

業績紹介：タンパク質の揺らぎに適した新しい基準振動解析

木寺 詔紀

(横浜市大・A01 公募研究代表者)

論文題目: "Normal mode analysis of protein dynamics in a non-Eckart frame"

著者: Sotaro Fuchigami, Satoshi Omori, Mitsunori Ikeguchi, and Akinori Kidera

雑誌巻号: *J. Chem. Phys.* **132**, 104109 (2010)

タンパク質の平衡揺らぎは幅広い時空間スケールにわたって生じている。しかし、タンパク質揺らぎの大部分は、少数の低振動モードで指定される低次元空間内の運動によって占められていることが知られている。この低振動モードを求める簡便で有用な手法が基準振動解析である。現在までに、数多くのタンパク質にこの解析が適用され、タンパク質の揺らぎと機能の関係が明らかにされてきた。

ここで、例として、T4 リゾチームの3つの最低振動モードを図(a-c)に示す。2つのドメインからなるT4 リゾチームでは、3つの最低振動モードはいずれもドメイン運動を表していることがわかる。しかし、矢印で示された運動がドメイン運動であることを理解するには少々時間を要するかもしれない。ドメイン運動を表示するには一方のドメインの運動方向を示せば十分であるにもかかわらず、振動モードでは2つのドメインが両方とも動くような形で運動が記述されているからである。その理由は外部運動の取り扱いにある。

タンパク質の内部運動を考えると、あらかじめ外部運動(並進と回転)を取り除いておく必要がある。立体構造の重ね合わせはこの作業に相当する。従来の基準振動解析ではタンパク質全体の外部運動が自動的に取り除かれる。その結果、振動モードは図(a-c)に示したような複雑な運動として表わされる。

しかし、タンパク質全体を用いた重ね合わせ(Eckart frame と呼ぶ)が運動の理解に最適であるとは限らない。ドメイン運動が起こっている場合、一方のドメインを用いて重ね合わせを行い、もう一方のドメインの動きを観察する方がはるかに運動を理解しやすい。基準振動解析でも同様のことができれば、振動モードで記述される運動の把握が容易になることが期待される。

本研究では、分子の一部分の外部運動を取り除いた場合(non-Eckart frame)の基準振動解析を実現する方法論を構築した。その中核は、Eckart frame における共分散行列を non-Eckart frame における共分散行列へと変換する公式である。この公式によって得られた non-Eckart frame における共分散行列を対角化することにより、望みの振動モードを得ることができる。

T4 リゾチームの一方のドメイン(図の右側、青)の外部運動を取り除いた場合の結果を図(d-f)に示す。期待通り、3つの低振動モードはもう一方のドメイン(図の左側、赤)の運動として記述されており、いずれもドメイン運動であることが容易にわかる。

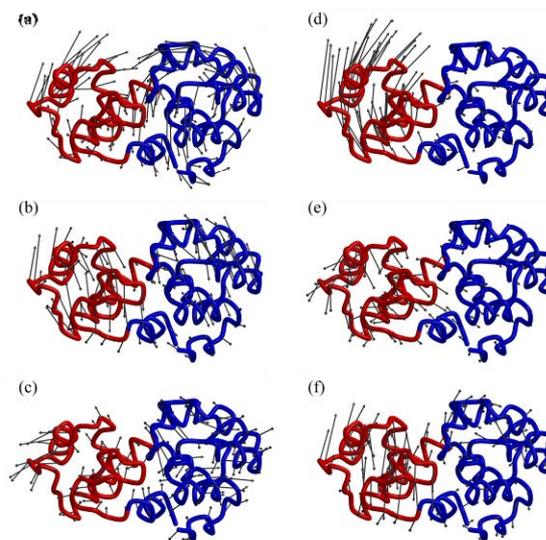


図: T4 リゾチームの低振動モード。2つのドメインを赤と青で色付けしてある。矢印が各振動モードにおける運動の方向を示している。(a-c) 従来の基準振動解析。(d-f) 右側のドメインの外部運動を取り除いた場合。

新しい基準振動解析は運動の表示法を変更したに過ぎず、従来のものと本質的に等価である。しかし、異なる視点からの解析結果は、複雑なタンパク質の運動を理解する上で大きな助けとなるだろう。また、本研究で得られた変換公式は、池口らによって提案された線形応答理論による構造変化の記述を基準振動解析に基づいて行うことを可能とする。今後、タンパク質立体構造変化の因果関係解明に役立つと期待される。

### 業績紹介：タンパク質構造揺らぎにおける主鎖二面角の補償的運動

木寺 詔紀

(横浜市大・A01 公募研究代表者)

論文題目: "Latent dynamics of a protein molecule observed in dihedral angle space"

著者: Satoshi Omori, Sotaro Fuchigami, Mitsunori Ikeguchi, and Akinori Kidera

雑誌巻号: *J.Chem. Phys.* **132**, 115103-115109 (2010)

タンパク質の構造変化は、主に主鎖二面角( $\phi, \psi$ )の変化によってもたらされる。タンパク質の平衡状態での構造揺らぎでは、主鎖二面角はタンパク質の球状構造を維持するためには、2 つ以上の二面角が互いの二面角変位によってもたらされた動きを補償するように動く必要がある。しかし、これまでにそのようなタンパク質の二面角ダイナミクスの詳細は明らかにされていない。そこで本研究では、球状タンパク質の立体構造を維持する主鎖二面角の補償的運動の仕組みを、二面角の二体相関のレベルで調べた。

多くの場合、タンパク質の平衡状態での構造揺らぎは、分子動力学(MD)シミュレーションの軌跡から得られるデカルト座標系分散共分散行列の固有値問題として解かれる主成分分析により記述され、大振幅の主成分で張られる低次元空間においてタンパク質の機能に関わる運動が説明されてきた。本研究では、二面角ダイナミクスの解析に、二面角系にあらわに存在する高次相関の影響を避けるために、デカルト座標系分散共分散行列からの線形変換によって得られた二面角系分散共分散行列を用いて二面角の二体相関を定義した。

座標値の平均二乗変位(MSD)は、二面角系分散共分散行列  $\Sigma$  とメトリック行列  $\mathbf{H}$  ( $\mathbf{K}'\mathbf{K}$ ;  $\mathbf{K} = (dx/d\theta)$ ) によって以下のように記述される。

$$\text{MSD} = \text{tr}(\mathbf{H}\Sigma)/N$$

ここで、 $\text{tr}$  は対角和を表し、 $N$  は原子数。これから、MSD は、 $\mathbf{H}$  と  $\Sigma$  の対応する固有ベクトルの固有値が順相関の時に最大値を、逆相関のときに最小値になることが理解できる。そして実際に、MD の結果は逆相関の関係を与え、MSD に最小値をもたらすことが示された (図 1)。これから、二面角の補償的運動は、 $\mathbf{H}$  と  $\Sigma$  との間にある固有値の逆相関によることが分かった。

$\mathbf{H}$  の大きな固有値に対応する固有ベクトル方向 (わずかな二面角の変化で大きな座標の変化を生む方向) に二面角が変位した場合、蛋白質の球状構造に歪みが生じてポテンシャルエネルギーの急激な増加を与える。従って、その方向は  $\Sigma$  の小さな固有値を持つ固有ベクトル方向 (ポテンシャル面の曲率が大きい方向) と一致する。そのために逆相関が表れ、結果として二面角空間での揺らぎによる座標値の変化が小さく抑えられることとなる。これは蛋白質の球状構造がもたらしめている特徴であると言える。実際、同様な解析を球状でないほどけた形状のペプチドに適用すると、このような補償的運動は見ることができなかった。

この関係は、もうひとつの二面角ダイナミクスの特徴に結びつく。 $\mathbf{H}$  の固有値が、単位二面角変化による座標値変化の自乗であることを考えると、補償的運動における逆相関は、二面角空間での大振幅の主成分ほど座標値に小さな変化を与える。逆に小振幅の主成分は座標値を大きく変化させやすい。結果として、二面角系ではほぼ全ての主成分が均等に構造揺らぎに寄与することとなり、少数の主成分のみが支配的なデカルト系の場合と全く異なった様相を呈していることが明らかとなった。

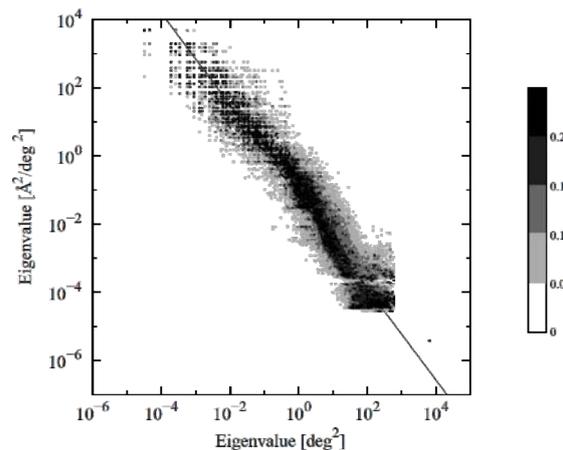


図 1. インフルエンザ菌ペリプラズム鉄結合タンパク質の二面角系分散共分散行列  $\Sigma$  の固有ベクトル(横軸)とメトリック行列  $\mathbf{H}$  の固有ベクトル(縦軸)の相関係数。縦軸と横軸はそれぞれの固有ベクトルに対応する固有値を表す。相関係数の大きさはグレースケールで表した。

業績紹介：蛋白質折りたたみにおける非局所相互作用の役割

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："Nonlocal interactions are responsible for tertiary structure formation in staphylococcal nuclease"

著者：Shingo Kato, Hironari Kamikubo, Satoshi Hirano, Yoichi Yamazaki and Mikio Kataoka

雑誌巻号：*Biophysical Journal* **98**, 676-686 (2010)

蛋白質の折り畳み過程では、非局所相互作用による凝集過程が重要な役割を果たすと考えられている。ここで、非局所相互作用とは、一次構造上で離れた位置にあるアミノ酸同士が立体構造上では近接して相互作用することを意味する。天然構造における"contact order"が折り畳み速度と密接に関係するという主張[1]や、折り畳みが少数の残基間の天然用接触で支配されるという主張[2]は、非局所相互作用の重要性を述べていると考えられる。我々は、折り畳みにおける非局所相互作用の役割を調べるために、Staphylococcal nuclease (SNase)を用い、非局所相互作用を人工的なSS架橋に置換し、その影響を調べた。

SNaseは、N端とC端の二つのドメインから形成されている。N端ドメインのY54を中心とする疎水面と、C端ドメインのI139を中心とする疎水面が、疎水相互作用により接触し、球状構造となる。C端の疎水面を形成するためには、W140を核とした疎水相互作用が必須であり、 $\Delta$ 140-149やW140AのようにW140を欠くと構造形成できなくなる[3]。そこで、野生型および $\Delta$ 140-149に対しY54C/I139Cの二重システイン置換変異体を作製し、折り畳みに対するSS架橋の影響を調べた。

図に、野生型(1)、全長二重システイン置換体(3)およびSS架橋をしたもの(2)、欠損変異体の二重システイン置換体(5)とそのSS架橋体(4)のCDスペクトルを示す。SS架橋を導入することで、構造形成できなかった $\Delta$ 140-149が天然様構造に折り畳まれていることが分かる。すなわち、SS架橋で代用したN端ドメインとC端ドメインの間の非局所相互作用が天然構造形成に必須であることが示された。

これらの酸変性構造は、CDスペクトルでは識別で

きないが、ゲルろ過によりSS架橋した方がコンパクトになっていることが示される。酸変性構造からの折り畳み過程の速度論的解析を行った。SS架橋したものは、折り畳みの初めからN端とC端の間の非局所相互作用ができあがっている。しかし、SS架橋の有無にかかわらず、全長蛋白質の折り畳み反応は、野生型と大きく異なることはなかった。SNaseは複数の折り畳み経路を持つが、SS架橋は、これらの速度定数に影響を与えなかった。この結果は、野生型においても、N端とC端の間の非局所相互作用は、折り畳みの初期(ストップフロー装置の不感時間以内)に完成し、その後二次構造の形成が進むこと、二次構造形成に複数の経路があることを示している。また、欠損変異体のSS架橋体の結果から、W140を中心とするC端疎水クラスターの形成がSNaseの折り畳みに必須であるという我々の主張(3)が、妥当であることが裏付けられた。

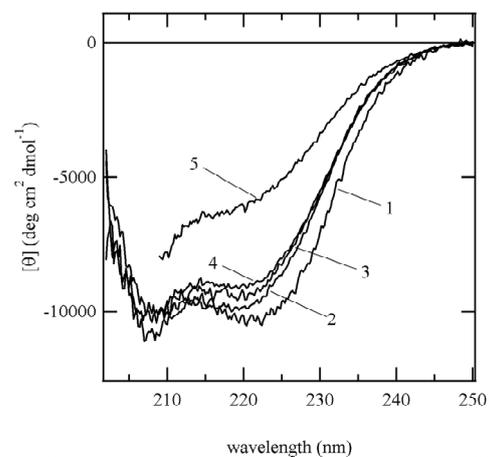


図. SNase 野生型(1)、全長の二重システイン変異体(酸化型)(SS+)(2)、全長の二重システイン変異体(還元型)(SS-)(3)、 $\Delta$ 140-149 欠損変異体(酸化型)(4)、 $\Delta$ 140-149 欠損変異体(還元型)(SS-)(5)のCDスペクトル。

[1] Baker, D., *Nature* **405**, 39-42 (2000).

[2] Dobson, C. M., *Nature* **426**, 884-890 (2003).

[3] Hirano, S., Kamikubo, H., Yamazaki, Y. and Kataoka, M., *Proteins: Struct. Funct. Bioinform.* **58**, 271-277 (2005).

### 業績紹介：スプライス産物の配列にNERを挿入しない効率的なスプライシング反応

黒田裕（東京農工大学・A02 公募研究代表者）

論文題目：Improved protein splicing reaction for low solubility protein fragments without insertion of native extein residues (NERs)

著者：Tetsuya Kamioka, Minako Tawa, Shihori Sohya, Toshio Yamazaki and Yutaka Kuroda

雑誌巻号：Biopolymers, 2009, 92(5):465-70.

本研究では、緑色蛍光タンパク質(GFP)中の揺らぎが大きいループ領域を利用してスプライシング反応を最適化する方法を開発した。タンパク質スプライシング反応とは、ポリペプチドの一部が切除されるという翻訳後修飾の一種である<sup>1)</sup>。RNAのintron exonに因んで、切除される領域をintein、スプライスされて最終産物のタンパク質となる領域をexteinと呼ぶ(図1)。また、前駆体タンパク質が2つのポリペプチドからなる場合もある(trans-splicing; 図1a)。スプライシング活性残基は殆どintein領域にあるが、スプライス箇所近辺にあるextein領域に活性に必須な残基がある(NER, Native Extein Residue)。現在、これら数個のNER残基を保存すれば、あらゆるextein配列のスプライスが可能であることが明らかにされている(図1a)。しかし、前駆体タンパク質の溶解性やスプライシング産物のタンパク質配列にNER残基が挿入されるという課題が残されている。

本研究では、exteinとinteinにそれぞれGFPuv(切断部位はループ領域の142・143; 図1)とシアノバクテリア由来のDnaE SssPを用いて、溶解性とNER挿入の問題を改善する方法を開発した。まず、溶解性の問題に対して、反応液にアルギニン<sup>2)</sup>を入れ、種々の反応条件(温度、塩濃度、pH)を最適化することでスプライス産物であるspliced-GFPの収量を9倍向上させた。次に、NER挿入の問題については、必須なアミノ酸がEYCFNの5残基であることを解明し、従来の方法を用いるとspliced-GFPの142と143残基目の間に5残基が挿入されることを明らかにした(図1a)。我々は、GFPの配列中のNERに類似性の高いループ領域を検索し、アミノ酸が挿入されるのではなく、置換されるように、GFP配列の142-146残基(EYNYN)をNER配列(EYCFN)に置き換えて、人工NER配列を設計した(図1b)。スプライシング位置を選択する際には、NERとの

相同性が高いほか、揺らぎが大きいループ領域を選ぶことでスプライシング効率が向上すると考えた(図1c)。この設計法を用いる事で、spliced-GFPに2残基のアミノ酸置換が起きるがNERは挿入されず、従来の方法でスプライスして5残基が挿入されたGFPより活性が6倍向上した。本研究で開発した効率的なスプライシング反応法及びNERが挿入されないスプライシング法は、スプライシング反応を様々なバイオ研究分野に応用する際に活用されると期待される。

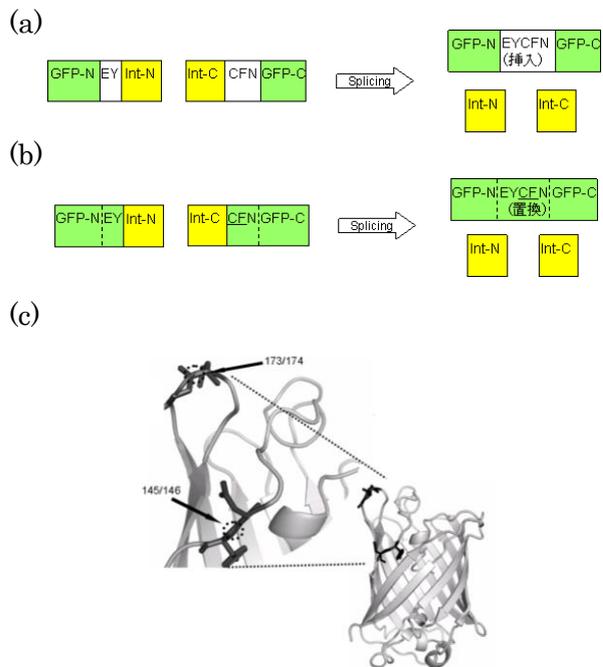


図1：NERの挿入問題を解決するための配列設計。(a)従来の手法でスプライスしたspliced-GFP。黄緑、黄、白はそれぞれ、GFP(=extein領域)、inteinと産物のspliced-GFPに挿入されるNER領域を示す。(b)本研究で得られるspliced-GFP。置換残基を下線で示す。(c)スプライシング位置に選んだループ領域をリボンモデルで示す。

#### 参考文献：

- 1) Hirata R. *et al*, *JBiol Chem* 25:265, 6726-33 (1990)
- 2) Tsumoto K. *et al*, *Biotechnol Prog*, 20, 1301-8 (2004)

### 業績紹介：ハイブリッドリポソームで原発性体腔性リンパ腫 (Primary effusion lymphoma) 細胞膜の揺らぎが増大する

上岡龍一

(崇城大生物生命・A03 計画研究代表者)

岡田誠治

(熊本大学エイズ研・A03 公募研究代表者)

論文題目：“Highly selective fusion and accumulation of hybrid liposomes into primary effusion lymphoma cells along with induction of apoptosis”

著者：Tomomi Towata, Yuji Komizu, Shinya Suzu, Ryuichi Ueoka, and Seiji Okada

雑誌巻号：Biochem. Biophys. Res. Commun. **393**, 445-448 (2010)

エイズは、HIV-1 感染により宿主が免疫不全に陥り、様々な日和見感染症を発症する疾患である。HIV-1 感染者は年々増加傾向にあるが、複数の抗ウイルス薬を組み合わせた HART の導入により予後は改善し、現在では HIV-1 感染症はコントロール可能な慢性疾患となった。一方、エイズ関連リンパ腫の発症率は、年々増加傾向にあり、エイズ患者の予後を脅かす要因となっている。

エイズ関連リンパ腫のひとつである原発性体腔性リンパ腫 (Primary Effusion Lymphoma ; PEL) は、腫瘤形成を欠き、体腔内滲出液を初発として発症する稀なリンパ腫であり、約 80% がエイズ患者に発症する。PEL は、カポジ肉腫関連ヘルペスウイルス (KSHV/HHV-8) 感染に起因する。PEL の治療は、HAART 療法と化学療法で行われるが、抗がん剤に対して耐性であり、50% 生存期間 6.2 ヶ月という予後不良の悪性リンパ腫である。そのため、PEL に対する安全で効果的な新しい治療薬の開発が急務となっている。

これまでの研究により、ハイブリッドリポソーム (HL) は、種々の培養がん細胞に対して、細胞レベルおよび動物レベルでがん細胞増殖を抑制し、アポトーシスを誘導することを示した。患者様へのインフォームド・コンセントを経て、生命倫理委員会承認後の臨床応用では、副作用が無く、リンパ腫の縮小効果を得ている。さらに、HL は、正常細胞とがん細胞の膜の揺らぎを見分けて、がん細胞のみに融合蓄積し、アポトーシスを誘導する制がんメカニズムを報告した。

本研究では、リン脂質 (DMPC) および PEG 系界面活性剤  $C_{12}(EO)_{21}$  からなるハイブリッドリポソーム (HL-21) を用い、HL-21 の PEL に対する細胞膜への融合蓄積、膜流動性の変化およびアポトーシス誘導について検討した。

HL の融合蓄積に関し、蛍光脂質含有 HL-21 は、PEL 細胞に対して、正常細胞 (末梢血単核球) にはほとんど蓄積せず、PEL 細胞選択的に蓄積することを明らかにした。

次に、HL-21 の PEL 細胞膜への融合前後で、細胞膜の揺らぎがどのように変化するかを、蛍光プローブ (DPH) で細胞膜を染色後、蛍光偏光解消法により検討した。その結果、HL-21 は、添加直後から 5 分間で、PEL 細胞膜の流動性が急激に増大することを初めて明らかにした (図 1)。

最後に、PEL 細胞の細胞死について、アポトーシス関連タンパク質であるカスパー-3 の活性化を指標に検証した。HL-21 処理後、短時間で、カスパー活性化および細胞の縮小を示し、アポトーシスを誘導することが明らかとなった。

以上の結果より、HL-21 が正常細胞には影響を与えず、PEL 細胞にのみ融合蓄積し、細胞膜のゆらぎの変化を経て、アポトーシスを誘導することが判明した。PEL に対する、副作用の無い新しい治療薬の可能性が期待できる。

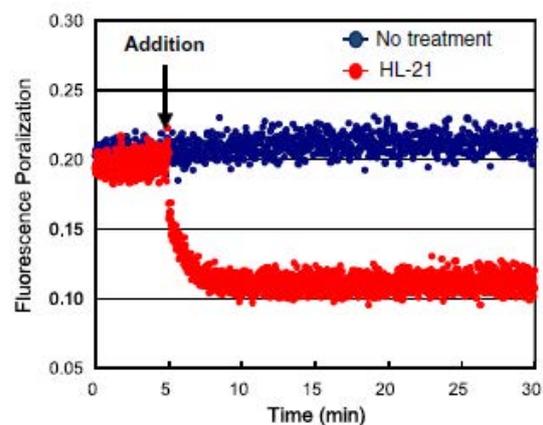


図1 HL-21処理したPEL細胞膜の流動性の時間変化。蛍光プローブとして、脂質膜の疎水部の流動性を反映する1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene (DPH)を用いた。HL-21添加 (Addition) 直後の蛍光偏光度 (Fluorescence Polarization) の急激な減少は (赤色)、細胞膜の流動性の増大を意味する。一方、未処理の細胞膜流動性は一定である (青色)。

業績紹介：カチオン性ハイブリッドリポソームの腎臓がんに対する治療効果

上岡龍一

(崇城大学応用生命科学・A03 計画研究代表者)

論文題目：" Effects of Cationic Hybrid Liposomes on the Growth of Human Renal Cell Carcinoma "

著者：Masayo Umebayashi, Taku Makizono, Hideaki Ichihara, Yoko Matsumoto, Ryuichi Ueoka\*

雑誌巻号：Anticancer Research, 30, 327-338 (2010)

筆者らが創製したハイブリッドリポソーム(HL)は [1]、従来の制がん剤なしに HL のみで種々のヒトがん細胞に対し増殖抑制効果を示し、アポトーシスを誘導することが明らかになっている[2]。in vivo において、担がんマウスを用いた治療実験から延命効果が得られ [3]、正常動物を用いた安全性試験で副作用が無いことが確認されている[4]。生命倫理委員会承認後の悪性リンパ腫患者に対する臨床試験において、高い安全性および延命効果が得られている[5]。

本研究では、がん細胞膜へのより多くの融合・蓄積を期待して、HL にカチオン性脂質(2C<sub>14</sub>ECl)を加えたカチオン性 HL を用い、in vitro にてヒト腎臓がん(OS-RC-2)細胞に対する制がん効果および制がんメカニズムについて検討した。in vivo では、担がんモデルマウスに対する治療効果の検討を行った。以下に結果を示す。

①カチオン性 HL は、電子顕微鏡観察から直径約 100nm の均一なベシクルの形態であることが観察された。動的分散法からは、1 ヶ月以上安定であることが明らかとなった。以上の結果から、カチオン性 HL は細網内皮系への取り込みが回避可能な膜直径であり、長期間安定で、臨床応用における保存に有用であることが明確となった。

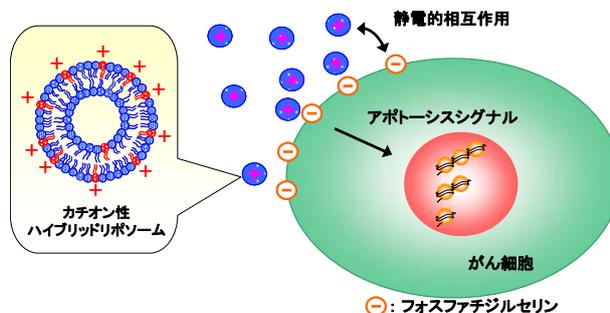
②カチオン性 HL の OS-C-2 細胞に対する制がん効果について検討したところ、50%増殖抑制濃度は、DMPC 単ーリポソームの約 1/3 と低く、低濃度で同等の制がん効果が得られることが明らかとなった。

③制がんメカニズムについて検討したところ、OS-RC-2 (腎臓がん) 細胞膜に融合・蓄積後カスパー-3, -8, -9 を活性化およびミトコンドリアを経由し、アポトーシスを誘導することが明らかとなった。また、RPTE (正常腎) 細胞に対しては、融合・蓄積しないことが確認された。さらに、RPTE 細胞と比較して OS-RC-2 細胞膜は、膜流動性が高く、アニオン性リン

脂質であるフォスファチジルセリン量も多いことが明らかとなり、カチオン性 HL のヒト腎臓がん細胞に対する特異的な融合に細胞膜の物性に関与することが示唆された。

④カチオン性 HL は、担がんモデルマウスに対して延命効果を示した。次に、投与終了後の担がんモデルマウスの腎組織切片を用い TUNEL 法により細胞死について検討したところ、アポトーシスを誘導していることが観察された。また、蛍光標識脂質 (NBDPC) を含有したカチオン性 HL を投与後、がん組織への集積を腎臓組織切片により観察したところ、長時間集積することが明らかとなった。以上の結果から、カチオン性 HL は担がんモデルマウスへの投与後に腫瘍組織に集積後アポトーシスを誘導し、抗腫瘍効果を示したことを初めて明らかにした。さらに、安全性を、溶血試験により検討したところ、カチオン性 HL は血液毒性を示さず、安全であることが確認された。

以上のように、カチオン性 HL の腎臓がんに対する「副作用のないアポトーシス誘導による治療効果」が初めて認められた。腎臓がんの新しい治療薬として期待できる。



腎臓がんに対するカチオン性 HL の治療効果のメカニズム

参考文献

[1] R. Ueoka et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **110**, 1588-1595 (1988). [2] Y. Matsumoto et al., *Int. J. Cancer*, **115**, 377-382 (2005). [3] R. Ueoka et al., *Biol. Pharm. Bull.*, **23**, 1262-1263 (2000). [4] H. Nagami et al., *Int. J. Pharm.*, **315**, 167-172 (2006). [5] H. Ichihara et al., *Anticancer Res.*, **28** 1187-1196 (2008).