

業績紹介：1 分子検出 FRET の新しい解析法

寺嶋正秀

(京都大院理・A01 計画研究代表者)

論文題目："Distribution analysis for single molecule FRET measurement"

著者：K.Okamoto, M. Terazima

雑誌巻号：J.Phys.Chem.B, 112, 7308-7314(2008).

揺らぎを検出する上で、1 分子検出法は有用となる。特に、FRET と呼ばれる共鳴エネルギー移動による蛍光検出手法は、現在では多くの研究者に用いられる標準的な手法となっている。この FRET 法では、エネルギードナー分子からアクセプター分子へのエネルギー移動効率を測定し、その分布数を知ることによって、不均一性や揺らぎについての情報を得る。このために、各分子あるいは種々の時間で測定したエネルギー移動効率を横軸にとり、その頻度を縦軸にプロットし、たとえばガウス関数でフィットする。しかしその際に、ランダムなノイズが含まれるために、ビンとよばれるある範囲を決めて平均する必要がある。ビンサイズを大きく取りすぎると 2 つの分布が重なってしまい間違った分布を解析で出してしまうことになるし、逆にビンサイズを小さく取りすぎると、ノイズが大きくなりフィットができなくなる。このように、FRET 解析にはビンサイズを適切に選ぶ必要があり、それは経験で選ばれていた。

我々は、ビンサイズを用いない FRET 解析法をここで提案した。それは、横軸に FRET 効率を取り、FRET 効率の順番に均一な幅で縦軸にプロットしていくものである。これは FRET 効率の積分型分布を与える。よって、もし FRET 分布がガウス型関数で与えられるものならば、その積分型であるエラー関数でこの分布がフィットされるはずとなる。もしいくつかのガウス型分布が存在するならば、積分分布曲線はエラー関数の和で表わされるはずである。この方法では、ビンサイズという任意性のあるものを使用しないで解析できることが特徴である(図 1)。

まずはじめに、このアイデアに基づく解析の妥当性を、ノイズを加えて数値計算したデータをこの手法で解析することで確認した。その結果、ビン化を行わな

いでも、積分表示にして、残差解析を行うことで、分布数を正確に出すことができた。

次に、実際の DNA oligonucleotides の 1 分子検出を行い、本手法を適用した。片方の端にエネルギードナー分子、もう片方にエネルギーアクセプター分子を結合したサンプルについて、1 分子蛍光測定を行い、FRET 効率を求めた結果を図 2 に示す。これを解析したところ、DNA 構造から予想される妥当な分布数を求めることができた。

本手法は、今後 FRET 解析に大きな威力を発揮するものと思われる。

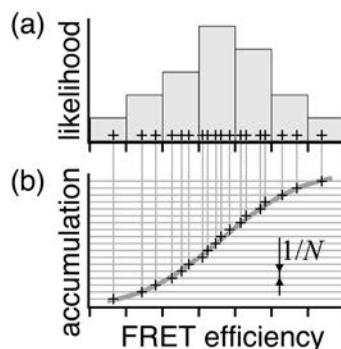


図 1 従来の解析法(a)と、新しい解析法(b)の概念図。上図の四角の幅がビンサイズである。

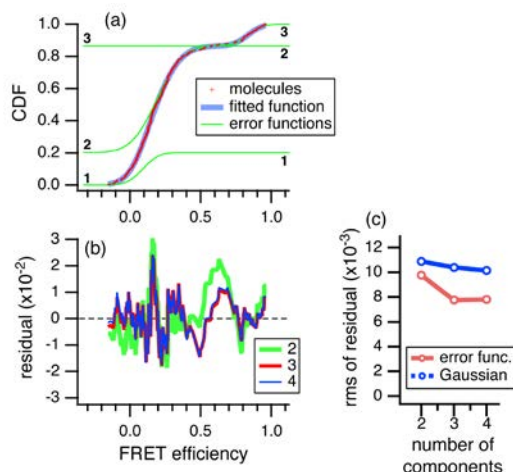


図 2 (a)実際に測定された FRET 効率の積分表示、(b)エラー関数の和でフィットした時の残差(緑、赤、青は使用した関数の数(2,3,4)を示す)、(c)使用した関数の数と残差との相関。エラー関数を 3 個以上用いてもフィットがよくなっていないことを示す。

業績紹介：イエロープロテインにおける低障壁水素結合の存在の証明

片岡幹雄

(奈良先端大物質創成・A02 計画研究代表者)

論文題目：" Low barrier hydrogen bond in photoactive yellow protein "

著者 :Shigeo Yamaguchi, Hironari Kamikubo, Kazuo Kurihara, Ryota Kuroki, Nobuo Niimura, Nobutaka Shimizu, Yoichi Yamazaki and Mikio Kataoka

雑誌巻号 : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **106**, 440-444 (2009).

1990 年代初頭より、低障壁水素結合(LBHB)が酵素活性の発現に寄与しているという主張がなされてきた。一方で、LBHB 形成の直接的証拠がないため、その主張に対する疑義も投げかけられている。LBHB の存在を証明するためには、水素原子の位置を同定し、ドナー原子、アクセプター原子の両者とも共有結合をしていないことを示す必要がある。イエロープロテイン(PYP)には、発色団の周囲に二つの短距離水素結合があり、LBHB の存在が議論されている。

本研究では、PYP の高分解能中性子結晶構造解析により、PYP の水素原子の位置を同定し、発色団周りの水素結合ネットワークや二つの短距離水素結合の実体を明らかにすることを目的にした。中性子回折実験のために調整した結晶は、室温でX線および中性子線に対しそれぞれ 1.25 Å、1.5 Å まで回折像を与えた。1.25 Å 分解能のX線構造解析により、C、N、O、S の各原子を精密化し、それに基づき 1.5 Å 分解能中性子構造解析により H (D) を精密化するという中性子/X線併用解析法を開発し、1.5 Å 分解能中性子構造を得た。全 942 個の水素原子のうち 819 個の水素原子の位置を決定することに成功した。発色団と E46 の間の短距離水素結合においては、水素原子と E46 のカルボキシル酸素との距離は 1.21 Å、水素原子と発色団のフェノール酸素との距離は 1.37 Å であり、LBHB を形成していることが明らかとなった。一方、発色団と Y42 の間の短距離水素結合では、水素原子は Y42 のフェノール酸素に共有結合しており (距離 0.96 Å)、短距離イオン性水素結合と同定された。LBHB がタンパク質のしかも基底状態に存在することが証明されたのは、世界で初

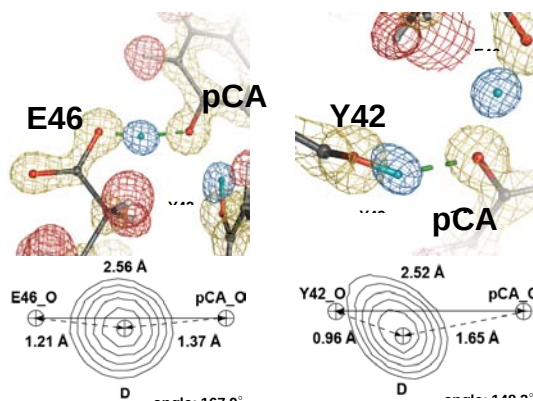


図 1. PYP の二つの短距離水素結合と水素 (重水素) 原子の位置。赤は水素原子、青は重水素原子を表す。

めてのことである。また、対イオンと考えられていた R52 は電荷を持っていないことも明らかにした。

これまでは、発色団が脱プロトン化しているのに対し E46 がプロトン化しており、R52 の正電荷が発色団の負電荷を安定化していると信じられていた。しかし、

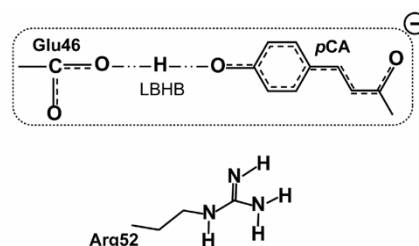


図 2. 提唱された電荷の安定化機構。

今回の結果は、これまで信じられていた機構は誤りであることを明瞭に示した。LBHB の強い結合エネルギーが静電エネルギーの不利を補い、LBHB 形成により π 電子系が発色団から E46 まで広がることで電荷密度を薄めているというタンパク質内部での疎水的環境下での孤立した負電荷の安定化機構が提唱された。また、励起状態では発色団の電荷はアシル基側に局在する。これにより、プロトン親和性が低下し、E46 がプロトン化した通常の水素結合に緩和すると考えられる。つまり、発色団からタンパク質部分に情報が伝わることになり、これまでに知られていなかった情報伝達機構が提唱されたものである。

業績紹介：タンパク質のN末端特異的標識のための新規手法を開発

芳坂貴弘

(北陸先端大マテリアルサイエンス・A02 計画研究代表者)

論文題目："N-Terminal specific fluorescence labeling of proteins through incorporation of fluorescent hydroxy acid and subsequent ester cleavage"

著者：Takayoshi Watanabe, Yoichi Miyata, Ryoji Abe, Norihito Muranaka, Takahiro Hoshika

雑誌巻号：ChemBioChem 9, 1235-1242 (2008)

タンパク質を蛍光標識することは、タンパク質の構造機能解析において有用である。しかし、化学修飾法によるタンパク質の蛍光標識では、特定部位のみを定量的に蛍光標識することは困難な場合がある。また、GFPなどの蛍光タンパク質融合法では、分子量の大きな蛍光タンパク質が標識するタンパク質の構造や機能に影響を与える可能性が考えられる。

一方、これまでに我々は、4塩基コドン法を用いて蛍光分子を結合させた非天然アミノ酸をタンパク質の特定部位に定量的に導入できることを報告している。この際、タンパク質の構造や機能への影響を最小限にするためには、多くの場合、タンパク質のN末端領域へ蛍光標識することが望ましいと考えられる。しかし、N末端にはタンパク質発現を効率化させるタグペプチドが付加されることが多く、その場合は蛍光分子を残してタグペプチドが除去されることが望ましい。

そこで我々は、蛍光標識アミノ酸の代わりに蛍光標識ヒドロキシ酸を用いた、新規N末端特異的タンパク

質蛍光標識法を開発した。タンパク質に導入された蛍光標識ヒドロキシ酸とその直前のアミノ酸の間のエステル結合は、翻訳反応が行われる弱塩基性条件では自発的に加水分解が起こり、その結果、N末端に蛍光標識分子のみが付加されたタンパク質が得られると予想される(図1)。

今回、蛍光標識ヒドロキシ酸として、BODIPYFL-アミノフェニル乳酸(BFLAFL)を設計・合成した。発現遺伝子として、様々なタグペプチドをストレプトアビジンのN末端に付加し、タグとストレプトアビジンの間に4塩基コドンCGGGを挿入した。これらタグ付加ストレプトアビジンのmRNAと、BFLAFLを結合させた4塩基アンチコドンを持つtRNAを、大腸菌無細胞翻訳系に加えることで、タンパク質合成を行なった。翻訳生成物をSDS-PAGEで分離し、蛍光イメージ測定とウェスタンブロットにより解析した結果、BFLAFLを導入することで、タグペプチドが除去されてN末端に蛍光標識分子が付加されたタンパク質が生成することを確認できた。

また、直前アミノ酸の最適化を行なった結果、Asnにすることで効率良くエステル結合の分解が起こることを見いだした。さらに、直前アミノ酸にAsnを挿入したタグ配列を用いて、様々なタンパク質についてN末端特異的蛍光標識が可能であることも確認した。今後、本手法はタンパク質内部への別の蛍光標識アミノ酸の導入と組み合わせて、タンパク質の構造揺らぎを蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)等により解析する上で、有用な手法になると期待される。

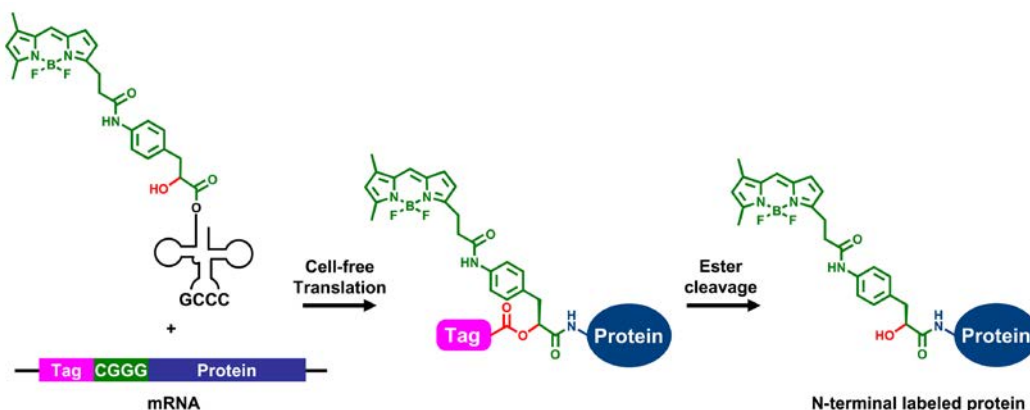


図1 蛍光標識ヒドロキシ酸の導入によるタンパク質のN末端特異的蛍光標識

業績紹介：乳がんに対するハイブリッドリポソームの制がん効果

上岡龍一

(崇城大応用生命科学・A03 計画研究代表者)

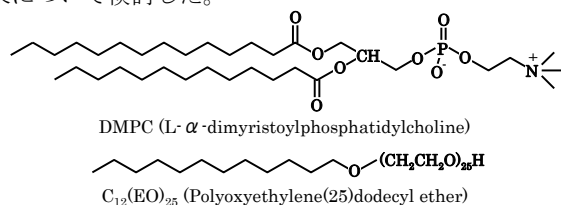
論文題目：“Nanoparticles of Hybrid Liposomes for the Inhibition of Breast Tumor Growth along with Apoptosis”

著者：Shinya Shimoda, Hideaki Ichihara, Yoko Matsumoto, and Ryuichi Ueoka

雑誌巻号：Chem. Lett., **38**, 134-135 (2009)

ハイブリッドリポソームは、リン脂質と界面活性剤を緩衝水溶液中で超音波照射するだけで容易に得られる生体適合性の医用素材である[1, 2]。これまでに、*in vitro*において、種々の培養がん細胞に対する制がん効果および制がんメカニズムが明らかになっている。ハイブリッドリポソームは、正常細胞には作用せず、膜の揺らぎ(流動性)の大きながん細胞膜へ特異的に融合・蓄積し、アポトーシスを誘導することを報告している[3]。*in vivo*においては、担がんモデル動物に対する治療効果および正常動物に対する安全性が確認されている。さらに、生命倫理委員会の承認後の臨床応用において、副作用がなく、固形リンパ腫瘍の顕著な縮小効果が得られている[4]。

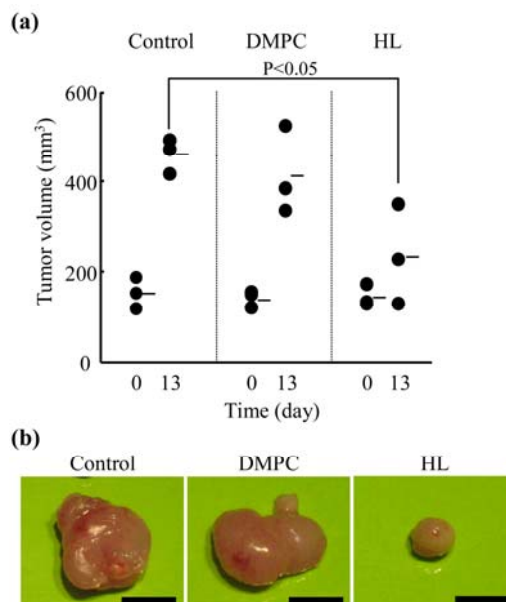
本研究では、副作用がなく患者にやさしい制がん剤の開発を目指し、リン脂質(DMPC)および PEG 系界面活性剤($C_{12}(EO)_{25}$)を構成成分とした 95mol%DMPC/5mol% $C_{12}(EO)_{25}$ ハイブリッドリポソーム(HL)を用い、*in vivo*における担がんモデルマウスに対する抗腫瘍効果について検討した。



まず、HL の膜物性について検討した。HL は、調製直後から粒形分布幅が狭く、均一な約 100 nm の膜直径で、1 ヶ月以上安定であることを確認した。この膜直径は、細網内皮系への取り込みを回避可能である。さらに、長期間安定であることから、臨床応用に適した医用素材であることが明らかになった。

次に、ヒト乳がん細胞をマウスに皮下移植し、担が

んモデルマウスを作成後、HL の *in vivo*における抗腫瘍効果について検証した。HL は、担がんモデルマウスに対して顕著な腫瘍抑制効果を示した。一方、DMPC リポソーム治療群においては、腫瘍抑制効果が見られなかった(図)。2 週間連続投与終了後、腫瘍切片を作成し、TUNEL 法により検証したところ、HL 治療群においてアポトーシス細胞が多く観察された。以上のように、*in vivo*において、HL は担がんモデルマウスに対して、アポトーシス誘導による抗腫瘍効果を示すことを今回初めて明らかにした。



図：担がんモデルマウスに対するハイブリッドリポソームの腫瘍抑制効果。

(a)：腫瘍容積，(b)：腫瘍写真。

今回得られた知見に加え、HL の高い安全性がこれまでに報告されており、乳がんに対し、副作用のない「膜の揺らぎをターゲットとする」新しい制がん剤としての期待が高まった。今後、さらに多くの知見を蓄積し、患者にやさしい制がん剤としての臨床応用を目指す予定である。

参考文献

- [1] R. Ueoka *et al.*, *J. Am.Chem. Soc.* **107**, 2185-2186 (1985). [2] R. Ueoka *et al.*, *J. Am.Chem. Soc.* **110**, 1588-1595 (1988). [3] Y. Komizu *et al.*, *Bioorg. Med Chem. Lett.* **16**, 6131-6134 (2006). [4] H. Ichihara *et al.*, *Anticancer Res.* **29**, 1187 (2008).

シンポジウム報告

2nd International Symposium on Nanomedicine (ISNM2009) Asian Core Symposium –Nano and Biomedical Molecular Science– February 4-7, 2009 at Okazaki Conference Center

上岡龍一

(崇城大応用生命科学・A03 計画研究代表者)

表記のシンポジウムが 2009 年 2 月 4 日から 4 日間、自然科学研究機構岡崎コンファレンスセンターにおいて開催された。

本シンポジウムの企画者は、分子科学研究所の宇理須恒雄教授、京都大学再生医学研究所の岩田博夫教授および東北大学医学系研究科の大内憲明教授である。基調講演および特別講演に招待された研究者のリストは以下の通りである。

Plenary Talk and Special Lecture

Hirro IWATA (Kyoto Univ., Japan)

Kazunori KATAOKA (The Univ. of Tokyo, Japan)

Chung-Hsuan Winston CHEN (Academia Sinica, Taiwan)

Li-Jun WAN (Chinese Acad. Sci., China)

Ryuichi UEOKA (Sojo Univ., Japan)

Shinae KONDOH (Kyoto Univ., Japan)

Steven G. BOXER (Stanford Univ., USA)

Takaomi SAIDO (RIKEN, Japan)

Yoon-Sik LEE (Seoul Nat'l. Univ., Korea)

Yoshiki SAWA (Osaka Univ., Japan)

Yuji KASHIWAKURA (Okayama Univ., Japan)

第 2 回ナノメディシン国際会議では、新学術領域研究「揺らぎと生体機能」の計画班員のなかから、崇城大学の上岡龍一教授が「Membrane Targeted Nanotherapy with Hybrid Liposomes for Tumor Cells Leading to Apoptosis」のタイトルで基調講演しました(写真 1)。ナノメディシンは、分子科学を基盤とした医学や医療という新しい概念であり、ナノサイズレベルのテクノロジーを医療応用する学問領域です。ワトソン、クリックの DNA 二重らせん発見を契機として、生命を生物物理学など物質科学の観点から研究する学際領域が

生まれています。がん、神経変性疾患、循環器病など難治性疾患の克服に向けて、新規治療開発研究におけるナノメディシンの役割は重要になりつつあります。上岡教授の講演には質問時間をはるかに超過して多くの質問がなされ、ハイブリッドリポソームの制がん効果に大きな反響がありました。本会議は、米国、欧州、アジア各国から研究者が集い、ナノメディシンの現状と将来について熱い討論が交わされました。ポスター発表では、上岡研究室の古水雄志博士研究員が「Inhibitory Effects of Ca^{2+} on the Growth of Tumor Cells」のタイトルで英語で発表し、The Best Poster Award に選ばれました(写真 2)。



写真 1 上岡教授の基調講演



写真 2 The Best Poster Award の古水研究員(左)と宇理須教授(右)

片岡班員らの研究成果が新聞に掲載される。

A02 班、計画研究代表者の片岡幹雄博士と同グループの上久保裕生博士（連携研究者）、山口繁生氏（研究協力者）及び日本原子力研究開発機構の黒木良太博士のグループの共同研究の成果が科学新聞（1月16日）に掲載されました。

科学新聞 21年1月16日 6面

低障壁水素結合 タンパク質で存在を証明

巨大分子であるタンパク質を構築している水素結合は、その複雑な立体構造を築き、酵素として触媒反応を行う際にも重要な役割を担っている。奈良先端科学技術大学院大学の片岡幹雄教授、上久保裕生准教授、山口繁生氏と日本原子力研究開発機構の黒木良太研究主幹、栗原和典研究主幹らの共同研究グループは、このタンパク質の水素結合のなかでも、これまで高いエネルギーで結びついた「低障壁水素結合（LBHB）」という特殊な相互作用がタンパク質にも存在し、その働きを支えていることを世界で初めて証明した。光合成にかかわる光受容タンパク質（エロプロテイン）を対象に、高分解能中性子結晶構造解析という独自の研究方法を用いて成功したもの。光情報伝達の新たなメカニズムも解明されており、今後、酵素を基盤に働かせる構造を開発するなどの新規な設計原理にも応用が期待される。

奈良先端大 原子力機構 創薬に応用期待

タンパク質機能の大部分は、構成分子から水素原子が抜け出すか吸着するかという反応で進行する。この反応は主に水素結合を介して起きるため、タンパク質機能のメカニズムを理解するには水素原子の位置を含めて構造を明らかにしなければならぬ。通常、タンパク質中でみられる水素結合は、ドナー原子と共有結合した水素が弱く正に帯電し、他の弱く負に帯電したアクセプター原子との静電相互作用によって生じる。一方で、液体中の有機低

タンパク質中の水素結合は、X線結晶構造解析など従来の測定手法では直接観測することが困難であったが、片岡教授らは、中性子結晶構造解析と高分解能X線結晶構造解析を併用した構造解析法を世界に先駆けて考案し、エロプロテインに存在する、ほぼすべての水素原子位置を決定することに成功した。その結果、タンパク質の基底状態でLBHBが存在することが初めて証明された。

タンパク質内部は疎水的であるため、孤立した水素結合は極めて不安定な状態にある。そのため、タンパク質内では正のイオンと負のイオンとが対になって存在している必要があり、エロプロテインでも、反応中心は負のイオンとなっており、対イオンにより孤立した水素結合が安定化されていると推察されていた。しかし今回、同教授らは、LBHBに加え、対イオンと結合していたアルギニンが、LBHBを持っていないことを突き止めた。これにより、LBHB自身が、タンパク質内部のイオンになりにくい疎水的環境でも孤立した水素結合を安定化させていることが明らかとなり、タンパク質に対する新しい物理化学的な役割がわかった。

さらに、LBHBは2つの電気陰性度の高い原子が同程度の水素原子親和性を示すときには生じる結合であることも判明した。水素原子に対する親和性は、水素結合に関与する反応基の電子状態と密接に関係するため、外的刺激により反応基の電子状態が変化すれば、その大きな結合エネルギーに相反して、結果的にLBHBを切断することができると、エロプロテインでは、この性質に基づいて反応中心が光を受けるとどのように生じる電荷移動がLBHBから水素結合へ切り替わり、タンパク質部分への迅速なエネルギー・情報移動を誘発していることが明らかになった。

今回解明された構造は、これまで全く考えられなかったものであり、LBHBの観測により初めてわかった。これらの成果は、タンパク質の触媒機構やエネルギー変換、情報伝達機構に関する新たな知見を提供しただけでなく、今後、LBHBを模倣に入れた新規の創薬デザインにも大きく貢献するものと期待される。