

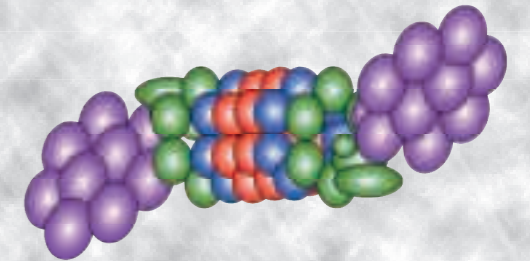
【プログラム】

- 10:00-10:10 文部科学省挨拶
- 10:10-10:30 **ターゲットタンパクプロジェクトの現状**
月原 富武 (兵庫県立大学)
- 【座長】 岩田 想 (京都大学)
- 10:30-11:30 **特別講演：Structure and Function of the G-protein Coupled Receptor Family**
Raymond C. Stevens (米国 SCRIPPS 研究所)
【解説】 岩田 想
- 11:30-12:30 ポスターセッション1
- 12:30-13:15 昼食
- 13:15-14:00 ポスターセッション2
- 【座長】 中島 春紫 (明治大学)
- 14:00-14:35 **フロリゲンはいかに花を咲かせるのか？：機能と構造からその謎に迫る**
島本 功 (奈良先端科学技術大学院大学)
- 【座長】 米田 悦啓 (大阪大学)
- 14:35-15:10 **創薬に繋がるV-ATPaseの構造、機能の解明**
村田 武士 (京都大学)
- 15:10-15:45 **タンパク質を膜透過させる分子装置**
濡木 理 (東京大学)
- 15:45-16:45 ポスターセッション3
- 【座長】 植田 弘師 (長崎大学)
- 16:45-17:20 **環境応答の分子・構造基盤**
山本 雅之 (東北大学)
- 17:20-17:55 **タンパク質の生産・解析・インシリコスクリーニングに基づく制御化合物創出への挑戦**
長野 哲雄 (東京大学)
- 17:55-18:00 閉会の挨拶
- 18:15-20:30 交流会

※プログラムは一部変更となる場合があります。

[平成20年度]ターゲットタンパク研究プログラム公開シンポジウム

ターゲットタンパク研究 プログラムから見える未来—2



東京国際フォーラムホールB5

平成21年1月15日(木)

予稿集

【お問い合わせ先】

株式会社クバプロ 〒102-0072 千代田区飯田橋3-11-15 UEDAビル 6階
TEL:03-3238-1689 FAX:03-3238-1837 E-mail:symposium@kuba.jp

ターゲットタンパクプロジェクトの現状

兵庫県立大学大学院生命理学研究科 月原 富武

「ターゲットタンパク研究プログラム」は、構造生物学の進歩を背景に平成19年度から5年間の予定で開始された。本プログラムは、「タンパク3000プロジェクト」や「タンパク質解析基盤技術開発」から産み出されている成果及び整備された基盤を最大限に活用しつつ、現在の技術水準では解明が極めて困難であるものの、学術研究や産業振興に欠かせない重要なタンパク質をターゲットに選定し、タンパク質の生産・解析・制御等を一体としてそれらの構造・機能解析を目指している。競争的資金制度の下に実施されるプログラムとして、タンパク質の構造・機能解析のための技術・研究開発10課題及び、基本的な生命の解明12課題、医学・薬学等への貢献10課題、食品・環境等の産業応用11課題を選定してタンパク質の構造・機能解明を行う研究を進めている。

本プログラムが実施されるに至った構造生物学の状況を振り返ることから、順次プログラムの内容を紹介したい。1960年前後に最初のタンパク質のX線構造解析が成功して以来、タンパク質の構造の研究は脈々と続けられて来た。その間タンパク質の生産・解析技術の進歩によって構造解析例は増えて、今日タンパク質データバンクに登録されているタンパク質の立体構造は5万を越えている。そして、タンパク質の構造研究は機能研究と一体化して展開されるのが通例になり、創薬等への応用にまで展開されるケースもでてきた。こうしたタンパク質立体構造の量的拡大は、新たな研究領域における構造研究の動機を呼び起こしている。そのことが、生命の基本原則の理解や医学・薬学及び食品・環境等への応用のために必要な構造を明らかにする本プログラムに繋がったと言える。

本プログラムは、従来の構造生物学の連続的な延長線上に設定されているように見えるが、構造研

究の実施において飛躍的な技術革新を必要としている。極端な言い方をすれば、これまでは構造決定できるタンパク質の構造を決定して、その結果を生命現象の理解に活かすという研究展開であった。一方、このたびのプログラムでは、生命の理解等に必要とする構造研究を、それが困難であろうとも実施するスタイルをとっている。このことは、タンパク質の生産・解析技術に対して厳しい要求を突きつけることになる。これらの技術がずいぶん進歩したとはいえ、まだまだ「可能な場合がある」という段階であり、「構造を必要に応じて決めることが可能」というにはほど遠い。この問題を克服するために、「タンパク質の構造・機能解析のための技術・研究開発」が独自の主要な課題として設定されている。

構造・機能研究の出口として増えてきた創薬などに足がかりを作る化合物ライブラリーを取り込んでいるのも、本プログラムの大きな特徴になっている。この化合物ライブラリーは単に構造・機能研究の出口としてのみならず、構造・機能研究そのものにも活用されている。

個々の研究の進展状況は本シンポジウムにおける口頭発表やポスターで詳しく報告される。ここでは、「技術・研究開発」と「構造・機能に関する個別研究」について概観する。「技術・研究開発」研究では、大きく分けて「タンパク質生産」と「構造解析法」がある。「タンパク質生産」では膜タンパク質、タンパク質複合体などこれまで成功例の少ないタンパク質の発現方法の開発が行われている。その結果、開発された技術が有効に適用されたケースもでてきており、中には成熟度の高い技術もでてきた。約1年半の研究期間であるが、実施者のこれまでの積み重ねの延長線上にある研究がなされているために、比較的順調に立ち上がっていると言え

る。しかし、これらの技術は「構造・機能に関する個別研究」からの要請に応える独創性のあるターゲットに適用されて初めて高く評価されるものである。まだこうした適用例は多くないが、今後増えることを期待したい。「構造解析法」では、X線結晶構造解析とNMR構造解析の研究がある。X線解析では微小結晶対応のビームライン、硫黄原子の異常散乱対応のビームラインの建設に取り組んでおり、3年間で完成する予定で着実に進んでいる。SAIL法によるNMR構造解析は成熟度の高い手法になっており、適用事例を増やすことが課題になっている。

「構造・機能に関する個別研究」はいずれも挑戦的な研究目標を設定している。それぞれの課題について、従来から継続して実施している場合と、これまで全く構造研究を行っていなかった生化学者が初めてタンパク質の結晶構造解析に取り組む場合がある。前者のケースでは既に、構造決定に成功しトップジャーナルに掲載された成功例もでてきた。後者のケースは3年間で構造決定にまで持ってゆくのは至難のことであるが、構造の研究者と機能の研究者が連携を強めて精力的に構造解析に向けて研究を展開している。困難が予想される研究課題が

殆どであり、3年間で決着がつくのは稀なケースかもしれないが、結晶を得ることに成功した事例もでてきた。今後の発展を長い目で見守る必要がある。

プログラム全体で研究をダイナミックに推進するためには、「技術開発」と「基本的生命」、「医学薬学」、「食品環境」の連携のみならず、各区分内での連携を強めることが必須である。そのために、情報プラットフォームを本プログラム推進の重要な課題に設定している。ポータルサイトを利用したプログラム内での情報交換も始まった。その他ホームページの構築は順調にされており、成果の増加とともにプログラム外への情報発信も一層活発になると期待できる。

プログラムで企画する種々の研究会等においては、研究代表者間だけでなく若手研究者が直接討論できる機会を多くするようにしている。これは、研究成果を挙げるだけでなく、研究を実施する過程で優れた若手研究者が輩出されることを願っていることによる。

公開シンポジウムはプログラムの研究について、広くご意見を頂く良い機会であり活発な討論を期待したい。



月原 富武 (つきはら とみたけ)

兵庫県立大学大学院生命理学研究科特任教授。理学博士。

1967年大阪大学薬学部製薬化学科卒業。69年大阪大学大学院理学研究科修士課程修了。71年鳥取大学工学部助手、73年鳥取大学工学部講師、78年鳥取大学工学部助教授、91年徳島大学工学部教授を経て、95年大阪大学蛋白質研究所教授。2008年3月大阪大学退職後、08年4月より現職。専門は蛋白質結晶学。特に生体超分子。87年日本結晶学会賞受賞。共著に『たんぱく質の姿、形とその働き』(大阪大学出版会)などがある。

Structure and Function of the G-protein Coupled Receptor Family

Department of Molecular Biology, The Scripps Research Institute
Raymond C. Stevens

G protein-coupled receptors comprise the largest family of human eukaryotic signal transduction proteins that communicate across the membrane. We recently solved the crystal structure of the human β_2 -adrenergic receptor bound to the partial inverse agonist carazolol and timolol at 2.4 Å and 2.8 resolution Å, respectively. More recently, we determined the structure of the human adenosine A2a receptor bound to the antagonists ZM281345 at 2.6 Å resolution. The structures provide a high-resolution view of a human G protein-coupled receptor bound to diffusible ligands. Ligand-binding site accessibility is enabled by the extracellular loops which are held

out of the binding cavity by a set of disulfide bridges and unique structural motifs. An exciting discovery is the role of cholesterol in receptor stability and potential function. Future studies include the determination of representative members from the different branches of the GPCR phylogenetic tree (Figure 1) including class A, B, and C GPCR's, as well as the receptors bound to agonists and G-proteins in an activated state.

This work was supported by the NIGMS Protein Structure Initiative (ATCG3D) and the NIH Roadmap Initiative (JCMPT).

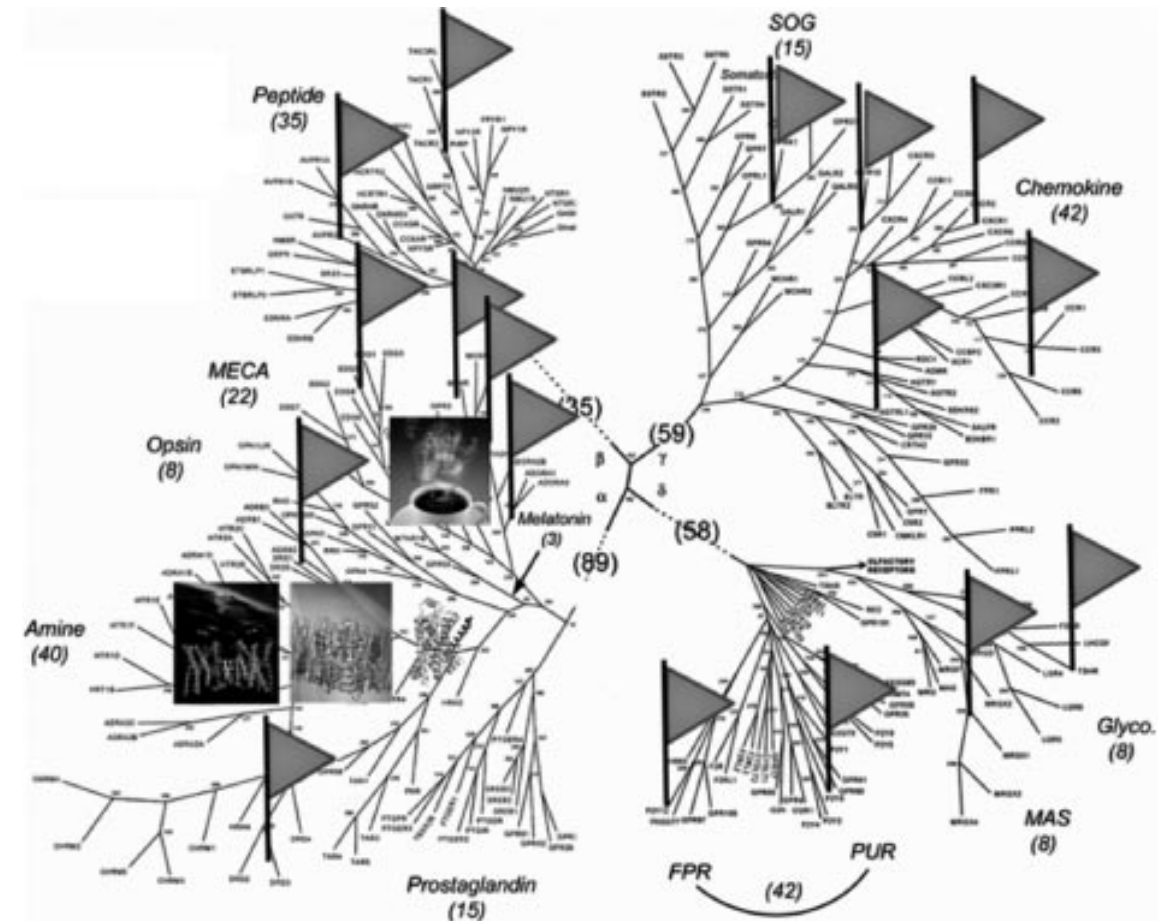


Figure 1. GPCR phylogenetic tree with green flags on the GPCR targets currently under structure investigation. Pictures are shown for the 4 structures currently known out of the several hundred class A GPCR's.



Raymond C. Stevens

Department of Molecular Biology, The Scripps Research Institute
10550 North Torrey Pines Road, La Jolla, CA 92037

Raymond Stevens is currently a Professor of Molecular Biology and Chemistry at The Scripps Research Institute in La Jolla, California where he focuses on understanding the basic principles of neurobiology and the associated disease states that affect mankind. After growing up in Maine and obtaining his B.A. degree there in 1986, Dr. Stevens obtained his Ph.D. in organic chemistry with Professors Robert Bau and George Olah (Nobel Prize 1994) at the University of Southern California in 1988 and conducted his post-doctoral research in structural biology with Professor William Lipscomb (Nobel Prize 1976) in the Chemistry Department at Harvard University. Prior to moving to Scripps in 1999, Dr. Stevens was a Professor of Chemistry and Neurobiology at the University of California, Berkeley. Dr. Stevens helped to pioneer the area of high throughput structural biology and has published more than 220 peer reviewed publications in the past 15 years, focusing primarily in the area of structural biology and structure based drug discovery including involvement in the development of TamiFlu™ for influenza, Phenoptin™ for mild phenylketonuria, Phenylase™ for classical phenylketonuria, and pegylated BoTox™ for neuromuscular disorders such as cerebral palsy. Dr. Stevens has received numerous awards for his research, including the Sidhu Award (1992), the National Science Foundation's Presidential Young Investigator Award (1994), Beckman Foundation's Young Investigator Award (1994), Lawrence Berkeley Laboratory Outstanding Performance Award (1995), Jouan Robotics Award (2003), and the USC Alumnus of the Year Award (2005). Dr. Stevens has also founded multiple biotech companies including Syrrx (acquired by Takeda), and MemRx (acquired by Chiron/Novartis) and NIH research centers including the Joint Center for Structural Genomics and the Joint Center for Innovative Membrane Protein Technologies. Most recently, Dr. Stevens has been successful in his 16 year quest to generate GPCR structural data to provide insight into the basic science and drug discovery of this important family of human receptors.

フロリゲンはいかに花を咲かせるのか?: 機能と構造からその謎に迫る

奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科 島本 功

1936年にロシアの科学者、Chailakhyanは短日植物であるキクを用いて、植物がどの器官で日長を感じ、花成を誘導しているのかを明らかにした。キクの茎頂付近もしくは葉にのみ光が当たるようにした植物を用いて、どちらの条件で花が誘導されたかを調べた結果、葉に光が当たるようにした場合のみ花成が誘導され、茎頂付近に光があたるようにした場合には、花の誘導が確認できなかった。この実験の結果は、植物が葉において日長を感じ取ることで、花成の誘導を促進していることを示している。また、日長を感じ取る場(葉)と実際に花成がおきる場(茎頂分裂組織)が空間的に離れていることから、花成を促進する日長におかれた植物の葉において花成を促進する何らかの物質が作られ、それが茎頂に運ばれることにより花成を促進していると考え、この物質のことを花成ホルモン、フロリゲン、と名づけた¹。

近年、長日植物であるシロイヌナズナと短日植

物であるイネの全ゲノム配列が解読され、モデル植物として分子遺伝学、分子生物学的な解析を行うことが可能になった。そして、光周性花成経路に関わる遺伝子の探索と特定およびその機能の解析が行われた。その結果、シロイヌナズナでは長日条件特異的にFT遺伝子²が、イネでは短日条件特異的にHd3a遺伝子³が発現することで、それぞれの光周性花成を誘導していることが明らかとなった。

イネ花成促進遺伝子Hd3aは、短日条件下に置かれたイネの明期開始時に発現のピークを示す日周変動を示し、長日条件下ではほとんど発現しない。またこの遺伝子をイネにおいて恒常的に発現させた形質転換体は早咲きの表現型を、発現を抑制した形質転換体は遅咲きの表現型を示す。イネにおいてどの組織でHd3a mRNAが発現しているのかを詳細に調べた結果、Hd3a mRNAはイネの葉でのみ高い発現が検出され、それ以外の組織特に茎頂分裂組織において発現はほとんど検出されなかった。次

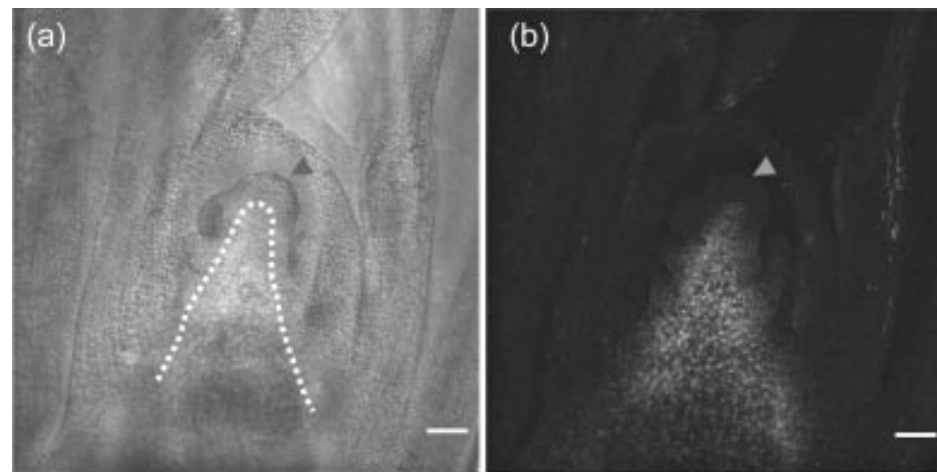


図1 形質転換イネの茎頂分裂組織およびその周辺部におけるHd3a-GFP融合タンパク質の局在。白線部で囲われた領域にHd3a:GFP融合タンパク質の蛍光が観察される。(a) 明視野像、(b) 蛍光像

に、Hd3aに蛍光タンパク質GFP遺伝子をつなげ、イネに導入した。この形質転換体を短日条件下で育成したところ野生型にくらべ、早咲きの表現型を示した。このことは、Hd3a-GFP融合タンパク質が花成の促進の機能を持つことを示している。続いて、Hd3a-GFPタンパク質の蛍光がイネのどの組織で観察されるか、形質転換体植物の茎頂分裂組織を含むように縦断切片を作製し、その切片をレーザー蛍光顕微鏡により観察した結果、Hd3a-GFPの蛍光は維管束周辺と思われる領域および茎頂分裂組織およびその周辺においてもHd3a-GFPの蛍

光が観察された(図1)。これらの結果から、この茎頂分裂組織で検出されたHd3a-GFPは維管束で発現したHd3a-GFPが茎頂分裂組織まで運ばれた結果である可能性が高いと考えられた⁴。

これらの結果を合わせ考えると、花成誘導条件の日長に置かれた植物体の葉の維管束で発現したHd3a/FT遺伝子は、翻訳されタンパク質となった後、維管束を通じて茎頂分裂組織近傍まで運ばれ、その後茎頂分裂組織まで移動し、他のタンパク質と相互作用し、花成を誘導していると考えられる(図2)。さらにこの結果は、これまで長年にわたり

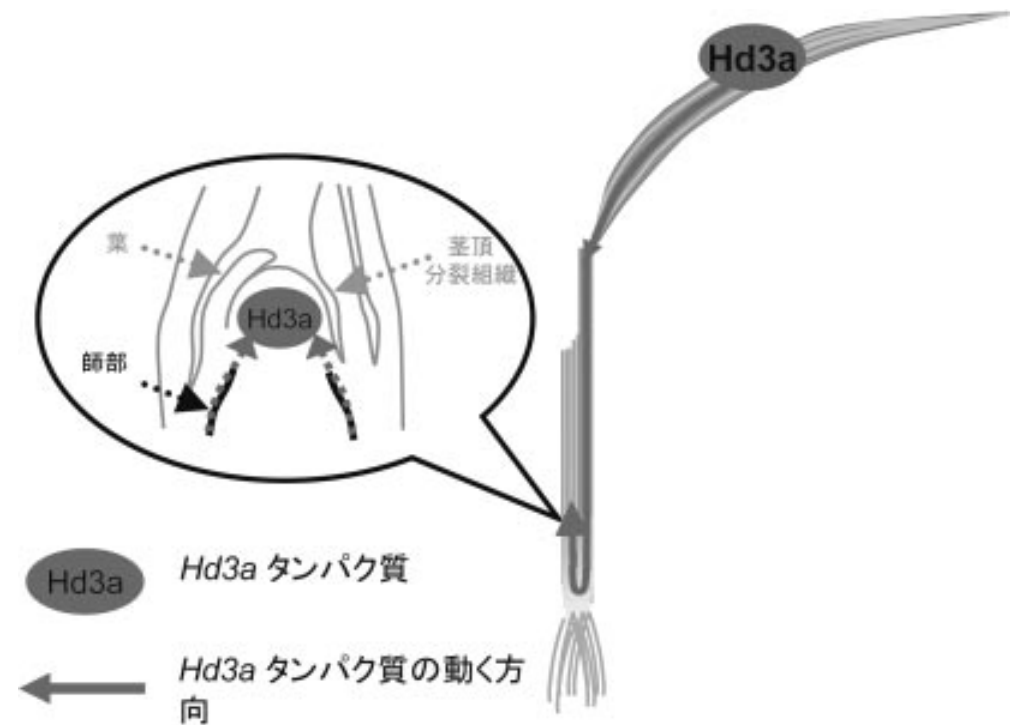


図2 イネの花成誘導モデル図

短日条件下で特異的に発現誘導されるHd3aは、タンパク質に翻訳されたのち、維管束組織を通じて茎頂分裂組織に運ばれ花成を誘導する。

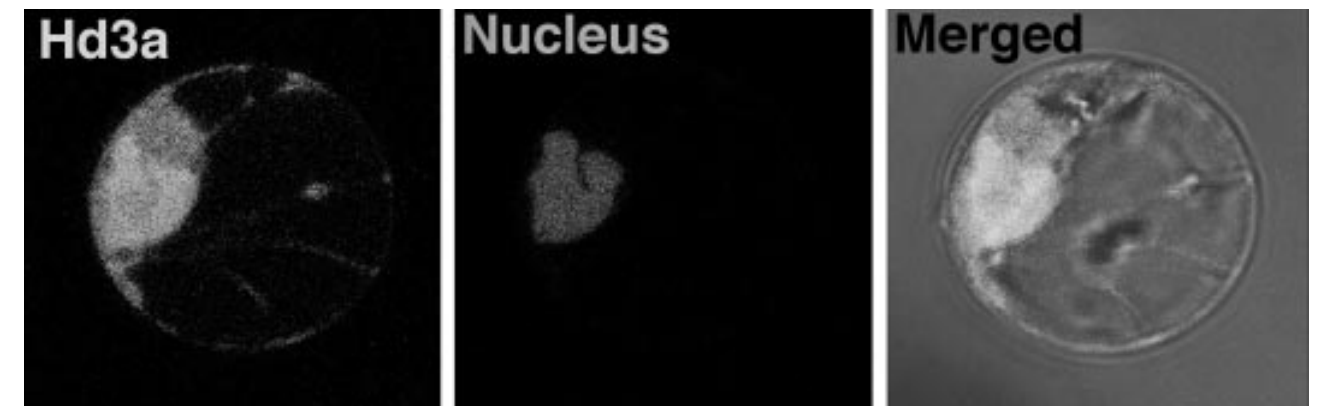


図3 Hd3a タンパク質の細胞内局在

Hd3a-mCherry融合タンパク質及び核のマーカとしてNLS-mOrangeをイネ培養細胞に一過的に発現させた。Hd3a-mCherryは核と細胞質の両方に局在する。(Hd3a)はHd3a-mCherry、(Nucleus)は核のマーカとしてNLS-mOrangeの蛍光を示す。(Merged)は両者の蛍光像と明視野像を合わせたもの。

創薬に繋がるV-ATPaseの構造、機能の解明

京都大学医学研究科／理化学研究所SSBC 村田 武士

実体が謎であったフロリゲンの実体がHd3a/FTタンパク質である可能性が高いことを示している^{4,5}。すなわち提唱されて以来70年を経てその実体が明らかになったわけである。

ではHd3a/FTフロリゲンはいかに花を咲かせるのか？その実体は分かったものの、フロリゲンが花を咲かせるメカニズムについてはまだほとんど分かっていない。我々はそのためHd3aと相互作用をするタンパク質の探索を行ってきた。その機能及びフロリゲンとの相互作用を現在解析中である。きわめて興味深いことに、フロリゲンが花を作るのみならず他の器官の形成にも関与するという結果が得られて

いる。また、フロリゲンは多くのタンパク質と相互作用をするということも明らかになって来た。そこで、現在Hd3aフロリゲンとその相互作用因子の構造に関して解析を行っている。これらの知見が明らかになることで、花を自在に咲かせたり、作物の開花・収穫をコントロールしたりする新しい技術が将来花開くことが期待できる。

1. Chailakhyan, M.K. *C.R. Acad. Sci. URSS* 13, 79 (1936).
2. Abe M. et al., *Science* 309, 1052 (2005).
3. Hayama Y. et al., *Nature* 422, 719 (2003).
4. Tamaki S. et al., *Science* 316, 1033 (2007).
5. Corbesier L. et al., *Science* 316, 1030 (2007).

要旨

V-ATPaseは、真核生物の空胞系膜に存在するプロトンポンプである。複雑なサブユニット構成からなる超分子複合体であり、親水性の触媒頭部部分（V₁部分）とH⁺輸送を担う膜内在性部分（V₀部分）から構成される（図1A）。回転触媒機構によりATPの加水分解エネルギーを使ってプロトンを小胞内に輸送し、内部を酸性化する。また、V-ATPaseは破骨細胞やガン細胞の細胞膜にも多く発現している。本酵素による酸性環境異常が骨粗鬆症やガン転移の原因の一つであり、その特異的阻害剤はこれら疾患の新しい治療薬として期待されている。このようにV-ATPaseは医学・生理学的にもエネルギー変換装置としても非常に興味深く、生体内で最も重要な酵素のひとつである。

我々は原核生物（バクテリア）にも類縁酵素が存在することを発見し、バクテリアV-ATPaseの分子

生物学・生化学・構造生物学的研究を展開してきた。本研究はターゲットタンパク質研究の「基本的生命の解明」分野に採択された。下記にその達成目標や研究体制、現在までに得られた成果について紹介する。

達成目標

本研究ではバクテリアV-ATPaseの構造・機能研究をさらに進め、V-ATPaseの分子メカニズムの解明を目指す（図1-B）。また、ヒトV-ATPaseサブユニットの構造・機能解析を行い、真核細胞V-ATPaseの多機能性や上記疾患などについて考察する（図1-C）。さらにバクテリアV-ATPaseのサブユニット構造を使ったインシリコスクリーニング、化合物ライブラリーからのスクリーニング、有機合成を行い、骨粗鬆症やガンの治療薬に繋がるV-ATPaseの特異的阻害剤の創出を目指す（図1-D）。

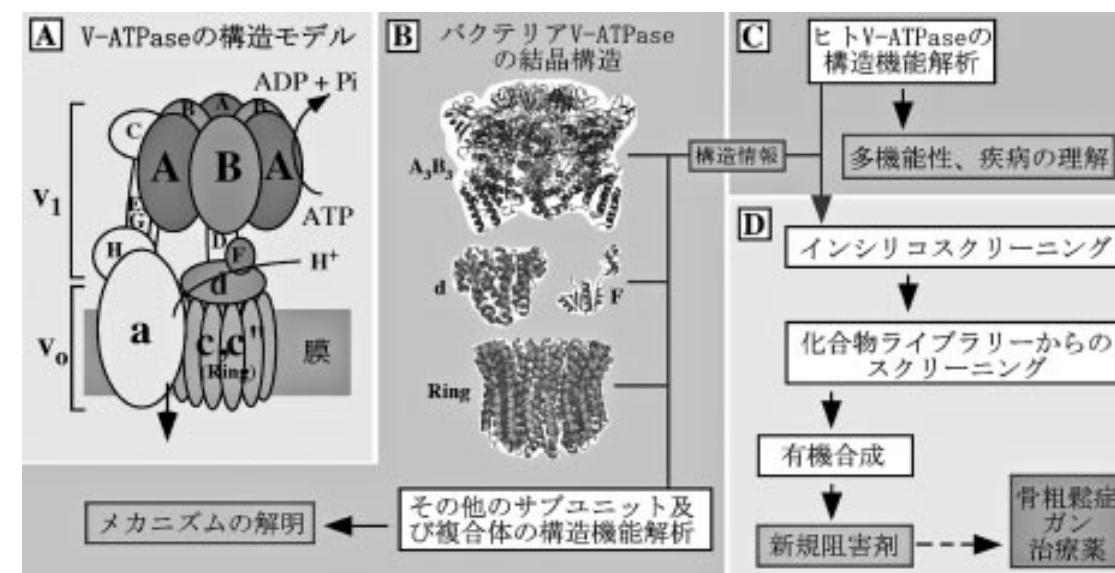


図1 研究の流れ



島本 功 (しまもと こう)

奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科教授。Ph.D.

1974年京都大学農学部農林生物学科卒業、80年ウイソコンシン大学遺伝学Ph.D.。スイスFriedrich Miescher研究所研究員、三菱化成植物工学研究所主任研究員を経て、94年より現職。

専門は植物分子遺伝学。特に花の咲くしくみ、植物が病気から身を守るしくみに関心をもつ。

1991年日本遺伝学会奨励賞、94年日本育種学会賞、2000年木原財団学術賞受賞。

著書（共著）に『Molecular Biology of Rice』（Springer、1999年）、『分子レベルからみた植物の耐病性』（秀潤社、2004年）、『植物における環境と生物ストレスに対する応答』（共立出版、2007年）などがある。

研究の連携体制

分担機関である理化学研究所でV-ATPaseの生産を行い、機能解析及び阻害剤のスクリーニング

を行う。精製標品を代表機関である京都大学に郵送し、結晶化及び構造解析を行う。その構造を基に分担機関である静岡県立大学で新規阻害剤の合成を行う。

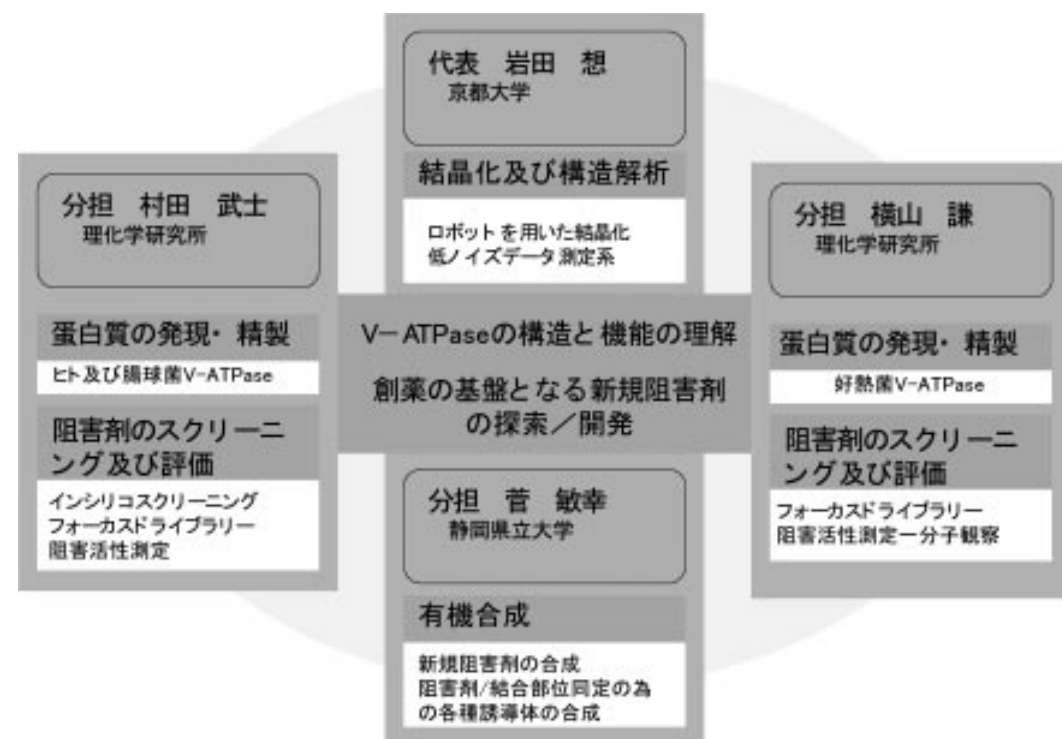


図2 研究の連携体制

研究成果

バクテリアV-ATPaseの分子メカニズムの解明 構造解析について

好熱菌由来V-ATPaseのA₃B₃複合体のX線結晶構造(2.5 Å分解能; R_{factor} 25%)をV-ATPaseとして初めて明らかにした(論文準備中)。また、EG複合体結晶の2.5 Å分解能でのデータ収集に成功し、構造解析を進めている。腸球菌由来V-ATPaseのEGa^N末ドメイン複合体のX線小角散乱による溶液構造を明らかにした(Yamamoto et al., *J. Biol. Chem.*, 283, 19422-31, 2008)。これらの構造情報を取り入れたV-ATPaseの全体構造モデルを図3に示す。

機能解析について

V-ATPaseの基本的な生化学的性質を明らかにするために、ATPの加水分解反応の1分子測定系を改良し、好熱菌由来V-ATPaseの酵素学的パラメーターを明らかにした(Nakano et al., *J. Biol. Chem.*, 283, 20789-20796, 2008)。さらに、ATP合

成活性測定系を確立し、膜電位がなくてもpH勾配だけで合成反応が起こることがわかった(Toei et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 104, 20256-20261, 2007)。イオン輸送メカニズムを明らかにする目的で、界面活性剤中での膜内リングへの²²Na⁺結合測定系を確立した。²²Na⁺結合・解離の酵素学的性質やLi⁺結合型膜内リングのX線結晶構造とNa⁺結合型の構造と比較することにより、本酵素のイオン選択性及びイオンの結合・解離のメカニズムを明らかにした(Murata et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 105, 8607-8612, 2008)。

ヒトV-ATPaseサブユニットの構造・機能解析

ヒトV-ATPaseの立体構造情報は報告されていない。我々はアイソフォームを含む全サブユニット(23種類)について、大腸菌無細胞タンパク質合成系を用いて発現のスクリーニングを行った。サブユニットD、F、d1、d2の大量発現・精製に成功し、それぞれ結晶化スクリーニングを行ったところ、サ

ブユニットDの結晶を得ることができた。今後は結晶化スクリーニングを継続し、良質の結晶が得られしだいX線結晶構造解析を行う。

V-ATPaseの特異的阻害剤の創出

既知V-ATPase阻害剤の阻害機構

F型V型の両ATPaseの阻害剤として知られる阻害剤DCCDと膜内リングとの共結晶構造及び上記で記載した²²Na⁺結合活性測定により、阻害機構を分子レベルで明らかにした(論文準備中)。環境ホルモンであるトリブチルチンクロライド(TBT)の阻害様式を1分子計測により解析し、ATP結合直後に起こるステップ回転を阻害することを示した

(Takeda et al., *Biophys. J.*, in press)。

化合物ライブラリーからのスクリーニング

バクテリアV-ATPaseのATPase活性阻害を指標に、制御領域が保有するすべての化合物(約8万種)からのスクリーニングを行っている。現在2万4千種類のスクリーニングが完了し、IC₅₀が10 μM以下の123種類の新規阻害剤を見いだした。現在、これら阻害剤と阻害剤結合候補の膜内リングとの共結晶構造解析を行っている。得られた構造を基にインシリコスクリーニングや有機合成を行い、創薬に繋がる新規阻害剤の開発を目指す。

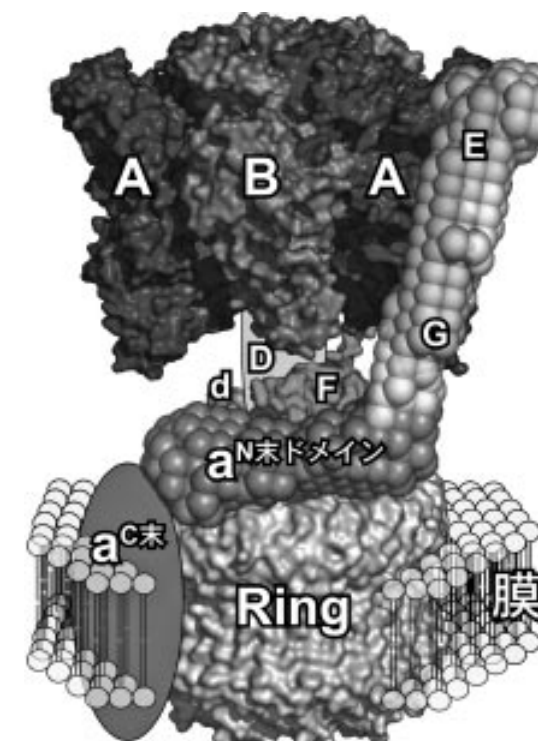


図3 V-ATPaseの構造モデル



村田 武士 (むらた たけし)

京都大学医学研究科分子細胞情報学助教/理化学研究所生命分子システム基盤研究領域客員研究員。工学博士。1995年東京理科大学基礎工学部生物工学科卒業。2000年東京理科大学大学院博士課程修了。2000年9月から05年3月まで日本学術振興会特別研究員、MRC postdoctoral fellow、日本学術振興会海外特別研究員として英国MRCにて博士研究員。05年4月理化学研究所基礎科学特別研究員を経て、07年7月より現職。JST ERATO 岩田プロジェクト・グループリーダー兼任。専門は構造生物学。特に膜タンパク質のX線結晶構造解析。学部生のときから現在までV-ATPaseの構造と機能の研究を継続し、筆頭著者としてJBC(7報)を中心にScience、PNAS等に研究成果を報告している。

タンパク質を膜透過させる分子装置

東京大学医科学研究所 濡木 理

タンパク質が生体内で適切に機能するためには、タンパク質の合成の場である細胞質から各細胞内小器官へと運ばれたり、細胞表面に分泌されたりする必要があります。その過程において、多くのタンパク質は、生体膜を越えて輸送されていきます。生体膜は通常イオンなどの小分子すら透過させない性質（膜透過障壁）を保っていますが、生体膜には巨大なタンパク質を輸送するためにSecトランスロコンと呼ばれるタンパク質を膜透過させる為の孔が存在しています。Secトランスロコンは通常は閉じており（クローズド型）、タンパク質が膜透過するときのみ開きます。Secトランスロコンを介したタンパク質の膜透過は、生物が生きていくために必須の機構であり、国内外で基礎研究が進められています。細菌においては膜タンパク質SecYE複合体がSecトランスロコンを形成し、モー

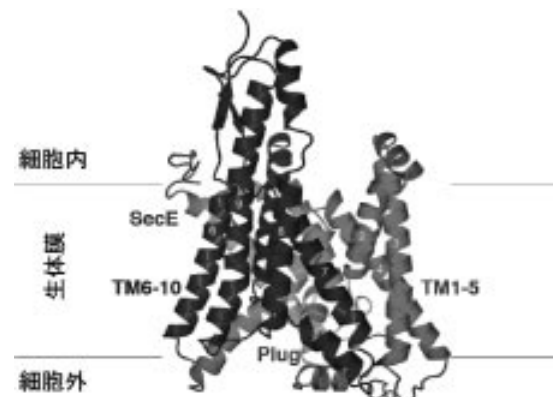


図1 SecYEタンパク質の構造モデル
SecYは、10回の膜貫通領域（TM1-TM10）を持っていて、内部にはタンパク質の透過孔が存在しています。この透過孔は通常、プラグによって閉ざされています。細胞内から細胞外へとタンパク質の膜を越えての輸送が起こるときには、細胞内の突出した領域にSecAが相互作用した後、プラグが外れSecYの透過孔が大きくなります。SecEは1回の膜貫通タンパク質でSecYの構造を錠のように支えています。

タンパク質であるSecA ATPaseがSecYと相互作用して膜透過反応を起こすことが知られていますが、その詳細なメカニズムは不明のままとなっていました。

本研究では、高度好熱菌由来SecYE複合体の立体構造をX線結晶構造解析によって決定し（図1）、その構造をもとに機能解析を進めました。その結果、Secトランスロコンはタンパク質の膜透過にもなって少なくとも2つの状態（プレオープン型とクローズド型）（図2）をとることが明らかとなりました。プレオープン型ではクローズド型と異なり、細胞質側の矢印で示した部位に疎水性の凹みが存在し、膜透過するタンパク質との相互作用部位を形成していると考えられます。

さらに我々はSecAとの相互作用の研究を進めた結果、SecYとSecAとの特異的相互作用部位を同定し、SecAとの相互作用によりSecYがクローズド型からプレオープン型へ構造転移することを示しました。一方、SecAもSecYとの相互作用によってSecAの内部にあるIRA1とNBF1という領域の間が広がる構造転移を起こすことを突き止めました（図3）。ここに示した構造変化によってSecYE、SecAが共に活性化状態となり、タンパク質の膜透過反応を開始するとのモデルを提唱しました。本研究結果は、世界的に活発に研究が進められているタンパク質の細胞内での動きや配置などの研究分野に大きな影響を与えることとなりました。今後、さらなる構造解析、生化学的解析によって近い将来タンパク質膜透過機構の全容が明らかとなると期待されます。

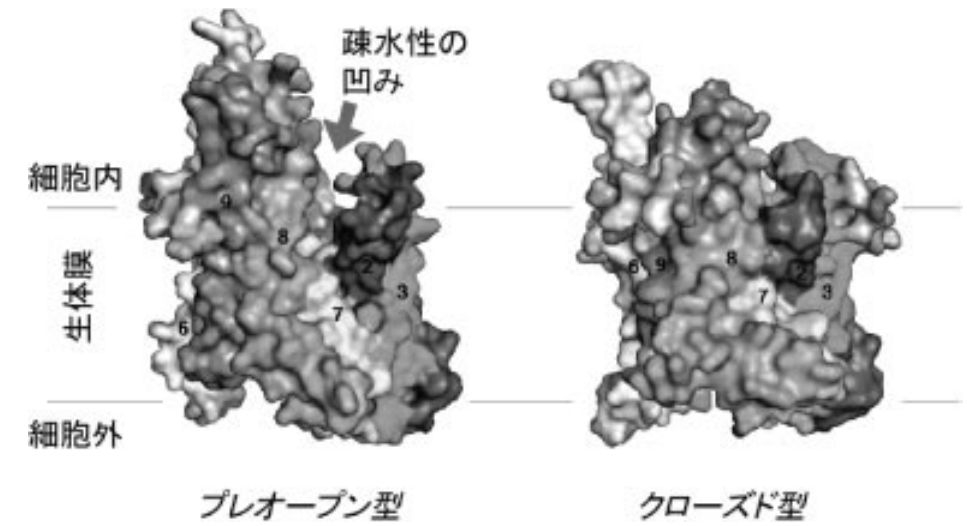


図2 Secトランスロコンのプレオープン型とクローズド型
プレオープン型とクローズド型のSecトランスロコンのタンパク質の表面を示しました。膜貫通領域をそれぞれ色分けして表示し、膜貫通領域の番号を表記しました。プレオープン型では2と8で表される領域が大きく開き、疎水性の凹みが形成されていることがわかります。



図3 SecYEとSecA間の相互作用モデル
SecAは4つの領域（NBF1、NBF2、IRA1、PPXD）からなります。SecAがSecYE複合体と相互作用すると、矢印のようにSecA、SecYEともに構造変化が起こり活性化された後、膜を透過する基質タンパク質（preprotein）がSecAからSecYEの疎水性の凹みに受け渡されタンパク質の膜透過が開始するモデルを提唱しました。



濡木 理 (ぬれき おさむ)

東京大学医科学研究所基礎医科学部門教授。理学博士。

1988年東京大学理学部生物化学科卒業。93年東京大学大学院理学系研究科生物化学専攻博士課程修了。博士（理学）（東京大学）取得。

93年日本学術振興会特別研究員PD、94年理化学研究所基礎科学特別研究員、95年東京大学大学院理学系研究科生物化学専攻助手、2002年東京大学大学院理学系研究科生物化学専攻助教授、03年東京工業大学大学院生命理工学研究科生命情報専攻教授を経て、08年4月より現職。

専門は構造生物学。特に遺伝暗号翻訳、膜輸送およびシグナル伝達。現在は神経細胞が感覚を受容したり神経伝達を行うために働く膜輸送体の構造機能相関を解明することに興味を持つ。

99年日本結晶学会進歩賞、05年手島工業教育資金団手島記念研究賞、07年手島工業教育資金団手島記念研究賞、07年文部科学大臣表彰科学技術賞（研究部門）を受賞。

著書に「アミノアシル tRNA 合成酵素 aaRS の tRNA 認識機構」（蛋白質核酸酵素、2001年）、「RNA成熟マシン」（実験医学、2005年）、「MgtE トランスポーターによる Mg²⁺ のホメオスタシス機構」（蛋白質核酸酵素、2008年）がある。

東北大学医学系研究科 山本 雅之

動物は、体内に酸素を取り込んで炭水化物などを燃やし、エネルギーを得ている。一方、鉄が酸素により錆びていくように、酸素は生体にとっていたみの原因になる重大な環境ストレスである。生体は、様々な環境変化に対して適切なタイミングで相応の酵素群を発現させる「しくみ」をもっており、体内のセンサー分子がストレスとなる環境情報を感知すると、これに適した生体防御酵素群の発現が誘導される。例えば、化学発癌研究の歴史を辿ると「親電子性物質」と呼ばれる一群の化学物質が化学発癌を惹起することに気がつくが、食品防腐剤として用いられる抗酸化物質を化学発癌物質と同時に投与すると、強力な発癌予防効果をもたらすことも報告されている。この発癌予防効果は、グル

タチオンやグルクロン酸などを抱合する第2相解毒酵素群の誘導発現によってもたらされる。

これらの事象の分子基盤を探る研究を通して、私たちは先に、生体が親電子性物質・活性酸素に暴露された際には、解毒酵素・抗酸化酵素遺伝子の発現が転写因子 Nrf2 により抗酸化剤応答配列 (ARE) を介して誘導されること、一方、Nrf2 活性は Keap1 分子により恒常的に抑制されていることを発見した。また、その後の解析から、親電子性試薬や活性酸素の刺激により、Nrf2 は Keap1 による抑制から逃れて核移行し、解毒酵素や抗酸化酵素群の遺伝子発現を活性化する (図1)。Nrf2 は約 20 分の半寿命で分解する非常に代謝回転の速い蛋白質であり、この分解には Keap1 と Cul3 が E3 複

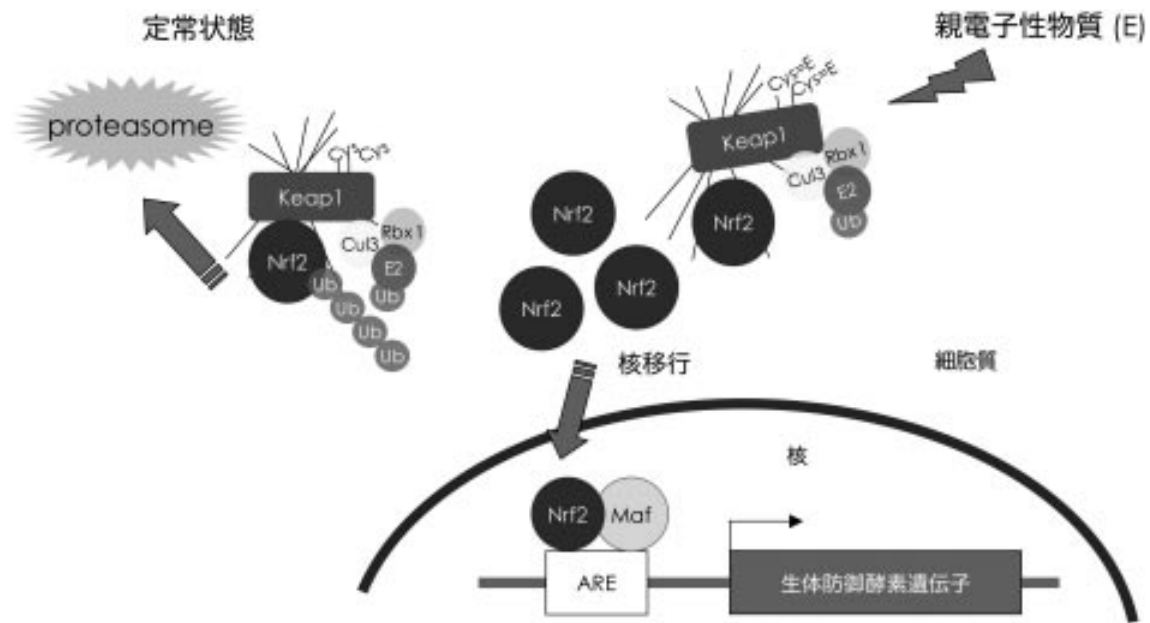


図1 親電子性物質に対する脱抑制応答機構

Nrf2 は通常は細胞質において Keap1 と Cul3 を含む E3 複合体によりユビキチン化され、プロテアソームにより迅速に分解されている。一方、親電子性物質 (Electrophiles; E) に曝されるとその分解は抑制される。そのような環境では、新たに合成された Nrf2 は、核に移行して転写活性化を行う。

合体を形成して関与している。親電子性物質は Keap1 による Nrf2 の代謝回転を阻害することで、核内の Nrf2 量を高め、転写誘導を行っている。私たちは最近、Nrf2 と Keap1 の相互作用に必要な領域をそれぞれの分子の上で同定し、さらに、詳細な Nrf2 と Keap1 の相互作用の様式を NMR 解析と X 線結晶構造解析により明らかにした (図2)。その結果、1 分子の Nrf2 が、分子内 2 カ所の結合部位を利用して 2 分子の Keap1 に結合し、「蝶番と門」を形成してセンサー機能を形成していることを明らかにした (図3)。

Nrf2 および Keap1 の遺伝子欠失変異マウスの解析から、Nrf2-Keap1 制御系が種々の呼吸器疾患の病因に深く関与することが明らかとなった。Nrf2 は慢性閉塞性呼吸障害発症の重要な発症要因である。一方、Keap1 の点変異・機能障害は肺癌細胞で高率に発見される。本研究により、外来異物あるいは活性酸素種に対する応答の基本原理の一端が解明され、それが個体の適応・応答機構において、また、呼吸器疾患発症において、いかなる貢献を果たしているのかが明らかになるものと期待される。

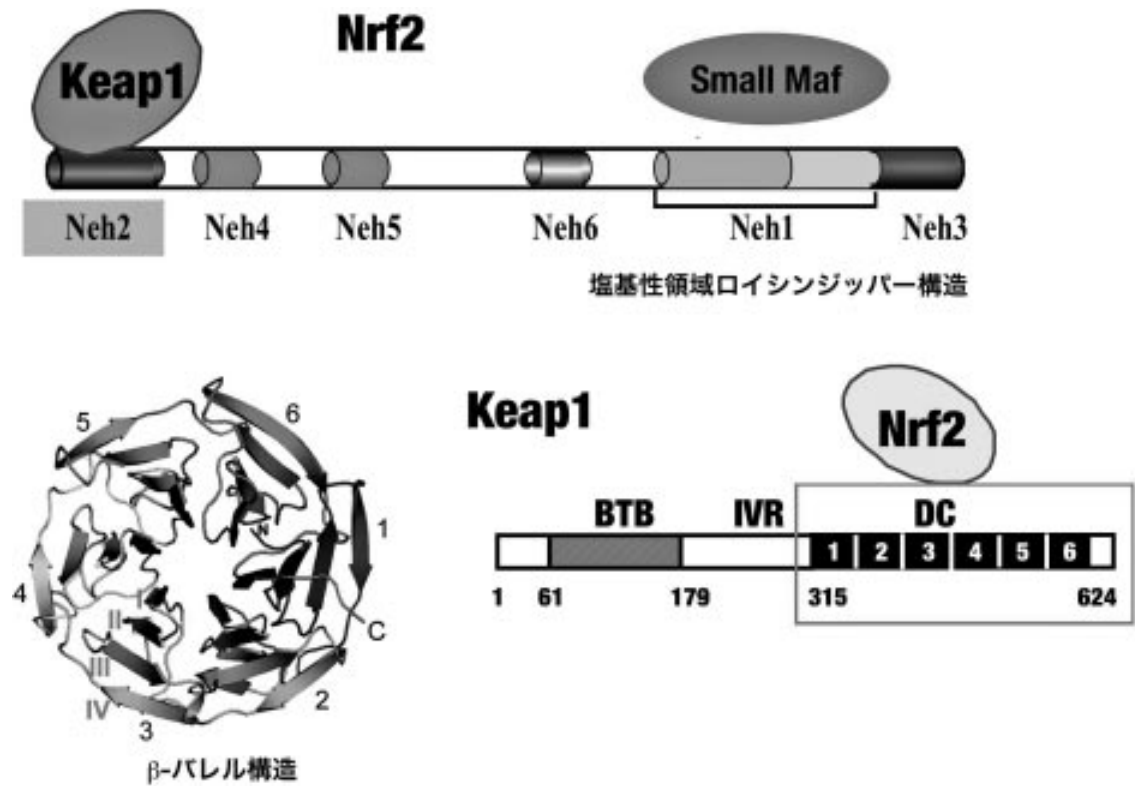


図2 Nrf2 と Keap1 のドメイン構成と Keap1 DC ドメインの結晶構造

Nrf2 は Neh と呼ばれる 6 個のドメインから成る。Neh1 ドメインは塩橋性領域ロイシンジッパー構造をとっており、Maf と 2 量体を形成する。Keap1 とは Neh2 ドメインで結合する。一方、Keap1 の DC ドメインは β バレル構造と呼ばれる 6 面体構造をとる。Keap1 は BTB ドメインを介してホモ二量体化し、β バレル構造の底面にあるポケットを介して Nrf2 と結合する。ポケットを構成する塩基性アミノ酸は Nrf2 の Neh2 ドメインにある ETGE と DLG モチーフと静電的に相互作用する。

タンパク質の生産・解析・インシリコスクリーニングに基づく制御化合物創出への挑戦

東京大学大学院薬学系研究科/東京大学生物機能制御化合物ライブラリー機構 長野 哲雄

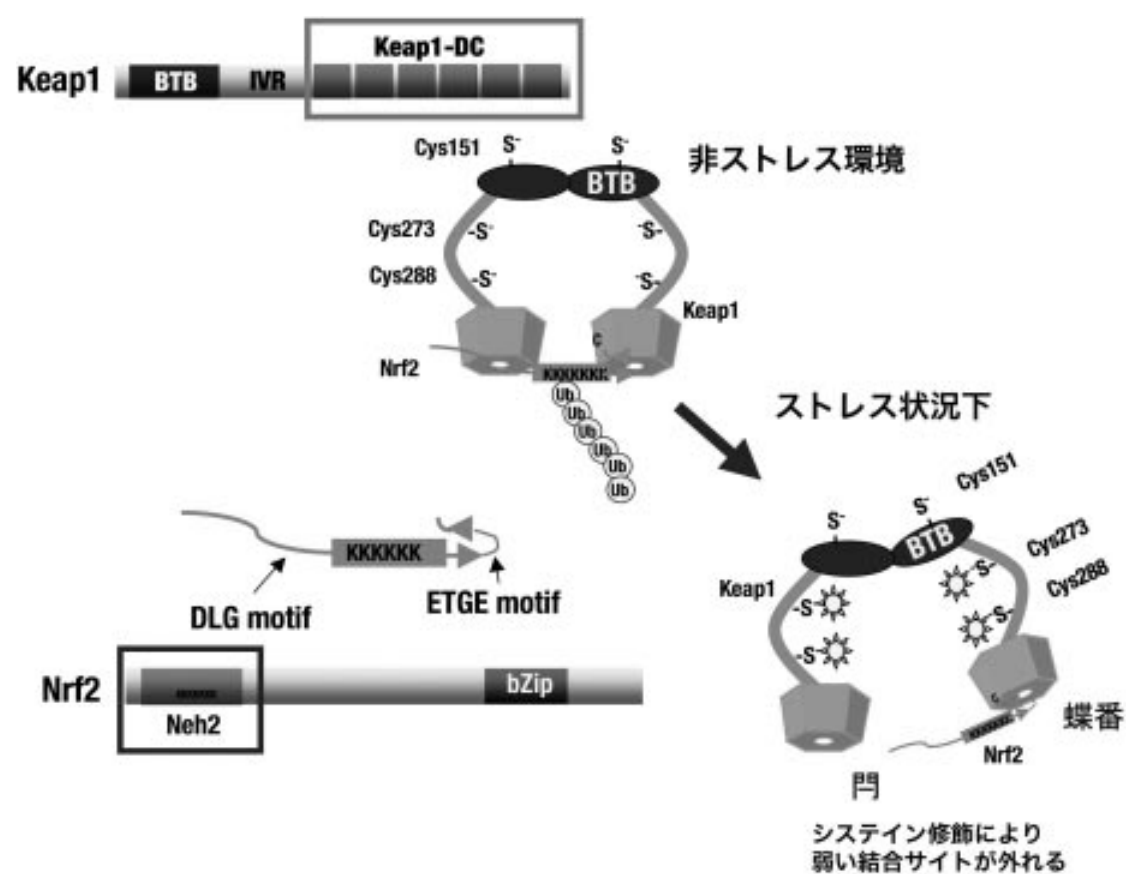


図3 Nrf2活性化に至る「蝶番と門」モデル
Keap1はホモ2量体を形成し、Nrf2のNeh2ドメインにある2つのサイト（ETGEとDLGモチーフ）に結合する。結合親和性はETGEの方がDLGよりも100倍ほど強いので、ストレス暴露によりKeap1の構造変化が起こり、Keap1とDLGの結合が解離すると考えられる。この際に、Keap1とETGEの結合は保持されるので、ちょうどETGEとDLGモチーフが蝶番と門のように振る舞う。このメカニズムを「蝶番と門（Hinge-Latch）」メカニズムと呼んでいる。

「ターゲットタンパク質研究プログラム」がスタートしてから1年半経つが、このプログラムのように化合物ライブラリーを基盤にして、タンパク質の活性を制御する機能性化合物の創出を目指したプロジェクトが世界各国で行われている。はじめに日本のこのプロジェクトと外国、特に米国のプロジェクトとの違いについて解説し、その後で本プロジェクトにおける種々の連携の現状について紹介する。

NIHを含め全米10箇所の施設（Vanderbilt Univ、Scrippsなど）で行われ、公開データベースとしてPubChemが整備運営されている。この米国のシステムはタンパク質を見出した研究者自らがhit化合物のためのスクリーニングをするわけではなく、スクリーニングは上記のスクリーニング施設で行われることになる。すなわち、全て分業体制になっている。また、そこで得られた成果は特許申請あるいは論文執筆などの猶予期間が60日間あるが、基本的には即時公開である。External Scientific Advisory Panelではアッセイ系の申請数の少なさが指摘された。昨年9月から第2期のProduction Phaseが開始されたが、第1期との違いは、スクリーニング施設が4箇所のComprehensive Screening Centerと

米国ではNIH Roadmapに従ってMolecular Libraries Initiativeとして2004年から2008年まで第1期のPilot Phaseが行われた。このプロジェクトでは化合物ライブラリーの管理運営を研究支援会社BioFocus DPIに委託し、スクリーニングは



山本 雅之 (やまもと まさゆき)
東北大学医学系研究科医化学分野教授。医学博士。
1979年東北大学医学部卒業。83年東北大学院医学研究科修了。
95年筑波大学先端学際領域研究センター教授を経て、2007年1月より現職。08年4月からは、東北大学副学長および医学系研究科長・医学部長。
専門は医化学・分子生物学。特に、生命現象の制御機構を分子生物学とマウス遺伝学手法を用いて追求している。85年にヘム合成系に赤血球特異的なイソ酵素が存在することを実証し、また、90年に血液細胞の分化方向性規定に重要なGATA因子群を発見した。さらに、97年から00年にかけてNrf2-Keap1制御系が酸化ストレス応答や解毒酵素誘導を制御することを発見した。現在は生体の環境応答機構の分子基盤解明に取り組んでいる。
95年井上学術賞、04年Thomson Scientific Research Front Award 2004、07年つくば賞、08年日産科学賞を受賞。



図1 技術基盤領域による個別研究への研究支援・協力

3箇所のSpecialized Screening Centerにまとめられた事、新たに2箇所のSpecialized Chemistry Centerが設けられた事である。これは研究者間のコミュニケーションを重視すると共に、Chemistry部門の強化を目的に行われたもので、この新設されたChemistry部門ではhit化合物からprobe化合物を創出することが求められている。

一方、本「ターゲットタンパク研究プログラム」は米国とは全く異なる体制で制御化合物の創出を行う。基本的生命現象に関連するタンパク質、疾患に関連するタンパク質および食品・環境に関連するタンパク質から計33テーマが選ばれたが、これら採択された研究グループ内にはタンパク質を見出した研究者だけではなく、そのタンパク質の構造解析を担当する研究者が加わってプロジェクトを推進する。更にスクリーニングにより見出されたhit化合物をlead化合物にする有機化学者が加わっているチームもある。3者の異なる研究者が共同して3～5年間の研究を行う。

この様な個別の研究チームに対して、基盤技術領域ではタンパク質の生産、解析、制御の基盤的な技術開発を行うことで研究の支援・協力を行う(図1)。得られた成果は情報プラットフォームにより管理され、最終的には公開されることになるが、即時ではなく特許など知財の取得が終了した後に公開となる。この体制の特徴は、タンパク質を見出

した研究者自らが構造生物学者あるいはメディカルケミストなどの研究協力を受けながら、制御化合物を見出す事にあり、モチベーションが極めて高いのが特徴で、この点が米国のシステムと大きく異なる。すなわち日本のシステムでは異なる研究分野の連携がkeywordである。

連携研究の現状は、制御領域(図2)を例に取れば現在までに制御領域内で収集した化合物の評価を行う実証研究として8つの連携研究が進行しており、個別チームとの連携では13チームと共同研究を行っている。12月末の時点で計30回を超える研究打ち合わせ会議が行われた(図3)。

米国のプロジェクトとの違いの2つ目としてインシリコスクリーニングの導入が挙げられる。今回の「ターゲットタンパク研究プログラム」は創薬の種になる制御化合物を創出することが最終目標であるが、その創出過程においてタンパク質の構造解析に基づいて行うことが求められている。米国においては別のプロジェクトとしてProtein Structure Initiativeがあり、Molecular Libraries Initiativeと多少の連携はあるが、日本のこのプロジェクトほど明確ではなく、インシリコスクリーニングも前面には出ていない。

タンパク質の立体構造を基にしてフォーカス化合物ライブラリーを構築してhit化合物を見出す方法



図2 制御領域内の連携

は、将来的には理論的な創薬に結びつくものである。ランダムスクリーニング、すなわち数十万から100万化合物を超える大量スクリーニングは、開発のスピードを重視する企業にとって極めて順当な手法ではあるが、アカデミアではこのようなスクリーニングによるのではなく、理論に基づいた制御化合物の創出を目指すべきであろう。インシリコスクリーニングを行うことで得られた知見は、次のターゲッ

トタンパク質の制御化合物を創製する時にも役立つものとなる。

これらに見られるように「ターゲットタンパク研究プログラム」は米国のプログラムおよび製薬企業の創薬研究と一線を画するものであり、独自の試みと言える。講演では制御化合物創出の実例を挙げて紹介する予定である。

分野-区分	テーマ	代表研究者	研究打ち合わせ	共同研究契約(化合物提供契約)	化合物提供数	補足
基本生命(課題A)	小胞輸送を制御するタンパク質複合体の構造機能解析	若槻 壮市	5回	済み	-	大規模スクリーニングを計画
基本生命(課題B)	新薬に繋がるV-ATPaseの構造、機能の解明	前田 慧	2回	済み	25,000	スクリーニング可能サンプル数を考慮し10化合物からなるHitの作成提供
医学-薬学(課題A)	タンパク質構造に立脚したDOCK2シグナル伝達機構の解明と創薬研究への応用	堀井 直規	2回	済み	11,227	大規模スクリーニングを実施中
医学-薬学(課題A)	アルツハイマー病治療薬創出に向けたセクレターゼの構造解析と機能制御	富田 泰輔	2回	済み	47	制御内でインシリコスクリーニング後化合物提供
医学-薬学(課題A)	核酸およびレドックス調整バスキューを標的とする抗がん剤の開発	北 潔	4回	済み	201	インシリコスクリーニング後化合物提供
医学-薬学(課題A)	メタボリックシンドローム・糖尿病の鍵分子アディポネクチン受容体AdipoR1/AMPK/AOCタンパク質の構造解析とそれに基づく機能解明及び治療法開発	門脇 孝	1回	済み	273	インシリコスクリーニング後化合物提供
医学-薬学(課題B)	ケモカイン-ケモカイン受容体-シグナル制御分子フロントファミリーの構造・機能ネットワークからの免疫システムの解明および創薬開発	松島 綱治	6回	済み	3,200	大規模スクリーニングを計画、ヒット化合物の2次評価方法について協議
医学-薬学(課題B)	核内セプターの新規機能解明と構造情報に基づいた神経疾患治療法の開発	藤澤 純	4回	済み	108	制御内でインシリコスクリーニング後化合物提供
医学-薬学(課題B)	がんや様々な疾患に関与するmRNAファミリータンパク質の機能構造解析から創薬まで	青木 淳賢	3回	済み	238	制御内でインシリコスクリーニング後化合物提供、アッセイ用重光プローブ作成・提供
医学-薬学(課題B)	セマフォリン及びセマフォリン受容体分子群をターゲットにした構造・機能解明と治療法開発	橋ノ部 洋	3回	済み	83	制御内でインシリコスクリーニング後化合物提供
食品・環境等(課題A)	畜産の繁殖抑制に活用可能なリガンドと受容体タンパク質の構造・機能解析	永田 宏次	1回	-	-	化合物利用について協議
食品・環境等(課題B)	腸道菌ペプチド性フェロモンファミリーの構造と機能の解明・ネズミの環境問題の解決に向けて	寺沢 宏明	1回	-	-	化合物利用について協議
食品・環境等(課題B)	新規味物質・味評価法開発に重要な味覚受容体の構造・機能解析	山下 敦子	1回(メール)	-	-	化合物利用について協議

図3 個別研究チームとの連携研究

長野 哲雄 (ながの てつお)

東京大学大学院薬学系研究科教授／東京大学生物機能制御化合物ライブラリー機構長。薬学博士。

1972年東京大学薬学部卒業。77年東京大学薬学系大学院博士課程修了。

77年東京大学薬学部助手、83年米国デューク大学医学部 Research Associate、86年東京大学薬学部助教授、96年東京大学薬学部教授を経て、97年東京大学大学院薬学系研究科教授(大学重点化に伴う措置)より現職。

2006年より東京大学生物機能制御化合物ライブラリー機構長を兼任。08年より日本薬学会会頭。

専門は Chemical Biology、特にバイオイメージング研究と創薬研究に関心を持つ。

04年上原賞、05年島津賞、06年日本薬学会賞を受賞。06年に紫綬褒章を受章。

共著に『創薬化学』(東京化学同人、2004年)、訳書『マクマリー生化学反応機構—ケミカルバイオロジーの理解のために—』(東京化学同人、2007年) などがある。