

タンパク質集合体に見出す 新機能

生体分子機能工学専攻
上野 隆史 研究室

上野 隆史 教授 1971年北海道生まれ。大阪大学大学院理学研究科高分子学専攻博士課程修了。2012年より、東京工業大学大学院生命理工学研究科生体分子機能工学専攻教授。



私たち生命を営むために、重要な働きをする「タンパク質」。人間の目に見えないところでタンパク質が動き、生体システムを動かす。上野研究室では、タンパク質集合体を研究の中心に据えて機能の解明や新機能の発掘を行い、さらにはオリジナルのタンパク質で生体内の不思議を解明しようとしている。ここでは、2つのタンパク質について、上野先生が行ってきた研究を紹介する。

タンパク質から新しい機能を見つける

人間の体には、約10万種のタンパク質があると言われている。それらが各々異なる性質をもち、人間の生命活動のために異なる役割をもつ。ウイルスのように人間とは程遠い小さな生命体でさえ、いくつかのタンパク質で構成されている。

生命体を構成するタンパク質は、ときに他のタンパク質と協力しながら、生命を維持するために特有の力を発揮する。それは、生命の長い歴史の中で、どのようなつくりのタンパク質ならばより丈夫な生命体を作り出せるか、より安定した生命活動を維持できるか、機能の取捨選択を積み重ねた結果であり、この営みはこれからも延々と続く。

このように生命の進化で培われてきたタンパク質の働きを、人間が一から考えて作り出すのは難しいだろう。しかし、この生体内の働きを拾い上げて、本来の用途とは違う目的で利用できないだろうか。

上野研究室では、生命体を構成するタンパク質の性質をもとに、それに手を加えて新しい機能をもつタンパク質を生み出す研究を行なっている。さらに、こうして改造したタンパク質が実際に生体内でどのように働くのかも調べている。特に、タンパク質1分子の機能を調べるのではなく、タンパク質が何分子も集まってできた「タンパク質集合体」の機能に注目している。

さて、上野研究室ではどのように実験を進めてきたのだろうか。

バクテリオファージから得た機能

まずはじめに紹介するのは、ウイルスの一種であるバクテリオファージが自身を複製させるときに行う、細胞膜貫通に注目したことから始まった研究である。

ウイルスといえば何を思い浮かべるだろうか。インフルエンザウイルス、エイズウイルス、ノロ

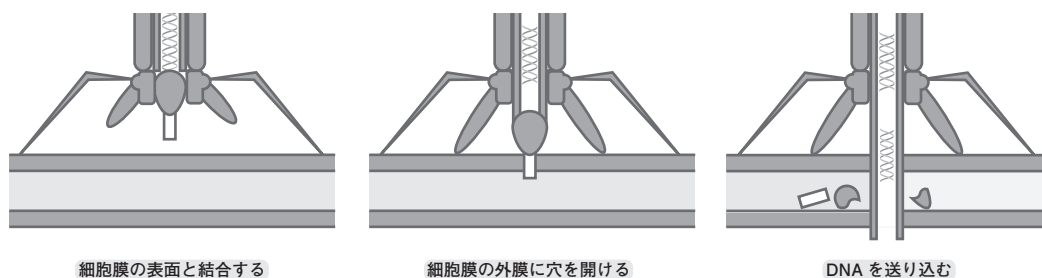


図1 バクテリオファージが大腸菌にDNAを送り込む仕組み

バクテリオファージが持つ針状タンパク質が大腸菌の外膜に刺さった後、胴体が細胞内まで入り込み、DNAが大腸菌内に送り込まれる。

ウイルス——これらは人を含めて動物に感染するウイルスであるが、ウイルスの中には細菌にのみ感染するウイルスもある。それがバクテリオファージである。バクテリオファージは、頭のような部分にDNAまたはRNAをもち、足のような部分で大腸菌の外膜に付着し、細胞内にDNA、RNAを送り込む。そして大腸菌内で大量のウイルスが複製される。

上野研究室が注目したのは、バクテリオファージT4（以下、T4ファージ）の「針状タンパク質」である。T4ファージは、大腸菌の外膜を貫通する針状の小さな構造をもっており、針が膜に刺さると空いた穴に胴体部分が入ってDNAが送り込まれる（図1）。このタンパク質はgene protein 5（gp5）と呼ばれ、三重鎖βヘリックス構造を含んでいる（図2）。これは、3本の鎖状分子が正三角形を描いてらせん構造をとった三量体で、これが膜貫通の機能の要だと考えられている。上野先生はこの機能をもとにして、三重鎖にタンパク質など他の物質を付けて細胞内に輸送する機能を与えられるのではないかと考えた。先生はそこで、こ

の三重鎖を材料に人工分子針の合成を試みた。

特定のタンパク質を合成する一般的な手法として、遺伝情報からそのタンパク質の合成に必要な情報を取り出し、それを大腸菌の遺伝情報に組み込んで合成させることが挙げられる。しかし、この方法で三重鎖を作ろうとすると、三本の鎖がうまくまとまらず、三重鎖にならなかった。三重鎖は、バクテリオファージの一部として存在する間は安定に存在するが、実験室で合成するには何らかの工夫が必要だった。

そこで先生が注目したのが、フォルドンというタンパク質である。フォルドンは本来、T4ファージがもつフィブリチンという別の三量体のタンパク質をまとめて、安定化させる分子である。この分子で三重鎖の端を覆うと、3本の鎖状分子同士が整列して分子針が効率よく生成するのではないか、と考えたのだ。

先ほどと同様に遺伝情報をもとにして3本の鎖状分子とフォルドンを同時に合成し、X線結晶構造解析により立体構造を調べると、今度は三重鎖が形成され、その片端をフォルドンが覆っていることがわかった。さらに、偶然にもフォルドンで覆っていない方の末端同士が組み合わさって、三重鎖を縦に2つ繋げた構造ができ上がったのだ（図3）。先生はこれをβ-Protein Needle（以下、β-PN）と名付けた。

さて、このβ-PNはバクテリオファージの針状タンパク質と同じように細胞に取り込まれるだろうか。もし取り込まれるとしたらどのように取り込まれるのだろうか。

細胞が物質を取り込む機構には、「直接貫通」と

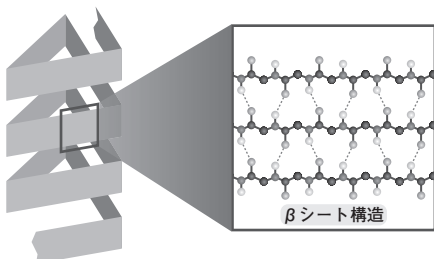


図2 三重鎖βヘリックス構造

3本のアミノ酸鎖がβシート構造を成し、さらにらせんを描く。

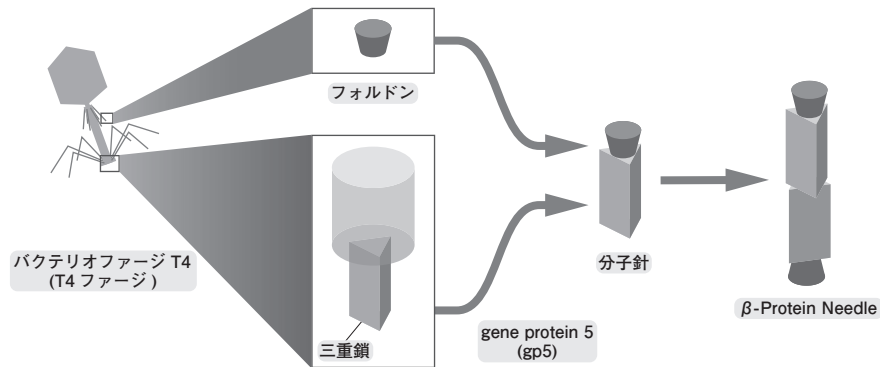


図3 T4ファージから分子針β-PNができるまで

β-PNは、T4ファージの中の異なる2か所の部位から成る。

「エンドサイトーシス」の2通りがある。直接貫通の場合、外来物質が細胞膜をこじ開けて細胞内に入り込むのに対して、エンドサイトーシスの場合は、細胞膜が外来物質を包み込むようにして取り込む(図4)。分子針がエンドサイトーシスで取り込まれた場合、そのまま異物として排出されてしまうが、直接貫通ならば、取り込まれた後に細胞内の器官に作用できる可能性がある。

過去に、外来物質が正電荷を帯びるとエンドサイトーシスで取り込まれる、という実験結果が報告されたことから、外来物質がこの2通りのうちどちらで取り込まれるかは、物質の表面電荷の影響を強く受けると推測できる。β-PNは、表面に正電荷を有するアミノ酸と負電荷を有するアミノ酸が1:2の割合で存在し、全体としては負電荷を帯びている。そこで、表面にある全てのアミノ酸が正電荷を帯びたβ-PN(+)と、負電荷を帯びたβ-PN(-)を新たに作り、電荷の異なる3種類の分子針を用意した。そして、これら3種類のβ-PNの取り込みを観察し、どの電荷で最も取り込

まれるかを調べた。

まず、赤血球について3種類の分子針の取り込みを調べた。この実験では、β-PN、β-PN(+), β-PN(-)の動きをこれらに結合させた蛍光色素分子によって追跡した。β-PNが細胞内に取り込まれるほど、β-PNによって運ばれた色素が細胞内で明るく蛍光を発するのだ。赤血球はエンドサイトーシスを行わず、直接貫通する物質しか受け付けられないことがわかっている。つまり、もしβ-PNが赤血球に取り込まれたとしたら、それはエンドサイトーシスではなく、直接貫通によるものだという証拠になる。これで、β-PNが直接貫通できるかどうかはわかるというわけだ。その結果、β-PNは取り込まれたが、β-PN(+), β-PN(-)はほとんど取り込まれなかった。このことから、β-PNは電荷を操作しない状態であれば直接貫通によって細胞に入り込むことがわかった。

次に、エンドサイトーシスと直接貫通のどちらも行うHeLa細胞を用いて同様に実験した。HeLa細胞はヒトの子宮頸がん細胞を実験用に培養したもので、実験用のヒト培養細胞の代表と言える。このヒト細胞に対してタンパク質結合型分子針が機能すれば、医療における実用化に一步近づく。

まず、HeLa細胞について3種類の分子針の取り込みを調べた。

その結果、β-PNの取り込みは赤血球の場合とほとんど変わらなかったが、β-PN(+), β-PN(-)はβ-PN以上に取り込まれた。次に、これらがエンドサイトーシスと直接貫通のどちらで取

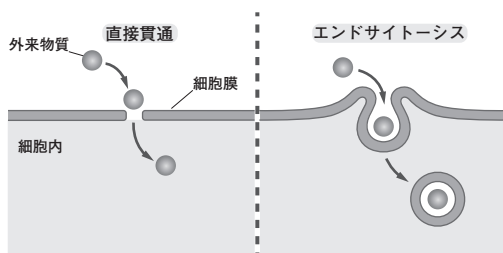


図4 直接貫通とエンドサイトーシス

り込まれたものかを見極めるため、エンドサイトーシス阻害剤を加えてHeLa細胞への取り込みを調べた。すると β -PN (+)、 β -PN (-) はほとんど取り込まれなかったが、 β -PNはエンドサイトーシス阻害剤を加えない場合とほぼ同じ量取り込まれた。これらの結果から、完全に正電荷や負電荷に偏らせたときは直接貫通しにくく、 β -PNはエンドサイトーシスを行える環境でも、直接貫通を優先的に行うことがわかった。

赤血球とHeLa細胞の実験からわかるのは、分子針がエンドサイトーシスを避けつつ、直接貫通で入り込むための、ちょうどよい電荷が存在する、ということだ。そして β -PNの表面電荷はその電荷に近かったのだ。

次の段階として、蛍光色素の代わりにタンパク質を付けて、 β -PNに輸送させることを考えた。タンパク質を細胞内に届けることで、そのタンパク質を細胞内の器官に作用させようという試みだ。

従来、タンパク質輸送は困難だと言われてきた。先に述べた小さな蛍光色素分子に比べ、タンパク質はサイズが大きく、 β -PNの表面を覆ってしまうため、 β -PNが分子針としての貫通機能を損なう恐れがあるからだ。また、タンパク質を細胞内の器官に作用させるためには、タンパク質は、輸送後に分子針から離れなくてはならない。

さっそく、タンパク質を結合させて、同じように β -PNが取り込まれるかを調べた。使用したタンパク質はGFPという蛍光タンパク質である。GFPは、下村脩先生のノーベル賞受賞で有名なオワンクラゲから取れるタンパク質だ。これを β -PNに繋げて β -PN_GFPを作製した(図5)。細胞内の酵素には、この部位を認識して自然に切断してくれるものがあるので、細胞内でGFPが自然と分子針から離れることが期待できる。

β -PN_GFP溶液と細胞の懸濁液を用意し、細胞外液と、細胞内液を比較して調べた結果、期待通り β -PN_GFPは細胞に取り込まれたことがわかった。さらに、最初は一体化していた β -PNとGFPが、細胞内では離れていることも確認できた。

この結果より、 β -PNは細胞内で有効に働くタンパク質の輸送手段としての利用が期待できる。この分子針が医療に役立ち、私たちもその恩恵に

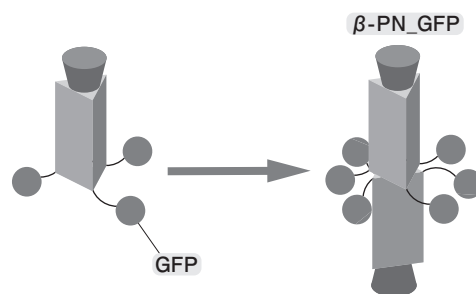


図5 タンパク質を付けた分子針 β -PN_GFP

1つの三重鎖に3つのGFPを結合させて、それを2つ積み重ねると、 β -PN_GFPができる。

あずかる日が来るかもしれない。

このようにタンパク質の本来の機能を違う観点から眺め、新しい機能を生み出すためにオリジナルの工夫を積み上げていくのが、上野研究室の研究である。

フェリチンによる生体システムの解明

さらに上野研究室では、私たちの体内にあるタンパク質の一つ「フェリチン」について、鉄を内包するという本来の機能から、体内でCO輸送を助ける機能を見出した。

COといえば、一酸化炭素中毒を引き起こして、人間を死に至らしめる物質として有名だ。酸素の代わりにヘモグロビンと結合し、血中の酸素輸送を阻害する物質である。ところが最近の研究で、低濃度であれば人体に有益に働くことがわかった。例えば、人間に必要なタンパク質を合成する細胞内の働きを促進したり、逆に過度にタンパク質が合成されてがんができるのを抑制したりするのだ。そして、人為的にCOを供給しようという試みが生まれ、ルテニウムとCOを結合させてルテニウムカルボニル錯体(RuCO)が作られた。これを医療で役立てるために、世界では引き続き研究が行われている。

しかし、このルテニウムとCOの錯体にはいくつかの問題点がある。細胞内の環境下ではルテニウムとCOの結合を切断する分子がたくさん存在しており、ルテニウムは長くCOを引き留めることができない。つまり体内に入れても作用しては

しい箇所に届く前にCOを放出したり、細胞内で必要以上にCOを供給したりするのだ。また、ルテニウムは本来体内に存在しない金属であり、細胞内に送入すると人体に害が及ぶ可能性が高い。つまり、これらの問題点を解決した上でCOを適切に細胞内に輸送できる仕組みが必要なのだ。

そこで上野先生は、フェリチンにRuCOを内包させて、フェリチンごと輸送することを考えた。フェリチンは24個の分子が集まってできたタンパク質集合体である（図6）。もともとフェリチンは、私たちの体内で血中の鉄イオンが不足したときにそれを補う役割をもっており、かごのような構造の中に鉄イオンを貯蔵している。この保護基のような機能に注目して、フェリチン内部に鉄の代わりにルテニウムを結合させ、そのルテニウムを介してCOを結合させようということだ。ルテニウムの毒性も、こうしてフェリチンに入れると無害化される。

さっそく、実際にRuCOをフェリチンの内部に結合させて、Fr-RuCO複合体を作り、CO輸送を試みた（図7）。

まず、この複合体がCOを放出する速度を測って、どの程度ゆっくり放出できるかを調べた。この実験ではミオグロビンという物質を使った。ミオグロビンは、筋組織において酸素を吸収して運ぶタンパク質である。ミオグロビンが酸素の代わりに吸収したCOの量を調べることで、Fr-RuCO

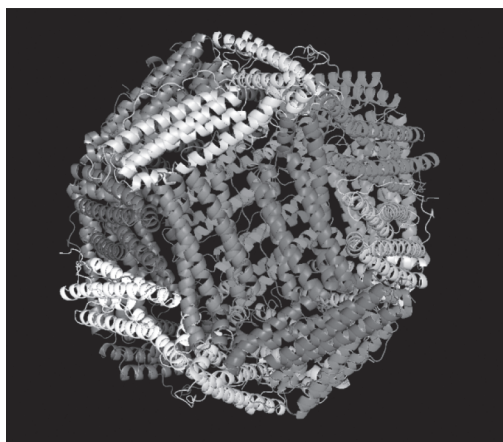


図6 フェリチン

同一のタンパク質24分子が規則正しく配置されている、球形のかご型分子である。

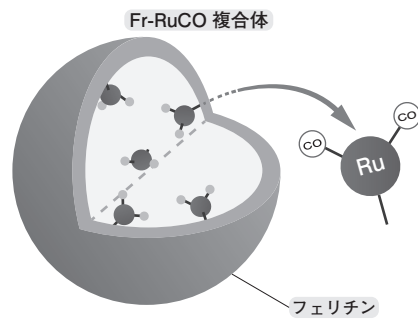


図7 Fr-RuCO複合体

複合体のCO放出速度がわかるのだ。

その結果、金属によってCOを固定させただけのRuCOに比べてFr-RuCO複合体の方が、1/18の速さでゆっくりCOを放出することがわかった。やはり、フェリチンのかご型の形状はCOの放出を抑えるのに有用だと考えられる。こうしてFr-RuCO複合体では、人体への悪影響を抑えた上に、必要以上にCOを放出してしまうという従来のRuCOの欠点も克服できた。

続いて、天然のフェリチンに手を加えて変異型フェリチンを作り、それを用いて別のFr-RuCO複合体を作った。本来、金属イオンはフェリチン内の特定の場所に結合しているが、アミノ酸の配列を変えるとルテニウムの結合する場所が変わり、結合数や結合部位の立体構造も変化する。

この変異型Fr-RuCO複合体についてもCOの放出の様子を調べたところ、CO放出速度は天然のフェリチンを用いたときと同程度だったが、放出する量が2倍になった。つまり、天然のフェリチンに細工を施すことで、放出するCOの量を調節できる可能性が示された。

こうして、フェリチンにCO輸送という新しい機能を見出し、その機能を高めることに成功した。さらに、上野研究室では、Fr-RuCO複合体の機能を活用して、COが細胞内で働くNF-κBという物質にどのような影響を与えるかを検証した。

NF-κBとは、生物の遺伝情報からタンパク質を合成する際に必要不可欠なタンパク質で、タンパク質の合成までに経る重要な過程を促す働きをもつ。NF-κBは、普段は不活性な状態で細胞内に存在しているが、必要に応じてCOが引き金となっ

て、活性化することが知られている。

Fr-RuCO 複合体も細胞内のNF- κ Bを人為的に活性化できるかもしれない。そこで、細胞がもつDNAの塩基配列中に、特定の条件下で発光を促すタンパク質を作るための遺伝情報を組み込み、実際に作られたタンパク質による発光の強度を測定して、どの程度NF- κ Bが活性化したかを確かめた。発光の強度が大きいほどNF- κ Bが活性化したことになる。

その結果、RuCO 錯体をそのまま使用したときに比べ、天然型Fr-RuCO 複合体は2.5倍、変異型Fr-RuCO 複合体は4倍、NF- κ Bを活性化させたことがわかった。

このように上野先生は、COの量を調節することでNF- κ Bの活性化の度合いも調節できることを、フェリチンを改造してできた自作の分子によって証明した。

今は、このFr-RuCO 複合体を使ってCOがどのようにNF- κ Bを活性化するのか、その詳しいメカニズムを探る研究を続けている。現時点では、COが何らかの過程を経て、NF- κ B活性化に繋がる、ということがわかっているだけで、その過程は解明されていない。

Fr-RuCO 複合体もまた医療への応用が期待されている。NF- κ Bを活性化するにはいくつかの方法があるが、中でもCOは遥かに即効性に優れているからだ。上野研究室では、NF- κ Bがどの程度活性化されると人間にとって一番有用なのかについても、Fr-RuCO 複合体によって調べている。

自分は10年後何になりたいか

バクテリオファージT4のもつ三重鎖のタンパク質と、人間がもつフェリチンタンパク質についての研究を紹介した。ウイルスと人間はかけ離れた生命体のように思えるが、これらの研究の共通点は何だろうか。

それはやはり、どちらも「タンパク質集合体」をターゲットとする、ということだ。実は、現在の科学の世界では、タンパク質1分子についてはよく研究されているが、それが複数個集まって初めて機能することについてはまだ研究が進んでい

ない。上野先生は、タンパク質がわざわざ集合体を形成することには、何らかの科学的な意味があるはずだと考え、それをしっかり理解したいという思いで研究を進めている。

先生は、大学で研究を続けることの面白さは、このように化学物質の本質的な側面を好きなだけ深められることにある、と言う。バクテリオファージの三重鎖はどうして他の細胞にDNAを送入できるのかを考え、それを分子針として作り変える。フェリチンはどうして鉄を内包できるのかを考え、CO輸送のためのかごに作り変える。これらがタンパク質集合体の本質的な機能を活かした研究だ。

しかし、このような研究は成果を出してすぐに実生活に利用されるとは限らない。それに、実験には苦戦が付きまとう。実験と考察を何度も繰り返したからといって、満足のいく結果が得られる保証はない。そのうちに柔軟な思考が難しくなり、一つの物事に固執してしまうこともある。それを乗り越えるために、先生は自分が何をしたいか、常に思い描く。タンパク質集合体の機能を解明したい、それができたらさらにその知識を使ってモノづくりをしたい、というのが先生の考えだ。

多くの学生はまだ自分のやりたいことを模索している段階かもしれない。学生のうちは留学をはじめいろいろな経験をして、失敗の経験も大事にするべきだ、と先生は言う。そうすれば将来広い視野をもって自分の本当にやりたいことを見極められるからだ。大事なのは、誰でもできるような一般的に広く評価される成果を出すのではなく、自分の得意分野で自分にしかできない成果を出すことだ。自分が10年後に「何をしているか」ではなく「何になりたいか」を常に考えておいてもらいたい、という言葉に、先生の研究者としての強い信念を感じた。

執筆者より

納得するまで取材や質問に応じてくださった上野先生に、心より御礼申し上げます。複雑な立体構造の理解に画像や動画が役立ちました。いただいた貴重なアドバイスは、学問の域を超えて是非今後に活かしたいと思います。（小島 摩利子）

Column SPring-8

SPring-8 (Super Photon ring-8 GeV) とは、兵庫県にある大型の実験施設であり、日本が誇る世界最先端の施設だ。上野研究室の研究ではSPring-8が活躍する。そこで、このSPring-8について紹介しよう。

■ SPring-8の特長

SPring-8で行われるのは、主に「X線結晶構造解析」である。X線結晶構造解析とは、複雑な構造をもつ化合物の結晶にX線を照射し、その際に試料から飛び出す電子やX線を観測して、正確な分子構造を突き止めることである。

X線結晶構造解析装置自体は珍しいものではないが、SPring-8は通常の装置よりはるかに優れている。例えば、X線の強度が高いことが挙げられる。これにより、X線を照射したときに試料から得られる情報の精度が高まる。さらに、SPring-8のX線は平行性が高く、長距離にわたって拡散しにくい。これにより、原子レベルの構造がより正確に把握できる。その上、装置の解析スピードも速く、SPring-8で実験を行う研究グループは多い。

■ 上野研究室とSPring-8

タンパク質の研究において、X線結晶構造解析は欠かせない。タンパク質は通常の有機化合物とは異なり、分子量が大きい上に複雑な立体構造を取っている。そして、この複雑な構造がタンパク質の性質を決定づける。そのため、タンパク質を扱う実験では、タンパク質の構造を把握すること

が重要であり、上野研究室は、SPring-8でタンパク質の構造解析を行なっている。

例えば、記事で取り上げたバクテリオファージの三重鎖や β -PNの構造は、SPring-8によって解析した。フェリチンの解析にもSPring-8を利用するが、フェリチンのアミノ酸配列を改造して金属の結合場所を操作したつもりでも、狙い通りの結合が生成していないこともある。そのときは、もう一度合成してSPring-8で解析する。

上野研究室がSPring-8で実験を行う大きな理由は、生成されるX線が優れていることに加え、測定波長を自由に設定できることである。

記事でフェリチンを使ってCO輸送を成功させたことに触れた。上野研究室では、この他にも、触媒となる金属を複数内包させる実験も行なっている。この実験において、フェリチン内に結合した金属の様子を把握することが重要なのだが、通常の装置では金属の種類を見分けるのは難しい。そこで、SPring-8を利用する。SPring-8では、使用するX線の波長を調節できる。X線の波長を変えると、各金属原子の電子密度が変化する。つまり、電子密度がピークになるときの波長は原子によって異なる。それを利用し、各原子について電子密度が一番大きくなるときの波長を調べておけば、どの金属がどこに結合しているのかが分かる。

触媒金属の結合の様子を調べることで、触媒を内包したフェリチンの中に反応の材料を入れると、触媒によって、複数の反応が自然と連続的に進む仕組みが実現できるだろう。上野研究室では、このようにフェリチンを小さな反応空間として機能させる研究も行なっている。

上野研究室では、年に4回ほどSPring-8へ実験しに行く。SPring-8のような最先端の設備も駆使し、先生は自分の得意分野で自分にしかできない発見を成し遂げているのだ。



写真 SPring-8の外観 (©RIKEN)