

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

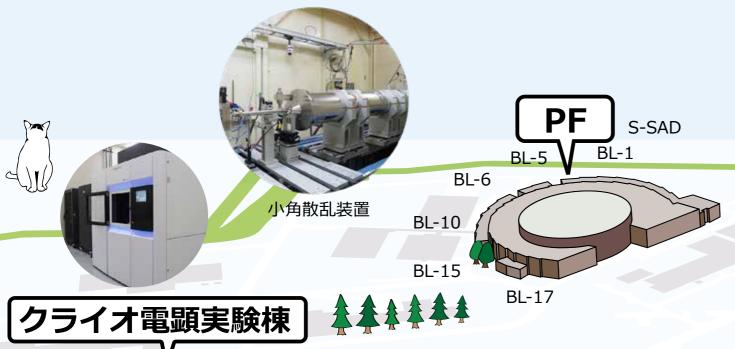




## 構造生物学研究センター関連施設

高エネルギー加速器研究機構 つくばキャンパス

●「最先端×使いやすさ」を実現 ... 14





## 構造生物実験準備棟

大量培養 大量精製

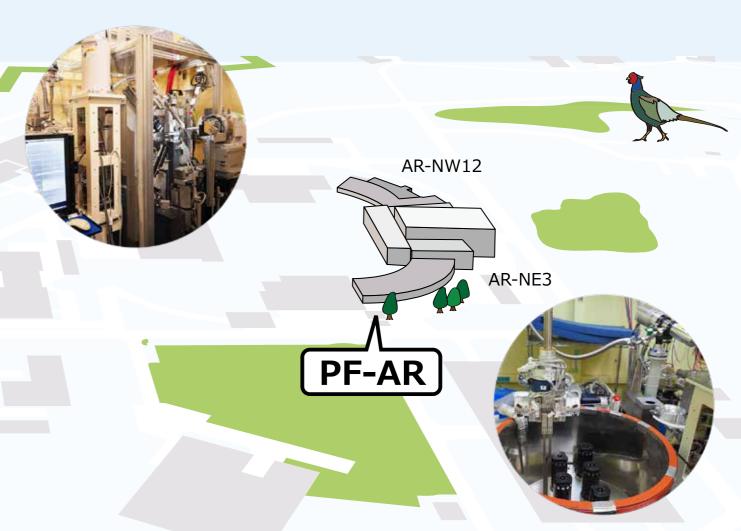
低温室 自動結晶化ロボット





- 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

● つなぎ、導く PReMo ... 12



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)、アドバンストリング(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。



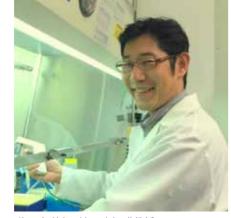
がん。長年日本人の死因トップに位置し、今やがんになる確率は日本人の2人に1人とも言われている。がんに侵され、みるみる細くなっていく人の姿を目にしたことのある人もいるだろう。その理由は様々だが、正常な生命活動に必要なタンパク質の生産より、がん細胞の増殖にエネルギーが使われてしまうためと考えられている。

#### 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の重要性は見過ごされてきた。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ボー公子である ATD (アデバンスコン

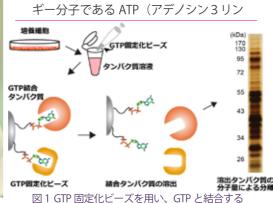


図  $\Gamma$  GIP  $\Box$  E化ヒー人を用い、GIP  $\zeta$  と結合 g る タンパク質を細胞内から探索、PISP4K  $\beta$  を発見。

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。

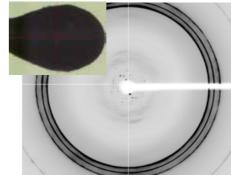
#### 人と人との出会い

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、PI5P4Kβ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 B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  $\beta$ 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 B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!!」



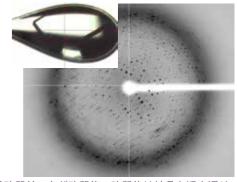


図2 PI5P4K βの結晶と X 線回折像。左が結晶改質前、右が改質後。改質後は結晶も透き通り、 広範囲に回折点が出現しているのが分かる。

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、窒素の冷気(約 - 180℃)で冷やしながら測定する。竹内氏が目にした「毛」というのは、冷気によって結晶にできた霜だった(図 2 左)。結晶というと鉱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。

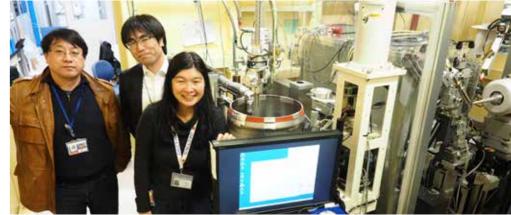
一方、色々な結晶を長年見てきてい た千田(美)氏は「結晶化しているの だから、絶対に回折像が見えるように なる。」と確信に近い思いを抱いてい た。その頃、千田(美)氏は結晶改質 の技術開発に取り組み、いくつか成功 していたのだ。竹内氏の作った結晶 は、触っただけで崩れてしまうものも 多く、このままではいくら時間をかけ ても十分な回折像を見ることは出来な いと考えていた。同時に改質方法のア イディアも持っていた。それは、結晶 冷却時に用いる約20種類の試薬候補 の中から PI5P4K β結晶に適したもの をいくつか選び出し、複数の試薬を組 み合わせて使う方法である。考えた通 り、1つめの試薬に結晶を浸けた後で 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  $\beta$  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  $\beta$ 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 PI5P4Kβ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: \$1097-2765(15)00945-4. doi: 10.1016/j.molcel.2015.12.011.



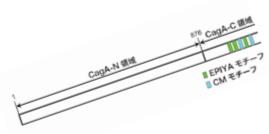
左から:千田俊哉 教授、竹内恒(こう)主任研究員、千田美紀 特任助教。 実験を行ったフォトンファクトリー RI-17A にて 物

## 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、それらの機能を撹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:產業技術総合研究所 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 通っ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 胞膜の内面に結合する。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 を撹乱し、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 CaqA の立体構造を調べた。

"Tertiary Structure-Function Analysis Reveals the Pathogenic Signaling Potentiation Mechanism of Helicobacter pylori Oncogenic Effector CagA Cell Host & Microbe, DOI: 10.1016/i.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/

#### 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。そこで千田氏らは、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

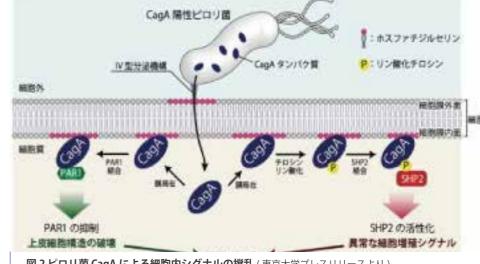


図 2 ピロリ菌 CagA による細胞内シグナルの撹乱 (東京大学プレスリリースより)

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 CaqA 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。

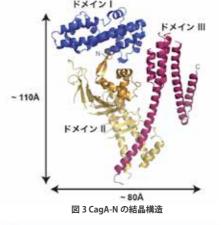
結合するため、一般的に細胞内の情報 伝達に重要な働きをすると考えられて いる。実際 CagA でも、細胞極性を制 御する PAR1 と結合する CM モチーフ、 細胞の分裂・増殖を制御する SHP2 と 結合する EPIYA モチーフはこの天然 変性領域にある(図1)。この領域を詳 しく調べていくと、その一部が決まっ た構造を持つ CagA-N 領域の一部と相 互作用をすることで、投げ縄状のルー プが形成されることが明らかになった (図5)。この投げ縄状の構造が形成さ れると、CagAとPAR1やSHP2との 間で形成される複合体が安定化し、よ り強いがん化シグナルが生成されるこ とが明らかに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

図 3~6 提供: 産業技術総合研究所 千田俊哉

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 の放射光は無くてはならない必要不可 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。



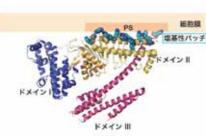


図 4 CagA と細胞膜の相互作用

90け原標店 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

物構研 News 2012 Autumn



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。

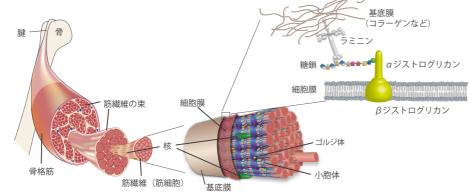


図1 筋肉の構造:筋肉は繊維状の束が伸縮することで動く。筋細胞の細胞膜にジストログリカン というタンパク質があり、糖鎖、ラミニンを介して細胞外の基底膜と結合している。

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

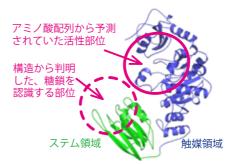


図2 POMGnT1 の立体構造

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。

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 \*<sup>2</sup>。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。加藤さんら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)

遠藤副所長は神戸大学の戸田達史教

\*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

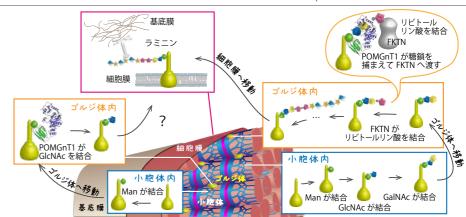


図3 ジストログリカンに出来る糖鎖の経路:ジストログリカンは、糖鎖修飾を受けながら小胞 体、ゴルジ体を経由し細胞膜へ移動する。左側が遠藤氏らの発見した糖鎖の経路で Man-GlcNAc (●■)ができる。この経路はラミニンと結合する糖鎖にはならない。右側がラミニンと結合す る糖鎖の経路で、FKTN がリビトールリン酸 ( ♠ • ) を結合させる際に POMGnT1 が FKTN に橋 渡ししていることが判明した。

物構研 News 2016 Autumn



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。直接見ることの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。

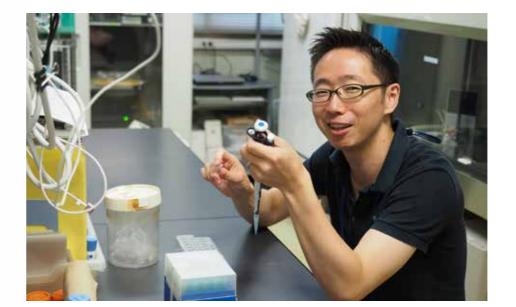
核を持ったことで DNA はより長く、 複雑な情報を安定して保存できるよう になったようだ。この時一緒に発達 したのが、DNA の情報を読む仕組み。 DNA とはアデニン(A)、チミン(T)、 シトシン(C)、グアニン(G)の4種類の塩基が鎖状につながってできた、生きるための機能全ての設計図となる重要な物質。DNAの中には遺伝子の情報が書いてあり、その25文字上流にTATAという順で塩基が並んでいる箇所がある(図1)。遺伝子の情報を読む時には、まずTATAという配列にTBP(TATAボックス結合タンパク質)が結合する。そしてTBPを足場として次々とタンパク質が結合し、DNAの一部がコピー(RNA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 の発見が相次いだが、真 正細菌(バクテリア)にだけは存在し





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 - AATAA」に、さらに時間が 経つと「ATATA - 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

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 いしかないんです。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)

		ТВР		TFIIB	
	順位	生物種	<b>d</b> DR	生物種	<b>d</b> DR
1~25位 古細菌 <b>【</b>	1位	M.jannaschii	0.488	M.maripaludis	0.784
	2位	M.maripaludis	0.516	M.fervens	0.820
	3位	M.fervens	0.524	M.thermolithotrophicus	0.828
	4位	M.infernus	0.524	M.fulgidus	0.862
	5位	M.thermolithotrophicus	0.560	M.jannaschii	0.869
26~34位 { 真核細胞	•••	•••	•••	•••	•••
	33位	G.gallus(ニワトリ)	1.19	S.cerevisiae(出芽酵母)	1.68
	34位	C.elegans (線虫)	1.22	A.thaliana (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<sub>DR</sub>: distance between Direct Repeats)

Scientific Reports 6, 27922 (2016)[DOI: 10.1038/srep27922]

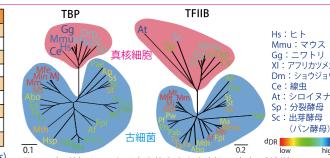
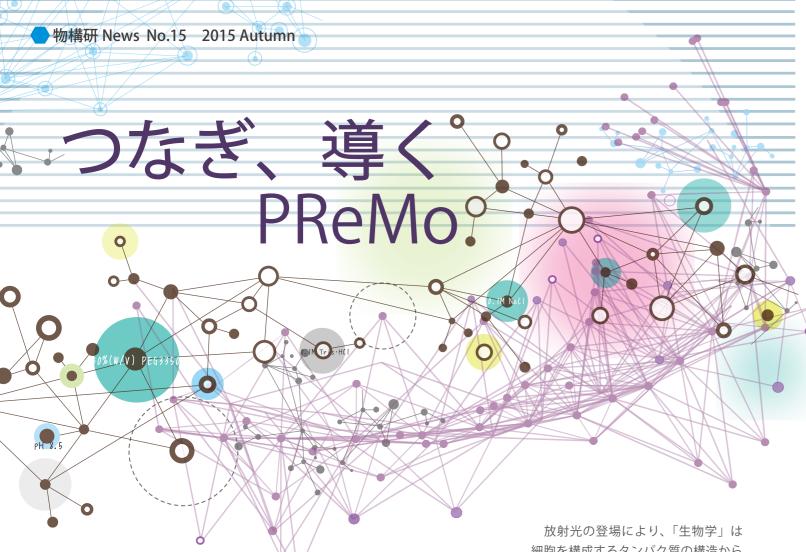


図3:本手法 $d_{DR}$ により書き換えられた新しい無根系統樹赤字ほど共通祖先に近く、青字ほど共通祖先から遠いことを示す。



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。

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 行うようになると考えている。

#### 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 だけじゃな くて、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 A.I.(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)

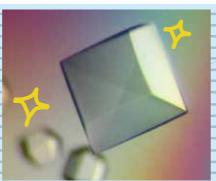


大腸菌などを利用してタンパク質を合成

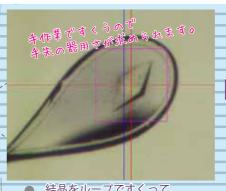
12



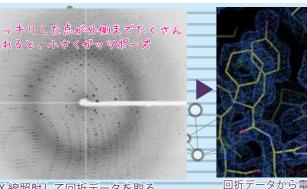
タンパク質を精製、結晶化条件を探る



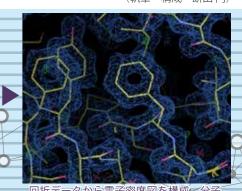
ドロップの中に結晶が出来たら、、、



■ 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構造が分かる。

物構研 News 2015 Autumn

# 最先端 使いやすさ」 を実現



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、高速で検出でき

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

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  $(10^{-10} \text{m}, 0.1 \text{nm})$  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上 がるタンパク質では、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降准教授は振り返 る。小角・高角同時測定、つまりミク

口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

試料 図1B:結晶構造解析の模式図

ダーで精緻に原子配置を決定できる。

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

### 世界と戦える研究環境を

に爆発的な増加となった。

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おり、 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 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 分かるんです。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 思ってます。」と語る。

検出器 ~5度 試料 (溶液など) 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。

回折点が広範囲に現れ、オングストロームオー

物構研 News 2016 Summer



#### 【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

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9km)
- □ 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)



2022.05



編集:物質構造科学研究所 広報室

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 TEL: 029-864-5602 https://www2.kek.jp/imss/ e-mail: imss-pr@ml.post.kek.jp 禁無断転載 ©All rights reserved by High Energy Accelerator Reseach Organization ( KEK )