

### 業績紹介：<sup>13</sup>C 検出NMR法の高分子量糖タンパク質の構造解析への応用

加藤晃一

(自然科学研究機構・A01 計画研究代表者)

論文題目: "A <sup>13</sup>C-detection NMR approach for large glycoproteins"

著者: Yoshiki Yamaguchi, Markus Wälchli, Mayumi Nagano, Koichi Kato

雑誌巻号: *Carbohydr. Res.* **344**, 535-538 (2009)

生体を構成しているタンパク質の多くは糖鎖による修飾をうけた糖タンパク質として機能している。糖鎖は、タンパク質の溶解性や安定性を規定するばかりでなく、タンパク質の機能部位の高次構造の構築に寄与しており、ウイルス感染や細胞間コミュニケーションを媒介する分子認識現象にも関与している。最近では、タンパク質のフォールディング・輸送・分解といった細胞内運命の決定にも糖鎖が深くかかわっていることが明らかとされつつある。

このように糖鎖の生物学的重要性は広く認識されているが、その機能発現メカニズムを立体構造解析を通じて解明しようというアプローチはこれまで困難を伴った。糖鎖の構造はゲノムに直接コードされておらず、微視的不均一性を示す。また、糖鎖は一般に、ポリペプチド鎖に比べて内部運動の自由度に富んでいるため、水溶液中では立体構造が揺らいでいる。そのため、糖タンパク質の結晶化は困難であり、構造生物学的研究が立ち遅れてきた。こうした状況に鑑みて、筆者らはこれまでNMRを利用した糖タンパク質の構造解析を体系的に行なうための研究戦略を開拓してきた[1, 2]。本論文は、筆者らがこれまで開発してきた安定同位体標識技術を利用して糖タンパク質の糖鎖に<sup>13</sup>C標識を施し、<sup>13</sup>C検出NMR法による高分子量糖タンパク質の構造解析の可能性を検討したものである。

動物細胞培養系を利用して代謝的に<sup>13</sup>C標識を施した免疫グロブリンG (IgG) のFcフラグメント(分子質量 56kDa) を調製して<sup>13</sup>C検出NMR計測を行な

った結果、<sup>13</sup>C間に観測される核オーバーハウザー効果を利用することにより、高分子量糖タンパク質の糖鎖由来の信号を効率的に帰属することが可能であることが判明した。特に、<sup>13</sup>C-<sup>13</sup>C NOESY スペクトル(図A)を計測することによって得られる化学シフト相関は糖残基の種類ごとに特徴的なパターンを示すことから、糖鎖ピークを残基タイプ別に分類するのに有効であることが示された。

一方、<sup>13</sup>C間のスカラー結合に基づく磁化移動を利用した<sup>13</sup>C-<sup>13</sup>C TOCSY スペクトル(図B)においては、糖鎖の中で運動性の高い部位に由来する信号のみが選択的に観測された。したがって、2種類のスペクトルから得られる情報を組み合わせることにより、糖鎖の揺らぎに関する有用な情報を得ることが可能である。

このように、安定同位体標識を施した試料に<sup>13</sup>C検出NMR法を適用することにより、高分子量糖タンパク質の動的構造研究に新たな可能性が切り拓かれた。

#### 参考文献

- [1] Y. Yamaguchi and K. Kato, In: *Modern Magnetic Resonance*, Springer, vol.1, pp.219-225 (2006)
- [2] K. Kato and Y. Yamaguchi, In: *Experimental Glycoscience: Glycochemistry*, Springer, pp.45-50 (2008)

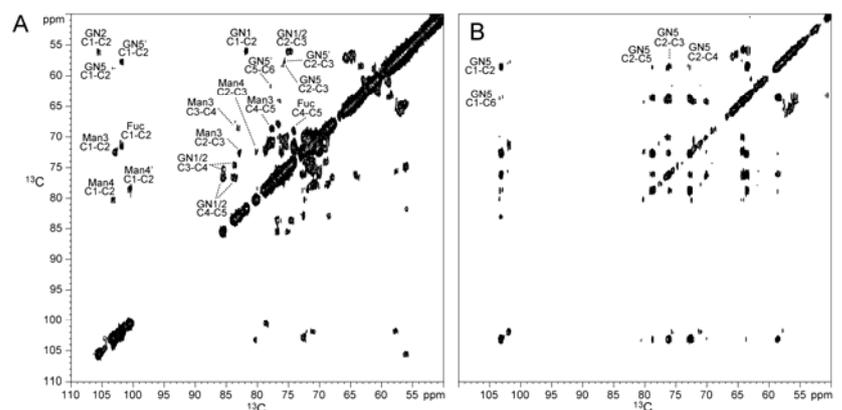


図: 免疫グロブリンGのFcフラグメントの(A)<sup>13</sup>C-<sup>13</sup>C NOESY スペクトルと(B)<sup>13</sup>C-<sup>13</sup>C TOCSY スペクトル

#### 業績紹介：ミオグロビンからのCO解離過程と熱力学に関する統計力学的研究

平田文男

(分子科学研究所・A03 計画研究代表者)

論文題目: "Theoretical Study of CO escaping pathway in Myoglobin with the 3D-RISM Theory"

著者: Yasuomi Kiyota, Ryusuke Hiraoka, Norio Yoshida, Yutaka Maruyama, Takashi Imai, and Fumio Hirata

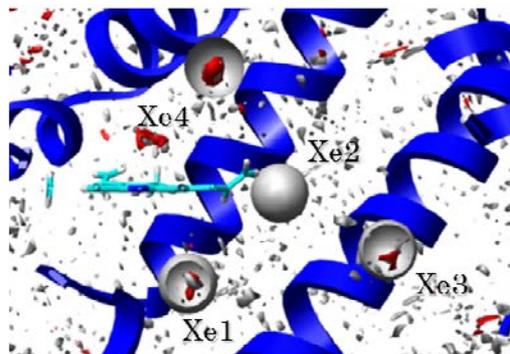
雑誌巻号: *J. Am. Chem. Soc.*, 2009, 131 (11), pp 3852–3853.

ミオグロビンは多くの生体において酸素の貯蔵に深く関わる球状タンパク質である。ミオグロビン内における分子の吸脱着過程は、酸素供給系の複雑な生理作用を解明する上で重要であり、一酸化炭素やキセノン等、多くのリガンド分子を用いて研究されてきた。分光学的実験により、リガンド分子はタンパク質内の空孔を經由し、溶媒からタンパク質内部の色素ヘムに吸脱着を行うことが予測されている[1,2]。しかしながら、どのような経路で吸脱着が行われるか等に関する統一的な見解は未だ存在していない。

本研究では、3D-RISM理論[3]を用いてリガンド分子(キセノン(Xe)、一酸化炭素(CO))の分布を分布関数として直接求めることで、ミオグロビンの分子吸脱着過程の再現、予測を行うことを目的とした。まずXe溶液中で構造最適化を行い、得られた3次元分布関数より配位数を計算することで、各Xeサイトにおけるリガンド分子の分布の相違を検証した。次にCO脱離過程を解析するため、中間体と考えられる構造を用意し、部分モル容積の変化を検証した。

まず、3D-RISM/KH方程式により得られた一酸化炭素の3次元分布関数を右図に示す。Xeについても同様に分布関数を求め、そこから配位数を計算した。各サイトにおけるリガンド分子の配位数の比較により、Xe1サイトではXe分子の親和性が高く、他のサイトではCO分子の親和性が高いことが示された。

次に、一酸化炭素の吸脱着過程の検証を行った。2つのXeサイト、Xe1およびXe4は、吸脱着過程における経路であるという分光学的実験結果が寺嶋らにより報告されている[1]。さらに、脱着過程における体積変化が測定されており、Xe存在下ではXe4サイトを



図：ミオグロビン内部における一酸化炭素分子の3次元分布。空孔はX線構造解析においてXe分子がトラップされていたためXeサイトと呼ばれている。

COが経由すると予測された[2]。そこで、脱離するCOを溶質としてあらわに扱い、色素ヘムの結合サイト(MbCO)、Xe1、Xe4のそれぞれにCOが存在する場合(Mb:CO)のモデルを構築した。各モデルでの部分モル体積を計算し、その変化を算出したところ、Xe4サイトを中間体とする経路が実験において測定された体積変化の傾向を良く再現することが分かった(下表)。実験における予測を理論により分子論的に立証した。

表：各モデルにおける部分モル容積とその変化。 $(\Delta V_1 = (\text{Mb:CO}) - (\text{MbCO}), \Delta V_2 = (\text{Mb+CO}) - (\text{Mb:CO}), \text{ and } \Delta V_{\text{total}} = (\text{Mb+CO}) - (\text{MbCO}))$ .

models	PMV[cm <sup>3</sup> /mol]		
MbCO	9029.0		
Mb:CO(Xe1)	9030.4		
Mb:CO(Xe4)	9032.8		
Mb+CO	9019.6		
	Xe1	Xe4	(exptl. [1, 2])
$\Delta V_1 =$	1.4	3.8	(3±1)
$\Delta V_2 =$	-10.8	-13.2	(-12.6±1.0)
$\Delta V_{\text{total}} =$	-9.4	-9.4	(-10.7±0.5)

#### 参考文献

- [1] Y. Nishihara, M. Sakakura, Y. Kimura, and M. Terazima, *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 11877-11888 (2004)
- [2] M. Sakakura, S. Yamaguchi, N. Hirota, and M. Terazima, *J. Am. Chem. Soc.* **123**, 4286-4294 (2001).
- [3] Hirata, F. *Molecular Theory of Solvation*; Kluwer: Dordrecht, Holland, **2003**.



## シンポジウム報告 新学術領域“揺らぎと機能”及び特定領域研究“水と生体分子” 合同公開ワークショップ

片岡幹雄

(領域事務担当)

本領域の第2回公開ワークショップが平成19年度に終了した特定領域研究“水と生体分子の織り成す生命現象の化学”(領域代表:桑島邦博)の第6回公開ワークショップと合同で、3月16, 17日の2日間、岡崎コンファレンスセンターで開催された。15件の招待講演のほか、89件のポスター発表がなされた。参加者は146名(うち外国人7名、学生33名)を数えた。

招待講演者のうち、Martina Havenith 教授は、急用で来日ができなくなり、講演が中止された。また、Sonia Longhi 教授は、来日後にウイルス感染症を発症し、招待されていた夫君の Frédéric Carrière 教授が Longhi 教授の講演を代読した。前代未聞のハプニングにもかかわらず、質の高い招待講演と興味深いポスター発表により、シンポジウムを成功裏に終えることができた。お世話をいただいた桑島邦博、加藤晃一両教授および両研究室の皆様へ感謝したい。加藤教授には、Longhi 教授の病院のお世話に走り回っていただきたい。Longhi 教授夫妻は無事帰国したことをお伝えしておきたい。

また、16日の夜には懇親会が開催された。国際アドバイザーの Miller 教授から本領域に対する期待が語られた後、廣田京大名誉教授の発声により“水と生体分子”の成功を祝福し、“揺らぎと機能”の進展を祈念して乾杯した。本シンポジウムの参加者による報告や印象は、次号のニュースレターに掲載する予定である。

### プログラム

3月16日(月)

#### 第6回“水と生体分子”公開ワークショップ

桑島邦博(岡崎統合バイオ): Folding mechanism of homologous proteins: A comparative study between  $\alpha$ -lactalbumin and lysozyme

岡本祐幸(名大・院理): Generalized-ensemble simulations of water and biomolecules

平田文男(分子研): Molecular recognition, fluctuation, and function of protein studied by a statistical mechanics of

liquids

桜井実(東工大): Physical study on the mechanism of anhydrobiosis in the sleeping chironomid, *Polypedilum vanderplanki*

後藤祐児(阪大・蛋白研): Amyloid fibril growth visualized by thioflavin T fluorescence and probed by H/D exchange

吉川研一(京大・院理): Transition of the higher order structure of DNA in Aqueous solution

#### 第2回“揺らぎと機能”公開ワークショップ

R. J. Dwayne Miller(トロント大): Making the molecular movie: Quest for the structure-function correlation of biology

寺嶋正秀(京大・院理): Time-resolved detections of conformation changes, intermolecular interactions, and fluctuations of short-lived intermediate species during biological reactions

3月17日(火)

芳坂貴弘(北陸先端): Site-specific fluorescence labeling of proteins through extension of the genetic code and its application to FRET analysis of proteins

松本陽子(崇城大): Nanotherapy with hybrid liposomes for tumors in relation to fluctuation of membranes

Frédéric Carrière(CNRS): How interfacial enzymes adapt to a new environment by changing their conformation: Opening the lipase lid

加藤晃一(岡崎統合バイオ): Ultra-high field NMR approaches to dynamical structures of proteins hard to deal with

片岡幹雄(奈良先端): Effect of hydration on protein dynamics studied by neutron scattering

Sonia Longhi(CNRS)(by F. Carrière): Structural disorder and induced folding within the replicative complex of measles virus: experimental assessment and functional role

Susan Marqusee(カリフォルニア大バークレー): Experimental studies to manipulate the energy landscape of proteins



シンポジウムの参加者による集合写真



Carrière 教授と寺嶋教授



懇親会で挨拶する Miller 教授



Marqusee 教授と岡本教授

### 領域代表 寺嶋正秀氏が井上學術賞を受賞

片岡幹雄  
(領域事務担当)

領域代表の寺嶋正秀氏が、平成 20 年度の井上學術賞を受賞されました。本領域の発足に際し、大変幸先のよい喜ばしいニュースです。本領域関係者の皆様とともに心からお祝いしたいと思います。

井上學術賞は井上學術振興財団から授与される賞であり、関係 28 学会及び財団の役員・評議員等から推薦を受けて、選考を行い授与を行っています。基礎科学領域での研究者を表彰するために設立された財団から贈呈される賞であり、50 歳未満の基礎科学領域で顕著な業績を上げた研究者に贈呈されます。毎年ほぼ各分野一人以下の受賞者数であります。ちなみに、井上學術振興財団は、井上節子氏の遺贈された浄財を基本財産にして各賞を設立し、基礎科学分野の研究者への支援及び助成を行っている団体です。若手への井上研究奨励賞も出しております。寺嶋正秀氏の受賞理由は以下の通りです。

**受賞課題：** 非平衡系時間分解熱力学分光法の創始とタンパク質反応ダイナミクスへの展開

**Title:** Developments of time-resolved thermodynamics and transport properties and applications to biological protein reactions

**授賞理由：**

これまで熱力学は、科学の根幹として物質の理解に大きな役割を果たしてきたが、常に定常状態に対して適用されており、熱力学量を指標にダイナミクスが論じられた事はなかった。寺嶋正秀博士は、化学反応で刻々と不可逆的に変わる系に対して、一定温度・一定圧力下での反応熱力学量変化を観測する事に世界で初めて成功した。これは 200 年に渡る科学史の中でのブレークスルーである。本手法を、まず基本的な溶液系で確認し、ついで多くの蛋白質での反応を記述する事に成功した。例えば、発色団の光化学変化が蛋白部分に伝わり、エネルギーや周りの水を含めた分子体積変化を生む過程を時間分割で観測することに成功している。これにより、定常状態の熱力学・分子拡散分野と化学

反応ダイナミクス分野を組み合わせた新学問領域を創成した。また、分子に光で注入したエネルギーが熱に変換される過程を、自作の「温度レンズ」や「分子温度計-分子ヒーター統合システム」等の新温度検出法で、1 ピコ（1 兆分の 1）秒刻みで追跡する事に成功し、光エネルギー注入後の温度を 0.001 度の精度、ナノメートルの空間分解能で検出する新手法を編み出した。これらの研究は非常に独創的であり、世界的にも類似の研究は存在しない。数多くの国際学会招待講演を行い、ゴードン会議チェアや日米先端科学会議運営委員長等を歴任し、世界をリードしている。



授賞式での寺嶋教授