

「創薬加速に向けたタンパク質構造解析基盤技術開発」
中間評価分科会説明資料
資料5-1

健康安心イノベーションプログラム

「創薬加速に向けたタンパク質構造解析基盤技術開発」プロジェクト

事業原簿

【公開版】

作成者	新エネルギー・産業技術総合開発機構 バイオテクノロジー・医療技術開発部
-----	--

— 目次 —

概要	i ~ v
プロジェクト用語集	A-1~10
I. 事業の位置付け・必要性について	1
1. NEDO の関与の必要性・制度への適合性	1
1.1 NEDO が関与することの意義	1
1.2 費用対効果	2
2. 事業の背景・目的・位置づけ	2
II. 研究開発マネジメントについて	4
1. 事業の目標	4
1.1 事業の目標	4
1.2 目標設定の理由	5
2. 事業の計画内容	6
2.1 研究開発の内容	6
(1) 研究開発項目①「電子線等による膜タンパク質及びその複合体の構造解析」	6
(2) 研究開発項目②「核磁気共鳴法(NMR)による膜タンパク質及びその複合体とリガンド分子の相互作用解析技術」	7
(3) 研究開発項目④「高精度 in silico スクリーニング等のシミュレーション技術」	8
2.2 研究開発の実施体制	9
(1) 実施体制の構造	9
(2) 課題解決型連携(実証研究)の実施	10
(3) 研究実施体制	10
2.3 研究開発の運営管理	11
3. 情勢変化への対応	11
4. 中間評価への対応	12
5. 評価に関する事項	12
III. 研究開発成果について	13
1. 事業全体の成果	13
2. 研究開発項目毎の成果	14
2.1 電子線等による膜タンパク質及びその複合体の構造解析技術開発	14
(1) 膜タンパク質及びその複合体の構造解析に必要な膜タンパク質等の発現・精製技術、結晶化技術の開発	14
(2) 極低温高分解能電子顕微鏡や自動電子顕微鏡等の電子顕微鏡の開発、コンピューター解析の高速化と精密化	15
(3) 電子顕微鏡とX線によるタンパク質構造解析	16

(4) 2次元結晶化できた試料の構造解析を可能にする電子結晶学用プログラム開発、単粒子解析プログラム開発	31
(5) ATP感受性カリウムチャンネル制御機構解明に向けた基盤技術開発	36
(6) 電子トモグラフィ技術を補完するためのソフトウェア開発	39
(7) 分子動力学計算による水銀のAQP1抑制機序の解析	40
(8) 亜鉛によるアクアポリン4の水透過性抑制	40
2.2 核磁気共鳴法(NMR)等による膜タンパク質及びその複合体とリガンド分子の相互作用解析技術	49
(1) 安定同位体標識タンパク質調製系の開発	49
(2) タンパク質複合体モデル構築を目指したNMR測定法の開発	56
(3) 細胞膜複合体相互作用解析のためのNMR試料調製法の開発	59
(4) 細胞膜複合体相互作用解析のためのNMR解析法の開発	66
(5) 創薬標的タンパク質の個別解析例	70
2.3 高精度 in silico スクリーニング等のシミュレーション技術	81
(1) in silico ドッキング計算の高度化	82
(2) 構造生理学アプローチによるタンパク質間相互作用解析	94
(3) 創薬開発への応用促進に向けた技術開発	118
IV. 実用化の見通しについて	154

(添付資料)

- ・イノベーションプログラム基本計画
- ・プロジェクト基本計画
- ・技術戦略マップ(分野別ロードマップ)
- ・事前評価関連資料
- ・成果発表・論文・特許出願リスト

概要

		作成日	平成21年7月 23 日
プログラム名	健康安心イノベーションプログラム		
プロジェクト名	創薬加速に向けたタンパク質構造解析基盤技術開発	PJコード	P08005
担当推進部/担当者	バイオテクノロジー・医療技術開発部/主査 伊豆本 義隆		
O. 事業の概要	<p>本事業は、電子線等による膜タンパク質及びその複合体の構造解析技術、核磁気共鳴法等による膜タンパク質及びその複合体とリガンド分子の相互作用解析技術、並びに高精度 in silico スクリーニング等のシミュレーション技術を活用し深度化して、細胞膜上で複合体を形成している生体内に近い状態の膜タンパク質およびその複合体の立体構造情報およびリガンド相互作用情報を抽出する方法論の開拓とそれに基づくヒット化合物の高効率探索技術の開発を行い、企業との課題解決型連携を通じて、これら技術を産業界に普及させるとともに創薬への有用性の実証研究を行う。また創薬上有用な膜タンパク質およびその複合体の解析と医薬リード化合物の取得を行い、タンパク質立体構造に指南された創薬戦略(SGDD: Structure-Guided Drug Development)を進展させる。</p>		
I. 事業の位置付け・必要性について	<p>近年、製薬企業の研究開発費は増大の一途であるものの、承認される薬剤の数は増えていない。また、研究開発費の増大分は、主として臨床開発費に充てられ、探索研究に回せるリソースは相対的に減少している。一方、欧米における創薬研究では、タンパク質の立体構造に基づいた薬剤の開発による創薬の効率化への取り組みが進みつつある。このため、今後の医薬品産業の国際競争力の強化に向けて、タンパク質の立体構造解析技術や計算科学による創薬候補化合物探索技術等の基盤技術の構築が重要となっている。</p> <p>現在、市販薬剤のほぼ 50%が膜タンパク質を作用点としているといわれており、膜タンパク質は、生命現象の解明においてのみならず、創薬開発の重要な標的タンパク質でもある。膜タンパク質は細胞膜上で複合体を形成し、その機能を発現している。従って、細胞表層における膜タンパク質およびその複合体の立体構造情報やリガンドとの相互作用の情報を取得し、それら情報に基づいた計算科学的解析により医薬リード化合物を効率よく絞り込んでいく「タンパク質立体構造に指南された創薬戦略(SGDD : Structure Guided Drug Development)」を進展させることは、さまざまな技術的困難さがあるものの、我が国において緊急かつ挑戦的な課題である。</p> <p>このような状況に鑑み、NEDO のプロジェクトとして「生体高分子立体構造情報解析」(平成14～18年度)プロジェクトが実施され、膜タンパク質及びその複合体を対象として電子顕微鏡による立体構造解析技術および核磁気共鳴法(NMR)などを用いた相互作用解析技術が開発され、さらに化合物結合の高速・高精度な計算科学的シミュレーション技術の開発が行われた。</p> <p>本事業では、これらの技術を活用して企業との課題解決型連携を行い、これら技術を産業界に普及させるとともに創薬への有用性の実証研究を行う。さらにこれら技術を深度化しつつ、細胞膜上で複合体を形成している状態での膜タンパク質の立体構造情報およびリガンド相互作用情報を抽出する方法論の開拓やそれに基づくヒット化合物の高効率探索技術の開発を行い、SGDD を進展させることを目的とする。</p> <p>これら一連の技術を開発し、統合的に利用することは広く国民の利益に資する基盤的研究であり、国(NEDO)の積極的な関与が必要なものと考えられる。今後、世界に類を見ない少子高齢化社会を迎える我が国において、国民が健康で安心して暮らせる社会を実現することは喫緊の課題であり、個の医療を通じて健康寿命の延伸、QOL(Quality of Life:生活の質)の向上を図る目的で行われる「健康安心イノベーションプログラム～健康で安心して暮らせる社会の実現を目指して～」プログラムの一環として本事業を実施する。</p>		
II. 研究開発マネジメントについて	<p>事業の目標</p> <p>本事業では最終的に、①細胞膜内での生体内に近い状態での膜タンパク質及びその複合体の立体構造を解析するため、2次元結晶解析技術、電子線トモグラフィー、および単粒子解析技術等を開発し、これらの技術と既存の技術を活用して、ヒト由来(発現系)膜タンパク質及びその複合体の構造を複数個解析する。②生体内に近い状態での膜タンパク質及びその複合体とリガンド分子の相互作用を解析するため、結合力が弱いリガンド分子の結合構造の解析技術開発、固体と液体が混合した不均一な系における解析技術の向上、および細胞表層における膜タンパク質及びその複合体とリガンド間相互作用を解析する技術開発等を実施し、これらの技術を基に、5個以上の膜タンパク質等創薬標的タンパク質を解析する。③高精度のin silicoスクリーニングを実現するため、in silicoスクリーニングの効率を従来法に比べ10倍程度に上げる技術およびターゲット選択性能を従来法に比べ10倍程度に上げる技術を開発し、さらに生理活性ペプチドから医薬品となりやすい非ペプチド性の化合物(低分子化合物等)を得る一般的手法等を開発して、産業上有用な化合物を10個以上取得する。これらを通じてSGDDを進展させることを目標とする。</p>		

<p>III. 研究開発成果について</p>	<p>研究開発項目②「核磁気共鳴法(NMR)等による膜タンパク質及びその複合体とリガンド分子の相互作用解析技術」</p> <p>1分子蛍光分析法をもとにした測定条件の体系的スクリーニング法および大腸菌発現系と同様の条件下で安定同位体標識できる酵母発現系を開発した。固液界面の分子間相互作用解析に有効な高分解能マジック角回転条件下の転移交差飽和(TCS)法において、非特異的相互作用を抑制できる多孔性担体を開発し、高感度・高精度な TCS データ取得に成功した。さらにアミノ酸選択的交差飽和方法の実験データと分子動力学計算を組み合わせて、高精度なタンパク質複合体の立体構造構築方法を計算科学チーム(研究開発項目③)と共同で開発した。また創薬標的タンパク質であるケモカイン受容体、ディスコインドメイン受容体、細胞接着因子 CD44、ならびに GPVI のリガンド認識機構を解明した。</p> <p>研究開発項目③「高精度 in silico スクリーニング等のシミュレーション技術」</p> <p>ドッキングスコアの精度向上のため、sequence-based DSM法を開発しより高いヒット率が得られる手法とした。FP法とTI法に基づく滑らかな解離経路で結合自由エネルギーを算出するSRPG法を開発し、それを電子顕微鏡実験チーム(研究開発項目①)によって解析されたアクアポリン4の阻害剤解析に応用した。核磁気共鳴実験チーム(研究開発項目②)と共同してASCS(アミノ酸選択的交差飽和)法の観測結果から蛋白質複合体モデルを構築する方法を開発し、ディスコインドメイン受容体とコラーゲンの複合体モデル構築へ応用した。生理活性を有する非ペプチド性化合物の探索のため、新たにMD-MVO法を開発し、μオピオイド受容体に対して検証した。hERGの立体構造モデルにCOMBINE法を適用し、従来法の7.9倍の選択性をもつ阻害活性予測法を開発した。水溶解度推定のため、物理化学的特徴を分子記述子に加える新たな高精度の予測法を開発した。μオピオイド受容体アゴニスト、農薬のシードとなる化合物、およびインフルエンザ・ウィルスのPA-PB1複合体阻害剤等の70を超えるヒット化合物を得、有用な化合物を20ヶ程得た。その際、ヒット率や選択性も向上できた。</p>			
	<table border="1"> <tr> <td>投稿論文</td> <td>「論文」 86件、「総説・解説記事等」 44件</td> </tr> <tr> <td>特許</td> <td>「出願済」 13件(うち国際出願4件)</td> </tr> </table>	投稿論文	「論文」 86件、「総説・解説記事等」 44件	特許
投稿論文	「論文」 86件、「総説・解説記事等」 44件			
特許	「出願済」 13件(うち国際出願4件)			
<p>IV. 実用化の見通しについて</p>	<p>研究開発項目①「電子線による膜タンパク質及びその複合体の構造解析技術」</p> <p>生体内に近い状態の構造を細胞内において観察することが出来る電子線トモグラフィーの方法を用いて高い分解能で立体構造解析を行うために、独自に開発した極低温電子顕微鏡の開発・改良を続けてきている。その結果、第7世代の極低温電子顕微鏡として、完成しつつあり、脂質2重膜を分離して観察できるような、電子線トモグラフィー法における最高の分解能を達成するシステムの開発が進んでいる。一方、心臓や免疫系、電気シナプスを始め、生体内で重要な機能を担うことがわかっているギャップ結合チャネルの構造を解析して、これまでの教科書の記述を変えるプラグゲーティングモデルを提案した(PNASとNatureに発表)。そのギャップ結合などの立体構造について、この第7世代の極低温電子顕微鏡と新たに開発しつつある電子線トモグラフィー像解析プログラムなどによって、高分解能電子線トモグラフィー観察法の実用化への研究が進んでいる。</p> <p>水チャネル、アクアポリン-4(AQP4)をノックアウトしたマウスでは、脳への障害が与えられたときに脳浮腫による死亡率が飛躍的に減少する。それゆえ、脳での特徴的発現が見られる水チャネルAQP4の水透過を阻害することが出来る薬剤は、脳浮腫を防ぐことが出来るかと期待され、その開発が望まれている。昆虫細胞を用いたAQP4の大量発現と精製を行い、ベシクルに再構成する純粋な系を用いて、AQP4の水透過阻害剤を探索した。その結果、アセタゾールアミド(AZA)がAQP4特異的に水透過を阻害すること、しかも、その阻害は、濃度依存的で、可逆的であることを解明した。また、電子線結晶学により解析したAQP4の構造と独自に開発したSievgeneというプログラムを用いて、AZAをはじめとして、メタゾールアミド(MZA)、バルプロイクアシッド(VPA)、サルチアミンなどの化合物がAQP4へ結合する様子のドッキングモデルを計算した。さらに、このような複合体の形成の様子を実際に近い水中での分子動力学(MD)計算を用いてシミュレートした。また、NMRを用いた相互作用解析により、相互作用部位を解明すると共に、AZAとAQP4複合体の構造を電子線結晶学により解析し、その情報から、最も効率が良く、薬として用いるのに最適な化合物を発見・開発する。この様に、各グループの密接な連携を通して、膜タンパク質の構造と機能解析、相互作用解析、計算科学を用いた創薬加速のための基盤技術を具体的な例を用いて、実用化を図る見通しである。</p> <p>研究開発項目②「核磁気共鳴法等による膜タンパク質及びその複合体とリガンド分子の相互作用解析技術」</p> <p>新規 NMR 用酵母発現系の開発:NMR による低分子およびタンパク質リガンドと標的タンパク質間相互作用解析を行う場合、標的タンパク質またはリガンドタンパク質を安定同位体標識することが要請される。したがって、なるべく多様な安定同位体標識発現系を完備しておくことで、一層の創薬研究が加速されると考える。本研究で開発された新規酵母発現系はその点でその点で有用である。</p>			

IV. 実用化の見通しについて

生体内に近い状態での膜タンパク質及びその複合体とリガンド分子の相互作用を解析するために、解離定数が mM ~ μ M のように結合力が弱いリガンド分子の標的分子結合部位を同定する技術を開発し、固体と液体が混在した不均一な系における膜タンパク質とリガンド分子の相互作用解析技術の高感度化を進めている。実際に、固定化担体や固定化方法スピニング条件などを検討し、感度を3倍から6倍ほどに向上させることに成功しているため、実用化の段階に入りつつある。

アミノ酸選択的交差飽和法(ASCS法)と分子動力学的計算を組み合わせることによって、受容体のNMRスペクトルの帰属を行わずに、相互作用しているタンパク質複合体のモデル構築を可能にする方法の開発を進めている。独自に開発したNMR測定法であるASCS法によりアミノ酸残基間距離情報を抽出し、先端的分子動力学計算法を用いて複合体のモデルを作製することに成功している。このような共同研究が進展しているため、タンパク質複合体モデルを作製する研究において、ここで開発しつつある手法が実用化できる見通しである。

NMR 溶液条件探索法の開発: NMR の試料測定においては、質の高いスペクトルを測定することが要求される。通常は実際にスペクトルを測定して、溶液条件の最適化を図ることが多いが、多大な測定時間、試料が必要となる。本開発で条件検討の時間の短縮化が達成された。

アミノ酸選択的交差飽和法およびモデル構築ソフト: タンパク質複合体の立体構造を求めることは、創薬開発研究において有用である。我々は、高分子量を有する標的タンパク質を複数種類のアミノ酸選択標識することにより、標的タンパク質のNMR帰属を行わずとも、標的タンパク質とリガンド間の残基距離情報を抽出することに成功した。アミノ酸選択標識可能な発現系が必要であるとの条件があるものの、有効と考える。さらに、中村チーム(研究開発項目③)は、この距離情報をもとに、精密な複合体モデルを構築するソフトの開発に成功した。我々のアミノ酸選択標識交差飽和法と中村チームの開発したソフトを組み合わせることにより、迅速に標的タンパク質・リガンド複合体モデルが作成でき、創薬研究に貢献できると考える。

研究開発項目③「高精度 in silicoスクリーニング等のシミュレーション技術」

医薬品探索を1つの目的とした分子シミュレーションソフト「myPresto」は、既に、経済産業省のホームページ (<http://medals.jp/myPresto/index.html>) 及び、大阪大学のホームページ (<http://presto.protein.osaka-u.ac.jp/myPresto4/>) で無償ダウンロード可能となっており、公開以来、約400回ほどダウンロードされ、600回以上のユーザーの問い合わせに応じ、化合物データベースLiganBoxも10サイト以上に配布を行ってきた。英語ページも作成しているため、米国、カナダ、ドイツ、フランス、イタリア、オランダ、ポーランド、ルーマニア、ブラジル、インド、中国、台湾、韓国、アカデミアおよび企業など海外からダウンロードされた件数もこれまでに69件ある。またソフトウェア開発での技術情報は論文のみならずバイオ産業情報化コンソーシアム(JBiC)のホームページ (http://www.jbic.or.jp/activity/st_pr_pj/mypresto/index_mypr.html) でも公開している。このmyPrestoは、国産の非商用の医薬スクリーニング・ソフトウェアとしては唯一のものであるため、各方面からその利用が期待されており、例えば、文部科学省が推進する次世代スーパーコンピュータ・プログラムにおけるフィジビリティの対象として採用され、ペタ・フロップスでの稼働性能を出せるという評価も受けている。企業においてmyPrestoがどこまで利用されているかは明らかではないが、プロジェクト参画製薬企業のみならず、日本電気(株)(NEC)などで創薬受託研究事業にも用いられ、医薬品スクリーニング特許申請(「化合物のスクリーニング方法及びそのスクリーニングシステム」特開2008-217594(P2008-217594A))、コンピューターシステム販売におけるmyPrestoのインストールサービス(NEC、ナベインターナショナル)などにも用いられている。

本創薬加速プログラムにおいて実施中の薬物探索実証研究では、塩野義製薬において48化合物、三井化学アグロにおいて23化合物、合計71化合物の活性化化合物を得ており、この中には有用な候補化合物となりうるものが20件ほど得られている。また、BIRC集中研において、大学等外部の研究機関との共同研究においては、横浜市大・朴教授との共同研究でインフルエンザウイルスPA-PB1タンパク質複合体阻害剤を、3化合物発見している。その他、いくつかの外部との共同研究においても、合計54化合物が新たに見出されており、本プロジェクトにて開発中の手法が、様々な標的タンパク質に対し、高い効率でヒット化合物を見出す手法を提供していると言える。さらに、hERGチャネルの阻害剤を選択的に同定する手法の開発においては、従来法に比べて7.9倍のパフォーマンスを発揮できており、極めて実用に近い方法と考えられる。

一方、研究開発項目①におけるAQP4阻害剤探索のように実験が難しい系にも適用することが可能なことが示唆されるデータを得たので、今後、応用を進める。また研究開発項目②における交差スピン緩和のデータを用いた複合体モデリング計算のソフト開発と応用にも目処がたっており、研究開発項目①、②で開発される新技術に対応したソフトウェアを開発・公開しつつ応用を進めていく。世界的に見てもこのような機能はユニークなものであり、研究開発項目①-②-③の連携によって初めて生まれたもので、商品として全く差別化されている。

以上のように、我々が開発を進めている in silico スクリーニングの技術は、一部は既に実用化されつつあるとも言える状況である。今後、さらにその技術が高度化すれば、国内だけでなく、海外を含めたより広い利用がなされるものと考えている。

V. 評価に関する事項	事前評価	H19年度は経済産業省の直轄事業として実施。H19年度末に事前評価を行い、H20年度からNEDO事業として実施。
	中間評価以降	平成24年度 事後評価実施予定
VI. 基本計画に関する事項	作成時期	平成20年3月制定
	変更履歴	なし

プロジェクト用語集

Actin (アクチン)

真核細胞の内部で、繊維状の構造を形成する細胞骨格タンパク質のひとつ。分子量5万の球状蛋白質である G-actin が螺旋状に多数重合して繊維状のアクチン (F-actin) を形成する。アクチンの重合と脱重合は、さまざまなアクチン結合蛋白質との相互作用によって制御されている。

Affinity Chromatography (アフィニティー・クロマトグラフィー)

クロマトグラフ法の1種。固定相に極めて特定のタンパク質に対する選択性が高く、かつ結合力の高い物質を付加させ、タンパク質を精製する手法。

APs (Accelerator Processors)

特殊な用途を高速に実施するためのチップ全体を意味し、具体的にはグラフィック表示を高速に行うためのグラフィックス・アクセレータや、GRAPE-DRのように数値演算を超高速に実施するために特殊に設計したチップが開発され、市販されている。

Ca²⁺-ATPase

アデノシン三リン酸 (ATP) の分解に伴うエネルギーを利用し、カルシウムを筋小胞体に取り込む膜タンパク質。

CAPRI

世界的な、タンパク質複合体構造の予測コンテスト。タンパク質の構造が提示され、世界中の計算チームがエントリーして、その複合体構造を計算で予測する。同時進行して複合体の構造解析が実験的に進められ、計算予測を完全なブラインドテストで評価する。

CDR (相補性決定領域)

抗原と相互作用する可変領域の中で抗原との直接的結合を担う領域。遺伝子レベルでの変異や組み換えが多いために、他との配列相同性が低く超可変領域とも呼ばれ、抗原特異性に重要とされる。

COMBINE法 (Comparative Binding Energy Analysis)

ドッキングソフト等を用いて作成した化合物-タンパク質複合体のポーズにおいて、両者の間の相互作用エネルギーを力場計算に基づいて算出し、それを注目するタンパク質の残基毎に振り直し、各値を記述子として定量的構造活性相関(QSAR)解析を行う方法のこと。力場計算における van der Waals エネルギーと静電エネルギーは物理化学的に算出されるが、それらの重みづけは標的タンパク質毎に調整されるため実験値に近いスコアが得られやすい。

Co-LET 法 (コレット法)

Co-Localization Expression Technique の略で Homer (Group I mGlu receptors と結合するタンパク質) を用いて膜タンパク質を効率よく局所的に大量に発現させる方法。

Coupled folding and binding

タンパク質の新しい分子認識メカニズム。相手と複合体を形成していない状態では特別なかたちをとらずにランダムな構造をもち、いわゆる天然変性状態となっているが、相手と遭遇するとフォールディングし (折れ畳まれ) 特別なかたちの複合体を形成し、生体信号伝達等を行うというもの。P. E. Wright が NMR によってその存在を証明したことで有名である。

ESI-MS(Electron Spray Ionization-Mass Spectrometer)

エレクトロスプレー法による試料イオン化法を用いる質量分析計。質量分析器の前段に、ミクロ HPLC やキャピラリー電気泳動を設置し、混合試料から直接目的物質を分離、構造解析ができる。

Evolutionary Trace 法

タンパク質複合体において、もしその複合体が生物学的に重要ならば、生物種を越えて複合体構造は保持されなければならない。従って、2つのタンパク質の界面に存在するアミノ酸配列は、同時に進化ないし保存されなければならない。この性質を用いて、配列進化・保存からタンパク質界面に存在する残基を特定する手法のこと。

Fed-Batch 法

微生物の培養法。流加培養などともいわれる。微生物自身の生育や微生物が目的分子を大量発現するうえで必要な栄養素を、培養期間中常に添加し続ける方法。通常の培養に比べて、微生物の生育と目的分子の大量発現の両方を大きく増加させることができる。

GPCR (G タンパク質共役型受容体、G Protein-Coupled Receptor)

膜貫通領域を 7 本持つ受容体。リガンド (タンパク質に特異的に結合する低分子物質) などの細胞外刺激により、3 量体 G タンパク質を活性化する。医薬品の 30% はアゴニスト、またはアンタゴニストといわれている。

GPGPU (General Purpose GPU)

Aps の一つであるグラフィックスアクセラータとして、通常は PC で利用される画像処理を行う GPU(Graphics Processing Unit)を、より汎用に利用するもの。NVIDIA 社が主要な製品を提供しており、NVIDIA 社が提唱する CUDA (Compute Unified Device Architecture : クーダ) と呼ばれる GPU 向けの C 言語の統合開発環境が利用されることが多い。

GRAPE-DR

東京大学情報理工学系・平木敬教授のグループが開発した演算チップで、512 ヶの要素プロセッサを集積し、1 チップで 512Gflops の計算速度を達成するもの。消費電力が少なく、高速演算を並列的に行う場合に、コスト・パフォーマンスが優れたチップである。

hERG チャンネル

human ether-a-go-go related gene (hERG)の遺伝子発現産物として同定された 6 回膜貫通ヘリックスを持つ心筋細胞にある膜タンパク質であり、心臓の K^+ イオンチャンネルの機能をもつ。一般に使用されている非循環器用薬剤を服用中に患者が失神もしくは突然死する報告が知られ、その症候は薬剤投与が引き起こす致死的な QT 延長による不整脈の惹起が原因であり、その因子が hERG チャンネルことが判明している。開発された薬剤の副作用として hERG チャンネル阻害をおこすこともあり、その場合には催不整脈作用の因果関係が明らかになり承認後に市場から撤退を余儀なくされたり、開発が中止されるケースもある。

His-Tag(ヒスチジンタグ、ヒスタグ)

タンパク質の N 末端または C 末端に付加した 6 個のヒスチジン。発現タンパク質をこれにより対標識し、精製を容易にするために用いられる。

In-cell NMR

生きた細胞内における蛋白質の立体構造情報を得るための NMR 手法。高分解能の NMR スペクトルを測定するために、安定同位体標識を施した蛋白質を細胞内に導入する必要がある、これまでに大腸菌やアフリカツメガエル卵母細胞を用いた手法が開発されている。

INPHARMA (Inter-ligand NOE for pharmacophore mapping)法

互いに競合阻害する 2 種類のリガンド分子とその標的分子の共存下における NOESY 測定において観測されるリガンド分子間 NOE のこと。INPHARMA は標的分子のプロトンを介したスピン拡散現象により生じると考えられ、2 種類のリガンドの結合部位における相対配向に関する情報として活用できる。

LDL (Low Density Lipo-Protein、低密度リポタンパク質)

コレステロールの体内循環・移送に係わるキャリアー。酸化するといわゆる悪玉コレステロールの酸化 LDL となる。このレセプターが LOX-1 と呼ばれる。

Ligand efficiency (LE)

ヒット化合物がリード化合物、候補化合物へと伸ばしていけるかを見積もる尺度の1つである。結合自由エネルギーを化合物に含まれる重原子の数で割った値であり、有望化合物では 0.3~0.5kcal/mol 程度となる。活性が強い化合物が有望なのではなく、ligand efficiency の高い物質が有望と言える。PEI (%阻害/重原子数)と類似の概念である。

PACAP

Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide の略で脳下垂体に存在するタンパク質。

PLS 回帰 (Partial Least Square)

偏相関最小2乗回帰と訳され、回帰分析法の一つである。因子の多数の値とその結果が統計的に得られている場合、入力因子と結果との間に潜在変数を新たに導入し、それらの相関関係が最大となるように変数を設定することで、overfitting の危険性が少ない適切なあてはめができる手法。

SDS-PAGE (Sodium Dodecylsulphonate-Poly Acrylamide Gel Electrophoresis)

タンパク質の電気泳動法として一般的な方法。SDS を用いて、試料を変性させた後、ポリアクリルアミドゲル板上で電気泳動を行う。

REDPRO 標識

大腸菌を用いたタンパク質発現を重水中 (~100% D₂O) で行い、炭素源としてグルコース (非重水素標識体) を使用することで、プロトン密度が軽減されたタンパク質試料が調製される。本標識の場合、□プロトン領域はほぼ完全に重水素化されるが、メチル基や芳香環についてはグルコース由来のプロトンが残るため、これらの NMR シグナルは感度良く観測される。

Sf9

夜盗蛾由来の継体培養のできる昆虫細胞。膜タンパク質の発現系として、しばしば用いられる。

STD(Saturation Transfer Difference)法

標的分子選択的なラジオ波照射により標的分子のプロトンを飽和させ、その飽和が結合するリガンドにのみ転移する現象を利用した NMR スクリーニング手法。標的分子からリガンドへの飽和移動は、リガンドシグナル強度の減少として検出されるが、その強度減少の程度は、リガンドプロトン-標的分子プロトン間距離にも依存することから、エピトープマッピング手法として利用された例もある。

TLC (Thin Layer Chromatography、薄層クロマトグラフィー)

クロマトグラフ法の1種。シリカゲルなどの固定相を塗布したガラス板上に混合物の試料を吸着させ、これを溶媒で展開することで混合物の各成分を分離・分析する。

アクアポリン

水の透過機能を持つ膜タンパク質の1種。ヒトでは12種類がクローニングされ、アクアポリン-4は主に脳に発現し、脳浮腫の病態生理の関与が示唆されている。

アゴニスト

ある生体作用物質の受容体（レセプター）に結合し、同じ（あるいは似た）作用を表す物質あるいは薬剤。

アシアロ糖タンパク質

糖タンパク質の糖鎖部分からシアル酸が除去されたもの。一般に糖鎖の非還元末端に結合するシアル酸は、やや不安定なため、血中を循環中に徐々に分解していく。通常、シアル酸の分解に伴って、糖鎖の非還元末端はGalもしくはGalNAcになる。

アンタゴニスト

前述のアゴニストに対し、拮抗的な作用を表す物質あるいは薬剤（阻害剤など）。

安定同位体標識

現在の生体高分子のNMR解析においては、測定感度、選択性等の観点から、測定対象試料の構成元素である炭素(C)、窒素(N)（、場合によっては一部のプロトン(H)）を、安定同位元素¹³C、¹⁵N（あるいは²H）で標識することが必須となっている。一般的な安定同位体標識タンパク質試料調製は、大腸菌を利用したタンパク質大量発現の際、¹³C、¹⁵N、²H標識した炭素源、窒素源、アミノ酸（前駆体）、重水等を用いることで行われる。

アレスチン

Gタンパク質共役型の情報伝達系に幅広く存在する水溶性のタンパク質。光受容体やアドレナリン受容体などGタンパク質共役型受容体のリン酸化型に特異的に結合し、情報伝達を抑制する。

一分子蛍光分析

試料溶液に共焦点レーザーを当て、その焦点部分をブラウン運動によって通過する蛍光標識分子の並進拡散時間を分析する手法。1フェムトリットル（1兆分の1リットル）という極めて小さな領域を観測領域とするため、試料分子の分子量や分子間相互作用などを一分子レベルで解析可能。

*in silico*スクリーニング

計算科学的手法を用いて、創薬標的タンパク質と相互作用する低分子化合物を見出すこと。医薬品等の候補物質を探索するときに用いられる。

***in silico* ドッキング**

計算機上で化合物と標的タンパク質との相互作用を計算し、タンパク質-化合物複合体構造とその活性を予測すること。

ウエスタン・ブロッキング (Western Blotting)

抗体を用いて、無数にあるタンパク質の中から、ある特定のタンパク質だけを検出する方法。電気泳動ゲルからタンパク質をニトロセルロース紙に転写し、その後、標識化した抗体により発色させ、特定タンパク質を高感度検出する。

エピトープマッピング

元来は、外来タンパク質分子の抗原性を示す部位を決定する手法の意味であったが、そこから派生してリガンド分子の標的タンパク質結合部位を同定する実験の意味で用いられる。

エンドサイトーシス

細胞が小胞（エンドソーム）を介して外環境から種々の物質を細胞内に取込む機構をいう。特に細胞表面の受容体を介してリガンドを取込む機構は受容体依存性エンドサイトーシスと呼ばれる。通常取込まれたリガンドはリソソームまで運ばれ、分解される。

エンリッチメント

薬物スクリーニング計算において予測化合物数に占める真のヒット化合物数の割合。通常、ランダムな実験では1万化合物に1化合物ヒットするので、もし計算で予測したヒット化合物候補100化合物中にヒットが1件あれば、ランダム実験に対するエンリッチメントは100倍となる。横軸を選択した化合物数、縦軸をヒット化合物数としたグラフをデータベースエンリッチメントカーブと呼び、この曲線の下を面積を **area under curve (AUC)** という。スクリーニング手法の良し悪しは通常 AUC で判断し、AUC が 50% ならランダムスクリーニングと変わらず、100% に近いものほど良い。

キナーゼ、

ATP, ホスホエノールピルビン酸などヌクレオシド三リン酸をリン酸供与体とするリン酸基転移酵素。

グラフティング

グラフト=移植するという意味。ここでは抗体の CDR3 を他の抗体 (scaffold) の CDR3 へ移植し、キメラ抗体を作製している。

結合自由エネルギー (ΔG)

タンパク質と化合物間の結合に伴うエネルギー変化をいい、タンパク質と化合物の結合の強さを示す。通常、5kcal/mol から 15kcal/mol 程度である。酵素阻害剤の場合、天然の基質より 2kcal/mol 程度 ΔG が強ければ、80-90%の阻害活性をし、薬効を示すことができる。

交差飽和法 (Cross-Saturation Method)

高分子量 (50K 以上) のタンパク質複合体の相互作用界面に存在するアミノ酸残基を高精度に決定する手法として開発された新規 NMR 測定法。

構造インタラクトーム

インタラクトーム(*interactome*)は有機体における分子相互作用の全体を指し、構造インタラクトームとは、相互作用する分子の複合体立体構造全体を指す。

ゴニオメータ

試料を回転させ、電子線、X 線などの照射角度を変える装置。

コラーゲン

細胞外マトリックスの主要成分として、体内に最も多く含まれる蛋白質である。一次配列に 3 残基ごとの Gly の繰り返しを含み、3 本のポリペプチド鎖がより合わさってトリプルヘリックス構造を形成し、さらに規則的に会合して巨大で不溶性のコラーゲン線維となる。

受容体型チロシンキナーゼ (RTK)

細胞表面に存在する受容体群で、主に増殖因子と結合し、二量体を形成することにより、細胞内のキナーゼが活性化し、細胞内へシグナルを伝達する。さまざまな受容体型チロシンキナーゼが腫瘍細胞において発現することが知られており、重要な創薬のターゲットとなっている。

生理活性ペプチド

生体物質であるか合成物質であるかを問わず、生物に対して生理作用ないしは薬理作用を発現するアミノ酸の重合体のうち、長さが短いものを指す。

双極子-双極子(DD)相互作用

核スピン間の磁氣的相互作用において、核スピン磁化の緩和の主な原因となる相互作用。そのハミルトニアンはスピン間距離の 3 乗に反比例するため、NOE や交差飽和法などスピン間距離を求める手法の基盤となる。原子の運動性が低いほど相互作用が大きくなるため、分子のダイナミクス解析法の基盤にもなっている。

代謝型グルタミン酸受容体

GPCR の 1 種。脳における神経伝達調節に重要な役割を担っていることが示唆されている。

縦緩和時間

静磁場中に置かれた核スピン系が非平衡の状態から熱平衡状態へと回復する過程を核スピン系の緩和といい、特に静磁場方向の磁化の緩和現象を縦緩和（スピン-格子緩和）と呼ぶ。その熱平衡状態に達するまでの時間を縦緩和時間という。

単粒子解析法 (Single-Particle Analysis)

タンパク質の結晶を使わずに、タンパク質の立体構造を求める手法。X 線 CT と類似した考えで、多数のタンパク質単粒子の電子顕微鏡像を使い、コンピュータにより立体像を再構築する。

デコイセット

In-silico 薬物スクリーニングの性能テストを行うとき、標的に対する活性化合物に加えて、標的に対して活性がないであろう化合物集団を「デコイセット」として用いる。

ドッキング

計算機科学的手法により、タンパク質とリガンド複合体の立体構造を求めること。フレキシブルドッキングとは、タンパク質とリガンドの立体構造変化を考慮し、計算する方法。

ナノ抗体

重鎖、軽鎖の 4 本鎖から成るヒト・マウス等の通常の抗体と異なり、重鎖 2 本のみからなるラクダ抗体の VHH (variable domain of heavy chain of heavy chain antibody) を指す。同程度の抗原親和性を示す通常の抗体よりもはるかに大きさが小さいことからナノ抗体と呼ばれる。

ヒアルロン酸

D-グルクロン酸と N-アセチルグルコサミンの 2 糖の繰り返しからなる直鎖状の高分子ポリマーである。ヒアルロン酸は、細胞外マトリックスの主成分として生体組織に広く分布し、炎症時には低分子量ヒアルロン酸が生成され、細胞運動を亢進させるなどの生理活性を有することが知られている。

標識アミノ酸のスクランブリング

生細胞では、他のアミノ酸を前駆体として代謝により合成されるアミノ酸も存在する。従って、同位体標識されたアミノ酸を生細胞に取り込ませてタンパク質を合成させる際、標識アミノ酸が代謝されることで、目的外の部位が標識されることがある (スクランブリング)。

ファージ・ディスプレイ法

タンパク質の選択的生産法の一つ。大腸菌に感染する繊維状ファージの遺伝子を組替え、ファージ表面に目的のタンパク質を“ディスプレイ”させることからの命名。

ファーマコフォア

リガンド分子が、標的分子と結合するために必要となる官能基群、およびそれらの相対的な空間配置情報を指す。ファーマコフォアを特定することで、新規のリガンドを検索、デザインすることも可能になると考えられている。

並進拡散時間

試料分子がブラウン運動によって溶液中を自由拡散する際に、単位距離あたりを拡散するのに要する時間。ストークス・アインシュタインの法則により、溶液中の試料分子の並進拡散時間は分子半径に比例するため、並進拡散時間から試料分子の分子量を解析できる。

μ オピオイド受容体

主に痛みに関する受容体で、モルヒネの作用点。 μ のアゴニストは、末期がんでの鎮痛、恐怖の緩和、アトピー皮膚炎などの強度のかゆみの緩和に用いられる。オピオイド受容体のサブタイプには κ 、 δ があるため、 μ アゴニストには通常、呼吸抑制、便秘、麻薬性の副作用がある。

マジック角高速回転(MAS)

静磁場に対し、約 54.7° 傾けた軸の周りに試料を高速回転することにより、不溶性成分により生じる局所磁場の不均一性を解消するとともに DD 相互作用を減弱することにより、スペクトルの高分解能化を図る NMR 手法である。DD は MAS 回転速度にほぼ反比例して減弱することが知られている。

マルチカノニカル法

拡張アンサンブル法などとも称される新しい統計物理学の手法で、普通の温度などの定義された状態をそのまま計算するのではなく、一度、分子が非常に運動しやすい仮想的な状態での計算を行い、その結果を現実の系に換算することで様々な構造変化を考慮した精密な計算を行う方法である。

ミトコンドリア

細胞内にある呼吸・エネルギー生成器官。

無細胞（タンパク質）合成／発現系

生きた細胞を用いずに、鋳型 DNA や RNA ポリメラーゼ、ATP、アミノ酸などを共栓付きフラスコ内でタンパク質を生産する技術。細胞内では毒性のタンパク質発現での収量低下、発現タンパク質の再分解などの問題を配慮する必要が無く、細胞では生産不能のタンパク質の生産できる可能性がある。細胞培養が不要のため、HTS(ハイスループットスクリーニング)に向いている。

メチル選択標識法

イソロイシン(□位)、ロイシン、バリンのメチル基 NMR シグナルを選択的に観測するための標識法。完全重水素化試料調製の途中段階に特定アミノ酸前駆体を添加することで容易にメチル基選択標識が達成される。

モデリング

計算機化学に於いて、タンパク質やリガンドについてエネルギー的に安定な分子構造をコンピュータ計算により決定すること。各原子の位置は座標として表示される。

モノアミン酸化酵素-A

モノアミン酸化酵素-A は、ミトコンドリア外膜および細胞外膜に、1本の α ヘリックスが膜に貫通する形でアンカリングして存在し、ドーパミンなどの神経伝達物質の分解を触媒することにより中枢神経系をコントロールするタンパク質である。このため、うつ病等の神経症治療薬の有望な標的タンパク質として知られている。

リード化合物

医薬品の原石となる化合物。誘導体化（化学修飾）することで、特異性、活性、薬物動態などの点で磨きあげられ、完成品である医薬品となりうる。通常、化学合成と誘導体化が容易で、誘導体に構造活性相関があり、化学反応性の高い置換基がない有機化合物をいう。

ロドプシン

眼球内にある光受容 GPCR。X線結晶構造解析により立体構造が決定されている唯一の GPCR。

ローリング

白血球が血液中から炎症組織やリンパ管へと移行する際には、細胞が血管内皮細胞上をゆっくりと転がるように運動するローリングが最初のステップとなる。このような細胞のローリングにおいては、受容体とリガンドとの間に一過的な結合の形成と解離が繰り返し起こっており、CD44 やセレクチンなどの細胞接着因子が関与する。

I. 事業の位置付け・必要性について

1. NEDOの関与の必要性・制度への適合性

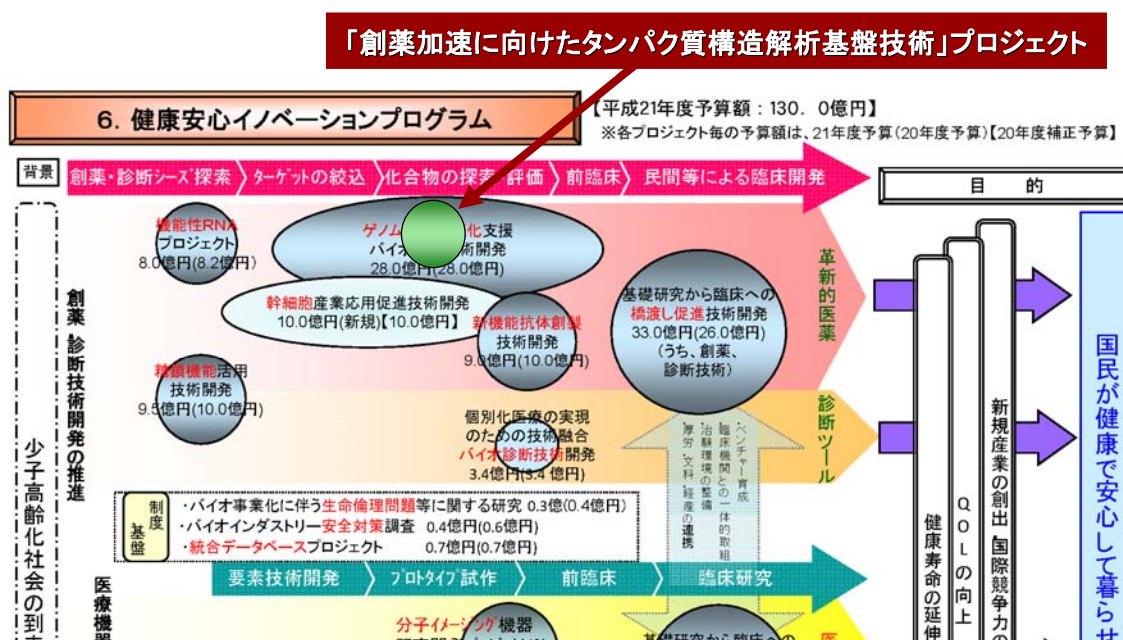
1.1 NEDOが関与することの意義

(健康安心イノベーションプログラムの推進)

今後、世界に類を見ない少子高齢化が進展する我が国において、国民が健康で安心して暮らせる社会を実現することは喫緊の課題である。具体的には、個の医療を通じて健康寿命の延伸やQOL (Quality of Life: 生活の質)の向上を図ることが求められている。

本事業(プロジェクト)は、この目的を達成するため、創薬に資する基盤技術の開発、再生医療の確立、および医療機器・福祉機器の開発等の手段を適切に組み合わせることによって、健康維持増進、疾患の早期診断、及び適切な治療法の提供を実現するほか、関連産業の競争力強化・ベンチャー企業の創出を図るための「健康安心イノベーションプログラム～健康で安心して暮らせる社会の実現を目指して～」の一環として実施されるものである。本プロジェクトは「健康安心イノベーションプログラム～健康で安心して暮らせる社会の実現を目指して～」において、「創薬・診断技術開発」の推進における「革新的医薬品の創出」を目指すプロジェクトに位置づけられている。

健康安心イノベーションでの位置づけ



(NEDO プロジェクトとしての必要性)

近年、製薬企業の研究開発費は増大の一途であるものの、承認される薬剤の数は増えていない。また、研究開発費の増大分は、主として臨床開発費に充てられ、探索研究に回せるリソースは相対的に減少している。一方、欧米における創薬研究では、タンパク質の立体構造に基づいた薬剤の開発による創薬の効率化への取り組みが進みつつある。このため、今後の医薬品産業の国際競争力の強化に向けて、タンパク質の立体構造解析技術や計算科学による創薬候補化合物探索技術等の基盤技術の構築が重要となっている。

現在、市販薬剤のほぼ 50%が膜タンパク質を作用点としているといわれており、膜タンパク質は、生命現象の解明においてのみならず、創薬開発の重要な標的タンパク質でもある。膜タンパク質は細胞膜上で複合体を形成し、その機能を発現している。従って、細胞表層における膜タンパク質およびその複合体の立体構造情報やリガンドとの相互作用の情報を取得し、その構造情報に基づいた計算科学的解析により、医薬リード化合物を効率よく絞り込んでいく「タンパク質立体構造に指南された創薬戦略(SGDD: Structure Guided Drug Development)」を進展させることは、さまざまな技術的困難さがあるものの、我が国において緊急かつ挑戦的な課題である。

この研究開発課題を達成するには、生物の研究者のみならず、物理、計測、および情報など関連する様々な分野の研究者からなる開発体制を構築し、集中的に推進することが必要である。また、最先端の研究開発であり、現時点においては産業化に向けた基礎的段階にあること、開発段階から産学官連携型による効率的な研究開発の推進が必要であり、開発リスクが大きく多額の資金を要するため、民間企業のみで取り組むことが困難であることから、ナショナルプロジェクトとしてNEDOが実施することが必要と考えられる。

1.2 費用対効果

本プロジェクトは、我が国の強みである世界最高レベルの膜タンパク質構造解析技術、タンパク質の相互作用解析技術、および高度な計算科学技術等の研究ポテンシャルを最大限活用し、膜タンパク質及びその複合体の細胞表層上における生体内に近い状態での立体構造解析技術と相互作用解析技術、および計算科学を用いた創薬候補化合物の効率的な探索技術など創薬基盤となる技術を開発する。これら技術により我が国の創薬関連産業が少ない研究開発費で効率的な創薬を達成し、国際競争力を高めていくことが可能と考えられる。また本プロジェクトで開発・取得されたリード化合物等は、参画企業との共同作業により医薬品としての実用化も想定される。さらに本プロジェクトの研究開発を通じて、膜タンパク質及びその複合体の機能・機構を説明する新しい概念の構築が期待できる。これは新しい観点からの画期的な新薬の創出や、それに基づく個別化医療への応用、健康維持・増進などを含めた幅広い分野への展開が期待されうる。と更に実用性の高いリード化合物への展開等のための技術など

2. 事業の背景・目的・位置づけ

(背景)

ゲノム情報から創薬標的タンパク質を同定し、その機能や立体構造情報から新規薬物を創製する「ゲノム創薬」の概念が提出されてから久くなる。ゲノム情報は創薬標的タンパク質の同定に役に立っているものの、現時点で「ゲノム創薬」は創薬研究のメインストリームになり得ていない。これは、疾患関連遺伝子が同定されようとも、その遺伝子産物が生体内で疾病とどのような係わり合いがあるのか、すなわち、作用機序の解明が困難であること、および創薬標的タンパク質に選択的に作用する化合物を合成し、薬物とすることが困難であるためである。

このようなボトルネックを解消すべく、分子生物学的な方法および薬理的なアプローチによるタンパク質機能解析や、ハイスループットスクリーニングによるリード化合物探索などさまざまな取り組みが

精力的に行われている。タンパク質の立体構造に基づく創薬標的タンパク質の機能解析および新規薬物の探索もその中のひとつである。近年明らかになったイオンチャネルや水チャネルの立体構造から、生体膜中における物質の高効率移動の分子論的説明がされたことなどからも明らかのように、もし、創薬標的タンパク質の立体構造が説明できるならば、その構造に基づき、タンパク質の機能およびさらに疾病発症機構を説明することも可能である。さらに、リガンド分子と創薬標的タンパク質の相互作用解析に基づき低分子化合物の設計指針を提案することもできる。実際、欧米のメガファーマでは、創薬標的タンパク質チロシンキナーゼや糖分解酵素の立体構造に基づき合成された慢性骨髄性白血病治療薬であるグリベックやインフルエンザ治療薬であるタミフル等が上市され、治療に大きく貢献している。特に市販薬剤のターゲット(作用点)としてほぼ50%を占めている膜タンパク質に対して、医薬リード化合物を効率よく絞り込むための基盤技術を開発し、「タンパク質立体構造に指南された創薬戦略(SGDD: Structure-Guided Drug Development)」を進展せしめて、創薬研究を効率化することがとくに重要となってきている。

(目的)

このような状況に鑑み、NEDO のプロジェクトとして「生体高分子立体構造情報解析プロジェクト」(平成14～18年度)が実施され、膜タンパク質及びその複合体を対象として電子顕微鏡などによる立体構造解析技術および核磁気共鳴法(NMR)などを用いた相互作用解析技術が開発され、さらに化合物結合の高速・高精度な計算科学的シミュレーション技術の開発が行われた。

本事業では、これらの技術を活用して企業との課題解決型連携を行い、これら技術を産業界に普及させるとともに創薬への有用性の実証研究を行う。さらにこれら技術を深度化しつつ、細胞膜上で複合体を形成している状態での膜タンパク質の立体構造情報およびリガンド相互作用情報を抽出する方法論の開拓やそれに基づくヒット化合物の高効率探索技術の開発を行う。開発した技術により、創薬上有用な膜タンパク質およびその複合体の解析と医薬リード化合物の取得を行って、「タンパク質立体構造に指南された創薬戦略(SGDD: Structure-Guided Drug Development)」を進展させることを目的とする。

II. 研究開発マネジメントについて

1. 事業の目標

1.1 事業の目標

本事業は、電子線等による膜タンパク質及びその複合体の構造解析技術、核磁気共鳴法等による膜タンパク質及びその複合体とリガンド分子の相互作用解析技術、並びに高精度 *in silico* スクリーニング等のシミュレーション技術深度化して、細胞膜上で複合体を形成している生体内に近い状態の膜タンパク質およびその複合体の立体構造情報およびリガンド相互作用情報を抽出する方法論の開拓とそれに基づくヒット化合物の高効率探索技術の開発を行い、企業との課題解決型連携を通じて、これら技術を産業界に普及させるとともに創薬への有用性の実証研究を行う。また創薬上有用な膜タンパク質およびその複合体の解析と医薬リード化合物の取得を行い、「タンパク質立体構造に指南された創薬戦略 (SGDD: Structure-Guided Drug Development)」を進展させることを目的とする。そのため以下の目標を設定している。

最終目標(平成23年度末)

- ①細胞膜内での生体内に近い状態での膜タンパク質及びその複合体の立体構造を解析するため、以下の技術を確立する。また、これらの技術と既存の技術を活用し、ヒト由来(発現系)膜タンパク質及びその複合体の構造を複数個解析する。
 - a) 2次元結晶化された膜タンパク質及びその複合体を2 Åより高い分解能で3次元構造解析する技術、細胞膜内において自然な構造の状態で固定化された膜タンパク質等の全体像を電子線トモグラフィ等により50 Åより高い分解能で3次元構造解析する技術を確立する。
 - b) 結晶化できない膜タンパク質の立体構造を8 Åより高い分解能で解析する技術(単粒子解析等)を確立する。
 - c) a)、b)を組み合わせることにより自然な状態の膜タンパク質及びその複合体の構造を解析する技術を確立する。
- ②生体内に近い状態での膜タンパク質及びその複合体とリガンド分子の相互作用を解析するため、以下の技術を確立する。また、これらの技術を基に、5個以上の膜タンパク質等創薬標的タンパク質を解析する。
 - a) 解離定数がmM~ μ Mと結合力が弱いリガンド分子の結合構造の解析技術を確立する。
 - b) 固体と液体が混合した不均一な系における膜タンパク質及びその複合体とリガンド分子の相互作用解析技術について従来法に比べ3倍に高感度化する。
 - c) 細胞表層における生体内に近い状態での膜タンパク質及びその複合体とリガンド間相互作用を解析する技術を開発する。
- ③高精度の*in silico* スクリーニングを実現するため、以下の技術を確立する。さらに、研究開発項目①、②の技術と連携により、産業上有用な化合物を10個以上取得する。
 - a) タンパク質の動的性質を正しく評価し、タンパク質受容体への基質結合能を高い精度で計できる新しい計算科学手法を確立し、*in silico* スクリーニングの効率を従来法に比べ10倍程度に上げる。
 - b) タンパク質と化合物とのドッキング計算手法の精度を高め、ターゲット選択性能を従来法に

比べ10倍程度に上げる。

- c) タンパク質間相互作用及び超分子複合体の構造情報に基づく構造生理学、構造薬理学のアプローチにより、タンパク質間相互作用を阻害・制御する低分子化合物を選択・設計するため、医薬品化が困難な生理活性ペプチドから医薬品となりやすい非ペプチド性の化合物（低分子化合物等）を得る一般的手法を開発し、その技術の有効性を確認するため、最低1つの実証を行う。

中間目標(平成 21年度末)

- ①細胞膜内での生体内に近い状態での膜タンパク質及びその複合体の立体構造を解析するため、以下の技術を開発する。また、これらの技術と既存技術を活用し、ヒト由来（発現系）膜タンパク質及びその複合体の構造を最低1個解析する。
- a) 2次元結晶化された膜タンパク質及びその複合体を2 Åより高い分解能で3次元構造を解析する技術、細胞の自然な状態での膜タンパク質及びその複合体の3次元構造を解析する技術（電子線トモグラフィー等）を開発する。
- b) 結晶化できない膜タンパク質の立体構造を10 Åより高い分解能で解析する技術（単粒子解析等）を開発する。
- c) a)、b)を組み合わせることにより自然な状態の膜タンパク質及びその複合体の構造を解析する技術を開発する。
- ②生体内に近い状態での膜タンパク質及びその複合体とリガンド分子の相互作用を解析するため、以下の技術を開発する。また、これらの技術を基に、2個以上の膜タンパク質等創薬標的タンパク質を解析する。
- a) 解離定数がmM～ μ Mと結合力が弱いリガンド分子の標的分子結合部位を同定する解析技術の開発を行う。
- b) 固体と液体が混合した不均一な系における膜タンパク質及びその複合体とリガンド分子の相互作用解析技術について従来法に比べ3倍に高感度化する。
- ③高精度のin silicoスクリーニングを実現するため、以下の技術を開発する。さらに、研究開発項目①、②の技術と連携により、産業上有用な化合物を5個以上取得する。
- a) タンパク質の動的性質を正しく評価し、タンパク質受容体への基質結合能を高い精度で計できる新しい計算科学手法の開発し、in silico スクリーニングの効率を従来法に比べ5倍程度に上げる。
- b) タンパク質と化合物とのドッキング計算手法の精度を高め、ターゲット選択性能を従来法に比べ5倍程度に上げる。
- c) タンパク質間相互作用を阻害・制御する低分子化合物の選択・設計の技術開発を行う。

1.2 目標設定の理由

世界最高レベルの解析精度・感度・速度を設定するとともに、それぞれの技術要素を統合した創薬支援システムとして機能させる点に留意した目標であり、産業上の効果が期待できる妥当な目標設定となっていると考えている。

2. 事業の計画内容

2.1 研究開発の内容

(1) 研究開発項目①「電子線等による膜タンパク質及びその複合体の構造解析技術」

【目的】

「生体高分子構造情報解析プロジェクト」から開発してきた極低温電子顕微鏡などを用いた膜タンパク質構造解析法の先見性は、国内のみならず世界的にも認められつつある。本研究開発項目では、このような高いポテンシャルを活かし、生理的に機能を発揮している膜タンパク質及びその複合体の生体内に近い状態での構造を効率よく解析出来る基盤技術を構築する。特に、解析が困難なヒトや哺乳類由来の膜タンパク質及びその複合体の構造解析技術を更に発展させて、創薬において非常にニーズの高い膜タンパク質及びその複合体の立体構造を解析することができる技術を開発し、実際にそれらの構造解析を行う。また研究開発項目②「核磁気共鳴法等による膜タンパク質及びその複合体とリガンド分子の相互作用解析技術」と研究開発項目③「高精度 in silico スクリーニング等のシミュレーション技術」という重要な2つの研究分野に情報を供与するとともに、これらと密接に協力して創薬を加速する基盤技術を開発する。さらに、電子線とX線を用いた膜タンパク質などの構造解析技術の発展により、革新的かつ生物学的に重要な発見や膜タンパク質及びその複合体の機能・機構を説明できる新しい概念構築等によるイノベーションを実現することで、我が国のバイオ産業の競争力強化や新産業の創出に貢献する。

【内容】

(A) 膜タンパク質及びその複合体を構造解析に供するための発現・精製

創薬において非常にニーズが高くその結晶化技術の開発解析が求められている膜タンパク質等の発現・精製技術と2次元結晶化技術の開発を実施している。

ア) 膜タンパク質及びその複合体の大量発現

ヒト等真核生物由来の膜タンパク質及びその複合体に関して、組み換え遺伝子技術と昆虫細胞等を用いた発現系の開発を進めて、解析が求められている膜タンパク質の発現・精製法の確立を行う。特に水チャネル、イオンチャネル、GPCR など、創薬分野から解析が期待されている膜タンパク質の構造解析を目指して大量発現・精製の研究を進めている。

イ) 膜タンパク質及びその複合体を細胞内に局在させて発現する方法の開発

任意の膜タンパク質及びその複合体を細胞内に局在させて発現する方法など、立体構造解析を行うために必要な発現技術の開発を進めている。

ウ) 膜タンパク質及びその複合体の結晶化

解析が求められている膜タンパク質などの結晶化を行っている。

(B) 電子顕微鏡の開発、コンピューター解析の高速化と精密化

ア) 電子線トモグラフィー用極低温電子顕微鏡の開発

細胞に存在する生体内に近い状態の構造を解析することを実現するために、電子線トモグラフィー用極低温電子顕微鏡の開発を行い、これを用いた分解能50 Å程度の解析を行っている。

イ) 2次元結晶化したヒト由来(発現系)の試料について、構造解析(分解能2 Åを超える精度)

を可能にする電子線結晶学用プログラムを開発し、水分子や脂質分子を直接観察できる高分解能での解析を行っている。

ウ)結晶化できない分子や複合体の構造解析を8Åの分解能で解析可能な単粒子解析用プログラム開発を行っている。さらに、細胞に存在する自然な状態での膜タンパク質及びその複合体の解析のために、高分解能の電子線トモグラフィー用コンピュータプログラムの開発を行っている。

エ)2次元結晶化用自動電子顕微鏡の開発

2次元結晶化条件の検査を従来に比べ2倍以上の効率で行うための、2次元結晶化条件検査用自動電子顕微鏡の開発を行っている。これにより、2次元結晶を作製する速度を飛躍的に向上させ、構造解析の加速を図る。

(C)電子顕微鏡とX線によるタンパク質構造解析

上記で開発した技術を用いた膜タンパク質、及びその複合体の構造解析を行っている。X線結晶構造解析を用いて迅速に解析できるタンパク質複合体については、X線による構造解析を進めている。3次元結晶化が困難な膜タンパク質の構造解析は電子線結晶学と単粒子解析を用いた構造解析を行い、細胞に存在する状態で電子線トモグラフィーの解析も行うことで、膜タンパク質及びその複合体の自然な状態の構造解析を目指している。

(2)研究開発項目②「核磁気共鳴法等による膜タンパク質及びその複合体とリガンド分子の相互作用解析技術」

【目的】

創薬標的タンパク質とリガンド分子との相互作用解析は、新規薬物の創製において重要な知見を与える。核磁気共鳴法(NMR)は生理的条件下でタンパク質など生体高分子の構造解析や相互作用解析が可能であるため、他の構造生物学的手法と比較し優位性があるものの、安定同位体を試料に取りこませ、かつ凝集のない状態で測定しなければならないなどの制約がある。そのため、必ずしも全ての標的タンパク質をNMR測定に供すことはできず、効率的な発現系の確立や変性状態からの巻き戻し法などが求められている。さらに、いくつかの膜タンパク質は、細胞表層でリガンド分子のみならず、複数分子と複合体を形成し、機能発現していることが知られている。したがって、従来の可溶化膜タンパク質を対象として解析するのみではなく、細胞膜中における膜タンパク質複合体を保持した状態でリガンド相互作用解析を行うことが可能であるならば、膜タンパク質の機能発現機構を解明でき、さらに新規作用機序に基づく創薬開発が期待される。しかしながら、このような細胞表層あるいは細胞自身など不均一超分子系における相互作用様式をNMRにより研究する場合、適切なNMR試料調製法やNMR測定法が確立されていないことにより、十分な成果を挙げることができていない。本研究開発項目では、上記課題を解決するため、以下の研究開発を実施している。

【内容】

(A)安定同位体標識タンパク質調製系の確立

タンパク質の安定同位体標識において、試料調製法を系統化し、効率的に目的のタンパク

質に適した試料調製法を探索するシステムの構築を目指す。具体的には、ア)安定同位体標識が可能なタンパク質発現系を系統的に選別する方法の確立、イ)不溶性画分でのみ発現されるタンパク質についての系統的なタンパク質巻戻し法の探索システムの確立、ウ)得られたタンパク質(複合体)試料の溶液条件を検討し、NMR測定に最適な溶液条件を高精度でかつ従来法に比べ5倍以上迅速に選別する手法を開発することにより、効率的な安定同位体標識タンパク質調製法の確立を行っている。

(B)リガンドベース創薬デザインのためのNMR相互作用解析手法の開発・高度化

構造解析へ適応可能なリガンドライブラリスクリーニングシステムなどの開発・高度化を進めるとともに、本システムに適応するため及び結合力の弱いリガンド分子の標的タンパク質結合部位を同定するための原子レベルでの相互作用解析法の開発を行なうことにより、リガンドベースの創薬デザインを加速する情報を得るための技術開発を行っている。また、本システムを疾患関連タンパク質複合体系に適用し、低分子リガンド及びリガンドタンパク質と標的タンパク質の相互作用解析を行い、合理的創薬開発に供する構造情報を取得することとしている。

(C)細胞膜複合体相互作用解析のためのNMR試料調製法の開発

従来の膜タンパク質の構造生物学的研究では、膜タンパク質を可溶化剤により可溶化するなど、実際に膜タンパク質が機能する場とは異なる状態での解析が主流で、細胞表層に着目した研究は立ち遅れている。そこで、実際に細胞膜中で膜タンパク質が機能している状態を保持した、あるいはその状態を再構成したNMR測定用試料作成法を開発している。

(D)細胞膜複合体相互作用解析のためのNMR解析法の開発

細胞表層あるいは細胞自身などをNMR研究対象として取り上げるために、ア)高分子量超分子から高感度に精密な構造情報を取り出すこと、イ)高分子量化及び液相・固相混合試料の不均一な磁化率に伴うNMR線幅の増大を抑えることの2点を克服する技術を開発している。具体的には、NMR測定装置及びNMR測定法の改良を行い、細胞表層に存在する膜タンパク質の相互作用様式が解明できるNMR解析法の開発を行うと同時に、この手法の有効性を実証することとしている。

(3)研究開発項目③「高精度 in silico スクリーニング等のシミュレーション技術」

【目的】

我が国で開発された世界最高レベルの電子顕微鏡技術・相互作用界面構造解析技術から得られる有用な情報を活用し、in silico スクリーニングの精度及び高速性の向上を図る新たな計算アルゴリズムとプログラムを開発し、さらに、その技術の具体的な創薬開発への応用することで、開発した計算科学手法による創薬加速の効果を検証する。また、データに基づくタンパク質の動的シミュレーション解析結果を構造解析と相互作用解析にフィードバックし、タンパク質とタンパク質、リガンド、化合物との相互作用、信号伝達におけるダイナミカルな現象に切り込み、新規知見を得て、スクリーニング及び創薬ターゲット選択にも新しい展開をもたらすことも意図している。本研究開発項目では、上記課題を解決するため、以下の研究開発を実施している。

【内 容】

(A) in silicoドッキング計算の高精度化

創薬プロセスにおけるin silicoドッキング計算において、

ア)タンパク質の動的性質を正しく評価するため、動的性質を抽出する手法の開発及び動的構造のデータベースの設計・試作を行い、

イ)ドッキングのスコアの精度を高めるため、タンパク質及び低分子リガンドの動的構造、及び各種相互作用を考慮した複合体の構造予測法及び結合エネルギー算出法の開発を行っている。

(B) 構造生理学アプローチによるタンパク質間相互作用解析

タンパク質は、タンパク質間の相互作用とそれに基づく超分子複合体として高度な生命現象を維持しているため、タンパク質間相互作用及び超分子複合体の構造情報まで含めた詳細な解析「構造インタラクトーム」に踏み込み、タンパク質間相互作用の阻害等の創薬において有用な機能を有するものの活性の維持等の観点から医薬品化が困難な生理活性ペプチドから、医薬品となりやすい非ペプチド性の低分子化合物等へ展開するため、ペプチドと同様あるいはそれ以上の強い結合性を有する非ペプチド性化合物(低分子化合物等)を探索・設計する新しい手法の開発を行っている。

(C) 創薬開発への応用促進に向けた技術開発

計算の高効率化と高速性が発揮できるアルゴリズムとプログラムの実装法の開発、専用ボードの利用、リガンド・データベースや計算結果を整理したデータベース等の開発を推進している。また、本開発研究のチーム間だけでなく、創薬メーカーと研究協力を行って具体的な創薬実証研究を実施している。さらに、上記開発するプログラムやデータベースを公開し、研究開発成果を広く社会に還元するため、Web siteから最新のプログラム、データ、情報を与えられる仕組みとする。

2. 2 研究開発の実施体制

(1) 実施体制の構造

本事業は、平成14年度から平成18年度までに実施された「生体高分子立体構造情報解析プロジェクト」の成果を活用し、平成19年度から平成23年までの5年間の「健康安心プログラム」の一環として経済産業省の直轄事業として開始した。平成20年度からはNEDO委託事業として実施している。

研究開発責任者(プロジェクトリーダー)である東京大学大学院薬学系研究科 嶋田一夫 教授の下で効果的な体制を敷いて平成19年度から開始した。平成20年度からはプロジェクトリーダーを京都大学大学院理学研究科 藤吉好則 教授に交代し進められている。また、研究分野及び内容が多岐に亘りかつ専門性が高いためにサブリーダーとして、平成19年度は、京都大学大学院理学研究科 藤吉好則 教授と大阪大学蛋白質研究所附属プロテオミクス総合研究センター 中村春木 教授が協力して、平成20年度からはプロジェクトリーダーの交代に伴い、嶋田教授がサブリーダーとして研究開発の推進を行っている。

さらに、実施に当たっては、効率運営を図るために研究開発項目毎にチームリーダーを配置し、運営の効率化を図っている。

研究開発項目①チームリーダー：

藤吉好則 京都大学大学院理学研究科 教授

研究開発項目②チームリーダー：

嶋田一夫 東京大学大学院薬学系研究科 教授

研究開発項目③チームリーダー：

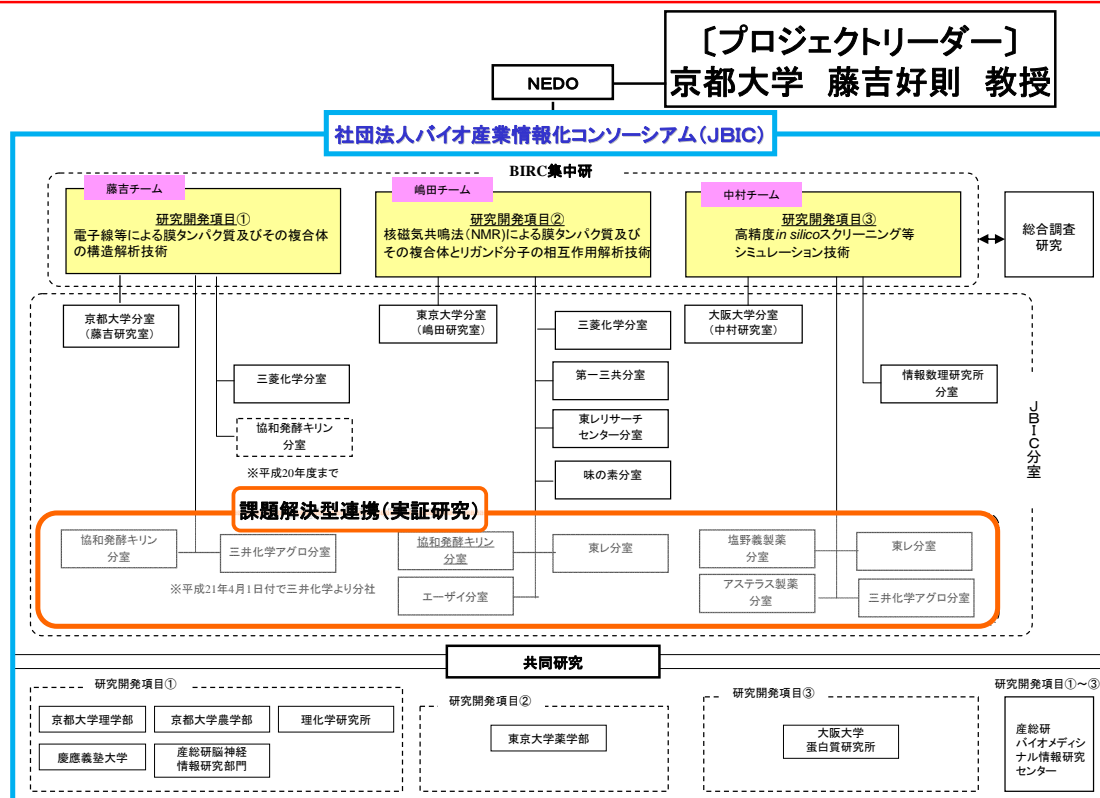
中村春木 大阪大学蛋白質研究所附属プロテオミクス総合研究センター 教授

(2) 課題解決型連携(実証研究)の実施

本事業では、開発してきた電子顕微鏡や核磁気共鳴法(NMR)などを用いた膜タンパク質およびその複合体の構造解析法と相互作用解析法の成果、および計算科学的創薬支援システムを活用し、企業との課題解決型連携を行い、これら技術を産業界に普及させるとともに創薬への有用性の実証研究を行うことを目的のひとつとしている。そのため、上記技術を自社の創薬研究開発のために使用したい企業を公募し、課題快活型連携として各チームリーダーのもとで実施している。これにより上記技術が、実際の創薬にいかにか有効であるかを実証できるとともに、企業側からの意見・要望を直接吸い上げることができ、本事業の技術開発の方向性の決定にも参考となると期待している。

(3) 研究実施体制

研究開発の実施体制



2.3 研究開発の運営管理

本事業は、「電子線等による膜タンパク質及びその複合体の構造解析技術」、「核磁気共鳴法等による膜タンパク質及びその複合体とリガンド分子の相互作用解析技術」及び「高精度in silicoスクリーニング等のシミュレーション技術」の各研究開発項目を連携させながら一体的に進めることが必要である。そのため、プロジェクト全体の研究内容の把握と研究推進を目的とし、全員が会してののの全体会議(兼 推進委員会)を平成19年5月18日(金)および平成21年1月30日(金)開催し、これまでの研究成果と今後の研究計画についてディスカッションを行った。同会議にはこの項の最後に示す各委員および経済産業省担当者も出席し活発な議論を行った。また各研究開発項目の研究推進についてより細かい議論を行うために、各グループが月例のミーティングなどを定期てきに実施している。

委員会における登録委員

氏名	所属・役職
藤吉 好則	京都大学大学院理学研究科生物物理学教室 教授／産業技術総合研究所バイオメディシナル情報研究センター タンパク質構造解析チーム 招聘研究員(委員会委員長)
嶋田 一夫	東京大学大学院薬学系研究科生命物理化学教室 教授／産業技術総合研究所バイオメディシナル情報研究センター 研究センター長
中村 春木	大阪大学蛋白質研究所附属プロテオミクス総合研究センター 蛋白質情報科学研究系 教授／産業技術総合研究所バイオメディシナル情報研究センター タンパク質構造解析チーム 招聘研究員
佐藤 主税	産業技術総合研究所脳神経情報研究部門構造生理研究グループ グループリーダー
安井 正人	慶應義塾大学大学院医学研究科 教授
木村 泰久	京都大学大学院農学研究科 助教
平井 照久	理化学研究所播磨研究所構造生理学研究グループ 三次元顕微鏡法研究チーム チームリーダー

3. 情勢変化への対応

本事業並びに先行した「生体高分子立体構造情報解析プロジェクト」は、「電子線等による膜タンパク質及びその複合体の構造解析技術」、「核磁気共鳴法等による膜タンパク質及びその複合体とリガンド分子の相互作用解析技術」、および「高精度in silicoスクリーニング等のシミュレーション技術」の3つの重要な技術開発を同時に行うというユニークさを持ち、その先見性と先進性は、

国内のみならず世界的にも認められつつある。今後もこのような高いポテンシャルをさらに活かして、解析が困難なヒトや哺乳類由来の膜タンパク質及びその複合体の構造解析研究を引き続き堅持して進めていく。

各研究開発項目では、企業を含むプロジェクト参加グループとの共同研究を含めて、それぞれ順調に進捗している。しかし、3つのそれぞれの研究開発項目内の研究を進める必要性と重要性から、ややもすると開発項目間の協力による研究テーマ推進が弱くなるおそれがある。この問題を解決するために、意識的に3つの研究開発項目間の連携を強化・発展させる努力を行っている。具体的には阻害剤開発およびタンパク質複合体モデル構築を可能とする新規手法の開発などを連携して実施している。

4. 中間評価への対応

該当せず。

5. 評価に関する事項

中間評価を平成 21 年度、事後評価を平成 24 年度に実施する。

Ⅲ. 研究開発成果について

1. 事業全体の成果

電子線等による膜タンパク質及びその複合体の構造解析技術開発においては、水チャンネル AQP4 の変異体を2次元結晶化して電子線結晶構造解析することにより、X 線結晶学の 1.8 Å 分解能の解析 (J.D. Ho et al., PNAS, 106, 7437-7442 (2009)) より高い精度でチャンネル内の水分子を可視化することに成功した。また、脂質分子の構造解析にも成功した。その結果、水チャンネルの速い水透過と高い選択性の分子機構を説明する H-bond isolation 機構を実証した。また、AQP4 が脳浮腫の原因となるので、AQP4 の水透過を阻害するための分子 AZA を同定した。ギャップジャンクションチャンネル Cx26 の M34A 変異体の2次元結晶の電子線解析により、プラグ構造を解明し、野生型 Cx26 の構造決定と併せて、チャンネルのゲーティングモデルを提案した。多層膜2次元結晶の解析用プログラムを改良し、上記 AQP4 や Cx26 等の解析を可能にした。また単粒子解析用プログラムを開発し、基質含有シャペロン GroEL/ES の構造解析に成功し、非対称変形による基質フォールディングモデルを提案した。さらに、ヒストンシャペロン CIA/Asf1 とヒストン H3/H4 複合体の構造と機能解析を行って、ヒストン(H3/H4)₂4量体を解離させる新しい概念となる CIA の機能を解明した。

核磁気共鳴法による膜タンパク質及びその複合体とリガンド分子の相互作用解析技術開発においては、1分子蛍光分析法をもとに測定条件の体系的スクリーニング法および大腸菌発現系と同様の条件で、安定同位体標識できる酵母発現系を開発した。固液界面の分子間相互作用解析に有効な高分解能マジック角回転条件下の転移交差飽和 (TCS) 法において、非特異的相互作用を抑制できる多孔性担体を開発し、高感度・高精度な TCS データ取得に成功した。さらにアミノ酸選択的交差飽和方法の実験データと分子動力学計算を組み合わせ、高精度なタンパク質複合体の立体構造構築方法を計算科学チームと共同で開発した。また創薬標的タンパク質であるケモカイン受容体、ディスコインドメイン受容体、細胞接着因子 CD44、GPVI のリガンド認識機構を解明した。

高精度 *in silico* スクリーニング等のシミュレーション技術開発においては、ドッキングスコアの精度向上のため、sequence-based DSM法を開発しより高いヒット率が得られる手法とした。FP法とTI法に基づく滑らかな解離経路で結合自由エネルギーを算出するSRPG法を開発し、それを電子顕微鏡実験チームによって解析されたアクアポリン4の阻害剤解析に応用した。核磁気共鳴実験チームと共同してASCS (アミノ酸選択的交差飽和) 法の観測結果から蛋白質複合体モデルを構築する方法を開発し、ディスコインドメイン受容体とコラーゲンの複合体モデル構築へ応用した。生理活性を有する非ペプチド性化合物の探索のため、新たにMD-MVO法を開発し、 μ オピオイド受容体に対して検証した。hERGの立体構造モデルにCOMBINE法を適用し、従来法の7.9倍の選択性をもつ阻害活性予測法を開発した。水溶解度推定のため、物理化学的特徴を分子記述子に加える新たな高精度の予測法を開発した。 μ オピオイド受容体アゴニストや農薬のシードとなる化合物、インフルエンザ・ウィルスのPA-PB1複合体阻害剤等70を超えるヒット化合物を得、有用な化合物を20ヶ程得た。その際、ヒット率や選択性も向上できた。

2. 研究開発項目毎の成果

2.1 研究開発項目①「電子線等による膜タンパク質及びその複合体の構造解析技術」

集中研究: 社団法人バイオ産業情報化コンソーシアム[バイオメディシナル情報研究センター(BIRC)、京都大学分室、三菱化学分室、協和発酵キリン分室、三井化学アグロ分室]

共同研究先: 独立行政法人産業技術総合研究所バイオメディシナル情報研究センター、独立行政法人産業技術総合研究所脳神経情報研究部門、国立大学法人京都大学大学院理学研究科、国立大学法人京都大学大学院農学研究科、独立行政法人理化学研究所播磨研究所、学校法人慶應義塾大学大学院医学研究科

(1) 膜タンパク質及びその複合体の構造解析に必要な膜タンパク質等の発現・精製技術、結晶化技術の開発

[バイオメディシナル情報研究センター／京都大学分室／京都大学大学院理学研究科]

(1-1) 組み換え遺伝子技術と昆虫細胞等による発現系を用いて、解析が求められているヒト等真核生物由来の膜タンパク質の発現・精製法の開発を行ってきた。特に水チャネル、イオンチャネル、GPCRなど、創薬分野から期待されている膜タンパク質の構造解析を目指して大量発現・精製の研究を進めた。具体的には、脳に発現する水チャネル、AQP4とその変異体、ギャップ結合チャネルCx26とその変異体、エンドセリン受容体、特にET_BRとそのキメラや変異体の昆虫細胞を用いた発現と精製が図1に示す様に安定に行えるような技術を確認した。また、GPCRとHomerを用いて界面活性剤による可溶化なしに発現・精製できる技術の開発を進めた。

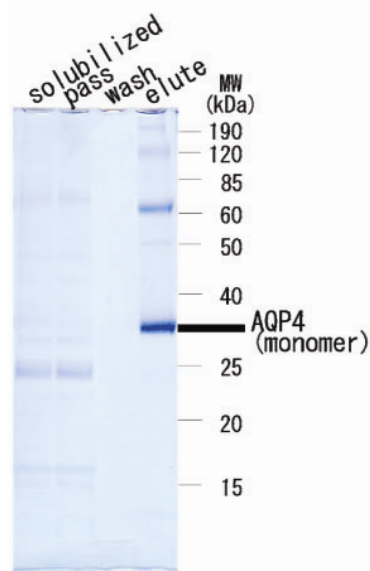


図1 ヒスチジンタグ配列を付加した AQP4 を昆虫細胞 SF9 を用いて発現し、界面活性剤オクチルグルコシド (OG) を用いて可溶化し、ヒスチジンのアフィニティー精製した結果、3 リッターカルチャーにより 10mg 以上の AQP4 が精製できる。モノマーの位置以外にもバンドは観察されるが、これは水チャネルが本来 4 量体で機能していることを反映している。他に顕著なバンドが見られないことからわかるように、昆虫細胞の発現系を用いて、高い精製度で、構造と機能研究に必要な量の AQP4 が安定に発現・精製できている。

(1-2)解析が必要な膜タンパク質、具体的には、AQP4とその変異体、Cx26とその変異体、H,K-ATPase、液胞型ATPase(V-ATPase)、ミクソソーム型プロスタグランジンE合成酵素1(MPGES1)等を用いて、2次元結晶化技術の開発を進めて、1例として図2に示すように、実際にこれらの膜タンパク質の2次元結晶化に成功した。

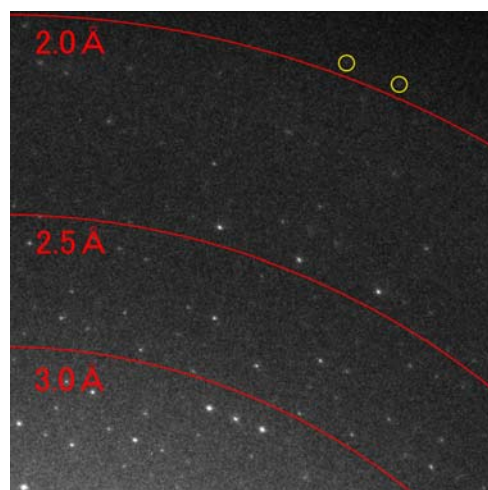


図2 AQP4の2次元結晶からの電子線回折像。丸で示すように、2 Å分解能以上の回折点が観察される。

(2) 極低温高分解能電子顕微鏡や自動電子顕微鏡等の電子顕微鏡の開発、コンピューター解析の高速化と精密化

(2-1)細胞に存在する生体内に近い状態の構造解析を実現するために、電子線トモグラフィー用極低温電子顕微鏡の開発を行った。その結果、トップエントリー式高分解能極低温電子顕微鏡に適した傾斜機構つき極低温電子顕微鏡が開発された。これを用いて、細胞に存在する生体内に近い状態のギャップ結合の構造を解析するための傾斜シリーズの撮影を行った。これらのデータから、50 Åより高い分解能の解析を行っている。

(2-2)2次元結晶化したヒト由来(発現系)の試料について、構造解析(分解能2 Åを超える精度)を可能にする電子線結晶学用プログラムを開発し、図3で示すように、水分子や、図4で示すように脂質分子を直接観察できる高分解能での解析を行うことが出来るようになった(JMB, 2009に発表)。

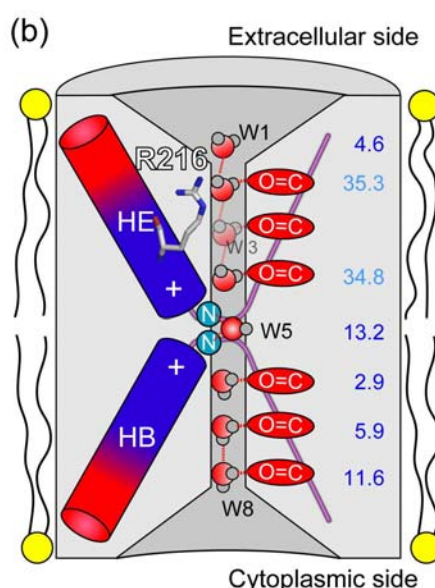
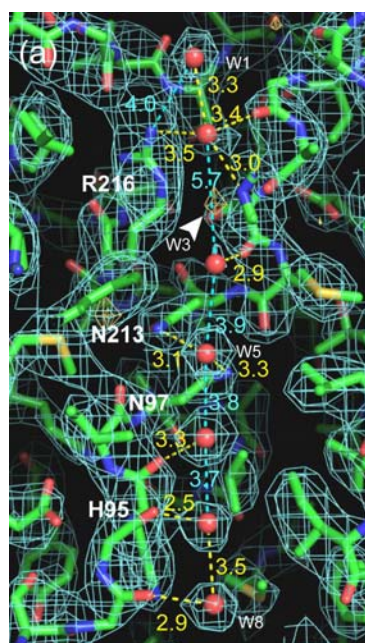


図3 AQP4のドーパミンシグナルによるリン酸化をミミックする変異体の高分解能の構造解析から、チャンネル内の全ての水分子、8個をきれいに分離して観察するのに成功した。この解析によって、P. Agre氏のノーベル賞の理由となったH-bond Isolation機構は、当時はモデルとして提案したのであるが、これを完全に実証できた。

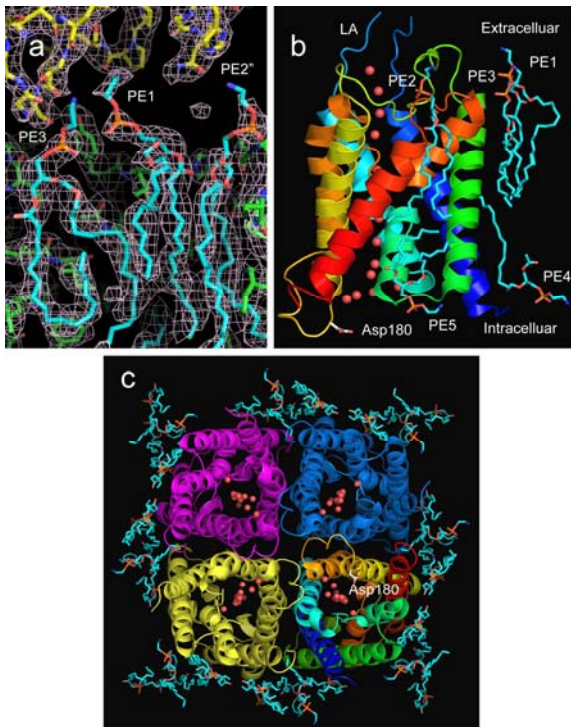


図4 AQP4 の高分解能の構造解析により解析された、結晶内の脂質分子の構造。高分解能の解析によって、水分子と共に、脂質分子の構造もきちんと分離して観察された。この解析から、AQP4 がアレイ構造を安定にとる場合の脂質分子との相互作用機構が解明されただけでなく、AQP4 分子が細胞外側で、反対の膜に存在するホスファチジルエタノールアミン (PE) と直接結合している構造も解明された。

(2-3) 結晶化できない分子や複合体の構造解析を8 Åの分解能で解析可能な単粒子解析用プログラム開発を産総研の佐藤グループの力で行った。さらに、細胞に存在する自然な状態での膜タンパク質及びその複合体の解析のために、高分解能の電子線トモグラフィー用コンピュータプログラムの開発を理化学研究所と日本電子との協力で行った。

(2-4) 2次元結晶化条件の検査を従来に比べ2倍以上の効率で行うための、2次元結晶化条件検査用自動電子顕微鏡の開発を行った。特に高性能CCDとそれを制御するコンピュータプログラムを開発することにより、2次元結晶を作製する速度を飛躍的に向上させると共に、実際に極低温電子顕微鏡を用いてデータ収集するシステムとしての効率も向上した。これらのシステムを活用して、図3や図4のような構造解析の効率とその質が飛躍的に向上した。

(3) 電子顕微鏡とX線によるタンパク質構造解析

上記で開発した技術を用いて膜タンパク質及びその複合体の構造解析を行った。以下に具体的な例で示すように、生理的に近い状態での構造解析を電子線結晶学を用いて行い、X線結晶構造解析を用いて迅速に解析できるタンパク質複合体については、X線による構造解析を進めた。3次元結晶化が困難な膜タンパク質の構造解析は電子線結晶学と単粒子解析を用いた構造解析を行い、細胞に存在する状態で電子線トモグラフィーの解析も行うことで、膜タンパク質及びその複合体の自然な状態の構造解析も行った。

(3-1) 京都大学分室の成果

特筆すべき成果を以下に示す。まず、中間目標で達成すべき目標として掲げた“ヒト由来(発現系)膜タンパク質及びその複合体の構造を最低1個解析する。”に関しては、ヒト由来ギャップ結合チャンネルコネキシン26(Cx26)の例を代表例としてあげることが出来る。

(3-1-1) Cx26のチャンネルを閉じる構造を安定化する変異体M34Aの2次元結晶を作

製し、電子線結晶学によってその構造を解析した。その結果、これまで教科書で説明されるギャップ結合チャネルのゲーティング機構とは異なり、このチャネルは、プラグと命名したゲーティングに関わると思われる（図5の白い矢頭で示す）構造をとっていることが明らかになった（PNAS, 2007に発表）。

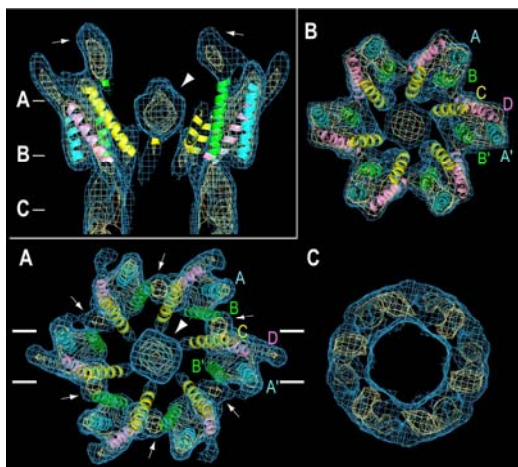


図5 昆虫細胞で発現し、精製、結晶化して、電子線結晶学で解析されたCx26の構造。白い矢頭で示した部分に、プラグと命名した密度が見られる。

このプラグが何によって形成されているかを確認するために、アミノ末端側を除いた変異体について、これらを昆虫細胞Sf9の発現系を用いて発現と精製法を確立した。また、それらの2次元結晶を作製し解析した結果、アミノ末端によって形成されることを確認した。

さらに、X線結晶学による構造解析により、図6のように原子モデルを解析し、コネクシン構造に関して混乱した状況に終止符をうつ歴史的成果を得た(Nature, 2009に発表)。

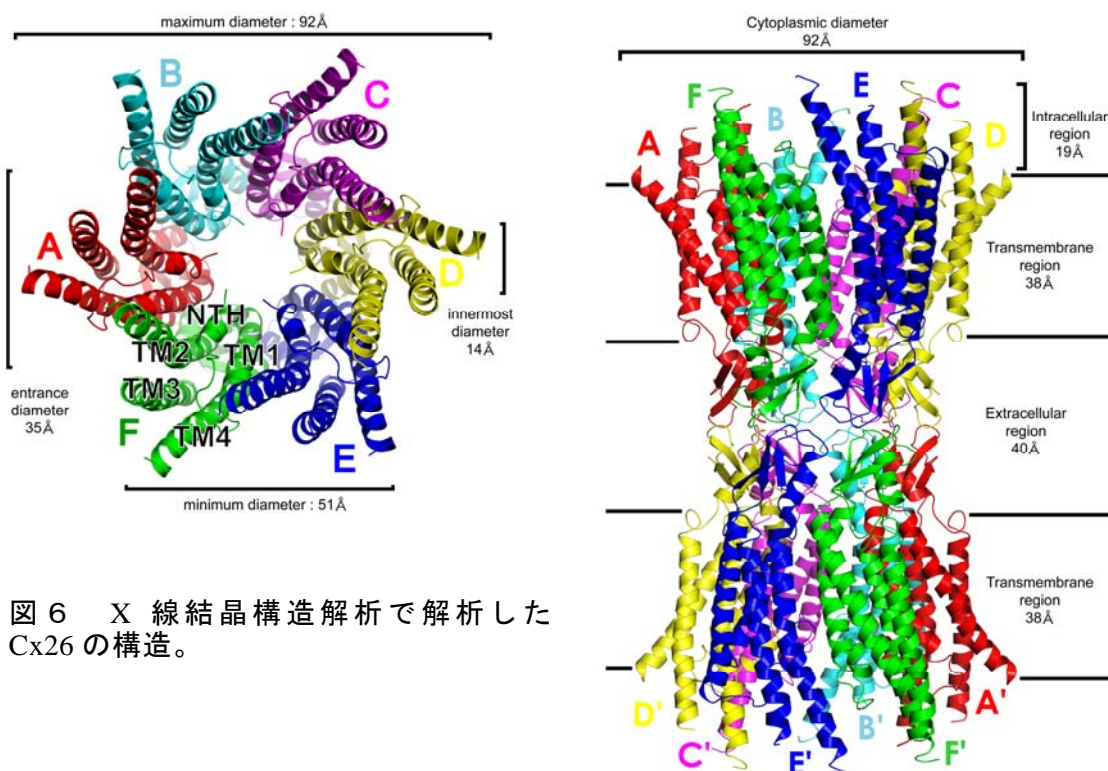


図6 X線結晶構造解析で解析したCx26の構造。

(3-1-2) 胃の内部はpHが1近くの酸性条件になっている、このような酸性の条件にするには強力なプロトンポンプの働きが必要である。豚の胃から精製したHK-ATPaseの2次元結晶を作製して、電子線結晶学による構造解析を行った結果、細胞膜内外のプロトンの濃度を100万倍という驚異の濃度勾配までポンピングして達成できるプロトンポンプの特徴的な分子機構を解明した。この機構をラチェットモデルと名づけた。図7に示す様にポンピングの機能を担う α サブユニットが逆回転しないように β サブユニットのアミノ(N)末端が、 α サブユニットのPDドメインに接触して、これがラチェットの働きをするようにポンプの逆回転を防ぐ構造を解明した。また、図7bに示す様にN末端を除いた変異体により、その機構を確認した。

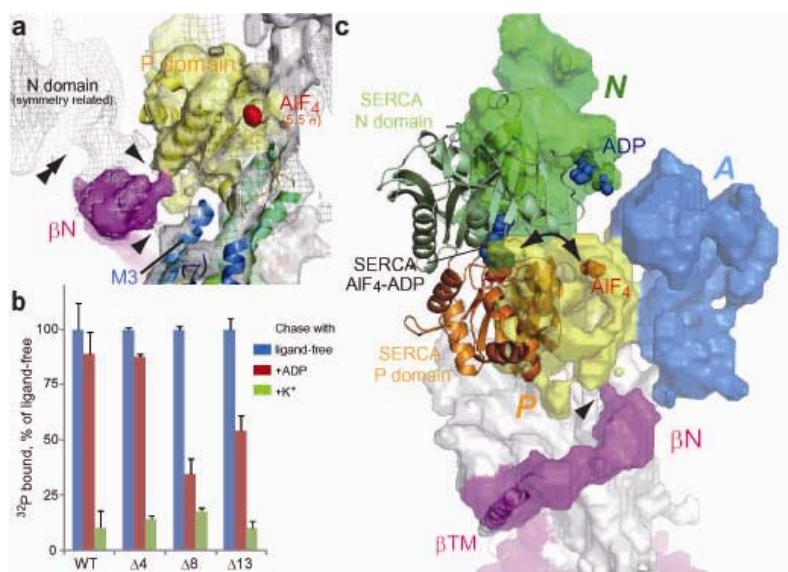


図7 HK-ATPaseの2次元結晶を作製して、電子線結晶学によって構造解析を行った結果。紫色の β サブユニットが α サブユニットのPDドメインに黒い矢印の部分で、接触して、プロトンポンプの逆回転を防ぐことによって、細胞膜内外のプロトンの濃度勾配を100万倍にもすることが出来る驚異の分子機構が解明された。

(3-1-3) 水チャネルAQP4のドーパミンカスケードによるゲーティング機構を解明するためにS180D変異体の構造を高分解能で解析した。そのために、発現・精製・結晶化条件を最適にすると共に、極低温電子顕微鏡用試料作製条件の最適化を行った。さらに、高分解能の電子線回折像を記録できるようにCCDカメラとそのプログラムシステム、解析用プログラムなどの開発を行った。その結果、1.9Å分解能のデータが収集できるようになった。高い傾斜角

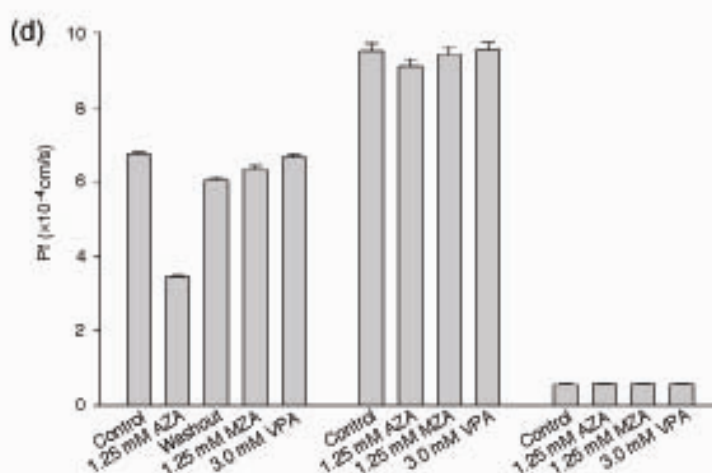


図8 AZAがAQP4特異的に、しかも可逆的に水透過を阻害することを解明した。AZAに構造が極めて似ているMZAが阻害を示さないことも確認した。

度のデータまで等方的に計算するために、分解能を2.8 Åに制限したが、2 Åを超える分解能での解析が可能になった。その結果、図3と図4に示す様にチャンネル内の水分子のみならず、脂質分子も可視化できるようになった。さらに、脳浮腫を軽減するなどの目的で、AQP4の水透過阻害剤の開発が望まれている。それゆえ、AQP4の水透過阻害剤として、図8に示す様にAQP4特異的に可逆的に水透過を阻害するアセタゾールアミド (AZA) を発見した。また、電子線結晶学により解析したAQP4の構造と計算科学グループが独自に開発したSievgeneというプログラムを用いて、AZAをはじめとして、メタゾールアミド (MZA)、バルプロイクアシッド (VPA)、サルチアミンなどの化合物がAQP4へ結合する様子のドッキングモデルを計算した。さらに、このような複合体の形成の様子を実際に近い水中での分子動力学 (MD) 計算を用いて結合の様子をシミュレートした。

(3-2) BIRCの電子顕微鏡グループの研究内容と研究成果

極低温高分解能電子顕微鏡や自動電子顕微鏡等の電子顕微鏡の開発、コンピューター解析の高速化と精密化を目指して研究を進め以下の様な成果を得た。

(3-2-1) ミクロソーム型プロスタグランジンE合成酵素1の高分解能構造解析のための電子顕微鏡法開発・改良

我々は以前、カロリンスカ研究所のHans Hebert博士のグループと共同で、ミクロソーム型グルタチオン転移酵素1 (MGST1) の電子線結晶構造解析を行い、その原子モデルを発表した。そのMGST1は、主にグルタチオンを利用した酵素活性を持つ膜タンパク質のグループである、Membrane Associated Proteins in Eicosanoid and Glutathione Metabolism (MAPEG)ファミリーの一員であり、他のメンバーとして、ミクロソーム型プロスタグランジンE合成酵素1 (MPGES1) が知られていた。今回、このMPGES1の二次元結晶がカロリンスカ研究所で得られていたので、その高分解能の電子線結晶構造解析の共同研究を行った。MPGES1は、炎症などを引き起こすメディエーターであるプロスタグランジンの生合成カスケードで、発現が誘導される終端酵素であるので、医薬的に特に重要と考えられている。

この結晶は、当初、非傾斜の結晶から、明らかに構造が異なると考えられる電子回折が得られたが、低温電子顕微鏡用の試料作製法を

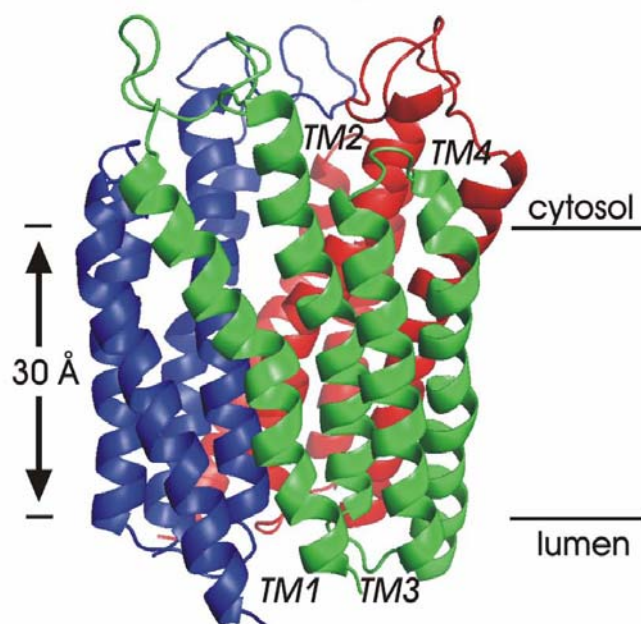


図9 電子線結晶学により解析された MPGES1 の構造

最適化することで、半分くらいの結晶について、同じ構造と考えられる電子回折図形が得られるようになった。しかし、これ以上、試料調製法を向上することができなかったため、傾斜と非傾斜の電子回折図形をペアで撮影することで、同じ構造を持つ結晶からの電子回折図形を選択して解析した。このようなデータ収集条件の改良により、図9のようなMPGES1の原子モデルを報告することができた。また、膜タンパク質が傾いて二次元結晶中に存在しているという特殊な結晶であることが明らかになり、試料調製が困難だった理由と考えられた。

このMPGES1の結晶構造と、以前に得られたMGST1の結晶構造を比較することで、いろいろな基質を受け入れて、それを可溶性に変換することで解毒を行うMGST1に対して、プロスタグランジン特異的なMPGES1の酵素機構が、基質のinduced fitに起因しているというモデルを提唱できた。このような構造変化を伴った基質認識機構は、その阻害薬の開発にも応用できる可能性がある。

(3-2-2) 膜タンパク質複合体V-ATPaseの電子線結晶構造解析のための結晶化法開発・改良

液胞型ATPase(V-ATPase)はF-type ATPaseと同様、回転型のナノモーターであり、イオン輸送を行う膜内部分(V_0)とATPase活性を持つ水溶性部分(V_1)に大きく分けることができる。そのため、そのイオン輸送の機構は両者で共通していると考えられるが、V-ATPaseは細胞内のコンパートメントの内部を酸性にする役割を担っており、その生理的な役割は重要であり、特に酵素活性の制御に関しては、水溶性部分の可逆的な解離結合などV-ATPase特有の性質が多い。そこで、哺乳類のV-ATPaseに近い、古細菌由来のV-ATPaseの立体構造を明らかにすることは、哺乳類V-ATPaseの制御機構の解明につながると考えられる。また、V-ATPaseは膜タンパク質複合体であり、それを用いて膜タンパク質複合体の結晶化法と電子線結晶構造解析の開発・改良を行うことができる。

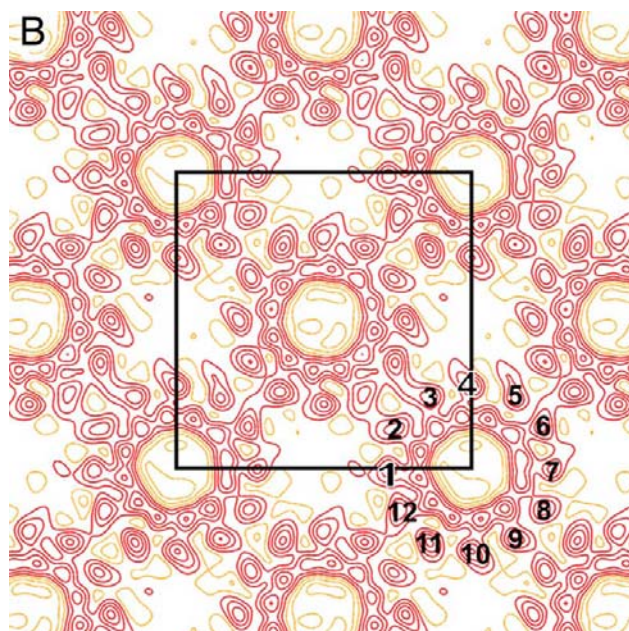


図10 電子線結晶学で解析された V_1 -ATPaseの投影構造

我々は以前、V-ATPase全体のホロ酵素の結晶化を行ったが、高分解能の構造が得られる結晶を得ることができなかつたので、今回はその膜貫通部分 V_0 のみを用いて二次元結晶化を行った。その結果、図10に示したような投影像を得ることができた。この投影像は7Å分解能で、ヘリックスを明瞭に観察することができ、それからサブユニット数が12と決定することができた。興味深いことに、そのサブユニット数は種により異なっており、そのタンパク質が存在する環境のpHにより、数が最適化されていることが示唆された。また、水溶性の V_1 -ATPase部分は三量体であるが、膜貫通部分はその倍数であっても、その活性

に問題がないことを、東工大との共同研究により明らかにし、対称性のミスマッチが機能に重要でないことを示した。現在、その立体構造を得る解析を進めている。

(3-2-3) 結晶によらない複合体構造解析のための極低温電子顕微鏡法開発・改良とそのシャペロニン複合体への応用

我々は、結晶を作ること無しに、比較的高分解能の構造解析を行うことができる単粒子解析に適した極低温電子顕微鏡を開発した。今回、その顕微鏡をシャペロニン複合体に応用して、実際の立体構造解析を行い、その構造を報告した。シャペロニンはタンパク質のfoldingを助ける分子シャペロンの一つで、複合体を構成するGroELとGroESが作る内孔に基質を取り込むことで、その折りたたみを助けると考えられている。我々が用いたシャペロニン複合体は、天然の *Thermus thermophilus* から得たので、折りたたみ途中の基質を結合していると考えられる。

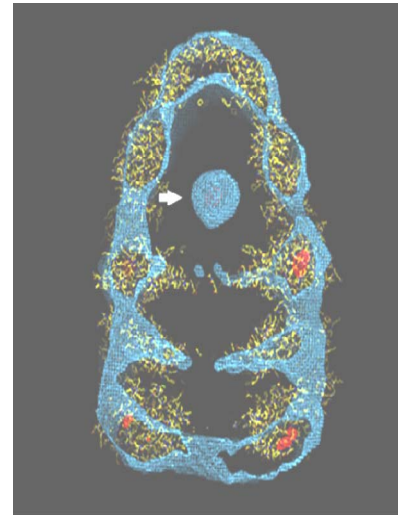


図 11 単粒子解析法で解析されたシャペロニン複合体の構造。

そのような試料を用いて得られた立体構造を図 11 に示す。これは多くの基質の平均像ではあるが、明らかに内部に基質に相当すると考えられる電位が観察される立体構造を得ることができた。このように観察された基質は、内孔のほぼ中央に位置していたので、内孔中の基質はシャペロニンから斥力を受けていることが示唆された。これは、基質の解離に重要であると考えられるとともに、基質の効率的な折りたたみにも寄与している可能性がある。タンパク質の誤った重合によると考えるアルツハイマー病などが問題となっており、このようなタンパク質の折りたたみの研究は、そのような病気の治療にも貢献できる可能性がある。また現在、この解析で得られた知見をもとに、極低温電子顕微鏡を用いた単粒子解析に適した撮影条件を検討しており、より高分解能の構造解析を目指している。

(3-3) BIRC の X 線グループの研究内容と研究成果

(3-3-1) クロマチン関連複合体に関する研究

(3-3-1-1) ヒストンシャペロン CIA/ASF1-CCG1 プロモドメイン複合体の構造と機能

真核生物のゲノム DNA は、ヒストンに DNA が巻き付いたヌクレオソームを形成することで、わずか数ミクロンの核内に収納されている。ヌクレオソームは DNA 上で起こる転写・複製・修復・組み替えなどの反応に抑制的に作用するため、これらの反応が DNA 上で進行するには、ゲノム DNA 中の特定の領域のヌクレオソームが、破壊・再形成される分子機構が必須である。これまでに、細胞内外のシグナルに依存してヒストンに化学修飾が施され、特定の領域のヌクレオソームの構造変換が選択的に起こることが明らかにされてきた。しかしながら、ヒストンの化学修飾からヌクレオソーム構造変換に至る具体的な分子機構については未だ解明されていない。

ヒストンのアセチル化修飾は、特定の領域のヌクレオソームを特定の時期に破壊する目印となることが明らかにされている。ヒストンシャペロンCIA/ASF1は、この目印となるアセチル化を特異的に認識するTFIIDの最大サブユニットCCG1の高保存領域であるダブルプロモドメイン(以下、DBD(CCG1)と略す)と機能的に相互作用することで、転写活性化領域にリクルートされると考えられている。ヌクレオソーム構造変換因子とアセチル化ヒストン認識ドメインとの複合体(CIA/ASF1-DBD(CCG1)複合体)を解析することは、生体内のシグナルによるヌクレオソーム構造変換制御の分子機構を理解する上で、有用な知見を与えると考えられる。更に、この過程は真核生物の遺伝子発現の根幹に関わるため、その分子機構の解明は新しい概念に基づいた創薬のターゲットとなりうる。そこで本研究では、この分子機構モデルを構造学的に明らかにするため、X線結晶構造解析の手法を用いてCIA/ASF1-DBD(CCG1)複合体の立体構造を決定した。更に、生体内でのCIA/ASF1-DBD(CCG1)複合体の働きを解明するため、決定した結晶構造に基づき生化学および生物学的解析を行い、アセチル化からヌクレオソーム破壊に至るまでの分子機構モデルを提出した。

CIA/ASF1(155)-DBD(CCG1)複合体の X 線結晶構造解析

CIA/ASF1(155)-DBD(CCG1)複合体溶液はモル比 1:1 で混合することにより調製し、15-20 mg/ml まで濃縮して結晶化に用いた。結晶化を行った結果、 $0.4 \times 0.25 \times 0.2 \text{ mm}^3$ の複合体結晶を得ることに成功した。シンクロトン放射光施設にて回折データ収集を行った結果、最大分解能 3.0 \AA の回折データを収集することに成功した。分子置換法により結晶構造の決定を行い、 3.3 \AA 分解能で結晶学的精密化を行った。精密化においては、分解能が 3.0 \AA より低いことから個々の原子の温度因子は精密化を行わず、TLS パラメーターのみ精密化を行った。 $R_{\text{work}} = 0.237$ 、 $R_{\text{free}} = 0.293$ となったところで精密化を終了した。

CIA/ASF1(155)-DBD(CCG1)複合体の全体構造

結晶構造解析の結果、1 分子の DBD(CCG1)に対して 2 分子の CIA/ASF1(155)が結合することが明らかになった(図 1-1 A)。CIA/ASF1(155)と DBD(CCG1)の接触面積は 818 \AA^2 (結合サイト 1)、 719 \AA^2 (結合サイト 2)であり、両者の相互作用は比較的弱いことが示唆された。CIA/ASF1(155)-DBD(CCG1)複合体の特徴的な点は、ヒストン H3-H4 やアセチル化ヒストン結合サイトと結合部位が重複していることである。結合サイト 1 では、DBD(CCG1)の Phe1536 が CIA/ASF1 分子の側面に位置する疎水ポケットを塞ぐ形で相互作用している(図 1-1 B)。この疎水ポケットは CIA/ASF1 とヒストン H4 Phe100 の相互作用に利用される領域でもある(図 1-1 B)。また、DBD(CCG1)の結合サイト 1 にはアセチル化ヒストン H4 との相互作用に関わる疎水ポケットが存在し、CIA/ASF1(155)は DBD(CCG1)の 2 つの疎水ポケットに近接した領域で相互作用している(図 1-1 A)。CIA/ASF1 は進化上高度に保存されたタンパク質でその相互作用因子も多いことから、共通表面を多数の相互作用に利用していることが示唆される。

CIA/ASF1(155)-DBD(CCG1)複合体の定量的相互作用解析

CIA/ASF1(155)とDBD(CCG1)の相互作用を溶液中で評価するため、点変異体を用いた GST プ

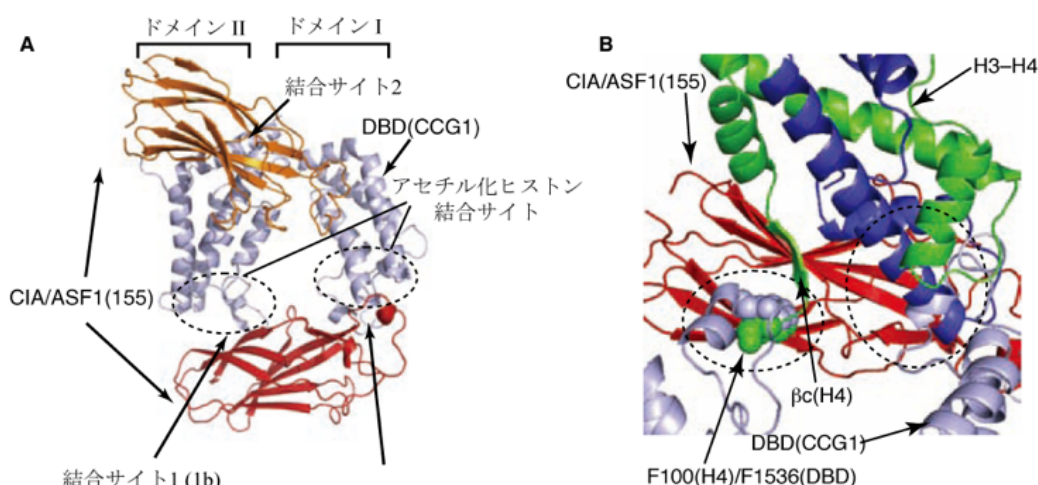


図 1-1 A) CIA/ASF1(155)-DBD(CCG1)の全体構造。DBD(CCG1)のアセチル化ヒストン結合サイトとCIA/ASF1(155)の結合サイトが近接している。B) CIA/ASF1-ヒストン H3- H4 複合体とCIA/ASF1(155)-DBD(CCG1)複合体のCIA/ASF分子での重ね合わせ。点線で示している領域で立体障害となるため、CIA/ASF1(155)、DBD(CCG1)、ヒストン H3- H4 による3者複合体は形成できないことが推察される。

ルダウンアッセイ、分析超遠心、等温滴定カロリーメトリー(ITC)による解析を行った。DBD(CCG1)変異体を用いた GST プルダウンアッセイの結果、結合サイト1および2における両者の相互作用が減少したことから、溶液中でも2つの異なる分子表面を用いて複合体を形成していると考えられた。次に、ITCを行った結果、2つの独立した結合サイトを持つモデルによるフィッティングで最良の結果が得られ、2つの結合サイトはそれぞれ $8.6 \mu\text{M}$ と $173 \mu\text{M}$ の解離定数を有することが示唆された。さらに、CIA/ASF1(155)の高親和性結合サイトを決定するため、DBD(CCG1)点変異体を用いて沈降速度法による解析を行った。その結果、Phe1536Ala(結合サイト1)点変異体では複合体が形成されないことから、CIA/ASF1(155)-DBD(CCG1)複合体の高親和性結合サイトは結合サイト1であること結論された。以上の結果から、結合サイト1の K_d は $8.6 \mu\text{M}$ 、結合サイト2の K_d は $173 \mu\text{M}$ であると考えられた。

CIA/ASF1(155)、DBD(CCG1)、ヒストン(H3-H4)₂による競合的相互作用

DBD(CCG1)との相互作用を介してプロモーター上にリクルートされた CIA/ASF1 は次にヒストン(H3-H4)₂ と相互作用し、ヌクレオソーム構造を破壊すると考えられる。CIA/ASF1(155)-DBD(CCG1)複合体と CIA/ASF1-ヒストン H3-H4 複合体の CIA/ASF1 分子で構造重ね合わせを行うと、立体障害のため DBD(CCG1)とヒストン H3-H4 が CIA/ASF1 に対して競合的に相互作用することが予想される (図 1-1 B)。そこで、3 者の相互作用の関連性を明らかにするため、

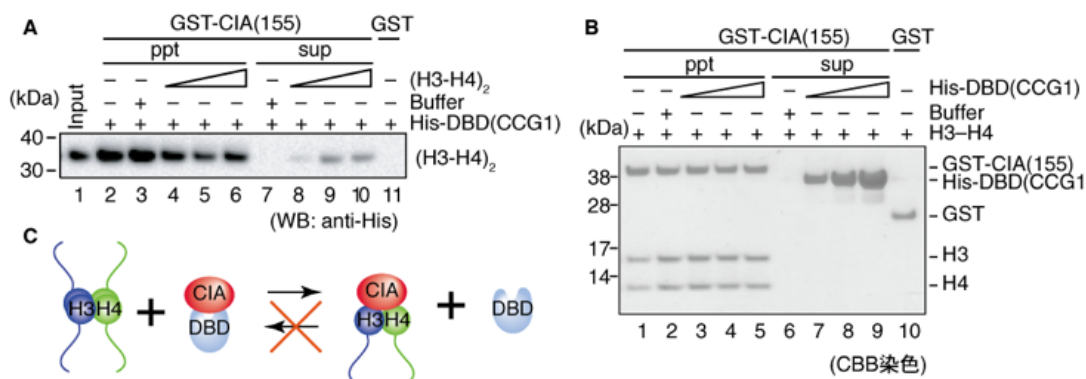


図 2 CIA/ASF1(155)と DBD(CCG1)の相互作用に与えるヒストン(H3-H4)₂の影響。A) CIA/ASF1(155)-DBD(CCG1)にヒストン H3-H4 を添加する競合実験。B) CIA/ASF1(155)-ヒストン H3-H4 に DBD(CCG1)を添加する競合実験。C) 競合実験の概略図。この過程は不可逆的に進行することがわかった。

CIA/ASF1(155)、DBD(CCG1)、ヒストン(H3-H4)₂を用いた競合的相互作用実験を行った。競合実験の結果、CIA/ASF1(155)-DBD(CCG1)複合体にヒストン(H3-H4)₂添加することで DBD(CCG1)が CIA/ASF1(155)から解離し、CIA/ASF1(155)はヒストン H3-H4 と複合体を形成することが示された (図 2A)。しかしその一方で、その逆過程は進行しないことが示された (図 2B)。以上のように、DBD(CCG1)とヒストン H3-H4 は CIA/ASF1(155)に対して競合的に相互作用し、CIA/ASF1(155)の DBD(CCG1)からヒストン H3-H4 への変化は不可逆的に進行することが明らかになった (図 2C)。これらの結果は、DBD(CCG1)との相互作用を介してプロモーター上にリクルートされた CIA/ASF1 が DBD(CCG1)からヒストン H3-H4 へと受け渡され、ヌクレオソームを破壊するという分子機構モデルを支持している。

DBD(CCG1)による CIA/ASF1 のプロモーター上へのリクルート

以上の結晶構造と生化学的実験の結果を踏まえて、CIA/ASF1 と DBD(CCG1)の相互作用の生体内における役割を明らかにするために、出芽酵母野生株と DBD(CCG1)ホモログの点変異株を用いて、クロマチン免疫沈降法 (ChIP) による機能解析実験を行った。その結果、野生株では CIA/ASF1 と DBD(CCG1)は、転写が活性化されている遺伝子のプロモーター上にリクルートされていた。また、両者の相互作用が減少するような点変異を導入した株では、DBD(CCG1)はプロモーター上に局在しつつも、CIA/ASF1 のプロモーター上へのリクルートが減少し、同時にヒストンの除去と転写活性化も抑制されることが明らかになった。

まとめ

本研究では、ヌクレオソーム構造変換因子-アセチル化ヒストン認識ドメイン複合体で最初の例となる CIA/ASF1(155)-DBD(CCG1)複合体の結晶構造を明らかにした。さらに、クロマチン免疫沈降を用いた局在解析の結果、CIA/ASF1 が DBD(CCG1)との相互作用を介して特定のプロモーター上に局在することを明らかにした。以上の結果から、細胞内でも「CIA/ASF1 が DBD(CCG1)との相互作用を介してプロモーター上にリクルートされた後、CIA/ASF1 が DBD(CCG1)からヒストン H3-H4 へと受け渡される」という分子機構モデルが示唆された。現在、これらの結果を国際誌に投稿中である。

(3-3-1-2)ヒストン蛋白質の大量調製技術の確立

真核生物の核内で起こるヌクレオソーム構造の変換反応は、転写・複製・修復に必須であると同時に、これらの反応の制御メカニズムとしても働いている。このため、ヌクレオソーム構造変換の分子機構は、創薬のターゲットとして魅力的なものであるが、その詳細な分子メカニズムが不明なため、合理的な薬剤分子設計が困難である。ヌクレオソーム構造変換の分子機構の理解が進まない一つの理由としては、ヒストンを始めとするクロマチン因子群には大量調製が困難なものが多く物理化学的な手法による解析が立ち後れている点あげられる。遺伝子組換え型ヒストンの調製法には、以前から知られているものがあるが、数100mgレベルの大量調製には向かず、簡便なヒストン大量調製法の確立が待ち望まれていた。そこで我々は遺伝子組換え型ヒストン複合体の新規大量精製法を開発した。

本方法の特色は、尿素を必要とするカラムクロマトグラフィーを用いず、各タンパク質の溶解度の違いを利用して不溶性画分から各ヒストンサブユニットを精製する点にある。この方法では、タンパク質の可溶化能が異なる数種類の溶液を用いて不溶性画分中のタンパク質を段階的に可溶化させ、遠心によって各ヒストンサブユニットと他の混在タンパク質との分離を行なう。尿素を用いずに精製を行なう

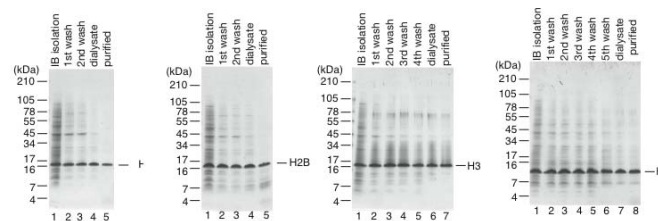


図 3. 今回開発した方法により精製した各ヒストン

ため試料のカルバモイル化を防ぐ処理も必要ない。単純化した精製操作の確立によりスケールアップが容易になり、グラム単位で各ヒストンサブユニットを精製できるようになった(図3)。本方法には、試料中に混在する核酸成分を取り除くことが難しいという弱点があったが、その弱点も、ヒストン複合体の再構成後に行なう精製方法の確立によって克服できた。グラム単位で比較的容易に各ヒストンサブユニットを精製し、核酸成分を除去する精製方法も確立したため、高純度なヒストン複合体試料を一度に数百ミリグラム単位で精製することが可能になった。本方法は、ヒスト

ンシャペロン等のヌクレオソーム構造変換因子の構造機能相関解析を推し進めるための、有力なツールとなるだろう(投稿準備中)。

(3-3-1-3)部位特異的変異を利用した、X線結晶構造解析用結晶の改良に関する研究蛋白質のX線結晶構造解析は、創薬における基盤技術とであるものの、得られた蛋白質結晶の質が構造解析を行うために十分でないことはしばしば起こる。良質の結晶を得る事は、創薬の現場に限らず、X線結晶構造解析における長年の課題である。近年、得られた結晶の質を改善するために、結晶凍結法の工夫をはじめとして様々な手法が考えられてきたが、決まった手順はなく試行錯誤により結晶の質を改善していくしかない。本研究では、ヒストンシャペロン TAF-1 β を例にとり、結晶の質の改善方法の検討を行なった。TAF-1 β の場合、野生型(WT)結晶からは 5.5Å 分解能のデータしか得られなかったため、そのままでは構造解析を進めるのが困難であった。そこで、「変異体結晶の利用」、「クライオ条件の最適化」を組み合わせる事で結晶の質を改善する事を試みた。

TAF-1 β の野生型(WT)結晶についてクライオ条件の検討を行った結果、クライオプロテクトANTとしてトレハロースを

用いアニーリングを行った場合に、分解能が改善されることが分かった。しかし、結晶の異方性が高く、 a^* 軸方向には 3.5Å の回折が生じたものの、 c^* 軸方向には 6.0Å 分解能の回折しか生じなかった。そのため WT 結晶による構造決定を断念し、変異体結晶を利用して構造解析を進めることにした。具体的には、全部で 14 個あるロイシン(Leu)のうちの幾つかをメチオニン(Met)に変異さ

せて結晶の質を改善する事を試みた。多くの変異体結晶を一度に作成し、その質を評価しながら構造解析を進めるのは効率が悪いと考えたため、結晶の質を確認しつつ2段階で多重変異体を作成するという方法で結晶の質を改善した。まず、14 個あるロイシンから3つを選択し3種類の点変異体を作成した。この3種類の変異体を結晶化し、結晶の質の比較を行った。この中から最も結晶の質が良かった変異体を選び(図4参照)、その変異体に更に変異を導入して3つの三重点変異体を作成した。これら変異体の結晶の質を比較した結果、作成した3重点変異体の1つにお

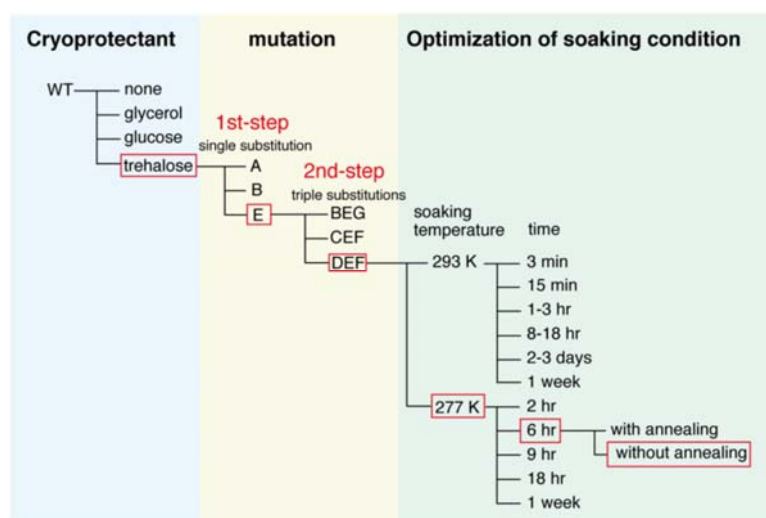


図4 TAF-1 β 結晶の質の改善

結晶凍結溶液の選択、2段階の変異導入、結晶凍結法の最適化の3つの段階をへて、最初は 5.5Å 分解能程度の回折像しか与えなかった TAF-1 β の結晶を 2.3 分解能まで改善して、多波長異常分散法による結晶構造解析を成功させた。

いて、結晶の凍結法を最適化した場合に顕著に分解能が改善することを見いだした(図4)。この結晶は、2.3Å以上の回折を示し、多波長異常分散法によりTAF-1βの結晶構造を決定する事ができた。

以上結果より、多重変異体の利用と結晶の凍結法の最適化を組み合わせる事で、全く構造解析に適さないような結晶でも、結晶の質を向上させる事が可能であることを示す事ができた。この結果は、*Acta Crystallographica* に発表済みである (Senda, M. *et al. Acta Crystallogr.* **64**, 960-965.)。

(3-3-1-4)古細菌由来 TATA ボックス結合因子(TBP)の X 線結晶構造解析

古細菌の転写反応系は、真核生物型の転写装置と真正細菌型の転写調節因子から構成されている。異なる起源に由来する古細菌の転写装置と転写調節因子は、機能的に相互作用するために、真核生物とも真正細菌とも異なった分子表面を進化的に獲得していることが予想される。従って、古細菌の転写装置と転写調節因子の分子間相互作用を研究することで、転写反応の進化的変遷を解明できると考えられる。とりわけ、真核生物と古細菌において転写開始反応に必須な TATA ボックス結合因子 (TBP) は転写反応における中心因子であり、1 次構造上の特徴から真核生物型・古細菌 I 型・古細菌 II 型の 3 種類のグループに分けられるため、3 グループの TBP の比較研究は、転写装置と転写調節因子の分子間相互作用を研究する上で極めて重要である。しかし、これまでに古細菌 II 型 TBP の立体構造は解析されていなかった。

今回我々は、*Methanococcus jannaschii*由来 TBP の立体構造の解析に成功した。アミノ酸配列の保存性を立体構造にあわせて調べたところ、3 つのグループを通じて高度に保存された分子表面のアミノ酸は DNA との相互作用に重要なアミノ酸であった。次に、グループ特異的に保存された表面は TFIIB との相互作用に重要なアミノ酸であった。その一方で、各グループに特異的な分子表面は、真核生物型 TBP(塩基性)・古細菌 I 型 TBP(塩基性と酸性が混在)・古細菌 II 型 TBP(酸性)とで大きく異なっていた(図5)。この結果は、TBP が DNA 結合蛋白質であることを考えると大変興味深く、古細菌 II 型 TBP は DNA に結合するのか?という疑問を抱かせた。等温滴定カロリーメトリー(ITC)による測定の結果、古細菌 II 型 TBP (MjTBP)は、酸性に富む分子表面を持つことと一致して、TATA box DNA と弱く相互作用することがわかった($K_d = 0.94 \mu M$)。以上のように、グループを通じて保存されたアミノ酸は TBP の有する共通の機能を担っており、それとは逆に、グループごとに異なる分子表面は TBP の有する転写制御能の多様性を担っていることが示唆された。また、進化系統樹から、TBP と TFIIB と RNA ポリメラーゼ II のサブユニットの一部(Rpb2, 3, 11)が共進化している可能性が示唆された。この結果は、*Genes to Cells* 誌に発表された(Adachi, N. *et al. Genes Cells*, **13**, 1127-1140)。

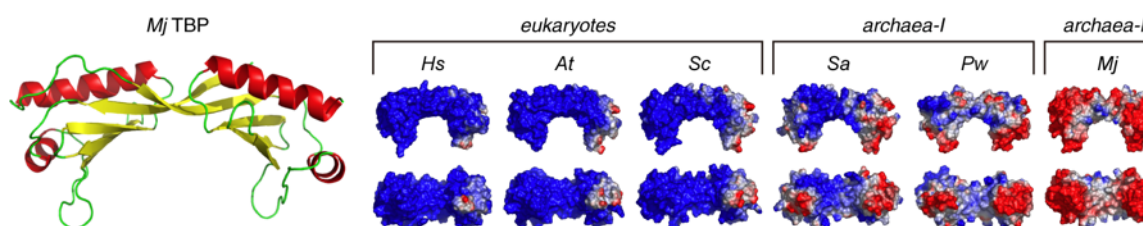


図5 MjTBPの結晶構造と各TBPの表面電荷の比較

(3-3-2) 電子伝達複合体に関する研究

タンパク質分子間のシグナリングは、細胞膜上の受容体から核内へのシグナル伝達に必須の過程で、この分子メカニズムを理解する事は創薬の基盤技術として欠く事ができない。特に、近年は強固な複合体形成によるシグナルを伝達だけでなく、弱い相互作用によるシグナル伝達に注目が集まっている。また相互作用は弱いものの、相互作用する分子間には親和性の調節が見られるものも多い。このような弱い相互作用に基づく蛋白質分子間のシグナリングには多くのものが知られているが、古くから研究されてきたものに電子伝達反応がある。生化学的な解析が容易である事から、弱い相互作用に基づいた蛋白質間シグナリングを研究するには最適な系である。そこで我々は、微生物に存在する電子伝達蛋白質を例にとり、弱い相互作用に基づいた蛋白質間シグナリングの解析を行なった。

蛋白質間の電子伝達反応は、光合成系、呼吸鎖、各種分解代謝系など生体内の多くの反応系に存在しており、生物の生存に必須な反応である。複数の電子伝達タンパク質から形成される電子伝達タンパク質間の結合は弱く一過性であること、この結合の親和性は電子伝達複合体を構成するタンパク質の酸化還元状態に依存して調節されることなどが知られており、これらの特徴は電子伝達が効率良く行われるために重要であると考えられてきた。しかし、電子伝達反応で生じる一連の反応中間体構造を原子のレベルで明らかにし、その構造変化から親和性の調節機構を示した例はない。その理由は反応中間体構造の決定に必須な嫌気条件下での結晶化等に技術的な困難があるためである。そこで我々は、嫌気条件下での結晶化等の技術的課題を解決することで、電子伝達タンパク質間の酸化還元状態に依存的した親和性調節機構を立体構造に基づき解明することを目的とし研究を進めてきた。具体的には、*Acidovorax* sp. strain KKS102 由来の芳香環水酸化ジオキシゲナーゼ(BphA)の電子伝達系を用いて X 線結晶構造解析と生化学実験を組み合わせた研究を行った。BphA の電子伝達系は、NADH 依存的フェレドキシン還元酵素(BphA4)とフェレドキシン(BphA3)から構成される。BphA4 は補酵素として FAD を含むフラビンタンパク質で、3つのドメイン(FAD 結合ドメイン、NADH 結合ドメイン、C 末端ドメイン)から成る。BphA4 は FAD が NADH から 2 個の電子を受け取ると二電子還元型になり、電子を 1 個ずつ、計 2 分子の BphA3 に伝達することができる。

本研究では、まず BphA4 の速度論解析データに基づいて、二電子還元型／一電子還元型の BphA4 が酸化型の BphA3 と強く相互作用する反応モデルを仮定した。その親和性の違いを証明するために嫌気条件下でのプルダウンアッセイによる相互作用解析を行い、BphA4 の BphA3 に対する親和性が、BphA4 の還元により上昇することを示した(図6)。

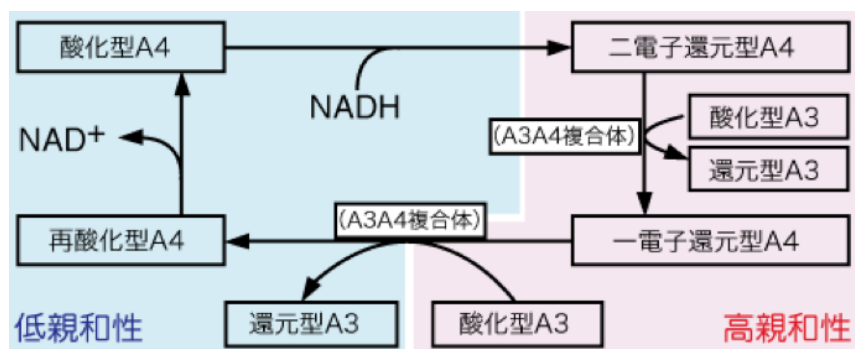


図 6. BphA4 と BphA3 の反応サイクルモデル

次に、BphA3 と BphA4 の間に存在する親和性調節機構を立体構造に基づき明らかにするために、BphA3-BphA4 複合体の立体構造(図7)に加え、BphA4 については 4 種類(酸化型、二電子還元型、一電子還元型、再酸化型)、BphA3 については 2 種類(酸化型、還元型)の反応中間体の結晶構造を、嫌気条件下での結晶化技術を用いることで決定した。これらは BphA3-BphA4 の電子伝達反応サイクルに存在するほぼ全ての反応中間体に相当する。

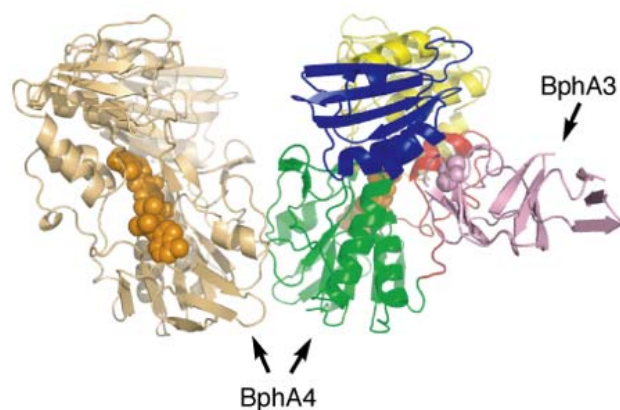


図 7. BphA3-BphA4 複合体の立体構造

BphA3-BphA4 複合体の X 線結晶構造解析の結果から、BphA4 の BphA3 結合部位は、FAD 結合ドメインと C 末端ドメインから構成されることが明らかになった。また、BphA3-BphA4 複合体、BphA4 の二電子還元型、一電子還元型の構造から BphA4 が還元されることにより NADH 結合ドメイン/C 末端ドメインが FAD 結合ドメインに対して回転すること、その回転に伴って生じる FAD 結合ドメインと C 末端ドメインの相対位置が変化することで BphA3 結合部位の構造が変わり BphA3 との親和性が高くなることが示された(図8)。

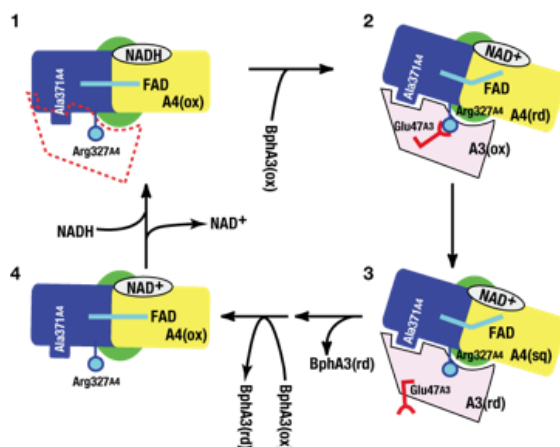


図 8. BphA4 の BphA3 に対する親和性調節の模式図

今回の解析により、電子伝達タンパク質の構造が各タンパク質の状態の変化とともに変化し、それにより分子間相互作用が調節される様子を原子レベルの立体構造に基づき世界に先がけて明らかにすることができた。この結果は、*J. Mol. Biol.*誌に発表された(Senda, M. *et al.* JMB, **373**, 382-400)。

また本研究に関連して、フラビン蛋白質の酸化還元状態の変化に伴うフラビン周辺の微細な立体構造変化が、どのように蛋白質構造に影響を与え、蛋白質間シグナリングに影響するかを調べ上げ、*Antioxidants & Redox Signaling* 誌へ発表した(Senda T. *et al.* ARS, **11**, 1741-1766)。

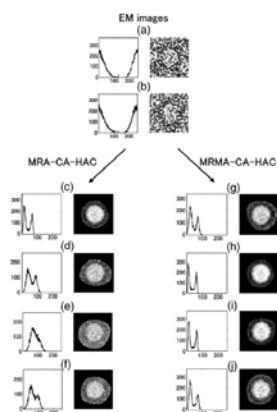
(4) 2次元結晶化できた試料の構造解析を可能にする電子結晶学用プログラム開発、単粒子解析プログラム開発

〔産業技術総合研究所脳神経情報研究部門〕

【研究成果】

単粒子解析法は、個々の蛋白質を電子顕微鏡で撮影して、それらの画像を重ね合わせてS/N比を向上させ、そこで得られた2次元平均画像群から3次元密度を計算してゆく方法である。そのため2次元平均画像の質(位置の精度と枚数)が、3次元再構成後の解像度に大きく影響する。その2次元平均画像生成過程においては、用いる個々の電子顕微鏡画像データのSN比が非常に小さく、位置あわせのための計算負荷が大きい。そのため、現在広く使われている方法やソフトウェアでは最適な位置あわせを行うのは困難な状況である。その結果、生成される2次元平均画像の分解能は低中程度に留まり、それらを用いた3次元解像度向上には限界があった。

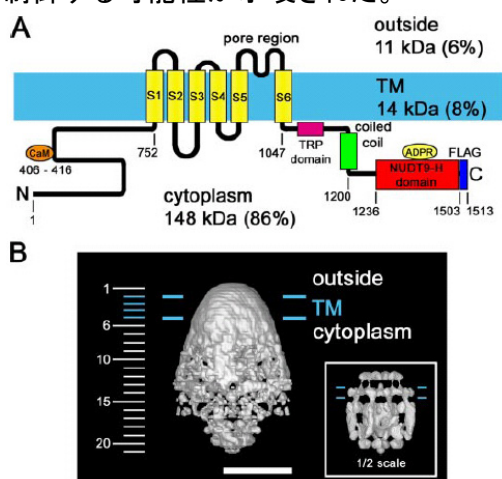
我々はこれらの限界を突破するために、多参照位置あわせ法と画像分類法を統計的に組み合わせた方法(multi-reference multiple alignment法: MRMA法)を開発した。この方法は、多参照位置あわせから得られる相同ピークを統計処理し最尤ピーク群を抽出した後、その各群に属する位置あわせ画像を用いて平均画像生成を行う。このことにより、ノイズの影響などで偶発的に誤った位置あわせが起こる確率を減少させる事ができる。また、高効率な分散並列処理による高速化と組み合わせる事により、高い耐ノイズ性を持った画像解析が、従来と同程度の計算資源で可能になる。MRMA法の有効性の検証には、さまざまなSN比を持ったモデル画像群、さらにはTRPC3とナトリウムチャンネルの電子顕微鏡画像を用い、その精度および処理速度を評価した。その結果、MRMA法は全ての評価データにおいて、耐ノイズ性・処理速度・生成される2次元平均画像精度の全ての点で既存の方法に比べ明らかな優位性を示した。よって多参照位置あわせ法と画像分類法を統計的に組み合わせたMRMA法は、単粒子解析における解像度向上に大きく寄与する。本新開発法とこれまでに小椋らと共に開発してきたSimulated annealing法やNeural Network法を用いて、以下のような生理的に重要な膜タンパク質の構造が判明した。



J. Electron Microscopy. **56**, 83–92 (2007)

TRP(transient receptor potential) チャンネルはごく近年発見されたイオンチャンネルである。しかしながら我々の体で極めて重要な役割を担うセンサーであることが判明してきた。細胞膜に存

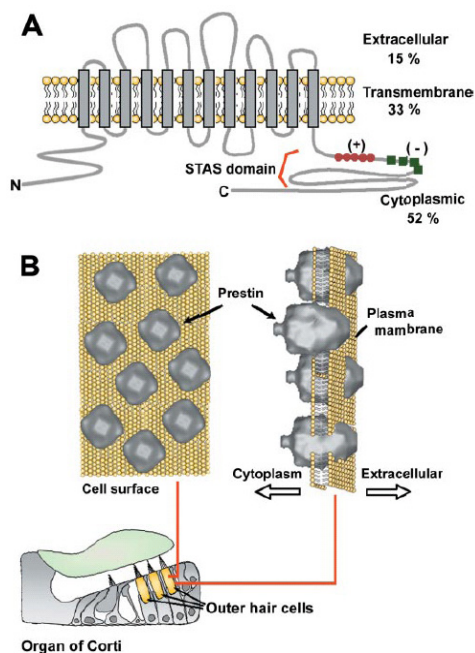
在し、情報伝達物質と結合することにより開く陽イオンチャンネルであり、細胞内部へと情報を伝達する。この TRP ファミリーに属するタンパク質は我々の体内でも30種類に及び、温度感受や酸化ストレス、浸透圧、味覚等々、様々な刺激に対するセンサー的な役割を担っている。これら TRP チャンネルの中で、TRPM2 は活性酸素種を感受するチャンネルである。TRPM2 は ADPRase 酵素活性ドメイン(NUDT9-H ドメイン)を分子内に有し、このドメインへのリガンド結合によってチャンネルの開閉が制御される、極めてユニークなタンパク質である。生体物質の酸化は、癌化や糖尿病等における最も重要な病因と考えられており、酸化の感知機構の解明は病理学的に極めて重要である。TRPM2 は同時に温度感受性も有する。しかし、これらの重要な役割にも関わらず、本チャンネルは構造がわからなかった。その一番大きな理由は精製の難しさである。温度をその柔らかな構造の振動により感知するため、壊れやすいと推測される。我々はこの TRPM2 タンパク質の精製法の開発に成功した。その鍵は、抗体カラムによる Affinity 精製にあった。精製されたタンパク質を用いて負染色電子顕微鏡画像を用いた単粒子解析法よりその三次元構造を解析した。TRPM2 分子全体はベル形構造をしており、大きく膨れた細胞内ドメインが特徴的であった。この膨らんだ構造は、TRPC3 チャンネルでも保存されているので、多種類の刺激のセンサーとして働く TRP チャンネル全体に共通なのかもしれない。また TRPM2 チャンネルの制御部位である NUDT9-H ドメインは、膜貫通領域のイオンゲートとは離れていた。そのため大掛りな立体構造の変化が開閉を制御する可能性が示唆された。



J. Biol. Chem. **282**(51), 36961–36970 (2007)

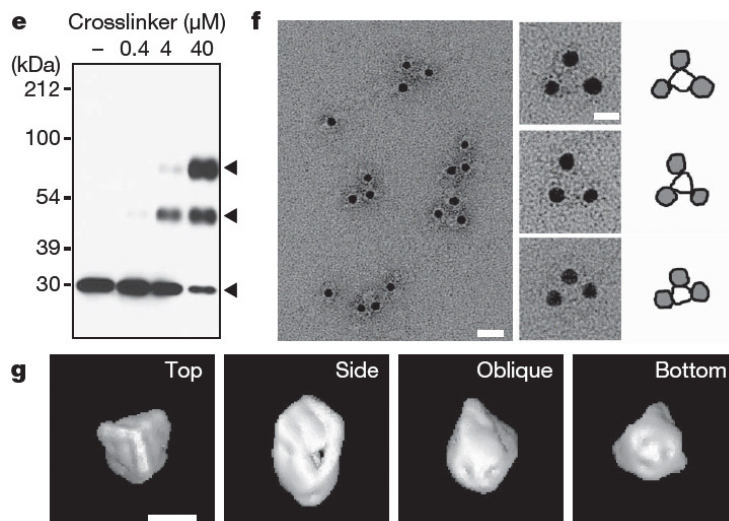
また我々哺乳類の耳は極めて優秀な音の増幅機構を有し、かすかな音をタンパク質分子の機構によって強力に増幅する。それは、内耳蝸牛に存在する外有毛細胞 (outer hair cells: OHC) が細胞膜電位の変化に応じてその細胞長を変化させ、基底膜の振動増幅を通じて音シグナルをおよそ 100 倍に増強させる機構である。その振動速度はマイクロセカンドレベル(≈ 20 kHz)であり、これまで知られているモータータンパクの中でも最も早い動きである。その分子実体は長い間不明であったが、2000 年に Zheng らが電圧変化に不感応な内有毛細胞 (IHC)との遺伝子差し引き法によりプレスチンが同定された(Zheng, J. et al., 2000, Nature)。これは陰イオントランスポーター SLC26 ファミリーに属する、12 回膜貫通型の膜タンパク質であった。これらのタンパク質が外有毛細胞の側壁にあたる細胞膜にびっしりと並び、分子直径を周期的に変化させることで高周波振動を実現しているのである。実際、本遺伝子の変異による難聴患者や、ノックアウトマウスにおけ

る聴覚障害が確認されている。本研究ではFLAGタグをつけたプレスチンを Sf9 細胞に発現させ、そこから精製したタンパク質を用いて負染色電子顕微鏡観察と単粒子構造解析を行った。約 2nm の分解能で示された立体構造から、プレスチンは $77 \times 77 \times 115 \text{ \AA}$ の大きさを持つ弾丸型の構造であることが分かった。また電圧変化に応じて Cl⁻ イオンが行き来すると思われる空隙を分子内部に確認することができた。本研究を聴覚の分子レベルでの理解に役立てたい。またアスピリンを我々の体内に頻繁に服用すると、難聴になる。ターゲットはプレスチンであることが知られており、その機構もこれらの研究から解明していきたい。



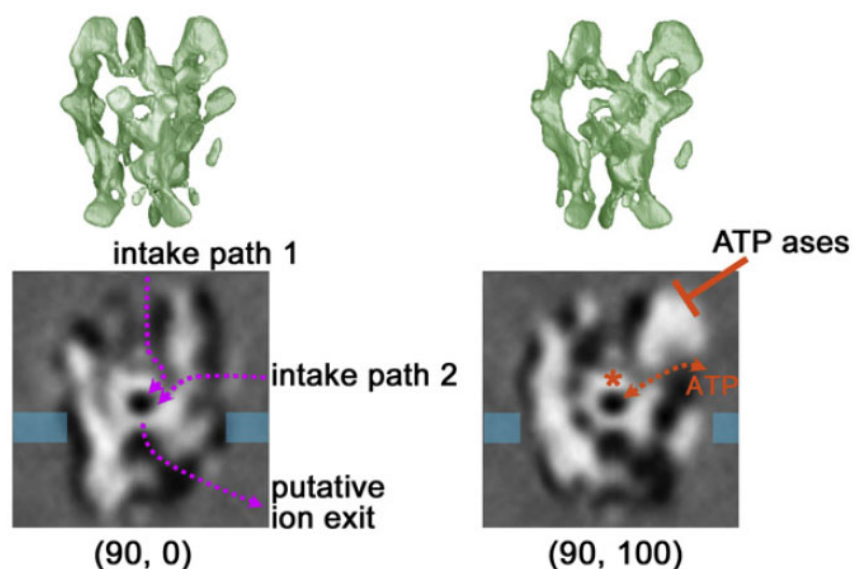
J. Biol. Chem. **283**(2), 1137-1145 (2007)

細胞内膜からイオンチャンネルを通して Ca^{2+} が放出されると小胞内はマイナスに電化を帯びるはずである。これが続くと Ca^{2+} 放出は抑制されるはずで、それを助けるために反対向きにイオンを流して中和するチャンネルが必要である。この役割を果たすチャンネルは長年謎であった。それは K^+ を通す TRICK channel であり、京大の竹島教授と共同でこのサイズわずか 90 kDa の小さいチャンネルの構造解明に成功した。本システム開発によって、この様なサイズの膜蛋白質の単粒子解析も可能になった。

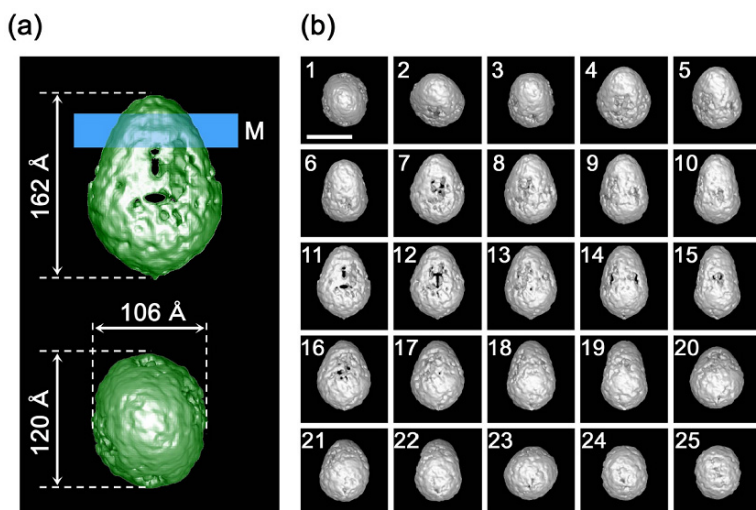


Nature **448**, 78-82 (2007)

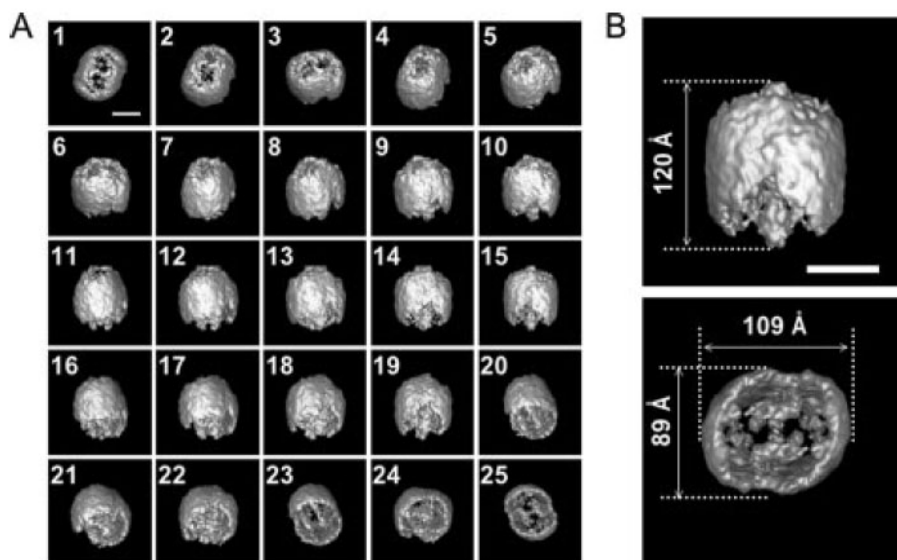
ATP の役割は、唯のエネルギー源ではない。細胞外に放出されたATPは、皮膚から中枢神経系まで広く存在するP2XおよびP2Y型ATP受容体を介して、痛覚等に関する細胞間情報伝達物質としても働く。我々は以前、負染色電顕画像を用いてP2X₂受容体の2次元平均化による可視化に成功し、全体として花瓶の様な形であること、また上部平均画像の三回対称性から3量体構造であることを直接的に証明した(2005 BBRC)。本研究では約9万枚のクライオ電子顕微鏡粒子画像と単粒子解析法を用いて、ATP非存在下でのP2X₂の3次元構造を再構築した。その結果、P2X₂受容体は細胞膜を挟んだ上下に隙間の多い緩やかなサブユニット構造を持ち、イオンやATP分子の取り込み、排出等に役立つことが想定された。さらに本構造はATP刺激の強度に応じてイオン透過性が変化する、P2X₂受容体の特異なチャネル特性を反映しているもの思われた。また細胞膜を貫通するポアと推定される部分には部分的狭窄が認められ、電気生理学的研究から推定される構造と一致した。軽い接触が激しい痛覚として感じられる異痛症(アロデニア)や、通常の暖かさを暑さと感じてしまう遺伝病等の解明へも役立つことが期待される。



嚢胞性線維症(CF: cystic fibrosis)は体中のあらゆる組織で粘膜分泌障害が引き起こされる重篤な遺伝病であり、特に白人幼児1000-3000人強に一人の割合で発症し、白人幼児死亡原因の第一位を占める。これはABCトランスポーターに属するクロライドチャネル、CFTR(cystic fibrosis transmembrane regulator)の遺伝子変化に基づく機能失調で発症する。我々は正常ヒトCFTRタンパク質をHEK293細胞に発現させ、界面活性剤で可溶化した後、抗体カラム・WGAカラム・ゲルろ過カラムを用いて精製した。負染色電子顕微鏡画像を用いて単粒子構造解析を行い、その3次元構造を明らかにした。その結果CFTRは120 × 106 × 162 Åの楕円形の構造を持ち、細胞膜直下に分子内外をつなぐ開口部を持つことが示された。本研究で明らかにされたCFTRの3次元詳細構造は、CFの疾病原因解明のみならず、正常な組織におけるCFTRの機能解明にも役立つことが期待される。



癌細胞が転移するときには、細胞間の結合組織であるファイブロネクチンなどの細胞外基質たんぱく質を切断しながら進んでゆく。RECK (Reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs)は細胞膜結合型のプロテアーゼインヒビターで、特にMMP(matrix protease)ファミリーの阻害を通じて哺乳類の形態形成や癌化等を制御する。実際、RECK欠損マウスでは胎生致死を引き起こし、また多くの癌でRECKタンパク質の量が低下していること、その発現量が癌の悪性度と相関が高いこと等が知られている。本研究ではMMP2とMMP7で切断を受けることによりRECKの活性化が起こり、細胞機能制御に重要な働きを持つファイブロネクチンのMMP7による分解を抑制することを示した。さらに遺伝子導入細胞を用いてRECKタンパク質の発現・精製を行い、負染色電顕画像からの3次元再構成により大きな空隙と突起状構造を持つカウベル型構造が示された。その開いた領域でプロテアーゼと結合し、機能制御することで癌の転移等を抑える機構が推定された。



(5) ATP感受性カリウムチャンネル制御機構解明に向けた基盤技術開発

[京都大学大学院農学研究科]

【研究成果】

概要

ATP感受性カリウムチャンネル(K_{ATP} チャンネル)はスルフォニル尿素剤受容体(SUR)とチャンネルサブユニット(Kir6.2)が4分子ずつ会合した細胞膜上のカリウムチャンネルであり、様々な組織で代謝レベルのセンサーとして機能している。このため K_{ATP} チャンネルは糖尿病や虚血性心疾患等に関与することから重要な創薬ターゲットとなっている。本研究は電子線単粒子解析による K_{ATP} チャンネルの立体構造決定を最終目的とするものであり、平成19,20年度は K_{ATP} チャンネル複合体の発現の手法構築と精製の技術開発を行なった。また、得られた標品による単粒子解析を開始した。本研究で開発したヒトの培養細胞による大量発現技術は複合体形成など、高次の品質管理機構を必要とする哺乳類の膜タンパク質の発現に有効である。また精製手法の開発では膜タンパク質複合体の物性評価手法を開発することで迅速な精製条件の決定に成功した。本評価手法は膜タンパク質複合体の精製に用いる界面活性剤の選定に特に有効であり、短時間での実施が可能であることから、今後スクリーニング手法としての応用が期待できる。

研究開発項目

・ヒト培養細胞を用いた K_{ATP} チャンネル複合体の発現系における技術開発

K_{ATP} チャンネル複合体は高度な翻訳後修飾及び品質管理機構を必要とするため動物細胞を用いた発現系の構築が必須である。しかし、現在までのところ有効な発現システムは構築されていない。本研究ではまず浮遊培養が可能なヒト培養細胞であるHEK293FS細胞を用いて大量発現系の開発を行った。またバイオリアクターによる発現系の大規模化を行った(図1)。

動物細胞を用いてタンパク質の一過性発現を行う場合、遺伝子導入に必要な試薬が高価であることが、汎用性を限られたものになっている。本研究で行った遺伝子導入化合物探索の結果、polyethyleneimine(PEI)によって市販薬と同等の遺伝子導入効率を得られることが明らかとなった。また、発現させた K_{ATP} チャンネルの細胞内局在、糖鎖修飾、複合体形成状況の解析から、PEIによって遺伝子導入した細胞においても高度な品質管理機構が維持されていることが確認できた。また遺伝子導入にかかる費用は市販薬に対して千分の一程度ときわめて廉価であり、高い汎用性が期待できる。本発現系によって既にABCA1等重要な生理機能を持つ膜タンパク質の精製に成功しており、順次解析を進めていく予定である。

・ K_{ATP} チャンネル複合体精製の条件のスクリーニングの技術開発。

K_{ATP} チャンネル複合体の精製ではサブユニットの解離させずに脂質二重膜から抽出する界面活



図1 バイオリアクターを用いたヒト培養細胞による大量発現系異なる機構のバイオリアクター2種を用い、発現系を構築した。左:WAVEバイオリアクター 右:セルマスター

性剤の選定が必要である。本研究ではまずサイズ排除クロマトグラフィーとGFP融合タンパク質を用いて K_{ATP} チャネル複合体の可溶化状態やサブユニットの会合状態を分析可能な検出系を構築した。これにより、未精製の状態で8量体の形成状態の把握が可能となり、界面活性剤など広範囲のスクリーニングが可能となった。その結果、安定に8量体を抽出する界面活性剤として $C_{12}E_8$ が最も適していることが明らかとなった。本手法は膜タンパク質複合体のサブユニットの会合状態や単分散性等の物性を未精製の段階でかつ短期間に決定可能であることから他の膜タンパク質複合体についても幅広い応用が期待できる。

・単粒子解析ターゲットの選定

K_{ATP} チャネルにはインスリンの分泌に関与する膵・細胞型(SUR1-Kir6.2複合体)と虚血性心疾患に関与する心筋細胞型(SUR2A-Kir6.2複合体)が存在し、共に重要な創薬ターゲットとなっている。本研究では上記スクリーニング手法を用いていずれのチャネルが単粒子解析に適しているかの検討を行なった。その結果、心筋型のチャネルは膵・細胞型に比べて界面活性剤溶液中で著しく不安定であり、単粒子解析による構造決定は困難であることが明らかとなった。以上の結果により、本研究では膵・細胞型のチャネルを用いて単粒子解析実験を行うこととした。

・ K_{ATP} チャネル複合体の精製手法の確立

界面活性剤のスクリーニングでヒットした $C_{12}E_8$ によって複合体を可溶化し、精製を行った。精製標品は8量体構造を保持していたが純度は80%程度と低いものであった。さらにスクリーニング時に得られた知見を精製手法にフィードバックさせ、手法の最適化を行った結果、精製に必要な時間を大幅に短縮によって精製タンパク質の安定化を達成すると共に精製純度を90%程度に上昇させた(図2)。また精製タンパク質のATP結合能を評価する手法を確立し、解析に用いている精製標品が活性な3次元構造を保持していることを確認した(図3)。

・単粒子解析実験の実施

上記手法により得られた精製標品を用いて極低温電子顕微鏡によりタンパク質像の観察を行なった。現在25 Å分解能程度での初期構造モデルを得ている(図4)。現時点では分解能の向上が困難であることから、化学的な架橋や糖鎖修飾の制御などにより、解析対象の質的向上を検討中である。

・ヒト薬物排出トランスポーター(MDR1)の機能解析

本研究に先行する研究として行なっていたヒトMDR1の精製・機能解析研究によりヒトMDR1の活性がコレステロールによって制御されていることを突き止めた。これまでに我々が明らかにしたヒトABCタンパク質の結果との比較からヒトのABCタンパク質はコレステロールを共通して認識す

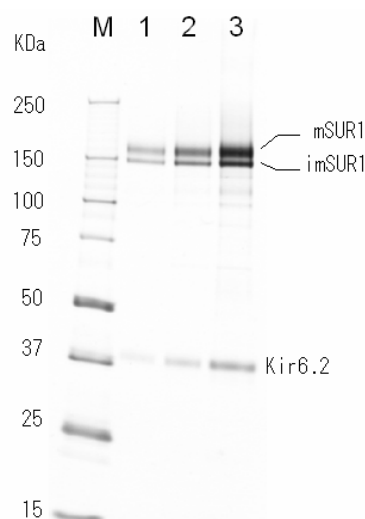


図2 K_{ATP} チャネル複合体の精製 K_{ATP} チャネル複合体を精製後、銀染色により純度検定を行った。レーン1から3にはそれぞれ0.1 μ g, 0.2 μ g, 0.5 μ gの標品を泳動した。mSUR1:糖鎖付加型SUR1, imSUR1:非糖鎖付加型SUR1

ることが示唆された。またリンカー領域の機能を明らかにした。

・HDL 形成に関与するヒト ABCA1 の機能解析

ヒト ABCA1 の細胞学的、生化学的解析により ABCA1 には細胞外ドメインに 2 つの重要な S-S 結合を有しており、これらが機能に必須であることを突き止めた。また ABCA1 は ApoA-1 以外に胆汁酸にもコレステロールを排出できることを明らかにした。これらの知見はヒト HDL の形成機構解明や高脂血症の治療薬開発において重要な知見となる。

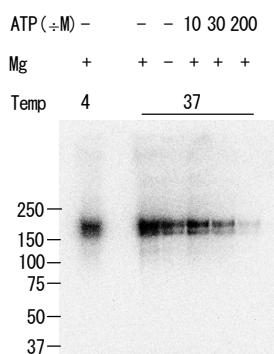


図3 精製チャネル複合体の活性評価 精製標品を10 μ Mの8-azido- γ -³²PATPで標識した。ATP結合はMgイオンに依存せず、非標識性のATPの濃度依存的に減少した。このことから精製チャネル複合体は活性な3次元構造を保持していることが明らかとなった。

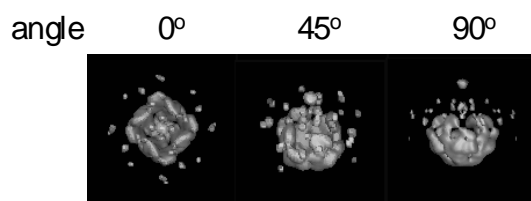


図4. 極低温顕微鏡による単粒子解析実験 現在1万個程度の像から25 Å程度の分解能で構造が得られている

(6) 電子線トモグラフィー技術を補完するためのソフトウェア開発

上記ソフトウェア開発を含めJBIC京都分室藤吉チームと共同研究を密接にして研究推進を行う。

[理化学研究所播磨研究所]

【研究成果】

1. 電子線トモグラフィー関連ソフトウェアの開発と実際の適用

JBIC京都分室藤吉チームが取得した電気シナプス結合部位を含むマーカーなしのクライオ・シングル傾斜トモグラフィーデータおよびマーカーなしの負染色ダブル傾斜トモグラフィーデータを依頼に応じて理研播磨研究所において順次処理し、解析結果をフィードバックした。マーカーなしのトモグラフィーデータの解析にはフロリダ州立大学で開発されたPROTOMOパッケージ (<http://www.electrontomography.org/>) を使用し、ダブル傾斜データのマージにはコロラド州立大学で開発されたIMODパッケージ (<http://bio3d.colorado.edu/imod/>) を使用した。マーカー情報が存在しない2つのトモグラムをアライメントするために、各々の投影像からおおまかなアライメントを得、最終的に3次元のアライメントを行うための独自のスクリプトを開発し使用した。

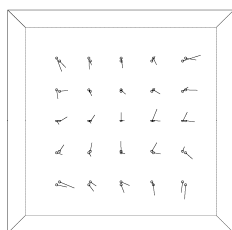


図1. ダブル傾斜データの3次元アライメント用変位図例

2つのトモグラムをいくつかのセグメントに分割しそれぞれのセグメントを3次元アライメントした時の位置のずれをベクトルで表示した図(変位を100倍に誇張)。この情報から2つのトモグラムをマージした。IMOD使用。

2. 電子線による電荷観察のシミュレーション

電子線で見えてくる構造はX線と異なり電荷の影響を大きく受けると言われている(Kimura Y. et al., *Nature* 1997, Mitsuoka et al., *JMB* 1999)。これは電子線の散乱因子が電荷により特に低角領域(20 Å以上)において大きく変化することによる。電子線による高分解能の構造解析が進めば例えば残基の電荷状態を確認できることになる。電子線における電荷の影響をシミュレーションし、論文(Hirai et al., *J. Electron Microsc.*, 2007)として発表した。

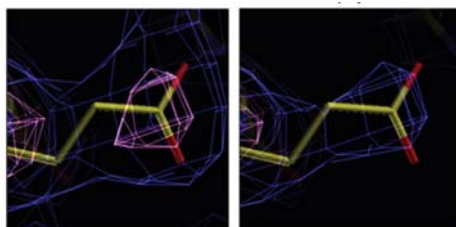


図2. 電荷の有無と残基の見え方

グルタミン酸残基の密度図のシミュレーション結果。左は中性、右は負に(2つの酸素原子に均等に)荷電していると仮定。計算には50 から3 Åのデータを使用。

3. 膜タンパク質の構造解析

3.1 バクテリオロドプシンの構造変化の差マップによる評価

電子顕微鏡像からは振幅情報のみならず位相情報も直接入手できる。光駆動型プロトンポンプであるバクテリオロドプシンの中間体構造を模する三残基変異体(D96G/F171C/F219L)と天然体の基底状態それぞれの二次元結晶像から投影像における差マップを計算した。この差マップは構造変化におけるヘリックスFおよびGの大きなシフトを支持するがX線で構造が解かれている中間体は必ずしもこの大きな構造変化を捉えていない。特に三次元結晶において光照射により構造変化を行わせた場合には立体障壁が問題となり正しく構造変化していないと考えられることなどを議論した(Hirai T. & Subramaniam S., *PLoS ONE*, 2009, Hirai et al. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 2009)。

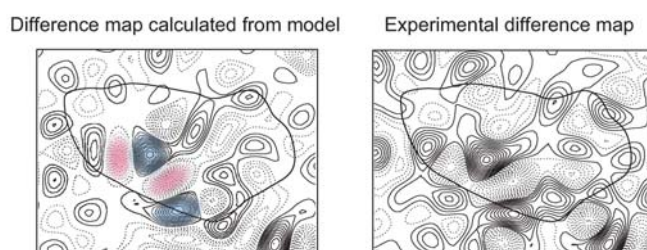


図3. バクテリオロドプシンの差マップ(投影像)

電顕(回折データを用いた分子置換法)で構造解析されたPDB座標から計算された差マップ(左)と実像のみから計算された差マップ(右)。この2つは良く一致した。

3.2 MFS型輸送体であるシュウ酸イオン輸送体の構造解析

シュウ酸イオン輸送体(OxiT)は基質の電気化学ポテンシャル駆動型輸送体の中のMFS型輸送体に属する。OxiTに関しては電子線結晶学により6.5 Åの三次元構造が報告されている(Hirai T. et al., *Nat. Struct. Biol.*, 2002、平井、*生物物理*、2007)。MFS型輸送体の輸送機構をより深く理解するために現在高分解能の構造解析に向けて結晶の改善を行っている。

3.3 ヒト赤血球膜蛋白質バンド3陰イオン輸送体の構造解析

バンド3は人の赤血球に存在する膜タンパク質で陰イオン交換輸送体として働く。具体的には HCO_3^- と Cl^- の交換を行うことにより、二酸化炭素によるpHの減少効果を増幅し、代謝が活発な組織においてヘモグロビンからの酸素の放出を促進することができる。バンド3の構造解析は以前から試みられているが10年以上前に20 Åの構造が報告されて以来(Wang D. et al., *EMBO J.*, 1994)、大きな進展はない。当研究チームに在籍した山口は長年このバンド3の二次元結晶化に取り組みらせん状結晶とチューブ状二次元結晶を得ることに成功した。らせん状結晶は単粒子解析法を応用したIHRSR法により20 Å程度で立体構造解析した(Yamaguchi T. et al., in preparation)。チューブ状二次元結晶はMRCプログラムを使用して7 Å程度で三次元構造解析を行った(Yamaguchi T. et al., in preparation)。いずれも投稿準備中である。

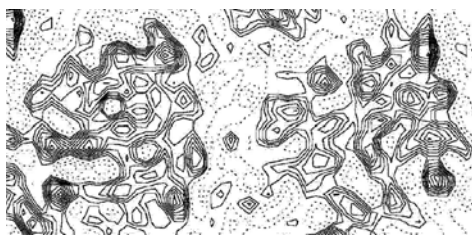


図3. バンド3投影像

バンド3の二次元結晶の電子顕微鏡像から得られた予備的な投影像。同じ結晶内でも左右異なるように若干の構造変化が識別される。

(7) 分子動力学計算による水銀の AQP1 抑制機序の解析

[慶應義塾大学大学院医学研究科]

水分子は生物が生きていく上で必須の物質である。体内にある水分子の含量は、生体組織や細胞レベルで巧妙かつ精密に調整されている。細胞は膜によって仕切られているが、膜の内部は疎水性の脂質から構成されているため、水分子は膜の内部を受動拡散により通過する。しかし、その速度は細胞内外の水分子の交換には充分ではない。例えば、赤血球や腎臓の尿細管上皮細胞の細胞膜の水分子透過性は受動拡散では説明できない。そのため、膜の中には水分子を通す「穴 (pore)」が存在し、その「穴」を介して分子の調整を行う膜タンパク質の存在が示唆されてきた。アクアポリンは水分子を選択的に透過する「穴」である。現在までの研究で、アクアポリンは全身に分布しており、ヒトを含めた哺乳類には 13 種類のアクアポリンのサブタイプが存在し、そのサブタイプ毎に細胞や組織に分布・局在していることが知られている。このことからアクアポリンは生命にとって非常に重要な働きをしていると考えられる。アクアポリンの身体における役割についてはこれまでに様々な研究が生化学的アプローチや理論的アプローチにより行われてきている。しかし、アクアポリンの分布・局在の理由や選択的水分子透過の制御機構に関しては未だ謎の部分が多い。

アクアポリンの機能を制御するような薬剤の発見は、その機能異常により起こる疾病の治療薬になると考えられる。しかしながら、これまでのところ、臨床応用可能なアクアポリンに対する阻害剤となりうる薬剤は見つかっていない。水銀などの金属は多くのアクアポリン中のシステイン残基に結合し、水分子透過を阻害することが生化学実験により知られている。しかし、その阻害機構について明確な答えはでていない。そこで、アクアポリン 1 中のシステイン残基に水銀が結合した系と結合していない系を構築して分子動力学計算を行い、両者の結果を比較することでアクアポリンの水銀による水分子透過阻害機構について解明することを研究の主な目的とした。

方法 分子動力学シミュレーションにより、アクアポリン 1 の膜中での構造ダイナミクスに関する研究を行った。分子動力学シミュレーションを行うためのモデル構造は次のように構築した。使用した結晶構造は bovine の AQP1 (PDB entry: 1J4N) である。アクアポリンの単量体の立体構造は 6 つのアルファ・ヘリックス (H1-H6) が膜を貫通している。さらに、2 つの短いアルファ・ヘリックス (HB, HE) が膜の中間付近で向き合っている。互いのアルファ・ヘリックス間は特に構造をもたないループで結ばれている。また、アクアポリン 1 は生体内では四量体として存在している。そこで、単量体構造から四量体構造を構築した。構築した四量体構造を脂質 (POPE) で構成された二重層膜に埋め込み、二重膜の上下に水分子 (TIP3P water) を発生させ、一辺がおよそ 110 Å の立方体セルを構築した (図 1)。このセルに含まれる原子数は約 10 万である。構築したモデル系について、まず、初期構造を構築するために温度 (310 K)、圧力 (1 atm) 一定 (NPT) の周期境界条件下で平衡状態の分子動力学シミュレーションを 2 ns 行った。2 ns の分子動力学シミュレーションを行い、得られた構造を初期構造とした。この初期構造から、水銀の結合した系 (Hg-AQP1) と結合していない系 (Free AQP1) を構築し、それぞれの構造について、さらに 40 ns の平衡状態の分子動力学シミュレーションをおこなった。分子動力学シミュレーション中は水素原子を含む結合長を平

平衡核間距離に保つために SHAKE 法を用いた。タイムステップは 1 fs とした。遠距離からの寄与は Particle Mesh Ewald (PME)法により計算した。計算プログラムは amber 8 を用いた。

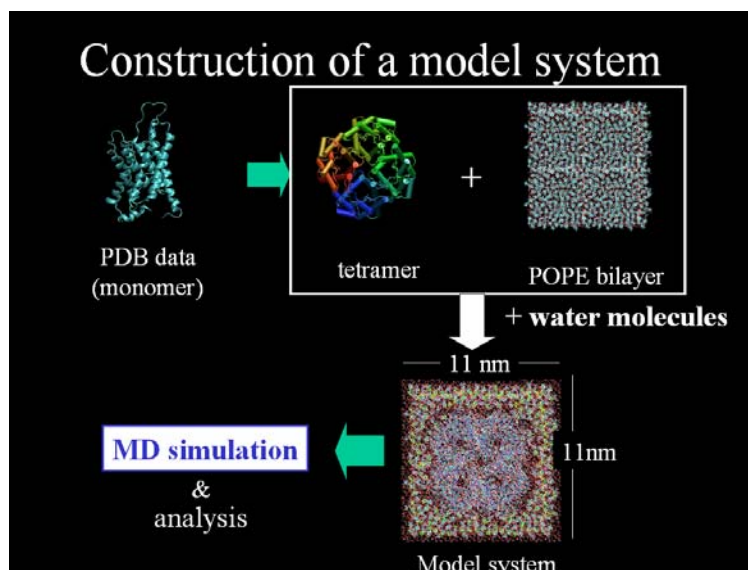


図1: アクアポリンの分子動力学計算のモデルの構築

結果および考察

Free AQP1 および Hg-AQP1 についてそれぞれ 40 ns の MD シミュレーションを行った。両者の全体構造について root mean square deviation (RMSD)を計算した。(図2)。Free AQP1 は 25 ns 以降、Hg-AQP1 は 30 ns 以降で RMSD の値が約 3.5 Å 付近に落ち着いている。各モノマー内部の RMSD を計算したところ、およそ 3 Å であったことから、全体構造の動きは、モノマー単位の移動ではなく、モノマー内部の動きであると予想される。また、2次構造をもつ H1-H6 の膜貫通ヘリックスと短い HB, HE ヘリックスに関して RMSD を計算したところ、全体のものよりも小さかった。つまり、全体構造のずれは、2次構造をもたない部位に起因すると考えられる。また、全体構造の場合と同様、Free AQP1 は 25 ns 以降、Hg-AQP1 は 30 ns 以降で RMSD の値が平衡に達している。ヘリックスの RMSD では、Free AQP1 と Hg-AQP1 に違いが見られた。このことから、両者は2次構造に違いがあると予測される。水銀が結合したシステインの周囲のアミノ酸残基を比較すると、両者に違いが見られた(図3)。水銀が結合することにより、主に水銀の結合したシステインの周囲のアミノ酸の側鎖の立体配置が変化することが分かった。水銀による水分子透過阻害機構は、水銀が pore を塞いでいるのではなく、水銀が結合し、周囲のアミノ酸の立体配置が変化し、pore の形が変形することによるが示唆された。pore の変形がどのような影響を与えるかを調べるために potential of mean force (PMF)により水分子通過の際の自由エネルギーを求めた(図4)。PMF の計算には WHAM 法を使用した。その結果、両者とも ar/R region を通過する際にエネルギー障壁が存在していることが明らかとなった。また、Hg-AQP1 は Free AQP1 よりも高いエネルギー障壁が存在した。このことから、水銀により誘導された pore の変形が水分子透過制御に影響を与えることが分かった。

今後の展望

PMF を求めることにより、分子・原子の結合により誘導された pore の変形が水分子透過制御に影響を与えることが分かった。この手法を応用することにより、タンパク質と基質(薬剤候補分子)の結合による機能への影響や結合部位の予測に役立つと期待される。

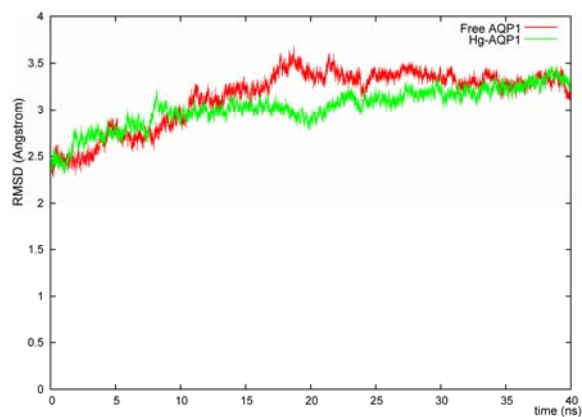


図2: 全体構造の C α について 40 ns 間の基準構造からのずれ(RMSD)を計算した。

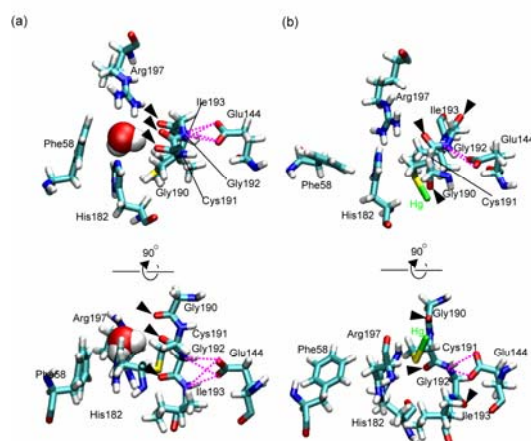


図3: 水銀が結合したシステインの周囲のアミノ酸残基の配座

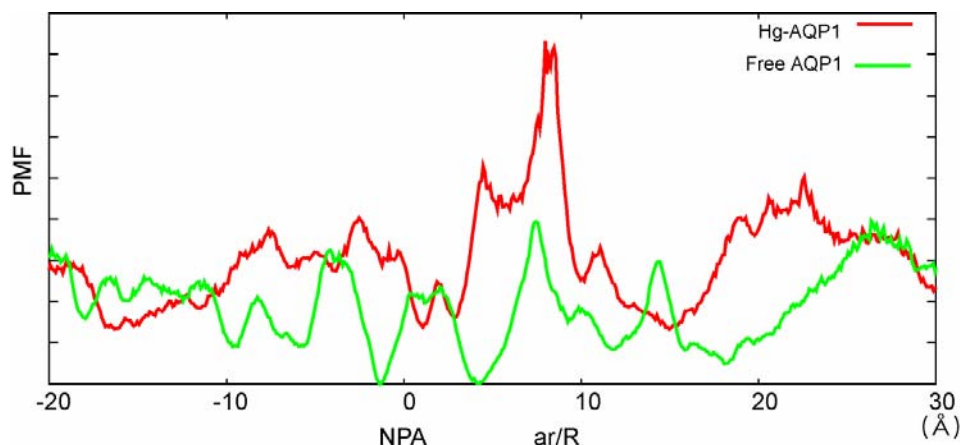


図4：水分子透過の際のPMF。赤線がHg-AQP1，緑線がFree AQP1を表す。両者ともar/R regionにエネルギー障壁が存在する。また、Hg-AQP1はFree AQP1よりも高いエネルギー障壁が存在する。水銀の結合により誘導されたporeの変形が水分子透過制御に影響を与えていることが分かる。

(8) 亜鉛によるアクアポリン4の水透過性抑制

〔慶應義塾大学大学院医学研究科〕

アクアポリン-4 (AQP4)は脳に最も多く存在する水チャネルであり、主にアストロサイトの終末足に発現している。脳における水の恒常性維持は生命活動において最も重要であり、AQP4が深く関わっていることが予想される。しかしながらその機能制御機構はほとんど明らかにされていない。ここで、われわれは、生体内微量元素である亜鉛がAQP4の水透過性を、プロテオリポソーム再構成系を用い可逆的に阻害することを見出したので報告する。塩化亜鉛のAQP4再構成リポソームに対する濃度応答効果を検討した結果、 IC_{50} 値は $287 \cdot M$ であり、この阻害された水透過性はAQP4再構成リポソームのWashoutやチオール還元剤との反応で完全に元に戻った。さらに、178番目のシステイン(Cys)をセリンに換えた変異体では塩化水銀の阻害効果がなかったことから、Cys178が塩化亜鉛の標的分子ということが示唆された。このCys178は細胞内に面するループDに存在するため、細胞内の亜鉛がAQP4の機能調節を担う可能性が示唆された。

背景

脳における水分子の恒常性維持は、生命維持に直結する最も重要な事象である。その恒常性の維持には水チャネルであるアクアポリン(AQP)の関与が予想される。AQPは哺乳動物では13種類が報告されており、そのいくつかは構造が決定されている。AQP4は脳において最も多く存在する水チャネルで、毛細血管を取り巻くアストロサイトの終末足に局在している。ノックアウトマウスの解析よりAQP4の脳浮腫への関与が強く示唆されているが、その機能調節に関してはほとんど明らかになっていない。最近、われわれはAQP4再構成リポソームを用いた系で、水銀がAQP4の水透過性を阻害すること、その標的分子が細胞内に面したCys178であることを見出した。このことは、AQP4の機能調節が細胞内から行われることを示唆した。しかしながら、生体内にお

いて水銀はほとんど存在しないので、他の Cys を標的とする生体内微量元素がこの役割を担っていると推測した。亜鉛は脳においてもっとも豊富に存在する生体微量元素の一つで、多くのタンパク質や酵素の活性に重要である。脳における亜鉛の濃度は $150 \cdot \text{M}$ と非常に高いことが知られているが、細胞内の遊離亜鉛イオンは picomolar と非常に少ない。これはメタロチオネインのような金属結合タンパク質が Cys を介し、細胞内の遊離亜鉛と結合、いわば貯蔵の役割をすることにより、細胞内の遊離亜鉛濃度を保っていることが考えられる。また、一酸化窒素などの酸化剤の存在下では亜鉛はこれらのタンパク質から遊離し、遺伝子発現やタンパク質の機能調節に働いていると考えられる。そこで、われわれは AQP4 が亜鉛によって機能制御されるという仮説を立て、AQP4 再構成リポソームを用いて実験を行った。

方法

1) AQP4の発現・精製、リポソームへの再構成 ラットAQP4遺伝子(野生型およびC178S変異体)を形質転換した *Saccharomyces cerevisiae*を発現用培地で培養し、回収した菌体から、膜画分を回収し、その膜を非イオン界面活性剤であるOctyl-glucoside(OG)で可溶化後、His-tagアフィニティカラムでAQPの精製を行った。AQP4、OG、脂質さらに水分子の指示薬として蛍光物質であるカルボキシフルオロセイン(CF)を混ぜた溶液を作製し、この溶液を、MOPS緩衝液で25倍希釈し、AQPを再構成したリポソームを作製した。

2) AQP4再構成リポソームの機能実験 水透過性はストップフロー装置を用いて、高張液とサンプル溶液を瞬時に混ぜ、リポソームの容積変化をCF quenching法にてミリ秒単位で追跡した。リポソーム内の水が外に出ることでリポソーム内の高濃度のCFが濃縮される。するとCFの蛍光の消失現象が起きる。この蛍光消失速度よりリポソームの容積変化速度を算出し、フィックの拡散方程式由来の水透過速度方程式に代入して、水透過速度を求めた。

結果

・ 塩化亜鉛の AQP4 再構成リポソームの水透過性への影響

生体内微量元素の AQP4 の水透過性に対する影響を調べるため、塩化物金属を AQP4 再構成リポソームに作用させ、水透過性を測定した。その結果、 $1000 \cdot \text{M}$ の塩化亜鉛と $100 \cdot \text{M}$ の塩化銅が AQP4 の水透過性を阻害した(Fig.1A)。また、水銀感受性の AQP1 ではその効果が認められなかった(Fig.1B)。また、AQP4 は His-tag を含むので、その影響を確認するために、His-tag を切断した AQP4 の水透過性も測定した(Fig. 1C)。その結果、これら亜鉛と銅による水透過性阻害効果は His-tag による影響はないと考えられた。

・ 塩化亜鉛と塩化銅の AQP4 水透過性に対する阻害効果の違い

塩化亜鉛と塩化銅の濃度応答効果を検討した結果(Fig. 2A)、 IC_{50} 値が塩化亜鉛では $287 \pm 58.5 \mu\text{M}$ であったのに対し、塩化銅では $7.7 \pm 2.5 \mu\text{M}$ であった。このことは、塩化亜鉛の AQP4 に対する親和性が塩化銅より低いことを示唆した。

これらの阻害効果の可逆性をプロテオリポソームを Washout すること、またチオール還元剤のジチオスレイトール(DTT)を添加することによって確認した(Fig2B,C)。その結果、塩化亜鉛添加ではいずれも AQP4 の水透過性が元に戻ったのに対し、塩化銅添加では Washout では戻らず、さらに DTT 添加でも部分的にしか阻害の回復が認められなかった。よって、亜鉛

の阻害効果は可逆的、銅の阻害効果は不可逆的ということがわかった。

- 亜鉛阻害効果の標的分子の同定

亜鉛の阻害効果の標的アミノ酸を同定するため水銀の標的である Cys178 の変異体の水透過性に対する影響を調べた(Fig.3C)。その結果、この変異体に対する塩化亜鉛の阻害効果は認められなかった。さらに、塩化銅でも同様の結果が得られた(Fig.3C)。よって、これらの金属の阻害は細胞内面に位置する Cys178 であることが示唆された。

- 酸化還元試薬の AQP4 に対する影響

Cys178 が AQP4 の機能阻害の標的アミノ酸であったため、Cys の修飾に関わる酸化及び還元剤添加時の AQP4 の水透過性に対する影響を diamide, S-nitroso- glutathione (GSNO), peroxyntirite (ONOO⁻), hydrogen peroxide (H₂O₂) および reduced glutathione (GSH)を 1 mM 添加し、検討した(Fig. 3A)。その結果、これらの試薬は AQP4 の水透過性に影響を与えなかった。また、diamide は Cys の-SH からプロトンを引き抜く作用がある。そこで、塩化亜鉛と併用実験を行ったところ塩化亜鉛は塩化銅と同等の阻害効果を示した(Fig.3B)。このことは、亜鉛は-SH からプロトンを引き抜き結合する、いわゆるメルカプチド結合で AQP4 に結合しているわけではないことが示唆された。このことは亜鉛の親和性が低く、可逆性を有する阻害形式をサポートする結果と考えられる。

Figure

Fig.1 塩化亜鉛及び塩化銅は AQP4 再構成リポソームの水透過性を減少させる。

(A) 1000 μ M MgCl₂, CaCl₂, MnCl₂, LiCl, CdCl₂, FeCl₃ and ZnCl₂ と 100 μ M CuCl₂ 処理(5 分間室温)した AQP4 再構成リポソームの水透過性 (n = 3-10, means \pm S.D.)

(B) 1000 μ M ZnCl₂ と 100 μ M CuCl₂ 処理(5 分間室温)した AQP1 再構成リポソームの水透過性 (n = 3, means \pm S.D.)

(C) His-tag を除去した AQP4 を再構成したリポソームの水透過性。(n = 3, means \pm S.D.)

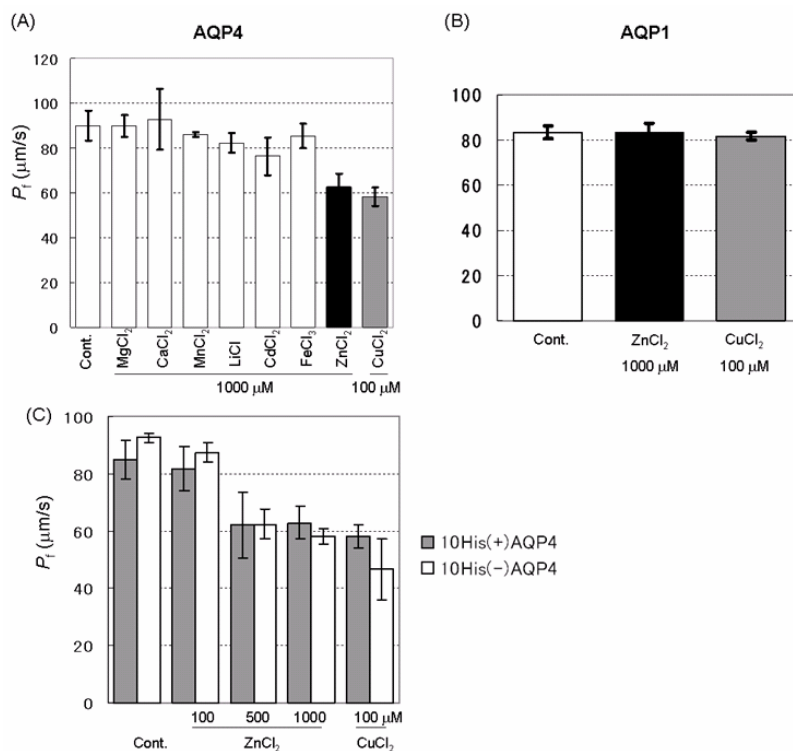


Fig.2 亜鉛と銅の AQP4 に対する阻害様式のの違い。
 (A) 亜鉛と銅の AQP4 に対する濃度応答効果。
 (n = 3-10, means ± S.D.) (B) 亜鉛及び銅を作用させた AQP4 再構成リポソームの Washout 効果。(n=3, means ± S.D.) (C) 亜鉛及び銅を作用させた AQP4 再構成リポソームの DTT 添加の効果 (n=3, means ± S.D.)

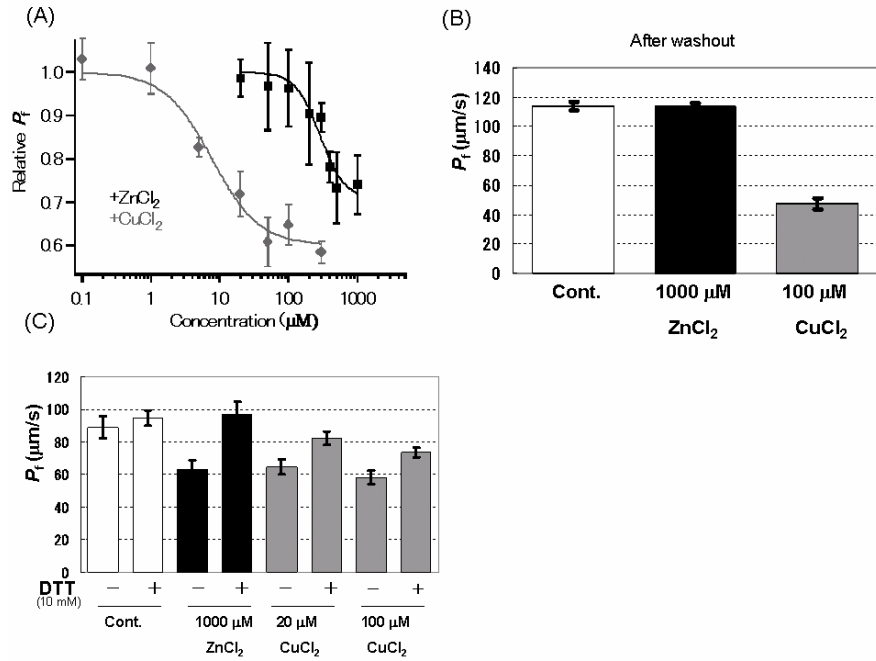
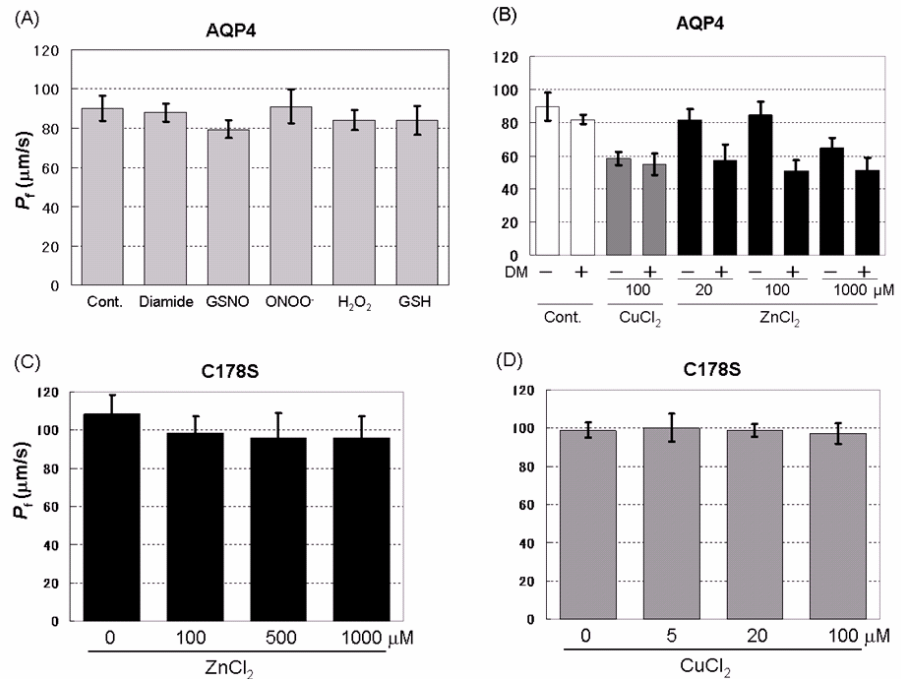


Fig.3 亜鉛による阻害効果の特性
 (A) 酸化及び還元剤の AQP4 水透過性に対する影響。反応時間は diamide、GSNO、H₂O₂ 及び GSH が 15 分、ONOO⁻ が 5 分で、それぞれ 1 mM を添加した。
 (B) 亜鉛と diamide(DM)の併用効果。
 (C, D) Cys178Ser 変異体に対する亜鉛(C)と銅(D)の効果



2.2 研究開発項目②「核磁気共鳴法等による膜タンパク質及びその複合体とリガンド分子の相互作用解析技術」

集中研究: 社団法人バイオ産業情報化コンソーシアム[バイオメディシナル情報研究センター(BIRC)、東京大学分室、三菱化学分室、第一三共分室、東レリサーチセンター分室、味の素分室、協和発酵キリン分室、エーザイ分室、東レ分室]

共同研究先: 独立行政法人産業技術総合研究所バイオメディシナル情報研究センター、国立大学法人東京大学大学院薬学系研究科

(1) 安定同位体標識タンパク質調製系の確立

(1)-1 NMR 解析を目指した新規酵母発現系の開発

[バイオメディシナル情報研究センター]

【序】

安定同位体標識タンパク質の発現には、容易かつ適切な標識コストにて大量発現が可能な大腸菌発現系が一般的に用いられる。しかし、ヒト由来のタンパク質や、高次構造形成に複雑なジスルフィド結合や翻訳後修飾が必要なタンパク質などの場合、大腸菌を含む原核細胞では発現が困難である場合も多い。高等な真核細胞である昆虫細胞や動物細胞を利用

Table 1. 従来のタンパク質大量発現系の特徴

	取り扱い 容易さ	安定同位体 標識のコスト	発現量	翻訳後修飾	哺乳類由来タンパク質/ 多重ジスルフィド結合形 成タンパク質発現
原核細胞					
大腸菌	◎	◎ <small>¹³C: グルコース (< 4g/L) ¹⁵N: ¹⁵NH₄Cl (1 g/L) 量水培養可能</small>	◎	×	△~×
真核細胞					
<i>Pichia pastoris</i> (酵母)	○	×	○(分泌◎)	○	○
		<small>誘導剤メタノールの毒性 同位体標識メタノールのコスト</small>			
Sf9, Sf21 (昆虫細胞)	△	×	△	○	○
CHO, HEK (動物細胞)	△	×	×	◎	◎

した発現系では、活性を有するタンパク質発現に成功する確率が高いが、収量がそれほど高くないことに加え、最少培地を使用することができないため現実的なコストで安定同位体標識試料を調製することは困難になる。そのような場合、比較的大量に安定同位体標識タンパク質を発現できる真核細胞である酵母 *Pichia pastoris* (*P. pastoris*) 発現系が検討されることがあるが、炭素源として高価なメタノールを比較的大量に (> 15-20 mL/L) 必要とすることや、メタノール自体の細胞毒性のため、安定同位体標識試料調製系として汎用的に用いられているとは言い難い状況にある。(Table 1)。

そこで、我々はこれらの問題を克服するため、酵母 *Kluyveromyces lactis* (*K. lactis*) を活用した、新しい安定同位体標識タンパク質発現システムの構築を行った。その結果、本発現系を用いて大腸菌発現系と同等のコストで安定同位体標識タンパク質を大量発現させることに成功した。

【方法および結果】

1. *K. lactis* の炭素源および培養法の検討

本来、*K. lactis* は、タンパク質発現誘導剤および単一炭素源として、20 g/L のガラクトースを利用

する。しかし、 ^{13}C 標識ガラクトースは高価 (^{13}C グルコースの 10 倍以上の価格) であるため、 ^{13}C 標識における障壁となりうる。そこで、グルコースでもタンパク質発現誘導は可能であるという報告¹⁾と、*K. lactis* の中でもグルコース資化性が比較的高いと言われている GG799 株 (New England Biolabs) を利用し、グルコースを用いて *K. lactis* に目的タンパク質を大量発現させる発現条件の検討を行った。モデルタンパク質として maltose binding protein (MBP) を使用し、ファーメンター培養で MBP を培地上清中へと分泌発現させた。しかし、グルコースで十分量のタンパク質発現を達成するには 20 g/L 必要であり (Fig 1, lane 1)、大腸菌発現系と同レベルの 4 g/L のグルコース量では十分な発現誘導は認められなかった (Fig 1, lane 2)。そこで、培養法を詳細に検討した結果、ファーメンター培養中に新鮮な培地をペリスタポンプで供給しつづける Fed-Batch 法により、大腸菌発現系とほぼ同レベルのグルコース量 (5 g/L) でも十分な発現誘導が達成されることを見出した (Fig 1, lane 3)。

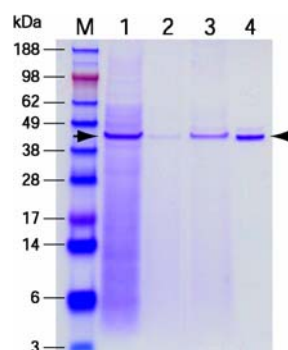


Fig 1. *K. lactis* 発現系で大量発現した MBP の SDS-PAGE 像
 レーン 1: 通常のファーメンター培養 (20 g/L グルコース使用)
 レーン 2: 通常のファーメンター培養 (4 g/L グルコース使用)
 レーン 3: Fed-Batch 培養 (5 g/L グルコース使用)
 レーン 4: 精製した MBP

2. 安定同位体標識効率の確認

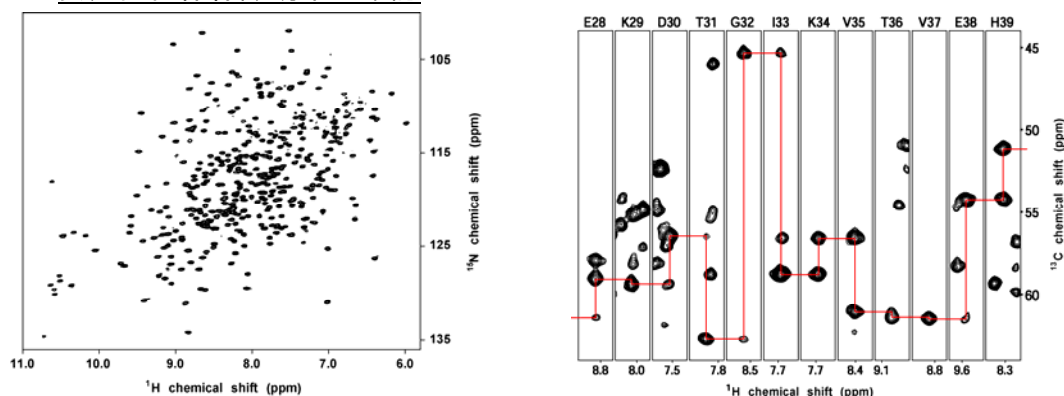


Fig 2. Fed-Batch 培養で大量発現させた均一 ^{13}C , ^{15}N 標識 MBP の NMR スペクトル
 パネル左: ^1H - ^{15}N HSQC スペクトル
 パネル右: 3 次元 HNCA スペクトルにおける各アミノ酸残基の ^1H - ^{13}C strip 表示 (赤線: 各アミノ酸残基間の ^1H - ^{13}C - ^{15}N シグナルの相関)

発現させた均一 ^{13}C , ^{15}N 標識 MBP の性質と標識効率を、 ^1H - ^{15}N HSQC および 3 次元 HNCA スペクトルの測定と MALDI TOF-mass 測定によって評価した。 ^1H - ^{15}N HSQC シグナルは良好に分散しており、発現した MBP が正しいフォールドを形成していることを確認できた (Fig. 2, パネル左)。3 次元 HNCA スペクトルもシグナル/ノイズ比が十分高く、主鎖シグナルの連鎖帰属を進めることができたことから、十分高い効率で ^{13}C , ^{15}N 標識されていることが示された (Fig. 2, パネル右)。さら

に、非標識、均一 ^{15}N 標識、および均一 ^{13}C , ^{15}N 標識 MBP について MALDI TOF-mass スペクトルの測定を行った結果、 ^{15}N および ^{13}C , ^{15}N の標識効率はいずれも約 93%、約 96%であることを確認した²⁾。

【考察】

酵母 *K. lactis* を使用し、かつ炭素源および培養法を工夫することにより、安定同位体標識のコストを大腸菌発現系と同レベルまで抑えた酵母発現系を構築することに成功した (Table 2)。

また *K. lactis* は、単一の炭素源を含む培地で培養し続けるだけで大量発現が可能であり、メタノールを添加する前に培地を交換する必要のある *P. pastoris* よりも作業上の手間が軽減される。そのような特長のため、*K. lactis* は取扱いや培養のスケールアップの容易さ、培養の再現性などにおいて優れており (Table 2)、目的タンパク質が酵母株で発現するかどうかの確認も比較的迅速にできるため、目的タンパク質を発現させる宿主を選択するうえで、大腸菌とともに第一選択肢になり得る発現系であると考えている。

	取り扱い 容易さ	安定同位体 標識のコスト	発現量	翻訳後修飾	哺乳類由来タンパク質/ 多重ジスルフィド結合形 成タンパク質発現
原核細胞					
大腸菌	◎	◎ <small>^{13}C: グルコース (< 4g/L) ^{15}N: $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ (1 g/L) 重水培養可能</small>	◎	×	△~×
真核細胞					
<i>Kluyveromyces lactis</i> (酵母)	◎	◎ <small>^{13}C: グルコース (5g/L)</small>	○(分産◎)	○	○
<i>Pichia pastoris</i> (酵母)	○	×	○(分産◎)	○	○
Sf9, Sf21 (昆虫細胞)	△	×	△	○	○
CHO, HEK (動物細胞)	△	×	×	◎	◎

Table 2. タンパク質大量発現系の特徴 (新たに *K. lactis* 発現系を加えた (赤字))

【今後の展望】

1. 重水素化タンパク質の大量発現法の確立

ヒト血清アルブミン (human serum albumin; HSA) は血漿中に含まれる総タンパク質の約 60% を占め、血管内外の水分の浸透圧調整に必須であるだけでなく、様々な薬物などの低分子の輸送タンパク質としても重要であることから、薬物と HSA の相互作用は、生体内での薬効発現にも深く関わってくるものである。しかし、ジスルフィド結合が 17 対存在し、分子量も比較的大きいため、native な立体構造の HSA を大腸菌で大量発現させることは不可能であった。

現在までの検討の結果、我々は native な立体構造の HSA を *K. lactis* で大量発現させることに成功している。HSA のような巨大分子を対象とする NMR 解析を進める場合、タンパク質の重水素化は必須となる。現在、*K. lactis* で重水素化タンパク質の大量発現を可能にする培養方法を探索中であり、重水素化 HSA を調製することができれば、これまで NMR 解析が困難であった薬物-HSA 複合体を対象とした相互作用解析を進展させることが可能になると考える。

2. アミノ酸選択的安定同位体標識法の開発

特定のアミノ酸を選択的に安定同位体標識する方法は、大腸菌ではほぼ確立されているが、*P. pastoris* をはじめとする酵母では未だ確立されていない。アミノ酸選択的標識は高分子量タンパク質の NMR 解析を進める上で必須の技術であり、重要な課題である。現在までの検討の結果、特定の安定同位体標識アミノ酸を Fed-Batch 法によって培養中に供給することで、そのアミノ酸のみを選択的かつ高効率で安定同位体標識した目的タンパク質を *K. lactis* で大量発現することに成功している。今後、他の安定同位体標識アミノ酸についても、その標識効率等を確認していくことで、*K. lactis* における体系的なアミノ酸選択的標識技術を確立する予定である。

3. 膜タンパク質の大量発現系の開発

一般的に、GPCR などの多数回膜貫通タンパク質は、大腸菌発現系では大量発現が困難である場合が多い。近年、酵母 *P. pastoris* 発現系で GPCR 等の大量発現の成功例が増えてきており、酵母発現系の有効性が指摘され始めている。今後、膜タンパク質の発現における *K. lactis* 発現系の有効性を検証していく予定である。

【参考文献】

- 1) Merico A et al. (2004) *J. Biotechnol.* **109**, 139–146
- 2) Sugiki T, et al., (2008) *J. Biomol. NMR* **42**, 159–162

(1)-2. NMR 試料の最適溶媒条件の新規スクリーニング法の開発

[バイオメディシナル情報研究センター]

【序】

生体高分子の溶液 NMR 解析において、試料分子間の非特異的な凝集は NMR シグナルの線幅の増大を引き起こし、構造情報取得の妨げとなる。したがって、試料が単分散の状態安定に存在する溶液条件を探索する必要がある。溶液条件の検討の手順として、様々な溶液組成の試料を調製して実際に NMR 測定を行うことで評価する手法がしばしば用いられるが、探索に必要な試料の量および費やす時間が膨大になるという難点があった。

我々は、溶液中における試料の並進拡散時間を少ない試料量で迅速に測定できる一分子蛍光分析法を用いることで、試料の凝集度と NMR スペクトルの質を迅速に評価できることを見出した。そこで、一分子蛍光分析法のハイスループット性を生かして、多種類の溶液条件を迅速、網羅的、体系的に探索する「溶液条件スクリーニングシステム」の構築を行った。

凝集性が高いために NMR 解析が困難であった ceramide trafficking protein (CERT) の PH ドメイン (CERT PH domain) の最適な溶液条件を本法にて探索した。その結果、凝集を改善させて良好なスペクトルを得られる溶液条件を一度のスクリーニング(従来の探索法の 7 倍以上の迅速性)で見出すことに成功し、CERT PH domain の溶液構造を決定することができたことから、本探索法の有効性が裏づけられた。

【方法と結果】

1. 一分子蛍光分析による凝集検出の検証

一般的にサブミリモル濃度という高濃度溶液である NMR 試料の場合、NMR 測定に必要とされる高濃度状態において特に凝集が激しくなる場合も多い。試料の凝集度を調べる既存の手法としては、微量透析法(目視で凝集の生成を検出する)、光散乱検出法、ゲル濾過法などが存在するが、しかしこれらの手法では、1) 見た目に沈殿が生じない凝集を検出できない、2) NMR 測定時と同等の高濃度状態で凝集度を見積もることが困難、といった問題があり、実際に NMR 測定を行ってみるまで NMR スペクトルの質を的確に判断できない場合も多い。その場合、凝集を解消する溶液条件を探索するには、様々な溶液組成の試料で NMR 測定を実際に行ってみるほかなく、したがって検討に必要な本数の NMR 試料を用意する必要があり、消費する試料量と NMR 測定時間は膨大なものとなる。

我々は、溶液中での試料の並進拡散時間を調べる手法である一分子蛍光分析法に着目した。そこでまず、一分子蛍光分析法が 1) NMR 試料のような高濃度試料の並進拡散時間を測定可能かどうか、2) 目視できない凝集を検出可能かどうか、を検証するため、pH の上昇によって凝集が進行し、それに伴って NMR スペクトルの質が低下するケモカイン MIP-1 α について一分子蛍光分析を行った。

一分子蛍光分析は、蛍光標識した試料が 1-10 nM 存在する溶液で可能である。そこで、NMR 測定に必要な高い試料濃度で一分子蛍光分析を行うため、80 μ M の MIP-1 α (非標識)溶液に蛍光標識 MIP-1 α が 1 nM となるように混和したものについて一分子蛍光分析を行った。その結果、その状態で MIP-1 α の並進拡散時間が測定可能であっただけでなく、pH の上昇に伴う MIP-1 α の凝集亢進の様子を明瞭に検出することができた (Fig. 1e)。また、そこで検出された凝集の亢進は、NMR スペクトル

の質が低下していく様子に対応していた (Fig. 1)。すなわち、一分子蛍光分析を行うことによって、NMR 測定することなしに試料の凝集度と NMR スペクトルの質の良し悪しを判断することができることを見出した。この検討で、1つの NMR スペクトルの測定に 400 μ L の試料と約 3 時間の測定時間を必要としたため、合計 1.6 mL の試料と約 12 時間の測定時間を必要とした。一方、一分子蛍光分析は 1 条件あたり 30 μ L の試料と約 3 分の測定時間で済んだため、合計 270 μ L の試料で 9つの条件

を 30分弱程度で測定でき、NMR 測定を行うよりも多数の条件を少量の試料かつ短時間で検討することができた。また、一般的な NMR 試料のようなマイクロモル～ミリモルの高濃度試料溶液で凝集度が判断できたことから、本法は NMR 測定時と等しい条件下で凝集を判断することができる

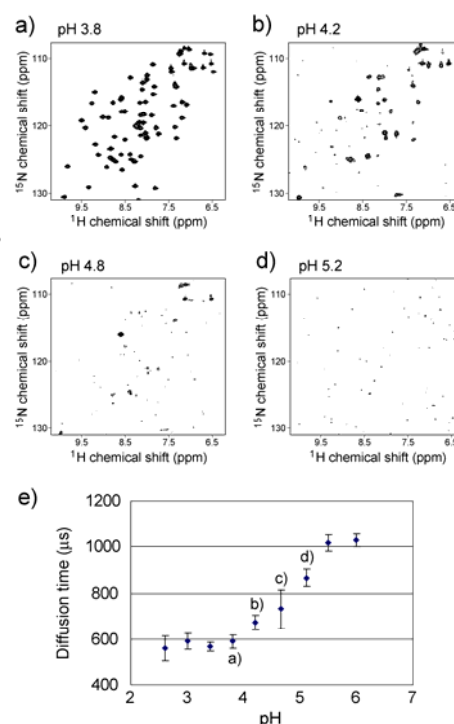


Fig. 1 MIP-1 α の ^1H - ^{15}N HSQC NMRと一分子蛍光分析。(a-d) 各 pH における MIP-1 α の ^1H - ^{15}N HSQC スペクトル。(e) 一分子蛍光分析で計測した各 pH における MIP-1 α の並進拡散時間。

点で、既存の手法に比べて信頼性が高いと思われる。

2. 溶液条件スクリーニングシステムの構築・実際の最適溶液条件の探索

試料の凝集が原因で NMR スペクトルの質が低く、解析が困難であった CERT PH domain について、凝集を解消する溶媒条件を一分子蛍光分析で探索した。また、探索にあたり、一分子蛍光分析は 384 穴プレートを使用し、必要な試料量が少ない(1 条件あたり 30 μ L)、測定時間が短い(1 条件あたり 1~数分)という特長を生かし、多数の条件を網羅的かつ体系的に探索するためのシステムを構築した (Chart 1)。本システムは、目的タンパク質の蛍光色素標識と精製を行った後、まず pH と塩濃度および両者の組み合わせについて最適な条件を一分子蛍光分析で探索し、それで不十分であった場合は次の段階で様々な添加物(塩、ポリオール類、界面活性剤など)を検討するという、段階的にスクリーニングを行う戦略をとった (Chart 1)。

第一段階の探索の結果、pH 7.5 において最も並進拡散時間が低下した。しかし、その条件でも NMR スペクトルの改善は不十分であり、凝集は完全には解消されていないことがわかった (Fig. 2a, c)。そこで次に、第一段階の探索で最も良好であった pH 7.5 の溶液に 14 種類の化合物を別々に添加し、一分子蛍光分析を行った。その結果、化合物 4 (50mM Na_2SO_4) 添加時に最も小さな並進拡散時間を示し、この条件での NMR スペクトルは質が顕著に改善していた (Fig. 2b, d)。このスクリーニングで消費した CERT PH domain の総量は 450 μ L (= NMR 測定 1-2 回分に相当)で、わずか 2 時間弱の一分子蛍光分析で 30 種類の溶液条件を一度に探索することができ、その結果 CERT PH domain の凝集を解消する条件を見出すことに成功した¹⁾。

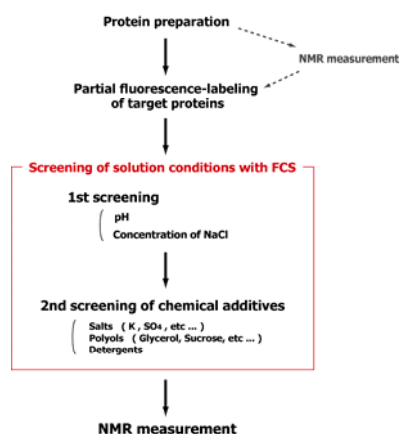


Chart. 1 一分子蛍光分析を用いて最適溶液条件を網羅的に探索するシステムの構築

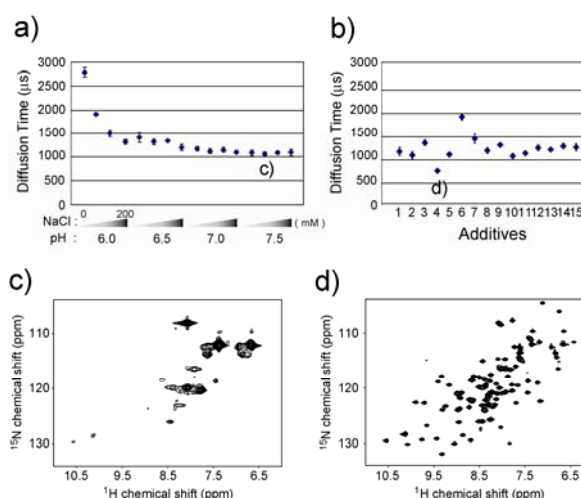
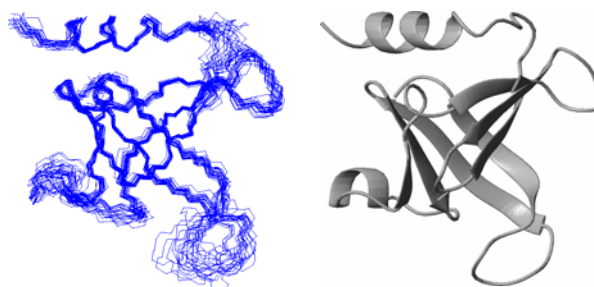


Fig. 2 一分子蛍光分析を用いて構築したシステムによる CERT PH domain の最適溶液条件の探索。(a) 最適な pH と塩濃度の探索。(b) pH7.5 における添加物の探索。(c) pH 7.5 における CERT PH domain の ^1H - ^{15}N HSQC スペクトル。(d) pH 7.5, 50 mM Na_2SO_4 における CERT PH domain の ^1H - ^{15}N HSQC スペクトル。

良好な溶液条件が決定できたことにより、CERT PH domain の NMR スペクトルの解析を進めることが可能になり、立体構造の決定を行うことができるまでに至った (Fig. 3)。

Fig. 3 構築したシステムを用いて CERT PH domain の最適溶液条件を見出した結果、NMR解析で立体構造解析を行うことが可能になった。
(左: 20 構造の重ね合わせ、右: 左図のリボン表示)



それに加えて、CERT PH domain のリガンド結合部位とその認識様式について NMR 分光法で解析を行うことも可能になり、CERT PH domain の機能的特徴の詳細と生物学的重要性を構造生物学的な見地から解明しつつある。

【考察】

一分子蛍光分析法は 1) 目視できない凝集(見た目には溶けているがマイクロに凝集しているもの)を検出できる、2) NMR 測定に必要な高濃度試料でも凝集度を判別できる という点で、NMR 測定時により近い状況で凝集が評価できる。また、一分子蛍光分析法で測定した試料の並進拡散時間が NMR スペクトルの質と対応することから、NMR 測定を行うことなしに一分子蛍光分析によって NMR スペクトルの質を評価できることを見出した。

一分子蛍光分析法のもつハイスループット性を生かし、凝集を解消する溶液条件を探索する体系的なスクリーニングシステムを構築した。凝集が原因で NMR スペクトルの質が悪く、解析が困難であった CERT PH domain について、実際に本システムを適用したところ、最適な溶媒条件を約 2 時間の一分子蛍光分析で見出すことに成功した。同様の探索を実際の NMR 測定で行う場合、約 15 時間程度を要すると考えられることから、本法は従来法に比べて 7 倍以上の迅速性を達成しているといえる。本法は NMR 試料についてだけでなく、結晶化のための溶液条件の探索等にも適用可能と考えられ、構造生物学の幅広い分野に貢献する手法となることが期待できる。

【今後の展望】

1. 必要試料量の少量化と検討条件数の拡大

現在の一分子蛍光分析装置では、384 穴プレートを使用し、1 穴あたりに必要な液量は 30 μL である。しかしながら観測領域である共焦点領域自体は極めて微小体積であることから、装置の改変を行うことで、より少量での測定を行うことは原理的には可能なはずである。1 穴あたりに必要な液量が 5 μL 程度である 1536 穴プレートが使用可能となれば、検討可能な条件数がさらに増え、より詳細な探索が可能になると期待される。

2. 試料調製の自動化・高速化

現在、多種類の溶液条件は実験者が 1 つ 1 つ手作業で調製しており、検討可能な溶液条件の数および実験の再現性に限界がある。そこで、タンパク質の結晶化条件の探索などで用いられている多種類溶液自動調製装置を本スクリーニング法と融合することにより、自動化、高速化、検討数の拡大が期待できる。

【参考文献】

1) Sugiki T, et al., (2009) *Protein Sci.* **18**, 1115–1120

(2) タンパク質複合体モデル構築を目指した NMR 測定法の開発

(2)-1. タンパク質複合体ドッキングモデル構築を可能とする新規 NMR 手法であるアミノ酸選択的交差飽和(ASCS)法、ならびに、分子動力的計算法の開発

〔東大分室(共同研究:中村チーム)〕

【序】

タンパク質の分子認識機構を立体構造の見地から解明することにより、生体内の多様なシステムである細胞認識や免疫機構、シグナル伝達などの重要な知見を得ることができる。タンパク質の結合界面を決定する NMR 手法として、化学シフト摂動法や H-D 交換法などが用いられるが、当研究室ではこれらの手法よりも正確な結合界面決定法として、交差飽和法(CS 法)の開発を行った。CS 法は目的分子(アクセプター)に結合している標的分子を交差飽和源(ドナー)とし、空間的に近接するアクセプター上の結合部位へと磁化飽和の移動を行う手法である。CS 法により、アクセプター上の結合界面を明らかとすることが可能であるが、ドナー全体を交差飽和源とするため、ドナー上のアクセプター結合部位に関する情報は得られない。しかしながら、より詳細な相互作用様式を明らかとするためには、両分子間の結合残基対の決定が必要となる。

そこで、ドナーに対して特定のアミノ酸以外を ^2H とする、アミノ酸選択的 ^1H ラベルを行い、交差飽和源を 1 種類のアミノ酸に限定する、アミノ酸選択的

CS(ASCS)法を考案した(Fig.1)。本手法により、ドナー上においてアクセプターへ近接するアミノ酸残基に関する情報が得られ、近接残基対の同定が可能となる。

さらに、得られた構造情報を中村チームに提供し、ASCS 法により得られる構造情報を満たす複合体モデル構築を計算する分子動力的手法の開発を行った。

本手法を検証する相互作用系として、76 アミノ酸残基である yeast ubiquitin(Ub)と、その加水分解酵素であり、234 アミノ酸残基である yeast ubiquitin hydrolase C90S 変異体(YUH1)を選択した。両者の解離定数は 43nM であり、複合体の結晶構造は報告されている(PDB code : 1CMX)。Ub をアクセプターに、YUH1 をドナーとして本手法に適用した。

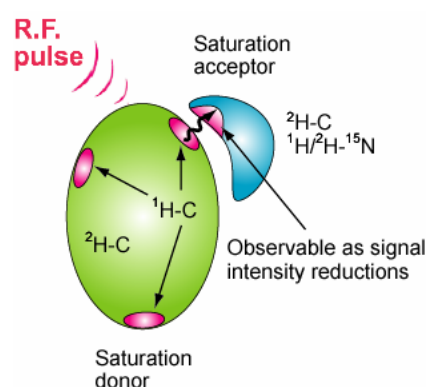


Fig. 1 アミノ酸選択的 CS 法

特定のアミノ酸以外を ^2H 化したドナーをアクセプターに結合させる。ラジオ波照射に伴い、ドナーの特定アミノ酸の脂肪族 ^1H の磁化が飽和され、交差飽和現象により、近傍のアクセプター残基へと飽和が伝播する。これを NMR シグナルの強度減少として検出する。

【方法・結果】

1. アミノ酸選択的 ¹H 標識の選択性と標識率の定量的評価

本手法で用いるドナーは、特定のアミノ酸のみが選択的に ¹H 標識され、他のアミノ酸を均一に ²H 標識されている必要がある。このような標識法として、ドナーを発現する大腸菌を ²H 化 M9 最小培地で培養し、発現誘導時に、¹H ラベルを行う対象の ¹H アミノ酸を、培地に含まれる当該 ²H アミノ酸の 5 倍量添加し、6 時間後に集菌するという方法をとった。

大腸菌はアミノ酸を代謝する様々な酵素を保持しており、添加したアミノ酸と他のアミノ酸間の変換が予想される。本手法は添加した ¹H アミノ酸が目的のアミノ酸にのみ効率よく取り込まれることが必須であるため、各アミノ酸の代謝状況を NMR 法により各原子ごとに確認した。Asn, Glu を除く 18 種類のアミノ酸について調べた結果 (Table. 1)、タンパク質を発現させるタイムスケールにおいて、Asp, Gln, Ser 以外のアミノ酸が選択ラベル可能であることが示された。

Table 1 各アミノ酸の ¹H 標識の選択性と、部位ごとの標識率

amino acid	selectivity	percentage of ¹ H				
		H _α	H _β	H _γ	H _δ	others
Ala	selective	44	78			
Arg	selective	96	84	86	74	
His	selective	51	67			77 (H _β 1), 63 (H _β 1)
Ile	selective	<3	90		100	86(H _γ 12,H _γ 13), 100 (H _γ 2)
Leu	selective	10	100	100	97	
Lys	selective	72	93	93	93	75 (H _ε)
Met	selective	40	71	94		80 (H _δ)
Phe	selective	7	81		97	97 (H _δ)
Pro	selective	54	79	79	56	
Trp	selective	10	45			75 (H _β 1), 77 (H _β 3), 77 (H _β 3), 79 (H _β 2)
Tyr	selective	<3	56	74	78	
Cys	selective	<3	30			
Gly	selective	37				
Thr	partially metamoblized	83	100	86		81(Ile H _β)
Val	partially metamoblized	11	70	68		40(Leu H _γ), 51(Leu H _β)
Asp	metabolized	54	N/A	N/A		
Gln	metabolized	<3	N/A			
Ser	metabolized	<3	N/A			

よく取り込まれることが必須であるため、各アミノ酸の代謝状況を NMR 法により各原子ごとに確認した。Asn, Glu を除く 18 種類のアミノ酸について調べた結果 (Table. 1)、タンパク質を発現させるタイムスケールにおいて、Asp, Gln, Ser 以外のアミノ酸が選択ラベル可能であることが示された。

2. ASCS 法の実施、結果のアミノ酸選択性の評価

1 に記述した方法で、目的のラベル状態を保持する YUH1(ドナー)を調製した。これを従来法により精製した。Ub(アクセプター)は従来の CS 法と同様に、[ul-²H,¹⁵N]体として調製した。Ub を完全に YUH1 結合型とすることで、アミノ酸選択的 CS 法に適用する NMR サンプルとした。

そこで、選択ラベルが可能な 7 種類のアミノ酸についてアミノ酸選択的 CS 実験を行った。Ala, Leu, Pro および Tyr 選択的 CS 実験の結果、Ub の L71, L73, R74, G75 の延べ 7 残基に大きな交差飽和が観測された (Fig. 2)。結晶構造において、これらの Ub 残基は ¹H ラベルを行った YUH1 のアミノ酸から 5 Å 以内に存在する。一方、5 Å 以上離れている残基には交差飽和が観測されなかった。このことは、近接アミノ酸からの交差飽和を観測する、アミノ酸選択的 CS 法が確立したことを示している。

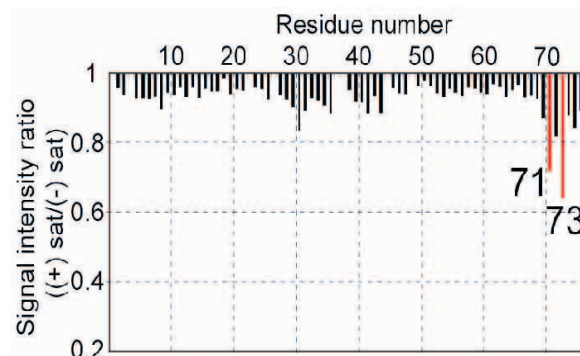


Fig. 2 Ala 選択的 ASCS 実験

横軸は Ub の残基番号、縦軸は交差飽和にとりまう NMR シグナルの強度減少率である。71 と 73 番目の Ub 残基に顕著な交差飽和が生じた。

3. ASCS 法による複合体中の分子間近接残基対の同定

交差飽和が観測された延べ 7 残基に対して、結晶構造に一致する交差飽和源の同定が実際に可能であるかの検証を行った。交差飽和源は、交差飽和が観測された Ub 残基から 5 Å 以内に存在すると考えられる。そこで、交差飽和を受けた Ub 残基のジオメトリーと一致する、YUH1 上で交差飽和源となったアミノ酸残基の組み合わせを検索した。まず、交差飽和源の種類と数を反映させて YUH1 から任意に延べ 7 残基を組み合わせた。これを最小二乗法により、交差飽和を受けた残基群と空間的に重ね合わせた。そして、対応する残基間の平均 RMSD をジオメトリーの一致度の指標とした。最小の RMSD を示す組み合わせにおいて、各 YUH1 残基と、それぞれにジオメトリーが近接する Ub 残基を 7 個の近接残基対とした結果、両者は実際に結晶構造中において 5 Å 以内に近接していた(Fig. 3)。よって、本手法によりタンパク質複合体の近接残基対の決定が可能であることが示された。

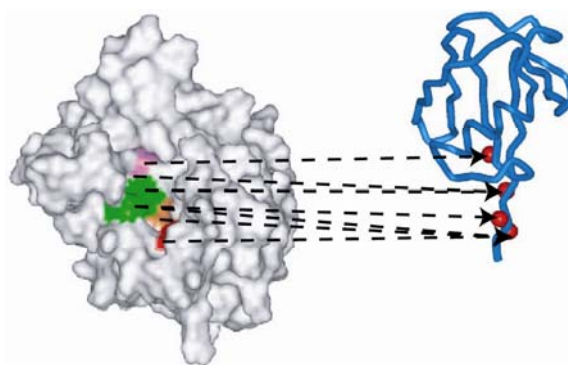


Fig. 3 ASCS 結果を満たす分子間近接残基対

赤の球で示した交差飽和を受けた Ub(右)の残基に対して、交差飽和源となった YUH(左)のアミノ酸残基を矢印で対応させた。

4. ASCS 結果を満たす複合体モデルを構築する分子動力学計算(中村チームとの共同研究)

次に、中村チームにより ASCS 結果を満たす複合体モデルを構築する分子動力学的(MD)計算法の確立が行われた。交差飽和の大きさは距離の 6 乗に反比例する。このことは、複合体の立体構造が明らかであれば、交差飽和の大きさを計算により算出することが可能であることを意味している。そこで、MD 計算を行った際に得られた複合体モデルについて、残基ごとに交差飽和の大きさを算出し、これを実際における ASCS 実験の交差飽和の大きさと比較することで、その差をエネルギー項 E_{sat} として取り扱った。これを通常行われる MD 計算におけるエネルギーに加算し、複合体のモデル構造を計算した(Fig. 4)。なお複合体モデル作成の計算プロトコール詳細は、研究開発項目③を参照のこと。このように、ASCS 実験結果を MD 計算に含めることで、詳細な複合体モデルが構築できることを示した。

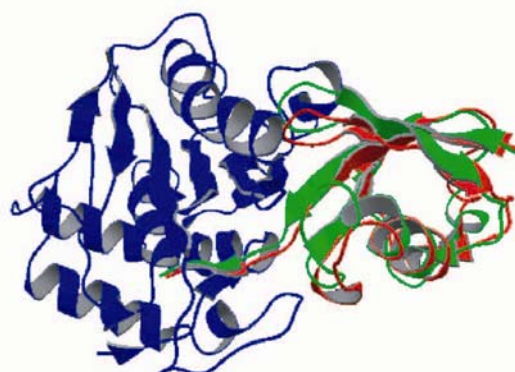


Fig.4 複合体モデルの構造

YUH(青)とUb(緑)で示した複合体の結晶構造に対して、YUH(青)とUb(赤)で示した複合体のモデル構造を重ね合わせた。

【まとめ】

本研究において我々は、タンパク質複合体の近接残基対を決定する手法として、アミノ酸選択的 CS 法を開発した。まず、本手法において選択ラベルが可能であるアミノ酸を明らかとした。そ

これらのアミノ酸選択的 CS 実験を行った結果、近接残基対間に選択的な交差飽和の検出に成功した。この実験結果から、結晶構造に一致する近接残基対の同定に成功した。さらに、MD 計算において、ASCS 実験におけるエネルギー項を含めることで、結晶構造における複合体構造と同等の複合体モデル構造を構築することに成功した。

従来の NMR 法を用いた近接残基対の決定には、複合体状態における両分子の側鎖水素原子の NMR シグナルおよび、分子間 NOE シグナルの帰属が必要であり、その同定には非常に多くの時間を費やす。また、分子量の増大に伴って、シグナルの帰属はより困難となることから、複合体として 30kDa 程度までの分子量に解析が限られていた。しかしながら、本手法においては非常に煩雑である上記の帰属は必要とせず、比較的容易に行える、複合体状態におけるアクセプター側の主鎖アミド水素原子のみの帰属が必要であるため、これまでに困難であった 30kDa 以上の複合体においても解析が可能であると予想される。

(3) 細胞膜複合体相互作用解析のための NMR 試料調製法の開発

(3)-1. 哺乳細胞内におけるタンパク質間相互作用を観測するための新規 In-cell NMR 測定法の開発

[東大分室]

【序】

細胞の機能発現は、細胞外シグナルに応答した細胞内生体分子の相互作用ネットワークの変化により達成される。細胞内では、膜タンパク質や、細胞骨格、細胞小器官などの構造体が、様々なタンパク質や補因子を保持しており、機能的な複合体としてその役割を担っている。そのため、生命現象の発動をタンパク質間相互作用の観点で解析する場合、機能を発揮する環境にある、よりインタクトに近い状態を構造生物学的対象とすることが望まれる。しかし、一般的な構造生物学的な解析では、高い純度のサンプルが解析対象となり、精製過程を必要とするため、構造体やタンパク質複合体を維持したまま調製することは困難である。また、膜タンパク質は、界面活性剤中では安定性が著しく低下するため試料調製が問題となるケースが多い。その一方で NMR 法は、生体試料に対し非侵襲測定が可能であること、安定同位体標識により解析対象のみを選択的に観測可能であるという他の構造生物学的解析法にはない特長を持っている。そのため、細胞をそのまま用いて、細胞内におけるタンパク質の立体構造・相互作用解析への適用が可能である。特に、動物細胞内における高次生命現象を、インタクトに近い状態にて構造的に解析することができれば、創薬へと応用する道も開かれる。そこで、本研究では、哺乳細胞を用いて、細胞内におけるタンパク質-タンパク質間の相互作用を検出するための NMR 測定法の開発を目的とした。

【方法】

細胞内にてアミノ酸残基毎の NMR シグナルを観測するためには、安定同位体標識を施した観測対象タンパク質を数 $10 \cdot M$ 程度細胞内に存在させる必要がある。これまでに、大腸菌内に過剰発現させた場合、および *Xenopus laevis* oocyte 内に microinjection した場合において、細胞内 NMR シグナルの観測が報告されているが、いずれの方法も哺乳細胞に対する適用は困難であるため、新たな手法が必要となる。そこで特別な装置を必要とせず、様々な種類の哺乳細胞に対して適用可能な汎用性の高い手法として、セミインタクト細胞の調製に用いられる streptolysin O (SLO) に注目した。SLO は、cholesterol と結合して形質膜上にポアを形成する

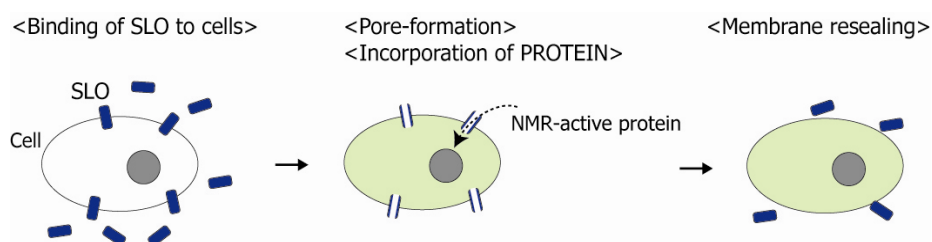


Fig.1 細胞調製方法の概略

細胞膜に対する SLO の結合、NMR 観測対象タンパク質 (あるいは、FITC 標識タンパク質) の導入、 Ca^{2+} 添加による細胞膜の再生 (resealing)、のステップから成る。

ため、細胞骨格や細胞内構造を保持した状態で、細胞質成分を自由に交換することができる。SLO が形成するポアの直径は約 30 nm であり、抗体 (150 kDa) や BSA (66 kDa) の導入が確認されているため、通常、NMR 観測対象となる 30 kDa 以下のタンパク質の導入は可能と考えられる。また、SLO により形成した形質膜上のポアは、細胞外に Ca^{2+} を添加することにより、再び塞がれる (reseal) ことが報告されている。そこで、SLO 処理と reseal を組み合わせることにより、細胞内部のみのタンパク質に由来する NMR シグナルを選択的に観測するための細胞調製方法の確立を目指した (Fig.1)。

細胞内にて NMR 観測および相互作用解析を行うためのモデル系として、細胞内に大量に存在する G-actin と相互作用する Thymosin-4 (T-4) を用いることとした。T-4 は、大腸菌により発現させ、精製したものをを用いた。細胞は、浮遊培養に適応させた 293F 細胞を用いた。

【結果および考察】

1. 細胞内 NMR 観測のための細胞試料の調製方法の確立

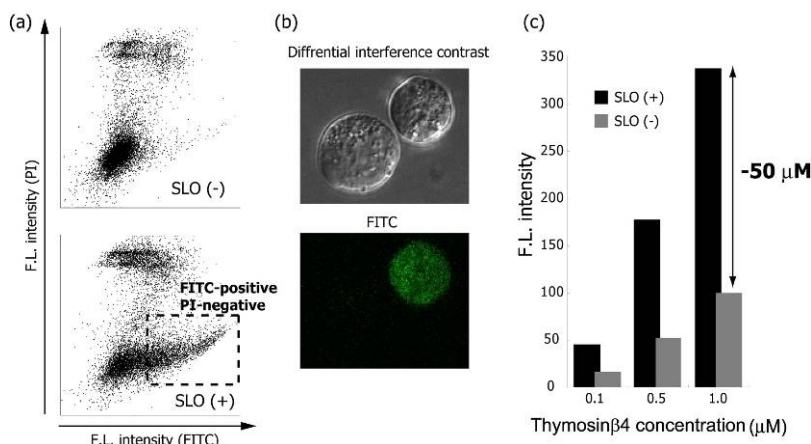


Fig.2 (a) 細胞調製時のフローサイトメトリーのプロファイル。SLO 非添加時(上)、SLO 添加時(下)。破線枠内の領域の細胞が、Tβ4 が導入された細胞集団を示す。(b) 細胞内に導入した Tβ4 の蛍光顕微鏡像。右上の細胞に FITC-Tβ4 が導入されている。(c) 細胞内 Tβ4 導入量の見積もり。横軸は、導入時に細胞外に添加した Tβ4 濃度を示す。SLO 非添加時と添加時の蛍光強度の差から、細胞内 Tβ4 導入量を算出した。

まず、 10^7 個程度の大量の細胞を SLO 処理し、NMR 観測可能な分子数の T・4 を導入するための細胞の調製条件を、Fluorescein isothiocyanate (FITC) にて蛍光標識した T・4 の導入を指標として検討した。Resealing の成否は、細胞調製後に、細胞膜非透過性の核染色試薬である Propidium iodide (PI) を添加して、染色されるか否かにて判断した。フローサイトメトリーにて FITC-positive/PI-negative の細胞集団が最も多く得られる条件を決定した (Fig.2a)。また、導入した FITC 標識 T・4 を共焦点蛍光顕微鏡にて観測した結果、細胞質内に分布していたことから、細胞内 actin と相互作用可能な状態にて存在することが示された (Fig.2b)。次に、細胞内 T・4 導入量の見積もりを行った。SLO 非添加時と添加時の FITC の蛍光強度 (蛍光波長 518 nm) の差より FITC-T・4 導入量を算出した結果、細胞内濃度の平均は $50 \cdot M$ 程度であったことから、NMR 測定に適用可能な量の T・4 が細胞内に導入されたと判断した (Fig.2c)。最適化した条件を用いて [$ul-^{15}N$] T・4 を導入した細胞の $^1H-^{15}N$ HSQC スペクトルを測定した結果、12 時間

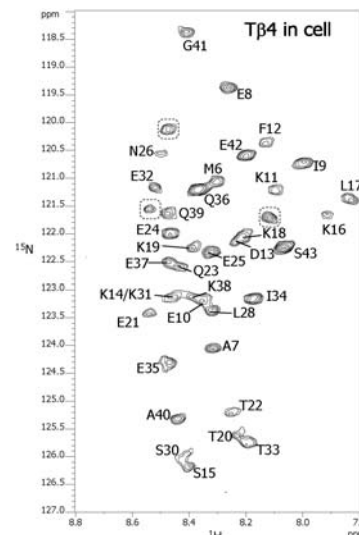


Fig.3 細胞内 Tβ4 の $^1H-^{15}N$ HSQC スペクトル
 図中、破線にて囲んだシグナルは、緩衝液中にて観測されるシグナルと、顕著に異なる化学シフトを与えている。その他のシグナルについては、同程度の化学シフトであったため、帰属を入れている。

の測定にて十分な S/N 比のスペクトルが観測された (Fig.3)。測定後の細胞をスピンドウンした後の上清成分の NMR スペクトルを測定した結果、細胞を用いた測定時と比較してシグナル面積が、1/10 程度であったことから、細胞を用いた場合に観測されたスペクトルは、細胞内に存在する T・4 に由来すると考えた。

2. 細胞内に導入した Thymosin・4 と内在性 G-actin との間の相互作用の検出

細胞内に導入した T・4 が、内在性の G-actin と相互作用しているか明らかにするため、細胞内 T・4 と緩衝液中 T・4 のスペクトル間における、各アミノ酸残基の化学シフト変化量を調べた

(Fig.4a)。両者間にて異なる化学シフトを与える原因として、G-actin との相互作用に加え、細胞質と緩衝液との pH・イオン強度の違いなど、さまざまな要因が考えられる。そこで、T・4 に対する G-actin の NMR 滴定実験を行い、各シグナルの化学シフト変化のパターンを比較した。生体内には ATP 型 G-actin (G_T)、ADP 型 G-actin (G_D) が存在しているため、それぞれを $[ul-^{15}N]$ T・4 に対して滴定した。

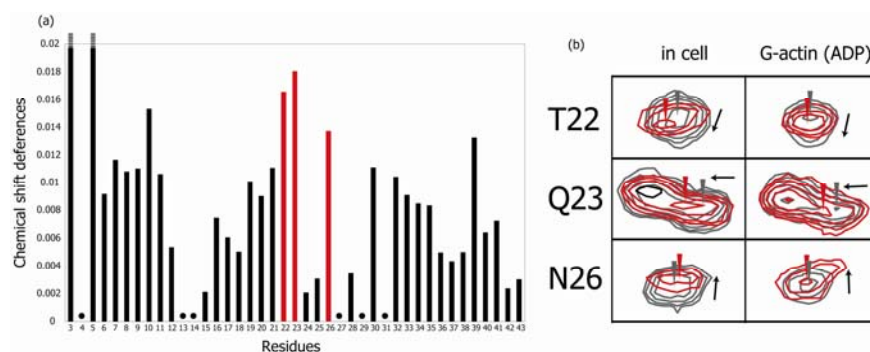


Fig.4 (a) 細胞内 Tβ4 と緩衝液 (pH6.1)中 Tβ4 間の化学シフト変化量。黒丸は、プロリン残基あるいは、シグナルが縮重したアミノ酸残基を示す。

(b) 細胞内にて観測された化学シフト変化と、ADP 型 G-actin 添加時に観測された化学シフト変化の様子の比較。G-actin 非存在下のシグナルを灰色にて示した。化学シフト変化の方向を矢印にて示した。

G_T の結合に伴う化学シフト変化は、NMR タイムスケールと比較して遅い交換であり、0.1 ppm 以上離れた位置に複合体に由来する広幅化したシグナルが新たに観測された。一方、 G_D の結合に伴う化学シフト変化は、NMR タイムスケールと比較して速い交換であり、50 \cdot M T・4 に対して 10 \cdot M G_D を滴定した結果、Q23, N26 にて最も大きな化学シフト変化が観測された。添加時に観測された化学シフト変化のパターンを調べた結果、細胞内 T・4 の NMR スペクトル中にて比較的大きな化学シフト変化が観測された T22, Q23, N26 にてその変化パターンがよく一致した (Fig.4b)。この結果は、細胞内に導入した T・4 が、T22-N26 を含む領域を介して G_D と相互作用していることを示す。一方で、T・4 の N 末端領域 (a.a. K3-K11) に集中して観測される 0.01 ppm 以上の比較的大きな化学シフト変化が、 G_D 滴定時には観測されていないことから、G-actin との結合以外の要因の存在が示唆される。

3. 細胞内に導入した Thymosin・4 の N 末端アセチル化修飾

生体内に発現した T・4 は、翻訳開始メチオニンが切断され、N 末端となったセリン残基がアセチル化修飾を受ける。そのため、細胞内に導入した T・4 の N 末端領域に観測された化学シフト変化が、細胞内における T・4 の N 末端アセチル化を反映している可能性を検証した。化学合成したアセチル化 T・4 の $^1H-^{15}N$ HSQC スペクトルを測定し、細胞内にて測定した T・4 のスペクトルと比較した。その結果、両者に共通して K3, D5 の顕著な化学シフト変化と、1 個の新たなシグナルが観測された (Fig.5a)。この結果は、細胞内に導入した T・4 において N 末端のアセチル化が進行したことを示す。また、アセチル化による各アミノ酸残基の化学シフト変化量を調べた結果、アセチル化によって、E10 までの N 末端領域に比較的大きな化学シフト変化が誘起されており、細胞内にて観測された N 末端領域の化学シフト変化を説明する (Fig.5b)。

【総括】

本研究において、哺乳細胞内にタンパク質を導入し、細胞内にて NMR 解析するための細胞試料の調製方法を確立した。まず、細胞内に導入した T β 4 に由来する NMR シグナルの観測に成功し、T β 4 が内在性の ADP 型 G-actin と相互作用していることも示した。さらに、細胞内に導入した T β 4 が細胞内で N 末端のアセチル化修飾を受けることも判明した。以上の結果は、導入した T β 4 の NMR シグナルがインタクトに近い環境にて観測されていることを示す。したがって本手法を適用することにより、生体内の状態を保ったまま、膜タンパク質やタンパク質複合体とリガンドとの間の相互作用解析が可能と考える。また、今回観測されたアセチル化のみならず、リン酸化など翻訳後修飾をアミノ酸残基レベルにて経時的・定量的な解析を行う上でも有用な手法であると考え

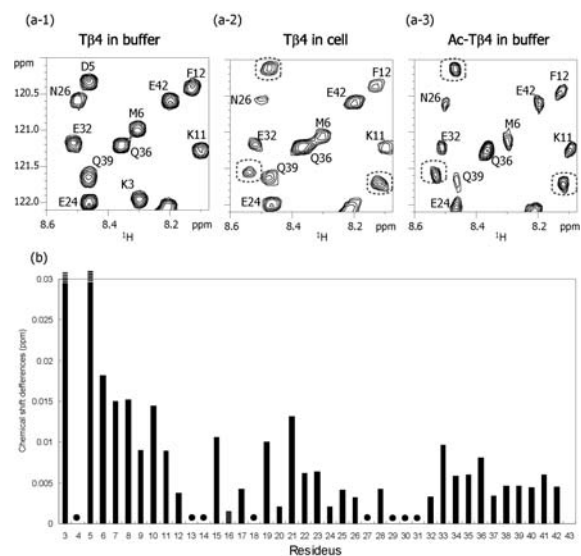


Fig.5 (a-1) 緩衝液中、(a-2) 細胞内における T β 4 のスペクトル。(a-3) 緩衝液中における N 末端アセチル化 T β 4 のスペクトル。破線枠内は、T β 4 を細胞内に導入した場合に、新たな化学シフト値に観測されたシグナルを示す。(b) N 末端アセチル化による化学シフト変化。黒丸は、プロリン残基あるいは、シグナルが縮重したアミノ酸残基を示す。

(3)-2. ケモカイン受容体 CCR5—リガンド間相互作用に関する構造生物学的解析法の確立

〔東大分室〕

【序】

CC-chemokine receptor 5 (CCR5) は、G タンパク質共役型受容体 (GPCRs) ファミリーに属する膜タンパク質である。CCR5 とそのリガンド (MIP-1 α , MIP-1 β , and RANTES など) 間相互作用は、G タンパク質を介したシグナル伝達を介して CCR5 を発現した白血球の遊走を引き起こす。加えて、CCR5 は HIV-1 の共受容体であることが報告されている。したがって、CCR5—リガンド間の相互作用機構を構造生物学的に解明することは、抗 HIV 薬の開発において重要である。しかし、その重要性にもかかわらず、CCR5 の構造生物学的解析は困難である。その原因は、CCR5 が生体膜から可溶化した状態において非常に不安定であり、生体内における機能を保った状態における大量調製法が確立していないためである。

CCR5 は可溶化した状態では不安定であるが、可溶化した状態から脂質二重膜中に再構成することにより安定性が向上する可能性がある。脂質二重膜再構成法の一つとして、近年報告された再構成 HDL (rHDL)がある。rHDL は、直径約 10 nm の脂質二重膜の周囲を、両親媒性 α -helix に富む apolipoprotein A-I (Apo A-I) 2 分子により囲まれた構造を持ち、脂質二重膜の内部に膜タンパク質を再構成することができる。rHDL は水溶性であり粒子径が均一であるという特徴から、構造生物学的解析にも適用可能であると考えられる。本研究では、rHDL を用いて溶液 NMR 解析に適した膜タンパク質再構成法の確立を行い、TCS 法を用いて CCR5 とそのリガンド間相互作用解析法の確立を目指した。

【結果】

1. rHDL 中に再構成した CCR5 の大量調製および性状解析

CCR5 はバキュロウイルス—昆虫細胞発現系を用いて Sf9 細胞により発現した。CCR5 を発現した細胞を超音波破碎した後、シヨ糖密度勾配遠心を用いて細胞膜画分を調製した。

CCR5 は、可溶化状態において急速に失活するため、可溶化した状態での精製は困難である。そこで、CCR5 が可溶化状態にある時間を短縮するため、rHDL による脂質二重膜再構成を導入し、以下の新規試料調製法を考案した (Fig. 1)。まず、CCR5 を発現した昆虫細胞膜画分を 1 % n-dodecyl- β -D-maltopyranoside (DDM) により可溶化した。これに Apo A-I を加え、DDM を除去することにより、CCR5 を脂質二重膜を含む rHDL 粒子中に再構成した。CCR5 を含む rHDL は、Ni アフィニティークロマトグラフィーおよび 1D4 抗体クロマトグラフィーにより精製した。

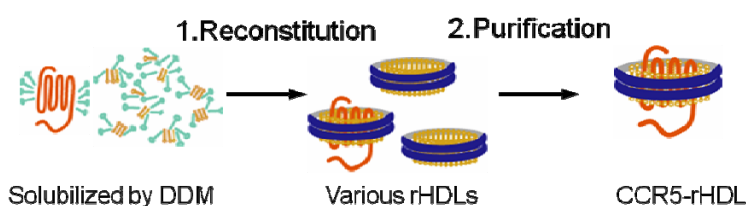


Fig. 1 rHDL 中に再構成した CCR5 新規調製法の概念図

界面活性剤による可溶化の直後に脂質二重膜再構成を行い、その後精製するという方法を考案した。

rHDL に再構成した CCR5 の純度は、SDS-PAGE 解析からおおよそ 80 % であった (Fig. 2)。また、rHDL に含まれる CCR5 の収量は、昆虫細胞 1 L 培養あたり約 10 \cdot g であった。

再構成した CCR5 がリガンド結合活性を持つことを確認するため、プルダウンアッセイを行った。CCR5-rHDL を固定したカラム上に、MIP-1 \cdot が保持されたことから、CCR5-rHDL が MIP-1 \cdot 結合活性を持つことがわかった (Fig. 3)。さらに、再構成した CCR5 が精製した G $_i$ タンパク質と共役することを確認するため、GDP-GTP 交換アッセイを行った。その結果、MIP-1 \cdot の濃度依存的に G $_i$ サブユニット上における GDP-GTP 交換が促進されることがわかった (Fig. 4)。

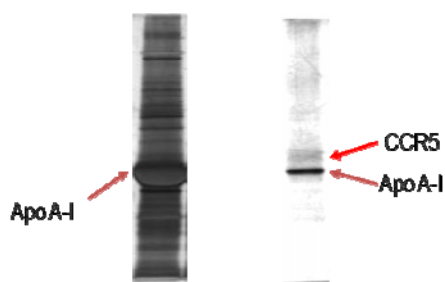


Fig. 2 CCR5-rHDL の精製前後の純度比較 (SDS-PAGE/銀染色)

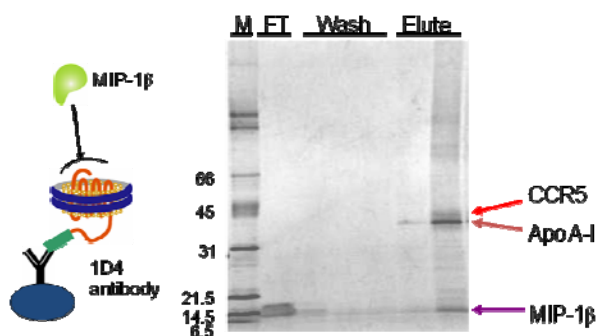


Fig. 3 CCR5-rHDL と MIP-1 β を用いた pull down assay

(左) 実験概念図

(右) 各溶出フラクションに対する SDS-PAGE 解析 (銀染色)

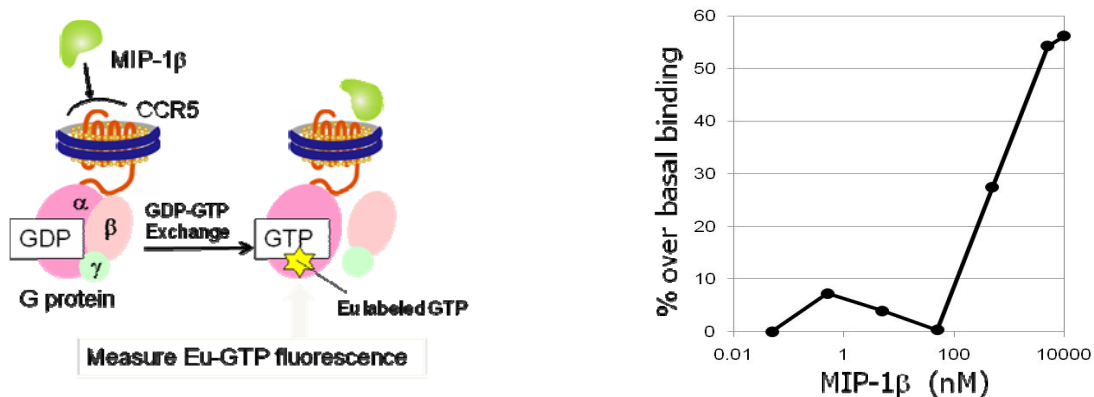


Fig. 4 rHDL に再構成した CCR5 のシグナル伝達活性に関する評価 (GDP-GTP 交換アッセイ)
 (左) 実験概念図 : MIP-1 \cdot 刺激を受けた CCR5 からのシグナル伝達により GTP 結合型となった G $\beta\gamma$ サブユニット量を、Eu 標識した GTP の蛍光強度をもとに評価した。(右) MIP-1 \cdot 濃度に対して、Eu 標識 GTP 蛍光強度の変化をプロットした。MIP-1 \cdot 濃度の増加に伴う、Eu-GTP 蛍光強度の増加を観測した。

加えて、rHDL の脂質二重膜中に再構成した CCR5 の安定性について、構造認識抗体 2D7 に対する結合活性を指標とした評価を行った。まず、昆虫細胞膜画分から 1 % DDM を用いて可溶化したミセル状態の CCR5 の安定性を調べたところ、4 $^{\circ}$ C 24 時間後で 2D7 結合活性が 10 % 未満に低下した。これに対し、rHDL 中に再構成した CCR5 では、4 $^{\circ}$ C 24 時間後にもとの活性の 85 % を保持していた。(Fig. 5)

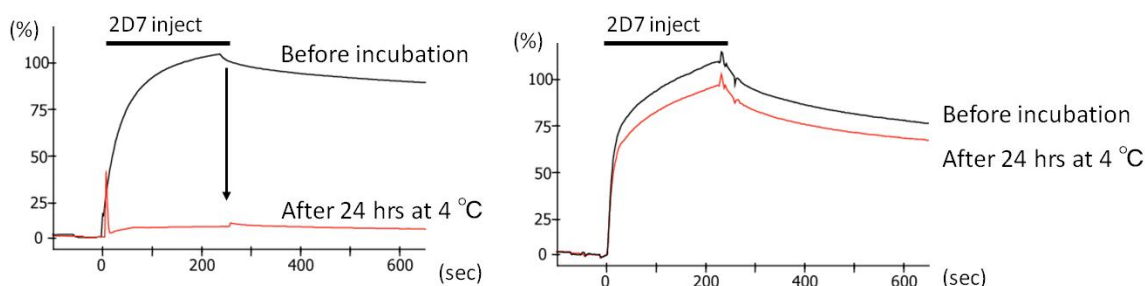


Fig. 5 DDM ミセルおよび rHDL 中における CCR5 の安定性比較
 センサーチップ上に CCR5 を固定し、2D7 抗体をアナライトとした際のレスポンスを示す。
 左) DDM ミセルにおける CCR5 は 24 時間後の 2D7 抗体結合量が 10 % 以下に減少した。
 右) rHDL 脂質二重膜中に再構成した CCR5 は 24 時間後に約 85 % の 2D7 抗体結合量を保持していた。

2. CCR5-rHDL と MIP-1 \cdot 変異体を用いた TCS 実験

CCR5—MIP-1 \cdot 間相互作用に関する構造生物学的知見を得るため、TCS 実験を行った (Fig. 6)。低濃度の CCR5-rHDL を用いて結合界面を同定

するために、高感度のメチル検出型 TCS 実験を適用した。Ile \cdot Leu \cdot Val のメチル基に選択的に 1 H, 13 C が導入された重水素化 MIP-1 \cdot (P8A/F13Y/E67Q) 10 \cdot M に対し、約 1 \cdot M の非標識の CCR5-rHDL を添加した試料を調製した。CCR5-rHDL の芳香族プロトンラジオ波照射した場合に、CCR5-rHDL との結合に起因する MIP

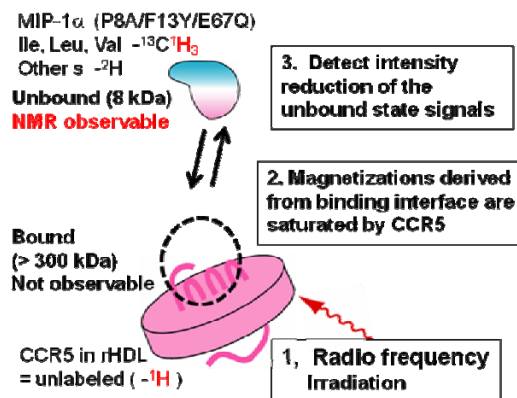


Fig. 6 CCR5-rHDL—MIP-1 α 間相互作用解析における TCS 実験の概念図
 ラジオ波の照射を照射した非標識の CCR5-rHDL に結合することにより、飽和が伝播し、MIP-1 α の NMR シグナル強度が減少する。

調べた。rHDL への非特異的結合の影響を見積もるコントロール実験として、CCR5 を含まない rHDL を用いた TCS 実験も行った。その結果、MIP-1 \cdot V59 の H \cdot シグナルにおいて、ラジオ波照射時に顕著なシグナル強度減少が観測された。この結果は、コントロール実験と比較して有意であり、V59 が CCR5 との結合界面に存在することを示している。

(Fig. 7)

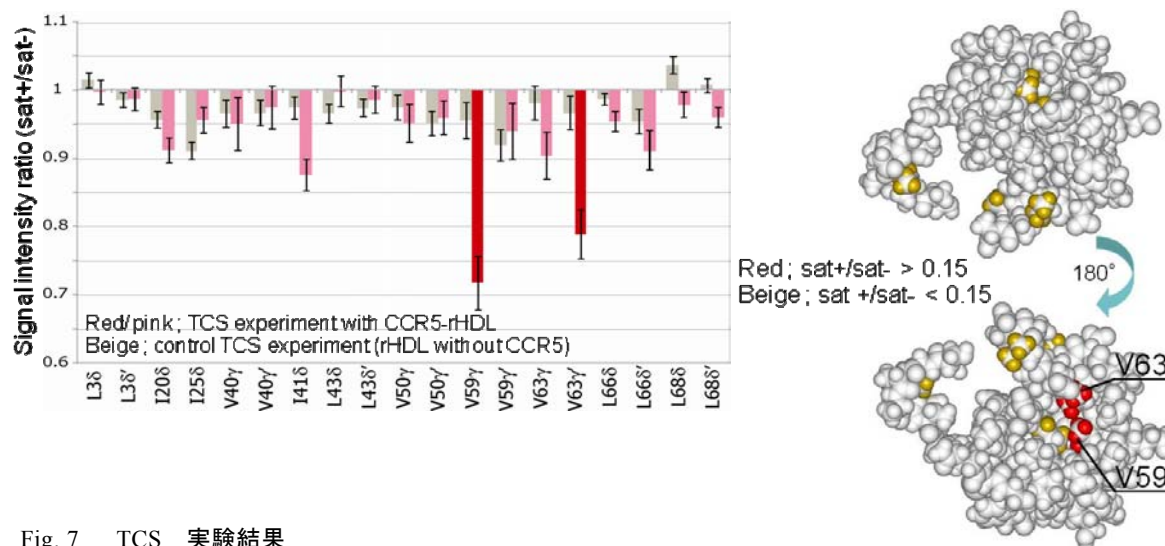


Fig. 7 TCS 実験結果

(左) 観測対象としたメチルプロトンの、ラジオ波照射によるシグナル強度減少比のプロット

(右) MIP-1 α 分子構造上における、シグナル強度減少が観測されたメチルプロトン(V59・V63) のマッピング

【考察】

本研究では、CCR5 の Sf9 細胞による大量発現および rHDL 脂質二重膜中への再構成を行った。rHDL に再構成した CCR5 は、リガンド結合活性およびシグナル伝達活性を持つことを示した。したがって、rHDL に再構成した CCR5 は生体膜中と同様の環境にあるといえる。

TCS 実験の結果から、MIP-1 \cdot の V59 が CCR5 との結合界面に含まれることが新たに示唆された。この領域については、CCR5 との相互作用に関する変異体解析が報告されていない。TCS 実験は、変異体解析が困難な疎水性領域に対して相互作用情報を得る手段としても有効であると考えられる。

以上から、本研究で確立した試料調製法と TCS 実験を組み合わせることにより、CCR5 とリガンド間の相互作用において構造生物学的解析が可能となった。この手法は、他の様々な GPCR においても、リガンドおよび細胞内エフェクター分子との相互作用解析へと応用が期待できる。

(4) 細胞膜複合体相互作用解析のための NMR 解析法の開発

(4)-1. HR-MAS を用いた膜蛋白質複合体における分子間相互作用の新規構造生物学的解析法の開発

[東大分室]

【序】

膜蛋白質の機能発現メカニズムを明らかにするためには、膜タンパク質・リガンド相互作用の解

明が必要である。従来の構造生物学的手法では、膜蛋白質は界面活性剤により可溶化された状態で解析されてきた。しかし、膜蛋白質は界面活性剤ミセル中でしばしばその高次構造が不安定化することが知られており、活性を保持した状態での試料調製法が必要とされる。

これまでに我々は、膜蛋白質をアフィニティビーズに固定化した状態で脂質二重膜中に再構成する”bead-linked proteoliposome (BPL)”を開発し、NMRを用いた相互作用解析法である転位交差飽和(TCS)法との併用により、カリウムチャンネルとその阻害毒素の複合体解析に成功した(Yokogawa M. *et al.* J. Am. Chem. Soc 2005)。しかし、ビーズなどの不溶性成分の混在により局所磁場が不均一となり、NMRシグナルが大きく広幅化するため、観測対象蛋白質は40残基程度に制限されていた。また、脂質二重膜中の膜蛋白質のように運動性の低下した分子においては双極子-双極子(DD)相互作用が亢進しており、TCS法において結合界面に観測される交差飽和がその周辺に拡散し、結合界面が明確に同定できない可能性が懸念されていた。

このような問題に対し、局所磁場の不均一性を解消しDD相互作用を減弱するマジック角高速回転(MAS, Fig.1 左)の適用により、スペクトルを高分解能・高感度化すると同時に、スピン拡散の抑制による明確な結合界面の同定が可能になると考えた。

そこで本研究では、MAS条件下においてビーズに固定化した蛋白質と溶液中の蛋白質の間(固液界面)における相互作用解析を可能とするNMR手法を確立することを目的とし、試料調製法の開発および交差飽和プロファイルに対するMASの効果の評価を行なった。

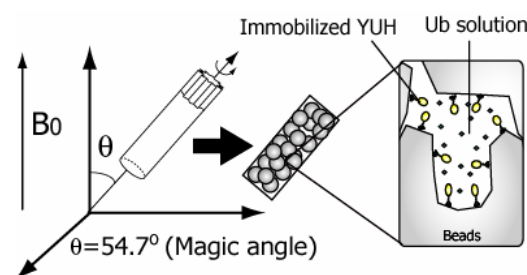


Fig. 1 MAS および MAS 試料内部の模式図

左：マジック角高速回転(MAS)とは、静磁場に対し、約 54.7°傾けた軸の周りに試料を高速回転することにより高分解能化を図る NMR 手法である。
右：YUH (黄色楕円) を固定化した多孔性シリカビーズを Ub (黒丸) 溶液に懸濁し、MAS 試料管に詰めた。

【方法】

解離定数(10 μ M)および複合体の立体構造が明らかとなっている Yeast ubiquitin (Ub: 8.6kDa)と Yeast ubiquitin hydrolase 1(YUH: 26kDa)の相互作用系を用いた。

1. 固定化担体・固定化方法の検討

固定化担体の材質として膨潤性セファロースと多孔性シリカ、固定化方法として His タグを介した Zn アフィニティビーズへの固定化法と、担体上のカルボキシメチル(CM)基に対してアミノ基を介して共有結合させる固定化法を検討し、担体の空隙率、非特異吸着の有無、YUH の固定化量、固定化された YUH の Ub 結合活性を解析した。

2. MAS による高感度・高分解能化の評価

ビーズと Ub の懸濁液の ^1H - ^{15}N HSQC スペクトルを MAS 適用時・非適用時に取得し、Ub 溶液単独の ^1H - ^{15}N HSQC スペクトルと比較することで、感度と分解能を評価した。

3. MAS 条件下の TCS 実験

2mM 均一 ^2H , ^{15}N 標識 Ub 溶液(50mM NaCl, 50mM NaPi, pH6.5, 80%D₂O)にて YUH 固定化ビーズを平衡化し、NMR 試料とし、25°C、回転速度 7000Hz にて TCS 実験を行ない、交差飽和プロファ

イルを取得した。

【結果】

1. MAS 条件下の TCS 実験に適した固定化担体・固定化方法を見出した。

固定化担体に関して、セファロースビーズはその膨潤性のために MAS の遠心力により円筒状の固相と Ub 溶液からなる内腔に分離した。一方、シリカビーズは MAS 回転後も均一に充填された状態を保持していた。さらに大きな比表面積により相互作用の場が確保されること、および 80% の高い空隙率により高感度測定が可能であることを見出し、固定化担体として多孔性シリカを採択した。

固定化方法に関して、Zn に対する His タグを介した固定化法では、YUH の Ub 結合活性の低下や Ub が Zn に対して非特異吸着することによる測定感度の低下および TCS 結果にアーティファクトが見られたのに対し、CM 基と YUH を共有結合させる固定化法によりこれらの問題が克服できることを見出し、固定化法として後者を採択した。

2. MAS の適用により NMR スペクトルの感度・分解能が約 6 倍向上した。

Ub の ^1H - ^{15}N HSQC スペクトルは、Ub 単独では ^1H 方向の線幅は 13Hz 程度であるのに対し、MAS 非適用時のシリカビーズ混在下では、局所磁場が不均一になることで ^1H の方向の線幅が 108Hz 程度まで広幅化し、観測可能な 72 残基中 42 残基が縮重していた (Fig. 2 赤)。一方、MAS の適用によりシグナルの ^1H の方向の線幅が 18Hz にまで先鋭化し、感度・分解能が約 6 倍向上した結果、縮重したシグナルは 6 残基にまで減少した (Fig. 2 青)

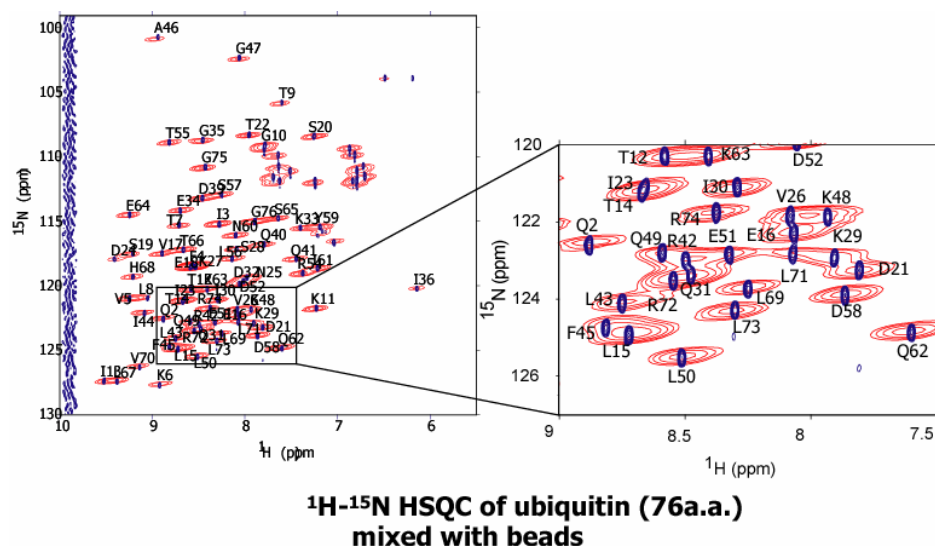


Fig. 2 silica beads 中の Ub の ^1H - ^{15}N HSQC スペクトルの重ね合わせ

(赤：非 MAS 条件下 青：MAS 条件下)

MAS の適用により ^1H 方向にシグナルが先鋭化し、縮重が解消されたことがわかる。

3. MAS 条件下の TCS 実験において、結合界面特異的な交差飽和の観測に成功した。

7000Hz の回転速度で TCS 実験を行ったところ、Ub の YUH 結合界面に顕著な交差飽和が観測され (Fig. 3 左)、Ub 上の YUH 結合界面を同定することに成功した (Fig. 3 右)。一部、結合界面周辺の残基への交差飽和も観測されている。蛋白質のビーズへの固定化に伴う YUH の運動性低下

により、複合体形成時に分子間での DD 相互作用が亢進しスピン拡散による強度減少が結合界面周辺残基に及んだと考えている。

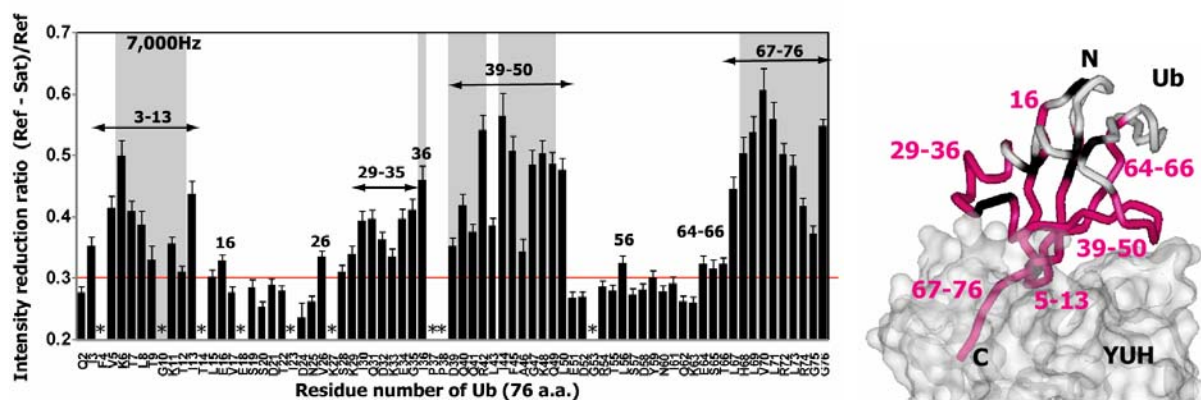


Fig. 3 MAS 回転速度 7kHz における交差飽和プロファイルと、大きな交差飽和が観測された残基の Ub-YUH 複合体の立体構造上へのマッピング。

左：横軸は Ub の残基番号、縦軸は YUH 非飽和時に対する YUH 飽和時の Ub のシグナル強度を表しており、理論上、交差飽和が観測される YUH から 5Å 以内に存在する Ub の残基をグレーの背景で示した。bar が長いほど、YUH からの交差飽和が大きいことを表している。(* は解析対象外の残基)

右： Ub-YUH 複合体の結晶構造に対するマッピング。

Ub を主鎖 tube 表示、YUH を表面表示にて示し、35%以上のシグナル強度減少を示した残基をマゼンタで示した。Ub の YUH に近接した残基が適切に同定されたことが分かる。(黒は解析対象外の残基)

【まとめ】

本研究により、固液界面の TCS 実験に対して MAS を適用することで、スペクトルが高感度・高分解能化するとともに、相互作用界面が明確に同定できることが示された。本手法は、BPLとして再構成した膜蛋白質の相互作用系に適用可能であり、脂質二重膜中の膜蛋白質の分子認識機構を解明する手法として期待される。

【今後の課題】

7000Hz の MAS 条件下の TCS 実験にて相互作用界面に特異的な交差飽和の観測に成功した一方で、MAS が DD 相互作用に与える影響に関してはより詳細に解析する必要がある。今後、静止条件下やより高速の回転速度にて TCS 実験を行ない、回転速度が DD 相互作用に与える影響を解析する。

(5) 創薬標的タンパク質の個別解析例

(5)-1. 転移交差飽和法を用いたケモカイン SDF-1 とその受容体 CXCR4 との相互作用解析

〔東大分室〕

【序】

ケモカインの1つである SDF-1 とその受容体 CXCR4 は、白血球の動態制御、造血、器官形成などの生理機能を有しており、また、ガンの転移や HIV-1 の感染など、多くの病態にも関係している。CXCR4 と SDF-1 との相互作用を特異的に阻害する薬剤を合理的に設計するには、両者の認識機構に関する原子レベルでの知見が必要となる。

先行研究における SDF-1 の変異体解析からは、SDF-1 の N 末端がシグナル伝達活性に必須である一方、受容体の親和性には SDF-1 の N 末端を除くコア領域が重要であることがわかっている。また、CXCR4 については、細胞外領域がリガンドとの親和性に重要である一方、膜貫通(TM) 領域がシグナル伝達に関与すると考えられている。このことから、CXCR4 と SDF-1 の間には、結合のみを担う相互作用 (SDF-1 コア領域-CXCR4 細胞外領域) と、シグナル伝達を担う相互作用 (SDF-1 N 末端-CXCR4 TM 領域) の、2 つの独立した相互作用が存在するという、2 段階仮説が提唱されている。しかし、この2種類の結合状態を示した知見はなく、これらの相互作用に関する原子レベルでの情報も得られていない。さらに、CXCR4 の N 末端に相当するペプチドと SDF-1 との相互作用解析はなされているものの、CXCR4 全長を用いた構造生物学的知見は皆無である。これは、CXCR4 が7回膜貫通構造をもつ G タンパク質共役型受容体 (GPCR) の1つであり、リコンビナント発現系や精製法の確立および結晶化がいずれもきわめて困難であることによる。

そこで、本研究では、SDF-1 上の CXCR4 相互作用部位の同定を行い、さらに、SDF-1 と CXCR4 との間に2つの独立した相互作用が存在するかを、構造生物学的に解明することを目的とした。

【方法および結果】

1. CXCR4 の発現・精製と性状解析

CXCR4 はバキュロウイルス-昆虫細胞発現系により発現し、ドデシルマルトシド (DDM) による可溶化後、C 末端に付加したエピトープタグを利用した抗体アフィニティー精製により精製した。SDS-PAGE 解析から、得られた CXCR4 の純度は 80 % 以上と見積もった。表面プラズモン共鳴 (SPR) 法による構造認識抗体 12G5 結合活性の解析から、得られた CXCR4 のうち約 50 % が正しくフォールドしていることを明らかとした。12G5 の結合量から見積もった、正しくフォールドした CXCR4 量は、1.5 L 培養あたり約 100 \cdot g であった。得られた CXCR4 が SDF-1 結合活性を有していることは、プルダウンアッセイにより確認した。さらに、SPR 法における 12G5 結合活性の解析から、低温に保持し、かつ glycerol を添加することが CXCR4 の安定性に必須であることが判明した。

2. 転移交差飽和法を用いた SDF-1 の CXCR4 相互作用部位同定

SDF-1 の CXCR4 相互作用部位を同定するため、安定同位体標識 SDF-1 (100 \cdot M) に対し、非標識 CXCR4 (10 \cdot M) を添加した条件で、転移交差飽和 (TCS) 法による解析をおこなった。低濃度の試料、低温、glycerol 存在下での解析を可能とするため、高感度検出に適したイソロイシン・

ロイシン・バリンのメチル基を選択的に¹H, ¹³C 標識してプローブとする、methyl-TCS 法を採用した。結合・解離の交換を促進し、解離状態の SDF-1 へ飽和を効率よく伝播させるため、シグナル伝達活性を保持している一方、野生型よりも CXCR4 に対する親和性が低い SDF-1 R8A/R12A 変異体を利用した。さらに、コントロール実験として、活性のある CXCR4 とほぼ等量の均一²H 標識野生型 SDF-1 を加え、特異的な相互作用のみを阻害した条件で TCS をおこなった。得られた結果をもとに、変性した CXCR4・DDM ミセル・不純物に由来する非特異的相互作用の影響を見積もった。

TCS 実験の結果、非特異的相互作用の影響を除いたシグナル強度減少幅 ($\Delta_{\text{reduction ratio}}$) が大きかった残基を SDF-1 構造上にマッピングした (Fig.1A)。シグナル強度減少幅が大きかった残基は、SDF-1 の N 末端 (V3, L5) に加えて、コア領域の半周にもおよぶ帯状の広い範囲 (V18, V23, L26, I28, L29, V39, V49, L55) に分布していた。したがって、この領域が SDF-1 の CXCR4 相互作用部位であると結論した。

3. SDF-1 の変異体解析

上述の TCS 解析結果は、先行研究における変異体解析から推測された領域に加え、コア領域の L55 を含むより広い範囲が、CXCR4 結合部位を形成することを示している。そこで、あらたに同定された結合部位の 1 つである L55 の近傍に変異導入し、THP-1 細胞を用いたケモタキシスアッセイにより評価した。その結果、L55 の近傍に位置する D52 への変異体 (D52A, D52S) は、受容体に対する親和性が低下していることが示された。

4. AMD3100 の SDF-1-CXCR4 相互作用に与える影響

さらに、SDF-1 と CXCR4 との相互作用様式を明らかにするため、CXCR4 の特異的なアンタゴニストである AMD3100 を用いた解析をおこなった。AMD3100 は CXCR4 の TM 領域に結合することが示されており、その SDF-1-CXCR4 相互作用に与える影響を解析することで、CXCR4 TM 領域をブロックした状態でも SDF-1 が結合しうるかを解析することができる。

まず、AMD3100 存在下にて上述と同様の TCS 解析をおこなった (Fig.1B)。その結果、SDF-1 のコア領域では AMD3100 添加前と同等のシグナル強度減少が観測されたものの、N 末端 (L3, V5)

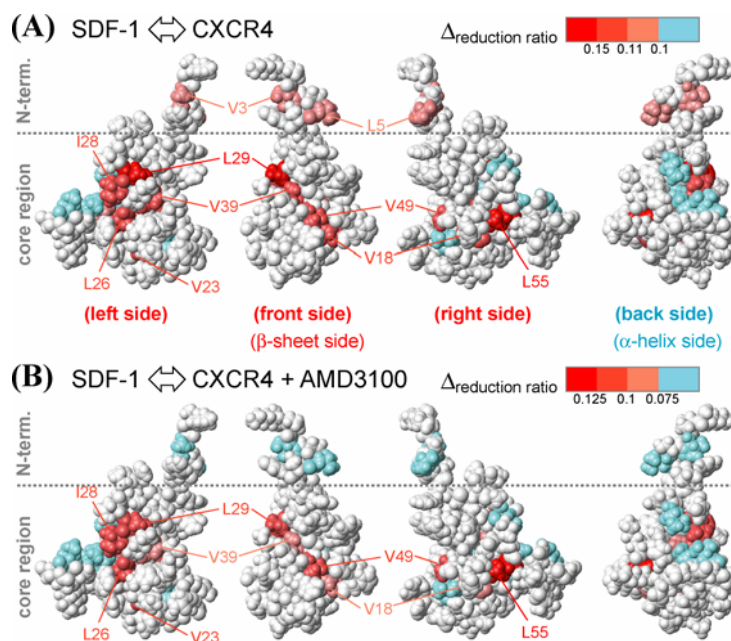


Fig.1 TCS 解析の結果

(A) SDF-1 の CXCR4 結合部位同定を目的としておこなった TCS 解析の結果。SDF-1 の構造を CPK 表示し、シグナル強度減少幅 ($\Delta_{\text{reduction ratio}}$) が大きいものを濃い赤～薄い赤、小さいものを青にて、残基ごとに色付けした。いずれも N 末端を上側に向け、コア領域の β -sheet を手前に向けたものを正面側、それとは逆の C 末端 α -helix を手間に向けたものを背面側とした。正面側から、左右に 90 度ずつ回転したものをそれぞれ、右面側および左面側とした。

(B) 1 mM AMD3100 存在下での TCS 解析の結果。(A) と同様に、SDF-1 の構造上に色付けして表示した。

のシグナル強度減少はほとんど観測されなくなった。このことは、AMD3100 存在下では SDF-1 N 末端は CXCR4 から解離しているものの、SDF-1 コア領域は依然として CXCR4 に結合しうることを意味する。

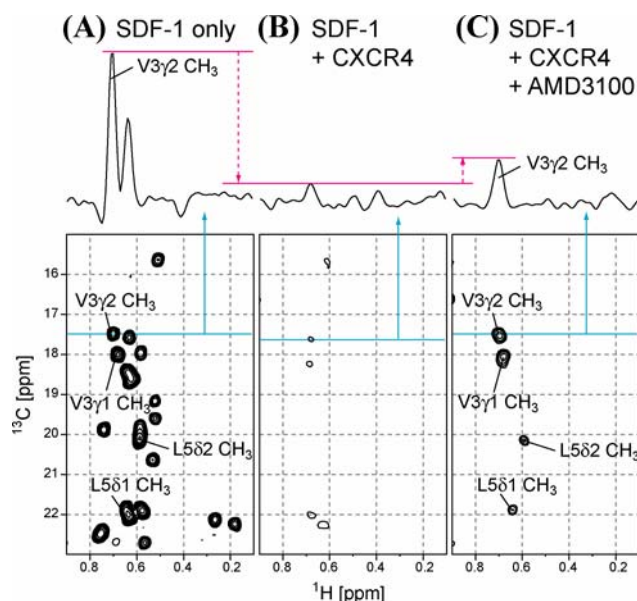


Fig.2 過剰量 CXCR4 存在下での

SDF-1 の NMR 解析

単独 (A)、過剰量 CXCR4 (20 μ M) 存在下 (B)、過剰量 CXCR4 および 1 mM AMD3100 存在下 (C) のロイシン・バリン選択的 ^1H , ^{13}C 標識 SDF-1 (10 μ M) の ^1H - ^{13}C HMQC スペクトル。スペクトルの上部には、それぞれのスペクトルの青線にて示した 1 次元の切り出しを示す。

さらに、過剰量の CXCR4 存在下で SDF-1 の NMR 測定をおこない、AMD3100 の影響を解析した。ロイシン・バリンのみを選択的に ^1H , ^{13}C 標識した遊離の SDF-1 の ^1H - ^{13}C HMQC スペクトル上では、13 個のロイシン・バリン残基に由来する 26 個のシグナルが観測された (Fig.2A)。これに過剰量の CXCR4 を添加したところ、すべてのシグナルが著しく強度減少した (Fig.2B)。このスペクトル変化は、SDF-1 が CXCR4 との複合体形成にともない、高分子量化したことを示している。さらに AMD3100 を添加したところ、N 末端 (V3, L5) に由来するシグナルのみ強度が回復して観測された (Fig.2C)。このことは、AMD3100 の添加にともない、SDF-1 の N 末端が CXCR4 から解離し運動性が上昇したことを示している。一方で、SDF-1 の N 末端を除くコア領域のシグナルは十分な強度で観測されず、実際に AMD3100 添加後も SDF-1 のコア領域は CXCR4 と相互作用していることが明らかとなった。

【考察】

1. SDF-1 上の CXCR4 相互作用部位

TCS 解析の結果から、SDF-1 の CXCR4 相互作用部位として、コア領域の広い範囲が寄与していることが明らかとなった。これらの領域には、塩基性残基 (R12, R47 など)、酸性残基 (E15, D52)、疎水性残基 (L29, V39, V49, L55 など) が分子表面に側鎖を向ける形で存在している。SDF-1 は他の多くのケモカインと異なり、受容体選択性が高いことが知られている。CXCR4 は、これら異なる性質をもつ多くの残基を組み合わせることで高い特異性を発揮していると考えた。

2. 2 段階結合モデル

今回の NMR 解析からは、AMD3100 は、SDF-1 の N 末端を CXCR4 から解離させるものの、SDF-1 コア領域の CXCR4 への結合への影響は小さいことが示された。AMD3100 が CXCR4 の TM 領域に結合することを考慮すると、SDF-1 の N 末端が CXCR4 の TM 領域に、SDF-1 のコア領域が CXCR4 の細胞外領域に、それぞれ独立に結合すると考えることが妥当である。この結果は、先

行研究にて推測された 2 段階の相互作用が実際に存在していることを、明確に示す知見といえる。

近年、複数の GPCR の X 線結晶構造が報告されており、低分子リガンドは、GPCR の TM 領域に存在する入り口の制限された cavity に結合することが示されている。同様の cavity 構造は、CXCR4 においても存在することが推測できるが、このような構造はケモカインのような比較的分子量の大きいリガンドの結合には不利である。上述の 2 段階の相互作用は、このような性質をもつケモカイン-ケモカイン受容体の相互作用に適しているといえる (Fig.3)。SDF-1 コア領域のみの独立した相互作用は、CXCR4 細胞外領域への迅速な結合とともに、効率よく SDF-1 を CXCR4 上につなぎとめておくことを可能とする。SDF-1 の N 末端は、この状態においても運動性が高く、効率よく結合空間を探索し、比較的狭い TM 領域の cavity への結合を促進する。

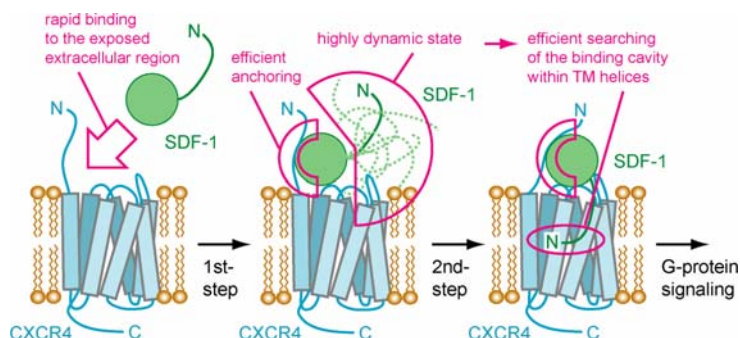


Fig.3 SDF-1 と CXCR4 の 2 段階相互作用
 2 段階相互作用モデルにおいては、まず SDF-1 のコア領域が CXCR4 の細胞外領域に結合する (1 段階目)。その後、運動性の高い SDF-1 の N 末端が、CXCR4 TM 領域に存在する cavity へ結合する (2 段階目)。さらに、TM 領域に構造変化が起こり、細胞内の G タンパク質へとシグナルが伝達される。

(5)-2. 白血球のローリングにおける CD44 リガンド結合ドメインの構造平衡

[東大分室]

【序および目的】

CD44 は細胞外マトリックスを構成するヒアルロン酸 (HA) に対する主要な受容体で、HA との相互作用を介して、内皮細胞上におけるローリングなどのリンパ球の動態制御に重要な役割を果たしている。CD44 は一回膜貫通型のタンパク質で、細胞外 N 末端側にある HA 結合ドメイン (HABD) を介してヒアルロン酸を認識する。HABD は、ヒアルロン酸結合タンパク質の間で保存された LINK モジュールとその N および C 末端に位置する付加配列領域からなり、その立体構造が NMR および X 線結晶構造解析から明らかとなっている (Teriete et al, *Mol Cell* 2004)。我々は HA 結合に伴う HABD の構造変化を解析し、HABD は C 末端領域が一定の構造を形成しない partially disordered (PD) form へと変化することを示した (Fig.1b, Takeda et al, *J Biol Chem* 2006)。しかし、2007 年に発表された HA 結合状態の X 線結晶構造では、C 末端領域が一定の構造を形成した ordered (O) form を

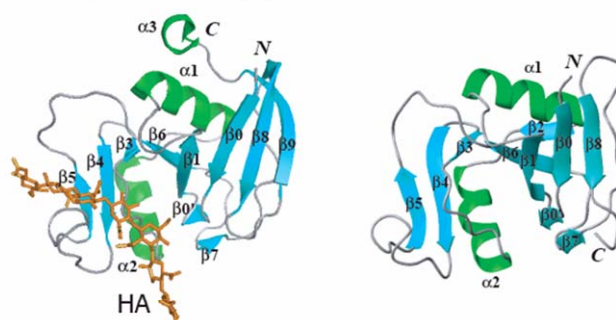


Fig.1 HA 結合状態の CD44 HABD の立体構造
 (a) HA8 が結合した状態の HABD の結晶構造 (PDB code: 2JCR)。
 (b) HA6 が結合した状態の NMR 構造 (PDB code: 2I83)。

形成しており (Fig.1a, Benerji et al, *Nat Struct Mol Biol.*, 2007)、HA 結合に伴って CD44 に構造変化が起こるか否かは不明である。そこで、本研究では CD44 の HA 結合に伴う構造変化についてさらなる解析を行い、CD44 の細胞接着能および血流下のローリング活性の制御機構を HABD の HA 認識に基づいて明らかにすることを目的とした。

【結果と考察】

1. 野生型の CD44 HABD には、リガンド結合の有無にかかわらず 2 状態の平衡にある。

HA 非結合時の CD44 HABD の ^1H - ^{15}N HSQC スペクトルには、O form に由来するシグナルに加えて、PD form に対応するマイナーなシグナルも同時に観測された (Fig.2a)。逆に HA 存在下の HABD のスペクトル上には PD form 由来のシグナルに加え、ordered form 由来のシグナルが観測された (Fig.2b)。さらに、2 状態間の交換をクロスピークとして観測する N_{zz} exchange 実験において、両シグナル間にクロスピークが観測された (Fig.2c)。よって、CD44 HABD は、リガンド非結合時において 2 状態間の平衡にあり、HA の結合は 2 状態間の平衡を PD form へシフトさせることが明らかとなった。以上の結果より、HA 結合状態の HABD の結晶構造は、溶液中にわずかに存在する O 状態を反映しており、生理的条件下の HABD は主に NMR 構造にて明らかとなった PD form を形成することが明らかとなった (Fig.2d)。

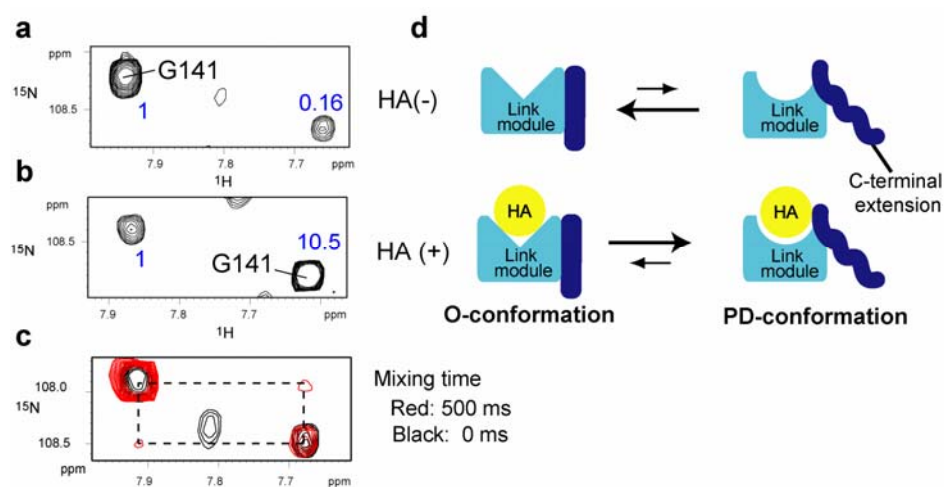


Fig.2 溶液中における HABD の 2 状態間の構造平衡

(a) リガンド非存在状態および(b)存在状態の HABD の G151 由来シグナル
(c) N_{zz} exchange 実験 (d) CD44 の HA 存在・非存在状態における構造平衡

2. Y161A 変異体は恒常的に PD form を形成し、HA に対して高親和性である。

O 状態の結晶構造には、リガンド結合部位から PD form でランダムコイル化する C 末端領域にかけて、水素結合のネットワークが形成されている (Fig.3a)。そこで、この相互作用の維持に特に重要な役割を果たすと予測される Y161 をアラニンに置換した変異体を作製し、その構造平衡がどのように変化するか調べた。HA 非存在下の Y161A の ^1H - ^{15}N HSQC スペクトルは、野生型と比較し大きな変化が観測されたことから、Y161A では分子全体にわたる構造変化が生じていることが明らかとなった (Fig.3b)。また、HA 存在下の野生型のスペクトルに観測される PD 状態由来のシグナルと Y161A のシグナルはよく一致した (Fig.3c)。また、Y161A のスペクトルには O 状態由来のシグナルが観測されないことから、平衡が完全に PD form にシフトしていると結論した。

次に Y161A HABD と野生型 HABD の HA 結合活性を SPR 法により解析した結果、Y161A は、野生型と比較して、7 倍高い HA 結合活性を有することが明らかとなった。野生型は、2 状態の平衡として存在するのに対して、Y161A 変異体は PD 状態としてのみ存在することから、O 状態よりも PD 状態の方が HA に対する親和性が高いことが示された。

3. Static な条件では細胞に発現した Y161A CD44 は野生型 CD44 と同程度の HA 結合活性を示す。

CD44 の構造平衡の生理的意義を明らかにするため、野生型 CD44 および Y161A CD44 の安定形質転換株を VMRC-LCD 細胞 (肺癌由来) を用いて調製した。フローサイトメトリーにより、同程度の発現量の細胞集団を選別し (Fig.4a)、ウェスタンブロッティングにより野生型と Y161A CD44 で糖鎖修飾などがほぼ同一であることを確認した (Fig.4b)。次に蛍光標識を施した HA との親和性を調べたところ、野生型、Y161 変異体ともに同程度の HA 結合能を示した (Fig.4c)。また、HA を固定化したプレートに対する、野生型および Y161A 変異体 CD44 発現細胞の接着を調べたところ、両者に有意な差は観測されなかった。よって、野生型と Y161A 変異体を発現する細胞の HA 接着能は、Static な条件では同等であると結論した (Fig.4d)。

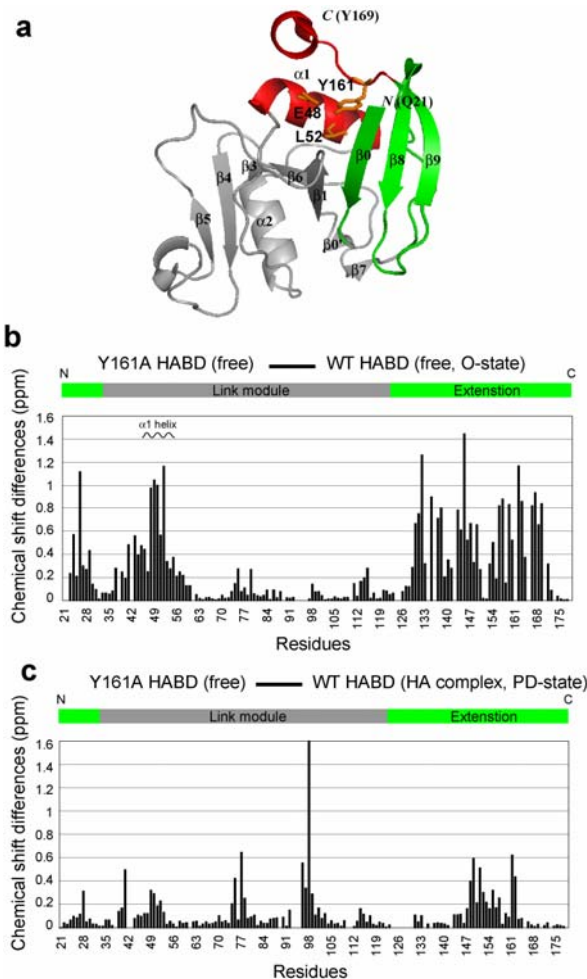
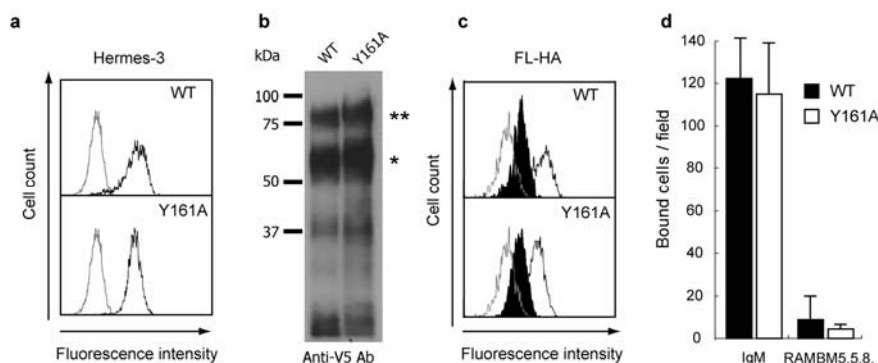


Fig.3 Y161A 変異体の構造

(a) O 状態の HABD における Y161A の位置 (b) リガンド非存在下および (c) 存在下の野生型 HABD と Y161A のシグナルの化学シフト変化



4. Shear stress 存在下において Y161A 変異体はローリング活性が損なわれる。

CD44 の構造平衡が、shear stress が存在する条件における細胞のローリング活性に影響を及ぼすか調べた。様々な shear stress 下において、HA を固定化したキャピラリーに CD44 発現細胞を還流させ、HA との相互作用によって生じる細胞のローリングの振る舞い(ローリング速度・細胞数)を調べた(Fig.5a)。その結果、野生型 CD44 発現細胞では、細胞のローリングが観測されたのに対し、Y161A 発現細胞では、ほとんどの細胞は接着後にローリングを示さず強い接着(Firm adhesion)のみを示した。また、ローリングや強い接着を示す細胞数は、すべての shear stress において Y161A 変異体よりも野生型 CD44 を発現する細胞のほうが多いことも明らかとなった(Fig.5a)。

5. Y161A 変異体は野生型よりも解離速度が遅く、Tether 形成効率が低い。

次に、細胞上の 1 分子の CD44 と HA との相互作用を調べるため、Transient tethering 実験を行った。Transient tether 実験では、低濃度の HA を固層化した条件において細胞を還流させるため、ローリングが観測されず、細胞上の 1 分子の CD44 と HA との相互作用に由来する一過的な接着の形成(transient tether)が観測される。一定時間における Tether 形成頻度を調べた結果、Y161A と比較して野生型の方が有意に tether 形成頻度が高いことが明らかとなった(Fig.5b)。また、tethering を示した細胞の滞在時間を tethering 細胞数の自然対数に対してプロットして、一次の解離速度定数を算出した。その結果、野生型と比較して Y161A 変異体では cellular off rate が低下していることが示された(Fig.5c)。野生型が主に形成する O 状態は、shear stress 下における新しい tether 形成に有利であり、また HA 結合状態においてもローリングに必要な速やかな解離に有利であると考えられる。O 状態を形成しない Y161A でローリングが観測されなかったことから、HA 結合状態における O 状態と PD 状態間の平衡が CD44 のローリングに重要な役割を果たしていると結論した。

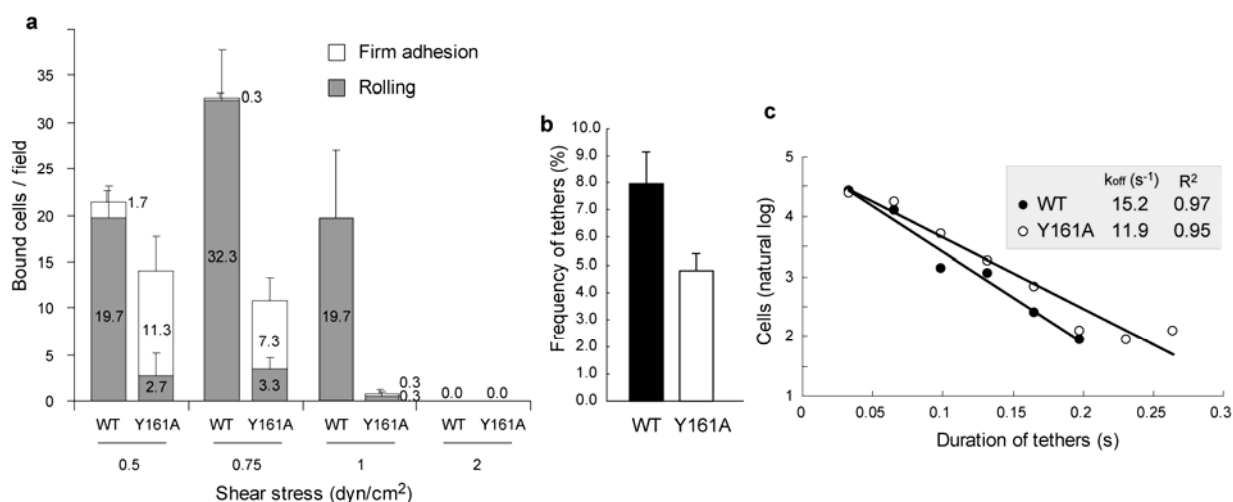


Fig.5 CD44 発現細胞のローリング活性の比較

(a) 野生型および Y161A 変異体 CD44 発現細胞のローリング活性とその shear 依存性。(b) Transient tether の形成頻度。(c) Transient tether の滞在時間に基づいた cellular off rate の見積もり

【参考文献】

Takeda M., Ogino S., Umemoto R., Sakakura M., Kajiwarra M., Sugahara KN, Kawashima H., Miyasaka M., Terasawa H., *Shimada I. (2006) Ligand-induced structural change of the CD44 hyaluronan-binding domain revealed by NMR. *J Biol Chem.* 281, 40089–40095.

(5)-3. Discoidin domain receptor 2 (DDR2) によるコラーゲン認識と活性化機構の解明

[東大分室]

【序】

Discoidin domain receptor 2 (DDR2) は、細胞外マトリックスの主要な構成成分であるコラーゲン線維をリガンドとする受容体型チロシンキナーゼ (RTK) であり、細胞の増殖、遊走などの生理機能や腫瘍細胞の転移、アテローム性動脈硬化などの疾患に関与している。DDR2 の活性化は、細胞外のディスコイジン (DS) ドメインとリガンドであるコラーゲンが結合することで誘起される (Fig.1)。我々はこれまでの研究において、DS ドメインの立体構造を解明し、転移交差飽和 (TCS) 法によりコラーゲン線維に対する結合残基を明らかとすることに成功した。しかしながら、DDR2 のコラーゲン結合様式を理解するためには、これらの知見に加えて DDR2 とコラーゲン複合体構造の解明が不可欠である。

また、DS ドメインへのコラーゲン結合により細胞内へとシグナルが伝達される機構は不明である。DDR2 は一般的な RTK とは異なり、リ

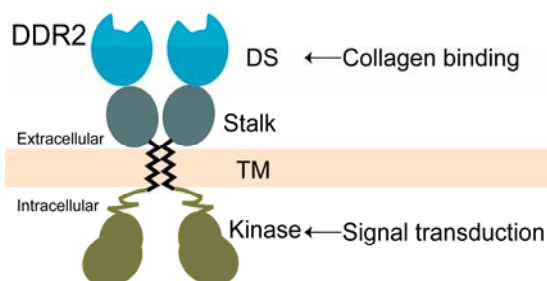


Fig.1 DDR2 ドメイン構造の模式図と各ドメインの機能
 DDR は DS ドメイン (アミノ酸番号: 30-185) によりコラーゲンと結合する。また、膜貫通領域 (TM) はコラーゲン非結合状態で二量体を形成している。

バンド非結合状態で膜貫通領域 (TM) が二量体を形成していることが報告されているため (Fig.1)、DDR2 の活性化機構の解明にはコラーゲン結合に伴う TM の構造情報を得ることが必要である。

本研究では、NMR 法により DDR2 とコラーゲンの複合体構造を解明し、システインスクランニング法により DDR2 の TM の二量体構造の解析を行った。

【結果と考察】

1.コラーゲン模倣ペプチドを用いたコラーゲン結合様式の解析

DDR2 はコラーゲンタイプ II の $^{394}\text{G}-^{405}\text{O}$ (O: 4-水酸化プロリン) 領域を認識することが報告されている。DDR2 の複合体構造解析には DDR2 結合配列を GPO の繰り返し配列で挟むことによりトリプルヘリックス構造を形成させたコラーゲン模倣ペプチド $(\text{GPO})_4$ - $^{394}\text{GPRGQOGVMGF}^{405}\text{O}-(\text{GPO})_4$ を用いた。SPR 法により DDR2-DS ドメインとの結合活性を解析したところ、野生型コラーゲンタイプ II と同程度の解離定数 $29 \cdot \text{M}$ を得た。また、TCS 法により同定した合成ペプチドに対する DS ドメインの結合界面は野生型コラーゲンタイプ II に対する結合界面とよく一致した。以上の結果から、DS ドメインはコラーゲン線維のうち一本のトリプルヘリックス鎖を認識することが判明した。そこで、ペプチドを用いて複合体の解析を以降行うこととした。

2. DS ドメインとコラーゲン複合体における距離情報の抽出

コラーゲンに対して DS ドメインが結合する配向を常磁性緩和促進 (PRE) 実験により決定した。DDR2 結合配列を含むコラーゲンペプチドの C 末端に、三量体構造を安定化させる foldon を付加したコンストラクト (FFCP: foldon fusion collagen peptide) を大腸菌にて調製後、Cys 残基へスピンラベル試薬 MTSL を導入した。スピンラベルなどのラジカル分子は近接する核スピンの緩和を促進し、周囲およそ 15\AA 以内に位置する原子の NMR シグナル強度を減少させる。DDR2 結合配列よりも N 末端側にスピンラベルを導入した場合にシグナル強度が減少した残基は、Fig. 2A 下側の領域に集中して存在した。一方、C 末端側にスピンラベルを導入した場合には、Fig. 2B 上側に存在する残基のシグナルが強度減少した。以上の結果から、DS ドメインの W52-G70 領域に対してコラーゲン

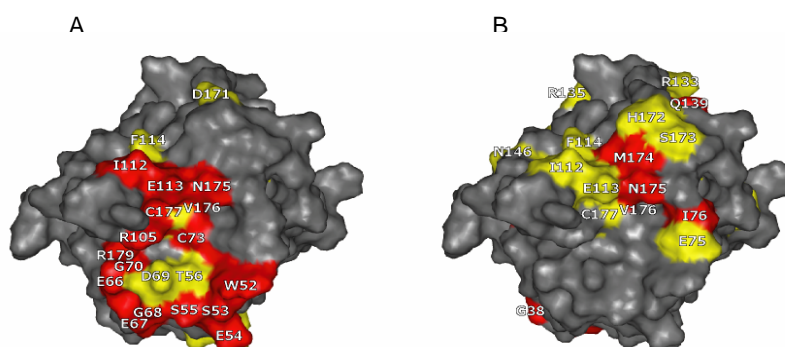


Fig. 2 A. N 末端側に MTSL 修飾した FFCP を用いた PRE 実験の結果。アスコルビン酸による還元前後のシグナル強度比に基づき DS ドメインの表面構造にマッピングした。赤: 強度比 0.74 以下, 黄: 0.74-0.8。B. C 末端側に MTSL 修飾した FFCP を用いた PRE 実験の結果。赤: 強度比 0.8 以下, 黄: 0.8-0.9。

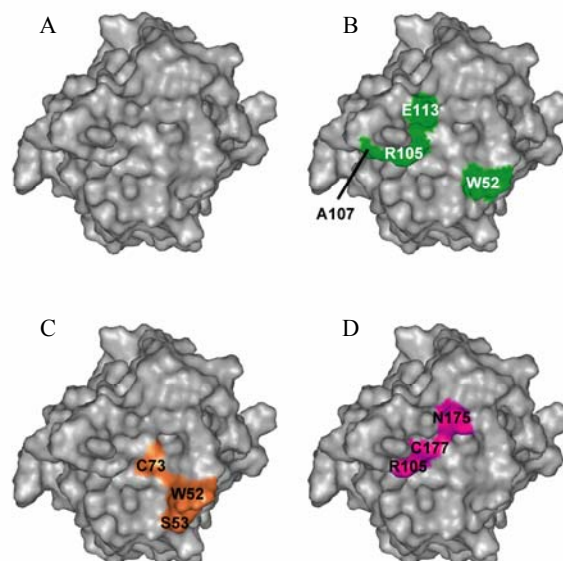


Fig. 3 Arg (A), Val (B), Met (C), Phe (D) 選択的 ^1H FFCP を用いた ASTCS 実験の結果。DS ドメインの表面構造に 0.2 以上のシグナル強度減少率を示した残基を色付けして示した。

が N 末端側を向けた配向で結合することが明らかとなった。

続いて、コラーゲンと DS ドメインの近接残基対をアミノ酸選択的転移交差飽和 (ASTCS) 法により決定した。ASTCS 法では、特定のアミノ酸のみに ^1H 標識を施した FFCP を用いて TCS 実験を行うことにより、当該アミノ酸からおよそ 5 Å 以内に存在する DS ドメイン上の残基を決定することが可能である。Arg, Val, Met, Phe についてアミノ酸選択的に ^1H 標識を施した FFCP を調製後、ASTCS 実験を行った。その結果、Arg 標識体については顕著な強度減少を示す残基は観測されなかったものの、Val 標識体では、W52 側鎖、A57、R105、R105 側鎖、A107、E113 が、Met 標識体では W52、W52 側鎖、S53、C73 が、Phe 標識体では R105 側鎖、N175 側鎖、C177 が 20% 以上顕著に強度減少した (Fig. 3)。 ^1H 標識したアミノ酸ごとに別々のコラーゲン結合残基のシグナルが強度減少したことから、アミノ酸選択的な距離情報を抽出できたと判断した。

3. DS ドメインとコラーゲンの複合体モデルの構築

次に、得られた実験結果に基づいて DS ドメインとコラーゲンの複合体モデル構造を中村チームによって開発されたドッキングプログラムにて作製した。DDR2 の 20 構造に対して、コラーゲンペプチドをドッキングさせ、各 300 の複合体構造を作成した。この 20x300 構造から ASTCS 実験の結果と定性的に合致する 119 構造を選び、疑似エネルギー項 E_{sat} を加えた分子動力学計算を行った。119 個の計算でサンプルされた構造のうち、 E_{sat} が小さく磁化変化 η が実験値とよく一致する構造を最終的な複合体構造とした。

得られた複合体構造において (Fig.4)、DDR2 結合への重要性が示されているコラーゲンの Met が、W52 と C73 で形成される疎水性領域と相互作用している。W52 に Ala 変異を導入すると、コラーゲンに対する結合親和性が 30 分の 1 に低下するため、W52 と Met の疎水性相互作用は重要であると考えた。同じく、相互作用に重要な Phe の側鎖が R105、C177 などの疎水性残基で形成されるくぼみに位置しており、嵩高で疎水性の芳香環が相互作用するのに適している。

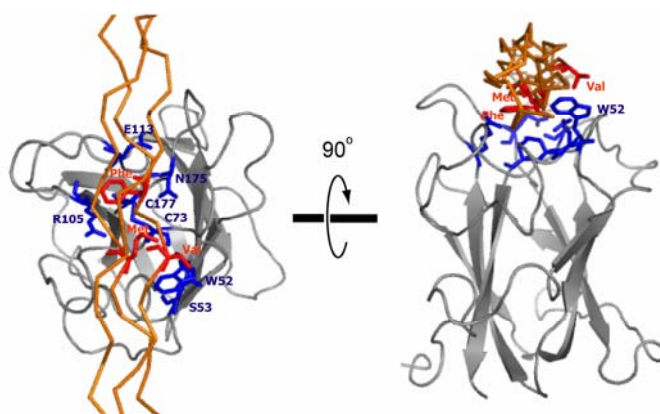


Fig.4 DS ドメインとコラーゲンペプチド複合体のモデル構造。相互作用に重要な残基について側鎖を表示した。

4. 膜貫通領域の二量体構造解析

膜貫通領域 (TM) の近接残基対は全長の DDR2 を用いて脂質二重膜中で解析する必要があるため、DDR2 を 293T 細胞に発現させ、システインスキニング法により解析した。システインスキニング実験では、DDR2 の特定の残基に Cys を導入し、SH 基を介したジスルフィド結合形成の有無をみることで、二量体中で当該残基が近接しているかを調べる。まず、

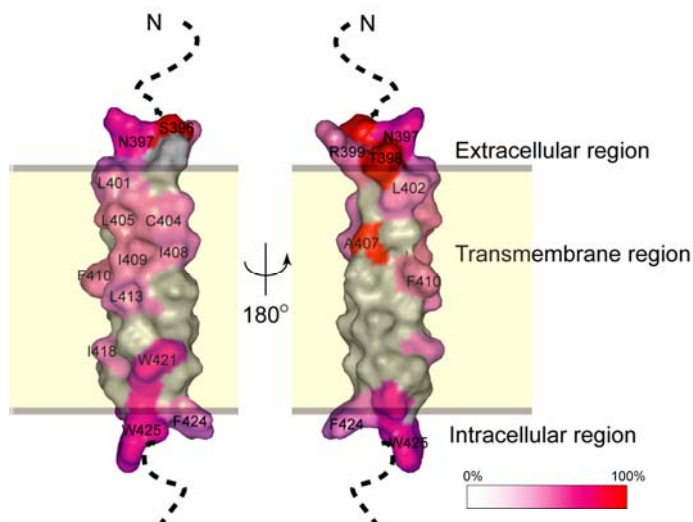


Fig. 5. DDR2 の TM とその近傍領域のシステインスキニング実験結果。 α -ヘリックスモデル構造上に、ジスルフィド形成効率が高い残基ほど濃い赤色にて示した。

DDR2 の内在性の遊離 Cys 残基に Ser 変異を導入した C288S/C404S 変異体に対して、TM とその近傍の残基について一残基ずつ Cys 変異を導入し、コラーゲン刺激によるリン酸化活性を確認した。コラーゲン非存在下におけるシステインスクヤニング実験の結果、細胞外領域 (P389-T398)、細胞内領域(Q423-W425) に関しては、K392C を除きすべての変異体がジスルフィド結合を形成した一方で、TM 領域の変異体は周期的にジスルフィド結合を形成した。これらの残基は TM ヘリックスモデル構造上で片側の面に局在したため、この面で二量体を形成すると考えた (Fig. 5)。一方、リガンド存在下において同様にシステインスクヤニング実験を行うと、TM 領域における周期性が消失した。この結果は、コラーゲン結合に伴って DDR2 の TM 領域に構造変化が生じていることを示し、コラーゲン非存在下において形成される TM 領域の二量体構造は、DDR2 の活性化を抑制していることが示唆される。

【総括】本研究では、NMR 法を用いた常磁性緩和促進実験およびアミノ酸選択的転移交差飽和実験により、コラーゲンと DDR2 の複合体構造を解明した。また、不活性状態における DDR2 膜貫通領域の二量体構造情報とコラーゲン結合に伴う構造変化を抽出することに成功した。今後、本研究において明らかとなった複合体構造に基づくコラーゲン結合阻害剤の設計や、TM 領域の二量体構造を安定化する薬剤の探索により、DDR2 活性化を阻害する抗腫瘍薬の開発へとつながっていくことを期待する。

【謝辞】

DDR2-DS ドメインとコラーゲンペプチド複合体のモデル構造の構築は、大阪大学・蛋白質研究所の中村春木教授、産総研・BIRC の金森英司研究員により行われた。

【参考文献】Ichikawa, O., Osawa, M., Nishida, N., Goshima, N., Nomura, N., Shimada, I. (2007) *EMBO J.*, **26**, 4168-4176.