構造解析ユニット

補助事業代表者（所属・職名）
米倉　功治（東北大/理研・教授/ｸﾞﾙｰﾌﾟﾃﾞｨﾚｸﾀｰ）

FTP

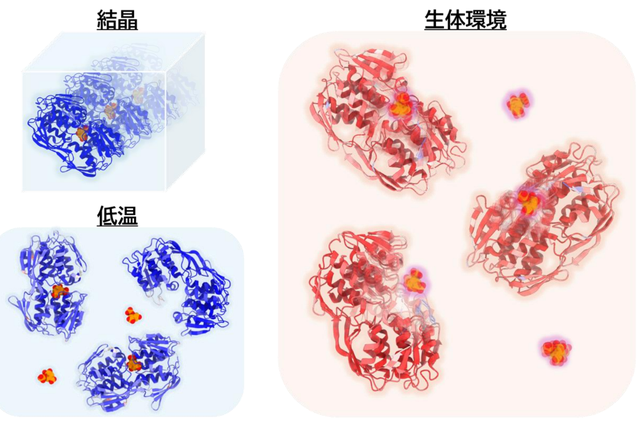
熱場，生体環境場におけるタンパク質構造の解明と創薬アプローチ基盤の開発

若手枠代表者（所属・職名）
濵口　祐（東北大多元研・准教授）

補助事業分担者（所属・職名）
浴本　亨（大阪公立大理学部・講師）、豊永　拓真（東北大多元研・助教）

Fast Track Project　背景・目的

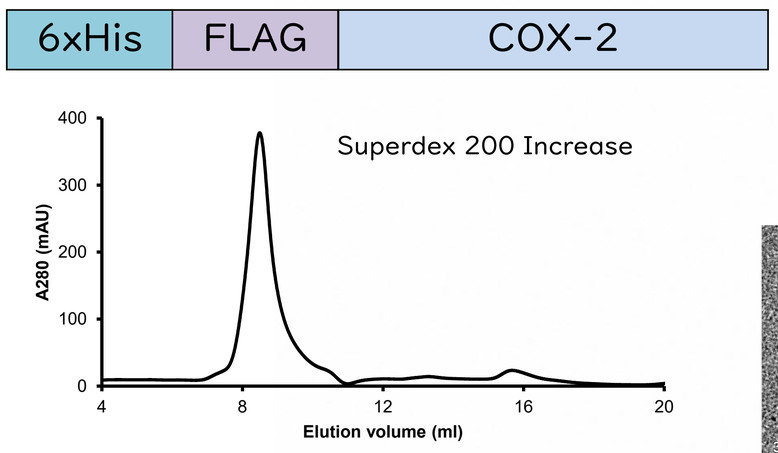
タンパク質が機能を発揮するためには適切な三次元構造を形成することが不可欠であり、その立体構造はアミノ酸配列に基づき、物理法則に従った自発的なフォールディング過程によって形成される。一方、タンパク質は単一の静的構造として存在するのではなく、分子が有する配座エントロピーを反映して絶えず構造揺らぎを示す。さらに、温度やpHなどの環境因子によってその構造分布は変化し、ときにはアンフォールド状態へと移行する。このように、**タンパク質の構造は周囲の環境に応答しながら絶えず揺らぎ、変化する**「万物流転」の存在として捉えることができる。しかし、これまでに報告されてきたタンパク質構造の多くは、結晶中あるいは低温下など、タンパク質本来の構造揺らぎが少なからず制限された条件で決定された安定構造である。これらの構造情報からは極めて多くの知見を得ることができ、疾患発症機構の理解のみならず、Structure-based drug design（SBDD）をはじめとする創薬研究に大きく貢献してきた。その一方で、静的な構造情報に基づいて設計された化合物が、必ずしも標的タンパク質に対して期待された結合能や薬効を示すとは限らない。その要因の一つとして、**タンパク質が本質的に有する構造揺らぎや不安定性が十分に考慮されていない**ことが挙げられる。そこで本研究では、タンパク質を静的な構造としてではなく、本来の環境下で熱揺らぎを伴って存在する「**構造集団**」として捉え、その動的構造を実験的に可視化することを目指す。さらに、得られた実験構造をin silico解析と統合することで、タンパク質の構造揺らぎ、薬剤結合および薬効の関係を定量的に理解する。本研究課題の最大の特徴は、従来の構造解析では可能な限り抑制されてきた**「熱揺らぎ」を、むしろ積極的に解析対象として取り込む**点にある。これにより、従来の静的構造に基づくSBDDを、動的な構造情報に基づく次世代型創薬へと発展させることが期待される。特に、より高い薬効を有する化合物の合理的設計や、利用可能な構造情報が限られる希少疾患を対象としたオーファンドラッグ開発において、構造と薬効をこれまで以上に密接に結び付ける新たな構造基盤を提供することを目指す。

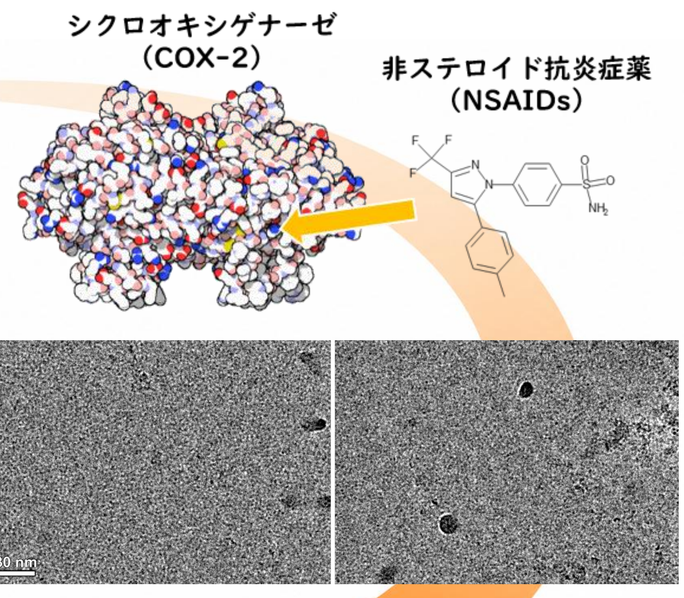


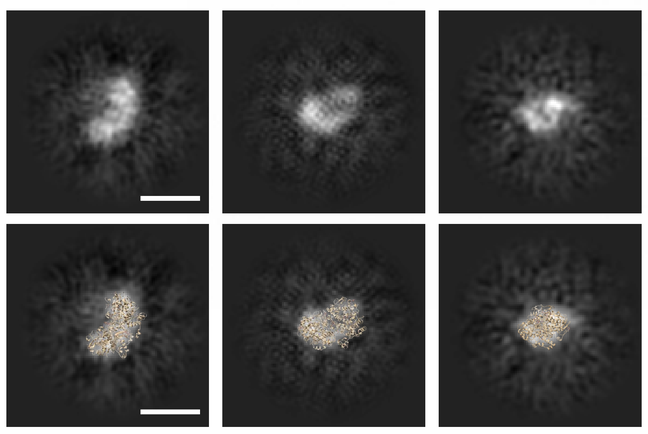
Fast Track Projectの成果

【クライオTEM】

組換えCOX-2の調製（バキュロウイルス-昆虫細胞発現系）
BINDS 支援課題 7153

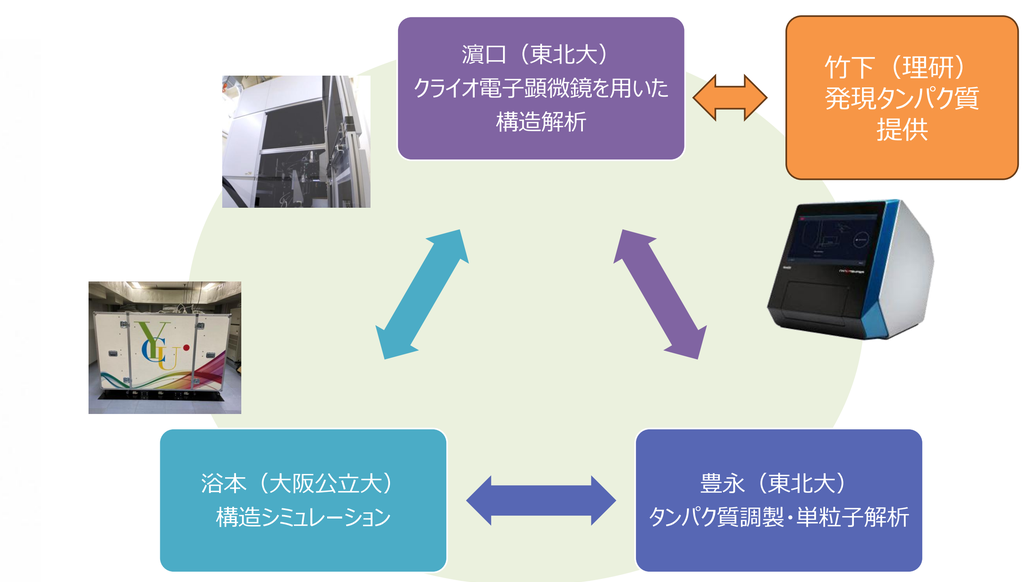






- COX-2は単一ピークに精製が可能
- 界面活性剤の影響により、粒子像質が悪い
- セレコキシブとの温度依存結合親和性の測定は可能

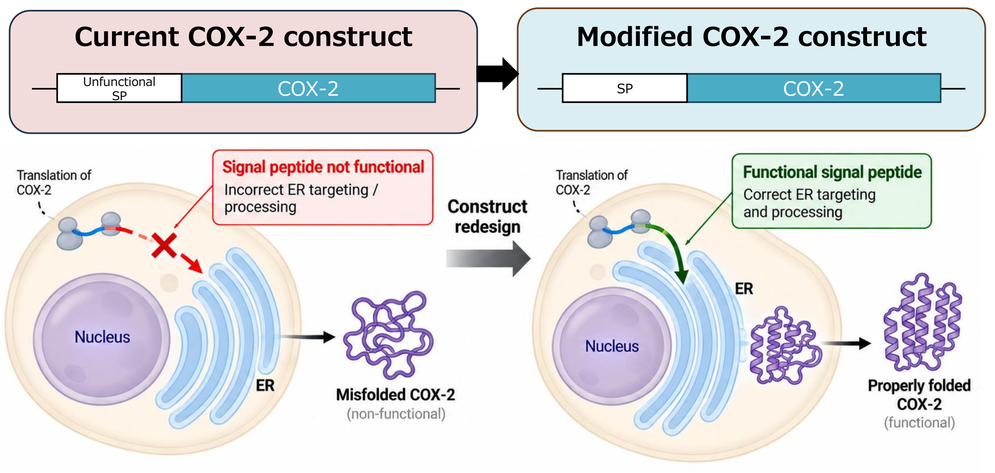
Fast Track Project　連携体制



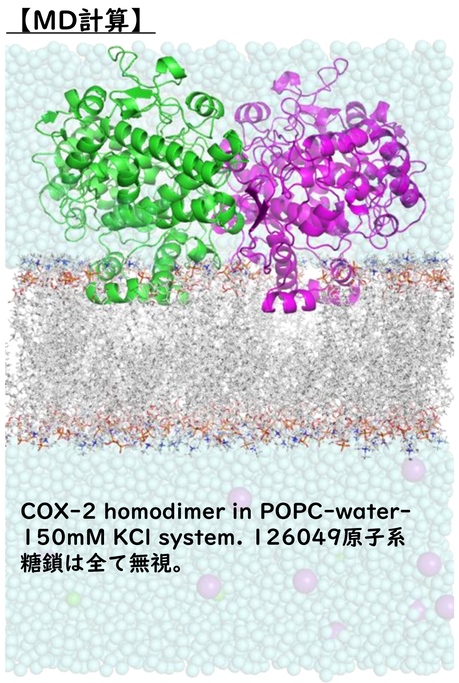
今後の課題

MD計算とクライオTEMで得られた構造情報を統合し、熱場構造解析の妥当性を評価する。

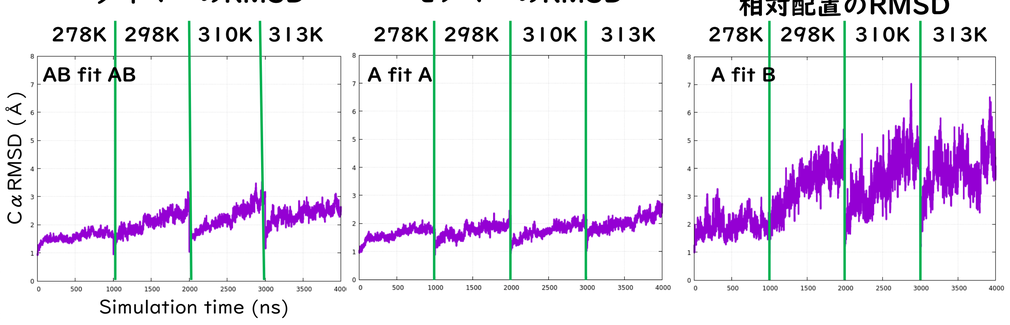
- COX-2のコンストラクト改変



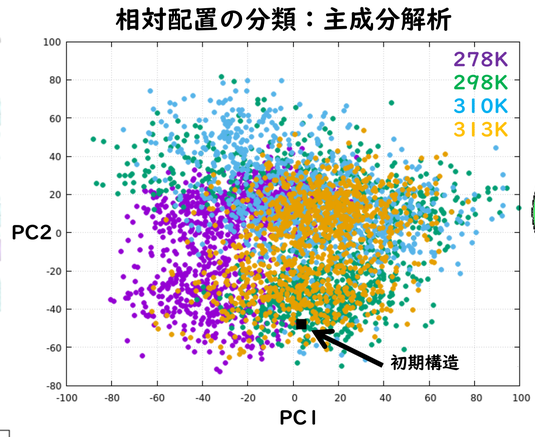
【MD計算】

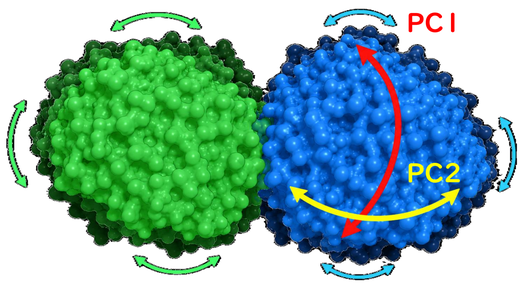


ダイマーのRMSD　モノマーのRMSD　もう一方のモノマーとの相対配置のRMSD

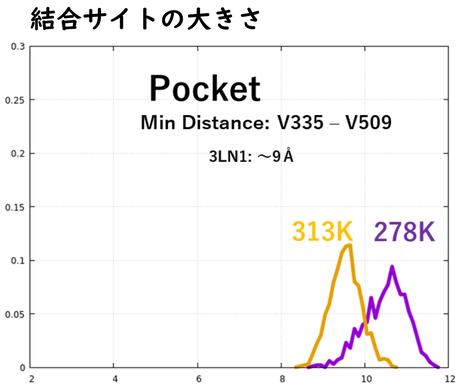


相対配置の分類：主成分解析

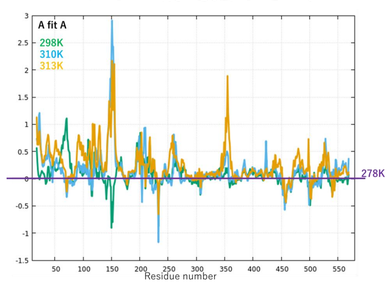




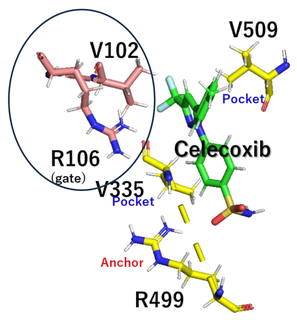
結合サイトの大きさ



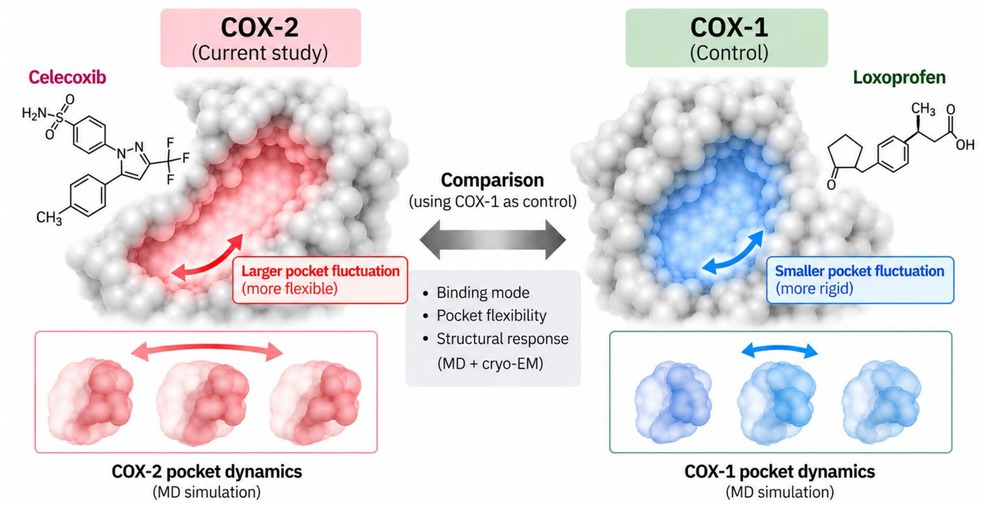
278Kからの構造揺らぎ（RMSF）変化



加温時に接近頻度が上昇する残基



- COX-1を用いた対照実験



- インフルエンザウイルスのノイラミニダーゼへの応用
  - タミフル結合親和性の温度依存性の測定
  - 温度依存的なダイナミクスの可視化