

業績紹介：非天然構造を持つ折りたたみ中間体の役割の研究

櫻井一正

(大阪大学蛋白質研究所・A01 公募研究代表者)

論文題目："A circumventing role for the non-native intermediate in the folding of β -lactoglobulin"

著者：Kazumasa Sakurai, Shunsuke Fujioka, Tsuyoshi Konuma, Masanori Yagi, and Yuji Goto

雑誌巻号：Biochemistry 50, 6498-6507 (2011)

タンパク質の中には、その折り畳み反応中に非天然の構造を持った中間体が見られるものがある。ウシ β ラクトグロブリン (β LG) も折り畳み初期に非天然 α ヘリックス構造を持った中間体が現れることが知られている。しかしシンプルな郷モデルでは、このような非天然構造の中間体の意義を説明することが難しい。そこで、私たちは変異を導入することでこの中間体の構造を変化させ、それにより折り畳み反応がどのように変化するかを調べることで、非天然中間体の意義を調べることを目指した。

β LG は主に β シートから成るタンパク質だが、アミノ酸配列の二次構造予測からは N 末端側で α 構造が好まれることがわかり、この性質が非天然構造形成の駆動力となっていると考えられる。そこで我々は、この N 末端領域で α 構造的性及び β 構造的性を上昇させるような変異（それぞれ G17E、E44L）を導入した。大腸菌で発現させ、中間体構造の二次構造含量を CD スペクトルから見積もったところ、G17E と E44L ではそれぞれ α 構造、 β 構造が増えており、意図した構造の変化を与えられたことが確認できた。

これらの変異体の折り畳みのキネティクスを観測したところ以下のような結果を得た。まず G17E は、中間体形成相の速度に変化はなかったが、著しく天然構造が不安定化しており、折り畳み反応条件下では天然構造に到達しなかった。一方 E44L では、天然状態と同程度の β 構造が中間体形成相で形成されるものの、天然構造形成相は野生型に比べ 10 倍ほど遅くなっていることが分かった。

これらの結果から考えられることは、非天然 α ヘリックス構造形成は、以降に続く天然構造形成をスムーズに進行させる効果があるということである。も

ともと提案されていた β LG の折り畳み過程は、初期段階でまず C 末端側の β 構造が形成し、続く相で N 末端側の β 構造が形成するというものである(図 B)[1]。ここで、C 末端側と N 末端側で β シートが同時に形成すると間違った組み合わせでの β シート水素結合や側鎖パッキングが起り、天然状態に至るまで時間がかかるのではないかと考えられる(図 C)。N 末端側の α ヘリックス形成能は、C 末端側で β シートを形成している間、N 末端側でのシート形成を抑え、いわば交通整理のように C 末端側と N 末端側の β シート形成を時間差で起こさせる効果があると考えられる。

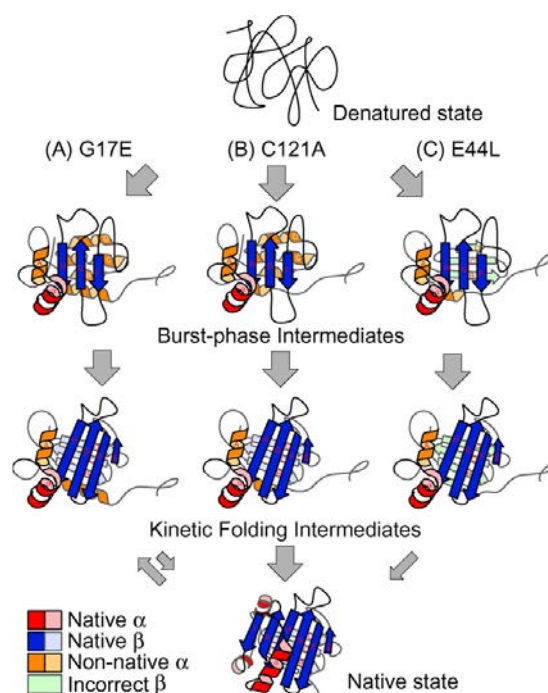


図. 考えられる擬野生型と変異体 β LG の折り畳み過程

今後筆者はこの折り畳み中間体状態に着目し、各変異体の中間体の残余構造やダイナミクスを NMR を用い残基レベルで調べる予定である。そして中間体の性質と、とられる折り畳み経路の間にどのような関連性があるのかを調べていきたいと考えている。

参考文献

[1] K. Kuwata et al., Nat. Struct. Biol. 8, 151-155 (2001).

業績紹介：ジヒドロ葉酸還元酵素はマイクロ秒時間域においてサブドメインごとにフォールディングする

新井宗仁

(東京大学総合文化・A02 公募研究代表者)

論文題目："Microsecond subdomain folding in dihydrofolate reductase"

著者：Munehito Arai, Masahiro Iwakura, C. Robert Matthews, and Osman Bilsel

雑誌巻号：J. Mol. Biol. 410, 329-342 (2011)

球状蛋白質のフォールディング反応過程は、酵素などが機能を発現するために必須のグローバルな揺らぎである。100 残基以下の小さな蛋白質のフォールディング機構は明らかになりつつあるが、サブドメインを複数持つ大きな蛋白質のフォールディング反応機構の詳細は未解明である。特に、反応開始後から数ミリ秒以内に起きるプロセスの計測はチャレンジングである。

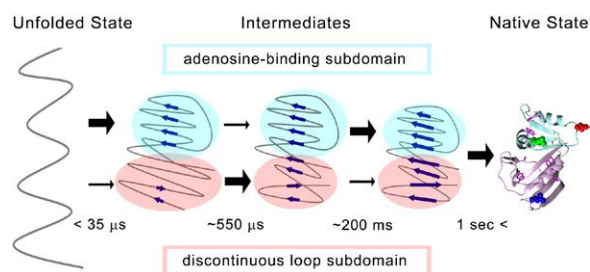
ジヒドロ葉酸還元酵素 (DHFR) は 159 残基の α/β 型蛋白質であり、ループサブドメイン (DLD) とアデノシン結合サブドメイン (ABD) の2つの領域からなる (図)。これまでに我々は、連続フローX線溶液散乱法により、フォールディング反応開始後300 μ s以内に、DHFR がコンパクトで球状の中間体を形成することを明らかにしている[1]。今回、時間・空間分解能を更に向上させ、各サブドメインがマイクロ秒時間域でどのようにフォールディングするのかを明らかにするために、連続フロー高速反応開始法とトリプトファンの蛍光寿命測定を組み合わせた実験を行った。この手法は、フォールディング反応軸上の各時間 (μ s オーダー) において、トリプトファンの蛍光寿命 (ns オーダー) を測定するという double kinetics の測定である。蛍光寿命は時間相関単一光子計測 (TCSPC) 法で測定した。これにより、35 μ s の dead time で、DHFR のフォールディング反応に伴うトリプトファン蛍光寿命の変化を追跡することができた。その結果、550 μ s の緩和時間で、トリプトファンが溶媒から隔離されて蛋白質分子中に埋もれる様子が観測された。

また、DHFR の DLD もしくは ABD にアクセプター IAEDANS を導入した変異体を作成し、トリプトファンから IAEDANS への蛍光エネルギー移動 (FRET) を

蛍光寿命から求めることにより、DHFR のフォールディング反応に伴う Trp-IAEDANS 間距離の変化を測定した。その結果、フォールディング開始後 35 μ s において、ABD はコンパクトな構造を形成するのに対し、DLD は広がったままだった。その後、550 μ s の緩和時間で DLD がコンパクト化する過程が観測された。

以上の結果から、DHFR のフォールディング反応機構は次のモデルで説明できる (図)。まず、35 μ s 以内に ABD がコンパクトになり、次いで 550 μ s で DLD がコンパクト化して、モルテン・グロビュール状の中間体を形成する。その後、200 ms のフェーズで ABD が更に構造化したあと、1 ~ 100 sec のフェーズでサブドメイン間のドッキングが起きて天然構造に至る。このように、DHFR は、サブドメインごとにフォールディングしていく。

DLD は N 末端側と C 末端側の領域が集まって形成されるのに対し、ABD は連続的につながった領域からなる。連続した領域のほうが先に構造形成するという事実は、鎖のエントロピーがフォールディング反応における活性化障壁であることを示唆する。これは、小さい蛋白質のフォールディングにおける活性化障壁が鎖のエントロピーであること (コンタクト・オーダーが小さいほどフォールディング速度が速いこと) と共通した特徴である。



図： DHFR はサブドメインごとにフォールディングしていく (太矢印の過程で各サブドメインが構造形成)。

参考文献

[1] M. Arai et al., J. Mol. Biol. 368, 219-229 (2007).

業績紹介：新規ハイブリッドリポソーム (DMPC/DHA) のヒト大腸がん肝転移モデルマウスに対する治療効果

上岡龍一

(崇城大応用生命科学・A03 計画研究代表者)

論文題目："Therapeutic effects of hybrid liposomes composed of phosphatidylcholine and docosahexaenoic acid on the hepatic metastasis of colon carcinoma along with apoptosis *in vivo*"

著者：Hideaki Ichihara, Keiko Zako, Yuji Komizu, Koichi Goto, Ryuichi Ueoka

雑誌巻号：Biol. Pharm. Bull., 34, 901-905 (2011).

ドコサヘキサエン酸(DHA)は、炭素数が 22、不飽和結合が 6 の n-3 系の直鎖の多価不飽和脂肪酸で、エイコサペンタエン酸(EPA)と同様、主に魚油に含まれる必須脂肪酸の一つである。最近、DHA や EPA などの長鎖不飽和脂肪酸を日常的に摂取することで、動脈硬化予防、抗アレルギー、発がん抑制などの報告があり、注目が集まっている。

一方、筆者らが創製したハイブリッドリポソーム (HL)は[1]、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、リン脂質(DMPC)および DHA からなる新規の HL(50mol%DMPC/50mol%DHA)を用い、ヒト大腸がん細胞(HCT116)細胞の肝転移モデルマウスに対する治療効果について *in vivo* で検討した。以下に得られた興味深い知見を示す。

① 新規 HL(DMPC/DHA)は、膜直径 100 nm 以下で 1 カ月以上安定であり、生体内投与した際に最適なサイズで、臨床応用に適していることが明らかになった。

② 新規 HL(DMPC/DHA)の大腸がん肝転移モデルマウスに対する *in vivo* における治療効果を検討した。臓器重量および肝臓剖検において、未治療のコントロールにおいては、大腸がん細胞の肝転移部における腫瘍増加が、剖検および臓器重量において確認された。一方、新規 HL(DMPC/DHA)治療群では、がん細胞を移植していない正常マウスと同様の状態の肝臓まで回復する顕著な治療効果が確認された (図 1)。

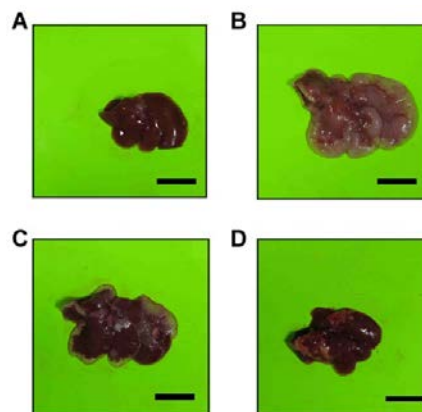


図 1 新規 HL(50mol%DMPC/50mol%DHA)の大腸がん肝転移モデルマウスに対する治療効果
A: 正常マウス, B: 未治療群, C: DMPC 治療群, D: 新規 HL(50mol%DMPC/50mol%DHA)治療群

③ 新規 HL(DMPC/DHA)の大腸がん肝転移モデルマウスに対する *in vivo* における治療効果を HE 染色および Oil Red 染色により組織学的に検討した。未治療のコントロールにおいては、大腸がん細胞の腫瘍の増大と肝機能低下による肝臓内への脂肪の蓄積が確認された。一方、新規 HL(DMPC/DHA)治療群では、転移病巣の縮小がみられるとともに、脂質代謝が回復する肝機能の著しい回復が確認された。

④ 肝臓切片を TUNEL 染色し、アポトーシス誘導メカニズムを検討したところ、新規 HL(DMPC/DHA)治療群は、アポトーシス誘導により治療効果を示すことが明らかになった。

⑤ 大腸がんの肝転移モデルマウスに対する新規 HL(DMPC/DHA)の延命効果を検討した。未治療のコントロール群の平均生存日数は、27.0 日であるのに対し、新規 HL(DMPC/DHA)治療群では、37.2 日 ($p < 0.01$)であり、顕著な延命効果が確認できた。

以上のように、HCT116 細胞の肝転移モデルマウスに対して、新規 HL(DMPC/DHA)による顕著な治療効果が *in vivo* において確認された。将来、ヒト大腸がんに対する新しい化学療法として、臨床応用が期待できる。

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] H. Ichihara et al., Int. J. Pharm., 394, 174-178 (2010). [4] H. Nagami et al., Int. J. Pharm., 315, 167-172 (2006). [5] H. Ichihara et al., Anticancer Res., 28, 1187-1196 (2008).

業績紹介：ハイブリッドリポソームの再生医療分野への応用に関する基礎研究

松下 琢

(崇城大応用生命科学・班友)

上岡龍一

(崇城大応用生命科学・A03 計画研究代表者)

論文題目："ハイブリッドリポソームを用いた形質転換肝幹細胞の選択的排除に関する基礎研究"

著者：押方 歩, 宮崎龍介, 松下 琢, 上岡龍一

雑誌巻号：YAKUGAKU ZASSHI. 131, 757-763 (2011)

現在、iPS 細胞や ES 細胞、各種臓器幹細胞を利用した再生医療が、新しい医療として大変注目されている。これらの幹細胞を細胞移植治療に応用する際には、生体外で種々の方法で目的の細胞へ分化誘導したのちに移植するということが一般的に考えられる。しかし、この際に、未分化な細胞や、形質転換を引き起こした細胞が混入した場合、細胞移植後に異常増殖して、腫瘍を形成するリスクがある。これを未然に防ぐためには、腫瘍を形成する可能性がある細胞を、事前に選択的に排除する方法が重要であり、幹細胞を用いた再生医療を安全な医療技術とするためには、これらの確立が必要となってくる。

一方、これまで、我々は、肝幹細胞の一種である肝芽細胞に着目し、未分化の細胞集団である正常ヒト胎児肝細胞から、肝芽細胞を効率よく誘導する条件の検討を行ってきた¹⁾。その結果、酪酸ナトリウム(Sodium Butyrate; SB)が、肝芽細胞の有効な誘導剤になることを発見した¹⁾。しかしその際、SB 濃度依存的に、肝腫瘍マーカーである異常プロトロンビン(PIVKA-II)の分泌量が増大することも同時に見出した。また、軟寒天中でもコロニーが形成されたことから、肝芽細胞の培養中に、腫瘍原性を有する形質転換幹細胞が出現することが示唆された(図参照)。

上岡らが開発したハイブリッドリポソーム(HL)は、リン脂質などのベシクル分子とミセル界面活性剤を緩衝溶液中で超音波照射することで容易に得られ、膜直径、膜流動性などのコントロールが可能な生体適合性に優れた医用素材である。これまでの本ニュースレターでも紹介されてきたように、HLは、*in vitro*及び*in vivo*において各種がん細胞に対して増殖抑制効果を示し、アポトーシスを誘導することも明らかになっており、臨床応用も進んでいる。このようなHLの特徴の一つは、正常細胞とがん細胞の膜流動性の違いを認識し、がん

細胞だけに選択的に蓄積することによって、がん細胞にアポトーシスを誘導することである²⁾。

そこで、本研究では、幹細胞の安全な培養技術の確立を目標に、この HL の正常細胞とがん細胞の高い選択性に着目し、ヒト胎児肝細胞から肝芽細胞を誘導する際に出現する形質転換細胞を、HL を用いて選択的に除去することを試みた。その結果、この肝芽細胞の誘導時に、0.33mM のハイブリッドリポソーム(HL23)を 96 時間処理することによって、PIVKA-II 産出速度が減少するとともに、軟寒天中でのコロニー形成数も大幅に減少した(図参照)。どちらの形質転換の指標も、SB 無処理のコントロール細胞よりも低い値となり、HL23 による形質転換細胞の選択的除去がなされたことが示唆された。

現在、iPS 細胞の安全性の確保に向けた研究として、iPS 細胞の導入因子の検討や、ベクターの改良など、様々な試みがなされている。本研究は、その中で、これらの細胞の生体外での培養中に出現する形質転換細胞を、HL23 を培養液中に添加することによって、選択的かつ積極的に除去できる可能性を示したものであり、幹細胞の品質保証、安全性確保の方法の一つとして、その利用が大いに期待されるものである。

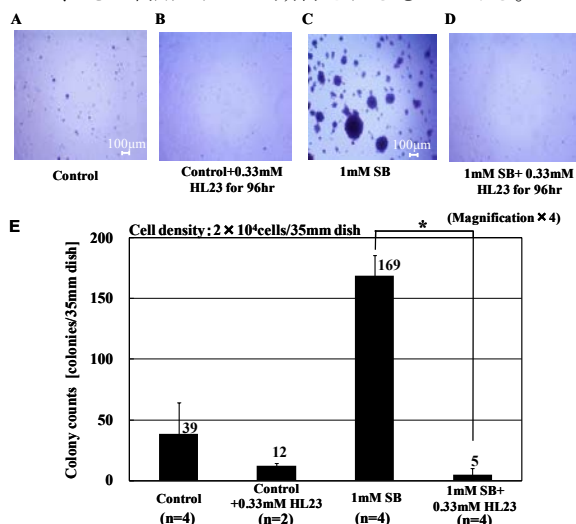


図 軟寒天中で形成されたコロニー数(腫瘍原性試験)

A: contol, B: control+HL23, C: 誘導された肝幹細胞、
D: 誘導された肝幹細胞+HL23、E: 各コロニー数
参考文献

[1] A.Kiyota et al., *Biol.Pharm.Bull.*, **30**, 2308-11 (2007).

[2] K.Nakano et al., *Bioorg.Med.Chem.Lett.*, **12**, 3251-54 (2002).

業績紹介：ハイブリッドリポソームのヒト成人T細胞白血病細胞に対するアポトーシス誘導

上岡龍一

(崇城大応用生命科学・A03 計画研究代表者)

岡田誠治

(熊本大エイズ研究センター・A03 公募研究代表者)

論文題目：“Selective accumulation of hybrid liposomes into adult T-cell leukemia cells along with induction of apoptosis”

著者：Yuji Komizu, Mamiko Yukihiro, Ryushou Kariya, Koichi Goto, Seiji Okada, Ryuichi Ueoka

雑誌巻号：Bioorg. Med. Chem. Lett., **21**, 3962-3965 (2011).

成人T細胞白血病(adult T-cell leukemia, ATL)は、HTLV-I (ヒトT細胞白血病ウイルスI型)の感染が原因となるT細胞の悪性腫瘍疾患であり、日本の九州地方やカリブ海沿岸諸国で多発している。HTLV-I感染者の大多数は無症候であるが、ごく一部がATLを発症する。そのため、ATL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。

ハイブリッドリポソーム(HL)[1]は、リン脂質とミセル系界面活性剤を緩衝水溶液中で超音波処理することにより調製でき、HL自身がアポトーシス誘導型の制がん効果を示すこと、その制がんメカニズムに“HLの揺らぎ(流動性)”や“がん細胞膜の揺らぎ”が重要であることを報告している[2, 3]。

本研究では、リン脂質(DMPC)およびPEG系界面活性剤C₁₂(EO)_nからなるハイブリッドリポソーム(HL-n; n = 21, 23, 25)を用い、HL-nのATLに対する*in vitro*での増殖抑制およびアポトーシス誘導について検討した。

まず、HL-nの増殖抑制に関し、HL-21は、ATL細胞株(MT-2, MT-4)に対して、最も効果的に細胞増殖を抑えることを*in vitro*で明らかにした。

次に、ATLの細胞死を形態学的・生化学的に検証したところ、HL-nは、ATL細胞に対して、カスパーゼ-3活性を経てアポトーシスを誘導することを明らかにした(図1A)。

さらに、ATL細胞に対するHLの融合蓄積について

検討した。蛍光脂質含有HL-21を調製し、ATL細胞に加え、FACSにより細胞あたりの蛍光強度を検出した。その結果、HL-21処理したATL細胞に蛍光蓄積量の増大が観測され、正常末梢血単核球(PBMCs)にはほとんど蓄積しなかった。興味深いことに、HL-21の融合蓄積量と細胞膜の流動性との間に良好な相関性を示し(図1B)、“膜の揺らぎ(流動性)”が大きな細胞ほど、HL-21の蛍光蓄積が増大することが分かった。

以上の結果より、HL-21は、揺らぎの大きなATL細胞膜に対して、特異的に融合蓄積し、アポトーシスを誘導することを初めて明らかにした。今後、ATL細胞を移植した免疫不全マウスに対するHLの治療効果を検討する予定である。

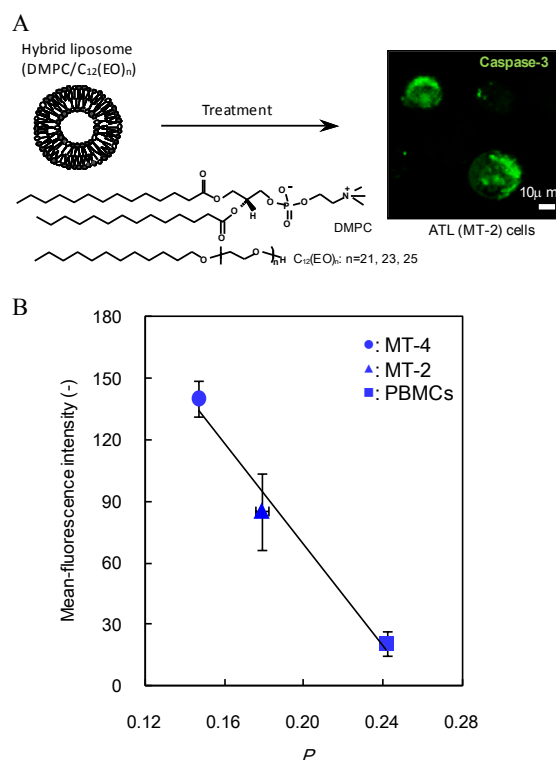


図1 HLのATL細胞に対する増殖抑制メカニズム
A) HLのATL細胞に対するアポトーシス誘導の蛍光顕微鏡観察、B) HLの融合蓄積量(Mean-fluorescence intensity)と膜流動性(P)との相関性。

参考文献

- [1] R. Ueoka et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **110**, 1588-1595 (1988).
- [2] Y. Komizu et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **16**, 6131-6134 (2006).
- [3] Y. Komizu et al., *ACS. Med. Chem. Lett.*, **2**, 275-279 (2011).

業績紹介：シャペロニン GroEL への MgATP^{2-} 結合 2 分子過程の分析

桑島邦博

(岡崎統合バイオサイエンスセンター・A03
計画研究代表者)

論文題目: "Dissecting a Bimolecular Process of MgATP^{2-} Binding to the Chaperonin GroEL"

著者: J. Chen, K. Makabe, T. Nakamura, T. Inobe, and K. Kuwajima

雑誌巻号: *J. Mol. Biol.* **410**, 341-356 (2011).

大腸菌由来シャペロニン GroEL は二つの 7 量体リングが背中合わせに重なった 14 量体の蛋白質超分子複合体である。ATP 依存的な、基質蛋白質やコシャペロニン GroES への結合力の調節はシャペロン機能の発現に必須であり、この調節は協同的なアロステリック転移によって起こる。GroEL のアロステリック転移についてはこれまでも平衡論的および速度論的な研究が広く行われてきた。しかしながら、アロステリック転移に先立って起こる、 MgATP^{2-} が GroEL へ結合する最初の二分子過程については明確になっていなかった。

本研究では MgATP^{2-} の結合過程を GroEL 変異体 (Y485W) を用いて測定し、その詳細な解析を行った。 K^+ 非存在かつ 4–5°C ではアロステリック転移および、それに引き続く ATP の加水分解は停止している。この条件では純粋な MgATP^{2-} の結合過程のみが観察できる。トリプトファン蛍光によるストップフロー測定により、 MgATP^{2-} と GroEL の急速混合を行い、結合反応が非協同的な二分子過程であることが明らかになり ($k_{\text{on}} = 9.14 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, $k_{\text{off}} = 14.2 \text{ s}^{-1}$)、その結合定数は $K_b = 6.4 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ であった (図 1)。我々はまた、等温滴定型熱量計を用いて MgATP^{2-} の GroEL への結合等温線を測定し、 $K_b = 9.5 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ を得た (結合の化学量論比 6.6)。ストップフロー測定で得られた結合定数と等温滴定型熱量計を用いて得られた結合定数はよく一致していた。結合速度定数の温度依存性からアイリング・プロットを行い、活性化エンタルピーを求めたところ、14–16 kcal/mol であった。

以上の結果から、 MgATP^{2-} の GroEL への結合は非協同的な二分子過程で起こり、結合の活性化エンタル

ピーは拡散律速過程に期待される値 (~4 kcal/mol) よりも十分大きいことを見出した。結合反応はまず、 MgATP^{2-} と GroEL の遭遇複合体が素早く形成され、その後に高いエンタルピー障壁を越えると考えられる。GroEL の ATP 結合部位と遊離 MgATP^{2-} の周りには水と水が存在し、複合体の形成にともなって、これらが脱水和する必要がある。この脱水和過程において大きなエンタルピーコストが発生すると考えられる (図 2)。また、自由エネルギーおよび活性化自由エネルギーの K^+ 濃度依存性から Φ 値解析を行い、遷移状態では K^+ がまだ結合していないことも明らかとなった。

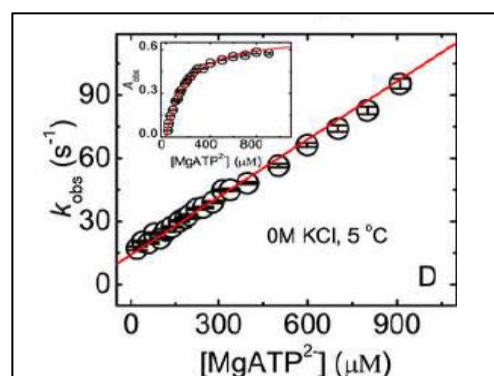


図 1 見かけの速度定数および蛍光強度変化量 (枠内) の MgATP^{2-} 濃度依存性。

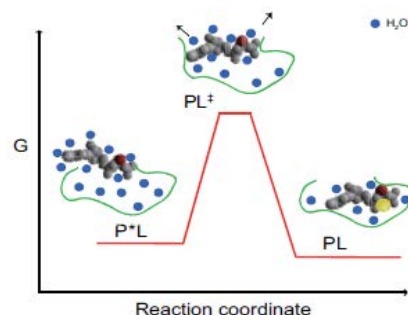


図 2 MgATP^{2-} の GroEL への結合過程の模式図。初めに形成された遭遇複合体 (P^*L) が高い活性化エンタルピーを持つ遷移状態 ($\text{PL}^\ddagger$) を経て最終複合体 (PL) を形成する。GroEL の結合部位を緑の線、ATP を灰色の実体球模型、 Mg^{2+} を赤い球、 K^+ を黄色い球で表した。

業績紹介：シャペロニンフォールディング反応の新規中間体の発見

元島史尋

(京都産業大・A03 公募研究代表者)

論文題目: "Polypeptide in the chaperonin cage partly protrudes out and then folds inside or escapes outside"

著者: Fumihiro Motojima and Masasuke Yoshida

雑誌巻号: *EMBO J.* 29, 4008-4019 (2010)

【概要】大腸菌の分子シャペロンの一つ、シャペロニン(GroEL/GroES)は変性タンパク質を空洞に閉じ込めてそのフォールディングを援助する。これまでシャペロニン空洞内部へのタンパク質の隔離がフォールディングの援助に重要だと考えられてきた。しかし、我々は空洞内の変性タンパク質は空洞内でフォールディングするが、空洞外への解離も同時に起こることを発見した。一連の結果から空洞内の変性タンパク質は native 構造を形成する直前まで GroEL と相互作用していることが示された。空洞内でのタンパク質とシャペロニンの結合がフォールディング援助に重要な役割を果たすことが示唆された。

【結果】我々は GroEL の変異体、single-ring D398A 変異体(SR398)による変性タンパク質(rhodanese)のフォールディングが、どの時点においても空洞の外から加えられた抗 rhodanese 抗体によって速やかにフォールディングが阻害されることを見いだした。また rhodanese の 15%は自発的に空洞の外へ遊離した後、自発的にフォールドしていることもわかった(図 1, O)。これらの結果から、空洞内の変性タンパク質は常に空洞外部に露出するほど変性した状態であることがわかった。

このような変性状態を維持するために、変性タンパク質がシャペロニンと結合していると予想された。実際、rhodanese は GroEL サブユニット同士の界面付近に導入したシステイン残基と効率よくジスルフィド結合を形成したことから、この領域に変性タンパク質が結合していると考えられた。

これらの結果は rhodanese だけでなく、マウス由来 DHFR, 藍藻由来 rubisco についても得られており、基質タンパク質によらないユニバーサルな事象であることを示している。

我々が提示した反応スキームを図 2 に示す。GroEL に結合した変性タンパク質は GroES と ATP の結合により形成された空洞内に閉じ込められる。変性タンパク質は空洞内で GroEL と相互作用するが、かなり自由に構造変化できると考えられる(D)。空洞内への解離は部分的な構造を保持した中間体(T)の形成に伴って起こると考えられる (in-cage release, 赤)。このような中間状態は速やかにネイティブ状態(N)を形成する (in-cage folding)。一方、空洞外に解離(natural escape, 水色)した変性タンパク質(E)は自発的フォールディングする(out-of-cage folding)。

このフレキシブルな新規中間体の形成によってシャペロニンによる効率的なフォールディングが可能になると予想されている。

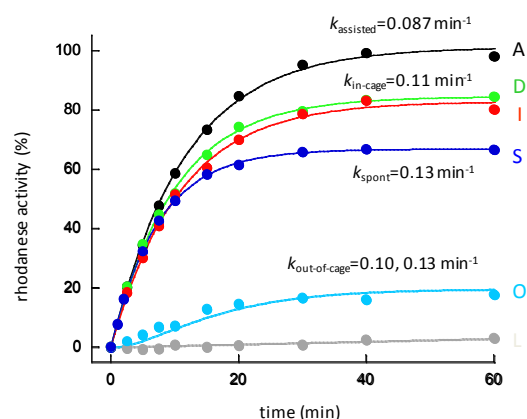


図 1. 空洞内フォールディング(D, I)と空洞外フォールディング(O)。

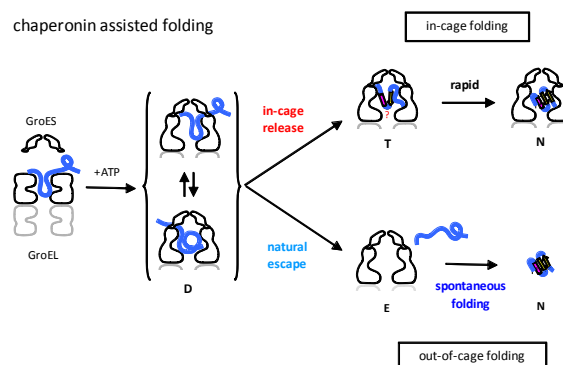


図 2. 新しいフォールディング反応モデル

「揺らぎと生体機能」平成 23 年度合同班会議報告

加藤晃一

(自然科学研究機構・A01 計画研究代表者)



新学術領域研究「揺らぎと生体機能」の平成 23 年度合同班会議が、平成 23 年 6 月 26 日（日）から 29 日（水）の日程で、北海道夕張市のゆうぱりホテルシューパーロにおいて開催された。本会議には、本

年度から新たに加わった公募班員を含む A01～A03 の計画・公募研究の研究代表者 43 名、評価委員の北川禎三先生、榎 茂好先生、中原 勝先生に加え、岸本直樹学術調査官、8 名の班友、さらに各研究グループに所属する研究員・大学院生・学部学生 37 名の参加を得て、総計 92 名の参加者が一堂に会した。

かつては炭鉱都市として盛え、現在はメロンの産地として名高い夕張市は、千歳空港から自動車ですら 1 時間ほどで、班会議の会場は「ゆうぱり国際ファンタスティック映画祭」の会場としても知られている。参加者の多くは 26 日午後に空港からの送迎バスで会場に到着し、4 日間にわたる班会議の幕は開いた。

研究発表に先駆けて、寺嶋領域代表より挨拶があり、新たなメンバーに向けて本学術領域の理念と目標が述べられ、これまでの活動・成果の総括と今後のさらなる発展に向けた方針が説明された。引き続き研究発表では、班員・班友がこれまでの研究成果と今後の研究計画を続々と披露された。発表内容の紹介は、櫻井先生、寺内先生、竹内先生による報告記事に譲るが、研究レベルは確実に向上しているという感想をいずれの評価委員の先生方からもいただき、また「揺らぎ」という漠たる概念にまつわる研究の成果が、本領域の中で明確な方向性をもって結実しつつあるという声も聞かれた。

熱心な発表と質疑はともすれば所定の発表時間（班員 20 分間、班友 15 分間）の中では収まらず、コーヒーブレイクや夜の自由討論の場でも熱い討論が繰り広げられた。今回の班会議では特に学生を含む若手の活発な議論が目立った。自由討論の会場で、若手同士が、あるいは老若男女が車座になって夜遅くまで議論を繰り広げるということが班会議の大きな醍醐味であろう。

次世代の科学を担う若手が、本班会議への参加を通じて、異分野間での人的交流を深め、先端的な生命分子科学に新しい息吹を吹き込む光景を目の当たりできたことは、世話人として何ものにも勝る大きな喜びであった。

最後に、遠路にもかかわらず本班会議に参加された皆様、会議の準備と運営のお手伝いをいただいた事務局の藤澤さんならびに会場スタッフの皆様に感謝申し上げます。



会議風景。92 名が参加し、4 日間にわたって研究発表が行われた。

櫻井一正

(大阪大学蛋白質研究所・A01 公募研究代表者)



平成 23 年 6 月 26 日から 6 月 29 日まで行われた新学術領域揺らぎと生体機能の班会議に参加した。会議場所は北海道夕張市のホテルシューパーロで（そもそも夕張の語源は鉱泉のわき出るところ

という意味のアイヌ語のユーパロで、シューパーロとはそれに、「源の」と言う意味である「シ」をつけた「シ・ユーパロ」からきており、夕張川の本流という意味らしい）、新千歳空港からバスで一時間ほどの、広大な畑の地帯を抜けた谷あいにあつた。夕張の町は、その知名度とは対照的にとても小さく静かな環境であつた。そのため集中的に各班員の発表を聞き、お互いに議論し合い、親睦を深めることができた。

今年度からの本学術新領域の構成員の全体的な印象として、分光法やその他の手法で“揺らぎ”の検出を

行っている研究者、計算機科学の研究者、膜の物性や治療への応用に携わっている研究者などが含まれており、分野が多岐に渡っているものの、お互いの分野が相補的に関連しており、多くの共同研究が期待されるバランスのとれた構成のように感じた。

私の参画している A01 班の班員と同時時間帯の班友の方の発表内容についてももう少し詳細に述べたい。A01 班の構成員は京大の寺島領域代表を班長とした 16 名であり「揺らぎ検出」というグループ名の通り、独自の揺らぎ検出の方法を確立、発展されている実験家と、コンピュータシミュレーションによって蛋白質の揺らぎの挙動を再現、理解しようとしている計算機科学者が参画した。

実験家のメンバーの発表を私なりの観点で 3 つのグループに分けてご紹介したい。第一のグループとして独自の計測法とデータの解析法を確立されている先生方である。簡単にテーマを列挙させていただくと、寺島先生の Transient Grating による構造変化に伴う熱力学パラメータの解析、林先生(東北大)による外力場存在下での F_1 -ATP 運動における Giant acceleration 現象の解析、石井先生(理研)によるヘアピン DNA の FRET 観察データの二次元蛍光寿命相関計測、関口先生(東大)による II 型シャペロニン分子の X 線一分子追跡法(DXT)によるねじれ運動の解析、高橋先生(東北大)の一分子蛍光観測による蛋白質分子構造変化と並進拡散の相関解析、松下先生(崇城大)の FRET や蛍光寿命測定によるテロメア構造の解析、今元先生(京大)の変異 SH 基の赤外吸収をプローブとしたロドプシン暗状態／中間状態間の構造変化の検出、川上先生(北陸先端大)の原子間力顕微鏡による一分子力学応答の観測というものであった。これらの先生方の研究は、検出方法の独自性が高いだけでなく、得られたデータの解析法にも独自の工夫があり、その様々な視点からの解釈をわくわくしながら聞かせて頂いた。

第二のグループとして NMR により残基レベルでのコンフォメーション変化やダイナミクスを研究している方が挙げられる。加藤先生(統合バイオ)によるユビキチンダイマーの異なる会合状態の解析と中性子小角散乱によるプロテアソーム α サブユニットの交換反応、北原先生(立命館)の NEDD8 の高圧条件下に見られる N_1 - N_2 状態間の構造変化の解析、櫻井(阪大)による $\beta 2$ ミクログロブリンのアミロイド線維形成前駆状態構造と形成機構の解析、西村先生(帝京平成大)による pH パ

ルス重水素交換を用いた変異体アポミオグロブリンのフォールディング中間体構造の解析とがあった。A02 班、A03 班にも NMR を用いた研究をされている方が多かったが、どの方も NMR の様々な手法を駆使して蛋白質の構造変化を詳細に研究されており、筆者も NMR を主に用いていることから、勉強になる部分が非常に多かった。

第三のグループは、膜分子の熱力学や流動性を研究されている方のグループである。岩田先生(学習院大)のスチルベン分子を蛍光プローブとした時間分解分光法による脂質二重膜内の熱拡散の観察、笹原先生(神戸大)のアミロイド β 線維による脂質二重膜破壊の顕微鏡観察、山村先生(筑波大)の断熱型熱量計を用いた相変化に伴う膜分子のコンフォメーション変化の研究があった。私自身膜についての知識が乏しかったため、膜の研究法について非常に勉強になったとともに、A02、A03 班と発表を聞くに従って本領域での膜の研究が非常に重要な意義を占めていることを強く認識した。

計算機科学の分野からは以下の 4 名の先生方が参画された。高田先生(京大)の Fragment-based multiscale MD による p53 蛋白質の大振幅揺らぎの研究、岡本先生(名大)のレプリカ交換法やアンブレラサンプリング法の開発及び改良、北尾先生(東大)の独立部分空間解析を用いた複合体形成反応の自由エネルギー地形の計算法、佐藤先生(京大)の RISM 理論による溶媒効果を取り入れた炭酸脱水素酵素反応中心のシミュレーションが挙げられる。蛋白質という巨大な分子や、溶媒という多数の分子の揺らぎをどのように効率よく記述するか、そのアプローチの方法や改良のお話を興味深く聞かせて頂いた。また、一般的には実験の結果を計算機科学で再現するという共同研究が多いと感じるが、理論や計算で予想されるイベントが実験によって検出されることで証明されるという逆の方向の共同研究も生まれたら、領域内の共同研究網も更に広がるのではないかと感じた。

以上駆け足になってしまったが、参加された全ての研究者が自身の研究を熱く語り、多くのディスカッションがなされたということを少しでもお伝えしたい。加えて、本班会議には学生などの若い参加者が積極的に質問をしていたことが特に目につき、ベテランの先生方と若い方との交流も多いことが本班会議の良い雰囲気を生んでいたのではないかと感じた。

最後に、この様な素晴らしい議論の場を準備して下

さった加藤晃一先生や統合バイオの皆様には感謝いたしますと共に、本領域の発展に少しでも貢献できればと思います。



会議風景。熱心な質疑応答が繰り広げられた。

寺内一姫

(立命館大学生命科学部・A02 公募研究代表者)



本新学術領域の平成 23 年度合同班会議が、6 月 26 日から 29 日に夕張市で開催された。合同班会議としては 3 回目になるそうであるが、今年度より公募班として参加している筆者にとっては初めての班会議であった。本領域のほとんどの方と研究分野がずいぶん違っているためか、参加者の中に知り合いはほぼ皆無であった。会議の冒頭に挨拶された領域代表のお名前とお顔さえ知らないということに、会場に着いて初めて気づいた。新しい方々との出会いを楽しみに会議に臨んだ。ここでは、私が所属する A02 班の発表を中心とした簡単な報告と印象を述べさせていただく。

A02 班は、班会議 2 日目午後に、計画研究の片岡先生と芳坂先生および 5 名の公募研究代表者の発表があった。A02 班は揺らぎを制御する観点からの研究が中心となっており、また他の班より少人数での構成となっている。

班長である片岡先生（奈良先端大）は、蛍光性非天然アミノ酸導入した SNase の作製とその評価について報告された。無細胞翻訳系を用いて、非天然アミノ酸を導入したタンパクを精製し、FRET に用いることを検討されている。A02 班の芳坂先生との共同研究であり、本班の目標とする揺らぎの制御に迫る興味深い研究であった。

新井先生（東京大）は、ミュータノーム解析に基づく天然変性蛋白質の揺らぎ制御の研究を展開している。ミュータノーム解析という新しい概念を軸に、アミノ酸配列と揺らぎの相関関係を網羅的に解析しようという今後の発展が楽しみな研究である。

水口先生（富山大）は、天然変性蛋白質 PQBP-1 の揺らぎと機能解明を目指し、ターゲット分子である U5-15kD との結合状態について報告された。PQBP-1 は、精神遅滞に関わっている蛋白質であり、疾病と蛋白質の制御が結びつく可能性を秘めた研究を展開されている。

楯先生（広島大）は、天然変性蛋白質の過渡期な構造形成の制御について報告された。酵母の転写因子のひとつである TFIIE β に含まれるある特定の部位が天然変性構造をもち、過渡的な立体構造を形成することを示された。過渡的な構造形成が機能制御に深くかわるという興味深い発表であった。

芳坂先生（北陸先端大）は、非天然アミノ酸の部位特異的導入技術を用いた蛋白質の揺らぎ解析について発表された。4 塩基コドンに非天然アミノ酸を割り当てることで非天然アミノ酸を導入する技術は大変ユニークであり、本領域内で多くの共同研究が展開されている。今回は、新しい蛍光標識法の開発や、天然および非天然アミノ酸による網羅的置換を効率的に行うための手法開発についても報告された。それぞれ今後の研究の発展が大いに期待できる。

湯浅先生（奈良先端大）は、発光プローブを用いて円偏光発光（CPL）を蛋白質の解析に適用するという取り組みについて発表された。希土類錯体を標識するという化学的手法を用いている。このような手法は、これまでの蛋白質解析にはあまり用いられておらず、今後新しい展開が期待された。

筆者（寺内、立命館大）は、シアノバクテリアの 3 つの時計蛋白質によって *in vitro* で 24 時間周期の生物時計が再構成できることを紹介した。時計蛋白質のリン酸化や ATP 加水分解活性が 24 時間周期で変動する。ゆっくりした反応を蛋白質がいかにして制御しているのか、その一端を明らかにしたいと考えている。

以上、A02 班の研究報告について紹介したが、他の班の発表についても興味深いものが多数あり、活発に議論がなされた。講演時間以外にも夕食後の自由討論など、多くの人と話す機会をもてるように企画された班会議であることが印象深かった。また、若い学生や

研究者が多く参加しており、この分野の将来の発展を予期するものであった。彼らが発表する機会があればより楽しい会議であったかもしれない。最後に、ご準備いただいた先生方やスタッフの皆様に心より感謝したい。

大学で授業がある都合で、会議途中で夕張を後にしなくてはならず残念だった。夕張は大変涼しく、メロンの美味しいのどかな町であった。帰途、ホテルから夕張駅まで歩く道中、廃校になった中学校があった。夕張のきびしさの一面を垣間見たが、風はさわやかでよい香りがした。



夕食後の自由討論の時間には、車座になって議論する参加者の姿が見受けられた。

竹内 恒（産総研・A03 公募研究代表者）



平成 23 年 6 月 26 日～29 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」平成 23 年度合同班会議が“ゆうばりホテルシュエパロ”にて行われた。全国的に蒸し暑さなか、非常に気候の良い当地、かつメロンの旬という素晴らしいタイミングで開催された本会議は、非常に白熱したものであった。4 日間の会議を終えて飛行機でそれぞれの拠点に帰られた瞬間に、当班会議のすばらしさを再確認された先生方も多かったのではないかと推察する。本稿では班会議 3、4 日目に行われた A03「揺らぎと機能」班の発表を報告したい。

A03 班では揺らぎの利用を主眼にしていることから、“様々な生体分子からの揺らぎを検出し、機能との関連を明らかにする研究”やさらに一步進んで“生体分子の揺らぎを利用して、新たな機能を創生することを目指す研究”が進んでいる。A03 班は発表人数 22

名という大所帯であり、計算科学、構造生物学から分子論的解析、さらには動物を用いた *in vivo* 解析まで、非常に多様な手法を用いて様々な角度からの研究発表がなされた。以下、順不同ではあるが、私なりの理解でまとめつつ、発表内容を簡単に報告させていただきたい。

上岡龍一 A03 班班長（崇城大院・工学研究科）は、ハイブリッドリポソーム(HL)の制がん機能メカニズムについて報告された。HL ががん細胞膜の揺らぎをターゲットとしてアポトーシスを引き起こすこと、モデルマウスや臨床試験でも良好な制がん活性が得られていることなどが報告された。リン脂質と界面活性剤のみで作られる安全な HL の治療能力を実感させられる発表であった。HL の膜流動性とがん細胞に対する抑制効果が直線的相関を示すことや、HL が FasL の活性化を経てアポトーシスを誘導することなど、その HL の制がん機能メカニズムに対する検証が進んでいることも示された。また鈴木元公募班員（名古屋大院・医学系研究科）は、HL の成分である C14 PC が、がん細胞でアポトーシス誘導活性を持つ C14 ceramide に変換されることを見出された。セラミド合成酵素の一つである CerS6 が、がん細胞においては miR101 による抑制を解除されるメカニズムは非常に興味深く、さらなる研究の進展が期待される。松本陽子公募班員（崇城大院・工学研究科）は、関節リウマチ(RA)に対しても HL が治療効果を示すことを、SKG RA モデルマウスも用いて報告された。異常増殖性の自己免疫疾患でも HL の治療効果が示されたことは、膜の物理化学的性質をターゲットとする治療法が従来のタンパク質標的創薬と異なる概念として確立する可能性を示唆する。また岡田誠治公募班員（熊本大・エイズ学研究センター）は造血あるいは造血器腫瘍に対する HL、CEP、HAMLET/BAMLET の細胞膜流動性変調作用を明らかにするため、GFP-Nude-Rag2/Jak3-double-knock-out マウスを新たに樹立された。*in vivo* において腫瘍の経時的、定量的解析を可能とする当マウスの樹立は、細胞膜の流動性を標的とした治療の発展に寄与するものである。

脂質を用いた機能性分子集合体の創生という観点で、出羽毅久公募班員（名古屋大院・工学研究科）のカチオン性脂質と核酸との複合体 Lipoplex を用いた研究は HL と共通する要素を持っている様に思われる。出羽班員は AFM・蛍光観察等の手法を駆使することで、

Lipoplex の細胞内 DNA 送達活性と Lipoplex ラメラ構造不安定性との関係を明らかにされた。

また本合同班会議では、脂質そのものの構造的な揺らぎを研究対象とした興味深い発表が複数見られた。中野実公募班員（京都大院・薬学研究科）は小角中性子散乱(SANS)法を用いて、リボソーム間の脂質交換およびフリップフロップ(FF)をより直接的に観測する手法について発表された。膜曲率や膜貫通ペプチドの配列、脂質組成などが脂質交換、FF に与える影響についても詳細な解析が行われていた。また手老龍吾班員（豊橋技術科学大・エレクトロニクス先端融合研究所）は、特定のパターンを持つ固体基盤上で脂質二重膜を再構成することで、生体膜に見られる 2 次元ドメイン構造を再現するという独創的な発表をされた。マイカ基板上における脂質膜の階層構造や、アミロイド線維の伸長亢進作用が報告され、興味深い内容であった。野口博史公募班員（東大物性研）は、リボソーム形成などの脂質自己会合を、脂質分子粗視化モデルを用いて再現可能であること。またこの粗視化モデルを用いて、集合体としての物性を決定する脂質分子の物理的性質を明らかにできることを示された。

桑島邦博計画班員（自然科学研究機構・岡崎統合バイオ）は大腸菌シャペロニン複合体 GroEL/GroES に対する ATP 結合と結合依存的構造変化を Trp の蛍光により速度論的に解析した結果を示された。標的蛋白質のフォールディングを誘起するこの重要な過程は、ストップトフロー蛍光スペクトルにおいて 3 相性の複雑な挙動を示す。桑島班員は巧みな条件設定により ATP 結合相のみを抽出するなど、美しく詳細な解析を発表された。GroEL/GroES 複合体の NMR 解析も一部示され今後の進展が非常に気になる場所であった。同じく GroEL/GroES を基質のフォールディングという側面から主に解析されていたのが元島史尋公募班員（京都産業大・総合生命学部）であった。元島班員は基質 BFP のフォールディングを詳細に解析した結果、GroEL/GroES 複合体中の BFP が、空洞内壁との疎水相互作用により完全変性状態にあること、基質フォールディング速度が必ずしも促進されるものではないことなど、今までの定説を覆す発表をされた。さらに、ほどけた基質の一部が GroEL/GroES 複合体の隙間から外に出ている可能性も示された。そのほかにタンパク質分子内の揺らぎが酵素としての活性を支配する例として、伊野部智由公募班員（富山大・先端ライフサイ

エンス拠点）の発表があった。プロテアソームの基質認識にはユビキチン化に加えて、基質変性領域の長さやアミノ酸配列の複雑さが関与していることが示され、今後それらの物理化学的意味が明らかになっていくことが期待される。

また分子内の構造的な揺らぎが機能に直結する特徴から、イオンチャネルのゲーティングを題材とした研究が目についた。井出徹班員（光産業創生大学院大学）はカリウムチャネル KcsA を題材とし、チャネル電流と分子運動を同時に観測可能な画期的な実験手法を確立された。さらに KcsA の C 末端細胞内領域を微小探針により物理的に圧縮することでチャネルの開閉確率を変化させるなど、確立された手法を用いることで初めて可能な実験を提唱されていた。筆者（竹内恒公募班員（産総研・バイオメディシナル情報研究センター））および大澤匡範公募班員（東大院・薬学系研究科）は KcsA を題材とする溶液 NMR 解析について発表した。筆者は C 末端ゲート領域の pH 依存的開閉を NMR 法により詳細に観測できること、変異導入により開閉を制御する残基 His25 を同定したことなどを報告した。大澤班員は KcsA カリウムチャネルが不活性化する機構を様々な条件設定を巧みに組み合わせることで明らかにした。開・閉のみならず開閉依存的な不活性化が複雑に絡み合う KcsA 分子内のゲーティング機構に、分子内微細構造を明らかにすることのできる NMR 法を用いて肉薄した非常に興味深い研究であると考えている。

分子モーターの構造揺らぎを 1 分子観察により明らかにする飯野亮太公募班員（東大院・工学系研究科）の発表では、構造的な揺らぎを変調せずに観測する技術の確立に多大な労力とアイデアが傾けられていることに大きな感銘を受けた。このような努力により、パワーストロークと前駆的“揺らぎ”との間の関係性が見出されており、今後の研究の発展が期待された。

平田文男計画班員（自然科学研究機構・分子科学研究所）はタンパク質によるリガンド分子認識を 3D-RISM/RISM 法を用いて解析することで、タンパク質分子表面におけるリガンド分子の分布確率を解析的な数学解として求める手法を示された。実際の解析例として KcsA イオン透過路における各種イオンの分布が示された。分子認識を“揺らぎ”を含む分布として求めることの重要性が説かれたように思う。さらに 3D-RISM 法を原子から分子に拡張する試みとして、アスピリン分子の PhospholipaseA2 結合様式の解析に応

用した結果が示された。また 3D-RISM 法と一種対極に位置する分子動力学的手法を用いた解析例として、林重彦公募班員（京都大学院・理学研究科）が QM/MM-RWFE-SCF 法を用いたアミラーゼ酵素反応の解析結果を示された。飛躍的に計算速度を高めた本手法の確立により 100ns にせまるシミュレーションが可能になったということで、量子化学的計算を取り入れることで初めて評価が可能になるような分子反応における応用が期待される。

タンパク質重合やタンパク質 - 基質相互作用など分子間の認識に対する“揺らぎ”の役割を明らかにする研究としては4題の講演がなされた。廣田俊公募班員（奈良先端大学院・物質創成科学研究科）はシトクロム c 多量体形成を題材に、単量体と多量体でへムに対する配向が変化し、これが酵素活性を制御する可能性について論じられた。また大橋祐美子公募班員（理研・脳科学総合研究センター）はオリゴマー形成の有無により、酵母プリオンタンパク質のアミロイド構造に違いが生ずることを示され、分子に内在する局所的な揺らぎがアミロイド形成において重要な役割を果たすことを提唱された。またアミロイド形成の初期段階と、天然構造形成時における“揺らぎ”との関係を以前より精査されていた濱田大三公募班員（神戸大院・医学研究所）は、一連の研究を、抗体 L 鎖に展開されるとのことで、今後の研究に期待がもたれた。相沢智康公

募班員（北大院・先端生命科学研究院）は FMBP-1 の DNA 結合ドメインの4回繰り返し配列と AT リッチ配列との相互作用が、転写を正に促進する分子機構について NMR を用いた研究を進められており、ダイナミックで複雑な相互作用が予想される本相互作用に、様々な手法を駆使して迫る研究を展開されていた。

戸谷希一郎公募班員（成蹊大学・理工）は細胞内の不均一性からくる反応場としての“揺らぎ”が生体機能に与える影響を、糖鎖のプロセッシングを例に解析されていた。分子クラウディングや微小空間効果を BSA やリボソームを用いて実験的に再現することで、酵素反応速度に複雑な応答がみられることを示された。

以上 A03 班は計画班員の先生方を中心として、いくつかの共通するトピックが結節点となりながら、手法、対象の広がりを持つことで多様な分野に展開されている印象を受けた。今回初めて合同班会議に出席させていただいたことで、全体における自分の研究の位置を強く意識することができたように思う。また研究発表のみならず、自由討論、宿泊部屋などで熱く交わされた議論を通じて、同じ問題意識を持った仲間がいると感じられたことはこれからの研究に対する大きな刺激になった。最後になりましたが、今回の合同班会議をお世話してくださいました加藤晃一先生と研究室の皆様に感謝いたします。



集合写真

シンポジウム報告：

International Workshop “Intrinsic Protein Disorder and Post-Translational Modifications” (PSSJ2011)

新井宗仁

(東京大学総合文化・A02 公募研究代表者)

2011 年 6 月 7 日 (火) に、第 11 回日本蛋白質科学会年会 (大阪府吹田市、阪急ホテルエキスポパーク) において、表記の国際ワークショップが開催された。これは、Protein Society、Asia Pacific Protein Association (APPA)、日本蛋白質科学会の共同開催であり、後藤祐児教授 (阪大) と桑島邦博教授 (岡崎統合バイオ、A03 計画研究代表者) らが企画し、太田元規教授 (名大) と筆者がオーガナイズを担当した。また、Protein Society の援助で 2 人の若手研究者に来日いただいた。

天然変性蛋白質 (Intrinsically Disordered Protein, IDP) は、天然条件下で長い不規則構造領域を持つ蛋白質である。結合相手に応じて構造を変え、揺らぎを利用して多様な標的分子を認識することから、揺らぎと生物機能の関係を解明する上での大変良いモデル系である。現在、IDP は世界的に注目され、90 年代に一世を風靡したモルテン・グロビュール研究のような勢いがある。その理由としては、構造物性の面白さもあるが、転写・翻訳・シグナル伝達等に関与し、高等生物が持つ蛋白質の約 4 割を占めるという、生命現象における重要性が挙げられるだろう。では、これらの生命現象は、IDP を通してどのように制御されるのだろうか？ その答えの一つは、リン酸化などの翻訳後修飾である。IDP 内の天然変性領域にはリン酸化部位が多く存在する。例えば、ガン抑制因子 p53 の N 末端にある天然変性領域が複数リン酸化されると、p53 は E3 ligase (HDM2) から解離する[1]。次いで、p53 の C 末端にある天然変性領域が CBP によってアセチル化され、ユビキチン化されなくなることにより、アポトーシス等が誘導される。このように、IDP の機能は翻訳後修飾によって制御されている。

そこで、本ワークショップでは、翻訳後修飾による IDP の機能制御について、5 人の方々にご講演を頂いた。ここ数年、IDP に関するシンポジウムは国内でも数多く開催されているが、翻訳後修飾に焦点を当てたところが、本ワークショップのユニークな点であろう。

楯真一教授 (広島大・A02 公募研究代表者) は、クロマチンリモデリング因子 FACT の天然変性領域がリン酸化されると、自身の DNA 結合領域を塞ぎ、機能を自己阻害することを報告された[2]。また、NMR 解析の結果、リン酸化は特異的な結合を誘起するのではなく、リン酸化数の増大による非特異的な静電的引力によって結合が起きることを示された。

Jianhan Chen 助教授 (Kansas State University) は、計算機シミュレーションによって得られた IDP の構造特性や分子認識機構、リン酸化による構造変化などについて講演された[3]。IDP という魅力的なシステムについて熱く語る様子が印象的だった。彼はスクリプス研究所でのポストドク時代に、Peter Wright 研究室にも顔を出していたようで、Wright 研でポストドクをした筆者には懐かしい話も聞けて、楽しい時を過ごせた。自分の将来を切り開こうと、毎日必死で研究に打ち込んでいたポストドク仲間の笑顔を思い出した。

ヒストンの N 末端側 tail は天然変性領域であり、そこにあるリジンのメチル化等は、エピジェネティック制御に重要である。有田恭平助教 (京大) は、この領域を認識する蛋白質 UHRF1 の X 線結晶構造を明らかにし、分子認識に伴ってヒストン tail がヘリックス構造を形成することなどを報告された[4]。

トロント大の Julie Forman-Kay 研究室は、リン酸化による IDP 制御機構について世界最先端の研究を展開しているが、それらの多くは Tanja Mittag 助教授 (St. Jude Children's Research Hospital) の業績である。天然変性蛋白質 Sic1 は、分子内の 6 か所以上がリン酸化されると、標的蛋白質 Cdc4 に結合できる。しかし、Cdc4 はリン酸基結合部位を 1 つしか持たない。それなのになぜ、Sic1 は 6 か所以上もリン酸化される必要があるのか？ 実験的・理論的な詳細解析の結果、複数のリン酸化が Sic1 の正電荷をシールドし、非特異的な静電的引力によって Cdc4 に結合できることがわかった。また、Tanja さんは、Cdc4 上に 1 つしかないリン酸基結合部位を、Sic1 の複数のリン酸基が競合するというダイナミックなモデルで反応機構を記述できることを示された (図) [5]。

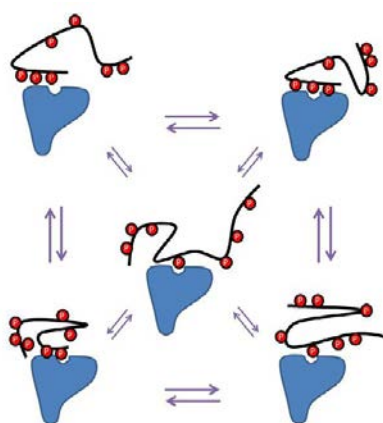
最後に、笹井理生教授（名大）は、統計力学理論に基づき、球状蛋白質のリン酸化などに伴うアロステリック転移では、pre-existing な揺らぎの存在が転移の活性化障壁を下げることを報告された[6]。IDP の分子認識でも同様の機構が適用可能かもしれない。

蛋白質学会年会では、英語でのワークショップ等が少なく、海外から人を呼びづらいことや、英語での参加登録ウェブシステムが整備されていないこと等、国際ワークショップを開催する上で改善すべき点も見られた。しかし、今回のような国際ワークショップは大変有意義であり、今後の継続を期待したい。

今回、Assistant Professor 級の若手研究者を海外からお呼びしてとても良かったと思う。彼らが熱意を持って IDP 研究に取り組んでいる様子に刺激を受けた。Tanja さんからは、アメリカの Biophysical Society Meeting の IDP サブグループ会議や、IDP の Gordon Conference に参加することを強く勧められた。アメリカの IDP 研究者の熱気を直に感じてほしいと言われた。

今後、翻訳後修飾による IDP の機能制御という観点からの研究成果が、国内から更に発信され、IDP を通して、揺らぎと機能の関係が明らかにされていくことを、ワークショップのオーガナイザーの一人として切に願う次第である。

- [2] Tsunaka et al., *J. Biol. Chem.* 284, 24610-24621 (2009).
- [3] Chen, *J. Am. Chem. Soc.* 131, 2088-2089 (2009); Ganguly & Chen, *J. Mol. Biol.* 390, 467-477 (2009); Ganguly & Chen, *J. Am. Chem. Soc.* 131, 5214-5223 (2009).
- [4] Arita et al., *Nature* 455, 818-821 (2008).
- [5] Borg et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104, 9650-9655 (2007); Mittag et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 105, 17772-17777 (2008); Mittag et al., *Structure* 18, 494-506 (2010).
- [6] Itoh & Sasai, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 107, 7775-7780 (2010); Itoh & Sasai, *J. Chem. Phys.* 134, 125102 (2011).



図：天然変性蛋白質 Sic1（黒）と Cdc4（青）のダイナミックな相互作用のモデル。赤丸はリン酸基。

参考文献

- [1] Ferreon et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 106, 6591-6596 (2009); Lee et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 107, 19290-19295 (2010)

加藤グループの矢木真穂研究員が日本蛋白質科学会 若手奨励賞を受賞

加藤晃一

(自然科学研究機構・A01 計画研究代表者)

このたび、2011 年 6 月 7 日から 9 日まで大阪にて開催された第 11 回日本蛋白質科学会年会において、私たちの研究グループの矢木真穂研究員が「ガングリオシドクラスターを舞台とするアミロイドβの構造転移と分子間相互作用」の研究によって、若手奨励賞を受賞いたしました。この若手奨励賞は、2008 年度から始まり、今年で第 4 回となります。今年は、53 名の応募者の中から書類選考で選ばれた 10 名が、若手奨励賞招待シンポジウムのセッションにて 15 分間の口頭発表を行い、厳正な審査を経て受賞者 2 名が選ばれました。

アルツハイマー病などの神経変性疾患の発症には、神経細胞膜上でクラスターを形成している糖脂質の存在が深く関わっていることが明らかにされつつあります。特に最近、神経系に豊富に存在する GM1 ガングリオシドは、アルツハイマー病に関わるアミロイドβの異常会合を引き起こすことが注目されています。矢木研究員は、これまでに、920 MHz 高磁場 NMR 計測を中心とする分光学的手法を縦横に用いて、GM1 ガングリオシドとの相互作用を契機として促進されるアミロイドβの重合に関する分子メカニズムの解明に貢献してきました。矢木博士の研究により、糖脂質クラスターという環境場がアミロイドβのコンフォメーションとダイナミクスを規定し、特異な分子間相互作用を促すことが示されました。アミロイドβの分子構造の揺らぎと秩序の均衡が破綻することに伴って、アルツハイマー病などの神経変性疾患の分子病態が引き起こされるものと理解されます。

このたびの受賞はこのような研究成果がみとめられたものです。これを機に、矢木真穂博士の研究が益々発展することを期待しています。



懇親会にて、受賞の喜びをスピーチする矢木研究員。

相沢グループの北村優紀さんが日本蛋白質科学会ポスター賞を受賞

相沢智康（北海道大学・A03 公募研究代表者）

平成 23 年 6 月 7 日（火）から 9 日（木）まで、ホテル阪急エキスポパークで開催された第 11 回日本蛋白質科学会年会において、本新学術領域研究の公募研究班員である相沢智康氏（A03 班、北海道大学）のグループの修士課程 1 年生の北村優紀さんが、蛋白質科学会ポスター賞を受賞されました。

北村さんは「酵母 *Pichia pastoris* を宿主としたペプチド大量発現系の構築」という演題で発表を行いました。遺伝子組換え蛋白質発現の宿主としての応用例が

多いメタノール資化酵母 *P. pastoris* ですが、ペプチドの大量発現への応用では、宿主由来のプロテアーゼによる分解を受けやすいことなどから、必ずしも成功例が多いとは言えません。北村さんは融合発現を用いたペプチドの安定性向上や発現経路の選択という手法で、従来よりも高い効率でペプチドの生産が可能となる発現系を検討し、その報告を行いました。

本新学術領域研究でもペプチドの「揺らぎ」を対象にした研究が盛んにおこなわれております。研究用や応用利用に向けたペプチド試料の効率的な調製にこのような研究成果が応用できることが期待されます。



本領域の計画研究代表者でもある日本蛋白質科学会会長、桑島先生から表彰状を授与される北村さん。