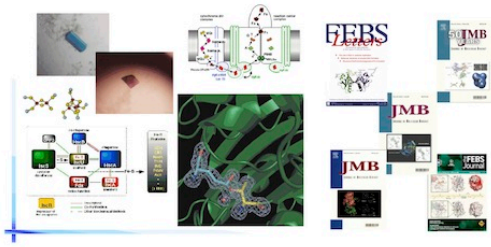
タンパク質の"かたち”から薬をデザインする
(細胞レドックスバランス維持システムの分子メカニズムの解明)

医学系物質科学分野 和田　啓　**Structural Biology, Wada Lab.**

研究コンセプト

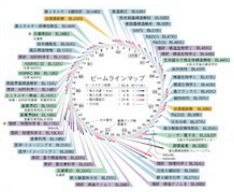
生体内では特有の反応を行うタンパク質が秩序正しく働いて生命が維持されています。当研究室では生体内レドックスバランス（酸化還元状態）の維持に必須ないくつかの系に焦点を当て、それらに関与する一連のタンパク質の高次構造、生合成、機能の解明に取り組んでいきます。

当研究室では、X線結晶構造解析を柱とし、分子生物学・生化学・分光学的な手法を駆使した研究の展開により、複雑な分子メカニズムの視覚化を進めています。X線は、その波長が通常の光より一万倍も短く、この光を使うことで分子の立体構造を決めることができます。研究対象は、鉄硫黄クラスター合成の酵素群、グルタチオン代謝系、過酸化水素消去系、ウイルス等です。一見すると無秩序に見えますが、これらのターゲットに共通しているのは、"機能発現に伴う蛋白質のダイナミックな構造変化"です。これらのタンパク質の立体構造を解析し、生物学的な様々な反応をミクロな分子機械の働きとして捕らえることで、その反応の分子機構を解明しようとしています。さらに、将来的には立体構造をベースとして薬（阻害剤）を開発する"ドラッグデザイン"（SBDD or FBDD）を目指しています。



タンパク質や核酸などの生体高分子は特有の立体構造をとってはじめて機能を発揮します。これらの分子の働きを明確に理解するため、X線結晶解析法で原子レベルの分解能で立体構造を決定しています。ここではタンパク質そのものの立体構造だけでなく、他のタンパク質や基質と相互作用している状態や、反応過程状態にある構造も解析しています。当研究室には、生化学的・分子生物学的実験装置はもちろん、解析用ワークステーションとソフトウエアを整備しています。さらに大型放射光施設 SPring-8 の放射光を積極的に利用して、構造解析のスピードと精度を向上させています。様々な生体反応をミクロな生物分子機械の働きとして捕らえ、タンパク分子が持つ精緻な反応メカニズムを解明しようとしています。

□型放射光施設 SPring-8□ 航空写真（1～2ヶ月に一回は測定に行きます。兵庫県・西播磨）



構造生物化学とは・・・

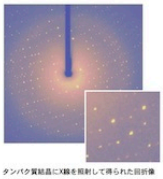
発現と精製

X線結晶解析には、精製された純粋なタンパク質から良質の結晶を得る必要があります。当研究室では、大腸菌・酵母・昆虫細胞等を使って目的の蛋白質を作らせます。研究ターゲットのタンパク質をコードした DNA を発現ホストに導入し、目的蛋白質を大量に発現させます。その後ホストを破砕し、精製を行うことでホスト由来の余分な蛋白質や核酸などを除き、目的のタンパク質を精製します。この行程では高機能の精製マシーンを駆使して実験を進めます。

X線回折像の撮影

X線発生装置から出たX線は、結晶によって散乱されます。X線は後方にあるCCD検出器に規則的な斑点を与えます。様々な方向からX線を照射し、全ての回折斑点のX線の強度を収集します。

□型放射光施設 SPring-8□ 実験ハッチ内



タンパク質結晶にX線を照射して得られた回折像

タンパク質は結晶になる

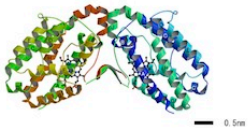
各々のタンパク質は一定の構造を持っています。タンパク質を適当な条件におくと結晶化します。タンパク結晶の色や大きさ、形は、タンパク質の種類や結晶化の条件によって様々です。その一部を紹介します。

回折データから分子の構造が見える

回折データを解析用ワークステーションで処理すると、分子の電子密度が現れます。電子密度から、タンパク質のアミノ酸配列を参考にして、タンパク質のモデルを構築します。このようにして、電子顕微鏡よりはるかに詳細な分子構造がわかります。

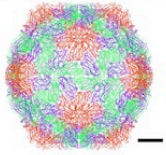
0.2nm

電子密度と構築した分子モデル



0.5nm

タンパク質分子のリボン図

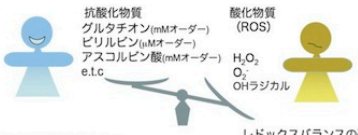


2 nm

ウイルスの立体構造（ワイヤーモデル）

細胞レドックスバランス維持システムの分子メカニズム ―ドラッグデザインの基盤造り―

酸化ストレスによる細胞障害の発生源は多岐に渡っており、一義的な決定は困難です。そのため、生体による酸化障害回避では発生源のコントロール、過酸化物の除去機構など様々な防御機構を備えています。当研究室では、酸化障害防御と発生源に関連する蛋白質超分子複合体の分子メカニズムの解明を進めています。生体内のレドックスバランスが破綻すると種々の神経変性疾患や肝ガンの亢進を引き起こします。本研究は細胞機能の基礎的な研究であると同時に、応用研究への現実的な発展性を包括しています。



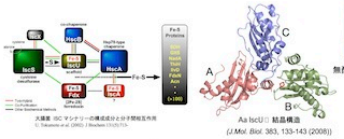
細胞内レドックスバランス維持の根幹に関わる系に着目

当研究室の研究ターゲットは、鉄硫黄クラスターの生合成系、グルタチオン分解酵素に加え、ウイルスの感染機構の解明、光合成生物の光酸化ストレス応答/防御機構など多岐にわたっています。一見すると無秩序に見えますが、これらのターゲットに共通しているのは、"機能発現に伴う蛋白質のダイナミックな構造変化"です。当研究室の研究は、蛋白質超分子複合体が備えた見事なまでに秩序化された複雑な構造変化や成分間の相互作用を、自然科学の共通言語である「原子・電子」による化学反応として捉え、生理機能を可視化することが特色といえます。

鉄硫黄クラスター形成の分子機構

鉄は全ての生物に必須な微量金属であると同時に、細胞毒性の高いフリーラジカルの発生源となり、神経変性疾患やフリードライヒ症候群を亢進します。そのため、細胞内の鉄代謝は厳密且つ巧妙にコントロールされています。近年の鉄代謝調節機構研究から、従来想定されていた細胞質鉄プールではなく、ミトコンドリアで生成される鉄硫黄(Fe-S)クラスターやヘムを介して鉄濃度変化をコントロールすることが見えてきました。

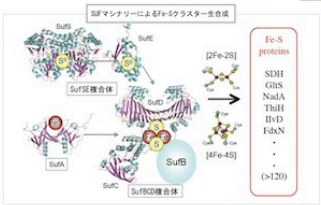
本研究で焦点を当てているFe-Sクラスターは、蛋白質のコファクターであり、普遍的な機能を担っています。例えば、生体内エネルギーの反応場であるミトコンドリアでは呼吸鎖複合体群に、葉緑体では光合成反応中心複合体で電子伝達を担うのがFe-Sクラスターです。さらに、細胞内の鉄濃度センサーもFe-Sクラスターが中心的な機能を果たします。バクテリア（大腸菌）では、全ORFの3%以上（120種類）がFe-S蛋白質であり、その種類はヘム蛋白質を凌駕します。これらの蛋白質のコファクターであるFe-Sクラスターがどこで、どのように生合成されるのかを、結晶学・生化学・遺伝学的な手法により展開してきました。



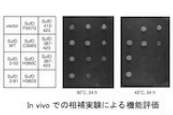
大腸菌 ISC マシナリーの構成成分と分子間相互作用
C. Takahashi et al. (2002) J Biochem (132),721A

Aa IscU□ 結晶構造
(J.Mol. Biol. 383, 133-143 (2008))

無酸素条件を実現する嫌気チャンバー



SufDへの変異導入部位

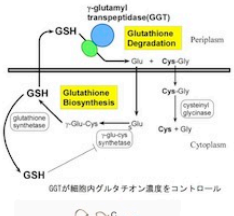


In vivo での相補実験による機能評価

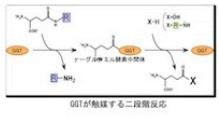
(FEBS Lett. 579, 6543-6548 (2005))
(FEBS Lett. 580, 137-143 (2006))
(J.Mol. Biol. 387, 245-258 (2009))
(PLoS ONE, e21977 (2011))

γ-グルタミルトランスペプチダーゼの構造と機能の解析

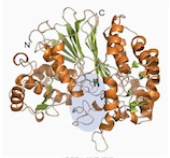
γ-グルタミルトランスペプチダーゼ（GGT）は細菌から哺乳類まで幅広い生物が持ち、グルタチオンなどのγ-グルタミルの転移反応と加水分解を触媒します。グルタチオンは、ほぼすべての生物において生体内での主要な還元剤哺乳類では、本酵素の機能不全は動脈硬化や腎障害、バーキンソン病を引き起こし、さらにガン細胞への多剤耐性への関与も報告されています。我々は、本酵素の立体構造だけでなく、基質・阻害剤結合型や反応中間体の構造も解析してきました。今後、反応機構の詳細を解明し、ヒトGGTに特異的な阻害剤開発の基礎の構築を目指します。



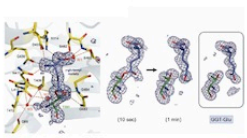
GGTが細胞内グルタチオン濃度をコントロール



GGTが触媒する二段階反応



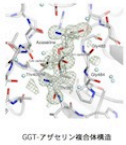
GGT□ 結晶構造



γ-グルタミル酵素中間体□ 電子密度とそ□ 経時変化

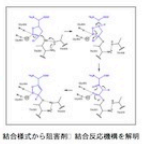
(PNAS,103, 6471-6476 (2006))
(J.Biol. Chem.282,2433-2439 (2007))

阻害剤の結合様式を可視化



GGT-アザセリン複合体構造

GGT-アシビシン複合体構造



結合様式から阻害剤□ 結合反応機構を解明

(J. Mol. Biol., 380, 361-372 (2008))
(FEBS J., 277, 100-1009 (2010)) 他

学院生募集中

研究室は、2012年4月にで　たばかりのラボです。
宮崎大学"初"の構造生物学ラボで一緒にサイエンスを楽しみませんか？
研究内容に興味がある方（バックグラウンドは問いません）、実際にラボを見て頂いた方が雰囲気がわかってもらえると思います。まずは気軽にコンタクトを！

連絡先：和田啓（TT助教）
清武キャンパス 総合教育研究棟7階G701
TEL:0985-85-0873, E-mail:kelwada@med.miyazaki-u.ac.jp