慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

| | |
|---|---|
| Title | 第10回慶應医学賞授賞式・受賞記念講演会・受賞記念シンポジウム |
| Sub Title | |
| Author | |
| Publisher | 慶應医学会 |
| Publication year | 2006 |
| Jtitle | 慶應医学 (Journal of the Keio Medical Society). Vol.83, No.1 (2006. 3) ,p.47- 51 |
| JaLC DOI | |
| Abstract | |
| Notes | 学会展望 |
| Genre | Journal Article |
| URL | https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN00069296-20060300-0047 |

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

## 学会展望

# 第10回慶應医学賞授賞式・受賞記念講演会・受賞記念シンポジウム

◇授賞式・受賞記念講演会

日　時　　平成17年12月6日（木）16時30分～18時

場　所　　慶應義塾大学信濃町キャンパス（医学部）
　　北里記念医学図書館2階北里講堂

◇受賞記念シンポジウム

「かたちのちから－構造生物学は医学に何をもたらすか？」

日　時　　平成17年12月7日（金）13時～

場　所　　慶應義塾大学信濃町キャンパス（医学部）
　　病院新棟11階大会議室

座　長　末松　誠，岡野　栄之，柚崎　通介（慶應義塾大学医学部）

13：05～「NMRを用いた，膜タンパク質・リガンド相互作用解析」
　　嶋田　一夫（東京大学大学院薬学系研究科）

13：45～「蛋白質立体構造データベースの国際化・高度化とその応用」
　　中村　春木（大阪大学蛋白質研究所）

14：25～「変異体を用いたウシチトクロム酸化酵素のプロトンポンプ機構の研究」
　　下方　国稔（慶應義塾大学医学部医化学）

15：00～「ドライアイとアクアポリン」
　　後藤　英樹（慶應義塾大学医学部眼科学）

15：20～「神経伝達物質輸送の構造基盤：$Na^+/Cl^-$依存性神経伝達物質トランスポーターの細菌由来ホモログの結晶構造」
　　山下　敦子（理化学研究所播磨研究所）

16：00～「膜タンパク質X線結晶構造解析の将来」
　　岩田　想（インペリアルカレッジロンドン）

16：40～「アクアポリン水チャンネルと病気」
　　佐々木　成（東京医科歯科大学大学病院医歯学総合研究所）

17：35～「構造生理学の登場とその展望」
　　藤吉　好則（京都大学大学院理学研究科）
　　第10回慶應医学賞受賞者

## 構造生理学の現状と展望

京都大学大学院理学研究科　藤吉　好則

### はじめに

生理学はここで改めて確認する必要はないであろうが，Physiology のラテン語の意味として，*physis* = Nature, *logos* = word と言う意味を内包している．それゆえ，構造生理学という言葉は，「分子構造レベルから生命を論理的に理解する学問」という気持ちで，勝手に使い始めた造語である．この構造生理学が実質的な意味を持つようになってきたのは，R．マッキノンによるところが大きい．彼は，2003年に水チャネルの発見とその構造と機能の解明でノーベル化学賞を受賞したP．アグレ博士と共にノーベル賞を受賞したのみならず，生理学の分野を大きく変えつつあると思う．

私どもは，試料を低温に冷却することによって電子線損傷を最少に押さえることができる極低温電子顕微鏡等の構造研究システムを開発してきた[1)2)]．これは，神経細胞の情報伝達や制御に関する分子的基礎原理を理解すること，そして将来的には記憶や意識，個性等を分子レベルで理解することを目指した技術や手法の開発を目指している．電子線結晶学は，これらの研究で鍵となる膜蛋白質の構造を膜に存在する状態で解析する事ができる．さらに，結晶性の試料でなくても立体構造の情報を得ることができるので，生理学を構造学的な視点から研究し，理解するには有力な手法であると思っている．

近年，極低温電子顕微鏡を用いた膜蛋白質の構造研究はそれなりに進んできた．典型的な例として，図1に水チャネルの構造を示すが，この解析で，このチャネルが1秒間に20億分子もの水を高速で透過しながら，いかなるイオンもプロトンさえも透過しない高い選択性を示す機構が解明された[3)]．また，アセチルコリン受容体の構造解析によって，神経筋接合部で行われる情報伝達の機構の1部分，アセチルコリンによって，このイオンチャネルが開閉される分子機構が解明された[4)]．

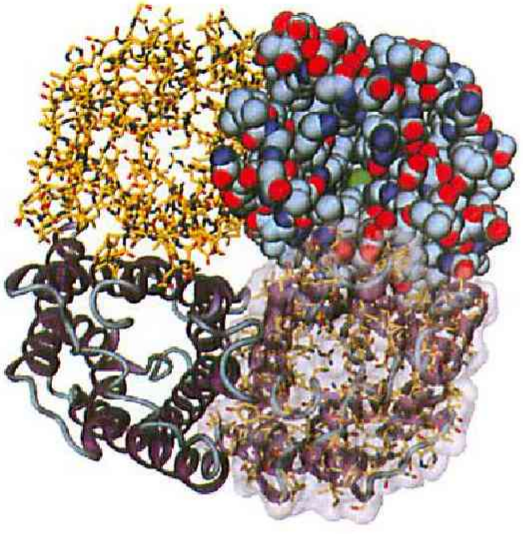

図1　電子線結晶学で解析された水チャネルの4量体の構造

### 水チャネルの構造と機能

水の選択的膜透過はイオンチャネルの機能発現のための基礎となっている．1992年にヒト赤血球から水チャネルが発見されて[5)]以来，ヒトでも13種類の水チャネルが知られる様になった．これらの内，AQP4 は AQP1 と同様，水のみを透過する水チャネルである．この水チャネルは，脳に発現しており，脳浮腫などに関与する重要な分子である．さらに重要な事に，未知の脳機能と関わっている可能性がある．実際，脳内毛細血管を取り巻いている星状膠細胞の終末足には，アレイ構造（orthogonal array）という特殊な結晶状格子が見られるが，この結晶性アレイは水チャネル AQP4 が周期的に配列したものであることが分かっている．また，浸透圧や，グルコースおよび温度センサーの機能を担うと考えられている視床下部のグリア細胞層にも，多くの AQP4 が発現している．我々は，AQP4 の2次元結晶と極低温電子顕微鏡を用いて，AQP4 の立体構造を 3.2Å 分解能で解明した[6)]．この2次元結晶は，二層の膜からなる特殊な結晶で，しかも，二層の相互作用が弱いために，2枚の結晶のずれが生じたものが30%程度も存在する．このずれた結晶を解析から除くために，同じ結晶から，電子線回折像と電子顕微鏡像を撮影する必要があった．独自に開発した極低温電子顕微鏡と新たに開発した試料作製法を用いることによって，この様な困難なデータ収集にも成功した．この構造から2次元結晶の分子のパッキングは，終末足で見られる格子状構造のものと同じであることを示唆する結果が得られ，そのアレイ構造の大きさを制御する機構のモデルも得られた．さらに，結晶の二層間の特異的な相互作用から，グリア細胞層で発現する AQP4 が接着分子として機能していることが新たに示唆された．

### おわりに

上記の様な構造研究が進んでも，脳組織や神経細胞の研究と構造生物学研究の間をうめる上で必須な，高次細胞機能構造体を分子レベルで議論できる立体的な構造観察技術は欠落していると思われる．また，これら神経細胞の機能は，細胞の動的な形態変化と密接に結びついているので，細胞の動的な形態変化を観察する新しい技術の開発が望まれている．それゆえ，細胞や組織の構造を分子レベルで議論できる極低温電子顕微鏡を用いた高分解能の立体構造観察法が，電子線トモグラフィーの発展と共に重要になってきている．そのために，傾斜機構を持った極低温電子顕微鏡を新たに開発している．今後も構造生理学とも言えるであろう研究分野に少しでも貢献したいと願っている．

文　献

1) Y. Fujiyoshi et al.; *Ultramicroscopy* **38**, 241-251 (1991)
2) Y. Fujiyoshi ; *Adv. Biophys.* **35**, 25-80 (1998)
3) K. Murata et al.; *Nature* **407**, 599-605 (2000)
4) A. Miyazawa, Y. Fujiyoshi, N. Unwin ; *Nature* **423**, 949-955 (2003)
5) G. M. Preston, T. P. Carrol, W. B. Guggino, P. Agre ; *Science* **256**, 385-387 (1992)
6) Y. Hiroaki et al.; *J. Mol. Biol.* in the press


## NMRを用いた，膜タンパク質・リガンド相互作用解析

東京大学大学院薬学系研究科　嶋田　一夫

ゲノム情報は直接の産物である蛋白質として具現することにより初めて生体内で目的とする機能を発現することができる．ゲノム情報を役立てるためには，タンパク質がどのような機構で機能を発揮しているかを明らかにすること，すなわちタンパク質及びそれらと相互作用する生体高分子の相互作用を詳細に解明することが重要である．

特に，シグナル伝達，細胞内へのイオン，物質透過，エネルギー変換，および細胞接着など生体内で重要な働きを担っている膜タンパク質とリガンドとの相互作用を解明することは，その機能を考える上で，またタンパク質の立体構造もとに薬物のデザインをする上でも，重要である．

構造生物学的手法の一つである核磁気共鳴法（NMR）は，タンパク質や核酸など生体高分子の立体構造や相互作用様式に関する情報を静的，動的な観点から提供する，ユニークな分光法である．しかしながら，NMRで立体構造を求めることができるタンパク質は，対象タンパク質の分子量がおよそ40K以下のものに制限されている．これは，高分子量タンパク質になるとNMRシグナルの線幅が著しく増大し，詳細な解析，が著しく困難になることに起因する．

一方，界面活性剤によって可溶化された膜タンパク質およびそのリガンドとの複合体は，NMR測定限界分子量をはるかに超える場合が多く存在する．したがって，NMRを用いて膜タンパク質・リガンド相互作用に応用するためには，測定法の開発が必須である．さらに，構造生物学的研究が可能な程度に大量かつよく精製された膜タンパク質を得ることは極めて困難な問題である．さらに，もし仮に膜蛋白試料が大量に得られたとしても，経時的変化を経て不可逆的に集合体をとることも多い．したがって，NMR測定に適した試料調製法の開発も行わなくてはならない．

本発表では，ここ数年間，我々が行ってきた，膜タンパク質・リガンド相互作用解析のためのNMR測定法およびNMR試料調製法に関して説明すると同時に，その応用例を紹介する．

## 蛋白質立体構造データベースの国際化・高度化とその応用

大阪大学蛋白質研究所　中村　春木

国際的な構造生物学の進展と成熟によって，多くの蛋白質の立体構造が従来に比べて迅速に決定される時代を迎えつつある．PDB (Protein Data Bank) では，1970年代からこれらに蛋白質の立体構造データを収集してデータベースとして維持・管理し，2005年11月の時点では33,000件を越える構造データを無料で全世界に公開している．大阪大学蛋白質研究所では，科学技術振興機構バイオインフォマティクス推進センターの支援を受け，日本蛋白質構造データバンク（PDBj：Protein Data Bank japan）という組織を作り，米国構造バイオインフォマティクス共同機構（RCSB）と欧州バイオインフォマティクス研究所（MSD-EBI）と共同して，三極でwwPDBなる組織を創設し，国際協力により蛋白質立体構造データベースの登録・維持・管理を進めている[1]．アジア・オセアニア地区からの登録については，本PDBjが担当しており，PDBjにおける登録処理件数は，平成13年356件，平成14年648件，平成15年935件，平成16年1,586件と急増しており，平成16年には世界の約27%以上を処理している．また，生体分子に対するNMR実験データを集めたBMRB (BioMagResBank) のミラーサイトを開き，日本でのデータ登録作業も行っている．

PDBjでは，様々なタグをつけたPDBデータ記述のXML化をラトガース大学と共同して行い，canonicalなXML記述としてPDBMLを確立した[2]．これによって，33,000件を越える全てのPDBMLデータからvalidationエラーをなくすことができた．また，オリジナルのPDBデータに多く欠損している分子機能や実験条件等の情報を文献から抽出して追加し，その数は現在15,000件を超えている．

このように集積してきた蛋白質構造情報から蛋白質機能を解読するため，我々は，蛋白質分子表面の形状とそこでの物理化学的特性に注目し，蛋白質分子認識機構の解析を行ってきた．講演では，情報科学・計算科学を用いた，蛋白質立体構造からその機能を解読する試みについて紹介する[3, 4]．


参考文献

1) H. Berman, K.Henrick, and H. Nakamura, *Nat. Struct. Biol.* 10, 980 (2003).
2) J. Westbrook, N. Ito, H. Nakamura, K. Henrick, and H. Berman, *Bioinformatics* 21, 988 (2005).
3) K. Kinoshita, H. Nakamura, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 13, 396-400 (2003).
4) K. Kinoshita, H. Nakamura, *Protein Science* 12, 1589-1595 (2003) ; *ibid.* 14, 711-718 (2005).


## 変異体を用いたウシチトクロム酸化酵素のプロトンポンプ機構の研究

慶應義塾大学医学部医化学　下方　国稔

チトクロム酸化酵素は，呼吸鎖の末端酸化酵素として酸素分子を水に還元するとともにプロトン（$H^+$）を膜の内側から外側にポンプする．さらに，酸素分子は，酸素還元部位で，

膜外側と内側からそれぞれ電子と$H^+$とが供給されて，水に変換されることによって，内側が負の膜電位と$H^+$濃度勾配が生じ，これらがATP合成を駆動する．このように，チトクロム酸化酵素による$H^+$ポンプは，細胞エネルギー変換の最も重要な過程の一つであり，その分子機構の解明が待たれている．

ウシ心筋酵素のX線構造解析（1，2）によって，膜外側に面した分子表面に近いアスパラギン酸残基（Asp51）と膜内側分子表面とは，効率のよい$H^+$輸送経路になり得ることが知られている水素結合のネットワークとこれに膜内側の水を接触させ得る空隙（水経路）とによって（H pathwayと呼ぶ），繋がっていることが明らかにされている．Asp51は，近傍に存在するヘムの一つ（ヘム*a*）が還元されると疎水性の分子内部から分子表面に移動するため，その$H^+$親和性が大きく低下する．これらの構造知見はAsp51が，ヘム*a*が酸化型のとき膜内側の$H^+$を取り込み，還元されると$H^+$を膜外側に放出することを示唆している．しかし，これらはX線構造にもとづく予測に過ぎないし，この$H^+$ポンプの中心として機能するAsp51が全ての生物種に保存されていないため，H pathwayが$H^+$ポンプ機能をもつことに疑問を持つ研究者が少なくない．

そこで本研究では細菌に保存されていないアミノ酸残基も含まれるウシ心筋酵素のH pathwayの機能を検証するために，ウシ酵素の機能発現系を開発した（2）．H pathwayを担うウシサブユニットI遺伝子（ミトコンドリアDNAにコードされている）を強力なプロモーターの支配下に置きHeLa細胞の核に組み込ませ，発現する蛋白質を細胞質からミトコンドリアに移行させる．この移行のために，ウシ酵素の核由来サブユニットの延長ペプチド（輸送シグナル配列）をウシサブユニットIのN末端に延長ペプチドとして連結した．ウシサブユニットIは他のヒトサブユニットと会合し，ウシーヒト雑種酵素をドミナントに形成する．得られた野生型の雑種酵素は，ヒト酵素に等しい酵素機能と吸収スペクトルを示していた．したがって，ウシサブユニットIはその固有の立体構造を雑種酵素中で形成していると考えられる．そこで，H pathwayの$H^+$ポンプ部位（Asp51），水素結合ネットワーク，そして水経路のそれぞれの部位に，それぞれの機能を妨害すると推定出来るアミノ酸を導入した．それら変異体は，正常に酸素を還元したが，$H^+$ポンプ機能を失っていた．変異体解析は，H pathwayが$H^+$ポンプ経路であることを強く示唆している．

1）Yoshikawa S., *et al.*, *Science* 280, 1723-1729 (1998)
2）Tsukihara T., *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 15304-15309 (2003)

### ドライアイとアクアポリン

慶應義塾大学医学部眼科学　後藤　英樹

ドライアイ症候群は“涙液分泌の減少または涙液の過剰な蒸発による涙液疾患であり，眼表面上皮障害，視機能障害，および眼不快感の症状を引き起こす．”と定義されており，涙液異常（シルマーテストによる分泌機能，または涙液層破壊時間測定による安定性評価）および角結膜障害の生体染色による評価により診断されている．ドライアイ症候群は様々な疾患に合併するが，その代表がシェーグレン症候群である．シェーグレン症候群は原因不明の自己免疫疾患であり，ドライアイ，ドライマウスなどを引き起こす．

近年ドライアイの診断及び治療に関しては大きな進展がみられている．いままでは点眼による水分の補充が治療の中心であったが，近年，涙液の鼻腔への排出口である涙点の閉鎖手術の成功率が高まり，また涙液の蒸発を制御している涙液最表層の油層の再建も可能となってきている．

しかし依然として，涙液分泌そのものを増加させる治療手段は乏しく，涙液分泌コントロールが将来有望な治療手段になる可能性がある．このような背景のもと，我々は，水チャンネルであるアクアポリンがドライアイに関連しているのではないかと注目した．今回の発表では，シェーグレン症候群患者涙腺におけるアクアポリン5（AQP5）の発現および局在の検討，シェーグレン症候群モデルマウスを用いたAQP5の局在異常の検討，アフリカツメガエル卵母細胞を用いたAQP5ゲーティング機構の検討について述べる．

### 神経伝達物質輸送の構造基盤：$Na^+/Cl^-$依存性神経伝達物質トランスポーターの細菌由来ホモログの結晶構造

理化学研究所播磨研究所　山下　敦子

脳神経系は，生命活動をする上で情報の受理，処理，統合そして伝達の役割を果たしているきわめて重要な器官であり，そのシステム全体の理解とともに個々の素過程に対する理解，それらを担うタンパク質の機能への理解も求められている．$Na^+/Cl^-$依存性神経伝達物質トランスポーター（NSS）は，中枢神経系に存在し神経伝達の制御に関わるトランスポーターである．これらは細胞の内外に存在する$Na^+$イオンと$Cl^-$イオンの電気化学勾配を利用して，ドーパミン，セロトニン，ノルエピネフリン，γアミノ酪酸，グリシンなどの主要な神経伝達物質を細胞内にとりこむことにより，神経細胞間のシグナル伝達を終焉させ次の信号の到達に備える役割を担っている．NSSファミリーは，その機能不全がうつ病，パーキンソン病，注意欠陥・多動性障害など様々な精神疾患の原因となり，それらの治療薬（抗うつ剤など）や麻薬・覚醒剤（コカインなど）の標的分子でもあることから，医学的・薬理学的にも重要な研究対象である．しかしながらこれらのトランスポーターは構造解析が困難な膜タンパク質であるため，これまで立体構造情報が全く得られておらず，その機能を担うメカニズムへの理解が進んでいなかった．我々はNSSの相同タンパク質が原核生物にも存在することに着目し，これらをクローニングしてX線結晶構造解析を行った結果，高度好熱菌*Aquifex aeolius*山来のNSS相同トランスポーター$LeuT_{Aa}$の結晶構造を1.65 Å分解能で明らかにすることができた．$LeuT_{Aa}$の構造は12の膜貫通部位から成り立って

おり，これまでに報告されたどの膜タンパク質の構造とも似ていないものであった．さらに解析したトランスポーター分子の中央付近に，輸送基質であるl-ロイシンと共輸送イオンである$Na^+$イオンが結合しているのが観察され，その部分がこれらの結合部位であることが判明した．$LeuT_{Aa}$分子にはαヘリックスが中央付近で中断されほどけた構造を持つ膜貫通部位が2か所存在しており，基質や$Na^+$イオンはちょうどこのほどけた構造の近傍に結合していて，主鎖を構成する原子やαヘリックスのダイポール・モーメントなど$LeuT_{Aa}$の骨格そのものをこれらの分子の結合に利用する巧妙な設計になっていた．また，それら結合部位の構造を含めた分子全体の立体構造は，トランスポーター分子がどのようにして基質やイオンの特異性を決定しているか，そしてどのようにして構造変化をおこして基質やイオンを輸送しているかについて説明を与えてくれるものであった．これらの基本的な骨格構造や輸送のメカニズムは実際に中枢神経系で働くNSSのものと共通と考えられることから，$LeuT_{Aa}$の構造はNSSの機能の理解への大きな手がかりとなり，さらには精神疾患の原因解明や治療薬の開発・改良のための重要な情報となることが期待できる．

**膜タンパク質X線結晶構造解析の将来**

インペリアルカレッジロンドン　岩田　想

膜蛋白質が初めて構造解析されてから20年が経とうとしている．この間に各種の技術開発がおこなわれ90種類程度の膜蛋白質の構造が解かれてきた．しかしながら高等生物の蛋白質の1/3程度は膜蛋白質であり，3万個以上の構造がプロテインデータバンクにおさめられている可溶性の蛋白質に比べるとその数はあまりに少ない．創薬等の鍵となる膜蛋白質構造解析の現状の問題点を指摘すると共に，どのような技術開発が今後の発展の為に必要とされているかについて実際の構造解析の例を示しながら議論する．

**アクアポリン水チャネルと病気**

東京医科歯科大学大学院腎臓内科学　佐々木　成

アクアポリンは水を選択的に通過させる膜蛋白であり，浸透圧勾配に従っての細胞内外への水の受動的輸送に働いているチャネルである．細菌から哺乳類まで普遍的に存在しており多くの種類が知られている．哺乳類では13種見つかっており（AQP0からAQP12），全身に分布しており種類ごとに細胞・臓器発現部位に特徴が認められる．そのいくつかは水のみならず，グリセリンのような小物質，さらにCO2ガスやClイオンなども通過させ，また細胞接着にも働いていることが報告されているが，その生理的意義には不明な点も多い．

アクアポリンの体内での役割は遺伝子改変マウスの表現型と遺伝子変異を有するヒトの症状・病態から検討されてきている．ノックアウトマウスの結果は，存在部位での水透過性の減少が認められ，アクアポリンが水チャネルとして働いていることを証明するものであった．また腎臓と脂肪細胞ではグリセリンチャネルとして働くことも明らかになった．さらには皮膚や脳で大切な役割を担っていることも示さてきている．一方，ヒトにおいては，AQP0, 1, 2, 3, 7における遺伝子変異の存在が知られているが，はっきりとした症状を示したのはAQP0とAQP2であった．AQP0では白内障になり，AQP2では腎性尿崩症という尿の濃縮力障害を示す病気となった．特にAQP2の変異による腎性尿崩症はアクアポリンの水チャネルとしての働きを，そして腎集合管でのAQP2を介する水輸送が尿濃縮に必須であることを証明したものである．またAQP5の後天的な異常によりシーエグレン症候群という眼と口の乾燥症が起こることも報告されている．

AQP2の遺伝子変異と臨床病型の対応からAQP2の細胞内動態に関する多くの示唆が得られており，調節系，調節蛋白などが次第に明らかになってきている．本講演ではアクアポリンの生体内での役割とその破綻からおこる疾患（アクアポリン病）の現状について自験データを中心にまとめてみたい．