

資料14-1-1

科学技術・学術審議会
研究計画・評価分科会
宇宙開発利用部会
ISS・国際宇宙探査小委員会
(第14回)H27.4.20

ISSでの次世代タンパク質結晶化への期待

新村信雄

茨城大学フロンティア応用原子科学研究センター

要旨:

宇宙環境(微小重力)下のISSでのタンパク質結晶化:

非常に大きな成果

ISSでのタンパク質結晶化の今後の方向性

従来手法の継続は必須 + 何か他に?

(世界の研究動向を踏まえて)

i) 膜タンパク質の結晶化

ii) タンパク質中性子回折実験用の大型結晶育成

宇宙実験でのこれまでの成果の特徴

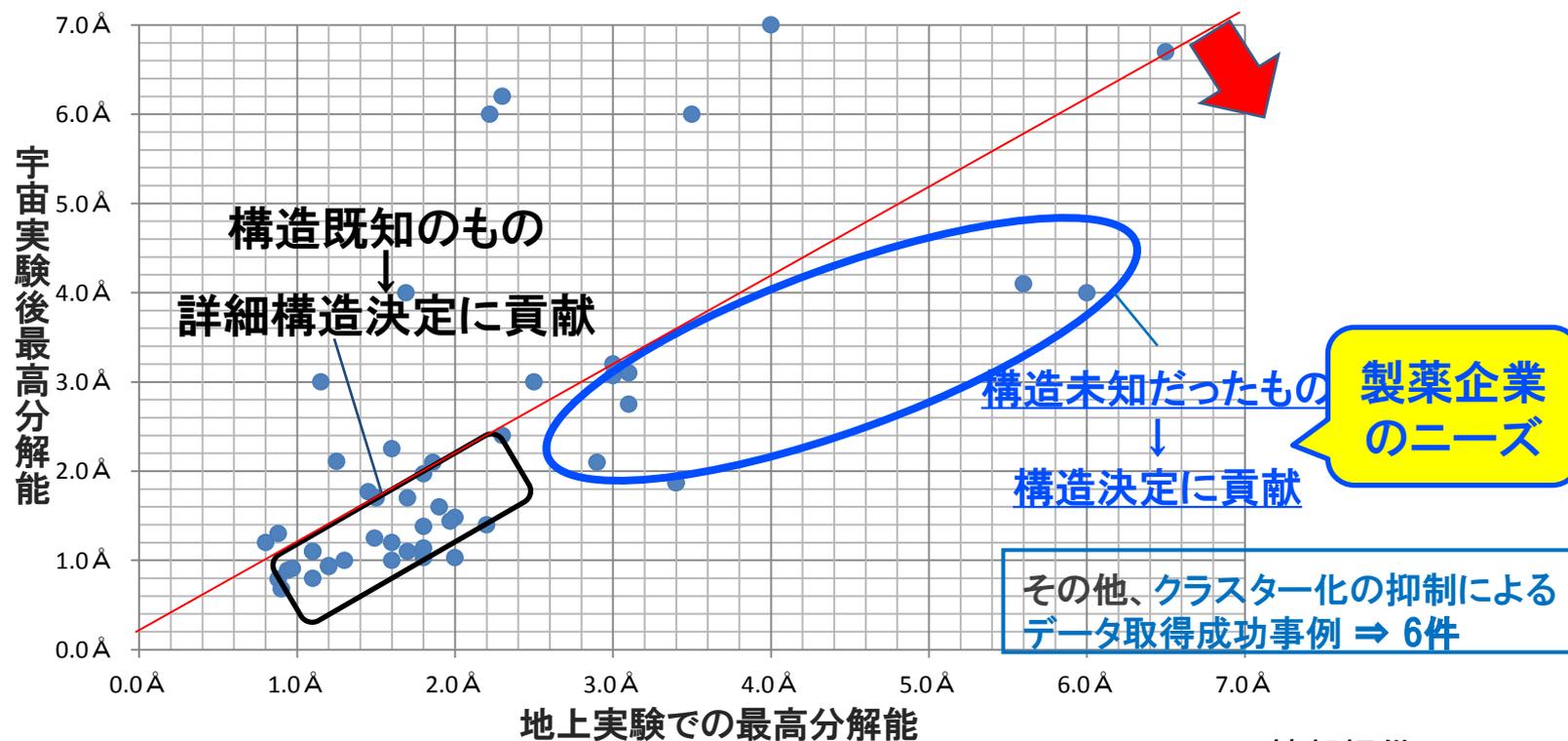
水溶性タンパク質について、宇宙実験による結晶品質の向上によって、X線回折法 (SPring-8)での構造解析の分解能が地上実験よりも向上。

主な成果: 創薬系ターゲットに限る例:

- (a) 抗がん剤(イレッサ)耐性型EGF受容体
- (b) 複数の薬物候補化合物(抗がん剤、抗菌剤、筋ジストロフィー等)の開発
- (c) 世界最高レベルの詳細なN型(高マンノース型)糖鎖の構造情報

なお、現状では、以下については、宇宙実験での技術は確立されていない。

- 膜タンパク質の結晶化
- 大型結晶の育成技術



(情報提供: JAXA)

膜タンパク質の結晶化技術の重要性

生体膜中に存在するタンパク質：膜内外の物質、情報伝達等を媒介する。

約400種類登録 (Protein Data Bank: PDB), (殆ど微生物由来)

c.f. その他タンパク質9万以上 (PDB)

創薬標的タンパク質の大半は膜タンパク質

創薬標的タンパク質に関する構造情報は圧倒的に不足

膜タンパク質の構造研究を難しくしている理由

- 1) 膜タンパク質を生産することが水溶性タンパク質に比べて困難
- 2) 膜タンパク質自身: 不安定、非水溶性 ————> 結晶化が困難

革新的な医薬品開発———> 貴重な膜タンパク質を効率よく且つ高品位に結晶化する技術
を確立することは極めて重要である。

膜タンパク質結晶化法

- 1) 界面活性剤により可溶化———> 水溶性タンパク質と同様の手順で結晶化
- 2) 界面活性剤による膜タンパク質の変成: これを防ぐための新手法: Lipidic Cubic Phase と呼ばれる状態の脂質に膜タンパク質を再構築(LCP法)

地上でも技術未確立な面が多く、地上での技術確立も必須。

膜タンパク質結晶の高品質化・大型化には宇宙実験が必要

中性子タンパク質結晶解析を可能にするための 大型結晶育成

- 1) 構造生物学の最終目標: タンパク質分子の機能解析——> 創薬。
- 2) タンパク質分子の機能解析の主役: 水素原子、水分子の水素原子、プロトン (移動出来る。)
- 3) これを観測可能な技術が中性子回折法である。

中性子回折法: X線回折実験と原理は同一

X線回折法との比較

	中性子	X線
水素、水分子の水素、プロトン	(x, y, z)の座標として観測 (2Å分解能程度)	0.8Å以下で漸く水素原子が見える。但し、座標は得られない。プロトン、水分子水素は不可
放射線損傷	無し (1Åの中性子のエネルギー: 80meV)	あり (1ÅのX線のエネルギー: 12keV)
低温実験	不要	必須
分子の酸化・還元	無し	あり (分子構造変化の可能性あり。)
線源強度	X線の5~10桁以下	
大型結晶	解析に必要な大きさ: ~1mm ³ 地上でこの大きさの生成は困難多い	10μm程度でも解析可能

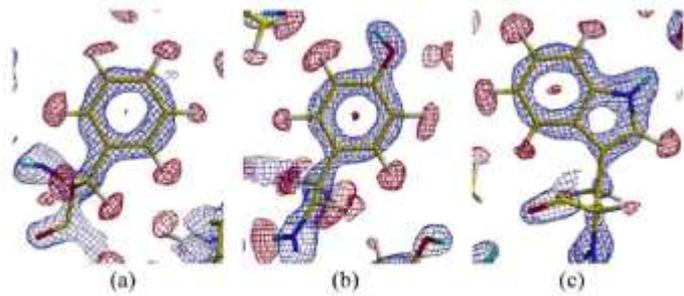
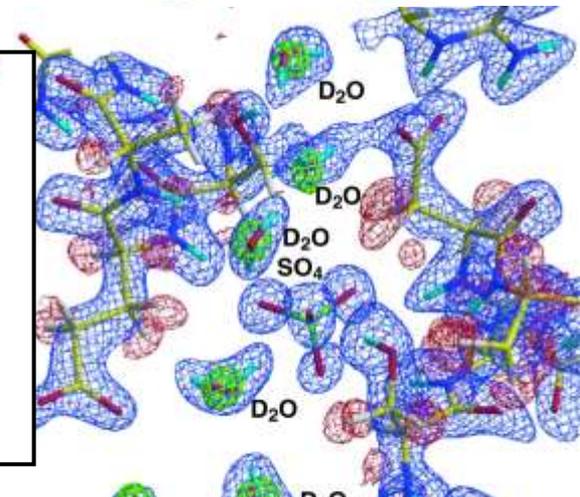
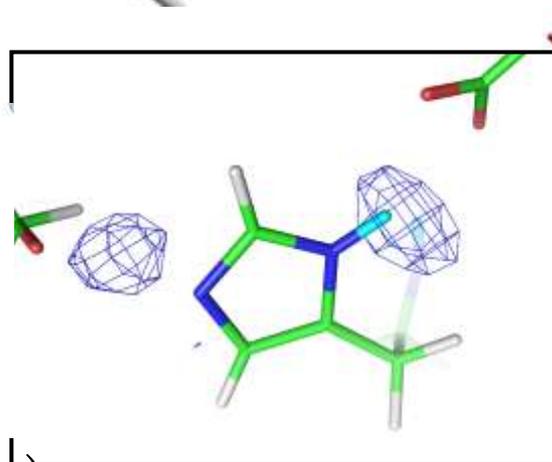
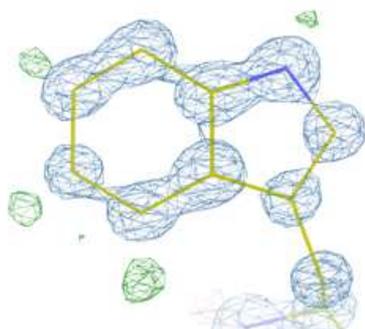
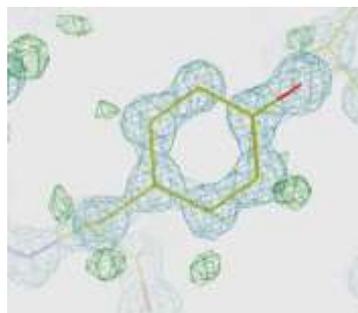
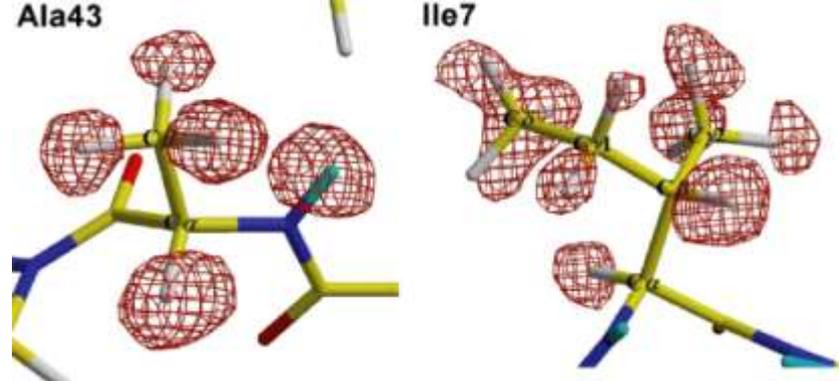
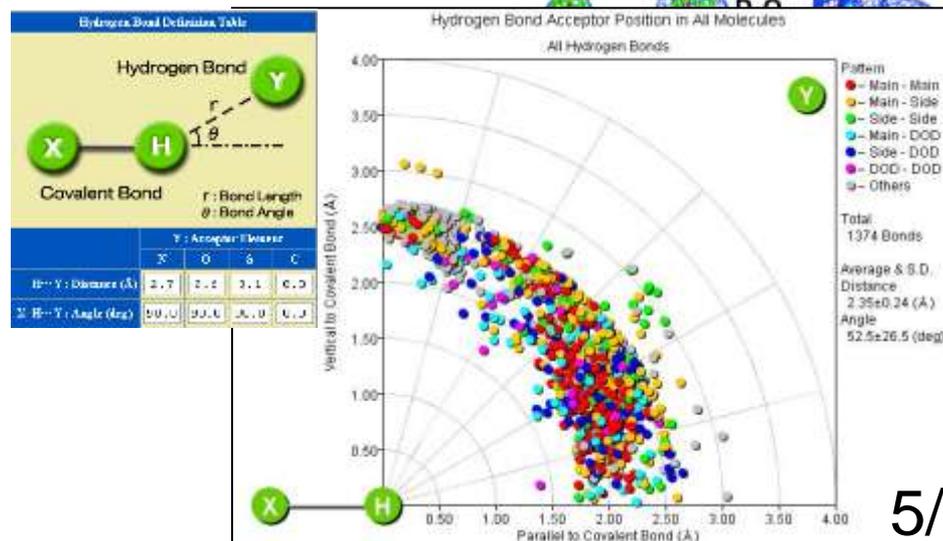


Fig. 1

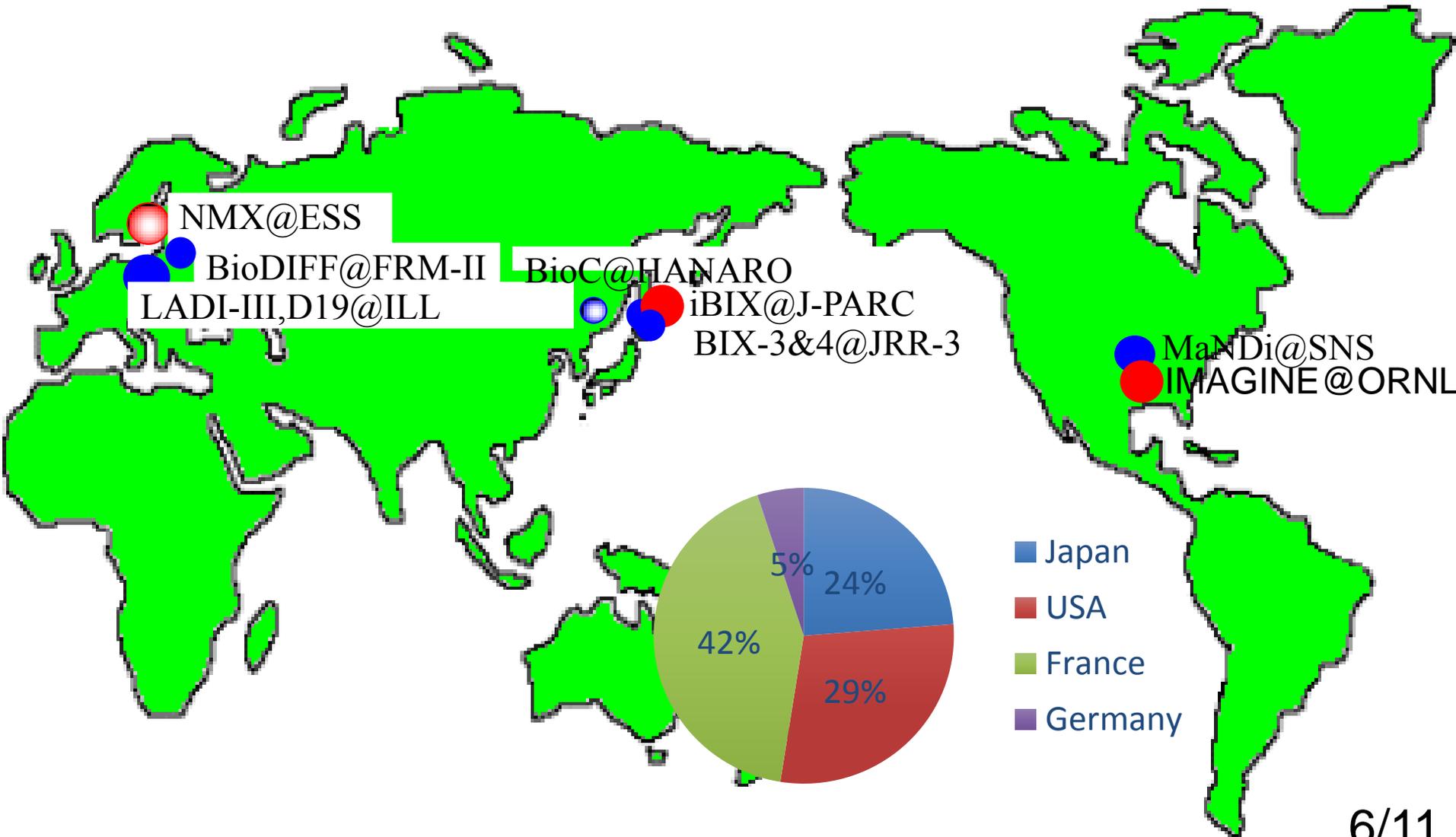


c.f. 超高分解能X線結果(0.7Å分解能)

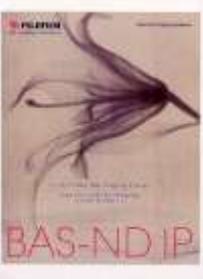
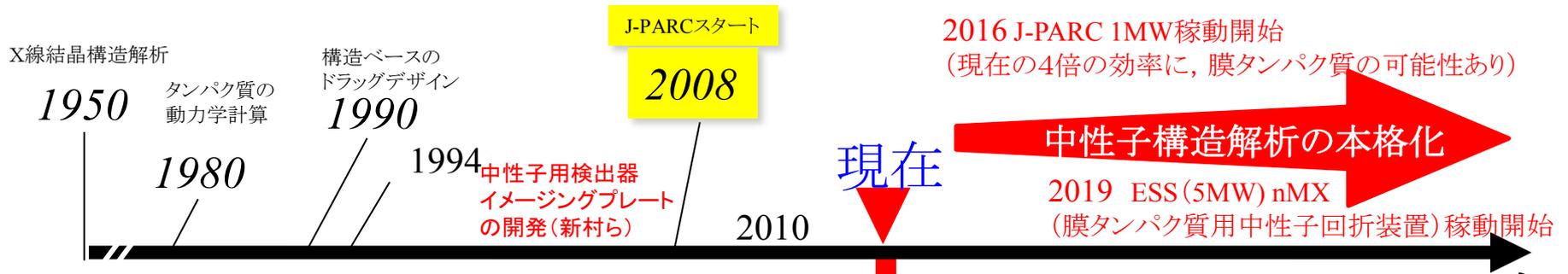
中性子回折法は
 水素原子位置, プロトン位置、
 水分子の水素原子位置
 を座標(x, y, z)で表現できる。
 ——> 定量的機能解析可能
 ——> ラショナルな創薬



Neutron diffractometers for protein crystallography



代表的な世界のタンパク質中性子解析装置について

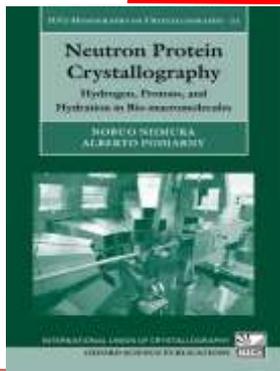


LADI (ILLフランス) 中型タンパク質



JRR-3 BIX-3,4 (原子力機構) 低分子+タンパク質

PCS (LANSCE米国ロスアラモス) タンパク質



iBIX (J-PARC日本) 中型タンパク質・低分子

MaNDi (SNS米国オークリッジ) 中型タンパク質

nMX (ESS欧州) 膜タンパク質

定常炉 (Steady-state reactor)

パルス中性子 (Pulsed neutron)

中性子イメージングプレート
の開発等、日本初の技術で
世界の中性子解析分野を
リードしてきた。



世界的に中性子解析でタンパク質を解析する必要性が認知され、世界最強強度の中性子施設の最初期に設置される回折装置の一つにタンパク質解析装置 (nMX) が選ばれた (STAP会議)。

宇宙空間での大型結晶育成の優位性

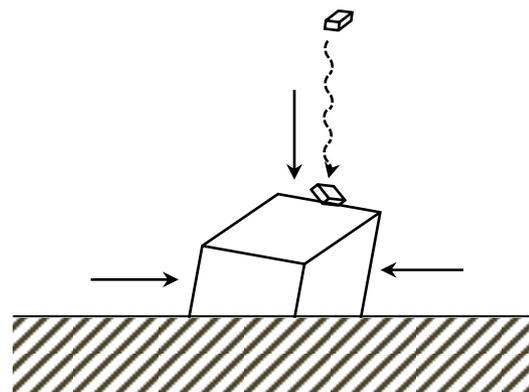
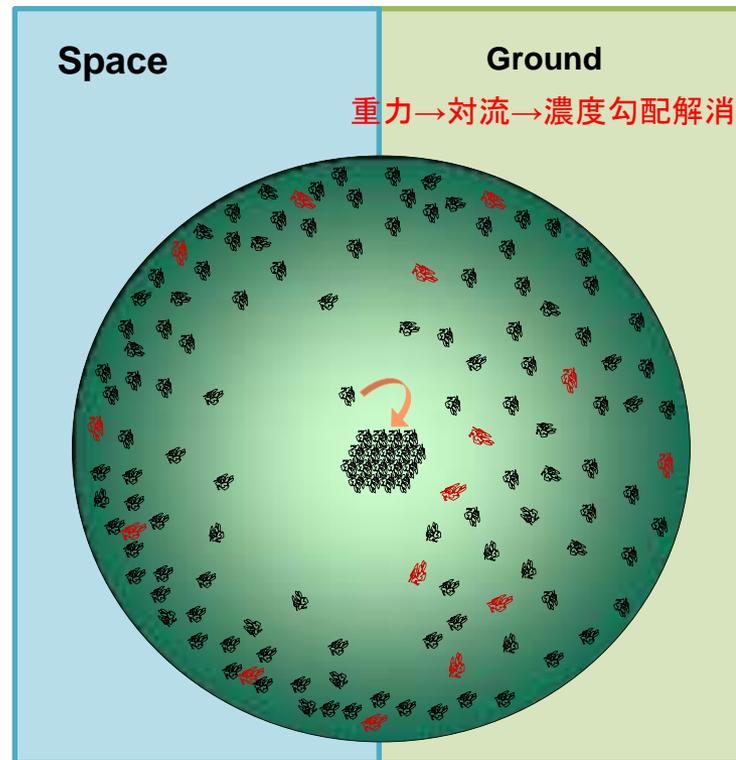
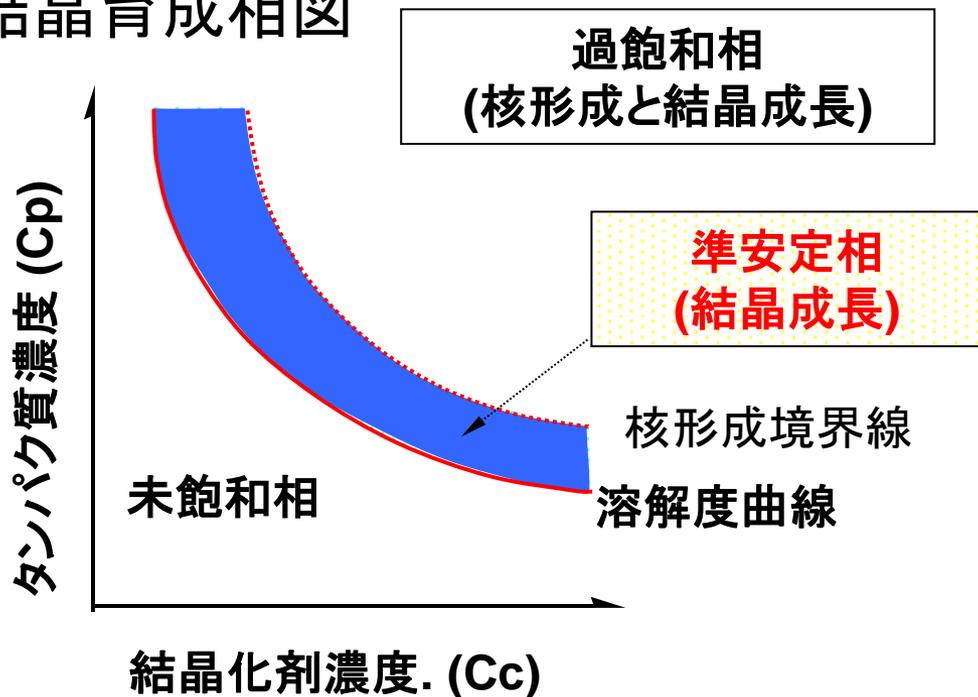
Space--→結晶核を中心にしたタンパク質濃度勾配→高品質タンパク質結晶

大型結晶育成の有利さ

- 1)タンパク質濃度勾配――→増強
- 2)結晶の沈降がない。
- 3)全方位からタンパク質接近結晶化
- 4)他結晶の沈降付着がない。

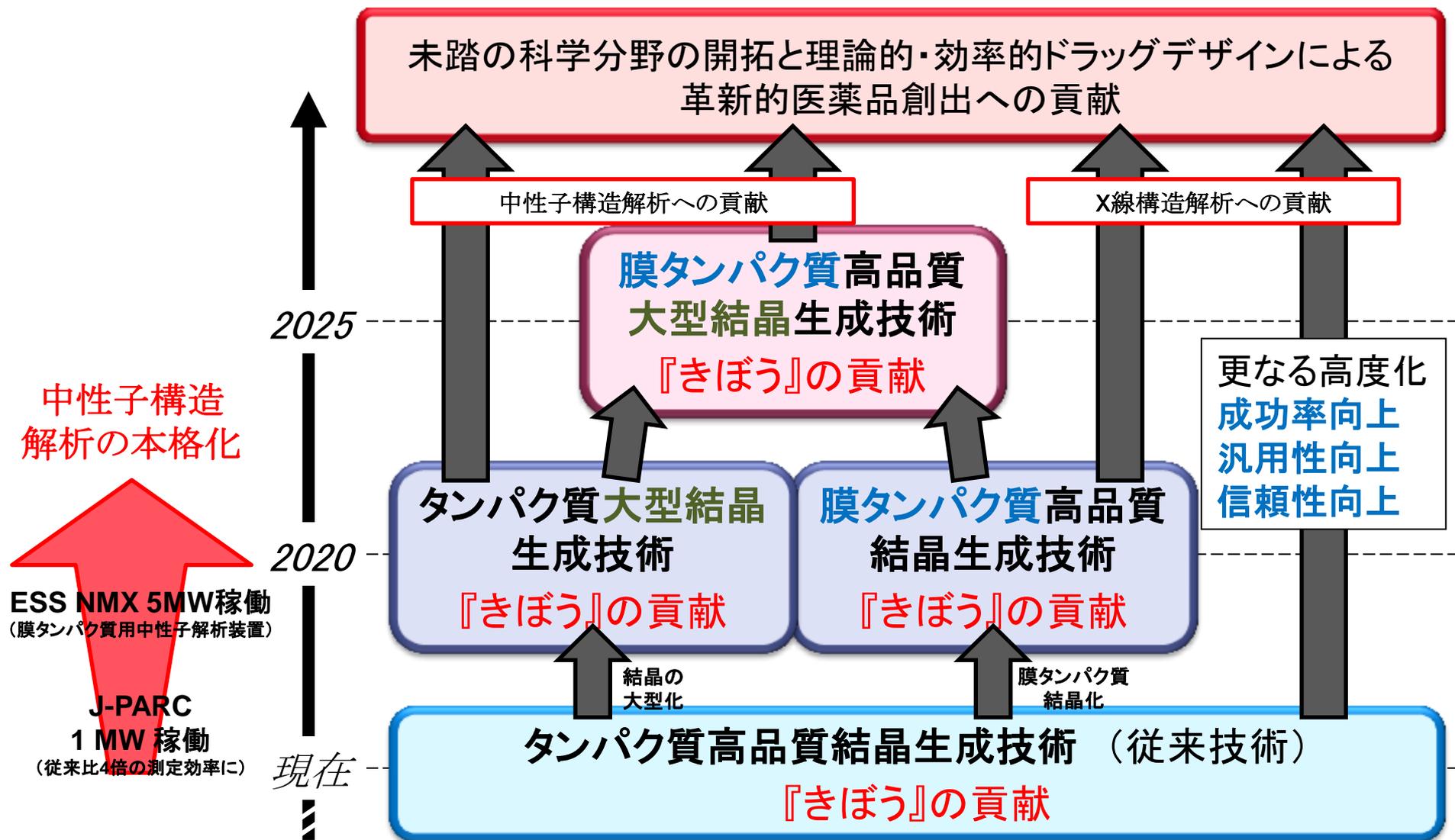
地上での大型結晶育成法原理は確定

結晶育成相図



まとめ

今後の国際宇宙ステーションにおけるタンパク質結晶化実験への期待
～構造生物学における世界動向と微小重力下結晶化技術のスケジュール対比～



まとめに代えて(エピローグ)

- 1989年: nature誌:中性子の構造生物学への寄与は少ないと、された！！
- 1994:neutron imaging plateの実用化--→中性子タンパク質結晶解析の復活、フランス、米国、ドイツそしてヨーロッパで大展開。
- 1997年7月:米国細胞生物学会勧告、2000年末:米国NRC勧告:
宇宙空間でのタンパク質結晶育成の意義は小さい、とされた！！
- 2010年:JAXAを中心に微小重力下でのタンパク質結晶育成法を確立

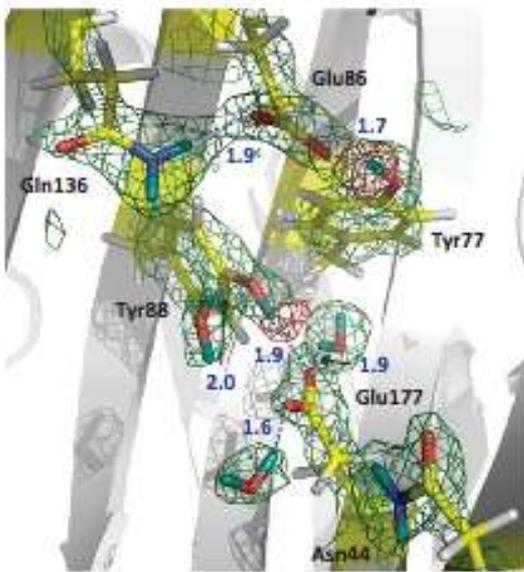
I have a dream. (by Martin Luther King)

葬られそうになった技術を蘇らせ(新しい科学再興させた)日本の底力をもう一度！！！！

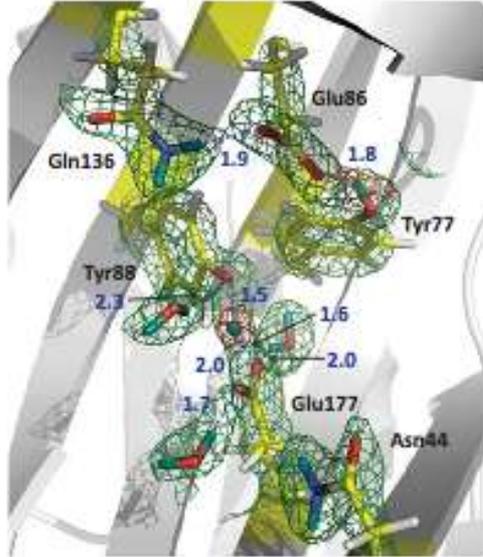
膜タンパク質の中性子結晶解析:nMX@ESSでのMain Topicsになっている。
日本が、微小重力下での膜タンパク質大型結晶育成を成功させ、
日本から中性子結晶解析、rationalな創薬の情報発信する。

I have a dream.！！！！！！

参考:最新の日本、世界のNPC成果 (中性子でしか観測出来ない)

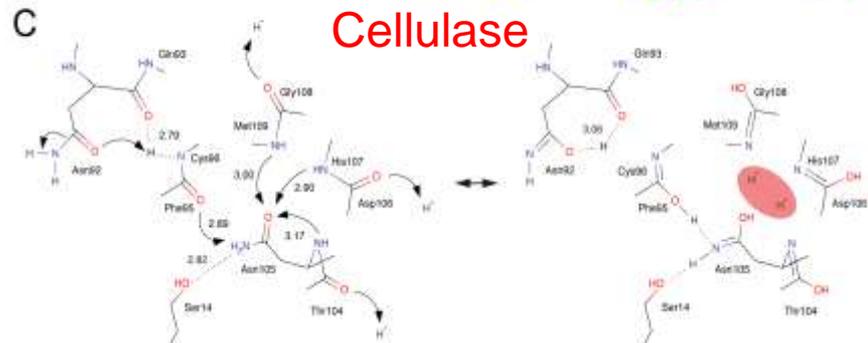
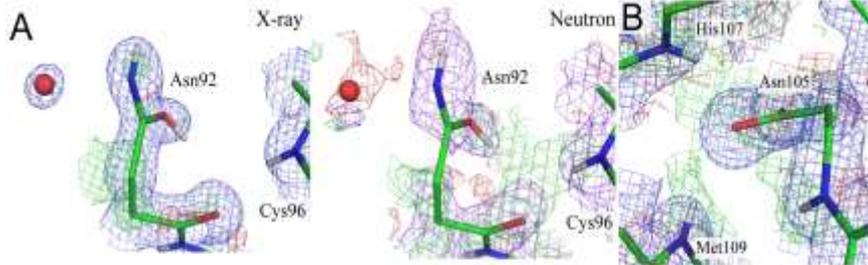


XynII – pH5.8

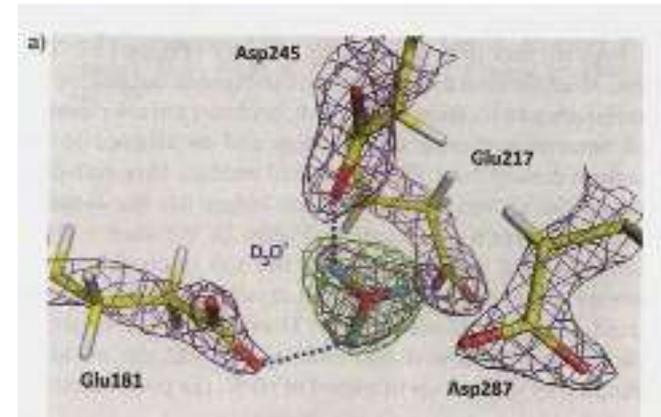


XynII – pH8.5

グリコシド加水分解酵素キシラナーゼ

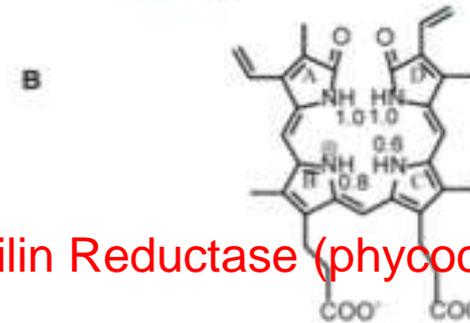
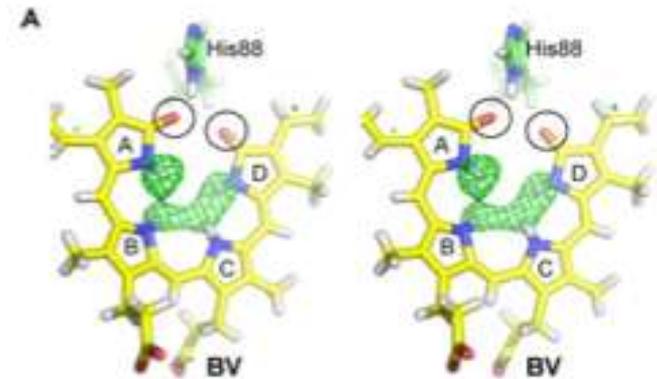


Cellulase



A.Y.Kovalevsky et al: Angew.Chem. Int.Ed. (2011)

D-xylose isomerase



Bilin Reductase (phycocyanobilin)