

## 研究室と研究の紹介

東京大学 大学院薬学系研究科 機能薬学専攻  
蛋白構造生物学教室 佐藤 能雅

### 1. 研究室の紹介

私たちの蛋白構造生物学教室は、東京大学大学院薬学系研究科の機能薬学専攻の生体分子機能学大講座の専門分野のひとつです。教室は、2年生からの薬学部の講義、3年生でのX線回折法による構造生物学の実習などを担当し、教室に配属される4年生の卒業実習、そして大学院の教育研究を担当しています。

薬学部では、東京都目黒区駒場の教養学部からの進学として、例年80名あまりを受け入れています。学部の講義は2年生の秋の進学内定とともに始まり、文京区本郷に実際に進学する3年生で、講義と実習が本格化します。薬学部は薬学科の1学科のみで、薬学系研究科の教官が講義と実習を行っています。薬学系研究科には20教室と寄附講座3教室があり、学内の医学部附属病院薬剤部、分子細胞生物学研究所、医科学研究所などの教官も研究科の教官として学部と大学院の教育に参加しています。学部では、物理化学、有機化学、生化学、医療系の薬学などを中心に幅広く履修します。

大学院薬学系研究科には、機能薬学専攻のほかに分子薬学専攻と生命薬学専攻があります。修士課程では例年90名程度、博士課程では50名あまりを研究科全体として受け入れています。私たちの教室の現在の教官は、私、助教授の原田繁春博士、助手の野口修治博士と水谷隆太博士です（図1の写真）。



図1. X線実験室でのある夜のスナップ

右から4番目が佐藤，原田助教授（右端）とスタッフ，ビールが好きな学生が集まって，米国からの夏季の留学生を送別した今夏のスナップ写真です。研究室の雰囲気とX線回折実験を行うための実験室の様子を示しています。

教室は、その名称のとおり、タンパク質を中心に、三次元構造の詳細をX線結晶構造解析により解明する構造生物学と構造化学の教育と研究を中心に据えています。とくに、構造生物学、生物物理学、有機化学などの基礎としての分子の三次元構造論、生体高分子の構造研究法と構造論に関する教育と研究を教室では推し進めています。タンパク質としては、DNAとRNAの核酸の切断などに関わる酵素、抗体など免疫系のタンパク質、糖の代謝を行い遺伝病にも関連する酵素、生体のエネルギー代謝や情報伝達に関わる生体膜のタンパク質などをターゲットとしています。これらの研究を通じて、タンパク質と結合するリガンドの三次元構造レベルでの相互作用に基づく医薬品の分子設計、アミノ酸の配列を改変して新たなタンパク質を創製する研究も行ってきました。現在の主な研究のテーマは次のようなものとなっています。

- ・ 遺伝子の変異によって生じたタンパク質の酵素活性が低下することにより発症するリソソーム病関連のタンパク質、その病態変異体の構造と疾患との関係の解明
- ・ 七回膜貫通型リセプターなど、生体での受容情報を担い、伝達するヒトのβアドレナリンリセプター、サイトカインリセプターや熱ショックタンパク質などの発現、調製と構造の研究
- ・ エネルギー代謝や酵素作用を担う膜タンパク質、膜に結合する酵素（糖蛋白質のヒト腎臓のジペプチダーゼなど）の構造の研究
- ・ 遺伝子ホーミング DNA切断酵素（エンドヌクレアーゼ）、プロテインスプライシングの反応機構、メチシリン耐性遺伝子リコンビナーゼなどの構造の研究
- ・ 抗体、その抗原との複合体などの構造（親和性成熟抗体、紫外線損傷DNAを認識する抗体など）、抗体の構造の利用、抗体の発現と改変などの研究
- ・ 酵素の反応機構、医薬品と酵素の相互作用の構造生物学的な理解、医薬創製を視野においた各種の酵素の構造研究

私たちのX線解析による三次元構造の研究では、タンパク質の遺伝子からの大量発現を重視し、発現に力を注いでいます。これは、研究のターゲットがおもにヒトのタンパク質であること、多くは微量にしか得られないこと、遺伝病の変異タンパク質などアミノ酸残基の変異を有するものや改変体を対象としていること、などの理由からです。そのため、酵母と大腸菌のホストを利用する大量発現系を採用しています。酵母の発現系は、シグナルペプチドが付加された前駆体としてタンパク質を得る必要がある場合や、糖が付加された糖タンパク質や膜タンパク質など、ヒトのタンパク質の調製と結晶化には有用と考え、重点的に取り組んできました。また、cDNAからの発現のみならず、ゲノム情報からのタンパク質の調製を目指して、ゲノミックDNAからの発現も行ってきました。現在では、ほとんどのタンパク質を研究室で自前で発現、精製し、結晶化を経てX線解析を行っています。この方向性は、自ら研究を立案し、ターゲットのタンパク質を調製して構造生物学を展開できることが現在と将来の研究者には求められると考えているからです。

教室の前身は薬品物理分析学教室で、飯高洋一教授（現名誉教授）が担当していました。元々からのX線結晶学の研究室ですので、私たちはX線回折の実験装置の開発から着手し、これらを良好な状態で整備し、稼働させています。4台の回転対陰極型X線発生装置を常用し、必要に応じてシンクロトロン放射光も利用しています。封入管式のX線発生装置、二次

元検出器のイメージングプレート回折装置，四軸型自動回折計と回折カメラ類も各種備えています。これらの回折装置類の多くは特徴的なものです。たとえば，X線ビーム光学系として，二重集光ミラー系，単一ミラー系，モノクロメータ系と3種をセットアップし，前者は格子が大きな結晶用，後2者はビーム強度が必要な結晶用で，モノクロメータ系では波長の選択も可能です。クライオ実験では，適当な市販品が無かった時期には自作の装置を用いたこともあります。現在では3台の市販品を用いています。

試料調製の面では，遺伝子操作，組換え，細胞培養，細胞破碎から，タンパク質の分離・精製，性状の解析，結晶化までの，一連の分子生物学と生化学の操作を研究室で行うことができます。大量発現のためのフェーメンター培養装置では，合わせて30L規模の細胞培養を自動モニターしながら行うことができます。超遠心機などの分離機器，分光光度計などの機器，HPLC精製装置も各種備え，低温実験室，ワークステーションによるデータの解析室と端末室も完備しています。実験室での機器のネットワーク化に早くから着手し，回折装置，ワークステーションなどの解析装置，パソコンなどの端末を10年以上前から階層的なネットワークで結び，インターネットへと接続してきました。

研究室では，自ら広く学んで深く理解し，考えることをメンバーに求めており，他の人と同じようには考えないこと，必要な実験テクニックと理論は着実に身に付けることを私は説いています。自主独立性を重視していますので，メンバーは伸び伸びと勉学と研究に励んでいます。自主性を重んずると協調性や責任感もより高まるようですので，教室のメンバーと出身者との交流と親交をよろしくお願いします。

## 2. 私たちの研究から

免疫応答では，一次免疫応答の抗体が初期に産生され，時間の経過とともに抗原への親和性がより高まった二次免疫応答の抗体が選択的に産生されるようになります。この現象は親和性の成熟と呼ばれます。

ニトロフェノールを抗原リガンドとして認識するマウスの抗体について，この抗体の親和性成熟の構造生物学的な研究を行ってきました。タンパク質の発現の例として，まず，二次免疫応答の抗体のFvについて紹介します。

FvはV<sub>H</sub>とV<sub>L</sub>の2本のポリペプチド鎖から成るヘテロダイマーであり，抗原の認識を担う抗体構造上の最小単位として，その分子質量は約25kDaです。Fvは遺伝子からの発現でのみ通常は得られ，多くの場合はV<sub>H</sub>とV<sub>L</sub>を数残基

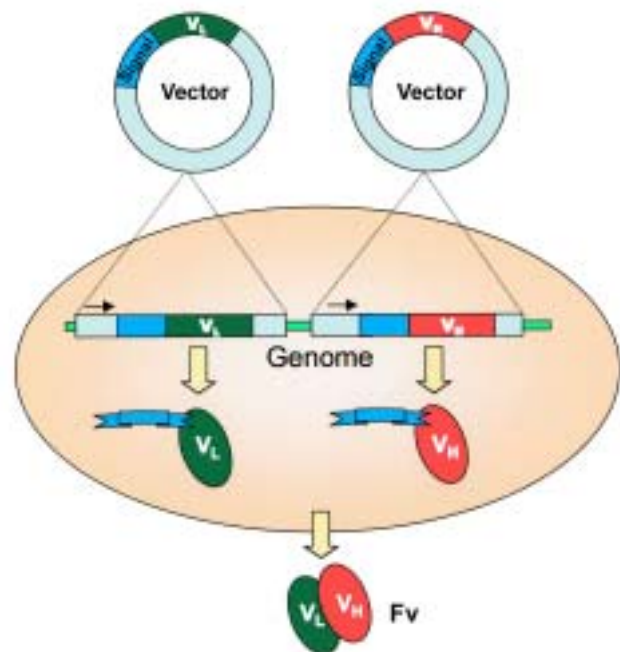


図2. 二本鎖抗体Fvの発現系の模式図

ベクターは酵母のゲノムに組み込まれ，翻訳産物のポリペプチド鎖からシグナルペプチドが除去され，ヘテロダイマーの二本鎖Fvが細胞外に分泌発現されます。

のペプチドのリンカーで連結した一本鎖 Fv として発現されています。

私たちは、Fv の構造研究を目指して、一本鎖 Fv と、連結されていない本来の Fv の双方を発現させました。後者については、分泌シグナルの遺伝子の下流に V<sub>H</sub> と V<sub>L</sub> の遺伝子をそれぞれ連結し、ベクターに組み込んだ酵母用の発現ベクターを調製しました(図 2)。これらのベクターにより二重に形質転換した酵母のゲノム中には、“シグナル-V<sub>H</sub>”と“シグナル-V<sub>L</sub>”が組み込まれました。こうして得た組換え体の酵母は、V<sub>H</sub> と V<sub>L</sub> のタンパク質を同時に発現し、細胞の外にヘテロダイマーの Fv を分泌します。得られた Fv はリフォールディングを行わなくても安定でしたので、ニトロフェノール誘導体との複合体として結晶化したところ、高い分解能の結晶を得ることができました [K. Murase, R. Mizutani, and Y. Satow; Expression, Characterization and Crystallization of the Fv Fragment of Mouse Antibody 3B62 from the Secondary Immune Response, *Acta Cryst.* **D57**, 1703-1705 (2001)]。

酵母の VMA1 遺伝子の産物の VMA1 タンパク質は、その中ほどに位置する intein と呼ばれる領域と、この領域の両端の、アミノ末端側の N-extein とカルボキシル末端側の C-extein を連結した領域を生じます。生じた intein は DNA ホーミングエンドヌクレアーゼ、extein が連結されたポリペプチド鎖は液胞性 ATPase の Vma1 触媒サブユニットとなります。このような反応はプロテインスプライシングと呼ばれ、それ自体で自己触媒的に進行します(図 3)。元々のタンパク質をプロトザイムと呼び、プロテインスプライシングを引き起こすプロトザイムは様々な生物種で見い出されています。

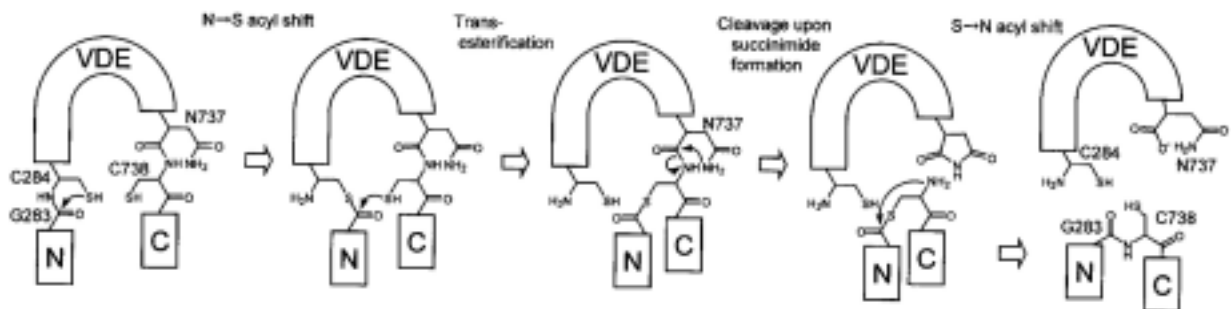


図 3. プロテインスプライシング反応

酵母の VMA1 タンパク質(プロトザイム)はアミノ酸 1071 残基から成り、図中の N は N-extein, C は C-extein, VDE は DNA ホーミングエンドヌクレアーゼに相当する領域です。プロテインスプライシング反応は図のように 4 段階に分けて考えることができ、最初の段階の N-S acyl shift はさらに 3 つのステップに分けることができます。全体の反応はプロトザイム自体で進行し、ペプチド結合の切断と組換えが起きています。

酵母の DNA ホーミングエンドヌクレアーゼは VDE (VMA1-Derived Endonuclease) と呼ばれ、VDE の遺伝子を欠失した酵母のゲノムに自らの VDE 遺伝子を組み込む部位特異的なホーミング酵素です。私たちは、VDE による遺伝子ホーミングとプロテインスプライシングという 2 つの現象に興味を持ち、構造生物学的な研究を行いました。後者のスプライシングの分子機構の解明に向け、VDE の改変体の発現系を構築しました。その結果、スプライシング反応の前駆体の結晶化と X 線解析を行うことができました [R. Mizutani, S. Nogami,

M. Kawasaki, Y. Ohya, Y. Anraku, and Y. Satow; Protein-Splicing Reaction via a Thiazolidine Intermediate: Crystal Structure of the VMAI-Derived Endonuclease Bearing the N and C-Terminal Propeptides, *J. Mol. Biol.* **316**, 917-927 (2002) ]。

この研究では、N-extein と C-extein に相当する 10 残基ほどのペプチドを VDE のアミノ末端側とカルボキシル末端側に付加させた、反応の前駆体に相当するタンパク質（アミノ酸残基に変異を導入して反応の進行を低下させた X10SSS）を発現させ、その構造（図 4）から、最初の N-S acyl shift の段階が環状のチアゾリン中間体を経ることを示しました。

ヒト腎臓のジペプチダーゼは、腎臓皮質の膜にアンカーされて、ジペプチドを加水分解します。この酵素は、ロイコトリエン類やペネムやカルバペネムのβ-ラクタム抗生物質などの加水分解を行います、トリペプチドは全く加水分解しません。

本ジペプチダーゼは、369 アミノ酸残基のサブユニット（42 kDa）から成るホモダイマーとして存在し、膜への結合は Ser 369 に結合する GPI アンカーによっています。

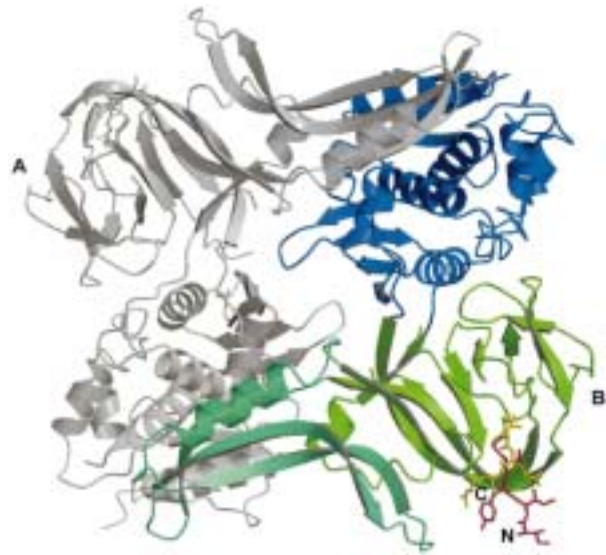


図 4. 前駆体タンパク質 X10SSS の構造  
結晶の非対称単位には 2 分子（A と B）の前駆体 VDE タンパク質が存在します。色彩を付した B 分子では、付加したペプチド部分をワイヤーモデルで示しています。スプライシング反応は緑色で示したドメインで起こります。青と青緑の領域はエンドヌクレアーゼ活性に関わるドメインです。

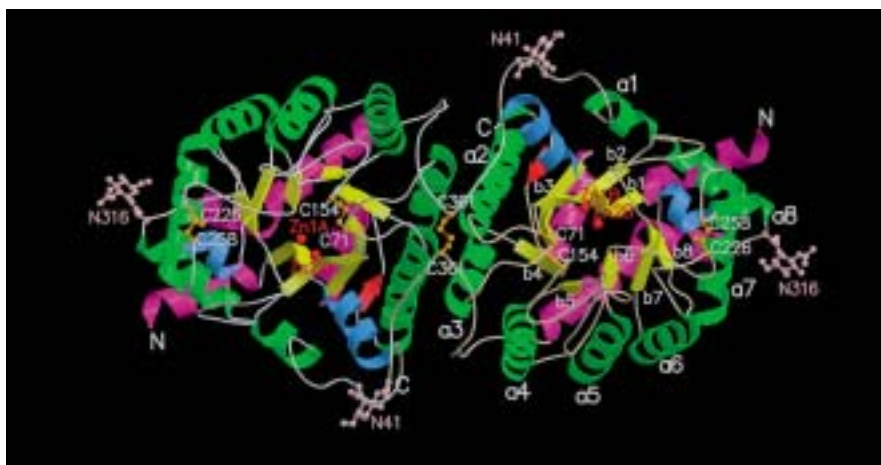


図 5. ヒト腎臓のジペプチダーゼの構造

結晶の単位格子に存在するダイマーとしての分子を、膜にアンカーされる側から見ています。各サブユニットには、糖鎖の結合部位が 3 カ所あり、活性部位には 2 つの亜鉛イオン（赤色）が存在します。活性部位は、バレルのβ鎖ストランドの C 末端側にあり、膜側を向いています。

ヒトからの酵素は *N*-結合型の糖鎖が付加され、そのサブユニットは 69 kDa 程度の分子質量を示し、糖鎖部分は 27 kDa にもなります。活性には亜鉛イオンが必須ですが、三次元構造が既知の亜鉛結合タンパク質とのアミノ酸配列の相同性は全く認められません。

大腸菌にこの酵素を発現させると、糖鎖が付加されないため酵素活性を全く示さないことから、酵母に発現させ、さらに、良好な結晶化の妨げとなる糖鎖を均一に短鎖化して、X線解析が可能な結晶を析出させました。図 5 に示すように、サブユニットは  $(\alpha/\beta)_8$  バレルのドメインから成っています [ Y. Nitanaï, Y. Satow, H. Adachi, and M. Tsujimoto; Crystal Structure of Human Renal Dipeptidase Involved in  $\beta$ -Lactam Hydrolysis, *J. Mol. Biol.* **321**, 177-184 (2002) ]。

抗生物質の代謝を行う酵素であることから、この酵素で加水分解されない抗生物質の設計、創製が求められていました。構造を決定する前には、哺乳類のジペプチダーゼの他には相同なタンパク質が見られず、活性には亜鉛イオンが必須ですが、イオンの数も配意するアミノ酸残基も不明で、ジスルフィド結合や糖鎖結合のサイトなども不明でした。私たちは、ネーティブ体と阻害剤薬物のシラスタチンとの複合体を解析しました。図 6 は複合体でのシラスタチンと活性部位の近傍を示しています。

ジペプチダーゼのバレル構造は、マウスのアデノシンデアミナーゼ、バクテリアのウレアーゼのドメインとよく似た $\beta$ 鎖の空間配置をとり、しかも亜鉛イオンとその配位子も空間的によく対応することに気が付きました。これら酵素は基質に水分子を付加していると考えることができ、私たちはこれらの酵素を metallo-hydrolase と分類し、共通の祖先から進化したか、あるいは、hydrolase 機能を担うように収束的に進化したのではないかと考えています。

### 3. おわりに

回折法による構造生物学の研究推進を目的に、産官学が連携協力する組織が、日本学術振興会の産学協力研究委員会の第 169 回折構造生物研究委員会として設けられています。第 169 委員会は、この目的の達成に向けて活発な活動を行っており、科学研究費補助金（学術創成研究費）への課題推薦を日本学術振興会に行うなど、研究の推進を提案してきました。

私たちは、第 169 委員会の推薦により、平成 14 年度の課題として「生体防御応答系蛋白

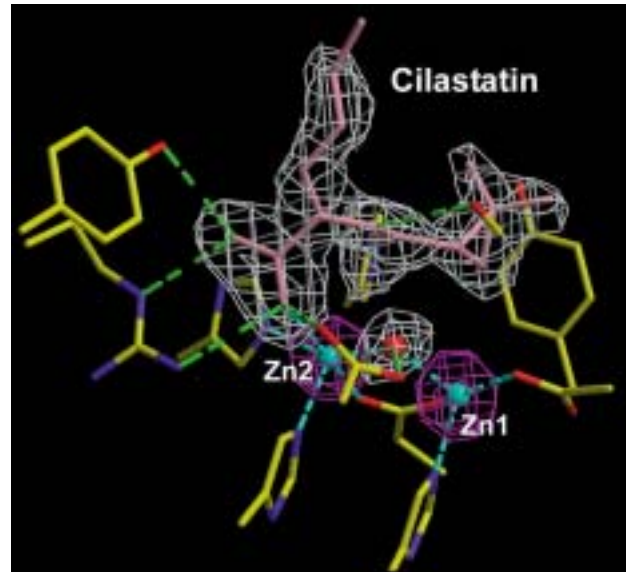


図 6. ジペプチダーゼの活性部位シラスタチン阻害剤との複合体での活性部位にある 2 個の亜鉛イオン（青い球）の間の距離は 3.3 Å しかなく、この近接はグルタミン酸残基のカルボキシル基による橋渡しで保持されています。近くにある水分子（赤い球）が加水分解で作用する求核基で、シラスタチン（ピンク）のペプチド部に近接しています。これらの原子についての電子密度も図に示してあります。

質の三次元構造の解明による創薬基盤の構築」, 同 15 年度の課題として「創薬のための難結晶性蛋白質の回折構造生物学の展開」をテーマとして課題の申請を行いました。外来異物や病原性細菌などを排除して生体の防御を担う免疫系のタンパク質, リガンドと結合して認識シグナルを伝達応答する受容体, 糖脂質などの代謝に関わる酵素は, 生体の防御と恒常性維持ホメオスターシスにおいて中心的な機能を果たしています。そこで, 平成 15 年度の課題申請では, 生体への異物, 病原性の各種因子への防御を担う獲得免疫系の抗体, 自然免疫系の TLR (Toll-Like Receptor) 受容体とその関連タンパク質, そして, 疾患と深く関わり, 様々なリガンドを特異的に認識し, あるいは代謝する酵素と受容体のタンパク質を, 医薬創製すなわち創薬に向けたターゲットとして取り上げました。これらタンパク質はいずれも試料の調製と結晶化が困難なものですが, 最新の分子生物学と X 線回折結晶学の手法を用いる構造生物学的アプローチによって三次元構造の詳細を原子レベルで解明することができれば, 創薬に向けたブレイクスルーをもたらすものと期待できます。このような回折構造生物学の展開のための学術基盤の構築を目的として, 私たちは課題を提案しました。

タンパク質の三次元構造情報に立脚した創薬では, まず, 疾患に関わる研究ターゲットのタンパク質を特定し, ゲノム情報を活用しながら, 生体中に微量にしか存在しないタンパク質を大量に発現させ, 精製し, 良質の結晶を析出させなければなりません。しかし, 創薬の対象となるタンパク質(とりわけ, ヒト由来のタンパク質)は, 糖鎖が付加されていたり, 細胞表面や細胞膜内に存在する 경우가多く, タンパク質の発現レベルも低く, 高純度かつ大量の試料を必要とする結晶化は未だ極めて困難です。私たちの提案では, これら困難を打開するために, 結晶試料の調製がとりわけ困難な防御応答系のタンパク質群をターゲットに, タンパク質の発現から, 結晶化, 三次元構造の解明へ至る一連の研究基盤の構築を目指しています。

第 169 委員会の活動と学術創成研究費への課題申請は, このような目的と方向性の一つの表れと考えられます。ここで紹介した私たちの研究とこの目的・方向性には, 皆様の研究と共通する面がいくつかありうると思います。皆様との学術的な交流または支援を賜うことができれば, あるいは, 微力ながらも皆様のお役に立つことができれば, 幸いです。