

タンパク質のかたちとはたらき

1

タンパク質のかたちとはたらき

タンパク質とは、細胞を構成し生物が生きていくうえで必要な活性物質(酵素など)としてもっとも重要なはたらきをする、複雑な構造の窒素を含む有機化合物である。ヒトの身体を構成している数十兆個の細胞内では、常にさまざまな種類のタンパク質が合成され、

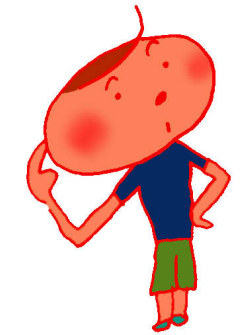
ある一定の機能を発揮したのち分解されている。生命現象を理解するためには、タンパク質がどのようなかたちをしていて、どのようにはたらいているかを知ることが必要である。しかし、タンパク質分子は非常に小さく(1mmの1万分の1以下)、光学顕微鏡などで見ることはできない。そこで、タンパク質の結晶を作製し、それに強いX線を当ててることによってタンパク質分子のかたちを調べる方法(タンパク質X線結晶構造解析)が開発されて活用されている。世界で最初のタンパク質の立体構造(図)が決定されたのもX線結晶構造解析の手法を用いたもので、この業績により英国のペルツとケンドルーは1962年のノーベル化学賞を受賞した。また、核磁気共鳴(NMR)や電子顕微鏡などもタンパク質のかたちを決定するのに用いられている。



生物の体を構成しているタンパク質は、20種類のアミノ酸と呼ばれる化合物が鎖のようにつながった巨大分子である。アミノ酸の並び順番、数(数十から数千に及ぶ)などの組み合わせは無限にあり、20個のアミノ酸から膨大な数の多種多様なタンパク質をかたち作ることができる。たとえば、わずか4つのアミノ酸からなる非常に短いタンパク質(通常、ペプチドという)でも、約16万種類の組み合わせが可能となる。

タンパク質は、アミノ酸でできた鎖が特定の立体構造をとることで、初めて本来のはたらきをすることができ、その機能を理解するうえで立体構造を決めることが極めて重要となる。

立体構造には階層性があり、もっとも基本的なレベルでは、 α ヘリックス、 β シートがあり、それらがどのように立体的に配向するかで最終的なかたちが決まる。アミノ酸自体は、主に、炭素、窒素、酸素、水素からなる両親媒性の化合物で、側鎖と呼ばれる部分以外の構造は共通である。つまり、アミノ酸の性質は側鎖の部分の化学的な性質によって決まるといえる。したがって、アミノ酸が並んだタンパク質の性質も、どの側鎖を持つアミノ酸が立体構造上どこに配置するかで決まるといことができ、そのかたちに基づいて酵素反応や電子伝達反応を行ったり、大きな分子複合体を構築してさまざまな機能を発現している。



タンパク質のライフサイクル —生成から分解まで—

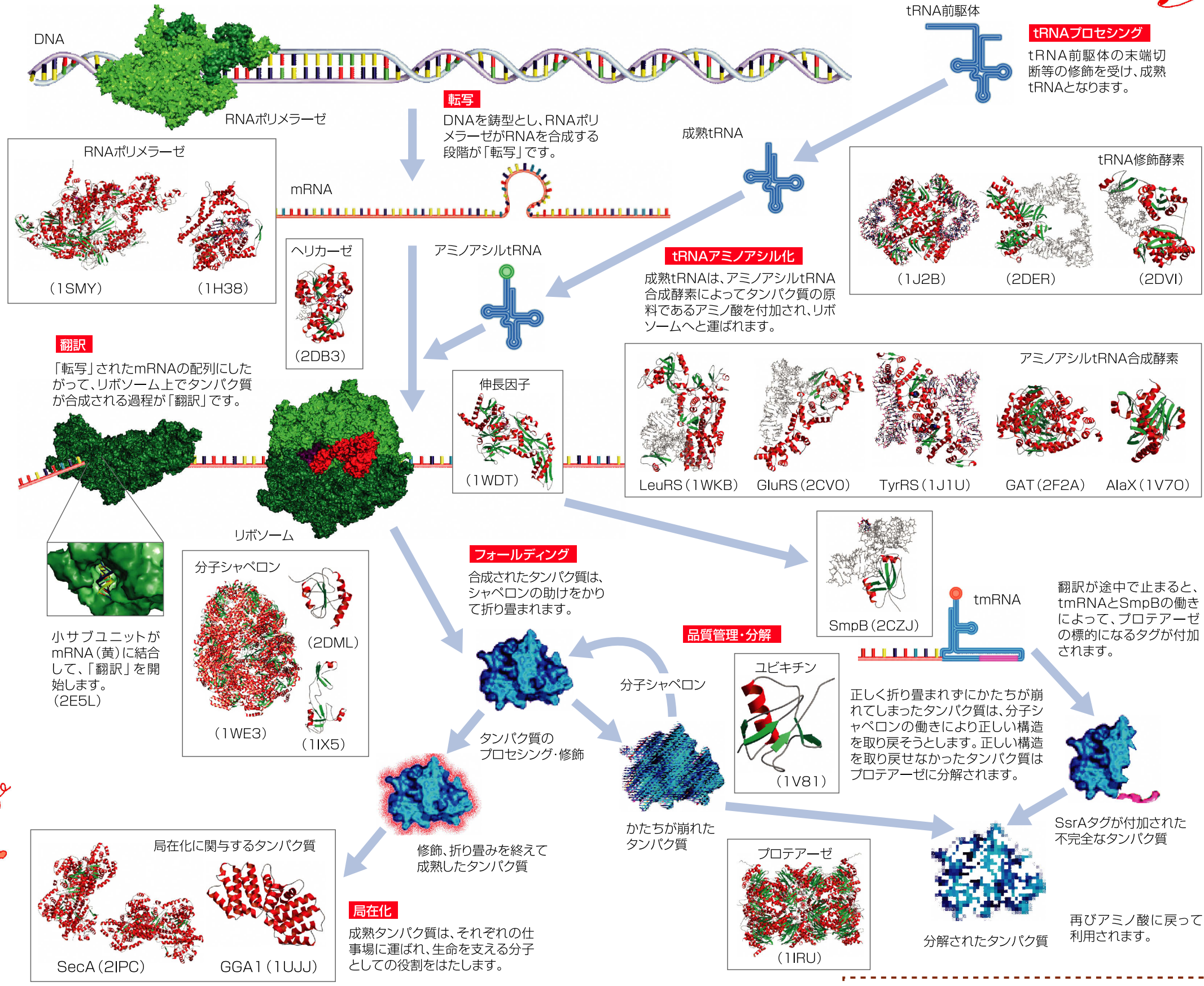
ゲノム(DNA)に書かれている遺伝情報は、mRNAに「転写」され、リボソーム上でタンパク質に「翻訳」される。この際、mRNA上の3文字の塩基配列(コドン)とアミノ酸を結びつけるアダプター分子がtRNAで、アミノ酸をリボソームに運び、アンチコドンと呼ばれる領域でmRNAと対合する。

合成されたタンパク質は、自発的に、あるいはほかのタンパク質のはたらきをかりて、正しく折り畳まれて機能的な分子となる。また、タンパク質は特異的な酵素によってプロセシングが除去されたり、N末端のホルミル基の除去やリン酸化、メチル化、糖鎖の付加などの修飾を受けることもある。

内部ペプチド結合が切断されたり、立体構造が崩れて機能できなくなったタンパク質は、ユビキチン化やN末端修飾などの「分解シグナル」を付加される。また、合成の途中で転写反応が終了したりして生じた不完全なmRNAから翻訳された機能できないタンパク質にも、特殊なタグ配列が付加される。これらの分解シグナルをもつタンパク質は、タンパク質分解系によって、最終的にはアミノ酸にまで分解され、新たなタンパク質を合成する反応に用いられる。

以上すべての反応にタンパク質が関与しており、どこかに異常が生じると病気の原因となることがある。

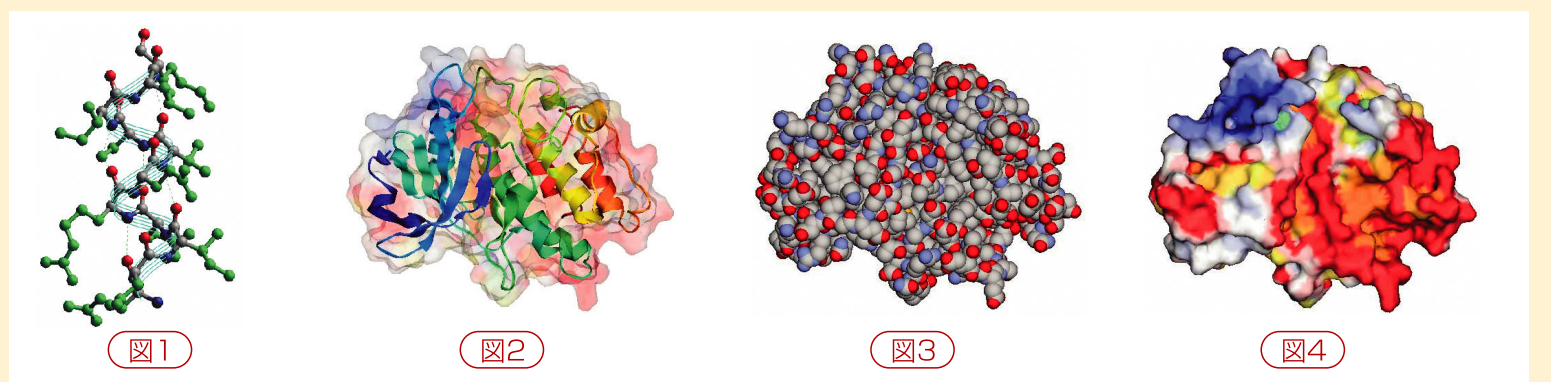
右図に示されるタンパク質は、それぞれの機能を有する一群のタンパク質のうち本プロジェクトで立体構造が決められたもの。カッコ内はPDBコード。



タンパク質の材料となるアミノ酸は20種類

アラニン Alanine Ala	バリン Valine Val	ロイシン Leucine Leu
イソロイシン Isoleucine Ile	グリシン Glycine Gly	プロリン Proline Pro
システイン Cysteine Cys	メチオニン Methionine Met	ヒスチジン Histidine His
フェニルアラニン Phenylalanine Phe	チロシン Tyrosine Tyr	トリプトファン Tryptophan Trp
アスパラギン Asparagine Asn	グルタミン Glutamine Gln	セリン Serine Ser
トレオニン Threonine Thr	リシン Lysine Lys	アルギニン Arginine Arg
アスパラギン酸 Aspartic acid Asp	グルタミン酸 Glutamic Acid Glu	

タンパク質の立体構造の見方とタンパク質構造データベース



立体構造を平面上で表示するのに、ステレオ図を用いることがしばしばある。図1はアミノ酸が規則的ならせん状構造をとる α ヘリックスを示したものの。タンパク質の構造を原子レベルで表す場合、原子を球で、結合している原子間のつながりを棒で、また、炭素は灰色、酸素は赤、窒素は青、硫黄は黄で表示する(図1)。

タンパク質全体をわかりやすく示すときには、主鎖はリボンを用いて表示される(図2)。このリボンには、らせん状(α ヘリックスと呼ぶ)とシート状(β 構造と呼ぶ)の部分がある。タンパク質分子のかさ高さを表現するために充填原子モデル(空間充填モデル)(図3)や、分子表面(図4)モデルが使われる。分子表面モデルでは、原子種ではなくアミノ酸の特性ごとに色を分けたり、静電位などの物理化学的な性質を色で表示することが多い(図4)。特に、正の電位を青、負の電位を赤、疎水性アミノ酸側鎖を黄色で示し、色を重ね塗りすることで性質が理解できるようにしている。

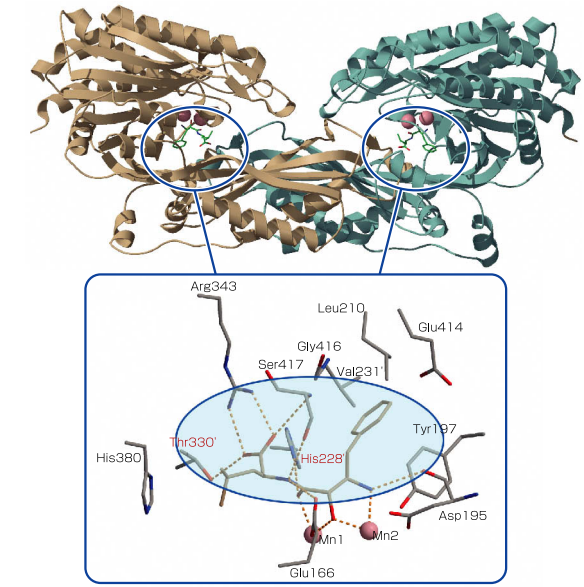
なお、図はすべてDAP(Death Associated protein)キナーゼ(PDBコード:1WVY)の構造を用いている。

PDB▶世界中で解析されたタンパク質の立体構造は、国際的なデータベースのPDB(Protein Data Bank)に登録され、誰でも無料で利用できる。日本では、日本蛋白質構造データバンク(PDBj: <http://www.pdbj.org>)が、登録とデータのダウンロード、その他の解析サービスを行い、「蛋白質構造百科事典」も公開している。

タンパク質の立体構造をもとにした新しい応用

●SARSプロテアーゼ

SARSプロテアーゼは、恐ろしい感染症のSARSウイルスのポリタンパク質が翻訳された後、ウイルスとして正しく機能するために必要なパーツを切り出すのに必要である。SARSプロテアーゼの立体構造を決定することは、SARS治療薬の開発に結びつく。

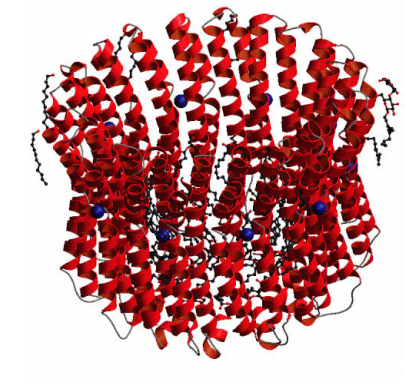


●カルノシン分解酵素

哺乳類の筋肉で合成されて血中に放出されるL-カルノシン(β -alanyl-L-histidine)は、脳の視床下部に作用して自律神経にはたらき、血糖や血圧を低下させ体内環境の恒常性の維持に関与している。運動が、糖尿病や高血圧によりいことを説明する候補因子の一つである。

●心筋収縮をコントロールするタンパク質トロポニンと緑茶由来カテキン(EGCG)

トロポニン3の構造上に、青色で示したEGCGを示しており、これらの領域にEGCGが結合すると考えられている。EGCGは、肥大型および拘束型心筋症の治療薬開発に向けたリード化合物として有望である。

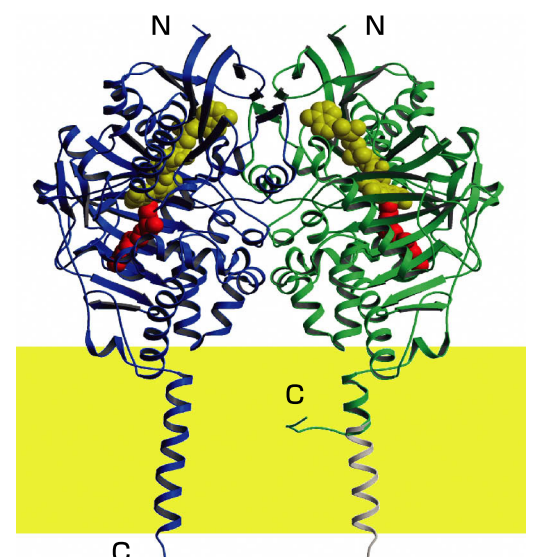


●V型ATPアーゼ

V型ATPアーゼは、生物のありとあらゆる細胞膜に存在し、ATPのエネルギーを使って水素イオンを輸送することで生命活動に必須の役割をはたしている。骨粗鬆症やガン転移などにもかかっている。

●モノアミン酸化酵素

モノアミン酸化酵素はセロトニンなどの神経伝達分子を酸化して神経のはたらきを抑制する。この酵素のはたらきを抑えると神経の活動が亢進されるので、うつ病の治療につながる。



タンパク質の構造を決める主要な方法である、X線結晶構造解析、NMR構造解析、電子顕微鏡構造解析について、それらの基礎となった科学的発見と、それらによって得られた著名な成果を年表にまとめた。

- 1895年 レントゲンがX線を発見(1901年ノーベル物理学賞受賞)
- 1914年 結晶によるX線の回折現象の発見によりラウエがノーベル物理学賞受賞
- 1915年 結晶によるX線の回折理論の確立によってブラッグ父子がノーベル物理学賞受賞
- 1931年 透過型電子顕微鏡の製作
- 1934年 パナールとクロフォートが、ペプシンのX線回折像を観測し、タンパク質が一定の立体構造をとっていることを実証
- 1951年 NMR構造解析の基礎となる、化学シフトおよびスピニング・スピンの発見
- 1962年 ケンドルーとペルツがミオグロビンとヘモグロビンのX線結晶構造解析によりノーベル化学賞受賞
- 1964年 ホジキンがビタミンB₁₂のX線結晶構造解析でノーベル化学賞受賞
- 1965年 リンチーのX線結晶構造解析
- 1978年 球状ウイルスのX線結晶構造解析
- 1982年 クルグが核酸・タンパク質のX線結晶構造解析でノーベル化学賞受賞
- 1988年 ダイゼンホファー、フーバー、ミヒエルが膜タンパク質光合成反応中心のX線結晶構造解析でノーベル化学賞受賞
- 1991年 エルンストがタンパク質のNMR構造解析法でノーベル化学賞受賞
- 1997年 ウォーカーがATP合成酵素のX線結晶構造解析でノーベル化学賞受賞
- 1999年 リボソームのX線結晶構造解析、電子顕微鏡構造解析
- 2002年 ビュートリッヒがタンパク質のNMR構造解析法でノーベル化学賞受賞
- 2003年 マキノンが膜タンパク質イオンチャネルのX線結晶構造解析でノーベル化学賞受賞
- 2006年 コーンバーグがRNAポリメラーゼのX線結晶構造解析でノーベル化学賞受賞



タンパク質のかたちとはたらき 2

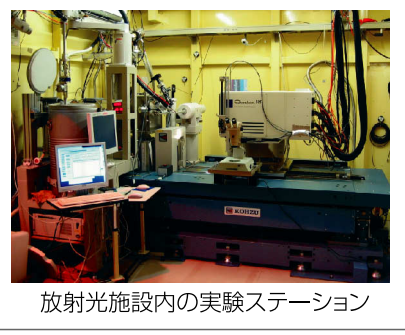
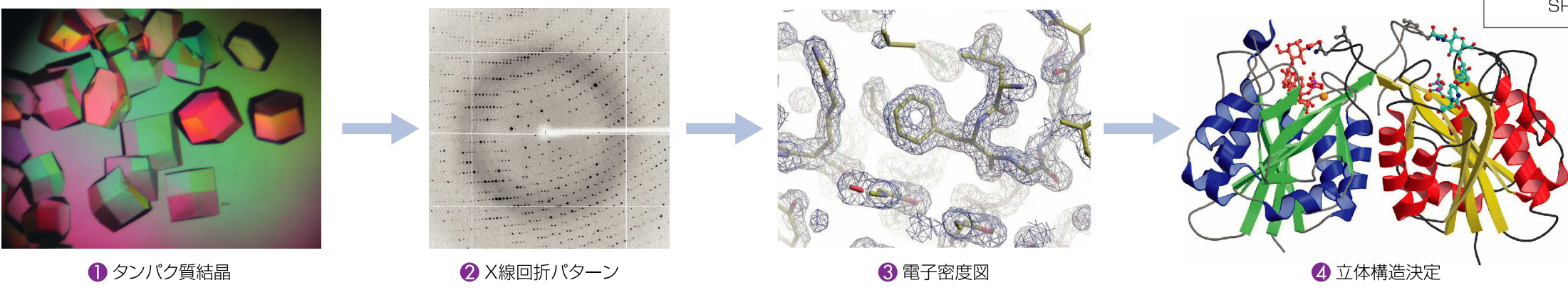
タンパク質構造解析に使われる最新技術

タンパク質の立体構造を原子レベルで解析する手法は、大きくX線結晶構造解析、NMR(核磁気共鳴)を用いたNMRスペクトル解析、電子顕微鏡構造解析に分けられる。X線結晶構造解析では、まず遺伝子操作や生化学的な手法を駆使して目的とするタンパク質を大量に調製して結晶化する。この結晶化が構造解析の律速段階となることが多い。次に、作製した結晶にX線を照射して回折パターンを得る。このとき、強度の強いX線を用いると小さな結晶でも鮮明な回折パターンが得られる。得られた回折パターンと結晶内の標的原子からの位相情報をもとにタンパク質の電子密度図を得て、その電子密度図に化学構造モデルを当てはめてタンパク質全体の構造モデルを構築する。X線結晶構造解析には結晶が必須であるが、全体として構造解析の効率が高い、タンパク質の大きさに制限がない、構造を原子レベルで直接みられること、などの特徴がある。

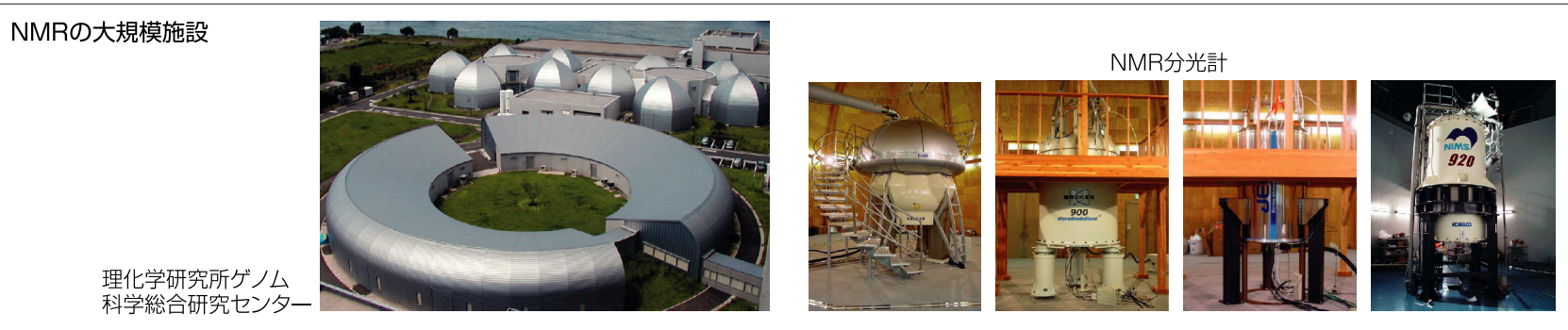
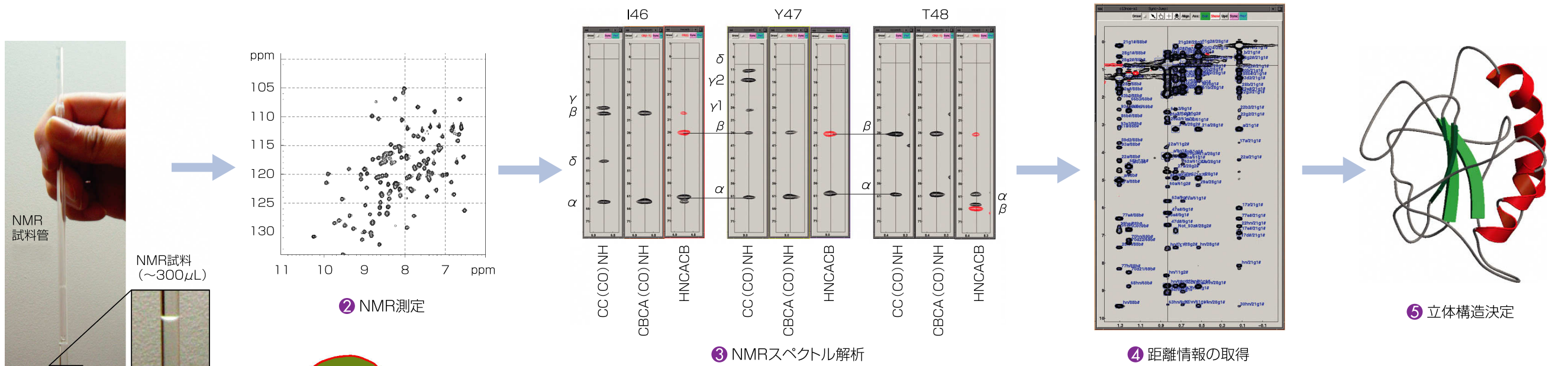
NMRスペクトル解析は、構造決定可能な分子量が10万以下という制約はあるが、水溶液の試料も対象にできるため、結晶化が困難なタンパク質の解析が可能なのが特徴。NMRでは、安定同位体(¹³C、¹⁵N)で標識したタンパク質試料を調製し、いろいろな原子核に対応する電磁波を与え、その応答を観測して各種の多次元NMRスペクトルを得る。このNMRスペクトルを解析して個々のシグナルが20種類のアミノ酸の、どの原子に対応するかを決定する。次に、タンパク質中の水素原子間の距離と角度についての情報などをもとに、最後に立体構造を決定する。

第3の手法は、極低温電子顕微鏡による膜タンパク質の構造解析である。この場合のサンプルは単層から数層の膜タンパク質複合体の2次元結晶であり、個々の膜タンパク質が生体膜にあるときと似通った環境のもとで結晶構造解析ができるという利点がある。また、単粒子解析により、可溶性・脂溶性タンパク質の超複合体の解析が可能になった。

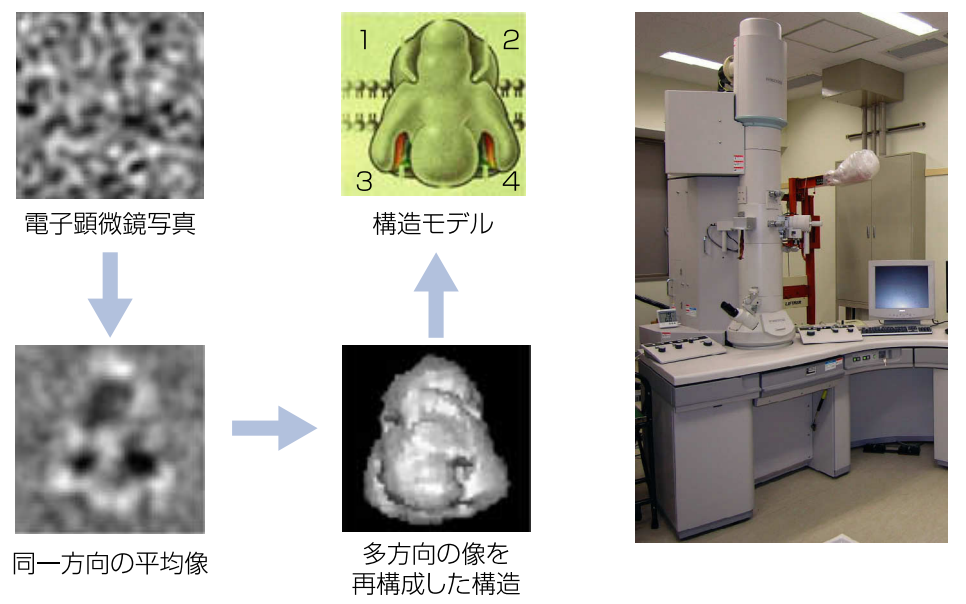
X線結晶構造解析



NMR(核磁気共鳴)



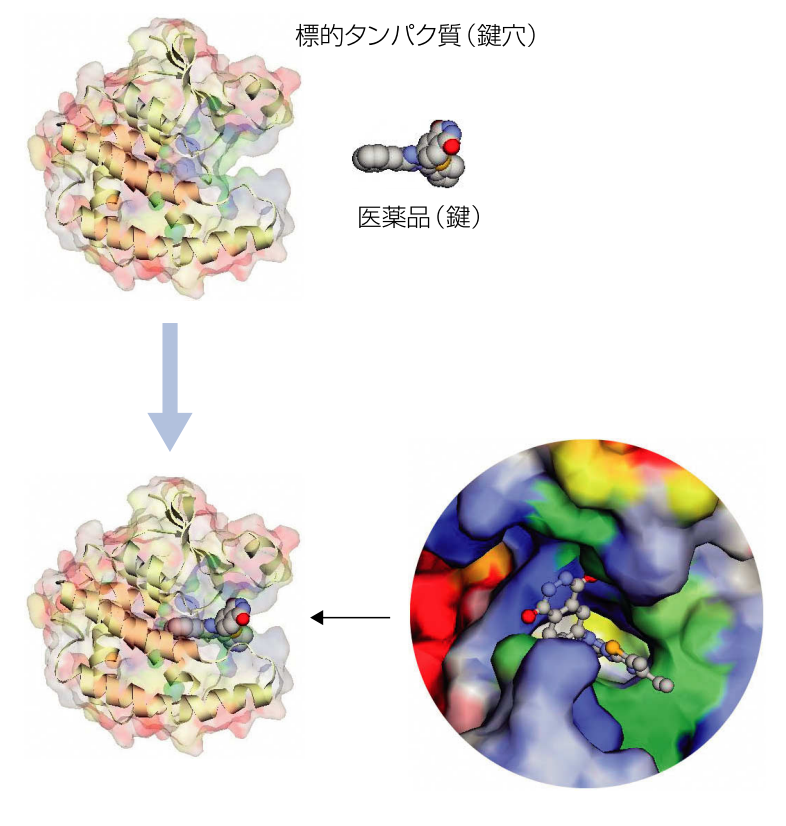
電子顕微鏡 単粒子構造解析



創薬への応用

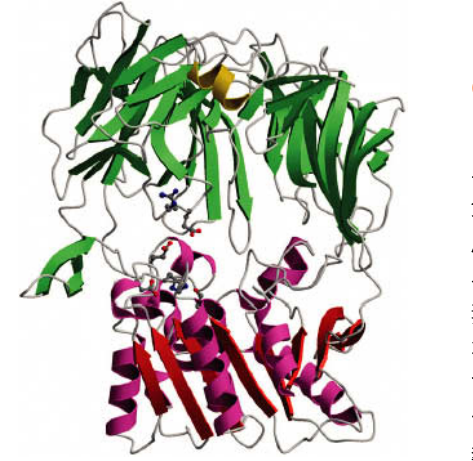
医薬品の標的タンパク質への結合は、鍵と鍵穴の関係にもたとえられる。タンパク質が機能する部位の立体構造(鍵穴)が明らかになると、その鍵穴へ最もよく当てはまる鍵の構造もわかる。鍵を人工的に合成すれば、標的タンパク質のはたらきを抑えたり、はたらきを助けることも可能になる。現在、鍵穴の構造をもとに医薬品を設計・合成する試みがさかんである。

図は、ヒト脳内において免疫反応やアレルギー性炎症反応に関与すると考えられている造血器型プロスタグランジンD₂合成酵素に、その機能を阻害する薬物が結合している様子。右下図は、左下の図で黒い矢印の方から見た図で、タンパク質表面のかたちと、色で表された静電位(青:正、赤:負)と疎水性(黄)が、うまく薬物にフィットしていることがわかる。



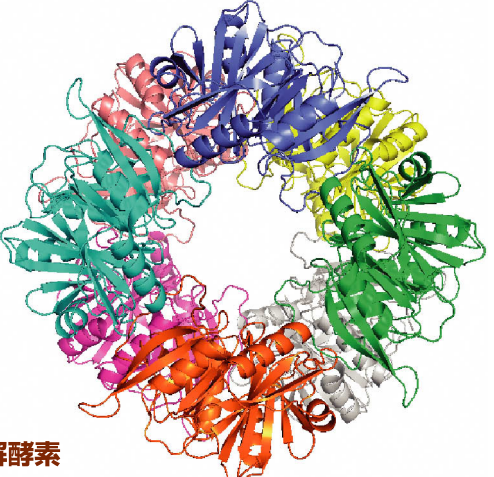
●歯周病菌由来プロリン特異的プロテアーゼ

歯周病の原因菌のもつプロテアーゼ(ペプチド分解酵素)は歯周病の原因酵素である。その一つプロリン特異的プロテアーゼは、病原菌にはみられるがヒトには今のところ存在しないとされており、菌の栄養源を絶つて攻撃的にするための治療薬の開発のターゲットとして有望である。



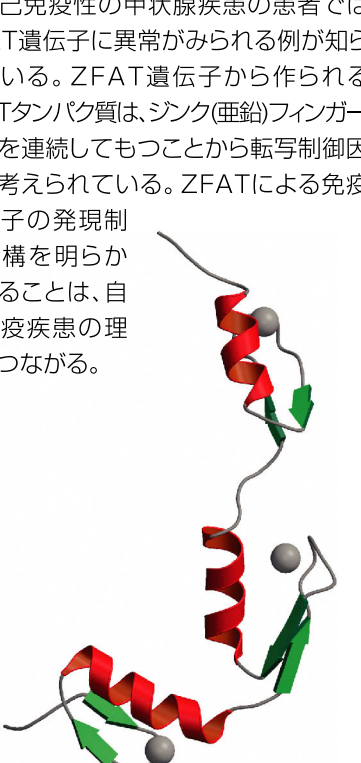
●PCB分解酵素

PCB(ポリ塩化ビフェニル)は、毒性をもつうえに分解処理が難しい。PCBを分解できる微生物のもつ酵素の構造解析で、その酵素反応の仕組みも明らかになってきた。この研究を推し進めることで、さらに毒性の強いダイオキシンを分解する酵素の開発や、未使用の資源であるリグニン(樹木の本質を構成する高分子の芳香族化合物)の有効利用にも活用できると考えられる。上の図はPCB分解系の酵素の一つBphCの全体構造。水酸化されたPCBの芳香環を開裂する。



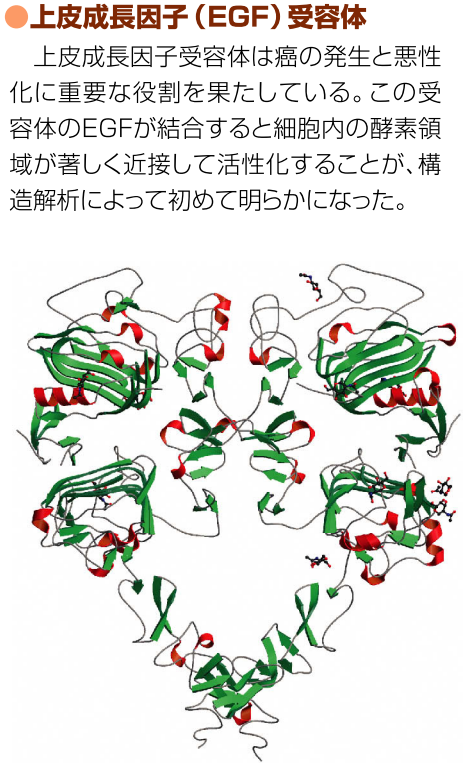
●ZFATタンパク質

自己免疫性の甲状腺疾患の患者ではZFAT遺伝子に異常がみられる例が知られている。ZFAT遺伝子から作られるZFATタンパク質は、ジंक(亜鉛)フィンガー領域を連続してもつことから転写制御因子と考えられている。ZFATによる免疫遺伝子の発現制御機構を明らかにすることは、自己免疫疾患の理解につながる。



●ペプチジルアルギニンデヒミナーゼ4

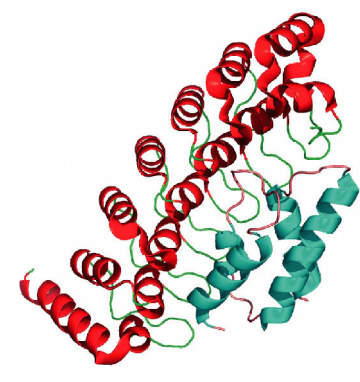
ペプチジルアルギニンデヒミナーゼ4は、ヒストン中のアルギニンをシルリニンに変換する酵素で、関節リウマチの発症にかかわっている。この酵素の立体構造が明らかになったことで、その働きを阻害する物質の開発が可能になり、慢性関節リウマチの根本的な治療薬の実現が期待される。



タンパク質の立体構造をもとにした新しい応用

●上皮成長因子(EGF)受容体

上皮成長因子受容体は癌の発生と悪性化に重要な役割を果たしている。この受容体のEGFが結合すると細胞内の酵素領域が著しく近接して活性化することが、構造解析によって初めて明らかになった。



●ガンキリン

ガンキリンは肝臓癌の原因タンパク質の一種。タンパク質を分解する酵素の一部と結合したり、癌抑制遺伝子がつくりだす物質と複合体を作ってこれを破壊することにより異常な細胞増殖を引き起こすと考えられている。