達したため、現段階で多量生産が可能である。さらに、トレオニン、メチオニンへの展開を検討する予定である。

一方、標識ピログルタミン誘導体は標識グルタミン酸、プロリン、ロイシン、イソロイシンなど多くの標識アミノ酸の共通合成中間体であるが、光学活性体を大量に合成することは非常に困難であり、その利用が大きく制限されているのが現状である。現在、セリンを原料として用いる標識ピログルタミン誘導体の新規合成ルートの開発にほぼ成功しており今後の展開によっては実用化も可能である。

アスパラギン酸はセリンとともに多重標識体が比較的容易に入手可能なアミノ酸であるが、他の標識アミノ酸の合成原料としてはあまり利用されていない。今後はアスパラギン酸

を出発原料として用いる新規アミノ酸合成法の開発も行う予定である。

3.3 固体 NMR 方法論の開発と膜タンパク質構造機能解析への応用 (大阪大学 阿久津グループ)

(1)研究実施内容及び成果

本研究グループにおいては以下の目的を掲げて研究を進めてきた。甲斐荘グループにおいて開発する SAIL 技術の高度利用を進めるために、巨大蛋白質複合体、特に膜蛋白質の構造と機能の解析に必要な固体 NMR の要素技術開発を行う。膜蛋白質の可溶性ドメインに関しては、溶液 NMR 法も併用して構造と機能に関する研究を進める。膜蛋白質としてはプロトン-ATP 合成酵素のサブユニット、GPCR モデルペプチドであるマストパラン X 等を対象として研究を進める。

I. 区分安定同位体標識 $F_1\beta$ サブユニットとリガンドとの相互作用の解析

1) 巨大な膜タンパク質であるプロトン ATP 合成酵素は触媒部位を持つ膜表在性の F_1 ドメイン ($\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$) と、プロトンチャンネルを形成する膜内在性の F_0 ドメイン (ab_2c_{10-14}) から構成されている。 $\alpha_3\beta_3$ は 3 回対称に近いリングをつくっており、サブユニット c は 10~14 個集まってドーナツ状のリングを形成している。

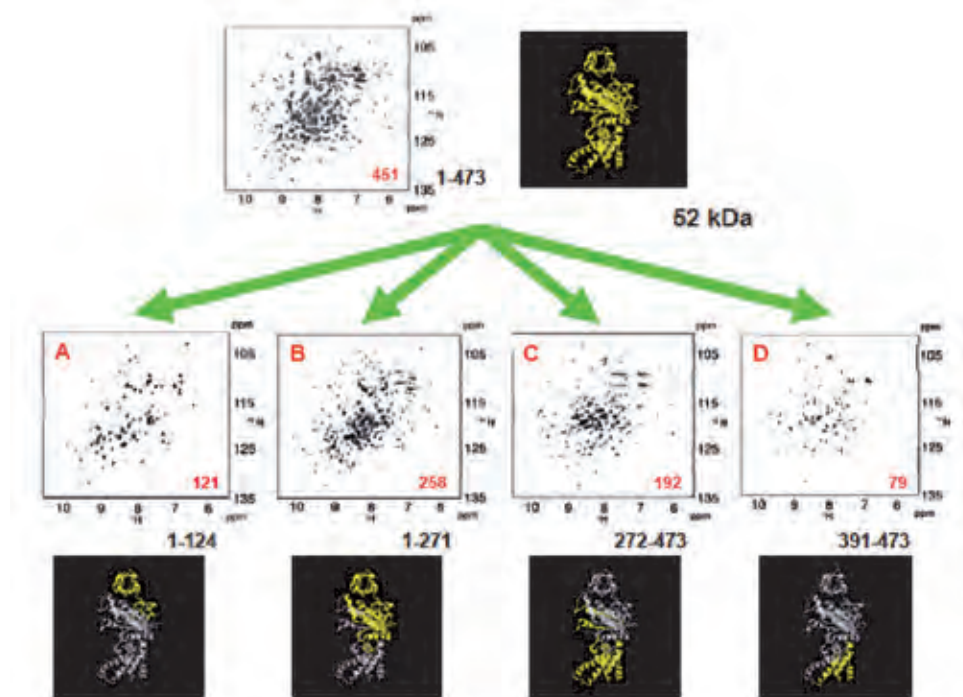


図-A インテインによる区分標識。 ^1H - ^{15}N TROSY-HSQC $\text{TF}_1\beta$ サブユニット

F_0 の中をプロトンが流れると c リングが回転し、それが F_1 の γ サブユニットの回転を引き起こし、 β サブユニットにおいて ATP 合成を行う。

β サブユニットは 52 kDa の質量を持ち、溶液 NMR における分子量の壁を越えるものである。そこで、将来の固体 NMR による解析の要素技術としてインテインによるスペクトルとの単純化法を開発し、その有用性を確認するために溶液 NMR による解析を行った。

インテインを用いて 4 種類の区分 ^2H , ^{13}C , ^{15}N 標識 β サブユニットを作成し、90% の ^1H , ^{13}C , ^{15}N のシグナルの帰属を行った。これを基に、TALOS 法による主鎖二面角の予測を行い、これと化学シフトインデックスを用いて、二次構造予測を行った (図-A)。

その二次構造は $\alpha_3\beta_3$ 複合体結晶構造とほぼ一致しており、 β サブユニット単量体の主鎖

フォールドは結晶構造とほぼ同じであると結論した。帰属された骨格 ^{15}N のシグナルを用いて、Mg-ADP を用いた滴定を行い、リガンドの結合が β にどのような構造変化を引き起こすかを全アミノ酸残基の情報を基に解析することができた。リガンド結合により誘起された化学シフト変化を F_1 の結晶構造中における β サブユニットの open 型構造と closed 型構造の相違と対応させるとよい一致が得られ、open 型と closed 型の間の相互変換が β 単量体でも起こることが示唆された (図-B)。

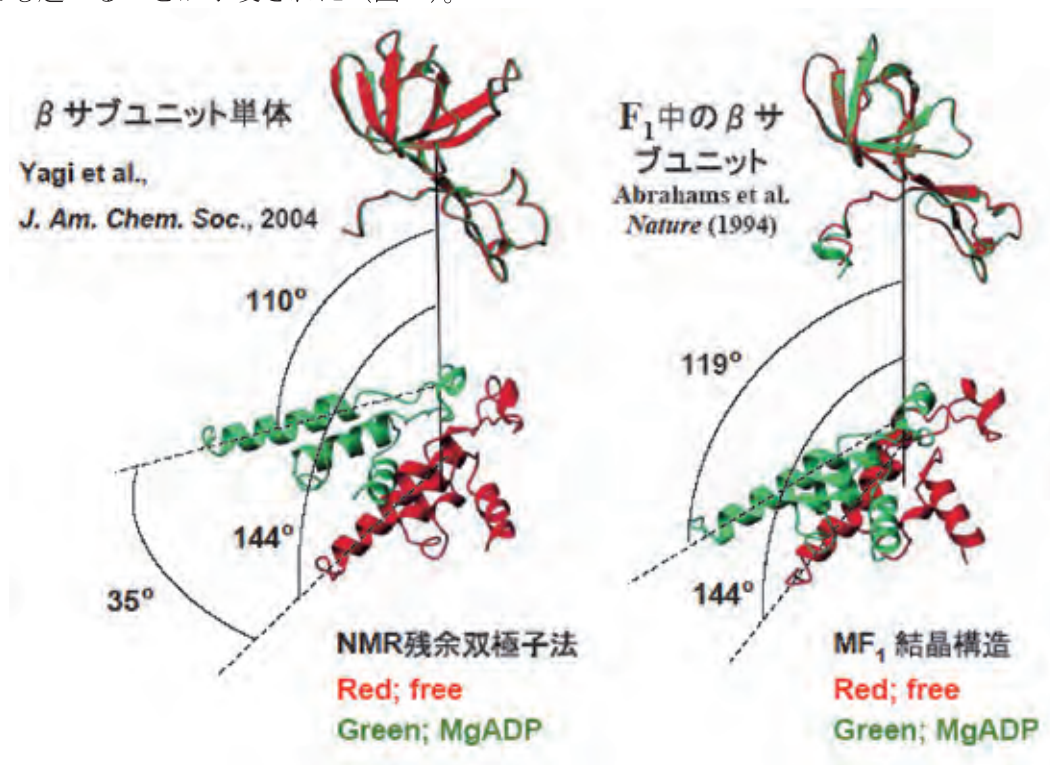


図-B リガンド結合による Open 型から Closed 型への構造変化

さらに、アミノ末端ドメインとカルボキシル末端ドメインの $^{15}\text{N}/^1\text{H}$ 残余双極子相互作用を解析し、リガンドの結合していない β サブユニット単量体は F_1 の結晶構造と同じく open 型構造をとっており、リガンドが結合すると closed 型をとることを直接的に示した。この方法は巨大タンパク質のスペクトルを解析可能な範囲まで単純化することにより解析可能にするものであり、可能性として語られていた区分標識法による巨大タンパク質の解析が実際に可能であることを示した世界で初めての例である。この研究は J. Am. Chem. Soc. 誌 (2004) に掲載された。

2) β サブユニット単量体に結合している ATP の構造については ^{13}C , ^{15}N 均一標識 ATP を用いて、固体 NMR を用いた解析を行った。多核種多次元固体 NMR 測定法を開発し、全シグナルの帰属を行い、距離測定を行った。これにより、ATP 構造の決定をほぼ終えることができた。現在、詰めの研究を行っている。

3) このサブユニットに SAIL 法による構造解析を行う目的で甲斐荘グループにおいてセルフリー系での発現チェックを試みた。発現そのものは良好であったが、SAIL 試料 ct-1H- ^{13}C HSQC スペクトルは予想外に広幅化しており、解析に耐えるスペクトルを得るにはいたらなかった。現在、SAIL 法と区分標識法を組み合わせた手法で解析する可能性を検討している。

II. 膜内在性ドメイン F_0 サブユニット c の溶液および固体高分解能 NMR による構造解析

上述のように、プロトン ATP 合成酵素の F_0 ドメイン (ab_2c_{10-14}) の中でプロトンが流れると c リングが回転し ATP 合成を行う。われわれは固体 NMR による解析の準備として、熱安

定性が高く、生体内で c リングが 10 個のサブユニット c から構成されていることが唯一明らかにされている好熱菌のサブユニット c （以下、 TF_0c ）を有機溶媒中に可溶化し、多核・多次元 NMR により構造を決定した。

TF_0c の溶液構造は大腸菌由来の EF_0c と似たようなヘリックス-ループ-ヘリックスの構造をとっていた。主鎖の重原子の rmsd は $0.30 \text{ \AA}$ であった。この構造においては、プロトン透過に必須な酸性残基（ TF_0c では Glu56、 EF_0c では Asp61）の側鎖の向きが二つの構造では異なっていた。さらに、大腸菌の場合と異なり、 TF_0c Glu56 のカルボキシル基（プロトン移動に必須）のプロトン解離による c サブユニットの構造変化は見られなかった。したがって、 EF_0c の構造変化をもとに提案されている現在のプロト

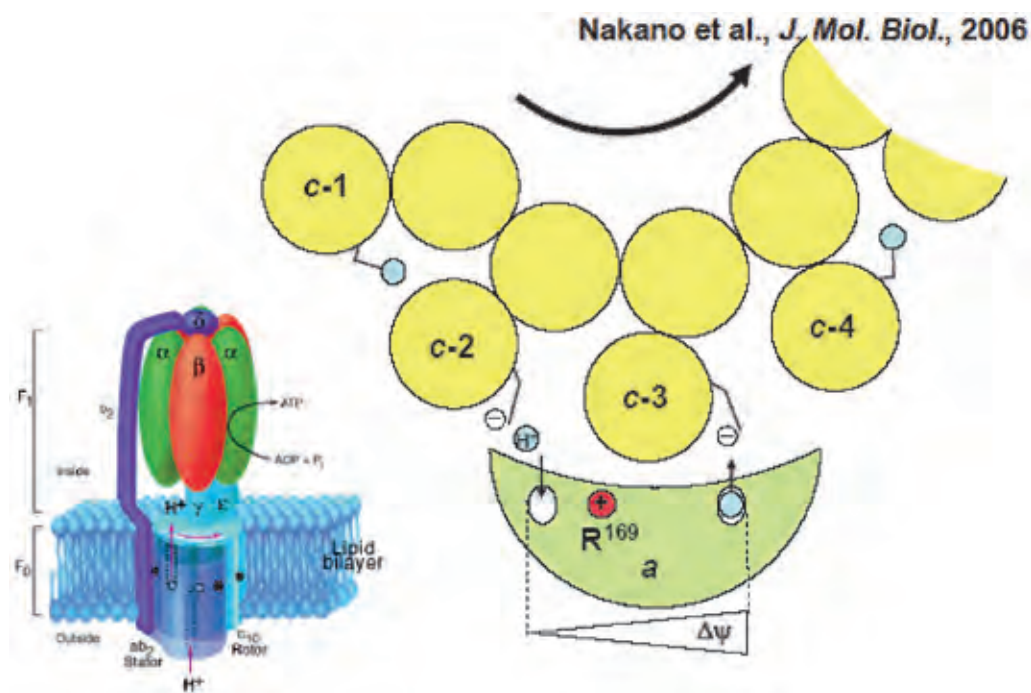


図-C c -リングの回転メカニズム

ン移動機構に疑問符が付いた。われわれはさらに、得られた構造と multiple energy minima の存在、 Na^+ -ATPase の c リングの結晶構造を総合することにより、 c リングの新しい回転機構、sidechain flipping model を提案した。このモデルでは Glu56 側鎖の protonation/deprotonation に連動して Glu56 側鎖が向きを変え、サブユニット a とプロトンの受け渡しが可能になる。これは今まで提案されていたサブユニット c の大きな構造変化を伴うモデルより、エネルギー的な観点から見ても合理的なモデルである。これは今まで一般に信じられていた説を変更するインパクトの大きい結果であり、J. Mol. Biol. (2006) 誌に掲載された（図-C）。

次の段階として、大腸菌のサブユニット c (EF_0c) の固体状態の構造解析をわれわれの開発した固体多次元高分解能 NMR 測定法を用いて行った。 ^{13}C , ^{15}N 均一標識した固体状態のサブユニット c を大量発現して精製し、固体 NMR 測定および化学シフトに基づくスペクトル解析から、どの程度まで信号帰属と二次構造解析が行えるかを検証した。膜内タンパク質では α ヘリックスが主要な二次構造となっており、固体 NMR によるシグナル帰属はかなりの重なるために困難を極めた。しかし、2 次元、3 次元のスペクトルを測定と解析法の工夫により帰属が進み、79 残基の 84% から 2 次構造についての情報をえることができた。こうして、固体状態でも基本的にヘリックス-ループ-ヘリックスの構造を取っていることが明ら

かになった。この解析結果は固体高分解能 NMR が膜タンパク質の構造解析の武器として使うことを示すものである。このように困難な膜タンパク質の固体 NMR による全面的解析の試みはこれが初めてであり、J. Biomol. NMR (2006) 誌に掲載された。

現在、膜に再構成したサブユニット c リングを均一標識蛋白質、相本教授の合成した選択標識蛋白質を用いて作成し、その解析に取りかかっている。また、これに SAIL アミノ酸を導入するためのコムギ胚芽無細胞発現の条件検討にも取り組んでいる。

III. 固体 NMR 測定法の開発

核種の多核種多次元パルスを開発し、これを用いて G タンパク質活性化ペプチド、 ^{13}C , ^{15}N 均一標識マストパラン X の全シグナルの帰属を行い、固体状態およびリン脂質膜結合状態での構造決定を行った。この構造解析では化学シフトの有効な利用法について明らかにすることができた。後者では選択的標識マストパラン X、均一標識マストパラン X を用いて高い分解能の構造決定を行った。また、脂質からマストパランへの磁化移動を用いた膜との相互作用構造決定法を開発した。これらはそれぞれ J. Biomol. NMR (2004), Biophys. J. (2006), J. Am. Chem. Soc. (2006) に掲載された。固体 NMR におけるプロトン間の距離測定法を SAIL バリンの利用により開発した。 ^1H は天然にも多く存在して感度が良いため ^1H -NMR は有用であり、溶液状態では広く利用されている。また、2D-NOESY 法で得られるような ^1H 間距離情報は構造解析をする上で重要である。ペプチド鎖の折れたたみを決定するためには離れた残基間の距離情報が必要であるが、 ^1H は炭素骨格から突き出ているため、構造決定に必要な距離は ^{13}C - ^{13}C 間よりも ^1H - ^1H 間の方が短く有利である。

しかし、固体状態においては ^1H - ^1H 双極子相互作用による線幅が大きく化学シフトによる分散が ^{13}C より小さいために、 ^{13}C に比べて高分解能な ^1H スペクトルを得ることは難しい。そこで、 ^1H の分解能を上げることを目的として以下の 3 点を利用した。まず、高い磁場 (16.4 T、 ^1H 共鳴周波数: 700 MHz) を用いて化学シフト差を双極子結合より大きくする。そして、高い MAS 回転数で ^1H 間双極子結合を切る。さらに、構造情報を失わないように SAIL 法により重水素化して ^1H 間双極子結合を弱める。さらに ^1H 直接観測による ^1H 間距離解析法をも開発した。 ^{13}C を通じて観測すると分解能は高いが、 ^1H を直接観測することで感度を上げることができる。

IV. 膜タンパク質合成法の開発 (相本)

阿久津グループの H^+ -ATP 合成酵素の構造と機能の解析に関する研究の一環として、 H^+ -ATP 合成酵素 c サブユニットの合成を行うとともに、高精度 NMR 解析に重要な役割を果たすであろう化学合成標識蛋白質の調製法の開発を行った。

c サブユニットは 79 残基のアミノ酸からなり、固相法で合成するにはやや大きすぎるため、筆者らの開発したチオエステル法で合成した。この蛋白質を 2 つのセグメントに分割し、それぞれを固相法で合成した。また、N 末端側のセグメントはペプチドチオエステル体として合成した。それぞれを逆相 HPLC で精製したのち、アミノ基に保護基を導入して合成ブロックとし、銀イオン、活性エステル構成成分、塩基存在下、c サブユニットを合成した。本合成において、合成ブロックや最終目的物の精製は困難を極めた。分離用カラムや溶媒を検討した結果、フェニルカラムを用い、ギ酸-2-プロピルアルコール-水を溶出液とする精製条件を見だし、合成ブロックの精製ならびに高純度の標識 c サブユニットを得ることに成功した。また、通常用いられている反応溶媒に対する合成ブロックの溶解性が悪く、反応の進行はきわめて遅かった。そこで、クロロホルム-メタノールという通常は用いられることの無い混合溶媒を縮合溶媒として試したところ、26% の収率で目的物を得ることができた。本研究を通して、世界で最初に 2 回膜貫通型蛋白質を化学的に合成することに成功した。

c サブユニットの合成を通して、易溶性蛋白質であれば小型酵素程度のものであっても合成できる段階に達している一方で、膜貫通ドメインを有する蛋白質の合成には多くの課題が残されていることが明らかとなった。

そこで、溶液ならびに固体 NMR を用いる蛋白質の構造・機能解析に今後とも大きく貢献するであろう化学合成蛋白質の調製法に関する総合的研究を行った。その結果、縮合法においては、縮合反応終了後、光照射によりペプチド鎖から除去できる補助基を開発するとともに、合成ブロックを順次結合することのできる補助基の開発にも成功した。また、蛋白質合成の一つのネックであったペプチドチオエステルの合成法においては、ラセミ化を効率的に抑制することができ、修飾蛋白質の合成にも威力を発揮するものと期待される *N-S* 転位反応を用いる方法を開発することができた。また、*N-S* アシル基転位反応を用いることにより、中性水溶液中で自動的にペプチド結合がチオエステル結合に変換されて合成ブロックを生成する新規合成ブロックを開発することに成功した。ここで得られた成果は、蛋白質の調製法の発展ならびに蛋白質の構造・機能解析に威力を発揮するものと期待される。

(2)研究成果の今後期待される効果

SAIL 法の今後の展開は疾患関連蛋白質を含む、より複雑な高分子蛋白質複合体の解析や、膜蛋白質の構造研究への大きく拡がることが期待されている。本課題研究においては限られたリソースを有効に利用しなければならないという制約から、SAIL 法の基本的技術的の完成に大きな重点がおかれ次のステップである固体 NMR への SAIL 法の拡張などに関しては大きな資金と人力を投入出来なかった。その中で本サブテーマにおいて得られた研究成果は高く評価すべきものであり、前項でも各所に述べられているように、平成 19 年度より開始される蛋白質解析基盤技術開発において推進が予定されている SAIL 法を中核として NMR 法の更なる技術開発に大きな礎石が得られた。

4 研究参加者

①都立大学甲斐荘グループ:SAIL テクノロジーズ G・首都大学東京 G(SAIL NMR 開発担当)

氏名	所属	役職	担当する研究項目	参加時期
甲斐荘正恒	都立大学	教 授	研究統括	H13.12-
小野 晶	都立大学	助教授	核酸・アミノ合成	H13.12-17. 3
磯辺 俊明	都立大学	教 授	蛋白質機能解析	H13.12-
淵上 和幸	都立大学	M	アミノ酸合成	H13.12-H14.3
石川 麗	都立大学	D3	核酸合成	H14.4-H17.3
岩下 伸行	都立大学	M	アミノ酸合成	H13.12-H14.3
岩佐 晴果	都立大学	M	アミノ酸合成	H13.12-H14.3
小神 将	都立大学	M	蛋白質 NMR 解析	H14.4-H15.3
田村 直也	都立大学	M	アミノ酸合成	H14.4-H15.3
塚本 太郎	都立大学	M	核酸合成	H14.4-H15.3
久保田美央	都立大学	M	核酸合成	H14.4-H16.3
河口久美子	都立大学	M	アミノ酸合成	H14.4-H16.3
高田 零	都立大学	M	NMR 構造解析	H14.4-H16.3
岩下 由紀	都立大学	M2	SAIL 法開発	H15.4-H17.3
杉森 望	都立大学	M2	SAIL 法開発	H15.4-H17.3
小菅 桃	都立大学	M2	核酸合成	H15.4-H17.3
小林久仁子	都立大学	M2	アミノ酸合成	H15.4-H17.3
大木 進野	都立大学	客員研究員	蛋白質構造決定	H13.12-H14.9
寺内 勉	都立大学	客員研究員	標識アミノ酸合成	H13.12-
小野 明	都立大学	客員研究員	標識アミノ酸合成	H13.12-
鳥澤 拓也	都立大学	客員研究員	蛋白質合成/NMR	H13.12-H.17.5
武田 光広	首都大学東京	客員研究員	蛋白質合成/NMR	H17.4-
吉田 均	首都大学東京	客員研究員	蛋白質構造決定	H14.9-H14.12
杉原 知子	都立大学	客員研究員	標識アミノ酸合成	H13.12-H14.5
土屋 征司	首都大学東京	客員研究員	標識蛋白質調製	H15.4-
若松 美紀	都立大学	客員研究員	標識蛋白質調製	H14.6-H16.3
戸塚 真由理	首都大学東京	客員研究員	標識蛋白質調製	H15.10-H17.
井上 亜希	首都大学東京	客員研究員	標識蛋白質調製	H17.4-
武藤麻紀子	都立大学		チーム事務	H13.12-H15.5
河原えりか	首都大学東京		チーム事務	H15.4-
石和 玲子	都立大学	客員研究員	蛋白質発現	H15.4-H17.3
吉田 均	首都大学東京	客員研究員	蛋白質構造決定	H17.11-H17.2
清水 真人	都立大学	客員研究員	標識蛋白質調製	H13.12-H14.7
桑迫香奈子	都立大学	客員研究員	標識蛋白質調製	H13.12-H14.3
上川合朋恵	SAIL tech.	SAIL tech.研究員	アミノ酸調製	H17.4-H18.3
遠藤 雅恵	SAIL tech.	SAIL tech.研究員	アミノ酸調製	H17.8-H17.9
下条めぐみ	SAIL tech.	SAIL tech.研究員	アミノ酸調製	H17.7-H17.8
若月 翔子	SAIL tech.	SAIL tech.研究員	アミノ酸調製	H18.4-
菅沼 一樹	都立大学	SAIL tech.研究員	標識蛋白質調製	H18.4-
近藤 早恵	都立大学	SAIL tech.研究員	標識蛋白質調製	H18.1-
森脇 義仁	都立大学	SAIL tech.研究員	標識蛋白質調製	H18.9-

②東海大学西山グループ(SAIL アミノ酸合成研究)

氏名	所属	役職	担当する研究項目	参加時期
西山幸三郎 大場 真 大熊 宏晶	東海大学 東海大学 東海大	教 授 助教授 修士	グループ統括 標識アミノ酸合成 SAIL アミノ酸合成	H14,4- H14,4- H16.4-H18.3

③大阪大学阿久津グループ(SAIL 法の固体 NMR への応用)

氏 名	所 属	役 職	研究項目	参加時期
阿久津秀雄 相本三郎 藤原敏道 川上 徹 八木宏昌 松木 陽 戸所泰人 小林将俊	大阪大学蛋白質 質研究所	教授 教授 助教授 助教授 助手 博士課程 博士課程 CREST 研 究員	グループ統括 標識ペプチド合成 固体 NMR 解析法 標識試料の調製 標識ペプチドの合成 固体 NMR パルス開発 標識G蛋白質研究 膜結合蛋白質解析法	H13.12～H18.11 H13.12～H18.3 H18. 3～H13.12 H18. 9 H13.12～H18.9

5 招聘した研究者等

氏 名(所属、役職)	招聘の目的	滞在先	滞在期間
Christian Griesinger, Professor, Max Plank Institute, Göttingen	JASS'03 Winter School 講師	大阪大学蛋白質 研究所	H16.1.25 ～ H16.2.1
Robert R. Griffin, Professor MIT	JASS'03 Winter School 講師	大阪大学蛋白質 研究所	H16.1.25 ～ H16.1.29
Mitsuhiko Ikura, Professor Ontario Cancer Institute	Symposium"Frontier of Biol. NMR 講師	大阪大学蛋白質 研究所	H16.1.22 ～ H16.1.28
Bong-Jin Lee, Professor Seoul National Univ.	Symposium"Frontier of Biol. NMR 講師	大阪大学蛋白質 研究所	H16.1.25 ～ H16.1.28
John L. Markley, Professor Univ. Wisconsin-Madison	JASS'03 Winter School 講師	大阪大学蛋白質 研究所	H16.1.25 ～ H16.2.1
Stanley J. Opella, Professor UCSD	Symposium"Frontier of Biol. NMR 講師	大阪大学蛋白質 研究所	H16.1.26 ～ H16.1.28
Heinz Rüterjans, Professor Univ. Frankfurt	Symposium"Frontier of Biol. NMR 講師	大阪大学蛋白質 研究所	H16.1.25 ～ H16.1.28
Peter E. Wright, Professor Scripps	Symposium"Frontier of Biol. NMR 講師	大阪大学蛋白質 研究所	H16.1.25 ～ H16.1.28
Ad Bax, Senior Research Fellow NIH	JASS'03 Winter School 講師	大阪大学蛋白質 研究所	H16.1.25 ～ H16.1.28

6 成果発表等

(1)原著論文発表 (国内誌 0 件、国際誌 69 件)

(甲斐荘正恒)

1. "Identification of the Metal Ion Binding Site on an RNA Motif from Hammerhead Ribozymes using ^{15}N -NMR Spectroscopy", Y. Tanaka, C. Kojima, E. H. Morita, K. Yamasaki, A. Ono, M. Kainosho, and K. Taira, *J. Am. Chem. Soc.*, 124, 4594-4601(2002).
2. "Graphical Analysis of the Relative Orientation of Molecular Alignment Tensors for a Protein Dissolved in Two Different Anisotropic Media", K. Nomura and M. Kainosho, *J. Magn. Reson.*, 154, 146-153 (2002).
3. "Distinctive Solution Conformation of Phosphatase Inhibitor CPI-17 Substituted with Aspartate at the Phosphorylation-site Threonine Residue", S.-y. Ohki, M. Eto, M. Shimizu, R. Takada, D. L. Brautigan, and M. Kainosho, *J. Mol. Biol.*, 326, 1539-1547 (2003).
4. "NMR Structure of Ubiquitin-like Domain in PARKIN: Gene Product of Familial Parkinson's Disease", M. Tashiro, S. Okubo, S. Shimotakahara, H. Hatanaka, H. Yasuda, M. Kainosho, S. Yoko. *J. Biomol. NMR*, 25, 153-156 (2003).
5. "The NMR Studies of Substituent Effects on the N-H...N Hydrogen Bond in Duplex DNA using 2'-Deoxyneblarine and ^{15}N Labeled 5-Substituted-2'-deoxyuridine Base Pairs", R. Ishikawa, A. Ono, M. Kainosho, *Nucleic Acids Research suppl.* 3, 57-58 (2003).
6. "Rotational Diffusion Tensor of Nucleic Acids from ^{13}C NMR Relaxation", J. Boisbouvier, Z. Wu, A. Ono, M. Kainosho, and A. Bax, *J. Biomol. NMR*, 27, 133-142 (2003).
7. "Phosphorylation-induced Conformational Change Responsible for the Function of a Myosin Phosphatase Inhibitor, CPI-17", S.-y. Ohki, M. Eto, R. Takada, M. Shimizu, D.L. Brautigan, and M. Kainosho, *Sci. & Tech. of Advanced Materials*, 5, 383-386 (2004).
8. "Efficient Production of Isotopically Labeled Proteins by Cell-free Synthesis: A Practical Protocol", T. Torizawa, M. Shimizu, M. Taoka, H. Miyano, and M. Kainosho, *J. Biomol. NMR*, 30, 311-325 (2004).
9. "NMR Assignment Methods for the Aromatic Ring Resonances of Phenylalanine and Tyrosine Residues in Proteins", T. Torizawa, A.M. Ono, T. Terauchi, and M. Kainosho, *J. Am. Chem. Soc.*, 127, 12620-12626 (2005).
10. "Carbon-13 NMR Method for the Detection of Correlated Hydrogen Exchange at Adjacent Backbone Peptide Amides and Its Application to Hydrogen Exchange in Five Antiparallel β -Strands within the Hydrophobic Core of *Streptomyces* Subtilisin Inhibitor (SSI)", K. Uchida, J.L. Markley, and M. Kainosho, *Biochemistry*, 44, 11811-11820 (2005).
11. "Structural Details on MDM2-P53 Interaction", A.-W. Chi, S.-H. Lee, D.-H. Kim, M.-J. Ahn, J.-S. Kim, J.-Y. Woo, T. Torizawa, M. Kainosho, and K.-H. Han, *J. Biol. Chem.*, 280, 38795-38802(2005).
12. "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).
13. "Evaluation of Stereo-array Isotope Labeling (SAIL) Patterns for Automated Structural Analysis of Proteins", T. Ikeya, T. Terauchi, P. Güntert, and M. Kainosho, *Magn. Res. Chem.*, 44, S152-S157(2006).

(西山幸三郎)

1. M. Oba, K. Ohkuma, H. Hitokawa, A. Shirai, K. Nishiyama, "Convenient synthesis of deuterated glutamic acid, proline, and leucine via catalytic deuteration of unsaturated pyroglutamate derivatives", *J. Label. Compds. Radiopharm.* 2006, 49, 229-235.
2. M. Oba, A. Iwasaki, H. Hitokawa, T. Ikegame, H. Banba, K. Ura, T. Takamura, K. Nishiyama, "Preparation of L-serine and L-cystine stereospecifically labeled with deuterium at the β -position", *Tetrahedron: Asymmetry* 2006, 17(12), 1890-1894.

(阿久津秀雄)

1. K. Sugase, Y. Oyama, K. Kitano, T. Iwashita, T. Fujiwara, H. Akutsu, and M. Ishiguro, Designing analogs of mini atrial natriuretic peptide based on structural analysis by NMR and restrained molecular dynamics. *J. Med. Chem.*, 45, 881-887 (2002).
2. A. Y. Nosaka, T. Fujiwara, H. Yagi, H. Akutsu and Y. Nosaka, Characterization of water in TiO₂ photocatalytic systems by solid state ¹H-NMR spectroscopy. *Chem. Lett.* 2002, 420-421 (2002).
3. T. Sato, T. Kawakami, K. Akaji, H. Konishi, K. Mochizuki, T. Fujiwara, H. Akutsu and S. Aimoto, Synthesis of a membrane protein with two transmembrane regions. *J. Peptide Sci.* 8, 172-180 (2002).
4. K. Sugase, Y. Oyama, K. Kitano, H. Akutsu, and M. Ishiguro, Structure-activity relationships for mini-atrial natriuretic peptide by proline-scanning mutagenesis and shortening of peptide backbone. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 12(9), 1245-1247 (2002).
5. E. Harada, Y. Fukuoka, T. Ohmura, A. Fukunishi, G. Kawai, T. Fujiwara, and H. Akutsu, Redox-coupled conformational alternations in cytochrome *c*₃ from *D. vulgaris* Miyazaki F on the basis of its reduced solution structure. *J. Mol. Biol.*, 319, 767-778 (2002).
6. Y.-H. Lee, H.-S. Won, H.-C. Ahn, S. Park, H. Yagi, H. Akutsu and B.-J. Lee, Backbone NMR assignments of the metal-free UreE from *Bacillus pasteurii*. *J. Biomol. NMR*, 24, 361-362 (2002).
7. E. Harada, J. Kumagai, K. Ozawa, S. Imabayashi, A. S. Tsapin, K. H. Nealon, T. E. Meyer, M. A. Cusanovich, and H. Akutsu, A directional electron transfer regulator based on heme-chain architecture in the small tetraheme cytochrome *c* from *Shewanella oneidensis*. *FEBS Lett.*, 532, 333-337 (2002)
8. Y. Kyogoku, Y. Fujiyoshi, I. Shimada, H. Nakamura, T. Tsukihara, H. Akutsu, T. Odahara, T. Okada, and N. Nomura, Structural genomics of membrane proteins. *Accounts. Chem. Res.*, 36, 199-206 (2003).
9. A. K. Khitrin, T. Fujiwara, and H. Akutsu, Phase-modulated heteronuclear decoupling in NMR of solids. *J. Magn. Reson.*, 162, 46-53 (2003)
10. Y. Matsuki, H. Akutsu and T. Fujiwara, Band-selective recoupling of homonuclear double-quantum dipolar interaction with a generalized composite 0degrees pulse: application to ¹³C aliphatic region-selective magnetization transfer in solids. *J. Magn. Reson.*, 162, 54-66 (2003)
11. A. Y. Nosaka, T. Fujiwara, H. Yagi, H. Akutsu and Y. Nosaka, Photocatalytic reaction sites at the TiO₂ surface as studied by solid-state ¹H-NMR spectroscopy. *Langmuir*, 19, 1935-1937 (2003).
12. K. Ozawa, Y. Takayama, F. Yasukawa, T. Ohmura, M. A. Cusanovich, Y. Tomimoto, H. Ogata, Y. Higuchi and H. Akutsu, Role of the aromatic ring of Tyr43 in tetraheme cytochrome *c*₃ from *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki F. *Biophys. J.*, 85, 3367-3374 (2003).
14. A. Y. Nosaka, E. Kojima, T. Fujiwara, H. Yagi, H. Akutsu and Y. Nosaka, Photoinduced changes of adsorbed water on a TiO₂ photocatalytic film as studied by ¹H-NMR spectroscopy. *J. Phys. Chem.* 107, 12042-12044 (2003).
15. Y. Matsuki, H. Akutsu and T. Fujiwara, Precision ¹H-¹H distance measurement via ¹³C NMR signals: Utilization of the ¹H-¹H double-quantum dipolar interactions recoupled under MAS conditions. *Magn. Reson. Chem.*, 42, 291-300 (2004).
16. T. Fujiwara, Y. Todokoro, H. Yanagishita, M. Tawarayama, T. Kohno, K. Wakamatsu and H. Akutsu, Signal assignments and chemical-shift structural analysis of uniformly ¹³C, ¹⁵N-labeled peptide, Mastoparan-X, by multidimensional solid-state NMR under magic-angle spinning. *J. Biomol. NMR*, 28, 311-352 (2004).
17. M. Sato, N. Shibata, Y. Morimoto, Y. Takayama, K. Ozawa, H. Akutsu, Y. Higuchi and N. Yasuoka, X-ray induced reduction of the crystal of high-molecular weight cytochrome *c* revealed by microspectrometry. *J. Synchrotron Rad.*, 11, 113-116 (2004).

19. T. Saitoh, Y. Tachibana, Y. Higuchi, H. Hori, and H. Akutsu, Correlation between the g tensors and the nonplanarity of porphyrin rings in *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki F cytochrome c_3 , studied by single crystal EPR. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 77, 357-363 (2004).
20. A. Y. Nosaka, T. Fujiwara, H. Yagi, H. Akutsu and Y. Nosaka, Characteristics of water adsorbed on TiO_2 photocatalytic system on temperature increase as studied by solid-state ^1H -NMR Spectroscopy. *J. Phys. Chem.*, 108, 9121-9125 (2004).
21. Y. Takayama, E. Harada, R. Kobayashi, K. Ozawa and H. Akutsu, Roles of non-coordinated aromatic residues in redox regulation of cytochrome c_3 from *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki F. *Biochemistry*, 43, 10859-10866 (2004).
22. J.-H. Lee, C.-J. Park, J.-S. Shin, T. Ikegami, H. Akutsu, and B.-S. Choi, NMR structure of the DNA decamer duplex containing double T/G mismatches of *cis-syn* cyclobutane pyrimidine dimer: implications for DNA damage recognition by the XPC-hHR23B complex. *Nucl. Acid Res.*, 32, 2474-2481 (2004).
23. S. Iimura, H. Yagi, K. Ogasawara, H. Akutsu, Y. Noda, S. Segawa, and K. Yutani, Unusually slow denaturation and refolding processes of pyrrolidone carboxyl peptidase from a hyperthermophile are highly cooperative: real-time NMR studies. *Biochemistry*, 43, 11906-11915 (2004).
24. H. Yagi, T. Tsujimoto, T. Yamazaki, M. Yoshida, and H. Akutsu, A conformational change of H^+ -ATPase β monomer revealed on segmental isotope labeling NMR spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.*, 126, 16632-16638 (2004).
25. M. Umitsu, H. Morishita, Y. Murata, K. Uda, H. Akutsu, T. Yagi, and T. Ikegami, ^1H , ^{13}C and ^{15}N resonance assignments of the first cadherin domain of Cadherin-related neuronal receptor (CNR)/Protocadherin. *J. Biomol. NMR*, 31 (4): 365-366 (2005).
26. N. Yahata, T. Saitoh, Y. Takayama, K. Ozawa, H. Ogata, Y. Higuchi, and H. Akutsu, Interaction of Cytochrome c_3 with [NiFe] Hydrogenase from *D. vulgaris* Miyazaki F. *Biochemistry*, 45, 1653-1662 (2006).
27. S.-M. Kim, T. Yamamoto, Y. Todokoro, Y. Takayama, T. Fujiwara, J.-S. Park, and H. Akutsu, Phospholipid-dependent regulation of cytochrome c_3 -mediated electron transport across membranes. *Biophys. J.*, 90, 506-513 (2006).
28. K. Akagi, J. Watanabe, M. Hara, Y. Kezuka, E. Chikaishi, T. Yamaguchi, H. Akutsu, T. Nonaka, T. Watanabe, and T. Ikegami, Identification of the substrate interaction region of the chitin-binding domain of streptomyces griseus chitinase C. *J. Biochem.*, 139, 483-493 (2006).
29. T. Nakano, T. Ikegami, T. Suzuki, M. Yoshida, H. Akutsu, A new solution structure of ATP synthase subunit c from thermophilic *Bacillus* PS3, suggesting a local conformational change for H^+ -translocation. *J. Mol. Biol.*, 358, 132-144 (2006).
30. T. Takai, T. Takaya, M. Nakano, H. Akutsu, A. Nakagawa, S. Aimoto, K. Nagai, and T. Ikegami, Orexin-A is composed of a highly conserved C-terminal and a specific, hydrophilic N-terminal region, revealing the structural basis of specific recognition by the orexin-1 receptor. *J. Peptide Sci.*, 12, 443-454 (2006).
31. Y. Takayama, Y. Kobayash, N. Yahata, T. Saitoh, H. Hori, T. Ikegami and H. Akutsu, Specific binding of CO to tetraheme cytochrome c_3 . *Biochemistry*, 45, 3163-3169 (2006).
32. T. Saitoh, T. Ikegami, M. Nakayama, H. Akutsu and T. Hase, NMR study of the electron transfer complex of plant ferredoxin and sulfite reductase: mapping the interaction sites of ferredoxin. *J. Biol. Chem.*, 281, 10482-10488 (2006).
33. A. Y. Nosaka, J. Nishino, T. Fujiwara, T. Ikegami, H. Yagi, H. Akutsu and Y. Nosaka, Effects of thermal treatments on the recovery of adsorbed water and photocatalytic activities of TiO_2 photocatalytic systems. *J. Phys. Chem. B*, 110, 8380-8385 (2006).
34. T. Fujiwara and H. Akutsu, Secondary Structure Analysis of Proteins from Angle Dependent Interactions. *Modern Magnetic Resonance*, Ed. G. Webb, Springer Netherlands, in press (2006).
35. Y. Kakitani, H. Nagae, T. Mizoguchi, A. Egawa, K. Akiba, T. Fujiwara, H. Akutsu and Y.

- Koyama, Assembly of a mixture of isomeric BCl *c* from *Chlorobium limicola* as determined by intermolecular ^{13}C - ^{13}C dipolar correlations: Coexistence of dimer-based and pseudo-monomer-based stackings. *Biochemistry*, 45, 7574-7584 (2006).
36. Y. Todokoro, I. Yumen, K. Fukushima, S.-W. Kang, J.-S. Park, T. Kohno, K. Wakamatsu, H. Akutsu and T. Fujiwara, Structure of tightly membrane-bound mastoparan-X, a G-protein-activating peptide, determined by solid-state NMR. *Biophys. J.*, 91, 1368-1379 (2006).
37. N. Yahata, K. Ozawa, Y. Tomimoto, K. Morita, H. Komori, H. Ogata, Y. Higuchi and H. Akutsu, Roles of Charged Residues in pH-Dependent Redox Properties of Cytochrome c_3 from *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki F. *Biophysics*, 2, 45-56 (2006).
38. E. Harada, Y. Todokoro, H. Akutsu and T. Fujiwara, Detection of peptide-phospholipid interaction sites in bilayer membranes by ^{13}C NMR spectroscopy: Observation of $^2\text{H}/^{31}\text{P}$ -selective ^1H -depolarization under magic-angle spinning. *J. Amer. Chem. Soc.*, 128, 10654-10655 (2006).
39. H. Morishita, M. Umitsu, Y. Murata, N. Shibata, K. Udaka, Y. Higuchi, H. Akutsu, T. Yamaguchi, T. Yagi, and T. Ikegami, Structure of the CNR/Protocadherin- α first cadherin domain reveals diversity across cadherin families. *J. Biol. Chem.*, in press.
40. M. Kobayashi, Y. Matsuki, I. Yumen, T. Fujiwara, and H. Akutsu, Signal assignment and secondary structure analysis of a uniformly [^{13}C , ^{15}N]-labeled membrane protein, H^+ -ATP synthase subunit *c*, by magic-angle spinning solid-state NMR. *J. Biomol. NMR*, in press.
41. K. Iwata, T. Fujiwara, Y. Matsuki, H. Akutsu, S. Takahashi, H. Naiki, and Y. Goto, 3D Structure of amyloid protofilaments of $\beta 2$ -microglobulin fragment probed by solid-state NMR. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, in press.

(相本三郎)

1. T. Sato, T. Kawakami, K. Akaji, H. Konishi, K. Mochizuki, T. Fujiwara, H. Akutsu, S. Aimoto, Synthesis of a membrane protein with two transmembrane regions, *J. Pept. Sci.*, 8, 172-180 (2002)
2. K. Teruya, T. Kawakami, K. Akaji, S. Aimoto, Total synthesis of [L40I, C90A, C109A]-human T-cell leukemia virus-type 1 protease, *Tetrahedron Lett.*, 43, 1487-1490 (2002)
3. T. Kawakami and S. Aimoto, A photoremovable ligation auxiliary for use in polypeptide synthesis, *Tetrahedron Lett.*, 44, 6059-6061 (2003)
4. T. Sato and S. Aimoto, Use of thiosulfonate for the protection of thiol groups in peptide ligation by the thioester method, *Tetrahedron Lett.*, 44, 8085-8087 (2003).
5. H. Yamada, T. Sasaki, S. Niwa, T. Oishi, M. Murata, T. Kawakami, and S. Aimoto, Intact Glycation End Products Containing Carboxymethyl-Lysine and Glyoxal Lysine Dimer Obtained from Synthetic Collagen Model Peptide, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 14, 5677-80 (2004).
6. T. Sato, Y. Saito, S. Aimoto, Synthesis of the C-terminal Region of Opioid Receptor Like 1 in an SDS Micelle by the Native Chemical Ligation: Effect of Thiol Additive and SDS Concentration on Ligation Efficiency, *J. Peptide Sci.* 11: 410-416 (2005)
7. W. Liu, E. Crocker, W. Zhang, J. I. Elliott, B. Luy, H. Li, S. Aimoto, S. O. Smith, Structural Role of Glycine in Amyloid Fibrils Formed from Transmembrane α -Helices. *Biochemistry*, 44, 3591-3597 (2005).
8. T. Kawakami, M. Tsuchiya, K. Nakamura, S. Aimoto, Sequential Peptide Chemical Ligation by the Thioester Method and Extended Chemical Ligation. *Tetrahedron Lett.*, 46, 5533-5536 (2005).
9. M. Mori, T. Oishi, S. Matsuoka, S. Ujihara, N. Matsumori, M. Murata, M. Satake, Y. Oshima, N. Matsushita and S. Aimoto, Ladder-shaped polyether compound, desulfated yessotoxin, interacts with membrane-integral α -helix peptides. *Bioorg. Med. Chem.*, 13, 5099-5103 (2005)
10. T. Kawakami, M. Sumida, K. Nakamura, T. Vorherr, S. Aimoto, Peptide Thioester Preparation Based on an *N*-S Acyl Shift Reaction Mediated by a Thiol Ligation Auxiliary. *Tetrahedron Lett.*, 46, 8805-8807 (2005)
11. T. Takai, T. Takaya, M. Nakano, H. Akutsu, A. Nakagawa, S. Aimoto, K. Nagai, T. Ikegami,

Orexin-A is composed of a highly conserved C-terminal and a specific, hydrophilic N-terminal region, revealing the structural basis of specific recognition by the orexin-1 receptor. *J. Pept. Sci.*, 12, 443-454 (2006)

12. H. Kim, J. K. Cho, S. Aimoto, Y. S. Lee, Solid-Phase Staudinger Ligation from a Novel Core-Shell-Type Resin: A Tool for Facile Condensation of Small Peptide Fragments. *Org. Lett.*, 8, 1149-1151 (2006).

13. K. Nakamura, M. Sumida, T. Kawakami, T. Vorherr, S. Aimoto, Generation of an S-Peptide via an N-S Acyl Shift Reaction in TFA Solution, *Bull. Chem. Soc. Jpn*, in press.

(2)その他の著作物

(甲斐荘正恒)

1. “ゲノム蛋白質の高効率・高精度 NMR 構造解析手法の開発に向けて”、寺内、大木、甲斐荘、蛋白質 核酸 酵素 増刊、構造プロテオミクスー蛋白質ネットワークの構造生物学、47, 1045-1051(2002).

2. “ゲノム蛋白質の高効率・高精度 NMR 構造解析手法の開発”、大木、寺内、甲斐荘、ケミカルエンジニアリング、47, 494-499 (2002).

3. “安定同位体利用NMR法の高度化と構造生物学への応用”、甲斐荘、戦略的基礎研究推進事業平成8年度採択研究課題「生命活動のプログラム」研究終了報告書、科学技術振興事業団、203-243(2002).

4. “タンパク性メタロプロテアーゼインヒビターSMPI の構造と機能”、小田、平賀、村尾、楯、甲斐荘、蛋白質化学第7巻「制御タンパク質 インヒビター」(大内編)、廣川書店(東京)、60-67 (2002).

5. “構造生物学におけるNMR研究手法の最近の進歩”、鳥澤、寺内、甲斐荘、生化学、74, 1279-1284 (2002).

6. “安定同位体利用 NMR 法によるゲノム蛋白質の立体構造決定”、甲斐荘、医学をゲノムする(山村、丸山、西村、柳編)、南山堂(東京)、95-105 (2004).

7. “NMR によるタンパク質の高精度・高効率立体構造決定手法(SAIL 法)の開発”、鳥澤、寺内、甲斐荘、ゲノムプロテオミクスの新展開、エヌ・ティー・エス(東京)、662-667 (2004).

8. “NMR(核磁気共鳴分光学)-溶液中のタンパク質の立体構造を見る-”、大木、甲斐荘、化学と教育、52、320-322 (2004).

9. “タンパク質の立体構造解析のための新しい安定同位体 NMR 技術-SAIL 法の開発”、鳥澤、寺内、甲斐荘、生物物理、44, 200-205 (2004).

10. “SAIL 法による高分子量蛋白質の立体構造解析”、鳥澤、寺内、小野、甲斐荘、蛋白質 核酸 酵素、50, 1375-1381 (2005).

11. “安定同位体標識アミノ酸を利用したタンパク質の高次構造解析” 寺内、小野、化学と工業、Vol.158, 12, 1426-1429 (2005)

“蛋白質 NMR 構造解析の可能性を拓げる:SAIL 法”, 甲斐荘、生体の科学、56, 606-613 (2005).

12. “ミオシンホスファターゼ阻害タンパク質 CPI-17 の構造と機能”,大木、江藤、松澤、甲斐荘、生物物理、45, 72-77(2005).

13. “タンパク質構造解析のための次世代NMR法の開発と事業化” 寺内、甲斐荘、化学工業 Vol.57 No.1, 59-66 (2006)

14. “タンパク質 NMR の常識を覆す革新技術 SAIL 法”,甲斐荘正恒、Peter Güntert,バイオテクノロジージャーナル、7-8月号、467-470(2006).

15. “SAIL法による高分子量タンパク質の構造決定—日本発の次世代世界標準 NMR 技術をめざ

して“武田光広、寺内勉、甲斐荘正恒、BIONICS, 8月号 60-63 (2006).

(阿久津秀雄)

1. 阿久津秀雄・藤原敏道; 固体 NMR による膜蛋白質の解析、蛋白質核酸酵素増刊「構造プロテオミクス」47 巻、1144-1151 (2002)
2. 阿久津秀雄・嶋田一夫・鈴木栄一郎・西村善文編; NMR 分光法—原理から応用まで—(日本分光学会測定法シリーズ 41)、学会出版センター (2003). 執筆 第2章「化学シフト」11-25、第5章「核スピン緩和」45-61
3. 阿久津秀雄; タンパク質研究における NMR の新しい挑戦、現代化学 387 号 (6 月号) 12-17 (2003)
4. 阿久津秀雄; 脂質二重膜 2 次元溶媒における分子混合特性の固体 NMR による解析、膜 28 巻 3 号 102-110 (2003)
5. 阿久津秀雄; 核磁気共鳴法 (NMR) によるリポソーム系の研究、リポソーム応用の新展開 (秋吉、辻井監修) NTS、p. 90-99 (2005)
6. 阿久津秀雄、月原富武、嶋田一夫編; 生命秩序を担う生体超分子、蛋白質核酸酵素増刊 50 巻 10 号 (2005); 執筆 八木宏昌、阿久津秀雄「H⁺-ATP 合成酵素 F₁ の回転駆動力は何か」1160-1166

(3)学会発表 (国際学会発表及び主要な国内学会発表)

(甲斐荘正恒)

国外講演

1. Masatsune Kainosho “Stereo-Array Isotope-Labeling (SAIL) Method. -High-throughput and Accurate Structural Determinations of Proteins-“, Workshop on High-throughput NMR Structure Determination of Proteins in the Post-genomic Era, (2003/11/1-2, Taipei, Taiwan)
2. Masatsune Kainosho “Toward High-throughput, High-accuracy NMR Structural Information for Larger Proteins beyond 40 kDa” AstraZeneca (2004/7/8, Manchester, UK)
3. Masatsune Kainosho “Stereo-Array-Isotope-Labeling -SAIL to high-throughput, high-accuracy NMR structures for larger proteins beyond 50 kDa-” Abbott (2004/7/20, Abbott Park, USA)
4. Masatsune Kainosho “Stereo-Array-Isotope-Labeling (SAIL) -A next-generation technology for protein NMR-” Bristle-Myers Squibb, (2004/7/25, Princeton, USA)
5. Masatsune Kainosho “Stereo-Array Isotope Labeling -SAIL to high-throughput, high-accuracy NMR structures for larger proteins beyond 50 kDa” Univ. Wisconsin-Madison NMRFAM (2004/7/23, Madison, USA)
6. Masatsune Kainosho “Stereo-array-isotope-labeling (SAILing) : Toward high-throughput, high-accuracy NMR structures for larger proteins beyond 40kDa”, The 25th Annual meeting of Korean Magnetic Resonance Society (2004/8/25, Busan, Korea)
7. Masatsune Kainosho “SAILing to large proteins: A new stable-isotope assisted NMR method”, ISMAR Conference (2004/10/28, Jacksonville, USA)
8. Masatsune Kainosho “Stereo-array-isotope-labeling (SAIL) technology: SAILing toward high-throughput, high-accuracy NMR structural determination of larger proteins beyond 40 kDa”, Carnegie Mellon Univ. (2004/11/1, Pittsburgh, USA)
9. Masatsune Kainosho “A New Horizon for Protein NMR Spectroscopy: SAIL Technology”, Korea-Japan Bilateral Symposium on Biological NMR (2004/12/3, Seoul, Korea)
10. Masatsune Kainosho “Stereo-Array Isotope Labeling (SAIL) Method: High-throughput and Accurate Structural Determinations of Proteins”, Symposium on Recent Advances in Biomolecular

NMR (2005/1/13-14, Taipei, Taiwan)

11. Masatsune Kainosho “The SAIL Method for Protein NMR Spectroscopy”, The 21th ICMRBS, plenary lecture (2005/1/16-21, Hyderabad, India)
12. Masatsune Kainosho “SAIL Method: An ultimate stable-isotope assisted NMR approach”, Keystone Symposium on Frontier of NMR in Molecular Biology (2005/1/29-2/4, Banff, Canada)
13. Masatsune Kainosho “Stereo-Array Isotope Labeling (SAIL) Method: High-throughput and Accurate Structural Determinations of Proteins”, Ontario Cancer Institute (2005/2/7, Toronto, Canada)
14. Masatsune Kainosho “Optimal Isotope Labeling for NMR Protein Structure Determination”, National Institute of Health (NIH) (2005/7/29, Bethesda, USA)
15. Masatsune Kainosho “Optimal Isotope Labeling for NMR Protein Structure Determination”, Harvard Medical School (2005/7/27, Boston, USA)
16. Masatsune Kainosho “Optimal isotope labeling for NMR protein structure determination: The SAIL method”, Telluride Workshop on Protein Dynamics (2005/8/3, Telluride, USA)
17. Masatsune Kainosho “Optimal isotope labelling for efficient and accurate NMR structure determinations of larger proteins”, PACIFICHEM 2005 (2005/12/15-17, Honolulu, Hawaii, USA)
18. “Optimal Isotope Labelling for NMR Structure Determinations of Proteins : The SAIL Method”, The International NMR conference in Korea (2006/2/21, Seoul, Korea)
19. Masatsune Kainosho “A Long and Winding Road for SAILing (1965-2006)” Toronto Univ. Seminar (2006/5/12, Toronto, Canada)
20. Masatsune Kainosho “Optimal Isotope Labeling for NMR Protein Structure Determinations” Structural Biology Meeting (2006 /5/15, Toronto, Canada)
21. Masatsune Kainosho “Stereo-array isotope labeling (SAIL) method for protein structure determinations: Current status and future” CA NMR-Life Workpackage Meeting (2006/6/15-16, Utrecht, The Netherlands)
22. Masatsune Kainosho “Stereo-array isotope labelling (SAIL) method for protein structure determinations: Current status and future”, ESF/LESC Exploratory Workshop: Experimental & Computational Aspects of High-throughput Protein NMR (2006/6/17-20, Göteborg, Sweden)
23. Masatsune Kainosho “Optimal Isotope Labeling for NMR Protein Structure Determinations”, NMR in structural Biology. Mini-symposium at Swedish NMR Center (2006/6/21, Göteborg, Sweden)
24. Masatsune Kainosho “Stereo-Array Isotope Labeling: SAILing to Larger Proteins”, Univ. Frankfurt (2006/8/16, Frankfurt, Germany)
25. Masatsune Kainosho “SAILing to Larger Proteins: A New Horizon of Isotope Labeling Method for Protein NMR Spectroscopy”, International Conference on Magnetic Resonance in Biological Systems (ICMRBS 2006) (2006/8/21-25, Göttingen, Germany)
26. Masatsune Kainosho “SAILing to Larger Proteins: A Strategy for Optimal Isotope Labeling for Protein NMR Spectroscopy”, The 5th International NCCR Symposium on New Trends in Structural Biology (2006/9/15-16, Zürich, Switzerland)
27. Masatsune Kainosho “The SAIL method – Toward the next-generation world de facto standard”, The 4th Taiwan-Japan NMR Symposium (2006/10/15-16, Taipei, Taiwan)

国内講演

1. 甲斐荘正恒、鳥沢拓也、寺内勉 “蛋白質NMRにおける立体整列同位体標識法の開発”、第3回日本蛋白質科学会年会、(2003/6/24, 札幌)
2. 甲斐荘正恒 “核酸とNMRと京極先生”、構造生物学と分光学の源流—京極好正先生追悼シンポジウム (2003/8/1, 大阪)

3. 甲斐荘正恒 “安定同位体利用NMR技術を用いるゲノム蛋白質の構造決定”、第27回阿蘇シンポジウム “、(2003/8/2, 熊本)
4. 甲斐荘正恒 “蛋白質立体構造解析の新NMR技術の開発と展開”、岡山理科大学基礎理学科・学術講演会、(2003/8/5, 岡山)
5. 鳥沢拓也、寺内勉、甲斐荘正恒 “タンパク質構造解析に向けた立体整列同位体標識 (SAIL) 法 “、タンパク3000プロジェクト公開シンポジウム、(2003/9/26, 東京)
6. 甲斐荘正恒 “蛋白質NMR研究における立体整列同位体標識 (SAIL) 法の応用”、大阪大学蛋白質研究所COE国際シンポジウム、(2003/10/27, 大阪)
7. 甲斐荘正恒 “Stereo-array-isotope-labeling (SAIL) method in protein NMR spectroscopy”、CREST-IPR International Symposium on Frontier of Biological NMR Spectroscopy”、(2004/1/26, 大阪)
8. 甲斐荘正恒 “構造ゲノム科学に向けた最先端NMR解析技術の開発:SAIL技術のもたらすもの” 日本生物物理学会第42回年会、(2004/12/13, 京都国際会館)
9. 甲斐荘正恒 “立体整列同位体標識 (SAIL) 技術の蛋白質構造決定への応用—一次世代の世界標準技術の開発”、ゲノムテクノロジー第164委員会 第15回(プロテオミクス)研究会、(2004/2/18, 東京大学)
10. 甲斐荘正恒 “Stereo-array Isotope Labeling(SAIL) method in protein NMR spectroscopy”、CREST-IPR International Symposium on Frontier of Biological NMR Spectroscopy (2004/1/26, 大阪)
11. 甲斐荘正恒 “ゲノム蛋白質の高効率・高精度NMR解析法の開発”、日本分光学会 NMR部会シンポジウム (2004/9/24, 東京)
12. 甲斐荘正恒 “生体系NMRにおける安定同位体の利用—SAIL技術へ至る道”、ブルカー・ユーザーズミーティング、(2004/10/5-6, 大阪・東京)
13. 甲斐荘正恒 “タンパク質構造の研究の動向：将来”、第77回日本生化学会大会 (2004/10/14-16, パシフィコ横浜)
14. 鳥澤拓也、寺内勉、岩下由紀、杉森望、小野明、土屋征司、田井真由理、Peter Guentert、甲斐荘正恒 “SAIL法による高分子量タンパク質のNMR解析に向けた取り組みの現状”、第43回NMR討論会、(2004/11/10, 駒場エミナース)
15. 甲斐荘正恒 “SAIL法による高分子量蛋白質の立体構造解析”、大阪大学蛋白質研究所セミナー、(2004/11/18, 大阪大学蛋白質研究所)
17. 甲斐荘正恒 “次世代タンパク質立体構造解析 (SAIL法) の開発と応用”、バイオEXP02005 (2005/5/19, 東京ビッグサイト)
18. 甲斐荘正恒、 “立体整列同位体標識 (SAIL) 法—タンパク質科学における次世代世界標準基幹技術—”、タンパク3000産学連携フォーラム (2005/10/7, 北海道大学)
19. 甲斐荘正恒 “Optimal isotope labelling for NMR Proteins Structure Determination: Stereo-Array Isotope Labeling (SAIL) Approach”、The 1st Asia-Pacific NMR Society Symposium/ 第44回NMR討論会 (2005/11/8, 横浜大榎橋ホール)
20. 甲斐荘正恒 “タンパク質の立体構造解析に向けた安定同位体NMR技術の最適化”、名古屋大学COEセミナー (2006/3/23, 名古屋大学)
21. 甲斐荘正恒 “タンパク質NMR構造解析の新技术—SAIL法”、地域再生コンソーシアム研究開発事業報告会 (2006/3/23, 北海道大学)
22. 甲斐荘正恒 “立体整列同位体標識 (SAIL) 法を基盤としたNMR解析技術”、大阪大学蛋白質研究所セミナー「より巨大な生体分子系の解析をめざした磁気共鳴法—高感度化と長距離測定—」(2006/7/27-28, 大阪大学蛋白質研究所)

23. 甲斐荘正恒 “Optimal isotope labeling for protein NMR spectroscopy”, New Frontiers of NMR Molecular Science、(2006/7/31、岡崎・生理研)

(西山幸三郎)

1. 大場 真、高村 正、番場裕之、浦 晃造、西山幸三郎、「重水素化セリナールの不斉還元を用いる重水素標識セリンおよびシスチンの合成」、日本化学会第 86 春季年会、船橋、2006年3月
2. 寺内 勉、大熊宏昌、大場 真、西山幸三郎、甲斐荘正恒、「位置・立体選択的安定同位体標識セリンを鍵中間体に用いた多重安定同位体標識システイン及びアラニンの合成」、日本化学会第 86 春季年会、船橋、2006年3月

(阿久津秀雄)

1. H. Akutsu, High-resolution Multidimensional Solid-State NMR Analysis of Biomolecules, Symposium on Biomedical Magnetic Resonance, Lucknow, India, January, 2002
2. H. Akutsu, Overproduction of Tetraheme Cytochrome c_3 and Determination of Its Solution Structure in the Fully Reduced State, 2nd Tsinghua International Conference of Protein Sciences, Beijing, China, June 3-6, 2002
3. H. Akutsu, Y. Miyasaka, M. Kainosho and T. Fujiwara, Structural Analysis of a Ligand Bound to a Large Protein, 34th American Chemical Society Central Regional Meeting, Michigan, USA, June 26-29, 2002
4. A. Y. Nosaka, T. Fujiwara, H. Yagi, H. Akutsu and Y. Nosaka, Behaviors of Alcohol on The Surface of Photocatalytic Systems, XIXth IUPAC Symposium on Photochemistry, Budapest, Hungary, July 14-19, 2002
5. A. Y. Nosaka, T. Fujiwara, H. Yagi, H. Akutsu and Y. Nosaka, Characterization of Water in TiO₂ Photocatalytic Systems by Solid State NMR Spectroscopy, 14th International Conference on Photochemical Conversion and Storage of Solar, Energy, Sapporo, Japan, August 4-9 2002
6. H. Akutsu and T. Fujiwara, Structural Analysis of Mastparan X by Solid-State NMR, XXth International Conference on Magnetic Resonance in Biological Systems, Toronto, Canada, August 25-30, 2002.
7. H. Akutsu, Protein Overproduction, NMR Proteomics, and Structural Biology, First Osaka-Yonsei Joint Proteomics Symposium, Seoul, Korea, October 9, 2002.
8. H. Akutsu, Protein Overproduction, NMR Proteomics, and Structural Biology, The 59th Annual Fall Meeting of the Biochemical Society of the Republic Korea, Taejon, Korea, October 10-11, 2002.
9. H. Akutsu, Structural change of the β subunit and the rotation of F₁ ATPase, The 6th membrane Research and The 13th ATI International Forum, Nagoya, Japan, November 4-7, 2002.
10. Y. Takayama, R. Kobayashi, E. Harada, K. Ozawa and H. Akutsu Characterization of the F20A Mutant of Cytochrome c_3 from *D. vulgaris* Miyazaki F. The First Asian Meeting of Bioinorganic Chemistry, Okazaki, Japan, March 7-10, 2003.
11. N. Yahata, K. Ozawa and H. Akutsu, The Effects of Surface Charges in Cytochrome c_3 from *D. vulgaris* Miyazaki F on Its Reduction by Hydrogenase. The First Asian Meeting of Bioinorganic Chemistry, Okazaki, Japan, March 7-10, 2003.
12. H. Akutsu, Y. Todokoro, Y. Miyasaka, M. Kainosho and T. Fujiwara, Analysis of the Structure of the Ligand Molecule Bound to a large protein by Solid-State NMR. Symposium on Biomedical Spectroscopy, Seoul. Korea, April 25, 2003.
13. Y. Nosaka, T. Fujiwara, H. Yagi, H. Akutsu and Y. Nosaka, Water properties in TiO₂ photocatalytic systems as studied by solid-state ¹H-NMR. The electron chemical society 203rd Meeting, Paris, France, April 27-March 2, 2003.
14. H. Akutsu, A Direction Electron Transfer Regulator Based on Heme-Chain Architecture in The Small Tetraheme Cytochrome c from *Shewanella oneidensis*. Second International Conference on

Biomedical Spectroscopy, London, UK, July 5-8, 2003.

15. A. Y. Nosaka, E. Kojima, T. Fujiwara, H. Yagi, H. Akutsu and Y. Nosaka, Photoinduced changes of adsorbed water on TiO₂ photocatalytic film surfaces as studied by ¹H-NMR spectroscopy. 21st International Conference on Photochemistry, Nara, Japan, July 26-31, 2003.

16. A. Y. Nosaka, T. Fujiwara, H. Yagi, H. Akutsu and Y. Nosaka, Water properties in various TiO₂ photocatalytic systems as studied by solid-state ¹H-NMR spectroscopy. 54th Annual Meeting of the International Society of electrochemistry, Sao Pedro, Brazil, August 31-September 5, 2003.

17. T. Saitoh, F. Delaglio, T. Fujiwara and H. Akutsu, Three dimensional structure analysis of metalloproteins using long range structure information from paramagnetic effects. Korea-Japan Bilateral Symposium on Biological NMR, Seoul, October 6, 2003.

18. Y. Matsuki, Y. Sudo, C. Kojima, T. Fujiwara, N. Kamo and H. Akutsu, Novel Solid-NMR Approach to Structural Analysis of Proteins. Korea-Japan Bilateral Symposium on Biological NMR, Seoul, October 6, 2003.

19. Y. Todokoro, T. Fujiwara, J.-S. Park, S.-W. Kang, T. Kohno, K. Wakamatsu and H. Akutsu, Structural Analysis of Membrane-Bound Mastoparan-X by Solid-State NMR. Korea-Japan Bilateral Symposium on Biological NMR, Seoul, October 6, 2003.

20. H. Akutsu, Investigation of the Electron Transfer Regulation in Proteins by NMR. KRIBB Conference "Critical Assessment of NMR Structural Biology", Seoul, October 7-8, 2003.

21. H. Akutsu, Open-closed conformational change of H⁺-ATPase β subunit revealed by down-sizing NMR. Fourth East Asian Biophysics Symposium, Taipei, November 3-6, 2003.

22. Y. Todokoro, H. Yanagishita, S. W. Kang, F. Fujiwara and H. Akutsu, Structural analysis of Membrane-Bound Mastoparan-X by Solid-State NMR. Fourth East Asian Biophysics Symposium, Taipei, November 3-6, 2003.

23. N. Yahata, T. Saitoh, A. Nakahara, H. Ogata, Y. Higuchi and H. Akutsu, NMR Investigation on the Interaction of Cytochrome *c*₃ with its Physiological Partner [NiFe] Hydrogenase. Fourth East Asian Biophysics Symposium, Taipei, November 3-6, 2003.

24. H. Akutsu, Structure determination of a G-protein activator peptide by high resolution solid-state NMR. The 2nd Functional Proteomics Symposium, Seoul, December 5, 2003.

25. A. Y. Nosaka, T. Fujiwara, H. Yagi, H. Akutsu and Y. Nosaka, Water properties Adsorbed on TiO₂ Photocatalysts as Characterized by Solid State ¹H-NMR Spectroscopy. Singapore International Chemical Conference 3 Frontiers in physical and Analytical Chemistry, Singapore, December 15-17, 2003.

26. H. Akutsu, Solid-State NMR Analysis of Peptide and Ligand in Supramolecular Systems. CREST-IP International Symposium "Frontier of Biological NMR Spectroscopy", Osaka, January 26 and 27, 2004.

27. H. Akutsu, Mechanism of Piston Movement of the β -subunit in TF₁-ATPase. 2nd Trilateral Symposium on Structural Biology, Yokohama, March 23-24, 2004.

28. Y. Takayama, E. Harada, R. Kobayashi, K. Ozawa and H. Akutsu, Role of aromatic rings in cytochrome *c*₃ from *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki F. The 1st Pacific-Rim International Conference on Protein Science, Yokohama, April 14-18, 2004.

29. M. Kobayashi, H. Yagi, T. Tsujimoto, T. Yamazaki, M. Yoshida and H. Akutsu, NMR Characterization of Subcomplexes of TF₁-ATPase. The 1st Pacific-Rim International Conference on Protein Science, Yokohama, April 14-18, 2004.

30. Y. Matsuki, Y. Sudo, C. Kojima, N. Kamo, T. Fujiwara and H. Akutsu, Structural Analysis of Transmembrane Halobacterial Transducer pHtrII by High-Resolution Two-Dimensional Solid-State ¹³C NMR. The 1st Pacific-Rim International Conference on Protein Science, Yokohama, April 14-18, 2004.

31. M. Kobayashi, T. Fujiwara and H. Akutsu, Signal assignment and secondary structural analysis of uniformly labeled protein, H⁺-ATPase subunit *c*, by solid-state NMR. 36th Central Regional Meeting of the ACS, Indiana, USA, June 2-4, 2004.

32. Y. Nosaka, T. Fujiwara, T. Ikegami, H. Yagi, H. Akutsu and Y. Nosaka, Effects of Thermal Treatments on Adsorbed Water of TiO₂ Photocatalysts. XX IUPAC Symposium on Photochemistry, Granada, July 17-22, 2004.
33. H. Akutsu, Investigation of Redox Regulation of Tetraheme Cytochrome *c*₃ Using Amino Acid Replacement. The 16th Annual Meeting of the Korean Society for Molecular and Cellular Biology, Seoul, October 14-15, 2004.
34. M. Kobayashi, Y. Matsuki, T. Fujiwara and H. Akutsu, Signal Assignments and Secondary Structural Analysis of a Uniformly Labeled Protein, H⁺-ATP Synthase Subunit *c*, by Solid-State MAS NMR. 2nd Japan-Korea Bilateral Symposium on Biological NMR, Osaka, November 1, 2004.
35. A. Egawa, K. Akiba, Y. Kakitani, Y. Koyama, T. Fujiwara and H. Akutsu, Structure Analysis of Chlorosomal Bacteriochlorophyll *c* Assembly and Chlorosomes by Solid-state NMR. 2nd Japan-Korea Bilateral Symposium on Biological NMR, Osaka, November 1, 2004.
36. Y. Takayama, E. Harada, R. Kobayashi, K. Ozawa and H. Akutsu, Roles of Noncoordinated Aromatic Residues in Redox Regulation of Cytochrome *c*₃ from *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki F, 2nd Japan-Korea Bilateral Symposium on Biological NMR, Osaka, November 1, 2004.
37. N. Yahata, Y. Takayama, K. Ozawa, A. Nakahara, H. Ogata, Y. Higuchi and H. Akutsu, NMR and Kinetic Investigation on the Interaction of Cytochrome *c*₃ with its Physiological Partner [NiFe] Hydrogenase, 2nd Japan-Korea Bilateral Symposium on Biological NMR, Osaka, November 1, 2004.
38. H. Akutsu, Structural analysis of membrane-related molecules by high resolution solid-state NMR. New Challenges in the Post Genome Era 2004, Seoul, November 9-11, 2004.
39. A. Y. Nosaka, T. Fujiwara, T. Ikegami, H. Yagi, H. Akutsu and Y. Nosaka, Characteristics of Adsorbed Water on TiO₂ Photocatalysts on Thermal Treatments. 6th International Symposium on Hybridized Materials with Super-Functions, Guanajuato, December 9-10, 2004.
40. T. Fujiwara and H. Akutsu, Structural Analysis of Membrane-Bound Peptide Mastoparan-X by Solid-State NMR under Magic-Angle Spinning. XXI International Conference on Magnetic Resonance in Biological Systems, Hyderabad, January 16-21, 2005.
41. Y. Matsuki, Y. Sudo, C. Kojima, T. Fujiwara, N. Kamo and H. Akutsu, Novel Solid-State NMR Approach to Structural Analysis of Protein: Application to Phoborhodopsin Transducer pHtrII in Lipid membrane Environment. XXI International Conference on Magnetic Resonance in Biological Systems, Hyderabad, January 16-21, 2005.
42. Y. Takayama, E. Harada, R. Kobayashi, K. Ozawa and H. Akutsu, Roles of Noncoordinated Aromatic Residues in Redox Regulation of Cytochrome *c*₃ from *Dusulfovibrio vulgaris* Miyazaki F. XXI International Conference on Magnetic Resonance in Biological Systems, Hyderabad, January 16-21, 2005.
43. A. Egawa, K. Akiba, Y. Kakitani, Y. Koyama, T. Fujiwara and H. Akutsu, Structure Analysis of Chlorosomal Bacteriochlorophyll *c* Assembly and Chlorosomes by Solid-state NMR. XXI International Conference on Magnetic Resonance in Biological Systems, Hyderabad, January 16-21, 2005.
44. T. Nakano, T. Ikegami, T. Suzuki, M. Yoshida and H. Akutsu, Solution structure of TF₁F₀ ATP synthase subunit *c*. XXI International Conference on Magnetic Resonance in Biological Systems, Hyderabad, January 16-21, 2005.
45. M. Kobayashi, T. Fujiwara, M. F. Brown, H. Akutsu, ²H NMR Studies of DMPC Membranes Containing Subunit *c* of *E. coli* ATP Synthase. Biophysical Society 49th Annual Meeting, Long Beach, California, February 12-16, 2005.
46. H. Akutsu, A challenge for investigation of H⁺-ATP synthase by NMR. International Symposium on Stable Isotope Aided Biological NMR, Tokyo, May 2-3, 2005.
47. H. Akutsu, Regulation of electron transfer in tetraheme proteins. "Complex Protein Structure and Function" The 3rd Joint Symposium between Interdisciplinary Program for Biochemical Engineering and Biotechnology, Seoul National University and Institute for Protein Research, Osaka University, Seoul, September 9, 2005

48. H. Takahashi, T. Fujiwara, T. Terauchi, M. Kainosho and H. Akutsu, Fast MAS of stereo-array isotope labeled amino acid under high magnetic field for high-resolution solid-state ^1H -NMR. Korea-Japan Bilateral Symposium on Biological NMR, Seoul, September 10, 2005
49. T. Nakano, T. Ikegami, T. Suzuki, M. Yoshida and H. Akutsu, Solution structure of TF_1F_0 ATP synthase subunit *c*. Korea-Japan Bilateral Symposium on Biological NMR, Seoul, September 10, 2005.
50. M. Kobayashi, H. Yagi, T. Yamazaki, M. Yoshida and H. Akutsu, NMR analysis of β subunit in TF_1 -ATPase subcomplexes by $\square$ subunit titration. Korea-Japan Bilateral Symposium on Biological NMR, Seoul, September 10, 2005.
51. N. Komi, K. Okawa, Y. Tateishi, H. Inooka, M. Shirakawa, T. Fujiwara and H. Akutsu, The Structural Analysis of PACAP Bound to Lipid Membrane by Solid State NMR. Korea-Japan Bilateral Symposium on Biological NMR, Seoul, September 10, 2005.
52. H. Akutsu, NMR Approach for Investigation of Large Molecule Systems. The 27th Scientific Meeting of Korean Magnetic Resonance Society, Seoul, September 24-25, 2005.
53. H. Akutsu, High-resolution solid-state NMR analysis of biological supramolecular systems. The 1st Asia-Pacific NMR Symposium, Yokohama, November 8-11, 2005.
54. H. Akutsu, Roles of Non-Coordinated Aromatic Residues in Redox Regulation of Tetraheme Cytochrome *c*₃. The 2005 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies, Honolulu, December 15-20, 2005
55. M. Kobayashi, Y. Matsuki, I. Yumen, T. Fujiwara and H. Akutsu, Solid-State MAS NMR of Membrane Integrating Protein, H^+ -ATP Synthase Subunit *c*. The 2005 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies, Honolulu, December 15-20, 2005
56. M. Kobayashi, A. V. Struts, T. Fujiwara, M. F. Brown and H. Akutsu, Hydrophobic Matching of ATP Synthase Subunit *c* with DMPC Bilayer Revealed by ^2H Solid-State NMR. Biophysical Society Annual Meeting 2006
57. E. L. Urich, H. Akutsu, J. F. Doreleijers, J. Hutchinson, Y. E. Loannidis, J. Lin, M. Livny, S. Mading, D. Maziuk, Z. Miller, E. Nakatani, C. Schulte, D. E. Tolmie, R. K. Wenger, H. Yao and J. L. Markley, BioMagResBank(BMRB). Keystone '06, 2006
58. H. Akutsu, CP/MAS Solid-State NMR Analysis of Biological Supramolecular Systems. The 28th Meeting of Korean magnetic Resonance Society, Taejon, February 20-21, 2006.
59. H. Akutsu, A new model for coupling of H^+ translocation and *c*-ring rotation in ATP synthase. The 9th Membrane Research Forum, Kyoto, March 15-17, 2006.
60. N. Komi, K. Okawa, Y. Tateishi, H. Inooka, M. Shirakawa, T. Fujiwara and H. Akutsu, The Structural Analysis of PACAP Bound to Lipid Membrane by Solid State NMR. The 9th Membrane Research Forum, Kyoto, March 15-17, 2006.
61. C. Kojima, Y. Sudo, Y. Matsuki, K. Hayashi, M. Mishima, T. Fujiwara, H. Akutsu and N. Kamo, Structure and signal transduction of negative phototaxis transducer *pHtrII*. 12th International Conference on Retinal Proteins, Hyogo, June 4-8, 2006.
62. S. Asai, Y. Horie, O. F. Ezono, T. Noguchi, T. Ikegami, H. Akutsu, H. Hirota and S. Meshitsuka, Solution Structure of the Activating Domain of Transcription Factor Hex. 20th IUBMB Congress of Biochemistry and Molecular Biology, Kyoto, June 18-23, 2006.
63. S. Kato, N. Kajiwarra, H. Tanaka, H. Yagi, T. Tsukihara, H. Akutsu, T. Suzuki, M. Yoshida, and Y. Kato-Yamada, Role of the ATP binding to the β subunit of thermophilic F_0F_1 -ATP synthase. 20th IUBMB Congress of biochemistry and Molecular Biology, Kyoto, June 18-23, 2006.
64. I. Yumen, H. Takahashi, M. Kobayashi, T. Nakano, T. Fujiwara, T. Tsukihara and H. Akutsu, Cell-Free Synthesis of a Membrane Protein, H^+ -ATP Synthase Subunit *c*, by Wheat Germ Extract System. 20th IUBMB Congress of Biochemistry and Molecular Biology, Kyoto, June 18-23, 2006.
65. T. Nakano, T. Ikegami, T. Suzuki, M. Yoshida and H. Akutsu, An New Solution Structure of ATP Synthase Subunit *c* from Thermophilic *Bacillus* PS3, Suggesting a Local Conformational Change for

H⁺-Translocation. 20th IUBMB Congress of Biochemistry and Molecular Biology, Kyoto, June 18-23, 2006.

66. H. Yagi, N. Kajiwara, T. Tsukihara, Y. Yamada, M. Yoshida and H. Akutsu, The structure of the isolated e subunit form thermophilic F₁-ATPase with ATP complex and its structural features. 20th IUBMB Congress of Biochemistry and Molecular Biology, Kyoto, June 18-23, 2006.

67. H. Akutsu, NMR analysis of the functional mechanism of H⁺-ATP synthase. The 29th Meeting of Korean Magnetic Resonance Society, Jeju, July 7-8, 2006.

68. S. Iimura, T. Umezaki, M. Takeuchi, M. Mizuguchi, K. Ogasahara, H. Yagi, H. Akutsu, Y. Noda, Shin-ichi Segawa and K. Yutani, Role of the C-terminal α -helix in folding and stability of pyrrolidone carboxyl peptidase from a hyperthermophile. 20th Annual Symposium of the Protein Society & 20th Anniversary Celebration, San Diego, August 5-9, 2006.

69. H. Akutsu and T. Fujiwara, Structural determination of biological supramolecular systems by CP/MAS solid-state NMR. XXIInd International Conference on Magnetic Resonance in Biological Systems, Göttingen, August 20-25, 2006.

70. T. Fujiwara, E. Harada, Y. Todokoro and H. Akutsu, Structure determination of mastoparan-X interacting with lipid bilayers by magic-angle-spinning solid-state NMR. XXIInd International Conference on Magnetic Resonance in Biological Systems, Göttingen, August 20-25, 2006.

71. M. Kobayashi, H. Yagi, T. Yamazaki, M. Yoshida and H. Akutsu, NMR analysis of beta subunit conformation in subcomplexes of F₁-ATP synthase from *thermophilic Bacillus* PS3. XXIInd International Conference on Magnetic Resonance in Biological Systems, Göttingen, August 20-25, 2006.

72. T. Ikegami, H. Morishita, M. Umitsu, Y. Murata, N. Shibata, K. Udaka, Y. Higuchi, H. Akutsu and T. Yagi, Structure-function relationship of CNR/Pcdh α EC1 protein. XXIInd International Conference on Magnetic Resonance in Biological Systems, Göttingen, August 20-25, 2006.

73. Y. Todokoro, Y. Miyasaka, H. Yagi, M. Kainosho, T. Fujiwara and H. Akutsu, Structural determination of ¹³C, ¹⁵N-uniformly labeled ATP bound to H⁺-ATP synthase β subunit by solid-state NMR. XXIInd International Conference on Magnetic Resonance in Biological Systems, Göttingen, August 20-25, 2006.

74. H. Yagi, N. Kajiwara, H. Tanaka, T. Tsukihara, Y. Yamada, M. Yoshida and H. Akutsu, Structural analysis of β subunit from TF₁-ATPase. XXIInd International Conference on Magnetic Resonance in Biological Systems, Göttingen, August 20-25, 2006.

75. Y. Takayama, Y. Kobayashi, N. Yahata, T. Saitoh, H. Hori, T. Ikegami and H. Akutsu, Specific binding of carbon monoxide to tetraheme cytochrome c₃. XXIInd International Conference on Magnetic Resonance in Biological Systems, Göttingen, August 20-25, 2006

(4) 特許出願

①国内出願 (4 件)

1. “安定同位体標識芳香族アミノ酸、その標的蛋白質への組み込み方法並びに蛋白質のNMR構造解析方法”、発明者：甲斐荘正恒、寺内勉、出願人：(独) 科学技術振興機構、出願日 2004/11/01、特願 2005-515191

2. “安定同位体標識脂肪族アミノ酸、その標的蛋白質への組み込み方法並びに蛋白質のNMR構造解析法”、発明者：甲斐荘正恒、寺内勉、出願人：(独) 科学技術振興機構、出願日：2005/2/27、出願番号：特願 2006-05926

3. “位置・立体選択的安定同位体標識セリン、システイン並びにアラニンの合成”、発明者：甲斐荘正恒、寺内勉、大場真、西山幸三郎、出願人：(独) 科学技術振興機構、学校法人東海大学、出願日 2006/03/17、特願 2006-75192

4. “核磁気共鳴装置用試料管”、発明者：甲斐荘正恒、高橋征三、武田光広、重実正博、出願

人：甲斐荘正恒、株式会社シゲミ、出願日 2006/04/03、特願 2006-101335

②海外出願 (7 件)

1. “安定同位体標識アミノ酸とその標的タンパク質への組み込み方法、並びに蛋白質の NMR 解析方法並びに位置立体選択的安定同位体標識フマル酸と酒石酸の合成”、発明者：甲斐荘正恒、寺内勉、出願人：(独) 科学技術振興機構、出願日、出願日：2002/12/19、出願番号：PCT/JP02/13303.
2. “安定同位体標識芳香族アミノ酸、その標的蛋白質への組み込み方法並びに蛋白質の NMR 構造解析方法”、発明者：甲斐荘正恒、寺内勉、出願人：(独) 科学技術振興機構、出願日：2004/11/1、出願番号：PCT/JP2004/016215
3. “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、アメリカ特許番号：US 7,022,310 B2, 特許登録日：2006/4/4、Priority 2001/12/19 JP2001286823 and 2002/01/30 JP2002022446
4. “Stabil isotopmerket aminosyre og fremgangsmate for a inkorporere same I malprotein, NMR-fremgangsmate for strukturanalyse av protein og fremgangsmate for fremstilling av resioselektivt stabil isotopmerket fumarsyre og vinsyre”, Inventor Masatsune Kainosho and Tsutomu Terauchi Assignee: Agency of Industrial Science and Technology, ノルウェー出願番号: 20042991, 移行日: 2004/7/13, 国際出願番号: PCT/JP2002/013303, Priority 2001/12/19 JP2001286823 and 2002/01/30/ JP2002022446
5. “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, ヨーロッパ出願番号：02783357.1、出願日：2002/12/19, 公開日: 2004/9/15、国際出願番号: PCT/JP2002/013303、国際公開番号: WO 2003/053910、Priority 2001/12/19 JP2001286823 and 2002/01/30/ JP2002022446
6. “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, カナダ出願番号：2,471,105、移行日：2004/6/11、国際出願番号：PCT/JP2002/013303、国際公開番号：WO 2003/053910, Priority 2001/12/19 JP2001286823 and 2002/01/30/ JP2002022446
7. "Stable isotope-labeled aromatic amino acids, method for incorporating the same in target protein and method for nmr-structural analysis of proteins", Inventors: Masatsune Kainosho, Tsutomu Terauchi Assignee: Japan Science and Technology Agency, アメリカ特許出願番号: 11/414,756、出願日：2006/4/28、公開番号：US2006/0194328 A1、公開日：2006/8/31、国際出願番号：PCT/JP2004/16215, Priority: 2003/10/31, JP2003373304

(5)その他

①受賞等

なし

②新聞報道等

1. “NMR によるたんぱく質構造解析の精度を上げる SAIL 法 原子を間引き情報減らす”、日経バイオビジネス 34-35 2002 年 12 月号
2. “たんぱく質の立体構造解析 解析期間 1/4 に短縮 都立大 NMR 装置向け新手法”、日刊

工業新聞、2002/12/12

3. “高磁場構造解析施設と SAIL 法の開発”、戦略的基礎研究推進事業「単一分子・原子レベルの反応制御」ニュースレター、7, 34-35 (2003).
4. “タンパク質解析で VB”, 日本経済新聞、2004/3/17
5. “都立大教授らバイオ VB 設立”、日本経済新聞、2005/2/22
6. “横浜市産学共同研究センターに初の大学発ベンチャー企業が誕生”、フジサンケイビジネスアイ、2005/2/28
7. “産学共同センターに大学発ベンチャー”、産経新聞、2005/3/9
8. “タンパク質解析横浜で V B 始動 都立大教授ら参加”、産経新聞、2005/3/9
9. “タンパク質構造解析 限界分子量 2 倍に 首都大核磁気共鳴の新手法” 日刊工業新聞、2006/3/2
10. “巨大タンパク質 NMR で構造解析 首都大学東京など”、日経産業新聞、2006/3/2
11. “Designer Labels”, Stanley J. Opella, News & Views, Nature, 440, 40 (2006)
12. “NMR structures of larger proteins Isotope labeling of amino acids leads to simpler, less congested NMR spectra”, Stu Borman, News of the Week, Chem. Eng. News, March 6, 2006
13. “NNR takes a new tack”, Research Highlights, Nature Biotech., 24, 421, April 2006.
14. “Plain Sailing”, Research Highlights, Nature Reviews Molecular Cell Biology, 7, 241, April 2006.
15. “SAILing toward larger protein structures”, Research Highlights, Nature Methods, 3, 340, May 2006.
16. “Optimal Isotope Labeling for NMR Structure Determinations”, Sci. & Tech. News from Japan (Swiss Embassy in Japan), 1, March 2006.
17. “Isotopen versimplen NMR-spectra”, Chem. Eng. News (The Netherlands), March 1, 2006.1. “構造解析を最短 2 週間で 首都大発 VB SAIL アミノ酸発売”、日刊工業新聞、2006/3/17
18. “タンパク質の時代に帆を上げる「SAIL」法”、JST ニュース、9 月号

③その他

(6)その他特記事項

SAIL 法の実用化は、SAIL アミノ酸の供給体制に大きく依存する。平成 16 年 10 月に大学等発ベンチャー創出支援事業の助成を得てベンチャー“SAIL テクノロジーズ”を立ち上げ、この 10 月から SAIL アミノ酸の試験的販売に漕ぎ着けた。

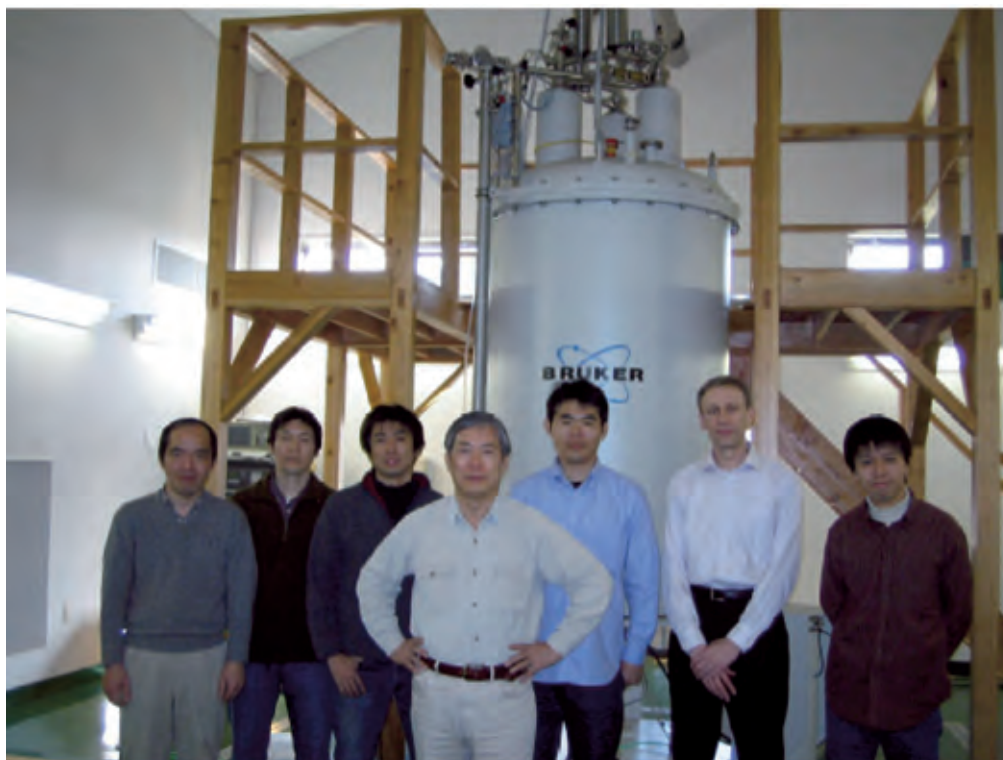
7 研究期間中の主な活動

(1)ワークショップ・シンポジウム等

年月日	名称	場所	参加人数	概要
平成 16 年 1 月 26-27 日	Frontier of Biological NMR Spectroscopy	千里ライフサイエンスセンター	約 200 名	海外より著名な NMR 研究者を招き最新のトピックを議論した。
平成 16 年 1 月 19-31 日	JASS'03 Winter School on “NMR Spectroscopy at the Frontier of Progress in the Life Sciences	阪大蛋白質研究所	約 50 名	日本・東アジア、印度など 10 ヶ国から若い研究者を招きワークショップを共催した。上記シンポジウムで最新の話題に触れる機会を与えた。

8 結び

SAIL 法は単に従来の分子量限界を超えた高分子量蛋白質の立体構造決定を迅速に、正確に決めるための手法開発のみを狙ったものではない。SAIL 法の誕生の持つ最も大きな意義は、蛋白質試料の最適化こそ今後の NMR 法の発展の中核を担うことを明確に示したことであろう。今後、これまで眠っていた NMR 法が本来持つ得難い能力が、様々な試料の最適化により大きく解放されることになる。蛋白質立体構造の集積から、再び立体構造と機能の関わりへと時代の流れは変わる。結晶構造解析の圧倒的な成功により、我々の心に深く刻まれた静止画像的な蛋白質のイメージを根底から覆すことができなければ、立体構造と生物機能は永遠に出会うことはない。溶液内で、或いは生体膜内で様々な時間スケールで動き回る蛋白質を原子レベルの分解能で捉える手段が必要なのである。NMR が僅か 25kDa の小さな蛋白質の立体構造しか解明できないという致命的な欠陥にもかかわらず、多くの研究者の関心を集め、膨大な努力が NMR 法の利用に向けられてきたのは、他に代替できない NMR 法の可能性を信じてきたからである。



(写真の説明) 平成 18 年 3 月 6 日に Nature 誌に SAIL 法の論文が掲載された折り、現在 SAIL 法の研究開発に携わっている主なメンバーを集めて 800MHz の NMR 装置をバックに撮影したもの。この写真は米国化学会の Chemical & Engineering News 誌の News of the Week 欄にトップ記事として SAIL 論文が紹介された中で使われた (March 6, 2006, p15). この建物は、平成 8 年度に採択された CREST 研究課題の推進のために、東京都立大学内の敷地に建設された 500 平米の NMR 構造解析施設であり、平成 10 年 3 月末に完成、3 台の NMR 装置は同年 7 月から現在に至るも研究活動を支え、革新技術 SAIL 法の完成を支えた (左より、小野、池谷、寺内、甲斐荘、武田、Güntert、土屋:撮影者は吉田)。

如何なる技術の発展の歴史でも、直線的に進歩が達成されることはない。必ず、発展は螺旋階段を登るように、繰り返し類似した状況が周期的に現れ、また一見進歩が止まったかに見える踊り場がある。NMR 技術は発見から 50 年余りの間、間断なく進歩を遂げているように見えるが、現実には常に踊り場があり、それを乗り越える画期的発展があつたのである。しかし、最近の構造生物学の画期的な成果が数多く結晶構造解析から生まれていることを横目に見て、多くの優秀な若い研究者が困難に満ちた NMR 分野を選ぶことは期待できない。NMR は現在、発展の踊り場にいる。大きな飛躍

の前には、動物は身を屈めるものである。新しい技術を生み出すことは容易ではない。SAIL 法のように、実に単純なアイデアであってもその実現には 10 年近くの歳月と膨大な資金、何よりも熱意が必要であった。方法論の開発は欧米では高く評価されても我が国では片隅に追いやられてきた。恐らく CREST の最大の貢献は、このように地味で日の当たらない基盤研究に初めて資金を与え、“資金の心配は我々に任せて、先生方は思う存分に研究を楽しんで欲しい”(平成8年に最初の CREST 課題が採択された折りのある方の言葉である)と勇気づけてくれたことにあると思う。SAIL 法の有効性が実証されたことは、ささやかではあるがこのように我々を支えて頂いた方々への恩返しである。今後はこの革新的手法を“夢の技術”に終わらせることなく、次世代の世界標準として実用化し、SAIL 法を基盤とした様々な NMR 法の発展から NMR の本来持つ類希な可能性が又一つ花開き、若い研究者が再びこの分野に続々と加わってくれることを望む。