

業績紹介：柔らかく、透明で、手で「扱える」タンパク質分子模型の開発

川上 勝

(北陸先端大マテ・A01 公募研究代表者)

論文題目: "A Soft, Transparent and Handleable Protein Molecule Model"

著者: Masaru Kawakami

雑誌巻号: *Rev. Sci. Instrum.* **83**, 084303 (2012)

現在、タンパク質の立体構造を眺めるには、主に CG を用いた描画法が一般的である。しかしその操作には熟練を要し、また立体的なイメージを他者と共有し、議論することには不向きである。一方で、分子模型は、使用者の構造に対する理解度を深め、他者との議論に大きく役立つ事は明らかであり、古くから有機化学の教材等で用いられてきた。しかし、タンパク質のように入り組んだ構造を持つ分子の模型を従来の手法で作成することは、製作コスト、実用性の低さの面からほとんど行われて来なかった。

近年、「3D印刷」という新しい技術を用い、フルカラーで精巧なタンパク質の模型を「一括」で作成することが可能となり、再び模型の価値が見直されるようになって来ている。しかし、これまでの3D印刷技術で作成できる模型は、石膏製で情報量が少なく、物理的に脆いため、研究の場での議論等に使用できるレベルには到底達していない。

今回の研究では、従来のカラー3D印刷技術に、「消失(破壊)型鋳型」というアイデアを導入した。具体的には、図1に示すように、タンパク質の「主鎖構造」の3Dデータに、分子表面(溶媒排除表面)の形を元にした「卵の殻」のような「鋳型3Dデータ」を融合させ、これをフルカラーで立体印刷した後に、柔らかく透明なシリコン樹脂を鋳型内部に充填し、固化後に鋳型を破壊することで、分子の凸凹構造を正しく表現した柔らかい表面をもち、主鎖構造が内部に正しい位置で再現された分子模型を作成することに成功した。また静電荷ポテンシャルや疎水性といった情報も、模型表面に着色する事で表現可能となった。本分子模型を用いることで、使用者は、主鎖の折れたたみ構造を透視し(図2a, b)、かつ模型表面を「眺め、触る」ことで、主鎖、分子表面を「同時に」「直感的に」理解することが可能となった。

またこの模型は柔らかいため、タンパク質が分子を認識し、結合するといった、分子が「揺らいで」いなければ実現できないような反応を、模型を歪ませて、模擬的に手でシミュレーションすることが可能となった(図2c)。さらには、タンパク質同士が組み合わさり、巨大な複合体を形成することで高度な分子機械として働く仕組みを、使用者が模型を組み合わることで再現することが可能であり(図3)、高度な機能発現機構の直観的な理解を大いに深めることができる。

もちろん、表現が多彩でフレキシブルなCGを用いた描画法が今後も主流となる事は明らかである。ドッキングシミュレーション等もコンピュータ計算が緻密で正確である。しかし、CGをどれだけ眺めていても決して得られることのない「リアリティ」が模型には有り、そこから「直観的な」研究に対するひらめきを得る事が有りえる、と著者は考える。また自分の研究成果を他者、特に分野外の者に説明する際、あるいは一般社会に発信する際には、CGと本模型の併用が大きな効果をあげるであろう。教材や科学館の展示としても活用が期待される。

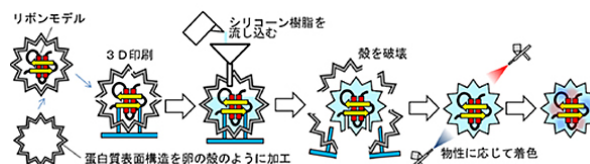


図1. 新しい模型の作製工程の概念図。

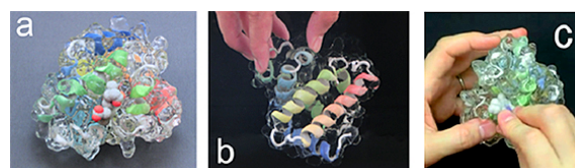


図2. ミオグロビンの模型写真。



図3. 複合体の分子模型写真。

(上段: カリウムチャネル、下段: ペロ毒素)

業績紹介：アミロイド線維伸長時に現れる過渡的複合体の実体

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: "The monomer-seed interaction mechanism in the formation of the β 2-microglobulin amyloid fibril clarified by solution NMR techniques"

著者: Kotaro Yanagi, Kazumasa Sakurai, Yuichi Yoshimura, Tsuyoshi Konuma, Young-Ho Lee, Kenji Sugase, Takahisa Ikegami, Hirobonu Naiki, and Yuji Goto.

雑誌巻号: *J. Mol. Biol.* **422**, 390-402 (2012)

アミロイド線維はタンパク質が間違った構造をとり形成される線維状の凝集体である。これまでの様々なタンパク質の線維形成過程の観察から、一般的に原因タンパク質が「部分変性」する溶媒条件で線維形成が起こるため、この部分変性状態が線維伸長の中間体であると考えられている。透析アミロイドーシスの原因タンパク質である β 2 ミクログロブリン(β 2m)も酸性条件下で残余構造を持つ変性状態をとり、この状態からアミロイド線維を形成する。近年我々は、 β 2m の核依存伸長反応において、モノマーと線維が非特異的に相互作用する過渡的な中間体状態が存在することを報告した[1]。モノマーの線維との相互作用の機構を解明することは、他のアミロイドーシスの疾患治療や予防法の確立につながると期待される。そこで筆者らは溶液 NMR を利用し、この過渡的な複合体のキャラクタライズを行い、 β 2m の線維形成機構についての知見を得ることを試みた。

はじめに転移交差飽和法による線維核と相互作用している残基の同定を試みた。 $[^1\text{H}, ^{14}\text{N}]$ 標識 β 2m で作製した線維核に $[^2\text{H}, ^{15}\text{N}]$ 標識 β 2m モノマーを混合し、NMR 信号強度を測定した。その結果、モノマー β 2m は 2 つの領域で線維と相互作用していることが分かった。これらの相互作用領域には疎水性残基が多く含まれることから、線維との相互作用には主に疎水性相互作用が寄与することが示唆された。

続いて、線維形成の始状態である酸変性 β 2m の構造や運動性を R_2 緩和分散法を用いて調べた。その結果、

有意な R_{ex} を示す残基が 2 つの領域で見られた (図 3)。これは、これらの残基がミリ秒オーダーで何らかの構造転移をしていることを示す。化学シフトの解析から、意外なことに酸変性 β 2m は部分変性構造と、さらに構造が広がった完全変性構造の化学交換平衡にあることが分かった (図、赤枠)。さらに興味深いのはこれらの残基が、転移交差飽和法で線維と相互作用している残基と一致したことである。

以上の結果から、我々は以下のような β 2m のアミロイド線維形成機構を提案した。始状態である酸変性 β 2m は部分変性構造と完全変性構造の間の平衡にある。後者は溶媒に疎水性残基を露出しており、疎水性相互作用によりアミロイド線維核と相互作用し、過渡的な複合体を形成すると考えられる。しかしこの複合体状態は非特異的な相互作用によるものであり、ここから最安定なアミロイド線維構造に転移していくのである (図、緑枠)。

我々の提案を基にすると、アミロイド線維形成阻害の薬剤のターゲットとするべきなのはこの完全変性状態だと考えられる。それは、原因タンパク質の量に比べ、サブストイキオメトリックな投与量でも線維形成を阻害しうるからである。これまで、完全変性状態を認識する分子を利用することで線維阻害を示した例もある。今後、アミロイド線維形成の研究は溶液中に少量存在する分子種にも目を向けた研究をしていく必要があると思われる。

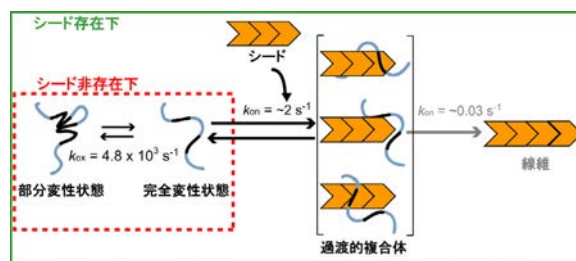


図: 本実験データから提唱される β 2m アミロイド線維伸長機構。酸変性 β 2m は残余構造を持つが、時々変性し疎水面を露出させるこの時線維核と相互作用し過渡的な複合体を形成する。

参考文献

[1] E. Chatani et al., *J. Mol. Biol.* **400**, 1057-1066 (2010).

業績紹介：癌抑制遺伝子 Rb による Toll-like Receptor3 発現制御の分子機構

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："Rb/E2F1 regulate innate immune receptor Toll-like receptor 3 in epithelial cells"

著者：Manabu Taura, Mary Ann Suico, Kosuke Koyama, Kensei Komatsu, Rui Miyakita, Chizuru Matsumoto, Eriko Kudo, Ryusho Kariya, Hiroki Goto, Shunsuke Kitajima, Chiaki Takahashi, Tsuyoshi Shuto, Yoshimitsu Nakao, Seiji Okada and Hirofumi Kai

雑誌巻号：Mol. Cell. Biol. 32(8), 1581-90 (2012)

ヒト癌の約 15%は、ウイルスが関与していると推定されている。肝臓癌や子宮頸癌、リンパ腫、白血病などはそれぞれ B/C 型肝炎ウイルスやパピローマウイルス、ヘルペスウイルス、成人 T 細胞性白血病ウイルスなどの癌原ウイルス感染が病因の 1 つとして知られている。癌原ウイルスは、ウイルス由来の様々なタンパク質により宿主細胞の有する p53 や Rb などの癌抑制遺伝子の機能を減弱させることによって無秩序な細胞増殖を誘発し、発癌に寄与すると考えられている。したがって、これら癌抑制遺伝子はウイルス感染による発癌および腫瘍形成において重要な遺伝子であることが示唆されている。実際に、p53 および Rb はウイルス感染時に細胞周期停止を誘導しウイルス産生を抑制する。さらに最終的にアポトーシスを誘導することにより感染細胞自身の細胞死によるウイルス排除を制御することが明らかにされている。

興味深いことに最近、癌抑制遺伝子 p53 は直接的にウイルス感染時に惹起されるインターフェロン産生を誘導し、抗ウイルス免疫応答を制御することが示されている[1]。さらに我々は、p53 はウイルス感染を直接認識するパターン認識受容体 Toll-like Receptor 3 (TLR3) の発現および機能を制御することを明らかにし、p53 はウイルス感染からシグナル伝達さらにアポトーシス誘導に至る、宿主の抗ウイルス制御機構を多面的に調節することを示した[2]。しかし、Rb による抗ウイルス免疫制御の分子機構は不明なままであった。

本研究では、TLR3 の発現および機能制御における Rb の機能を解析した。Rb 過剰発現および Rb ノックダ

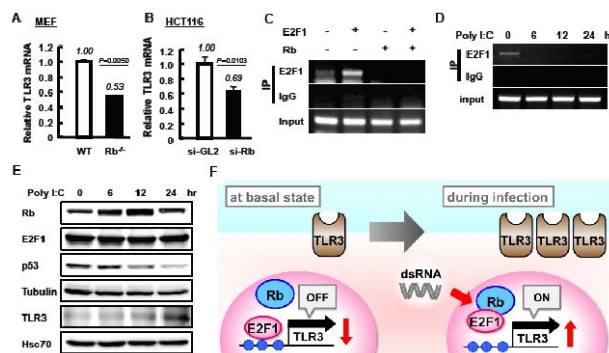


図. Rb は E2F1 を介して TLR3 の発現を制御する

(A、B) Rb 発現低下により TLR3 の発現が減少する。(C) Rb は、E2F1 の TLR3 プロモーター上への結合を阻害する。(D、E) TLR3 刺激は Rb の脱リン酸化を誘導し、E2F1 の TLR3 プロモーターへの結合を阻害する。(F) 本研究で解明した Rb による TLR3 制御の概略図。

ウンによる TLR3 発現量への影響を検討した結果、TLR3 mRNA およびタンパク質ともに Rb により正に制御されることが示された。さらに Rb は TLR3 の発現を制御することにより TLR3 の機能であるサイトカイン誘導を正に制御することを明らかにした。そこで次にルシフェラーゼ解析およびクロマチン免疫沈降法を用いて TLR3 プロモーター解析を行った。その結果、Rb は転写因子 E2F1 の TLR3 プロモーター上への結合を阻害することによって、TLR3 の転写を誘導することが示された(図 A-C)。

本研究では、TLR3 刺激による Rb-E2F1 への影響を検討した。その結果、TLR3 刺激により Rb の脱リン酸化が起これ、Rb と E2F1 の結合が促進することによって、TLR3 プロモーター上に結合する E2F1 量が減少することが示された(図 D、E)。したがって、Rb-E2F1 は TLR3 が活性化するウイルス感染時に、ウイルス感染認識を担う TLR3 自身の発現誘導に寄与することが考えられる。

以上本研究は、癌抑制遺伝子 Rb により TLR3 の発現および機能が正に制御されることを示し、宿主は p53 や Rb に代表される癌抑制遺伝子により、ウイルス感染時における抗ウイルス免疫応答を直接制御することが明らかになった。

[1] Takaoka A. et al., Nature, 2003

[2] Taura M. et al., Mol. Cell. Biol., 2008

「揺らぎと生体機能」平成 24 年度合同班会議報告

芳坂貴弘

(北陸先端大マテリアル・A02 計画研究代表者)

平成24年度の「揺らぎと生体機能」合同班会議は、平成24年7月29日(日)から8月1日(水)の日程で、仙台市作並温泉、ホテルの坊において開催された。今回の会議には、A01～A03班の計画・公募研究の研究代表者41名(高田彰二先生、伊野部智由先生は欠席)、5名の班友の先生方、評価委員の北川禎三先生、榊茂好先生、中原勝先生、本領域担当の文部科学省学術調査官である重田育照先生にご出席頂き、また、各研究室に所属する研究員・大学院生50名の参加もあり、合計で参加者は100名に達した。作並温泉は仙台市中心部からも比較的近く、新幹線や空路によって全国の研究者が集う上でアクセスの良い地点にあった。また、会場となったホテルの坊は、100人以上規模のコンベンション施設を備え、本会議の会場として十分な施設であった。当日は、やや遅れ気味であった東北地方の梅雨も明け、深い緑と澄んだ空気に囲まれた会場で、4日間の研究発表・討論が進められた。

研究発表に先立ち、領域代表の寺嶋先生より、本領域の概要と現在までの状況について紹介があり、また、領域内の共同研究の状況とさらなる活性化に向けた領域の方針が示された。

続いて、各研究者の発表が行なわれた(発表時間25分、うち講演20分間、討論5分間)。それぞれの発表内容に関しては、次頁以降で今元先生(A01班)、新井先生(A02班)、後藤先生、鈴木先生、岡田先生、野口先生(以上、A03班)に詳しくご報告頂く。発表は



深い緑に包まれた作並温泉



領域代表の挨拶

夕方まで続き、夕食後も夜遅くまで自由討論が繰り広げられた。2日目の夕食時には懇親会が行なわれ、研究者や学生間の親睦を大いに深める機会となった。

また、3日目の昼休みには、近くのニッカウキスキー宮城峡蒸留所の見学会を行なった。10年以上の歳月を要するウイスキーの製造工程は、長期間に渡る継続的な研究活動とも重なるものがあり、多くの参加者の興味を引くものであった。それとともに、長時間の会議による疲労から心身をリフレッシュするとともに、研究者同士の親睦をさらに深める機会となった。

今回の班会議は、各研究者の最新の成果について相互に理解し、討論するとともに、さらなる共同研究を探る機会となった。今後、それぞれの研究のさらなる進展と、新たな共同研究につながることを期待され、本領域全体の進展に大きく寄与するものと思われる。最後に、本会議が無事に終了できましたことを、ご参加頂いたすべての先生方、学生諸氏、事務局の藤澤さん、会場係担当の東北大高橋研の学生の皆様にお礼申し上げます。

高橋 聡

(東北大多元研・A01 公募研究代表者)

今回の合同班会議は、多くの皆さんがこれまでの成果を基に報告を行い、大変聞き応えのある会議となりました。特に、若手の方々の研究の進展が著しく、若手とは言えない者として、負けずに頑張らなければという思いを新たにしました。

私は、会場の選定を昨年の班会議後に託されました。いろいろ調べた上で、3月に下見を兼ねた小さな研究会を同会場で開催し、これなら大丈夫と思っていた。しかし、3月の日差しは弱く、会場にカーテンがないことに気づかなかったことは誤算でした（二日目以降に貼られたピンクの布はテーブルクロスです・・・）。また、学生アルバイトが連日遅刻したことなど、至らなかった部分について、大変申し訳なく思っています。

三日目の昼食時に、今後の展望に関する議論がすこしだけなされました。これについて、個人的な感想を書かせてください。Stryerの生化学の教科書の最新版（7th edition）を読むと、かつては、酵素名や化合物名を暗記するだけだった生化学が、様変わりして大変面白くなっていることに驚きます。記述を特に面白くしているのは、現象のダイナミックな側面です。反応中間体はどのような構造を持つのか、なぜこんな動きをするのかなどの説明が、生き生きとした印象を与えていると思います。

揺らぎを基に生体分子の機能を考える本領域の主題は、生物とはなにか、生物らしさとはなにかを捉えるための重要なテーマであり、今後も継続すべきと思います。特に、教科書にあまり記載されない現象も対象として選ぶ必要があるのではないのでしょうか。また、揺らぎを含んだ分子系を人工的に構築する方法にまで踏み込む必要があるのではと思いました。

新領域研究を基礎として、教科書に記述される成果が生まれることを期待したいと思います。

今元 泰

（京都大学理科学研究科・A01 公募研究代表者）

今年度の合同班会議が、7月29日（日）～8月1日（水）の日程で、仙台市の作並温泉で開催されました。会場となった「一の坊」は、露天風呂、大浴場、客室はもちろん、ロビーなどの公共スペースでもサービスが充実しており、たくさんの宿泊客、日帰り入浴客で賑わっていました。夏の一番暑い時期に関西から脱出するつもりでしたが、夕方でも外気温が30℃近くあった上に、3泊4日の中二日も夕立に見舞われ、温暖化の影響か東北でも関西と大差ないと感じました。

さて、一の坊のコンベンションホールで行われた班

会議は、A01班の研究報告からスタートしました。「揺らぎ検出」をテーマとしたA01班は、班長の寺嶋先生（京大）を含め、計画研究・公募研究あわせて16の発表がありました。

まず、寺嶋正秀先生（京大）より、過渡回折法に圧力をパラメータとして組み入れて構造揺らぎを検出する方法、石井邦彦先生（理研）より蛍光相関分光法を発展させた揺らぎ計測について報告がありました。これらの報告では、開発した測定手法を実際の蛋白質に適用した結果が報告され、揺らぎを検出する新しい手法が確立されつつあることが実感できました。続いて今元（京大）が蛋白質の選択的な相互作用と構造揺らぎの関連を報告しました。

次に理論研究の報告があり、岡本祐幸先生（名大）による拡張アンサンブル法を用いた分子シミュレーション手法、北尾彰朗先生（東大）による溶液中の蛋白質の構造転移の解析法、佐藤啓文先生（京大）による積分方程式理論にもとづいた解析の精度を高める方法の報告がありました。これらの発表では、理論的な原理だけでなく実際の実験数値と整合性も含めた議論がなされました。

その後の、川上勝先生（北陸先端大）による力学的アンフォールディングの1分子実験、関口博史先生（JASRI）による膜蛋白質の高速1分子動態計測の報告では、実験がうまくデザインされており、蛋白質の揺らぎやダイナミクスが視覚的に表現されていました。山村泰久先生（筑波大）は熱容量の精密測定による膜脂質の運動解析について報告されました。一日目の会議はこれで終了し、夕食の後、恒例の自由討論となりました。自由討論では、ホテルの宴会場を開放していただき、ビールや地酒をのみながら親交を深めるとともに、各所で共同研究の打ち合わせ、あるいはデータのディスカッションをする姿がみられました。

二日目はまず、NMRによる揺らぎ解析の報告がありました。加藤晃一先生（岡崎統合バイオ）は蛋白質糖鎖複合体、北原亮先生（立命館大）は高圧下の精密構造、櫻井一正先生（阪大）はアミロイド形成前駆状態、西村千秋先生（帝京平成大）は天然変性蛋白質の解析を切り口として、それぞれNMRを用いて明らかにした生体機能と揺らぎの関連を議論されました。他の班も含めてNMRを使っている班員が多く、質疑応答の時間には、データの解釈だけでなく測定原理にま

で立ち入った議論がなされていました。

その後、高田彰二先生（京大）の代理の寺川進先生によりガン抑制転写因子 p53 の運動についてシミュレーション、高橋聡先生（東北大）によりマイクロ秒のタンパク質の高速揺らぎ、林久美子先生（東北大）によりミトコンドリア輸送の駆動力測定についての報告がありました。A01 班の後には、班友の井出徹先生（光産業創成大）による構造揺らぎと機能揺らぎの 1 分子計測についての報告がありました。

こうして A01 班の発表をながめると、実に幅広い対象に対して幅広い手法でアプローチしていると思います。しかし、これだけ幅広くても雑多な感じにならないのは、寺嶋先生がおっしゃるように「生命分子の揺らぎ」という概念が確立しつつあるためではないかと思います。本領域の班会議では、一人の持ち時間が 25 分ですが、これは、一般の学会の口頭発表の時間と比較してもかなり長くなっています。そのため、発表する側としてはごまかしがきかず準備が大変ですが、聞く側としては研究背景や測定原理など、通常の講演では詳しく話してもらえないような話を聞くことができ、勉強になりました。

私自身は二年目、一期目から継続の方は四年目となり、「揺らぎ検出」を目指した A01 班でも、計測法の開発だけでなく実際の応用を通じて揺らぎと生体機能の関連が明らかになりつつあることが実感できた班会議でした。

新井宗仁

（東京大学総合文化・A02 公募研究代表者）

2012 年 7 月 29 日～8 月 1 日までの 4 日間、仙台市の作並温泉にて、平成 24 年度合同班会議が開催された。昨年の班会議（夕張）で聞いたのとは異なる新しい研究成果をたくさん聞くことができ、「揺らぎ」というキーワードに基づいた研究が、領域全体で大きく進展している印象を受けた。ここでは、A02 班の発表内容をご紹介します。

片岡幹雄先生（奈良先端大）は、構造・機能エレメントという概念に基づくタンパク質構築原理の解明と揺らぎ制御に関する発表をされた。p100 タンパク質は SNase と類似構造を持つが、配列一致度は低い。しか



会議風景。総勢約 100 名が参加した

し p100 に SNase の機能エレメントを移植すると、SNase 固有の核酸分解活性を獲得できた。このことは、移植した機能エレメントの中に、機能発現に必要な揺らぎを制御する情報が含まれることを示唆している。構造・機能エレメントは網羅的なアラニン挿入変異解析によって得られる。筆者は現在、網羅的なアラニン置換変異解析を行っているが、側鎖の置換だけでは摂動が弱く、変異導入した「部位」の役割を解明することは難しい。それに対し、アラニン挿入は主鎖への摂動が大きいので、変異「部位」の役割を明らかにしやすいだろう。今後我々も網羅的なアラニン挿入変異解析を行い、アラニン置換と比較してみたい。

楯真一先生（広島大）は、NMR 測定とアミノ酸置換を組み合わせ、酵素や天然変性タンパク質（IDP）の揺らぎと機能制御の研究をされている。まず、DHFR の活性ループにおける構造揺らぎを NMR 法で解析し、触媒反応速度との関係を議論された。また、TFIIIE や FACT などの IDP が、標的分子と相互作用する際に過渡的な構造変化を示す様子を報告された。NMR 法はタンパク質の構造揺らぎと機能制御の関係を調べる上で非常にパワフルな方法であり、A02 班の半分は NMR を用いて研究を進めている。

水口峰之先生（富山大）は、精神遅延関連タンパク質 PQBP-1 の構造揺らぎと機能の関係を研究されている。PQBP-1 は IDP であり、スプライソソームのタンパク質と相互作用して立体構造を形成する。今回、この複合体構造を X 線結晶構造解析で解明された。また、結合部位にアミノ酸置換を導入し、分子認識に重要なアミノ酸を明らかにした。さらに、PQBP-1 の選択的スプライシング変異体の構造揺らぎも研究されている。タンパク質分子レベルでの揺らぎ制御異常が疾患と密

接に関与している可能性が示唆される。

寺内一姫先生（立命館大）は、24 時間周期という遅い揺らぎを持つ時計タンパク質の揺らぎ制御機構を研究されている。この揺らぎ制御は、KaiC タンパク質のリン酸化・脱リン酸化によって行われるが、KaiC の C 末端領域を欠損させた変異体を用いることにより、この領域が KaiA と相互作用してリン酸化を制御することを示された。また現在、C 末端領域が Kai の ATP 加水分解や立体構造に及ぼす影響を解析されている。筆者はタンパク質分子内の速い揺らぎを研究しているが、時計タンパク質の揺らぎは分子間相互作用を介した遅い揺らぎであり、大変興味深い。

芳坂貴弘先生（北陸先端大）は、タンパク質の揺らぎ検出や制御のための非天然アミノ酸導入技術を開発されている。1 本鎖抗体断片 scFv を蛍光標識することにより、抗原結合を蛍光検出する新しい手法を開発された。また、非天然アミノ酸を導入したタンパク質を無細胞翻訳系で 100 $\mu\text{g/ml}$ 以上作成することは困難であるが、大腸菌を用いて mg オーダーでタンパク質を大量発現する方法も開発中との発表があった。

湯浅順平先生（奈良先端大）は、タンパク質や核酸の立体構造の局所的なキラリティーを検出する円偏光発光プローブを開発されている。このようなプローブをタンパク質の特定部位に共有結合で導入し、二次構造の時間変化を計測することができれば、タンパク質の局所的な構造揺らぎをリアルタイムで追跡できるようになるだろう。

筆者自身は、IDP による標的分子認識機構の解明と、タンパク質の揺らぎ制御の研究を行っている。まず、NMR により、p53 の天然変性領域が CBP の TAZ2 ドメインと極めて高速で結合することを示した。これは大きく揺らぐという IDP の特性と密接に関係しているかもしれない。また、抗体精製用アフィニティリガンドの pH 依存性を制御したタンパク質の新規創製を行った。さらに、ミュータノーム解析により、アルカン合成酵素の高活性化を進めている。

以上のように、A02 班のメンバーは 7 名のみで、A01 班の 1/2、A03 班の 1/3 でしかない。しかし、手前味噌ではあるが、A02 班には少数精鋭のメンバーが揃っており、A01 班や A03 班の研究目標にも関係した成果を創出していると思う。また、他班との共同研究による成果も出てきており、班同士の有機的な結びつきが明

確になってきたと思う。

毎朝、温泉に入っていると、同じ顔ぶれを見かけた。よく考えてみたら、みな A02 班のメンバー（男性）だった。なんと、寺内さんも同じ時間に入っていたそうである。行動パターンや趣味嗜好が似ているのだろうか。それとも、何かの縁だろうか。この新学術領域（公募）は今年度で終わりなのでとても残念だが、また皆が結集するような縁があるのではないかと期待している。

今回の会場だった一の坊はとてもきれいなホテルで、私の研究室の学生たちは「すごい、すごい」と感動していた。また、ニッカウキスキー蒸溜所見学も楽しかった。世話人の芳坂先生と高橋先生に感謝いたします。4 年間、この新学術領域でお世話になり、大変ありがとうございました（まだ終わっていませんが）。泊りがけの班会議はとても楽しく、刺激的でした。残りの半年間、揺らぎ制御の実現に向けて、精一杯頑張っていきたいと思っております。

後藤浩一（崇城大応用生命・A03 計画研究（上岡）共同研究者）

岡田誠治（熊本大エイズ研・A03 公募研究代表者）

鈴木 元（名大院医・A03 公募研究代表者）

野口博司（東大物性研・A03 公募研究代表者）

別領域の新学術研究班員の方にお話をお聞きすると、班会議は東京で開催し、学会のように 9 時-5 時で集会するところもあるようだ。本領域のように地方でたっぷり時間をとって行う形式とどちらの方式がいいか？諸説あるだろうが、私は本領域のような形式が好きだ。特に夕食を共にすることで、研究以外のことにも話が弾み、相互理解と個々の信頼関係が増すように思う。

今回たまたま、片岡先生の向いに座らせていただいたところ A03 班の報告をお願いされた。皆さんのお話をより真剣に聞かせていただく機会を与えていただいたわけで喜んでお引き受けしたものの、ひとりですべての班員のお話を理解し、記録に残すことができるだろうかと不安に駆られた。そこで、たまたま近くにいた 3 名の先生方をお願いしたところ、快く分担をお引き受けいただいたのでこの報告を書きあげることができた。各人にそれぞれ一つから二つのセッションを担当

当していただき、鈴木がまとめるという形にさせていただきました。

ニュースレターに向け万全の態勢を整えた後、翌 2 日目夕刻より A03 班の発表が始まった。

戸谷希一郎先生（成蹊大）は、生化学反応が起こる生体内の特殊反応場環境を人工系で再構築して検討した研究を報告した。糖鎖プロセッシングをモデル反応とし、BSA を添加した分子クラウディング環境、リポソーム内水相での微小空間環境、ヒアルロン酸による網目環境など擬似的な生体内環境での反応特性について説明がなされた。

老木成稔先生（福井大）は、チャネル蛋白質の機能発現と相関した構造揺らぎの観測に関する研究を報告した。従来の結晶構造解析では不明確であったイオン透過の動的構造変化について、KcsA カリウムチャネルの AFM 測定や、平田文男先生との共同研究で行われた計算結果に基づき、カリウムイオンの選択的透過機構を説明した。

黒田玲子先生（東京理科大）は、独自に開発した全偏光対応型分光計を用いたキラリティー観測によるタンパク質の高次構造（凝集構造）に関する研究を報告した。アルツハイマー病の原因タンパク質 β -アミロイドについて、水溶液中での二次構造とアミロイド繊維の凝集挙動を観測した結果が報告された。インシュリン、血清アミロイドなどのキラリティー観測についても紹介がなされた。

上岡龍一先生（崇城大）は A03 班の班長として、班員の紹介とハイブリッドリポソーム研究の基礎的情報とその歴史についての総論をおこなった。引き続き、ハイブリッドリポソームに関わる研究が三題行われ、それぞれに対して活発な討論がなされた。



会議風景。充実した討論が繰り広げられた

岡田誠治（筆者、熊北大）は上岡先生との共同研究であるハイブリッドリポソームによる治療効果と共に、新たな桑島先生との共同研究である HAMLET/BAMLET の細胞死メカニズムについて報告を行った。HAMLET/BAMLET は投与後短時間で Caspase 依存性のアポトーシスとオートファジーを引き起こすことを細胞レベル、また、マウスモデルから示した。また、移植実験に有用な GFP-NudeRJ マウスを樹立した。

鈴木元（筆者、名大）はやはり上岡先生との共同研究であるハイブリッドリポソームによる細胞死のメカニズムについて報告を行った。従来知られている膜での癌細胞への選択的結合の他に、癌細胞での CerS6 高発現を利用してセラミド濃度を高めることを通じてアポトーシスを誘導するとの仮説を示した。正常細胞では CerS6 発現量が低いいためアポトーシスが起らないこと、また、癌細胞は CerS6 依存的に転移能を獲得しているという実験結果を示した。

松本陽子先生（崇城大）はハイブリッドリポソームの関節リウマチ(RA)に対する効果を、関節炎モデルマウスを用いて示した。ハイブリッドリポソーム投与群と非投与群ではリウマチスコア法で顕著な差が観察されたほか、組織切片においてもパンヌス像の消失などスコアに一致した結果が得られた。また、癌細胞同様、RA 滑膜細胞膜も正常滑膜細胞膜に比べ大きな流動性が観察され、これが RA 滑膜細胞特異的ハイブリッドリポソーム取り込みにつながっているとの考察がされた。

これらの発表はハイブリッドリポソームの作用機序からマウス疾患モデルまでの内容を含んでいる。しかし、討論での指摘にもあったように、さらに一步踏み込んだメカニズム解明、あるいは、臨床応用へ向けて必要となるプロセスを積み重ねることが求められていると思われた。

平田文男先生（立命館大）は 3D-RISM により、分子認識プロセスにおいてタンパク質内外の水分子の存在が決定的役割を演じていることを KscA channel、アスピリン、HIV proteinase を例にして紹介した。中でも、老木先生との共同研究である KscA channel モデルでは、channel 中に本来のイオンである K に加え、Li さえ水を配位して存在することを示した点が興味深かった。

桑島邦博先生（岡崎統合バイオサイエンスセンター）

は GroEL/ES をモデルに、構造揺らぎと機能発現の関係を物理化学的に明らかにすることを目標に研究を行っている。このトピックス4題に加え、岡田との共同研究 HAMLET/BAMLET の紹介を行った。トピックス中では分子シャペロンである GroEL apical domain が自身ではアミロイド形成をするという報告が興味深く感じられた。

相沢智康先生（北大）はカイコ絹フィブロイン H 鎖の転写制御因子 FMBP-1 の STPR domain が DNA 非結合状態ではヘリックス領域と変性領域が繰り返した揺らぎの大きな天然変性構造を有していることを報告した。domain のみと比べ、全長だと binding specificity が向上するという最近のデータを紹介し、より正確な天然変性タンパクの揺らぎと機能の関係解明に期待をもたせた。

飯野亮太先生（東大）は金ナノ粒子をプローブとしたイメージング法による F1-ATPase の回転運動を中心に研究を行っている。今回は金ナノロッドを用い、その散乱光を互いに垂直な2成分に分ける方法、及び、無偏光証明とデフォーカスイメージングを組み合わせた方法で行った解析結果の紹介を行った。特に後者では回転角を正確に測定できるメリットが明快に示され、回転揺らぎ解明に向けた新しい展開に期待を持たせた。

伊野部智由（高橋一暢）先生（富山大）はプロテアソームにおけるタンパク分解における揺らぎのある変性領域の役割を報告した。polyUb(もしくは UbL)-DHFR-spacer-揺らぎ構造を有するモデルタンパクを構築し、polyUb(もしくは UbL)と揺らぎ構造間の距離の重要性を示した。また、揺らぎ構造としてスフィンゴミエリナーゼ変異体を用い、構造と分解効率の関係を論じた。

大橋祐美子先生（理研）は酵母プリオンタンパク質 Sup35 のアミロイドコア形成を、主に野生型、S17R 変異体を比較しながら、CLEANEX-PM, STD-NMR, PRE-NMR などの方法で検討を行った。その結果、N 末領域に2カ所の amyloid initiation site を同定した。

濱田大三先生（神戸大）は多発性骨髄腫などで観察される、免疫グロブリン HC(LC)のアミロイド繊維凝集と VL の配列との関係を調べた。アミロイド繊維形成性 BRE と非アミロイド繊維形成性 REI、さらに RB51, RB45 を用いてタンパク質のフォールディング中間状態が安定化されることでアミロイド繊維凝集が促進さ

れることを示唆した。

林重彦先生（京大）は量子化学(QM)計算と分子力学(MM)法を組み合わせたハイブリッド QM/MM 法に基づき、タンパク質の熱揺らぎを考慮した酵素化学反応の自由エネルギー反応経路を計算する方法(QM/MM-RWFE-SCF 法)の紹介を行った。この方法を用い、 α アミラーゼ酵素反応におけるタンパク構造変化による反応遷移状態、pKa 計算、カルモジュリン N 末ドメインの Ca 結合に伴った開閉運動などの例を紹介した。

cyt c は本来単量体で働くと考えられるが、変性条件下で多量体を形成することが知られている。廣田俊先生（奈良先端大）はこの際ウマ cyt c が C 末端 α ヘリックス領域を別分子の対応する領域とドメインスワッピングすることにより多量化することを明らかにした。一方で緑膿菌 cyt c、高熱菌 HT cyt c では類似の、しかし構造的、熱力学的に異なるスワッピングを観察した。さらに多量体構造は cyt c だけではなく、ミオグロビンタンパク質でも観察されることを示した。

元島史尋先生（京都産業大）は大腸菌 GroEL によるシャペロン機能発現過程で tethering 中間体の存在を提案した。この中間体は GroEL によるフォールディング機能過程で空洞内、外でのフォールディング経路の分岐点にある。丁寧な1つずつの実験もさることながら、質疑応答での桑島先生との discussion が、班会議らしい open なやりとりでおもしろかった。

タンパク質には数 cm^{-1} 領域に低振動運動と呼ばれる振動運動の存在が示唆されている。山本直樹先生（神戸大）はリゾチウムを用い、テラヘルツ分光手法を用いて、温度及び水和が低振動ダイナミクスにどう影響するか、スペクトルからの情報抽出を試みた。その結果約 20cm^{-1} 以上の領域で差吸収係数の増大が観察された。こうした視点から今後どのように揺らぎ研究が発展するか興味深い。

最終日は NMR を用いた構造解析の2つの研究発表から始まった。大澤匡範先生（東大）は独自に開発したアミノ酸選択的交差飽和法を用いた NMR 測定でカリウムチャンネルの電位センサードメインと阻害剤 VSTx1 の複合体の構造を決定し、両者の結合機構と VSTx1 阻害機構のモデルを提唱した。論理的にきちんとまとまっており、また、説明も丁寧に門外漢にもわかりやすくていい勉強になった。

竹内恒先生（産総研）は多剤耐性転写制御因子（MDR-GR）のひとつである LmrR の薬剤結合の検討を行った。この因子は薬剤の多様な構造にあわせて結合部位の構造を変化させると考えられる。NMR により結合、非結合状態を比較することで、薬剤結合部位が揺らぐこと、また、薬剤との結合はエントロピー駆動であることを明らかにした。分子結合による分子構造の揺らぎの増大を示唆する非常に興味深い結果であり、今後の定量的な解析が期待される。

出羽毅久先生（名工大）は独自に開発した脂質・核酸複合体リポプレックスの細胞内動態を共焦点レーザー顕微鏡により観察し、細胞処理後 2 4 時間にはリポプレックスは核内に核酸をデリバリーしていることを示した。脂質部位の構造を工夫することにより、さらに高い遺伝子のトランスフェクション効率を得ており、今後の進展次第では市販の試薬を置き換えることが可能ではないかとの期待を持たせた。

中野実先生（富山大）は脂質輸送蛋白質 Sec14 の PI, PC 輸送活性を、独自に開発した小角中性子散乱法その他で解析した。POPC 輸送活性は PI や PS の存在によって促進されるものの、Sec14 の膜結合能には影響を与えなかった。また、Sec14 のリポソーム結合には曲率依存性が認められるなど興味深い実験結果が示された。

野口博司（筆者、東大）は界面活性剤 2 成分混合系

におけるミセル形成の粗視化分子シミュレーションについて発表した。単分子膜の自発曲率と臨界ミセル濃度によって、蛸状ミセルなど、実際に電子顕微鏡観察より明らかとなっているものと同じく多様なミセル構造が得られることを示した。寺嶋先生よりこの研究をハイブリッドリポソームの膜融合に応用してみてもどうかとの提案があった。

笹原健二先生（神戸大）はシリカ上に脂質膜を構成し、この上でアミロイド凝集体が形成、最終的に膜を破壊する過程について発表した。興味深いことに、細胞膜にマイクロドメイン成分であるコレステロールやスフィンゴミエリン等を添加することで、アミロイド凝集体形成が促進された。マイクロドメイン依存性的アミロイド凝集が実際の病態でも観察されるのか興味深いところである。

A03 班は班員も多く、また、内容も多岐にわたる。その中から揺らぎ班の目的となっている共同研究が数多く生まれている点に感銘を覚えた。また、会議を通じて領域代表はじめ、多くの方々が、適切なコメント、提案、討論をされていた。全体で新しい方向性を作り出していこうという、熱意を感じた。私どもが残された期間、少しでも貢献できるよう努力しなければ決意を新たにした 4 日間であった。



集合写真。会場の玄関前にて

シンポジウム報告

FASEB Science Research Conference "Protein Folding in the Cell"

伊野部智由

(富山大学先端ライフサイエンス拠点・A03
公募研究代表者)

7月29日から8月3日まで6日間にわたって米国ヴァーモント州のSaxtons Riverという小村で開かれたFASEB Science Research Conference "Protein Folding in the Cell"に参加した。ちょうど同時期に本新学術領域「揺らぎが機能を決める生命分子の科学」の合同班会議があったのだが、前々から約束しておいた共同研究者との打ち合わせがあり、やむなく班会議での発表をポストドクに任せて、この会議に参加した。この標題の会議は20年ほど前から2年ごとに開催されているが、筆者は今回初めての参加である。ボストンから車で3時間ほど離れた山間の小さな高校を貸し切って合宿形式で行われる会議で、本新学術領域の班会議に似た雰囲気であった。

今回の会議ではJudith Frydman教授(UCSF)とJeffrey Brodsky教授(ピッツバーグ大)が全体をオーガナイズして開催され、Ulrich Hartl教授(マックスプランク研究所)の基調講演から始まり、以下の9つのセッションに分けられ講演が行われた。

1. Principles of Protein Folding
2. Function of Chaperone Machines
3. Protein Folding Networks
4. Cotranslational nascent chain interactions and folding
5. Biology and Biophysics of Amyloids
6. Evolution of Proteins and Protein Machines
7. Quality Control and Degradation
8. Stress Responses and Signaling
9. Protein Misfolding and Disease

午前中に奇数番号のセッション、夕食後に偶数番号のセッションが行われ、いずれのセッションも5-7人の講演者が口頭発表を行った。またセッション間の毎日午後にはポスターセッションが開かれ、活発な議論が行われていた。昼休みが長くとられているものの、毎晩11時ごろまでセッションがあり、そのままバーに流れ込むという毎日が6日も続くので、体力的にかなりハードな会議であった。

会議では分子シャペロンに関する研究を中心に講演が行われたが、試験管内の蛋白質のフォールディングから蛋白質の品質管理、アミロイド形成、蛋白質分解に至るまで多岐に渡る話題が提供された。またその実験手法も様々で、生物物理学的手法から分子・細胞生物学的手法を用いたものまでであった。このような幅広い研究の話と同じ会議で聞けるので、知적お得感が非常に高かった。

日本からの参加者は口頭発表を行った森和俊教授(京大)、森戸大介博士(京都産業大・永田研)など数名の参加があった。なお伊野部はハンチントン病などを引き起こすポリグルタミン異常伸長蛋白質のプロテアソームによる分解を誘導するアダプター蛋白質についてのポスター発表を行った。ラボを持って初めての国際会議なので気合いを入れて臨んだためか、発表はなかなかの盛況であった。ただ比較的年齢の近いポストドクや若手PIと話す機会は多かったが、大物研究者とはなかなか話せず残念な思いをした。

本会議では特に揺らぎに焦点をあてた会議ではなかった。しかしながら"Protein Folding in the Cell"の研究は、蛋白質構造形成にかかわる細胞内での揺らぎの制御機構の研究と言い換えることが出来るのではないかなと思われる。そう考えればすべての講演が揺らぎに関係したものであり、蛋白質の揺らぎに関する将来の研究に対して、大変示唆に富んだ発表が多かったと感じる。



参加者の集合写真

関口班員が International Workshop 3D-AINAS にて Best poster awards を受賞

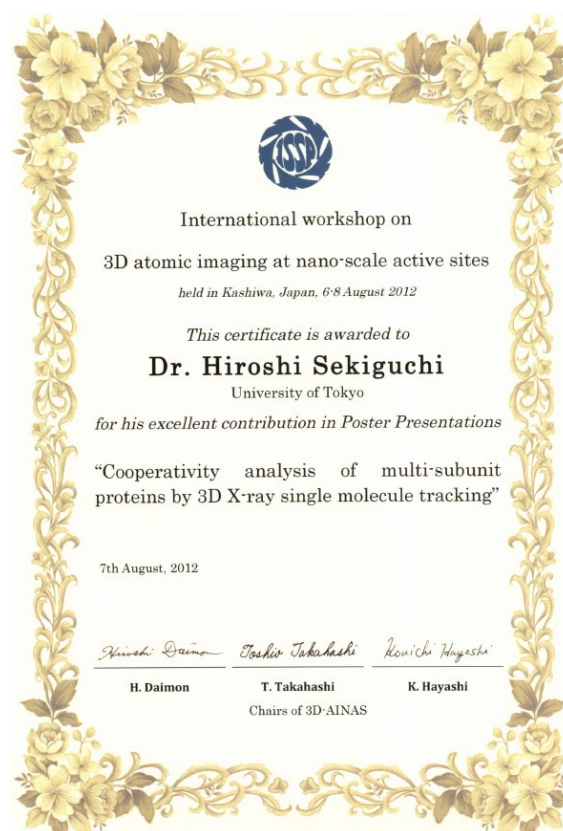
関口博史（高輝度光科学研究センター・A01 公募研究代表者）

平成 24 年 8 月 06 日（月）から 08 日（水）まで、東京大学柏図書館メディアホールで開催された International workshop on 3D atomic imaging at nano-scale active sites in materials (3D-AINAS 2012)において、本新学術領域研究の公募研究班員である関口博史（A01 班、公益財団法人 高輝度光科学研究センター）が、Best poster awards を受賞しました。3D-AINAS 2012 は、先端材料や生体物質などの機能解明に大きな役割を果たすと考えられる原子分解能ホログラフィーや回折イメージングなどの手法、及び、それらの応用研究について議論する国際学会です。Best poster awards は優れたポスター発表に対して与えられるもので 23 件のポスター発表のうち、2 件が選ばれました。

研究発表タイトルは「Cooperativity analysis of multi-subunit proteins by 3D X-ray single molecule tracking」です。本発表では、タンパク質の分子内運動検出に特化した X 線 1 分子追跡法を精錬化し、2 種類の複合体タンパク質(II 型シャペロニン、アセチルコリン受容体)の機能的なダイナミクス情報を 1 分子レベルで検出した内容を報告しました。II 型シャペロニンのダイナミクス計測では、ATP が作用することでまず、シャペロニンリングの各サブユニットが非同期的にリング内側に傾き、その後、同期的なねじれ運動をともなって閉状態に移行する実験結果を報告しました。さらにシャペロニンの機能発現条件と X 線 1 分子追跡法で観察される運動を対比するとリング全体のねじれ運動と変性タンパク質の巻き戻し活性に強い相関があることを報告しました(Sekiguchi et al., submitted)。X 線 1 分子追跡法で観察された 2 段階の閉運動は、本新学術領域・計画研究班の桑島邦博研究室(岡崎統合バ

イオサイエンスセンター)との共同研究によるストップフロー蛍光測定によっても確かめられています。アセチルコリン受容体のダイナミクス計測では、アセチルコリン受容に伴って回転ねじれ運動と傾き運動の 2 つの回転軸の運動が活性化されることが、X 線 1 分子追跡法の高速化($10 \mu s/f \sim 100 \mu s/f$)によって顕わになったことを報告しました。X 線 1 分子追跡法の高速化は、関口が本新学術領域で取り組んでいるテーマであります。

今後、様々な複合体タンパク質分子のダイナミクス計測に適用し、サブユニット間の動きについての協同性やタンパク質の機能に結びつく動きについて理解を深めていきたいと考えています。

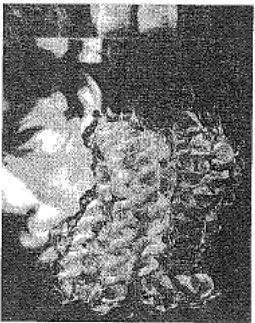


川上班員の研究成果が新聞、ウェブサイト上に掲載される

A01 班、公募研究代表者の川上勝博士の成果が日刊工業新聞、中日新聞、北國新聞（8月7日）、日本経済産業新聞（8月8日）に掲載されました。また数多くの地方新聞社、経済産業誌のウェブサイトにも本成果の記事が掲載されました。

平成24年8月7日・日刊工業新聞21面

たんぱく質の構造再現



樹脂で複雑立体模型

北陸先端大 研究教材に一役

北陸先端科学技術大学院大学マテリアルサイエンス研究科の川上勝准教授は6日、たんぱく質の複雑な分子構造を再現できる3次元造形技術を開発したと発表した。従来のシリコン樹脂を素材にしており、変形しやすい樹脂同士を合体させたりできる。たんぱく質の分子構造を直感的に理解することができ、研究現場での教材やディスカッションツールとして役立つという。

たんぱく質は一本のひもが複雑に折り畳まれたような構造をしている。この構造をリボンのように描いたモデルは「リボンモデル」が一般的に使われている。従来、リボンモデルは構造が複雑すぎたため、立体として再現するのが困難だった。川上准教授は今回、データを入力すれば立体を造形できる3次元造形機（3次元プリンター）で分子構造の輪郭を作り、鋳型の中にシリコン樹脂を流し込むことでリボンモデルを立体で再現することに成功した。コンピュータで仮想的に描いたたんぱく質の分子構造模型を複製（北陸先端大提供）

平成24年8月8日日経産業新聞9面

たんぱく質の立体模型

印刷で忠実再現

北陸先端大

北陸先端科学技術大学院大学の川上勝准教授は、たんぱく質の模型を待っている。成果は米国の物理学専門誌「サイエンス」に掲載された。複雑な形をしたたんぱく質の立体構造を忠実に再現できる。たんぱく質は内部骨格で直感的に、たんぱく質の内部構造を理解しやすい。たんぱく質の形も重なり、全体が複雑な形を呈する。たんぱく質の立体構造は、たんぱく質の機能や生物学的な役割を理解するための重要な情報である。たんぱく質の立体構造を忠実に再現することは、たんぱく質の機能を理解するための重要なステップである。

たんぱく質の立体構造を忠実に再現することは、たんぱく質の機能を理解するための重要なステップである。たんぱく質の立体構造を忠実に再現することは、たんぱく質の機能を理解するための重要なステップである。

平成24年8月7日北國新聞21面

たんぱく質の構造再現



樹脂で複雑立体模型

北陸先端大 研究教材に一役

北陸先端科学技術大学院大学マテリアルサイエンス研究科の川上勝准教授は6日、たんぱく質の複雑な分子構造を再現できる3次元造形技術を開発したと発表した。従来のシリコン樹脂を素材にしており、変形しやすい樹脂同士を合体させたりできる。たんぱく質の分子構造を直感的に理解することができ、研究現場での教材やディスカッションツールとして役立つという。

たんぱく質は一本のひもが複雑に折り畳まれたような構造をしている。この構造をリボンのように描いたモデルは「リボンモデル」が一般的に使われている。従来、リボンモデルは構造が複雑すぎたため、立体として再現するのが困難だった。川上准教授は今回、データを入力すれば立体を造形できる3次元造形機（3次元プリンター）で分子構造の輪郭を作り、鋳型の中にシリコン樹脂を流し込むことでリボンモデルを立体で再現することに成功した。コンピュータで仮想的に描いたたんぱく質の分子構造模型を複製（北陸先端大提供）