

東京大学アイソトープ総合センター



VOL 41 NO. 1 2010. 6. 25

安全管理における生命科学の重要性

東京大学アイソトープ総合センター長 宮 川 清

本年4月より、最近新しい治療薬として注目されているある癌治療薬の使用において、その効き具合を予測する重要な遺伝子の点突然変異を検査することが、わが国の保険診療においても認められるようになった。これはたった一つの塩基置換で癌治療の有効性が大きく左右されることを示唆しているが、1980年代以降の分子生物学主導で開発されている癌治療の進歩を理解すれば当然の結果である。このような特定の遺伝子異常の情報を応用した癌治療に加えて、遺伝子全体をハイスループットの塩基配列決定方法によって網羅的に解析する試みも癌研究では導入されつつあり、塩基置換や染色体再構成のパターンの情報から、癌で異常をきたしているDNA修復経路も同定することが可能になってきている。

このような発展を遂げている癌治療研究の荒波に揉まれている研究者が、放射線安全管理に係る研究・教育に直面することになった場合に何を感じるであろうか。私はそのような集団の一人として、この一年間感じたことを述べたい。一言でまとめるのであれば、安全管理のコミュニティと生命科学の間に存在する距離が広がっていることである。放射線の人体影響に関する多くの情報は、被ばく者を対象とした医学、生物学、物理学、化学等の複合的アプローチによって得られ、それは安全規制の基盤ともなった。ところが、時代が変わるとともに学問は細分化し、放射線安全に関しても独立した存在であることの色彩が濃くなってきた。その一方で、低線量被ばく健康影響や高線量被ばくに対する治療開発は、依然として未解決のままである。これらの未解決問題の本態で重要な位置を占めているのは、遺伝情報維持の破綻という生命科学の重要な領域である。これは、かつては癌研究よりも放射線科学が真摯に取り組んでいた領域である。

放射線の安全な利用を保障するためには、癌治療で当たり前となりつつある日進月歩の生命科学の情報を理解しながら多職種チームで業務から研究・教育を行う姿勢が、安全管理のコミュニティでももっと取り入れられるべきであると思う。そうでなければ、確立した業務を維持するだけでは、専門化された学問の発展はあったとしても、安全管理にとっても最も重要な課題である放射線による生命の危機を、人類社会は救うことができないのではないかと。

研究紹介

植物のストレス環境適応メカニズムに迫る ～アブシジン酸シグナル伝達タンパク質の X 線結晶構造解析～

東京大学大学院農学生命科学研究科 澤 野 頼 子

1. はじめに

タンパク質は複雑な生命現象を支える中心的な物質であり、その機能を発揮するためには特有の立体構造をとる必要がある。したがって、タンパク質分子の機能を解明するにはその立体構造を明らかにすることが有用である。タンパク質分子の立体構造を調べる方法としては、X 線結晶構造解析、NMR（核磁気共鳴）、電子線回折（電子線結晶構造解析、電子顕微鏡）、中性子結晶構造解析などがある。X 線結晶構造解析は上記の中でも最も精度よく立体構造を決定できる手法で、結晶化できれば理論上解析できる分子量の制限が無い。タンパク質の立体構造決定には最も良く使用されている手法である¹⁾。

タンパク質の X 線結晶構造解析では、1) タンパク質の発現、精製と結晶化、2) X 線回折強度データ収集、3) 位相決定、4) モデル構築および精密化の段階を経て分子の構造が得られる²⁾。結晶が得られたら X 線を照射し、回折強度データの収集を行う。X 線の光源としては、実験室系で回転対陰極型^{*1}のものを用いるか、大学共同利用機関法人高エネルギー加速器研究機構 (KEK)・放射光科学研究施設 Photon Factory (PF) や財団法人高輝度光科学研究センター・大型放射光施設 (SPring-8) などのシンクロトロン放射光を用いる。シンクロトロン放射光からは広い波長範囲で強度の強い X 線を得ることができ、小さい結晶の解析や精度の高い（高分解能）構造解析に威力を発揮している。

私たちの研究グループでは、X 線結晶構造解析の手法を用いて、産業上有用な様々なタンパク質・酵素の立体構造解析を行い、立体構造に基づいた酵素の高機能化等に取り組んできた。本稿では、緑地化や作物の量産等の技術開発に役立つ植物タンパク質の立体構造解析について紹介する。

2. 植物のアブシジン酸シグナル伝達経路とストレス耐性機構

近年、温暖化など急激な地球環境の変化に伴い、農地環境の劣悪化（干ばつ、高温、塩害等）が進み、作物収量の減少が深刻になってきている。加えて、人口増加に伴う食糧不足問題も懸念されており、緑化対策や作物収量の増産が求められている。このような問題を克服するために、劣悪環境に対する耐性を高めた植物（作物）の開発が期待されている。

植物の環境耐性能には植物ホルモンの 1 つであるアブシジン酸（Abscisic acid：ABA）が関与している。ABA は乾燥などのストレス環境にさらされると合成量が増加し、葉の気孔の閉鎖

^{*1} 回転対陰極型

実験室系の X 線発生装置は高電圧管内の陽極の金属板に加速電子をおつけて特定の波長の X 線（特性 X 線）を放出させる。高電圧のために金属板が熱をもつため、金属板を実験中に回転させて効率よく冷却するようにしたのが回転対陰極型の X 線発生装置である。

に働き蒸散による水損失を抑制するとともに、様々な遺伝子発現を誘導して植物のストレス耐性を高めることが知られている。最近、ABA の細胞内受容体タンパク質「PYR/PYL/RCAR」が同定され、ABA シグナルがこの受容体を経て ABA シグナル伝達経路を活性化することが提唱された(図1)^{3), 4)}。植物に乾燥などのストレスが加わると ABA が細胞内に蓄積し、ABA 受容体 PYR/PYL/RCAR に結合する。ABA と結合した受容体は、ABA シグナル伝達経路のタンパク質脱リン酸化酵素 PP2C と結合し、その脱リン酸化活性を阻害する。すると、下流のタンパク質リン酸化酵素 SnRK2 は PP2C による脱リン酸化から解除されて活性化型として働き、すぐ下流の転写制御因子 AREB/ABF をリン酸化して活性化する。AREB/ABF は乾燥ストレス耐性の付与に働く遺伝子群の転写を促進し、植物はストレス耐性を獲得する。

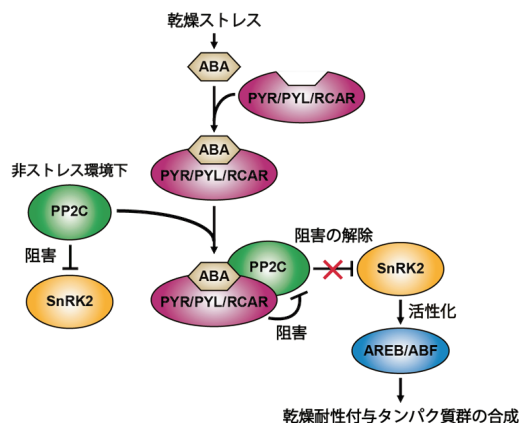


図1 ABA シグナル伝達経路

3. ABA シグナル伝達タンパク質の X 線結晶構造解析

我々は、X 線結晶構造解析により、ABA 受容体タンパク質の 1 つである PYL1 と ABA との複合体、さらにこれにタンパク質脱リン酸化酵素 PP2C である ABI1 の触媒ドメインが結合した三者複合体の立体構造を決定し、ABA シグナル伝達系において ABA がどのように受容され、シグナルを伝達していくかの仕組みを明らかにした⁵⁾。

PYL1 と ABA の複合体の結晶については、KEK の PF の BL-5A ビームラインにおいて X 線回折データの収集を行い、2.05 Å 分解能で結晶構造を決定した(図2)。また、PYL1 と ABA と ABI1 の触媒ドメインの複合体の結晶は、同じく PF の AR-NW12A ビームラインにおいて X 線回折データの収集を行い、2.10 Å 分解能で結晶構造を決定した(図3)。

PYL1 と ABA の複合体構造において、植物ホルモンとして機能する (+) 型の -ABA は PYL1 の α ヘリックスと β シートで挟まれたタンパク質分子内部に結合していた(図2A)。(+) -ABA は PYL1 の分子内部側では主に水分子を介した水素結合ネットワークによって、分子表面付近では複数の疎水性残基による疎水性相互作用によって立体特異的に認識されており、これが (+) -ABA に対する PYL1 の高い立体選択性を決定したと言える。また、複合体構造の分子表面モデル(図2B)において、ABA は PYL1 の分子内に閉じ込められるように結合しており、これを達成するためには $\beta 3$ - $\beta 4$ ループと

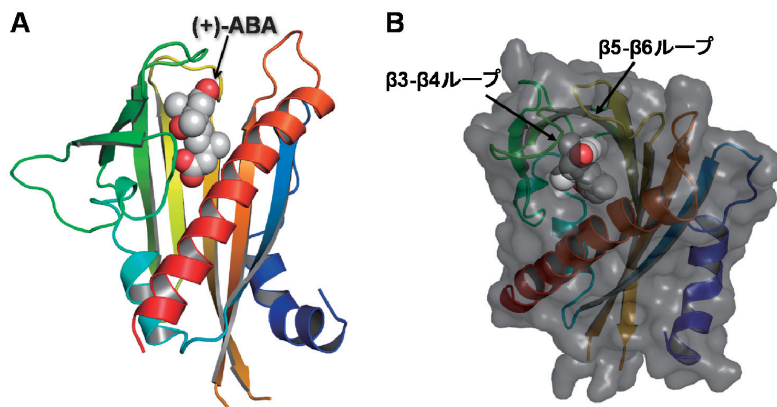


図2 ABA と ABA 受容体 PYL1 との複合体の結晶構造

A. リボン表示 B. 分子表面表示

$\beta 5$ - $\beta 6$ ループが構造変化を起こし、ABA 結合部位の入り口を閉じる「蓋」として機能することが推測された。PYL1の ABA 非結合型立体構造 (PDB^{※2} ID: 3KAY) が発表され、ABA 結合型構造と比較したところ、筆者らが推定したように ABA 結合に伴って2つのループに構造変化が起こることが明確となった (未発表データ)。

PYL1-ABA-ABI1三者複合体の構造解析の結果、ABI1の触媒ドメインは、PYL1の ABA 結合部位の蓋として機能する2つのループで主に形成される疎水性表面に結合していた(図3)。PYL1の $\beta 5$ - $\beta 6$ ループによって形成される疎水性ポケット (Trp 結合ポケット) はABI1の Trp300残基と相互作用しており、この結合は、変異体のプルダウンアッセイ^{※3}から、PYL1-ABI1間の複合体形成に極めて重要であることが示された。そして、その強固な結合を利用して、PYL1の $\beta 3$ - $\beta 4$ ループはABI1の触媒活性部位に栓をするように入り込み、PYL1の Ser112残基は

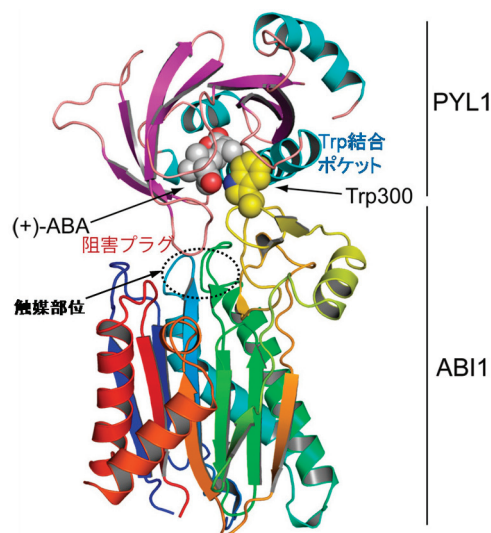


図3 PYL1-ABA-ABI1 複合体の結晶構造

ABI1の触媒残基の1つである Glu142残基と水素結合を形成していた。このようにして、ABA を結合した PYL1は、ABI1の触媒活性部位を直接塞ぐことにより、その脱リン酸化活性を競合的に阻害し、ABA シグナル伝達経路を活性化することが明らかとなった(図4)。

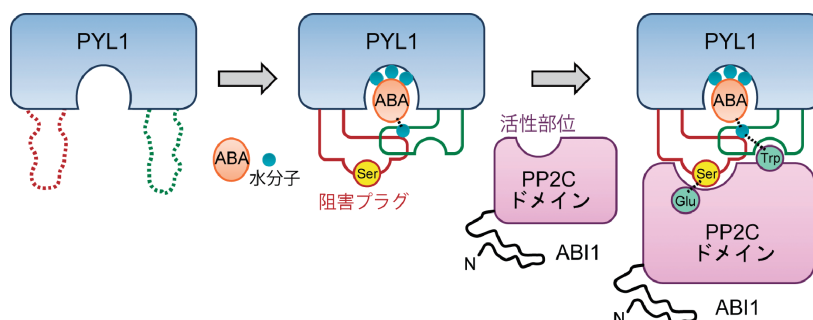


図4 PYL1 を介した ABA による ABI1 の制御機構モデル

PYL1 に ABA が結合すると、ABA 結合部位の蓋となる $\beta 3$ - $\beta 4$ ループ(赤)と $\beta 5$ - $\beta 6$ ループ(緑)において、ABI1 の触媒ドメイン (PP2C ドメイン) との結合に重要な構造が形成され、最終的に、ABI1 の触媒部位が塞がれ、脱リン酸化活性が阻害される。Glu、Trp、Ser は、各々、ABI1 の Glu142、Trp300、PYL1 の Ser112 塩基を指している。

※2 PDB

Protein Data Bank; タンパク質構造データベース。タンパク質および核酸の3次元構造の構造座標が登録されている国際的なデータベースである。登録できる構造データは、X線結晶構造解析、NMR、電子顕微鏡等により実験的に決定されたものに限定されている。2010年8月3日現在の時点で66961の構造が登録されている。

※3 プルダウンアッセイ

タグ付きタンパク質を利用したタンパク質間相互作用解析法の1つである。担体に固定化したタグ付きタンパク質 (ベイト) に任意のサンプルをインキュベートした後溶出させ、ベイトと相互作用する (結合する) タンパク質 (プレイ) との複合体を検出することで、相互作用の相対的な強弱を調べることができる。インキュベートするサンプルには、細胞抽出液や培養上清、またはベイトとの相互作用が予想される精製タンパク質などを用いる。

以上のような ABA シグナル伝達タンパク質の一連の立体構造解析により、ABA 受容体を介して ABA シグナル伝達経路を活性化する仕組みを明らかにすることができた。この成果は、植物の乾燥ストレス機構の理解を深めるとともに、乾燥ストレス高耐性植物（作物）の開発や植物の機能を制御可能な薬剤の開発など応用展開につながる研究に寄与すると期待される。

謝 辞

本稿の執筆にあたり、共同研究者の田之倉 優教授、篠崎 和子教授、宮園 健一博士、宮川 拓也博士、窪田 恵子博士、姜 禧珍博士、藤田 泰成博士、小平 憲祐博士、浅野 敦子氏、宮内 裕美子氏、高橋 美穂子氏、支 月華氏、吉田 拓也氏に感謝申し上げます。

参考文献

- 1) 宮園健一, 佐々木宏, 田之倉優. 第4章 構造決定法 1. X線結晶構造解析 基礎から学ぶ構造生物学 (河野敬一, 田之倉優 編) p.30-44, 共立出版 (2008).
- 2) 田之倉優, 伊東孝祐. X線結晶構造解析からみるナノバイオテクノロジー. ナノバイオテクノロジーの最前線 (植田充美 監修), p.414-424, シーエムシー出版 (2003).
- 3) Park SY, Fung P, Nishimura N, Jensen DR, Fujii H, Zhao Y, Lumba S, Santiago J, Rodrigues A, Chow TF, Alfred SE, Bonetta D, Finkelstein R, Provart NJ, Desveaux D, Rodriguez PL, McCourt P, Zhu JK, Schroeder JI, Volkman BF, Cutler SR. Absciscic acid inhibits type 2C protein phosphatases via the PYR/PYL family of START proteins. Science 324, 1068–1071 (2009).
- 4) Ma Y, Szostkiewicz I, Korte A, Moes D, Yang Y, Christmann A, Grill E. Regulators of PP2C phosphatase activity function as absciscic acid sensors. Science 324, 1064–1068 (2009).
- 5) Miyazono K*, Miyakawa T*, Sawano Y*, Kubota K*, Kang HJ, Asano A, Miyauchi Y, Takahashi M, Zhi Y, Fujita Y, Yoshida T, Kodaira KS, Yamaguchi-Shinozaki K, Tanokura M. (*equal contribution) Structural basis of absciscic acid signalling. Nature 462, 609-614. (2009).

◆ 平成 22 年度共同利用追加申込

所 属	取扱責任者	研 究 課 題
工 学 部	出 町 和 之	造影剤を用いた腫瘍画像撮像のための検証実験
工 学 部	上 坂 充	Study on the Diagnostic and Therapeutic Application of Gold Nanoparticles using CDF1 and Balb mice
薬 学 部	大 澤 匡 範	K ⁺ チャネル再構成リポソームへの ⁸⁶ Rb ⁺ の取り込みを利用した、K ⁺ チャネルの活性評価
附 属 病 院	三 井 純	ラジオリベルを利用した COQ2 assay
RI センター	桧 垣 正 吾	放射性ヨウ素の効果的な捕集に関する研究

◆ 平成 22 年度運営委員会名簿

(平成22年 4 月 1 日～平成23年 3 月31日)

部 局	職 名	氏 名	備 考
医 学 部	教 授	宮 川 清	委員長（センター長）
病 院	准 教 授	百 瀬 敏 光	
工 学 部	教 授	田 中 知	
理 学 部	教 授	鍵 裕 之	
農 学 部	教 授	浅 見 忠 男	幹 事
教 養 学 部	准 教 授	齋 藤 晴 雄	
薬 学 部	教 授	関 水 和 久	幹 事
新 領 域	教 授	三 谷 啓 志	幹 事
医 科 研	准 教 授	秋 山 泰 身	平成 22 年 4 月 1 日委嘱
生 研	教 授	井 上 博 之	
分 生 研	准 教 授	前 田 達 哉	
物 性 研	教 授	小 森 文 夫	幹 事
大 気 海 洋 研	教 授	小 島 茂 明	幹 事
保 健・健康推進本部	講 師	石 川 隆	
アイソトープ総合センター	教 授	井 尻 憲 一	

◆ 平成 22 年度客員研究員受入名簿

客員研究員	継続・新規	放射線取扱区分	受入区分	受入教員	部門主任
佐 藤 純	継続	放射線取扱者	物理部門	小 池 裕 也	井 尻 憲 一
卷 出 義 紘	継続	放射線取扱者	化学部門	桧 垣 正 吾	井 尻 憲 一
瀧 上 豊	継続	放射線取扱者	化学部門	桧 垣 正 吾	井 尻 憲 一
永 井 尚 生	継続	放射線取扱者	化学部門	桧 垣 正 吾	井 尻 憲 一
森 川 尚 威	継続	放射線取扱者	放管部門	野 川 憲 夫	井 尻 憲 一
薬 袋 佳 孝	継続	放射線取扱者	放管部門	野 川 憲 夫	井 尻 憲 一

◆ 人事異動

・退職 2010. 3. 31発令

庶 務 係 佐 藤 佳年子

業 務 係 鈴 木 ミツ子

武 田 真 憲

中 村 陽

・学内異動(出) 2010. 4. 1発令

主 査 富 田 正 明 理学部環境安全研究センター事務室主査

・新規採用

業 務 係 城 川 美 樹

研究開発部 堀 駿一朗

小 泉 早 苗

・学内異動(入) 2010. 4. 1発令

主 査 金 丸 敏 眞 教養学部経理課主査

◆ 平成 22 年度センターニュース編集委員名簿

委 員 長	角 野 浩 史	助 教	理学系研究科 地殻化学実験施設
委 員	田野井 慶太郎	助 教	農学生命科学研究科 放射性同位元素施設
〃	國 友 博 文	助 教	理学系研究科 生物化学専攻
〃	野 川 憲 夫	助 教	アイソトープ総合センター 研究開発部
〃	廣 田 昌 大	特任助教	工学系研究科 原子力国際専攻
〃	金 丸 敏 眞	主 査	アイソトープ総合センター 事務室
事務担当	城 川 美 樹	業務係	アイソトープ総合センター 業務

東京大学アイソトープ総合センターニュース

目 次

安全管理における生命科学の重要性.....	宮川 清	1
研究紹介		
植物のストレス環境適応メカニズムに迫る		
～アブシジン酸シグナル伝達タンパク質の X 線結晶構造解析～	澤野 頼子	2
平成22年度共同利用追加申込.....		6
平成22年度運営委員会名簿.....		6
平成22年度客員研究員受入名簿.....		7
人事異動.....		7
平成22年度センターニュース編集委員名簿.....		7

平成22年度最初の、東京大学アイソトープ総合センターニュースをお届けします。昨年度初めてセンターニュースの編集委員になり、今年度は畏れ多くも編集長を拝命いたしました。まだ行き届かないところもあり、関係者の方々にご迷惑をおかけすることも多いと思いますが、共同利用で長い間お世話になっているセンターに、少しでも恩返しできるよう尽力していきます。センターニュースの持つ長い伝統を受け継ぎながら、新しい風を少しずつ吹き込めればと思案中です。

読者の皆様のご意見やアイデア、執筆希望など、何でもお気軽にお寄せください。よろしく願いいたします。

(角野浩史)

連絡先：kanamaru.toshimasa@mail.u-tokyo.ac.jp