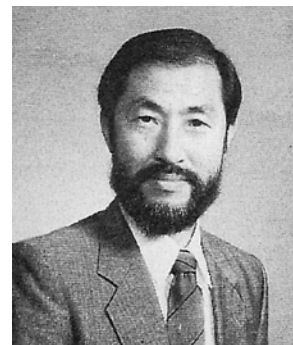


Structural Study of Molecular Interaction in Living Organisms 生体分子間相互作用の構造生物学的研究

プロジェクトリーダー 藤 吉 好 則

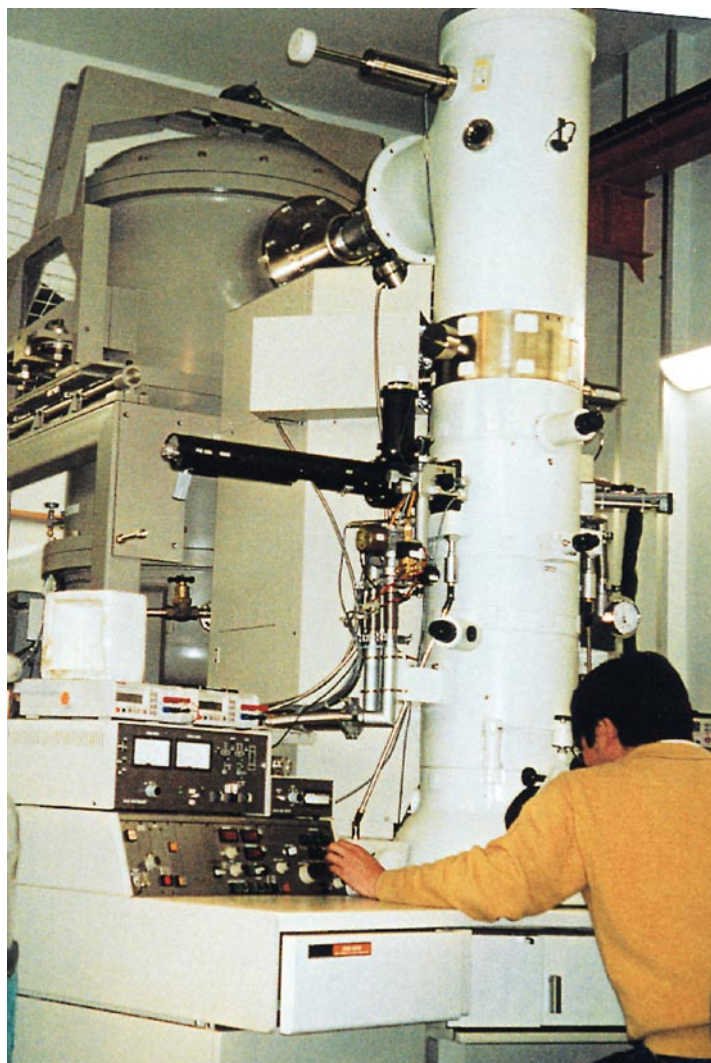
京都大学 大学院理学研究科 教授



1. 研究の目的

個々の細胞のみならず、感覚器や神経系等の複雑な生体機能の中心的担い手は蛋白質である。多くの蛋白質分子は、他の蛋白質・核酸等の生体高分子や、リガンド・基質・金属・補欠分子等の小分子と相互作用することによって、複雑な機能を担っている。G蛋白質共役型受容体の情報増幅システムは、成熟した固体においては無論のこと、発生や分化の過程も含む広い生命現象において、数々の重要な働きをしていることが示唆されてきている。しかも、これらは単一の蛋白質によって担われているのではなく、複数の蛋白質が複合的に相互作用することで機能している。したがって、蛋白質が関与する生体反応の分子機構を解明し、その機能調節やそれらの分子間の相互作用を原子レベルで議論する事は焦眉の課題であり、そのためには、蛋白質分子やその複合体の立体構造に立脚した構造生物学が不可欠である。

本研究は、電子線結晶学を用いて、膜蛋白質を含む蛋白質複合体の構造解析を行う事を目的としている。ここでは、種々の生体分子間の相互作用を分子論的に理解し、その構造・機能相関の解明に挑むと共に、生体情報伝達機構の解明を目指して、受容体やイオンチャネル等の重要な膜蛋白質の構造解析と機能調節機構の解明を行う。これらの構造解析と機能調節機構の研究は、ドラッグデザイン等の応用が期待されているのみならず、生命科学の詳細を理解し、その機構を応用するために欠かすことのできない基礎研究分野である。



本プロジェクトで開発中の極低温高分解能電子顕微鏡

2. 研究の内容

膜蛋白質は、情報伝達、イオンや物質の輸送、エネルギー変換等の多様な役割を担っており、生物学的に重要な分子であることが知られてきている。(例えば、ヒトエンドセリン受容体、PACAP 受容体やオピオイド受容体等は G 蛋白質に共役しており、細胞のシグナル伝達機構の最初の段階で重要な役割を担っている。一次構造が知られているものだけでも2000を超える普遍性の高い受容体のスーパーファミリーを形成している。)生体において重要な機構を担っているこのような膜蛋白質の構造研究は、現段階では、容易ではない。この膜蛋白質やその複合体を解析する手法として、電子線結晶学の発展が期待されている。独自に開発した極低温高分解能電子顕微鏡を用いて高い分解能での構造解析を行うことにより、膜蛋白質を中心とする複合体の機能を研究する。具体的には、

- ・水分子だけを選択的に透過する水チャネルのアクアポリン、
- ・光のエネルギーを使ってプロトンポンピングするバクテリオロドプシン、
- ・シナプスにおけるイオン透過を制御しているニコチンアセチルコリン受容体、そして
- ・血圧などの調節を行うエンドセリン受容体等とそれらの蛋白質複合体の機能を研究する。

電子線結晶学を用いた膜蛋白質の高分解能の立体構造解析には、右に示すように大きく分けて4つのステップがある。

・ 目的蛋白質の大量発現と精製

膜蛋白質は生体中で重要な働きをしているが、天然には微量にしか存在しない場合が多い。この量が少ないことが膜蛋白質の構造研究にとって、大きな困難の一つであり、さらに、大腸菌などを使って活性のある状態で膜蛋白質を大量に発現することが出来ないこともこの研究を困難なものにしている。このような問題を克服するために、目的とする膜蛋白質の遺伝子を組み込んだ大量発現系とその精製法とを確立しなければならない。その方法の一つとして、目的蛋白質の DNA を組み込んだウィルス (baculovirus) を昆虫細胞 (Sf9 cell) に感染させることにより大量に発現させ、アフィニティカラムなどを開発することにより精製する。

・ 脂質膜内での結晶化

現在、電子線結晶学における最大の律速段階は膜蛋白質の脂質膜内での結晶化(二次元結晶化)であり、このための新しい方法の開発を含めた集中的研究が必要である。

・ 極低温電子顕微鏡を用いた立体構造解析

我々は世界最高の低温電子顕微鏡を開発しており、データの収集システムは、世界のトップに立っている(現在、世界各国から我々のところにデータを収集するために多くの研究者が来ている)。また、英国・ケンブリッジ MRC 研究所の Henderson 等が開発した構造解析用コンピュータシステムを改良して、解析スピードでも世界のトップに立った。

以上のシステムを用いて、具体的には

・ 上記の膜蛋白質とその複合体の構造と機能の詳細を解明する。

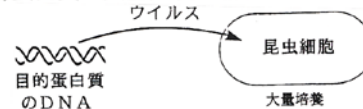
3. 研究の体制等

期 間：1996 年 10 月～2001 年 3 月

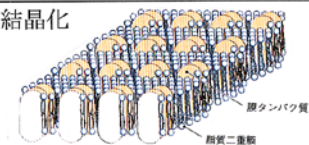
構 成：プロジェクトリーダー 1 名、コアメンバー 2 名、研究協力者 5 名ほか研究室に所属する大学院生多数がこの研究に参加している。

実施場所：京都大学大学院理学研究科藤吉研究室を中心に、京都大学大学院薬学研究科佐藤研究室が緊密な連絡を取ってプロジェクトを進めている。

① 目的蛋白質の大量発現と精製

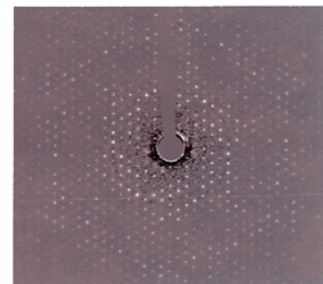


② 脂質膜内での結晶化



③ 極低温電子顕微鏡を用いた立体構造解析

独自に開発した世界最高の低温電子顕微鏡を用いた最高分解能の構造解析



バクテリオロドプシンの電子線回折像

膜蛋白質等の複雑な生体高分子の

新しい立体構造解析法の確立

④ 細胞膜の複雑な構造と機能の詳細解明

