

業績紹介：小蛋白質のフォールディング初期状態は収縮しているかどうか？

高橋 聡

(東北大学多元物質科学研究所・A01 公募研究代表者)

小沼 剛

(大阪大学蛋白質研究所)

論文題目："Time-resolved small-angle X-ray scattering study of the folding dynamics of barnase"

著者：Tsuyoshi Konuma, Tetsunari Kimura, Syuzo Matsumoto, Yuji Goto, Tetsuro Fujisawa, Alan R. Fersht, and Satoshi Takahashi

雑誌巻号：J. Mol. Biol. **405**, 1284-1294 (2011)

小蛋白質のフォールディング初期状態（変性剤の少ない溶液における変性状態）の大きさに関する論争が、長く研究者を困惑させている。議論の発端となったのは、Plaxco や Baker らが行った先駆的な実験である[1]。彼らは、残基数が 62 の protein L のフォールディング過程を X 線小角散乱法（SAXS）で時分割観察し、変性剤が薄い溶液における変性状態の回転半径（ R_g ）が大きいことを示した。類似の結果は、他の二種類の 100 残基以下の蛋白質でも得られている。これらの結果は、小蛋白質のフォールディング初期状態は広がった構造を持つという一般則を導くかと思われた。

しかし、全く異なる結果がその後の一分子蛍光観察により得られた。Haran らは protein L に二つの蛍光色素をラベルし、色素間の FRET 効率を計測した[2]。特に、一分子観察により変性剤の少ない条件で存在する変性状態を捉え、この状態が収縮していることを結論した。この結果をはじめとして、一分子 FRET 実験により小蛋白質のフォールディング初期状態が収縮しているとする多くの実験データが報告されている。

この問題に対する手がかりを得るために、我々は barnase を取り上げ、時分割 SAXS 法における観察を行った。barnase はアミノ酸残基数が 110 の蛋白質である。barnase はフォールディング中間体を形成するが、中間体は不安定で、中間体を形成する 100 残基よりも大きい中蛋白質と、形成しない 100 残基以下の小蛋白質の境界にあたる蛋白質である。

始めに、Spring-8 のビームライン BL45XU において、

様々な変性剤濃度における barnase の SAXS 測定を行い R_g を求めた。結果を図 1 A に示す。このプロットは、変性剤濃度が上昇するにつれ、天然構造を持つ barnase が二状態的に変性し、変性剤 3M 以上で完全に変性することを示している。特に、変性状態では R_g が変性剤濃度に依存しない点が指摘できるが、これは、protein L の SAXS 観測でも得られた結果である[1]。

次に、ストップフロー装置を用いた時分割観察を行った。得られたデータを解析し、変性剤希釈直後の溶液に存在する変性状態の R_g を導出した（図 1 B）。得られたデータは、多少の収縮はあるものの、barnase の変性状態では R_g が広がったままであることを示している。barnase のフォールディングには、cis 型プロリン残基の異性化による不均一性が存在する。この成分の寄与を見積もっても結果は変わらなかった。このように、barnase のフォールディング初期状態は、広がった構造をもつと言える。

今回の結果は、小蛋白質のフォールディング初期構造に関する矛盾は、観測手法の違いに起因することを強く示唆する。この矛盾を説明する仮説として、蛍光色素間の距離と R_g の間の比例定数の変性剤濃度依存性や、蛍光色素のラベル化が R_g に影響を与える可能性などを挙げるができる。変性した小蛋白質の大きさは、分子動力学計算の正確さのベンチマークともすべき基礎的な量である。新しい計測法や、蛍光色素をラベルした蛋白質の X 線小角散乱観測など、斬新なアプローチによる問題の決着が望まれる。

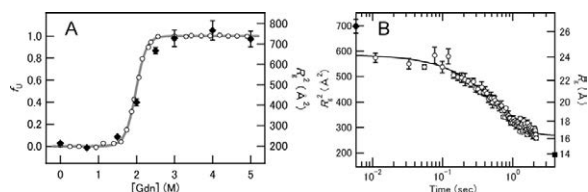


図 1 (A) 様々な変性剤濃度における barnase の蛍光強度および R_g^2 の変化。(B) フォールディングによる R_g^2 の時間変化
参考文献

[1] Plaxco, K. W. et al. Nat. Struct. Biol. **6**, 554-556 (1999).

[2] Sherman, E. & Haran, G. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **103**, 11539-11543 (2006).

業績紹介：蛋白質の新しい構築原理の提唱

片岡幹雄

(奈良先端大物質創成・A02 計画研究代表者)

山口真理子

(奈良先端大物質創成・A01 公募研究代表者)

論文題目："Systematic alanine insertion reveals the essential regions that encode structure formation and activity of dihydrofolate reductase"

著者：R. Shiba, M. Umeyama, S. Tsukasa, H. Kamikubo, Y. Yamazaki, M. Yamaguchi, M. Iwakura, and M. Kataoka

雑誌巻号：BIOPHYSICS 7, 1-10 (2011).

アミノ酸配列に記述された情報の理解は、蛋白質科学の基本問題の一つである。個々のアミノ酸の担う情報は、部位特異的置換によりよく研究されているが、アミノ酸配列上離れた位置にあるアミノ酸が立体構造上で近づくことによってできる情報や、配列の連結性の担う情報については系統的な研究は少ない。我々は、配列の連結性の持つ意味を、配列に分断を受け入れるかどうかを調べることで、理解しようと考えた。その目的のために、網羅的アラニン挿入法を考案し、ジヒドロ葉酸還元酵素（DHFR）に適用した結果、構造形成、機能発現に必須な領域を抽出することに成功した。配列の任意の箇所にアラニンを挿入することにより、前後の配列が分断される。分断が受け入れられる場合、構造形成や機能発現に影響はなく、分断が受け入れられない場合は、構造形成あるいは機能発現が阻害されると期待される。DHFR は、159 個のアミノ酸からなり、アラニンを 13 個含んでいるため、可能なアラニン挿入変異体は、145 個となる。145 個の全ての挿入変異体を作製し、構造形成能は溶解度試験で、酵素機能は TMP 耐性試験によりスクリーニングした。任意に選んだ変異体を精製し、溶液構造、酵素反応を測定し、スクリーニング法の妥当性を検証した。

構造形成や機能発現のために、アラニン挿入を受け入れない箇所は、配列上に連続して現れ、それぞれ異なる 12 個の領域を形成していた。これらの領域をそれぞれ構造エレメント、機能エレメントと定義した。構造エレメントのいくつかは、機能エレメントを含んでいる。これは、これらのエレメントの担う構造形成の

ための相互作用が機能発現にも必須であることを示唆する。しかし、機能エレメントを含まない構造エレメントが存在する。この構造エレメントの担う相互作用は、活性部位のトポロジー形成には必要でない、すなわち構造の安定性を決定するために重要な領域と考えられる。一方、構造エレメントに含まれない機能エレメントも存在した。触媒活性を示すための動的性質を担う領域と考えられる。また、折り畳み初期に形成される部位は全てが構造エレメントに含まれていた。これらの結果から、構造エレメントや機能エレメントは、構造形成や機能発現のために必須の相互作用を担う領域と結論し、蛋白質は構造エレメント、機能エレメントおよびそれらをつなぐリンカーから構成されるという新しいタンパク質の構築原理を提唱した。また、アラニン挿入変異法は、どのような蛋白質にも応用できる有効な手法であることを合わせて示した。

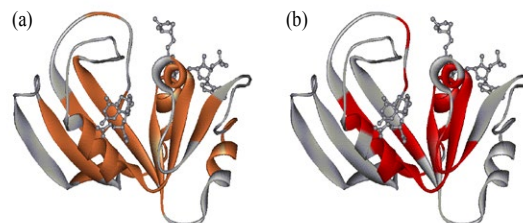


図 1. DHFR の構造エレメント(a)と機能エレメント(b)。

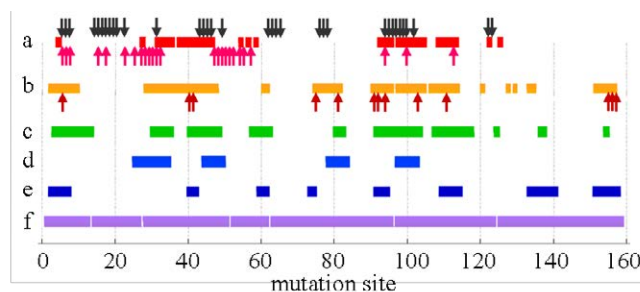


図 2. 機能エレメント(a)、構造エレメント(b)と様々な構造要素との比較。(c)円順列変異により決定されたフォールディングエレメント、(d)αヘリックス、(e)β構造、(f)モジュール構造。黒矢印、NADPG 結合部位、赤矢印、DHF 結合部位、茶色の矢印、折り畳み初期に形成される部位。

業績紹介：リンカーを介したジンクフィンガー同士の相互作用

今西未来

(京都大学化学研究所・A02 公募研究代表者)

論文題目: "Zinc finger-zinc finger interaction between the transcription factors GATA-1 and Sp1"

著者: Miki Imanishi, Chika Imamura, Chika Higashi, Wei Yan, Shigeru Negi, Shiroh Futaki, and Yukio Sugiura

雑誌巻号: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **400**, 625-630 (2010)

ジンクフィンガーは代表的な DNA 結合モチーフとして知られているが、近年、タンパク質間相互作用に関わることも明らかになってきた。その DNA 結合様式に関する研究が広く行われてきた一方、タンパク質間相互作用に関しては、未解明な点が多い。

本研究では、血球の分化において相乗的に働くことが示唆されている転写因子 GATA-1 と Sp1 のジンクフィンガードメイン同士の相互作用様式を明らかにするため、欠失変異体およびアミノ酸置換体を作製し、等温滴定カロリメトリー (ITC) の測定を行った。

GATA-1 は 2 つの C4 型ジンクフィンガー (N-, C-finger) を、Sp1 は 3 つの C2H2 型ジンクフィンガー (図 1) を DNA 結合ドメインとして有する転写因子である。これらの欠失変異体を用い、プルダウンアッセイを行った。その結果、GATA-1 と Sp1 のジンクフィンガードメイン間の相互作用には、「GATA-1 C-finger とその N 末端側 (リンカー) の塩基性に富む領域」が重要であること、また、Sp1 ジンクフィンガーはフィンガーを 1 つ欠損させても相互作用能を有するものの、「3 つのフィンガーを持つ Sp1 DNA 結合ドメイン全長」が最も強く相互作用することが明らかになった。

次に、カロリメトリー測定により、その相互作用様式を検討した。その結果、低塩濃度条件では、弱い吸熱すなわち、エントロピー駆動の相互作用が検出された (図 2A)。一方、高塩濃度条件では、ほとんど相互作用しないことが明らかになった。プルダウン実験の結果も考慮すると、これらの結果は、GATA-1 と Sp1 のジンクフィンガー間の相互作用には、静電相互作用が重要であることを示唆するものである。

そこで、Sp1 ジンクフィンガーに存在する酸性アミ

ノ酸のうち、DNA 結合時に溶媒に露出するリンカー部分のグルタミン酸に着目し、その点変異体を作製した (図 1)。GATA-1 ジンクフィンガーと Sp1 リンカー変異体を用いてカロリメトリー測定を行ったところ、野生型とは異なり、一定量の微小な吸熱しか検出されなかった (図 2B)。このことは、Sp1 ジンクフィンガー間のリンカーに存在するグルタミン酸が GATA-1 塩基性領域との相互作用に関わっている可能性を示すものである。リンカー領域の新しい役割を示す知見として興味深い。

本測定で検出された熱量変化は極めて小さく、GATA-1、Sp1 ジンクフィンガー単体同士の相互作用はかなり弱いことが示唆される。GATA-1、Sp1 ジンクフィンガー両者とも、DNA 結合能を有するドメインであり、DNA 結合状態では揺らぎが変化すると推察される。今後、DNA 結合状態における、ジンクフィンガー間相互作用様式の解明に興味を持たれる。

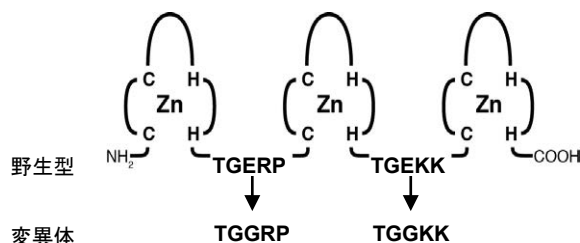


図 1. Sp1 ジンクフィンガーのリンカー点変異体

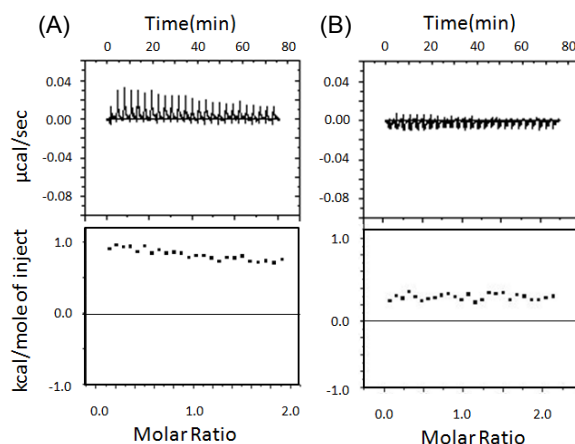


図 2. GATA-1 ジンクフィンガーへの (A) 野生型 (B) 点変異型 Sp1 ジンクフィンガー 滴下による熱量変化 (下は希釈熱を差し引いたもの)

業績紹介：酸化 LDL 受容体タンパク質 LOX-1 の構造階層性と機能との相関

楯 真一

(広島大学理学研究科・A02 公募研究代表者)

論文題目："Surface plasmon resonance study on functional significance of clustered organization of lectin-like oxidized LDL receptor (LOX-1)"

著者: Izuru Ohki, Hirokazu Amida, Risato Yamda, Mamoru Sugihara, Tomoko Ishigaki, and Shin-ichi Tate

雑誌巻号: *Biochim. Biophys. Acta* **1814**, 345-354 (2011)

私たちのグループでは、酸化 LDL 受容体タンパク質の構造機能相関研究を進めてきている[1]。血液にあるコレステロールキャリアーである LDL (Low Density Lipo-protein) は、「悪玉コレステロール」と俗称されるが、血液中で非酸化状態にある場合には毒性はない。活性酸素等と反応して生成される酸化 LDL は生体異物として血管壁中でマクロファージに貪食され、マクロファージを泡沫化する。泡沫化したマクロファージが動脈硬化病巣を形成する。非酸化 LDL を認識する LDL 受容体と、酸化 LDL を認識する受容体は全く異なる構造をもつ。このため、両受容体の分子認識機構の違いに興味を持たれている。

酸化 LDL 受容体には様々なタイプが存在する。私たちが研究対象とする受容体は、血管内皮細胞上の主要な酸化 LDL 受容体タンパク質として同定された LOX-1 である。私たちは以前にこの立体構造を発表しているが、これは酸化 LDL 受容体タンパク質構造の初めての例となった。本研究は、私たちが結晶構造解析・細胞アッセイに基づいて提唱した LOX-1 の酸化 LDL 認識機構を、表面プラズモン共鳴法(SPR)を用いて検証した報告である。

LOX-1 の基質認識ドメインは、分子間ジスルフィド結合を介してホモ 2 量体構造を形成する。結晶構造解析から、ホモ量体構造の表面に存在する塩基性スパイン構造(basic spine)が酸化 LDL 認識に必要であることを明らかにした。しかし、今回の SPR を用いた実験では、ホモ 2 量体 1 分子では $K_D = 10^{-5}$ M 程度の酸化 LDL 結合能しか示さず、細胞上で観測された LOX-1 の酸化 LDL に対する親和性 $K_D = 10^{-8}$ M とは大きく食い違った。つまり、ホモ 2 量体 1 分子が酸化 LDL を認識する

という機構では説明できない。ちなみに、非酸化 LDL に対する受容体 (LDL-R) は受容体 1 分子で 1 つの LDL 粒子を捕捉する。酸化 LDL 受容体 LOX-1 は全く異なる様式で酸化 LDL を認識することが分かった。

LOX-1 は細胞上でクラスターを形成することが、細胞上に発現した LOX-1 に対する化学架橋実験から示されていた。そこで、私たちは LOX-1 が細胞表層で集積構造を取ることが特異的認識に必要であると考えた。ビオチン化した LOX-1 リガンド結合ドメインを用いて Streptavidin を固定化した SPR センサー (Biacore SA-sensor) 上に固定化することで細胞表層上での LOX-1 集積構造を模した表面を作り相互作用解析を行った (図 1)。Streptavidin は 4 量体タンパク質であり 4 つの biotin 結合部位を持つ。このため、biotin-LOX-1 を固定化することで図 1 にイメージするように局所的に LOX-1 結合メインが集積した構造を作りあげられると期待した。実験の結果、擬集積構造の LOX-1 は $K_D = 10^{-10}$ M の親和性を示した。このことから細胞上での LOX-1 集積構造形成が酸化 LDL 認識には重要であることを示すことができた。さらに、自発的な 2 量体形成能が低下する変異体 (W150A) をジスルフィド結合を介してホモ 2 量体化したフラグメントは、野生型の対応するフラグメントよりも明らかな結合能の低下を示した。集積構造を構成する各 2 量体構造が安定な構造を保持することも活性には必要であることが分かった。安定なホモ 2 量体構造ユニットが集積化するという階層的構造が LOX-1 の機能発現には必要である。

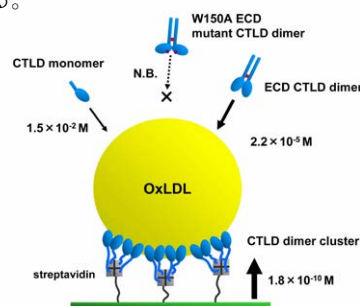


図 1 : SPR で明らかになった LOX-1 と酸化 LDL との相互作用

参考文献

[1] I. Ohki, *et al. Structure*, **13**, 905-917 (2005).

業績紹介：3D-RISM 理論と分子動力学法の結合に基づく自由エネルギー計算

宮田 竜彦

(愛媛大学・共同研究者)

平田 文男

(分子科学研究所・A03 計画研究代表者)

論文題目："Free energy calculation using molecular dynamics simulation combined with the three dimensional reference interaction site model theory. I. Free energy perturbation and thermodynamic integration along a coupling parameter"

著者：Tatsuhiko Miyata, Yasuhiro Ikuta, and Fumio Hirata

雑誌巻号：J. Chem. Phys. **133**, 044114 (2010).

論文題目："Free energy calculation using molecular dynamics simulation combined with the three-dimensional reference interaction site model theory. II. Thermodynamic integration along a spatial reaction coordinate"

著者：Tatsuhiko Miyata, Yasuhiro Ikuta, and Fumio Hirata

雑誌巻号：J. Chem. Phys. **134**, 044127 (2011).

溶液中の化学プロセスを理解する上で鍵のひとつとなるのが自由エネルギーの計算である。分子認識に関連する結合定数、生体分子の構造安定性の議論など、自由エネルギー計算の応用例は枚挙にいとまがない。既存の 3D-RISM 理論に基づく自由エネルギー計算は、基本的に分子の内部自由度を凍結するという前提の下で行われてきた。これに対し本研究では 3D-RISM 理論に基づきつつ、溶質分子（生体分子等）の揺らぎを考慮した自由エネルギー計算を目的とした。この目的に沿って、3D-RISM 理論と分子動力学（MD）シミュレーションの結合手法[1]（以下、MD/3D-RISM 法）を用いた自由エネルギー計算法を提案した。

方法論の詳細は上述の論文を参照されたい。ここでは紙面の都合で計算適用例と結果の部分のみを紹介する。クラウンエーテル 18C6 は水中でカリウムイオン K^+ を認識することが知られている。MD/3D-RISM 法に基づいた熱力学的積分法を用いて、この分子認識プロセスにおける平均力ポテンシャル(PMF)を計算した。結果を図 1 に示す。 K^+ が 18C6 に近づくプロセスにおいて、自由エネルギー障壁が存在する。この自由エネルギー障壁を経た後、 K^+ は 18C6 と結合し、安定な複合体が形成される。図 1 において"coupling"と示された

データは、 K^+ と 18C6 が無限遠離れた状態から複合体を形成したときの自由エネルギー変化の計算結果であり、PMF とよく一致している。したがって 18C6- K^+ 間の有効相互作用は、水中においては重心間距離が約 10 Å 以上になれば消失すると結論づけられる。

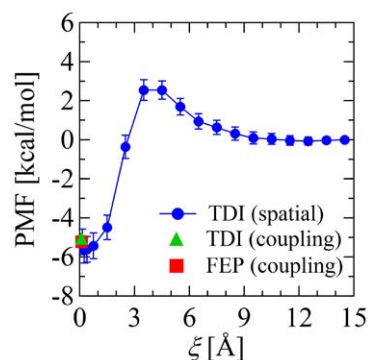


図 1：平均力ポテンシャル。ξ は 18C6 と K^+ イオンの重心間距離を表わす。

次にスナップショットと 3 次元分布関数の例を図 2 に示す。MD/3D-RISM 法のトラジェクトリーに沿った複合体の構造解析から、18C6 分子のコンフォメーションは 18C6- K^+ 分子間の距離に依存して有意に変化することが分かった。さらに 3 次元分布関数から計算した水の配位数と複合体の構造解析を通して、図 1 の自由エネルギー障壁の本質を調べた。その結果、 K^+ イオンとその周囲との相互作用が PMF の概形を決める主要因であることが分かった。ξ = 4 Å 近傍で K^+ イオンは周囲と十分に相互作用できず、それが自由エネルギー障壁として現れていると解釈できる。

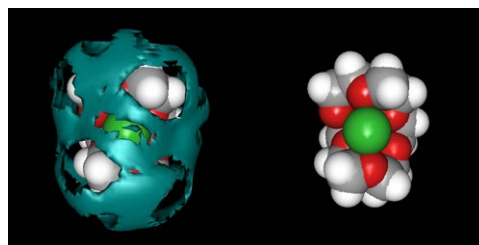


図 2：ξ = 2 Å における 18C6- K^+ 複合体のスナップショットの例。左図の青い領域は水の 3 次元分布を表わす。ホスト分子である 18C6 の環構造はゲスト分子 K^+ との重心間距離に依存して有意に変化する。

参考文献

[1] T. Miyata and F. Hirata, J. Comput. Chem. **29**, 871-882 (2008).

業績紹介：チャネルタンパクの1分子計測 - 1分子生理学に向けて -

井出 徹

(理化学研究所・A03 計画研究代表者)

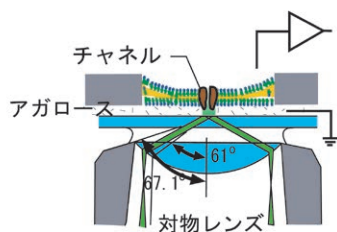
論文題目: "Simultaneous Optical and Electrical Recording of Single Molecule Bonding to Single Channel Proteins"

著者: Toru Ide

雑誌巻号: *ChemPhysChem*, **11**, 3408-3411 (2010)

チャネルタンパクは、生体膜のイオン透過性を制御することによって、細胞の様々な機能をコントロールする「孔」である。この孔には、特定の刺激に応じてフタを開閉する「ゲート」機能が備えられている。単一チャネル電流計測法により、発現したゲート「機能」は詳細に解析されているが、その分子実体は未だに謎に包まれている。

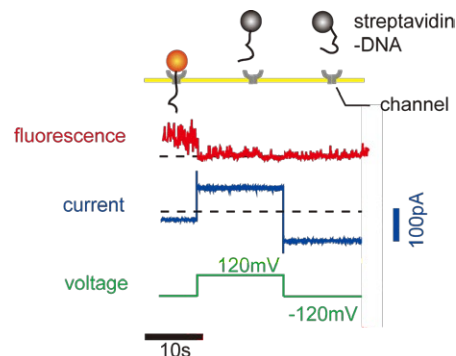
我々の研究の目的は、刺激の受容（例えばリガンドの結合）からゲート開閉までの過程を1分子レベルで可視化計測することにある。いつ、幾つものリガンドが結合すると、どのような構造変化を起し機能発現に至るのか、一連の流れを1分子レベルで計測解析できる実験系を開発しようというわけである。単一チャネル電流記録法によって、チャネルの機能は1分子レベルで計測可能であり、最近の1分子可視化技術の進展によって、蛍光1分子が比較的に簡単に見えるようになってきているので、これら2つの技術を上手く組み合わせれば、目的としている測定が可能となるであろう。



今回の報告は上の一連の測定のうち、特に刺激の受容、つまりリガンド結合の1分子可視化に関係する。イオンチャネルの1分子可視化のために、我々は図のような実験装置を開発した^[1,2]。装置は上下2つの溶液槽に分かれており、溶液間の隔壁に開けた小穴に人工脂質平面膜を形成する。膜が底面のカバーガラスに十分に近ければ、全反射照明によって膜上の蛍光1分子の可視化ができ、しかも

寒天等のゲルで膜と装置底面との間にイオンの通路を作っているため、膜を介した微小電流の同時計測も可能である。

論文では、開発した装置の評価を行うために、扱いが非常に簡単なイオンチャネル (α -ヘモリシン) とその阻害剤 (一本鎖 DNA) との結合を電気・光学的に同時計測した。ヘモリシンチャネルは細菌毒によって形成される大きな孔で、生理機能を持つチャネルと違いゲートを持たない。溶液中に大きな荷電粒子が存在すると、膜電位によってそれらが電気泳動的に導入されポアを閉塞し、イオンの透過が阻害される。例えば、一本鎖 DNA を膜の上部溶液に添加した場合、膜上部を負電位に固定すれば、負電荷を帯びた DNA 分子はチャネルポアを透過し膜の下側に運ばれる。この時、DNA のポア透過中には、(孔が狭くなるので) イオン性電流は 10%程度にまで減少する。一本鎖 DNA を蛍光性アビジン分子等の大きな分子で修飾しておけば、膜電位を印加している限りポア内に留まり、電流を阻害し続ける (下図)。



膜電位を逆転させると、DNA 分子はポアから排出され、溶液中に拡散するので、蛍光輝点は消失、電流はもとの大きさに戻る。

ここで示したのは、非生理的なチャネルと DNA との相互作用という特殊な例であるが、技術的には生理的チャネルとリガンド間の測定も同様に可能であり、チャネル-リガンド相互作用の電気・光学同時1分子計測装置の開発に成功したと結論して良いであろう。

[1] Ide et al. (2002) *Single Molecules*, **3** (1), 33-42.

[2] Ide and Yanagida (1999) *BBRC*, **265** (2), 595-599.

業績紹介：磁気ビーズを用いて結合力の弱いレクチンを

穏和な条件でエンリッチする方法

戸谷希一郎

(成蹊大学理工学部・A03 公募研究代表者)

論文題目："Magnetic beads-assisted mild enrichment procedure for weak-binding lectins"

著者：Kiichiro Totani, Haruka Miyazawa, Shino Kurata, and Yukishige Ito

雑誌巻号：Anal. Biochem. **411**, 50-57 (2011)

レクチンは糖鎖結合能を有するタンパク質であり、免疫や感染、タンパク質の品質管理など多様な生体機能の調節に関わっている。それらのリガンド結合力は抗体と比較して1万分の1程度の強さであり、その結合力の弱さがレクチンの機能を見過ごす要因となっている。しかしながら生体内で結合解離を繰り返し、糖鎖を弱く認識しているレクチンは、その結合の可逆性ゆえに生体内の状況を鋭敏に反映して機能の on/off を行うことができる点に重要な意義をもつ。本論文ではこのように生体内での存在形態が揺らいでいる結合力の弱いレクチンを簡便に探索する手法の開発について述べている。

本研究は糖鎖リガンドを固定化した磁気ビーズとタンパク質混合液を作用させ、レクチンを糖鎖磁気ビーズ上に結合し回収するアフィニティービーズ法を改良したものである。例えば通常のバッチ式実験手法では、糖鎖磁気ビーズを磁石で沈降させた後にレクチン候補と夾雑タンパク質を選別するために、反応液の除去とバッファーによる洗浄を繰り返す。しかしながら多くのレクチンは、その結合力の弱さによって洗浄工程を繰り返すことで糖鎖磁気ビーズ上から解離し消失してしまう。我々は、レクチンは糖鎖と結合解離を繰り返し、糖鎖磁気ビーズ近傍に広く分布しているものと考えた。そこで洗浄の際に上澄みを半量程度残し、結合解離のスペースを確保する工夫を施したマイルドエンリッチ法を提案し、その有効性を検証した。

まず蛍光レクチンと糖鎖磁気ビーズを用いたモデル実験でレクチンの分布を確認したところ、レクチンは予想通り糖鎖磁気ビーズ周辺に広がって存在している

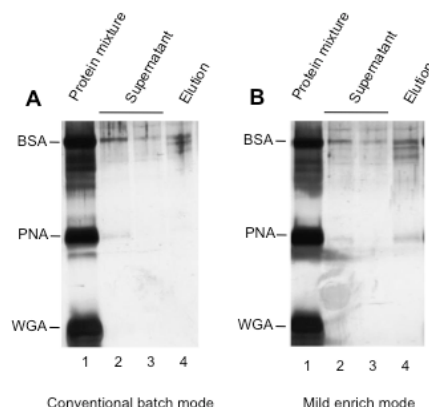


図1. タンパク質混合液からのレクチン選別

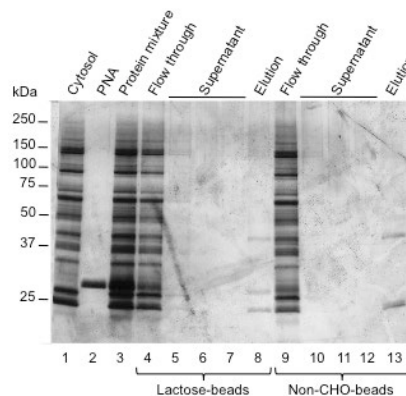


図2. 生体抽出液からのレクチン選別

ことが分かった。ついで磁気ビーズ回収法として磁力と遠心力の比較、洗浄法として上澄み除去量の比較を行い、最適エンリッチ条件を定めたのち、レクチン選別のモデル実験を行った。例えばピーナツレクチン (PNA) とウシ血清アルブミン (BSA)、小麦胚芽レクチン (WGA) を混合し、PNA と $K_d \sim 10^{-3}$ M オーダーで弱く結合するラクトース固定化磁気ビーズを用いて選別実験を行ったところ、従来のバッチ法では溶出画分にPNAをエンリッチできず、マイルドエンリッチ法ではこれが可能であることが示された (図1)。また、本手法は複雑な組成の生体抽出液からのレクチン選別においても有効であることが分かった (図2)。

本研究によってレクチンのリガンド周辺におけるブロードな分布が明らかとなり、この揺らぎを加味した簡便なレクチン選別法の有効性が実証された。

シンポジウム報告

Intrinsically Disordered Regions in Proteins and Related Topics

January 31, 2011 at Ritsumeikan University, Kyoto

北原 亮

(立命館大学薬学部・A01 公募研究代表者)

1月31日に立命館大学のびわこ・くさつキャンパスにて蛋白質の天然変性領域に関連したシンポジウムが開催された。演者は、Keith Dunker (インディアナ大)、Peter Tompa (ハンガリーアカデミーバイオロジカルリサーチセンター)、西川建 (前橋工科大、立命館大学客員教授)、太田元規 (名古屋大)、福地佐斗志 (国立遺伝研)、西川郁子 (立命館大学)、本間桂一 (国立遺伝研)、菊地武司 (立命館大学)、筆者 (立命館大学) である。

天然変性蛋白質 (IDPs) と変性領域 (IDRs) は、近年その機能的意義に注目が集まり立体構造と物性に関する研究も進んでいる。本シンポジウムでは、データベースに基づく統計解析や NMR を含む分光学解析について発表があった。Dunker は、データベースに基づく統計解析についてこれまで得られている様々な知見を専門外の聴衆にも分かりやすく紹介された。例えば、真核生物では原核生物より 2 倍程度 IDPs や IDRs が多いことや、p53 を例に IDRs の標的蛋白質や folding の多様性について言及された。真核生物と原核生物での IDRs の比較については、福地がさらに詳細な解析を報告した。真核生物、特にヒトでは 30~300 アミノ酸程度までの比較的長い IDPs/IDRs が存在すること、隣接する領域の立体構造とは明確な相関はないが DNA 結合蛋白質など比較的小さな蛋白質ではその構造ドメイン (SCOP 分類に基づく) 前後で高確率に IDRs が存在することを報告した[1]。西川郁子は、膜蛋白質の細胞外領域や細胞外蛋白質について O 結合型糖鎖付加は IDRs で生じている確率が高く、特にクラスター型の糖鎖付加について 90%以上が IDRs で生じていることを指摘した。このような傾向は N 結合型では見られない。IDRs に付加された糖鎖の役割は、酵素による分解の抑制や親水性の向上、相互作用の制御など考えられる。

Tompa は、植物由来蛋白質 ERD14 について分光学的研究に加え詳細な NMR 解析について報告した。ERD14 は dehydrin ファミリーに分類され脱水ストレス

の応答として誘導発現される蛋白質で Ser や Lys リッチな領域をもつ。蛋白質の熱変性に伴う凝集阻害やリン脂質膜との相互作用が報告され、シャペロンとしての分子機能が提案されている。TROSY-HSQC スペクトルや ^{15}N スピン緩和解析から高度に変性した IDP であることが示された。しかし 2 次構造を反映する $\text{C}\alpha$ と $\text{H}\alpha$ の化学シフト値による CSI 解析 (Chemical Shift Index 解析) では、幾つかの部分について α ヘリックス構造が残存していることが示唆された。さらに大腸菌発現系を用いた in cell NMR 測定により、in vitro と in cell 条件でのスペクトル変化を比較した。興味深いことに残存構造が示唆された領域の信号は、in cell で消失 (或いは著しく広幅化) する結果となり、残存構造部位で標的分子との相互作用が示唆された。IDPs/IDRs による標的との coupled folding のメカニズムについてはまだ各論的であるが本領域の片岡や菅瀬、新井らの研究成果も注目である。

筆者は、ライム病の感染に必須でありワクチンにも使用された OspA 蛋白質について、高圧力 NMR 法による局所変性構造の解析結果を報告した。OspA の局所変性構造は 257 残基中の C 末端側 160 残基ほどが高度に変性した状態であり、生理条件下の存在率は 0.001%以下であることを示した。この変性領域には標的レセプターの結合部位が含まれることから、局所変性構造は遠方のレセプター認識に有効に働くこと、分布率が低くプロテアーゼによる加水分解を受けにくいことを示唆し、局所変性構造が構造と安定性の観点で合理的デザインになっていると論じた。また IDPs/IDRs に分類されないいわゆる球状タンパク質における変性状態・局所変性状態の構造と機能の重要性も強調した。

変性状態や部分変性領域は、一部の蛋白質の特異な状態ではなく球状蛋白質を含む全ての蛋白質について定常的に存在する状態であり、残存構造や機能的意義に興味をわく。

参考文献

[1] Minezaki Y, Homma K, Kinjo AR, Nishikawa K., *J Mol Biol.* **359**, 1137-49 (2006)

シンポジウム報告

Berkeley Mini Statistical Mechanics Meeting

January 14-16, 2011 at University of California, Berkeley

米谷佳晃

(原子力機構・A03 公募研究代表者)

1月14日から16日の3日間、カリフォルニア大学バークレー校で開催された「Berkeley Mini Statistical Mechanics Meeting」に参加した。今回初めて参加したが、毎年1月にDavid Chandler博士により開催され、今年で12回目とのことである。これまでの様子はホームページ[1]に記録があり、分子シミュレーションや統計力学の著名な研究者が講演しているのがわかる。実際にいってみると300人ほどの参加者があり、カリフォルニア州を中心にアメリカの研究者がたくさん参加していた。原子・分子系、生体系の統計力学が主題で、結晶化、自由エネルギー、一分子測定、非平衡、相転移、自己組織化、ゲノム、細胞の生物学など広範囲の話題がとりあげられている。

筆者は、分子シミュレーション研究をしていることもあり、レアイベントや自由エネルギー計算の話題が充実しているように感じた。Peter Bolhuis博士は、結晶化シミュレーションにおける反応座標をどのように選ぶべきかという問題について講演した。反応座標の選択は、結晶化の他にも、タンパク質の構造転移など様々なイベントを記述したり、自由エネルギー変化を計算する際に直面する問題である。今後そのような問題がますます重視されてくるように感じた。

昨年12月に「揺らぎと生体機能」シンポジウムで来日したGerhard Hummer博士の講演もあった。「揺らぎと生体機能」のときとは違う内容で、Jarzynski等式をベースに自由エネルギープロファイルを計算する方法について話した。その方法を利用すると、一分子測定でタンパク質を変形させた際のデータから自由エネルギー変化を計算できるということであった。

生体高分子については、粗視化モデルを使ったシミュレーションを行い、相図を導く流れのものが多く、ウィルスカプシド蛋白質、膜、液晶、DNAの自己組織化などが対象に挙げられていた。

他に熱力学の関係式と情報理論、機械学習との関係

やゲノム、細胞の生物学を対象にした研究もあった。ゲノムと表現型を関係づけたり(Joel Bader博士)、遺伝子発現の制御機構を解析する(Rob Phillips博士)など、見た目が異なっているが、原子・分子系と同じように統計力学的にアプローチしている様子は新鮮に感じた。様々な対象を統計力学を軸に見ていこうとする意図が、会議構成から感じとられ、大いに刺激になった。

夜にはポスターセッションがあり、筆者はDNAの水和水ダイナミクスについて発表した。ポスターセッションは2日間あり、他に生体高分子の粗視化モデル、陰的溶媒モデル、疎水性水和、水の相平衡など興味深い研究がたくさんあった。夜10時頃まで続き、参加者のモチベーションも非常に高かった。

閉会後に、会議でお会いした九州大学の秋山さん、川島さんとバークレー市内を散策し、カリフォルニアワインを買って帰った。充実した3日間であった。



会場の UC Berkeley

[1] http://gold.cchem.berkeley.edu/statmech/Mini_Stat_Mech_Conference/Home.html