

業績紹介：糖脂質含有バイセルを用いたガングリオシドクラスターと天然変性タンパク質とのNMR相互作用解析

加藤晃一

(自然科学研究機構・A01 計画研究代表者)

論文題目：“Ganglioside-embedding small bicelles for probing membrane-landing processes of intrinsically disordered proteins”

著者：Takumi Yamaguchi, Tsuyoshi Uno, Yoshinori Uekusa, Maho Yagi-Utsumi, and Koichi Kato

雑誌巻号：Chem. Commun. 49, 1235-1237 (2013)

神経細胞に豊富に存在する糖脂質ガングリオシドは、細胞膜上でクラスターを形成し、様々な生命現象に関与している。近年では、ガングリオシドクラスターが多く神経変性疾患の発症に密接に関わっていることが見出されつつある。例えばアミロイドβやα-シヌクレイン (α-Syn) は、ガングリオシドの種類に応じた結合特異性を示し、ガングリオシドクラスターとの相互作用を通じて立体構造変化を起こすことが知られている。このようなガングリオシドクラスターへの天然変性タンパク質の結合過程においては、膜表層での糖鎖-タンパク質相互作用や、それに続く膜内の疎水性領域へのアンカリングなど、多段階の相互作用を経て、タンパク質の立体構造の揺らぎが大きく変化すると考えられる。ガングリオシドクラスターと天然変性タンパク質の多様な相互作用様式を明らかにすることは、その機能メカニズムを理解する上でも重要な課題である。本研究では、脂質膜モデルであるバイセルに着目し、溶液 NMR 計測を主軸としたガングリオシド含有バイセルと α-Syn との相互作用解析を行った。

具体的には、ガングリオシド GM1、GM2 または GM3 をそれぞれ組込んだ小型バイセルを調製した。これらのガングリオシドは単独では水中で巨大な会合体を形成してしまうが、バイセルへ組込むことで、サイズの制御されたクラスターモデルを構築することができた。ガングリオシド含有バイセルに α-Syn を添加し NMR 計測を行った結果、α-Syn の N 末端領域に顕著なスペクトル変化がみられた (図 1)。GM1 または GM2 含有バイセルを添加した際には α-Syn のスペクトルに変化が観測されたのに対し、GM3 含有バイセル添加時には

スペクトルにほとんど変化が生じなかった。これらの結果から、α-Syn の N 末端領域は糖鎖構造に依存した結合特性を担っていることが明らかとなった。α-Syn の二次構造変化について調べた。α-Syn は脂質膜に結合することで、ランダムコイルから α-ヘリックスへ構造変化することが知られている。しかし、今回明らかとなったガングリオシド含有バイセルとの相互作用においては、特定の二次構造が誘起されないことが、NMR 計測および CD 測定の結果から示された。

以上のように、本研究では α-Syn が N 末端領域を介して糖鎖構造を識別し、ガングリオシドクラスターと結合することを明らかにした。さらに、その際に二次構造変化を伴わない相互作用様式が存在することを見出した。これは α-Syn が脂質膜と結合して α-ヘリックスを形成する初期段階における、過渡的な遭遇複体の形成を反映している可能性が考えられる。

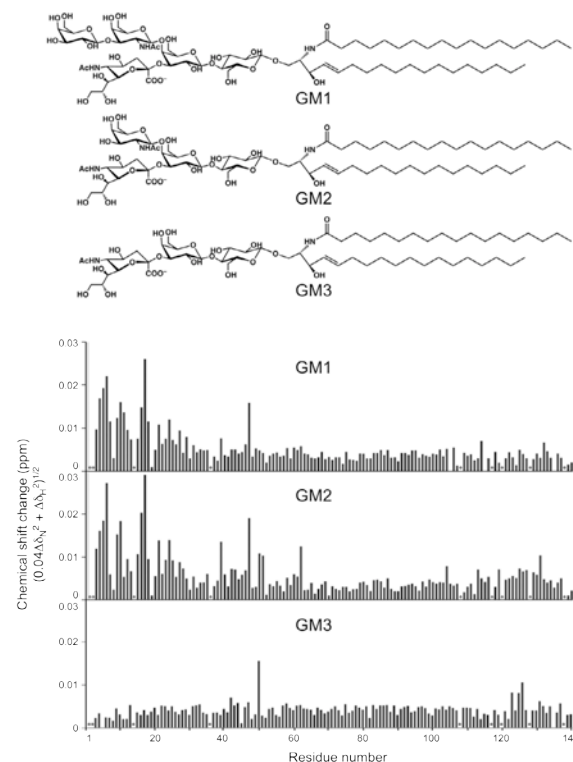


図 1. GM1、GM2、GM3 の構造およびガングリオシド含有バイセル添加時の α-Syn の化学シフト変化。

業績紹介：エネルギー表示溶液理論を用いた分子動力学シミュレーションによる
リゾチーム-triNAG 複合体の自由エネルギー解析

北尾彰朗

(東京大学分生研・A01 公募研究代表者)

論文題目："Free-energy analysis of lysozyme-triNAG binding modes with all-atom molecular dynamics simulation combined with the solution theory in the energy representation"

著者： Kazuhiro Takemura, Raghunadha R Burri, Takeshi Ishikawa, Takakazu Ishikura, Shun Sakuraba, Nobuyuki Matubayasi, Kazuo Kuwata, and Akio Kitao

雑誌巻号： *Chem. Phys. Lett.* (2013) in press

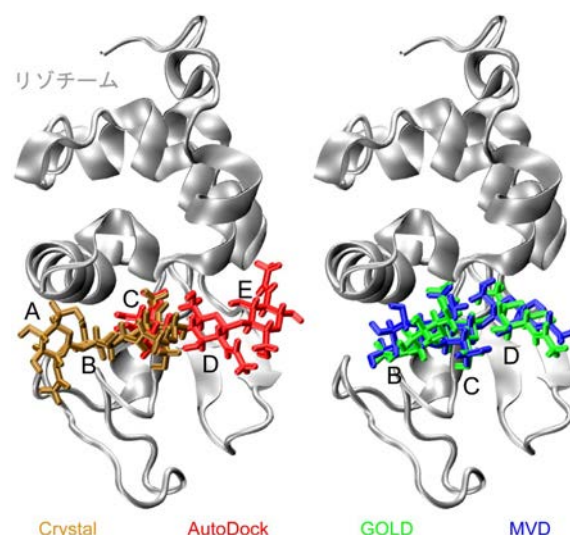
<http://dx.doi.org/10.1016/j.cplett.2012.12.063>

蛋白質は他の分子との相互作用を介してその分子機能を発現する。そのため、蛋白質の複合体構造と分子間相互作用を知ることは、蛋白質の機能を理解する上での重要な鍵となる。これまでに我々は、溶媒を露わに含めた全原子モデルの分子動力学 (MD) シミュレーションとエネルギー表示法を用い、結合自由エネルギーを高精度に評価することにより、最適な複合体モデルを選択する手法を提案してきた[1]。本手法では、エネルギー表示法を用いることにより、わずか 1-5 ns の複合体の MD 計算から複合体間の結合自由エネルギー差を評価することが可能である。

今回紹介する研究において、我々は、提案した手法をリゾチーム-triNAG の複合体に適用している。複合体のモデルは、蛋白質-リガンドのドッキングに広く用いられている、AutoDock、GOLD、Molegro Virtual Docker (MVD)を用いて作成した。リゾチームには糖残基の結合する 6 つのサブサイトがあることが知られており、図に示したように、結晶構造ではサブサイト ABC に triNAG が結合している。AutoDock ではサブサイト CDE、GOLD、MVD ではサブサイト BCD に triNAG が結合した複合体構造を尤もらしい構造として予測している。結晶構造を含む 4 つの複合体構造をそれぞれのドッキングプログラムの評価関数で再評価した結果、表のように結晶構造は低く評価されている (GOLD のみ高い数値の時に評価が高く、他は低い数値の方が高く評価している)。リゾチーム-triNAG 複合体結晶構造

では triNAG がリゾチーム内部でなく溶媒に露出したサブサイトに結合している点がドッキングプログラムによる複合体予測を困難にしていると思われる。MD シミュレーションとエネルギー表示法により、溶媒和自由エネルギーとエントロピーを取り入れている我々の手法では、結晶構造に最も高い評価を示した。以上の結果から、本手法は蛋白質-リガンド複合体モデルの選択に有効であると結論付けた。

表：ドッキングプログラムと本手法による構造の評価



図：リゾチーム-triNAG 複合体の結晶構造とドッキングモデル

Model	AutoDock	Gold	MVD	Our Method
Crystal	-7.1	33.4	-101.1	-4774.0
AutoDock	-11.9	30.6	-127.9	-4765.3
GOLD	-5.1	54.2	-114.4	-4744.1
MVD	-13.1	48.9	-182.0	-4745.3

参考文献

[1] K. Takemura, H. Guo, S. Sakuraba, N. Matubayasi, and A. Kitao, *J. Chem. Phys.*, **137**, 215105 (2012).

業績紹介：フォールディング速度論と実時間NMRにより明らかにされた
β₂ ミクログロブリンの天然状態の不均一性

桑島邦博

(岡崎統合バイオサイエンスセンター・A03
計画研究代表者)

論文題目: "Native-State Heterogeneity of
β₂-Microglobulin as Revealed by Kinetic Folding and
Real-Time NMR Experiments"

著者: Atsushi Mukaiyama, Takashi Nakamura, Koki
Makabe, Kosuke Maki, Yuji Goto and Kunihiro Kuwajima
雑誌巻号: *J. Mol. Biol.* **425**, 257-272 (2013)

β₂ ミクログロブリン (β₂m) は透析アミロイドシスの原因蛋白質として知られており、長年の透析治療による血中β₂m濃度の上昇が主な原因と考えられている。しかしながら、血中には、より高濃度で存在するにも関わらずアミロイド線維を形成しない蛋白質が存在することを考えれば、血中濃度の上昇だけでは、なぜβ₂mがアミロイド線維を形成するのか説明できない。そこでβ₂mの高いアミロイド形成能に関する知見を得るために我々はβ₂mのアムフォールディング・フォールディング反応の解析を行った。

ストップフロー法とダブルジャンプ実験を組み合わせた方法を駆使することにより、β₂m のフォールディングはparallel-pathwayモデルで記述できることが明らかとなった (図 1)。β₂m は天然状態において 32 番目の Pro がシス型のコンフォメーションをとっている。Pro32 がシス型である分子種がすばやく天然状態 (N_C) へとフォールディングするのに対し、トランス型の分子種はトランス型のコンフォメーションを保持したまま天然状態によく似た構造 (N_T') へとフォールディングする。こうして形成された N_T' が非常にゆっくりとした速度で N_C へと構造変化することでフォールディングが完了する。興味深いことに過渡的に形成される N_T' がフォールディング反応の完了した後もわずかに存在する。その詳細を明らかにするために、実時間 NMR 測定を行った結果、生理条件下 (pH 7.5、37°C) において N_T' が 7-9%存在することを見出した (図 2)。最近の研究ではトランス型をもった分子種がアミロイド線維形成に関与していることが報告されて

いる[1]。この生理条件下でも N_T' がわずかに存在することが、他の蛋白質に比べて生体内においてβ₂m がアミロイド線維を形成しやすい要因であると考えられる。

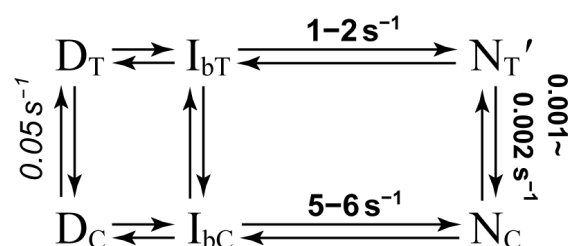


図 1 β₂m のフォールディング・スキーム。N、I_b、D はそれぞれ天然状態、バースト相中間体、変性状態を表す。添え字の C、T は Pro32 のシス型、トランス型を表す。

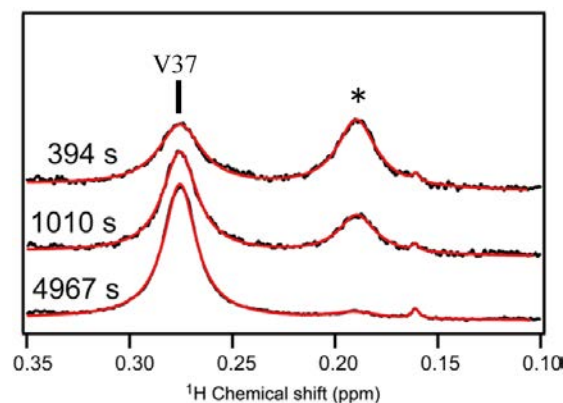


図 2 実時間 NMR 測定。黒線および赤線はそれぞれ実験結果および理論曲線を表す。*は N_T' のピークを示している。

参考文献

- [1] T. R. Jahn et al., *Nat. Struct. Mol. Biol.* **13**, 195-201 (2006).

業績紹介：pH 4 で蓄積する β_2 ミクログロブリンのモルテン・グロビュール状態とそのフォールディングにおける役割

桑島邦博

(岡崎統合バイオサイエンスセンター・A03
計画研究代表者)

論文題目："The Molten Globule of β_2 -Microglobulin Accumulated at pH 4 and Its Role in Protein Folding"

著者：Atsushi Mukaiyama, Takashi Nakamura, Koki Makabe, Kosuke Maki, Yuji Goto and Kunihiro Kuwajima

雑誌巻号：J. Mol. Biol. **425**, 273-291 (2013)

100 残基以上の多くの球状蛋白質は過渡的に形成される中間体を経てフォールディングする。この中間体の構造的性質を調べることはフォールディング機構を明らかにする上で重要である。我々は免疫グロブリンスーパーファミリーに属する β_2 ミクログロブリン(β_2m)を研究対象とし、平衡条件下で観測される中間体の構造的特徴を調べ、フォールディング過程で見られる速度論的中間体との関係を明らかにした。

まず β_2m の平衡条件下における酸変性を調べたところ、pH 5 – pH 4 および pH 4 – pH 3 の2つの pH 領域で転移が見られる三状態転移モデルで表されることがわかった (図)。遠紫外 CD、トリプトファン蛍光、パルス磁場勾配 NMR による測定の結果、pH 4 付近で形成される中間体はモルテン・グロビュール(MG)状態の特徴を備えていることが明らかとなった。 β_2m と同様に pH 4 で MG 中間体を形成する蛋白質としてアポミオグロビン(アポ Mb)が良く知られているが、アポ Mb がヘリックス型蛋白質であるのに対し、 β_2m は β 構造に富んだ蛋白質といった違いがある点は興味深い。さらに pH 滴定実験の結果、 β_2m の天然状態から MG 状態への構造転移は天然状態において異常に低い pK_a を示す 84 番目の His と少なくとも 10 個の Glu または Asp のプロトン化が引き金になっていることがわかった。アポ Mb も同様の振る舞いをすることから、pH4 における MG 中間体形成過程に両者に共通した機構が存在することになる。次に、 β_2m のフォールディング過程における MG 中間体の役割について明らかにするために、酸変性状態および MG 中間体からのフォールディング反応を解析した。その結果、MG 中間体がフォー

ルディング過程で過渡的に形成される中間体と同一であるアポ Mb と異なり、 β_2m では装置の不感時間内に形成されるバースト相中間体が MG 中間体よりも天然状態に近い構造を持つことが示された。以上のことから β_2m のフォールディングは酸変性状態→MG 中間体→バースト相中間体→天然状態の順に進行すると考えられる。

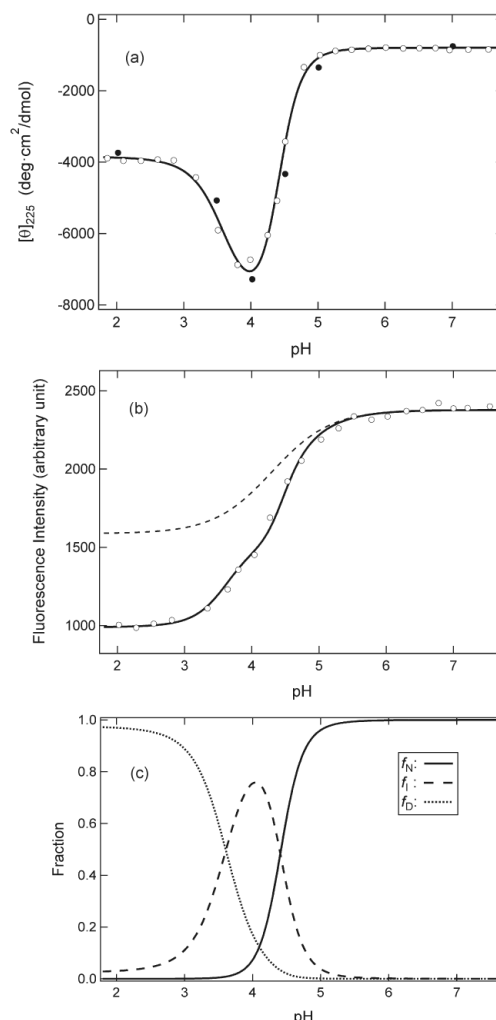


図 平衡条件下における β_2m の酸変性。(a) 225 nm の遠紫外 CD、(b) 295 nm で励起した時の 338 nm の蛍光強度、(c) 各状態の存在比。N、I、D はそれぞれ天然状態、中間体、酸変性状態を表す。

業績紹介： α ラクトアルブミンのN末端変異による安定性摂動の構造論的考察

桑島邦博

(岡崎統合バイオサイエンスセンター・A03
計画研究代表者)

論文題目："Structural insights into the stability perturbations induced by N-terminal variation in human and goat α -lactalbumin"

著者：Koki Makabe, Takashi Nakamura, and Kunihiro Kuwajima

雑誌巻号：Protein Eng. Des. Sel. 26, 165-170 (2013)

α ラクトアルブミンを大腸菌で組み替え体発現させると、安定性が大きく減少することが報告されてきた^{1,2}。組み替え体ではそのN末端に余分なメチオニン残基が付加しているのが真性体との唯一の違いである

(図1)。この不安定化のために、 Φ 値解析など不安定化を誘導する変異導入を行うと、精密な安定性を決定するのが難しくなる。このため変異体を用いた研究を行うことが困難であった。Berlinerらはこの問題を克服するために、ウシ α ラクトアルブミン組み替え体の1番目の残基を欠失した変異体を構築した。これは真性体で1番目の残基をメチオニンに置換した変異体であり、これによってアミノ酸残基数が真性体と同じになる。このN末端欠損変異体は真性体と同程度の安定性を持つことが明らかとなった³。最近、我々もヤギ α ラクトアルブミンで同様のN末端欠損変異体を作製し(図1 GLA-E1M)、安定性の回復を報告した⁴。しかしながら、どのような構造メカニズムによって安定性の回復が起こるのかについて不明瞭であった。

今回、我々はヒトおよびヤギ α ラクトアルブミンN末端欠損変異体(HLA-K1MおよびGLA-E1M)の結晶構造を決定し、以前に決定された結晶構造と比較を行った。

結晶構造から、真性体においてN末端のN原子がT38と形成していた水素結合が、組み替え体では壊れていることが分かった。これはメチオニンの付加によって1残基目のN原子がT38付近のポケットに位置できなくなったためである。しかし、N末端の欠損によってHLA-K1MとGLA-E1Mは真性体と同様なT38への水素結合が形成していた。加えてauthHLAと

recHLAの平衡下における分子動力学計算をそれぞれ5 ns行った。結果、recHLAではN末端部位が大きく揺らいでおり、水素結合が過渡的にしか形成していないことが明らかになった。以上から真性体と同じ水素結合ネットワークを形成していることが、HLA-K1MやGLA-E1Mの安定性に大きく寄与していることが示唆された。

human α -lactalbumin	residue number			
	0	1	2	3
authHLA		K	Q	F
recHLA	M	K	Q	F
HLA-K1M		M	Q	F

goat α -lactalbumin	residue number			
	0	1	2	3
autGLA		E	Q	L
recGLA	M	E	Q	L
GLA-E1M		M	Q	L

図1 今回作製した変異体のN末端配列。authHLAとauthGLAが真性体のヒトとヤギ α ラクトアルブミン。recHLAとrecGLAが組み替え体。HLA-K1MとGLA-E1MがN末端欠損変異体。

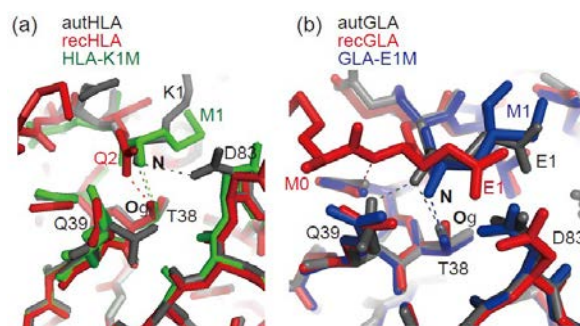


図2 N末端変異体の結晶構造。(a)ヒト α ラクトアルブミン、(b)ヤギ α ラクトアルブミン

参考文献

- [1] TK Chaudhuri, et al. *J. Mol. Biol.*, **285**, 1179–1194 (1999)
Corrigendum (2004) 336, 825.
- [2] TK Chaudhuri, et al. *Biochemistry*, **39**, 15643–15651 (2000).
- [3] DB Veprincev, et al. *Proteins*, **37**, 65–72 (1999)
- [4] K Tomoyori, K, et al. *Proteins: Struct., Funct., Bioinform.*, **80**, 2191–2206 (2012)

業績紹介：エタノール添加によるウマシトクロム *c* の
単量体から多量体への変換過程での二次構造保持

廣田 俊

(奈良先端大物質創成・A03 公募研究代表者)

片岡幹雄

(奈良先端大物質創成・A02 計画研究代表者)

論文題目: "Maintenance of the secondary structure of horse cytochrome *c* during the conversion process of monomers to oligomers by addition of ethanol"

著者: Shun Hirota, Mariko Ueda, Yugo Hayashi, Satoshi Nagao, Hironari Kamikubo and Mikio Kataoka

雑誌巻号: *J. Biochem.* **152**, 521-529 (2012)

我々はこれまでに、ウマ cyt *c* がエタノール存在下で、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]。しかし、cyt *c* 単量体からドメインスワップ構造を取る多量体への構造変化を制御する要素は未解明のままである。本研究により、cyt *c* はエタノール存在下で多量化し、沈殿することが判明した。エタノールを添加すると、cyt *c* は二次構造を保持したまま、メチオニン 80 (Met80) 周辺領域の構造が局所的にほどけることにより多量化することも示唆された。

酸化型ウマ cyt *c* に 30%–40%（終濃度）のエタノールを添加すると、Met80 のヘム鉄への配位に由来する 695 nm の吸収帯の強度が減少し、Met80–ヘム配位が解離することが判明した。Cyt *c* の溶液構造はエタノール添加により少し摂動を受けるが、 α ヘリックス構造を保持すること、タンパク質の慣性半径は僅かに大きくなるが、C 末端 α ヘリックスは残りの蛋白部分から大きく解離しないことが、円偏光二色性測定および X 線小角散乱測定より判明した。

固体 NMR スペクトルより、cyt *c* は多量体の沈殿状態でも α ヘリックス構造を保持することが判明した。Cyt *c* へのエタノール添加によって得られた沈殿の透過型電子顕微鏡画像では、直径約 3 nm の球状ユニットが多数連なった像が得られた。球状ユニット間の距離は 4.0 ± 0.4 nm で、X 線結晶構造解析および X 線小角散乱測定により見積もられる多量体中のタンパク質ユ

ニット間の距離（3.5–4.5 nm）によく一致した。

以上より、cyt *c* が多量化する際、単量体の Met80 周辺領域の立体構造が部分的に崩れるが、二次構造を保持したままの状態を経由することが示唆された（図 1, 2）。

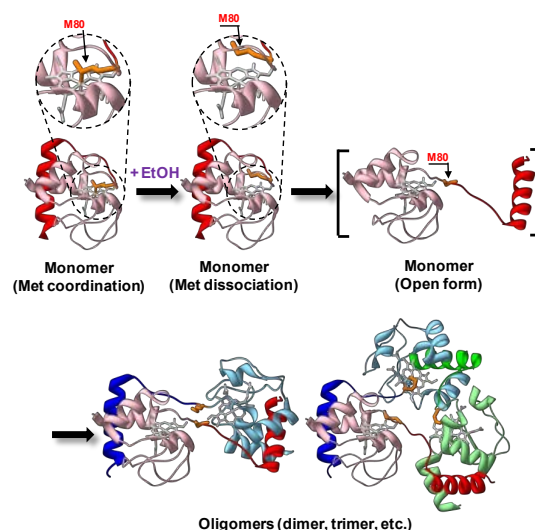


図 1: エタノール添加による cyt *c* のタンパク質構造変化の模式図。

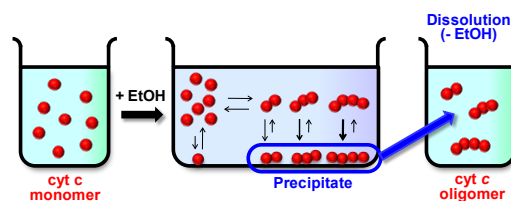


図 2: エタノール添加による cyt *c* 多量化過程の模式図。

参考文献

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

A03 班岡田研究室の刈谷龍昇さん(D2)が Molecular Medicine Conference 2012 で Oral Presentation Award を受賞

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）

平成 24 年 12 月 19 日（水）から 22 日（土）まで、タイ国バンコクで開催された Molecular Medicine Conference 2012 (MMC 2012) -*Alternative Strategies against Cancer and Inflammation*- (<http://www.mmc2012.org/>)において当研究室の大学院生、刈谷龍昇さん(D2)が、Oral Presentation Award を受賞した。ポスター全 134 演題の中から 4 演題が選ばれて、15 分間の口頭発表の機会が与えられた。

刈谷さんは、"HAMLET and BAMLET induces cell death of primary effusion lymphoma"という演題で口頭発表を行った。HAMLET/BAMLET (human/bovine α -lactalbumin made lethal to tumor cells)は、部分変性 α -lactalbumin とオレイン酸の複合体であり、抗腫瘍効果があるが正常細胞にはほとんど影響しないことが知られている。一方、Primary effusion lymphoma (PEL) は、HIV-1 感染に合併する予後不良の悪性リンパ腫であり、標準的治療法が確立していない。HAMLET/BAMLET を PEL 細胞株に添加したところ、短時間で Reactive oxygen species (ROS) 産生、Caspase 依存性アポトーシスとオートファジーが引き起こされた。また、PEL マウスモデルに BAMLET を投与したところ、PEL の増殖が抑制された。これらの結果から HAMLET/BAMLET は、PEL 治療に有用な薬剤であることが示唆された。本研究は、中村敬博士、桑島邦博博士（岡崎バイオ）との共同研究であり、現在、古水雄志博士、上岡龍一博士（崇城大学）、鈴木元博士（名古屋大学）にご協力をいただき、その作用機序の解明を試みている。

会議は、チャオプラヤ川のほとりに位置する Siriraj 病院（Mahidol 大学）に新たに建てられた研究棟内のカンファレンスルームで行われた。Siriraj 病院は、1888 年に設立されたタイで最も古い病院・医学部であり、現在プミポン国王が入院していることでも知られている。また、Siriraj 病院内にはいくつかの博物館が併設されており、特に解剖学・寄生虫・法医学博物館は見応えのあるものであった。会議のゲストスピー

カーとして Michael Karin 博士 (University of California)、Guy Haegeman 博士 (University of Gent) をはじめとする有名な研究者が招待されており、内容の濃い会議であった。また、会議は、Mahidol 大学のポストドクや学生により運営されており、hospitality にあふれる楽しいものであった。刈谷さんは Mahidol 大学の学生達と様々な交流を楽しんだようである。会議中に様々なディスカッションができ、新たな共同研究の可能性も生まれ、私にとっても大変有意義な会議であった。



写真 1. 口頭発表する刈谷さん



写真 2. スタッフと Gala Dinner の後に