核酸分子認識とその機能を中心とした構造生物学

奈良先端科学技術大学院大学情報科学研究科情報生命科学専攻

CREST・科学技術振興機構 箱嶋敏雄

Toshio HAKOSHIMA: Structural Biology of Nucleic-Acid Recognition and its Roles in Regulation of Protein Functions

Crystallographic studies on nucleic acid-nucleic acid, nucleic acid-protein and protein-protein interactions are reviewed. The studies contain base pairing, sequence-specific stability of Z-DNA structures, base recognition by ribonuclease T1, transcriptional factors-DNA interaction, G proteins and the effector protein recognition, and protein-protein interactions in intracellular signaling pathways.

1. はじめに

もともと、薬物などの特異的な薬理作用の物理化学的な理解に興味があったことから、生体分子の構造研究を始めた。その意味では現在の構造生物学に違和感はない。学部3年時修了の研究室配属前に何冊かのX線結晶学の入門書を読んだときに、小綺麗で取っ付きやすい学問(特にNMRに比べて)だなと思ったのが結晶学との出会いであるが、結晶学の将来に確信があるわけではなかった。時代背景(1970年代)などもあって、核酸の構造研究から始まり、タンパク質工学、転写を中心とした構造分子生物学、低分子量Gタンパク質の構造研究を契機に細胞生物学領域での構造・機能研究というように研究を展開してきた。初期の研究は構造化学的な趣向が強いものもあるが、本来の興味であった分子機能へ収斂してきた。分子が機能するというと門外漢の方にはわかり難いかもしれないが、つまるところ、ほかの分子と、あるいは分子内で、相互作用するということである。それで、分子複合体の構造決定を心がけてきた。以下、時代背景も紹介しながら、研究紹介したい。

2. 核酸の構造化学

研究生活は合成核酸の高次構造に関する基礎研究(1976年)から始まった。この頃は、核酸の構成単位であるヌクレオチドやヌクレオチドの結晶構造解析の構造データが蓄積して、基本的なコンホメーションがでそい始めたころであり、安定なコンホメーションについての一般的な概念が形成されていった。当時、構成原子やコンホメーション角の命名はいまだに統一されていなかった。また、Watson-Crickの二重らせん構造については、X線繊維回折データに基づいた構造の精密解析が進行中であった。ちなみに、タンパク質の結晶構造決定も報告されるようになっていたが、最小自乗法などで構造精密化されたものはなかった。

2.1 非Watson-Crick型二重らせん構造は存在できる

当時、Watson-Crickの二重らせん構造、Watson-Crick型塩基対により会合した2本のポリヌクレオチド鎖の5'-3'極性が反対(反平行)の右巻き二重らせん構造(図1)、は広く受け入れられていた。しかし、新しい構造多形の発見も相次いでおり、塩基配列などに依存した構造転移の真偽や生物学的意義が議論されていた。また、これらに関連したいくつかの基本的な疑問も残っていた。例えば、Watson-Crick型二重らせん構造では、グアニンとシトシン(GC)、アデニンとチミンあるいはウラシルの対(AT, AU)が、WatsonとCrickの提唱した塩基対(Watson-Crick型塩基対)を形成するとされていたが、塩基を用いた単結晶X線解析や赤外分光学あるいはNMR研究では、それが必ずしも最も安定な塩基対ではなかった。特に、アデニンとチミン(あ

図1 Watson-CrickのDNA二重らせん構造。(Structure of the DNA double helix proposed by Watson and Crick.)

図2 非 Watson-Crick 型塩基対をもつ poly (m²A)-poly (U) の二重らせん構造。(Structure of the DNA double helix with non-Watson-Crick type base pairing formed by poly (m²A) and poly (U).) 上図は m²A-U の可能な 4 つの塩基対。下図は X 線繊維回折で構造決定された poly (m²A)-poly (U) の構造 (部分) で Hoogsteen 型塩基対をもっている。

るいはウラシル) 塩基対には、Watson-Crick 型、逆 Watson-Crick 型、Hoogsteen (発見者の名前) 型、逆 Hoogsteen 型の 4 つの型の塩基対が知られていた (図2)。そこで、塩基対形成に影響を与える修飾塩基を含むポリヌクレオチドを利用して、複合体構造を X 線繊維回折で解析した。そのなかで、Watson-Crick 型や逆 Watson-Crick 型塩基対形成を阻害するように、アデニン塩基の 2 位に置換基を導入した 2-methyl-adenine (m²A) や 2-methylthio-adenine (ms²A) を塩基としてもつポリヌクレオチド poly (m²A) や poly (ms²A) は、poly (U) と Hoogsteen 型塩基対をもつ二重らせん構造を形成することを発見して、非 Watson-Crick 型塩基対をもつ二重らせん構造は存在することを初めて証明

した。²⁾ この poly (m²A)-poly (U) や poly (ms²A)-poly (U) の二重らせん構造は、しかし、2 つのポリヌクレオチド鎖の極性が平行であった。一方、Watson-Crick 型二重らせんの極性は反平行 (図1) であり、このことが、現存する生物がもつとされる半保存的複製の条件となっていた。したがって、残念ながら、われわれの構造は現在信じられている遺伝情報伝達機構に適合しないことがわかった。この問題に関しては、最近、自己相補的な DNA オリゴマー d (ATATAT)₂ が Hoogsteen 型塩基対を形成した逆平行の極性をもつ二重らせん構造を形成しているという興味深い単結晶構造解析の結果が報告されている。³⁾ 非 Watson-Crick 型塩基対が遺伝子 DNA 中に存在し何らかの機能に関与している可能性は残っている。

ここでは割愛するが、核酸の高次構造に影響を与えるリボース糖の 2'-水酸基の修飾ヌクレオチドの単結晶 X 線解析や、そのポリヌクレオチドの形成する二重らせん構造を X 線繊維回折解析により調べて、合成 2'-フッ素置換 RNA (ウイルス RNA より強いインターフェロン誘発活性をもつ) は RNA よりも安定な A'-RNA 構造をもつことなどを構造化学的に示した。

2.2 合成 DNA オリゴマーは単結晶化する：MIT へ

1970 年代当時、合成核酸のオリゴマーは単結晶にはならないだろうというのが大方の見解であった。長鎖核酸分子のもつ負に荷電したいくつものリン酸基が結晶格子中で反発しあって、それを中和するのが難しいというのが、もっともらしい理由であった。実際、ヌクレオチドの結晶化はヌクレオシドよりはるかに難しかった。しかし、ジヌクレオチドや転移 RNA (tRNA) が結晶化された。そして、ついに、1979 年の暮れに、マサチューセッツ工科大学 (MIT) の Alexander Rich らによって、合成オリゴマーが形成する二重らせん DNA の結晶構造が初めて報告された。⁴⁾ この d (CGCGCG)₂ の構造は、Watson-Crick 型塩基対をもち、2 本のポリヌクレオチド鎖の極性も反平行であるが、左巻きの二重らせんを形成しているという衝撃的な構造であった。このような、それまでの常識を破る結果は往々にしてにわかには信用されない。しかし、論文では、高分解能の単結晶構造によって、まったく新規な非 Watson-Crick 型二重らせん構造 (ポリヌクレオチド骨格が zig-zag に走っているので Z-DNA と呼ばれる) が存在し得ることが一点の曇りもなく示されていた。この研究を契機にして、DNA 構造の多様性やその塩基配列依存性、薬剤やイオンなどほかの分子との相互作用の研究などが爆発的に進展することは明白であった。そこで、単結晶 X 線解析による核酸オリゴマーの高次構造研究法を MIT で学ぶことにした。

2.3 Z-DNA 二重らせんの塩基配列依存性は水と水で決まる

米国では、1982 年の夏からの 11 カ月と短い期間であったが、Z-DNA 構造を形成し難い塩基配列をもつ Z-DNA

オリゴマーの結晶⁵⁾や、抗生物質の1つであるトリオスチンAとDNAオリゴマーとの複合体結晶⁶⁾の構造決定を経験した。前者では、Z-DNAの塩基配列依存性を明らかにすることが目的であり、Z-DNAを形成しやすい繰り返し配列d(CG)_nをもち結晶化することがわかっていたd(CGCGCG)₂の中央を、Z-DNAを形成し難い配列TAに置換したd(CGTACG)₂を工夫して結晶化した。例えば、シトシンの5位のメチル化(あるいは臭素化)はZ-DNA形成を促進することがわかっていたので、Cの代わりにm⁵Cやbr⁵Cを導入してZ-DNA構造を安定化して、高品質の単結晶(分解能1.2~1.5 Å)をつくって構造決定した。PROLSQを核酸版にした「NUCLSQ」を用いて構造精密化した結果、Z-DNA構造自体には本質的な差異はないが、d(CpG)の糖-リン酸骨格のつくる深い溝の中の水と水の安定化にグアニンの2位のアミノ基(アデニンにはこのアミノ基はない)が必須であることを構造化学的に説明した(図3)。後者では、DNAを標的とする薬剤Triostin AがB-DNAの広い溝に結合して、らせんを大きく巻き戻すことが明らかにされた。これらの成果は、核酸構造の多様性、特に、DNA構造の塩基配列依存性や、薬物による塩基配列の認識とDNA構造の変形のメカニズムの理解において役に立った。学んだ核酸構造研究の実験法は生化学実験講座などに概略した⁷⁾。また、その経験は後の転写因子とDNAオリゴマーとの複合体の構造決定につながった。

Z-DNA構造の細胞中での生理学的意義については、その後、長い論争の歴史がある。初期の頃はZ-DNA構造の細胞中での存在を証明することに、後半ではZ-DNA結合タンパク質の単離とその機能の解析に精力が注がれた。これらの経緯についてはほかの総説に記した⁸⁾。

図3 Z-DNA, d(CGTACG)₂の二重らせん構造。(Structure of the Z-DNA double helix formed by d(CGTACG)₂.) 左図はCが5-臭素(黒)化されたd(CGTACG)₂の二重らせん構造で、2つのTのメチル基が中央に見える。中図はその水和状態。右図はCGとTA塩基対ステップの電子密度で、上図のW1とW2はCGステップの深い溝の中で固定された水と水。

3. タンパク質による核酸認識

1980年代の前半に、オリゴマーの単結晶解析を通して核酸構造の一般論は完成していった。同時に、遺伝子工学による組み換えタンパク質の量産化とタンパク質精製用クロマトシステムの進化、結晶化のルーチン化によって、タンパク質構造研究の第1ハードルも低くなっていた。そこで、ごく自然に、以前から興味があったタンパク質との相互作用研究に踏み込んでいった。タンパク質結晶学も、二次元検出器、電子密度改良法、シンクロトロン放射光とMAD法によって、強力なものに成熟しつつあった。

3.1 塩基認識：RNase T1のタンパク質工学

1980年代前半は遺伝子操作の発展期でもあり、タンパク質工学という言葉ができたのもこのころである。日本では、池原森男教授(大阪大学名誉教授、前タンパク質工学研究所初代所長)らが特別推進プロジェクトとして開始した、リボヌクレアーゼT1(RNase T1)のタンパク質工学研究が最初である。この研究に構造面から参加できたことは幸運であった。RNase T1は一本鎖RNAを基質とするが、切断部位のグアニン塩基に対する一塩基特異性は非常に高い(10⁷倍以上)ものであった。ここでの成果の紹介は割愛するが、分子の三次元構造に基づいて機能を議論する(予測する)のみにとどまらず、人工変異を通して、議論を実証するという研究態度を身につけることができた。この一連の研究で、この酵素のきわめて特異な性質である広いpH範囲で保たれる高い触媒活性の巧妙な機構^{9),10)}や、塩基認識における特異的および非特異的相互作用¹¹⁾⁻¹⁴⁾について定量的な知見を得るとともに、分子動力学(自由エネルギー摂動法)を用いた理論的な検討を加えて、予測の可能性を示した¹⁵⁾。詳しくはほかの総説を参考にされたい^{16),17)}。

3.2 塩基配列認識：複合体のX線構造研究と凍結結晶学

先に述べたDNAオリゴマーの研究やタンパク質工学の経験をもとに、組み換えタンパク質を用いた転写因子とDNAとの複合体の構造決定にとりかかった。塩基配列認識機構とタンパク質の結合によるDNA構造変化の解明が主眼であった。この研究は多くの困難を伴い、長い年月を要した。総括すると、その決定的な理由は、凍結結晶学(cryocrystallography)を利用したシンクロトロン放射光によるデータ収集の導入の判断が遅れたことであると思っている。タンパク質-DNAオリゴマー複合体の結晶は、DNAオリゴマーの鎖長、末端配列の工夫、配列の系統的な検索、DNA組み換え技術で生産するDNA結合ドメインの領域の検討などの工夫で、比較的容易につくることができる。しかし、それらのほとんどの回折能が著しく弱く、低分解能の回折データしか与えないか、あるいは、すぐに劣化してしまうものであった。また、格子も大きかった¹⁸⁾。今、振り返ってみれば、これを克服するには放射光を利用した凍結結晶学の手法しかなかったわけであるが、その有

図4 単結晶X線回折で決定された転写因子-DNA複合体の構造。(Structures of transcription factor-DNA complexes determined by X-ray single-crystal diffraction.) IRF-2-DNA複合体ではタンデムDNA配列に結合した6分子のIRF-2の中2分子を描いている。

図5 bZIPモチーフをもつ転写因子のDNA塩基配列認識の多様性の起源。(Versatility of the DNA recognition by bZIP transcription factors.) Pap1-DNA複合体とGCN4-DNA複合体の比較で、下にDNA結合モチーフと認識配列との直接の相互作用を模式的に(実線は水素結合、点線はvan der Waals接触)示した。

図6 ヒト低分子量Gタンパク質RhoAのスウィッチ構造変化。(Structural changes in the switch regions of human small molecular weight G protein RhoA.) GTP結合型(活性)とGDP結合型(不活性)を重ね合わせてある。

図7 低分子量Gタンパク質の標的タンパク質の認識。(Effector recognition by small G proteins.) 左図がRhoA-PKN複合体で、PKNのRho結合ドメインはα-らせんのみからなり、その側面で結合する。右図はRap1A-c-Raf1複合体で、c-Raf1のRap/Ras結合ドメインは主にβ-シートからなり、Rap1Aのβ-シートと新たなβ-β会合を通して結合する。Rap1AはH-Rasファミリーであり、同じ標的タンパク質を認識する。

図8 ERM (Ezrin/Radixin/Moesin) タンパク質の活性化機構概念。(Activation mechanism of ERM proteins.) ERMタンパク質は閉じた状態(不活性)と開いた状態(活性)をとり、Rhoシグナルによって活性化される。

図9 ERMタンパク質のFERMドメインを介した細胞膜とPIP2の認識。(PIP2 recognition by the FERM domain of ERM proteins.) 左図はRadixinのFERMドメインの表面電荷とPIP2の頭部のIP3の結合。右図は認識様式。

効性の評価は、まだ日本では定まっていなかった。また、私自身も、1992年に、凍結結晶学のパイオニアの1人であるH. Hope直々にUC-Davisの彼の研究室で実演してもらった手技(残念ながらオイル法で、しかも試料は「石ころのように大きくて丈夫な」concanavarin Aの結晶だった)は、きわめて不安定なタンパク質-DNAオリゴマー複合体の結晶にはとても適用できるとは思えなかった。そのような経緯もあって、データ収集は通常のキャピラリー法で行っていた。¹⁸⁾後に、ループ法を採用するとともに、凍結結晶学を装備する(少なからず投資した)ことによって事態は一挙に好転した。¹⁹⁾⁻²¹⁾最終的に、酵母由来のリン酸代謝系の転写因子PHO4とその認識配列を含むDNAとの複合体²²⁾マウス由来のインターフェロン制御因子であるIRF-2とDNAとの複合体²³⁾酵母の薬剤耐性に関与する転写因子Pap1とDNAとの複合体²⁴⁾の構造を決定できた(図4)。

図10 ERMタンパク質のFERMドメインを介した細胞接着分子ICAM-2の認識。(ICAM-2 recognition by the FERM domain of ERM proteins.)

3.3 塩基配列認識：転写因子-DNA複合体

一般に、真核細胞の転写因子に認識される配列はいくつもの遺伝子上流にあり、それら複数の遺伝子の発現を制御している。PHO4-DNA複合体では、PHO4が共通の認識配列の外の配列も認識していることを明らかにして、制御下にある複数の標的遺伝子の発現を各遺伝子に個性ある強さで制御していることを示した。また、IRF-2-DNA複合体では、生化学的な実験では困難であった、タンデムに繰り返した配列中での真の共通認識配列を明らかにするとともに、二重らせんDNAの広い溝と狭い溝の両側から塩基配列を認識することが可能なことを示した。

転写因子は、アミノ酸配列に特徴のあるDNA結合ドメイン(あるいはDNA結合モチーフ)を通して塩基配列を認識する。例えば、真核細胞に特徴的な転写因子の一群(GCN4など)は、塩基性アミノ酸残基の富んだ領域にロイシン・ジッパー(Leucine zipper, 7つおきにロイシンが現われる配列で、 α らせんをとり、ほかの同様のモチーフと会合して「coiled coil」のスーパーヘリックスを形成する)が続いたbZIPというDNA結合モチーフをもち、塩基配列認識部位にNxxAAxxCR(xはどのアミノ酸残基でもよい)という特徴的なアミノ酸配列を通して、共通配列d(TGACGTCA)を認識する(これは回文配列であり、二回軸をもつ二量体の転写因子が認識するが、その独立の半分に下線をした)。例えば、最初のN(アスパラギン残基)はTG配列を水素結合で認識する(図5：実際には、TとGの相手のCと直接に水素結合を形成していることに注意)。しかし、このDNA結合モチーフをもちながら、これとは異なる共通配列を認識する一群の転写因子も知られている。例えば、Pap1はその1つで、NxxAQxxFRという配列を塩基配列認識部位にもち、d(TTACGTAA)という塩基配列を認識する。Pap1-DNA複合体では、中央のアラニンの1つがQ(グルタミン残基)に置換することによって、Nの側鎖が立体的に押しやられて、最初のTのみ認識してお

図11 神経線維芽腫瘍II型の病因タンパク質MerlinのFERMドメイン構造。(Structure of the FERM domain of neurofibromatosis type 2 protein, merlin.) 左図はRadixinとMerlinのFERMドメインの重ね合わせ。中図と右図は患者から単離された変異のMerlinのFERMドメイン上での位置。

り、代わりに、そのQが続くTA配列を水素結合で認識することが明らかとなった。また、Cを置換したF(フェニルアラニン)は、TT配列の2つのメチル基との疎水的な相互作用を通して、この配列認識に寄与していた。一般に、タンパク質の機能を論じる際に、機能部位に高度に保存された配列は同じ機能をもつと仮定する。しかし、Pap1-DNA複合体構造は、どんなに高度に保存された残基でも、周りの配列によってコンホメーションを変化させることによって、異なった相互作用をすることを明示しており、少しずつ、アミノ酸配列を変異させながら、多様なDNA塩基配列を認識可能としてきた進化のからくりの一端を垣間見た気がした。なお、ロイシン・ジッパーどうしの会合の特異性については最近の総説に要約した。²⁵⁾

総括すると、DNA塩基配列を認識する転写因子のDNA結合ドメインには、いく種類かの構造モチーフが存在するが、これらの精密な解析により、同一のDNA結合モチーフの塩基配列認識の多様性の機構や、ほかの実験では決定不可能であった特殊な認識配列の決定に成功した。これらの複合体構造を含んだ核酸と核酸-タンパク質複合体の構造論や、転写因子-DNA複合体構造の一般論はほかの総説を参考にしてもらいたい。^{26),27)}

4. 核酸によるタンパク質機能制御：Gタンパク質 Rhoとシグナル伝達系

核酸は遺伝情報の担い手であるが、細胞内シグナル伝達系においても重要な役割を果たしている。例えば、ヌクレオチドの1つATPは、生体系のエネルギー源の1つとしてのみならず、タンパク質リン酸化のリン酸供給源としてきわめて重要である。真核細胞ではタンパク質リン酸化と脱リン酸化酵素が発達しているが、原核細胞中では、より省エネのリン酸転移反応が主流である。そこで、手始めに、このリン酸転移反応に重要なまったく新規な機能ドメインの構造を明らかにした。²⁸⁾ 一方、いくつかはヌクレオチドは情報分子として直接に重要な役割を担っている。その1つにグアニンヌクレオチドがある。グアニンヌクレオチドは、Gタンパク質(あるいはGTP結合タンパク質、正確にはGTPaseなので酵素である)と呼ばれる一群のタンパク質によって認識される。Gタンパク質はGTPに結合することによって、その構造を変化させて、情報の流れのスイッチを「on」することが知られている。この活性型はGTPase活性によりGDP結合型に変換され、活性を失う(スイッチ「off」)。Gタンパク質への興味は古くからあり、阪大時代に恩師富田研一教授のもとで学生らとともに、Gタンパク質の原型であるタンパク質合成系で重要な役割を果たしているポリペプチド鎖延長因子(EF-Tu、遺伝子名はtuf)の遺伝子を高度高熱菌からクローニングしたことがある。²⁹⁾

Gタンパク質のなかで、分子量2万程度の低分子量Gタ

ンパク質と呼ばれるものは特に真核細胞の細胞内シグナル伝達で重要である。その1つであるRasは癌原遺伝子産物として有名であったが、そのほかにもいくつかの種類があり、機能分化していることがわかり始めていた(細菌にもいくつかの低分子量Gタンパク質があることが最近のゲノム研究からわかっている)。そこで、癌の浸潤や転移とも深くかわり、細胞骨格を制御しているヒト由来の低分子量Gタンパク質Rhoに注目して、GTPアナログとの複合体構造を決定した。この構造により、Rhoのスイッチ機構を明らかにするとともに、Rasとの相違点などを明らかにした。³⁰⁾ 特に、スイッチ領域の1つであるswitch Iが、大きく広がっていることは注目に値した(図6の上部に広がっている)。また、標的タンパク質の1つであるタンパク質キナーゼPKNとの複合体の構造決定に成功して、Rhoの標的分子認識の詳細を解明した(図7)。³¹⁾ これは、Gタンパク質としてまったく新規な認識様式であり、しかも、それは前の論文で指摘したswitch Iの構造変化の広がった部分を中心に結合していた。³⁰⁾ この頃は、代表的な低分子量Gタンパク質の標的タンパク質の認識機構が次々と解明された時期であったが、驚いたことに、どれ1つとして同じものがなかった。³²⁾ これは、低分子量Gタンパク質が、Gドメインという共通の基本骨格をもちながらも、異なった分子認識能をもつことにより、機能的に分化していることがわかった。タンパク質の構造と機能との関係が、一般に考えられているような単純なものではないことを示唆している。さらに、マグネシウムイオンを含まない結晶構造を決定して、スイッチ機構のもととなる構造変化のおおもとがGTPやGDPとともに結合しているマグネシウムイオンであることを明らかにした。³³⁾ GDP結合型からGTP結合型への変換にはGEF(グアニンヌクレオチド交換因子)という触媒タンパク質が必要であるが、これがマグネシウムイオン結合部位へ直接に働いてイオンの脱離を促進することがヌクレオチド交換機能の重要なステップであることが直後に証明されて、われわれの結果を支持した。³⁴⁾ Rhoファミリーの低分子量Gタンパク質の構造生物学は最近の総説で概説した。^{35),36)}

5. 構造細胞生物学へ：細胞内シグナル伝達系

シグナル伝達系での研究をさらに発展させて、Rhoシグナルの制御下にある細胞接着・細胞骨格の重要な制御因子などの構造機能研究に踏み込んでいった。例えば、細胞接着と細胞骨格を結ぶタンパク質の1つであるERMタンパク質は、通常は機能部位がマスクされた状態で細胞質に存在する(図8)。そこへ、Rhoを経由するシグナルがくると、細胞膜リン脂質の1つであるイノシトール2リン酸(PIP2)の合成酵素、ERMタンパク質をリン酸化するタンパク質キナーゼが活性化される。このPIP2の結合やリン酸化によって、ERMタンパク質は活性のある開いた状態

に変換される。³⁷⁾ 開いた状態の ERM タンパク質の FERM ドメインは、接着分子の細胞質部分などを認識する。真核細胞に特異的なイノシトールリン酸は、単なる膜構成成分ではなく、細胞増殖や細胞接着・骨格を制御するタンパク質群の活性化に働く重要なシグナル分子であり、その認識は 10 kDa 程度の比較的小さな PH (plekstrin homology) ドメインやその類縁ドメインで認識されるとされていたが、35 kDa と比較的大きい FERM ドメイン (3つのサブドメインをもつ) が、2つのサブドメインを動員して、PIP2 に結合することを明らかにした。³⁸⁾ また、この新規な結合はサブドメインの 1つ (図 9, Subdomain C) に構造変化を誘起して、活性のある開いた状態への移行を促進することを明らかにした。また、ERM タンパク質の標的接着分子の 1つである ICAM-2 (白血球の血管内皮への結合などに関与) の細胞質テールとの複合体の構造を決定した。³⁹⁾ その結果、従来知られていた細胞質ペプチド認識ドメイン、SH2 ドメイン (リン酸化チロシンの認識) SH3 ドメイン (ポリプロリンモチーフ、PxxP モチーフ)、PTB ドメイン (NPxY モチーフ)、あるいは PDZ ドメイン (ペプチド C-末端の-TxL モチーフなど) とまったく異なる配列モチーフ、RxxTYxLxxA、を認識することを明らかにした (図 10)。これにより、相互作用する細胞質タンパク質が未知であった多くの接着分子がこの配列をもち、ERM タンパク質群と相互作用することがわかった。

この ERM タンパク質群には、Merlin と呼ばれるタンパク質がある。Merlin は、神経線維芽腫瘍 II 型 (Neurofibromatosis type 2, NF2) の原因遺伝子がコードするタンパク質であり、Merlin の異常により細胞接着機能の低下などが原因となって、両側聴神経の異常に伴い、髄膜腫、脊髄腫瘍などの神経系腫瘍が同時に多発する。われわれはこの Merlin の FERM ドメインの構造解析を行い (図 11)、この FERM ドメインが ERM タンパク質と同様の接着分子の認識機能をもつことや、その機能が NF2 患者から見つかった突然変異の大部分が、この FERM ドメイン上にあり、FERM ドメインの機能を破壊していることを明らかにした。⁴⁰⁾ さらに詳しい細胞骨格・接着制御系や FERM ドメインについては総説を参考にさせていただきたい。⁴¹⁾

6. 構造生物学の黄金時代へ

1970 年初頭に、Harvard 大の若い結晶学徒であった S. C. Harrison と Don C. Wiley (2001 年の暮れに亡くなった) は、いかにして structural molecular biology (構造分子生物学) を打ち立てるかを夢見たという。⁴²⁾ 日本では主に構造生化学として発展してきたが、この何年かで構造細胞生物学を日本で興すことができたと思う。Harrison によれば、今後、さらにこれらが融合して、ほかの生物学との相補性を打ち立てる必要があるという。⁴³⁾ いずれにしても、強力な結晶学を背景に、生物学や医学上重要な分子を狙い撃ちできる

時代になったのである。

構造分子生物学の手始めとしての転写因子の研究を始めてから、現在の細胞生物学中心の研究に至るまでに 10 年以上かかったが、その間には、新規の抗酸化タンパク質であるペルオキシレドキシン HBP23 の構造決定や、⁴⁴⁾ 補酵素ビオプテリンの生合成の律速酵素である GTP シクロヒドロラーゼ I とその制御タンパク質 GFRP との複合体の構造、⁴⁵⁾ あるいは、脳に高発現する記憶に関与するセリンプロテアーゼであるニューロブシンの構造決定^{46),47)} など、構造生化学も楽しんだ。また、これらの構造生物学と細胞生物学、分子生物学、あるいは生化学との溝を埋めることも意図して、いくつかの雑誌に特集を組んだりもしたので、興味のある方にはご一覧いただきたい。⁴⁸⁾⁻⁵⁰⁾ 理路整然として美しい結晶学に比べて、構造生物学はとりとめののないもののように見えるかもしれないが、それは複雑系における分子間/分子内相互作用の研究の一形態である。

本稿は、2003 年度の結晶学会学術賞の受賞論文として執筆した。しかし、論文というよりは essay となってしまった感がある。いずれにしても、自分の研究を振り返る良い機会になった。若い研究者への参考になればとも思っている。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、多くの方々のご指導、ご協力を得た。記して感謝の意を表したい。大阪大学名誉教授 富田研一教授と池原森男教授には阪大時代にご指導ご鞭撻いただいた。MIT の Alexander Rich 教授には留学でお世話になった。大阪大学名誉教授・大嶋泰治教授、京都大学理学部・柳田充弘教授、東京大学医学部・谷口維紹教授、名古屋大学医学部・貝淵弘三教授、京都大学医学部・月田承一郎教授、早智子教授には、共同研究をとおしてご鞭撻いただいた。また、横浜市立大学・清水敏之助教授には奈良の研究室の立ち上げなどでご協力いただいた。

文 献

- 1) IUPAC-IUB Joint Commission: *Eur. J. Biochem.* **131**, 9 (1983).
- 2) T. Hakoshima, T. Fukui, M. Ikehara and K. Tomita: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **78**, 7309 (1981).
- 3) N. G. A. Abrescia, A. Thompson, T. Huynh-Dinh and J. A. Subirana: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**, 2806 (2002).
- 4) A. H. Wang, G. J. Quigley, F. J. Kolpak, J. L. Crawford, J. H. van Boom, G. van der Marel and A. Rich: *Nature* **282**, 680 (1979).
- 5) H. -J. Wang, T. Hakoshima, G. van der Marel, J. H. van Boom and A. Rich: *Cell* **37**, 321 (1984).
- 6) H. -J. Wang, G. Ughetto, G. J. Quigley, T. Hakoshima, G. van der Marel, J. H. van Boom and A. Rich: *Science* **225**, 1115 (1984).
- 7) 箱嶋敏雄, 富田研一: 新生物化学実験講座 第 2 巻 “核酸—II. 構造と性質” (日本生化学会編), p. 311, 東京化学同人 (1991).
- 8) 箱嶋敏雄: 蛋白質 核酸 酵素 **45**, 595, (2000).
- 9) S. Nishikawa, H. Morioka, H. J. Kim, K. Fuchimura, T. Tanaka, S. Uesugi, T. Hakoshima, K. Tomita, E. Ohtsuka and M. Ikehara: *Biochemistry* **26**, 8620 (1987).

- 10) K. Gohda, K. Oka, K. Tomita and T. Hakoshima: *J. Biol. Chem.* **269**, 17531 (1994).
- 11) T. Hakoshima, S. Toda, S. Sugio, K. Tomita, S. Nishikawa, H. Morioka, K. Fuchimura, T. Kimura, S. Uesugi, E. Ohtsuka and M. Ikehara: *Protein Engineering* **2**, 55 (1988).
- 12) T. Hakoshima, S. Tanaka, T. Itoh, K. Tomita, T. Amisaki, S. Nishikawa, H. Morioka, S. Uesugi, E. Ohtsuka and M. Ikehara: *Protein Engineering* **4**, 793 (1991).
- 13) T. Hakoshima, T. Itoh, K. Tomita, K. Gohda, S. Nishikawa, H. Morioka, S. Uesugi, E. Ohtsuka and M. Ikehara: *J. Mol. Biol.* **223**, 1013 (1992).
- 14) W. -C. Lam, A. H. Maki, T. Itoh and T. Hakoshima: *Biochemistry* **31**, 6756 (1992).
- 15) T. Amisaki, T. Hakoshima, K. Tomita, S. Nishikawa, S. Uesugi, M. Ikehara, S. Yoneda and K. Kitamura: *Chem. Pharm. Bull.* **40**, 1303 (1992).
- 16) 箱嶋敏雄, 池原森男: 分子生物学の進歩 第3巻 “蛋白質の機能構造” (分子生物学会編: 編集担当 池原森男, 三浦謹一郎, 京極好正), p.167, 丸善, 東京 (1990).
- 17) 箱嶋敏雄: 蛋白質 核酸 酵素 増刊号「核酸化学の新展開」, p.1627, 共立出版 (1995).
- 18) T. Hakoshima, Y. Teranishi, T. Ohira, K. Suzuki, M. Shimizu, M. Shirakawa, Y. Kyogoku, N. Ogawa and Y. Ohshima: *J. Mol. Biol.* **229**, 566 (1993).
- 19) A. Toumoto, T. Shimizu, M. Shimizu, Y. Kyogoku, N. Ogawa, Y. Oshima and T. Hakoshima: *Acta Crystallogr.* **D53**, 103 (1997).
- 20) Y. Fujii, T. Ohira, Y. Kyogoku, T. Toda, M. Yanagida and T. Hakoshima: *Acta Crystallogr.* **D54**, 1014 (1998).
- 21) M. Kusumoto, Y. Fujii, Y. Tsukuda, T. Ohhira, K. Uegaki, Y. Kyogoku, T. Taniguchi and T. Hakoshima: *J. Struct. Biol.* **121**, 363 (1998).
- 22) T. Shimizu, A. Toumoto, K. Ihara, M. Shimizu, Y. Kyogoku, N. Ogawa, Y. Oshima and T. Hakoshima: *EMBO J.* **16**, 4689 (1997).
- 23) Y. Fujii, M. Kusumoto, T. Shimizu, Y. Kyogoku, T. Taniguchi and T. Hakoshima: *EMBO J.* **18**, 5028 (1999).
- 24) Y. Fujii, T. Shimizu, T. Toda, M. Yanagida and T. Hakoshima: *Nature Struct. Biol.* **7**, 889 (2000).
- 25) T. Hakoshima: *Nature Encyclopedia of the Human Genome*, Vol.3, p.679, Nature Pub. Group (2003).
- 26) 箱嶋敏雄: シリーズ・ニューバイオフィジックス3「構造生物学とその解析法」(日本生物物理学会編), p.49, 共立出版社 (1997).
- 27) 箱嶋敏雄: 「ゲノムからの情報発現: 転写因子とその機能」, p.73, スプリンジャー・フェアラーク (2000).
- 28) M. Kato, T. Mizuno, T. Shimizu and T. Hakoshima: *Cell* **88**, 717 (1997).
- 29) M. Satoh, T. Tanaka, A. Kushi, T. Hakoshima and K. Tomita: *FEBS Lett.* **288**, 98 (1991).
- 30) K. Ihara, S. Muraguchi, M. Kato, T. Shimizu, S. Kuroda, K. Kaibuchi and T. Hakoshima: *J. Biol. Chem.* **273**, 9656 (1998).
- 31) R. Maesaki, K. Ihara, T. Shimizu, S. Kuroda, K. Kaibuchi and T. Hakoshima: *Molecular Cell* **4**, 793 (1999).
- 32) I. R. Vetter and A. Wittinghofer: *Science* **294**, 1299 (2001).
- 33) T. Shimizu, K. Ihara, R. Maesaki, S. Kuroda, K. Kaibuchi and T. Hakoshima: *J. Biol. Chem.* **275**, 18311 (2000).
- 34) D. K. Worthylake, K. L. Rossman and J. Sondek: *Nature* **408**, 682 (2000).
- 35) T. Hakoshima, T. Shimizu and R. Maesaki: *J. Biochem. (Tokyo)* **134**, 327 (2003).
- 36) 箱嶋敏雄: 生化学 **74**, 日本生化学会, 1237 (2002).
- 37) H. Ishikawa, A. Tamura, T. Matsui, H. Sasaki, T. Hakoshima, Sh. Tsukita and Sa. Tsukita: *J. Mol. Biol.* **310**, 973 (2001).
- 38) K. Hamada, T. Shimizu, T. Matsui, Sh. Tsukita, Sa. Tsukita and T. Hakoshima: *EMBO J.* **19**, 4449 (2000).
- 39) K. Hamada, T. Shimizu, S. Yonemura, Sh. Tsukita, Sa. Tsukita, T. Hakoshima: *EMBO J.* **22**, 502 (2003).
- 40) T. Shimizu, A. Seto, N. Maita, K. Hamada, Sh. Tsukita, Sa. Tsukita and T. Hakoshima: *J. Biol. Chem.* **277**, 10332 (2002).
- 41) 浜田恵輔, 箱嶋敏雄: 蛋白質 核酸 酵素 **46**, 共立出版, 1929 (2001).
- 42) S. C. Harrison: *Cell* **108**, 313 (2002).
- 43) S. C. Harrison: *Nature Structural Biology* **11**, 12 (2004).
- 44) S. Hirotsu, Y. Abe, S. Okada, N. Nagahara, H. Hori, T. Nishino and T. Hakoshima: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**, 12333 (1999).
- 45) N. Maita, K. Okada, K. Hatakeyama and T. Hakoshima: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**, 1212 (2001).
- 46) T. Kishi, M. Kato, T. Shimizu, K. Kato, K. Matsumoto, S. Yoshida, S. Shiosaka and T. Hakoshima: *J. Biol. Chem.* **274**, 4220 (1999).
- 47) T. Oka, T. Hakoshima, M. Itakura, S. Yamamori, M. Takahashi, Y. Hashimoto, S. Shiosaka and K. Kato: *J. Biol. Chem.* **277**, 14724 (2002).
- 48) 箱嶋敏雄編: 「特集: 構造生物学が解明するシグナル伝達: 三次元構造から機能を探る」, 細胞工学 **18**, 秀潤社, 1453 (1999).
- 49) 箱嶋敏雄編: 「特集: 大きな構造フレームで捉えるシグナル伝達」, 蛋白質核酸酵素 **46**, 共立出版, 1915 (2001).
- 50) 稲垣冬彦, 箱嶋敏雄編: 「特集: 構造生物学の最前線」, 生化学 **74**, 日本生化学会, 1226 (2002).

プロフィール

箱嶋敏雄 Toshio HAKOSHIMA

奈良先端科学技術大学院大学情報科学研究科情報生命科学専攻 (構造生物学分野), CREST・科学技術振興機構

Structural Biology Laboratory, Graduate School of Information Science, Nara Institute of Science and Technology, CREST, Japan Science and Technology Agency

〒630-0192 奈良県生駒市高山町 8916-5

8916-5 Takayama, Ikoma, Nara 630-0192, Japan

e-mail: hakosima@bs.naist.jp

URL: <http://bsw3.naist.jp/hako/>

最終学歴: 1982年大阪大学大学院薬学研究科博士課程修了

専門分野: 構造生物学, 生化学, 分子細胞生物学, 結晶学

現在の研究テーマ: 細胞内シグナル伝達, 核酸・タンパク質の分子認識と機能制御