S3C06

巨大タンパク質核酸複合体の構造解析ーイネ萎縮ウイルスを例としてー

○中川 敦史（阪大・蛋白研）

ヒトゲノムの全塩基配列が決定され、その他の生物種においてもそのゲノムの塩基配列が次々と決定されてきている現代において、その遺伝子の転写産物であるタンパク質の機能を分子レベルで解明することが生命科学にとって次世代の重要な研究対象になってきている。遺伝子はその情報を1次元の塩基配列上のみ持つのに対して、タンパク質はポリペプチド鎖が3次元的な立体構造を取ることによって初めてその機能を持つため、タンパク質の機能を知るためにはその立体構造の情報は非常に重要である。生体内では複数のタンパク質が互いに相互作用しあいながら機能している場合がほとんどであり、また、複数のタンパク質あるいは核酸が会合することによって1つの機能を持つ場合も多い。

近年のX線結晶構造解析の方法論の進歩により、分子量数万程度の通常のタンパク質であれば短時間で構造決定を行うことが可能になってきた。これに伴って、単体で機能するタンパク質だけではなく、複数のポリペプチド鎖が会合して相互作用した状態で機能している巨大タンパク質核酸複合体ー生体超分子複合体ーの構造解析の重要性が指摘されるようになってきた。生体内の組織化された機能を理解するためには、多様な機構で反応系を制御している生体超分子複合体の立体構造を知ることが不可欠であると言えるであろう。

我々のグループでは、SPring-8の生体超分子構造解析ビームライン（BL44XU）を中心として、いくつかの生体超分子複合体の構造解析を進めているが、そのうちの1つであるイネ萎縮ウイルス（RDV）の構造解析を通して、生体超分子複合体の解析の重要性と解決しなければいけない問題点を明らかにしていきたい。

A.Nakagawa：Structure determination of biological macromolecule assemblies; structure of rice dwarf virus as an example

S3D01

物理化学的特徴によるゲノムワイドなGPCRの分類

○諏訪 牧子（産総研 生命情報科学研究センター）

Gタンパク質共役型受容体（GPCR）は、リガンド受容、細胞内シグナル伝達を通じて実に多彩で重要な機能を発現する。これまで様々な分野で精力的に研究されてはきたが、比較的限られた種類の受容体のみが対象にされ、GPCR全体としての機能発現のメカニズム解明には至っていない。一方、今日ヒトを始め多くの生物のゲノム解読が進んでおり、少なくとも配列からはGPCRファミリーを総体として議論することが可能になってきた。この状況では、(1)ゲノムからGPCRを網羅的に発見し、(2)それら全体を機能分類することで、GPCRの機能発現のメカニズムを理解し、未知の配列に対して機能予測が可能になると期待できる。本会では、まずヒトゲノムからGPCRの網羅的な発見の話に触れ（詳細はポスター参照）、次に機能分類に関して議論する。

機能分類の段階では、私たちは以下の仮定を置いた。GPCRは、機能発現する場合に、細胞外側からリガンド分子、細胞質側からGタンパク質が一体となった複合体とみなせる。とすれば、リガンド、GPCR本体、Gタンパク質の間で構造形成、機能発現に関わる物理量の相関性がある。実際に機能として見えている現象は多様であっても、この相関性に注目すれば、分類はシンプルになり、しかも機能発現メカニズムを説明できるものになる。

そこで機能既知のGPCRとそれらに対応するリガンド、Gタンパク質について様々な物理量で記述し、各多変量間の相関性を解析した。その結果、リガンドの分子量、GPCRの細胞質側、細胞外側ループ長、膜貫通ヘリックス内極性環境、あるいはGタンパク質選択性の間には明確な相関性が得られた。この結果は、GPCRの配列を特定のリガンド、Gタンパク質の組み合わせ領域にマップできる可能性を示唆している。

M.Suwa：Genome-wide classification of GPCR sequences using physico-chemical descriptors.

S3C07

タンパク質の構造はビジネスになるか

○伊中 浩治、杉山 成（（株）丸和栄養食品）

蛋白質の立体構造情報を基に「薬」を設計する手法をStructure Based Drug Design（SBD）とよび、欧米ではこの手法により様々な化合物が開発され、既に具体的な新薬として市場に登場しはじめている。医薬品の開発や、バイオサイエンス分野における新規機能性物質の研究開発においては、生物物質を代表するタンパク質分子の立体構造情報の重要性が益々増大しつつある。SBDの手法を用いて新薬開発を行うためには信頼のおける蛋白質の立体構造情報が不可欠になるが、上述のような動きに刺激されてか、蛋白質の立体構造をビジネスとして解析しようというグループが最近現れ始めた。アメリカに本拠地をおく、Structual GenomiX社や、Syrrx社あるいはBioCryst Pharmaceutical社などはその代表例である。これらの会社は、スタッフにX線結晶構造解析の著名な学者をそろえ活発に活動を始めている。彼らの事業内容とその目的は、薬剤のターゲットになる蛋白質の発現から結晶化、構造決定及び構造の精密化で、これらの事業によりクライアントのdrug discovery programを助けることにあるとしている。日本でも我々のグループが2年前から事業としての構造解析の受託を始めた。上述のグループの様に株式公開をして大々的に事業展開するには至っていないが、現在までにいくつもの重要なサンプルを大手製薬企業や様々な研究機関から預かり、蛋白質の精製結晶化から構造解析までを行っている。また、企業からの受託ではなく、我々が独自に特定の疾患や重要な生体内反応に関与する蛋白質に着目し、将来的にはこれらの蛋白質構造を製薬企業等に提供していく事業も開始している。我々はこれらの事業を行う技術上のキーポイントとして、結晶化の技術に着目し従来のスクリーニングを実施しなくてもすむ結晶化の技術開発も行っている。

K.Inaka, S.Sugiyama：Protein Structures for Discovering New Drugs

S3D02

受容体ーGα融合蛋白質を用いたリガンド検索

○武田 茂樹、芳賀 達也（学習院大・生命研）

我々は新規のG蛋白質共役受容体（GPCR）や新規の生体内リガンドの検索を目指して研究を行っている。新規GPCRの同定はまずヒトゲノムデータからGPCRが7回膜貫通という共通の構造を持つこと、およびGPCRの多くがそのOpen reading frame（ORF）にイントロンを持たない、という2つの事実を利用して候補遺伝子の検索を行った。この検索では、まずヒトゲノムシーケンスから予想されるORFを膜貫通領域を予想するプログラムSOSUIで解析し、膜貫通領域を6ー8回持つ物を選びだした。その結果50種類の味覚、嗅覚受容体以外の新規GPCRと考えられる配列を得た。このうち34個についてRT-PCRの解析を行い、20個については発現を確認することができた。これらの受容体に対するリガンド検索のために我々は受容体とG蛋白質αサブユニットとの融合タンパク質を昆虫細胞で調製し、その膜画分を用いてアゴニスト依存性[³⁵S]-GTPγS結合活性を測定する系を利用することとした。この方法では他の方法と異なり、大量の培養細胞を継代し続ける必要がない。この活性測定法のモデル実験としてノシセプチン受容体とGi2αの融合蛋白質を用いた。融合蛋白質にノシセプチンを添加することにより融合蛋白質への[³⁵S]-GTPγS結合活性は最大5倍程度上昇し、EC₅₀値は2nMであった。さらにブタ脳抽出物中のノシセプチン活性をゲルろ過および逆相系HPLCの画分の中に同定することができた。以上のことからこの活性測定方法がGPCRの内在性リガンドの同定に応用できると考えた。今後、新規受容体とGi1αとの融合蛋白質に対して[³⁵S]-GTPγS結合活性を上昇させる画分があるかどうかを、各組織抽出物などを用いて検索する予定である。

S. Takeda and T. Haga：Receptor-Galpa fusion proteins as a tool for ligand screening