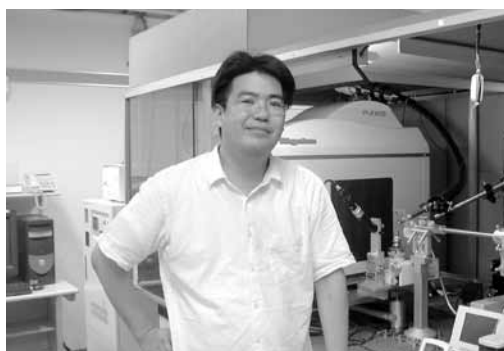




タンパク質の構造を解き明かす

村上 聡 研究室～分子生命科学専攻



村上 聡 教授

タンパク質は私たちの体を構成し、生命活動の根本である体内の化学反応に関わっている。生体内には無数のタンパク質が存在し、各々決められた役割を担っている。生命を支えるこの無数のタンパク質はそれぞれ独特な機能を持ち、同時に複雑な立体構造をもっている。

村上研究室では、X線結晶構造解析という手法を用いて、タンパク質の複雑な立体構造について原子レベルでの解析を行っている。そして、それをもとにしてタンパク質の機能の仕組みを解明しようとしている。



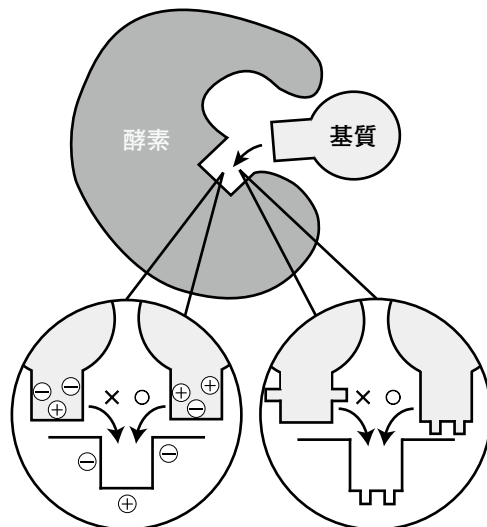
タンパク質の機能と構造解析

生命活動は無数の化学反応から成り立っており、これらの化学反応の連鎖が生命を形作るさまざまな活動を可能にしている。したがって、これらの化学反応の連鎖が生命そのものであると言っても過言ではない。そして、これら生体内で起こっているほぼ全ての化学反応にタンパク質が関わっている。

生体内に存在するあらゆるタンパク質は、わずか20種類のアミノ酸が組み合わさることで、できている。それにもかかわらず、タンパク質は実に多様な機能や性質をもっている。では、このような多様性は一体どのようにして獲得されるのだろうか。この疑問に対する答えはタンパク質の複雑な立体構造にある。

酵素もタンパク質の一種であるが、酵素が特定の基質とだけ反応する基質特異性という性質もタンパク質の複雑な立体構造に由来している。

酵素には、基質と結合するための部分がある。この部分は複雑な立体構造やそれによる性質をもっており、水素結合による引力、ファンデルワールス力、静電気力などさまざまな力で基質と引き合っている。静電気力を例にとる。この例で



電荷の空間的配置 結合する部分の形状
図1 基質特異性

は、基質と結合する部分には電荷が配置されている(図1)。基質と結合する部分の正電荷の部位には基質の負電荷の部位が対応し、負電荷の部位には正電荷の部位が対応する。酵素と結合することができる基質は、結合する部分の全ての電荷の

配置に対応した配置をもつものだけである。このように、基質特異性は、基質と結合する部分の立体構造によるものである。

また、酵素以外のタンパク質においても形や電荷の配置は重要であり、それらの性質と立体構造は密接に関わっている。

村上先生は、タンパク質の性質に深く関わる立体構造を原子レベルで見たいと思い、日々研究を行っている。村上研究室ではX線結晶構造解析という方法を用いて、タンパク質の構造を原子レベルで解析している。

X線結晶構造解析

X線結晶構造解析の手順は、大まかに言えば、対象を精製し、結晶化し、X線を当て、散乱光を観測するという流れである。以降、具体的にそれぞれの操作について説明する。

X線結晶構造解析を行うには、まず、遺伝子を組み換えた大腸菌などの微生物を使って、微生物の内部で目的のタンパク質を大量に合成させる。次にこれらの微生物を破砕して、目的のタンパク質を取り出す。

しかし、微生物を破砕したものの中には目的のタンパク質以外のタンパク質も含まれている。結晶を作成するためにはそれらを取り除かなければならない。そこで、この微生物を破砕したものの中から、分子サイズや種々の官能基に対する相互作用の差を利用して目的のタンパク質だけを取り

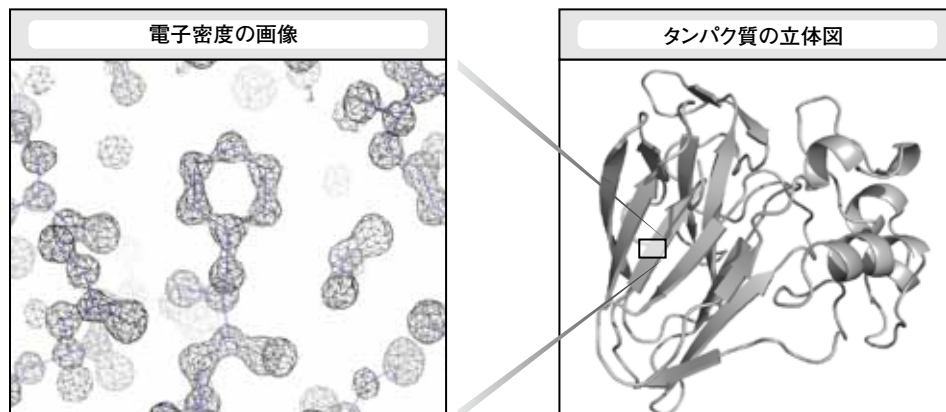
X線結晶構造解析とは、X線を用いて対象となる分子の立体構造を解析する方法である。物を見る場合、原則として対象の物の大きさよりも短い波長の電磁波を当てなければならない。X線は、タンパク質や核酸など生体分子を構成する炭素、酸素、窒素などの原子間距離より短い波長をもつ電磁波なので、原子レベルでタンパク質を見ることができる。

次に、X線結晶構造解析ではどのような手順でタンパク質の構造解析を行っているのかを紹介していく。

出し、結晶化する。

次に、タンパク質の構造を決定するために、分子からのX線の散乱光を観測する。しかし、分子一つひとつからの散乱光は弱い。そこで、結晶化したタンパク質にX線を当てることで、観測するのに十分な強さの散乱光を得ることができる。結晶は分子が規則正しく並んでいるので、回折格子のようなはたらきをする。X線結晶構造解析では、結晶がもつ回折格子のような性質を用いて分子の構造を解析する。

照射したX線は原子中の電子で散乱する。その散乱光が強め合う回折点をコンピュータで処理することで、電子密度が視覚化された解析画像を得ることができる。この画像から原子の位置がわかり、その情報からタンパク質の立体構造がわか



解析の結果として電子密度の画像が得られ、タンパク質の全体像がわかる。

図2 電子密度の画像とタンパク質の立体図

る(図2)。

回折点のデータを処理するとき、解析に使える回折点が多い方がより鮮明な解析像が得られる。しかし、得られた回折点の中でも弱い回折点はデータとして使うことができない。したがって、さまざまな結晶を試して、より多くの強い回折点を得られる結晶を選ぶ必要がある。また、強いX線を用いることで散乱光の強度が高まり、解析に適した回折像が得られる。

より強いX線とよりよい結晶を選んで使うことにより、たくさんの回折点の情報を収集し、よ

り鮮明な解析像を得ることができる。鮮明な解析像が得られれば、ベンゼン環を構成している炭素原子一つひとつを観測することさえできる(図2)。しかし、観測できる回折点が少ないと解析に使える情報が少なくなり、不鮮明な解析像になってしまう。

以上が、X線結晶構造解析における一連の流れである。この解析方法を用いて、先生はさまざまなタンパク質の構造解析を行ってきた。では、次に先生が解析したタンパク質の具体的な例を見ていこう。



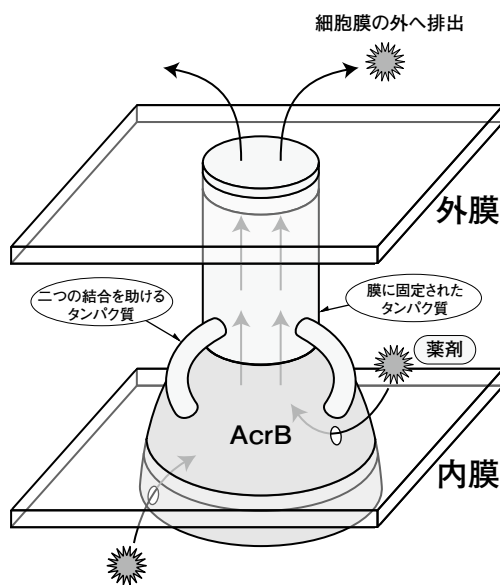
多剤排出トランスポーター AcrB

近年、多剤耐性化した細菌の院内感染が問題になっている。多剤耐性化とは、さまざまな薬剤に対して細菌が耐性をもつようになることである。多剤耐性化した細菌は多くの薬剤が効かなくなる。先生はX線結晶構造解析により、この耐性をもたらすと考えられていたタンパク質である、多剤排出トランスポーター AcrB の構造解析に世界で初めて成功した。

AcrBは細菌の細胞膜に存在するタンパク質である。このタンパク質は、ある一つの薬剤だけを排出するのではなく、さまざまな薬剤を排出することができる。しかし、細胞の成長や分裂に必要なビタミンなどの物質まで誤って排出することはない。先に説明した酵素のように、多くのタンパク質は作用対象となる物質が数種類と少ない。それに対して、AcrBは多種類の基質を作用対象とし、この広い基質特異性に興味もたれる。

また、AcrBは広い範囲に効果を及ぼすことができる。院内感染で問題となっているような種類の細菌は、細胞膜が内膜と外膜という二つの膜で構成されている。AcrBは内膜の内側だけでなく内膜と外膜の間にある薬剤も排出することができる(図3)。

このように、さまざまな種類の薬剤を排出でき、広い範囲に効果を及ぼすことができるという点で、AcrBは非常に特徴的である。そこで先生は、このタンパク質の興味深い機能がどのような構造に由来するのかを知りたいと思い、構造解析を行った。しかし、AcrBの性質上、その解析は一筋縄ではいかなかった。



内膜の内側と、内膜と外膜の間の部分から薬剤を取り込み細胞外に排出する。

図3 多剤排出トランスポーター AcrB

解析にあたり困難であった点の一つとして、このタンパク質の大量合成には手間がかかるという点が挙げられる。AcrBは細胞膜に存在する膜タンパク質の一つであるが、細胞における細胞膜の占める体積は、細胞全体の体積の5%程度しかない。それに加えて、遺伝子組み換えによって微生物にAcrBだけを過剰に合成させると、微生物の生存に必要な他の膜タンパク質の合成を邪魔してしまい、微生物がうまく育たなくなってしまう。そのため、一つの細胞の中でAcrBを大量に合成

することはできない。これらの理由により、一つの細胞から取れる AcrB の量は少ない。

また、AcrB が水溶液中での取り扱いが難しいタンパク質であるということも、解析を困難にする要因であった。AcrB は、水とよくなじむ親水性の部分と、あまりなじまない疎水性部分を一つの分子内に共にもつタンパク質である。このようなタンパク質は、水の中でも、逆に油の中でも不安定であり、結晶化することができないので、構造を解析することができない。そこで、AcrB の疎水性の部分界面活性剤で覆い、水になじみやすくしてから結晶化させた。

結晶の中では分子が動かずきれいに並んでいなければならないので、対象のタンパク質を結晶化するには、そのタンパク質分子の立体構造が変化しないことが望ましい。

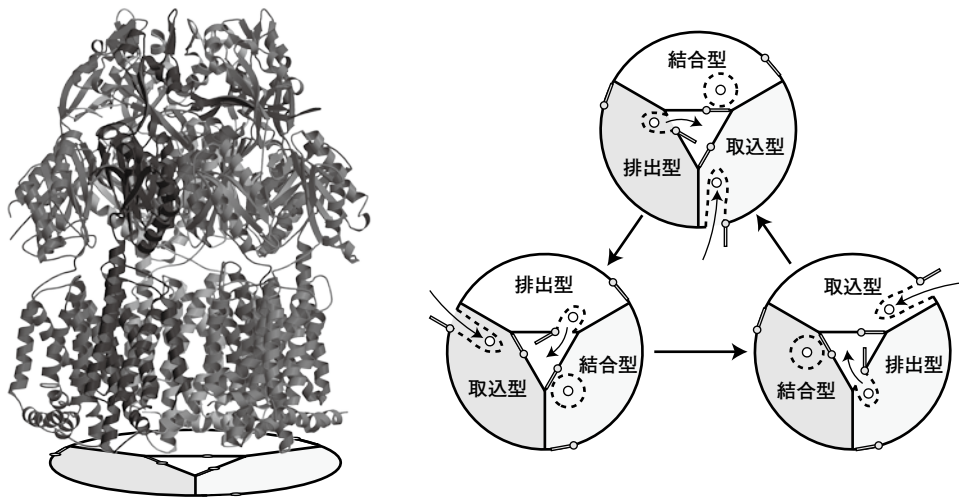
ところが、物質を排出するタンパク質は、自らの構造を変化させることによって対象の物質を排出するため、結晶化が困難であった。薬剤など分子量の大きな化合物を排出する AcrB のようなタンパク質は、溶液中で分子構造が変化してしまうので、特定の形を維持することが非常に難しい。同じ分子が厳密に同じ形で同じ向きに並んでいなければ結晶にならずに沈殿してしまうので、AcrB を結晶化するのは非常に難しい。しかし、

先生は、用いる界面活性剤の種類や溶液の温度、pH などを変えてさまざまな条件で試した結果、うまく結晶化させ、X 線結晶構造解析に成功した。

解析の結果、AcrB は三つのプロトマーが結合した構造をしていることがわかった。タンパク質の中には同じ分子が複数合体して構成されているものがあり、その分子一つひとつをプロトマーと呼ぶ。AcrB のプロトマーには内側と外側に扉が付いている。薬剤は外側の扉から取り込まれ内側の扉から細胞膜外に排出されていた(図4)。

三つのプロトマーは少しずつ構造が異なっており、また構造に応じた役割をもつことがわかった。これらはそれぞれ取込型プロトマー、結合型プロトマー、排出型プロトマーと呼ばれる。取込型プロトマーはプロトマーの外側の扉を開いて薬剤を取り込む。そして結合型プロトマーはプロトマー内部で薬剤と結合し、最後に排出型プロトマーが内側の扉を開いて薬剤を排出する。

これら三つのプロトマーはいつも同じ形をしているわけではなく、それぞれ絶えず構造変化をしている。薬剤を排出するとき、ある瞬間の AcrB は三つのプロトマーが必ず取込型、排出型、結合型のいずれかの形をとっている。しかし次の瞬間にはそれぞれのプロトマーが一段階ずつ構造変化し、AcrB 全体としてはプロトマーそれぞれの役



三つのプロトマーが協調して構造変化することにより効率的に薬剤を排出している。AcrB 自身は回転していないが、あたかも回転しているかのようにプロトマーが役割を変えている。

図4 協調的にはたらく三つのプロトマー

割が一つずつずれた形になる(図4-右)。

このように、プロトマー一つひとつは隣り合うプロトマーの構造変化に影響を及ぼし合いながら、三つの役割を順番に繰り返す。AcrBは分子内であたかも回転しているかのように三つのプロトマーが協調して構造変化している。このようにすることでAcrBは効率的に薬剤を排出している。一般的に、タンパク質はそれぞれのプロトマー一つひとつが独立してはたらくよりも、複数で協調してはたらく方が効率的である。



タンパク質構造解析の社会への貢献

AcrBの薬剤排出の仕組みが解明されたことにより、AcrBに排出されないような薬剤のデザインが可能となった。例えば、トランスポーターに認識されることのないような薬剤をデザインしたり、あるいはトランスポーターとの間に強い相互作用をはたかせることによって、一度結合したら離れずにトランスポーターの機能を止めてしまうような薬剤をデザインしたりするといった応用が可能である。

院内感染や再発がん、末期がんの治療では薬剤耐性が問題となっており、従来は薬剤の排出量を考慮してそれを上回る量の薬剤を投与していた。しかし、薬剤にはそれぞれ副作用があるので、必要以上に投与するのは望ましくない。多剤排出トランスポーターの構造がわかると、それに排出されないような新薬を作ることができる。こうして抗がん剤の投与量を減らすことができ、副作用を軽減することができるだろう。

また、AcrBの構造解析のさらなる展開として、このタンパク質の動きを解析するという研究も行われている。X線結晶構造解析では、分子の静的状態しか見ることができないので、AcrBなどの動きの大きい分子であってもそれが実際に薬剤を排出しているときの動きは見ることができない。

そこで、村上研究室では、計算系の専門家との

AcrBは単体で薬剤排出を行っているのではなく、他のタンパク質と協力して薬剤を排出している。細胞膜にはAcrBとは別に外膜に固定された筒状のタンパク質と、この筒状のタンパク質とAcrBとの結合を助けるタンパク質が存在している。AcrBが薬剤を排出するときは、これらのタンパク質と協力してはたらくしている(図3)。

村上先生はAcrBをX線結晶構造解析を行ったことで、AcrBが薬剤排出を行う仕組みを構造面から解明した。

共同研究により、分子の動きまでも解明しようとしている。具体的には、コンピュータを用いた分子の動きのシミュレーションである。AcrBの薬剤排出であれば、コンピュータ上で薬剤をAcrBの中に投入し、その動きをシミュレーションする。

X線結晶構造解析は、タンパク質の研究の中では基礎研究にあたる部分である。タンパク質の研究は製薬などに広く応用することができるが、製薬は莫大な資金がかかり、また薬剤の承認までには多くの段階を経ることになるので、研究室単位で行うことはできず、これらは十分な資金がある大企業で行うしかないのが現状である。だからこそ、大学としての役割は基礎研究を行うことであると先生は考えている。

基礎的な分野の研究においてはそれぞれの分野を突き詰めて考えることが重要であり、より深い専門性が必要であると先生は考えている。そして、さまざまな分野の研究との融合を必要とする応用的な開発を行うときは、それぞれの分野の研究の専門家と共同研究をする。先生は他の研究機関、他分野の専門家との共同研究により応用的な研究への貢献もしている。

X線結晶構造解析を用いた村上先生の研究により、今後も多くの神秘的なタンパク質の機能の仕組みが明らかにされていくだろう。

今回の研究室訪問では、村上先生にX線結晶構造解析についてのお話を伺いました。タンパク質の結晶など、難解なお話もありましたが、実際にタンパク質の立体図がわかる過程など、非常に

興味深いお話ばかりでした。

末筆になりますが、お忙しい中取材に応じてくださった村上先生に厚く御礼申し上げます。

(劉 芽久哉)