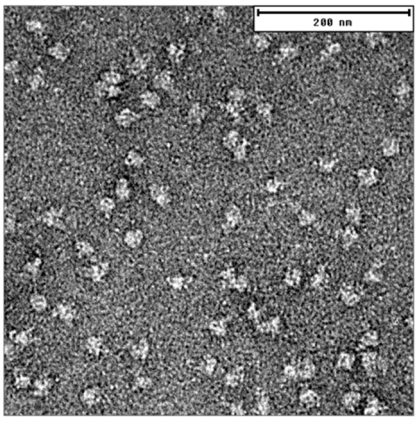
149　金属過不足疾患に関わる亜鉛輸送体の構造と機能の解明	田中　良樹

【目的】生命活動の維持のために、輸送体タンパク質によって細胞内部の分子濃度は一定の範囲に維持されている。輸送体の「選択性」と「輸送制御」が適切に機能することで、生体恒常性が保たれる。この輸送体のメカニズムの完全な理解のためには原子分解能レベルの構造情報が必要である。しかし、高分解能で構造解析されている大半の輸送体が原核生物由来のものであり、輸送体膜タンパク質の構造研究は発展途上にある。このため構造情報からのヒトの疾患に対する創薬への応用までの道程は長い状況にある。本研究では構造未知の真核生物由来の亜鉛輸送体タンパク質などの三次元構造に焦点をあてた研究を行う。

【方法】亜鉛などの金属イオンの輸送を担う輸送体膜タンパク質の立体構造決定を第一の目標とし、それに加えて構造情報に基づく解析を行うことにより、構造と機能の間の相関を解明し、既知の疾患などの原因を明らかにすることを目標に研究を行った。構造決定のためには純度の高いタンパク質試料が大量に必要となる。そのために必要となる試料は真核生物のタンパク質発現系の一つであるメタノール資化酵母を形質転換して調製した。研究代表者はこれまでにこの系を利用して植物の多剤排出輸送体の構造を決定し報告した [1]。複数の生物種から解析対象タンパク質の遺伝子をデータベースから検索し、DNA 合成により遺伝子を入手した。発現用ベクターに遺伝子を導入し、酵母発現系を構築した。発現条件の検討、精製条件の検討を繰り返し、精製試料を得る系を確立した。精製試料を用いて、結晶化や電子顕微鏡撮影を行った。結晶が得られた物に関して、大型放射光施設 SPring-8 BL32XU などのマイクロフォーカス X 線を用いて回折実験を行い、立体構造決定を試みた。同時にクライオ電子顕微鏡による構造決定も予定していたが、クライオ電子顕微鏡での構造解析を行うには輸送体の分子量が小さいという問題点があったため、抗体を結合させ、複合体で測定を行うことで分子量の小ささを解決する方法を試みた。解析対象に特異的結合する抗体を、マウスを用いて作製する方法と、特定のペプチドに結合する抗体を利用する方法の二つを進めた。

【結果】植物の亜鉛を含む 2 価金属イオン輸送体について、取り込み型と排出型のそれぞれについて大量発現系・精製系を確立した。特異的結合抗体を作製し、安定な複合体を形成することを確認した。共結晶化を行った結果、タンパク質結晶を得ることに成功したが、回折実験では高分解能データは得られていない。並行して、クライオ電子顕微鏡での構造解析の前段階としてネガティブ染色電子顕微鏡撮影を行った。ネガティブ染色での撮影像から、輸送体タンパク質と抗体複合体粒子を確認している (図)。クライオ電子顕微鏡像による高分解能の立体構造解析を可能とするためには、より均一で安定した複合体が必要と考えられたため、測定試料の調製方法の改良が必要であると結論付けた。

抗体複合体ネガティブ染色電子顕微鏡像