

業績紹介：天然SS結合を形成する組換えガウシア由来ルシフェラーゼの大量発現系の構築及びその生物物理学的解析

黒田 裕

(東京農工大学・A02 公募研究代表者)

論文題目：Biophysical characterization of highly active recombinant Gaussia luciferase expressed in Escherichia coli.

著者：Tharagani Rathnayaka, Minako Tawa, Shihori Sohya, Masafumi Yohda, Yutaka Kuroda
雑誌巻号：Biochim Biophys Acta. Proteins and Proteomics (2010)

最近発見されたガウシア(海洋カイアシ類 *Gaussia princeps*; 海洋性プランクトンの一種)由来のルシフェラーゼ(以下、GLuc; 169 残基)は、生物発光を触媒する最も小さな酵素である(文献1)。GLuc は、蛍ルシフェラーゼ(550 残基)より安定性・活性・汎用性の面で優れたレポータータンパク質となる可能性を秘めている。しかし、10個のシステインがSS結合を形成する組換えGLucの巻き戻しは難しく、動物細胞からしか精製できないGLucの応用範囲は限られている(図1A)。本研究では、大腸菌を宿主とした組換えGLucの発現・精製法を確立し、その活性や熱安定性を初めて生物物理学的な手法で測定した。まず、非天然型SS結合の問題に対して、発現温度を25℃及び16℃に下げ、上清画分で発現されたGLucのみを回収する工夫を施すことで、培養液1L当たり2mgの組換えGLucを得ることが可能となった(図1B)。この手法で得た組換えGLucの発光活性は今まで考えられていたよりはるかに強く、蛍ルシフェラーゼの10倍(同酵素濃度比較)以上であることを示した(図1C)。さらに、円偏光二色分光法から測定したGLucの変性温度が60℃であり、GLucが広い温度範囲で利用可能であることを示した。今後は、本手法で発現した組換えGLucを用いて、GLucの2つの推定ドメイン間の揺らぎを解析し、GLucをさらに改変する予定である。

参考文献：1) O. Shimomura, Bioluminescence: chemical principles and methods, World Scientific, Hackensack, N.J.; London, 2006.

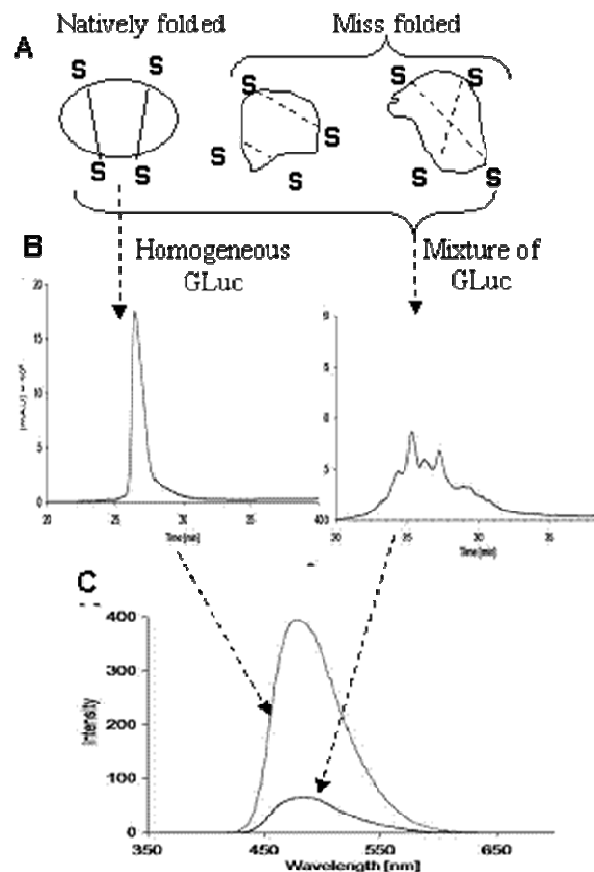


図1：大腸菌で発現した組換えGLucにおけるSS結合形成の問題。(A)配列中に10個のシステインを有するGLucを、従来の手法で発現すると非天然型SS結合を形成する不活性GLucが多く混合する。本計画では天然GLucのみを大腸菌から精製する方法を開発した。(B)大腸菌で発現したGLucの逆相HPLC。(左)本手法で発現したGLucでは一本のHPLCピークが観測される。(右)従来の発現方法では、非天然SS結合を有するGLucが混合しているため、多数のブロードなピークがHPLCで観測される(C)組換えGLucの発光スペクトル。今回開発した手法で発現したGLucの発光活性が強いことから、天然型SS結合を形成する天然GLucの精製に成功したことが、強く示唆される。

業績紹介：インフルエンザ A-M2 チャンネルのプロトン透過機構

平田文男

(分子科学研究所・A03 計画研究代表者)

吉田紀生

(分子科学研究所・A03 公募研究代表者)

論文題目："Proton Transport through the Influenza A M2 Channel: 3D-RISM Study"

著者：Saree Phongphananee, Thanyada Rungromongkol, Norio Yoshida, Spot Hannongbua, and Fumio Hirata

雑誌巻号：J. Am. Chem. Soc., 2010, 132, pp 9782–9788.

M2 チャンネルはインフルエンザ A の細胞膜に存在するプロトンチャンネルであり、細胞膜内外の pH を調整する機能を持つ。よく知られたインフルエンザ薬であるアマンタジンはこのチャンネルの阻害剤である。しかし、アマンタジンの作動機構は未だによく分かっていない。また、アマンタジン耐性ウイルスの出現が報告されている。したがって、M2 チャンネルのプロトン透過機構自体の理解を深めることは今後のドラッグデザインにおいて重要である。

M2 チャンネルは pH に応じてゲートを開閉することで細胞内の pH を調整している。M2 チャンネルは 4 量体からなり、ゲート部には 4 つのヒスチジン残基が存在する。これまでの、実験およびシミュレーションなどから、細胞外の pH に応じてヒスチジンのプロトン化状態が変わることでゲートが開閉していることが知られている。そこで、0H(全てのヒスチジンがプロトン化していない状態)から 4H(全てのヒスチジンがプロトン化している状態)の 5 つの状態について、MD シミュレーションから抽出した構造を用いて、3D-RISM でチャンネル内のプロトン (ヒドロニウムイオン) および水分子の分布および平均力ポテンシャルを計算した。

図に 3D-RISM 理論で求めたチャンネル内の平均力ポテンシャルを示す。0H~2H では大きな障壁が存在しており、水もプロトンも透過の可能性は無いことが分かる。3H では 5kJ/mol 程度の障壁が見られるが、これは熱運動で超えることができる程度の障壁である。4H ではゲートは 3H よりも開いているものの、障壁が高くなり、プロトン透過性はむしろ下がっていることが分かる。ゲートの開閉はプロトン化したヒスチジ

ン間の静電反発により起こるため、0H,1H,2H,3H,4H とプロトン化状態が進むほどゲートは大きく開くが、一方でプロトン化したヒスチジンにより、正の静電ポテンシャルが作られるため、ヒドロニウムイオンには反発力が働くことになる。したがって、M2 チャンネルのプロトン透過性はゲート開閉による立体障害とプロトン化による静電反発のトレードオフによって決まることになる。

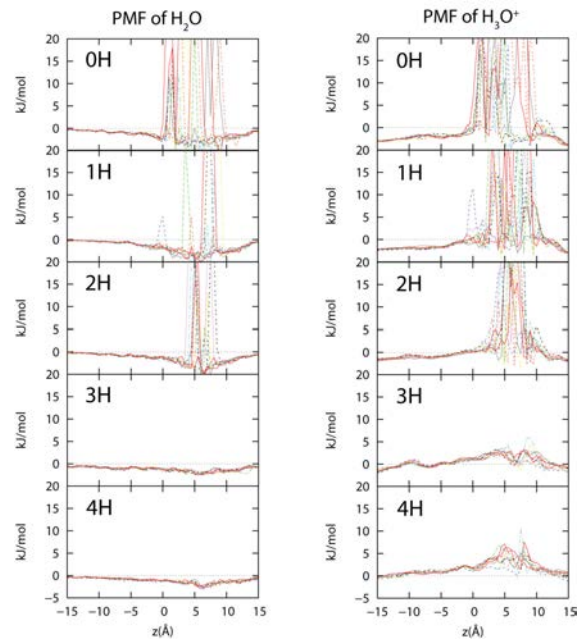


図 1

以上の分布関数およびそれから求めたヒスチジン残基の周りの水およびヒドロニウムイオンの動径分布関数から、プロトンの透過機構に関して図 2 に示す新しいモデルを提案した。

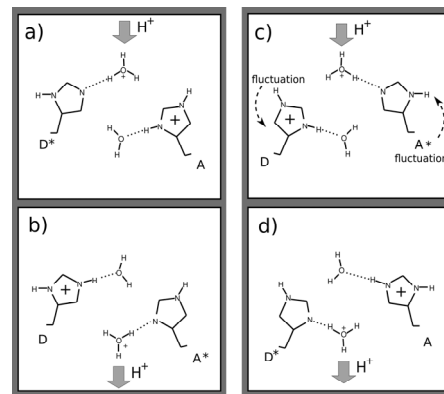


図 2

大阪大学蛋白質研究所セミナー

「蛋白質の多様な相互作用 —動的機構の解明から医学的応用まで—」報告

石森浩一郎

(北大院理・A01 公募研究代表者)

鎌形 清人

(東北大多元研・A01 公募研究連携研究者)

櫻井 一正

(阪大蛋白研・A01 公募研究連携研究者)

淵上壮太郎

(横浜市大生命ナノシステム)

本セミナーは、蛋白質の相互作用を多面的にかつ動的に捉え、その新たな実験、理論的手法によるアプローチから、現在注目されている蛋白質相互作用の研究状況とその課題、さらに発展して生体内での蛋白質相互作用を利用した医学的な応用まで、各分野での最新動向を概観するとともに、今後の展開について種々の観点から討議することを目的として、東北大・多元研の鎌形、阪大・蛋白研の櫻井、横浜市大・生命ナノシステムの淵上、北大・院理の石森が企画し、大阪大学蛋白質研究所セミナーの一環として平成22年10月21日、22日の両日にわたって開催された。講演内容は「蛋白質-基質結合」(座長：石森)、「蛋白質-蛋白質結合」(座長：淵上)、「蛋白質-生体高分子結合」(座長：鎌形)、「相互作用の医療への応用」

(座長：櫻井)の4つのセッションに分かれ、それぞれ3~5名の研究者が発表を行った。いずれも蛋白質の「揺らぎ」と深く関連した内容であるので、以下にその概要を紹介する。

セッション1では蛋白質と基質間の相互作用について3件の発表があり、最初の箱嶋敏雄博士(奈良先端大・情報科学)が植物ホルモンの受容体における相互作用について、その詳細な結晶解析の結果から、植物ホルモンの受容体に共通な蛋白質-基質(植物ホルモン)相互作用様式を提案した。一見、その構造に類似性のない植物ホルモンであるが、その疎水性、親水性官能基の配置には一定の規則性があり、その受容体との相互作用にも共通性があるということは、蛋白質の分子進化の点でも非常に興味深い。一方、二番目の発表者である雨宮崇之博士(名大・院情報科学)は基

質結合による蛋白質の構造変化について、線形応答理論によるデータベース解析を行い、多くの蛋白質における基質結合による構造変化が数種の構造変化に分類可能であることを示した。この研究は、基質結合による構造変化の基本原則を解き明かすものであり、先の箱嶋博士の実験的な結果からも、生物は蛋白質の基質結合における相互作用を共通性のある一定の原理に基づいて設計してきたことを強く示唆しているように感じた。このセッション最後の講演は原田英里砂博士(サントリー生有研)で、ヘムオキシゲナーゼのNMR解析から、「見えない構造」の存在とその機能的意義が明確に示された。このような蛋白質の動的構造の重要性からは、先の発表の2件とは対比的に、蛋白質構造には表面的にはわからない「奥深さ」のようなものを感じることができた。(座長：石森)



多数の参加者を集めてセッション1の開始

2番目のセッションでは、蛋白質-蛋白質結合に焦点をあて、3名の方々に講演していただいた。まず、野本直子博士(北大・院理)の代理として石森浩一郎博士(北大・院理)によって、電子伝達系におけるシトクロムcとシトクロムc酸化酵素との間の相互作用についてNMRを用いて解明された結果が紹介された。従来から認識されていた静電相互作用だけでなく、多様な相互作用が関与していることが明らかにされ、また、それらの相互作用が蛋白質間の安定な結合に最適化されているわけではないことが指摘された。続いて、肥後順一博士(阪大・蛋白研)から天然変性蛋白質で



セッション2での質疑

ある NRSF とそのパートナー蛋白質 Sin3 との複合体形成について計算機シミュレーションを駆使して得られた成果が発表された。蛋白質間の相互作用と NRSF のフォールディングが複雑に絡み合った様相がシミュレーションによって再現され、自由エネルギー地形を用いて複合体形成のシナリオが端的に提示された。最後に、佐甲靖志博士（理研・細胞情報）から細胞内 1 分子イメージングによって明らかにされた情報伝達系における蛋白質間相互作用について 2 つの話題が紹介された。前半では、低分子量 GTPase である Ras とリン酸化酵素 Raf との間の tight な分子間相互作用において、Ras が Raf のコンフォメーションを巧妙に制御していることが示された。後半では、EGF 受容体の動的会合形成における loose な分子間相互作用の実態が紹介された。本セッションの 3 つの講演により、蛋白質-蛋白質間相互作用といってもその形態は個々の機能に即して多種多様であり、簡単に一般化できるものではないことが改めて浮き彫りにされた。一方で、いずれにおいても蛋白質ならではの柔軟さ・曖昧さが決定的な役割を担っているように感じられる。今後、多様な研究の展開により、その共通メカニズムが解明・理解されることが期待される。（座長：淵上）

セッション 3 は蛋白質-生体高分子結合というテーマで 3 人の方に講演していただいた。五十嵐圭日子博士（東大・院農学生命）は、糖質加水分解酵素の結晶性多糖への吸着と反応について発表された。高速 AFM を使用し、糖質加水分解酵素一分子が結晶性のセルロースの上を動きながら、加水分解する様子を明らかにした。鶴澤尊規博士（理研）は、一本鎖 DNA のダイナミクスの観測から明らかとなった生体高分子の分子内運動の普遍的な時間スケールについて発表された。

一本鎖 DNA に蛍光色素と消光子を付加し、それらの接触速度を測定することにより、DNA の分子内運動の時間スケールを明らかにした。原田慶恵博士（京大・iCeMS）は、DNA-タンパク質相互作用の 1 分子イメージングについて発表された。RNA ポリメラーゼのプロモーターを探す運動や DNA 相同性組み換え運動などの一分子測定の結果を示された。以上 3 名の発表は、生体高分子の物性と蛋白質-生体高分子結合の理解を促進するものであった。



セッション3での質疑

セッション 3 終了後にはセミナー会場の隣室で懇親会が開催され、若い研究者から熟年の研究者まで幅広い年齢層の方々にご参加いただいた。懇親会は、箱嶋先生の乾杯の挨拶で始まり、和やかな雰囲気の中、参加者間で「多様な」交流が行われた。（座長：鎌形）

2 日目のセッション 4 では相互作用の医療への応用というテーマで 5 人の方に講演していただいた。小澤大博博士（福井大・医）はアミロイド原因蛋白質の $\beta 2$ ミクログロブリン ($\beta 2m$) と細胞外シャペロンの $\alpha 2$ マクログロブリン ($\alpha 2M$) の相互作用研究について発表された。 $\beta 2m$ の変性に伴い $\alpha 2M$ との会合が促進されることを示し、変性条件と結合増強の関係性を考察されていた。山本典史博士（名大・院情報科学）はファーマコロジカルシャペロンと呼ばれる蛋白質の変性を抑制する合成分子とヒトプリオン蛋白質との相互作用をシミュレーションした結果を述べられた。博士の研究室で発見された GN8 という分子とプリオンの複体のシミュレーションを行ったところ、正常型プリオンの構造を安定化し、異常型プリオンへの構造転移を抑えるという結果が得られた。富山貴美博士（大阪市大・院医）はアミロイド β ($A\beta$) がアルツハイマー病を引き起こす機構について発表された。現在広く受け入れられ

ているアミロイド仮説を否定し、博士の提唱するオリゴマー仮説を裏付ける実験結果を数多く示された。以上3名の発表は、コンフォメーション病と呼ばれる病気の原因解明と対処法の可能性を示すものであったと思う。



セッション4の開始

本セッション4人目の乾隆博士（大阪府大・院生命環境）はL-PGDSという輸送蛋白質のドラッグデリバリーシステムへの利用について話された。難溶性の薬剤分子とL-PGDSが複合体を形成することを物理化学的な実験から示し、マウスを使った実験から薬剤の効果がL-PGDSを用いた時に増強する結果を示された。最後の朴三用博士（横浜市大・生命ナノシステム）はインフルエンザRNAポリメラーゼの結晶構造をもとにした阻害剤の開発について発表された。RNAポリメラーゼは3サブユニットの複合体であり、博士の解いたサブユニット間の会合部位の構造を元に、複合体形成を阻害する候補分子が得られたという結果を示された。後半2名の発表は、構造という蛋白質の基礎的な情報が、薬剤開発の応用につながるというとても明快な例を示されたものだと感じた。（座長：櫻井）

本セミナーでは「蛋白質の相互作用」をキーワードとし、分野や手法については敢えて特定のものに限定せず、幅広い内容の講演をお願いした。そのため、全体的なまとまりがない散漫な会になってしまうことも危惧されたが、わずか2日間で「多様な」分野を概観することができただけでなく、個々の講演それぞれには講演者の分野ならではの「多様な」個性が感じられたと同時に、その根底に共通する「蛋白質の相互作用」を実感することができた。本セミナーの講演を通して、「蛋白質の相互作用」は「多様な」アプローチによって「多様な」意味づけをされ、多彩な光を放つ研究対

象であることが再認識された。しかし、その光はまだ十分に掴み切れるものではなく、大きく揺らぐ曖昧なもののようにも感じられた。今後、「蛋白質の相互作用」の意義をさらに明確にしていくためには、各分野のさらなる研究発展はもちろんのこと、分野をまたいだ研究者間の「多様な」相互作用が必須であることは間違いない。本セミナーがその一助となれば、世話人として望外の喜びである。（まとめ：淵上）

シンポジウム報告

膜シンポジウム 2010 セッション「膜の揺らぎと機能への展開：研究の最前線」

岡村恵美子

(姫路獨協大薬・A03 公募研究代表者)

2010年11月19～20日に京都大学薬学部記念講堂において「膜シンポジウム2010」が開催され、その初日に本領域の共催のもと標記のセッション講演が行われました。膜シンポジウムは日本膜学会が毎年秋に開催するシンポジウムで、膜をキーワードとする医学・生物学・化学・物理・工学に至る幅広い分野の研究者が一堂に会して十分な討論を行うというユニークなものです。22回目となる本年、運営委員長である筆者の提案で初めてセッション講演を企画しました。本領域からの3名の先生を含む以下の講演に対して、100名を超える参加者全員で白熱した討論が展開されました。

1. 「趣旨説明」(姫路獨協大学) 岡村恵美子
2. 「人工膜および細胞膜の揺らぎとがん治療」
(崇城大学) 松本陽子
3. 「ソフトな脂質膜の揺らぎと薬物透過についてのNMR研究」
(姫路獨協大学) 吉井範行・岡村恵美子
4. 「酸化基板表面上の平面支持脂質二重膜内での分子拡散挙動のその場観察」
(豊橋技術科学大学) 手老龍吾
5. 「中性子散乱と蛍光法を用いた脂質膜の構造とダイナミクスの評価」
(京都大学大学院薬学研究科) 中野 実
6. 「リポソーム形成のメカニズム：分子シミュレーションによるアプローチ」
(産業技術総合研究所ナノシステム) 篠田 渉

生体膜はソフトな空間であり、膜の揺らぎが機能に果たす役割は大きいと考えられます。本セッションでは、「膜のなかの揺らぎ」に焦点をあて、揺らぎをいかにして捉え、膜の動的な機能の理解に結び付けるかについて、本領域からの成果を含む最新の研究例を紹介し、膜学研究の場において揺らぎの概念と重要性をさらに定着させることを目的としました。

オーガナイザーの趣旨説明の後、松本先生には抗がん剤としてのハイブリッドリポソームの基礎から臨床応用までを、筆者らのグループから高分解能溶液NMRを用いた薬物輸送を、手老先生には蛍光分子追跡法による膜のなかの分子拡散を、中野先生には中性子散乱によるリポソーム間の脂質分子移動とフリップフロップについて、篠田先生には分子シミュレーション+粗生化モデリングによるリポソーム形成過程についてそれぞれ講演をいただきました。

いずれのトピックスも膜の揺らぎが密接に関係したものであり、「揺らぎ」が膜において非常に重要な役割を演じていることが分かります。また、方法論も、NMR、蛍光、中性子散乱、分子シミュレーションなど多彩です。今後、これらの方法や関連のアプローチによって、生体機能に結びつく膜の様々な揺らぎが捉えられ、理解されていくものと期待されます。

最後になりましたが、本セッションの共催をご快諾いただくとともに、当日もセッション講演から懇親会まで長時間にわたってご参加いただきました領域代表の寺嶋先生に厚く御礼申し上げます。

