

業績紹介：中性子小角散乱で探るホモオリゴマータンパク質の4次構造の揺らぎ

加藤晃一

(自然科学研究機構・A01 計画研究代表者)

論文題目: "Kinetic asymmetry of subunit exchange of homooligomeric protein as revealed by deuteration-assisted small-angle neutron scattering"

著者: Masaaki Sugiyama, Eiji Kurimoto, Hirokazu Yagi, Kazuhiro Mori, Toshiharu Fukunaga, Mitsuhiro Hirai, Giuseppe Zaccai, and Koichi Kato

雑誌巻号: *Biophys. J.*, **101**, 2037-2042 (2011)

生体内に存在するタンパク質の多くは多数のサブユニットから構成されるオリゴマーとして存在している。こうしたタンパク質の4次構造のダイナミクスを解明することは、その機能発現機構やサブユニット会合機構を理解するうえで重要である。しかしながら、同一サブユニットから構成されるホモオリゴマータンパク質に関して、その水溶液中における動態を非侵襲的に解析する方法論はこれまであまり知られていない。そこで我々は、タンパク質の重水素標識を利用した中性子小角散乱 (SANS) 法により、ホモオリゴマータンパク質のサブユニット交換の速度論解析を行う方法を本論文で提唱した。

本論文では、ホモオリゴマータンパク質のモデル系としてプロテアソームの $\alpha 7$  サブユニットのみからなるホモ 14 量体を用いた。プロテアソームは多種類のサブユニットから構成される巨大なタンパク質分解酵素複合体であり、 $\alpha 7$  は本酵素複合体の中核に位置するリング状構造体を構築する 7 種類の $\alpha$ サブユニットの 1 つである。我々は中性子小角散乱を用いて、 $\alpha 7$  サブユニットが水溶液中で自発的に集合し、リング状の構造を呈するホモ 7 量体が 2 つ重なり合った 14 量体を形成することを既に報告している[1]。

本研究では、大腸菌発現系を利用して重水素標識を施した $\alpha 7$  サブユニットのホモ 14 量体を調製し、これを非標識 14 量体と混合した後の SANS プロファイルの経時変化を追跡した。その際あらかじめ 3 次元構造モデルに基づいて、ホモ 14 量体の重水素標識体と非標識体の中性子散乱長密度をもとめておき、それら中間の値を示す溶液 (81%重水) 中で実験を行った。この

条件下でサブユニット交換が進行し、 $\alpha 7$  の標識体と非標識体が混在したホモ 14 量体が形成されれば、中性子散乱強度は低下することが期待される。実際に、 $\alpha 7$  ホモ 14 量体の標識体と非標識体を混合すると、数時間というゆっくりとした時間域で散乱強度の低下が観測された (図)。同一条件下での X 線小角散乱では、こうした変化は観測されなかったことから、溶液中での 4 次構造は安定に保たれていることが確認された。

意外なことに、速度論解析の結果、交換可能なサブユニットはホモ 14 量体中で 2 つのみに限られることが明らかとなった。さらに興味深いことに、それらのサブユニット交換は 2 段階の過程からなっていることが示された。このことは、交換可能な 2 つのサブユニットがそれぞれ、活性型と不活性型の 2 状態を行き来しており、活性型の間でのみサブユニット交換が起こると考えることでうまく説明することができる (図)。

これまではプロテアソームの $\alpha 7$  サブユニットは、ホモ 14 量体中で等価な構造をしているとみなされていたが、サブユニット交換の速度論解析からその 4 次構造の非対称性が浮かび上がってきた。本方法は今後様々なオリゴマータンパク質に応用可能であり、4 次構造の揺らぎに関する有用な知見をもたらすことが期待される。

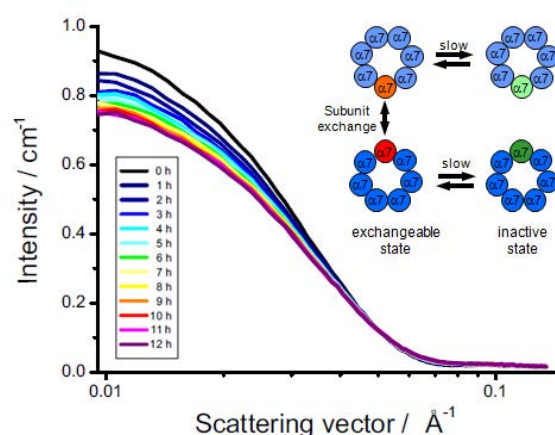


図 SANS プロファイルの経時変化と、その解析の結果提唱されたプロテアソーム $\alpha 7$ ホモ 14 量体におけるサブユニット交換反応のモデル。

参考文献

[1] M. Sugiyama et al., *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. A.*, **600**, 272-274 (2009)

業績紹介：ユビキチン 2 量体のコンフォメーションのダイナミクス

加藤晃一

(自然科学研究機構・A01 計画研究代表者)

論文題目："Conformational dynamics of wild-type Lys-48-linked diubiquitin in solution"

著者：Takashi Hirano, Olivier Serve, Maho Yagi-Utsumi, Emi Takemoto, Takeshi Hiromoto, Tadashi Satoh, Tsunehiro Mizushima, and Koichi Kato

雑誌巻号：J. Biol. Chem., 286, 37496-37502 (2011)

ユビキチンは 76 残基からなる小さなタンパク質であるが、酵素反応のカスケードにより活性化された C 末端カルボキシル基を介して他のタンパク質に連結する性質を有している。特に、ユビキチン同士が (イソ) ペプチド結合を介して連結されることにより形成される重合体は、それが修飾するタンパク質の細胞内における機能や運命を制御する働きをもっている。なかでも、Lys48 を介して連結されたポリユビキチン鎖は、プロテアソームによるタンパク質分解の目印として機能している。

これまで、様々な連結様式のユビキチン 2 量体の立体構造が研究されており、Lys48 を介して連結されたユビキチン 2 量体については、ユビキチン分子表面の疎水性領域がドメイン間相互作用により遮蔽された結晶構造が専ら報告されていた。また、NMR 解析においても Lys48 型ユビキチン 2 量体は水溶液中では疎水表面を遮蔽した閉構造が主に形成されていることが報告されてきた。しかしながら、ポリユビキチン鎖がタンパク質分解経路で機能する際には、こうした疎水表面を介して他のタンパク質と相互作用していることが知られている。また、これまでの NMR 研究には、連結部位にあたる Lys48 と C 末端部に変異を導入することにより調製されたユビキチン 2 量体が用いられてきた。そこで本研究では、試験管内酵素反応を工夫することによって調製した野生型ユビキチン 2 量体の立体構造解析を行った。

まず、野生型ユビキチン 2 量体について X 線結晶構造解析を実施したところ、本タンパク質は疎水表面を露出した開構造を呈していた。一方、我々は 2 つのイソペプチド結合を介して環状構造を形成したユビキチン

ン 2 量体を調製することにも成功しており、NMR 解析によって環状 2 量体は従来報告されていたのと同様の閉構造を有していることを明らかにした。以上の結果より、野生型ユビキチン 2 量体は水溶液中で開構造と閉構造の動的平衡にあると考え、NMR 解析によってそのダイナミクスを定量的に明らかにすることを試みた。具体的には、ユビキチンの単量体と環状 2 量体をそれぞれ開構造と閉構造のモデルとして、野生型 2 量体との NMR 化学シフトの比較解析を行った。その結果、Lys48 を介して連結された野生型ユビキチン 2 量体の 75%は、pH7.0 において開構造を形成していることが示された。さらに、溶液 pH を下げるにつれて開構造の占める割合は増大し、pH4.5 では専ら開構造のみとなった。

ユビキチンの疎水表面の周囲には塩基性アミノ酸残基が分布しており、それらの間の静電反発が pH 低下に伴う閉構造の不安定化をもたらしているものと考えられる。実際、疎水表面に位置する His68 をバリンに置換したユビキチン 2 量体では、閉構造の割合が有意に増大していた。

本研究により、Lys48 を介して連結されたユビキチン 2 量体は、従来考えられていたのとは異なり、水溶液中で疎水表面を露出した開構造を専ら呈していることが明らかとなった。このことは今後ユビキチンの分子認識を研究するうえで重要な知見となるものと思われる。

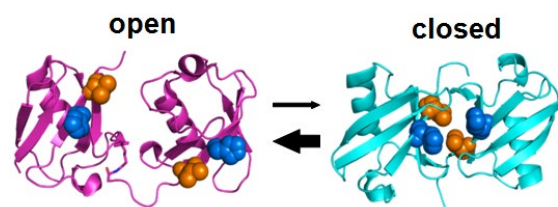


図 Lys48 を介して連結された野生型ユビキチン 2 量体は溶液中で 2 つのコンフォメーションの平衡にあるが、その主体は疎水表面を露出した開構造であった。His68 (橙) と Val70 (青) の側鎖を表示した。

業績紹介：糖鎖の改変による治療抗体の有効性向上の構造基盤

加藤晃一

(自然科学研究機構・A01 計画研究代表者)

論文題目："Structural basis for improved efficacy of therapeutic antibodies upon defucosylation of their Fc glycans"

著者：Tsunehiro Mizushima, Hirokazu Yagi, Emi Takemoto, Mami, Shibata-Koyama, Yuya Isoda, Shigeru Iida, Kazuhiro Masuda, Mitsuo Satoh, and Koichi Kato

雑誌巻号：Genes Cells, 16, 1071-1080 (2011)

免疫グロブリン G (IgG) は生体防御システムにおいて抗体としての中心的な役割を担っている多機能糖タンパク質である。IgG の Fc 領域には 2 本鎖 N 型糖鎖が結合している。この糖鎖上の  $\alpha$ 1,6 フコース残基を欠損させると、ナチュラルキラー細胞 (NK 細胞) 上に発現されている Fc $\gamma$ レセプター IIIa (Fc $\gamma$ RIIIa) に対する IgG-Fc の親和性が有意に増大し、その結果、NK 細胞を介した抗体依存性細胞障害 (ADCC) 活性が劇的に向上することが示されている。このことは抗体医薬の高機能化の有効な戦略として注目されている。本研究では、X 線結晶構造解析を基軸に、こうした IgG の糖鎖の改変による ADCC 活性上昇の構造基盤を解明することを試みた。

我々は、細胞外領域のみからなる可溶性 Fc $\gamma$ RIIIa (sFc $\gamma$ RIIIa) と Fc の非フコシル体の複合体の構造解析を行った。ヒト sFc $\gamma$ RIIIa は 5 個所の N 型糖鎖結合部位を有するが、結晶化にあたっては、そのうちの 2 箇所 (Asn45 と Asn162) のみを残して他を点変異によりグルタミンに置換した試料を用いた。こうして Fc-sFc $\gamma$ RIIIa 複合体の結晶構造を 2.2 Å 分解能で決定することに成功した。

興味深いことに、複合体の結晶構造から Fc と sFc $\gamma$ RIIIa の複合体は、タンパク質間相互作用のみならず、糖鎖とタンパク質の間の相互作用、さらには糖鎖同士の相互作用により安定化されていることが明らかとなった。しかしながら、Fc の糖鎖がフコシル化されると sFc $\gamma$ RIIIa の Asn162 糖鎖に対して立体障害を生じ、複合体は不安定化すると考えられる (図左)。このことが、フコースの除去に伴い IgG の Fc $\gamma$ RIIIa への親和性

が増大し、ADCC 活性が向上することの理由の 1 つである。また、これまで我々の NMR 解析[1]により、Fc 非フコシル体の Tyr296 はレセプター非存在下では複数のコンフォメーションをとっていることを示していたが、本研究で明らかにした複合体中では本残基の側鎖芳香環が sFc $\gamma$ RIIIa の糖鎖と Lys128 に挟まれるかたちで複合体の安定化に寄与していた (図右)。これに対して、フコシル化された Fc では、フコースが Tyr296 と分子内で相互作用してその動きを拘束しており、Fc と sFc $\gamma$ RIIIa との相互作用に対して抑制的にはたらいっていると予想される (図左)。このこともフコースの除去に伴って Fc $\gamma$ RIIIa との親和性が向上する要因であると考えられる。

本研究により、IgG の Fc 上のフコース残基は、糖鎖間の相互作用およびアミノ酸残基の運動性を制御することによって、ADCC 活性に影響を与えていることを明らかにした。

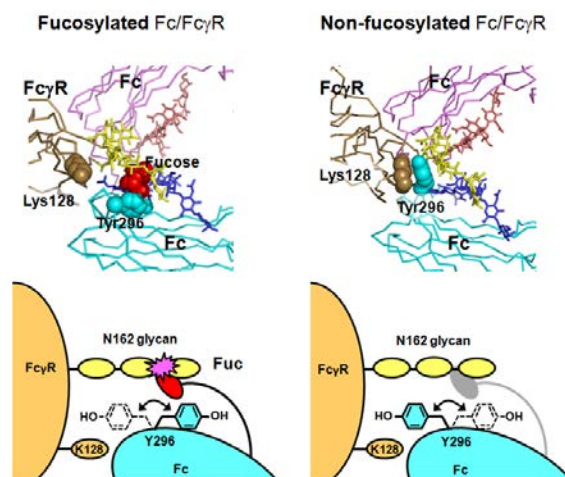


図 Fc のフコース残基は sFc $\gamma$ RIIIa の糖鎖との間で立体障害を引き起こすだけでなく、分子間相互作用に重要なアミノ酸残基 (Y296) の動きを抑制することによって活性を負に制御する。(左) フコシル化された Fc と sFc $\gamma$ RIIIa の複合体の 3 次元構造モデル。(右) 非フコシル体 IgG-Fc と糖鎖修飾 sFc $\gamma$ RIIIa の複合体の結晶構造 (PDB:3AY4)。

参考文献

[1] S. Matsumiya et al., *J. Mol. Biol.*, **368**, 767-779 (2007)

業績紹介: 3次元 RISM 理論に基づくドラッグデザインへ向けた解析手法の開発と応用

吉田紀生 (分子研・A03 計画研究分担者)

平田文男 (分子研・A03 計画研究代表者)

論文題目: "A new approach for investigating the molecular recognition of protein: Toward structure-based drug-design based on the 3D-RISM theory"

著者: Yasuomi Kiyota, Norio Yoshida, and Fumio Hirata

雑誌巻号: *J. Chem. Theory Comput.*, 7, 3803–3815 (2011)

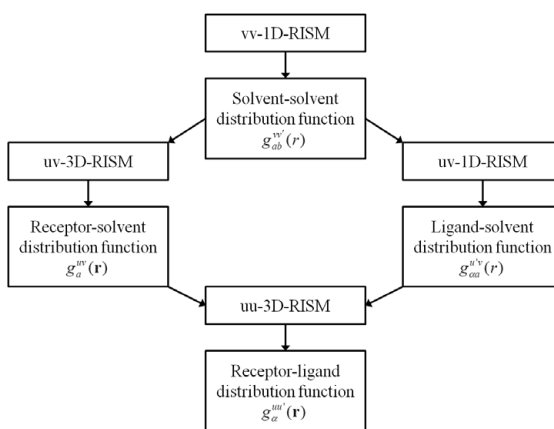
我々のグループでは、これまでに液体の統計力学に基づいた 3D-RISM 理論により、多くのタンパク質の分子認識過程を理論的に解析してきた[1]。タンパク質の分子認識は多くの生体内反応の初期過程であり、その機構を解明することは、生理作用、薬理作用を分子論的に議論する際の基点となる。3D-RISM 理論により分子認識を扱うことの利点は、生体内環境である溶媒を考慮したうえで、認識される分子の 3 次元分布関数を直接的に得られる点にある。しかし、これまでの 3D-RISM 理論を用いた研究では、リガンド分子が大きくなるに従って、RISM 方程式の数値解の発散傾向が急速に増大するという困難があった。本研究では、この問題を克服するため、多サイトを持つリガンド分子を溶質（無限希釈下:  $\rho_f = 0$ ）として扱う手法 (uu-3D-RISM 法) を提案し、創薬分野でのモデルタンパク質の一つとされる Phospholipase A2 について、アスピリンが結合する系[2]についての検証を行った。

uu-3D-RISM 法は、従来の 3D-RISM 方程式を拡張した手法である (スキーム 1)。従来の手法では、リガンド分子を含んだ溶媒系によりタンパク質-溶媒系を解くのに対して (スキーム 1 内の uv-3D-RISM に相当)、uu-3D-RISM 法では、リガンド分子-溶媒系においてもリガンド分子を溶質として取り扱い (uv-1D-RISM)、それを用いてタンパク質-リガンド分子系を解く。この uu-3D-RISM 法を用いて、アスピリンの 3 次元分布関数を求めた。得られた 3 次元分布関数からリガンド分子の結合モードを決定するため、平均的位置分布及び配向分布に関するスコア関数を定義し、それらに基づきリガンド分子の位置および配向を解析した。

この系についての解析結果を図 1 に示す。図は、定義したスコア関数におけるトップスコアの結合モード

であり、この結果は X 線構造をほぼ再現している。

ここで定義した二つのスコア関数のうち位置を決定するためのスコア関数は、リガンド分子全体の平均的確率分布を表す。解析の結果、結合サイトのみならず、タンパク質表面にもこのスコア関数に複数のピークが現れることから、これらはリガンド分子の着脱過程における経路や中間体を示していると思われる。



スキーム 1: uu-3D-RISM 法のアルゴリズム。

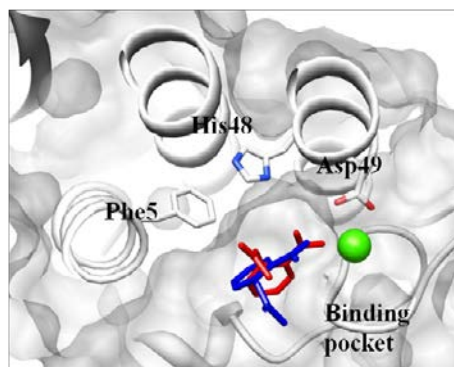


図 1: アスピリン配置の理論予測(赤)と X 線構造 (青)。

参考文献

- [1] (a) T. Imai, R. Hiraoka, A. Kovalenko, F. Hirata, *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 15334 (2005); (b) N. Yoshida, S. Phongphanphanee, and F. Hirata, *J. Phys. Chem. B*, **111**, 4588-4595 (2007).
- [2] R. K. Singh, A.S. Ethayathulla, T. Jabeen, S. Sharma, P. Kaur, and T. P. Singh, *J. Drug Target.* **13**, 113-119 (2005)

業績紹介：高速でモデル細胞膜に結合・解離を繰り返す疎水性薬物の運動状態を NMR で in situ 計測

岡村 恵美子  
(姫路獨協大薬・班友)

論文題目："Binding of Hydrophobic Fluorinated Bisphenol A to Large Unilamellar Vesicles of Egg Phosphatidylcholine"

著者：Noriyuki Yoshii and Emiko Okamura

雑誌巻号：J. Phys. Chem. B **115**, 11074-11080 (2011)

細胞膜への薬物の結合・解離挙動や膜のなかの運動状態は、ソフトな膜の揺らぎと密接に関係している。我々は、これまでに、高分解能溶液 NMR とパルス磁場勾配法を組み合わせ、膜中の薬物の拡散運動、膜への結合と解離のキネティクスを in situ で計測し定量化する方法を独自に開発した[1,2]。本研究では、内分泌かく乱物質・ビスフェノール A フッ素置換体 (FBPA、図 1) を薬物に用いて、高速で膜への結合・解離を繰り返す FBPA の運動を NMR で初めて明らかにした。

FBPA は水への溶解度が極端に低い (30 °C における溶解度：約 60 μM)。そのため、細胞膜のモデルとしてリン脂質一枚膜ベシクル (直径 100 nm) を加えると、高濃度のベシクル溶液中で、FBPA 分子のほぼすべてがベシクルに結合した。結合に伴う自由エネルギー変化 ΔG は約 -20 kJ/mol であり、エントロピー駆動により膜中に容易に移行する様子が明らかとなった (図 2 左)。

FBPA の 1D <sup>19</sup>F NMR スペクトル (図 3) は、いずれも、結合状態 (B) と解離状態 (F) を区別することができない。FBPA が高速で結合・解離を繰り返す rapid exchange の状態にあり、2 状態 (B と F) が平均化されたシグナルになっていることによる。そこで、FBPA の 1D NMR シグナル強度を、結合・解離の 2 状

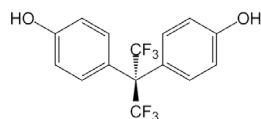


図 1：FBPA の構造

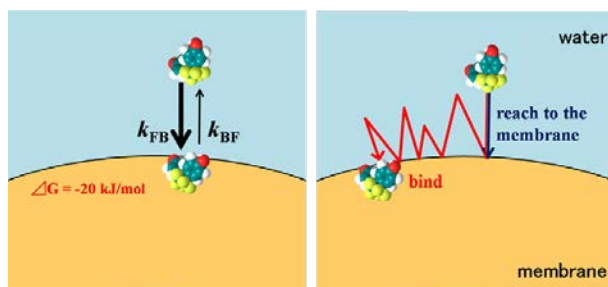


図 2：ベシクル内への FBPA の輸送過程：(左) 膜への結合と解離、(右) 動的な結合効率

態間の交換を考慮した Bloch 方程式から化学シフト  $\omega$  の関数として

$$M(\omega) = M_B(\omega) + M_F(\omega)$$

$$= \frac{M_0}{\pi} \frac{\beta_F f_B + k_{FB} f_F + \beta_B f_F + k_{BF} f_B}{\beta_B \beta_F - k_{BF} k_{FB}}$$

と表して、膜への結合・解離の速度定数  $k_{FB} \cdot k_{BF}$  を決定した。図 3 のように実測のシグナルに上式をフィッティングした後、FBPA の結合と解離の時定数を算出したところ、30 °C でミリ秒～十ミリ秒のオーダーとなり、高速でバルクと膜の間を行き来する FBPA の運動を NMR で定量化することができた。

また、FBPA がどの程度効率的に膜のなかに取り込まれるか (図 2 右) を見積もった。拡散して膜表面に到達した分子が約 20 回に 1 回の割合で膜内に移行することが明らかとなった。これは親水性の抗がん剤・5-フルオロウラシルの結合効率の約 70,000 倍であり、FBPA が非常に疎水的であるためと考えられる。

NMR 計測は、揺らぎをとまなう膜へのドラッグデリバリー研究に有効な方法であり、今後、ペプチド・タンパク質の膜への結合と解離のキネティクス、膜のなかの運動状態の解析への展開が期待される。

参考文献

- [1] E. Okamura et al., J. Chem. Phys. **129**, 215102 (2008). [2] N. Yoshii et al., Chem. Phys. Lett. **474**, 357-361 (2009).

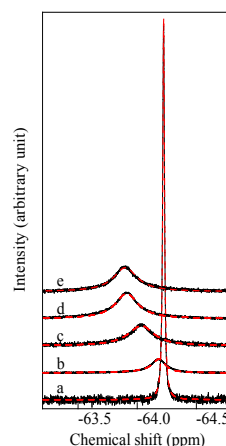


図 3：0 (a) - 40 mM (e) のベシクルと混合した FBPA の <sup>19</sup>F NMR スペクトル。黒が実測、赤がフィッティング結果を示す。

### 公開シンポジウム報告

#### 蛋白質の機能を解き明かす多彩なアプローチ

洲上壮太郎（横浜市大）

鎌形清人（東北大）

木寺詔紀（横浜市大・元 A01 公募研究代表者）

芳坂貴弘（北陸先端大・A02 計画研究代表者）

2011 年 10 月 17, 18 日の 2 日間に渡って、横浜市立大学鶴見キャンパスにおいて、公開シンポジウム「蛋白質の機能を解き明かす多彩なアプローチ」が本新学術領域研究の共催で開催されました。本シンポジウムは、2010 年 3 月 4, 5 日に、東北大学多元物質科学研究所において開催された公開シンポジウム「蛋白質の基質結合や構造変化における分子揺らぎの意義を議論する会」（本ニュースレター No.16 の報告を参照）に続く第 2 回目のシンポジウムとして企画されました。当初は 2011 年 3 月に開催の予定でしたが、東日本大震災の発生により開催を延期せざるを得ませんでした。半年ほど遅れての開催となりましたが、当初予定していた通りのプログラムで無事開催することができました。講演をお引き受け下さった講演者の方々にこの場を借りて厚く御礼申し上げます。

今回のシンポジウムでは、タンパク質の機能が実現される分子機構を解明するためには「アミノ酸配列と機能の関係」や「構造揺らぎと機能の関係」を実験と理論を含む多様なアプローチを用いて明らかにする必要がある、という認識にもとづき、アミノ酸配列空間の網羅的な解析や最先端手法による構造揺らぎの解析に取り組んでおられる 7 名の方々に講演をしていただきました。また、忌憚ない意見のやり取りによって実験と理論の相互理解を深め、一体となった取り組みを増進することを目的として、インフォーマル・ミーティングも企画しました。以下に、本シンポジウムでなされた講演の概略や議論の一端について報告いたします。

本シンポジウム最初の講演は、伊倉貞吉准教授（東京医科歯科大）によって「ペプチジルプロリルイソメラーゼの機能のアミノ酸配列依存性」と題して行われました。本講演では、プロリン異性化酵素の触媒機構を解明するため、酵素活性部位のアミノ酸残基を他の

19 種類のアミノ酸へと網羅的に置換し、活性を測定した結果が紹介されました。この実験により、酵素活性にアミノ酸の特性はあまり関係がなく、疎水ポケットが形成されていることが重要であるとの結論が導かれ、実際に酵素活性のないタンパク質に適当な疎水ポケットをデザインすることによってこの仮説が肯定的に確認されたのは驚きでした。さらに、基質タンパク質の相互作用部位の網羅的なアミノ酸変異（飽和変異）による基質特異性の解析結果についても報告され、網羅的な変異解析が酵素活性の必要十分条件を明らかにしたり、思いもよらない相互作用の重要性を発見できたりとタンパク質の機能を理解する上で強力な手法であることを再認識させられました。一方で、膨大な数の変異体を効率的に、かつ、安価に作成できる手法の開発が大きな課題であると考えられます。

続いて、新井宗仁准教授（東大、A02 公募研究代表者）から「蛋白質による標的分子認識のメカニズム」というタイトルで 3 つの研究結果が紹介されました。まず、ジヒドロ葉酸還元酵素（DHFR）の飽和変異解析の結果から、DHFR が安定性を犠牲にし、大きな揺らぎを許容することによって高い活性を実現していることが報告され、*stability-activity trade-off* というタンパク質特有のメカニズムが明らかにされました。次に、すべてのアミノ酸残基をアラニンに置換するという Ala スキャン解析によって、転写コアクチベーター CBP の KIX ドメインが転写因子 MLL と相互作用するのに



木寺教授による挨拶からシンポジウムがスタート

重要なアミノ酸残基が特定された例が紹介されました（本ニュースレターNo.25 の報告も参照）。最後に、天然変性タンパク質 p53 のタンパク質間相互作用が核磁気共鳴法と等温滴定型熱量測定による解析で明らかにされ、p53 のリン酸化による活性化メカニズムの詳細が提示されました（本ニュースレターNo.25 の報告も参照）。いずれの話題においても、目的に合わせた適切な実験手法が選択され、網羅的かつ緻密な解析によって説得力のある結論が導かれていたのが印象的でした。

次の講演は、丹羽達也助教（東工大）による「**無細胞蛋白質合成系を利用した蛋白質凝集の網羅的解析**」についてでした。大腸菌の全タンパク質を無細胞合成系によって発現させることで、タンパク質の凝集能を網羅的に調べるという内容は圧巻の一言でした。タンパク質の多様性を考えると凝集能も千差万別だと想像されますが、実際には凝集し易いものとし難いものに大きく二分できることが明らかにされ、この違いを生み出している要因について多角的な検討結果が報告されました。水溶性タンパク質と膜タンパク質という分類で単純に理解することができず、決定的な要因を特定できていないところにタンパク質の奥深さを実感させられました。さらに、凝集し易いタンパク質に対して、分子シャペロンによる凝集抑制効果が網羅的に調べられ、その効果がシャペロンの種類によって異なることが示されました。これらの貴重なデータは網羅的な解析を短時間で行うために随所に凝らされた工夫の成果であり、今後、定量性の向上や解析手法の発展によって新たな真理が発見されることが期待されます。

休憩を挟んだ後、明石知子准教授（横浜市大）の講演「**機能するタンパク質の構造変化を質量分析で探る**」で再開しました。まず、トリプトファン合成制御因子 TRAP とその抑制因子 Anti-TRAP の複合体を例に、タンパク質複合体のストイキオメトリーを手早く確実に同定することができる質量分析の利点が紹介されました。続いて、タンパク質の形状の違いを検出できるイオンモビリティ質量分析について、その原理が説明され、具体例として、ヒストン H2A/H2B 二量体と相同組換えに関わる Swi5-Sfr1 複合体の 2 つの結果が報告されました。H2A/H2B 二量体の観測結果は X 線結晶構造解析で決定された立体構造と矛盾しないものでしたが、末端部分の多くの欠損残基を考慮していないことから、結果の妥当性に若干の疑問が残ります。一

方、Swi5-Sfr1 複合体では、X 線小角散乱で決定されたモデル構造との比較が行われ、大きな食い違いが生じていることが判明しました。その原因として、Sfr1 の天然変性領域の立体構造が計測手法によって大きく変化することが考えられます。このように、本手法には様々な問題点が残されているようですが、他の手法では得られない情報を与えてくれる手法ですので、今後、幅広く利用されていくことが予感されます。

1 日目最後の講演は、山根努特任助教（横浜市大）から「**多剤排出トランスポーター AcrB の全原子分子動力学シミュレーション**」というタイトルで行われました。AcrB は、細胞膜を介して形成された水素イオンの濃度勾配を駆動力として、様々な薬剤を細胞外に排出します。水素イオンは AcrB の膜貫通部位を通過しますが、その経路を実験的に決定することは容易ではありません。一方、計算機を用いる場合、タンパク質側鎖のプロトン化状態を仮定し、シミュレーションを行うことで、機能中に実現している状態、および、その変化を推測することが可能です。実際、AcrB を脂質二重膜中に埋め込んだ系が作成され、100 ns におよぶ計算によって、機能発現におけるプロトン化状態の変化や水素イオンの輸送経路の推定結果が紹介されました。ひとつひとつの原子の動きを追うことができるシミュレーションの強みが遺憾なく発揮された研究だと言えるでしょう。今後は、膜貫通領域におけるプロトン化状態の変化がどのように薬剤を排出する動きへと繋がるのか、分子メカニズムの解明が待たれます。

1 日目の講演終了後には懇親会が開催されました。お酒もあり、リラックスした雰囲気の中、シンポジウムの講演者・参加者の方々の間で、本日の講演に關す



歓談で盛り上がる懇親会の様子

る質問や議論はもとより、タンパク質の機能実現の分子機構について幅広い意見交換が活発に行われました。

2 日目最初の講演は、オーガナイザーの一人である芳坂貴弘教授（北陸先端大）から「**非天然アミノ酸の導入によるタンパク質の二重蛍光標識と FRET 解析**」と題してなされました。まず、4 塩基コドンを用いることで非天然の蛍光標識アミノ酸を部位特異的に導入できることが示されました。さらに、開始 tRNA に別の蛍光標識アミノ酸を結合させて N 末端に導入することで、タンパク質を二重に蛍光標識することができ、蛍光共鳴エネルギー移動（FRET）による解析でタンパク質の立体構造変化を観測できることがカルモジュリンを例として報告されました。蛍光標識アミノ酸以外にも、翻訳後修飾されたアミノ酸やポリエチレングリコール化されたアミノ酸など様々な非天然アミノ酸が導入可能であることが次々と紹介され、本手法の汎用性・拡張性に圧倒されました。アンバー終止コドンも利用できることから、複数の場所に異なる非天然アミノ酸を導入でき、その可能性は無限大です。実際にどのようなアミノ酸をどのような位置に挿入するかは実験家の腕の見せ所であり、今後、どんな実験がデザインされ、新しい知見が得られるのか楽しみです。

最後の講演は、小井川浩之研究員（東北大）による「**マイクロ秒分解一分子蛍光検出による蛋白質構造変化の追跡**」についてでした。芳坂教授の手法で作成された蛍光標識タンパク質を用いて、その構造変化を一分子レベルで直接観察するという意欲的な内容でした。今までの一分子観測は時間分解能が悪く、タンパク質の構造が時々刻々と変化していく様子を捉えることができないのが大きな不満点でしたが、計測手法や実験装置、試料調整などに様々な工夫を施すことで、数十マイクロ秒という高い時間分解能が実現されていました。これにより、タンパク質が立体構造変化する様子が実時間で捉えられることが期待されますが、具体例として挙げられたシトクロム c とマルトース結合タンパク質のいずれにおいても、残念ながら期待通りの観測結果が得られたとは言い難いようでした。しかし、マイクロ秒程度の時間分解能はタンパク質の構造変化過程を捉えるのに十分な時間分解能ですので、適切なターゲットと実験をデザインすることで、期待通りの（もしかしたら期待を裏切るような）タンパク質特有の動きが近いうちに観察されることでしょう。

昼食後には、開催地である横浜市大鶴見キャンパスの実験施設を見学したいという要望がありましたので、急遽見学会を企画し、X 線回折装置・核磁気共鳴装置（NMR）・質量分析装置・スーパーコンピュータを見学していただきました。

2 日目の午後は、さらなる議論を行う場としてインフォーマル・ミーティングを開催しました。このミーティングでは、猿渡茂准教授（北里大）、鎌形清人助教（東北大）、淵上壮太郎助教（横浜市大）より話題の提供がなされ、それぞれについて議論するとともに、タンパク質の機能はどのように理解できるか、そのためにはどのような情報が必要か、そして、どのような研究をデザインすればよいか、など実験と理論の垣根を越えた忌憚ない意見のやり取りが行われました。

以上のように、本シンポジウムでは、講演者の方々に様々な解析手法をご紹介いただき、タンパク質の機能を理解するために利用可能な方法の多様性、個々の特徴など貴重な情報を発信できたとともに、それぞれの間の連携の可能性などを考える機会を提供することができたと思います。今後、解析手法がさらに洗練化されると同時に、それらを総合的に用いてタンパク質の機能を解き明かす研究が発展していけば、オーガナイザー冥利に尽きます。また、このような会を定期的に開催し、常に最新の動向を把握できることが望ましいと考えています。どのような場になるかわかりませんが、今後もなんらかの形で続けていければと考えています。その際には、皆さんにも是非ご参加・ご協力いただければ幸いです。

最後になりましたが、旅費の一部をサポートしてくださいました本新学術領域研究に御礼を申し上げます。



インフォーマル・ミーティングの会場風景

### A03 班会議報告

松本陽子

(崇城大学応用生命科学・A03 公募研究代表者)

A03 班会議が 2011 年 11 月 3~4 日、滋賀県近江八幡市の休暇村近江八幡において開催された。本会議には A03 班の班長の上岡龍一先生、計画研究代表者の平田文男先生および桑島邦博先生はじめ 17 名の公募研究代表者のうち 12 名、さらに班友 1 名、研究グループの教員や博士研究員 9 名、合わせて 25 名が参加した。

安土にほど近い近江八幡は、大河ドラマ「江」縁りの地。近江商人の古い町並みが八幡堀とともに保存され、日本の遊歩百選にも選ばれている。会場の休暇村近江八幡では、眼前に広がる雄大な琵琶湖を朝な夕な満喫しながらの会議であった。

班長の上岡先生の挨拶で会議は幕を開け、揺らぎが生み出す機能に関しての研究に主眼を置いた A03 班の研究内容の概要および本学術領域研究内で進行中の A03 班の研究者との共同研究について述べられた。以下、発表順に発表者およびタイトルを記す。

1 平田文男計画班員(分子研)

「3 次元 RISM 理論に基づくドラッグデザインへ向けた解析手法の開発と応用」

2 濱田大三公募班員 (神戸大医)

「免疫グロブリン軽鎖キメラ体のアミロイド形成能とフォールディング」

3 松下琢班友(崇城大生命)

「テロメア DNA 四重らせん構造の揺らぎと機能に関する分子科学的研究」

4 野口博司公募班員(東大物性研)

「粗視化分子模型による脂質膜のシミュレーション」

5 中野実公募班員(京都大薬)

「中性子散乱法を用いた脂質膜対称性の解消に関わる脂質 - タンパク質相互作用の解明」

6 上岡龍一 A03 班班長(崇城大生命)

「Hybrid Liposomes を用いる難治性疾患治療」

7 鈴木元公募班員(名古屋大医)

「Hybrid Liposomes は一部 CerS6 を介して ceramide に代謝され作用する」

8 松本陽子公募班員(崇城大生命)

「ハイブリッドリポソームによるアポトーシス誘導」

9 岡田誠治公募班員(熊本大医)

「細胞膜の揺らぎと HIV 感染」

10 林重彦公募班員(京都大理)

「タンパク質機能における pKa 制御の分子機構」

11 廣田俊公募班員(奈良先端大物質創成)

「シトクロム c の多量体形成とポリマー化」

12 桑島邦博計画班員(岡崎統合)

「 $\alpha$  ラクトアルブミンの N 末端異変体の構造揺らぎと安定性」

13 元島史尋公募班員(京都産大総合生命)

「シャペロン補助フォールディングにおけるタンパク質の揺らぎ制御の解析」

14 出羽毅久公募班員(名古屋工大)

「生体機能解明のプラットフォームとしての脂質二分子膜」

15 相沢智康公募班員(北大先端生命)

「タンデムリピートを持つ新規天然変性 DNA 結合ドメインの揺らぎと分子認識機構」

16 大橋祐美子公募班員(理研脳)

「酵母プリオン Sup35 のアミロイド構造を決定する揺らぎ」

A03 班会議では、タンパク、脂質膜、遺伝子の構造と機能についての最新の研究成果が発表され、熱い討論が続いた。2 日目午前に班員の全発表が終了し、午後の自由討論をはさんで、夕食後、若手発表・討論会の時間が設けられた。以下の発表が行われ、活発な討論で夜遅くまで盛会であった。

若手発表・討論会

1 古水雄志(上岡グループ)

「膜の揺らぎを標的とするハイブリッドリポソームのがん抑制機構」

2 丸山豊(平田グループ)

「シニョリンの熱変性ダイナミクス:MD-3DRISM による解析」

3 中村敬(桑島グループ)

「抗腫瘍活性を持つ蛋白質複合体の構造と物性」

最後になりましたが、今回の A03 班会議をお世話いただいた平田文男先生と研究室の皆様にご感謝申し上げます。



A03 班会議集合写真 (2011 年 11 月 3～4 日)

### 加藤グループの山本さよこさんが ISNMR 2011 にて若手ポスター賞を受賞

加藤晃一

(自然科学研究機構・A01 計画研究代表者)

平成 23 年 11 月 15 日 (火) から 18 日 (金) まで、横浜大さん橋ホールにて、日本核磁気共鳴学会による The International Symposium on Nuclear Magnetic Resonance 2011 (ISNMR 2011) が開催されました。本シンポジウムは第 50 回記念 NMR 討論会も兼ねており、国内外より第一線で活躍される多くの著名な先生の素晴らしい講演を拝聴することができました。また、多くの若手研究者による先端的な研究発表も印象的であり、活発な議論が飛び交うシンポジウムでありました。

我々の研究室からも数名が本シンポジウムに参加し研究発表を行いました。分子科学研究所特別共同利用研究員 (名古屋市立大学大学院薬学研究科 2 年生) の山本さよこさんは若手ポスター賞 (Young Scientists Poster Awards) に応募し、"Application of paramagnetic NMR to analyses of conformations and dynamics of oligosaccharide" という演題で英語と日本語 (各 1 時間) ポスター発表を行いました。山本さんのポスター発表は審査員の方々から非常に高い評価を頂き、多くの応募者の中から本賞受賞者に選ばれました。

本研究では、常磁性 NMR を応用した糖鎖の新規立体構造解析法の開発を試みています。常磁性ランタニドプローブを糖鎖へ導入することにより、糖鎖に由来する NMR 信号の擬コンタクトシフトを観測することに成功しました。そして、この NMR で得られた結果と分子動力学計算を用いた統合的な解析を行うことにより、糖鎖の動的な立体構造を明らかにすることが可能となりました。今後、生体内において重要な機能を担っている様々な糖鎖の立体構造とその揺らぎの研究への応用が期待されます。



懇親会にて英語でスピーチする山本さん

### 片岡グループの上久保裕生博士、芝るみ博士が The 17th International Biophysics Congress において最優秀ポスター賞を受賞

片岡幹雄

(奈良先端大物質創成・A02 計画研究代表者)

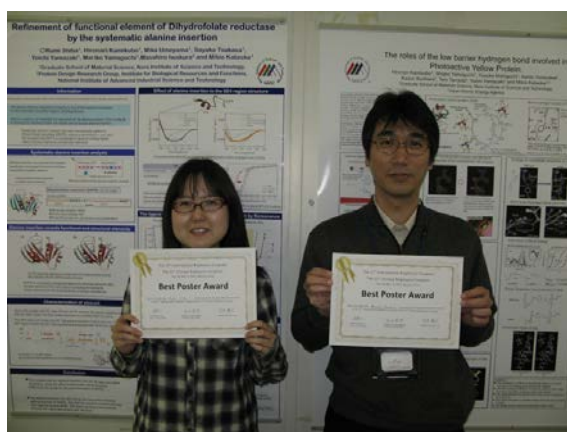
片岡グループ (A02 班計画研究) の上久保裕生准教授及び芝るみ博士 (博士研究員) の 2 名が、10 月 30 日から 11 月 4 日まで、北京で開かれていた The 17th International Biophysics Congress において、最優秀ポスター賞を受賞しました。International Biophysics Congress は、International Union of Pure and Applied Biophysics (IUPAB) が主催する国際会議で、生物物理学の中では最も重要な国際会議に位置付けられており、3 年に 1 度開催されています。会議には、3 名のノーベル賞受賞者ほか、世界中の第一線の生物物理学研究者が参加しました。

上久保博士は”The roles of the low barrier hydrogen bond involved in Photoactive Yellow Protein”の演題で発表しました。当グループでは、光合成細菌中に存在する光センサー蛋白質 (Photoactive Yellow Protein) の反応中心近傍に、低障壁水素結合が存在することをすでに明らかにしてきました。本発表では、低障壁水素結合を失活させた変異体に対し、中性子・X 線併用結晶構造解析を適応し、蛋白質中に形成された低障壁水素結合が通常の水素結合の約 2 倍程度の結合エネルギーを有すること、また、近傍アミノ酸のプロトン化状態の直接観測によって、低障壁水素結合によって蛋白質内部電荷の非局在化が実現され

ていることを明らかにしました。これらの結果は、蛋白質内部の微小空間で生じるプロトン移動反応と高次構造転移を関連づける上で重要な知見となり得ます。

芝博士は、”Refinement of function element of dihydrofolate reductase by the systematic alanine insertion”の演題で発表しました。ジヒドロ葉酸還元酵素に対し、網羅的アラニン挿入変異を行い、各変異体を精製した後、構造と酵素活性を測定することにより、構造形成と酵素活性発現のために必須な一次構造上の領域を明らかにしたものです。配列をアラニン挿入で分断することにより、構造形成能を失う領域、酵素活性を失う領域が明確に決定できます。機能発現に必須な領域は、さらに補酵素(NADPH)結合に関与する領域、基質(ジヒドロ葉酸)の結合に関与する領域および触媒活性に関与する領域に分類することができました。触媒活性に関与する領域には、活性部位を含んでいない領域もあり、揺らぎとの関係が注目されます。A02 班公募研究代表者の新井宗仁さんが、円順列変換により DHFR の folding element を同定していますが、今回の結果は、この結果を支持するとともに、folding element のうちのいくつかは、機能発現に必須で必ずしも構造形成に必須な領域ではないことも示されました。

会議の閉会式において、各セッションからポスター賞受賞者が発表され、賞状等が授与されました。



帰国後、受賞ポスターの前で記念撮影。

### 報道：領域の研究活動が Science に紹介される

片岡幹雄

(奈良先端大物質創成・A02 研究計画代表者、領域事務担当)

我々の新学術領域研究（領域提案型）“揺らぎが機能を定める生命分子の科学”の研究内容が、Science 9 月 2 日号（Science 333, 1329 (2011)）に紹介されました。Focus on Japan という特集の一部で、寺嶋領域代表ら

と Science の取材に応じたものです。この記事を読んだと思われる方から、来年 1 月の公開シンポジウムへの参加、ポスター発表の申し込みがありました。



**Grant-in-Aid for Scientific Research on Innovative Areas**

**Molecular Science of Fluctuations toward Biological Functions**

Masahide Terazima (Kyoto University, Project Leader)  
Mikio Kataoka (Nara Institute of Science and Technology, Secretary General)  
Ryuichi Ueoka (Sojo University, Coordinator)

**Fluctuation controls biological functions!**

Living phenomena are the consequence of a series of various chemical reactions, in which a number of biological molecules are cooperatively involved. Understanding the biological reactions at the molecular level is one of the major targets in many scientific fields. Although the structures of biological molecules provide important information for these purposes, the static structures are not sufficient. Dynamics are essential, because reactions are always dynamic. Since almost all biological molecules work in water at ambient temperature, it is impossible to escape from thermal fluctuation. Fluctuation involves random movements without changing the average structure and energy. How can such biological molecules perform selective and efficient reactions for their functions in life? Does the fluctuation play an important role in the reactions?

In support of a Grant-in-Aid for Scientific Research on Innovative Areas (research in a proposed research area) from the Ministry of Education, Culture, Science, Sports and Technology in Japan, we organized a project group termed "Molecular Science of Fluctuations toward Biological Functions". In this research area, we are creating and establishing a field of "fluctuation of biological molecules" by clarifying the importance of fluctuations for biological reactions.

For this purpose, scientists in a variety of fields (physics, chemistry, pharmacy, medical science etc.) collaborate together and elucidate the nature of fluctuations and the relationships between fluctuations and the chemical reactions related to various biological functions. The project consists of the following three research sections.

**Research section A01: "Detection of fluctuation"**

The main targets of this section are the development of experimental techniques for the detection of structural and energy fluctuations, and the characterization of the nature of the fluctuations. In particular, the detection of fluctuations of short-lived intermediate species in a time domain is an important target of this section. Using such methods, we will elucidate whether fluctuation is really enhanced during the reactions. The development of theoretical methods to characterize the fluctuation is also a target of this section.

**Research section A02: "Regulation of fluctuation"**

The aim of this section is to seek new methods for regulating fluctuation by mutations, introduction of artificial amino acids or modification by newly designed organic reagents. By regulating fluctuation, we can clarify how fluctuation is important for the reactions. One of the main targets of this section could be studies on the reaction mechanisms and roles of the recently discovered intrinsically denatured proteins (IDPs), which should possess flexible conformations.

**Research section A03: "Fluctuation toward function"**

The studies in this section are mainly focused on clarifying direct relationships between fluctuations and various biological functions. The target molecules could be proteins, DNA, RNA, membranes, and so on. Theoretical and experimental studies will be carried out to explore the structure formation (folding), dynamics, and functions of proteins and other biomolecules. We also aim to develop clinical chemotherapy strategies using fluctuation.

Brief summaries of the current status of the results are described below.

In order to clarify the reaction coordinates along the function and changes in the fluctuation, we, in the research section A01, are utilizing a variety of possible techniques, such as NMR relaxation method, spectroscopy and AFM of single molecules, thermodynamics, and theoretical MD simulation. For example, the group headed by Prof. Terazima has succeeded in developing a time-resolved thermodynamics combined with a high pressure technique to trace the changes in the fluctuation in the time domain. Furthermore, this group has developed a new time-resolved technique of the diffusion coefficient for studying reactions that lead to the biological functions.

In the research section A02, the group led by Prof. Kataoka has succeeded in creating mutants of functional proteins that can be regarded as models of IDPs. They have revealed that some mutants can recognize and bind their ligand in a disordered state and that the binding induces folding, suggesting that disorder and fluctuation are essential for the ligand recognition of IDPs in some cases. Prof. Hohsaka developed a unique method to introduce several artificial amino acids into desired positions in a target protein. These methods have been widely utilized by the project members.

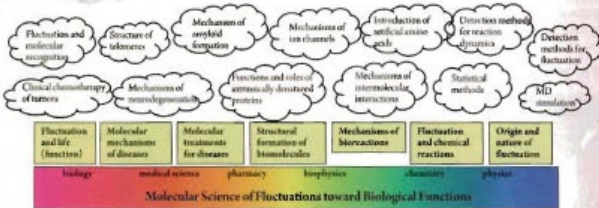
In the research section A03, some applications have been pursued using the fluctuation. For example, Prof. Ueoka's group produces hybrid liposomes (HLs), which are mixtures of vesicular and micellar molecules. Remarkably high inhibitory effects of HLs with higher membrane fluidity on the growth of tumor cells in vitro and in vivo have been obtained without drugs. Furthermore, a successful clinical chemotherapy involving drug-free HL administration to patients with lymphoma has been reported. HLs can distinguish between tumor and normal cells through fusion and accumulation into tumor cell membranes only after HL treatment.

We will hold the 5th Open Symposium on January 7 and 8, 2012, at Todaiji Culture Center (Nara). We call for poster presentations at the symposium. More information and the results of this project can be obtained in our homepage:

[http://kuchem.kyoto-u.ac.jp/hikari/yuragi/index\\_e.html](http://kuchem.kyoto-u.ac.jp/hikari/yuragi/index_e.html)

**Contact:**  
Prof. Masahide Terazima  
Department of Chemistry,  
Graduate School of Science, Kyoto University  
Sakyo-ku, Kyoto, 606-8502, Japan  
TEL/FAX: +81-75-753-4026  
e-mail: mterazima@kuchem.kyoto-u.ac.jp

Prof. Mikio Kataoka  
Graduate School of Materials Science  
Nara Institute of Science and Technology  
Ikoma, Nara 630-0192, Japan  
e-mail: kataoka@ms.naist.jp



**Molecular Science of Fluctuations toward Biological Functions**

biology    medical science    pharmacy    biophysics    chemistry    physics

online @sciencecareers.org

Science Careers

FOCUS ON JAPAN