

物構研 News

大学共同利用機関法人
高エネルギー加速器研究機構
物質構造科学研究所

構造生物学研究センター
SBRC 特集



表紙イラストレーション：楠木 雪野

「正義の女神ユースティティアと GTP 分子」

PI5P4K β は細胞内の GTP 分子を計って細胞の運命を決定します。

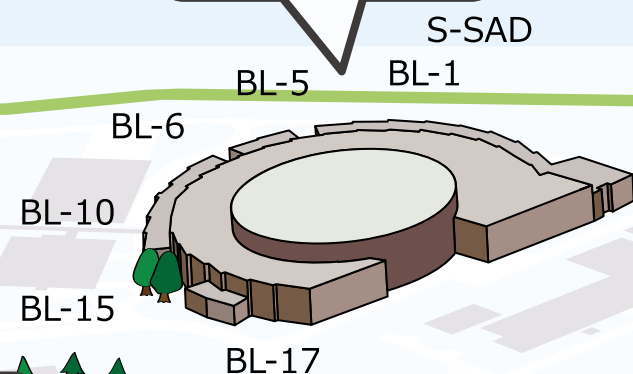
この働きを古来より伝わる女神ユースティティアの姿になぞらえました。

- 「最先端×使いやすさ」を実現 ... 14



小角散乱装置

PF



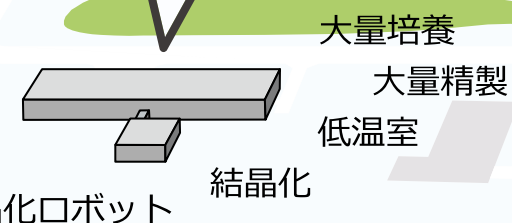
- つなぎ、導く PReMo ... 12



AR-NW12

AR-NE3

構造生物実験準備棟



- 細胞の代謝とがん化を司る GTP センサー ... 4
- 胃がんを引き起こすピロリ菌由来の
発がんタンパク質 ... 6
- 筋ジストロフィー発症のしくみ ... 8
- 分子進化論 ... 10

PF-AR



構造生物学研究センター (SBRC: Structural Biology Research Center) は、高エネルギー加速器研究機構 (KEK) 物質構造科学研究所 (IMSS) に属する施設です。構造生物学研究センターでは、PF リング (2.5GeV)、アドバンスリング (PF-AR, 6.5GeV) という、特徴ある 2 つの放射光専用の光源加速器を用いて、生体分子が担う反応の仕組みを立体構造情報に基づいて解明することを目的として研究に取り組んでいます。



野生型 PI5P4K β および、GTP センサー機能の無い PI5P4K β のがん細胞における比較。野生型 PI5P4K β ではがん細胞が増殖、腫瘍を形成し（上、赤矢印）、GTP センサー機能の無い PI5P4K β ではがん細胞が増殖しなかった（下）。

細胞の代謝とがん化を司る GTP センサー

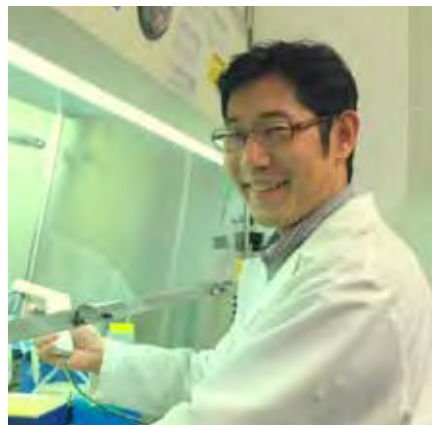
がん。長年日本人の死因トップに位置し、今やがんになる確率は日本人の2人に1人とも言われている。がんに侵され、みるみる細くなっていく人の姿を目にしたことのある人もいるだろう。その理由は様々だが、正常な生命活動に必要なタンパク質の生産より、がん細胞の増殖にエネルギーが使われてしまうためと考えられている。

エネルギー源 GTP

GTP（グアノシン3リン酸）はタンパク質の合成やシグナル伝達に関わるエネルギー分子で、細胞内エネルギー代謝に不可欠な存在である。がん細胞ではエネルギー源として GTP が多量に消費されている。これを裏付ける現象が、がん細胞の爆発的な増殖と、その一方で痩せていく生体そのものの変化。こうした現象を GTP というフィルターを通して捉える研究が行われている。

90 年におよぶ細胞のエネルギー研究において、GTP の重要性は見過されてきた。その中で米国シンシナティ大学癌研究所の佐々木敦朗准教授（右写真）は、GTP の代謝に興味を持ち、がん細胞の GTP 濃度変化を調べた。細胞分裂などで GTP が使われれば GTP は減るはずだが、がん細胞はむしろ GTP を増やしており、状況に応じて濃度を巧みに変化させていた。このこと

から佐々木氏は、細胞には GTP 濃度の変化を感知して GTP 量を制御するしくみがあり、がんはこれを利用して増殖するのではないかという仮説を立てた。これを証明するために「GTP センサー」タンパク質を探し始めた（図1）。ただし、細胞内のタンパク質は2～3万種類。この中から存在するかどうかも分からない GTP センサーを探し



佐々木 敦朗（あつお）准教授。

出すことは無謀とも見られ、常識を超えるアイデアに研究費を得ることも困難だった。それでも勝算があると考えた佐々木氏は研究を進めた。GTP センサーは GTP に結合するはず。工夫を重ね、細胞から GTP と結合するタンパク質を見つける方法を確立した。可能性を絞り、最終的に脂質キナーゼの一種 PI5P4K β に注目した。しかし当時、PI5P4K β は GTP に似た細胞内のエネルギー分子である ATP（アデノシン3リン



図1 GTP 固定化ビーズを用い、GTP と結合するタンパク質を細胞内から探索、PI5P4K β を発見。

酸）に結合し酵素反応に使うと考えられていた。キナーゼは ATP を使うものと信じられていたのである。

人と人との出会い

同じ頃、米国ハーバード大学に在籍していた竹内恒氏（現在は産業技術総合研究所、主任研究員）と研究会で知り合い、共同研究が始まった。NMR を利用したタンパク質の構造解析が専門の竹内氏は、PI5P4K β が ATP より GTP に強く結合して酵素反応に利用することを NMR を使って明らかにした。一方佐々木氏は、PI5P4K β は ATP とも結合するが、脂質キナーゼとしての働きは ATP の細胞内濃度域では変化せず、GTP の濃度変化だけに伴って変化することを見つけた。細胞内での PI5P4K β の活性が GTP の濃度変化で変わる性質は、GTP センサーの条件に合致すると思われた。しかし、これを証明するには、ATP に対する働きは変えずに GTP に対する働きだけを失った PI5P4K β を作り、生体内での働きを比較する必要がある。そして、このような変異型 PI5P4K β のデザインには、PI5P4K β がどのように GTP と ATP とを見分けるのかを原子レベルで知る必要があり、NMR では難しかった。その後、帰国し産総研へと異動した竹内氏は、千田俊哉氏、美紀氏（現在は KEK 物構研教授、特任助教）と出会った。千田氏は放射光を利用したタンパク質結晶構造解析のプロ。結晶さえあれば X 線で構造を見ることは可能として、結晶構造解析を担うことになった。

竹内氏は PI5P4K β の結晶を作り、千田氏に託す日々が始まった。千田氏はフォトンファクトリーで実験がある度に調べるが、なかなかデータが取れない。結晶から立体構造を決めるには、X 線の回折像がいるのだが、どの結晶も回折点が現れない。その結果を受け取り、竹内氏は再び結晶を作り、また託す。結晶を渡し始めてから約半年が経っていた。

衝撃的な転機

「このままではダメだ。一度実験しているところを見においでよ。」千田（俊）氏に呼ばれ、竹内氏は初めてフォトンファクトリーを訪れた。実験現場を見て納得。その第一印象は強烈なものだった。「結晶に毛が生えている！！」

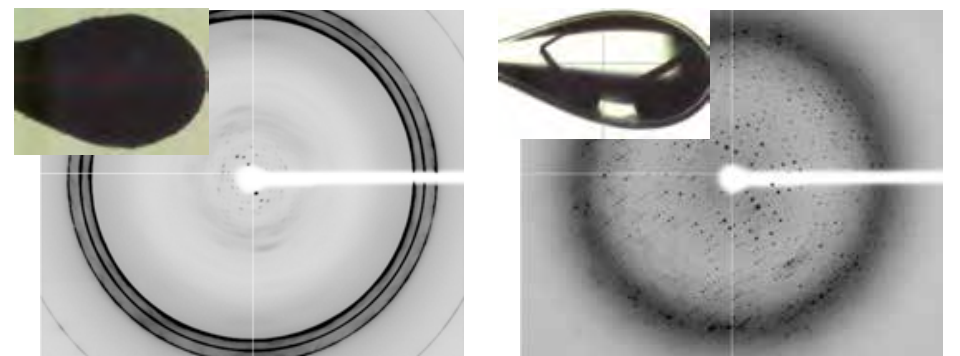


図2 PI5P4K β の結晶と X 線回折像。左が結晶改質前、右が改質後。改質後は結晶も透過り、広範囲に回折点が出現しているのが分かる。

X 線結晶構造解析では、X 線照射による損傷を軽減するため、窒素の冷氣（約 -180℃）で冷やしなが測定する。竹内氏が目にした「毛」というのは、冷氣によって結晶にできた霜だった（図2左）。結晶という鉋物のような硬いイメージを持つが、タンパク質の結晶は殆んどが水。例えるならば豆腐のようなもの。非常に脆く、水をたくさん含むため、結晶内で大量に作られた氷が結晶を破壊していたのだ。もちろん回折像が出るわけもない。

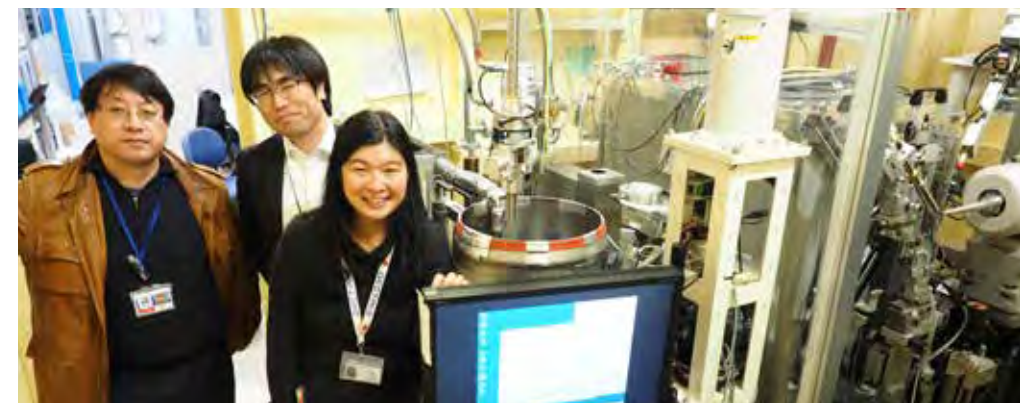
一方、色々な結晶を長年見てきていた千田（美）氏は「結晶化しているのだから、絶対に回折像が見えるようになる。」と確信に近い思いを抱いていた。その頃、千田（美）氏は結晶改質の技術開発に取り組み、いくつか成功していたのだ。竹内氏の作った結晶は、触っただけで崩れてしまうものも多く、このままではいくら時間をかけても十分な回折像を見ることは出来ないと考えていた。同時に改質方法のアイデアも持っていた。それは、結晶冷却時に用いる約 20 種類の試薬候補の中から PI5P4K β 結晶に適したものをいくつか選び出し、複数の試薬を組み合わせて使う方法である。考えた通り、1 つめの試薬に結晶を浸けた後で 2 つめの試薬を加える 2 段階処理を行うと、ダメージを与えることなく結晶を冷やすことがきた。見事に生まれ変

わった結晶からは十分な回折像が得られ、分解能は最高で 2.1 Å に達した（図2右）。そして GTP 類似体や ATP 類似体が結合した状態の立体構造を決定、PI5P4K β が ATP と GTP とを見分ける仕組みも原子のレベルで明らかになった。この構造を参考に、竹内氏は、GTP と結合する働きだけがなくなった変異型 PI5P4K β を作り上げた。

PI5P4K β は GTP センサーに相応しい性質を持つが、生体内で PI5P4K β が GTP センサーとして働いていることが示されなければ生物学として意味がない。竹内氏は作った変異型 PI5P4K β をシンシナティの佐々木氏に送った。シンシナティでは、野生型、変異型の PI5P4K β を持つがん細胞をマウスに移植する生物学実験が行われた。研究グループの仮説が正しければ、変異型のがん細胞は増殖しないはずである。実験結果は劇的だった。正常な PI5P4K β を与えたマウスではがん細胞が増殖し、腫瘍が形成されたのに対し、GTP センサー部分を働かなくさせた変異型 PI5P4K β ではがん細胞が増殖しなかった（左頁写真）。ついに PI5P4K β が GTP を感知し、細胞増殖など細胞応答のシグナル伝達に関わる分子であることが示されたのである。

（執筆：千田俊哉・餅田円、構成：餅田円）

Mol Cell. 2016 Jan 5. pii: S1097-2765(15)00945-4. doi: 10.1016/j.molcel.2015.12.011.



左から：千田俊哉 教授、竹内恒（こう）主任研究員、千田美紀 特任助教。実験を行ったフォトンファクトリー BL-17A にて。

胃がんを引き起こす ピロリ菌由来の発がんタンパク質

全世界のがん死亡原因の第二位を占める胃がんは、毎年約 70 万人もの命を奪っている。中でも日本は胃がん最多発国で、予防や治療に関する研究が盛んだ。胃がんの発症に重要な役割を担うピロリ菌は、世界人口の半数以上が感染していると言われ、近年ピロリ菌が産生するタンパク質「CagA」が、胃の細胞内に侵入することでヒトが持っている様々なタンパク質と結合し、それらの機能を攪乱することで胃がんの発症を誘導することが明らかになってきた。

CagA が胃がんを引き起こす

CagA は約 1,200 個のアミノ酸が一本鎖に繋がり、折りたたまれてできた大きなタンパク質。アミノ酸配列を調べていくと、タンパク質の端である C 末端領域に CM モチーフと EPIYA モチーフと呼ばれる特徴的なアミノ酸の繰り返し配列があることが分かった(図 1)。



図 1 CagA の構造模式図

CagA は約 1,200 個のアミノ酸からなるタンパク質で、N 末端側で決まった構造をとっている CagA-N 領域と、C 末端側の天然変性領域である CagA-C 領域から構成されている。画像提供：産業技術総合研究所 千田俊哉

CagA は、次のようなしくみで胃がんを引き起こすと言われている。ピロリ菌内で産生された CagA は、ピロリ菌の持つ微小な注射針のような装置を通して胃の細胞内に侵入する。侵入した CagA は細胞膜の構成成分であるホスファチジルセリンと相互作用し、細胞膜の内面に結合した CagA は、胃の上皮細胞で働く PAR1 という酵素と CM モチーフの部分で結合し、この酵素の働きを抑える。上皮細胞や神経細胞などは、1 つの細胞内で機能の違う部分が存在し(細胞極性)、PAR1 はこの極性を制御している。CagA は PAR1 の働きを抑えることで、胃粘膜の構造を破壊してしまうのだ(図 2 左)。

同時に CagA は、EPIYA モチーフ中のチロシン残基がリン酸化修飾を受ける

ことで、ヒトのがんタンパク質として知られるチロシンホスファターゼ SHP2 と結合する。SHP2 は CagA との結合によって異常に活性化され、細胞のがん化につながる異常な分裂・増殖シグナルを発する(図 2 右)。

このように、ピロリ菌が産生する CagA は、胃の細胞内に侵入し、CM モチーフと EPIYA モチーフを巧みに使ってヒトが本来持つ様々な分子機能を攪乱し、胃の細胞をがん化すると考えられている。CagA が「がんタンパク質」として働くための分子機構を明らかにするため、産業技術総合研究所・バイオメディシナル情報研究センターの千田俊哉 主任研究員と東京大学大学院医学系研究科の畠山昌則教授のグループは、X 線結晶構造解析の技術を駆使して CagA の立体構造を調べた。

膜と結合し、 発がんスイッチを入れる

CagA の約 1,200 個のアミノ酸配列は全てが決まった形に折り畳まれているのではなく、C 末端側の 830 ～ 1186 番目までの領域では決まった立体構造を持たない「天然変性領域」となっていた。X 線結晶構造解析を行うには、全く同じ構造をしたタンパク質を並べた結晶を作ることが不可欠だが、個々に自由な形をした天然変性領域が含まれていると、結晶を作ることが難しくなる。そこで千田氏は、まず決まった立体構造を持つ 1 ～ 829 番目の領域「CagA-N 領域」の立体構造解析を行った。その結果、CagA-N 領域は 3 つの構造ドメインが N 字型に構成された、これまでに知られているどのタンパク質とも似ていない新規の立体構造であることが明らかになった(図 3)。そして、CagA 分子の中央部には多数の塩基性アミノ酸が集まってプラスの電荷を持つ部分(塩基性パッチ)があることもわかった(図 4)。この塩基性パッチは、マイナス電荷を持つホスファチジルセリンと静電的な相互作用により、細胞膜と結合していたのだ。一方、決まった構造を持つ CagA-N 領域とは異なり、830 ～ 1186 番目までの「CagA-C 領域」は状況に応じてその構造を自由自在に変化させることができる「天然変性領域」。この領域は、構造を変えながら様々なタンパク質と

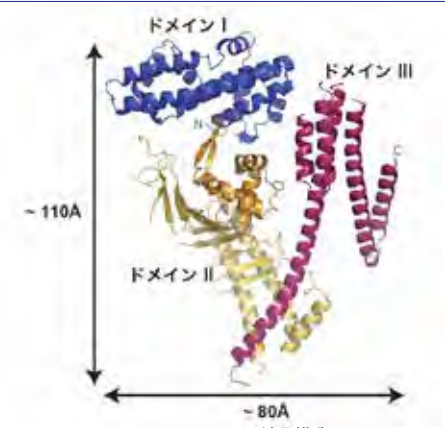


図 3 CagA-N の結晶構造

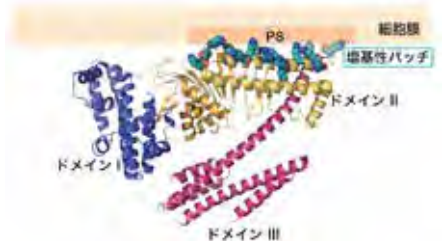


図 4 CagA と細胞膜の相互作用

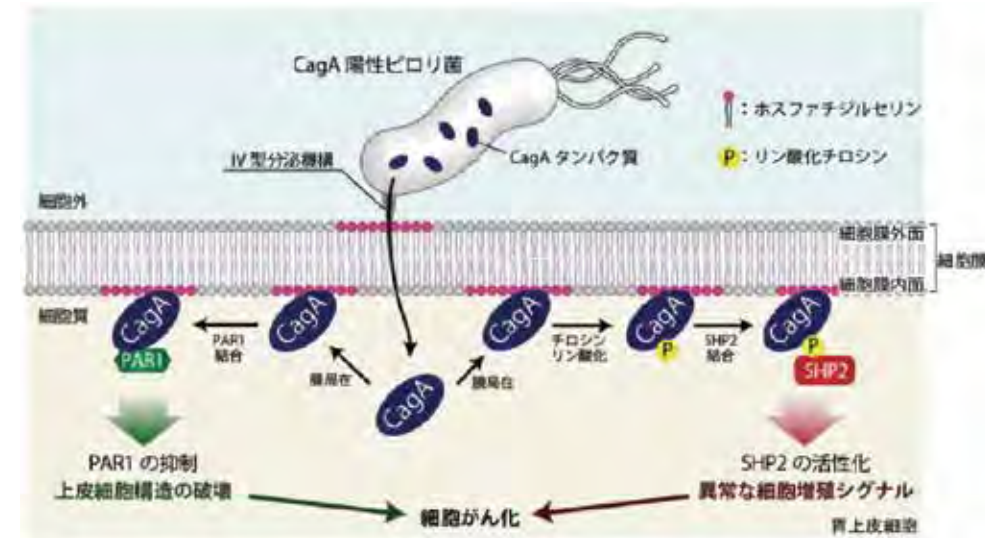


図 2 ピロリ菌 CagA による細胞内シグナルの攪乱(東京大学プレスリリースより)

胃上皮細胞に感染したピロリ菌は、CagA を産生し宿主細胞に注入する。細胞内に侵入した CagA は細胞膜内面に分布するホスファチジルセリンと結合して膜局在に局在する。その後、PAR1 との結合によって PAR1 のキナーゼ活性を抑制する(図左)。一方同時に CagA はチロシンリン酸化修飾を受けた後、SHP2 との結合により SHP2 を異常活性化する(図右)。これらの細胞内標的分子との相互作用により CagA は上皮細胞構造の破壊と異常な細胞増殖シグナルを誘引し細胞をがん化へと向かわせる。

結合するため、一般的に細胞内の情報伝達に重要な働きをされると考えられている。実際 CagA でも、細胞極性を制御する PAR1 と結合する CM モチーフ、細胞の分裂・増殖を制御する SHP2 と結合する EPIYA モチーフはこの天然変性領域にある(図 1)。この領域を詳しく調べていくと、その一部が決まった構造を持つ CagA-N 領域の一部と相互作用をすることで、投げ縄状のループが形成されることが明らかになった(図 5)。この投げ縄状の構造が形成されると、CagA と PAR1 や SHP2 との間で形成される複合体が安定化し、より強いがん化シグナルが生成されることが明らかになったのだ(図 6)。

図 3~6 提供：産業技術総合研究所 千田俊哉

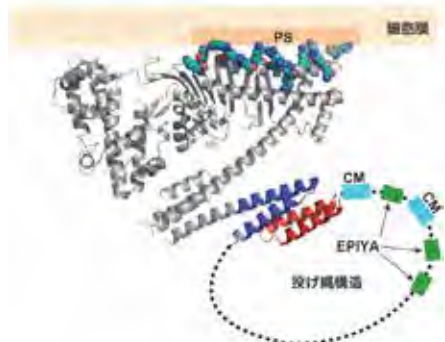


図 5 CagA の C 末端領域に見いだされた投げ縄構造

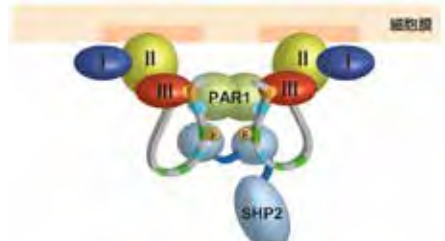


図 6 細胞内膜上に形成されると考えられる複合体

このことから、CagA-N 領域と CagA-C 領域との間で生じる相互作用は、発がん活性を上げるための分子内スイッチとして働くと考えられる。CagA と PAR1、SHP2 との相互作用、その相互作用をより強くする投げ縄構造は、ピロリ菌による胃がん発症の重要な鍵を握っている。分子レベルでこの仕組みが明らかになったことは、ピロリ菌が引き起こす胃がんの発症を抑える薬の開発につながると期待されている。このタンパク質の立体構造解明には、技術的な工夫と、多くの結晶試料が用いられた。CagA 結晶から得られた初めての回折パターンは 10 オングストローム分解能程度しかなく、高分解能の構造解析には不向きであった。しかし、約 1 年半にわたり結晶の質を改善し、X 線損傷を最小に押さえるためのデータ測定法の工夫、低分解能のデータからモデルを構築するための工夫などを重ねた結果、少しずつデータの質が改善され、最終的には 3.3 オングストローム分解能のデータが収集でき、構造決定に至った。構造決定までに凍結した結晶の数は 2,000 個以上、X 線を当てた結晶の数は 1,000 個以上にもなる。このような大量の結晶を用いて条件を改善していく解析には、高強度の放射光は無くてもならない必要不可欠なもの。千田氏は、この経験から、「質の悪い結晶であっても、詳細な条件検討を効率よくこなしていく事で、結晶の質を改善できることが多いと考えています。」と語った。

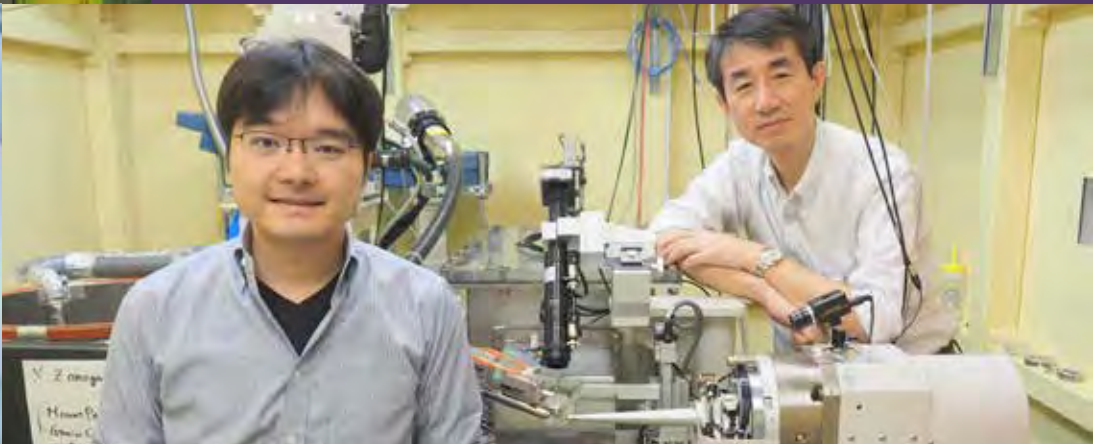
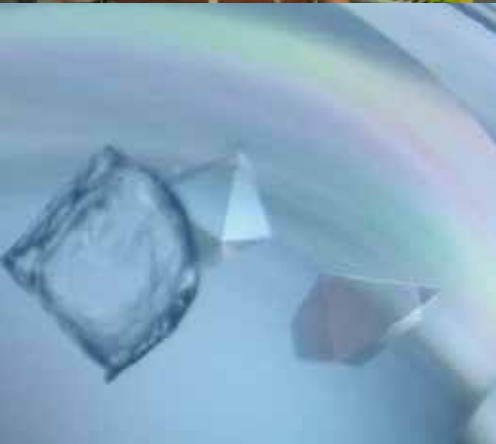
"Tertiary Structure-Function Analysis Reveals the Pathogenic Signaling Potentiation Mechanism of Helicobacter pylori Oncogenic Effector CagA"

Cell Host & Microbe, DOI : 10.1016/j.chom.2012.05.010

この記事は KEK ハイライトでもご覧いただけます。
<http://www.kek.jp/ja/NewsRoom/Highlights/>



筋ジストロフィー 発症のしくみ



写真：左から遠藤玉夫（東京都健康長寿医療センター）、桑原直之、加藤龍一（KEK 物質構造科学研究所）、左下は POMGnT1 の結晶

筋ジストロフィーとは、全身の筋力が徐々に衰えていく、遺伝性筋疾患の総称。日本では一万人に1～2人が発症している一方で、病態には不明な部分が多く、根本的な治療法が未だに存在しない厚生労働省の指定難病である。

東京都健康長寿医療センターの遠藤玉夫副所長は、老化に伴う筋力低下の原因として、筋細胞が接着する仕組みを調べていた。そして、筋細胞を接着、安定させるタンパク質ジストログリカンに注目した。ジストログリカンは筋細胞表面の細胞膜にある糖タンパク質で、糖鎖、ラミニンを介して基底膜と筋細胞を結合させる役割を持つ(図1)。筋肉の様にダイナミックに動く細胞では、糖鎖を介して結合することで、筋肉の伸縮による細胞と基底膜とのずれ動きに対応している。これが上手く働いていないと、筋肉の伸縮時に細胞膜が破れることで細胞が破壊され、結果、筋細胞の減少、筋力の低下につながる。

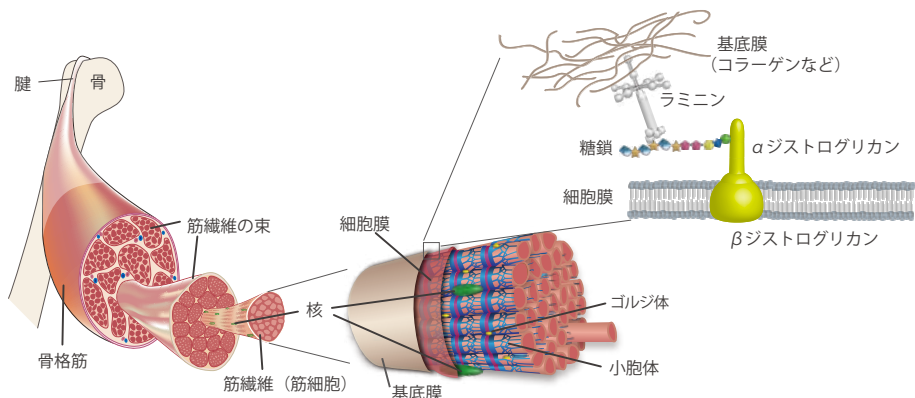


図1 筋肉の構造：筋肉は繊維状の束が伸縮することで動く。筋細胞の細胞膜にジストログリカンというタンパク質があり、糖鎖、ラミニンを介して細胞外の基底膜と結合している。

この現象が筋ジストロフィーでも起きていた。ジストログリカンから伸びる糖鎖の解明に乗り出した遠藤副所長は、Man（マンノース●）、GlcNAc（N-アセチルグルコサミン■）という糖から成る糖鎖を発見、2001年には2番目の糖鎖である GlcNAc ■ を付ける酵素 POMGnT1 というタンパク質を発見した。

POMGnT1 がジストログリカンの糖鎖を作る過程を具体的に解明するための共同研究が始まった。構造生物学を専門としている KEK 物構研の加藤龍一准教授、タンパク質の糖修飾を専門としている桑原直之研究員らは、POMGnT1 の立体構造から、糖鎖が作られる場所と仕組みを原子レベルで解明しようとした。「最初はとにかくタ

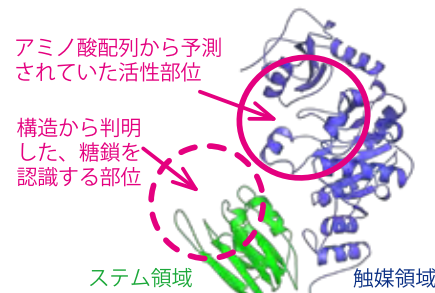


図2 POMGnT1 の立体構造

ンパク質の発現に苦労しました」と振り返る加藤准教授。立体構造を得るには、まず目的のタンパク質を大量に得ることが必要なのだ。最も簡易で良く使われているのは大腸菌だが、複雑なタンパク質は作ることができない。ヒトと同じ真核細胞である酵母や昆虫培養細胞なども試し、哺乳類細胞で POMGnT1 の発現に成功、ようやく結晶を得ることができた。およそ10年の歳月が過ぎていた。結晶をフォトンファクトリーの結晶構造解析ビームラインを用いて得られた立体構造が図2になる。構造は大きく触媒領域（青）とステム領域（緑）の二つの部位に分かれており、予測されていた活性部位は触媒領域にある。だが立体構造をつぶさに調べるも、糖鎖を付けるターゲットのタンパク質を強く認識するような結合は存在しなかった。「正直、どうしようかと思いました。これじゃあ論文にならないな、と」桑原研究員。「テーマを変えることまで考えましたよ。糖鎖が出来る経路から考えると、このタンパク質（POMGnT1）をやって意味あるのかなあ、って（笑）」。

糖鎖が作られる経路

体内では、タンパク質に糖が結合することで、機能発現や、細胞での局在などが制御される。ジストログリカンの場合、まず小胞体内で Man ● が結合される。その後ゴルジ体に運ばれて POMGnT1 によって、GlcNAc ■ が結合される（図3左側の経路）。桑原研究員が見ようとしていたのはまさにこの部分だった。ところが、ジストログリカンのユニークな糖鎖（●■）の発見後、世界中で精力的に研究された結果、ラミニンと結合する糖鎖は POMGnT1 を経由しない別の経路で出来ることが見いだされていた（図3右側の経路）。しかし生体現象としては POMGnT1 に異常があるとラミニンと結合する糖鎖

は出来ず、筋ジストロフィーを発症する。関係あるのか無いのか、構造から判断しようと試みたものの、確たる情報が得られず、心が折れそうになるところだった。転機となったのは構造生物学研究センター長である千田俊哉教授の一言。「こっちのステム領域も調べてみたら？」一見関係無さそうな部位（図2 緑）を調べるよう助言した。ステム領域と呼ばれる機能未知な部分を調べると、糖鎖を認識できそうな構造をしていた。産業技術総合研究所の平林淳主席研究員らと共に、生化学実験から調べると POMGnT1 が Man-GlcNAc の糖鎖（●■、core M1）、そして Man-GlcNAc-GalNAc（N-アセチルガラクトサミン）の糖鎖（●■、core M3）の両方を認識することが分かった。

POMGnT1 が FKTN を手助け

残る課題は疾患との関係。細胞膜でラミニンと結合する糖鎖ができるには、POMGnT1 の様に糖を結合させる酵素がたくさん関与する。その中の一つ、FKTN（フクチン）は福山型筋ジストロフィーの原因となっているもので、Man-GlcNAc-GalNAc（●■）にリビトールリン酸（●）という糖を結合させる（図3右側ゴルジ体内）。この糖鎖はさらに伸びて、ラミニンと直接結合する糖鎖になる。ここまでの結果が示すように、POMGnT1 が core M1（●■）に加えて core M3（●■）も認識できるとしたら、ゴルジ体内で POMGnT1 と隣接して働いている FKTN への橋渡しをしている可能性が高い（図3右上）。これは、POMGnT1 と FKTN が複合体を形成するという以前の観察^{*1}とも一致する。

遠藤副所長は神戸大学の戸田達史教授らと共同で、POMGnT1 の機能を働かなくした細胞を作り、筋ジストロフィーモデル細胞で検証実験を行った。そして POMGnT1 のステム領域の糖結合性が FKTN の機能、およびラミニン結合に必要な糖鎖形成に必須であることを確かめた。X線結晶構造解析から得られた立体構造を始めとして、原子レベルから細胞レベルまでの階層横断的な研究が結実し、POMGnT1 の機能、そして筋ジストロフィー疾患への影響を解明できた^{*2}。遠藤副所長は、この一連の研究を顧みて次のように語った。「最初にジストログリカンのユニークな糖鎖を見つけてから、何度も浮き沈みがありました。ジストログリカンに付く最初の二つの糖鎖を解明したのは我々ですが、筋細胞接着に関わる糖鎖は他のチームに発見されてしまいました。今回の POMGnT1 の場合も、分割して触媒領域だけで結晶化するという進め方もあったと思います。でも、もしそうしていたらステム領域の働きは分からなかったでしょうし、FKTN との連携作用までたどり着かなかったでしょう。加藤さんが本当に苦労して結晶化してくれたお陰で、糖鎖に関わる最後のピースをきちんと我々の手で埋めることが出来ました」。また、筋ジストロフィーの治療に向けても「福山型筋ジストロフィーというのは、日本人に多く発症する筋ジストロフィーで、日本人（福山幸夫博士）によって発見されました。だからこそ、日本人の手で解明し、治療法を開発しなければいけない病気だと思っています」と語った。（執筆・構成 餅田円）

*1 Biochem. Biophys. Res. Commun., 350, 935-941, 2006. doi: 10.1016/j.bbrc.2006.09.129
*2 PNAS 113, no.33 (2016) 9280-9285
doi: 10.1073/pnas.1525545113

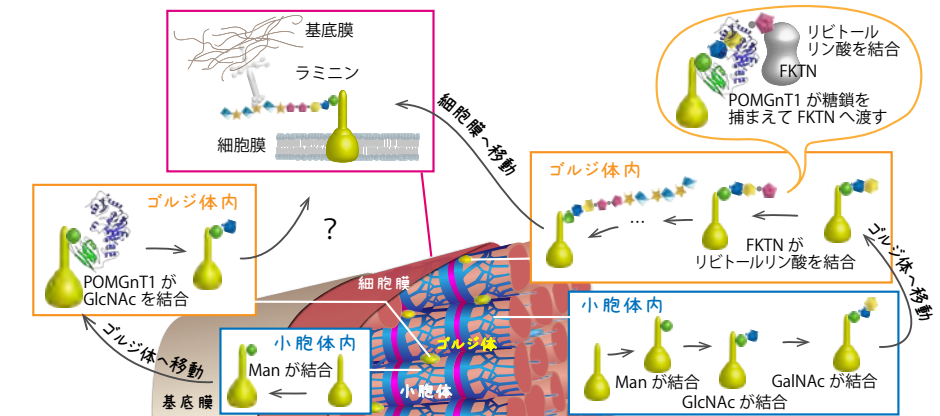


図3 ジストログリカンに出来る糖鎖の経路：ジストログリカンは、糖鎖修飾を受けながら小胞体、ゴルジ体を経由し細胞膜へ移動する。左側が遠藤氏らの発見した糖鎖の経路で Man-GlcNAc（●■）ができる。この経路はラミニンと結合する糖鎖にはならない。右側がラミニンと結合する糖鎖の経路で、FKTN がリビトールリン酸（●）を結合させる際に POMGnT1 が FKTN に橋渡ししていることが判明した。

分子進化論

地球に初めて生命が誕生したのは約 38 億年前。どんな姿形をしていたのだろうか。そこからどのように進化し、現在のように多様な生物界を作り上げてきたのだろうか。直接見ることはできない進化の様子を、DNA を読む仕組みから解明する研究が行われている。

生物が受け継いできた仕組み

原始生命は、遺伝情報を持つ DNA が膜に包まれただけの単純なものだったと考えられている。その後、真正細菌（バクテリア）と古細菌が分かれたのが約 35 億年前。そして細胞膜や細胞質が複雑になると共に、DNA は別の膜に包まれ、核を持つ生物、真核細胞が約 20 億年前に誕生したと考えられている。

核を持ったことで DNA はより長く、複雑な情報を安定して保存できるようになったようだ。この時一緒に発達したのが、DNA の情報を読む仕組み。DNA とはアデニン（A）、チミン（T）、

シトシン（C）、グアニン（G）の 4 種類の塩基が鎖状につながってできた、生きるための機能全ての設計図となる重要な物質。DNA の中には遺伝子の情報が書いてあり、その 25 文字上流に TATA という順で塩基が並んでいる箇所がある（図 1）。遺伝子の情報を読む時には、まず TATA という配列に TBP（TATA ボックス結合タンパク質）が結合する。そして TBP を足場として次々とタンパク質が結合し、DNA の一部がコピー（RNA 合成）される（転写）。RNA は核の外へ運ばれ、タンパク質合成の場であるリボソームに移動しタンパク質へと変換される（翻訳）。この複雑な仕組みが全

ての細胞内で行われているだけでも驚きに値するが、現在生き残っている古細菌からヒトに至るまで、この仕組みは殆んど同じだと言うから驚嘆する。種を超えて保存されているということは、生物にとって重要であることを意味する。

TBP はどこから？

遺伝子の情報を読むために必須な TBP を、1989 年に世界で最初に発見したのが東京大学分子細胞生物学研究所の堀越正美准教授。その後、色々な生物から TBP の発見が相次いだ。真正細菌（バクテリア）にだけは存在し

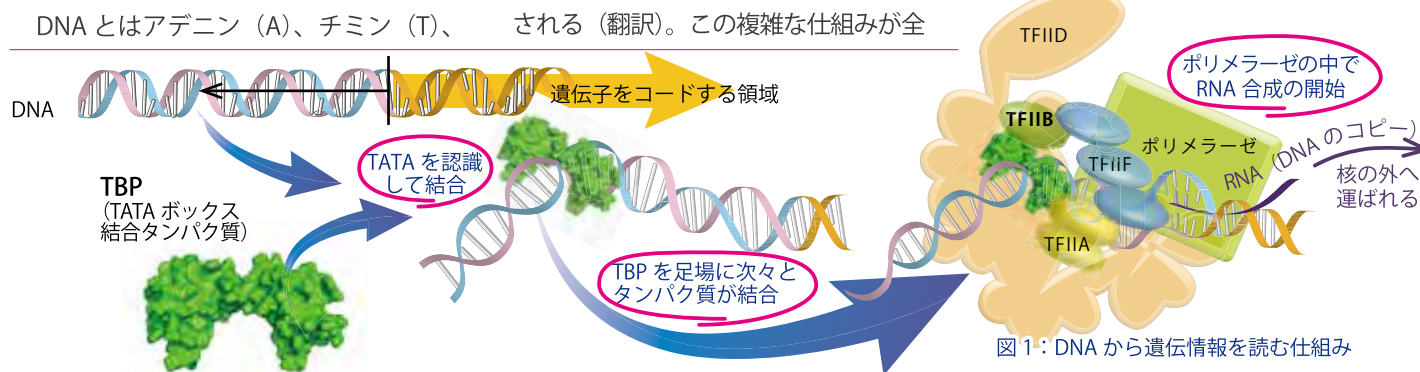
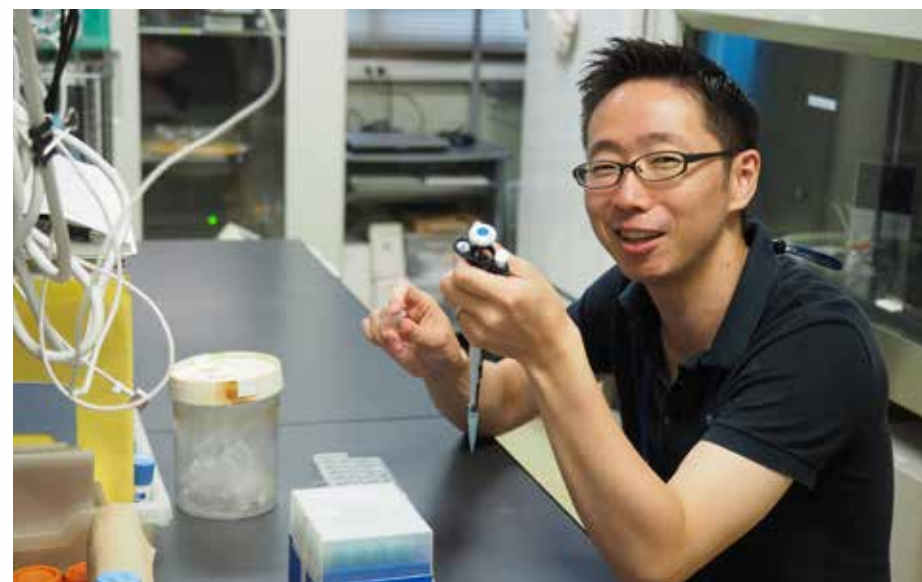


図 1: DNA から遺伝情報を読む仕組み



なかった。「こんなに重要な TBP が、真核細胞と古細菌にはあって、真正細菌にはない。TBP の祖先は何なのか？」と堀越准教授は疑問に思っていた。

学生の頃、堀越准教授に師事していた KEK 物質構造科学研究所の安達成彦特別助教は TBP の研究に着手した。「昔の生き物を調べる方法といえば、化石や凍土から発見された遺骸ですが、古細菌のような単細胞生物は化石になり難いし、DNA やタンパク質が解析できるほど良い状態で保存されていることは、ほぼありません。」と語る。古細菌は今でも深海の熱水噴出孔や塩分濃度の高い湖など、原始地球に似た特殊環境で生存している。そこで今現在生存している古細菌の TBP の立体構造を、フォトンファクトリーを利用して KEK 物構研の千田俊哉教授と共に決定（図 1 左下）。古細菌と真核細胞が持っている TBP を比較した。すると、形状や機能は同じであるにも関わらず、表面の性質が古細菌では酸性、真核細胞では塩基性と幅広いバリエーションがあることが立体構造から明らかになった。TBP の結合相手である DNA 表面は酸性のため、TBP も酸性だと反発して近づきにくく、塩基性であるほうが結合に有利となる。これらの違いは、進化の結果として生じたものであるが、

古細菌と真核細胞のどちらの TBP が祖先に近いかは、決定できなかった。

「古さ」を決める基準

古細菌という名から古い生き物という印象があるが、必ずしも祖先に近いわけではない。古いか新しいかを決めるには基準が必要であり、古細菌の TBP が真核細胞の TBP より祖先に近いと決定づける証拠は今のところなく、いわば状況証拠的に古いとされている。この問題に対し、安達特別助教が着目したのは、DNA にコードされている TBP を作る遺伝子配列の「繰り返し」部分。具体的にはこうだ。TBP の遺伝情報のある部分に「AAAAA」という配列があるとして、何かをきっかけに重複が起こる。重複コピーされた瞬間は「AAAAA - AAAAA」という全く同じ文字列が二回連続する。この状態を祖先と考える。一度重複した遺伝情報は、世代を超えて受け継がれていく。その間、ある確率で変異が起こる。すると全く同一だったものが「ATAAA - AATAT」と変化していく。重複配列の間の差異を数値化し、祖先からの変化と考える。つまり、変化量の大きいものほど、祖先から遠いと言えるのだ。この方法を用いて、古

	順位	TBP		TFIIB	
		生物種	d_{DR}	生物種	d_{DR}
1～25 位 古細菌	1位	<i>M.jannaschii</i>	0.488	<i>M.maripaludis</i>	0.784
	2位	<i>M.maripaludis</i>	0.516	<i>M.fervens</i>	0.820
	3位	<i>M.fervens</i>	0.524	<i>M.thermolithotrophicus</i>	0.828
	4位	<i>M.infernus</i>	0.524	<i>M.fulgidus</i>	0.862
	5位	<i>M.thermolithotrophicus</i>	0.560	<i>M.jannaschii</i>	0.869
26～34 位 真核細胞	...	...	...	...	...
	33位	<i>G.gallus</i> (ニワトリ)	1.19	<i>S.cerevisiae</i> (出芽酵母)	1.68
	34位	<i>C.elegans</i> (線虫)	1.22	<i>A.thaliana</i> (シロイヌナズナ)	1.95

図 2: 共通祖先から近い順のランキング (d_{DR} : distance between Direct Repeats) Scientific Reports 6, 27922 (2016)[DOI: 10.1038/srep27922]

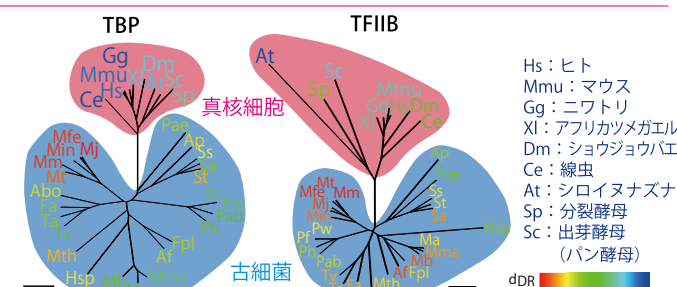


図 3: 本手法 d_{DR} により書き換えられた新しい無根系統樹 赤字ほど共通祖先に近く、青字ほど共通祖先から遠いことを示す。

細菌からヒトを含む生物 34 種の TBP の繰り返し配列を比較、ランク付けをした（図 2）。同様に転写において TBP と一緒に働くタンパク質 TFIIB についても繰り返し配列を比較した（図 3）。その結果、両者ともに古細菌の方が真核細胞より共通祖先に近く、特にメタン菌の TBP や TFIIB が共通祖先に近い性質を持つことが示された。

TBP 遺伝子を共通祖先から近い順に並べると、最初に調べた TBP 表面の性質の違いも説明できる。祖先から近い順に、TBP のアミノ酸組成を調べると、徐々に酸性から塩基性へと変化していた。DNA 表面は酸性なので、TBP は DNA との結合に不利な酸性のアミノ酸を減らしていったと考えられる。さらに 3 人で考察を進めると、DNA から遺伝情報を読むシステムが進化的に発達する過程で、TBP よりも TFIIB が先に加わったことも明らかになった。

情報を利用する仕組み

「DNA は生命の設計図です。A、T、G、C のたった 4 種類の文字で構成され、ヒト DNA は 30 億文字、データ量にすると 750MB。CD 一枚に収まってしまうくらいじゃないんです。それなのに、こうやって話をしたり、考えたり、色んなことが出来ます。それには DNA に書き込まれた限られた情報を上手に活用する方法、つまり DNA を読む仕組みに何か巧妙な仕掛けがあると思うんです。」と研究の動機を語る。安達特別助教は遺伝子発現制御の仕組みの解明を専門としている。DNA から遺伝情報を読むには、80 種類以上のタンパク質が関わっている。これらが必要に応じて集合し、仕事をしてまた解散する。今回の中心となった TBP もその一つ。「DNA の情報を活用する仕組みが解明できれば、今の情報社会の中で、例えば人工知能の性能向上にも応用できるかもしれない。」と展望を語った。（執筆・構成：餅田 円）

つなぎ、導く PReMo

タンパク質の精製や結晶化の条件探しが、構造生物学にとってボトルネックとなっている今、ビッグデータを活用することで活路を見出そうとしている。

こうしたことを狙って動き始めているのが PReMo（プレモ、Photon Factory(PF) Remote Monitoring System）。元来、PF で行われる実験の様子を外からモニターするために開発されたシステム。

PReMo は測定結果を管理するデータベースでもあり、国内外の研究者が集う PF には、膨大なデータが蓄積される。ここにビッグデータの解析が加わることで、新たな研究の形を作ろうとしている。

放射光の登場により、「生物学」は細胞を構成するタンパク質の構造から機能を理解する「構造生物学」へと発展した。タンパク質の機能を解明していくことは、生命活動のしくみを解明することであり、学術的な意義に加え、病気の解明や治療薬の開発につながるとして製薬企業の多くが放射光を使うようになった。

タンパク質結晶構造解析の一般的な流れは次の通り。①大腸菌などを利用して、目的のタンパク質を大量に作る。②タンパク質を精製、集めた溶液から結晶を作る。③放射光をあて回折データを得る。④データ解析し、立体構造を得る。創薬研究の場合、これに加え薬の元となる様々な化合物との結合などをみるため、サンプル数が膨大になる。

PF のような放射光実験施設で行われるのは③と④。実験者はとにかくたくさんのサンプルを用意して、次々とデータを取っていく。立体構造を得るには、結晶を 0.5 ～ 2 度刻みで回転させながら、半周 180 度相当のデータを撮影する。その数、一日当たり 100 ～ 300 セット。実験者にはビームタイムという放射光を利用できる時間が配分されており、時間内に出来るだけ多くのデータを取り、持ち帰ってデータを解析する。放射光実験で得られるのは、無数の回折点が記録された回折イメージ。そこから回折強度データを抽出する際の統計情報から、結晶性の良し悪しを判断し、構造解析に適したサンプルを選定する。そして回折強度データからタンパク質の電子密度分布を構成し、そこに分子構造をあてはめることで全体の立体構造を作り上げていく。

放射光ビームラインでは、実験室で使われる X 線発生装置を凌駕する性能の X 線ビームや、整備の行き届いた高性能実験装置を利用することができ、これらはタンパク質結晶構造解析を行う上で必要不可欠なものとなっている。PReMo は、PF にある全てのタンパク質結晶構造解析ビームラインに備えられ、回折実験の条件や、得られた回折イメージなどを記録しインターネット経由で世界中どこからでも閲覧可能にしている。さらに回折イメージを処理して回折強度データを得る工程も PReMo が自動で行い、統計情報から得られるデータの質までもデータベースに記録される。これは得られたデータが後の構造解析に向くものかどうかを客観的に評価する手助けになり、実験そのものを効率化させる。

結晶化の壁

構造生物学の分野では、これまでタンパク 3000 (2002 ～ 2006 年) や、ターゲットタンパク研究プログラム (2007



PReMo を開発した山田悠介助教。画面は PReMo で閲覧できる結晶化や回折データなど。

～ 2011 年) といった大きなプロジェクトが次々と進められてきた。これにより、放射光ビームラインが整備されビーム性能や実験装置が充実してきた。またそれに伴い、タンパク質の構造は次々と解かれ、研究対象が結晶化し易い単純なタンパク質から、結晶化が困難で手が付けられなかった複雑なタンパク質へと移行してきている。必然、実験の進め方も変わってきている。これまでは、X 線発生装置で結晶の質を事前にチェックして、適したものだけを放射光ビームラインに持ちこみ測定していた。複雑なタンパク質になると、結晶が微小であったり不完全であったりして X 線発生装置では全く測定することが出来ず、結晶の良し悪しから放射光で判断する必要がある。今後は、さらに遡ってサンプルが結晶化に適した均一な状態かを放射光を利用した溶液散乱で調べたり、結晶化の条件を大規模に探ることも放射光施設で行うようになって考えている。

PReMo × ビッグデータ

そこで重要となってくるのが、サンプルごとに ID を割り付けた実験データ管理。タンパク質精製の条件、結晶化のための溶液の条件、溶液散乱、結晶の状態、測定環境、どこをとっても生い立ちを辿ることができ、どの過程

にもフィードバックを正確に迅速に出来る必要がある。PReMo の本当の狙いは、データベース化による新しい研究の進め方だ。そのために、結晶化ロボットのデータベース化 (PXS-PReMo)、溶液散乱のデータベース (SAXS-PReMo) との統合に現在取り組んでいる。

「このシステムは、これからの放射光実験の屋台骨となるものです。」と語るのは、PReMo を開発、導入してきた山田悠介助教 (写真)。学生の頃から実験で PF を利用し、今ではビームライン設計からシステム構築まで手掛けている。自身が実験をしてきたからこそ、ユーザーにとって使い易い、システムが作れるのだろう。

また構造生物学研究センター長の千田俊哉教授は PReMo の展望を次のように語る。「最終的にはね、PF だけでなく、SPring-8 や他の放射光施設も合わせたデータベースにしたいんだ。そして膨大なデータから AI (人工知能) で、結晶化や測定の条件の傾向を導けるようにしたいんだよね。」個々の研究室単位で扱えるタンパク質のデータは多くても十数種類程度。PF は、そうした研究室などにより年間約 300 件利用されている。これらの知を統合的に管理、活用することで、構造生物学にブレイクスルーをもたらそうとしている。

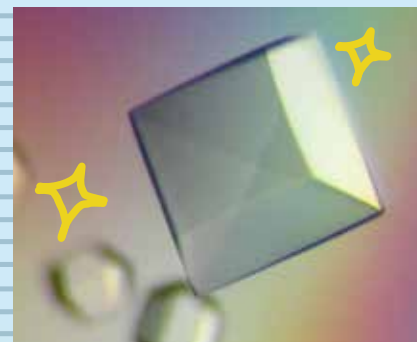
(執筆・構成 餅田円)



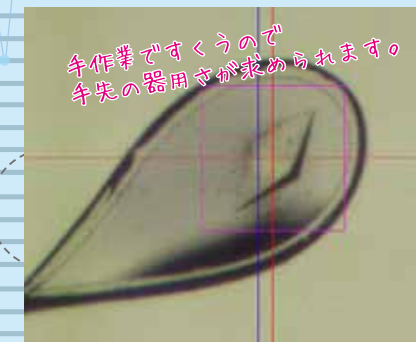
大腸菌などを利用してタンパク質を合成



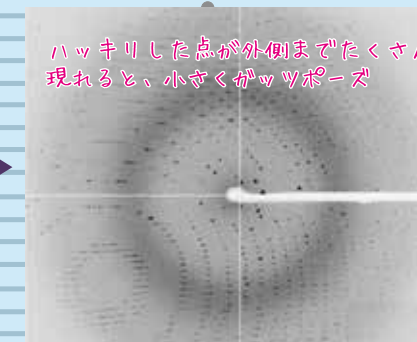
タンパク質を精製、結晶化条件を探る



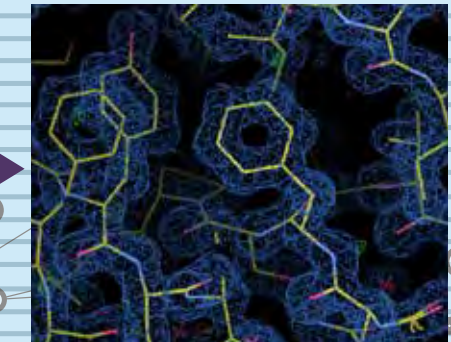
ドロップの中に結晶が出来たら、



結晶をループですくって、

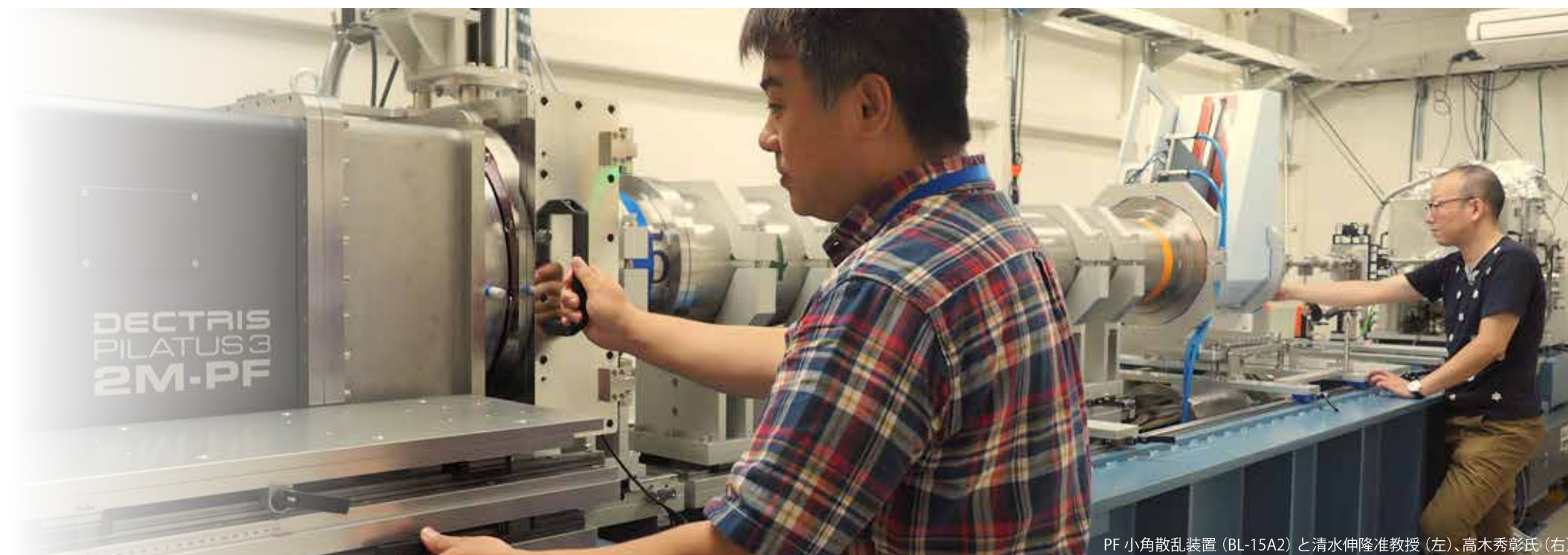


X線照射して回折データを取る。



回折データから電子密度図を構成、分子構造が分かる。

「最先端 × 使いやすさ」 を実現



PF 小角散乱装置 (BL-15A2) と清水伸隆准教授 (左)、高木秀彰氏 (右)

物質の構造は機能とリンクする。従って物質の構造を分子レベル、原子レベルで正確に理解すること、そして分子同士や分子集団間の相互作用を階層を追って理解していくことが重要である。

その中で物質中の階層構造を観る「X線小角散乱」という手法がここ数年、活気を帯びてきている。

X線小角散乱 (SAXS, Small Angle X-ray Scattering、溶液試料の場合は溶液散乱とも言う) は、その名の通り試料から散乱されるX線のうち、およそ ~ 5 度までの小さい角度領域の散乱を計測する手法のこと。散乱される角度の大きさは試料情報の細かさに反比例する。原子配列のようなオングストローム (10^{-10} m, 0.1nm) オーダーの情報は広角 (~ 30 度) に、分子や分子集団による周期構造など、数10～数100ナノメートルオーダーの情報は小角散乱の領域に散乱される (図1)。手法自体は古くからあり、DNA二重らせん構造を決めたワトソン・クリックのX線回折像 (1953年) も小角散乱像だ。フォトンファクトリー (PF) でも、設立当初の1980年代から2本

のビームラインがあり、高分子等の材料系分野や生物の分野等で幅広く利用されていた。例えば、アミノ酸が鎖状に繋がり、折りたたまることで出来るタンパク質では、その折りたたみ過程がどのように進むのか、またタンパク質同士がどのように結合しているのか (複合体) などを調べるために利用されていた。

爆発的な広がり

「一番大きな要因は、小角だけでなく高角まで広い角度範囲を一度に測定出来るようになったことです。そして、検出器と解析手法の発展ですね。」PFの小角散乱ビームラインの整備を一手に担ってきた清水伸隆准教授は振り返る。小角・高角同時測定、つまりミク

ロな原子配列とマクロな分子や分子集団の並びによる構造の変化を同時に見る。例えば温度変化によって構造が変わる場合、ミクロな構造とマクロな構造のどちらが先に変化するか、何がきっかけとなって変化が起こるか、という階層をまたいだ構造変化を一度に追うことが出来る。国内ではSPring-8やPFのBL-9Cで2000年代中頃より小角・高角同時測定が実用化されている。もともと小角散乱の検出器には、国内ではレントゲン写真などにも使われているイメージングプレート (IP) とカメラなどにも用いられるCCDイメージセンサが主に利用されてきた。IPは弱いシグナルから強いシグナルまで幅広く (5桁以上) 検出できるが、読み出し時間がかかるという弱点が

あった。一方、CCDイメージセンサは読み出しが速いものの、検出できるシグナルの幅が4桁程度と狭い。ビーム中心周辺の小角領域から広い角度範囲を計測するとX線強度は数カウント/秒から10万カウント/秒まで6桁にわたり変化することもある。このような広範囲を歪みなく、高速で検出することが必要だった。転機となったのは、スイスのポールシェラー研究所 (PSI) が開発した大面積ピクセル型検出器 PILATUS の登場。2010年頃から世界の放射光施設の小角散乱ビームラインに次々に導入され、小角・広角の2台、さらには中角も含めた3台による同時測定系も整備された。特に材料系分野では標準装備となっている。また生物分野では、2000年頃に溶液散乱曲線から分子概形を推定する解析ソフトウェアが公開され、原子レベルの構造が得られる結晶構造解析と溶液散乱を組み合わせた解析が行なわれるようになった。これらが生物分野、材料系分野からの利用を押し上げ、世界的に爆発的な増加となった。

世界と戦える研究環境を

一方、国内ではどうだろう。材料系分野では同様に増加したものの、生物系のユーザーは減少の一途をたどっていた。主な原因は2つ。1つは生物分野の測定に対応した最新の測定装置が整備されなかったこと。もう1つは、

それをリードする研究者が施設側から居なくなってしまったこと。こういった状況から清水准教授は、世界と戦える装置を備えたビームラインと、新しいユーザーを支援する研究環境を整えるために、五十嵐教之准教授、森丈晴専門技師、大田浩正氏 (三菱電機 SC) と共に PF 内の各所と協力して小角散乱ビームラインの高度化を進めてきた。

「最も重要なのは実験するユーザーにとって使い易いことです。セットアップ～測定～解析まで全てユーザーフレンドリーであることを目指しています。」ビームや装置のセットアップ、測定・解析、データの持ち帰り、それらがストレスなく簡便に行えること。かつては装置のセッティングはもちろん、サンプルを作る人、それを試料ホルダーに詰める人、データを取る人、と実験には多くの時間と人手が必要だった。それを劇的に改善し、装置というハードと運用するソフトを繋げた。これは自らビームライン設計も装置を利用する実験も、両方行う清水准教授だからこそ実現できた、まさに痒い所に手が届いた設計。そしてそれを実現させた永谷康子氏ら技術職員。PFにはビームライン制御のためのスタッフがあり、ソフト開発、プログラム制御などを専門的に行う。彼らの強力なサポートあっての実現であったと清水准教授は語る。単に装置が新しくなるだけでなく、使い勝手の良い更新は鮮烈だった。

次なるステージ

設備や使いやすさを充実させた今、次はそこで展開される研究支援の段階に移っている。現在、高分子を中心とした材料系分野は高木秀彰氏、タンパク質の溶液散乱には西條慎也特任助教が中心となってユーザーサポートをしている。加えて、両氏共に自ら最新の設備を利用した最先端の研究も行なっている。高木氏の開発した新たな測定手法や、それによる利用分野の開拓は、平成27年度繊維学会奨励賞を受賞するなど実績が認められている。

また、解析を支えるソフトウェアの開発も進められている。研究支援員の谷田部景子氏と高橋正剛氏は、初心者でも使いやすいソフトウェア開発を清水准教授と共に進めている。

これらの結果は徐々に表れ始めている。停滞気味だった利用課題の申請数も2011年から2016年で1.5倍。中でもタンパク質分野からの課題は2.5倍と人の流入が顕著、小角散乱初心者や企業の利用も増えている。この様な広がりを見て、清水准教授は「これから2つの分野が両輪で進むことが大切です。小角散乱のデータって、タンパクの人、材料の人、お互いに何となく分かんんです。だからサイエンスの分野で切り分けることなく、連携しながら一緒に発展していけたらいいな、と思っています。」と語る。

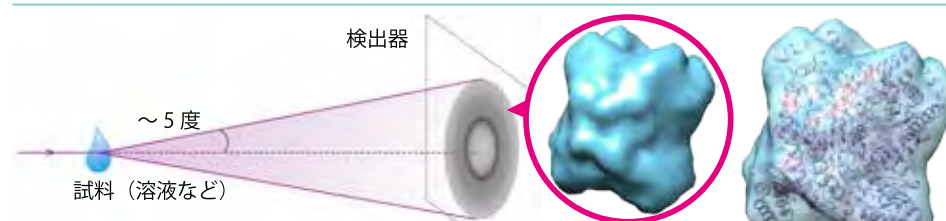


図1A：小角散乱の模式図
小角領域に散乱像が現れる。分子全体や表面の概形、分子同士が作る周期性などが分かる。

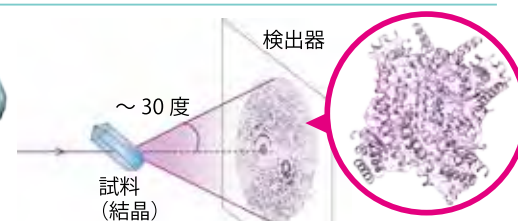
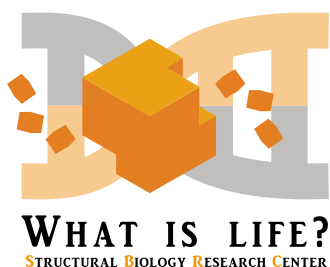


図1B：結晶構造解析の模式図
回折点が広範囲に現れ、オングストロームオーダーで精緻に原子配置を決定できる。



【お問い合わせ】



高エネルギー加速器研究機構
物質構造科学研究所 構造生物学研究センター
〒305-0801 茨城県つくば市大穂 1-1
TEL : 029-879-6178 FAX : 029-879-6179

センター長：千田 俊哉（物質構造科学研究所 教授）
研究分野：生物科学・構造生物化学・X線結晶構造解析
E-Mail : toshiya.senda@kek.jp

【アクセス】



- ☐ つくばエクスプレス
つくば駅下車 隣接のつくばセンターから
路線バス（所要時間約 20 分）高エネルギー加速器研究機構 下車
タクシー（約 9 km）
- ☐ 常磐道
桜土浦 IC または谷田部 IC から（所要時間約 30 分）
- ☐ 圏央道
つくば中央 IC から（所要時間約 20 分）

2017.9



編集：物構研 広報委員会
(山田 和芳(委員長)、足立 伸一、安達 成彦、阿部 仁、岩野 薫、宇佐美 徳子、大島 寛子、木村 正雄、小嶋 健児、瀬谷 智洋、伴 弘司、深堀 協子、山田 悟史)

発行：高エネルギー加速器研究機構 物質構造科学研究所
〒305-0801 茨城県つくば市大穂 1-1 <https://www2.kek.jp/imss/>
TEL: 029-864-5602 e-mail: imss-pr@ml.post.kek.jp

禁無断転載 ©All rights reserved by High Energy Accelerator Research Organization (KEK)

