

業績紹介：フォールディングの初期段階でトラップされた中間体の構造と揺らぎ

水口峰之

(富山大学・A02 公募研究代表者)

論文題目: "Structural characterization of a trapped folding intermediate of pyrrolidone carboxyl peptidase from a hyperthermophile"

著者: Mineyuki Mizuguchi, Makoto Takeuchi, Shinya Ohki, Yuko Nabeshima, Takahide Kouno, Tomoyasu Aizawa, Makoto Demura, Keiichi Kawano, Katsuhide Yutani

雑誌巻号: *Biochemistry* **51**, 6089-6096 (2012)

一般に球状タンパク質は自発的にフォールディングするが、一部のタンパク質はフォールディングの途中で非天然構造にトラップされる。我々は、リフォールディングの初期段階でトラップされた中間体の構造と揺らぎについて調べた。

本研究では、pyrrolidone carboxyl peptidase の Cys フリー変異体 (PCP-0SH) を用いた。以前の研究により、PCP-0SH のリフォールディングは異常に遅いことがわかっている[1]。我々は、PCP-0SH を 6 M のグアニジン塩酸塩で変性し、その後に 4°C, pH 2.3 の条件でリフォールディングさせた。この条件では、PCP-0SH はリフォールディングの初期段階で中間状態 (D1 状態) にトラップされる。D1 状態は単量体として存在するので、PCP-0SH のトラップはタンパク質凝集が原因ではないと思われる。本研究では、D1 状態の構造と揺らぎについて、NMR、CD、ANS 蛍光を用いて調べた。D1 状態の主鎖連鎖帰属は、16 種類のアミノ酸選択標識と 3 次元 NMR スペクトルを組み合わせることによって行った。D1 状態の ^1H - ^{15}N HSQC スペクトルでは、1-113 番目のアミノ酸残基に由来するシグナルが観測された。一方、114-208 番目に由来するシグナルは観測されなかった。これは、化学交換による広幅化 (chemical exchange broadening) が原因であり、114-208 残基が μsec ~ msec のタイムスケールで揺らいでいることを示している。一方、1-113 残基の主鎖アミドプロトンは、 ^1H 軸の狭い範囲にシグナルを与えた。これは、D1 状態における 1-113 残基は disorder 状態であることを示している。

我々は、プロリンスキャン変異導入の手法で D1 状

態における α ヘリックス構造を調べた。PCP-0SH のプロリン変異体を 16 種類準備し、D1 状態における CD スペクトルを測定した。プロリンは、天然状態で α ヘリックスを形成しているアミノ酸残基に導入した。プロリン変異によってヘリックス含量が減少したことから、D1 状態で $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 6$ ヘリックスが形成していることがわかった。

D1 状態の PCP-0SH が存在する条件で、ANS 蛍光を測定すると強い蛍光が観測された。これは D1 状態において、ゆるくパッキングした疎水性コアが存在することを示している。次に、D1 状態のプロリン変異体が存在する条件で測定したところ、Y147P 変異と A199P 変異は ANS 蛍光を大きく減少させたが、これら 2 つ以外は ANS 蛍光にほとんど影響を与えなかった。Y147 と A199 は $\alpha 4$ と $\alpha 6$ ヘリックスに位置する。したがって、D1 状態のゆるくパッキングした疎水性コアは、 $\alpha 4$ と $\alpha 6$ によって形成されていると思われる (図)。

天然状態の PCP-0SH には 7 本の β ストランドからなる β シートがあり、それは $\alpha 4$ と $\alpha 6$ の間に位置している (図)。我々は、D1 状態でゆるい疎水性コアを形成する $\alpha 4$ と $\alpha 6$ は、天然構造にフォールディングする前に離れると結論づけた。以上の結果は、 $\alpha 4$ と $\alpha 6$ の非天然の相互作用が PCP-0SH の異常に遅いフォールディングの原因であることを示唆している。

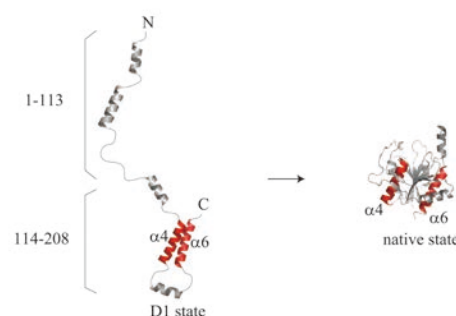


図. PCP-0SH の D1 状態の予想図。比較のために天然構造も示した。

参考文献

[1] J. K. Kaushik et al., The unusually slow relaxation kinetics of the folding-unfolding of pyrrolidone carboxyl peptidase from a hyperthermophile, *Pyrococcus furiosus*. *J. Mol. Biol.* **316**, 991-1003 (2002).

業績紹介：トラスツズマブで活性化した自己リンパ細胞を用いる新しいがん免疫療法

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: "New cancer immunotherapy using autologous lymphocytes activated with Trastuzumab"

著者: Shinichirou Nakagawa, Yusuke Matsuoka, Hideaki Ichihara, Hitoji Yoshida, Kenshi Yoshida, Ryuichi Ueoka

雑誌巻号: *Biol. Pharm. Bull.*, **35**, 1213-1215 (2012)

乳がん患者の 20~30% が ErbB2(ヒト上皮増殖因子受容体 2 型: HER2)を過剰発現しているとされる。HER2 陽性患者は抗がん剤が効きにくく、生命予後は不良であった。しかし、分子標的薬のトラスツズマブ (TTZ, ハーセプチン) が開発され、HER2 陽性乳がんに対しての有効性が明らかにされた[1]。トラスツズマブは、増殖抑制や抗体依存性細胞傷害 (ADCC) を引き起こすことで、HER2 陽性がん細胞への有効性を発揮することが明らかになっている[2]。一方で、第 4 のがん治療法と言われている活性化自己リンパ球療法 (LAK) は、患者自身の免疫能力を活用する治療法なので副作用は少ない。免疫療法を施していないグループと比較して生存率の向上と無再発率が高いという報告がある。

本研究では、筆者らのがんに関する研究をベースとして[3-4]、TTZ で活性化したリンパ球を用いて、新しい免疫細胞治療法の開発を目指した。以下に得られた興味深い結果を示す。

①我々は、TTZ による末梢血単核球 (PBMC) への影響を検討した。TTZ 未刺激群の PBMC と比較して刺激群の PBMC が増殖することが確認された。この結果により、TTZ により活性化した PBMC を用いる新しい免疫細胞治療としての有効性が示唆された。

② TTZ により活性化した自己リンパ球 (TTZ-LAK) を用いて、HER2 発現レベルの異なる乳がん細胞株 SK-BR-3(高), MDA-MB-453(中), MCF-7(低)をターゲット細胞とし、細胞傷害活性を検討した。健常ドナー 3 名の末梢血採血より得られた PBMC を用い、TTZ-LAK 細胞を作製した。WST-8 assay を用いて、TTZ-LAK 細胞と従来法の CD3-LAK 細胞のヒト乳がん細胞株への細胞傷害活性を比較した結果を図に示す。TTZ-LAK 細胞は、CD3-LAK 細胞と比較して SK-BR-3 および MDA-MB-453 乳がん細胞株に対して有意に細胞傷害

活性を増強した。一方、HER2 発現レベルの低い MCF-7 に対する細胞傷害活性は、CD3-LAK 細胞と同レベルであった。また、培養 2 週間後の総細胞数は、従来の CD3-LAK 細胞と同等あるいはそれ以上の増殖を示したことから、臨床を想定した場合の治療に十分な細胞数が確保できることが明らかになった。

③ 強い細胞傷害活性を示した TTZ-LAK 細胞のメカニズムを検討するために、TTZ で刺激したリンパ球を抗体染色してフローサイトメータを用いてリンパ球のポピュレーションを解析した。TTZ で刺激するリンパ球培養法により増殖したリンパ球群は、臨床で用いている活性化リンパ球と比較して、細胞傷害活性の指標となる NKG2D、TCR $\gamma\delta$ ($\gamma\delta$ 細胞) の発現率および CD16+CD56+細胞 (NK 細胞) 集団の割合が上昇することが確認された。

以上のように、*in vitro* において、TTZ で PBMC を刺激することにより作成した TTZ-LAK 細胞は、HER2 を発現している乳がん細胞に対して、現在臨床で用いている活性化自己リンパ球 CD3-LAK 細胞よりも高い細胞傷害活性を示すことが明らかになり、新しい免疫療法として期待できる。

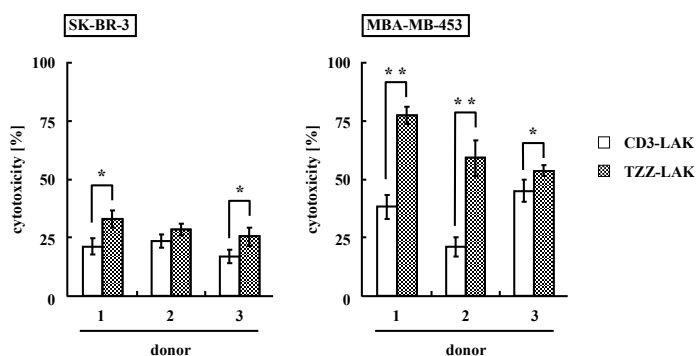


図 HER2 発現乳がん細胞株に対する TTZ-LAK 細胞の細胞傷害活性

参考文献

- [1] G.D. Lewis *et al.*, *Cancer Immunol. Immunother.*, **37**, 255-263 (1993). [2] L.M. Weiner *et al.*, *Lancet*, **373**, 1033-1040 (2009). [3] K. Yoshida *et al.*, *Nature*, **218**, 977-78 (1968). [4] R. Ueoka *et al.*, *Curr. Pharm. Des.*, **17**, 1709-1719 (2011).

業績紹介：ハイブリッドリポソームのヒト大腸がん肝転移モデルマウスに 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)

松本陽子

(崇城大学応用生命科学・A03 公募研究代表者)

論文題目："Intravenous injection of hybrid liposomes suppresses the liver metastases in xenograft mouse models of colorectal cancer *in vivo*"

著者：Hideaki Ichihara, Motoki Hino, Masayo Umebayashi, Yoko Matsumoto, Ryuichi Ueoka

雑誌巻号：Eur. J. Med. Chem., **57**, 143-148 (2012)

上岡らが開発したハイブリッドリポソーム (HL) は [1]、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る。HL 自身がアポトーシス誘導型の制がん効果を示すこと [2]、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 [3]。 *in vivo* において、担がんマウスを用いた治療実験から延命効果が得られている [4]。さらに、生命倫理委員会承認後の悪性リンパ腫患者に対する臨床試験において、高い安全性および延命効果が得られている [5]。

本研究では、ヒト大腸がん (CRC) 肝転移モデルマウスに対する HL-25 の治療効果を検討し、以下に示す知見が得られた。

①HL は、直径約 100nm の均一なベシクルであることが観察された。動的光散乱法からは、1 ヶ月以上安定であることが明らかとなった。すなわち、HL は細胞膜内皮系への取り込みが回避可能な膜直径であり、長期間安定で、臨床応用における保存に有用であることが明確となった。

②HL-25 の CRC 肝転移モデルマウスに対する延命効果を検討した。未治療群に対する HL 投与群の延命率は、130% ($p < 0.05$)、であり、高い延命効果が得られた。一方、DMPC に延命効果は認められなかった。

③HL-25 で治療した CRC 肝転移モデルマウスの肝臓の剖検と重量測定を行った。未治療群および DMPC において、CRC 肝転移による腫瘍の腫大が確認されたが、HL-25 治療群ではノーマルと同等であり、顕著な治療効果が得られた。

④HL-25 で治療した CRC 肝転移モデルマウスの肝

臓を組織学的に解析した。HE 染色した切片観察から、未治療群および DMPC において、肝臓内で大腸がん細胞の著しい増殖が確認された。一方、HL-25 治療群では、転移巣はほとんど確認されなかった。次に、TUNEL 染色した肝臓組織切片を観察した。HL-25 治療群において、アポトーシス誘導に伴う DNA 断片化が明らかになった。これらの結果からアポトーシス誘導による治療効果が明らかになった。

⑤CRC 肝転移モデルマウスに対して、蛍光標識 HL-25 を投与し、組織切片を用いて体内動態を検討した。HL-25 の静注後、CRC 肝転移モデルマウスの肝臓における腫瘍部位への長時間の選択的蓄積が観察された (図)。

これらの結果から、ヒト CRC 肝転移モデルマウスに対する、薬物を含まない HL のみによる治療効果が、*in vivo* で初めて明らかとなった。

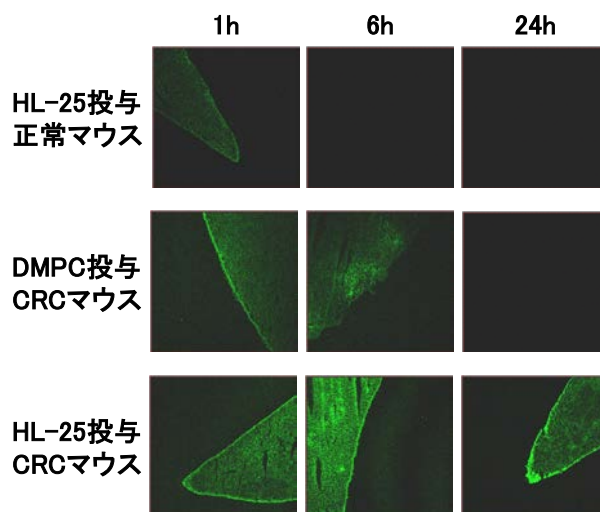


図 HL-25 の CRC 肝転移モデルマウスに対する体内動態

HL-25 は、CRC 肝転移モデルマウスの肝臓において、長時間腫瘍部位へ選択的に蓄積した。

参考文献

- [1] R. Ueoka *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **110**, 1588-1595 (1988). [2] Y. Matsumoto *et al.*, *Int. J. Cancer*, **115**, 377-382 (2005). [3] R. Ueoka *et al.*, *Curr. Pharm. Des.*, **17**, 1709-1719 (2011). [4] H. Nagami *et al.*, *Int. J. Pharm.*, **315**, 167-172 (2006). [5] H. Ichihara *et al.*, *Anticancer Res.*, **28**, 1187-1196 (2008).

業績紹介：カチオン性脂質含有ハイブリッドリポソームの大腸がん細胞に対するアポトーシス誘導

上岡龍一

(崇城大学応用生命科学・A03 計画研究代表者)

松本陽子

(崇城大学応用生命科学・A03 公募研究代表者)

論文題目："Anti-tumor effects of cationic hybrid liposomes against colon carcinoma along with apoptosis in vitro"

著者： Motoki Hino, Hideaki Ichihara, Yoko Matsumoto, Ryuichi Ueoka

雑誌巻号： *Biol. Pharm. Bull.*, **35**, 2097–2101 (2012)

上岡らが開発したハイブリッドリポソーム (HL) は [1]、従来の制がん剤なしに HL のみで種々のヒトがん細胞に対し増殖抑制効果を示し、アポトーシスを誘導することが明らかになっている [2]。 *in vivo* において、担がんマウスを用いた治療実験から延命効果が得られ [3]、正常動物を用いた安全性試験で副作用が無いことが確認されている [4]。さらに、生命倫理委員会承認後の悪性リンパ腫患者に対する臨床試験において、高い安全性および延命効果が得られている [5]。

アニオン性のがん細胞膜との相互作用を期待し、カチオン性脂質 (2C₁₄ECI) 含有 HL を用いて、 *in vitro* および *in vivo* における腎臓がん細胞に対する増殖抑制効果を見出している [6]。本研究では、カチオン性脂質 (2C₁₄ECI) 含有 HL のヒト大腸がん (HCT116) 細胞に対する制がん効果および制がんメカニズムについて検討した。以下に得られた知見を示す。

①カチオン性脂質含有 HL は、電子顕微鏡観察から直径約 100nm の均一なベシクルの形態であることが観察された。動的光散乱法からは、1 ヶ月以上安定であることが明らかとなった。以上の結果から、カチオン性 HL は細網内皮系への取り込みが回避可能な膜直径であり、長期間安定で、臨床応用における保存に有用であることが明確となった。

② カチオン性脂質含有 HL の HCT116 細胞に対する制がん効果について検討したところ、50%増殖抑制濃度は、DMPC 単ーリポソームの約 1/3 と低く、低濃度で同等の制がん効果が得られることが明らかとなった。

③ HCT116 細胞膜へのカチオン性脂質含有 HL の融合・蓄積を検討した。結果を図に示す。DMPC 単ーリポソームは、HCT116 細胞膜へ融合しないのに対し、

カチオン性脂質含有 HL は、短時間で HCT116 細胞膜へ融合・蓄積することが確認された。HCT116 細胞は、アニオン性のフォスファチジルセリンやシアル酸量が多いことが報告されており、カチオン性脂質含有 HL の HCT116 細胞膜に対する特異的な融合に細胞膜の物性に関与することが示唆された。

④ カチオン性脂質含有 HL の HCT116 細胞に対する増殖抑制メカニズムを検討した。TUNEL 法による観察では、DMPC リポソームでは、アポトーシス細胞が観測されないのに対し、カチオン性脂質含有 HL で処理した HCT116 細胞において、アポトーシス細胞が確認された。また、フローサイトによる断片化 DNA を定量したところ、濃度依存的な断片化 DNA の増大が確認された。さらに、ミトコンドリア膜電位の低下が確認され、ミトコンドリアを経由するアポトーシス誘導メカニズムであることが明らかになった。

以上のように、カチオン性脂質含有 HL の大腸がんに対する「アポトーシス誘導による増殖抑制効果」が初めて認められ、大腸がんの新しい治療薬として期待できる。

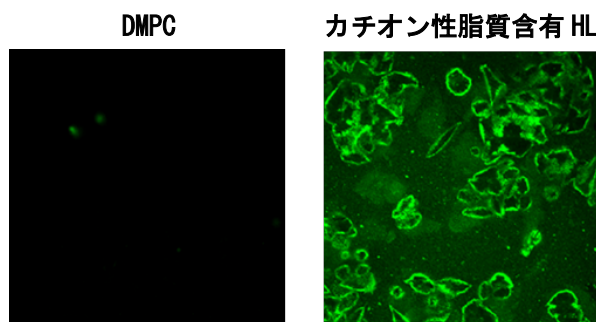


図 大腸がん細胞へのカチオン性脂質含有 HL の特異的蓄積

参考文献

- [1] R. Ueoka *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **110**, 1588-1595 (1988). [2] Y. Matsumoto *et al.*, *Int. J. Cancer*, **115**, 377-382 (2005). [3] R. Ueoka *et al.*, *Biol. Pharm. Bull.*, **23**, 1262-1263 (2000). [4] H. Nagami *et al.*, *Int. J. Pharm.*, **315**, 167-172 (2006). [5] H. Ichihara *et al.*, *Anticancer Res.*, **28** 1187-1196 (2008). [6] M. Umebayashi *et al.*, *Anticancer Res.*, **30** 327-338 (2010).

業績紹介：ヒアルロン酸存在下における Jack bean α -mannosidase の性状

戸谷希一郎

(成蹊大学理工学部・A03 計画研究代表者)

論文題目："Properties of Jack bean α -mannosidase in the presence of hyaluronan"

著者：Mayumi Nakamura, Yuka Adachi, and Kiichiro Totani

雑誌巻号：Biosci. Biotechnol. Biochem. 76, 856-858 (2012)

ヒアルロン酸 (HA) は細胞外マトリクスの構成成分であり、水溶液中で網目構造を形成することが知られている。その網目の大きさは HA 濃度に依存し、分子量には依存しないことも報告されている。本研究では HA 水溶液中の網目環境を、細胞外マトリクス内の反応場モデルとして用い、Jack bean α -mannosidase の反応性に与える影響を調べた。

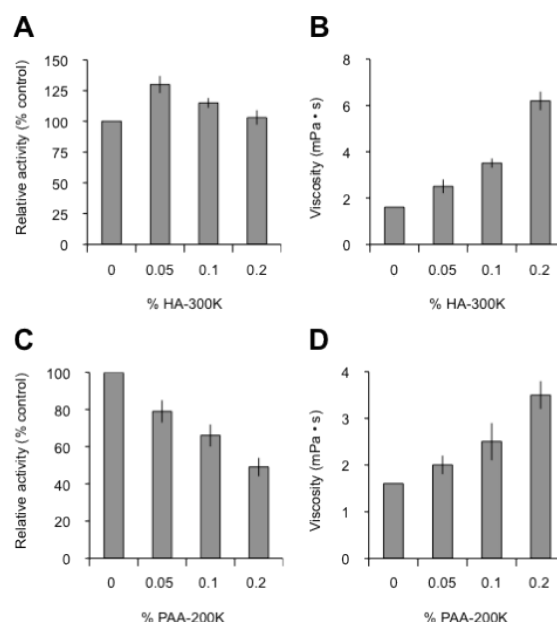
網目反応場を形成する HA として平均分子量为 300,000 (HA-300K) に調節した合成物を、基質として *p*-nitrophenyl α -D-mannopyranoside (pNP-Man) を用い、Jack bean α -mannosidase の糖加水分解活性を検討した (図 A)。その結果、HA 非存在下の活性を基準とした場合、0.05% の HA-300K の添加によって相対活性は有意に向上することが分かった。HA の添加濃度を 0.2% まで順次向上させた場合、相対活性は濃度依存的に低下したが、いずれも HA を添加しない場合の活性を超えていた。これらの反応に用いた HA 添加濃度における系内の粘度を測定したところ、粘度は HA 添加濃度依存的に向上し、0.2% 添加時には非添加時の 3 倍以上の粘度を示した (図 B)。粘度の向上が分子の拡散を低下させることを考慮すると、酵素反応活性も HA 濃度依存的に低下するはずである。しかしながら図 A の結果は系内粘度に依存しない酵素反応の活性化を示している。同様の検討を HA-1000K 存在下で行った結果、同じように HA 0.05% 存在下で活性の向上を示し、HA 添加濃度の向上に伴って、その活性は低下する傾向が認められた。

HA 添加濃度 0.05% における反応性の向上は、酵素が網目内に捕捉されて拡散が制限されることによって、基質との衝突頻度が向上したためと解釈できる。一方、本反応場では系内の粘性の向上に伴う反応性の低下も同時に生じており、HA 添加濃度 0.1 および 0.2 %に

おける HA 濃度依存的な反応性の低下は、粘度向上によるものと思われる。すなわち細胞外マトリクス中では、生体分子の衝突確率を正負の方向に調節する相反した要因が共存しており、形成される網目構造の大きさと対象となる酵素分子の大きさのバランスによって、当該活性への影響が揺らいでいることが示唆される。

この現象が網目環境場特異的なものであることを証明するために、我々は次に網目構造を形成しない高分子モデルとして架橋していないポリアクリルアミドを、酵素反応系内に添加した場合の影響を調べることとした。図 A の検討と同様の反応条件で添加剤を HA から分子量 200,000 のポリアクリルアミド (PAA-200K) に変更して加水分解活性を比較したところ、PAA 添加濃度依存的な粘度の向上と相関して反応効率は低下し、HA のように添加による反応効率の向上は認められなかった (図 C, D)。

本研究は HA が形成する網目環境が酵素を捕捉し、分子の拡散が制限された微小空間内で酵素と基質の衝突頻度が向上する可能性を示したものであり、生体内揺らぎ反応場の存在を示唆するものと解釈できる。



図：ヒアルロン酸およびポリアクリルアミドの添加による Jack bean α -mannosidase 活性と系内粘度の変化

業績紹介：好熱性水素細菌由来シトクロム c_{552} 二量体における
ヘムおよびN末端 α ヘリックスを含む領域のドメインスワッピング

廣田 俊

(奈良先端大物質創成・A03 公募研究代表者)

論文題目："Domain swapping of the heme and N-terminal α -helix in *Hydrogenobacter thermophilus* cytochrome c_{552} dimer"

著者：Yugo Hayashi, Satoshi Nagao, Hisao Osuka, Hirofumi Komori, Yoshiki Higuchi and Shun Hirota

雑誌巻号：Biochemistry **51**, 8608-8616 (2012)

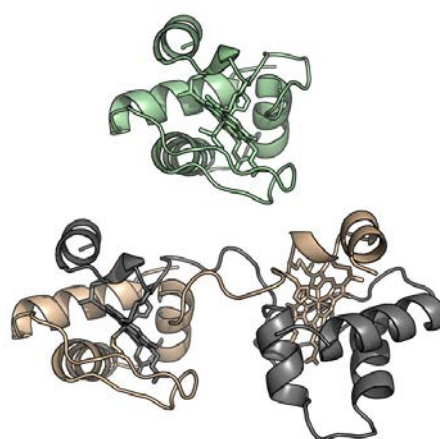
好熱性水素細菌 (*Hydrogenobacter thermophilus*, HT) 由来シトクロム (cyt) c_{552} は哺乳類の cyt c よりも小さく (9.2 kDa)、高い熱安定性を示す。我々はこれまでに、ウマ cyt c がC末端 α ヘリックス領域を別分子の対応する領域と交換 (ドメインスワッピング) することにより多量化することを明らかにした[1]。本研究では、HT cyt c_{552} 二量体の構造と機能、熱安定性について調べた。

酸化型 HT cyt c_{552} にエタノールを添加すると多量体が得られ、エタノール添加時の温度を 0°C から 50°C に上げるに従って、多量体の形成量は増加した。ウマ cyt c では 40 量体以上の高次多量体が観測されるが、HT cyt c_{552} では 5 量体までしか観測されなかった。20°C で HT cyt c_{552} 溶液にエタノールを終濃度 60% (v/v) で加えても吸収スペクトルは変化しなかったが、50°C では Soret 帯の極大吸収波長が 1 nm 短波長シフトし、メチオニン-ヘム鉄結合に由来する 690 nm の吸収帯の吸光度が減少した。この結果は、ヘム鉄に配位するメチオニンがエタノール添加により一部解離したことを示している。

HT cyt c_{552} 二量体の Soret 帯の極大吸収波長は単量体と同様、410 nm に観測された。690 nm の吸収強度も単量体と二量体でほとんど変わらなかった。Cyt c_{552} 二量体の CD スペクトルは 208 と 222 nm に負の極大を示し、ピーク強度は単量体と類似していた。これらの分光学的特徴は HT cyt c_{552} 二量体が単量体と類似した活性部位構造と二次構造を有することを示唆している。X 線結晶構造解析より、HT cyt c_{552} 二量体では、Ala18、Lys19、Lys20 の位置が単量体での位置から大

きくずれ、N末端 α ヘリックスとヘムを含む領域を別分子の対応する領域とドメインスワッピングしていることが明らかになった (図 1)。ヘムに結合するメチオニン残基のまわりのループで比較的強い水素結合ネットワークが形成されているため、HT cyt c_{552} 二量体で、C末端 α ヘリックスは残りのタンパク質部分から解離しなかったと推測される。二量体では、メチオニンはヘム鉄に配位していたが、ヘムが属しているプロトマーとは別のプロトマーに属していた。HT cyt c_{552} 単量体の熱安定性に重要なアミノ酸残基のパッキングは二量体でも維持され、二量体は高い熱安定性を示した。

HT cyt c_{552} 二量体の酸化還元電位 (E_m) は単量体の E_m (240 ± 2 mV) より少し低く、 213 ± 2 mV であったが、高い E_m は維持されていた。二量体から単量体への解離反応の活性化エンタルピーおよび活性化エントロピーは、エタノール添加により、それぞれ、 140 ± 9 から 110 ± 5 kcal/mol、 310 ± 30 から 270 ± 20 cal/(mol·K) に減少した。一方、二量体から単量体への解離反応のエンタルピー変化は正の値を示した (プロトマー当たり 14 ± 2 kcal/mol)。これらの結果は、ドメインスワッピングの交換領域および熱力学的性質に対して新しい知見を与える。



図：HT cyt c_{552} 単量体 (上、PDB: 1YNR) および二量体 (下、PDB: 3VYM) の立体構造。

参考文献

[1] S. Hirota et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **107**, 12854-12859 (2010).

業績紹介：シャペロニン空洞内負電荷によるフォールディング促進効果の再検証

元島史尋

(京都産業大・A03 公募研究代表者)

論文題目："Revisiting the contribution of negative charges on the chaperonin cage wall to the acceleration of protein folding"

著者：F. Motojima, Y. Motojima-Miyazaki, and M. Yoshida
雑誌巻号：Proc. Natl. Acad. Sci. **109**(39), 15740-15745 (2012)

【概要】大腸菌の分子シャペロンの一つ、シャペロニン(GroEL/GroES)は変性タンパク質を空洞に閉じ込めてそのフォールディングを援助する。最近、Hartl グループは、負電荷を正電荷に置換した single-ring GroEL (SR1)の変異体(SRKKK2)がフォールディング促進活性を失っていることを理由に、シャペロニン空洞内の負電荷がフォールディングに必要な水分子の構造形成に必要であると報告した^{1,2}。しかし、我々が発見した out-of-cage folding³ (変性タンパク質がシャペロニン空洞外へ遊離した後、自発的フォールディングする) が SRKKK2 で起こっている可能性が考えられ、検証を行った。予想通り、彼らの主張の根拠である DMMBP のフォールディングは out-of-cage folding によるものであった (結果②～⑤)。また SRKKK2 がフォールディングできないとされた藍藻由来 Rubisco はフォールディングが可能であることも分かった (結果⑥)。したがって、彼らの主張は誤りであると結論づけた。さらにシャペロニン援助フォールディングは single-turnover の条件で、tethering model³ を基に解析する必要があることがわかった。

【結果】本研究で分かった彼らの実験の問題点を以下に列挙する。

- ① SR1 に GroES は安定して結合していると報告されていたが、実際には GroES は結合・解離を繰り返していた。彼らはこれまで single-turnover でフォールディング反応を観察していなかったことが判明。
- ② DMMBP は SRKKK2 の空洞内でフォールディングされたと考えられていたが、実際にはほとんどの変性 DMMBP は SRKKK2 の空洞外に escape し、自発的にフォールディングしていた (図 1 A)。

- ③ タンパク質のフォールディングに伴う蛍光 anisotropy の減少は、Hartl グループの confinement model が想定していた空洞内への放出ではなく、空洞外への escape が原因であった (図 1 B)。シャペロニンとタンパク質との相互作用により、タンパク質の揺らぎは抑制されていることが示された。
- ④ SRKKK2 の空洞内に閉じ込めた DMMBP は protease で切断できないという結果は再現できず、変性状態で escape する DMMBP のほとんどが切断された。
- ⑤ TMAO は SRKKK2 が失った負電荷の効果を補って水分子の構造形成を促すと報告された。しかし、上述のように DMMBP は SRKKK2 の空洞内に入っておらず、この結果は誤りであった。
- ⑥ SRKKK2 は Rubisco を全くフォールドできないと報告されたが、彼らの処理条件では活性のある Rubisco dimer が形成できないことが判明し、我々の処理条件では dimer が形成しフォールドできた。

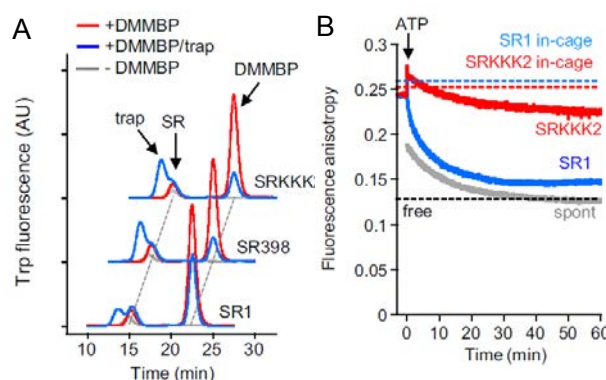


図 1. (A) シャペロニンでフォールディング後の DMMBP のゲル濾過解析。 Guanidinium salt の影響で 90%以上の DMMBP がシャペロニン複合体から遊離している。(B) 蛍光標識 DMMBP のフォールディングにおける蛍光 anisotropy 変化。 Guanidinium salt の代わりに尿素を用いた。 Free: native DMMBP, SR1 in cage : 精製した SR1/DMMBP/GroES 複合体。

- [1] Tang Y.C., et al. Cell **125**, 903-914 (2006)
- [2] Chakraborty K., et al. Cell **142**, 112-122 (2010)
- [3] Motojima, F., et al. EMBO J. **29**: 4008-4019 (2010)

北原グループの北沢氏が NMR 討論会若手ポスター賞を受賞

北原 亮

(立命館大薬学・A01 公募研究代表者)

平成 23 年 11 月 8 日（木）から 10 日（土）まで、愛知県名古屋市のウインクあいちで開催された第 51 回 NMR 討論会において、公募研究班員である報告者（A01 班、立命館大学・薬学部）グループの北沢創一郎氏（博士後期 2 年）が、NMR 討論会若手ポスター賞を受賞しました。また受賞者には、3 日目に受賞講演の機会が与えられました。受賞演題は、「ユビキチンの高エネルギー状態 N2 の立体構造解明」です。今大会の NMR 討論会若手ポスター賞は、大学等アカデミア部門と企業研究者部門の 2 部門よりなり、それぞれ 6 名と 4 名が受賞されました。北沢氏は、アカデミア部門に応募し受賞となりました。膜たんぱく質の構造揺らぎの研究、MRI や装置開発の研究などレベルの高い演題が多い中、蛋白質の高エネルギー構造に関する演題で受賞できたのは、蛋白質科学における高エネルギー状態の重要性が認められたためかもしれません。何より、博士研究のテーマとして一生懸命に実験や解

析を進めてきた北沢氏の努力の結果であり、指導者としても光栄です。

彼の博士課程における研究テーマは、高圧力下で発見されたユビキチンの高エネルギー状態をアミノ酸変異という一般的手法で安定化し、精密な立体構造解析や機能解析を進めるというものです。北沢氏は、H23 年度にはユビキチンの準安定状態 N2 のアミノ酸変異による安定化に成功し蛋白質科学会にて若手ポスター賞を受賞いたしました。今回は、高圧力 NMR 測定により N2 構造が 15% から 70% にまで増幅されていることを示し、さらに N2 状態を模倣した変異体の NMR による精密構造解析に成功しました。ポスター発表では、同 A01 班の川上先生が開発された蛋白質模型を手により、変異部位や構造転移の様子を分かりやすく解説したため、審査員の高評価にもつながったものと感じます。模型を無償提供いただいた川上先生にお礼申し上げます。また共同研究者である A01 計画班の加藤晃一先生、矢木・内海真穂さんにもお礼申し上げます。今後は高エネルギー状態の機能的意義の解明にも取り組む予定です。



NMR 討論会懇親会にて（左：北沢創一郎、右：北原、左下：分子模型）。

北沢氏は核磁気共鳴学会から、若手研究者渡航費助成も受けたため 2 枚の賞状をいただいた。

片岡班員らの研究成果がWebで紹介される

A02 班、計画研究代表者の片岡幹雄博士（奈良先端科学技術大学院大学）と同グループの上久保裕生博士（連携研究者）及び米国 NIH の Philip Anfinrud 博士のグループの共同研究により、イエロープロテインの 100 ピコ秒時間分解能 X 線結晶構造解析が行われ、反応に伴う構造変化の詳細が明らかになりました。特に、発色団のトランス型からシス型への異性化の中間状態（90°ねじれた発色団構造）を世界で初めて明らかにしました。この成果が平成 24 年 11 月 9 日付産経新聞の Web ニュース【ベテラン記者のデイリーコラム・坂口至徳の科学の現場を歩く】で紹介されました。

http://sankei.jp.msn.com/west/west_life/news/121109/wlf12110916300017-n1.htm

この他、11 月 7 日（水）付の日刊工業新聞でも紹介されています。

基となった研究は Proc. Natl. Acad. Sci. USA（early edition）に年 11 月 6 日付でオンライン公表されています。研究内容の詳細は、後日紹介する予定です。

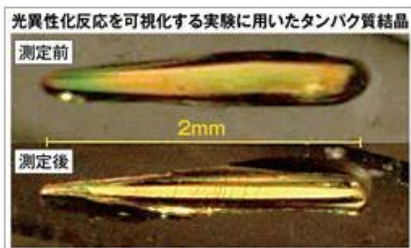
【ベテラン記者のデイリーコラム・坂口至徳の科学の現場を歩く】

光を感じ変化…タンパク質の原子の動きを画像化 奈良先端

2012.11.9 16:30（1/3ページ）【ベテラン記者コラム】

生体の中で瞬時に反応するタンパク質の微細な変化を原子のレベルで高速度撮影のようにとらえることができれば、たとえば、薬がどのように結合して効いているかを調べることができ、創薬の有力な手段になると期待されている。

この際、変化を追跡するために反応の様子をコマ撮りする時間は間隔が短いほどきめ細かく反応の過程がわかり、新発見に結びつく情報が得られる。画像（空間）の解像度を上げるとともに、時間の解像度の向上も不可欠なのだ。



光異性化反応を可視化する実験に用いたタンパク質結晶

■ 世界最高「兆分の1」レベル…光ディスクなど工業も応用

奈良先端科学技術大学院大学物質創成科学研究科エネルギー変換科学研究室の上久保裕生准教授、片岡幹雄教授らは、米国立衛生研究所・国立糖尿病・消化器・腎疾病研究所のフィリップ・アンフィンランド教授らとの共同研究で、光により構造が変化する光センサータンパク質の様子を世界最高のレベルの分解能で可視化することに成功、反応途中の未知の重要な変化も発見した。

光センサータンパク質は、生物が環境の変化に適応するために持っている物質だ。片岡教授らは、紅色光合成細菌が光を感じて走行するさいに働く「イエロープロテイン」とい