

業績紹介：GM1 クラスタに結合したアミロイドβのトポロジーの超高磁場 NMR 解析

矢木-内海 真穂

(名古屋市立大学大学院薬学研究科)

加藤 晃一

(自然科学研究機構・A01 計画研究代表者)

論文題目："Up-and-down topological mode of amyloid β -peptide lying on hydrophilic/hydrophobic interface of ganglioside clusters"

著者：Maho Utsumi, Yoshiki Yamaguchi, Hiroaki Sasakawa, Naoki Yamamoto, Katsuhiko Yanagisawa, Koichi Kato

雑誌巻号：Glycoconj. J. 26, 999-1006 (2009)

アルツハイマー病の発症には、アミロイドβペプチド (Aβ) の神経細胞膜への凝集・沈着が深く関わっている。神経細胞膜に豊富に存在する糖脂質である GM1 ガングリオシドは、Aβの重合を促進する環境因子の1つとして注目されており、Aβと GM1 の複合体が核となって Aβの凝集が促進される可能性が提唱されている。本研究では、GM1 ガングリオシドとの相互作用が引き金となって開始する Aβの重合メカニズムを解明するために、超高磁場 NMR 計測を行い、Aβと GM1 の相互作用の構造的基盤を明らかにすることを試みた。

まずはじめに、CD スペクトル計測を通じて Aβと GM1 ミセルおよび lyso-GM1 ミセルとの相互作用に伴う構造変化を解析した。Aβ(1-40)に GM1 ミセルもしくは lyso-GM1 ミセルを添加した場合には、αヘリックス形成を示す CD スペクトルが観測されたのに対し、GM1 糖鎖もしくは PG を添加しても典型的なランダムコイル構造を示す CD スペクトルに変化はみとめられなかった。このことから、Aβ(1-40)の二次構造形成には GM1 が多数集合してクラスターを形成する必要があることが明らかとなった。

次に、GM1 ミセルに結合した Aβ(1-40)の構造を明らかにするために、安定同位体標識 NMR 解析を行った。しかしながら、分子量 14 万の巨大な GM1 ミセルに結合した Aβ(1-40)はシグナルが広幅化してしまい、観測が困難であった。そこで、信号の広幅化をもたらす非選択的な磁気-双極子相互作用を断ち切るために、¹³C、¹⁵N に加えて ²H を用いて Aβ(1-40)に安定同位体三重標

識を施し、920 MHz 超高磁場 NMR 装置を利用した計測を行った。その結果、ピークの広幅化が大幅に改善され、これまでは観測が困難だった GM1 ミセルに結合した状態の Aβ(1-40)の NMR シグナルを観測することに成功した[1]。NMR 解析の結果から、Aβ(1-40)は中央部分に2つのαヘリックス構造を形成して GM1 ミセルに結合しており、他の領域は特定の二次構造を形成していないことが判明した。また、飽和移動実験の結果から、Aβ(1-40)は GM1 クラスタの疎水性部分 (脂質) と親水性部分 (糖鎖) の境界面において、2つのαヘリックスと C 末端のジペプチド部分 (Val39-Val40) は疎水的環境に埋没し、残りの領域 (N 末端領域およびαヘリックスのリンカー領域) は親水的環境に露出しているトポロジーを呈していることを明らかとした (図)。

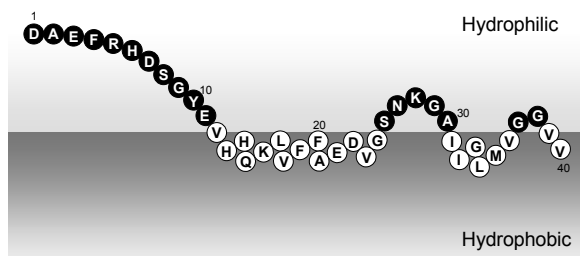


図: GM1 クラスタの親水性/疎水性 境界面における Aβのトポロジー

以上の結果より、ガングリオシドクラスターは Aβ分子の構造遷移を誘起するとともにその特徴的な空間配置を規定するような環境場を形成していることが明らかとなった。これにより Aβ同士の特異的な分子間相互作用が促され、重合体形成に至るものと考察される。

今後は、今回同定した構造変化の先にあると考えられる現象、すなわち、特徴的なトポロジーにより規定される Aβ-Aβ分子間の過渡的な相互作用を詳細に捉え、Aβの重合開始のメカニズムを段階的に明らかにしていきたい。

参考文献

[1] K. Kato et al., *Biochim. Biophys. Acta.* 1780, 619-625 (2008).

業績紹介：電位依存性プロトンチャネルプロトン透過の温度依存性

老木 成稔

(福井大学医学部・A03 公募研究代表者)

論文題目：“Temperature dependence of Proton Permeation through a Voltage-Gated Proton Channel.”

著者：M. Kuno, H. Ando, H. Morihata, H. Sakai, H. Mori, M. Sawada & S. Oiki:

雑誌巻号：J. Gen. Physiol. 134: 191-205 (2009)

生体には様々なイオンを透過させるチャネル蛋白質が存在する。その中で、プロトンチャネル（電位依存性プロトンチャネル：Hvチャネル）が神経細胞はじめ様々な細胞で発見されている（Meech 1982）。プロトン以外のチャネルでは、狭いイオン透過路（ポア）に入り込む際にイオンが脱水和される過程が不可欠であることが示されている。水溶液中で他のイオンとは異なる移動様式（Grotthuss 機構）をとるプロトンはチャネルの中でどのような透過様式をとるのだろうか。Hvチャネルのプロトン透過機構を明らかにするために、私達はプロトン流の温度依存性を測定した。プロトンチャネルの単一チャネルコンダクタンスは 1 pS 以下であり測定が困難なため、microglia 細胞に発現する多数のチャネルからのプロトン電流を測定した（全細胞電流記録）。このチャネルは脱分極電位でチャネルを開口し、プロトン流が観察できる。チャネルが開口する数秒から数 10 秒の間に細胞を高い温度の灌流液に瞬間的に変化させ 1 秒間だけ暴露させる。温度ジャンプ前後の電流値からプロトン流の温度依存性を精密に測定することができた。この方法は以前、浸透圧ジャンプのために開発したものであるが[1,2]、温度ジャンプに関しては heat ジャンプだけでなく cool ジャンプも行え、広い温度範囲（4~48℃）での実験が可能となった。プロトン電流の温度依存性を Arrhenius plot すると直線とはならず、大きく上に凸の曲線を示した。これはプロトン透過過程に複数の物理化学的過程が含まれていることを示唆する。その中でアクセス抵抗に注目した。これは、プロトンがバルクからポアの小さな入口に移動する際に、流束が幾何学的に収束し、電気的抵抗が発生することによって起こる。この抵抗の寄与を実験的に初めて求めることができた。測定電流からアクセス抵抗に起因する成分を

除外し、チャネル分子内でのプロトン透過過程の温度依存性を抽出することに成功した。その結果、チャネル分子内プロトン透過に伴う活性化エンタルピーが約 60 kJ/mol であることを明らかにした。他のイオンチャネルの活性化エンタルピー（約 30 kJ/mol）と比較するとプロトン透過は高値を示し、プロトン透過の特殊性を物語る。Hv チャネルの分子実体が最近クローニングされており[3]、プロトン選択・透過機構との関連が今後の研究対象である。

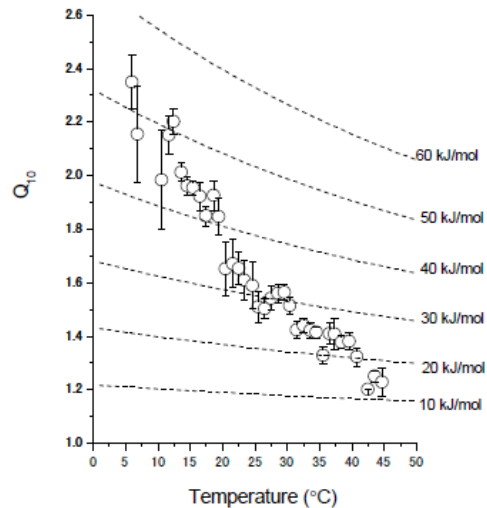


図 温度ジャンプ法で求めたプロトン電流の温度依存性を Arrhenius プロットから Q_{10} （温度差 10 度での電流比）に変換して示した。点線は等エンタルピー曲線。

参考文献

- [1] H. Ando, M. Kuno, H. Shimizu, I. Muramatsu and S. Oiki: Coupled K^+ -Water Flux through the HERG Potassium Channel Measured by an Osmotic Pulse Method. *J. Gen. Physiol.* **126**, 529-538 (2005).
- [2] 老木 成稔、安藤博之、久野みゆき、清水啓史、岩本真幸：K チャネルのイオン透過機構：流動電位によるアプローチ。生物物理 **48**, 246-252, (2008).
- [3] F. Tombola, M.H. Ulbrich and E.Y. Isacoff: Architecture and gating of Hv1 proton channels. *J Physiol.* **587**, 5325-5329, (2009).

寺嶋グループの近藤正人君が第三回分子科学討論会で優秀講演賞を受賞

寺嶋正秀

(京大院理・A01 計画研究代表者)

平成 21 年 9 月 21 日 (月) から 24 日 (木) まで、名古屋大学で開催された第三回分子科学討論会の口頭講演において、当研究室の大学院生である近藤正人君が優秀講演賞を受賞いたしました。分子科学討論会は分子科学会の主催する最も主要な学会合です。第三回となる今回も 1,200~1,300 名の参加、約 900 件の研究発表(口頭講演約 350 件、ポスター講演約 550 件)が行われました。優秀講演賞は討論会の一般口頭講演において優秀な発表を行った 33 才未満の若手研究者もしくは学生に対して贈呈される賞で、今回は 9 件の発表が選定されました。

近藤君は「光回復酵素の DNA 修復反応における酵素-基質間相互作用ダイナミクス」という講演題目で発表を行いました。光回復酵素は紫外線で損傷を受けた DNA (基質) を修復する酵素です。その DNA 修復反応は古くから知られ、多くの研究者の興味を惹きつけてきました。これまでに提案されてきた修復反応サイクルでは、まず酵素が暗状態で損傷を認識し、基質と複合体を形成します。光を受けることで酵素から基質へと電子移動が起こり、損傷の修復が行われます。最終的に、酵素は修復された DNA (生成物) を放出することでサイクルを閉じ、次の新しい修復サイクルに備えます。このように一連の修復反応において、酵素と基質は電子の授受や解離会合といった形で多くの相互作用を行います。これらを捉えていくことは修復反応の理解に不可欠な課題ですが、光修復反応における相互作用ダイナミクスに関する情報は限られたものであり、特に修復サイクル後半の生成物の放出過程に関しては全く得られてきていません。そのような酵素と基質全体で起きる相互作用過程を時間分解で捉えることが従来の手法では不可能であったためでした。近藤君はこうした相互作用過程を捉えるために、分子拡散過程に注目しました。光修復後に酵素が生成物を放出するとすれば、修復後には生成物の拡散過程も観測されるため、修復前と異なる分子拡散の様子が観測されるはずだというアイデアです。そこで過渡回折格子法

を用いて、光修復後の様々な時間スケールでの分子拡散の様子を観測することで、光修復反応における分子拡散過程の変化を観測しました。その結果、酵素が生成物を放出する過程を分子拡散過程の変化として観測でき、その速度が 50 μ s であると決定することに成功しました。今回の受賞はこの優れた研究発表に対して与えられたものです。ここで見られた新しいアプローチは生体機能の理解に不可欠な生体分子間(蛋白質-蛋白質間、蛋白質-リガンド間など)の相互作用ダイナミクスの検出法として応用できることが期待されます。他の手法で揺らぎ制御が可能となったとき、揺らぎの大きさが相互作用ダイナミクスに与える効果を調べるための手法としても活躍すると考えています。



平野健司氏および飯田健二氏が、

分子科学討論会・溶液化学シンポジウムにおいて優秀ポスター賞を受賞

佐藤啓文

(京都大学工学研究科・A01 公募研究代表者)

平成 21 年 9 月 21 日から 24 日まで、名古屋大学東山キャンパスで開催された第三回分子科学討論会において、修士課程の大学院生平野健司君が優秀ポスター賞を受賞しました。また、平成 21 年 11 月 18 日から 20 日まで、新潟・朱鷺メッセで開催された第 32 回溶液化学シンポジウムにおいて、博士後期課程の大学院生で日本学術振興会特別研究員 (DC1) の飯田健二君が優秀ポスター賞を受賞しました。二人は本領域研究評価委員の榊茂好教授の研究室の大学院生であり、筆者佐藤も共同研究者です。平野君の受賞した優秀ポスター賞は、物理化学分野の最も大きな学会である分子科学討論会において発表される 600 件近くのポスターの中から、学生による発表のみを対象として 10 件が選ばれるものです。一方、飯田君のポスター賞は 70 件あまりの発表から 35 歳以下の講演者を対象に、今回 3 件が選ばれました。

平野君の研究は「3 次元溶媒和構造の解析法の開発と Bacteriorhodopsin への応用」と題するもので、同君の他に横川大輔博士 (阪大蛋白研)、私と榊教授の共著によるものです。3D-RISM 法や MD 法など、蛋白質近傍あるいは内部の水和構造を理論化学・計算化学的に高精度で得ることが最近徐々に現実となってきました。我々も並列化効率の極めて高い統計力学的方法を開発し、既にいくつかの蛋白質への応用計算を展開しています。これに伴い計算結果を適切に解析する方法も必要となってきました。平野君の研究は、水和水 (あるいは内部水) を物理化学的に特徴づけるために、その分布を Gauss 型関数でフィットすることで確率密度、あるいは分布の広がり (すなわち「揺らぎ」) を定量的に評価しようとする試みです。Bacteriorhodopsin の内部水を例とした結果は極めて妥当であり、直感的あるいは感覚的な議論をより客観化して行くための一つの方法を提案しています。

一方、飯田君の研究は「単原子電解質水溶液の並進エントロピーの濃度依存性における水の役割」であり、

同君の他に博士後期課程大学院生・城戸健太郎君、私と榊教授の共著によるものです。この研究では電解質溶液中での並進エントロピーを積分方程式に基づいて評価し、濃度による差異を分子論的立場から理解しようとするものです。元来エントロピーは比較的計算が難しい物理量ですが、濃度依存性を系統的に調べようとすると更に困難が増します。飯田君の研究は、水溶液の基礎的性質の理解を深める上で極めて重要な寄与をするものとして期待されています。なお、同君は昨年度の「アミンによる二酸化炭素吸着についての理論的研究」に続いての二年連続受賞です。

両君の受賞を心からお祝いするとともに、基盤的物理化学の立場から生体分子系の理解を進めるべく、一層の精進をはかっていきたいと考えております。



平野君の賞状と受賞する飯田君

参考文献

- [1] “A highly parallelizable integral equation theory for three-dimensional solvent distribution function: Application to biomolecules”, D. Yokogawa, H. Sato, T. Imai, and S. Sakaki, *J. Chem. Phys.*, **130**, 064111 (2009).
- [2] “The position of water molecules in Bacteriorhodopsin: A three-dimensional distribution function study”, D. Yokogawa, H. Sato, S. Sakaki *J. Mol. Liq.*, **147**, 112 (2009).
- [3] “Carbon dioxide capture at the molecular level”, K. Iida, D. Yokogawa, A. Ikeda, H. Sato, S. Sakaki, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **11**, 8556 (2009).

上岡班員らの研究成果が新聞に掲載される。

A03 班、計画研究代表者の上岡龍一教授の研究成果が熊本日日新聞に掲載されました（11月30日）。

県内大学
グループ

焼酎粕を食に活用



芋焼酎「阿蘇乃魂」を持つ荒木朋洋教授（左）と多賀直彦講師。びんの液体はムラサキ芋の焼酎粕やその上澄み液＝東海大阿蘇キャンパス

▼めざせ「循環型」
芋の焼酎粕から芋の酒粕を取り出し、残り物をえさなどに、その排液物を堆肥化して再び芋を栽培する。東海大農学部（南阿蘇村）と九州大農学部（阿蘇キャンパス）が協力した。東海大農学部バイオサイエンス学科

産学官連携 廃棄物ゼロへ（東海大） 効果確認 健康ドリンクに（崇城大）

焼酎粕は90%以上が水分で、焼酎の生産量と同等かそれ以上の量が発生する。2007年春から海洋政策が禁止され、産地の九州では家畜飼料などへの利用が加速している。

世界初のマクロ完全養殖に成功した近畿大など、各地の大学で珍しい食品や食材の研究開発が活発だ。県内でも、崇城大と東海大のグループが焼酎の製造で出る廃液「焼酎粕」の有効性に着目。健康飲料の開発や廃棄物ゼロの製造法の研究で、厄介な副産物を食品として有効活用する取り組みを進めている。

焼酎粕は90%以上が水分で、焼酎の生産量と同等かそれ以上の量が発生する。2007年春から海洋政策が禁止され、産地の九州では家畜飼料などへの利用が加速している。

細葉研究センター（合志市）などの産学官連携グループは6年ほど、完全循環型の焼酎製造技術確立に取り組み、原料のムラサキマサリは同センターが開発したムラサキイモの新種で、目など体に良いとされるアントシアニンが豊富。この焼酎粕から醸造したちみ酢には機能性成分のクエン酸やアミノ酸も多く、搾った液は健康飲料、固形分は家畜飼料として活用をめぐす。



焼酎粕が完全循環型になった。崇城大の上岡龍一教授（左）と、健康飲料「アサヒ」の開発者である多賀直彦講師。持った箱は「アサヒ」の健康飲料「アサヒ」。

上岡龍一教授（63）らのグループは、ひと足早く02年に焼酎粕由来の健康飲料を製造し、大学発のベンチャー企業「健康予防医学研究所（同市）」が販売している。上岡教授は、人工細胞膜を使った「アサヒ」の製造に意欲的だ。門「国産焼酎醸造研究所の依頼」

「阿蘇乃魂」の統一ブランドで展開する。一方、崇城大（熊本市）の「アサヒ」は、ひと足早く02年に焼酎粕由来の健康飲料を製造し、大学発のベンチャー企業「健康予防医学研究所（同市）」が販売している。上岡教授は、人工細胞膜を使った「アサヒ」の製造に意欲的だ。門「国産焼酎醸造研究所の依頼」

「阿蘇乃魂」の統一ブランドで展開する。一方、崇城大（熊本市）の「アサヒ」は、ひと足早く02年に焼酎粕由来の健康飲料を製造し、大学発のベンチャー企業「健康予防医学研究所（同市）」が販売している。上岡教授は、人工細胞膜を使った「アサヒ」の製造に意欲的だ。門「国産焼酎醸造研究所の依頼」

の荒木朋洋教授（51）はフルーティーな甘い香りが特徴と出来栄に満足した。10年は焼酎の生産拡大に加え、ちみ酢の製品化も目指す。産学官連携の成果を実用化するため、より多くの企業や研究機関の参加を求めている。荒木教授、飼料や堆肥も含め実用化した製品は「阿蘇乃魂」の統一ブランドで展開する。

熊本日日新聞
発行所
熊本市世安町172
〒860-0806
代表(096)361-3111
© 熊本日日新聞社 2009

2009年（平成21年）
11月30日
月曜日

焼酎粕の分析にかかわり、成分に制がん効果や美白効果があることを確認した。これを機に、大学の後押しで研究成果を商品化する健康予防医学研究所を設立。02年に米焼酎粕エキスを詰めた健康飲料「創命王」、04年には第2段の麦焼酎粕タイプ「U」ドリンクを発売した。代理店を通じて販売が中心だ。ドリンクは輸送・製造コスト見直しで1本（300ml）700円から4200円に価格を引き下げた。「愛飲者の口コミなどで、販売本数は年間5万本から10万本に増えた」（上岡教授）という。