

業績紹介：天然変性タンパク質オステオポンチンの NMR 解析

加藤晃一

(自然科学研究機構・A01 計画研究代表者)

山口芳樹

(理研・糖鎖構造生物学研究チーム)

論文題目："NMR characterization of intramolecular interaction of osteopontin, an intrinsically disordered protein with cryptic integrin-binding motifs"

著者：Yoshiki Yamaguchi, Shinya Hanashima, Hirokazu Yagi, Yutaka Takahashi, Hiroaki Sasakawa, Eiji Kurimoto, Takeshi Iguchi, Shigeyuki Kon, Toshimitsu Uede, Koichi Kato

雑誌巻号：Biochem. Biophys. Res. Commun. **393**, 487-491 (2010)

オステオポンチン (OPN) は、もともと骨基質において見出されたタンパク質であるが、その後、様々な組織や体液中において存在がみとめられ、骨吸収、免疫応答、炎症、腫瘍転移など多様な生命現象に関与していることが明らかとなっている。本タンパク質は分子の中央部にインテグリン結合配列を有しており、細胞外マトリクスタンパク質として細胞接着性を介した生体機能調節を行っていることが明らかとなりつつある。OPN はインテグリン結合配列の C 末端側近傍にトロンビンによる切断される領域を有しており、この切断をうけるとインテグリンに対する結合活性が上昇する。また、OPN はインテグリンの他に、CD44、ヘパリン、ヒドロキシアパタイトなど様々な生体成分と結合することが知られている。

これまでの核磁気共鳴 (NMR) や円二色性 (CD) を利用した分光研究の結果、OPN は生理的な溶液条件下においても特定の二次構造を持たない天然変性タンパク質の 1 つであることが報告されている。本研究では OPN のこうした性質に着目し、NMR を用いて分子内相互作用と運動性の解析を行ったもので、OPN の溶液構造をより詳細に検討する目的で、マウス OPN (278 残基) およびトロンビン切断の結果生じる N 末端側フラグメント (OPN-N: 137 残基) を対象に、主に安定同位体標識を利用した NMR による解析を行っている

OPN と OPN-N はいずれも天然変性状態にあること

が確認されたが、CD を利用したグアニジン滴定実験の結果から、OPN は生理的溶液条件下では何らかの高次構造を保持していることが示唆された。この問題についてさらに探究するために、常磁性効果を利用した NMR 解析を実施した。具体的には、C 末端にヘキサヒスチジンタグを付加した OPN の溶液に Mn^{2+} を添加し、NMR ピークの広幅化を観測した。常磁性効果による NMR の緩和促進はヘキサヒスチジンタグに結合した Mn^{2+} からの距離に依存するため、OPN の C 末端近傍に由来するピークは顕著な広幅化を示したが、興味深いことに分子の中央部を飛び越えて N 末端側の部分にも有意なピークの広幅化が観測された (図 1)。これにより、OPN は溶液中で C 末端部が N 末端側に空間的に近接するようなコンフォメーションを取り得ることが明らかとなった。OPN がトロンビンによる切断をうけると、このような分子内相互作用が消失し、その結果、インテグリンが OPN 上の結合部位に対してアプローチし易くなるのかもしれない。

OPN は発現組織に依存したリン酸化や糖鎖修飾をうけることが知られており、こうした翻訳後修飾を通じて OPN の分子内相互作用が影響をうけ、これによって本タンパク質の組織特異的な機能調節が行われている可能性もある。

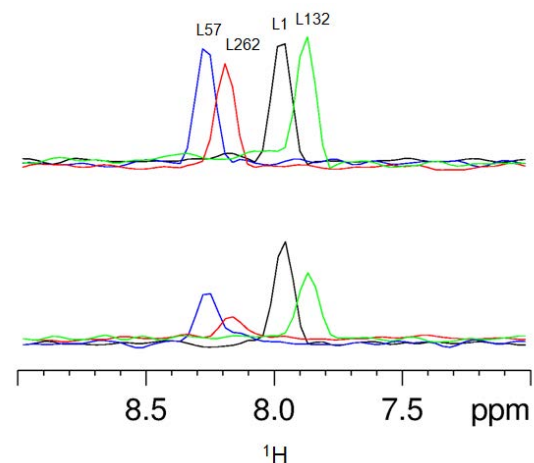


図 1 常磁性効果を利用した OPN の NMR 解析。 Mn^{2+} を配位したヘキサヒスチジンが遊離のペプチドとして存在する場合 (上) と、OPN の C 末端に付加された場合 (下) の一部の Leu シグナルの広幅化を示す。

業績紹介：ストレス応答タンパク質 ARMET の立体構造とダイナミクス

山口芳樹

(理研・糖鎖構造生物学研究チーム)

加藤晃一

(自然科学研究機構・A01 計画研究代表者)

論文題目："Solution Structure and dynamics of mouse ARMET"

著者：Jun Hoseki, Hiroaki Sasakawa, Yoshiki Yamaguchi, Momoe Maeda, Hiroshi Kubota, Koichi Kato, Kazuhiro Nagata

雑誌巻号：FEBS Lett. 584, 1536-1542 (2010)

ARMET は小胞体ストレスによって誘導されるタンパク質であり[1]、細胞の生存を維持するために必須であることが示されている[2]。しかしながら、本タンパク質がストレスから細胞を守る分子メカニズムについては現在も不明である。そこで我々は、まず ARMET の水溶液中の立体構造を 920MHz NMR 装置を用いて決定した。ARMET は全体的に α -ヘリックス構造で形成されており、2つのドメイン (N-ドメインと C-ドメイン) から構成されていることが明らかとなった。両ドメインの表面は正電荷を帯びており、ARMET は負に帯電した分子と相互作用することが予想された。また ARMET の限定分解を行ったところ、トリプシンは ARMET の N-ドメインと C-ドメインをつなぐリンカー領域を切断することが明らかとなった。このことから、ARMET の両ドメインをつなぐリンカーは柔軟であることが予想された。

詳細に ARMET の動的性質を調べるために、ARMET の ^{15}N 緩和解析を 920MHz NMR 装置を用いて行った。それぞれのドメイン内のアミノ酸残基の主鎖アミド窒素の ^{15}N スピン - 格子緩和時間 (T_1) はおよそ同程度の値を示したが、N-ドメインのアミノ酸残基の T_1 の平均 (0.97 s) は C-ドメインの T_1 の平均 (0.72 s) と比べて長いことが判明した。同様の傾向はスピン - スピン緩和時間 (T_2) にも当てはまり、N-ドメインの残基の T_2 の平均 (53 ms) は C-ドメインの残基の T_2 の平均 (77 ms) よりも短いことが判明した。N-ドメインの T_1/T_2 の平均 (19.4, NOE > 0.6) と C-ドメインの T_1/T_2 の平均 (9.5, NOE > 0.6) は他の同程度の分子量からな

る球状タンパク質で報告されている値とおおよそ一致していることから、両ドメインは柔軟なリンカーでつながれており、それぞれ独立に運動していることが明らかになった。

これらの立体構造とダイナミクスに関する知見は、ARMET の生理機能を明らかにするうえで重要である。

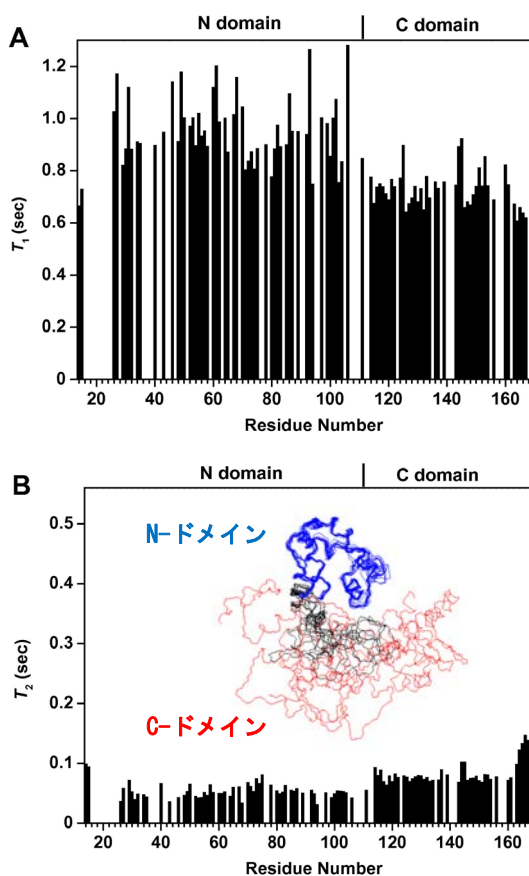


図: ARMET のダイナミクス解析
 (A) ^{15}N スピン - 格子緩和時間 (T_1)
 (B) ^{15}N スピン - スピン緩和時間 (T_2)
 図中に NMR によって決定した ARMET の立体構造を示す。

参考文献

[1] N. Mizobuchi et al., *Cell Struct. Funct.* **32**, 41-50 (2007).
 [2] A. Apostolou et al., *Exp. Cell Res.* **314**, 2454-2467 (2008).

国際シンポジウム報告：The 1st Frontier Technology of Stem Cell Therapy Conference and Workshops (Suranaree University of Technology, Thailand)

岡田誠治

(熊本大学エイズ研・A03 公募研究代表者)

3月22-26日、タイ国スラナリ技術大学(Suranaree University of Technology) [1]において第1回 Frontier Technology of Stem Cell Therapy Conference and Workshops [2]が開催され、招待講演を行う機会を得た。

近年、タイは若手研究者の養成に力を入れており、1996年から国王即位50周年を記念して、The Royal Golden Jubilee (RGJ) Ph.D. Program [3]が開始された。このプログラムは、最初の15年間で5000人の優秀なPh.D.を養成し、25年でタイの科学研究レベルを世界トップレベルに持って行こうというものである。特に、博士課程の学生を海外の研究室に派遣し、共同研究を通して将来のタイの科学を背負って立つ人材の育成に力を入れている。私の研究室でも、この3年間でタイから3人の博士課程学生を受け入れてきたが、彼らは総じて聡明で研究熱心である。

Suranaree University of Technology は、1989年創立の比較的新しい国立大学であるが、特に研究面に力を入れており、タイ教育省による大学評価では、チュラロンコン大学やマヒドン大学と同様タイで第1位にランクされている。近年、生命科学に力を入れており、最近医学部も開設されている。また、国際交流にも積極的で、2009年に熊本大学医学教育部とも部局間交流協定を結んでいる。

会議は、タイ国スラナリ技術大学生命科学部が中心で運営され、タイ全土から幹細胞研究者と臨床医が集まった。海外からは、日本の他に台湾とシンガポールから研究者が招待された。米国、中国などからも参加予定であったがタイの政治的混乱のために直前にキャンセルされたのは残念であった。会議では、3日間の講演と学生によるポスター発表が行われ、その後若い研究者向けに幹細胞を用いた実習を行う Workshop が開催された。

私は、“Establishment of Stem Cell Therapy Model and Applications in Medicine”という演題で招待講演を行い、ヒト幹細胞研究における高度免疫不全マウスの有用性についての議論を行った。造血幹細胞療法の基礎と臨床、間葉系幹細胞、ES細胞、iPS細胞などについての講演があり、タイにおいてもこれらの研究や臨床応用の試みがかなり進んできていることが判り、興味深く拝聴した。

会議では熱のこもった議論がなされ、特に大学院生が積極的に参加しているのが印象的であった。タイは現在かつてない政治的混乱のさなかにいるが、一刻も早く収束することを願っている。また、今後も両国の友好と科学技術の発展に寄与していきたいと考えている。

参考 URL

[1] http://web.sut.ac.th/sutnew/sut_en/

[2] http://science.sut.ac.th/stemcellworkshop/about_en.html

[3] <http://rgj.trf.or.th/eng/rgje11.asp>



会議中スラナリ技術大学博士課程学生と



講演風景

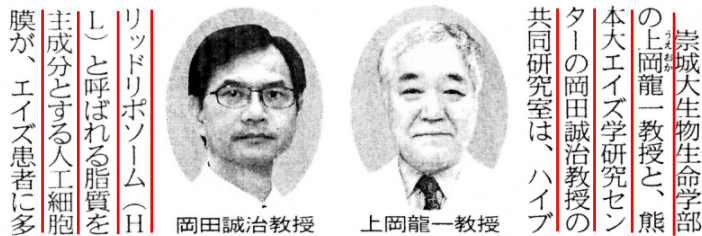
上岡班長・岡田班員らの研究成果が新聞に掲載される。

A03班「揺らぎと機能」の班長である上岡龍一教授(崇城大学)および班員の岡田誠治教授(熊本大学)の共同研究成果が熊本日日新聞に掲載されました(2010年4月29日)。

熊本日日新聞

平成22年(2010年)4月29日 木曜日

社会 26



岡田誠治教授

上岡龍一教授

崇城大生物生命学部の上岡龍一教授と、熊本大エイズ学研究センターの岡田誠治教授の共同研究室は、ハイブ

エイズ患者リンパ腫に効果

崇城大研究室開発の人工細胞膜
熊本大とマウスで証明

く見られる原発性体腔性リンパ腫(PEL)の細胞にとりついてアポトーシス(細胞の自殺死)を起させることをマウスの実験で明らかにした。

HLは上岡研究室が開発。これまでも、胃がんや大腸がんなど複数のがん細胞と一体化し、周辺の正常細胞をほとんど傷つけることなく、アポトーシスに至ることが、実験室レベルで証明されている。一部のリンパ腫では、臨床応用でも縮小させる効果が認められ

両教授は、「今回の研究結果をヒトに応用することで、これまでエイズ患者の発症するリンパ腫。両教授によると、発症後、50%の患者が6・2カ月以内で死亡しており、有効な化学療法はないとい

今回の研究では、エイズ患者由来のPELの細胞株をマウスに移植。HLを1日1回3週間わたって投与した結果、8匹中6匹でPELが完全に無くなり、2匹でも腫瘍が少なくなった。

両教授は、8月に韓国・釜山であるウイルスと感染に関する国際会議での講演の中で報告する予定。

(東寛明)