

新学術領域研究「揺らぎと生体機能」終了にあたって

寺嶋正秀

(京都大院理・領域代表)

はやいもので、2008 年末に始まった新学術領域研究「揺らぎが機能を決める生命分子の科学」が 5 年目を迎え、領域研究として一つの区切りを迎えようとしています。このニュースレターに最初のあいさつを書いたのがついこの前のような気がします、F&F ニュースレターもこれが最後になるでしょう、最後のあいさつを書かせていただきます。

思い出すと、この領域を立ち上げる時には、片岡先生と何度も議論して、「揺らぎ」をキーワードにまとめていくことにしました。「揺らぎ」と言うのは学会でも時々聞く言葉だし、これから重要になってくるに違いない。自信を持って領域提案しました。しかし内容を説明した時、多くの人から「揺らぎって何？」と聞かれ、その説明を何度もすることになるとは思いもしませんでした。実際、公募研究が始まって最初の合同班会議の時にも、メンバー間で「揺らぎ」がいろいろにとらえられており、そうかそういう風に見ることもできるのかとびっくりしたことが思い出されます。

しかし合同班会議を繰り返し、公開シンポジウムを行い、各種学会でのシンポジウムを行っているうちに、だんだんと統一した理解がなされてきたように感じました。これがまさに「領域」形成ではないでしょうか。特に、最後の合同班会議では、まさに「揺らぎ」が私の思いもしないいろいろな場面で重要な働きをしていることが解き明かされている過程を見ることができ、改めて「揺らぎ」の重要性と多くの異なった現象が「揺らぎ」という共通の言葉で理解できるという驚きを感じました。

A01 班(検出班)では、最初はどうやって揺らぎというある意味「あいまい」なものをとらえればいいのか、本当にできるのかとも思うときもありましたが、理論開発も含めて多くの方の協力の下で、種々の手法が可能となってきました。A02 班(制御班)では、変異体作成をキーとして、揺らぎと機能との相関が解き明かされ、改めて生体分子は安定性を犠牲にしても揺らぎを大きくするように進化したのだと認識を新たにしました。A03 班(応用班)においては、タンパク質、

膜、DNA などバラエティーのある生体系に対して、実験・理論の面からより機能に直結した研究が発展し、特に癌治療への進展が見られたのは大きな発展であったと思います。こうした点は領域代表としてかなりひいき目に見ているかもしれませんが、客観的に見ても「揺らぎ」の言葉を学会に根付かせ、「揺らぎ」の言葉で反応・機能を理解できるようになったのは大きいことだと思います。

期限が決まっているとはいえ、この領域研究が盛んになってきたこの時点で終了するのは、非常にもったいないことでもありますが、この領域研究の目的が領域の形成の立ち上げにあると思えば、一応の立ち上げを終えて、次のステージに入るための役目を終えたと見ることもできます。この領域研究は、分野形成のための助走と Take off の初期段階であり、これからこの領域メンバーによって研究はますます活発になり安定飛行に移ることを願っています。

このニュースレター発行はおそらく最後でしょうが、この新学術領域研究自体は実はまだ完全には終わっていません。来年度はとりまとめの年として、これまでの成果を世に出してまとめる年となっています。このため、いくつかの出版とシンポジウムを計画しているので、またご協力をお願いすることになると思います。よろしくお願いいたします。

更に、こうしたとりまとめと言う意味だけでなく、研究自体もこれで終わりということではありません。既存の分野を離れ、真に融合した新しい分野を形成しなくてはいけません、サイエンスの分野を作るには、長い年月がかかることは当然であり、5 年間で完結するわけがありません。是非とも、皆様のご協力を得て、この「揺らぎと生体機能」と言う分野の確立と更なる発展をめざしたいと思っております。

最後になりますが、このような活発な領域研究が遂行できたのは、多くの方のご協力のおかげです。事務的には、領域事務局の片岡先生をはじめとして先の事務局秘書の日笠(旧姓)さん、現事務局秘書・藤澤さん、寺嶋研究室秘書の清水さんのご努力がなければ運営はできなかったでしょう。また研究面では、計画研究班員、前期・後期の公募研究班員、班友をはじめとして、共同研究や議論のための多くの先生方のお世話になり

ました。また、お忙しい中でシンポジウムなどの活動に参加していただき、多くの有用なご助言をいただいた評価班の先生方、特に海外からこの領域のために毎年駆けつけていただいた、Miller 教授にはいくら感謝しても、し足りないぐらいです。本当にお世話になりました。

また来年度も(そして将来長くに渡って)お会いできることを願いながら、最後のあいさつとさせていただきます。ありがとうございました。



2012 年 12 月の最終公開シンポジウムで片岡先生と



2012 年 12 月の最終公開シンポジウム

領域終了に寄せて～評価委員より～

北川 禎三

(兵庫県立大生命理学・評価委員)

化学では、「反応」、「構造」、「物性」が基本と云われてきたが、それと並んで「揺らぎ」という概念が同程度に重要である事を、領域代表の寺嶋先生が言い出された。そして本領域の概要には、「確率入出力でありながら、確定的な生命現象を創出する基礎は何か？」という質問を設定しておられる。これは、非常に大事な問題提起であり、新しい学術領域の創成に相応しい提案であると思った。

「揺らぎが生体機能を作る」という言葉を聞くと、以下に書くような「ノイズが機能を生み出す系」を頭に浮かべられる人もあると思う。細胞中で動きまわり反応する分子それぞれは、弱い相互作用をし合っているが、見た目は互いに無関係に行動しているように見える。つまり揺らいでいる。しかし、それが細胞内で集まって、ある種の集合体として行動すると、機能が生まれる。これは、要素と階層の問題であり、要素間にある関係が整えば、自発的に揺らぎが規則的な構造や物性を生み出す。これは「自己組織化」として、錯体化学では最近非常に注目された言葉である。エントロピー減少に向かう系である。

化学では BZ 反応として知られる系があり、要素分子の濃度がある閾値を超えると反応が進むという非線形性のために、シャレーでそれをやるとパターンが出来る。そういう系にノイズを入れるとパターンが時間軸で変化する。空に雲が出来る過程も、対流の階層構造によるとされる。要素それぞれがあるリズムでランダムに動いている時に、ノイズが入るとそれが同期する現象も、揺らぎが機能を生み出す系であり、確率共鳴といわれている。脳における神経伝達も、同じ原理が働いているかもしれない。

しかしながら、寺嶋先生が提案された新学術領域研究「揺らぎと生体機能」は、物理の人が抱く揺らぎではなくて、生体分子の構造の多様性と機能の相関であった。これは生体分子科学としては基本的問題であり、マクロに現れる生体機能をミクロに調べ、それらを結びつけるという点で、上記の物理的な見方と共通性をもつ。この抽象的な考えを、本学術領域研究で

は、重要な具体的問題に対して解明していかれ、成功された事に高い敬意を表する次第である。

多様性の中には、静的なものと動的のものがあり、後者がダイナミクスとして注目された。静的のものは、遺伝子工学で蛋白質にアミノ酸置換を起こし多様性を作るという実験と、測定の精度を上げて構造の少しの違いを検出するという実験から生まれてくる。動的な研究は、時間分解測定という新しい手法の開発を伴って初めて生まれる。どちらも専門家しか出来ない面がある。新しい手法を開発するには、装置に関する知識や技術が必要であり、その人が、細胞中に新しい分子を見つける実験をする事は難しい。一方、新しい生体分子を見つけ、機能を定める人達は、ダイナミクスを調べる装置を開発する事も不可能に近い。その両者が共同研究をすると、一つの研究グループでは達成できない、新しい成果が得られるはずであり、国際的なブレークスルーとなる事が期待される。それは、新学術領域のようなグループ研究によって生まれやすくなり、そこに存在意義があると思う。本グループは沢山の異分野間の共同研究でその目的を見事に達成され、国際的にトップレベルの成果をあげたと思う。班長の片岡先生、上岡先生のそのための陰の努力を評価したい。

領域会議に於ける多くの発表は、ハイレベルの生体分子科学の研究であり、優れた理論家がメンバーにいた事が、討論を深め、非常に良かったと思う。しかし、それらの基礎研究と A03 班の「ハイブリッドリボソームが選択的にがん細胞を殺す」という興味深い結果とがどう繋がるか？は評価委員としては心配であった。実際には、最終年度の発表で、桑島グループと上岡グループの共同研究で、解決の糸口が見えた気がして、非常に良かったと思う。学理が確立されれば、この方法が現実に使われていくだろう。

また本領域の全体会議には、いつも多くの若い人たちがポスター発表をかねて、活発に討論に参加された。結果として、この新学術領域研究は、生体分子科学の分野に多くの若い優秀な人材を育てる事が出来た。その事が、何より大事な功績であったと、高く評価している。私は領域会議で多くの新しい事を学ぶと共に、サイエンスを楽しませてもらった。5年間、会議に招待して下さった事に深く感謝している。

榊 茂好

(京都大福井謙一記念研究センター・評価委員)

この新学術領域は、化学およびその周辺領域に、また、私個人にとっても、多くの点で新しい概念や視点を提供してくれたと考えている。その意味で、「新学術領域」と言う範疇に最も適した研究領域であったと言っても良いだろう。「揺らぎと生体機能」と言う言葉からは、タンパクが生体の中で、様々な構造を取ることが出来て、しかも、その構造の間を容易に変化することが可能であり、ある構造をとる時に特有の機能を発揮する、と言うように、直感的に理解できる。しかし、これを学術的に研究しようとする、とたんに難しくなる。第一に「揺らぎ」をどのように定義出来るだろう。私の専門は電子状態理論とその応用であるが、電子状態計算で「揺らぎ」をどう取り扱えば良いのか、これまで考えたこともないし、考えて見ても簡単ではない。分子動力学計算では、多少容易になるとしても、やはり簡単ではない。「揺らぎ」は構造の広がりではなく、振動でもないはずである。「揺らぎ」に関する私なりの理解は、「多数の(準)安定構造が、近いエネルギー準位で存在し、構造はそれらの間を、容易に(熱的に)行き来出来る」と言うものであろう。それをどのように、物理化学的・分子科学的に明らかにすることが出来るだろうか？このような視点は、研究者の心の奥に、無意識的に、あるいは、深層心理的に存在していたであろうが、これまで、正面から考えられたことは無いのでは無いか。そう考えると、この新学術領域は、新しい視点で、新しい研究領域を提案し、そのために、新しい実験的測定法、理論的手法の開発を要請し、その結果の理解と解釈にも新しい考察を必要としたと言える。

この新学術領域の、もう一つの特徴は、化学から医学までの領域をカバーしたことであろう。多くの場合、化学およびその周辺領域と言うと、生物物理、化学物理などが想起されるが、医学までをカバーした領域はほとんど無かったであろう。特定領域や新学術領域では、異なる専門の研究者が多少の強制力を感じながら、一堂に会し、お互いの研究成果を発表し、視野と研究者間の交流を広げ、各々の研究を一層深め、発展させると言う側面があり、それが、実のところ、直接的な成果よりも重要とさえ考えられる。その意味でも、こ

の新学術領域は大成功であったと言えよう。癌の治療を化学の観点から、これまでの制癌剤とは全く異なる方向からアプローチすると言う研究は基礎化学、理論化学の研究者にとっても興味深かったと考える。

このように、新しい化学事象を、新しい手法で測定し、新しい結果を得て、解釈するには、物理化学、分子科学、理論化学との共同研究、共同作業が必要不可欠である。構造揺らぎにアプローチすると言うことから、分子動力学法や積分方程式理論の研究者の参加が多かったが、構造変化により電子状態が変化し、あるいは、逆に電子状態の変化が構造変化を誘起し、物性値の変化や新しい機能が表れると言う場合には、電子状態理論の参加が不可欠であろう。次のステージでは電子状態との関連を考えると、研究の新しい側面が表れるのでは無いだろうか。

この新学術では揺らぎを構造に限定し、生体機能と関連付ける、と言う方向性も持っていたが、しかし、生体機能だけでなく、多くの場合に、揺らぎは重要な役割を果たしているのでは無いだろうか。分子素子は複数の構造、電子状態の間の相互変換を利用している場合が多い。

そのように考えると、「揺らぎとXX」と言うように、もっと広い領域で揺らぎを考慮した研究があっても良いように感じられる。この研究領域が終了し、次の研究領域が始まるとしても、「揺らぎ」と言う考え方、化学事象の見方は、終わることなく、一層深化して欲しいと感じている。

中原 勝

(京都大学名誉教授・評価委員)

「生体機能に開かれた揺らぎの扉」

あつという間であった。新学術領域研究「揺らぎが機能を決める生命分子の科学」【略称、「揺らぎと生体機能」】(寺嶋先生代表)が採択されたのは2008年晩秋であったが、「揺らぎと生体機能」は多くの成果論文や情報発信のドキュメントを世に残して、やがて幕を降ろす。評価委員・アドバイザーの一人として「揺らぎ」と戦った研究者集団の傍にいた筆者。日本語の評価委員というより、英語のアドバイザーを意識しながら、好かれるためでも嫌われるためでもなく、枯れた研究



者として。日本の学術研究発展のために資金と時間が有効に使われるようにとの気配りで。研究の進歩を希求し、未来への懸け橋が誕生することを願いながら。

「揺らぎと生体機能」とのプロジェクト名には求心力とインパクトがあった。「揺らぎ」はやや難解で、物理学(微分が絡む、光散乱、液体論の世界、久保亮五、山本常信の線形応答理論業績を思い出して)に埋もれた自然科学用語と心配されたが、「機能と生命分子」という単語との(ちょっと思いつかない、やわらかい)結合で現代風の力を生み出した。新しい学問の扉を開く「テコ」としての「揺らぎ」への期待感をアピールした。「揺らぎ」の新領域は、熱力学、統計力学、量子力学などの歴史的発展に登場した、微分を伴う基礎方程式に端を発するもの(揺らぎの古典論と量子論)であるが、それを定性的な概念の下で「生体機能」へと扉を開こうとした野心に新領域「揺らぎと生体機能」の真骨頂がある。「スナップショット」などの一点時間描写では尽くせない、自然の多体系についての真理描像の発展への心意気であった。動的に揺らぐ自然を静止面に投影すると、濃い一点スポットの周りには薄い影がつきまとう。揺らぎの研究はいわば自然界の影武者探しである。無束縛自由運動の気体には均一に塗り潰された影描写が想定され、格子モデルの結晶性固体にはスポット描写が近似的に妥当する。束縛下で分子・原子が運動する液体・溶液・ゲル・界面にこそ「揺らぎの描像」が相応しい。一方、溶液には生命現象のゆりかごがある。そこには、様々な時間スケール、空間スケールの揺らぎがある。基底状態だけでなく、励起状態や中間体・遷移状態でも揺らぎの概念は重要である。揺らぎの数学・物理学・化学・生化学・生物学の序列で、“左翼”の数学から“右翼”の生物学を視野に入れて、化学・生化学の分野に境界領域を開拓することが代表者寺嶋先生の大目標であった(「揺らぎと生体機能」ニュースレターNo.1, 26 December 2008 を参照)。

大目標を達成するために用意された3つの計画班は、A01「揺らぎ検出」(寺嶋先生班長)、A02「揺らぎ制御」(片岡先生班長)、A03「揺らぎと機能」(上岡先生班長)であった。野心的な方法論で、生命現象の多様性を支える「揺らぎを検出」し、生命現象を支える分子・タンパク質・DNA/RNA・糖質・脂質・水—の「揺らぎを制御」し、生命にかかわる分子の「機能における揺らぎの役割」を解明しようとするプロジェクトで

あった。揺らぎの要素を発見し、要素のメカニズムを解明して制御し、揺らぎの基礎研究を応用研究に活用する、一連の流れが構想されているプロジェクトであった。これまで機能と静的構造との相関関係が注目されてきたが、その枠組みを超えて、機能と動的揺らぎの相関関係に着目して、検出・制御・機能を総合化する試みであった。プロジェクト進行中に突如として日本を襲った東日本大震災の影響を乗り越えて、良い中間評価を経て、プロジェクトは閉めの時期を迎えた。

評価委員の一人として寺嶋プロジェクトに参加し、さまざまな事業・活動を楽しませてもらった。超臨界水・脂質・糖質・電解質を主たる対象とした揺らぎ研究の自己体験を参考にしながら、「揺らぎと生体機能」研究者の揺らぎ研究を学ばせてもらった。国内のみならず世界を視野に入れる国家プロジェクトであると理解し、国際的な波にもまれる科学者集団の活躍を観察し、プロジェクトの全体構想と個々の成果の分散状態を国際基準で評価しながら見守ってきた。評価の良心的基準値には客観性が求められるが、論文数や発表数というものの以外の評価は、研究の進行中の真ただ中で行うしかない。自己の経験に照らして価値判断の評価軸を設定するしかない。もちろん、評価の一般的基準は、論文の数×掲載誌の国際的知名度×論文引用回数。論文の引用回数が最も客観性に優れており、その信頼度は群を抜いて高い。プロジェクトの期間内にプロジェクトの成果として発表された論文の引用回数の統計量は不十分である。よって、論文誌の知名度が過度に偏重される。結局、著者ではなく歴史が研究の成果を評価するといえる。

業績紹介：プロテアソーム活性化因子 PA28 の柔軟なループの役割

加藤晃一

(自然科学研究機構・A01 計画研究代表者)

論文題目：“Spatial arrangement and functional role of the α subunits of the proteasome activator PA28 in the heterooligomeric form”

著者：Massaki Sugiyama, Hiroki Sahashi, Eiji Kurimoto, Shin-ichi Takata, Hirokazu Yagi, Keita Kanai, Eri Sakata, Yasufumi Minami, Keiji Tanaka, and Koichi Kato

雑誌巻号：Biochem. Biophys. Res. Commun. **432**, 141-145 (2013)

プロテアソームはタンパク質分解活性を介して細胞の生存と恒常性の維持に重要な役割を果たしている。プロテアソームの分解活性は、その活性中心である 20S プロテアソームの両端に結合した、プロテアソーム活性化因子 (PA) により厳密に制御されている。本研究の対象である PA28 は α および β サブユニットからなるヘテロ 7 量体を形成し、MHC クラス I 分子が提示する 9 残基程の抗原ペプチドの生成に関与することが知られている。両サブユニットは 50% の相同性を有するが、それぞれ独特の挿入ループを有している。 α サブユニットのホモ 7 量体については結晶構造が報告されているが、このループ部分の電子密度像は得られていない。本研究では、PA28 ヘテロ 7 量体中の α および β サブユニットの空間配置を中性子小角散乱 (SANS) 法により決定するとともに、 α サブユニットのループ領域の存在がプロテアソームによる基質ペプチドの分解に及ぼす影響を解析した。

α サブユニットを選択的に重水素で標識した PA28 について実測した SANS プロファイルと α サブユニットホモ 7 量体の結晶構造に基づいて構築した立体構造モデルを比較照合した結果、PA28 のヘテロ 7 量体中では 3 つの α サブユニットと 4 つの β サブユニットが $\beta\alpha\beta\alpha\beta\alpha\beta$ とほぼ互い違いに配置されたリング構造をしていることを見出した (図 1)。一方、 ^{15}N で標識を施した α サブユニットを用いて再構成した PA28 の ^1H - ^{15}N HSQC スペクトルにおいては、大部分の残基に由来する信号はピークが観測困難なほど広幅化している中で、ループ領域に位置する残基に由来するシグナ

ルはシャープなピークとして観測された。これは、ループ領域のコンフォメーションが顕著に揺らいでいることを意味している。SANS によって明らかとなった 4 次構造を考慮すると、これらの柔軟なループは、プロテアソーム内への基質の出入り口を取り囲むように配置しているものと考えられる。

次に、野生型 PA28 と α サブユニットのループを欠損した PA28 変異体を用いて、それぞれによって活性化された 20S プロテアソームの基質分解の効率を鎖長の異なる一連の基質ペプチドについて比較した。その結果、野生型 PA28 は 9 残基を越えるペプチドについては分解が抑えられているのに対して、ループ欠失体では、こうしたペプチド鎖長に対する選択性が失われていることが明らかとなった。このことは、 α サブユニットのループが、鎖長が長い基質のプロテアソームへ出入りを抑制するゲートキーパーの役割を演じていることを示唆している (図 2)。このことは PA28 が抗原提示に用いられる 9 残基程度のペプチドを効率よく生成することと深く関わっている可能性がある。

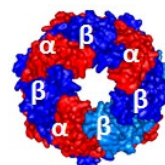


図 1. SANS により明らかになった水溶液中における PA28 のサブユニット配置

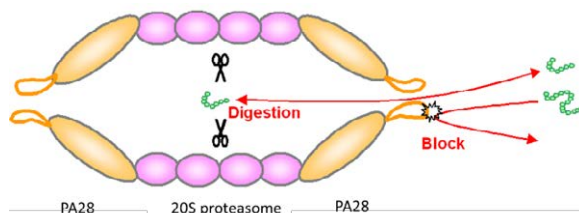


図 2. PA28 α サブユニットのループ領域はプロテアソームへの基質の出入りを制御している

参考文献

- [1] M.Sugiyama, E.Kurimoto, Y.Morimoto, H.Sahashi, E.Sakata, K.Hamada, K.Itoh, K.Mori, T.Fukunaga, Y.Minami, and K.Kato, *J. Phys. Soc. Jpn.* **78**, 124802 (2009)

業績紹介：安定同位体標識を活用した高マンノース型糖鎖の NMR 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：“Application of metabolic ^{13}C labeling in conjunction with high-field NMR spectroscopy for comparative conformational analysis of high mannose-type oligosaccharides”

著者：Yukiko Kamiya, Kotaro Yanagi, Toshihiko Kitajima, Takumi Yamaguchi, Yasunori Chiba, and Koichi Kato

雑誌巻号：Biomolecules 3, 108-123 (2013)

タンパク質上に提示された高マンノース型糖鎖は、そのプロセッシング過程と共役して分泌経路におけるタンパク質の品質を表示するタグとしての役割を担っている。これらの高マンノース型糖鎖は、タンパク質のフォールディング・輸送・分解といった運命の決定に関わっており、プロセッシングの各段階における糖鎖が示す揺らぎを含めた 3 次元構造の差異が、糖鎖と様々なレクチンとの相互作用を通じてタンパク質品質管理機構に密接に関与していると考えられる。私たちはこれまでに、溶液 NMR による糖鎖構造の精密解析を行うための技術基盤として、酵母変異体を用いて安定同位体標識を施した高マンノース型糖鎖を、均一かつ大量に調製する方法を確立してきた[1]。これにより、マンノース 8 残基、アセチルグルコサミン 2 残基からなるオリゴ糖鎖 M8B の NMR 解析例を報告している。本研究ではこの手法を拡張し、小胞体内の糖鎖プロセッシングの過程で生じる 2 種の高マンノース型糖鎖 M8B および M9 (図) を対象に、それらの動的 3 次元構造を明らかにすることを試みた。

糖鎖プロセッシングに関わる遺伝子 *OCH1*、*MNN1*、*MNN4* および *MNS1* を破壊した酵母変異体を用いて、新たに高マンノース型 11 糖である M9 の安定同位体標識体を大量調製することに成功した。得られた試料を用いて超高磁場 NMR 解析を実施した結果、両糖鎖の違いは非還元末端のマンノース 1 残基の有無だけであるにもかかわらず、コンフォメーションの差異が、共通のコア部分にまで及んでいることが示された。そこで、M9 および M8B について ^{13}C -edited NOESY 法による核オーバーハウザー効果 (NOE) の計測を行い、原

子間距離を評価した。その結果、M8B は M9 に比べ立体構造の変動範囲が大きいことが示唆された (図)。以上の研究により、糖タンパク質の品質管理に関わる一連の高マンノース型糖鎖のプロセッシングによる、ダイナミックなコンフォメーション変化を明らかにすることができた。

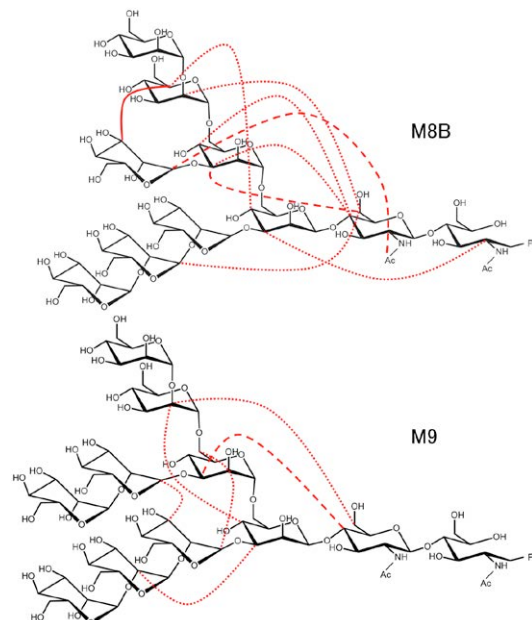
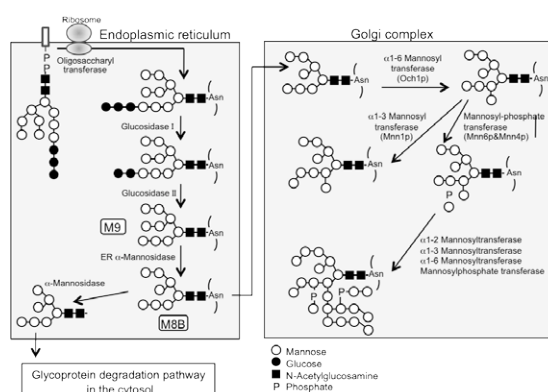


図. 細胞内における高マンノース型糖鎖のプロセッシングパスウェイ (上) と、安定同位体標識を利用して観測された M8B と M9 の NOE ネットワーク (下)。

参考文献

[1] Y. Kamiya, S. Yamamoto, Y. Chiba, Y. Jigami, and K. Kato, *J. Biomol. NMR* 50, 397–401 (2011).

業績紹介：常磁性プローブ導入による高マンノース型糖鎖の動的構造解析

加藤晃一

(自然科学研究機構・A01 計画研究代表者)

論文題目：“Terminal spin labeling of a high-mannose-type oligosaccharide for quantitative NMR analysis of its dynamic conformation”

著者：Takumi Yamaguchi, Yukiko Kamiya, Yeun-Mun Choo, Sayoko Yamamoto, and Koichi Kato

雑誌巻号：Chem. Lett. (2013) in press

糖鎖は、内部運動の自由度に富むことに加え、複雑な分岐構造を持ち、水溶液中では一定のコンフォメーションをとっていない。私たちは、このような糖鎖の立体構造の揺らぎを通じて発揮される生物機能の理解を深めるために、溶液 NMR を用いた糖鎖の動的構造解析手法の開発に取り組んできた。例えば、常磁性プローブを用いた NMR 法と分子動力学計算とを組み合わせることで、糖鎖の動的 3 次元構造を定量的に描象する手法の開発に成功している[1]。一方、遺伝子改変酵母を用いて、複雑な高マンノース型糖鎖を大量に調製することを可能としてきた。タンパク質の品質を提示する高マンノース型糖鎖 M9 は、マンノース 9 残基を含む 11 糖であり、その非還元末端に 3 本の分岐鎖を有している。これらの分岐鎖にはいずれも共通する糖鎖構造(Man α 1-2Man)が含まれているにも関わらず、M9 に結合するタンパク質が特定の枝を選択的に識別していることを私たちは見出している[2]。そこで今回、これまでに培ってきたこれらの技術を組み合わせて、高マンノース型糖鎖の精密 NMR 解析を行うことを試みた。

酵母糖タンパク質上に均一に発現させた M9 に関して、その分離・精製条件、および化学修飾のための反応条件を最適化し、高効率に常磁性プローブを付与する手法を確立した。これにより、M9 糖鎖の還元末端にニトロキシラジカルを選択的に導入することに成功した(図 1)。こうして得られた M9 について ^1H の緩和時間測定を実施し、各マンノース残基の空間配置に関する情報を反映した常磁性緩和促進効果を観測した。解析の結果、3 本の分岐鎖のコンフォメーションは有意に異なっており、一部の枝を還元末端側に向けたフォールドバック構造を取り得ることが示された

(図 2)。

このように NMR 解析を通じて複雑な分岐構造を有する高マンノース型糖鎖のコンフォメーションのダイナミクスを定量的に捉える道筋を確立することができた。更に私たちが確立した糖鎖の安定同位体標識技術と組み合わせることにより、一連の高マンノース型糖鎖のコンフォメーションの揺らぎの評価を系統的に実施することが可能となる。

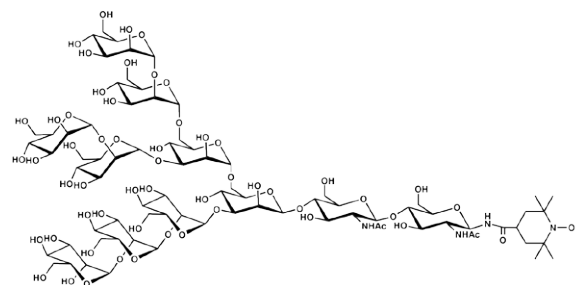


図 1. 常磁性プローブを導入した M9 糖鎖。

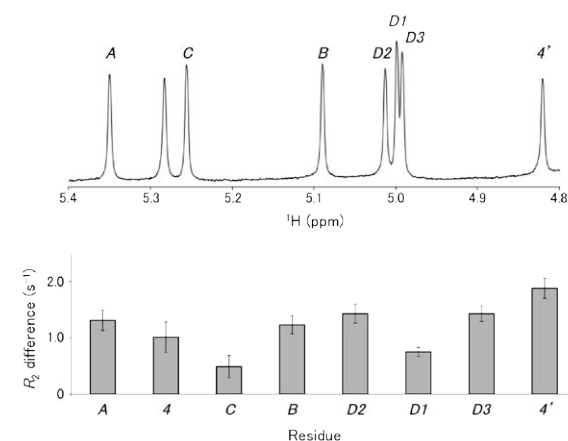


図 2. 常磁性 NMR 解析による各マンノース残基の横緩和速度 (R_2) 変化。

参考文献

- [1] Y. Zhang, S. Yamamoto, T. Yamaguchi, K. Kato, *Molecules* **17**, 6658–6671 (2012).
- [2] Y. Kamiya, T. Satoh, and K. Kato, *Biochim. Biophys. Acta.* **1820**, 1327–1337 (2012).

業績紹介：NMR 法を用いた GroEL と変性タンパク質との相互作用解析

加藤晃一

(自然科学研究機構・A01 計画研究代表者)

元島史尋

(京都産業大・A03 公募研究代表者)

論文題目：“NMR approaches for characterizing interactions between the bacterial chaperonin GroEL and unstructured proteins”

著者：Noritaka Nishida, Maho Yagi-Utsumi, Fumihiro Motojima, Masasuke Yoshida, Ichio Shimada and Koichi Kato

雑誌巻号：J. Biosci. Bioeng. (2013) in press

doi: 10.1016/j.jbiosc.2013.02.012

分子シャペロンは、生体条件下もしくはストレス条件下においてタンパク質のフォールディングを補助することを通じて、細胞内の様々な生物現象に関わっている。大腸菌の分子シャペロンである GroEL の反応サイクルに関しては、はじめに GroEL に基質となるタンパク質が結合し、さらに ATP および補助シャペロンである GroES が結合することでタンパク質の折り畳みを促進することが既に明らかにされている。しかしながら GroEL と基質タンパク質との詳細な相互作用様式についてはこれまで必ずしも十分には明らかにされていない。本研究では GroEL と基質タンパク質との相互作用の構造的基盤を明らかにすることを目的とし、安定同位体標識技術と NMR 手法を組み合わせることにより、両者の結合様式の詳細を解明することを試みた。モデル基質タンパク質としては、GroEL の機能解析に広く用いられているロダネーゼ (Rho)、および天然変性タンパク質である α シヌクレイン (α SN) を用いた。

まずはじめに、大腸菌発現系を用いてアミノ酸残基選択的に α 炭素を ^{13}C 標識した Rho を調製し、 ^{13}C NMR 計測を実施した。 ^{13}Ca の化学シフト値に基づいて GroEL に結合した際の Rho の二次構造を評価し、尿素を用いて Rho を変性させた際のスペクトルと比較した結果、Rho は GroEL に結合した状態でも分子の大部分は特定の二次構造をとっておらず、そのコンフォメーションは揺らいだ状態にあることが明らかとなった。

次に、 ^{15}N 標識を施したリコンビナント α SN を調製

し、 α SN のスペクトル変化を指標に GroEL と α SN の相互作用解析を実施した。GroEL の添加に伴い、 α SN の N 末端の 2 つの領域 (Val3-Ala17、Val37-Val40) に由来するシグナルにおいて、特異的に強度減弱が観測された。このことから、 α SN はこれら N 末端の 2 つの領域を介して GroEL に結合しており、その他の領域は高い運動性を保持していることが判明した (図 1)。 α SN の N 末端はアニオン性の膜に結合して α ヘリックス構造を形成することが知られているが、GroEL に結合した状態では特定の二次構造を形成していないことも明らかとなった。

このように本研究を通じて、基質タンパク質は高い運動性を保持したままアンフォールド状態で GroEL と結合することが示された。さらに、NMR を用いて変性状態にあるタンパク質の中の“GroEL-philic”な領域を捉えることを可能とした。

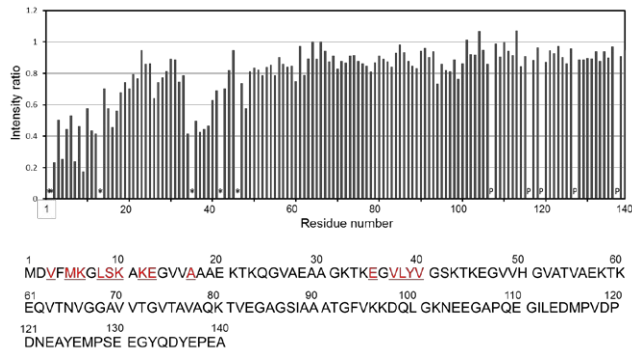


図 1 GroEL 添加前後における α SN 由来の NMR シグナル強度比のプロット (上) および α SN の一次構造 (下)。NMR シグナルの強度減弱が有意に観測された残基を赤色で示した。

参考文献

- Nishida, N., Motojima, F., Idota, M., Fujikawa, H., Yoshida, M., Shimada, I. and Kato, K., *J. Biochem. (Tokyo)* **140**, 591-598 (2006)
- Yamaguchi, Y., Masuda, M., Sasakawa, H., Nonaka, T., Hanashima, S., Hasegawa, S.-I., Kato, K. and Hasegawa, M., *J. Mol. Biol.* **395**, 445-456 (2010)

業績紹介：圧力によるフォールディングエネルギーランドスケープの探索

北原 亮

(立命大薬・A01 公募研究代表者)

論文題目："Exploring the folding energy landscape with pressure"

著者：Kazuyuki Akasaka, Ryo Kitahara, Yuji O. Kamatari

雑誌巻号：Arch. Biochem. Biophys. (2013) in press

<http://dx.doi.org/10.1016/j.abb.2012.11.016>

高圧力 NMR 研究によりこれまでに報告してきた研究結果に基づいて、蛋白質の圧力変性機構を平衡論と速度論の立場から紹介した総説である。特に、圧力軸における蛋白質の変性過程をフォールディングファネルを用いて説明している。フォールディングファネルの横軸はコンフォメーションエントロピーであり、縦軸は内部エネルギーと水和エントロピーの和となっているが、縦軸に含まれる内部エネルギー項は、蛋白質の構造形成と強く相関している。一般に蛋白質の構造が壊れるほど部分モル体積が小さくなることから、ファネルの最下部には構造形成したいわゆる天然状態が、最上部には変性状態が位置し、その中間域には中間体が位置する事となる。つまり加圧により部分モル体積の大きな天然状態から部分モル体積が小さな変性状態までの一連の構造を順に安定化させ NMR による高分解能構造解析が可能になる。本総説では、ユビキチンとリゾチームを例に圧力下で変性中間体がどのように NMR 観測されるかを解説し、構造的特徴を明らかにしている。また圧力下では、水の凝固点が降下する事から (2000 気圧の場合、約-20℃)、蛋白質の低温変性状態についても解説している。

さらに圧力下で安定化された変性中間体の特徴と速度論的に観測されているフォールディング中間体の構造的類似性も指摘している。また天然状態における水素/重水素交換 NMR 法による構造揺らぎの特徴との類似性についても指摘している。これらの比較解析から、圧力下で安定化される高いギブスエネルギーを持った状態は、生理条件において蛋白質が持つ構造揺らぎの一部である事を強く示している。

本総説により、高圧力 NMR 研究から得られた蛋白質の圧力変性のメカニズムや構造的特徴がよくまと

まっているとともに、まだ十分な理解に及んでいない問題点についても指摘している。例えば、蛋白質内部に存在するキャビティー周辺では、特徴的な圧力応答が得られる場合が多いが、その常圧下における水和状態を X 線結晶構造解析や溶液 NMR 法によってもまだ十分に確立されていないため、圧力による応答についてもまだ理解が不十分である。大きなキャビティーの周辺では圧力による局所変性がみられるなど、局所的な安定性や揺らぎと密接に関わっている事が推測される。

業績紹介：圧力化学シフト変化を用いた蛋白質の構造揺らぎの解明

北原 亮

(立命大薬・A01 公募研究代表者)

論文題目："Pressure-induced chemical shifts as probes for conformational fluctuations in proteins "

著者： Ryo Kitahara, Kazumi Hata, Hua Li, Mike P. Williamson, Kazuyuki Akasaka

雑誌巻号： *Prog. Nucl. Mag. Res. Sp.* (2013) in press

<http://dx.doi.org/10.1016/j.pnmrs.2012.12.001>

高圧力 NMR 法は、耐圧 NMR セルの汎用化もあり (Daedalus Innovation, USA), 世界で 10 以上のグループが研究を開始している。高圧力 NMR 法の背景や方法論、理論などを包括的に紹介するとともに、これまでに行った研究のうち 16 の蛋白質のデータを統計的に解析し、新しい発見や解釈を紹介している。

これまでに我々が報告した 20 以上の蛋白質の研究例の中から、50-250 アミノ酸残基の範囲の 16 蛋白質のデータとその実験条件を紹介した。加圧による pH 変化や化学シフト基準物質を使用する際の注意事項についてもまとめた。

次に化学シフトの圧力依存性の線形応答と非線形応答について解説し、テトラペプチド内のアミノ酸に対して、立体構造を有する蛋白質中でのアミノ酸では、 ^1H や ^{15}N 化学シフトの圧力依存性に非線形性が增大する事を示した。線形応答が 1 つの状態内での原子間距離等の変化 (圧縮・膨張) を示すのに対し、蛋白質中でみられるアミド ^1H や ^{15}N の非線形応答は、異なる圧縮率を有する状態への転移と解釈できる。

次に、Williamson らにより開発された化学シフト変化量から立体構造を計算する手法により、リゾチムや BPTI について加圧により水素結合の短縮や膨張が生じる事を示した。化学シフトから計算された立体構造変化は、高圧力下の X 線結晶構造解析の結果と良い一致を示した。

また 16 の蛋白質の圧力に対する化学シフト変化を 2 次式によりフィットし、線形性と非線形性を定量的に評価した。非線形性が高い部位は立体構造上近接する場合が多く構造変化部位に相当すると考えられる。さらに蛋白質ごとの線形性、非線形性の平均値を解析

する事により、 ^1H と ^{15}N の線形性或非線形性は互いに良い相関を示した事から、本質的には線形性が状態内の圧縮率を反映し、非線形性が高エネルギー状態への状態転移を反映しているとする我々の考えは裏付けられた。

また 2 状態転移を仮定した化学シフトからの熱力学解析の方法についても紹介した。NMR の場合、状態間の化学シフト差が交換速度より十分に小さい場合、分布率に応じ平均化された信号が観測される。すなわち化学シフト値は、速く交換するすべてのコンフォメーションの分布率を加味した平均値として得られる。圧力により分布率の変化が生じると、化学シフトが非線形的に変化するため、解析的に ΔG (分布率差) や ΔV (部分モル体積差) が算出できる。

このような 16 蛋白質の構造揺らぎの程度を立体構造上にカラーマップで示しており、揺らぎの大きな部位がわかりやすくプレゼンテーションされている。

業績紹介：ユビキチンの高エネルギー構造 N₂ の精密立体構造解析に成功

北原 亮

(立命大薬・A01 公募研究代表者)

加藤晃一

(自然科学研究機構・A01 計画研究代表者)

論文題目: "Solution structure of the Q41N variant of ubiquitin as a model for the alternatively folded state N₂ of ubiquitin"

著者: Soichiro Kitazawa, Maho Yagi-Utsumi, Kenji Sugase, Nicola Baxter, Koichi Kato, Mike P. Williamson, Ryo Kitahara

雑誌巻号: *Biochemistry* (2013) in press

doi: 10.1021/bi301420m

蛋白質構造において、天然状態を逸脱した高エネルギー状態の存在が溶液 NMR 法で確認されているが、構造やダイナミクス、安定性の解析、機能的意義の解明は天然状態ほど進んでいない。蛋白質の高エネルギー状態を圧力下で安定化させ、NMR による立体構造を行い、最安定状態から変性状態までの一連の構造変化を可視化する事ができる。これまでに高圧力 NMR 法によりユビキチンには、最安定状態 N₁ の他に準安定状態 N₂ や局所変性状態 I、完全変性状態 D が存在することを明らかにしてきた (1, 2)。また野生型ユビキチンについて 3000 気圧下で N₂ 構造を 78% まで分布させ、立体構造解析に成功している (1)。N₂ 構造の精密構造解析や、機能的意義の研究のために 1 気圧下で N₂ 構造が安定化された変異体を合理的に設計することを試みた。

1 気圧下での N₁ 構造と 3000 気圧下での N₂ 構造の立体構造比較から、I36-Q41 間の水素結合長と K11-E34 間の塩橋が大きく変化していることが明らかになった。そこで、水素結合と塩橋の相互作用を減弱させるために Q41A, Q41N, K11A, E34A 変異体を作成し、高圧力 NMR 測定を含む各種 NMR 測定に基づいて、立体構造、ダイナミクス、熱力学的安定性の解析を行った。

圧力 (3000-30 bar) による化学シフト変化と変異による化学シフト変化に相関がみられたことから、加圧時と同様に変異によっても N₂ 構造の安定化が示唆された。最も化学シフト変化量が大きい Q41N について、高圧力 NMR 法により N₂ 構造の分布率が 70% 程度と分かった。

距離情報 (NOE) と角度情報 (RDC, TALOS+) から Q41N の精密な立体構造に成功した。Q41N は、8-44-70 からなる疎水性パッチの構造は保持しつつも、高圧下で決定された WT の N₂ 構造と同様に、 α -helix, loop, β_3 -strand, β_5 -strand の配向が変化していた。

Q41N のスピン緩和 NMR 解析から、 α -helix, loop, β_3 -strand, β_5 -strand の領域で μ s-ms 域の構造揺らぎが観測されたことから、変異により N₁-N₂ 構造転移が増幅されたことが分かった。Cleanex-PM NMR 解析からは、これらの部分で変異により安定性が低下し水和水が進んでいることが示された。 α -helix と loop 部分は酵素 E2 との相互作用部位であり、N₂ 構造が E2 認識に関与している可能性が示唆される。Q41N 変異体は N₂ 構造の良いモデル変異体であり、機能的意義の解明に必須な変異体となるだろう。

参考文献

1. R. Kitahara et al., *J. Mol. Biol.* **347**, 277-285 (2005).
2. R. Kitahara et al., *Progress in NMR spectroscopy*, in press (2013).

業績紹介：化学シフトデータから複数の基質結合部位を同時に同定

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："Principal component analysis of chemical shift perturbation data of a multiple-ligand-binding system for elucidation of respective binding mechanism"

著者：Tsuyoshi Konuma, Young-Ho Lee, Yuji Goto, and Kazumasa Sakurai.

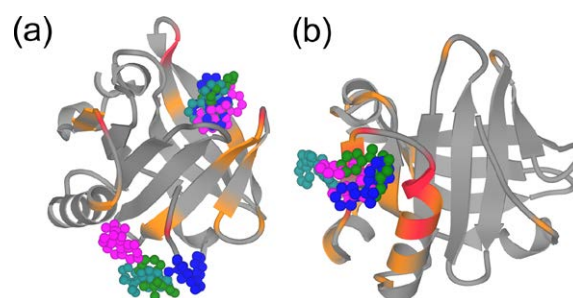
雑誌巻号：Proteins 81, 107-118 (2013)

タンパク質の2次元NMRスペクトルのひとつであるHSQCスペクトルから各残基の主鎖アミド窒素と水素の化学シフト値が得られる。化学シフトは対応する残基の周辺環境に敏感に反映するため、基質の滴定に伴う各残基の化学シフト変化（化学シフト摂動）の情報は、リガンド結合部位の同定によく用いられている。しかし、対象タンパク質が複数のリガンド結合部位を持つ場合、化学シフト摂動データだけではそれぞれの結合サイトを分離して同定することは難しい。そこで我々は、滴定実験から得られる一連の化学シフト(CS)データを主成分分析(PCA)することで各リガンド結合部位を分離して同定する方法(CS-PCA)を提案した。

PCAは、膨大なデータの中からある傾向を見つけ出し、限られた数のパラメータでそれらを説明する方法である[1]。今回提案する手法では、全ての残基の化学シフトデータの主成分解析から共通の挙動を示す残基をグルーピングし、それぞれを基質の各結合部位に帰属するという手順で行った。

我々はこのCS-PCA法をウシβラクトグロブリン(βLG)の基質結合の解析に適用した。これまでの研究から、βLGは基質のひとつであるアニリノナフタレンスルホン酸(ANS)の結合サイトを複数持つと考えられていたが、結合部位、会合定数、各部位の結合数などは明確に分かっていなかった。そこで我々はANS滴定に伴うHSQCスペクトル変化を測定し、得られた化学シフトデータを主成分解析した。得られた主成分データを加重平均距離($\bar{d}$)という値を参考にグルーピングし、それぞれのグループに対しHADDOCKというプログラムでβLG-ANS複合体の構造計算を行った。

その結果2つの結合部位、ひとつはβバレル内部、もうひとつはβバレル-αヘリックス間の溝、にANSが結合した構造を得ることができた(図参照)。また、CS-PCAで得られた結合定数や各部位へのANS結合数のパラメータから、後者はANSが単純にβLG分子表面に結合するのに対し、前者は基質結合と構造変化が同時に起こる協同性の高い結合様式であることが示唆された。これまでの蛍光やCD、ITCなどによる測定では、各部位への結合を分離して観測できなかったため、詳細な結合機構を説明できなかったと考えられる。



図：化学シフト主成分解析(CS-PCA)によるβラクトグロブリンのANS結合部位の同定。
(a)はバレル内部、(b)はβバレル-αヘリックス間における結合部位を示す。立体構造上で赤や橙で示されているのは有意な化学シフト摂動を示した残基、ボールアンドスティックで示されているのはHADDOCKによって予想される結合状態のANS分子の構造である。

今回我々はこのCS-PCA法を基質結合部位の同定に用いた。しかし尿素変性や温度、圧力変化によるタンパク質の構造変化は化学シフト摂動を伴うことが多く、このようなデータにも本解析法が適用できる。この場合、条件変化の途中に生じる変性中間体の構造やダイナミクス変化に関する情報が得られると期待される。今後本解析法を様々なタンパク質、そして様々な変性実験における構造変化や揺らぎの解析に応用し、本解析法を改良していきたい。もし他の班員の方に本解析に適すると思われるデータをお持ちの方は、是非ご紹介いただけると幸いです。

参考文献

[1] K. Sakurai and Y. Goto. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **104**, 15346-51 (2007).

業績紹介：癌抑制転写因子 p53 は DNA 上をどのように探索するか？

高田彰二

(京都大学大学院理学研究科・A01 公募研究代表者)

論文題目："p53 searches on DNA by rotation-uncoupled sliding at C-terminal tails and restricted hopping of core domains"

著者：Tsuyoshi Terakawa, Hiroo Kenzaki, and Shoji Takada

雑誌巻号：J. Am. Chem. Soc. **134**, 14555-14562 (2012)

p53 は癌抑制性の多機能転写因子であり、細胞周期に関わる多数のタンパク質の転写を制御する。転写因子は一般に長いゲノム DNA 上の特異的結合部位を効率よく探索する必要がある。転写因子が、いかにして速やかにターゲットを探索できるのか、という問題は細胞生物学における重要な基礎問題である。

p53 はホモ 4 量体を形成してその機能を果たす。それぞれの単量体は、2 つの構造ドメイン（右図上のコアと TET）と 3 つの変性領域（NTD、Linker と、C 末端ドメイン）よりなっており、このうちコアドメインと C 末端ドメインがともに DNA 結合ドメインであることが興味深い。二つの DNA 結合ドメインが、どのように協調して特異的結合部位を探索するかはよく知られていない。

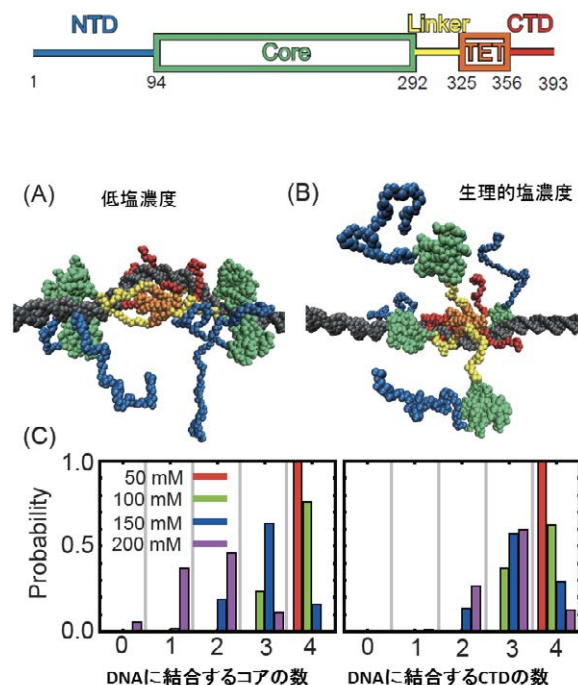
本研究では、まず、p53-DNA 複合体の粗視化モデルを構築した。特に、p53 のアミノ酸配列の 40% を構成する天然変性領域のモデルのために、PDB に登録されているループ領域の構造から統計ポテンシャルを構築した [1]。また、3 次元立体構造を形成する領域には、天然構造の情報をベースにしたモデルを用いたが、全原子シミュレーションで求めたタンパク質の揺らぎと粗視化シミュレーションの揺らぎが一致するように決定したパラメータ（AICG [2]）を用いた。

それらのモデルを用いて、p53-DNA 複合体の粗視化シミュレーションを行うことにより、生理的な塩濃度下で（構造は図 B）、C 末端ドメインが DNA 上をスライディングする一方で、コアドメインは探索中に DNA との結合、解離を繰り返すことを明らかにした

（図 C）。このメカニズムは、近年の一分子実験の結果を説明するために提唱されたモデルと一致する。また、C 末端ドメインによるスライディングが、DNA 上の溝に沿った拡散ではないことを明らかにした。これは、他のタンパク質が DNA に結合している状況でも、p53 がそれらを避けて DNA 上を拡散することができることを示唆している。さらに、拡散定数の塩濃度依存性を解析した結果から、天然変性領域である C 末端ドメインが DNA 上を素早くスライディングすることに適したドメインであることが示唆された。また、コアドメインと C 末端ドメインを繋ぐリンカーの、特異的結合部位の探索における重要性が示唆された。

参考文献

- [1] Terakawa & Takada (2011) *Biophys J* **101**:1450
- [2] Li, Wolynes, & Takada (2011) *PNAS* **108**:3504



業績紹介：ハイブリッドリポソームを用いたヒト成人T細胞白血病細胞移植モデルマウスに対する *in vivo* での治療効果

上岡龍一

(崇城大応用生命科学・A03 計画研究代表者)

松本陽子

(崇城大応用生命科学・A03 公募研究代表者)

岡田誠治

(熊本大エイズ研・A03 公募研究代表者)

論文題目：“Therapeutic effects of hybrid liposomes for mouse models of adult T-cell leukemia/lymphoma *in vivo*”

著者：Yuji Komizu, Mamiko Yukihara, Toshiko Ueoka, Hideaki Ichihara, Yoko Matsumoto, Seiji Okada, Ryuichi Ueoka

雑誌巻号：Nano Bull., 1, 120105 (2012).

成人T細胞白血病/リンパ腫 (Adult T-cell Leukemia/Lymphoma: ATLL) は、HTLV-I (ヒトT細胞白血病ウイルスI型) の感染が原因となるT細胞の悪性腫瘍疾患であり、日本において九州地方で多発している。HTLV-I感染者の大多数は無症候であるが、ごく一部がATLLを発症する。そのため、ATLLに対する安全で効果的な新しい治療薬の開発が急務となっている。

ハイブリッドリポソーム (HL) [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、HL自身がアポトーシス誘導型の制がん効果を示すこと、その制がんメカニズムに“HL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[2]。最近、ATLL (MT-2, MT-4) 細胞に対して、HLが選択的に融合・蓄積後、アポトーシスを誘導するがん抑制効果を報告した[3]。しかし、ATLLマウスに対する *in vivo* での効果については不明であった。そこで、本研究では、リン脂質 (DMPC) および PEG 系界面活性剤 C₁₂(EO)₂₅ からなる HL-25 を用い、ATLLモデルマウスに対する *in vivo* でのがん抑制効果について検討した。

まず、ATLLモデルの作成として、T細胞、B細胞およびNK細胞の免疫機能を欠損した高度免疫不全マウス (Balb/c Rag-2/Jak3) [4] を用い、ATLL (MT-4) 細胞をマウスの脾臓に移植し、ATLLの肝転移モデルを作成した。HL-25のMT-4細胞の肝転移モデルマウスへの治療効果を検討したところ、HL-25の14日間の静

脈投与後の肝臓重量は、未処理のコントロールおよびDMPC単一リポソーム投与群と比べ、有意に抑制された ($p < 0.01$, 図1A)。さらに、肝臓の組織切片作成後のHE染色 (図1B) および免疫染色 (CD4, CD25) においても、HL-25処理により、肝臓でのMT-4細胞増殖を顕著に抑制することが明確となった。

次に、HL-25によるATLL移植マウスの延命効果について検討した。HL-25を14日間の連続投与したATLL移植モデルマウスにおいて、平均生存日数が72日であった。一方、コントロールおよびDMPC単一リポソーム群では、それぞれ、57日および56日であった。さらに、HL-25投与群の延命率は、125%であり ($p < 0.01$)、顕著な延命効果が明らかとなった。

以上の結果から、HL-25のATLLモデルマウスに対する *in vivo* での治療効果を初めて明らかとした。今後、さらに前臨床試験を積み重ね、副作用のないATLL治療薬を目指して、ステップアップできるものとする。

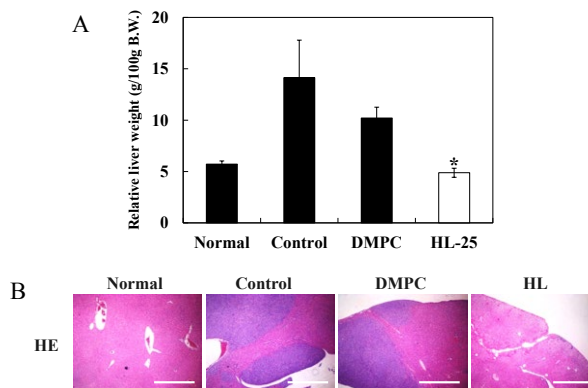


図1. HL-25のATLL移植モデルマウスに対する *in vivo* での肝転移抑制効果。A, マウスの肝臓の重量。B, 肝臓の組織切片のHE染色画像。Normal: MT-4細胞を移植していないマウス, Control: 5%-ブドウ糖水溶液, DMPC: 136 mg/kg, HL-25: 136 mg/kg。*: $p < 0.01$

参考文献

- [1] R. Ueoka et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **110**, 1588-1595 (1988).
- [2] Y. Komizu et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **418**, 81-86 (2012).
- [3] Y. Komizu et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **21**, 3962-3965 (2011).
- [4] A. Ono et al., *J. Biomed. Biotechnol.*, **2011**, 539748 (2011).

業績紹介：スピнкаラムを用いた DMSO 反応停止水素/重水素交換 NMR 法

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)

加藤晃一

(自然科学研究機構・A01 計画研究代表者)

論文題目："The use of spin desalting columns in
DMSO-quenched H/D-exchange NMR experiments"

著者：Mahesh S. Chandak, Takashi Nakamura, Toshio
Takenaka, Tapan K. Chaudhuri, Maho Yagi-Utsumi, Jin
Chen, Koichi Kato and Kunihiro Kuwajima

雑誌巻号：Protein Sci. (2013) in press

doi: 10.1002/pro.2221

水素/重水素交換 NMR 法は蛋白質の構造揺らぎを調べるために有用な実験法である。その中でも Zhang らによって発表された DMSO 反応停止水素/重水素交換 NMR 法は、①DMSO は強力な変性剤であるため、会合体や不溶性の凝集体を単量体として溶解することができる、②DMSO 中では水素/重水素交換速度は水溶液中と比較して非常に遅いため、DMSO で水素/重水素交換を停止することにより水溶液中では観測困難な速い水素/重水素交換反応を追跡できる、という点において蛋白質又は蛋白質集合体の構造揺らぎを調べることに適している。従来の DMSO 反応停止水素/重水素交換 NMR 法は、まず水溶液中で水素/重水素交換させた蛋白質試料を液体窒素等で凍結させ、凍結乾燥した蛋白質試料を DMSO に溶解することにより NMR 測定用の試料を調製する。しかしながら、この方法では NMR 測定用の試料に水素/重水素交換反応時に用いた塩が残ってしまうため、水素/重水素交換反応時の溶媒条件に制限が生じる。この問題を克服するために我々はスピнкаラムを用いた DMSO 反応停止水素/重水素交換 NMR 用の試料調製方法を開発したので、ここで紹介する。

まず、我々はスピнкаラムにのせる試料体積を決めた。Bed Volume 5 ml、MWCO7000 の Zeba™ spin desalting columns を用いた場合、1.0 ml 以下の蛋白質試料溶液をスピнкаラムにのせると蛋白質試料溶液由来の水のコンタミが少ないことがわかった。次に、この

条件で我々は 6 M グアニジン存在下でのユビキチンの DMSO 反応停止水素/重水素交換 NMR 法を行った。その結果、図中の A、B、C の NMR 信号が交換反応時間に応じて減衰している様子を観測する、つまり 6 M グアニジン存在下でのユビキチンの水素/重水素交換反応を追跡することに成功した。

この方法を用いることにより、高濃度の塩存在下で DMSO 反応停止水素/重水素交換 NMR 法を行うことが可能となる。例えば 6 M のグアニジンで変性させた蛋白質の水素/重水素交換反応速度を調べることにより、その蛋白質が 6 M のグアニジン存在下で完全に変性しているのか、それとも何らかの残存構造があるのかといった情報を得ることができるだろう。

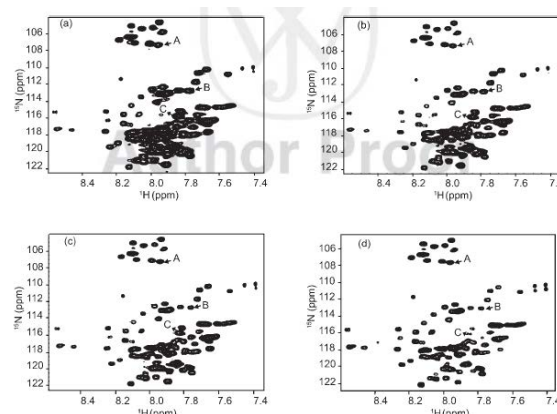


図 6M グアニジン存在下でのユビキチンの水素/重水素交換反応

水素/重水素交換反応条件は、6M グアニジン、pH 2.6、20°C。それぞれの NMR スペクトルは、(a)水素/重水素交換反応前(b)水素/重水素交換反応後、10 分(c)水素/重水素交換反応後、60 分(d)55°C、30 分で完全に水素/重水素交換反応させた試料、である。

業績紹介：V γ 9V δ 2T 細胞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："Potent antitumor activity of zoledronic acid-induced V γ 9V δ 2 T cells against primary effusion lymphoma"

著者：Hiroki Goto, Kouki Matsuda, Pattaravadee Srikoon, Ryusho Kariya, Shinichiro Hattori, Manabu Taura, Harutaka Katano and Seiji Okada

雑誌巻号：Cancer Lett. (2013) in press

doi: 10.1016/j.canlet.2012.12.021

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/AIDS 患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。

V γ 9V δ 2T 細胞は、主に末梢血に存在する $\gamma\delta$ T 細胞で、末梢血リンパ球の1-10%を占める。がん細胞やウイルス感染細胞に対して、MHC 非拘束性の細胞傷害活性を有する。近年、第3世代ビスホスホネート製剤であるゾレドロン酸により V γ 9V δ 2T 細胞を特異的に誘導する方法が見出された。そこで、V γ 9V δ 2T 細胞の PEL に対する治療効果について検討した。

末梢血単核球(PBMCs)をゾレドロン酸 1 μ M、IL-2(100U/ml)存在下で14日間培養し、V γ 9V δ 2T 細胞の特異的な増幅を *in vitro* で行った。

V γ 9V δ 2T 細胞は3種類の PEL 細胞株(BCBL-1、BC-1、BC-3)に対して、フローサイトメトリーを用いた実験において、細胞傷害活性を認めた。阻害剤や阻害抗体を用いた実験から、腫瘍細胞の MICA/B やメバロチン代謝産物を認識し、perforin 経路・TRAIL 経路を介した細胞傷害活性を認めることが明らかとなった。

フローサイトメトリーで脱顆粒のマーカーとして知られる CD107a の発現を評価したところ、PEL 細胞との共培養下で、CD107a の発現上昇を認めた。

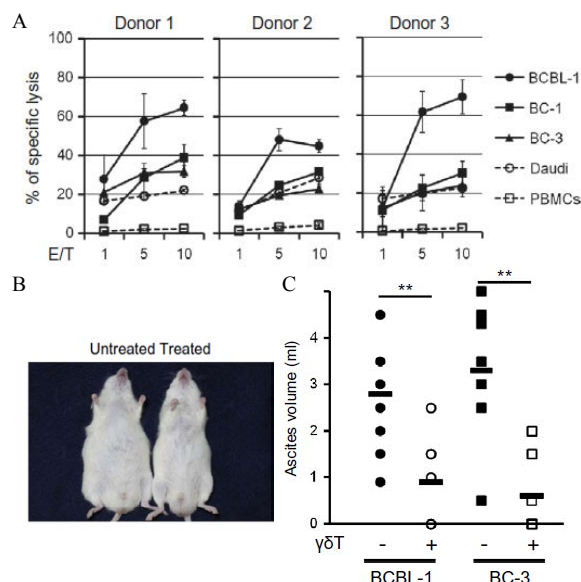


図1. V γ 9V δ 2T 細胞の抗腫瘍効果。A, PEL 細胞株に細胞傷害活性を認めた。B, C, PEL マウスモデルで腹水量が減少した。

さらに、V γ 9V δ 2T 細胞の 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: NRJ マウス)の腹腔内に PEL 細胞株 BCBL-1 を移植し、無治療群、V γ 9V δ 2T 細胞投与群にわけて31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。V γ 9V δ 2T 細胞投与群では、腹水量の減少、遠隔臓器への浸潤抑制を認めた。また、治療群のマウス脾臓・末梢血中には、V γ 9V δ 2T 細胞を認めており、NRJ マウスは V γ 9V δ 2T 細胞の解析モデルとしても有用であることが示唆された。

以上の結果から、ゾレドロン酸により誘導された V γ 9V δ 2T 細胞は、PEL 細胞に対して、腫瘍表面の MICA/B・メバロチン代謝産物を認識し perforin 経路・TRAIL 経路を介して、*in vitro*、*in vivo* で抗腫瘍効果を認めることが明らかとなった。

今回の研究から、V γ 9V δ 2T 細胞による免疫療法は PEL に対する有効な治療法の一つと考えられる。

業績紹介：生体内糖鎖プロセッシングに対する多様な分子クラウディング効果

戸谷希一郎

(成蹊大理工・A03 公募研究代表者)

論文題目："Diverse effects of macromolecular crowding on the sequential glycan processing pathway involved in glycoprotein quality control"

著者：Hikaru Matsushima, Makoto Hirano, Yukishige Ito and Kiichiro Totani

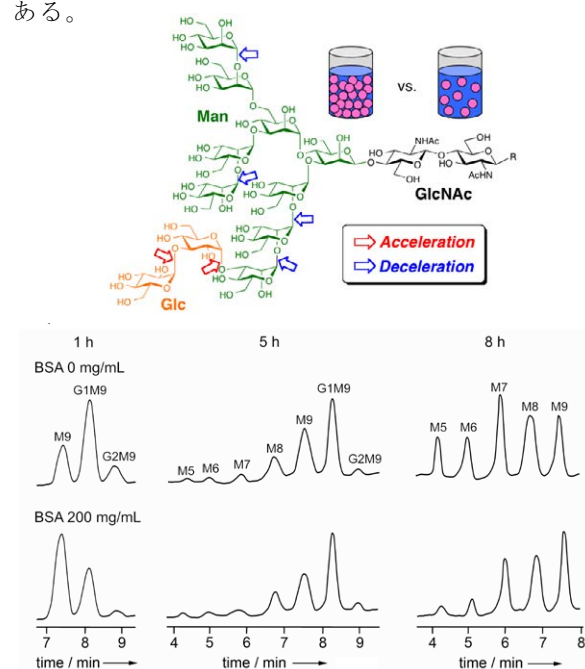
雑誌巻号：ChemBioChem (2013) in press

細胞内環境は一般的な *in vitro* 実験環境と比べて多様な生命分子によって混み合った状態にある。この分子クラウディングは酵素やタンパク質の性状に様々な影響を及ぼすことが知られている。これまでタンパク質のフォールディングや相互作用、酵素反応に対する分子クラウディング効果は個々に評価されてきたが、連続的な分子変換や相互作用に関わる生命プロセス全体に対して分子クラウディングを検討した例はない。本研究では小胞体内の糖タンパク質糖鎖プロセッシングを連続的な代謝経路のモデルとして、分子クラウディングが生命プロセス全体に及ぼす影響を検証した。

糖加水分解酵素やレクチンが関わる糖タンパク質プロセッシングは、タンパク質の品質管理を制御する因子として重要である。我々は化学合成した均一構造の $\text{Glc}_2\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2(\text{G2M9})$ 誘導体 (上図) をラット肝臓から抽出した小胞体画分に添加し、その糖鎖プロセッシング状況を高速液体クロマトグラフィーによって定量的に評価した (下図)。その際、通常の *in vitro* 実験環境とウシ血清アルブミンをクラウディング剤として共存させた分子クラウディング環境の双方で糖鎖プロセッシング状況を経時的に比較したところ、反応 1 時間後ではグルコース切断のみが観測され、それらの反応は分子クラウディング下で促進することが分かった。反応 5 時間後では、グルコース切断に加えマンノース切断も観測されたが、分子クラウディング下のクロマトグラムは通常の希釈条件下とほぼ同一であった。このことはグルコース切断に引き続き起こるマンノース切断が、分子クラウディング下で減速することを示唆している。実際、反応 8 時間後のクロマトグラムを比較すると、分子クラウディング下でマンノース切断が

進行した生成物が減少した。分子クラウディングによるグルコース切断の加速とマンノース切断の減速は、それぞれを個別に評価する実験系でも同様に確認された。これらの結果は分子クラウディングが、ひとつの生命プロセスの上流と下流に対して異なる影響を及ぼす可能性があることを示した初めての例である。また、これらの分子クラウディング効果は、生体内糖鎖構造をもつ高マンノース型糖鎖基質を用いた場合にのみ観測され、市販の *p*-ニトロフェニルグリコシドを基質とした場合には、顕著な分子クラウディング効果は認められなかった。さらに本研究では糖鎖プロセッシング中間体と結合するレクチン様分子シャペロン「カルレティキュリン」のレクチン活性に対する分子クラウディングについても併せて検討した。その結果、分子クラウディング下で当該レクチン活性は有意に向上することが分かった。

本研究では *in vitro* 実験において、分子クラウディングによって疑似細胞内環境を作り出すことや、真のリガンド構造をもつ基質を用いることの重要性を実証した。とくに連続的な代謝過程を正しく理解するためには、分子クラウディング効果を考慮することが肝要である。



図：連続糖鎖プロセッシングに対する分子クラウディング効果
本研究の概要 (上図) と典型的な結果 (下図) を示す

業績紹介 : Katanin p60 のカルシウム結合による機能制御機構

濱田大三

(神戸大学大学院医学研究科・A03 公募研究代表者)

論文題目 : "Effect of Ca^{2+} on the microtubule-severing enzyme p60-katanin"

著者 : Naoko Iwaya, Kohei Akiyama, Natsuko Goda, Takeshi Tenno, Yoshie Fujiwara, Daizo Hamada, Teikichi Ikura, Masahiro Shirakawa, Hidekazu Hiroaki

雑誌巻号 : *FEBS J.* **279**, 1339-1352 (2012).

Katanin は、spastin や fidgetin と同様にマイクロチューブルの切断活性を持つ酵素であり、ATP 加水分解活性を持つ p60 サブユニット(p60-katanin)と、そのアダプターである p80 サブユニットのヘテロ二量体構造を形成している。P60-katanin は、ATP 依存的なマイクロチューブル切断活性を有し、N 末端の variant microtubule interacting and trafficking (vMIT) ドメインとその下流の AAA ATPase ドメイン、ならびに二つのドメインを連結する 200 アミノ酸程度のリンカー領域から構成される。遺伝的に関連する他の AAA ATPase である Vps4 と p60-katanin は良く似た基質認識機構を保持しており、katanin の vMIT ドメインは、アミノ酸配列の相動性は低いものの、Vps4 の N 末端にある microtubule interacting and trafficking (MIT) ドメインと良く似た立体構造を形成している[1,2]。また、これまでの研究から、マイクロチューブルあるいは、マイクロチューブルと p80 共存下において、p60-katanin の ATPase 活性が促進されることが報告されている。

本研究では、p60-katanin の vMIT ドメイン(p60-vMIT)のマイクロチューブルや p80 による ATPase 活性促進のメカニズムを明らかにするために、溶液 NMR やその他の生化学的アッセイ系を用いて、p60-vMIT とこれらの因子の相互作用について解析を行った。その結果、p80 の C 末端ドメインが、p60-vMIT のヘリックス 1 をとりまくような広範囲の領域に結合することが明らかになった。この p80 結合サイトはマイクロチューブルの結合サイト (ヘリックス 2 と 3 で構成される面) とは異なっていた。

このような研究を進める中で、 Ca^{2+} の添加によって、

p60-katanin のマイクロチューブル切断活性が、抑制された。同様に、p80 の存在下によるマイクロチューブル切断活性も、 Ca^{2+} によって抑制された。しかし、p60-katanin のマイクロチューブル結合に対して、 Ca^{2+} の有無は影響を与えない。溶液 NMR を用いて、p60-vMIT の Ca^{2+} 結合部位を解析したところ、マイクロチューブル結合部位とは異なるヘリックス 2 の末端部分に Ca^{2+} が結合することが、明らかになった (図 1)。

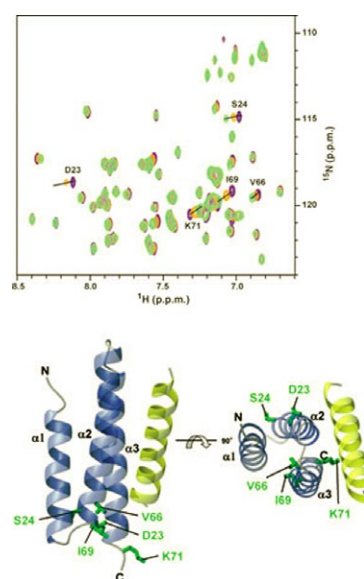


図 1. p60-vMIT の Ca^{2+} 結合部位. (A) Ca^{2+} の常磁性プロープである Ce^{3+} 添加による ^1H - ^{15}N HSQC スペクトルの変化. (B) Ca^{2+} 結合に関与するアミノ酸の側鎖.

すなわち、マイクロチューブルおよび p80 は p60-vMIT に結合して、200 残基離れた AAA ドメインの ATPase を活性化し、一方 Ca^{2+} は p60-vMIT に結合して ATPase を不活性化する。このことは、200 アミノ酸のドメイン連結リンカー領域に、大きな構造揺らぎがあり、p60-vMIT と AAA の二つのドメインが過渡的に接触することで、ATPase が活性化状態になるのに対し、p60-vMIT に Ca^{2+} が結合し、リンカー領域の揺らぎが抑制されると ATPase が不活性化されることを示唆する。

参考文献

- [1] N. Iwaya et al., *J. Biomol. NMR* **37**, 53-63 (2007).
- [2] N. Iwaya et al., *J. Biol. Chem.* **285**, 16822-16829 (2010).

業績紹介：並進・回転運動するベシクル上の脂質の側方拡散を NMR で分離

岡村恵美子

(姫路獨協大薬・班友)

論文題目："Lateral Diffusion of Lipids Separated from Rotational and Translational Diffusion of a Fluid Large Unilamellar Vesicle"

著者：Noriyuki Yoshii, Tomomi Emoto, and Emiko Okamura

雑誌巻号：Colloid Surf. B-Biointerfaces 106, 22-27 (2013)

脂質膜ベシクル中で、脂質分子はベシクル表面上の制限された空間を移動する。膜の流動性や構造揺らぎと関連して重要なのは脂質の側方拡散であるが、実験によって観測される（見かけの）拡散係数には、ベシクル表面上の側方拡散のほか、ベシクル自体の並進、回転運動に伴う拡散が合わさっており、観測される拡散係数はこれらが足し合わされたものとなっている。本研究では、パルス磁場勾配 NMR 測定を利用して、実測の拡散係数からベシクル自体の並進拡散係数 D_T 、および回転拡散係数 D_{ROT} を分離し、脂質分子の側方拡散係数 D_L を求める方法を考案した。

図 1 のように、脂質分子は球状ベシクル上を D_L で拡散する。同時に、ベシクル自体も D_T および D_{ROT} で拡散運動している。拡散時間が短い場合、ベシクル自体の並進、回転による変位に比べ、脂質分子の側方拡散による変位が支配的になる。一方、時間が十分に長ければベシクル自体の並進拡散による変位が支配的になる。見かけの拡散係数 D^{eff} が時間に依存して変化する

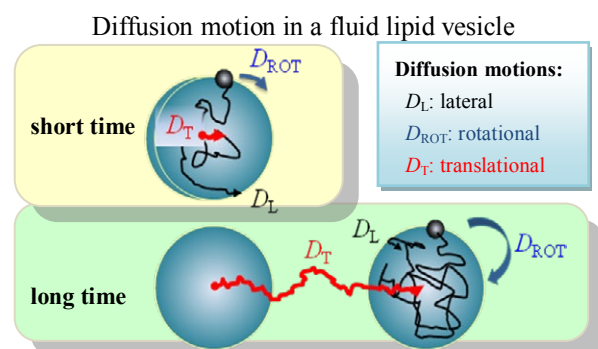


図 1：並進・回転運動するベシクル表面の脂質分子の側方拡散。

ることを利用すれば、 D_L 、 D_{ROT} 、 D_T を分離できる。

脂質分子のベシクル上での側方拡散を球面上でのランダムウォークとみなし、ベシクル自体の並進、回転運動もランダムウォークとして取り扱えば、実測される拡散係数 D^{eff} は

$$D^{eff} = D_T + D_L^{eff} + D_{ROT}^{eff} \quad (1)$$

のように表される。 D_L^{eff} は側方拡散に伴う見かけの拡散係数で、拡散時間を Δ_{diff} 、ベシクルの半径を R とすると

$$D_L^{eff} = \frac{R^2}{3\Delta_{diff}} \left[1 - \exp\left(-\frac{2D_L\Delta_{diff}}{R^2}\right) \right] \quad (2)$$

で与えられる。 D_{ROT}^{eff} についても式(2)の D_L を D_{ROT} に置き換えることにより同様の式で与えられる。 D_T や D_{ROT} は水の粘性係数を η として、それぞれ Einstein-Stokes の関係式 $D_T = k_B T / 6\pi\eta R$ および球の粘性流体中の回転拡散の式 $D_{ROT} = k_B T / 8\pi\eta R$ を用いて求められる。

Dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) を成分とする直径 800 nm のベシクルについて、脂質が液晶相にある 45 °C で磁場勾配 NMR 計測を行い、実測された拡散係数 D^{eff} の Δ_{diff} 依存性を求めた。図 2 のように、 Δ_{diff} の大きな領域では実測の D^{eff} (●) がベシクル自体の並進拡散係数 $D_T = 8.2 \times 10^{-13} \text{ m}^2/\text{s}$ と同程度の値となっているのに対し、 Δ_{diff} が小さくなるに従い次第に D^{eff} が増加する。得られた D^{eff} に式(1)をフィッティングすることにより D_L を求めると、 $1.5(\pm 0.6) \times 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$ となる (図 2)。ベシクル自体の並進や回転の拡散係数の 10 倍以上に相当し、脂質分子がベシクル表面上で非常に速く拡散していることがわかる。

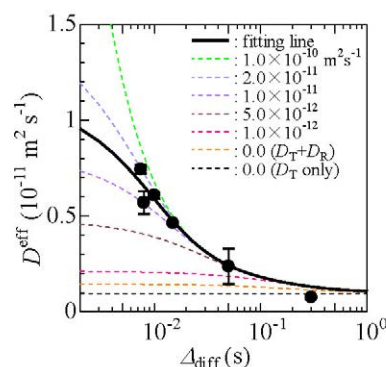


図 2：ベシクル中の DPPC の拡散係数の時間依存性。●は実測値、各線は側方拡散係数 D_L が図中の数値で与えられるときの式(1)のフィッティング結果。

上岡班員の研究成果がテレビに放映される

A03 班、班長の上岡龍一教授（崇城大学）の研究成果が、KKT くまもと県民テレビ「テレビタミン」カラダ ココロ研究所のニュース特集として「副作用のないがん治療を目指して」とのタイトルで、2013年2月6日に放映されました。注目されている『がん細胞膜の揺らぎをターゲットとするハイブリッドリポソームの制がん効果』についてであり、約7分間の中で、上岡教授のインタビューとわかりやすいアナウンサーの解説が好評でした。報道後には、多くの視聴者から問い合わせがありました。

