

業績紹介：G 蛋白質 α サブユニットの C 末端部はヌクレオチド交換反応を制御する

今元 泰

(京都大学理学・A01 公募研究代表者)

論文題目："The C-terminus of the G protein α subunit controls the affinity of nucleotides"

著者：Naoki Kimata, Takahiro Yamashita, Take Matsuyama, Yasushi Imamoto, and Yoshinori Shichida

雑誌巻号：Biochemistry 51, 2768-2774 (2012)

G 蛋白質共役型受容体 (GPCR) は細胞表面に存在する受容体蛋白質の中で最大のファミリーを形成しており、創薬のターゲットとして重要な蛋白質群である。GPCR はそれぞれ固有の刺激に応答するため、哺乳類で約 1,000 種類が報告されている。一方、G 蛋白質は数 10 種類程度しか報告されておらず、GPCR による G 蛋白質活性化効率は G 蛋白質の種類に大きく依存する。そのため GPCR は、それぞれが相互作用すべき G 蛋白質を認識することができると考えられる。

刺激を受けた GPCR は、膜貫通ヘリックスの配置が大きく変化してオープンな構造をもつ。GPCR と G 蛋白質の複合体の結晶構造解析では、G 蛋白質 α サブユニット ($G\alpha$) の C 末端部の α ヘリックスが GPCR と相互作用していることが示されており、GPCR と G 蛋白質の選択性には、この領域が関与していると考えられる。しかし、GPCR と結合していない G 蛋白質の結晶構造解析では、 $G\alpha$ の C 末端部の構造は得られていない。このように、高い選択性を持つ蛋白質間相互作用において、選択性に関わると考えられる部位の構造が揺らいでいることは、揺らぎが蛋白質間の選択性や相互作用に関与することを示唆する知見である。本研究では $G\alpha$ の C 末端部に変異を加え、G 蛋白質活性化における C 末端部の役割を検討した。

実験には、光刺激で活性化することができる GPCR であるウシロドプシンを用いた。ロドプシンと相互作用する G 蛋白質は視細胞内ではトランスデュシン (Gt) であるが、Gt は大腸菌を用いた変異体の調製が困難であるため、同じグループに属する G_i を用いた。 G_i の C 末端部のアミノ酸配列を、ロドプシンによる活性化効率が低い G_o のものと比較し、配列を入れ替えた変異体を作成した。

	C-terminal sequence of $G\alpha$												
	340	I	K	N	N	L	K	D	C	G	L	F	350
G_i		I	K	N	N	L	K	D	C	G	L	F	
G_o		I	A	N	N	L	R	G	C	G	L	Y	
$G_i/DGFY$		I	K	N	N	L	K	G	C	G	L	Y	
$G_i/KAKR$		I	A	N	N	L	R	D	C	G	L	F	
$G_i/K341A$		I	A	N	N	L	K	D	C	G	L	F	
$G_i/K345R$		I	K	N	N	L	R	D	C	G	L	F	
$G_i/D346G$		I	K	N	N	L	K	G	C	G	L	F	
$G_i/F350Y$		I	K	N	N	L	K	D	C	G	L	Y	

図 1：作成した $G\alpha$ 変異体の C 末端アミノ酸配列。

これらの変異体を用いて GDP/GTP 交換速度の速度を解析したところ、 $G\alpha$ の C 末端部は $G\alpha$ のヌクレオチド結合部位から約 30 Å 離れているにもかかわらず、GDP/GTP 交換速度に大きく影響することがわかった。速度論的な解析から、GDP の結合速度 (k_{+1}) と GTP の結合速度 (k_{+2}) を求めたところ、いずれも C 末端部の変異による影響をうけていた。

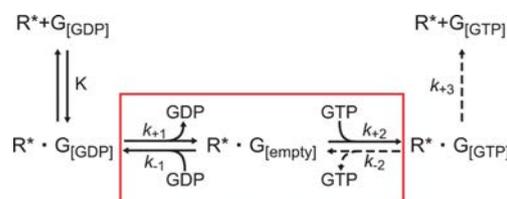


図 2：刺激を受容した GPCR (R^*) が G 蛋白質を活性化する 4 つのステップ。赤線で囲んだ GDP/GTP 交換反応が $G\alpha$ の C 末端部の影響をうけることがわかった。

光刺激したロドプシンは、G 蛋白質と複合体を形成することで活性状態が安定化するが、活性状態の生成量と G_i の活性化効率は相関がみられなかった。これは、G 蛋白質 C 末端部が単に GPCR との相互作用を担うだけでなく、ヌクレオチド結合部位にも影響を及ぼしていることを示唆している。このことを確認するため、GPCR と結合していない状態の $G\alpha$ の自己活性 (自発的 GDP/GTP 交換反応) を測定したところ、自己活性も C 末端部の影響を受けることがわかった。

本研究は、結晶構造解析で構造が得られない揺らいだ領域のアミノ酸残基が、相互作用する蛋白質の認識や活性化に深く関与していることを示している。

業績紹介：揺らぎの定理による回転分子モーターのトルク測定

林久美子

(東北大学工学研究科・A01 公募研究代表者)

論文題目: "Measurements of the driving forces of bio-motors using the fluctuation theorem"

著者: Kumiko Hayashi, Mizue Tanigawara and Jun-ichi Kishikawa

雑誌巻号: *BIOPHYSICS* **8**, 67-72 (2012)

本研究では、揺らぎの定理を生体モーターの駆動力測定に応用した [1]。生体モーターの運動の揺らぎを利用して非破壊に力を測定する。本論文は(1)コロイド粒子のシミュレーションを用いた揺らぎの定理の検証 (2)揺らぎの定理の導出 (3)生体分子モーターの駆動力測定法 (4) 回転分子モーターF₁-ATPase の一分子実験への応用から成り、実験分野でも広く読まれるよう工夫してレビューした。

揺らぎの定理による駆動力測定: 熱揺らぎを受けて駆動力 F で一方向に進むリニアモーターに対して (図 1 左)、

$$\ln[P(\Delta X)/P(-\Delta X)] = F \Delta X/k_B T \quad (1)$$

ここで、X はカルゴの位置、 $\Delta X = X(t+\Delta t) - X(t)$ 、 k_B はボルツマン定数、T は温度、P(ΔX)は ΔX の分布である。一方、熱揺らぎを受けてトルク N で一方向に回転する回転モーターに対して (図 1 右)、

$$\ln[P(\Delta \theta)/P(-\Delta \theta)] = N \Delta \theta/k_B T \quad (2)$$

ここで、 θ はビーズの回転角度、 $\Delta \theta = \theta(t+\Delta t) - \theta(t)$ 、P($\Delta \theta$)は $\Delta \theta$ の分布である。X(t)や $\theta(t)$ のタイムコースを一分子実験で測定し、P(ΔX)と P($\Delta \theta$)から F や N を得る。

回転モーターF₁-ATPase のトルク測定: F₁-ATPase (F₁)は ATP を加水分解して得たエネルギーで動く回転モーターである。F₁ が約 10nm と小さいため 200nm-500nm のビーズを付けて、光学顕微鏡で観察す

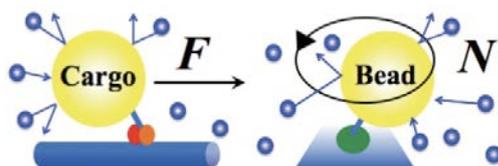


図 1 リニアモーター(左)と回転モーター(右)の模式図

る。ビーズの重心から回転角度 $\theta(t)$ を計算する。ATP の濃度が高い場合、タイムコース $\theta(t)$ は連続的になるが (図 2 左)、ATP の濃度が低い場合、ATP の待ち時間が長いので、 $\theta(t)$ はステップ状になる(図 2 右)。後者の場合、実際に F₁ がトルクを発生している赤い四角中の $\theta(t)$ から P($\Delta \theta$)を計算する(図 2 右上)。P($\Delta \theta$) から、(2)式の左辺 $\ln[P(\Delta \theta)/P(-\Delta \theta)]$ を計算し、 $\Delta \theta/k_B T$ に対してプロットすると、グラフの傾きがトルク N である。

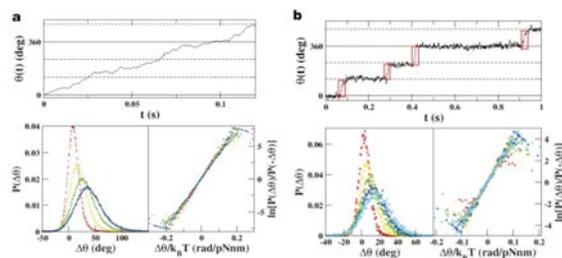


図 2 揺らぎの定理を F₁ の回転トルク測定へ応用する: ATP 高濃度(a)と ATP 低濃度(b)の場合

(2)式は従来の回転トルク測定法と比較して、トルク値が回転ビーズの揺らぎから直接求まることが利点である。F₁のトルク発生メカニズムを調べる際、変異型と野生型のトルク比較のために、(2)式が利用された [2-3]。また、F₁と類似した回転モーターV₁の研究においても、(2)式からトルク値が測定された。近年、揺らぎの定理による駆動力測定が回転モーターの一分子計測で定着しつつあるので、他の生体モーターへの応用が期待される。今後、私自身は揺らぎの定理を生細胞内のミトコンドリア輸送へ応用する研究を進めたい。

参考文献

- [1] 林久美子, 生物物理 **51** 188-189 (2011).
- [2] E. Usukura, T. Suzuki, S. Furuike, N. Soga, E. Saita, T. Hisabori, K. Kinosita Jr and M. Yoshida, *J. Biol. Chem.* **287**, 1885-1891 (2012).
- [3] M. Tanigawara, J. Ito, Y. Ito, R. Watanabe, K. Koyasu, M. Ikeguchi, K. V. Tabata and H. Noji, submitted.

業績紹介：がん細胞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

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："Selective accumulation and growth inhibition of hybrid liposomes to human hepatocellular carcinoma cells in relation to fluidity of plasma membranes"

著者：Yuji Komizu, Hidetsugu Ueoka, Ryuichi Ueoka

雑誌巻号：Biochem. Biophys. Res. Commun., **418**, 81-86 (2012)

ハイブリッドリポソーム (HL) 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、その制がん機構として“HL 自身の揺らぎ(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[1]。また、HL がヒト肝臓がん(HepG2)細胞に対して、選択的に融合・蓄積し、アポトーシスを誘導することは明らかとなっていたものの[2]、細胞膜の流動性とがん抑制効果との関連性については不明であった。本論文では、がん細胞膜の揺らぎを標的とした HL のがん抑制機構の一般化を目指し、7 種類の細胞株 (正常肝臓、肝臓がん、白血病、膵臓がん、脳腫瘍、星細胞腫) を用い、細胞膜の流動性と HL のがん抑制との関連性について *in vitro* で検討し、以下に示す新しい知見が得られた。

(I) *In vitro* での細胞増殖抑制試験から、HL (DMPC/C₁₂(EO)₂₃) は、ヒト肝臓がん(HepG2, HuH-7) 細胞に対して、濃度依存的に細胞増殖を抑制した(図 A)。一方、正常肝臓細胞 (Hc) に対しては、0-400 μM の濃度範囲において、細胞増殖にほとんど影響を及ぼさなかった。すなわち、HL の HepG2 および HuH-7 細胞に対する 50%細胞増殖抑制濃度 (IC₅₀) は、Hc 細胞に対する IC₅₀ の約 1/4~1/7 であり、HL は、肝臓がん細胞の増殖を選択的に抑制することが分かった。さらに、細胞内カスパーゼ-3 活性の蛍光イメージングにより、HL は、肝臓がん細胞に対して、カスパーゼ-3 の活性化を経て、アポトーシスを誘導することを明らかにした。

(II) 蛍光脂質含有 HL を用いた全反射顕微鏡による細胞膜への融合・蓄積の蛍光イメージングにより、HL は、肝臓がん細胞膜選択的に融合・蓄積することを明

らかにした。

(III) がん細胞膜の流動性と HL の制がん効果との関連性に関し、正常肝臓(Hc)細胞を含む 7 種類の細胞株について、膜流動性(1/P)と HL の制がん効果(1/IC₅₀)との間で、良好な相関性が得られた(図 B)。すなわち、“揺らぎ (流動性) の大きながん細胞ほど、HL のがん抑制効果が高くなること”が分かった。さらに、HL の融合・蓄積の度合いと膜流動性や制がん効果の間にも良好な相関性が得られた。これらの結果より、「膜の揺らぎの大きながん細胞は、流動性の小さな正常細胞と比べ、HL が融合・蓄積しやすく、顕著ながん抑制を示した」と考える。今後、*in vivo* での揺らぎと HL のがん抑制について検討する予定である。

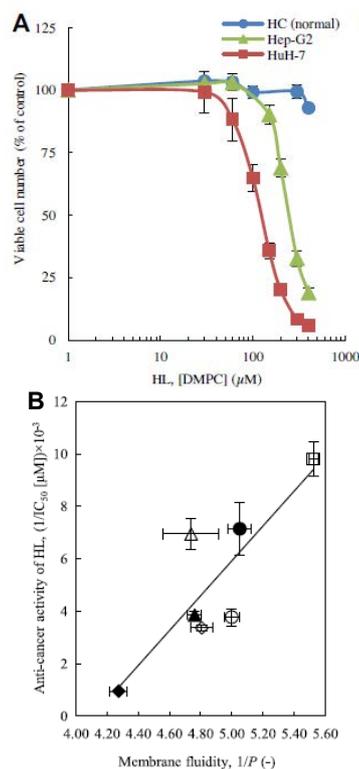


図 がん細胞膜の揺らぎを標的とする HL のがん抑制効果
 A: HL の肝臓がん細胞に対する選択的な増殖抑制効果
 B: 種々の細胞膜の揺らぎ (流動性) と制がん効果の相関性
 肝臓がん HuH-7(●), 肝臓がん HepG-2(▲), 正常肝臓 Hc (◆), 脳腫瘍 U251(○), 膵臓がん KP-4(△), 白血病 MOLT-4(□), 星細胞腫 Marcus(◇) 細胞.
 $r = 0.85, p < 0.01$

参考文献

- [1] R. Ueoka et al., *Curr. Pharm. Des.* **17**, 1709-1719 (2011).
 [2] K. Nakano et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **12**, 3251-3254 (2002).

業績紹介：べん毛のⅢ型分泌装置内の基質認識切り替えタンパク質 FliKのNMR構造解析

楯 真一

(広島大理学研究科・A02 公募研究代表者)

論文題目: "The NMR Structure of FliK, the Trigger for the Switch of Substrate Specificity in the Flagellar Type III Secretion Apparatus"

著者: Shino Mizuno, Hirokazu Amida, Naohiro Kobayashi, Shin-ichi Aizawa and Shin-ichi Tate

雑誌巻号: *J. Mol. Biol.* **409**, 558-573 (2011)

多くの細菌は、溶液中でべん毛を動かすことで移動している。べん毛は基部体、フック、フィラメントの3つの基礎部分から構成されており、細胞内から細胞外へと伸長していく。基部体とフィラメントをつなぐフックは、長さがFliKタンパク質により約55 nmと制御されており、その情報がFlhBに伝わりフックタンパク質からフィラメントタンパク質へと輸送基質が変化する。FliKは、フック長制御と基質認識切り替えの二機能性タンパク質である。本研究では、NMRを用いてFliKの構造決定を行い、基質認識切り替え機構を調べた。

本研究では、*S. Typhimurium*由来のFliKを用い、タンパク質限定分解と構造予測ソフトPONDRの情報からFliK_{full}、GST-FliK_N(1-147)、FliK_C(204-370)の3通りの試料を作成した。¹H-¹⁵N HSQCスペクトルは、FliK_{full}では、約70%のアミドプロトンの信号が8.4ppm付近に集中しており、FliK_Nでも同様に信号の大きな分散が見られなかった。これは、安定な構造を保っていないためと考えられる。一方、FliK_Cは、よく分散した信号を示した。構造情報を得るために、¹⁵N(¹H) hetNOE測定を行い、Pro253-Ser355の領域に安定な構造(FliK_C core domain)が存在することを確認し、NMR立体構造決定を行った。得られたFliK_C core domainの構造は、2本の α -ヘリックスと平行、逆平行それぞれ1組ずつで構成された β -シートを有している(図A)。その中の β 1- β 2間のループ2は、FliKと同様の機能を持つタンパク質の相同性検索により、LxPx₁x₂LGと高く保存されていることを我々は発見した。このモチーフのx₁とx₂には酸性アミノ酸が入り、FliK_CではLHPEELGとなる。また、ループ2内の*cis*-Pro296も配列解析より保存されており、

FliK_C core domainの構造安定性または基質認識切り替え時に重要な役割を持っていると考えられる。

我々は、Ⅲ型分泌装置内のFlhBのホモログであるYscUの結晶構造[1]を用いてFliKとの相互作用に重要なNPTHループのcleaved, uncleavedモデル構造を作成した。この二つの構造の差異はループが切断されることによって、表面に隠れていた塩基性残基が露出される点にある。FliK_Cと上記のFlhBモデル構造を用いて、ドッキングシミュレーションプログラムHADDOCKにより、変異体による活性情報を基にしてFliK:FlhB複合体のモデルを構築した(図B)。この結果、FliK_Cのループ2は、FlhBのNPTHループが切断されることでできた"basic cleft"に割り込むように立体相補的な相互作用を行っており、NPTHループの切断が基質認識切り替えに必要であることが示された。

本研究の成果は、べん毛形成において二機能性を示すタンパク質であるFliKの構造から、その基質認識切り替え機構に関する新たな知見を与えた。

参考文献

[1] Lountos GT et. al., *Protein Sci.* **18**, 467-74 (2009)

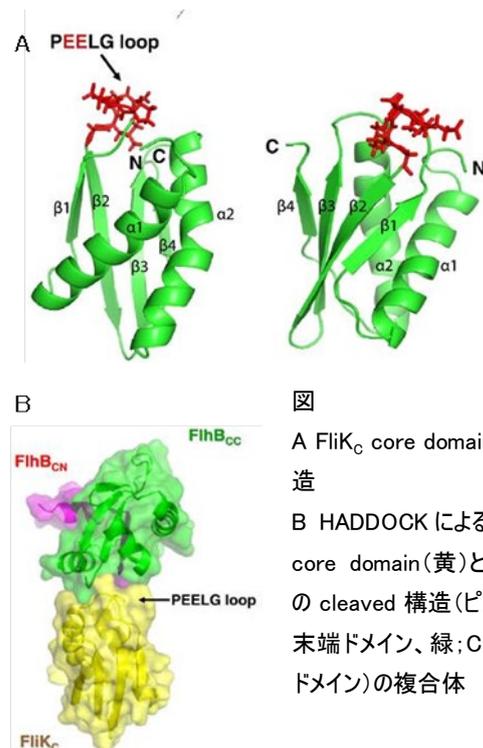


図
A FliK_C core domainの構造
B HADDOCKによるFliK_C core domain(黄)とFlhBのcleaved構造(ピンク: N末端ドメイン、緑: C末端ドメイン)の複合体



班友の今西氏が日本薬学会奨励賞を受賞

中野 実（富山大学大学院医学薬学研究部・A03 公募研究代表者）

平成 24 年 3 月 28 日（水）から 31 日（土）まで、北海道大学で開催された日本薬学会第 132 年会において、本新学術領域研究の班友である今西未来氏（京都大学化学研究所）が、平成 24 年度日本薬学会奨励賞を受賞されました。

今西さんの受賞タイトルは「人工 DNA 結合タンパク質のデザインと細胞機能制御への展開」です。今西さんは「金属イオン配位能」および「DNA 認識能」の 2 つの精密な分子認識能を有し、モジュール構造を

とって DNA 結合能を発揮するジンクフィンガーを鋳型として、新しい DNA 結合特性を有する人工タンパク質をデザインしました。DNA 結合には直接関与しないと考えられていたリンカー部分の重要性を示唆し、また、亜鉛イオン濃度に応答して構造形成と DNA 結合能をオン・オフできるスイッチ型タンパク質を創製しました。さらに、応用例として、特定のゲノム領域を標的とする人工転写因子をデザインし、概日リズムを司る時計遺伝子を制御することに成功しました。構造揺らぎを利用した機能制御など、本新学術領域研究の目的に合致した内容も含まれており、今後のさらなる研究の展開が期待されます。

平成 24 年度行事のご案内

今年度は下記の会議を予定しております。班員の皆様はご出席下さい。
詳細は別途お知らせいたします。

◆ 平成 24 年度合同班会議

日時：平成 24 年 7 月 29 日（日）午後～8 月 1 日（水）午前
会場：作並温泉 ゆづくし Salon 一の坊

◆ 新学術「水を主役とした ATP エネルギー変換」との合同シンポジウム

日時：平成 24 年 9 月 14 日（金）、15 日（土）
会場：大阪ガーデンパレス（予定）

◆ 第 6 回公開シンポジウム

日時：平成 24 年 12 月 5 日（水）、6 日（木）
会場：京都テルサ