

業績紹介：機能の無くなる(揺らぎの静まる)速度は？

寺嶋正秀

(京都大院理・A01 計画研究代表者)

論文題目： " When is the helix conformation restored after the reverse reaction of Phototropin? "

著者： Y.Kawaguchi, Y. Nakasone, K.Zikihara, S. Tokutomi, M.Terazima

雑誌巻号： *J.Am.Chem.Soc.(Communication)*, 132, 8838-8839(2010).

フォトリポピン(Phot)は、多くの植物が持つ代表的な青色光センサータンパク質である。Phot は、LOV ドメインと呼ばれる光受容を担うドメインを2つ有している。その光反応は多くの興味を集め、詳細な研究がなされてきた。それによると、発色団 FMN の光励起後、数マイクロ秒で FMN とタンパク質部分との間で共有結合が作られ、その後約 100 マイクロ秒ほどで、LOV に疎水結合でついているリンカーと呼ばれるヘリックス構造をもった部分が LOV から解離する。その解離に続いて、数ミリ秒でそのヘリックス構造が壊れ(図1)、それによってC末にあるキナーゼドメインが活性化し、生理学的な機能を発揮する。この活性状態は数分続き、その後 FMN とタンパク質の間の共有結合が解裂して元の不活性状態へ戻る。この一連の機能に関する反応の中で、機能を持つ方向への順反応については FMN やタンパク質構造変化も含めて多くの研究がなされて来ているが、不活性になる過程については発色団の吸収変化による戻り反応が分のオーダーの時間分解で調べられているだけであり、構造変化についての知見は全くなかった。タンパク質構造は、共有結合が切れるのと同時に素早く元に戻るのであろうか、LOV ドメインからリンカーが解離する過程には揺らぎ増大が関与している可能性があるが、その揺らぎはすぐに収まる(静まる)のであろうか。Unfold したリンカー部分が元のヘリックスを巻く過程は、タンパク質の折り畳み過程とも関係して興味深い。この逆反応過程について、構造変化を時間分解で調べることのできる過渡回折格子(TG)法を用いて調べた。TG 法を逆反応に適用するために、筆者が以前に開発していた2段階励起 TG 測定法を用いた。

図2に、この手法を用いて測定した逆反応と順反応の TG 信号を示す。一見するとかなり似た信号であるが、幾つか異なる点が見つかる。まず、順反応の信号

には数マイクロ秒で共有結合が生成する過程が立ち上がりとして観測されるが、逆反応には見られない。これは共有結合解裂がピコ秒の早い時間スケールで完了していることを示している。ミリ秒領域での構造変化を表す信号は両過程で似ているが、詳細な解析によると屈折率変化の符号が逆であり、順反応ではヘリックスの崩壊が、逆反応ではヘリックス生成が観測されていることが分かった。更に、逆反応の信号の時間変化を測定し、このヘリックス形成速度を求めたところ、10 ミリ秒ほどと Unfolding 過程よりも遅いものであった。ヘリックス形成速度は種々のポリペプチドで報告されており、サブマイクロ秒から数マイクロ秒で完了することがほとんどである。実験前には Phot のヘリックスもこれらの速度で巻き戻るものと予想していたが、結果は4桁以上遅いものであった。これは LOV ドメインがヘリックスのテンプレートとして働いており、まさに揺らいでいる変性タンパク質が折り畳まれる過程を再現していると考えられる。

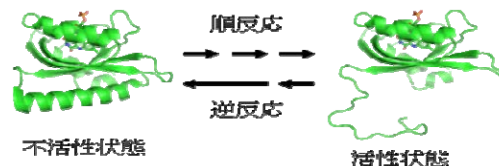


図1 フォトリポピンの反応

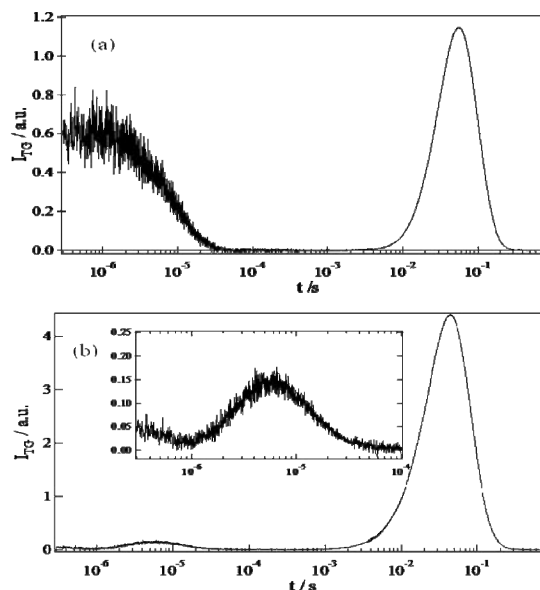


図2 フォトリポピンの戻り反応を表す TG 信号(上)と順反応の場合の TG 信号(下)。下図の挿入図は時間の早いところの拡大図。

業績紹介： HaloTag タンパク質の 1 分子力学計測への応用：目的タンパク質の基盤への部位特異的共有結合による固定法

川上 勝

(北陸先端大・A01 公募研究代表者)

論文題目："Application of HaloTag Protein to Covalent Immobilization of Recombinant Proteins for Single Molecule Force Spectroscopy"

著者：Yukinori Taniguchi and Masaru Kawakami*

雑誌巻号：Langmuir, 26, 13, 10433-10436, 2010

近年、原子間力顕微鏡 (AFM) 技術を用いたタンパク質 1 分子力学測定法が発展し、タンパク質フォールディング、ダイナミクス、メカノケミストリーといった研究分野へ、「力」をプローブとした新しい切り口からの貢献が注目されている。この手法の要は、いかに対象となるタンパク質分子を基盤とカンチレバー間に部位特異的に固定するかにある。現在はタンパク質を数珠状に作成し、1) 基盤とカンチレバー先端部への物理吸着を利用してタンパク質の両端を固定する 2) 金基盤を用い、ポリプロテインの一端にのみ存在させたシステインとの金-チオール結合を利用して化学的に固定し、もう一端を物理的吸着を利用して捕らえる、という 2 つの手法が主流である。しかし前者は分子の物理的吸着が両末端部のみに偶然起こる事象を利用しているため測定効率は非常に悪い。後者の方法は、金-チオール結合を用いており、測定の効率、部位特異的固定の観点では改善されている。しかしこの方法の欠点は、タンパク質末端部にのみシステインが許されていないため (そうでないと、タンパク質分子中のシステインと金基盤間で共有結合が起こってしまう)、本来システインを有さないタンパク質や、あらかじめシステインを変異によってセリンなどへ変えたタンパク質でしか測定が出来ない点にある。生物学的に重要な働きをするタンパク質はシステインを有している場合が多く、それらタンパク質に対して計測が困難であることは深刻な問題である。

近年 HaloTag タンパク質とリガンドの共有結合を利用したタンパク質の選択的固定手法が様々な分野において急速に発展している。我々はこの固定法に着目した。タイチン 5 量体の N 末端ドメインを HaloTag タン

パク質に置き換えた融合タンパク質を調製し、これを HaloTag リガンドを化学修飾したマイカ上に共有結合で化学固定する。このタンパク質の C 末側をカンチレバーの物理吸着によって捕らえ、融合タンパク質の力学的アンフォールディングを測定することに成功した。HaloTag タンパク質とタイチンのアンフォールディングピークは、分子のアミノ酸残基数が異なることから、ほどけた長さ ΔL を調べることで容易に区別できる (図 1 右)。また HaloTag タンパク質はタイチンよりも弱い力でアンフォールディングすることがわかった。さらに詳細にピークを調べると、HaloTag タンパク質は 2 種類の間体を持つことが分かり、 ΔL からその構造のキャラクタリゼーションを行った (図 2)。

本手法はシステインを含んだ、生物学的に重要な多くのタンパク質を部位特異的に固定することが可能であり、AFM を用いた 1 分子力学測定の適用範囲を大きく広げると期待される。

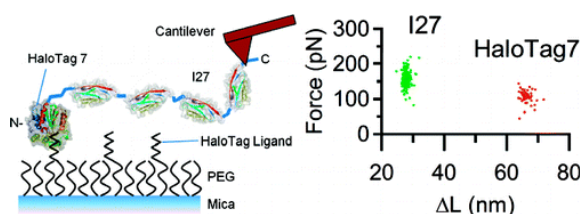


図 1. (左) HaloTag-Titin (I27)₄ 融合タンパク質のマイカ上への化学固定の模式図。(右) アンフォールディング力と ΔL をプロットすると、HaloTag と Titin のピークが分離される。

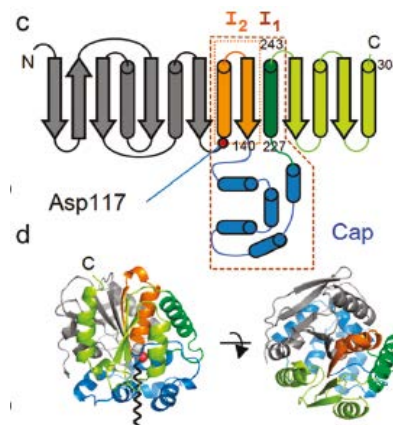


図 2. HaloTag タンパク質の立体構造とアンフォールディング中間体 (I1, I2) の残存構造 (上図、点線で囲った部分)。

業績紹介：1分子粘弾性測定によるミオシンロッド Coiled-coil 構造のフォールディング／アンフォールディング転移のダイナミクス研究

川上 勝

(北陸先端大・A01 公募研究代表者)

論文題目：“Dynamics of the coiled-coil unfolding transition of myosin rod probed by dissipation force spectrum”

著者：Yukinori Taniguchi, Bhavin S. Khatri, David J.

Brockwell, Emanuele Paci and Masaru Kawakami*

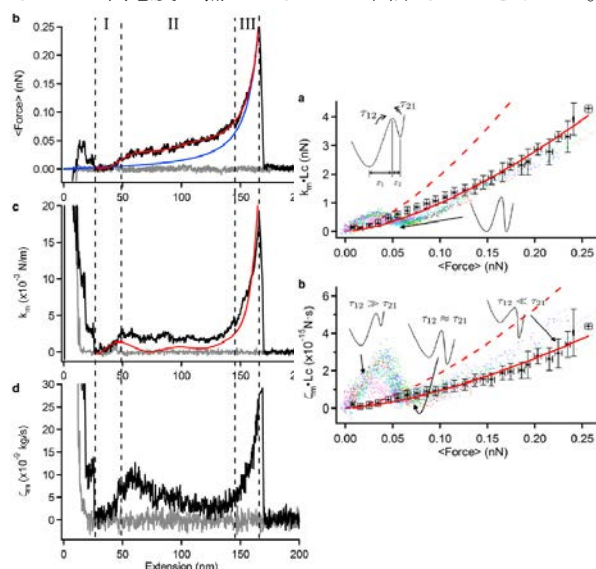
雑誌巻号：Biophysical Journal, 99, 1, 257-262, 2010

ミオシンはアクチン繊維上を動くモータータンパク質であり、筋肉中のミオシンIIはアクチンフィラメント上を動くことで筋収縮を起こしていることが知られている。ミオシンの尾部である Coiled-coil (ミオシンロッドと呼ばれる) は、頭部で発生した力を効率よく伝える重要な役割を果たしていると考えられている。これまでミオシンロッドに関する研究は、その弾性について、いわば静的(static)な物性についてのみが行われており、これらの研究から、ミオシンロッドは純粋な弾性体であると考えられてきた。しかし、ミオシンは生体内において、様々な時間(速度)に依存した負荷に対して応答しているはずであり、そういったミオシン分子のダイナミックな特性を本当に理解するためには、分子の弾性だけでなく、粘弾性 (Viscoelastic) 応答を調べる必要がある。

これまで1分子の力学特性を調べるために、原子間力顕微鏡技術を用いて対象となる1分子の一端を基盤に固定し、もう一端をカンチレバーで捕らえて分子を引っ張り上げ、フォースカーブを測定する1分子力学測定が用いられてきた。しかしこの手法では分子の粘性情報を得ることが出来なかった。我々は強力に磁化された磁石球を付けたカンチレバーで1分子を引っ張り、同時に振動磁場によって引き起こされるカンチレバーの振動スペクトルを測定、解析することで、捉えている分子の粘弾性を測定する手法を開発してきた。今回本手法を用いて、ミオシンロッドの Coiled-coil 構造のアンフォールディング転移前後での1分子粘弾性スペクトルを測定し、ミオシンロッドの粘弾性が張力に対して非常に特徴的な変化を示すことを発見した。

ミオシンロッドを引っ張ると、最初は Coiled-coil 構造を保っており、その粘性は単にランダムコイルのペプチド2本分(右図ドットと赤破線)に比べてもはるかに大きく、これは Coiled-coil 構造をとることで、大きな粘性、エネルギーの散逸経路が存在するという事を示唆している。これまで純粋なばね弾性体といわれてきたミオシンロッドが、実は異常に大きな粘性を持つことを初めて示した。さらに力を加えると、ミオシンロッドは 50pN 辺りの張力で coiled-coil 構造の unfolding を起こし、フォースカーブに平坦部が現れる。このとき、ロッドの弾性、粘性は大きく減少し(右図 0.05nN 付近)、ミオシンが純粋なばね弾性体として働くことを示した。これはミオシンロッドの構造が un-coiling に関して非常に大きなエネルギー障壁を持ち、そのことで予期せぬ大きな力に対しての力伝達の調節機構として働くことを示唆している。

本研究結果は、これまで弾性測定しか行われていなかったために隠されていたタンパク質分子のダイナミックな分子構造を、1分子粘弾性スペクトルを測定することで高感度で捕らえることが出来ることを示した。



図。(左) ミオシンロッド1分子の力学曲線と弾性、粘性スペクトル(黒実線)。(右) ミオシン1分子粘弾性の張力依存性(ドット)。ランダムコイルペプチド1本、2本分の粘弾性を重ねて表示(赤実線、破線は理論値、マーカーは1本分の実測値)

業績紹介：レーザー照射によるアミロイド β 線維の増殖と崩壊

八木寿梓

(大阪大学蛋白質研究所)

後藤祐児

(大阪大学蛋白質研究所・A01 公募研究代表者)

論文題目："Laser-induced propagation and destruction of amyloid β fibrils"

著者：Hisashi Yagi, Daisaku Ozawa, Kazumasa Sakurai, Toru Kawakami, Hiroki Kuyama, Osamu Nishimura, Toshinori Shimanouchi, Ryoichi Kuboi, Hironobu Naiki and Yuji Goto

雑誌巻号：J. Biol. Chem. **285**, 19660-19667 (2010)

アミロイド線維は、部分変性した蛋白質が規則正しく重合した超分子複合体である。アミロイド線維が原因とされる疾患を総称してアミロイドーシスと呼ばれ、約30種類の疾患が報告されている。アミロイド線維の増殖機構はさまざまな仮説が提案されているが、可視化した例は少なく、また直接的な証明はされていない。アミロイド線維の形成阻害・崩壊機構を調べることはアミロイドーシスの治療の足がかりとなる。以前の研究より、アミロイド線維特異性蛍光色素（チオフラビンT）と、励起レーザーを組み合わせることにより、 β_2 ミクログロブリンの部分ペプチド（K3 ペプチド）が形成するアミロイド線維が分解することを明らかにした[1]。

本研究では、この方法が他のアミロイド線維に対しても同様の効果を与えるかを調べるために、アルツハイマー病原因ペプチドの一つである、Amyloid β (1-40) (A β (1-40)) を用いた。実験は全反射蛍光顕微鏡を用い、アミロイド線維は自発的に石英スライドガラス上で形成させた。形成途中、形成後のアミロイド線維に対してさまざまな条件でレーザーを照射し、アミロイド線維の挙動を調べた。サンプルに対するレーザー照射の回数が少ない場合には、自発重合によってアミロイド線維が形成した。興味深いことに、一線維がある長さまで伸長すると断片化が生じ、その後に爆発的にアミロイド線維の増殖することが明らかになった（図1）。さらに徹底したレーザー照射では A β (1-40) 線維は崩

壊した。アミロイド線維の増殖と崩壊をレーザー照射エネルギーに対してプロットすると、照射エネルギーが強いときはアミロイド線維を崩壊させるが、照射エネルギーが弱いときは線維が増殖する結果が得られた（図2）。すでに蓄積したアミロイド線維に対するレーザーによる分解・除去は、今後のアミロイドーシスの治療方法の一つとして期待されるが、これらの結果は、徹底したレーザー照射でなければアミロイド線維を増殖させてしまう危険性も示唆する。



図1. レーザー照射による A β (1-40) 線維の増殖。一線維上で線維の断片化等が生じ、その後に爆発的に線維が増殖した。スケールバーは 10 μ m。

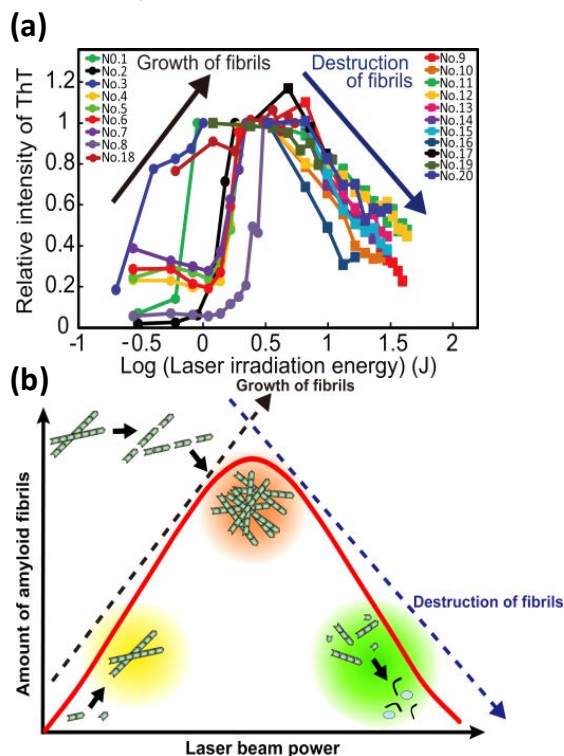


図2. (a) TIRFM 観察で得られた線維の増殖および崩壊における蛍光強度を算出し、それをレーザー強度と照射時間から得られたエネルギーに対してプロット。(b) (a) をもとに作成したレーザー強度と線維量との関係図。線維増殖には線維が損傷することが必須であるが、その程度の違いが増殖と崩壊のいずれかの経路を決定する。

参考文献

[1] D. Ozawa et al., J. Biol. Chem. **284**, 1009-1017 (2009).

業績紹介：超分子集合化を利用した Zn^{2+} イオン濃度の可視化

湯浅順平

(奈良先端大物質創成・A02 公募研究代表者)

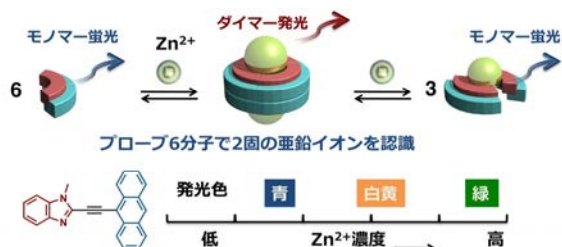
論文題目："Highly Selective Ratiometric Emission Color Change by Zinc-Assisted Self-Assembly Processes"

著者：Takuya Ogawa, Junpei Yuasa, Tsuyoshi Kawai

雑誌巻号：Angew. Chem., Int. Ed., 49, 5110-5114 (2010)

蛍光プローブは系中に存在する金属イオンなどのターゲットを検出する簡便かつ高感度な分析法の一つであり、ターゲットと相互作用することでターゲットを可視化することができる。^[1] 一方で、生体内の重要な金属イオンである Zn^{2+} イオンなどの金属イオンは、その存在量が細胞部位によってナノモル濃度からミリモル濃度の幅広い分布を持つことが知られている。そのため蛍光プローブには従来のイメージングによる位置情報だけでなく、金属イオンの濃度変化を蛍光シグナルの変化として情報化することのできる機能が求められるようになってきている。

本研究では、段階的な錯形成によって Zn^{2+} イオンと高次組織化し、 Zn^{2+} イオンの濃度変化を蛍光の色調変化として可視化することのできる新規蛍光プローブ (BzIm-An) について報告する。BzIm-An は発光部位であるアントラセンに三重結合を介して金属配位部位であるベンズイミダゾールを連結したプローブであり、シンプルなプロセスによって簡便に合成することができる。この BzIm-An は 6 分子で 2 個の Zn^{2+} イオンを認識し $[(\text{BzIm-An})_3-\text{Zn}^{2+}]_2$ で表される超分子錯体を与える。



この超分子錯形成によって BzIm-An のアントラセン部位に π - π 相互作用が誘起され、アントラセンダイマー発光に特徴的な白黄発光が観測される。そのため低濃度 (< 0.1 mM) の Zn^{2+} イオンを存在下においては、BzIm-An 本来の青色発光が白黄発光へと劇的に変化する

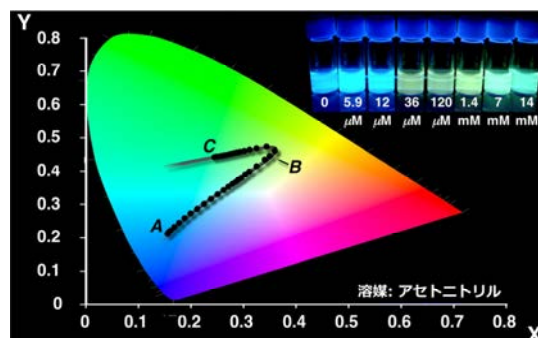


図 1 アセトニトリル中、BzIm-An (50 μM) に Zn^{2+} イオン (0-14 mM) を滴下した際の CIE 色度図; A: 0 M, B: 75 μM , C: 66 mM

る(図 1)。一方、さらに過剰の Zn^{2+} イオンを存在させると $[(\text{BzIm-An})_3-\text{Zn}^{2+}]_2$ はシンプルな 2:1 錯体、 $(\text{BzIm-An})_2-\text{Zn}^{2+}$ へと構造変化を起こす。この $(\text{BzIm-An})_2-\text{Zn}^{2+}$ は錯体内に π - π 相互作用を持たないため、 $[(\text{BzIm-An})_3-\text{Zn}^{2+}]_2$ に由来する白黄発光は再びアントラセンモノマー発光に由来する青緑発光へと変化する(図 1)。

さらにこの蛍光プローブの Zn^{2+} イオン選択性について調べた。図 2 に示すように BzIm-An は 0.5 mM の各種金属塩イオンの内、 Zn^{2+} イオン存在下でのみアントラセンダイマー発光に由来する白黄発光が観測された。

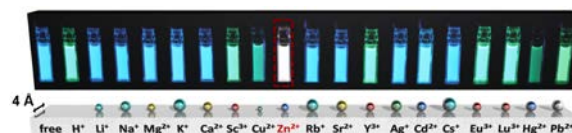


図 2 各種金属塩 (0.5 mM) に対する BzIm-An (50 μM) の発光応答

以上のことから今回我々が開発した BzIm-An が Zn^{2+} イオンを選択的に認識し、その濃度変化をプローブの発光色の変化として情報化することのできるユニークなセンサーとして機能することを明らかにした。今後はプローブの水溶化を行い、細胞系への展開を計りたいと考えている。

参考文献

[1] A. P. de Silva, H. Q. N. Gunaratne, T. Gunnlaugsson, A. J. M. Huxley, C. P. McCoy, J. T. Rademacher, T. E. Rice, *Chem. Rev.* **97**, 1515 (1997).

業績紹介：チャネル 1 分子イメージング法の開発

井出 徹

(阪大生命機能・A03 公募研究代表者)

論文題目：" Simultaneous optical and electrical single channel recordings on a PEG-glass"

著者：Toru Ide, Yuko Takeuchi, Hiroyuki Noji, and Kazuhito Tabata

雑誌巻号：Lanmuir 26 (11), 8540–8543 (2010)

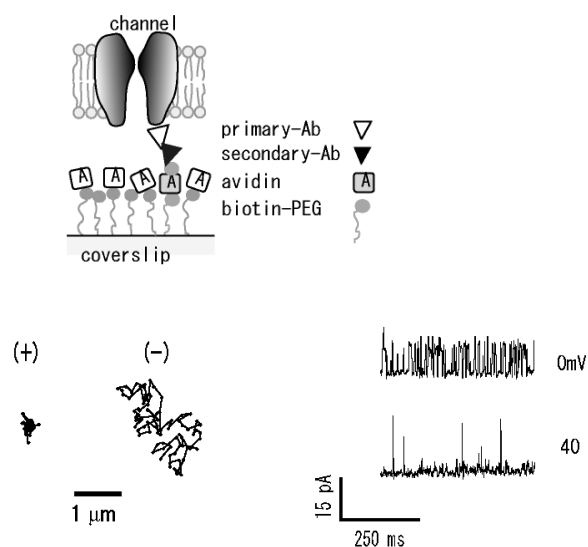
単一チャネル記録法は、生理学、薬理学の重要なツールであり、これを用いて多くのチャネルタンパクの機能が 1 分子レベルで、かつ高い時間分解能で解析されている。しかし、残念ながらチャネルの機能変化に伴う他分子との相互作用を 1 分子レベルで検出する方法は存在していない。例えば、アセチルコリン受容体チャネルのような化学受容チャネルの機能は、結合するリガンドの個数やタイミングも含めて詳細に議論されているが、リガンドの結合解離を直視した例はなく巨視的な測定からの推論によるところが大きい。そこで我々は、薬剤 1 分子とチャネル 1 分子の相互作用を電気的かつ光学的に同時計測可能な実験系の開発に取り組んできた。即ち、単一チャネル電流記録法と 1 分子蛍光イメージングの融合である。

本論文では、チャネルタンパク 1 分子の電気・光学同時計測を行うための新しい技術を開発した。1 分子イメージング法は多くの生体分子に適用され、今や生物物理学の標準的な手法となったと言える。しかし、膜タンパク、特にチャネルタンパクに関する適用例は少なく、1 分子の機能を測る技術が確立しているにも関わらず、単一チャネル記録法と 1 分子イメージングとの融合は成功していなかった。それは、膜の脆弱性と流動性に起因しており、汎用的な技術開発のためには膜の強化とタンパクの拡散阻害が避けて通れない課題であった。

我々は、ガラス表面をポリエチレングリコール (PEG) で被覆することにより、安定に 1 分子蛍光観察を行い、同時に単一チャネル電流も記録できる実験系の開発に成功した。ここでは平滑筋由来のカルシウム依存性カリウムチャネル(BK)の同時計測を行った。チ

ヤネルタンパクは、図のようにビオチン-アビジン系を介してガラス表面に固定される。これによって、タンパクの膜内拡散は完全に抑えられ (図左下)、タンパクと蛍光性夾雑物とが容易に識別可能となった。図中の (+) はガラスに固定したとき、(-) は固定しないときのチャネルタンパク 1 分子の軌跡を表している。このとき、膜とガラス表面の間隙を介してイオン性電流が流れ、単一チャネル電流の記録が可能であった (図右下)。

チャネルを固定することが可能となったことにより、長時間にわたる 1 分子観測が出来るようになり、冒頭に記した薬剤とチャネルタンパクの相互作用の電気・光学的同時計測、即ち 1 分子薬理学への道が拓かれたと言える。



図：新規チャネル 1 分子同時計測法 (BK チャネルの拡散阻害)

上：チャネル固定法の概略図。チャネルはベシクル融合によって人工膜に組み込まれた後、抗体・2 次抗体・ビオチン・アビジン・ビオチン PEG を介してガラス表面に固定された。左下：(+)抗体存在下および(-)非存在下で記録されたチャネル 1 分子の軌跡。右下：左図(+)時に記録された電流ゆらぎ。従来法での測定結果と同様である。

「揺らぎと生体機能」第2回合同班会議報告

芳坂貴弘

(北陸先端科学技術大学院大学・A02 計画研究代表者、第2回合同班会議世話人)

「揺らぎと生体機能」平成22年度合同班会議が、平成22年6月27日(日)から6月30日(水)の日程で、石川県加賀市片山津温泉の加賀観光ホテルにおいて開催された。本会議には、A01～A03班の計画・公募研究の研究代表者41名(A03班 黒田玲子先生は欠席)、評価委員の北川禎三先生、榊茂好先生に出席頂き、また、各研究室に所属する研究員・大学院生37名の参加もあり、合計で参加者は80名に達した。片山津温泉は、大阪・京都・名古屋からJR特急で2時間ほど(加賀温泉駅下車)、空路でも羽田・福岡・札幌・仙台から小松空港への便があり、全国の研究者が集う上で比較的交流のしやすい地点にある。また、会場となった加賀観光ホテルは、100人以上規模のコンベンション施設を備え、駅・空港からバスで15分程度と近く、本会議の会場として十分な施設であった。

当日はあいにくの梅雨空が広がっていたものの、雨には至らず、穏やかな湖面の柴山瀉を望む会場で、4日間の研究発表・討論が開始された。



寺嶋先生(領域代表)挨拶

研究発表に先立ち、領域代表の寺嶋先生より、本領域の目標と各班の発表内容について紹介があり、また、領域内の共同研究の状況とさらなる活性化に向けた領

域の方針が示された。続いて、各研究者の発表が行なわれた(発表25分間、討論5分間)。それぞれの発表内容に関しては、次頁以降で神山先生、水口先生、米谷先生に詳細にご報告頂いている。発表は夕方まで続き、夕食後も夜遅くまで自由討論が繰り広げられた。また、2日目の夕食時には懇親会が行なわれ、研究者や学生間の親睦を大いに深める機会となった。



懇親会の一コマ

また、3日目の昼休みには、近くの中谷宇吉郎雪の科学館の見学会を行なった。中谷博士の業績に触れるとともに、よく工夫された雪や氷に関わる実験への参加を通じて、研究成果の社会への発信という点でも大いに参考になったのではないと思われる。



雪の科学館での実験風景

今回の班会議は、各研究者の研究内容を改めて相互に理解するとともに、最新の成果について討論する機会となり、本領域全体の進展に大きく寄与するものであった。今後、それぞれの研究のさらなる進展と、新たな共同研究等につながる事が大いに期待される。最後に、遠路ご参加頂いた先生方、お手伝い頂いた事務局の皆様、会場スタッフの皆様に感謝申し上げます。

神山 匡

(近畿大学・A01 公募研究代表者)

2010 年6 月27 日～30 日の4 日間にわたり、本特定領域研究の平成22年度合同班会議が石川県片山津の加賀観光ホテルで行われた。今回の合同班会議は昨年9 月の阿蘇に続く二回目であり、昨年末に名古屋で行われた第3回公開シンポジウム以来の研究報告となる。ここでは、私が所属するA01班を中心に簡単に報告させていただく。

A01班では、構造やエネルギーなどのさまざまな揺らぎ検出手法の開発と、生体分子の機能と揺らぎの相関解明を目指し、熱力学や分光学、一分子計測、NMR、シミュレーションなど、さまざまな角度から“揺らぎ”という多彩な側面を持つ概念の実像化を目指しており、これまでの成果や共同研究の進展状況について、計画研究班と公募班をあわせた16件の報告がなされた。今回の合同班会議は、これまでよりも長めに各30分の講演時間が設定されていたが、時間を超過して議論が続くこともしばしばであった。質疑では、同じA01班からだけでなく、他班からもそれぞれの視点に立った質疑が積極的に行われ、“揺らぎ”という目標のもとに多種多様な研究者が集まる本特定領域の特徴が有効に機能している様子がうかがえた。以下に、A01班の各研究報告を簡単にまとめさせていただくが、内容に関する齟齬は平にご容赦いただきたい。

1日目は8件の報告が行われた。寺嶋正秀 A01 班班長（京都大院）は、パルスレーザー励起の過渡回折格子法に新規の高圧システムを加え、揺らぎへの圧力効果や、光応答が熱応答にも対応していることを報告した。石井邦彦 氏（理研・基幹研）は、無標識蛍光相関分光を用いた広い時間領域での揺らぎ検出について装置の改良を含めて報告し、多段階反応の緩和過程の解析について質疑が交わされた。筆者（神山 匡・近畿大）は、高圧下密度測定により求まる等温圧縮率を指標にした揺らぎ検出について報告し、高圧下での内部空隙や水和が構造揺らぎに及ぼす影響について質疑が交わされた。木寺詔紀 氏（横浜市立大）は、MDによる炭素鎖の揺らぎや二面角を指標にしたダイナミクスについて報告し、質疑においてホモ多量体の分子対称性が揺らぎに及ぼす素数則について議論が行われた。後藤祐児 氏（阪大蛋白研）はアミロイド繊維形成における

分子量や、濃度、超音波照射の効果について報告し、アミロイド形成と結晶化の関係について議論が行われた。高橋 聡 氏（東北大・多元物質科学研）は、蛍光ラベルを用いた一分子観測による、蛍光強度変動と拡散定数による揺らぎの決定を装置改良と併せて報告し、溶媒粘性と揺らぎの関係について質疑が交わされた。川上 勝 氏（北陸先端大）は、AFMを用いて蛋白質分子のばね定数から揺らぎの決定と温度の影響について、モデルの問題点と併せて報告した。質疑ではRefolding過程の観測や、両端固定の影響、エントロピー効果について意見が交わされた。山村泰久 氏（筑波大）は、絶対熱容量を指標にし、シス体とトランス体を有する脂質二分子膜のラメラ相と等方相のエネルギー揺らぎについて報告した。膜サイズや曲率の影響、二本鎖への展開などについて議論が行われた。

2日目は2件の報告が行われた。石森浩一郎 氏（北大・院理）は、FRET効率の圧力依存性から求まる線圧縮率を指標にした揺らぎの決定について報告した。質疑では、蛋白質の特定部位間の揺らぎの定量化や経時変化について議論が行われた。山口真理子氏（奈良先端大）は蛋白質分子内・分子間の蛍光・燐光寿命をクエンチャー濃度を変えて計測することで、構造のダイナミクスを計測する手法について報告し、クエンチャーの種類について議論が行われた。

3日目前半はシミュレーションを用いた揺らぎ検出について、3件の報告があった。佐藤啓文 氏（京都大）は、3D-RISMとMC-MOZ法を統合することにより、蛋白質の水和状態について、内部水の位置と特定の方向への揺らぎがあることを報告した。質疑では、決定される水分子の位置と第一水和層との関係について意見が交わされた。高田彰二 氏（京大院理）は、原子レベルの分子力場と粗視化モデルにより天然構造まわりの



討論風景

常時揺らぎを予測し、クラッキング探索を通してClose状態が稀にOpen状態になることについて報告した。質疑では、CloseとOpenの存在率、活性部位と揺らぎの関係、大きな揺らぎの原因について議論が行われた。岡本祐幸氏（名大院理／計画班）は、拡張アンサンブル法を用い、エネルギー上、温度上のランダムウォークに加え、圧力によるランダムウォークも行い、高圧NMRの結果との比較について報告した。3日目後半はNMRを用いた揺らぎ検出について、3件の報告があった。加藤晃一氏（自然科学研／計画班）は、タンパク質の異常な会合形成における揺らぎの影響を明らかにするため、モデル系としてGM1およびlyso-GM1の高磁場NMR計測について報告した。質疑では、不溶ダイマーの要因やスピラベルの減少について意見が交わされた。北原亮氏（立命館大・薬）は、高圧NMRを用いて直鎖状および環状のジユビキチンの構造揺らぎを測定し、単体と同様に加圧により各サブユニットに準安定構造が誘起されることを報告した。質疑では、各状態の安定性や水和水の圧力によるダイナミクス変化について議論が交わされた。菅瀬謙治氏（サントリー生有研）は、 R_2 dispersion法によりDNA結合蛋白質やheme Oxidase Iのマイナー状態の構造情報を検出し、揺らぎとアミノ酸配列の関係について報告した。質疑では検出可能なマイナー状態の数や速い状態について議論が交わされた。3日目の昼食時には個別班会議が行われ、互いの研究について意見を交換するとともに、今後、“揺らぎ”の検出手法を発展させていくためには、どのような分野の研究が必要か、などが話し合われた。

講演以外でも、夕食後の自由討論や、温泉、各宿泊部屋において、普段あまり話す機会のない研究者の方と研究や研究環境のことなど話し合う機会が十分に用



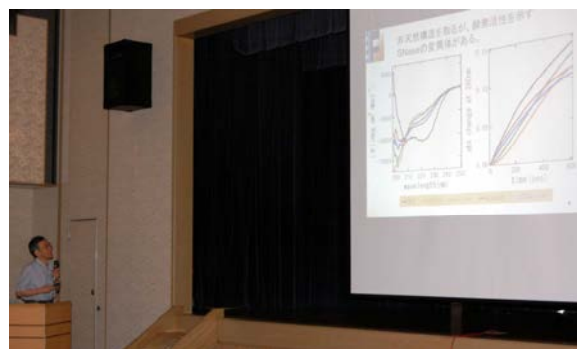
神山先生

意されており、まさに、24時間、刺激を受ける合同班会議であった。このようなすばらしい会場とホスピタリティをご準備下さった芳坂貴弘先生ならびに北陸先端大の皆さんに御礼申し上げます。

水口峰之

（富山大学・A02 公募研究代表者）

2010年6月27日～6月30日に新学術領域研究「揺らぎが機能を決める生命分子の科学」の平成22年度合同班会議が加賀観光ホテルで開催された。加賀観光ホテルは美しい湖（柴山潟）の隣に位置し、討論会場からは素晴らしい風景を楽しむことができた。本稿では、班会議2日目の午前と午後に行われたA02班の発表を中心に報告したい。



片岡先生（A02 班班長）

片岡幹雄 A02 班班長（奈良先端科学技術大学院大学）は、天然変性タンパク質の性質を有する SNase 変異体を発見され、そのフォールディングについて研究されている。興味深いことに、リガンド結合によってフォールディングが誘起される変異体（Induced-fit model）と、フォールディングしてからリガンドが結合する変異体（pre-existing model）を作り分けることに成功された。また、N末端領域とC末端領域を結びつける相互作用がフォールディング初期にできていること、N末端領域とC末端領域を結びつけるにはW140が特に重要であることを明らかにされた。SNaseのアミノ酸配列をわずかに変えるだけで天然変性タンパク質の性質をもつことは非常に興味深いと感じた。天然変性タンパク質は揺らぎが大きいタンパク質と考えられるが、その理解にとって重要な研究になると期待される。

芳坂貴弘氏（北陸先端科学技術大学院大学）は、非天然アミノ酸を部位特異的に導入する技術を用いてタンパク質の揺らぎを研究している。非天然アミノ酸の導入は4塩基コドンに非天然アミノ酸を割り当てることによって達成されている。会議では、マルトース結合タンパク質に蛍光標識アミノ酸を導入し、タンパク質の変性に伴う FRET を蛍光相関分光法で調べた結果について報告された。芳坂氏の4塩基コドンを用いた非天然アミノ酸導入技術はオリジナリティーが高く、この領域内で多数の共同研究が行われている。共同研究を含めた今後の研究の発展が楽しみである。

新井宗仁氏（東京大学）は、配列摂動解析法を利用して DHFR の揺らぎ制御について研究されている。今回の班会議では、DHFR の Arg44 に 20 種類全てのアミノ酸変異を導入し、酵素活性や熱安定性について解析した結果を報告された。新井氏は Arg44 の位置は 20 種類全てのアミノ酸を許容するが、変異によって酵素活性と補酵素結合能は低下することを示された。さらに網羅的な相関解析を行い、DHFR の Arg44 の位置は、タンパク質の安定性を犠牲にしながら、静電的相互作用を通して補酵素 NADPH との強い親和性を維持し、これにより高い酵素活性を保持する stability-activity trade-off であると提案された。DHFR の研究に加えて、天然変性タンパク質 p53 転写活性化ドメインと転写コアクチベーター CBP TAZ2 ドメインとの相互作用解析についても報告された。

今西未来氏（京都大学）は、代表的な DNA 結合モチーフであるジンクフィンガーにアミノ酸変異を導入し、新しいジンクフィンガーを創出することに挑戦されている。そのために、あえて保存されている Zn 配位子に変異を導入することで安定性を低下させ、Zn 濃度に依存して DNA に結合するジンクフィンガーを作ることに成功された。また、ルシフェラーゼを用いた系で細胞内での機能評価を行い、人工のジンクフィンガーが細胞内で Zn 濃度に応答して転写を活性化することを示された。

黒田裕氏（東京農工大学）は、タンパク質の主鎖構造の局所的な揺らぎと変形が熱安定性に及ぼす影響を解明するために、BPTI の 14 番目および 38 番目の残基をそれぞれグリシン、アラニン、バリンに置換し、合計 9 種類の変異体について熱安定性と置換残基周辺の局所的揺らぎとの関係を調べて報告した。また、

BPTI 変異体の結晶構造を決定する際に、ヘテロシーディングの手法が有効であると報告された。変異体によってヘテロシーディングが有効な場合とそうでない場合があることについて興味深く聞かせていただいた。

楯真一氏（広島大学）は、ジヒドロ葉酸還元酵素（DHFR）の揺らぎと機能について研究されている。この研究は、構造を乱さないアミノ酸置換で揺らぎを制御し機能を制御する試みである。DHFR の変異体は、活性ループから離れた遠隔位ループにアミノ酸変異を導入することによって得ている。DHFR に系統的なアミノ酸変異を導入し、NMR のスピン緩和分散法による揺らぎ解析を行った結果から、酵素活性に重要な揺らぎは 500 Hz 程度の揺らぎであるかもしれないと報告された。タンパク質にはいろいろな時間スケールの揺らぎがあるが、比較的ゆっくりとした大きな動きが酵素活性に重要であるのかもしれないということであった。今後の研究の発展によって、DHFR の遠隔位ループ変異と揺らぎの関係が明らかになると期待される。この他に、天然変性タンパク質である FACT の NMR 解析についても報告された。

湯浅順平氏（奈良先端科学技術大学院大学）は、これまでにない新しい希土類プローブの開発に取り組んでいる。そのプローブを使うことで、タンパク質の揺らぎ変化を円偏光や発光スペクトル形状の変化として検出できるという。会議では SNase-Biot-Eu³⁺ に 370 nm の紫外光を照射すると、594 nm および 614 nm にそれぞれ磁気双極子遷移および電気双極子遷移が観測されることを示された。さらに、CD で調べた SNase の熱変性曲線との比較から、湯浅氏の希土類プローブを使うことでタンパク質の構造変化を検出できることを示された。

著者は、天然変性タンパク質 PQBP-1 がターゲット分子である U5-15kD をどのように認識しているのかについて報告した。また、PQBP-1 の変異は精神遅滞に深く関与していることがわかっているが、本発表では PQBP-1 変異体の構造と精神遅滞の関係についても報告した。PQBP-1 がターゲット分子に結合しても構造が変わらないこと、PQBP-1 は C 末端ドメインにある 23 残基を使って U5-15kD に結合していること、U5-15kD への結合に必須のセグメントが精神遅滞の PQBP-1 変異体では失われていることを示した。



水口先生

以上、A02 班 8 名の研究報告について簡単に紹介した。他の班の発表についても多数の興味深い発表があり、活発な議論が行われた。共同研究の進行状況についての報告も多く、領域内での共同研究が活発になってきていると感じた。最後に、今回の合同班会議をお世話してくださった芳坂先生と研究室の皆様感謝いたします。

米谷佳晃

(日本原子力研究開発機構・A03 公募研究代表者)

A03 班の発表は、班会議 2 日目の午後から始まり、最終日の 4 日目まで、全部で 17 件あった。最初に班長の上岡先生から A03 班全体の紹介があり、引き続き各講演者の発表が行われた。以下発表順に講演内容を記します。



上岡先生 (A03 班班長)

上岡氏 (崇城大学) は、ハイブリッドリポソームの制がん機能について報告された。テレビでも紹介されたアポトーシスのムービーが示された。ハイブリッド

リポソームの流動性が高いほど制がん効果は大きいということが分かってきたが、そのメカニズムは検証中ということで、共振の可能性など、活発な議論が行われた。また、臨床実験においても患者の延命など、ハイブリッドリポソームによる効果が確認できていることなどお話をされた。

松下氏 (崇城大学) は、テロメア 4 重らせんの構造と金属導入の影響について報告された。FRET により、 Na^+ 、 K^+ 、 Rb^+ 、 Ca^{2+} が 4 重らせんの形成を促進することがわかってきた。実験結果に加えて、3D-RISM によるエネルギー成分の結果を示し、テロメア 4 重らせんがバスケット型構造をとり、その安定性に脱水和が大きく寄与していることなどをお話をされた。

岡田氏 (熊本大学) は、細胞膜の揺らぎが人の正常造血、造血管腫瘍に及ぼす影響を報告された。ハイブリッドリポソーム、セファラチンにより膜の流動性を変化させ、アポトーシスを選択的に誘導できることを示された。新たに作成した無毛高度免疫不全マウスの応用研究についても紹介された。

黒田氏 (東京大学、原田氏が代理発表) は、蛋白質の凝集に伴う構造転移を観測するために、非溶液状態の光学異方性存在下でキラリティを測定する分光装置を開発されており、LB 膜、キャスト膜を用いた測定結果などを示された。現在、第 2 世代のマルチチャンネル CD、吸収同時測定装置を開発中ということである。

桑島氏 (岡崎統合バイオ) は、 α ラクトアルブミンのフォールディング中間状態の構造について報告された。ヒトとヤギの α ラクトアルブミンは、いずれも不飽和脂肪酸の結合により細胞死誘導活性を示すが、それぞれ、結合部位が全く異なっていることが NMR により明らかになったとお話をされた。

飯野氏 (大阪大学) は、回転モータータンパク質 F_1 の 1 分子測定を報告された。開発したレーザー暗視野顕微鏡による測定でわかってきた F_1 の回転メカニズムについて紹介された。また、プローブの揺らぎから F_1 のトルクを求める理論など、新しい方法も導入されているということであった。

井出氏 (理化学研究所) は、チャンネルタンパク質 KcsA の構造変化と機能の同時観測について報告された。チャンネル電流により 1 分子の活性を測定しながら、AFM の指針により KcsA の開閉構造を操作する実験系を開

発し、開閉構造の変化がチャネル電流の変化と直接関係していることを実証された。

矢野氏（京都大学）は、膜貫通タンパク質の構造形成について報告された。POPC、POPC コレステロール膜内で2種類のモデル膜貫通ヘリックスの蛍光強度を測定し、その時間変化の様子から、ヘリックスの相互作用の揺らぎを実験的に捉えることに成功した。

老木氏（福井大学）は、KcsA カリウムチャネルの開閉の構造変化を報告された。バックグラウンドノイズを下げるなど改良を重ね、回折 X 線追跡法で時間分解能を従来の毎秒 30 フレームから 5000 フレームへ上げたことにより、1 分子の構造変化の過程を詳細に追跡することができるようになってきたということである。大量データの解析など、今後の課題についてもお話された。

岡村氏（姫路獨協大学）は生体膜中の薬物の輸送機構について報告された。高分解能 NMR とパルス磁場勾配スピネコー法の組み合わせにより、ベシクル結合状態と非結合状態の薬物分子の運動性を測定し、結合・解離速度、膜透過速度を *in situ* で決定することに成功した。膜の中での薬物分子の位置がまだわかっておらず、今後調査しなければならないということである。

戸谷氏（成蹊大学）は、糖タンパク質のプロセッシングに対する分子クラウディング環境の影響について報告された。分子クラウディングは、グルコースの切断を加速するのに対して、マンノースの切断を減速するという結果を紹介された。他に、微小空間、網目環境の影響についてもお話された。

鈴木氏（名古屋大学）は、遺伝子の複製エラーが発がんに関与しているのかについて報告された。細胞 DNA 複製酵素をノックアウトすると、細胞レベルでも複製エラーが増大することを示し、DNA ポリメラーゼ内の複製エラー抑制機構が重要であることなどお話された。他に、ハイブリッドリボソームと細胞死についての進行中の課題について紹介された。

平田氏（分子科学研究所）は、3D-RISM により明らかになってきた膜透過現象について報告された。アクアポリン中のグリセリンの透過については、実験結果に反して「透過しない」という結果が海外のシミュレーショングループにより示されていたが、3D-RISM で計算すると、実験結果にも矛盾することなく「透過す

る」という結果になったことを示し、3D-RISM が優位である点を述べられた。他に、KcsA 中の Na イオンの透過、M2 チャネル中の水の透過について紹介された。

吉田氏（分子科学研究所）は QM/MM と RISM 理論を組み合わせた新規手法の開発について報告された。溶媒の配置についてサンプリングが不要なことなど QM/MM/RISM の長所を述べ、適用例として DNA とプロフラビンの結合を示された。結合に対する配列の違いの影響や溶媒の寄与が明らかになってきたということであった。

筆者米谷（日本原子力研究開発機構）は、DNA マイナーグループの水和水の振舞いについて分子動力学計算から得られた結果を報告した。特に水和パターンと DNA 構造揺らぎの配列依存性、水和水の水素結合ダイナミクスについて紹介した。また、DNA とタンパク質の結合に伴う自由エネルギー変化の計算など進行中の課題について紹介した。



米谷先生

手老氏（分子科学研究所）は、脂質膜の過渡的相分離過程の構造、物性について報告された。蛍光標識脂質を用いた一分子追跡法により、サブミクロン、50ms のスケールで分子拡散を追跡することができるようになってきた。基板表面のナノ構造を反映した階層的分子拡散の可能性など、測定から導かれた見解について述べられた。

出羽氏（名古屋工業大学）は、ポリアミン脂質と DNA の複合体形成について報告された。リボソーム化したポリアミン脂質と DNA が複合体を形成すると、ラメラ構造をとるが、酸性条件下では、構造変化し、DNA が放出されることが明らかになってきた。これらの構造変化と遺伝子送達活性の関係についてお話された。

以上 A03 班の発表は、タンパク質、脂質、核酸など様々な対象を扱いつつも、いくつか共通するトピックを含み、それらが接点となり全体的につながりができていくように編成されていた。そのため、全ての発表を聞いたあとで各テーマを振り返ると、これまで直接体験したことがなかったことも身近な問題に感じられるようになってきた。「揺らぎと生体機能」全体の集ま

りは、昨年度の合同班会議、公開シンポジウムに続いて3回目であり、研究の進展や共同研究などについて繰り返し情報交換することは刺激になった。これからの研究活動の活力にしたいと思う。また、研究発表のほかに、懇親会、討論会も多く、貴重な機会となった。今回の合同班会議でお世話になりました芳坂先生と研究室の皆さまに感謝いたします。



平成 22 年度合同班会議（片山津）集合写真（会議 3 日目）