

「生体分子の形と機能」研究領域 領域活動・評価報告書
—平成 17 年度終了研究課題—

研究総括 郷 信広

1. 研究領域の概要

本研究領域は、遺伝情報が機能として発現するのを支えている物理的実体としての生体分子(タンパク質)に焦点をあて、物理学、化学等の物質科学の原理に基づき、その立体構造形成の仕組みや立体構造に基づく機能発現の仕組みを研究するとともに、今急速に蓄積が進んでいるゲノム情報等を対象としたバイオインフォマティクスの手法を用いた研究も対象とする。

具体的には、タンパク質等の立体構造の実験的決定、理論的予測、物性研究、相互作用や複数の分子からなる超分子構造体の解析に関する新しい研究方法の開発等の基礎的研究とともに、合理的薬物設計、生物的機能の工学的利用を目指した応用的研究が含まれる。

2. 研究課題・研究者名

別紙一覧表参照

3. 選考方針

選考の基本的な考えは下記の通り。

- 1) 選考は「生体分子の形と機能」領域に設けた選考委員8名と研究総括で行う。
- 2) 選考方法は、書類選考、面接選考及び総合選考とする。
- 3) 選考にあたっては、下記事項を重視した。
 - ① 研究領域の趣旨に合致する必要があるが、領域の定義は広めに捉える。
 - ② 研究者自身による独創性のある研究構想であること。
 - ③ 知的財産の形成や新技術の創製につながるような、今後の科学技術にインパクトを与える可能性を有しているものと共に、当面の応用を意識しない基礎研究も重視する。
 - ④ 研究構想が現実的なものについては、3年間の構想を厳しく評価し、夢を追及する面のあるものに関しては、夢の質と研究者の資質を問う。

4. 選考の経緯

一応募課題につき研究総括および領域アドバイザー2名の計3名が書類審査し、書類選考会議において面接選考の対象者を選考した。続いて、面接選考および総合選考により、採用候補者を選定した。

選考	書類選考	面接選考	採用者
対象者数	84名	18名	8名

5. 研究実施期間

平成 14 年 11 月～平成 18 年 3 月

(当初計画は平成 17 年 10 月が研究終了時期であったが、期間中に延長制度ができ、2 期生は全員延長制度を利用した。)

6. 領域の活動状況

(1) 研究課題達成への取り組み

上記期間中に領域会議を7回実施して、研究進捗状況の報告と、領域アドバイザーや領域全研究者との間で、研究課題達成への問題点、方向性、指針等についての自由闊達な議論を展開し、研究の進捗を図った。

また CREST「たんぱく質の構造・機能と発現メカニズム」領域とのたんぱく質関連領域合同シ

ンポジウムを2回実施し、熱心な質疑応答が研究に生かされた。

また、領域アドバイザーは研究者からの研究内容に関する相談があったときは、随時適確な指導・助言を行った。

(2) 研究遂行への支援

研究開始前に、全研究者の研究実施場所およびその上司を訪問し、研究実施場所の確認と研究者へのアドバイス、上司への協力依頼を行った。

研究開始後は、研究者が研究を最大限に促進できるための、迅速な物品購入や進捗に応じた予算執行等の支援、研究成果の取りまとめや外部発表への積極的な支援、新技術創製に繋がる基礎的研究の特許出願促進等の支援を、領域事務所が本部と連携して行った。

また、研究実施現場での諸課題については領域事務所職員が実地に赴き、研究者と直接対話しながら適確に対応処理した。

(3) これらの領域活動が円滑に行われたのは、領域事務所が研究者とのコミュニケーションを図りながら支援しているところが大きく、さきがけ制度における領域事務所機能が十二分に発揮された結果と考えている。

7. 評価の手続き

個人研究者からの報告・自己評価をもとに、領域アドバイザーの協力を得て行った。また領域会議での研究進捗状況発表や外部発表の内容を考慮した。さらに一般公開の合同シンポジウムにおいての産官学の参加者からの意見、質疑応答の内容などを参考にした。

(評価の流れ)

平成 17 年 10 月～	研究期間終了
平成 18 年 3 月	
平成 17 年 11 月	研究報告会開催
平成 18 年 2 月	研究報告書及び研究課題別評価提出
平成 18 年 3 月	研究総括による評価

(研究期間延長制度を利用した研究者も、評価はこの流れで実施した。)

8. 評価項目

- (1) 外部発表(論文、口頭発表等)、特許、研究を通じての新たな知見の取得等の研究成果
- (2) 得られた研究成果の科学技術への貢献

9. 研究結果

H14 年度に採択した研究者(第2期生)8名の研究分野は、たんぱく質の結晶構造解析による立体構造研究が3名、光学手法等によるたんぱく質の機能発現機構研究が3名、たんぱく質設計に関する研究が2名であった。全員地道に研究を進め、領域会議をきっかけとして2期生同士の交流は無論のこと、1期生および3年目に参加した3期生との交流も積極的に行った。その結果具体的な共同研究が10件近く遂行された。

平成17年11月に実施したCREST「たんぱく質の構造・機能と発現メカニズム」領域との合同シンポジウムにおいては、CREST研究代表者の報告に混じって、2期生全員が3年間の成果をまとめて報告したところ、ユニークな発想や研究内容、および積極的な取り組み姿勢について参加者から好評を得た。2期生の成長が客観的にも認められたものと受けとめている。

立体構造研究分野では、濡木理研究者が、遺伝情報を翻訳してたんぱく質合成に結びつける遺伝暗号翻訳装置についての構造研究を進め、遺伝暗号翻訳過程におけるtRNAの役割やアミノアシルtRNA合成酵素のtRNA認識機構や作用機序について、多くの複合体の結晶構造解析に成功して機構解明を行った。うち、鋳型非依存性RNAポリメラーゼ反応機構に関する論文は、Nature誌に掲載された。tRNAの一生に関わる本研究は、H17年度SORSTに採択され、遺伝暗号翻訳装置の機能統合の構造的基盤解明に発展させることになった。

この分野では、村上聡研究者も、世界で始めて結晶構造解析により立体構造を解明していた

多剤排出たんぱく質 AcrB の薬剤認識機構解明の研究を進め、多剤と AcrB 結合複合体や発現制御因子の結晶構造解析に成功し、AcrB 非対称構造にもとづく新しい反応形態による、薬剤の認識機構と多剤の排出メカニズムを解明した。これもインパクトの大きい研究成果である。この分野は 1 期生も含めると、かなりの研究者数になったので、X線結晶構造解析装置のある Spring8 のような施設でお互いに顔をあわせる機会も多く、領域会議とは別の場所でも情報交換や交流ができたことも研究推進に役立ったと思われる。

光学手法等による機能発現機構研究分野では、芳坂貴弘研究者が、日本化学会進歩賞や東京テクノフォーラム 21・ゴールドメダルを受賞した 4 塩基コドンによる非天然アミノ酸のたんぱく質への導入という斬新な発想を用いて、新規な構造機能解析法の開発を進め、蛍光標識アミノ酸を特定の 2 箇所に導入して蛍光共鳴エネルギー移動効果を高めるという新規な解析法を開発し、2 件の特許出願を行った。実用化検討課題にも採択された。この分野も 1 期生及び 3 期生も含めると、かなりの数の研究者が、蛍光物質などの発光体を用いて生体の機能解析を進めたので、領域会議での討議やアドバイザーからの指摘が、研究を進める上で大いに参考になったと思われる。

たんぱく質設計の研究分野では、高野和文研究者が、たんぱく質の配列と構造の相関関係を、安定性の要因も加えて系統的に行う研究を進め、この過程で凝集性のアミロイド配列の構造解析に成功した。アミロイド配列の繊維状凝集は、アルツハイマーやプリオンの病因とされているので、メディアからも注目された。また高野研究者は、大阪大学発たんぱく質結晶化ベンチャー「創晶」の立ち上げを主導し、1 期生の井上豪研究者および 2 期生の村上聡研究者とともに技術顧問としてその活動を支えている。

その他の 2 期生も顕著な成果を挙げているので、各研究者の研究課題別評価を是非参照願いたい。H14 年度は当領域の活動も軌道に乗ってきた時期で、採択された 2 期生にとっても、良い研究環境が提供できたのではないかと思う。ほとんどの 2 期生がさきがけ研究期間中に昇格や昇任を果たしたことも特記したい。

以上概観したように、「生体分子の形と機能」の領域をある程度広く捉えて多様な研究課題を採択し、新技術創製とともに研究者の交流や成長に寄与したいとの当初の思いはかなり達成できたと考えている。新鮮な発想とある程度の経験をもっている 30 代の研究者に国の支援を与え、自分のやりたいテーマを追求できる個人型研究「さきがけ」の制度は、新技術創製や若手研究者の育成の点からは非常に優れた制度であることを研究総括の経験から強調しておきたい。

10. 評価者

研究総括 郷 信広 日本原子力研究開発機構 量子ビーム応用研究部門 特別研究員

領域アドバイザー氏名(五十音順)

北川 禎三	自然科学研究機構分子科学研究所 教授
桑島 邦博	東京大学大学院理学系研究科 教授
五條堀 孝*1	国立遺伝学研究所生命情報研究センター 教授
近藤 滋	名古屋大学理学部生命理学科 教授
月原 富武	大阪大学蛋白質研究所 教授
中野 明彦	東京大学大学院理学系研究科 教授
西川 建	国立遺伝学研究所生命情報研究センター 教授
吉田 賢右	東京工業大学資源研究所 教授

*1 平成 13 年 10 月～平成 17 年 7 月まで参画

(参考)

(1)外部発表件数

	国内	国際	計
論文	7	118	125
口頭	114	42	156
その他	9	7	16
合計	132	165	297

※平成18年3月末現在

(2)特許出願件数

国内	国際	計
2	0	2

(3)受賞等

- ・濡木 理
手島工業教育資金団手島記念研究賞(H17.2)
- ・芳坂 貴弘
日本化学会 進歩賞(H15.3)
東京テクノ・フォーラム ゴールドメダル(H15.4)
第4回バイオビジネスコンペ JAPAN 最優秀賞(H16.4)
- ・村上 聡
国立大学法人大阪大学 教育研究功績賞(H16.1)

(4)招待講演

国際 30件
国内 40件

別紙

「生体分子の形と機能」領域 研究課題名および研究者氏名

研究者氏名 (参加形態)	研究課題名 (研究実施場所)	現職 (応募時所属)	研究費 (百万円)
佐藤 健 (兼任)	タンパク質選別輸送装置の人工膜小胞への再構成 (理化学研究所中央研究所)	理化学研究所中央研究所 研究員 (同上)	51
沈 建仁 (兼任)	生体光エネルギー変換の分子機構－光化学系Ⅱ複合体の構造と機能の解明及びその応用 (岡山大学大学院自然科学研究科)	岡山大学大学院自然科学研究科 教授 (理化学研究所播磨研究所 前任研究員)	53
高野 和文 (兼任)	蛋白質の「配列－構造－安定性」関連の系統的解析 (大阪大学大学院工学研究科)	大阪大学大学院工学研究科 助教授 (同上 助手)	41
田口 英樹 (兼任)	シャペロニンの役割の解明による効率的なタンパク質折りたたみ法の確立 (東京大学大学院 新領域創成科学研究科)	東京大学大学院新領域創成科学研究科 助教授 (東京工業大学資源化学研究所 助手)	50
濡木 理 (兼任)	構造ゲノム科学およびプロテオミクスに基づく新規の遺伝暗号翻訳装置の同定と機能発現メカニズムの解明 (東京工業大学生命理工学研究科)	東京工業大学大学院生命理工学研究科 教授 (東京大学大学院理学系研究科 助教授)	78
芳坂 貴弘 (兼任)	蛍光標識アミノ酸の導入によるタンパク質の新規構造機能解析法の開発 (北陸先端科学技術大学院大学 材料科学研究科)	北陸先端科学技術大学院大学 材料科学研究科 助教授 (岡山大学工学部 助手)	60
松浦 友亮 (兼任)	分子進化工学的手法による新規トポロジ-を有する蛋白質の探索 (大阪大学大学院工学研究科)	大阪大学大学院工学研究科 助手 (Universitat Zurich, Biochemisches Institut, ポスドク)	41
村上 聡 (兼任)	薬剤耐性化問題の克服を目指した多剤排出蛋白質の薬剤認識機構の解明とその応用 (大阪大学産業科学研究所)	大阪大学産業科学研究所 助教授 (同上 助手)	37

研究課題別評価

1 研究課題名: タンパク質選別輸送装置の人工膜小胞への再構成

2 研究者氏名: 佐藤 健

3 研究のねらい:

真核生物の細胞内には、小胞体、ゴルジ体、リソソーム等のオルガネラ(細胞内小器官)が発達し、それぞれのオルガネラが独自の機能を担っている。これらのオルガネラ間では直径50-100nmの「輸送小胞」を介した小胞輸送と呼ばれるシステムにより、盛んに物質や情報のやりとりが行われている。特に代表的なオルガネラの一つである小胞体では、各オルガネラで機能するタンパク質や脂質、あるいは細胞外に分泌されるタンパク質の合成が行われ、必要な翻訳後修飾や高次構造の形成が完了したもののみが選択的に輸送小胞に取り込まれて目的の場所へと運ばれていく。本研究では、小胞体からの輸送小胞形成に関わる精製因子と再構成人工膜小胞を用いて、精製因子のみにより輸送小胞の形成と、輸送小胞へのタンパク質の選択的取り込みを再現する完全再構成系を構築し、輸送小胞形成とタンパク質選別輸送の分子機構について詳細に解析を行った。

4 研究成果:

(1) 精製因子のみによる輸送小胞形成反応の完全再構成系の開発

小胞体から形成される輸送小胞は、COPII コートと呼ばれるタンパク質複合体によって覆われていることから COPII 小胞と呼ばれる。COPII コートは、小胞体膜上の輸送されるタンパク質が持つ輸送シグナルと特異的に結合し、この複合体が膜上で集合することにより、目的のタンパク質を選択的に取り込んだ COPII 小胞が形成されると考えられている。COPII コートと輸送されるタンパク質が結合するには、低分子量 GTPase である Sar1p が必要であり、Sar1p の GTPase 活性により輸送されるタンパク質の輸送小胞への取り込みが厳密に制御されていると考えられている。本研究では、出芽酵母を材料として、小胞体から輸送されるタンパク質を再構成したプロテオリポソームを作成し、ここに COPII コートと低分子量 GTPase Sar1p を加えて、輸送されるタンパク質を選択的に取り込んだ COPII 小胞の形成過程を、精製因子のみで再現する完全再構成系の開発を行った(図1)(J. Biol. Chem. に掲載)。

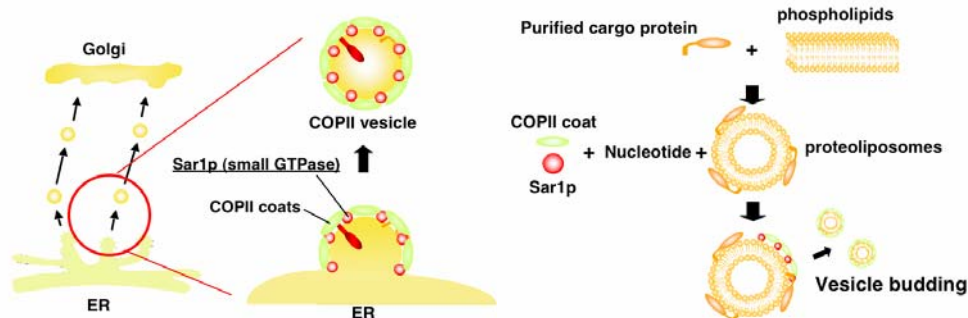


図1 小胞体からの輸送小胞形成(左)と精製因子による完全再構成系の構築(右)

(2) 低分子量 GTPase Sar1p によるタンパク質選別機構の発見

小胞体で機能する低分子量 GTPase Sar1p に限らず、細胞内すべての小胞輸送経路において、輸送小胞の形成は低分子量 GTPase によって制御されていると考えられているものの、その制御機構は長い間謎であった。その理由の一つとして、これまでの細胞から分画したオルガネラを用いた in vitro 実験系では、さまざまな種類の GTPase が混在しているため、輸送小胞形成過程で機能する GTPase 機能のみを切り離して解析することが非常に困難であったことが挙げられる。本研

究で開発した、小胞体からの COPII 小胞形成を必要最小限の精製因子で再現する完全再構成系を用いることにより、COPII 小胞形成反応で中心的な役割を担っている Sar1p の GTP 加水分解の様子を直接測定することが可能となった。さらに、COPII コートに YFP、プロテオリポソーム上の輸送されるタンパク質に CFP を融合させ、COPII 小胞形成過程における COPII コートと輸送されるタンパク質との分子間相互作用を CFP-YFP 間の FRET を指標としてリアルタイムで追跡することのできる実験系を開発した(図2)。これらのオリジナルな実験系を用いて詳細に解析を行った結果、Sar1p は GTP 加水分解のエネルギーを利用して、輸送小胞に取り込むタンパク質の選別を行っているという現象を見いだすことができた(Nat. Struct.& Mol. Biol. に掲載)。

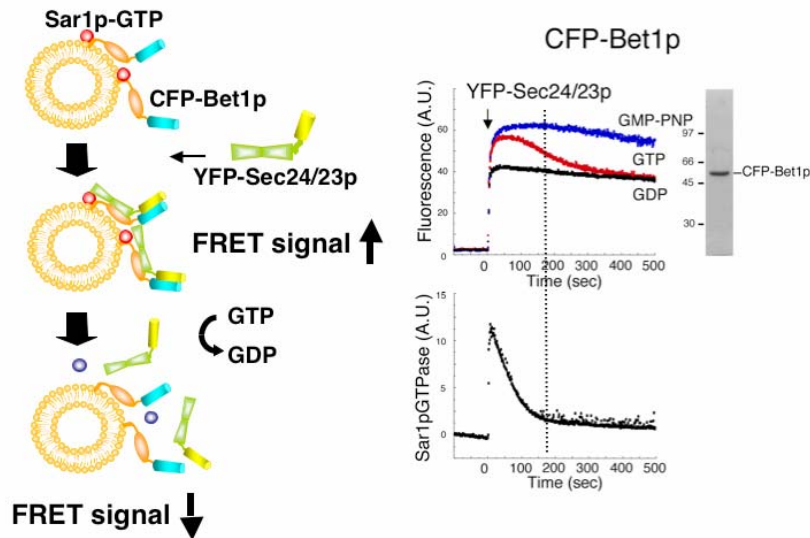


図2 FRET を利用した COPII コートのアセンブリーをリアルタイムで検出する実験系

(3) 輸送小胞形成過程の可視化

これまで、輸送小胞が形成される様子は、電子顕微鏡による固定されたスナップショットという静止した情報しか得られないという限界があった。輸送されるタンパク質が輸送小胞に取り込まれる過程をリアルタイムで可視化することができれば、輸送小胞形成の分子レベルでの作用機序について詳細に解析を行うことができる。そこで、COPII 小胞形成の完全再構成系を人工脂質平面膜上に再現し、1分子観察用の全反射顕微鏡下で COPII 小胞形成過程における輸送されるタンパク質の動態を1分子レベルで可視化することを試みている(図3)。これまでに、平面膜上の蛍光標識された輸送されるタンパク質の二次元拡散が Sar1p の添加によって変化する様子を1分子レベルで計測できるまでに至っている。

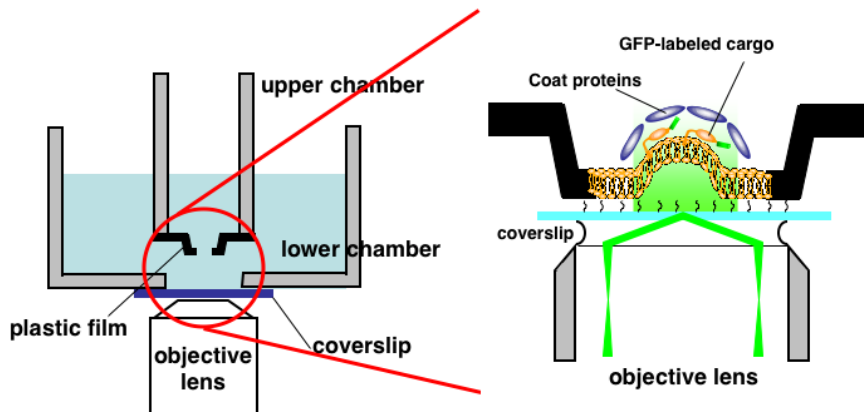


図3 COPII 小胞形成過程の可視化

5 自己評価:

生体膜とタンパク質複合体により機能発現している現象の分子レベルでの解析において、これまで最も大きな成果を残してきた手法の一つにプロテオリポソームへの再構成技術の活用が挙げられる。本研究では、この技術を小胞輸送に応用し、他のグループにさきがけて精製因子のみによる輸送小胞形成の完全再構成系の開発に成功した。この独自の実験系を用いることにより、従来の実験系では解析が困難であった輸送小胞形成過程における低分子量 GTPase の役割を解明することができた。この結果は、本研究において開発した完全再構成系以外の手段ではまず解りそうもないことであり、大きなブレークスルーを達成したといえる。今後、この実験系を用いて他のグループに先行して解析を進めていくことは大きなメリットとなる。

また、完全再構成系を発展させて、顕微鏡下で人工脂質平面膜上に再現した輸送小胞形成反応の1分子計測を行うという試みでは、平面膜上に再構成した輸送されるタンパク質の動態が、輸送小胞形成因子の添加によって変化する様子が捉えられるまでに至っている。このように、完全再構成系と平面膜法を組み合わせる方法が、これまで行われてきた単一で機能する生体分子の1分子計測とは異なり、複数の因子がダイナミックな解離会合を行うことで始めて発現する小胞輸送のような現象の解析に非常に強力な手法となりえることを示した。今後、輸送小胞形成過程を完全に平面膜上に再現し、この現象に関わる因子を1分子単位で計測することにより、輸送小胞形成とタンパク質選別輸送のメカニズムの解明を目指していきたい。

6 研究総括の見解:

成功するには相当の技術レベルを必要とする難度の高い研究課題であったが、輸送小胞形成の完全再構成に関する独自の実験系を創出し、輸送小胞形成過程における低分子量 GTPase Sar1p の役割を見事に解明した。本人の研究課題に対する問題意識が極めて明確で、かつ保有する技術レベルが極めて高いことが成功の要因と評価している。成果の背景には膨大なトライアル量があったと推測するが、本研究は全て本人が一人で地道にやり遂げたものであり、個人型研究さきがけの典型例であったことも付言したい。

7 主な論文等:

論文

1. Ken Sato and Akihiko Nakano

“Oligomerization of a cargo receptor directs protein sorting into COPII-coated transport vesicles”

Mol. Biol. Cell, **14**, 3055–3063, (2003)

2. Ken Sato and Akihiko Nakano

“Reconstitution of coat protein complex II (COPII) vesicle formation from cargo-reconstituted proteoliposomes reveals the potential role of GTP hydrolysis by Sar1p in protein sorting”

J. Biol. Chem. **279**, 1330–1335, (2004)

3. Ken Sato and Akihiko Nakano

“Kinetic dissection of COPII subunits assembly and disassembly on SNAREs during Sar1p GTP hydrolysis”

Nat. Struct. Mol. Biol., **12**, 167–174, (2005)

* 同誌同号の News and Views に掲載される (Vol. 12, p106–107 (2005))

4. Ken Sato and Akihiko Nakano

“Reconstitution of cargo-dependent COPII coat assembly on proteoliposomes”

Methods Enzymol. **404**, 83–94, (2006)

5. Tadashi Satoh, Ken Sato, Akira Kanoh, Katsuko Yamashita, Yusuke Yamada, Noriyuki Igarashi, Ryuichi Kato, Akihiko Nakano, and Soichi Wakatsuki
“Structures of carbohydrate recognition domain of Ca²⁺-independent cargo receptors Emp46p and Emp47p”
J. Biol. Chem. (2006) in press

出版物

1. Ken Sato

“COPII coat assembly and selective export from the endoplasmic reticulum”

J. Biochem. (Minireview) **136**, 755–760, (2004)

2. 佐藤 健、中野明彦

「小胞体におけるタンパク質の選別輸送」*実験医学* Vol. 21, No. 7, 886–891. (2003)

3. 佐藤 健、中野明彦

「小胞体-ゴルジ体間輸送の制御」*生化学* 第 75 卷 第 6 号, 472–478. (2003)

4. 佐藤 健、中野明彦

「小胞体における輸送小胞形成とタンパク質選別の分子機構」*実験医学(増刊)* Vol. 21, No. 14, 122–128. (2003)

招待講演

1. 佐藤 健

シンポジウム「蛋白質の一生:ゆりかごから墓場まで」

「小胞体における輸送小胞形成機構～FRETを用いた解析～」

日本生物物理学会第 42 回年会 (京都) 2004 年 12 月

2. Ken Sato

シンポジウム”Membrane Dynamics and Cell Regulation”

“Dynamics of COPII subunits during GTP hydrolysis”

第 5 回日本蛋白質科学会年会サテライトシンポジウム (福岡) 2005 年 6 月

3. 佐藤 健、中野明彦

ワークショップ「蛋白質の一生を観て、操作して、知る」

「完全再構成系による輸送小胞形成のダイナミズム解析と高速高感度 3D 共焦点イメージングによる小胞輸送の可視化」

第 5 回日本蛋白質科学会年会 (福岡) 2005 年 7 月

4. Ken Sato

ミニシンポジウム「メンブレン・トラフィック研究の新しい流れ」

“Molecular mechanisms and dynamics of COPII vesicle formation”

第 78 回日本生化学会大会 (神戸) 2005 年 10 月

研究課題別評価

1 研究課題名： 生体光エネルギー変換の分子機構—光化学系 II 複合体の構造と機能の解明及びその応用

2 研究者氏名： 沈 建仁

3 研究のねらい：

光合成光化学系 II (以下 PSII とする) はラン色細菌から高等植物までのチラコイド膜上に存在する、14-16 種の膜貫通サブユニットと 3 種の膜表在性サブユニットを含む分子量 350kDa の超分子複合体である。この複合体は太陽の光エネルギーを吸収し、一連の電子伝達反応を通して生物利用可能な化学エネルギーに変換し、同時に水を分解し分子状酸素を放出する。従って、PSII が生物エネルギーの固定と地球上酸素の供給と言う点で極めて重要な複合体である。本研究は、PSII 複合体を精製・結晶化し、その立体構造を X 線結晶構造解析法を用いて解明することにより、PSII における一連の電子伝達、水分解・酸素発生反応の機構を詳細に解明することを目的とした。

4 研究の成果：

(1) PSII 複合体の精製・結晶化

PSII は膜貫通タンパク質と膜表在性(親水性)サブユニットを含む巨大複合体であるため、精製標品の安定性が大きな課題であったが、本研究では結晶化に必要な高い安定性と活性を持つ PSII を大量精製できる材料として、好熱性ラン色細菌 *Thermosynechococcus vulcanus* を選んだ。本研究者が従来開発した界面活性剤による可溶性・陰イオン交換カラムによる精製法を用いて PSII を精製し、結晶化を行った(図1)。得られた結晶の分解能は当初 3.7 Å であったが、本研究においてより高純度、高活性を有する PSII 標品を精製するため、界面活性剤による可溶性条件を最適化し、また、微量な夾雑物を除去するようイオン交換カラムによる精製条件を検討、最適化した。

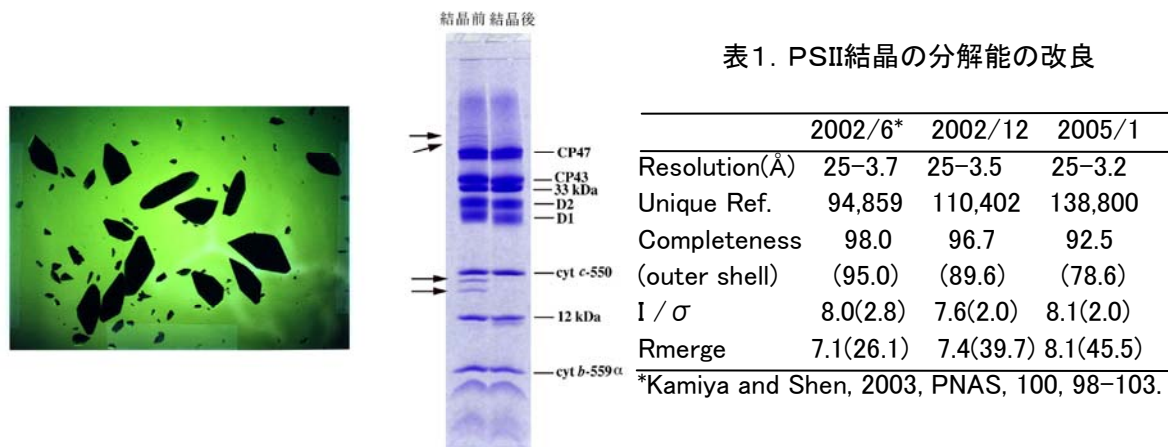


図1. PSII 複合体の結晶(左)とそのタンパク質組成(右)。矢印は結晶化前の標品に存在する夾雑物で結晶化より取り除かれたことを示す。

その結果、従来より高い酸素発生活性と純度をもつ PSII 標品を調整することができた。この標品を用いて結晶化条件の検討・改良を行い、特に結晶化方法を従来のマイクロ透析法からハンギング・ドロップ法に変更し、結晶析出に要する時間を2週間から2-3日間に短縮させ、これにより従来の結晶化法でPSIIの一部サブユニット(12kDa サブユニット)がプロテアーゼによる分解を受けていたという点を克服することができた。さらに結晶の凍結条件等を改良することにより、分解能を3.2Åに改善することに成功した(表1)。

(2) PSIIの構造解析

SPring-8の放射光を利用して重原子同型置換法により初期位相を決定し、得られた初期電子密度図を溶媒平滑法により改良し、構造解析を行った(図2)。PSIIは単量体あたり約2,800のアミノ酸残基を含んでいるが、そのうち主要な膜貫通サブユニットであるD1, D2, CP47, CP43、及び膜表在性タンパク質である33 kDa、チトクロム *c550*, 12 kDaの配列を含む約75%の2,100残基を同定し、残りをアラニンもしくはC α としてアサインした。このほか、36分子のクロロフィル、2分子のカロテノイド、4原子Mnを含むMnクラスター、2分子ヘム鉄、1分子非ヘム鉄、を同定し構造決定した。結晶分解能の向上に伴い、電子密度図を改良し、得られた構造に修正・改良を重ね、最終的に3.2-3.3 Å分解能の構造を得た。

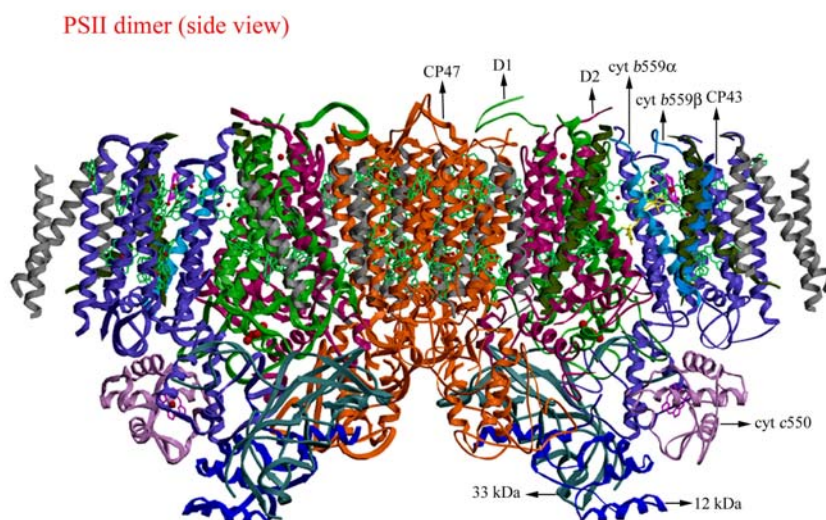


図2. チラコイド膜の側面から見たPSII二量体の結晶構造。

(3) PSIIの構造に基づく機能解明

PSIIの結晶構造からこれまで不明であった多くの機能的特徴を明らかにした。まず反応中心と呼ばれるD1, D2サブユニットの構造をより詳細に解明し、光エネルギーを直接吸収し励起するクロロフィル分子が四量体として存在するが、そのうち中心に位置する2つのクロロフィル分子がより近接しており、強い相互作用をしていることを明らかにした。PSII反応中心とD2サブユニットの近くに存在するチトクロム *b559* の間にカロテノイド分子が存在することを見つけ、このカロテノイド分子はチトクロム *b559* から反応中心への2次的電子伝達反応を仲介することでPSII複合体を過剰な光による傷害から保護していることを示した。さらに水分解・酸素発生反応を直接触媒しているMnクラスターの配置とその近傍に結合しMnクラスターを安定化している3つの膜表在性タンパク質の構造をすべて同定し、地球上最大の化学反応の一つである光合成水分解反応の機構に関する重要な知見を得た。

5 自己評価:

PSIIの標品精製法や結晶化条件・方法の改善により結晶の分解能を3.2 Åに向上させ、PSII構造モデルの改良を行った。これまでのPSII構造解析の結果を論文発表し、この研究分野に大きな

インパクトを与えたと言える。しかし、結晶構造の分解能を 3.0 Å 以上に向上させることで初めて真の原子レベルでの構造解析ができるので、その意味では本研究の結果は充分とは言えない。この分野の研究の進展は目覚しく、最近では別種のラン色細菌由来 PSII について不完全ではあるが 3.0 Å 分解能の構造が報告され、より高分解能を与える結晶の作製が求められる。さらに当初 PSII の各種変異体についても結晶化・構造解析を計画していたが、そのうちの数種について大量培養・精製を行った結果、充分よい結晶を与える変異体の PSII 標品を得ることができなかった。これは PSII が巨大な膜タンパク質複合体であるため、その Native な状態での精製が困難であることに由来しているが、PSII 複合体の構造形成と機能制御機構を完全に理解するためには、各構成サブユニットの機能をその欠失変異体の構造解析から解明することが必要であり、今後の重要な課題となっている。

6 研究総括の見解:

超分子複合体構造の解析精度を上げていくという、非常に困難で忍耐のいる仕事をきっちりと成し遂げた点、研究者としては感激的である。脚光を浴びる大成果ではないが、こういう粘り強い研究態度、姿勢がこの構造解析研究分野には必要であるという見本と評価している。構造研究の質は世界の一流に達しているの、今後は世界の関連研究者との交流や情報交換を一層積極的に行って、構造から機能へ向う研究でも世界のトップに立って欲しい。

7 主な論文等:

論文

1. Kamiya N. and Shen J.-R. (2003) Crystal structure of oxygen-evolving photosystem II from *Thermosynechococcus vulcanus* at 3.7 Å resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 98–103.
* 2006年2月10日現在の被引用回数: 286回。
2. Koulougliotis D., Shen J.-R., Ioannidis N. and Petrouleas V. (2003) Near-IR irradiation of the S₂ state of the water oxidizing complex of photosystem II at liquid helium temperatures produces the metalloradical intermediate attributed to S₁Y₂[•] *Biochemistry*, 42, 3045–3053.
3. Ohta H., Suzuki T., Ueno M., Okumura A., Yoshihara S., Shen J.-R. and Enami I. (2003) Extrinsic proteins of photosystem II: An intermediate member of the PsbQ protein family in red algal PSII. *Eur. J. Biochem.* 270, 4156–4163.
4. Weng J., Tan C.-Y., Shen J.-R., Yu Y., Zeng X.-M., Xu C.-H. and Ruan K.-C. (2004) pH-induced conformational changes in the soluble manganese stabilizing protein of photosystem II. *Biochemistry*, 43, 4855–4861.
5. Enami I., Suzuki T., Tada O., Nakada Y., Nakamura K., Tohri A., Ohta H., Inoue I. and Shen J.-R. (2005) Distribution of the extrinsic proteins as a potential marker for the evolution of photosynthetic oxygen-evolving photosystem II. *FEBS Journal*, 272, 5020–5030.

他9報

出版物

1. Yamamoto Y., Sakuma S. and Shen J.-R. Isolation of photosystem II-enriched membranes and the oxygen-evolving complex (OEC) subunit proteins from higher plants. In *Methods in Molecular Biology: Photosynthesis Protocols* (ed. by R. Carpentier), 274: 29–36. Humana Press, 2004.
2. Shen J.-R. and Kamiya N. 3D Crystal Structure of the Photosystem II Core, In *Photosystem II: The Light-Driven Water:Plastoquinone Oxidoreductase*, Edited by T.J. Wydrzynski and K. Satoh, pp. 449–4677, Springer, The Netherlands, 2005.
3. 神谷 信夫、沈 建仁: 光化学系 II 複合体の構造と機能、「蛋白質 核酸 酵素」、50, 1174–1179, 2005.

招待講演

1. Shen J.-R. and Kamiya N. (Plenary Lecture) Crystal structure of photosystem II from *Thermosynechococcus vulcanus*. 11th International Symposium on Phototrophic Prokaryotes, Tokyo (2003.8).
2. Shen J.-R. and Kamiya N. Functions of carotenoids and other pigments in photosystem II from a structural point of view. 10th Congress of the European Society for Photobiology, Vienna, Austria (2003.9).
3. Shen J.-R. Crystal structure of PSII from *Thermosynechococcus vulcanus*. 314th WE-Heraeus-Seminar: Water Oxidation in Photosynthesis, Bad Honnef, Germany (2003.11).
4. Shen J.-R., Naitow H., Kamiya N. (Plenary Lecture) Crystal structure of photosystem II from *Thermosynechococcus vulcanus* and its functional implications. “Photosynthesis and Post-Genomic Era”, An International Satellite Meeting in conjunction with the 13th International Congress on Photosynthesis, Trios-Rivieres, Quebec, Canada (2004.8).
5. Shen J.-R. Functional analysis of photosystem II based on its three-dimensional structure. Japanese-Finnish Collaboration Seminar “Molecular Mechanisms of Regulation of Photosynthesis by Environments” and 7th Nordic Photosynthesis Congress. Turku, Finland (2004.11).

国際:他 2 件

国内:他 11 件

その他:国際学会発表:6件 国内学会発表:18件

研究課題別評価

1 研究課題名：蛋白質の「配列－構造－安定性」関連の系統的解析

2 研究者氏名：高野和文

3 研究のねらい：

蛋白質は、そのアミノ酸配列に起因して特異的な立体構造を形成するが、そのメカニズムはまだ明らかにはなっていない。本研究では、この課題に対して、直接実験で「配列と構造」の関係を構築することで新たな知見を得ることを試みる。具体的には、ある10残基程度のアミノ酸配列を蛋白質の種々の環境に導入し、その配列がどのような因子に規定され立体構造を形成するのかを調べる。

4 研究成果：

(1) アミロイド性配列の構造特性

アルツハイマー病やプリオン病をはじめとする様々なヒトの病気では、蛋白質が条件により α 構造から β 構造へと変化し、繊維状の凝集体を形成することが病気の原因であるといわれている。そこでアルツハイマー病における老人班の主成分であるアミロイド β ペプチド($A\beta_{1-42}$)の線維化に重要と考えられている Tyr10-Val24 ($A\beta_{10-24}$)と Lys28-Ala42 ($A\beta_{28-42}$)の領域の配列をRNaseHIIIのC末端領域の種々の部位に導入した変異体を作製し、そのX線結晶構造解析を行った。 $A\beta_{1-42}$ は凝集しやすいという特性から水溶液中での構造はまだ明らかになっていない。作製した変異体のうち、変異体 RNaseHIII₁₋₁₉₇- $A\beta_{28-42}$ について結晶構造を得ることができた。その結果、RNaseHIII₁₋₂₁₂(WT)では α ヘリックス構造を形成しているC末端領域が、変異体 RNaseHIII₁₋₁₉₇- $A\beta_{28-42}$ では逆平行 β シート構造を形成していた(図1)。この結果は、水溶液中の $A\beta_{1-42}$ において、 $A\beta_{28-42}$ が β 構造を形成していることを示唆している。この $A\beta_{28-42}$ の構造は、水溶液環境下における $A\beta_{1-42}$ の初めての原子レベルでの構造である。さらに、作製した変異体のアミロイド線維形成能の測定などから、図2に示すような $A\beta_{1-42}$ の水溶液環境下における構造変化のモデルが提案できた。

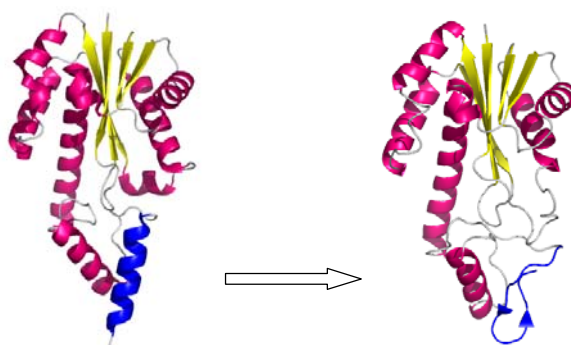


図1 RNaseHIII₁₋₂₁₂(WT)(左)とRNaseHIII₁₋₁₉₇- $A\beta_{28-42}$ (右)の構造

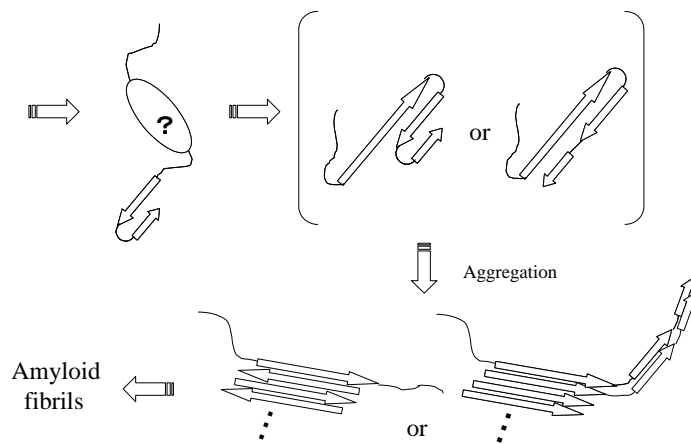


図2 Aβ₁₋₄₂の水溶液環境下における構造変化モデル

(2) カメレオン配列の構造特性

同じアミノ酸配列でありながら蛋白質の立体構造中で異なる二次構造を形成する配列は、「カメレオン配列」と呼ばれている。そこで天然蛋白質中に見出されたカメレオン配列の一つ「TQDMINKST」を他の蛋白質のC末端領域の種々の部位に導入した変異体を作製し、そのX線結晶構造解析を行った。その結果、このカメレオン配列は、他の蛋白質の二次構造上に導入した場合、同様の二次構造を形成した。一方、二次構造以外の部位に導入した場合は、構造を形成していなかった。これらの結果は、天然蛋白質中に見出されたカメレオン配列が、他の環境においても環境に依存して構造を形成すること、さらにその形成には配列上隣接した二次構造が必要なことが明らかになった。このことから、蛋白質の構造構築原理に、構造の「接触感染」現象があることを見出した。

5 自己評価:

当初予定していたほどの量と質の実験データを得ることができなかった。しかし、蛋白質の立体構造の構築原理の解明に向けた直接的なオリジナルな実験研究にあえて一から取り組み、アミロイドペプチドの構造を初めて明らかにした点や、構築原理に新しい現象を見出した点などは、常法の研究により得られる成果とは異なる意義のある成果を得ることができた。

6 研究総括の見解:

蛋白質設計に関する分野においては重要な研究である。アミロイド性配列については一定環境下における構造と配列の関係を把握し成果を挙げたが、カメレオン配列については何をすることが重要なのかの位置づけが今ひとつ明確にならなかったように思う。なお、本来の研究からは外れるが、関連研究者との結晶化ベンチャー(創晶)立ち上げを本人が主導し成功に導いている。さきがけ研究のひとつのあり方を見ている気がする。

7 主な論文等:

論文

1. Takano K, Endo S, Mukaiyama A, Chon H, Matsumura H, Koga Y, Kanaya S. (2006) Structure of amyloid β fragments in aqueous environments. FEBS J. 273, 150–158.

研究課題評価

1 研究課題名: シャペロニンの役割の解明による効率的なタンパク質折りたたみ法の確立

2 研究者氏名: 田口 英樹

3 研究の狙い:

Anfinsen のドグマで知られるように、タンパク質の折れたたみは他からのエネルギーを必要としない自発的に進行するプロセスである。しかし、細胞内の多くのタンパク質の折れたたみにはシャペロンが必要である。さらには、必須のシャペロンであるシャペロニン GroEL の場合、ATP の加水分解まで必要である。はたして、シャペロニンはタンパク質の折れたたみに対していったい何をしているのだろうか。逆に、シャペロニンに折れたたみが助けられるタンパク質(基質タンパク質)の性質とはどのようなものであろうか。本研究では、シャペロニンと基質タンパク質双方をさまざまな手法で解析し、シャペロニンによるタンパク質折れたたみの全容解明を目指した。

4 研究成果:

(1) シャペロニンの反応サイクル ダブルタイマー機構

大腸菌のシャペロニンはダブルリング構造の GroEL と補助因子 GroES からなる分子量 90 万におよぶタンパク質複合体である。GroEL は ATP 存在下で大きく構造変化したのちに GroES と結合し、大きな空洞を形成する。その空洞には基質となる変性タンパク質が閉じ込められて、その「ゆりかご」の中で凝集の危険から免れた基質タンパク質は折れたたみを完了することが知られている。このシャペロニンの機能(GroEL と GroES の結合・解離、変性 GFP のシャペロニン空洞内での折れたたみ)を1分子イメージングで解析し、さらには ATP 加水分解活性の速度論解析なども行った結果、我々は GroEL の反応サイクルは二つの独立したステップが連続して起こる「ダブルタイマーモデル」に従うことを提案した(図1)。

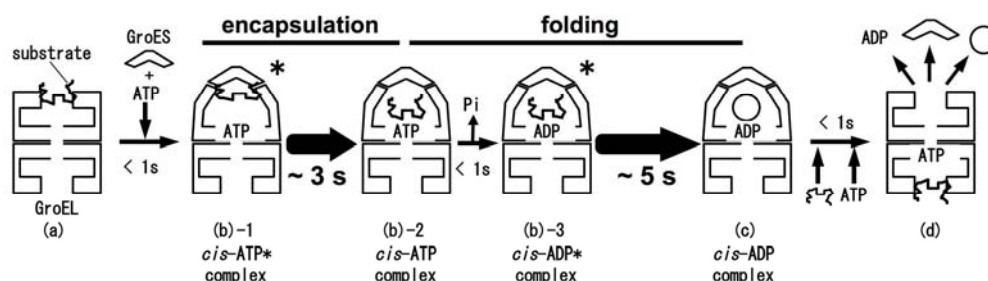


図1 シャペロニン GroEL-GroES の反応サイクルモデル

また、このサイクルにおいて基質タンパク質がどのように構造変化していくのか調べるために、シャペロニンの基質としてよく用いられる Rubisco タンパク質に部位特異的に2種類の蛍光色素を導入して分子内蛍光共鳴エネルギー解析もおこなった。

(2) 基質タンパク質を空洞内に閉じ込めたシャペロニン複合体を用いた研究

(a) 基質タンパク質を閉じ込めたシャペロニン複合体の立体構造

GroEL の ATPase サイクルが変性タンパク質によって大きく加速されること、比較的大きなタンパク質の空洞内での折れたたみはかなり窮屈になることなどから、GroEL 自身が基質タンパク質の折れたたみに何らかの作用を及ぼしているのではないかと予想されている。まず、基質タンパク質を空洞に含んでいる GroEL-GroES 複合体の立体構造はどうなっているのだろうか。好熱菌の GroEL-GroES 複合体は安定で、精製中も複合体が解離しないので、細胞内でシャペロニンの基質タンパク質を含んだまま精製できる。その立体構造を決定したところ、興味深いことに GroES が結合している GroEL の頂点ドメインだけが大きく歪んでおり、特徴的な七回対称から大き

く崩れていることがわかった。X線結晶解析では基質タンパク質の電子密度は見えていないが、生化学的な解析からは歪みの見えた GroEL リングは基質タンパク質を含んでいるので、基質タンパク質の存在が歪みを生じさせたのではないかと考えている。

(b) in vivo で空洞に入る基質タンパク質の同定

上記の好熱菌 GroEL-GroES 複合体には多くの種類の基質タンパク質が含まれている。そこでプロテオミ的手法で基質タンパク質の同定を行い、シャペロニンの空洞内に入る23種類の基質蛋白質のリストを作った。

(c) 基質タンパク質を閉じ込めるのに必須の残基

好熱菌 GroEL-GroES 複合体には大腸菌の複合体では見つかっていなかった GroEL と GroES の接触部位が存在していた。この接触部位の中の保存された疎水性残基を親水性に置換した GroEL をもつ大腸菌は生育できないことから、この残基の重要性が確認できた。また、in vitro でその変異をもつ GroEL は基質タンパク質を GroEL-GroES の空洞内に閉じ込めることができないことがわかった。

(3) 必須因子のみからなる無細胞タンパク質合成系(PURE システム)を用いたシャペロニン

GroEL の役割解明

in vitro で GroEL がタンパク質の折れたたみを助ける実験では、既に天然構造を取っているタンパク質を尿素や熱などで変性させて用いるので、翻訳後できてきた新生ポリペプチドの折れたたみのようすを調べることはできない。シャペロニンが新生ポリペプチドのフォールディングの際、どのようにはたらいているのかを調べるために、最近開発された必須因子からなる無細胞タンパク質合成系(PURE システム)を用いた。PURE システムは通常用いられる細胞抽出液を用いた無細胞タンパク質合成系とちがひ、シャペロンをまったく含まない。そこで、翻訳の際に GroEL がどのように影響するかを純粋に調べることが可能である。PURE システムでさまざまなタンパク質を翻訳させたところ、GroEL-GroES があるときに可溶性が大きく上昇するタンパク質が存在した。また、これまで、GroEL は翻訳後に折れたたみを助けると信じられてきたが、我々の結果からは、翻訳に共役して、つまりリボソームから新生ポリペプチドが解離する前から GroEL は関与して、折れたたみを助けることを見いだした。さらに、PURE システムだけでなく、大腸菌内においても GroEL は翻訳途中のリボソームに新生ポリペプチドを介して結合していることも見いだした。

5 自己評価

以上のように本研究により、シャペロニン GroEL の作用機構の理解が大きく深まったと考える。特に従来あまり顧みられることがなかった基質タンパク質が存在するところで GroEL がどのようにはたらくか、構造がどうなっているのかに関して大きな進展があった。

これまで GroEL の研究は in vitro の研究が先行しており、細胞内で実際にどうはたらいているのかは意外なほどわかっていない。本研究で明らかになった空洞内に入る細胞内基質タンパク質のリストや新生タンパク質の折れたたみにおけるシャペロニンの役割は、今後 GroEL が細胞内でどのようにはたらいているかを知るための重要な知見になると考える。

また、本研究では十分に追究できなかったが、折れたたみが非常に困難なタンパク質がなぜシャペロニンの空洞内では折れたたむのかについて今後研究を進めていきたい。シャペロニンがないと折れたたみが進行しないように見えるタンパク質では、シャペロニンが積極的にタンパク質を「折りたたんで」いる可能性も示唆されてきている。もし、そうであるならば、シャペロニンはどのような作用を基質タンパク質に及ぼすのであろうか。今後も研究を進めていき、究極的にはシャペロニンを有効に用いて効率的なタンパク質折りたたみ法を確立したいと考えている。

6 研究総括の見解

シャペロニン複合体の反応サイクル機構解明や、基質タンパク質が存在する場での GroEL の役割や構造解明に大きな進展があった点、評価している。特にシャペロニンの働きをタンパク質

物性のレベルで考えられるようにしたことは大きな成果といえる。この分野では世界をリードする研究者であり、今後の研究進展が非常に期待できる。

7 主な論文等:

論文

1. Ueno, T.*, **Taguchi, H.***, Tadakuma, H., Yoshida, M., Funatsu, T. [* equally contributed] “GroEL mediates protein folding with a two successive timer mechanism” *Mol. Cell* **14**, 423-434 (2004)
2. Shimamura, T., Koike-Takeshita, A., Yokoyama, K., Masui, R., Murai, N., Yoshida, M., **Taguchi H.**, Iwata, S. “Crystal structure of the native chaperonin complex from *Thermus thermophilus* revealed unexpected asymmetry at the *cis*-cavity.” *Structure* **12**, 1471-1480 (2004)
3. **Taguchi, H.**, Tsukuda, K., Motojima, F., Koike-Takeshita, A., Yoshida, M. “BeF_x stops chaperonin cycle of GroEL/GroES and generates a complex with double folding chambers” *J. Biol. Chem.* **279**, 45737-45743 (2004)
4. Ying, B.-W. **Taguchi, H.**, Kondo, M., Ueda, T. “Co-translational involvement of the chaperonin GroEL in the folding of newly translated polypeptides” *J. Biol. Chem.* **280**, 12035-12040 (2005)
5. Koike-Takeshita, A., Shimamura, T., Yokoyama, K., Yoshida, M., **Taguchi, H.** “Leu-309 plays a critical role in the encapsulation of substrate protein into the internal cavity of GroEL.” *J. Biol. Chem.* **281**, 962-967 (2006)

(邦文総説)

- 1 小池あゆみ、田口 英樹 「分子シャペロン」(分担)in タンパク質科学—構造・物性・機能(化学同人) 291-302 (2005)
- 2 田口 英樹 「シャペロニン GroEL の作用機構:ATP と変性蛋白質の役割」生物物理 印刷中
- 3 田口 英樹、イン・ベイウエン、上田卓也 「翻訳時のシャペロンのはたらき」タンパク質社会学 実験医学別冊 23, 2248-2253 (2005)
- 4 河田 康志、田口 英樹、吉田 賢右 「シャペロニン GroEL の作用機構」蛋白質核酸酵素 **49**, 847-852 (2004)
- 5 上野 太郎、田口 英樹 「GFP1分子の折れたたみ観察から GroEL の機能を探る」実験医学 **22**, 90-91 (2004)

研究課題別評価

1 研究課題名: 構造ゲノム科学およびプロテオミクスに基づく新規の遺伝暗号翻訳装置の同定と機能発現メカニズムの解明

2 研究者氏名: 濡木 理

3 研究のねらい:

遺伝子に蓄えられた遺伝情報は、遺伝暗号の翻訳過程における精密な酵素反応の集積により、正確にタンパク質として翻訳され、生命に必須な機能を発揮する。特にトランスファーRNA (tRNA) が、mRNA 上のコドンに特異的なアミノ酸を対応づけることによって、正確な遺伝暗号の翻訳が保証されている。tRNA 自体にはアミノ酸を選択的に結合する能力はなく、アミノアシル tRNA 合成酵素 (aaRS) がアミノ酸と tRNA を厳密に認識し、正しい組み合わせのアミノアシル tRNA を合成している。aaRS が tRNA を正確に認識するためには、tRNA が正しい長さにプロセシングを受け、様々な転写後修飾を受けて、tRNA が成熟する必要がある。本研究では、tRNA のプロセシング、転写後修飾、アミノアシル化に働く酵素と tRNA (前駆体) の複合体の X 線結晶構造解析を行い、遺伝暗号翻訳のメカニズムを原子分解能のレベルで解明することを目指した。さらに、各ステップで、酵素群が機能的統合により超分子複合体 (プロセソーム、モディフォソーム、アミノアシルソーム) を形成することを想定し、これを同定し構造解析することを目的として研究を遂行した。

4 研究成果:

(1) プロセシング過程における tRNA 前駆体の適切な切断・修復の構造的基盤

tRNA は L 字型の高次構造をしており、L 字の一方の末端には、アンチコドンという領域があり、コドンと塩基特異的に水素結合を形成する。一方、tRNA のもう一方の末端である 3' 末端には CCA (C74-C75-A76) という決まった配列があり、アミノアシル tRNA 合成酵素が末端のアデニンに特異的なアミノ酸を結合させる。これにより、tRNA はコドンというヌクレオチド配列の情報をアミノ酸配列の情報に変換するアダプター分子として働くことができる。tRNA は 5' 末端にリーダー配列、3' 末端にトレーラー配列と呼ばれる余分な配列が結合した状態で転写される。プロセシングの第一段階で、RNaseP (リボザイム) がリーダー配列をまるごと切断し、RNaseE などのエンドヌクレアーゼがトレーラー配列を途中で切断する。次に残ったトレーラー配列を RNasePH などのエキソヌクレアーゼが 1 ヌクレオチドごとに切断していくが、RNasePH が切り込みすぎて CCA 配列 (あるいはその一部) を失ってしまった場合、CCA 付加酵素という RNA ポリメラーゼの 1 種が CCA を修復する。また、古細菌の多くと真核生物においては、ゲノム上に tRNA の CCA 配列はコードされていないため、CCA 付加酵素が tRNA の 3' 末端に *de novo* に CCA 配列を付加する必要がある。

我々は *Aquifex aeolicus* 由来の RNasePH の結晶構造を 2.3Å 分解能で決定した (図1) (*J. Biol. Chem.*, 2003)。RNasePH は加リン酸分解により RNA をトリミングしていく酵素である。その結晶構造から、RNasePH は 6 量体で、活性部位に加リン酸分解に必要な無機リン酸が結合していた。活性部位を形成するクレフトは、単鎖 RNA が入り込めるだけの幅で、その深さは、ちょうど tRNA の 3' 末端の単鎖部分の 4 ヌクレオチド分であった。このことから、tRNA 前駆体の 3' 末端のトレーラー配列 (単鎖) がクレフトに入り込んでその底に結合している無機リン酸により加リン酸分解を受け、ちょうど成熟 tRNA の 3' 末端の単鎖 4 ヌクレオチドに到達したところで加リン酸分解が終了することが示唆された。

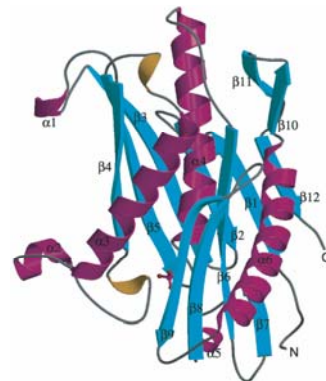
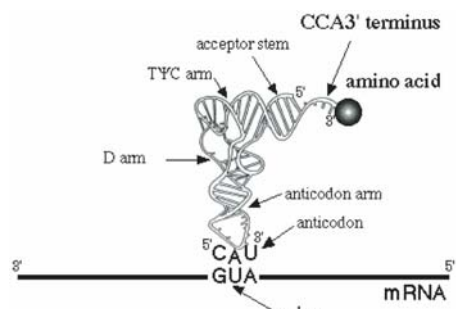


図1 RNasePH の構造

プロセッシングの最終段階でアミノ酸結合末端である CCA 配列を修復する CCA 付加酵素は、DNA の鋳型を必要とせず、tRNA の末端にこの CCA という決まった配列の RNA を結合させる。我々は、真性細菌 *Aquifex aeolicus* 由来の CCA 付加酵素とプライマーとなる tRNA 前駆体 (末端が CC)、および基質である ATP の 3 者複合体の結晶構造を 2.8Å 分解能で決定した (図2) (*Nature*, 2004)。その結果、本酵素は、鋳型 DNA の代わりに酵素のアミノ酸残基で構成された「タンパク質性の鋳型」によって、基質となる CTP や ATP を固定し、tRNA の末端が伸縮することで、鋳型なしでも特異的に CCA 配列を結合させることができることを明らかにした。

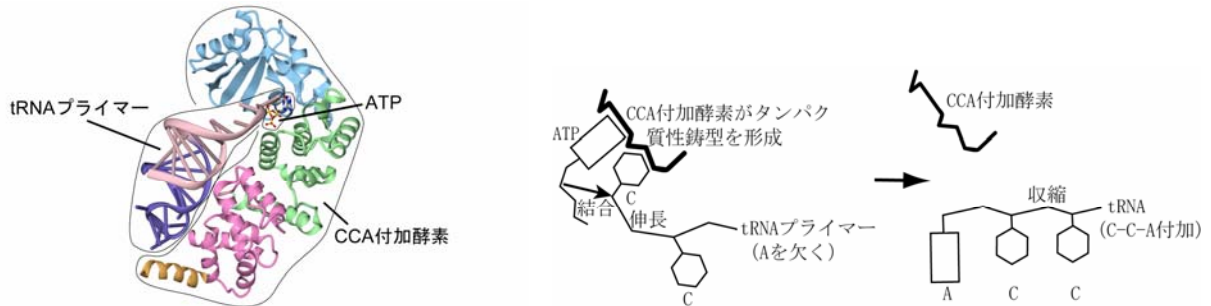


図 2. CCA 付加酵素と tRNA プライマーと ATP の複合体の結晶構造 (左) と鋳型非依存性重合反応のメカニズム

CCA 付加酵素は、古細菌由来のクラス I 酵素と、真核細胞および真性細菌由来のクラス II 酵素に分類される。我々は、クラス I に属する *Archaeoglobus fulgidus* 由来の CCA 付加酵素の結晶構造を決定し、クラス I とクラス II の CCA 付加酵素は、触媒ドメイン以外は、全く異なる構造を持つことを明らかにした (*EMBO J.*, 2004)。我々はさらに、*A. fulgidus* 由来のクラス I CCA 付加酵素とミニヘリックス tRNA (CCA, CA, A それぞれが欠けているもの) と NTP との複合体の結晶構造解析に成功した (図3)。本酵素は、Tail domain によって、tRNA に特徴的な TΨC ループに存在する TΨC 配列を認識していることが明らかになった。確かに、この Tail domain を欠失した変異体酵素は tRNA との結合能を失った (論文準備中)。

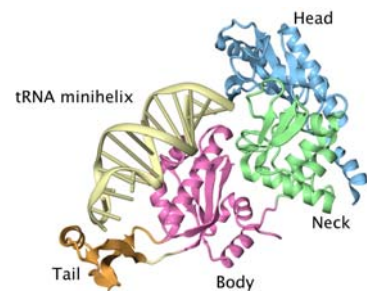


図 3 クラス I CCA 付加酵素と tRNA ミニヘリックスの複合体の結晶構造

(2) 酵素による tRNA 修飾の構造的基盤

tRNA は転写後に様々な化学修飾を受ける。転写後修飾は、その部位により意義が異なってくる。tRNA のコア領域と呼ばれる D ループ、TΨC ループに導入された修飾は、tRNA の L 字型構造を安定化する働きを持つ。一方 tRNA のアンチコドンに導入された修飾は、アンチコドンが正しいコドンと塩基対を形成することを保証したり、aaRS による tRNA の正確な認識に働く。

我々は、古細菌の tRNA の D ループの G15 をアーケオシンにすげかえる ArcTGT (アーケオシン tRNA グアニトランスグリコシラーゼ) と tRNA の複合体の結晶構造を 3.3Å 分解能で決定した (*Cell*, 2003)。その結果、ArcTGT は tRNA の L 字型構造を λ 型に変形させ (図4)、D ループを活性部位に引っ張り込むことによって、奥まった G15 の塩基置換を触媒していることが明らかになった。

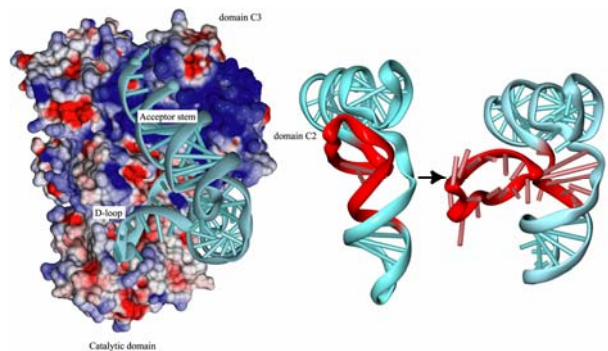


図 4 ArcTGT に結合した tRNA は L 型から λ 型に変化する

さらに我々は、tRNA の D ループの G18 の 2' OH (リボース) をメチル化する TrmH とメチル基供与体である S アデノシルメチオニン (AdoMet) の複合体の結晶構造を 1.85Å 分解能で決定した (図5) (*Structure*, 2004)。特徴的なことに、TrmH はこれまで解析されたメチル基転移酵素と異なり、

触媒ドメインに明確な結び目構造を持っている。結晶構造から、この結び目構造は、AdoMet 結合部位の形成とメチル化活性部位の構築に働いていることが明らかになった。さらに変異体解析の結果から、TrmH はこの結び目構造により2量体を形成し、一方のサブユニットの Arg41 が他方のサブユニットの活性部位に入り込み、tRNA の G18 が活性部位にはまると、G18 のリン酸基や Ser150 により脱プロトン化を受けて活性化し、G18 の 2' OH を脱プロトン化し、この 2' O が AdoMet のメチル基を求核攻撃するという「RNA 依存的なメチル化」機構を提唱した。

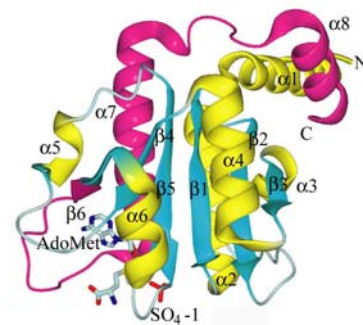


図5 TrmHの構造

tRNA^{Ile}₂ のアンチコドンは、未修飾のままでは CAU であり、メチオニンのコドン AUG と対合する。この場合、未修飾の tRNA^{Ile}₂ はメチオニル tRNA 合成酵素 (MetRS) によって認識され、メチオニンを運搬するため、問題は生じない。細胞内では、tRNA^{Ile}₂ のアンチコドン1次目の C はリジン(L)に修飾されており、アンチコドン LAU はイソロイシンのコドン AUA を認識する。さらに修飾された tRNA^{Ile}₂ は、イソロイシル tRNA 合成酵素 (IleRS) に認識され、イソロイシンを運搬する。すなわち、この C34 から L34 への修飾により、tRNA^{Ile}₂ のコドン特異性とアミノ酸特異性がメチオニンからイソロイシンへ同時に切り替わることになる。我々は、tRNA^{Ile}₂ のアンチコドン1次目の C をリジン(L)に修飾するリジン合成酵素 (TilS) の結晶構造を 2.4Å 分解能で決定することに成功した(図6) (Pro. Natl. Acad. Sci. USA, 2005)。TilS のN末端の触媒ドメインは N 型ピロリン酸分解酵素と同じ構造を持っており、このことから、TilS は C34 の C2 をアデニル化し、活性化されたリジンがこの C2 を求核攻撃することによってリジンに修飾されることが予測された。TilS の網羅的な変異体解析を行うことにより、この反応機構および活性残基を同定することに成功した。



図6 TilSの結晶構造

tRNA^{Glu} や tRNA^{Lys} のアンチコドン1字目の U34 は2位のカルボニル基がチオ化された修飾を受けており、このチオ基は正確なコドンの認識および特異的な aaRS による認識に必須である。tRNA へのチオ基の導入は、酵素 IscS がシステインからチオール基を受容し、酵素 MnmA が tRNA にチオ基の修飾を行うが、最近の遺伝学的な解析によって、この2つの酵素の間に TusA、TusBCD、TucE という新規の酵素群が介在し、硫黄をリレー方式に IscS から MnmA まで受け渡すことが明らかになった。さらに TusBCD、TusE、MnmA は超分子複合体(モディフォソーム)を形成し、効率的な硫黄の転移に働いていることが示唆された。我々は、大腸菌の TusBCD の結晶構造を 2.1Å 分解能で決定することに成功した(図7) (Structure, 2006)。TucBCD は三量体からなるヘテロ6量体を形成し、変異体の遺伝学的解析の結果、TusD サブユニットの Cys78 が硫黄の転移に働いていることをつきとめた。さらに我々は、MnmA と tRNA^{Glu} との複合体の結晶化に成功した(論文投稿中)。その結果、MnmA は U34 をフリップアウトさせ、ATP を用いてこれをアデニル化した後、活性化した硫黄が求核攻撃することでチオ化が起こることを明らかにした。また、MnmA の触媒ドメインはアンチコドン3塩基を特異的に認識している一方で、中央ドメインのループが tRNA の D ステムヘリックスのマイナーグループに入り込み、タンパク質の主鎖と RNA の主鎖が密接な水素結合を形成すると言う特徴的な RNA 認識機構を持つことが明らかとなった。この結晶構造解析では、我々は3種類の異なる反応ステージの結晶構造を決定し、チオ化反応のスナップショットを撮ることに成功した。



図7. TusBCDの結晶構造

(3) アミノアシル tRNA 合成酵素の作用機序の構造的基盤

メチオニル tRNA 合成酵素 (MetRS) は、酵素単独の結晶構造が最初に解明されたアミノアシル tRNA 合成酵素の1つであり、膨大な生化学的な研究結果も集積しているながら、世界中の結晶学者が tRNA との複合体の結晶化に挑戦しているにもかかわらず、未だ結晶構造が報告されていない

かった。また、MetRS は他の aaRS に比べ、極めてシンプルなドメイン構造を持ちながら、initiator および elongator の2種の異なる tRNA^{Met} を厳密に認識することができる。我々は、*Aquifex aeolicus* 由来の MetRS と elongator の tRNA^{Met} との複合体の結晶構造を 2.4Å 分解能で決定した(図8) (*Nat. Struct. Mol. Biol.*, 2005)。その結果、MetRS による認識により、tRNA^{Met} のアンチコドンループは大きく歪み、C34、A35、A38 からなる”triple base stack”なる構造を取り、MetRS の Trp 残基と Arg 残基が RNA を模倣する形でこれを認識していることが明らかになった。

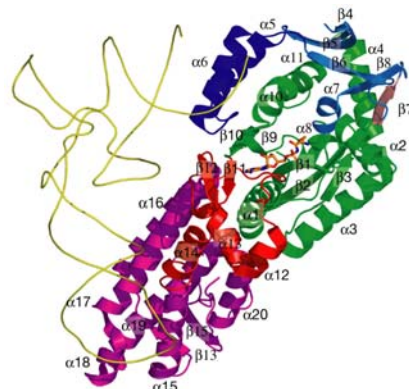


図8 MetRS と tRNA と Met-AMP の複合体の結晶構造

一方、ヒトなどほ乳類の aaRS は、タンパク質合成以外に、アポトーシス制御や免疫系の活性化など重要な細胞機能に働く多機能酵素であることが最近注目されている。ヒト由来トリプトファン tRNA 合成酵素(hTrpRS)は、スプライスバリエント(mini TrpRS)として発現されると、細胞外へ分泌され、血管内皮細胞のアポトーシスを促し、血管新生の抑制に働く。一方、近縁のヒト由来チロシル tRNA 合成酵素(hTyrRS)は、アポトーシスを起こした細胞で2断片に分解されると、その一方(mini TyrRS)は、血管新生を促進する。これら2つの近縁なアミノアシル tRNA 合成酵素が、本来のタンパク質合成とは異なる細胞機能を有し、しかも全く逆のサイトカイン活性を持つメカニズムの解明が待たれていた。我々は、ヒト由来 mini TrpRS の X 線結晶構造解析を行い、得られた結晶構造をバクテリア由来の TrpRS およびヒト由来 TyrRS の結晶構造と比較して、mini TrpRS に特徴的な4つの構造を発見した(図9; M1~M4)。さらに、これらの構造の変異体の生化学・細胞生物学解析を行うことで、mini TrpRS の tRNA を認識するドメインに挿入された 8 ペプチド(M3)が血管内皮細胞のアポトーシスさらに血管新生の抑制に必須であることを解明した(*Nat. Struct. Mol. Biol.*, 2004)。

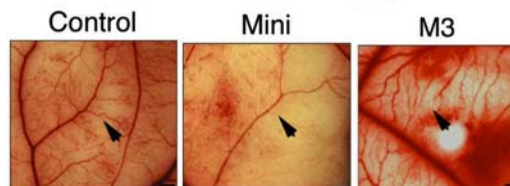
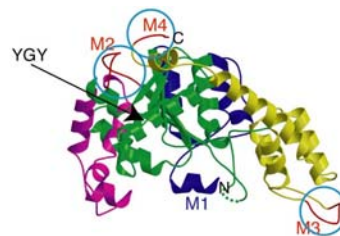


図9 hTrpRS の結晶構造(上)。tRNA 認識ドメイン内の 8 ペプチドを欠失した M3 変異体はアポトーシス活性を失った(下)。

本研究により、血管新生によって引き起こされる失明や癌細胞の増殖を抑制する薬剤のデザインが可能になると考えられる。

5 自己評価:

tRNA のプロセッシング、翻訳後修飾、アミノアシル化を触媒する酵素と tRNA(前駆体)の複合体に関しては、系統的かつ網羅的に構造解析を遂行し、その一般的な作用機序を原子メカニズムで明らかにすることができ、当初の研究目標の前半に関してはかなり達成できたと考えている。tRNA を介した遺伝暗号の翻訳は、すべての生物の生命維持にとって基本的なシステムであり、その研究分野はほぼ決着がついたと言われて久しいが、最近のゲノム解析の結果、まだまだ新しい研究課題があることが判明し、また盛り上がりを見せている。今後も tRNA の成熟過程、アミノアシル化過程に関して構造生物学を展開して行きたい。また、ヒト由来のアミノアシル tRNA 合成酵素は、遺伝情報の翻訳以外に、シグナル伝達の機能を持つに至り、細胞周期や自然免疫の制御に働くことが判明し、今後は医療的な応用にもらんだ構造生物学を遂行して行きたい。ただ、当初の研究目標の後半である超分子複合体(プロセソーム、モディフォソーム、アミノアシルソーム)の構造解析に関しては、本研究期間内では本格的に進めるに至らなかったため、今後、無細胞タンパク質合成系を用いた超分子複合体の再構築およびウシの肝臓から複合体の抽出を行い、構造解析を実現する予定である。

6 研究総括の見解:

研究期間の途中で研究場所が変わったにも関わらず驚異的な実験量をこなし、多くの複合体の結晶構造解析に成功して遺伝暗号翻訳機構の解明を行い大きな成果をあげた。鋳型非依存性 RNA ポリメラーゼ反応機構に関する論文は *Nature* 誌に掲載された。たんぱく質合同シンポジウムのアンケートでも、内容と量、現象への迫り方に圧倒されたという感想が見られ、客観的にも高い評価を得たと感じている。本人も指摘しているように超分子複合体の構造解析は端緒についたばかりなので、SORST での進展に期待したい。

7 主な論文等:

論文

1. Y. Kise, S. W. Lee, S. G. Park, S. Fukai, T. Sengoku, R. Ishii, S. Yokoyama, S. Kim and O. Nureki
“A short peptide insertion crucial for angiostatic activity of human tryptophanyl-tRNA synthetase”
Nature Struct. & Mol. Biol., **11**, 149–156 (2004).
* 2004 年 1 月 13 日付の日刊工業新聞、2004 年 5 月 21 日付の科学新聞に掲載される
 2. O. Nureki, K. Watanabe, S. Fukai, R. Ishii, Y. Endo, H. Hori, and S. Yokoyama
“Deep knot structure for construction of active site and cofactor binding site of tRNA modification enzyme”
Structure, **12**, 593–602 (2004).
 3. K. Tomita, S. Fukai, R. Ishitani, T. Ueda, N. Takeuchi, D. G. Vassylyev, and O. Nureki
“Structural basis for template-independent RNA polymerization”
Nature, **430**, 700–704 (2004).
* 2004年8月5日付の日刊工業新聞に掲載される、*Nature Struct. & Mol. Biol.*誌 News and Viewsで紹介される (Vol. 11, p807–808 (2004))
 4. K. Nakanishi, S. Fukai, Y. Ikeuchi, A. Soma, Y. Sekine, T. Suzuki, and O. Nureki
“Structural basis for lysidine formation by ATP pyrophosphatase accompanied with a lysine-specific loop and a tRNA-recognition domain”
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **21**, 7487–7492 (2005).
 5. K. Nakanishi, Y. Ogiso, T. Nakama, S. Fukai and O. Nureki
“Structural basis for anticodon recognition by methionyl-tRNA synthetase”
Nat. Struct. Mol. Biol. **12**, 931–932 (2005)
- その他 国際 10 報、国内 8 報

受賞

1. 手島工業教育資金団手島記念研究賞(平成 17 年 2 月 22 日)

招待講演

1. O. Nureki “Structural basis for RNA maturation”
Gordon Research Conference (2003, Newport, RI, USA)
2. O. Nureki “Structural genomics of genetic code translation systems”
Second JSPS Forum in France (2003, Strasbourg, France)
3. O. Nureki and S. Kim
“A Short Peptide Insertion Crucial for Angiostatic Activity of Human Tryptophanyl-tRNA Synthetase”
ARS2004 (2004, Seoul, Korea)
4. O. Nureki “Structural Biology of tRNA Maturation”
The Seventh R.O.C.-Japan Joint Seminar on Crystallography (2004, Tokyo, Japan)
5. O. Nureki “Structural biology on translation of genetic code using the third generation synchrotron, SPring-8” (Plenary Lecture)

The Tenth Symposium on Recent Advances in Biophysics (The Biophysics Society of Taiwan)
(2005, Taiwan)
その他 国内 7 件

研究課題別評価

1 研究課題名： 蛍光標識アミノ酸の導入によるタンパク質の新規構造機能解析法の開発

2 研究者氏名： 芳坂 貴弘

3 研究のねらい：

蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)は、通常の X 線結晶構造解析では知ることのできないタンパク質の立体構造変化を検出することができる手法として、非常に有用な手法である。しかし、タンパク質の特定の2ヶ所へ定量的に蛍光分子を導入することはこれまで困難であった。本研究では、研究者がこれまで開発してきた4塩基コドンによる非天然アミノ酸のタンパク質への導入技術を利用して、FRET のドナー・アクセプターとなる蛍光標識アミノ酸を特定の2ヶ所に導入したタンパク質を合成し、フォールディングやタンパク質間相互作用によるタンパク質の構造変化を FRET により検出することを検討して、タンパク質の新規構造機能解析法としての確立を目指した。

4 研究成果：

(1) FRET のドナー・アクセプターを導入したカルモジュリンの合成と蛍光分析

本研究ではまずモデルタンパク質としてカルモジュリンを用いることにし、4塩基コドン法により FRET のドナー・アクセプターとなる蛍光標識アミノ酸の導入を行なった。まず、発現遺伝子の蛍光標識アミノ酸の導入部位のコドンを 4 塩基コドン CGGG および GGGT に置換した遺伝子を作製した。続いて、蛍光標識アミノ酸として BODIPY FL-aminophenylalanine (BODIPY FL-AF、ドナー) と、アクセプターとなる蛍光標識アミノ酸 BODIPY558-AF を、対応する4塩基アンチコドンを持つ tRNA に化学的アミノアシル化法により結合させた。これら大腸菌由来無細胞翻訳系へ加えることにより、4塩基コドンで指定した部位への蛍光標識アミノ酸の導入を行なった(図 1)。

カルモジュリンの N 末端領域および C 末端領域に、BODIPY 558-AF と BODIPY FL-AF の導入を行なった場合の SDS-PAGE を図 1 右に示す。両方の蛍光標識アミノ酸-tRNA を添加した場合のみ、完全長カルモジュリンの位置に二色の蛍光を発するバンドが確認されたことから、目的の二重蛍光標識されたカルモジュリンが合成されたと判断された。

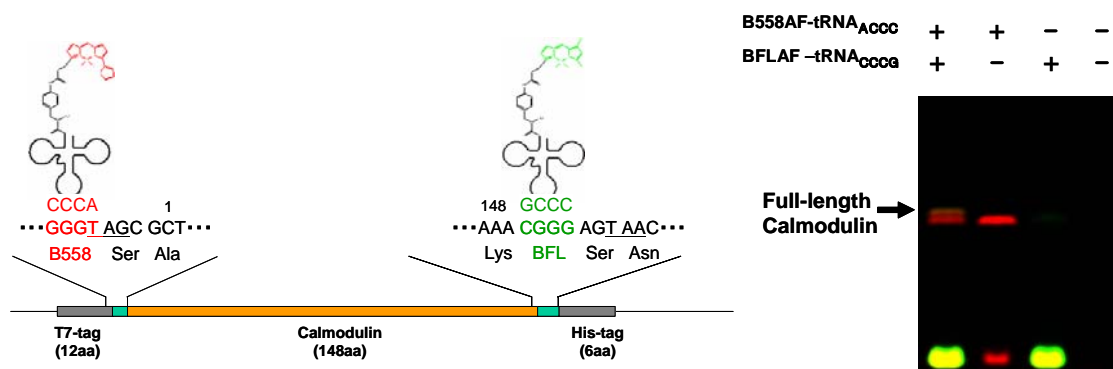


図 1 FRET のドナー・アクセプターを導入したカルモジュリンの合成

そこで続いて、C末端に付加したHisTagにより精製を行ない、その蛍光スペクトル測定を行なった。その結果、BODIPY FL(ドナー)を励起した場合に、BODIPY558(アクセプター)由来の強い蛍光ピークが観測され、FRETが起きていることが確認された。ここに変性剤として尿素を添加していったところ、尿素濃度の増加に伴ってドナーの蛍光が増加しつつアクセプターの蛍光が減少する様子が観察された。これは尿素変性によってカルモジュリンのN末端とC末端の距離が離れ、その結果FRETが生じなくなっていくためだと解釈される。従って、本手法により合成された二重蛍光標識カルモジュリンは、その立体構造に依存したFRETシグナルを与えることが確認された。

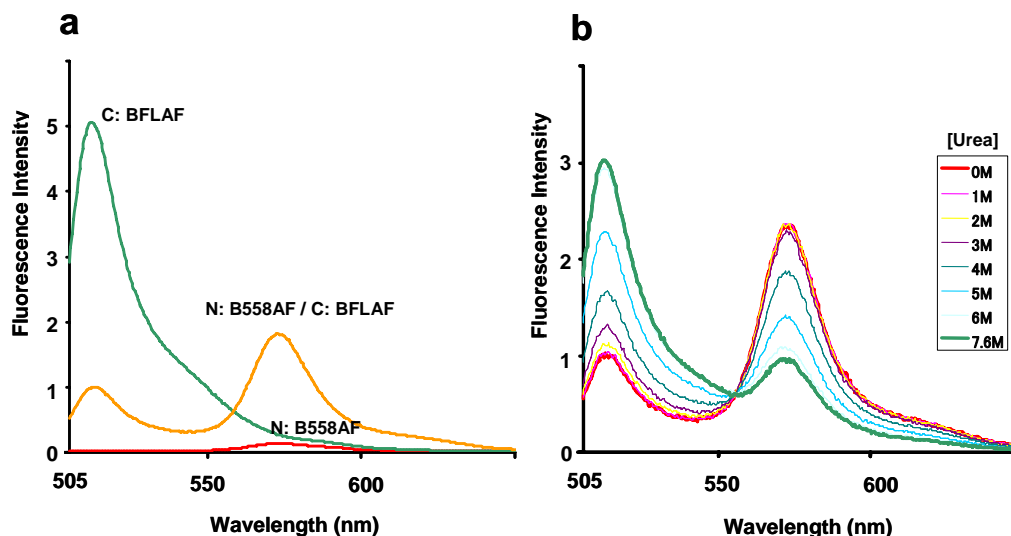


図2 N末端・C末端領域二重蛍光標識カルモジュリンにおけるFRET
 (a) 励起波長490nmによる一重および二重蛍光標識カルモジュリンの蛍光スペクトル
 (b) 尿素添加による二重蛍光標識カルモジュリンの蛍光スペクトル変化

カルモジュリンは、カルモジュリン結合タンパク質との相互作用によりその立体構造を大きく変化させることがX線構造解析によって既に明らかとなっていることから、ここではその変化をFRETにより検出することを試みた。しかし上述のN末端・C末端領域に二重蛍光標識したものでは、FRETの明確な変化は観測されなかった。そこで、BODIPY558(アクセプター)の導入位置をN末端領域に固定して、BODIPY FL(ドナー)を種々の部位へ導入した。翻訳生成物のSDS-PAGEからは、全ての二重蛍光標識カルモジュリンについて合成が確認できた。また、カルモジュリン結合ペプチドであるM13とマルトース結合タンパク質(MBP)の融合タンパク質(MBP-M13)を用いてゲルシフトアッセイを行なったところ、全てのものが結合活性を保持していることも確認された。そこで、HisTagによる精製後、蛍光スペクトルの測定を行なった。その結果、図3に示すように、M13ペプチドの添加に伴うFRET変化は導入部位に大きく依存しており、特にドナーを40位あるいは99位に導入したもので大きなFRET変化が生じることがわかった。このFRET変化曲線は、アクセプターを直接励起した場合の蛍光偏光度測定による結合曲線と一致したことから、MBP-M13の結合によりFRETの変化が生じたと言える。一方、59位あるいは69位ではFRETはほとんど変化しなかった。従って、立体構造の変化をFRETにより検出するためには、ドナー・アクセプターを適切な位置に導入することが必要であり、この結果はそれを可能にする4塩基コドンを用いた導入技術の有用性を証明していると言える(特許出願済み、論文準備中)。

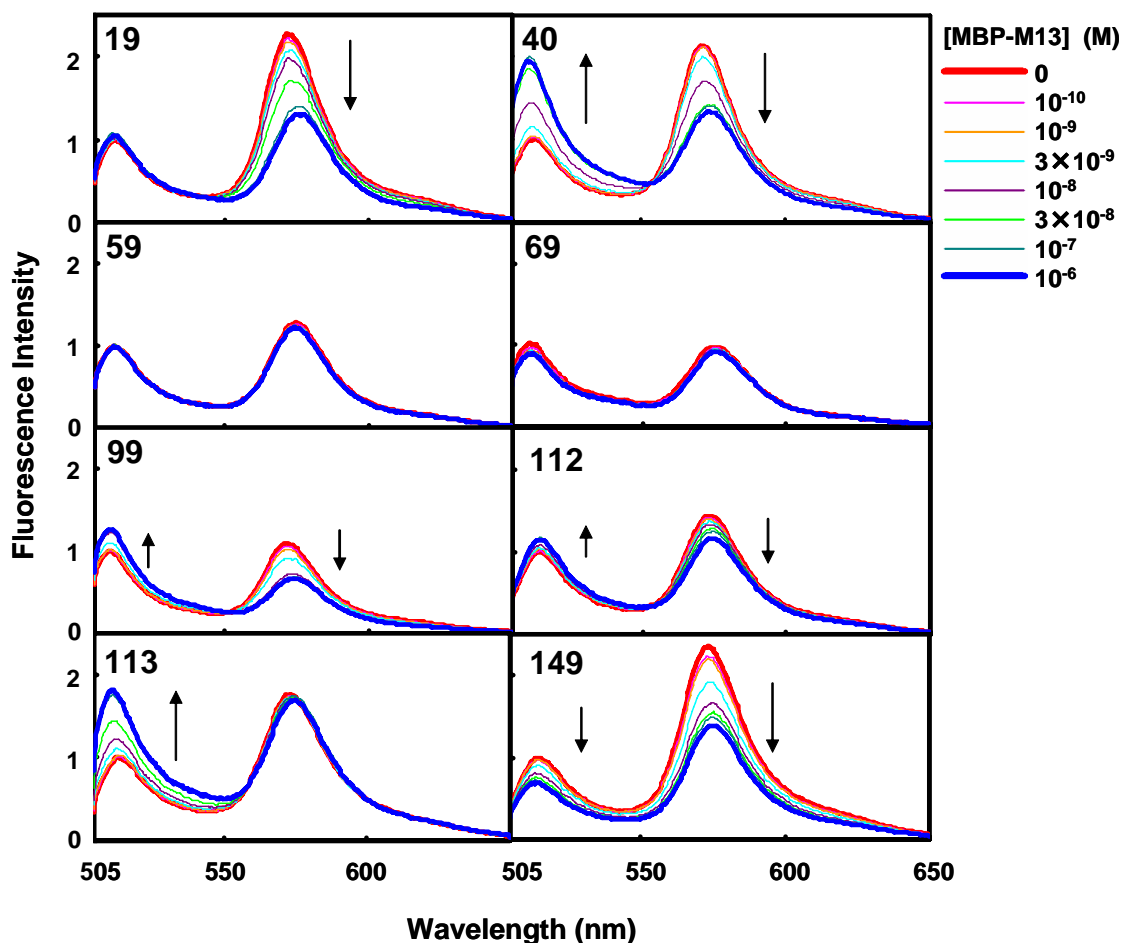


図3 N末端部分と種々の部位を二重蛍光標識したカルモジュリンにおけるM13ペプチドの結合に伴う蛍光スペクトル変化

(2) シャペロニン依存タンパク質フォールディングの FRET 分析

タンパク質に FRET のドナー・アクセプターとなる蛍光標識アミノ酸を導入することで、シャペロニン依存タンパク質フォールディングを FRET により分析する手法を開発した。実際に、マルトース結合タンパク質変異体を用いて、シャペロニンへの結合、シャペロニン上での構造変化、シャペロニン内部でのフォールディングに伴う基質タンパク質の構造変化を、FRET の変化として捉えた予備的な実験データを取得できた。これにより今後、基質タンパク質とシャペロニンとの相互作用を詳細に解析することが可能になると期待される。

(3) 蛍光標識アミノ酸導入のための関連技術の開発

タンパク質の二重蛍光標識は 4 塩基コドン法によって実現されたが、遺伝子の配列によっては 4 塩基コドン部位以外への非特異的な蛍光標識アミノ酸の導入が起こってしまうことが観察された。そこで終止コドン UAG の利用も検討したが、4 塩基コドンに比べて蛍光標識アミノ酸の導入効率が低く、二重蛍光標識タンパク質の収量が極めて低くなってしまった、という問題があった。今回、これまで使用してきた酵母フェニルアラニン用 tRNA の代わりに、高効率な導入を行なうことのできる新たな tRNA の探索を試みた。その結果、マイコプラズマ由来 tRNA の中から、UAG を用いた場合でも 4 塩基コドンと同等の効率で蛍光標識アミノ酸の導入を行なうことのできる新たな tRNA を見出すことができた(特許出願済み、論文準備中)。

5 自己評価:

本研究ではまず、二種類の蛍光標識アミノ酸を導入して FRET によりタンパク質構造変化を解析する技術の開発に取り組んだ。そのためのモデルタンパク質としてカルモジュリンを選択し、アンフォールディングや基質ペプチドの結合に伴う構造変化を FRET の変化として捉えることに成功した。その過程では、特に蛍光標識アミノ酸の導入部位の選択が重要であり、場合によっては予想される FRET 変化が観測できないこともあった。これは、当初は主に蛍光基間距離が FRET 効率を決定すると予想していたが、実際には FRET が蛍光基の配向や環境変化の影響を強く受けたためだと考えている。これについては、導入部位の最適化を行なうと共に、環境変化を受けにくい蛍光基を使用するなど、今後もさらなる技術的改良が必要であると考えている。

また、この技術を利用してシャペロニンに依存したタンパク質のフォールディングの解析も試み、シャペロニンとの相互作用に伴う基質タンパク質の構造変化を測定することができた。その過程では、対象タンパク質の種類によっては、一部の 4 塩基コドンで蛍光基の部位特異的導入が達成されないという問題が生じた。そこで終止コドンの利用を検討し、従来よりも導入効率が大幅に向上する tRNA 変異体を見いだすことができた。これは、様々なタンパク質を対象にする上で大きな技術的改良である。

このようにタンパク質の種類に制限されずに、低分子蛍光基を特定部位へ導入して FRET により構造変化を検出できる技術は、世界的にも初めてのものである。ただし、当初はカルモジュリンをモデルタンパク質とし、その後様々なタンパク質について構造変化解析を行ない新しい知見の取得を試みる計画であったが、上記のように当初は予想していなかった問題が生じ、新しい知見の取得は実現できなかった。今後は、実際に様々なタンパク質に適用して新たな知見の取得を試みると共に、共同研究や試薬キットの事業化を通じてこの技術を普及させ、タンパク質研究の有用なツールに発展させて行きたいと考えている。

6 研究総括の見解:

さきがけ研究採択前に、4 塩基コドンによる非天然アミノ酸のタンパク質への導入という画期的で際立って斬新な手法を見出した。さきがけ研究においては、その技術を応用した FRET 解析法の開発を目指した。いくつかの技術障害をクリアして目的の FRET 解析法や導入効率を向上させる tRNA 変異体を見出し、特許出願 2 件に結び付けた点は評価できる。tRNA 変異体については生産試験検討も認められたので、今後の機能の実用化という点で成果が期待できる。

7 主な論文等:

論文 国際誌 4 件、国内誌 3 件

1. Daisuke Kajihara, Takahiro Hohsaka, Masahiko Sisido, Synthesis and Sequence Optimization of GFP Mutants Containing Aromatic Nonnatural Amino Acids at the Tyr66 Position. *Protein Eng. Des. Sel.*, 2005, 18, 273-278.
2. Hikaru Taira, Masaharu Fukushima, Takahiro Hohsaka, Masahiko Sisido, Four-Base Codon-Mediated Incorporation of Nonnatural Amino Acids into Proteins in a Eukaryotic Cell-Free Translation System. *J. Biosci. Bioeng.*, 2005, 99, 473-476.
3. Takahiro Hohsaka, Norihito Muranaka, Chie Komiyama, Kinue Matsui, Satomi Takaura, Ryoji Abe, Hiroshi Murakami, Masahiko Sisido, Position-Specific Incorporation of Dansylated Non-natural Amino Acids into Streptavidin by using a Four-Base Codon. *FEBS Lett.*, 2004, 560, 173-177.
4. Takahiro Hohsaka, Incorporation of Nonnatural Amino Acids into Proteins through Extension of the Genetic Code. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 2004, 77, 1041-1049.
5. 芳坂貴弘、遺伝暗号を拡張して人工蛋白質を合成する。 *化学と生物*, 2005, 11, 753-757.

特許 2 件

1. タンパク質と他の分子との相互作用を検出するためのタンパク質プローブ
発明者 芳坂貴弘、出願人 科学技術振興機構、特願 2005-230768(国際出願申請中)

2. 非天然アミノ酸をタンパク質に導入するための tRNA 変異体
発明者 芳坂貴弘、出願人 科学技術振興機構、特願 2005-329115

受賞 3 件

1. 芳坂貴弘、日本化学会進歩賞(平成 15 年 3 月 20 日)
2. 芳坂貴弘、東京テクノ・フォーラム21 ゴールドメダル(平成 15 年 4 月 16 日)
3. 芳坂貴弘、第4回バイオビジネスコンペ JAPAN 最優秀賞(平成 16 年 4 月 16 日)

招待講演 国際学会 1 件、国内学会 4 件

1. Takahiro Hohsaka, Extension of the genetic code and its application to position-specific incorporation of caged amino acids into proteins in a cell-free translation system, PACIFICHEM2005, Honolulu (2005.12.16)
2. 芳坂貴弘、遺伝暗号の拡張による人工タンパク質の合成とその応用、第52回高分子学会年会(2003.5.29)
3. 芳坂貴弘、遺伝暗号の拡張によるタンパク質の新規部位特異的修飾技術の開発、第20回日本 DDS 学会(2004.7.15)
4. 遺伝暗号の拡張による非天然アミノ酸のタンパク質への部位特異的導入、第27回分子生物学会年会(2004.12.9)
5. 芳坂貴弘、遺伝暗号を拡張した人工タンパク質合成システムの開発とその応用、日本薬学会第125年会(2005.3.30)

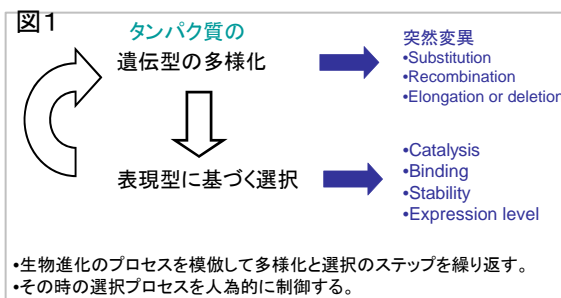
研究課題別評価

1 研究課題名: 分子進化工学的手法による新規トポロジーを有する蛋白質の探索

2 研究者氏名: 松浦 友亮

3 研究のねらい:

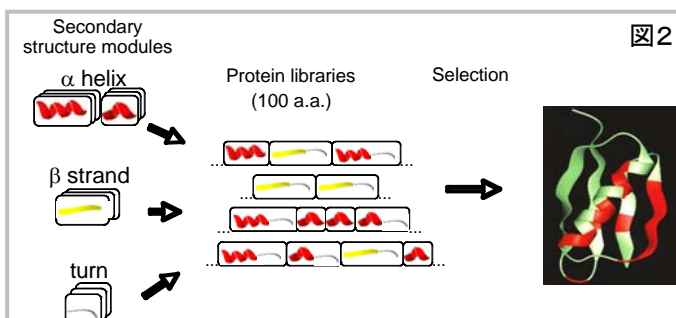
蛋白質は、アミノ酸残基間の相互作用や、溶媒との相互作用など数多くの相互作用により、特有の機能を発現しうる構造に折り畳まれる。一般的に、相互作用が多いほど複雑性が増すため、与えられた摂動に対する影響が予測しにくい。我々は、このような性質を有する蛋白質を理解するための手法として分子進化工学的手法を用いる。分子進化工学的手法とは、多様性を有する蛋白質ライブラリーの作成し、それらの内から目的とする機能を有する分子を選択することを行う(図1)。本研究では、この手法を用いて、新規蛋白質を造り出すことを行った。



4 研究成果:

(1) はじめに

既知の蛋白質は二次構造リッチである。また、 α ヘリックスや β シートなどの二次構造を構成する配列には、特有の極性と非極性残基のパターンが存在することが知られている(binary パターン)。我々は、現在までに蛋白質が二次構造リッチであることに着目し、二次構造を形成する傾向の強い配列を binary パターンを基にデザイン、合成し、これをランダムに連結することにより、約100アミノ酸残基からなる蛋白質ライブラリー(二次構造モジュールライブラリー)を作成した(図2: Matsuura, T. et al(2002))。本研究では、この蛋白質ライブラリーから分子進化工学的手法を用いて、単一構造に折り畳まれる蛋白質、および機能性蛋白質を選択し、この構造決定を含む構造特性を明らかにすることで、1: 機能性蛋白質が取得できるのか、2: その構造、配列は既知の蛋白質と比較してどのようなものであるのか、という問いに答えることを目的とした。天然に存在する配列、構造は蛋白質物理的に可能な唯一解ではない。よって、新規蛋白質をつくり出し、これを解析することが蛋白質に関する更なる知見を得るのに重要であると考えた。



(2) Bovine Serum Albumin (BSA)結合蛋白質の創出

上記の二次構造モジュールライブラリーからリボソームディスプレイ法という進化分子工学的手法を用いて、機能性蛋白質を取得することを目指した。変異と選択のプロセスを10回繰り返した結果、当初目的としていたピオチンではなくBSAに結合する蛋白質(E8)が取得された(KD = 2.1 μ M)。この蛋白質のBSAとの結合は特異的であり、さらに二次構造を有していることがわかった(図3)。さらに、その2次構造がBSAとの結合に必須であることも明らかにした。また、E8のアミノ酸配列は既知の配列との相同性も無かった。このことは、二次構造モジュールを無作為に連結しただけのライブラリーから機能性蛋白質が造り出せることを示している。さらに、この蛋白質の結晶化を試みたが、構造を決定するに至らなかった。

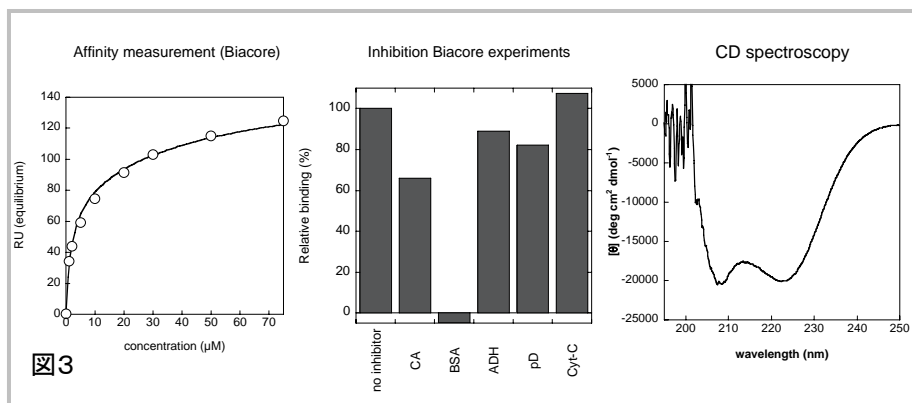


図3

(3) DNA結合蛋白質の創出

天然の蛋白質はその多くが複数のドメインから成るマルチドメイン蛋白質である。様々な蛋白質において、アミノ酸置換を導入したときの機能・構造の変化を調べた研究から、例外はあるものの、多くの蛋白質はアミノ酸置換に寛容であることは広く認識されている。一方で、ドメイン置換が蛋白質の機能に与える影響を調べた例は少ない。

マルチドメイン蛋白質の1つであるDNA結合蛋白質、zif268は3つのドメインから構成されている(図4)。この蛋白質はN末端からそれぞれfinger 1, 2, 3と呼ばれるドメインから構成されており、それぞれのfingerのDNAに対する解離定数はmMのオーダーにあると予測されるが、各fingerが特異的な配列を認識することで全体として 10^{-10} (M)もの非常に高い結合能を示す。このように、各ドメインは低機能であっても、これが集合することにより、全体として高機能を有する。

本研究ではZif268を用い、このドメインを全く異なる配列群に置換して、ドメイン置換がZif268の機能に与える影響を調べた。具体的には、Zif268の3つのドメインのうち、ドメイン1をZif268とは全く関係のない、先に紹介した2次構造モジュールライブラリーで置換したプールを作成した。そのうち無作為に選んだいくつかのクローンのDNA結合能をファージディスプレイ法により評価したところ、そのほとんどがドメイン1を欠失したものに比べて高い機能を有することがわかった。また、挿入されたポリペプチドのアミノ酸配列とDNA結合能とのあいだには、特に傾向が見られなかった。このことからZif268のDNA結合能はドメイン置換に非常に寛容であることがわかった。このことは、ドメイン置換という変異に対してzif268は進化的に寛容であることを示唆している。

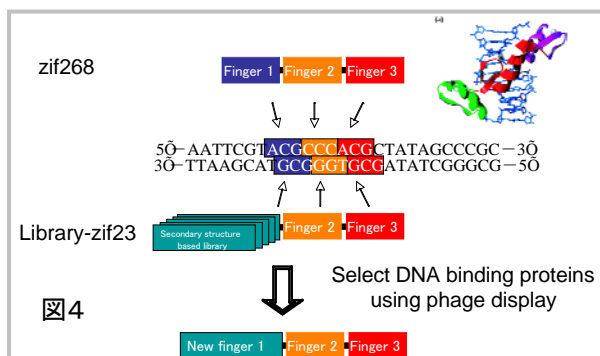


図4

さらに、蛋白質としてどのような機構で異なるドメインを受け入れているのかを理解するため、ファージディスプレイ法を用いてこのドメイン置換ポリペプチドライブラリー(diversity = 105)の中からより高機能なポリペプチドを選択することにした。選択実験を行った結果、アミノ酸配列の異なる数クローンが濃縮され、さらにファージディスプレイ法により、これらのクローンはドメイン1が欠失したzif268よりも約1000倍の結合能を持つことが明らかになった。このように、ドメイン置換により、新規蛋白質が造り出せることを示すことが出来た。

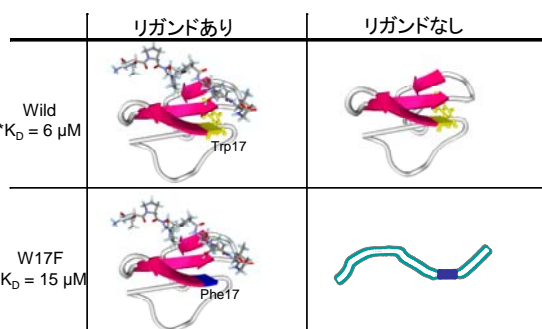
(4) Unstructured protein を初期配列とした機能進化

ほとんどの蛋白質はアミノ酸配列によって規定される特定の高次構造に折り畳まれる。一方、生理的条件下で基質と結合していない状態では特定の高次構造を持たない蛋白質群が近年多数見つかっている。現存の蛋白質は、明らかに進化の産物である。ゆえに、本研究では、特定の

高次構造を持たない蛋白質を出発点として人工的に進化させたときに構造・機能の変化を調べることで蛋白質構造揺らぎと機能との関係性を明らかにする。

特定の高次構造を持たない蛋白質として、hYAP65 WW ドメインの1アミノ酸置換体であるW17F 変異体を用いた。野生型 WWドメイン (WT)はコンパクトな立体構造を有し、PY リガンドと呼ばれるペプチドを基質として特異的に結合する。一方、W17F は基質非存在下では特定の立体構造を持たないが、基質存在下では立体構造を形成し、野生型の 1/3 程

度の結合能を持つことが知られている。我々は、分子進化工学的手法の一つであるリボソームディスプレイ法を用い、W17F を初期配列とした変異体ライブラリーから、PY リガンドに強く結合する分子の選択を行った。また、そのとき W17F の復帰変異が起こらないようにした。その結果、いくつかの結合能の向上した高機能変異体の取得に成功した。ゲル濾過クロマトグラフィーにより、これら高機能変異体の見かけの分子量は初期配列の W17F よりも小さく(コンパクトに)なっていることがわかった。さらに、結合するという機能を向上させることで、構造特性がどのように変化したのかを調べることにした。また、取得された高機能変異体は基質特異性に関しても変化が見られた。特定の構造を取らない W17F の基質特異性をPYリガンドの変異体を用いて調べた結果、W17F は WT と比べて基質特異性が弱かったのに対して、選択された変異体は基質特性の向上が見られた。よって、あるリガンドに結合するという選択圧を加えた結果、その他リガンドには結合しないという性質が表れうることが明らかになった。



*PYリガンド(EYPPYPPPPYPSG)との解離定数(μM)
Koepf, et al. *Biochemistry* 1999

5 自己評価:

さきがけ研究では、新規機能性蛋白質をつくり出し、これの結晶構造を取得することを目指した。結果的に、現在までに構造を得るまでに至っていないことは反省すべきである。一方で、進化工学的手法を用いて、様々な蛋白質を造り出せたことは満足しており、これからも、進化分子工学的手法を用いて、蛋白質の新たな側面を明らかにしてゆきたいと考えている。ただ、論文にまとめるという作業に予想以上に時間がかかってしまい、研究期間内にまとめることができなかつたことについても反省している。

6 研究総括の見解:

進化工学的手法により新規機能性蛋白質をつくり出そうという試みであり、こういう分野は成果を出すのが難しいことを承知でさきがけ研究者に採択していただいた。狙い通りの成果が出たかどうかは疑問であるが、蛋白質ライブラリーやドメイン置換を用いる進化工学的手法により、新規な蛋白質がつくりだせることを示した点の一つの成果である。ただし未だ構造と機能の関係が明確でないところに留まっているので、今後そのことの意味を突きつめていく方向に研究を進めたい。

7 主な論文等:

論文

1. Matsuura, T., Ernst, A., Zechel, D. and Plückthun A.: (2004). Combinatorial approach to novel proteins. *Chembiochem*, 5, 177-182.
2. Matsuura T and Plückthun A.: (2003). Strategies for selection from protein libraries composed of de novo designed secondary structure modules. *Orig. Life Evol. Biosph.*, 34: 151-157.
3. Matsuura, T. and Plückthun A.: (2003). Selection based on the folding properties of proteins with ribosome display. *FEBS letters*, 539: 24-28.

研究課題別評価

1 研究課題名： 薬剤耐性化問題の克服を目指した多剤排出蛋白質の薬剤認識機構の解明とその応用

2 研究者氏名： 村上 聡

3 研究のねらい：

薬剤耐性化問題の主因である多剤排出蛋白質の立体構造を詳細に解析することで、どのような分子メカニズムにより多種多様な薬剤分子が排出蛋白質の基質として認識され、排出されるのかを明らかにすることが本研究の一つめのねらいである。次の段階のねらいとして、同多剤排出蛋白質の遺伝子発現制御に関わる転写因子の立体構造も併せて解析する。それにより多剤の結合蛋白質と、排出蛋白質両方の構造情報を比較することが可能となり、より詳細な多剤認識メカニズムに迫ることが可能となる。本研究は、構造情報が皆無であった膜輸送蛋白質の構造生物学分野に世界初の情報を供するばかりでなく、ファジーな基質認識機構という酵素化学の例外的な現象の理解へ向けて本質的な知見を与える。また基礎学問分野に対する貢献ばかりでなく、多剤耐性化問題の原理解明に繋がるためその問題克服へ向けての門戸を開くという応用面での展開も期待できる。

4 研究成果：

(1) 大腸菌多剤排出蛋白質 AcrB の立体構造の解明

昨今のゲノム解析の結果、多剤排出蛋白質は古細菌をはじめとするバクテリアから我々人間の細胞に至るまで、あらゆる細胞が持つ最も基本的で普遍的な生体防御機構であるということが分かってきた。モデル細胞である大腸菌では 1997 年のゲノム解析完了をうけて、大腸菌には約 40 種類もの薬剤排出蛋白質が存在することが予測された。これらのうち、大腸菌の通常生育条件下で構成的に発現しており、大腸菌の薬剤自然抵抗性を担う最も重要な多剤排出蛋白質が AcrB である。AcrB は細胞膜を介して存在する水素イオン濃度勾配ポテンシャルをエネルギー源として多剤を能動的に排出する膜輸送蛋白質(トランスポーター)である。AcrB は外膜チャネル蛋白 TolC と、膜融合蛋白 AcrA と複合体を形成し協調して、細胞質からのみでなく内外膜の間の空間(ペリプラズム空間)からも抗生物質などの基質を排出する強力な多剤排出蛋白質である。我々は、AcrB を大量精製し、結晶化を行い、X線結晶構造解析することに成功した。その結果、AcrB 分子は三量体で存在し、細胞外に大きな水溶性ドメインを有する 12 回膜貫通型蛋白質であることを示した。プロトンや基質(薬剤)透過、および排出メカニズムに対して多くの知見を与えた。多剤排出蛋白質としても、またトランスポーターとしても世界で初めての詳細な立体構造解析例であるこの成果は、英科学誌「ネイチャー」の表紙を飾った。

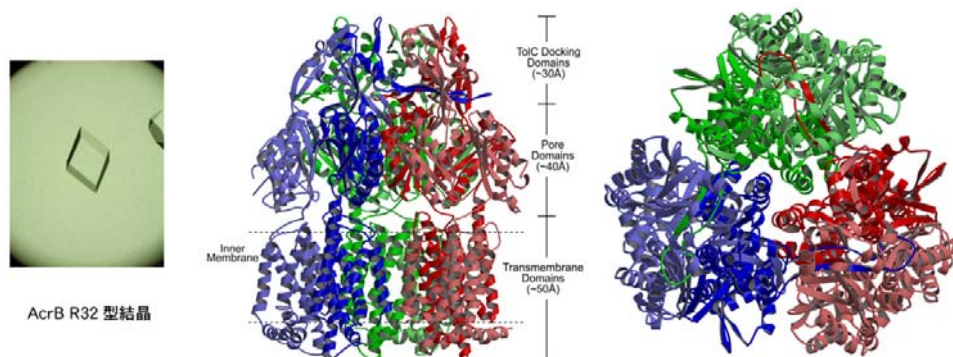


図1 AcrB の R32 型結晶(左)と、それを用いて解析した結晶構造。三量体を別々の色で示す。細胞膜に対して側方から(中)と上方から(右)

(2) AcrB の非対称結晶構造の解明

先に述べた構造解析に用いた結晶における分子のパッキングを表す空間群は $R32$ で、結晶学的三回対称を持つ。その3回軸が偶然(しばしば起こることだが)生物学的三回軸と一致した構造が得られた。つまり、得られた構造は三回対称性を持ち、含まれる3つの単量体の立体構造は、等価になる。これは構造解析における分子モデル構築が1/3で済むという解析上のメリットを持つものの、各単量体の協調的機能や、薬剤結合量を問うたりする化学量論的考察には向かず、機能を解析する上では大きなデメリットでもある。

そこで、薬剤結合型構造解析に先立ち、三回対称を持たない結晶の作成を試みた。膜蛋白質の結晶化は非常に難しい技術であることは生化学分野における常識であるが、試行錯誤の末、精製および結晶化に用いる界面活性剤の種類を変更することにより、対称性の低い空間群に属する結晶を得ることに成功した。その結晶構造解析にあたっては、改めて重原子同型置換法により位相情報を実験的に求め注意深く解析を行った。分解能についても 2.8 \AA と従来の 3.5 \AA からの大幅な改善がみられた。

得られた立体構造は先の構造と比べ、全体的成り立ちについてはほとんど等しかった。しかしより詳細に AcrB に含まれる三量体の立体構造を非対称的に観測することで、同蛋白質による排出メカニズムを知る上で非常に重要な、三回対称からずれて単量体各々で構造が異なる部分が複数箇所あることが判明した。それら構造変化を起こしている部分は、分子中央に存在するチャネル様構造を持つポア・ヘリックスや、AcrB と強調して機能するアダプター蛋白 AcrA の結合部位、薬剤取り込み口など、機能的に重要と考えられている部分に集中していた。この構造解析結果は、同薬剤排出蛋白質の薬剤輸送メカニズムにおける反応中間体を3種類得たと解釈することも出来、多剤排出メカニズムを解明する決定的な知見となった。

(3) AcrB 薬剤複合体結晶構造の解明と機能的回転メカニズム

多剤認識機構解明の為に AcrB 分子に薬剤を複数種結合させた複合体状態での構造解析が不可欠である。ポンプやチャネルが膜を介したイオンの輸送を行うのに対し、トランスポーターは薬剤などの“分子”を輸送するため、基質結合および解離による構造変化が大きいいためか、複合体形成目的の為に通常行われる基質溶液への結晶の浸潤法は成功せず、共結晶化法をとる必要があった。40 種類以上に及ぶ多剤に対してすべて結晶化を行った結果、抗生物質 A を用いた場合に、AcrB 単量体の水溶性ドメインのほぼ中心辺りに薬剤由来の差フーリエ・ピークが観測された。しかし、基質結合が弱いためか、電子密度が幾分不明瞭であった。

より結果を確信の持てるものにする為に臭素化した抗生物質 A を化学合成し、臭素原子の異常散乱測定により薬剤結合部位の決定を試みた。SPring8 放射光を用いることで、明瞭な臭素の異常散乱ピークが得られ、臭素と結合する薬剤位置の確定に成功した。薬剤の結合は AcrB 分子の水溶性ドメインのほぼ中央あたりのフェニルアラニンに富む分子の内腔に見出された。この部位は $R32$ 型結晶構造の結果から推定された基質透過経路から幾分ずれていた。さらに驚くべき事に薬剤分子は AcrB 三量体の一つにしか結合しないことが分かった。三量体の持つ構造的な非対称性と、単量体特異的な薬剤結合は、非対称性に基づく多剤の結合・解離の調節機構が存在することを意味している。つまり AcrB 三量体のなかで、単量体各々が、違った結合中間状態を持ち、このそれぞれの状態が秩序だつて順に変化することにより、一方向への輸送を達成させている。これは、ATP 合成を司る F1Fo-ATPase の回転触媒機構との共通点が多く、非対称性を利用した結合状態調節の一般的機構であると考えることが出来る。F1Fo-ATPase と異なり物理的な回転を伴うことはないにしても、機能的状態の秩序だつた転位が機能の協調性と密接に関係する機構である。

対称性の低い新型結晶を用いた多剤排出蛋白質-薬剤複合体の構造解析結果より、芳香族-芳香族相互作用を中心とする多剤の認識機構と、非対称性に基づく新規薬剤排出機構を提唱するに至った。排出蛋白質基質複合体の結晶構造解析は世界初の例であるばかりでなく、非対称性構造に基づく新しい反応メカニズムは、構造変化と薬剤結合状態の非対称性を無理なく説明でき、当該分野におけるエポックメイキングな成果である。

(4) 多剤結合型転写調節因子の結晶構造の解明

大腸菌ゲノム解析の結果、大腸菌には数多くの薬剤排出蛋白質が存在することが判っているが、これらの大部分は菌の通常生育環境では発現して居らず、薬剤暴露の刺激などにより排出蛋白質をコードする遺伝子の転写活性が高進し、排出蛋白質が発現され、その排出にあたと説明されている。つまり、多剤排出蛋白質の発現制御因子は多剤のセンサーとしてはたらく多剤結合蛋白質である。多剤認識機構の詳細な解析をめざし、本研究では大腸菌のもつこれらセンサー蛋白質の立体構造解析もおこなってきた。いくつかの多剤結合型転写調節因子のクローニング、大量発現系構築、結晶化を行い、分解能 1.1 Å での超高分解能結晶構造解析に成功した。立体構造はいわゆるヘリックス-ターン-ヘリックス・モチーフを持つ既知の立体構造であり、新規性はなかったが、当該分野における最も分解能が高い解析例となった。

高分解能で解析できたため、構造の中に内在性の基質の結合を偶然にも発見した。マスペクトル等の分析により、この基質の化学的同定を完了したが、その生理的意味づけを進めている。現段階では、この物質はどうやら脂溶性の代謝産物であり、好氣的環境下での活性酸素等の働きにより生ずる脂溶性毒素である可能性が高い。多剤排出蛋白質の発現制御因子の中に多剤排出蛋白質の基質類似物質の結合を認めたことで、多剤排出蛋白質群の本来の生理的役割について示唆を与えた。すなわち、多剤排出蛋白質は 20 世紀に氾濫した抗生物質や抗ガン剤を排出するために細胞の起源から脈々と備えてきたわけではなく、細胞内で自然発生する脂溶性毒素を排出することが本来の役割であると考えの方が自然であろう。排出蛋白質の内因性基質の探索は排出蛋白質阻害剤開発のリード化合物としての有用性があるため多くの研究者により行われてきたが、本研究のような多剤排出系の発現制御因子の結晶構造中に見出されたことはまさにセレンディピティーといえる。

(5) 今後の展開

高分解能での立体構造情報は構造に基づくアンタゴニスト設計にも直接供することが出来る。これら本研究で得られた構造情報は全て PDB データベースに登録し、多剤耐性化問題の克服を目指すあらゆる研究者に対して公開する。本研究により多剤耐性化問題の主因である多剤排出蛋白質の分子実態とその働きが明らかになったばかりでなく、細胞内での本来の生理的役割についても知るところとなった。つまり、問題の責任蛋白質のいわゆる“攻めどころ”が多く明らかとなったことで、今後の特効薬開発や、新しい治療方法の開発などに拍車がかかることが大いに期待される。本研究が多剤耐性化問題克服への一助となることを祈念する。

5 自己評価:

膜を介した物質輸送に関わる膜蛋白質は、ポンプ、チャネル、トランスポーター(トランスポーターのみ膜輸送体という日本語訳を持つ)と大別することが出来る。このうちイオンの輸送に関わるポンプ、チャネルの構造と機能に関わる研究は、1990 年代半ばから急速に発展し、カリウム・チャネルの基質選択メカニズムを構造を基に解明したマッキノンらは 2003 年のノーベル賞に輝いた。一方で薬剤などの分子の輸送に関わる膜輸送蛋白質は結晶化が困難であるが故、構造解析が筆者らの研究以前はひとつも成功しておらず、機能の本質的理解のための最大のミッシング・ピースとなっていた。本さきがけ研究における、多剤排出蛋白質 AcrB の世界初の立体構造解析、AcrB・薬剤複合体構造解析、及び、それらから想起されたトランスポーターの基質輸送メカニズム(回転触媒機構)はまさに世界にさきがける成果であり、この種の蛋白質の構造・機能研究における本質的な解を与えたものと思われる。

また、薬剤排出蛋白質の発現制御因子の構造解析に成功したことで、多剤の排出蛋白質と、結合蛋白質の詳細な立体構造が両方そろった。そのような例は本研究以外に無く、多剤認識機構の解明へ向けて、当該分野における最も重要な知見であると言われている。

そればかりでなく、構造解析の結果得た多剤排出システムの内因性基質の偶然なる発見は、なぜ生物は排出蛋白質をもつことで、有史以来様々な薬剤に対する対抗策を講じていたか? というナゾに対するヒントも与えた。すなわち、排出系は細胞の中で自然発生する毒性のある脂溶性代謝産物を吐き捨てるための掃除機であり、近代医薬はその掃除機にたまたま吸い込まれて耐

性が起こるといふ説を強く示唆するものであった。つまり薬剤排出蛋白質は本来の生理的な役割をもち、薬剤の排出は二次的なものであるという説に実質的なデータを与えた。これら全ての知見はなぜこれまで排出蛋白質を封じ込める特効薬が存在しなかったか？なぜ新薬もしばらくすると排出され始めるのか？という事象を説明する杖となる。今後も薬剤耐性化問題の克服へ向け、基礎的知見を積み重ねてゆきたい。

6 研究総括の見解:

さきがけ研究採択直前に世界で初めて多剤排出蛋白質である AcrB の構造決定に成功するという画期的成果を出した。そこで一服せず、さきがけ研究開始後も、この蛋白質の機能認識メカニズムの解明を課題に掲げ、AcrB・薬剤複合体、AcrB 発現制御因子、内因性基質等の結晶構造解析に次々と成功して、多剤認識や薬剤排出の機構を明らかにするという画期的な成果を挙げた点、大いに評価する。機能を理解するために必要な実験をデザインして、それを証明していくという、構造研究者のお手本になる研究の進め方が身についていると感じる。

7 主な論文等:

論文

1. Satoshi Murakami, Ryosuke Nakashima, Eiki Yamashita and Akihito Yamaguchi
“Crystal structure of the bacterial multidrug efflux transporter AcrB”
Nature **419**, 587–593 (2002)
2. Satoshi Murakami and Akihito Yamaguchi
“Multidrug-exporting secondary transporters”
Curr. Opin. Struct. Biol. **13**, 443–452 (2003)
3. Satoshi Murakami, Norihisa Tamura, Asami Saito, Takahiro Hirata and Akihito Yamaguchi
“Extramembrane Central Pore of Multidrug Exporter AcrB in *Escherichia coli* Plays an Important Role in Drug Transport”
J. Biol. Chem. **279**, 3743–3748 (2004)
4. Hiroaki Adachi, Satoshi Murakami, Ai Niino, Hiroyoshi Matsumura, Kazufumi Takano, Tsuyoshi Inoue, Yusuke Mori, Akihito Yamaguchi and Takatomo Sasaki
“Membrane Protein Crystallization Using Laser Irradiation”
Jpn. J. Appl. Phys. **43**, No.10B, L1376–L1378 (2004)
5. Norihisa Tamura, Satoshi Murakami, Yoshiaki Oyama, Masaji Ishiguro, Akihito Yamaguchi
“Direct Interaction of Multidrug Efflux Transporter AcrB and Outer Membrane Channel TolC Detected via Site-Directed Disulfide Cross-Linking”.
Biochemistry **44**, 11115–11121 (2005)

ほか 10 報

出版物

1. 村上聡、山口明人
“多剤排出トランスポーターAcrB の結晶構造解析”
細胞工学 **21**, 1520–1521 (2002)
2. 村上聡、山口明人
“異物排出トランスポーターの結晶構造、ついに決まる”
蛋白質・核酸・酵素 **48**, 26–32 (2003)
3. 村上聡、中島良介、山下栄樹、山口明人
“大腸菌多剤排出トランスポーターAcrB の結晶構造解析”
日本結晶学会誌 **45**, 256–261 (2003)
4. 村上聡、(分担執筆)
“多剤耐性化を引き起こす薬剤排出タンパク質”
タンパク質のかたちから生命の謎を解く 生物マシーナリー構造生物学の最前線(編集)

者:田之倉優, 総ページ数:232 頁)、pp.178-190、株式会社クバプロ、(2004)

5. 村上聡、山口明人

“薬剤排出タンパク質の構造と機能 ～薬剤耐性化の克服を目指して”
バイオサイエンスとインダストリー 62, 11-16 (2004)

ほか 2 報

受賞

1. 国立大学法人大阪大学・教育研究功績賞 (平成 16 年 1 月)

招待講演

1. Satoshi Murakami, Ryosuke Nakashima, Eiki Yamashita, Akihito Yamaguchi
“X-ray crystallographic analysis of bacterial multidrug efflux transporter AcrB”
Gordon Research Conferences on Multi-Drug Efflux Systems, March 9-14, 2003, Four point Sheraton, Ventura, CA, USA., (2003)
2. Satoshi Murakami
“X-ray crystallographic analysis of multidrug efflux transporter AcrB”
Japan-UK Membrane Protein Structure Biology-Towards high-throughput membrane protein crystallography and related technology, September 11-12, SPring-8 Public Relation Hall, Hyogo, JAPAN, (2003)
3. Satoshi Murakami, Ryosuke Nakashima, Takashi Matumoto, Eiki Yamashita Akihito Yamaguchi
“Crystal Structure of Bacterial Multidrug Efflux Transporter AcrB”
The Sixth Conference of the Asian Crystallographic Association (AsCA'04) Symposium, "Macromolecular assemblies" June 27-30, Hong Kong University of Science and Technology, Hong Kong, China, (2004)
4. Satoshi Murakami, Ryosuke Nakashima, Takashi Matumoto, Eiki Yamashita Akihito Yamaguchi
“X-ray crystallographic analysis of multi-drug efflux transporter”
The 8th International Conference on Biology and Synchrotron Radiation(BSR2004), Symposium "Membrane Proteins, September 7-11, Egret Himeji, Hyogo, JAPAN, (2004)
5. Satoshi Murakami
“Structure and function of bacterial multi-drug efflux transporter”
Gordon Research Conference on Multi-Drug Efflux Systems, August 28-September 2, Magdalen college, Oxford University, UK, (2005)

ほか招待講演 12 件(国際) 15 件(国内)

ほか学会発表等 9 件(国際) 43 件(国内)