

## 構造生物薬学

教授：加藤 博章 准教授：中津 亨 助教：山口 知宏



## 研究概要

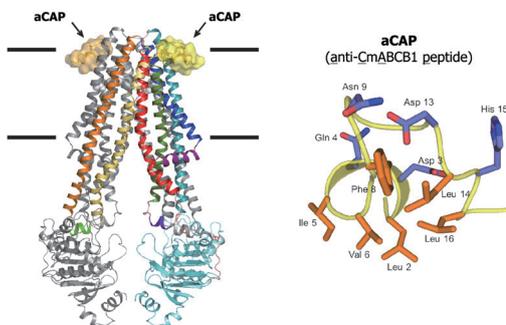
生体分子の機能を解明するためには、その立体構造を原子レベルで明らかにすることが大切です。しかし、静止した構造を決定するだけでは不十分です。なぜなら、実際に機能を発揮するときの生体分子は、立体構造を変化させることで高い性能を発揮しているからです。そこで我々は独自に確立してきた速度論的結晶学という、立体構造の時間変化を精密に捉える方法論を駆使して、以下のような生物学的に未解明な生体分子の仕組みの解明を行なっています。

**1) ATP Binding Cassette** トランスポーターの構造薬理学：ATP Binding Cassette (ABC) トランスポーターとは、遺伝子上で良く保存された構造のATP結合部位を分子内にもつ膜タンパク質であり、自らATPを加水分解してエネルギーを発生させることで、細胞の膜を介した化合物の輸送を行っています。その代表がP糖タンパク質 (P-gp) または ABCB1 あるいは MDR1 と呼ばれる多剤排出トランスポーターです。P-gp は、外部から体内へと侵入してくる多種多様な化合物 (異物) を吐き出すことで生体を防御している重要な分子です。しかし、体にとっては薬も異物であり、P-gp によって吐き出されることになることから、その機能を明らかにすることは、薬理学における最大の課題の一つです。特に、がんの化学療法においては、初回の抗がん剤治療によってわずかに生き残った癌細胞が P-gp を大量に作ることで、再発時には、これまで処方しなかった抗がん剤までもが効かない状態を作り出してしまい、治療を困難にしています。我々は、ヒトの P-gp と機能が良く似ているが、立体構造が安定で結晶化に適している CmABCB1 を好熱性の真核生物から発見し、その立体構造を決定しました。さらに、CmABCB1 に対して細胞の外側から強力に結合する新規メカニズムの阻害剤を作り出しました。さらに、解明した立体構造を基に、多剤を認識できる仕組みや ATP によって駆動される基質輸送の仕組みを解明しようとしています。

**2) X線自由電子レーザーを用いた新規 X線構造解析手法の開発**  
X線結晶構造解析法の最大の欠点は良質の結晶を必要とする点であり、その克服は構造生物学者が挑むべき最

大の課題である。その克服に向けて、発生させる X線の強度を上昇させるための試みが続けられてきた。その結果、X線自由電子レーザーと呼ばれる方法による第四世代の放射光施設が最近稼働を開始し、SPring-8 に代表される第3世代放射光の10億倍強力な X線が利用可能になってきた。この X線自由電子レーザーを用いれば、驚異的な強さの X回折強度が測定可能となることから、結晶を作らずに1つの分子を用いて立体構造を決定するという夢が実現するかもしれない。我々は、まず、結晶をマイクロメートル程度の微結晶まで小さくして立体構造を決定する可能性を追求している。特に、我が国が米国に次いで稼働させた自由電子レーザー施設 SACLA は世界で初めて短波長領域の X線を実現しており、我々はこの優位性を活用することで可能となる立体構造決定法の構築を目指している。薬物の受容体や輸送体はいずれも結晶化が困難な膜タンパク質であり、微結晶による構造解析法が実現すれば、創薬研究に革命的な進歩が得られるものと期待される。

**3) 酵素の触媒作用の構造的起源の解明**：酵素は、化学反応を驚異的なスピードへと加速することができるタンパク質です。そこで、その機能の仕組み (からくり) を担う「構造基盤」を、X線結晶構造解析を用いて明らかにすることを目的に、ホタルの発光酵素ルシフェラーゼの立体構造解析を行っています。ホタルルシフェラーゼは黄緑色の発光反応を触媒します。我々はルシフェラーゼ-DLSA 複合体の構造解析を行うことで動的 X線結晶構造解析に成功し、発光反応の際、ルシフェラーゼの構造変化を捕らえることに成功しました。DLSA は我々自身で合成した化合物で、発光反応におけるルシフェリル AMP 中間体を模倣した化合物です。野生型ルシフェラーゼの Ile288 は DLSA のオキシルシフェリン部分に近づいていましたが、赤色に光る S286N 変異体では Ile288 の動きは観測されませんでした。このことからルシフェラーゼは Ile288 を使って発光色を制御していることを明らかにしました。現在は発光の量子収率がなぜ 90% と高いのかを明らかにしようとしています。一方、リパーゼという脂質分解酵素の立体構造から受容体へと進化を遂げたのが、植物ホルモン、ジベレリンの受容体タンパク質です。我々は、決定したその立体構造を基に、そのジベレリン受容の仕組みから、分子進化の過程を解明していきます。



CmABCB1 (Cyanidioschyzon merolae 由来 P-糖タンパク質) と我々が発見した特異的阻害剤との複合体の立体構造 (左側)。その阻害剤 aCAP (抗 CmABCB1 ペプチド) のみの立体構造 (右側)。

## 主要論文

- Kodan *et al.* Structural basis for gating mechanisms of a eukaryotic P-glycoprotein homolog. *Proc Natl. Acad. Sci. USA*, **111**, 4049, 2014.
- Yamashita *et al.*, An isomorphous replacement method for efficient de novo phasing for serial femtosecond crystallography. *Sci Rep*, **5**, 14017, 2015.
- Nakatsu *et al.* Structural basis for the spectral difference in luciferase bioluminescence. *Nature*, **440**, 372, 2006.