

### 業績紹介：1 残基変異による力学的安定性の違いとその仕組みを原子間力顕微鏡による 1 分子機械的伸張実験により解析

川上勝（北陸先端大マテリアルサイエンス研究科・A01 公募研究代表者）

論文題目："Identification of a Mechanical Rheostat in the Hydrophobic Core of Protein L"

著者：David P. Sadler, Eva Petrik, Yukinori Taniguchi, James R. Pullen<sup>1</sup>, Masaru Kawakami, Sheena E. Radford and David J. Brockwell

雑誌巻号：J.Mol. Biol. **393**, 237-248 (2009)

蛋白質やその複合体は力学的刺激に対して構造を保持、または構造を変化（アンフォールディング過程を含む）させるが、これは細胞にとって外的刺激を信号として伝達する非常に重要な機能である。これまで、原子間力顕微鏡（AFM）による 1 分子力計測により、様々な構造をもったタンパク質の力学的安定性について定量的に調べられてきた。一般的に、タンパク質の力学的安定性はそのトポロジーと密接に関係していることが分かっている。しかし近年の研究により、タンパク質の力学的安定性はトポロジーだけでなく、側鎖のパッキング、特に疎水性コアの形成に関係していることが指摘されてきている。

今回我々は、小さく丈夫な構造を持った protein L の B1 ドメインに着目した。このタンパク質の N,C 末端を引っ張ると、2 つの力学的安定なドメイン（図 1 a 赤、緑部分）を引きちぎるようにしてタンパク質はアンフォールドされる。このタンパク質の疎水性コア形成部分に対し、コアを不安定化させるさまざまな 1 残基変異体を作成し、1 分子伸張実験を行った。具体的には、野生型、変異体 protein L それぞれを titin とのタンデム型ポリマーとして発現し（これは可溶性を上げるためと、protein L 同士の相互作用の影響を避けるためである）、AFM によってポリマー 1 分子を引っ張り、得られるのこぎり刃状のフォースカーブ曲線から、タンパク質のアンフォールディングに必要な力  $F$  を測定した。さらに引っ張る速度と力  $F$  の関係性を調べ、これをヘテロタンパク質ポリマーを想定したモンテカルロシミュレーションの結果と照らし合わせることで、protein L の力学的安定性ととも、 $x_u$ （天然状態一遷

移状態間の分子長差）や  $k_u$ （外力ゼロの時のアンフォールディング速度定数）といったエネルギー地形に関するパラメータを求めた。そして変異体の結果を野生型のそれらと比較し、疎水性コア部分の変異がタンパク質の力学的安定性やエネルギー地形に対し、どのように影響を及ぼすのかを調べた。

その結果、2 つの安定ドメイン間の境界部に位置する 60 番目の残基の変異体(I60V)が著しく不安定化されている(野生型との差:  $\Delta F = -36$  pN,  $\Delta x_u = 0.2$  nm)ことが分かった。さらにこの部位に対して、逆に疎水性残基間のコンタクトを増やすようにした変異体について力学的安定性を調べると、疎水性残基間だけでなく、2 つの安定ドメイン間のコンタクト数を増加させる変異(I60F)に対し、著しい安定性の上昇が見られた( $\Delta F = +72$  pN)。これらの結果から、タンパク質の力学的安定性の決定には、トポロジー、疎水性コア、安定ドメイン間相互作用が複合して働いていることが分かった。これらを考慮することが、タンパク質の安定性改善に向けた理論的なアプローチにつながると期待される。今後これら野生型、変異体の力学的パラメータから、1 分子のばね定数、揺らぎの大きさを求め、変異による構造の揺らぎの影響を調べていく予定である。

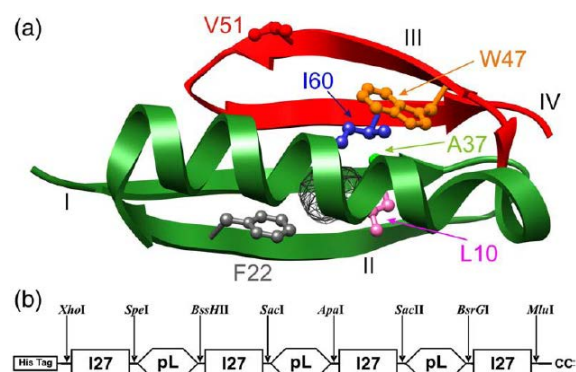


図 1. (a) protein L(PDB:1HZ6)の 3 次元構造。変異を加えられた残基の側鎖(ball & stick)と、疎水コア中のキャビティ(mesh)を表示。(b) (protein L)<sub>3</sub>-(titin)<sub>4</sub> ヘテロポリマーのコンストラクト。C 末端にシステイン 2 残基が付加されており(その他のシステインはセリンに置換)、基盤に金表面を用いることで、選択的に C 末端でタンパク質を基盤に固定している。

#### 戸谷希一郎氏が第 12 回日本糖質学会奨励賞を受賞

片岡幹雄（領域事務担当）

A03 班公募研究代表者の戸谷希一郎氏（成蹊大学・理工学部准教授）が「第 12 回日本糖質学会奨励賞」を受賞されました。平成 21 年 9 月 9 日（水）から 11 日（金）まで、飛騨・世界生活文化センターで開催された第 29 回日本糖質学会年会において、授賞式ならびに受賞講演が行われました。本領域からも心からお祝いしたいと思います。

日本糖質学会では、糖質科学の分野で優れた研究成果を挙げた満 40 歳以下の研究者に対し、毎年、化学系 1 名、生物系 1 名を対象に「奨励賞」の表彰を行ってきました。本年度は化学系として戸谷氏が生物系として名古屋大学大学院医学系研究科の岡島徹也氏が受賞者として選ばれました。

今回の受賞対象となった戸谷氏の研究課題は「小胞体糖鎖プロセッシングに関する化学的な研究」です。タンパク質の多くは小胞体において複雑な糖鎖付加を受け、その後様々な糖鎖プロセッシング酵素の働きによって多様なグリコフォームを獲得します。一昔前まではこのような糖鎖修飾の意味は理解されておりましたが、近年、これらの糖鎖がタンパク質のフォールディングを制御するタグとして利用されていることが

明らかになってきました。しかしながら、基質糖タンパク質の詳細な受け渡し機構や各糖鎖の機能は依然、明確ではありませんでした。戸谷氏は構造が均一な合成糖鎖基質や人工糖タンパク質を駆使することで、小胞体糖鎖プロセッシング機能の分子レベル解析に取り組み、とくに糖タンパク質品質管理の中心機構であるカルネキシン／カルレティキュリンサイクルについて詳細な基質受け渡し機構を解明しました。また一連の研究を通じて糖鎖プロセッシング酵素が、細胞内揺らぎのひとつと考えられる分子クラウディング環境で特有の構造変化を伴う活性調節を受けていることを見出しました。この研究で確立した揺らぎを考慮した酵素アッセイ方法は、本新学術領域研究の推進にも寄与するものであり、今後の研究展開が期待されます。



受賞講演の様子



学会会場にて研究室の学生とともに  
右から 3 人目が戸谷准教授



授与された賞状

高田班員らの研究成果が新聞に掲載される。

A01 班、公募研究代表者の高田彰二准教授と同グループの古賀信康研究員（研究協力者）、亀田倫史研究員（研究協力者）の共同研究の成果が京都新聞（10月18日）に掲載されました。

京都新聞 2009年（平成21年）10月18日 日曜日 15面

京大などのグループ、コンピューターでシミュレーション

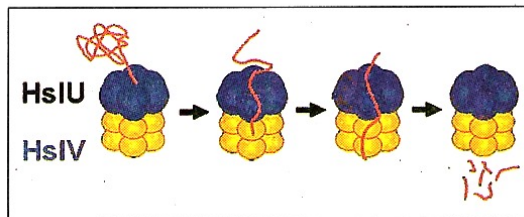
分解酵素複合体

不要なタンパク質  
“オール”で引き込む

細胞内で不要になったタンパク質を分解している小器官が、自らの穴構造にタンパク質を引き込む動きをコンピューターでシミュレーションすることにより、京都大などの研究グループが成功し、米科学アカデミー紀要でこのほど発表した。

研究グループは、京大理学研究科の高田彰二准教授、米ワシントン大の古賀信康研究員、産業技術総合研究所の亀田倫史研究員ら。

タンパク質を分解している酵素複合体「プロテアソーム」の働きを調べようと、細菌でプロテアソームにあたる酵素複合体を作るタンパク質HsIUについて、産総研のスーパーコンピューター「ブルージーン」でシミュレーションした。



HsIUとHsIVの複合体がタンパク質を引き込んで分解するイメージ（高田彰二京大准教授提供の図から作製）

HsIUは、タンパク質分解酵素HsIVとともに筒状の構造体を作り、タンパク質をとりこめて分解している。HsIU自体は六つが組み合わせ

さって六角形を作り、ATPのエネルギーを用いて全体の形を変えながら中央の穴にタンパク質を引き込んでいると考えられている。

高田准教授らは、原子単位の詳細な計算にアミノ酸単位の粗い計算を組み合わせて簡略化し、HsIUの動きと穴に入ったひも状のタンパク質の挙動を原子間の力からシミュレーションした。穴に突き出ている部分（チロシン）がボートのオールのようにパドリングしてタンパク質をとらえ、うまく穴の中に引き込んでいた。

高田准教授は「実際にも、パドリングのような動きがあるのではないか」といい、「神戸市で建設中の次世代スーパーコンピューターが完成すれば、さらに詳細なシミュレーションが可能になる」と期待している。

（稲庭篤）