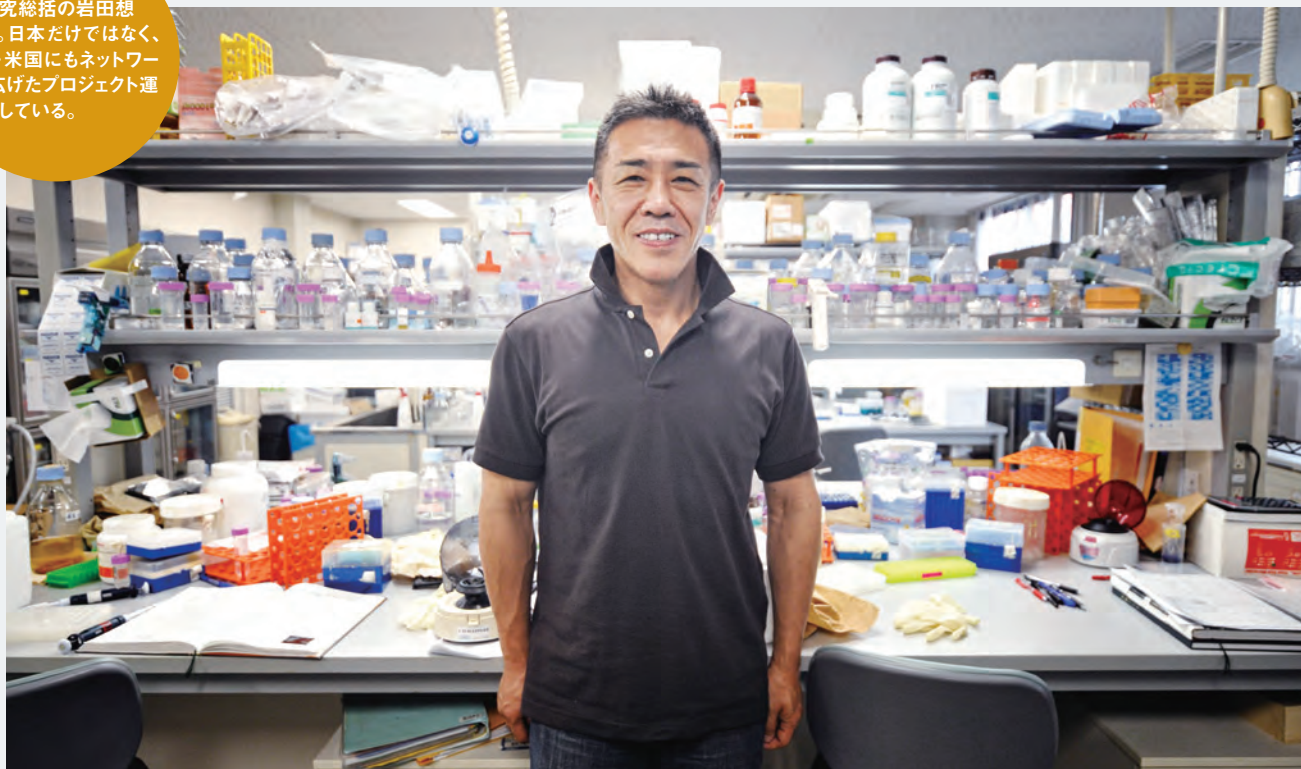


研究総括の岩田想さん。日本だけではなく、英国・米国にもネットワークを広げたプロジェクト運営をしている。



膜たんぱく質の構造解析への挑戦

なぜ、構造を解くのか？

薬が効くメカニズムを解明し、副作用の少ない創薬などの可能性を開く、膜たんぱく質の構造解析。困難とされた技術が可能になった背景には、生命現象に構造から迫りたいという強い思いと、サイエンスは1人の研究者ではなく人類全体のものだという確固たる信念があった。

世界的な研究者の姿に刺激を受け チャレンジングなテーマに挑む

食べ物や薬などが体外から取り込まれた時、最初にそれらに触れ、体内に受け入れるための受容体の役目を果たするのが「膜たんぱく質(*)」だ。

*膜たんぱく質

細胞を内と外に区切る細胞膜にあるたんぱく質。数万種類といわれるヒトたんぱく質の約3分の1を占め、情報の伝達や物質の通り道として重要な役割を担う。

体外から入ってくる物質は、体にとって必要なものばかりとは限らない。膜たんぱく質は数千種類があり、それぞれ決まった物質を受け入れる構造をしている。それによって、必

要な物質だけを体内に取り入れ、有害な物質から身を守っているのだ。

京都大学大学院医学研究科教授の岩田想さんは、今から約20年前、文部省高エネルギー物理学研究所に在籍していた時代に、膜たんぱく質の構造解析に興味を抱いた。

「当時は強力なX線を利用できる施設が世界でも少なく、世界中から著名な構造解析の研究者たちが訪れていました。構造解析が難しいとされている物質に彼らが挑んでいる姿を見て、自分もチャレンジングなテーマに取り組みたいと思いました。なかでも興味を抱いたのが膜たんぱく質でした」

体内に2万5千種類もあるといわれるたんぱく質のうち、当時、解明されていたのはわずか数種類だけだった。もしも構造解析の効果的な手法を開発し、たんぱく質の構造を明

らかにできれば、創薬をはじめさまざまな研究に発展できると考えたのだ。

意欲に燃えて研究に取り組み、成果を出したが、次第にもどかしさを感じるようになった。構造を解析するには、対象となる物質を大量に入手し、結晶化して、X線解析をするというステップを踏む。その各段階で困難なハードルが立ちはだかっており、自分一人の力では限界があると感じたのだ。「それぞれの分野の最高峰の研究者でチームをつくる必要がある」——そんな岩田さんの願いは、2005年に、JSTのERATO「岩田ヒト膜受容体構造プロジェクト」として形になった。これまで培った人脉を生かし、同じ志をもった研究者に声をかけてチームを結成。「受容体産生」「結晶創成」「X線測定」といった、それぞれのテーマでチャレンジが始まった。

Step 1

受容体産生

膜たんぱく質のDNAを合成し
酵母に導入して培養

構造解析を行うには、最初のステップとして目的の物質を大量に集める必要がある。しかし、膜たんぱく質の場合はこれが簡単ではない。

「膜たんぱく質のなかで最初に構造が解かれたのは、光合成に関するものでした。このたんぱく質は、葉緑体や光合成細菌に非常に高い密度で集まっているため、大量に入手することが比較的簡単だったのです。そのほか、ミトコンドリアに存在する呼吸に関するたんぱく質など、ごく一部は生体から入手しやすく、構造解析を行えました。しかし、多くの膜たんぱく質の場合、ほとんどは細胞の表面に数個ある程度なので、大量に集めることは困難でした」

そんな状況を一変させたのが、遺伝子工学の進展だった。遺伝子組み換えの技術を用いることにより、人工的に目的のたんぱく質を大量発現させることが可能になったのだ。プロジェクトの受容体産生グループでは、この技術を膜たんぱく質に応用し、大量発現させる課題に取り組んだ。

対象として選んだのは、膜たんぱく質のなかでも「Gたんぱく質共役型受容体(**)」とよばれるグループだ。

****Gたんぱく質共役型受容体 (GPCR)**
受容体となる膜たんぱく質の一種。神経伝達物質やホルモンなどの受容にかかわる。全たんぱく質のなかで最大のグループで、アドレニン受容体、ヒスタミン受容体などが含まれる。細胞膜を縫うように7回貫通する特徴的な構造をもつ。

● 京都大学



受容体産生グループと結晶創成グループの拠点は、岩田さんが教授を務める京都大学大学院医学研究科にある。この拠点は、ERATO「岩田ヒト膜受容体構造プロジェクト」のために整備された。

医薬品の半数近くがGPCRを標的にしているといわれ、構造解析手法が確立されれば、大きなインパクトを与えられる。そう考へての選択だった。

受容体産生グループでは、培養が容易で増殖速度が速く、高密度での増殖が可能な酵母に着目し、構造が安定していて、機能を保持した状態のGPCRの産生に取り組んだ。

「構造解析に適したたんぱく質の結晶を得るには、安定した構造であることが求められます。私たちは、GPCRの構造の安定性が発現に重要な要因であることを突き止め、機能を維持し、かつ構造が安定しているGPCRを発現させる技術を確認させたのです」

さらに、出芽酵母やメタノール資化酵母

を用いて研究を重ね、安定したGPCRを大量に発現させることに成功した。こうして、最初のステップである「受容体産生」はクリアされた。

生命現象や機能を
分子構造から明らかにしたい

高エネルギー物理学研究所でX線測定に取り組んでいた岩田さんの経歴から考えると、酵母を用いた培養などという、生化学的な実験にはなじみがないように思われる。しかし、じつは岩田さんはもともと農学部出身で、学生時代は細胞の培養など、生化学の実験に明け暮れる日々を過ごしていたという。

「でも、当時は遺伝子工学も進んでいませんでしたから、ある生命現象や機能を説明しようと思っても、観察や実験結果の数値をもとに推測するしかありませんでした。分子構造を明らかにできれば、それをもとに現象や機能をはっきりと説明できる——そう考へて、X線測定技術を身につけることにしたのです」

こうして飛び込んだX線測定の現場では、測定の技術自体に興味をもつ研究者が多く、岩田さんのように、身につけた技術を使って構造を解き明かすことに興味をもつ研究者は少数派だったという。しかし、岩田さんがそんな視点をもっていたからこそ、膜たんぱく質の構造解析という誰も試みなかったのけないチャレンジングなテーマに踏み出せたとし、構造解析への道筋全体を見通して、各分野の最高峰の研究者を集めたERATOのプロジェクトを誕生させることもできたのだろう。



酵母を用いた培養装置(写真左)。GPCR合成遺伝子を導入した酵母を、1晩から3日間、培養する。昆虫細胞を用いたGPCR産生も進められている。(写真右)。昆虫細胞には、高等真核生物特有の翻訳後修飾(たんぱく質ができた後にさまざまな化学物質が結合すること)能力があり、これが目的のGPCRを得るために不可欠なこともある。

Step 2

抗体をのりしろにすることで 分子の方向をそろえて結晶化を実現

次のステップである「結晶創成」には、明確な課題があった。膜たんぱく質が水に溶けないことだ。

「砂糖やミョウバンの結晶を作るときのことを思い出してください。まず、その物質の濃い水溶液を作ってから、ゆっくりと乾かしていくと、きれいな結晶ができます。これと同じように、結晶を得るにはまず水溶液にするのが一般的です。ところが、膜たんぱく質は疎水性が高く、水に溶けないのです」

そこで、界面活性剤を用いた手法が検討された。せっけんが汚れを落とすときのように、界面活性剤の集合体(ミセル)が、細胞膜の中に埋まった膜たんぱく質を包み込むようにして取り出し、水に溶かすことができるのだ。

しかし、この手法には、結晶化するうえで大きなハードルがあった。結晶化には、分子が一定の方向にそろい、規則正しく密に並ぶ必要がある。ところが、膜たんぱく質は界面活性剤に囲まれ、ボールの中に入り込んだような状態になっているため、規則正しく並ぶことが難しいのだ。

結晶創成グループでは、膜たんぱく質の一部に抗体をくっつけることで、この課題を解決しようと試みた。

「くっついた抗体は、界面活性剤のボールからはみ出すような形で外に出ています。これが互いを認識する目印となり、のりしろのような役割を果たして、膜たんぱく質がきれいに並んで結晶化すると考えたのです」

この手法は1995年に岩田さん自身が世界で初めて開発し、構造解析にも成功していた。ただし、それは

細菌の膜たんぱく質でのこと。ほ乳類のGPCRでは、精製すると立体構造が変化してしまうため、うまくくっつく抗体を得られなかったことなどから、成功した例はなかった。

結晶創成グループでは、GPCRが生体内に存在するときと同じ立体構造を保つことができる技術(リボソーム免疫法)を開発し、それをもとに望む抗体を作製することを可能にした。この抗体をのりしろにすることで、GPCRの分子の向きをそろえた結晶創成に成功。2つ目のハードルもクリアされていた。

優れた手法があると知れば ためらいなく海外から学ぶ姿勢

結晶化に向けては、もう1つ、米国スクリプス研究所のレイモンド・スティーンズ教授がGPCRの結晶化に初めて適用することに成功した「キュービック液晶法(*))」という新しい手法を取り入れた研究も進められた。

* キュービック液晶法

脂質の中で結晶化を行う方法。脂質が親水的な部分と疎水的な部分を併せもつことを利用し、親水的な部分を外側にした三次元構造を作製。その中に膜たんぱく質を導入すると、自由に拡散して結晶化する。

キュービック液晶法の優秀性を認めた岩田さんは、この手法で世界をリードしているスクリプス研究所に研究員を派遣した。研究の結果、この手法によってもヒトGPCRの結晶化に成功した。複数の手法が開発されたことで、今後、さまざまなGPCRの結晶化が進むことが期待される。

前述の抗体を用いた手法は、岩田さん自

結晶創成

サイエンスは
人類のものであり、
境界はありません!



研究総括

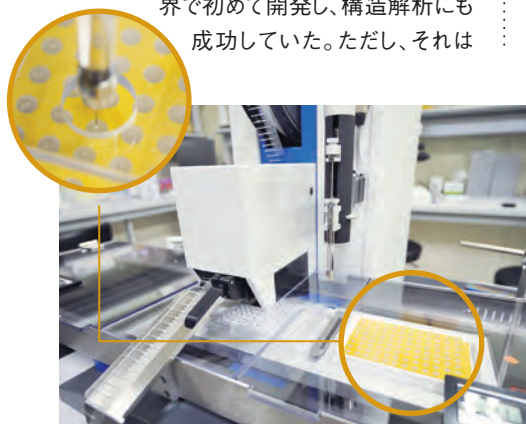
岩田 想

いわた・そう

1991東京大学大学院農芸化学専攻博士課程修了。農学博士。京都大学大学院医学研究科教授、英国インペリアルカレッジロンドン分子生命学科教授。2005年からJST ERATO「岩田ヒト膜受容体構造プロジェクト」研究総括を務める。

らが開発したものだけに、それにこだわって研究を進めたいのが自然だと思われるが、岩田さんには、ほかの手法を取り入れることに対するためらいはなかった。そんな姿勢に、岩田さんのサイエンスに対する信念がうかがえる。

「何よりも大切なのは膜たんぱく質が結晶化され、構造解析に成功することです。そこには、“誰が”成功したという、主語を加える必要はないと思います。サイエンスは人類のものであり、そこに境界はありません。成功に導くために“最適な手法は何か”を第一に考え、違った分野の研究者や異なる国の優れた技術を持ち寄り、つなぎ合わせるべきではないでしょうか」



キュービック液晶法による結晶化装置(写真左)。最適な条件下で脂質と膜たんぱく質を混ぜ合わせると結晶化する。できた結晶は顕微鏡で確認してすくい取る(写真中、右)。

Step 3

X線測定

ビームラインの細さが
正確なX線測定を可能にした

3つ目のステップである「X線測定」の拠点となったのは、英国の放射光施設ダイヤモンドだ。そのメリットは、X線結晶構造解析(**)で用いるX線のビームサイズの細さにあった。

**X線結晶構造解析

結晶化したたんぱく質にX線を照射し、得られた回折データから、結晶内部で原子がどのように配列しているかを決定する方法。

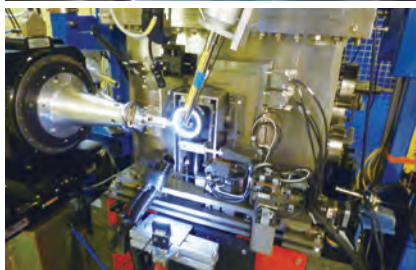
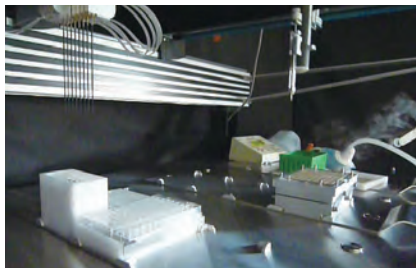
GPCRの結晶は小さく、結晶の中でX線がよく回折する個所も限られているため、ビームサイズが細いほど正確なデータを得られる。従来のX線のビームサイズは約 $50\mu\text{m}$ ($1\mu\text{m}$ は1000分の1mm)程度だったが、岩田さんのプロジェクトで立ち上げたダイヤモンドの「マイクロフォーカス・ビームラインI24」なら、約 $10\mu\text{m}$ まで細くできるのだ。

「とくに、キュービック液晶法で得られた結晶は、脂質が粘っこいためたんぱく質分子が集まりにくく、サイズが小さくなりがちです。ダイヤモンドのビームラインを使えたからこそ、測定可能だったといえます」

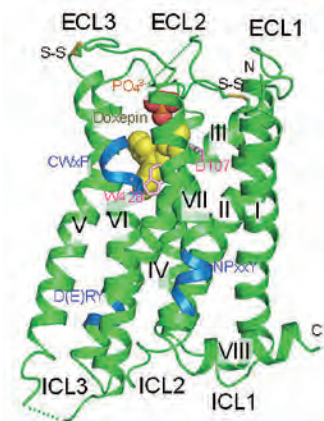
結晶創成のステップで加えられた工夫が、ここでも役に立った。得られたデータから構造を特定するためには、X線の波の高さのほか、位相、すなわち山谷のずれに関する情報が必要だ。膜たんぱく質ではこの情報を得るのが難しかったのだが、結晶創成の際につけた抗体の構造はわかっているため、これを位相を知るための大きな手がかりにすることができた。岩田さんは、結晶創成のために抗体をつけた時点で、すでに構造解析時の位相の手がかりとすることも見据えていたという。

抗体の果たす役割はそればかりではない。開発された技術によってGPCRの1つである「アデノシンA2a受容体」の構造を明らかにしたところ、抗体分子が受容体内側のくぼみに深く突き刺さり、受容体を不活性な構造にしていることがわかった。アデノシンA2a受容体は、パーキンソン病などの中枢神経の疾患に関係しており、その活動を抑えることは症状の改善につながるといわれる。つまり、

● DIAMOND



英国の放射光施設ダイヤモンド。写真上は自動で結晶化を行うロボット。写真中はマイクロフォーカス・ビームラインの中枢部。写真下のモニターにはX線回折データが映っている。左は岩田さん。

ヒスタミンH1受容体(H1R)の
立体構造

受容体の構造が解明されただけでなく、花粉症の薬として知られる抗ヒスタミン薬が、この構造のどの部位と結合するのかも明らかになった。

抗体自身が医薬品になる可能性も見出したのだ。

何の構造を解き、それが世の中に
どう役立つかがそこが大切

こうして確立された技術により、アデノシンA2a受容体以外にもさまざまなGPCRの構造解析が進められている。その1つが、花粉症の薬の標的として注目されている「ヒスタミンH1受容体」だ(左下図参照)。花粉症は、花粉などの刺激によって体内にあるヒスタミンなどの炎症物質が飛び出し、受容体に結合することで引き起こされる。ヒスタミン受容体の構造が明らかになったことで、ヒスタミンだけが受容体と結合できなくなるような、効果的で、副作用を抑えた薬などの開発に役立つと期待される。

「GPCRを標的にした薬は、抗ヒスタミン剤のように日常的な服用が必要なものが少なくありません。だからこそ、GPCRの構造が明らかになり、副作用を抑えた薬が開発される意義は大きいと思います」

さらに、岩田さんは細胞膜を通して体の各部に物質を運ぶ各種の輸送体や、一酸化窒素還元酵素など、GPCR以外のモデル膜たんぱく質の構造も明らかにしている。それは、岩田さんがプロジェクトを立ち上げたときから構想していたことでもあった。

「GPCRは、細胞膜を縫うように7回貫通する複雑な構造をしています。受容体のなかには、1回だけしか貫通しない単純な構造のものもありますから、そちらのほうが成果は得やすかったかもしれません。しかし複雑だからこそ、GPCRの構造が解ければ、ほかの物質の構造も解けるはずだと考えたのです」

プロジェクトの名前は、たとえば「たんぱく質構造解析プロジェクト」といったあいまいな表現にすることもできた。それは、研究の進み具合によって方向を調整できる、保険のような意味合いもある。しかし、岩田さんはあえて「ヒト膜受容体構造プロジェクト」と、具体的な名称を選んだ。そこに、ただ構造を解くことだけではなく、「何の構造を解き、それが世の中にどう役立つのか」ということに焦点を定めた岩田さんの覚悟を感じる。その覚悟こそが「なぜ、構造を解くのか?」という問いに対する、岩田さんの答えでもある。■