

業績紹介：長時間一分子観測による変性タンパク質のエネルギー地形解析

高橋 聡

(東北大多元研・A01 公募研究代表者)

鎌形清人

(東北大多元研・A01 公募研究連携研究者)

論文題目: "Long-term observation of fluorescence of free single molecules to explore protein-folding energy landscapes"

著者: Kiyoto Kamagata, Toshifumi Kawaguchi, Yoshitomo Iwahashi, Akinori Baba, Kazuya Fujimoto, Tamiki Komatsuzaki, Yoshihiro Sambongi, Yuji Goto, and Satoshi Takahashi

雑誌巻号: *J. Am. Chem. Soc.* **134**, 11525-11532 (2012)

変性したタンパク質は無数の構造の集合体であり、たえずゆらぎ運動を行うと考えられる。そのため、ある一分子の変性タンパク質を継続して観察するならば、この分子がさまざまな構造を経巡る様子が追跡できるはずである。これは、タンパク質のフォールディング過程の解明に必須の情報となるに違いない。

私達は、このような期待に基づいて、変性したタンパク質を一分子レベルで観察する研究プロジェクトを継続している。我々は、第一に蛍光信号を観測する方法について、第二に得られた時系列データの解析方法について、新しい手法を開発することを志した。

第一のデータ観察方法の開発では、色素をラベルしたタンパク質が、自由拡散しながら蛍光を発する様子の継続観察を目指した。2007年に報告した手法[1]に根本的な改良を加え、低倍率でありながら集光効率の大きい球面鏡を使った光学系を開発した。これにより、比較的大きい観察体積の中を、セルの壁面との相互作用の影響無しに運動する分子の観察がはじめて可能になった。さらに、一分子を長時間観察できるように、圧力制御方式のポンプを使ってセル中の試料溶液の流れを止める技術を確立した。そのほか、試料の調整方法、試料セルの作成技術、時系列データの抽出方法などについて、さまざまな課題を克服する必要がある。

第二の時系列データ解析方法の開発では、局所平衡状態解析 (LES 解析) と名付けられた新しい解析技術を共著者である小松崎らが開発した[2]。この手法を用

いることで、一分子時系列信号から変性タンパク質の特性を再現する自由エネルギー空間を構成することが可能になった。

本研究では、試料タンパク質として緑膿菌由来のシトクロム *c* を用いた。C 末端付近に色素をラベルした試料を用意し、蛍光強度の変動を一分子レベルで観察したところ、タンパク質の構造変化を現す蛍光強度の変動が多数観測された。得られた時系列データを、LES 解析で定量的に解析した結果、複数の局所平衡状態とその間の遷移を特定することができた。さらに、遷移回数や各状態の滞在時間を調べることで、試料の自由エネルギー地形を作製できた (図 1)。

開発した一分子蛍光測定と自由エネルギー地形解析方法は、多くの系への応用が可能である。開発した手法により他のタンパク質のフォールディング特性や機能特性を解明する研究が期待される。一方で、図 1 に示された変性タンパク質の状態数は、我々が期待していた数よりも驚くほど少ない。時系列データの時間分解能や、タンパク質ラベル方法の工夫による構造情報量の向上など、研究手法のさらなる深化が必要である。

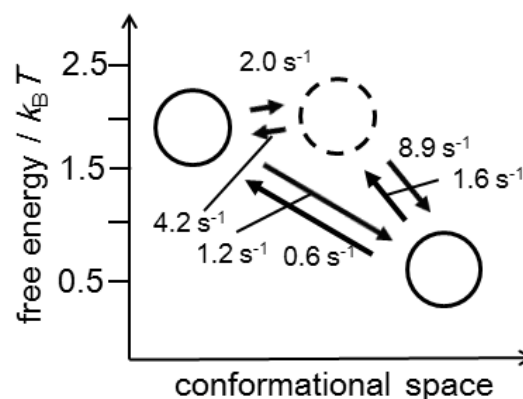


図 1: 緑膿菌由来シトクロム *c* の変性状態におけるエネルギー地形 (紹介論文の Fig. 4 を改変した)

参考文献

- [1] M. Kinoshita et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**, 10453-10458 (2007).
- [2] A. Baba and T. Komatsuzaki, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**, 19297-19302 (2007).

業績紹介：酸化 LDL 受容体の 2 量体を安定化するインターロック構造

楯 真一

(広島大学理学研究科・A02 公募研究代表者)

論文題目："Structural implication for the impaired binding of W150A mutant LOX-1 to low density lipoprotein, OxLDL"

著者：Shogo Nakano, Mamoru Sugihara, Risato Yamada, Katsuo Katayanagi, Shin-ichi Tate

雑誌巻号：Biochim. Biophys. Acta 1824, 739-749 (2012)

酸化 LDL(OxLDL)は動脈硬化発症を誘導する主たる原因物質である。OxLDL は血管内皮細胞上の酸化 LDL 受容体(scavenger receptor)に結合することで、内皮細胞に機能不全を誘導し、動脈硬化病巣（プラーク）形成に至る反応カスケードを促進する。つまり、OxLDL の酸化 LDL 受容体への結合は動脈硬化発症のスイッチとなる過程であり、その分子認識機構に興味を持たれている。

私達は、酸化 LDL 受容体の 1 つである LOX-1 の立体構造を報告した。これは、酸化 LDL 受容体の初めての構造の例であり、現時点では唯一の構造例となっている[1]。立体構造と同時に、その認識機構の詳細も解析してきており、LOX-1 が細胞膜状でクラスターを形成することが重要であることも明らかにしてきている。LOX-1 は、ホモ 2 量体を基本単位として細胞膜状で複数の（最低 3 つのホモ 2 量体からなる）受容体からなるクラスターを形成することで初めて特異的な OxLDL 認識が可能である [2]。

これまでの一連の研究で、基質認識部位とは分子構造上反対側に位置する W150 が A に置換された変異体が劇的な活性の低下を示すことを見いだしていた。今回の研究では、W150A 変異によりどのような受容体構造変化が生じているかを結晶構造解析により明らかにした。

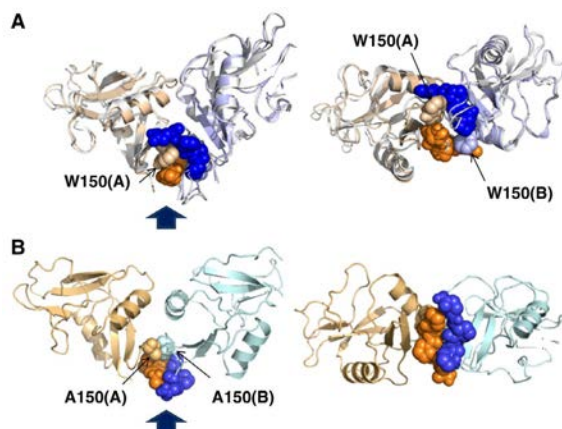
解析の結果、W150 がホモ 2 量体構造を安定化するために非常に緊密な分子間相互作用を実現していること、また、その特異な相互作用により、LOX-1 の基質結合部のホモ 2 量体構造が OxLDL に最適になるように保たれていることが明らかになった。

W150 は疎水性部の中心に位置するが、変異による

近接残基への構造変化の影響はきわめて少なかった。このことは、NMR スペクトル上のわずかな変化としても確認された。W150A 変位によりどのようなホモ 2 量体形成能の変化が生じるかをドッキングシミュレーションを併用して検討した。

野生型では W150 の W 側鎖がもう 1 つのサブユニットの疎水性残基からなるキャビティに対して立体相補的に挿入して強固なインターロック構造を形成している。これに対して、W150A 変異体では相互作用エネルギーの似通った多様な相互作用が可能となり、安定に野生型と同様な 2 量体構造を形成し得ないことが示唆された。

上記のシミュレーションとすでに得ている相互作用データ・2 量対形成能のデータ[2]から、LOX-1 は分子 W150 による強固なインターロック構造により安定なホモ 2 量体を形成することが OxLDL 認識に必要であるということが分かった。



図：LOX-1 の 2 量体構造を安定化する W150 を介したインターロック構造。(A) 野生型 (B) W150A 変異体で可能となるホモ 2 量体構造の 1 つ。

参考文献

- [1] I. Ohki, T. Ishigaki, T. Oyama, S. Matsunaga, Q. Xie, M. Ohnishi-Kameyama, T. Murata, D. Tsuchiya, S. Machida, K. Morikawa, S. Tate, *Structure* (Camb.) 13 (2005) 905–917.
- [2] I. Ohki, H. Amida, R. Yamada, M. Sugihara, T. Ishigaki, S. Tate, *Biochim. Biophys. Acta* 1814 (2011) 345–354.

業績紹介：焼酎蒸留粕の肝臓がんモデルマウスに対する治療効果

上岡龍一

(崇城大学応用生命科学・A03 計画研究代表者)

論文題目："Anticancer effects of residual powder from barley-Shochu distillation remnants against the orthotopic xenograft mouse models of hepatocellular carcinoma *in vivo*"

著者：Masahiro Ohgidani, Hideaki Ichihara, Koichi Goto, Yoko Matsumoto, Ryuichi Ueoka

雑誌巻号：Biol. Pharm. Bull. **35**, 984-987 (2012).

本格焼酎は、麴に水と酵母を加えて発酵させたもろみに主原料（蒸した米、麦、芋など）を仕込み、発酵成熟させたもろみを単式蒸留機で蒸留して作られる。焼酎もろみを蒸留した後に残る焼酎蒸留粕（焼酎粕）は、年間十数万トン排出されており、主な処理方法として、海洋投棄、堆肥化、飼料化、焼却といった処理がなされてきた。2007 年以降、焼酎粕の海洋投棄が原則禁止された。そのため、海洋投棄に代わる処理方法、または有効利用法の開発が求められている。

焼酎粕に含まれる成分は、原料である米、麦、芋や酵母菌体、麴菌体などに由来したタンパク質、脂質、糖分、有機酸、繊維質、ミネラル、ビタミン類など有効成分を多く含んでおり、バイオマス有効利用の観点から、焼酎粕の医薬分野での基礎研究がおこなわれている。本研究では、焼酎粕の種々の培養がん細胞に対するがん抑制効果[1]、正常ラットに対する免疫賦活効果[2]を明らかにした。さらに、特有の発酵臭を減らし、吸湿性を抑えるため、独自に開発した各焼酎粕パウダー(PSDR: powders from Shochu distillation remnants)のがん細胞の増殖抑制効果[3]および美白効果[4]などを報告している。

本研究では、肝臓がん(HCC: hepatocellular carcinoma)原発モデルマウスに対する麦焼酎粕パウダー(barley-PSDR)の治療効果を検討した。以下に得られた興味深い知見を示す。

① 免疫不全 (SCID: Severe Combined Immuno Deficiency) マウスの肝臓に、ヒト HCC(HepG2)細胞を同所移植して、HCC モデルマウスを作成し、barley-PSDR の 21 日間の経口反復投与後に肝臓を取り出し、肝臓重量、ヘマトキシリン-エオシン染色により治療効果を検討した。未治療群の肝臓においては、

肝臓がんの増殖によるさまざまな異常所見が見られたが、barley-PSDR 治療群では、がん細胞を移植していないノーマルマウスの肝臓とほぼ変わらず、顕著な治療効果が確認された (図 1)。

② HCC モデルマウスに対して barley-PSDR を経口投与し、肝臓組織切片を作成し TUNEL 法により検討したところ、barley-PSDR 治療群では、多くのアポトーシス細胞が確認された。

③ HCC モデルマウスに対して barley-PSDR を経口投与し、延命効果を検討したところ、barley-PSDR 治療群では、170% ($p < 0.01$)の顕著な延命効果が確認された。また、投与期間中に体重減少などの副作用は全くなく、barley-PSDR の安全性が確認された。

以上のように、HCC に関して、天然物質である barley-PSDR による副作用のない顕著な治療効果が動物レベルでの組織学的分析により確認されたことは、非常に興味深い。



図 1. 肝臓がん(HCC)モデルマウスに対する麦焼酎粕パウダー (barley-PSDR) の治療効果

未治療群では肝臓がんの増殖が見られたが、barley-PSDR 治療群では、がん細胞を移植していないノーマルマウスの肝臓とほぼ変わらなかった。

参考文献

- [1] Y. Kadota et al., J. Chem. Eng. Japan, **38**, 154-157 (2005).
- [2] K. Funamoto et al., J. Health. Sci., **54**, 287-293 (2008).
- [3] M. Ohgidani et al., J. Biosci. Bioeng., **114**, 104-109 (2012).
- [4] M. Ohgidani et al., Food Chem., **132**, 2140-2143 (2012).

業績紹介：焼酎蒸留粕パウダーのヒト肝臓がん細胞に対する増殖抑制機構

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："Residual powders from *Shochu* distillation remnants induce apoptosis in human hepatoma cells via the caspase-independent pathway"

著者：Masahiro Ohgidani, Yuji Komizu, Koichi Goto, Ryuichi Ueoka

雑誌巻号：J. Biosci. Bioeng., 114, 104–109 (2012)

焼酎もろみを蒸留した後に残る焼酎蒸留粕（焼酎粕）は、年間十数万トン排出されており、主な処理方法として、海洋投棄、堆肥化、飼料化、焼却といった処理がなされてきた。2007年以降、焼酎粕の海洋投棄が原則禁止された。そのため、海洋投棄に代わる処理方法、または有効利用法の開発が求められている。

焼酎粕に含まれる成分は、原料である米、麦、芋や酵母菌体、麹菌体などに由来したタンパク質、脂質、糖分、有機酸、繊維質、ミネラル、ビタミン類など有効成分を多く含んでおり、バイオマス有効利用の観点から、焼酎粕の医薬分野での基礎研究がおこなわれている。本研究室では、特有の発酵臭を減らし、吸湿性を抑えるため、独自に開発した焼酎粕パウダーのがん抑制効果[1]、免疫賦活効果[2]、および美白効果[3]などを報告している。

本論文では、各（麦、芋、米）焼酎粕パウダーのヒト肝臓がん細胞に対する増殖抑制機構について検討し、以下に示す新しい知見が得られた。

(I) *in vitro*での増殖抑制試験から、麦焼酎粕パウダーがヒト肝臓がん細胞株（HepG2、HuH-7）に対して、最も顕著な細胞増殖抑制効果を示した。

(II) 細胞死の解析より、各焼酎粕パウダーは、ヒト肝臓がん細胞に対して、アポトーシスを誘導することを明らかにした。さらに、麦焼酎粕パウダーのアポトーシス誘導率は、最も顕著な効果を示した。

(III) アポトーシス誘導メカニズムを検討するため、カスパーズの関与について調べた。その結果、麦焼酎粕パウダーは、肝臓がん細胞に対して、カスパーズ非依存的にアポトーシスを誘導することが分かった。さらに、ミトコンドリアの関与について、麦焼酎粕パウ

ダーを処理した肝臓がん細胞におけるミトコンドリアの膜電位の低下、シトクローム C の放出、およびアポトーシス誘導因子(AIF)の核への移行（図）が観察された。これらの結果から、麦焼酎粕パウダーは、ヒト肝臓がん細胞に対して、カスパーズ非依存的ミトコンドリア経路でアポトーシスを誘導することが強く示唆された。これらの結果より、麦焼酎粕パウダーのヒト肝臓がん細胞に対する増殖抑制効果およびアポトーシス誘導機構が細胞レベルで明らかとなった。最近、麦焼酎粕パウダーの肝臓がん細胞移植モデルへの治療効果を報告している[4]。以上のことより、焼酎粕の医薬分野への応用へ向けた基礎的な知見が得られた。

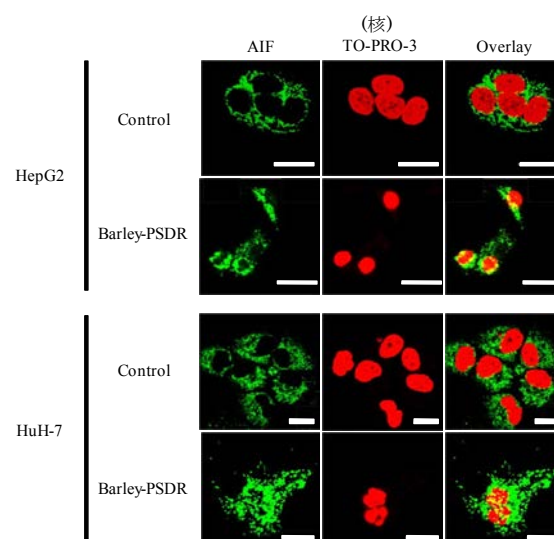


図 麦焼酎粕パウダー処理したヒト肝臓がん細胞内でのアポトーシス誘導因子(AIF)*の核への移行

Control(未処理)、麦焼酎粕パウダー(Barley-PSDR)、重ね合わせ(Overlay)

*AIF(アポトーシス誘導因子)は、ミトコンドリア膜より放出され、カスパーズ非依存的に核へ移行し、アポトーシスを誘導することが分かっている。

参考文献

- [1] Y. Kadota et al., *J. Chem. Eng. Japan*, **38**, 154-157 (2005).
- [2] K. Funamoto et al., *J. Health. Sci.*, **54**, 287-293 (2008).
- [3] M. Ohgidani et al., *Food Chem.*, **132**, 2140-2143 (2012).
- [4] M. Ohgidani et al., *Biol Pharm. Bull.*, **35**, 984-987 (2012).

業績紹介：Berberine の悪性リンパ腫に対する抗腫瘍効果

岡田誠治（熊本大学エイズ学研究センター・A03 公募研究代表者）

論文題目："Antitumor effect of berberine against primary effusion lymphoma via inhibition of NF- κ B pathway"

著者：Hiroki Goto, Ryusho Kariya, Masako Shimamoto, Eriko Kudo, Manabu Taura, Harutaka Katano and Seiji Okada

雑誌巻号：Cancer Sci. 103, 775-781 (2012)

原発性滲出液リンパ腫(Primary Effusion Lymphoma: PEL)は、リンパ節や節外臓器に明らかな腫瘍を形成せず、体腔内(胸腔・腹腔・心膜腔)に腫瘍細胞が浮遊した状態で発症する非ホジキン悪性リンパ腫である。HIV-1 感染者や臓器移植後の免疫不全患者に特異的に認め、HHV-8 によるウイルス発がんが原因とされる。従来の化学療法に抵抗性で、生存期間中央値は6ヶ月未満と予後は極めて不良であり、新たな治療法の開発が望まれている。

Berberine は、キハダやオウレンなどの植物に含まれるベンジルイソキノリンアルカロイドの一種で、古来より Chinese herb として使用され、抗菌・抗炎症・中枢抑制・血圧降下などの薬理作用があるとされる。近年、Berberine の様々な腫瘍に対する抗腫瘍効果の報告があり、Berberine の PEL に対する治療効果について検討した。

Berberine は3種類の PEL 細胞株(BCBL-1、BC-1、BC-3) に対して MTT アッセイで濃度依存的な細胞増殖抑制効果を認めた。フローサイトメトリーを用いた解析からカスパーゼを介したアポトーシスの誘導が明らかとなり、DNA ラダー法でアポトーシスに伴う腫瘍細胞の断片化を認めた。ウェスタンブロッティングで NF- κ B 経路上流の IKK(I κ Bkinase)リン酸化の阻害及びそれに引き続く I κ B の蓄積・I κ B のリン酸化の阻害、核内での p65 の減少を確認した。EMSA(Electrophoretic Mobility Shift Assay)で NF- κ B と DNA の結合抑制を認めた。PEL では腫瘍細胞の生存に NF- κ B 経路の恒常的な活性化が関わっているとされ、Berberine は IKK を含めた NF- κ B 経路の抑制を介して PEL に対する抗腫瘍効果を認めることが明らかとなった。

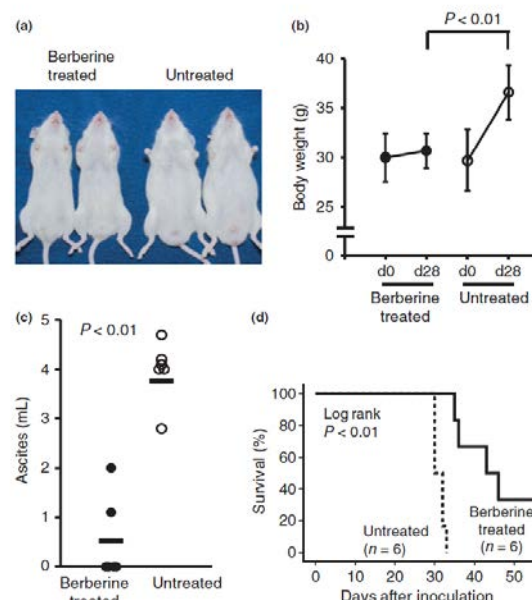


図1. PEL マウスモデルでの Berberine の抗腫瘍効果。(a), (b), (c). Berberine 投与により腹水量が減少している。(d). Berberine 投与群で生存率の改善を認めた。

さらに、Berberine の PEL モデルマウスにおける抗腫瘍効果の検討を行った。当研究室で樹立した高度免疫不全マウス(NOD/Rag-2/Jak3 二重欠損マウス)の腹腔内に PEL 細胞株 BCBL-1 を移植し、無治療群、Berberine 投与群にわけて 28 日間観察したところ、無治療群では、マウスへの腫瘍細胞の生着と腹水の貯留を認めた。Berberine 投与群では、腹水量の減少、遠隔臓器への浸潤抑制及び生存率の改善を認めた。

以上の結果から、Berberine は PEL 細胞に対して、*in vitro*、*in vivo* における抗腫瘍効果を認め、その作用機序として NF- κ B 経路の抑制を介していることが判明した。

Berberine のその他の薬理作用として、HIV-1 に対する抗ウイルス効果及び小胞体ストレス抑制を介した HIV プロテアーゼ阻害薬の毒性緩和効果の報告があり、PEL だけでなく HIV に対する抗ウイルス療法にも寄与する可能性がある。

今回の研究から、PEL に対して IKK を含めた NF- κ B 経路を標的とした治療は有効であり、Berberine は有望な治療薬剤の一つと考えられる。

業績紹介：ハイブリッドリポソームは細胞の脂質組成とカベオラ構造を変化させる

鈴木 元（名大院医・A03 公募研究代表者）

論文題目："Hybrid liposomes affect cellular lipid constituents and caveolae structures"

著者：Cao K, Tanaka K, Komizu Y, Tamiya-Koizumi K, Murate T, Ueoka R, Kyogashima M, Usukura J, Takahashi T, Suzuki M.

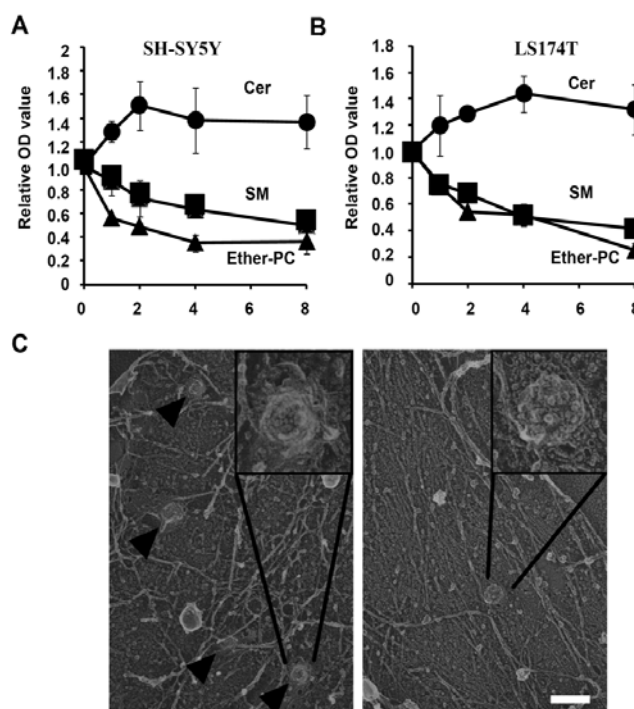
雑誌巻号：Bioorg. Med. Chem. Lett. 22, 1731-1733 (2012)

ハイブリッドリポソームはリン脂質とポリエチレングリコールよりなり、様々ながん細胞に対してアポトーシス作用を有する。我々は、このアポトーシス発現メカニズムを解明するため、ハイブリッドリポソーム投与の細胞脂質組成に与える影響を調べた。まず、種々カスパーゼ群の切断活性を調べたところ、アポトーシスは投与後 2 時間程度から活性化されると推測された。一方で、MALDI-TOF MS 解析により、投与したハイブリッドリポソームの主要構成成分 DMPC が速やかに細胞に取り込まれることを明らかにした。さらに、ハイブリッドリポソーム投与後 1 時間の時点ですでに細胞内のスフィンゴミエリンとエーテル型リン脂質の総量の減少およびセラミドの増加を観察した（図 A,B 参照）。これら脂質は全て death signal を含む様々な情報を細胞内へと伝達する機能を有する構造体「カベオラ」の構成成分である。さらに、脂質組成変化が、アポトーシスシグナル発生時間より早期に観察されるため、我々はハイブリッドリポソーム投与が細胞内脂質組成の変化を誘導し、カベオラ構造に何らかの変化を与えることを通じて細胞死を誘発したと推測した。

この仮説を検証するため、我々は、電子顕微鏡観察によりカベオラの構造変化を調べた。観察に際しては細胞固定によるアーティファクトを排除するため、従来の切片作成する方法ではなく、細胞を液体ヘリウムで急速凍結し、形質膜裏打ち構造を観察する新世代電子顕微鏡技術を用いた。すると我々の予測通り、ハイブリッドリポソーム投与により、典型的なカベオラ構造の消失が明らかとなった。さらに、投与前には観察

されなかった非典型的なカベオラと推定される構造体の出現が観察された（図 C 参照）。

以上の結果はハイブリッドリポソームが細胞膜の組成を変化させ、その結果細胞膜上のシグナル伝達機能体カベオラ構造も変化させていることを示している。細胞死のシグナルはこうした非典型的カベオラより発生している可能性がある。今後さらにアポトーシスの詳細なメカニズムを解明することにより、より抗がん効果の高いリポソームの開発やハイブリッドリポソームの臨床応用への道が開けるのではないかと。



図：A および B、SHSY5Y および LS174T 細胞におけるハイブリッドリポソーム投与後の細胞内スフィンゴミエリン（SM）、エーテル型 PC(Ether-PC)、セラミド（Cer）量の変化。横軸は時間。C、ハイブリッドリポソーム投与前（左）、投与後（右）の細胞膜カベオラ構造の変化。投与後においてはカベオラの数が減少し、その形も非典型的なものとなっていた。

業績紹介：酵素反応の触媒活性におけるタンパク質の柔軟さの役割

林 重彦

(京都大学理学研究科・A03 公募研究代表者)

論文題目: "Crucial role of protein flexibility in formation of a stable reaction transition state in an α -amylase catalysis"

著者: Takahiro Kosugi and Shigehiko Hayashi

雑誌巻号: *J. Am. Chem. Soc.* **134**, 7045-7055 (2012)

タンパク質の構造の柔軟さは、その顕著な分子機能を可能にする重要な特徴の一つである。しかしながら、酵素の化学反応ステップの触媒活性へのタンパク質ダイナミクスの影響は、依然、論争が続いている。一般的な触媒活性のモデルは、酵素に限らず、基質の化学反応遷移状態を安定化するように配置された構造を持つ触媒への結合によるものである（事前配向）。一方、タンパク質の基質結合部位の構造は不変のまま、遅い構造揺らぎダイナミクスの振る舞いを変える変異体により、化学反応ステップの時定数が変化する例が観測されており[1]、タンパク質ダイナミクスの触媒活性への関与が示唆されている。しかしながら、化学反応遷移状態の寿命（< ピコ秒）とタンパク質に特徴的なダイナミクス（ナノ〜ミリ秒）の時定数は大きく異なり、それらの相関の分子機構は明らかではない。

本研究では、そのようなタンパク質の特徴的なダイナミクスとして捉えられる構造緩和により、化学反応のエナジェティクスが変化し（再配向）、大きな触媒活性が得られることを、分子シミュレーションを用いて明らかにした。このとき問題となるのは、反応基質の電子状態が陽に変化する化学反応遷移状態の同定を、タンパク質の遅い構造緩和を考慮して行う必要があることであり、従来の分子シミュレーションの技術では困難であった。一方、最近、我々が開発した QM/MM RWFE-SCF 法は、この困難を解決し、タンパク質の大きな構造変化を含む自由エネルギー曲面上で、酵素反応の遷移状態を決定することを可能にしている[2]。

本研究で対象とする酵素反応は、好冷性 α アミラーゼのグリコシル結合加水分解である。図 1a に、基質の化学反応ステップに相関する近傍ループの構造変化を示す。反応遷移状態（TS）生成により、L2 ループ

の顕著なシフトが見える。この動きは線形応答揺らぎより大きく、タンパク質の特徴的な遅い（>10 ns）非線形構造緩和による。図 1b に示されるように、反応遷移状態生成（Glu220 と glucose 間のプロトン移動）の際の基質部分の小さな構造変化が伝播・増幅し、ループ部分の大きな構造変化と相関している。

図 1c にこの反応の活性化自由エネルギーを示す。ここで、図 1a に見られた L2 ループの再配向を考慮できる長い MD シミュレーションと、その構造緩和が含まれない短い MD シミュレーションの結果を比較したところ、L2 ループの再配向により活性化自由エネルギーが大きく減少することを見出した。詳細な解析により、L2 ループの遅い大きな再配向が、反応遷移状態生成に伴う基質周辺の速い線形応答的な再配向を安定化し、活性化自由エネルギーの減少を与えていることを見出した。このように、新規な分子シミュレーションの手法により、タンパク質の柔軟さがもたらす酵素活性への重要な寄与の分子機構が明らかになった。

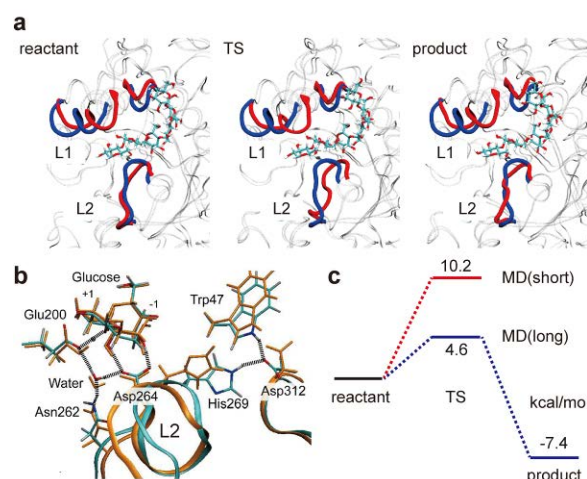


図 1: (a) 化学反応ステップに相関する近傍ループの構造変化（赤）。参照に X 線結晶構造も示す（青）。(b) 反応活性部位（Glu200 と glucose）と L2 ループの構造変化の相関。反応遷移状態（青）と始状態（オレンジ）。(c) 反応自由エネルギープロファイル。

参考文献

- [1] G. Bhabha et al., *Science* **332**, 234-238 (2011).
- [2] T. Kosugi and S. Hayashi, *J. Chem. Theory. Comput.* **8**, 322-334 (2012).

業績紹介：分子シミュレーションと一分子観測実験による
F₁-ATPase の ATP 加水分解反応の分子機構の解明

林 重彦

(京都大学理学研究科・A03 公募研究代表者)

飯野亮太

(東京大学工学研究科・A03 公募研究代表者)

論文題目："Molecular mechanism of ATP hydrolysis in F₁-ATPase revealed by molecular simulations and single molecule observations"

著者：Shigehiko Hayashi, Hiroshi Ueno, Abdul Rajjak Shaikh, Myco Umemura, Motoshi Kamiya, Yuko Ito, Mitsunori Ikeguchi, Yoshihito Komoriya, Ryota Iino, and Hiroyuki Noji

雑誌巻号：J. Am. Chem. Soc. **134**, 8447-8454 (2012)

ヌクレオチド三リン酸の加水分解は、多くの生体分子の機能において鍵となる化学反応である。しかしながら、その重要性にも関わらず、化学反応機構及び触媒活性の分子機構は明らかではない。本研究では、分子シミュレーションと一分子観測実験の共同研究により、分子モータータンパク質である F₁-ATPase のアデノシン三リン酸 (ATP) 加水分解反応の反応機構を解明した。F₁-ATPase は、一分子観測実験により、酵素化学反応ステップなどの素過程が直接観測可能であり、計算と実験の対応を非常に明確に行うことができる。

図 1 に、MD シミュレーション及び QM/MM 計算により得られた、ATP 加水分解反応のポテンシャルエネルギープロファイルと反応機構を示す。三リン酸の加水分解のためには、求核攻撃をする水分子 (Wat1) からプロトン移動 (PT) によりプロトンの一つを取り除かなければならない。本研究で明らかになった反応経路では、従来の単純な S_N2 型反応モデルとは異なり、PT 反応が反応の律速段階となり、また、それに先立ってリン酸の P_γ-O_β 結合の解離 (POD) 及びメタγリン酸の生成が起こる。メタリン酸の生成は、アルギニンフィンガー (αR373) 及び P-loop のアミノ酸との相互作用により活性化され、生成した反応性の高いメタリン酸は、求核攻撃水との結合形成の安定化を用いて、最も困難な過程である求核攻撃水分子からのプロトンの放出を促進する。このような連鎖的な活性化が、

F₁-ATPase の高い触媒活性を与えている。

計算によって予測された反応機構は、一分子観測実験により検証された (図 2)。反応時定数は D₂O 溶媒中で顕著に遅くなり、PT 反応が律速段階であることを示している。また、ATP_γS アナログ分子の時定数の変化は、POD→PT の順序を示している。更に、αR373K 変異体における同位体効果 (KIE) の消失は、POD と PT 過程が強く相関していることを表しており、それらの過程の連鎖的活性化機構を支持する。

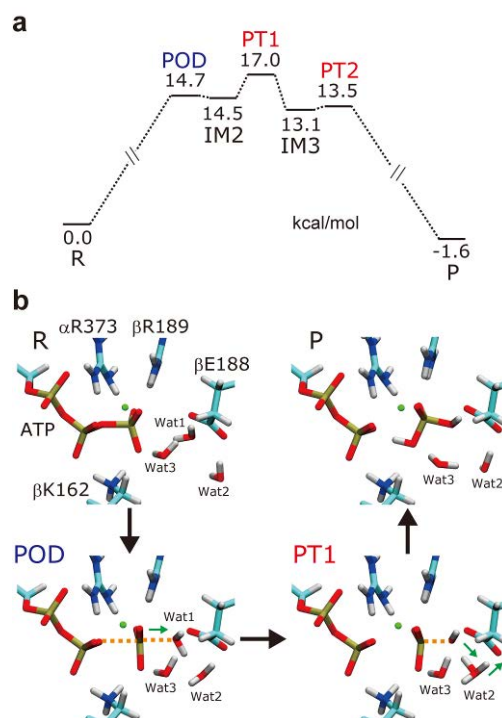


図 1: ATP 加水分解反応の分子機構。(a) ポテンシャルエネルギープロファイル。(b) 反応機構。

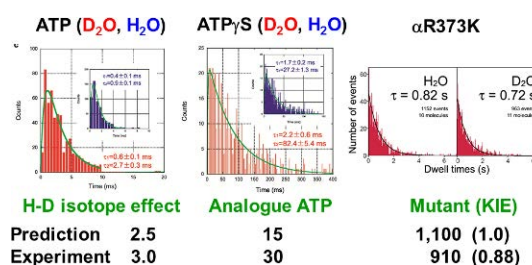


図 2: 反応時定数の変化 (native/ATP/H₂O との比)。

シンポジウム報告

大阪大学蛋白質研究所セミナー 蛋白質と過飽和

～ Impacts of Supersaturation on Protein Science ～

濱田大三

(神戸大医・A03 公募研究代表者)

櫻井一正

(阪大蛋白研・A01 公募研究代表者)

2012年6月18日から19日にかけて、後藤祐児(阪大蛋白研)、桑田一夫(岐阜大医)と濱田大三(神戸大医)の三名をオーガナイザーとする標記のセミナーが、大阪大学蛋白質研究所において開催されました。当日は台風4号が接近しており開催自体も危ぶまれましたが、70名近い来聴者があり、関連する学会直前(続く6月20日～22日に名古屋で日本蛋白質科学会年會が開かれた)に開かれる英語でのセミナーとしては、中々な盛況でありました。

本セミナーは、蛋白質のアミロイド凝集反応や水の結晶化といった、生命科学・生命現象に関連する様々な「過飽和現象」について議論することを目的として、国内外の関連する研究を進めている13名の研究者による講演が行われました。

講演の内容は5部に分かれており、それぞれの演者は以下の通りです。

Session 1: Crystalization and solubility

佐崎元(北大)、杉山成(阪大)、李映昊(阪大)

Session 2: Theories and models

原野雄一(阪大)、Sihyun Ham (Sookmyung Women's University, Korea)、石川岳志(東北大)

Session 3: Amyloids

Riccardo Porcari (Univ. Pavia, Italy)、山口圭一(岐阜大)

Session 4: Folding and Unfolding

濱田大三(神戸大)、Rino Esposito (Univ. Udine, Italy)、Rita Chen, (Academica Sinica, Taiwan)

Session 5: Structure and Function

Kardos József (Eötvös Loránd University, Hungary)、Robert Robinson (Institute of Molecular and Cell Biology, Singapore)

セミナー全体を通して「蛋白質・水の結晶化」「蛋白質のアミロイド凝集形成と可溶性」「アクチン線維形成機構と生命現象」が話題の中心であり、様々なアプローチがとられていることが印象的でした。特に、「レーザー共焦点微分干渉顕微鏡を用いた氷結晶の表面液体相形成に関する直接観察(佐崎)」、「蛋白質可溶性予測(原野、Ham)」、「温度接動を伴うアミド重水素交換法による、蛋白質の揺らぎの研究(Esposito)」、「異なる生物種のアクチン線維形成のメカニズムと機能の比較(Robinson)」など、非常にユニークな講演が行われ活発な議論がなされました。

生命科学において「過飽和現象」が関与しているという概念は未だに定着しておらず、未開の領域ですが、その理解には「分子内及び分子間の揺らぎ」を意識しなければならない点で、本新学術領域研究とも深く関連しています。今後も同様な活動を進め、生命現象の本質に迫る研究を推進することが重要であると感じました。



講演の一風景(左：講演中の原野先生、右：質問中の後藤先生)



懇親会の様子(歓談中のHam先生と後藤先生(左)と一仕事終え、リラックスした様子の桑田先生(右))