

業績紹介：分岐型糖鎖のコンフォメーション揺らぎの評価

加藤晃一

(自然科学研究機構・A01 計画研究代表者)

論文題目："Application of Paramagnetic NMR-Validated Molecular Dynamics Simulation to the Analysis of a Conformational Ensemble of a Branched Oligosaccharide"

著者：Ying Zhang, Sayoko Yamamoto, Takumi Yamaguchi, and Koichi Kato

雑誌巻号：Molecules, 17, 6658-6671 (2012)

糖鎖は、他の生命鎖にはみられない分岐構造を有し、その運動性の高さと相まって、溶液中で多様な立体構造を示す。私たちはこれまでに、ランタニドイオンを用いた常磁性プローブを活用し、NMR 法と分子動力学 (MD) 計算を組み合わせた糖鎖の動的立体構造解析法を開発してきた[1]。本研究では、この手法を分岐型糖鎖 GM2 (NeuAc α 1-3(GalNAc β 1-4)Gal β 1-4Glc) に応用し、そのコンフォメーションを明らかにするとともに、分岐構造が糖鎖の立体構造の揺らぎに与える影響を評価した。

スフィンゴ糖脂質の一つであるガングリオシド GM2 の糖鎖構造は、シアル酸残基 (NeuAc) を含む四糖からなり、直鎖型三糖である GM3 糖鎖 (NeuAc α 1-3Gal β 1-4Glc) にアセチルガラクトサミン残基 (GalNAc) が連結した分岐構造を有している (図 1)。本論文では、GM2 糖鎖について、常磁性 NMR 法と MD 計算による解析を行い、水溶液中の糖鎖の立体構造を明らかにした。すなわち、本糖鎖の還元末端へ常磁性ランタニドイオンを導入し、擬コンタクトシフトの実験値と理論値を比較することで、その配座空間を決定した。この結果を、既に報告した GM3 糖鎖の結果と比較したところ、シアル酸残基のグリコシド結合がとりうるコンフォメーションは、両者の間で有意に異なることが明らかとなった (図 1)。すなわち、GM2 糖鎖のシアル酸残基が限定された配向を示すのに対し、分岐のない GM3 糖鎖では対応する部位の内部運動の自由度が大きいと、より多様な立体構造を示した。さらに GM2 糖鎖の安定構造を詳細に解析したところ、糖残基間の水素結合によって取り得る構造が制限されることが示唆された (図 2)。

このように私たちは、常磁性プローブを用いた動的立体構造解析を分岐型糖鎖へと拡張することに成功し、糖残基間の相互作用を通じて立体構造の揺らぎが制御されている様子を捉えることができた。本手法を活用することで、今後より巨大で複雑な分岐構造をもった糖鎖について、その揺らぎを含めた詳細な立体構造情報を得ることができるものと期待される。

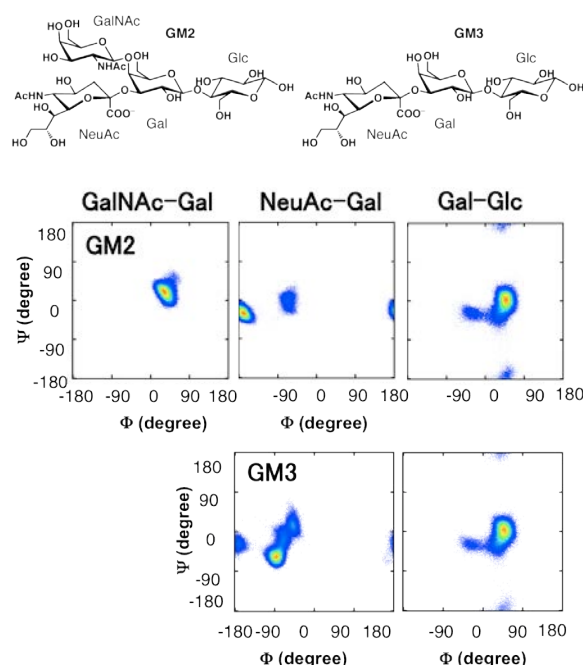


図 1. GM2, GM3 糖鎖の構造 (上) およびそのコンフォメーション空間 (下)。

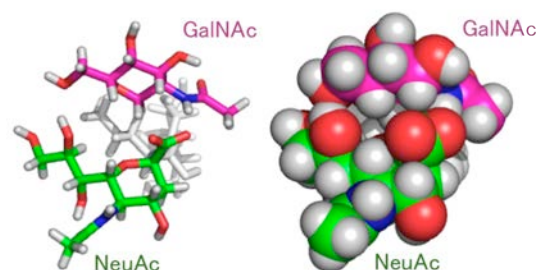


図 2. GM2 糖鎖の安定構造。シリンダー (左) およびスペースフィリングモデル (右)。

参考文献

[1] S. Yamamoto et al., *Chem. Commun.* **48**, 4752–4754 (2012)

業績紹介：水モデルのチューニングによる
蛋白質の回転拡散と NMR スペクトル密度の再現

北尾彰朗

(東京大学分生研・A01 公募研究代表者)

論文題目："Water model tuning for improved reproduction of rotational diffusion and NMR spectral density"

著者：Kazuhiro Takemura and Akio Kitao

雑誌巻号：J. Phys. Chem. B. **116** (22), 6279-87 (2012)

これまでに我々は、分子動力学シミュレーションと NMR 緩和より得られるスペクトル密度が一致しない原因として、溶液中の蛋白質の回転拡散が速いこと、また更にその原因として、蛋白質および水モデルの並進拡散は、シミュレーションを行う箱の大きさに依存することを指摘してきた[1]。

今回紹介する研究において、我々は、箱の大きさ依存に関する修正を入れた水モデルの拡散係数を実験値に合わせた時、蛋白質の回転拡散も再現できることを予測した。予測に基づき、SPC/E モデルの結合長を 1% 長くしたモデル (SPC/E_b) を構築し、SPC/E_b を水モデルとして用いることにより、蛋白質の回転緩和時間を再現できることを示した。

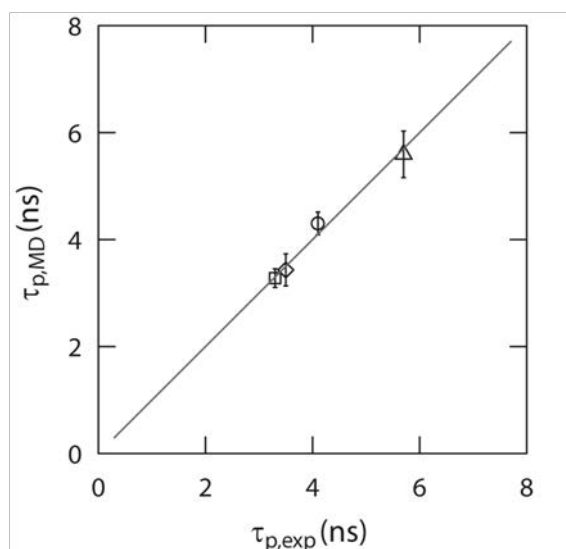


図1 MDシミュレーションと NMR 緩和より得られる蛋白質の回転緩和時間 (○ユビキチン、◇BPTI、◇プロテイン G、△バースター C40/82A)

SPC/E_b モデルを用いると、蛋白質の回転緩和時間のみでなく、NMR 緩和より得られるスペクトル密度を再現できることをユビキチンおよびプロテイン G に関して示した。従来までは、蛋白質の外部運動と内部運動を別々に取り扱う手法がスペクトル密度を再現する方法として用いられていたが、外部運動と内部運動を別々に記述する必要、またあらかじめ外部運動に関する情報が必要であり、蛋白質の柔軟性や異方性が大きい場合は取り扱いが困難になることが考えられる。しかし、SPC/E_b モデルを用いる本手法では、ある程度の異方性を有するプロテイン G のスペクトル密度を再現しており、蛋白質の異方性も含めた溶液中の振る舞いを再現できることを示した。

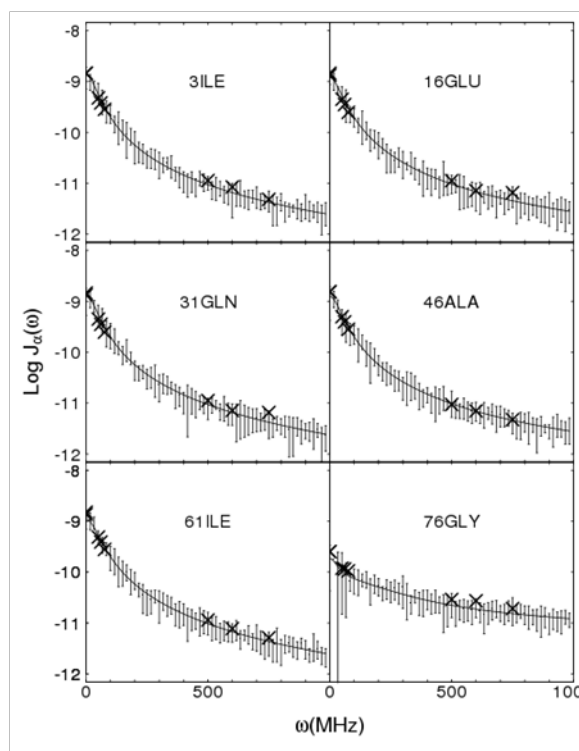


図2:MD シミュレーションと NMR 緩和 (×) より得られたスペクトル密度の比較

参考文献

[1] Kazuhiro Takemura and Akio Kitao, J. Phys. Chem. B, **111**, 11870 (2007).

業績紹介：生体膜の膜融合中間体の自由エネルギー計算

野口博司

(東京大学物性研究所・A03 公募研究代表者)

論文題目："Line tension of branching junctions of bilayer membranes"

著者：Hiroshi Noguchi

雑誌巻号：Soft Matter 8, 3146-3153 (2012)

生体膜の融合は膜動輸送などの生体機能や、ハイブリットリポソームのがん細胞への導入などにおいて、重要な素過程であるが、その経路やメカニズムはまだよくわかっていないことが多い。3通りの融合経路がシミュレーションでこれまでに得られているが、経路を決める要因は理解できていない[1]。本研究では、融合経路に見られる準安定な中間体の一つである hemifusion diaphragm (HD) 中間体に注目し、その自由エネルギーを分子シミュレーションにおいて計算する方法を提案した。計算で得られた値は Hamm-Kozlov の傾き模型[2]で解析的に求めた値と良い一致を示す。

HD 中間体では、もとの2つの二分子膜の内膜が接合して新しい二分子膜を形成するが、もとの2つの二分子膜との結合するところで膜が分岐している。この HD 構造が十分大きければ、この構造を形成するための自由エネルギーは分岐線の線張力で定義できる。本研究では、この線張力を図 1(a)に示す周期的な生体膜の六方格子を用いて計算した。脂質分子としては、最近我々が開発した粗視化分子模型[3]を用いた。

線張力 Γ は圧力テンソル $\mathbf{P}$ を用いて、

$$\Gamma_{br} = \left\{ (P_{xx} + P_{zz}) \frac{a_{xy}}{a_L} - P_{yy} \right\} \frac{V}{2L_y}$$

と表すことができる。V は図 1 (a)中の直方体の箱の体積、 L_y は奥行き方向の長さである。 a_{xy} と a_L は実際に一分子が占める面積と六方格子上的面積であり、膜が厚みを持つために必要な補正項である。 a_{xy} は中央の水平の膜から計算できる。

Helfrich の曲げ弾性理論に脂質分子の傾斜の自由度を加えた Hamm-Kozlov の傾き模型[2]を用いて、解析的にも線張力を求めた。図 1(b)に示すように、シミュレーションと理論の結果は良い一致を示す。

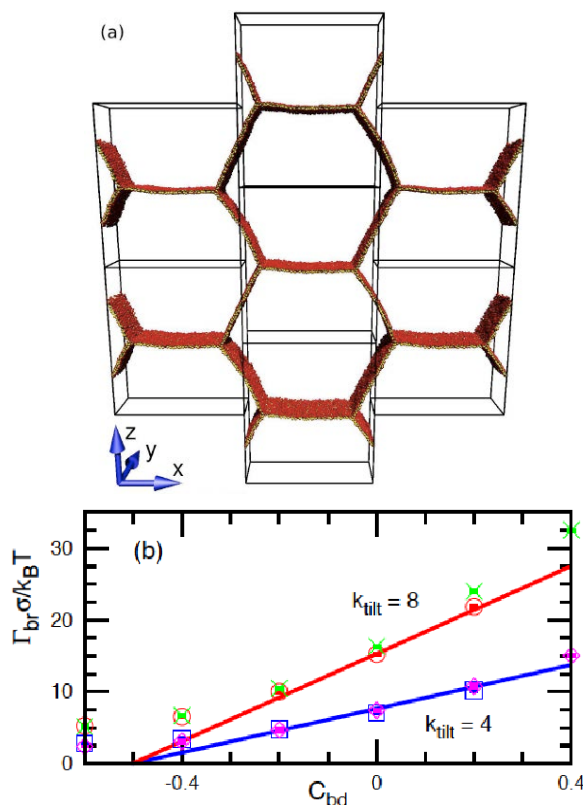


図 1 二分子膜の分岐の線張力 Γ 計算。(a) 周期的六方格子構造の二分子膜。(b) 線張力 Γ の単分子膜の自発曲率に対する依存性。記号がシミュレーション結果を実線が理論値を表す。

疎水基が親水基に比べて相対的に大きい脂質分子（単分子膜が負の自発曲率をもつ）では、分岐は低い線張力を持ち、HD 中間体の形成に必要な自由エネルギーは少ないことがわかった。今後、stalk 中間体など他の中間構造と準安定状態間のエネルギー障壁の大きさを調べていく予定である。また、ハイブリットリポソームのように二成分の界面活性剤における脂質膜の構造安定性についても研究を進めている。

参考文献

- [1] 野口博司, アンサンブル 57, 1-4 (2012).
- [2] M. Hamm and M. M. Kozlov, Eur. Phys. J. B 6, 519-528 (1998).
- [3] H. Noguchi, J. Phys. Chem. Phys. 134, 055101 (2011).

寺内グループの大山克明氏が日本生化学会近畿支部例会優秀発表賞を受賞

寺内一姫（立命館大学・A02 公募研究代表者）

平成 24 年 5 月 19 日（土）に、京都大学宇治キャンパスで第 59 回日本生化学会近畿支部例会が開催されました。真新しい“おうばくプラザ”をメイン会場として、モーニングレクチャー、一般講演、ポスター発表、そして「結晶構造から生化学へ―結晶構造を利用したタンパク質の機能解析―」と題したシンポジウムが開かれ、一日のみの会期でしたが大変充実した一日を過ごすことができました

すべての発表者は、口頭とポスターの両方で行うという方針のもと、60 余の演題による研究発表が行われました。寺内の研究室からは、修士課程 1 年生の大山克明君が「シアノバクテリア時計タンパク質 KaiC の動態解析」という演題で、13 分間の講演とポスター発表を行いました。全参加者による投票により、5 件の「優秀発表賞」が決まり、懇親会席上で表彰されると聞いていました。大山君は今回が初めての学会発表という修士 1 年生の学生であり、私たちが表彰されることなど全く考えておりませんでした。ところが、思いがけず、懇親会で名前が呼ばれ、優秀発表賞の一人として表彰されることとなりました。

私たちは、シアノバクテリアの時計タンパク質 KaiC の生化学的解析により、24 時間周期で揺らぐタンパク質の仕組みを明らかにすることを目的として本領域に参画しています。本研究では、KaiC のリン酸化と複合体形成を解析し、その結果から中心振動子と考えられている KaiC の時間同調のしくみを解く手がかりを得ることができました。今後、さらに詳細な解析をすすめ、24 時間周期で揺らぐタンパク質の仕組みの解明をめざし、タンパク質が時間を計るとはどういうこと

なのかを明らかにしていきたいと考えています。

本研究はもちろん、大山君の 4 年生での卒業研究の成果ですので、まだまだ多くの課題があります。今回は、参加者の皆様が彼の研究に対する熱意と努力を理解してくださり、今後に期待するという意味を込めて票を投じてくださったものと理解しています。大山君の研究者人生はまだ始まったばかりですので、今後の彼の努力とさらなる成長に期待し、応援していきたいと考えています。



左：大山克明君 右：寺内一姫
京都大学宇治キャンパスおうばくプラザにて

鈴木グループの Cao Ke さんが中国政府より 2011 Chinese Government Award for Outstanding Self-financed Students Abroad を受賞

鈴木 元 (名大院医・A03 公募研究代表者)

中国政府は 2003 年より、中国国家留学管理委員会より Chinese Government Award for Outstanding Self-financed Students Abroad を授与しております。本年度、私とともに研究をいたしております大学院生 Cao Ke (曹科) さんが、38 名の受賞者の一人に選ばれ、賞状および奨学金 6000 ドルが授与されましたのでご報告申し上げます。

Cao Ke さんは中国湖南省出身で中南大学を 2004 年に卒業後、同大学修士課程に進学しました。その後 2006 年 9 月に来日し、特別研究員として一年間兵庫医科大学で肝臓がんの分子標的に関する研究を行いました。2007 年 11 月より名古屋大学に外国研究員として所属し、2008 年より同大学博士課程に進学しております。この春めでたく博士課程を修了し、現在はポストドクとして、論文を投稿するため最後の努力をしている最中であります。

これまで Cao Ke さんは、日本留学中ヒト細胞中で、DNA ポリメラーゼ α の塩基取り込み揺らぎに関する研究を行いました。また、microRNA が癌の低栄養時、低酸素状態時に生存シグナルを伝える必須の役割を果

たしていることを示しました。現在の Cao Ke さんの主たる研究内容は「癌の分子標的を用いた治療法の開発」です。すでに、Cao Ke さんはハイブリッドリボソームを用いて、細胞死に伴い細胞内セラミドの増加と細胞膜カベオラ構造の変化が観察されることを明らかにしております。これら一連の業績が認められ、多数の応募者の中から今回の受賞に至りました。

Cao Ke さんは、本年 6 月いっぱいをもって中国に帰国し、中南大学第 3 附属病院腫瘍内科に勤務する予定となっております。在日中、班員の皆様には班会議、あるいは個別の打ち合わせを通じて多くの励ましや大切なコメントをいただきました。この場を借りて厚くお礼を申し上げます。また、参加させていただいた奈良の公開シンポジウムにおきましては、Tom Cech 先生と一緒に東大寺を観光できたことが最も「光栄な思い出」になったということです。公開シンポジウムをご企画いただきました関係者の皆様にも感謝の気持ちを伝えてほしいということでした。

今後は臨床と研究の傍ら、研究協力等を通じて日本との友好の橋渡しを行いたいとのことです。中国帰国後も在日中と変わらぬ温かい励ましを賜りますようお願い申し上げます。



Award を受賞し、中国教育部長袁貴仁氏と記念撮影を行う Cao Ke さん
(平成 24 年 5 月 25 日 (金) 東京中国大使館)