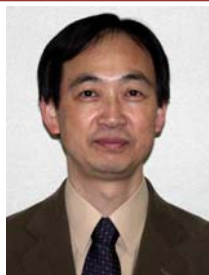


【特別推進研究】

生物系



研究課題名 薬剤開発を視野に入れた膜輸送体の構造研究

東京大学・分子細胞生物学研究所・教授

とよしま ちかし
豊島 近

研究分野：生物学

キーワード：イオンポンプ、膜蛋白質、結晶解析、エネルギー変換

【研究の背景・目的】

本研究の目的は、第一に、イオン能動輸送機構を完全に理解することである。第二に、高等動物細胞を含む大量発現系を用いて、マラリア原虫や結核菌など、人類の脅威となっている生物の膜輸送体を大量生産してその構造を決定し、薬剤開発への道をつけることである。

我々はこれまで筋小胞体カルシウムポンプ (Ca^{2+} -ATPase) に関しては反応サイクルほぼ全体をカバーする9つの状態の、また、医学的にはより重要ともいえる Na^+ , K^+ -ATPase では2つの状態の結晶構造を決定し、能動輸送のメカニズムの大略を原子構造に基づいて明らかにした。この研究は、イオンポンプをはるかに超えた広い領域に多大なインパクトを与えた。しかし、「どうしてそういう構造でなければならないのか」、「ATPの化学エネルギーはどう使われているのか」という本質的問いに対する正面からのアプローチは出来ていない。原子構造と熱力学を結びつけることが必要であるが、大きすぎる課題でもある。本研究では筋小胞体カルシウムポンプと腎臓のナトリウムポンプを主な対象とし、変異体の構造解析や熱測定等を通じてこの問いにアプローチしたい。

イオンポンプの構造解析の過程で、ポンプ蛋白質の阻害剤に関する知識は著しく深まった。ポンプ蛋白質は生体の恒常性の維持に本質的な役割を果たすため、疾病に関わるものは多くないにしても、病原菌を殺すためには優れた標的でありえる。実際、結核菌には多くのポンプ蛋白質があり、マラリア原虫のポンプに対する薬剤が開発されている。我々は独自の結晶化技術を持っているのであるから、病原菌の輸送体の構造研究を通して、薬剤開発にも貢献したい。

【研究の方法】

基本と成るものはX線結晶解析である。本プロジェクトでは変異体の構造解析が重要となるため、大きな膜蛋白質の組替え体の大量生産が必須となる。そのためにアデノウイルス・COS1細胞による発現系を確立した。また、エネルギー変換機構の理解のためには、熱測定や rapid quenching による部分反応の速度論的測定を系統的に行う必要がある。分子動力学計算も重要な手段となる。

【期待される成果と意義】

(a) 筋小胞体 Ca^{2+} -ATPase (SERCA1a) の残された中間状態と変異体の高分解能構造決定：まだ構造決定されていない中間状態で特に重要なものは $\text{E1}(\text{Ca}^{2+}$ 無し) である。これによって、「 Ca^{2+} 結合による磷酸化反応の活性化シグナルとは何であるか」が明らかになる。変異体構造で特に重要なものは、 Ca^{2+} 通路のゲートである Glu309 の変異体である。これによって、最初の Ca^{2+} 結合によって引き起こされる構造変化の実態が明らかになる。この二つの構造が明らかになると、ポンプサイクルの構造的記述はほぼ完成といえる。

(b) Na^+ , K^+ -ATPase の反応中間体の構造決定と薬剤や他の蛋白質・ペプチドとの複合体の構造決定：E2K状態と E1~P状態の構造決定のほかに、強心配糖体や他の蛋白質との複合体の構造決定を計画している。 Na^+ , K^+ -ATPase は単なるポンプではなく Src キナーゼや IP3 受容体などと巨大な信号複合体を作り、癌などにも深く関わると考えられているからである。

(c) マラリア原虫の P 型 ATPase の大量生産と構造決定：PfATP4 と PfATP6 はマラリア原虫のイオンポンプであり、薬剤の標的ともなっている。このポンプを大量生産し、生化学的測定と構造決定を行う。同時に、結核菌の膜輸送体をも研究対象とする。成功すれば、より有効な薬剤開発への大きな貢献が可能になる。

【当該研究課題と関連の深い論文・著書】

T. Shinoda, H. Ogawa, F. Cornelius and C. Toyoshima: Crystal structure of the sodium-potassium pump at 2.4 Å resolution. *Nature* **459**, 446-450 (2009)

C. Toyoshima, Y. Norimatsu, S. Iwasawa, T. Tsuda and H. Ogawa: How processing of aspartylphosphate is coupled to luminal gating of the ion pathway in the calcium pump. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. **104**, 19831-19836 (2007)

【研究期間と研究経費】

平成23年度－27年度

399,600千円

【ホームページ等】

<http://www.iam.u-tokyo.ac.jp/StrBiol/index.html>