

## 事後評価報告書（日英研究交流）

1. 研究課題名：エネルギー変換やイオン輸送に関わる膜蛋白質のX線結晶構造解析
2. 研究代表者名：
  - 2-1. 日本側研究代表者：月原 富武（兵庫県立大学大学院生命理学研究科 特任教授）
  - 2-2. 英国側研究代表者：N. Isaacs（グラスゴー大学化学部 統括、構造解析担当）

総合評価：(秀)

### 3. 研究交流実施内容及び成果：

本研究交流では、エネルギー変換系膜蛋白質とイオンチャネル等の新しい膜蛋白質の構造研究を目的とする。具体的には、膜蛋白質大量発現と大量調整、膜蛋白質の結晶化、脆弱な結晶による高精度回折強度測定技術を有する英国側と協力し、エネルギー変換系膜蛋白質とイオンチャネル等の新しい膜蛋白質の構造決定を目指す。

研究成果としては以下のとおり。

#### (1) 日本側の成果

##### ①共通の課題

- a. 若手研究者や大学院生はグラスゴー大学を訪問して、英国の研究スタイルに接することにより、自ら実施している困難な研究に取り組む研究意欲を高めることができた。
- b. 「脆弱な結晶による高精度回折強度測定」については、方法の確立に努め、通常では決定が困難な蛋白質結晶の構造解析を行うことができた。

##### ②個々の蛋白質についての研究成果

###### a. モノアミン酸化酵素

膜貫通領域も含む全構造を決定した。変異体の構造決定も行った。その結果、酵素の特異性を決める活性中心の構造や膜に結合する $\alpha$ ヘリックスの構造が明らかになった。

さらに、本酵素が $\alpha$ ヘリックスを介してミトコンドリアに結合した状態とミトコンドリア膜から遊離の状態での酵素活性を測定して、活性の違いを解析した。その結果、膜に結合した状態での活性が高くなり、その要因は、膜に結合することによって、酵素分子内部気質の取り込みが促進されることによることを明らかにした

###### b. チトクロムc酸化酵素

チトクロム酸化酵素の完全酸化型に2種類あるが、その両者の機能の違いをもたらす構造の差異を明らかにするため、蛋白質精製標品として得られたものの構造決定を1.95 Å分解能で行った。

#### c. ギャップ結合チャンネル

ヒトのコネキシン26ギャップ結合チャンネルの構造を3.5Å分解能で決定した。その構造は2つの細胞膜を貫通した状態のものであった。コネキシン分子は4回膜貫通型ヘリックスを持っており、その配置は従来から提唱されていたものとは全く異なっていた。また、電子顕微鏡による閉口型の低分解能構造と比較することによって、チャンネルの開閉機構を提案した。ギャップ結合チャンネルの初めての原子構造であり、様々な遺伝病と深く関わりのある構造が明らかにされた。

#### (2) 英国側の成果

3件の論文を発表した。

#### 研究交流の今後期待される効果

##### ・ 科学技術進展の面から

**Spring-8** ビームラインの改良によって、脆弱な結晶による回折強度データの質の改善をもたらし、ギャップ結合チャンネル等の構造解析の成功に結実した。ギャップ結合チャンネルの構造解析において確立した構造解析法は、低い分解能の構造解析法として広く活用できるものである。

ギャップ結合チャンネルの3.5Å結晶構造解析は、数多くあるギャップ結合チャンネルに共通した構造を提供した。この構造は、これまで蓄積されてきた膨大な分子生物学的研究結果を全面的に検討し直すことを余儀なくした。さらに、教科書にも掲載されているチャンネルの開閉機構も否定する新たなものであった。

チトクロム酸化酵素の完全酸化型の構造決定は、酸化還元とそれに同期したプロトンポンプの仕組みの解明に向けて着実に1歩前進した。

モノアミン酸化酵素の構造は、最初の1回膜貫通の構造であり、酵素反応において膜結合の役割を初めて解明した意義は大きい。

##### ・ 社会・産業への波及効果の面から

ギャップ結合チャンネルの構造は難聴等の治療薬の開発において貴重なものであり、既にその分野で最先端の研究者から日本側研究チームに対し問い合わせや共同研究の申し入れがいくつも来ている。

モノアミン酸化酵素は阻害剤との結合した構造を決定しており、これをもとに鬱病の治療薬開発がベンチャー企業において行われている。

#### 4. 事後評価結果

##### 4-1. 総合評価

本事業が優れているのは、第一に目標の設定が適切であった点にある。研究代表者は本研究

交流の目的を、必ずしも共著の論文に結実するような共同研究を実行することを中心とするのではなく、研究の経験の交流をすることと、若手研究者のモチベーションを高揚することに置いた。この分野の研究は（１）対象蛋白質の設定と解明すべき機能やメカニズムの設定、（２）蛋白質の発現、機能検定、結晶化、X線強度測定と解析などの技術的問題の解決、（３）構造を基にしたメカニズムの解明、（４）蛋白質一般についての新しい知識を確立すること、の４つの作業に分かれる。このうち（１）と（３）は個々の蛋白質固有の問題であり、論文もこの内容を記述するものである。それに対し（２）の技術的問題は、研究現場では労力の大半を占める重要な作業であるにも拘わらず、研究室の枠を超えた交流ができにくい。また若い研究者はこの困難に負けてモチベーションを失う。本研究交流では（２）を目標として設定した。第二の優れている点は、目的によく合致した交流先の研究者を選択した点にある。X線結晶学に強い日本グループと生化学に強い英国グループと相補的である。さらに技術的問題の解決に対し真摯であり、経験も豊富、かつオープンな態度を持つパートナーであった。第三に、若い研究者のモチベーションをあげることを交流事業の中心に置いた点である。我が国は地理的にも文化的にも離れているために、意識的な努力をしないと、このような問題での交流を図り、若い研究者のモチベーションを高めることは難しい。

これらの交流は、それぞれの研究課題への取り組みに生かされた結果、複数の膜蛋白質の構造決定という極めて大きな成果に結実している。両者の交流は本事業規模の範囲内（英国側は英国政府から「日英研究交流」としての予算の獲得に至らなかった）で十分に実行されて、最も有効に成果に結びつけられたと認められる。本事業は、極めて高く評価できる。

#### 4-2. 研究交流の有効性

日本側は、モノアミン酸化酵素の 2.2 Å 構造決定 (PNAS, 2008), チトクローム c 酸化酵素の 2.95 Å 構造決定 (PNAS, 2009), ギャップ結合の 3.5 Å 構造決定 (Nature, 2009) に成功しており、極めて大きな成果を収めたと言える。蛋白質試料調製技術等を得意とする英国側からは、内膜蛋白質の発現・精製に関するハイスループットなスクリーニング法や脂質のスポンジ相での膜蛋白質結晶化法 (Mol. Membr. Biol. 2008; Structure, 2008) 等の興味深い方法論の研究成果が発表されている。多くの膜蛋白質試料についても有効であることが期待される。以上の成果は高く評価できる。

本事業は、エネルギー変換系膜蛋白質とイオンチャネル等の新しい膜蛋白質の構造研究を目的にした研究交流であったが、具体的な課題である、膜蛋白質大量発現と大量調製・膜蛋白質の結晶化・脆弱な結晶による高精度回折強度測定技術、に関して、他の膜タンパク質にも適応可能な改良点や知見が、もっと具体的に本最終報告中に述べられれば、インパクトが更に増したのではないかとと思われる。

蛋白質精製法を修得するために日本からは複数の大学院生、若手研究者が英国に行き、若手の研究意欲の高揚をもたらしたと考えられ今後が楽しみである。

共同研究として成功しているので、必然的に、積極的な交流が深まるであろうと期待できる。また、日本側の若手研究者が独立したりして、他大学に研究の場を移している。本研究交流が端緒となり、今後も、研究交流が発展する可能性があると十分に思われる。

#### 4-3. 当初目標の達成度

英国側は英国政府から「日英研究交流」としての予算の獲得に至らなかったという不遇があったが、英国の他の財団からの支援等もあり、日本側から英国側への滞在に関しては、研究交流実施体制等は適切であったと判断できる。一方、英国側からの訪問が限られたことは、上記事情で致し方ないとはいえ、残念であった。

当初の計画通り、英国側への大学院生の長期滞在やワークショップへの参加が適切に図られたと考えられる。当初の計画よりも滞在日数が少なかったのは、研究の進展により仕方のなかったことであろう。一方、当初の計画にはあった英国側若手研究者の日本滞在が実現しなかったことは残念である。ワークショップなどは適切に開催されていると思われる。