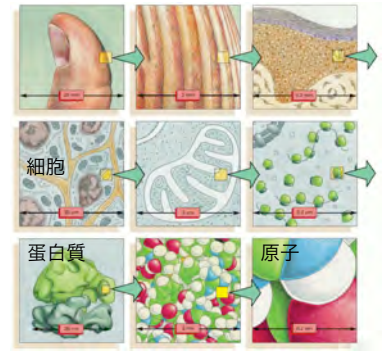


膜蛋白質の構造研究

岩田 想
京都大学大学院医学研究科

細胞及び蛋白質

私たちの体は無数の細胞で構成されています。細胞の表面は細胞膜という脂質の膜によって覆われています。細胞には多くの蛋白質が存在し、各種の機能を司っています。



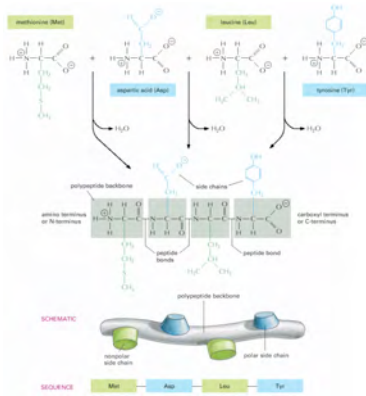
手の指を拡大していくと。。

タンパク質とは

我々の体は2万5000種類以上の違ったタンパク質からできています。

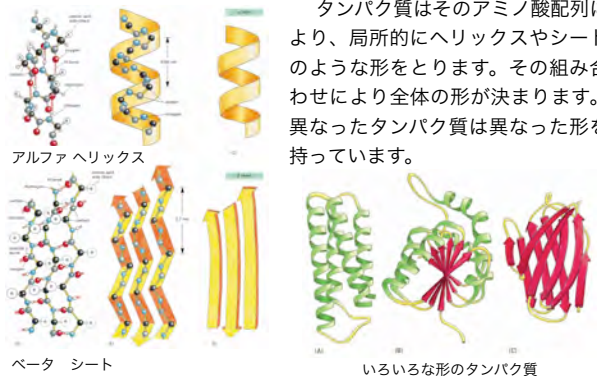
タンパク質は20種類のアミノ酸が決まった順序（配列）に結合し、鎖状に重合したものです。

異なったタンパク質は違うアミノ酸配列、長さを持っています。



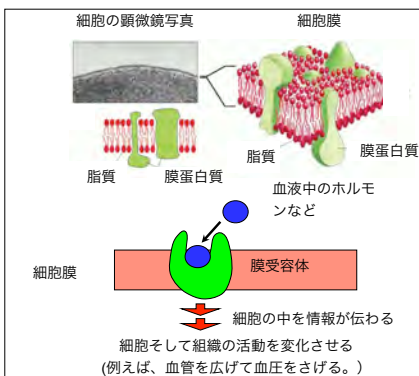
タンパク質の形

タンパク質はそのアミノ酸配列により、局所的にヘリックスやシートのような形をとります。その組み合わせにより全体の形が決まります。異なったタンパク質は異なった形を持っています。



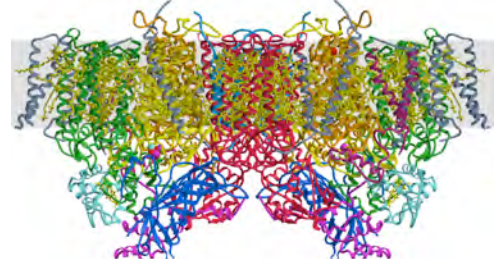
膜タンパク質そして膜受容体

細胞膜の中に存在しているタンパク質を膜タンパク質と呼びます。この内、細胞の外から来るホルモン等の物質を受け取り、細胞の機能を調節する蛋白質を膜受容体と呼びます。

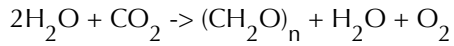
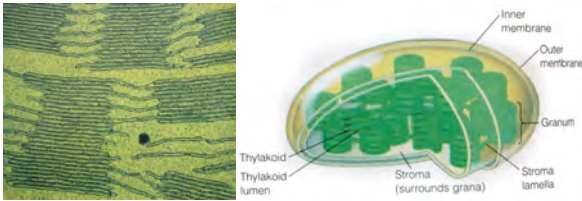


我々がこれまでに構造解析した膜タンパク質の例

- 光合成系II：植物において、光エネルギーを用い水を酸素と水素と水素に分解する蛋白質である。我々の呼吸する酸素は全てこのタンパク質に由来する。将来のクリーンなエネルギー（水素）の生産への応用が期待される。

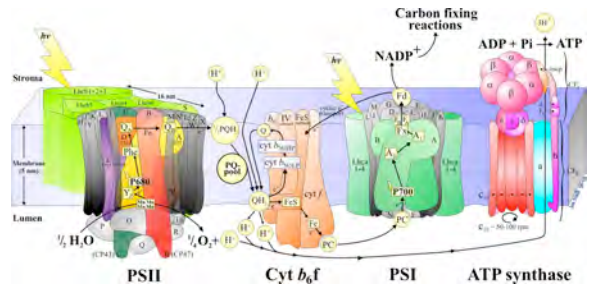


葉緑体



暗反応 (でんぷんを作る) 明反応 (酸素を作る)

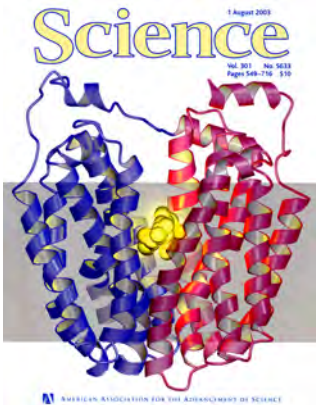
明反応を行う膜タンパク質群



全ての空気中の酸素は光化学系IIにより作られる

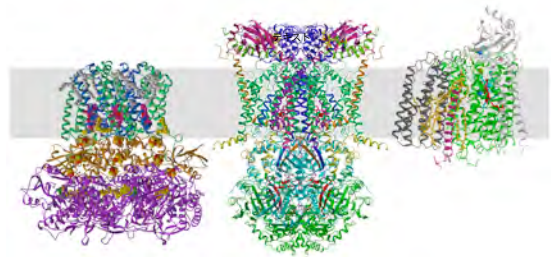
ラクトース輸送体

●糖輸送体：細胞の血液からの糖（栄養源）の取り込みを行う蛋白質であり、その構造は糖尿病治療法の開発等への利用が期待される。

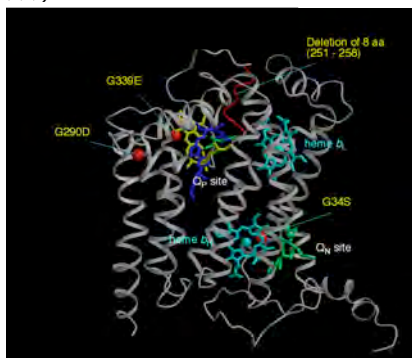


呼吸鎖酵素群

●人間が呼吸した酸素を用い、栄養分を燃焼することによりエネルギーを作る一連の重要な蛋白質である。その欠陥が多くの遺伝病に関係しており、その治療法の開発に構造の知識が不可欠である。



構造を用いたヒト遺伝病の解析（エクササイズイントレランスの例、Andreu et al, N. Engl. J. Med. 341,1999)



シトクロム
bcl複合体

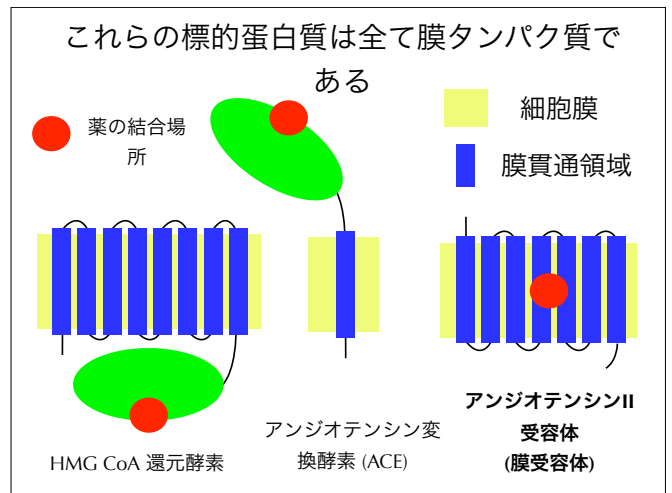
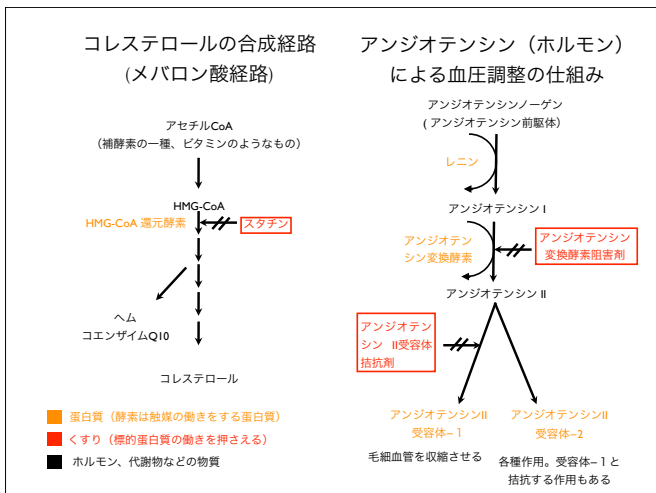
21世紀の岩田研の目標
タンパク質の形を決めて健康になろう！



コレステロールを減らす
スタチン: HMG CoA 還元酵素の阻害剤

血圧を下げる
Cozaar: アンジオテンシン II 受容体拮抗薬

Lisinopril: アンジオテンシン変換酵素 (ACE)の阻害剤

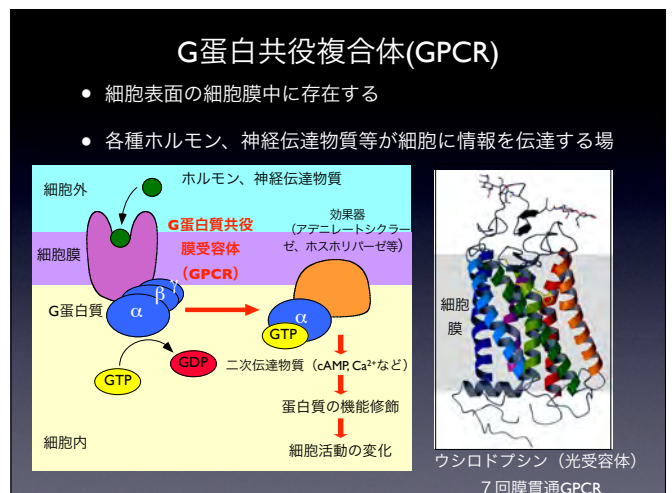


血圧以外にも問題が。。

毛根細胞において男性ホルモンからアンドロジェンの産生を阻害する薬 (プロペシア) が効果をあげている。

減量前(2003) → 減量後(2006)

Propecia



受容体 (GPCR) と創薬

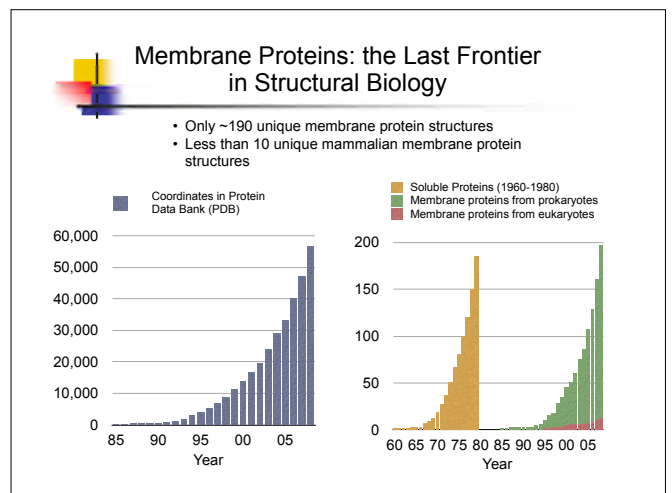
膜受容体は最も多く存在するヒトの膜蛋白質 (1000種以上) です。市販されている薬の50%以上が膜蛋白質、特に膜受容体に結合して働くことが知られています。

医薬のターゲットの内訳

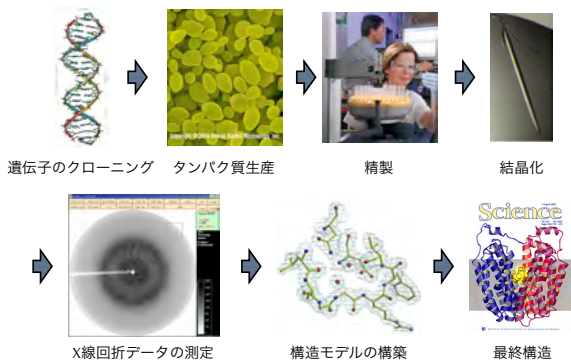
膜受容体	30%
各種膜蛋白質	7%
その他	47%

膜受容体をターゲットとする医薬の例

抗アレルギー剤、胃潰瘍治療薬、降圧薬、心不全治療薬、抗不整脈薬、喘息治療薬、抗うつ薬、片頭痛治療薬、パーキンソン病治療薬、抗精神病薬など



タンパク質構造解析の手順



ERATO岩田ヒト膜受容体構造プロジェクト

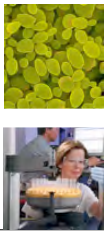
受容体構造決定の流れ（2、3、4のプロセスがボトルネック）



複数のボトルネックを解消する技術を平行して開発し、5年間で5-10個程度の創薬に重要な膜受容体の構造解析を目指す。

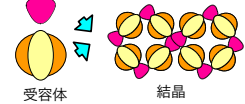
京都研究室における技術開発

膜受容体を酵母などを用いて大量に生産する技術の確立をめざします。



膜蛋白質の結晶化を促進する技術の開発をめざします。

結晶化を促進する蛋白質

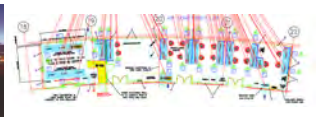
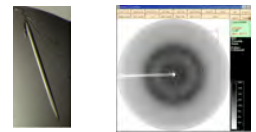


英国放射光実験施設ダイヤモンド膜蛋白質研究室における技術開発(インペリアルカレッジと協力)

自動化により、少ないサンプルから迅速に膜蛋白質結晶を得る技術を確認します。

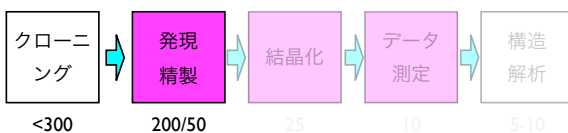


受容体結晶からのX線回折データを測定する高精度システムの開発をめざします。



研究体制：受容体発現精製グループ

- 200個程度のヒトGPCRを酵母/昆虫細胞を使って発現させる。
- 50個程度のヒトGPCRを安定にかつ大量（数mg-数十mg）に精製する技術を確認する。



ヒトタンパク質の大量生産

- ヒトから大量に取ることはできないので、他の生物を使い生産する。

大腸菌や酵母などに作ってもらう。

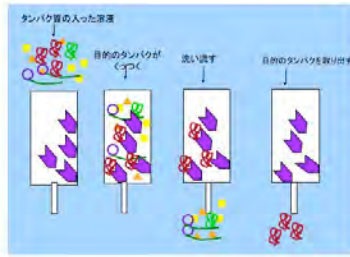
細胞を使わずに作る。(無細胞系)



タンパク質を作るのに必要な材料と酵素を入れることで、目的のタンパク質を作ることが出来る。

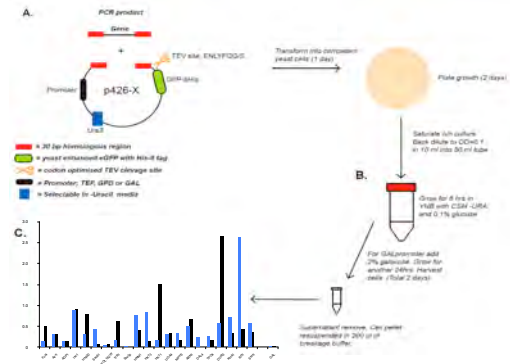
こうして得られたタンパク質の溶液には目的のタンパク質以外のものも含まれている。そこで、キレイにする必要がある。

目的のタンパク質を精製する

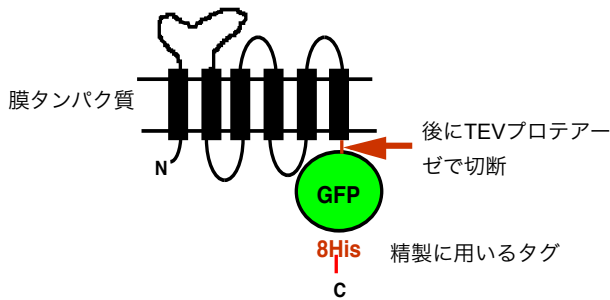


大きさや性質によっていろいろなタンパク質を分けることができる。

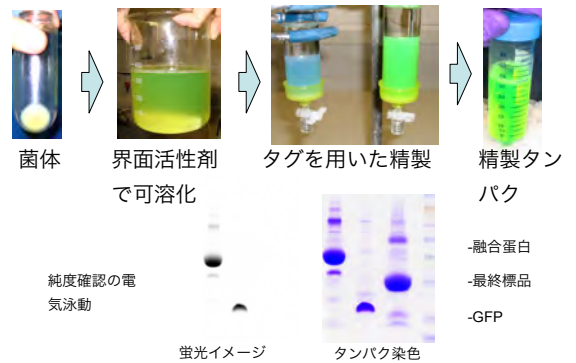
サッカロマイセス（パン酵母）を使ったGPCR生産



タンパク質がGFP（蛍光タンパク質）と Hisタグ（精製のための標識）との融合タンパク質として生産される



蛍光標識された膜タンパク質の精製



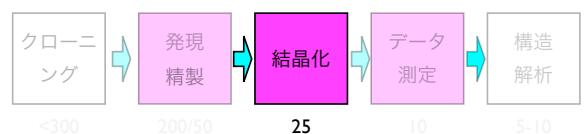
これまでに酵母で発現に成功している

GPCRと創薬

- セロトニン受容体 抗うつ薬、片頭痛治療薬
- アデノシン受容体 パーキンソン病治療薬、虚血性心疾患治療薬
- タキキニン受容体 気管支喘息治療薬
- オピオイド受容体 麻酔薬、麻薬性鎮痛薬、薬物依存治療薬
- ヒスタミン受容体 抗アレルギー剤、消化性胃潰瘍治療薬
- ドーパミン受容体 パーキンソン病治療薬、抗精神病薬
- アドレナリン受容体 降圧薬、心不全治療薬、抗不整脈薬、気管支喘息治療薬

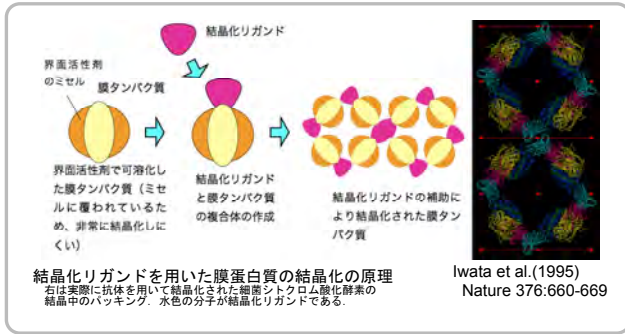
結晶創成グループ

- ヒトGPCRの結晶性を飛躍的に向上させる抗体フラグメントまたはバインダー（人工抗体）作成する技術を確立する。
- 発現量の低い(数mg程度)ヒトGPCRに対し、すべての主要な結晶化条件（10万条件程度）でスクリーニングを行える微量膜蛋白質結晶化技術を確立する。
- 25個程度のヒトGPCRの結晶を得ることを目指す



結晶化リガンドとしての抗体の有用性

- 抗体が結合することによって膜蛋白質と安定な複合体を形成する
- 膜蛋白質/抗体複合体の全体としての親水性表面が拡大して結晶性が向上する



達成目標

- 任意の膜蛋白質（特に哺乳類由来）に対して高い特異性と親和性（ 10^{-9} Mオーダーの解離定数をもつ）を兼ね備えた抗体を生産するための一連の技術を開発する
- その技術を用いて本プロジェクト期間中に膜蛋白質/抗体複合体の新規構造を、2Å付近での高分解能で決定する

開発すべき3つの要素技術

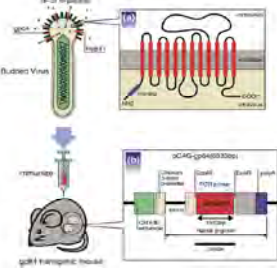
- (1) 膜蛋白質の機能的構造（天然のコンフォメーション）を保持したままマウスに免疫する技術
- (2) 結晶化リガンド候補のハイスループットスクリーニング系
- (3) 生体免疫系から得られた抗体を進化分子工学の手法により高機能化する技術

開発すべき要素技術 (1)

膜蛋白質の機能的構造を保持したままマウスに免疫する技術

ヒト膜蛋白質の不安定さと抗原性の低さを解決する方法

膜蛋白質を発芽型バキュロウイルスにディスプレイして、ウイルス外被タンパク質(gp64)のトランスジェニックマウスに免疫する。ターゲットをノックアウトしたマウスを使うとさらに有効。



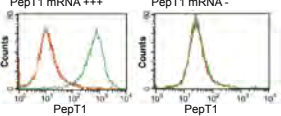
モノクローナル抗体作製例

Anti-PepT1 mAb

PepT1: H⁺依存型オリゴペプチドトランスポーター
12回膜貫通、ヒト由来

樹立されたモノクローナル抗体の特異性

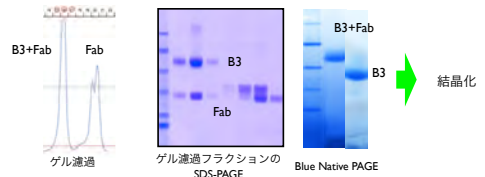
AsPC-1(ヒト肺癌細胞株) BxPC-3(ヒト肺癌細胞株)
PepT1 mRNA +++ PepT1 mRNA -



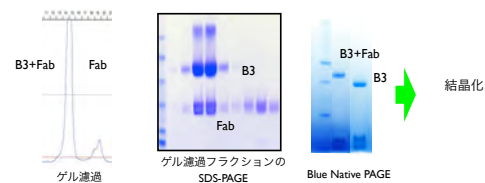
GREEN: (+) Ab Red: (-) Ab
フローサイトメトリー陽性の(抗PepT1抗体を産生する)ハイブリドーマ47クローンを樹立

ヒト赤血球膜バンド3と抗体の共結晶化の実例

Antibody BRAC17 (Western negative)

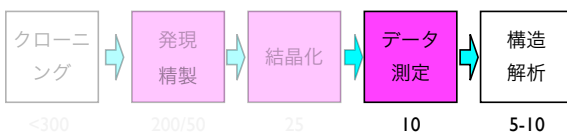


Antibody BRAC18 (Western negative)

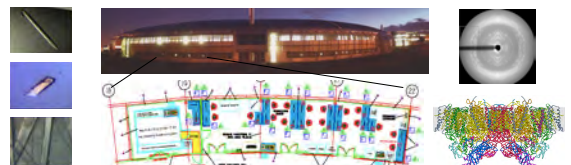


データ計測技術開発グループ

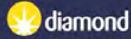
- 結晶化プレートから直接X線回折データを計測し結晶最適化条件をスクリーニングするシステムを開発する。
- 微小で回折の弱い膜蛋白質結晶から回折データを得られる超低ノイズのデータ測定系を開発する。
- 10個程度の良好な回折データ、5-10個程度のヒトGPCR構造を得ることを目指す。



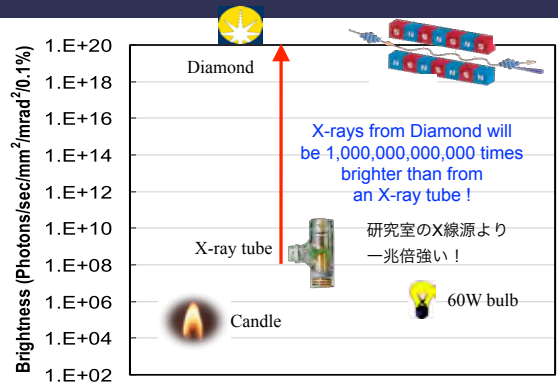
ダイヤモンド膜タンパク研究室 (Diamond-MPL)



ダイヤモンド放射光実験施設 (日本のSpring-8に相当)



非常に強いX線を発生させる装置



ダイヤモンド膜タンパク研究室 (Diamond-MPL)



Nov 2006

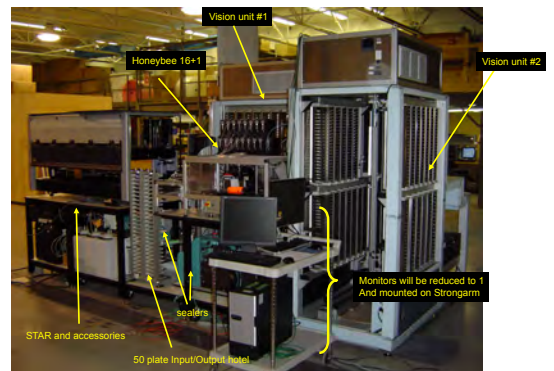


March 2007

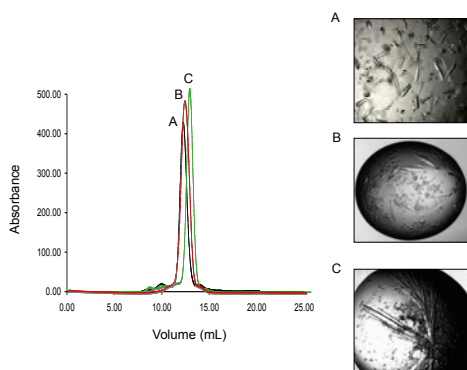


April 2007

全自動結晶化装置

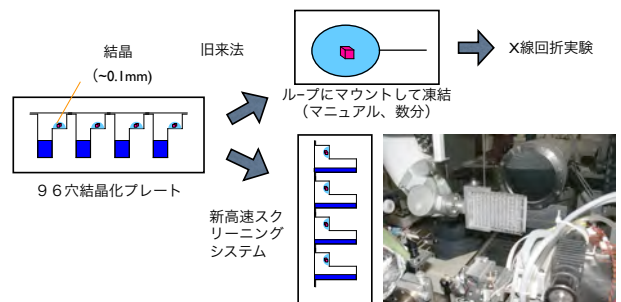


生産された膜タンパク質の結晶化



高速結晶スクリーニングシステム

- 結晶条件の最適化が現在構造解析の律速になっている。
- 結晶化プレートを直接回折計にマウントし、X線回折データを測定する。結晶化条件最適化の時間を1/100程度に短縮できる可能性がある(1-2年→数日/週間)。

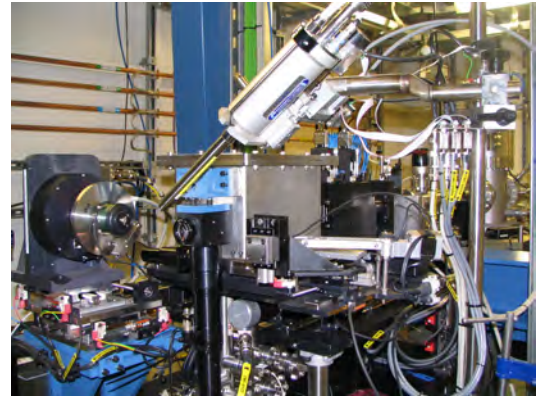
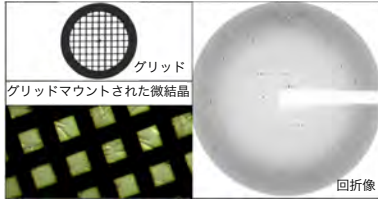


超低ノイズデータ測定システム

●英国の新シンクロトロン "Diamond"において、微結晶から高精度データを測定するマイクロフォーカスビームラインを建設中。



●多数の結晶を一度にマウントしたグリッドからデータを測定する。テストの結果このシステムを使うことにより、分解能を1Å以上向上できる可能性があることがわかった。



本研究の波及効果

受容体発現
精製

膜蛋白結晶
化技術

データ計測
技術

受容体構造
構造解析技術

医学、創薬
- 副作用の少ない医薬の開発
- SNPsの構造上での解釈に基づくテーラーメイド医療

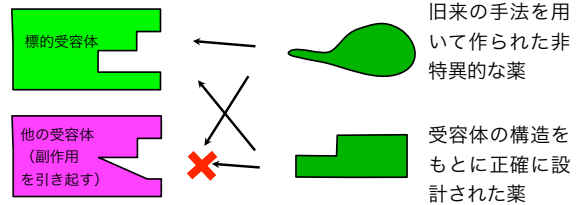
細胞生物学、分子生物学
- 構造に基づく情報伝達研究
- 各種ヒト膜蛋白質構造解析

計算機科学
- 構造未知受容体のモデリング
- オープン受容体のリガンドの推定

私たちの暮らしとの関わりについて

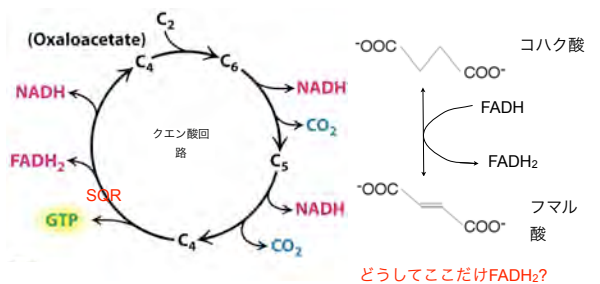
薬が作用する膜受容体の形を正確に知ることにより、副作用の少ない薬を作ることができるようになります。

一人一人の遺伝子の違いによる薬の効果の違いが予測できるようになり、その人に最も適した治療を行うことが可能になります。

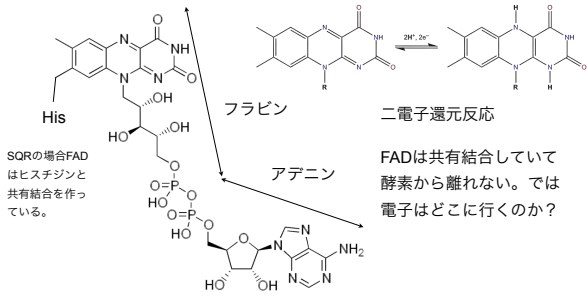


3. セミナー：コハク酸脱水素酵素の構造と機能

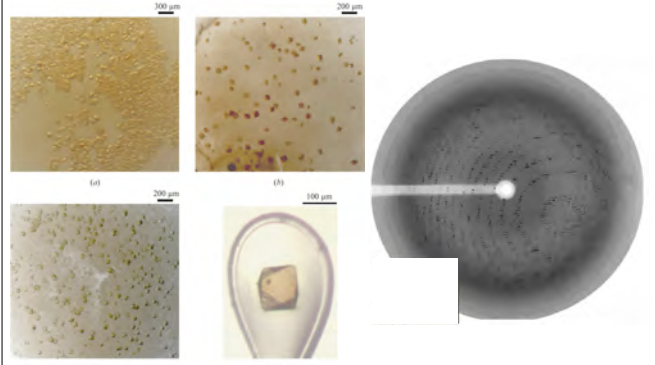
コハク酸脱水素酵素 (SQR)



フラビンアデニンジヌクレオチド (FAD)

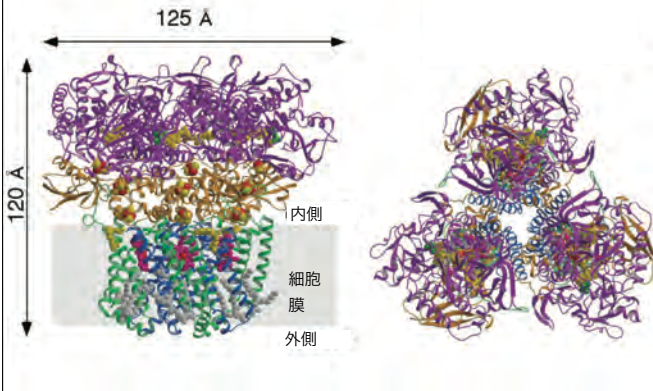


コハク酸脱水素酵素 (SQR) の結晶構造解析

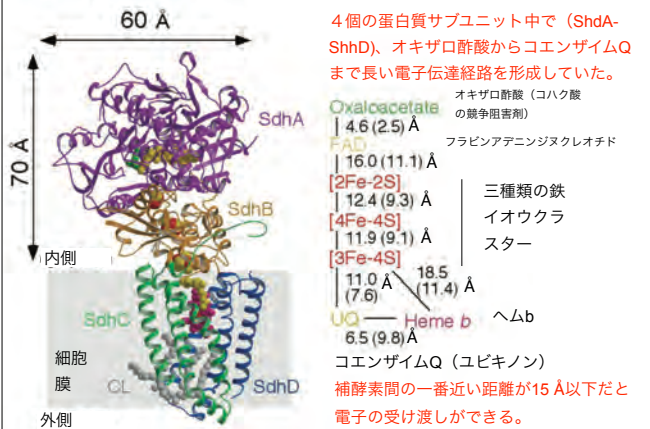


コハク酸脱水素酵素 (SQR) の全体構造

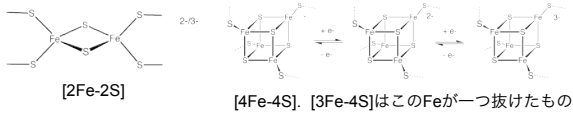
コハク酸脱水素酵素は膜蛋白質



コハク酸脱水素中の補酵素

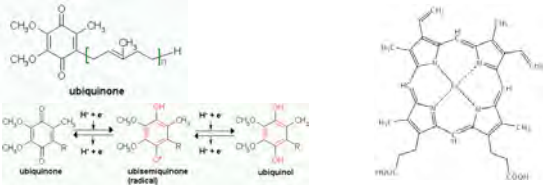


3種類の鉄イオウクラスター



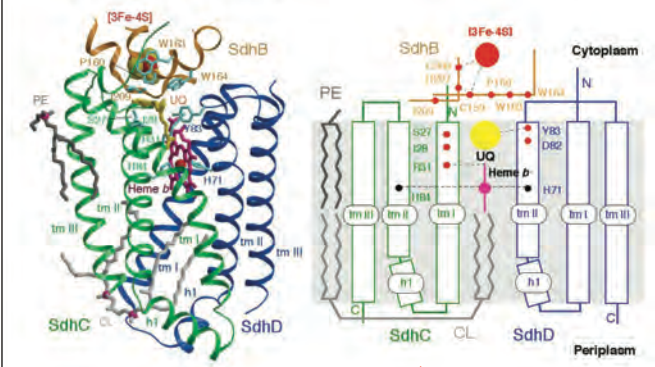
コエンザイムQ (ユビキノン、UQ)

ヘムb

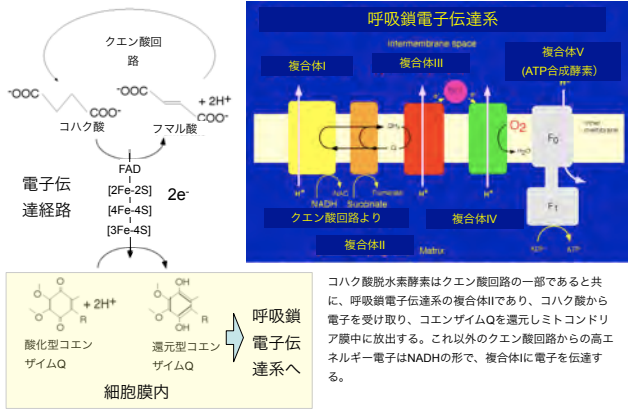


いずれも複数の酸化還元状態を持ち電子の受け渡しができる

コエンザイムQの結合部位は細胞膜中にある



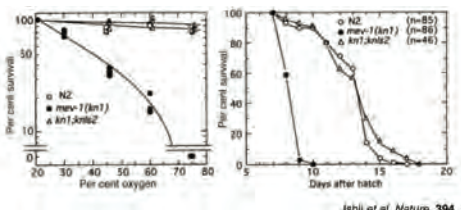
コハク酸脱水素酵素は呼吸鎖電子伝達系に直接電子を渡す



コハク酸脱水素酵素はクエン酸回路の一部であると共に、呼吸鎖電子伝達系の複合体IIであり、コハク酸から電子を受け取り、コエンザイムQを還元しミトコンドリア膜中に放出する。これ以外のクエン酸回路からの高エネルギー電子はNADHの形で、複合体Iに電子を伝達する。

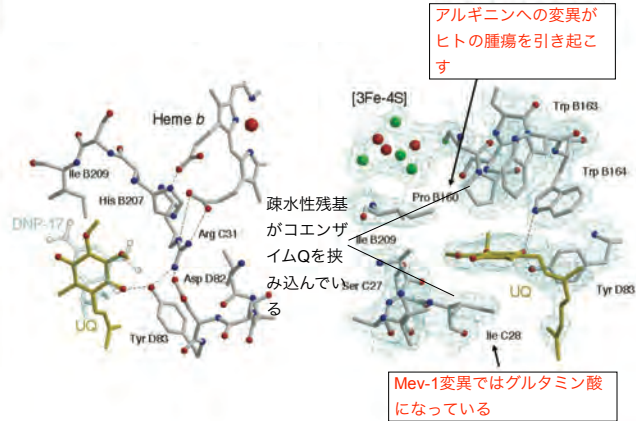


コハク酸脱水素酵素のMev-1変異はC.elegans線虫の加齢を加速する。



- 高い酸素濃度で加速され、細胞内の活性酸素濃度が上昇する
- ラジカル補足剤 (ラジカスカベンジャー) により通常の寿命を回復する
- 同じ部分の変異は人間では腫瘍を引き起こす (Hereditary paragangliomaやpheochromocytoma)

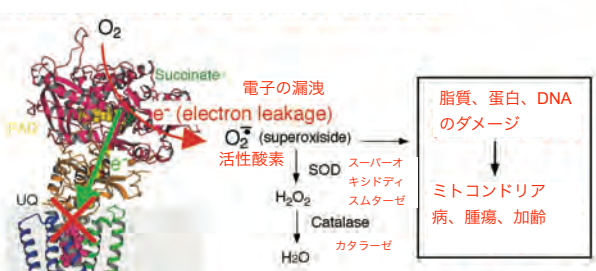
Mev-1はコエンザイムQの結合部位の変異である。



アルギニンへの変異がヒトの腫瘍を引き起こす

Mev-1変異ではグルタミン酸になっている

機能しなくなったコエンザイムQの結合部位が高エネルギー電子の漏洩を引き起こし、活性酸素が生じる。



脂質、蛋白、DNAのダメージ
↓
ミトコンドリア病、腫瘍、加齢

コハク酸の酸化能力は残っているが、コエンザイムQ (UQ)に電子を渡せなくなるため、受け取った電子がFAD (唯一外部に露出) から酸素に渡され活性酸素が生じる。

