

2009 年度 生物物理学会中部支部講演会
講演要旨集

2010 年 3 月 29 日-3 月 30 日

岡崎コンファレンスセンター

主催： 生物物理学会中部支部

プログラム

口頭発表時間 15分： 発表12分 質疑3分
20分： 発表16分 質疑4分
25分： 発表20分 質疑5分
30分： 発表25分 質疑5分
40分： 発表30分 質疑10分

(1 鈴：発表終了1分前, 2 鈴：発表終了質疑開始, 3 鈴：質疑終了)

ポスター発表 3月29日

15:20-16:20 奇数番号, 16:20-17:20 偶数番号

3月29日(月)

13:30-13:40 支部長あいさつ

桑島邦博 (岡崎統合バイオサイエンスセンター)

口頭発表1 (13:40-15:00) (座長: 古谷祐詞)

13:40-14:00 (20分) ビブリオ属特異的べん毛タンパク質 FlgT が形成する基体の新規リング構造

○寺島浩行、小池雅文、小嶋誠司、本間道夫 (名古屋大学 大学院理学研究科)

14:00-14:15 (15分) 糖鎖の NMR 構造解析のための新規手法の開発

○山口拓実¹、山本さよこ²、宇野剛²、加藤晃一^{1,2} (¹岡崎統合バイオサイエンスセンター、²名古屋市大薬)

14:15-14:45 (30分) イカロドプシン光異性化反応の X 線結晶解析

○村上緑、神山勉 (名古屋大学大学院理学研究科)

14:45-15:00 (15分) 単層βシート蛋白質の構造形成機構

○真壁幸樹¹、小出昌平²、桑島邦博¹ (¹岡崎統合バイオサイエンスセンター、²シカゴ大学)

15:00-15:20 (休憩)

ポスター発表

15:20-17:20 ポスター発表

(15:20-16:20 奇数番号, 16:20-17:20 偶数番号)

17:30- 懇親会 (お食事処 味大) 会場まで OCC 前からバスで移動

帰りは東岡崎駅まで送迎

3月30日(火)

口頭発表2 (9:00-10:30) (座長: 榎互介)

9:00-9:20 (20分) 拡張アンサンブル法によるアラニンジペプチドの分子動力学シミュレーション

○奥村久士(分子科学研究所)

9:20-9:50 (30分) 一般化焼き戻し法によるペプチド系の温度・圧力依存性の研究

○森義治、岡本祐幸(名古屋大学大学院 理学研究科)

9:50-10:10 (20分) 既存のタンパク質系力場の改良について

○榮義丈、岡本祐幸(名古屋大学大学院 理学研究科)

10:10-10:30 (20分) ペプチド鎖の非典型的な構造・相互作用に由来する振動スペクトルの特徴に関する理論的解析

○鳥居 肇(静岡大教育)

10:30-10:45 (休憩)

口頭発表3 (10:45-12:15) (座長: 秋山修志)

10:45-11:25 (40分) (6-4)光回復酵素によるDNA修復の赤外分光観測

○張 宇¹、岩田達也¹、山元淳平²、人見研一^{2,3}、岩井成憲²、藤堂 剛⁴、

Elizabeth D. Getzoff³、神取秀樹¹(¹名工大院工、²阪大院理、³スクリプス研、⁴阪大院医)

11:25-11:40 (15分) 赤色・緑色光センサータンパク質 AnPixJ の光反応過程の4中間状態の低温でのトラップ

○富田祐介¹、福島佳優¹、青木俊¹、宇津巻竜也¹、成川礼²、池内昌彦²、伊藤繁¹(¹名古屋大学大学院 理学研究科 物質理学専攻、²東京大学 大学院総合文化研究科)

11:40-11:55 (15分) 水溶性試薬との反応性と赤外分光による微生物走光性受容体・センサーリーロドプシンIの構造変化解析

○入枝泰樹¹、鈴木大介¹、川鍋陽²、本間道夫¹、神取秀樹²、須藤雄気^{1,3}(¹名大・院理・生命理学、²名工大・院工・未来材料、³PRESTO, JST)

11:55-12:15 (20分) 霊長類色覚視物質の赤外分光解析

○片山耕大¹、古谷祐詞^{1,2}、今井啓雄³、神取秀樹¹(¹名工大・院工、²分子研・生命錯体、³京大・霊長研)

12:15-14:00 (昼食)

口頭発表4 (14:00-15:00) (座長：岡本祐幸)

14:00-14:15 (15分) 相同蛋白質のフォールディング機構：ヤギ α -ラクトアルブミンとイヌミルクリゾチームの比較研究

○中村敬¹、真壁幸樹^{1,2}、友寄克亮³、槇互介¹、向山厚¹、桑島邦博^{1,2} (¹岡崎統合バイオ、²総研大・物理科学、³東京大学大学院・理・物理)

14:15-14:35 (20分) **A potassium switch of ATP-induced GroEL conformational changes**

○Chen Jin, Koki Makabe, Kunihiro Kuwajima (岡崎統合バイオサイエンスセンター)

14:35-15:00 (25分) 蛍光寿命測定による蛋白質フォールディングダイナミクスの観察

○木村哲就^{1,#,*}、Harry B. Gray¹、Jay R. Winkler¹ (¹カリフォルニア工科大・ベックマン研、[#]分子研、^{*}総研大・物理科学)

15:00-15:30 休憩 (優秀発表賞、ポスター賞選考委員会)

15:30 - 16:30 中部支部総会と優秀発表賞、ポスター賞贈呈

ポスター発表演題

ポスターは 3/29 午後 3 時までに掲示してください。

ポスターは都合が付かない場合を除いて 3/30 の講演会終了まで掲示したままにしてください。

3/29 15:20-17:20 ポスター発表

(15:20-16:20 奇数番号, 16:20-17:20 偶数番号)

- P-01 制がん性白金二核錯体が長鎖 DNA の持続長と folding の連続性におよぼす効果
○秋田谷 龍男¹、中井 唱²、佐藤 卓史³、神戸 俊夫⁴、村田 静昭⁵、吉川 研一⁶(¹名城大薬、²鳥取大院工、³大阪薬大薬、⁴名大院医、⁵名大院環、⁶京大院理)
- P-02 血液凝固因子欠乏症の原因遺伝子産物間の協働的相互作用の構造基盤
○西尾美穂^{1,2}、神谷由紀子^{1,2}、水島恒裕¹、若槻壮市³、山本一夫⁴、内山進⁵、野田勝紀⁵、加藤晃一^{1,2,6,7} (¹名市大・院薬、²統合バイオ、³高エネ研、⁴東大、⁵阪大、⁶グライエンス、⁷お茶大)
- P-03 NMR 法による分子シャペロン Hsp47 とコラーゲンの相互作用解析
○良川須美^{1,2}、矢木真穂^{1,2}、山口芳樹^{1,3}、栗本英治^{1,4}、石田義人⁵、本間貴之⁵、寶関淳⁵、西川良美⁶、小出隆規⁷、永田和宏⁵、加藤晃一^{1,2} (¹名市大・院薬、²自然科学研究機構・統合バイオ、³理研、⁴名城大・薬、⁵京大・再生研、⁶新潟薬大・薬、⁷早大・先進理工)
- P-04 X線小角散乱に用いる分子量標準タンパク質の品質管理
○秋山修志^{1,2,3} (¹名大院・理、²JST・PRESTO、³理研・播磨)
- P-05 時計タンパク質 KaiC の ATPase やリン酸化に依存した構造変化
角田明菜¹、大迫政人¹、近藤孝男^{1,3}、○秋山修志^{1,2,3,4} (¹名大院・理、²JST・PRESTO、³JST・CREST、⁴理研・播磨)
- P-06 三つの色素会合体内での励起エネルギー移動の理論の構築
○木村明洋 (名大院・理・物理)
- P-07 高速溶液混合法を用いたアポミオグロビンのフォールディング機構の研究
○水上琢也¹、榎互介¹ (¹名古屋大学・大学院理学研究科)
- P-08 β2 ミクログロブリンのフォールディング機構と天然状態におけるプロリン異性化反応の解析
○向山厚¹、中村敬¹、真壁幸樹^{1,2}、榎互介¹、後藤佑児³、桑島邦博^{1,2} (¹岡崎統合バイオ、²総研大・物理科学、³阪大・蛋白研)

- P-09 海洋性細菌 *Vibrio alginolyticus* ベン毛モータータンパク質 PomA-FliG 間相互作用の解析
○吉住玲¹、林こころ²、小嶋誠司¹、須藤雄気¹、児嶋長次郎²、本間道夫¹ (¹名古屋大・院理・生命理学、²奈良先端大・バイオ)
- P-10 Proteorhodopsin の色を変える E-F ループの変異体
○山田啓介、川鍋 陽、吉次麻衣子、神取秀樹 (名古屋工業大学)
- P-11 霊長類色覚視物質の赤外分光解析 (口頭とポスター両方の発表)
○片山耕大¹、古谷祐詞^{1,2}、今井啓雄³、神取秀樹¹ (¹名工大・院工、²分子研・生命錯体、³京大・霊長研)
- P-12 板状シリカメソ多孔体細孔中での好熱性シアノバクテリア光化学系 II コア複合体の機能
○野地 智康¹、上滝 千尋¹、川上 恵典²、沈 建仁²、神 哲郎³、伊藤 繁¹ (¹. 名古屋大学大学院理学研究科、². 岡山大学大学院自然科学、³. 産業技術総合研究所 環境化学技術研究部門 高機能ガラスグループ)
- P-13 クロロフィル *d* を持つシアノバクテリア *Acaryochloris marina* の光化学系 I、II のタンパク質分析と分光特性
○山川壽伯¹、佐藤慶彦¹、西田康二¹、奥村小百合¹、菓子野康浩²、伊藤繁¹ (¹名古屋大・理・物質理学、²兵庫県立大・理・生命理学)

ビブリオ属特異的べん毛タンパク質 FlgT が形成する基部体の新規リング構造

○寺島浩行、小池雅文、小嶋誠司、本間道夫

名大・院理・生命理学

要旨：細菌のべん毛は、回転モーターとして機能する運動器官である。海洋性ビブリオ菌のべん毛モーターは、大腸菌のものよりも、およそ 4 倍近い速度(1100rps)で回転することができる驚異的な分子モーターである。べん毛モーターの特性を知るためには、回転力を作り出す部分(固定子)だけでなく、回転する部分(回転子、あるいは基部体)の解析が必要である。我々はこれまでに、回転子であるビブリオ菌べん毛基部体を精製し電子顕微鏡で観察してきた。ビブリオ菌の基部体は、大腸菌とは異なる特徴を持っていた。一つは、T リングと我々が名付けたビブリオ菌固有の構造である(Terashima et al, 2006, Mol Micro)。もう一つは、大腸菌より直径の大きい LP リングである。今回我々は、精製した基部体画分に FlgT というビブリオ菌特異的なタンパク質が含まれることを発見し、*flgT* 欠損変異体の基部体では LP リングが小さくなることを見出した。これらの結果から、FlgT は LP リングの周囲に結合し、リング構造を形成していることが示めされた。これらビブリオ菌特異的な構造が、ビブリオ菌の非常に速い回転速度を安定につくるために重要な役割を持つのかかもしれない。

糖鎖の NMR 構造解析のための新規手法の開発

○山口拓実¹、山本さよこ²、宇野剛²、矢木真穂²、加藤晃一^{1,2}

¹分子研・岡崎統合バイオ、²名市大院薬

糖鎖の生物機能の分子科学的基盤に関する理解を深めるためには、糖鎖及びそのクラスターを対象に、立体構造に関する精密な情報を収集することが不可欠である。私たちはこの目的に向け、NMR による糖鎖の立体構造解析のための新規手法の開発に取り組んでいる。本研究では、常磁性タグによる化学修飾と、小型バイセルを用いた糖鎖集積を活用し、糖鎖の NMR 解析を行った。

糖鎖は核オーバーハウザー効果による距離情報の取得が困難であり、その立体構造解析はこれまで十分になされてこなかった。この問題を解決するために、ランタニドイオンを用いた常磁性タグを糖鎖へ導入した。各種 NMR 測定の結果、常磁性効果を応用することで、水溶液中の糖鎖の立体構造情報が新たに得られることを見出した。一方、糖鎖クラスターの NMR 解析を行うために、糖脂質 GM1 を含有したバイセルの調製を行った。ディスク状の二重膜構造を有し、かつサイズ制御が可能なバイセルを用いることで、GM1 集積体の詳細な NMR 解析に成功した。

イカロドプシン光異性化反応の X 線結晶解析

○村上緑、神山勉 (名古屋大学大学院理学研究科物理学教室)

ロドプシンが担う光情報変換機能の初期過程は、蛋白質内に含む発色団レチナールの 11-cis 型から全トランス型への光異性化反応である。バソ中間体において活性部位レチナールに微小な歪みとして蓄えられたエネルギーが、後に続く光反応サイクルの駆動力となる。我々は、イカロドプシン結晶を用い、バソ中間体形成にともなって活性部位に生じる構造変化を捕捉することを試みた。

ロドプシン結晶に対し低温下でさまざまな光を照射すると、基底状態、バソ中間体と、9-シス型レチナールをもつイソロドプシンの 3 状態間で平衡状態を形成した。適当な波長の光照射下で X 線回折実験を行い、活性部位近傍の電子密度に有意な差が観察された回折データセットを用いて各状態のモデル構築を行った。その結果、ロドプシンからバソ中間体が形成されるとレチナールは全トランス型へ、バソ中間体からイソロドプシンへの遷移では、全トランス型から 9-cis 型へと変化した。

単層 β シート蛋白質の構造形成機構

○真壁幸樹^{1,2}、小出昌平³、桑島邦博^{1,2}

¹岡崎統合バイオ、²総研大・物理科学、³シカゴ大学

要旨

蛋白質の二次構造はポリペプチドの主鎖が持つ特徴的な水素結合パターンによって形成する。この中で、 β シートは β ストランド同士が特異的に並び、平面を形成する構造要素である。 β シートの形成機構を理解することは、球状蛋白質の立体構造形成原理を理解するのに重要なだけでなく、アミロイドのような β シートに富んだ凝集体の理解にも重要である。ボレリア菌由来 Outer Surface Protein A (OspA) は N 末端ドメインと C 末端ドメイン間に単層 β シート (single-layer-beta-sheet; SLB) 領域を持つ。この SLB 領域は β シートの両面が溶媒に露出しており、側鎖はパッキングに関与していないため、 β シートそのものの物理化学的性質を観察できる。我々はこの OspA を β シート研究のモデルシステムとして用いてきた。本講演では、 β シートがどのように形成するのかについて、蛋白質工学に基づいて構築した変異体の結晶構造や急速混合法による巻き戻り反応から研究した例について発表する。

拡張アンサンブル法によるアラニンジペプチドの分子動力学シミュレーション

○奥村久士

分子研、総研大

生体分子など分子動力学シミュレーションを素朴におこなうと、自由エネルギー極小状態にトラップされてしまい多くの構造を探索できない。マルチカノニカル法はこの問題を解消する強力な方法だが、体積を一定に保つため圧力を指定できないし体積変化をとまらなう現象を扱うこともできない。またシミュレーションを始める前に重み因子を決定しなければならないが、大きな系では重み因子を決めるのが難しくなる。これらの問題を解決するため最近2つの方法を提案した。1番目の問題を解決するためにマルチバーリック・マルチサーマル法を提案した。この方法ではエネルギー空間上と体積空間上の両方でランダムウォークを実現し、広い範囲の温度と圧力における定温定圧アンサンブルを得られる。2番目の問題を解決するために部分的マルチカノニカル法を提案した。この方法では重要なエネルギー項だけ広くサンプルするので、重み因子を決定する労力を節約でき、より効率的に構造サンプリングができる。

一般化焼き戻し法によるペプチド系の温度・圧力依存性の研究

○森義治、岡本祐幸

名大・院・理

タンパク質の構造を探る上で圧力は重要となってきた。いくつかのタンパク質は高圧下において変性することが知られている。このような圧力によるタンパク質の変性機構を、コンピュータシミュレーションを用いて解明したい。

このことを実現するためには、系の圧力依存性を正確に計算でき、さらに効率的なシミュレーションを実行するための手法が必要となる。そこでわれわれは、拡張アンサンブル法のひとつである焼き戻し法 (simulated tempering: ST) を定温定圧アンサンブルで行うことができるように拡張し、タンパク質の圧力依存性を計算できるようにした。

この計算方法を水中のペプチド系において適用し、正確かつ効率的なシミュレーションを行うことができることを見出した。また、実際に圧力変性がおこるタンパク質に対してこの方法を適用するつもりであるが、その展望についても述べたいと思う。

既存のタンパク質系力場の改良について

○榮慶丈、岡本祐幸

名古屋大学大学院理学研究科

要旨

タンパク質を対象とした分子シミュレーションでは、AMBER や CHARMM といった古典力学を基にした分子モデルがよく用いられる。この分子モデルでは力場パラメータと呼ばれる、通常小分子の量子化学計算や実験データから決められた複数の定数を必要とする。ところが近年、既存の複数の力場パラメータについて比較をおこなったところ、特に二次構造の形成に関して明らかに異なる傾向をもつことが明らかとなった。

そこで我々は二次構造形成の傾向に深く関与する力場パラメータである主鎖の二面角である ϕ と ψ のエネルギー項に注目し、Protein Data Bank に登録されている複数のタンパク質構造を基に既存の力場パラメータの最適化を試みた。その結果、最適化をおこなった力場の方がペプチドの二次構造形成の傾向について実験で知られている立体構造により近いことが分かった。

ペプチド鎖の非典型的な構造・相互作用に由来する振動スペクトルの特徴に関する理論的解析

○鳥居 肇
静岡大教育

要旨：ペプチド基特有の振動バンドが、ペプチド鎖の構造や分子間相互作用に大きく依存することは、良く知られている。しかし、振動スペクトルの特徴がかなり明らかになっているのは、 α ヘリックスや β シートなど典型的な2次構造や、ペプチド基どうし或いは溶媒水分子との水素結合といった典型的な分子間相互作用の場合であって、その他の構造や相互作用の場合については、未だに知見が乏しい。本研究では、(1) ハロゲン含有分子（阻害剤としての機能をもつものなど）とのハロゲン結合形成に伴う、アミド I モードの特徴の変化、(2) K^+ チャンネル等において、ペプチド基と金属イオンの相互作用により形成される2次構造に由来するアミド I バンドの特徴、の2点について理論的解析を行った。ペプチド以外の系との比較についても述べる。

(6-4) 光回復酵素による DNA 修復の赤外分光観測

○張 宇¹、岩田達也¹、山元淳平²、人見研一^{2,3}、岩井成憲²、藤堂 剛⁴、

Elizabeth D. Getzoff³、神取秀樹¹

¹名工大院工、²阪大院理、³スクリップス研、⁴阪大院医

DNA が紫外線を吸収すると、励起状態からの緩和の過程でしばしば隣り合ったチミン同士が共有結合を形成した CPD または (6-4) 光産物を形成する。これらの DNA 損傷は、細胞のガン化など生命に危険な状態をもたらすため、生成した共有結合を解裂させる種々の酵素を生物は有している。このうち、光回復酵素は青色光を用いて DNA の修復を行う酵素であり、いずれも FAD をクロモフォアとしている。CPD 光回復酵素よりも発見が遅く、より複雑な反応機構を持つ (6-4) 光回復酵素の研究はあまり進んでいない。

今回、Xenopus 由来の (6-4) 光回復酵素に対して赤外分光法を用いて光修復過程における構造変化の解析を試みた。酸化型の酵素は光還元によって DNA 修復能を得るが、これまでの赤外分光に用いられた水和フィルムでは溶液中と同様の光還元が起らなかった。そこで濃縮溶液を用いた測定条件の構築を行い、(6-4) 光産物存在下と非存在下における活性化過程の光誘起差スペクトル（酸化型と還元型の差）を測定することに成功した。さらに光照射波長を最適化することで (6-4) 光産物の光修復に伴う光誘起差スペクトルも得ることができた。興味深いことに、酵素と基質の比を変えて実験したところ、光照射時間依存的に異なるスペクトルが得られたが、これらは酵素と基質の結合に伴う構造変化の情報も含んでいるものと解釈できた。

赤色・緑色光センサータンパク質 AnPixJ の光反応過程の 4 中間状態の低温でのトラップ

○富田祐介¹、福島佳優¹、青木俊¹、宇津巻竜也¹、成川礼²、池内昌彦²、伊藤繁¹

1. 名古屋大学大学院 理学研究科 物質理学専攻

2. 東京大学 大学院総合文化研究科

要旨

AnPixJ はフィコシアノビリンを結合する新種のシアノバクテリオクロムで、*Anabaena (Nostoc) sp. PCC 7120* が持つ水溶性光センサータンパク質である。赤色光照射で、吸収極大を 543 nm に持つ緑色吸収型(Pg)になり、緑色光照射で 648 nm に極大を持つ赤色吸収型(Pr)となる相互変換をする(1)。色素結合 GAF ドメイン (AnPixJ-GAF) の分子量は約 20 kDa で、Pr 状態の結晶構造のみが分かっている(2)。His タグをつけた AnPixJ-GAF をフィコシアノビリン産生大腸菌内に発現させ、Ni アフィニティーカラムにより精製した。反応中間体を詳しく調べるために、77 K で光照射した後、暗所で徐々に温度を上げながら吸収スペクトルを測定し、赤→緑変換の中間状態 2 つ、緑→赤の変換に伴う中間状態 2 つ合計 4 中間状態のトラップに成功し、各状態の低温スペクトルを得た。これらの 4 状態の吸収スペクトルは、室温での時間分解測定で確認されている中間体とほぼ同じであった。これらの結果に基づきこのタンパク質の光変換反応のメカニズムを議論する。

水溶性試薬との反応性と赤外分光による微生物走光性受容体・センサーロドプシン I の構造変化
解析

○入枝泰樹¹、鈴木大介¹、川鍋陽²、本間道夫¹、神取秀樹²、須藤雄気^{1,3}

¹名大・院理・生命理学、²名工大・院工・未来材料、³PRESTO, JST

要旨：微生物には走光性を示すものがある。センサーロドプシン I (SRI) は、共役タンパク質 (HtrI) と正(負)の走光性受容体を形成する。どのような構造変化が、SRI から HtrI への情報伝達時に起こるのだろうか？本研究では、安定な *S. ruber* 由来 SRI-HtrI 複合体を用い、構造変化解析を試みた。活性型 M 中間体の構造変化のインディケーターである Azide 添加により、SRI-HtrI 複合体では M 中間体崩壊速度の上昇がみられたが、SRI 単体ではみられなかった。この結果は負の走光性を仲介する SRII とは逆の効果であった。赤外分光法により構造変化の温度依存性を解析した結果、SRII-HtrII 複合体とは異なり、SRI-HtrI 複合体では温度依存性がみられなかった。以上の結果は、正と負の走光性における逆のシグナル制御機構に対応していると考えられる。

霊長類色覚視物質の赤外分光解析

○片山耕大¹、古谷祐詞^{1,2}、今井啓雄³、神取秀樹¹
(¹名工大・院工、²分子研・生命錯体、³京大・霊長研)

動物は、桿体視細胞に存在する視物質ロドプシンによる薄明視と、錐体視細胞に存在する視物質による色覚という二種類の視覚を持つ^[1]。ヒトを含む霊長類は、吸収極大波長が 30 nm 異なる緑・赤感受性錐体視物質を遺伝子重複により生成したが、桿体視物質ロドプシンと異なり X 線結晶構造も解かれておらず、我々が緑と赤を識別するための構造情報は皆無である。今回我々は、サル¹の錐体視物質を培養細胞により発現し、低温赤外分光法を用いた構造解析を開始した。培養細胞から得られる錐体視物質の発現量はロドプシンと比較してわずかであるが、77 K における Batho 中間体との光可逆性を利用することで高精度のスペクトルを測定することが可能となる。重水水和した光誘起差スペクトルの X-H, X-D 伸縮振動領域からは、レチナール近傍の水素結合ネットワークに関する情報を得ることができる。本発表では、サル緑・赤感受性視物質に対して中赤外の全波数領域において、初めて測定できたスペクトルを報告する^[2]。特に緑・赤感受性視物質間で確認された水分子を含む水素結合ネットワークの違い^[3]から、視物質の内部結合水が波長制御に關与する可能性について議論したい。

[1] Y. Shichida, H. Imai (1998) *Cell. Mol. Life Sci.* 54, 1299-1315.

[2] K. Katayama, Y. Furutani, H. Imai, H. Kandori (2010) *Angew. Chem. Int. Ed.* 49, 891-894.

[3] K. Katayama, Y. Furutani, H. Imai, H. Kandori, manuscript in preparation.

相同蛋白質のフォールディング機構：ヤギ α -ラクトアルブミンとイヌミルクリゾチームの比較研究

○中村敬¹、真壁幸樹^{1,2}、友寄克亮³、榎互介¹、向山厚¹、桑島邦博^{1,2}

¹岡崎統合バイオ、²総研大・物理科学、³東京大学大学院・理・物理

要旨： α ラクトアルブミンとリゾチームは互いにアミノ酸配列の類似した相同蛋白質であり、それらのフォールディング経路が進化的に保存されているか否かを明らかにすることは、蛋白質のフォールディング問題を考える上で重要である。

我々は、ヤギ α ラクトアルブミン (GLA) のフォールディング反応の速度論的解析を行い、以前に研究されたイヌ乳リゾチーム (CML) の結果と比較した。GLA は Ca^{2+} 存在下では非存在下と比べて巻き戻り速度は 104 倍速くなるが、変性速度は Ca^{2+} の有無にあまり依存しない。一方、CML の巻き戻り速度は Ca^{2+} の存在・非存在でほとんど変わらないが、変性速度は Ca^{2+} 非存在下では存在下に比べて 1000 倍以上速い。また、水素/重水素交換 NMR から GLA は C-ヘリックス、CML は A、B-ヘリックスが巻き戻り中間体中で構造化していることがわかった。これらの実験から GLA と CML は互いに相同で立体構造も類似しているがフォールディング経路が異なることが明らかになった。

このフォールディング経路の違いを考察するために、天然状態の GLA 及び CML について、それぞれ全原子-全原子間の距離を計算し、相互作用の密度を調べた。GLA では C-ヘリックスと β ドメイン間、CML では A、B-ヘリックスと D-ヘリックス及び C 末端間に相互作用密度の高い領域があった。この天然立体構造中の相互作用高密度領域の分布の違いが GLA 及び CML のフォールディング経路の違いをもたらしていると推察される。また、これら相互作用高密度領域には高い割合で芳香族側鎖を持つアミノ酸残基 (Trp, Tyr) が含まれていた。これらと相互作用しているアミノ酸残基も嵩高くて疎水的な側鎖を持つアミノ酸残基 (Phe, Ile, Val) や嵩高く極性側鎖を持つアミノ酸残基 (Gln, Asn, Glu, His, Lys) であった。これらのアミノ酸残基と芳香族側鎖を持つアミノ酸残基間の疎水相互作用や水素結合が、GLA と CML のフォールディング経路を決定するのに重要な役割を果たしていると考えられる。

A potassium switch of ATP-induced GroEL conformational changes

○Chen Jin, Koki Makabe, Kunihiro Kuwajima

*Okazaki Institute for Integrative Bioscience and Institute for Molecular Science,
Myodaiji, Okazaki, Aichi 444-8787, Japan,*

*Department of Functional Molecular Science, the Graduate University for Advanced Studies
(Sokendai), Myodaiji, Okazaki, Aichi 444-8787, Japan*

E-mail: kuwajima@ims.ac.jp (K. Kuwajima)

Bacterial chaperonin GroEL utilizes the co-chaperone GroES to assist folding of cellular proteins in an ATP-dependent manner. An ATP-induced allosteric communication through GroEL double rings is prerequisite for the overall chaperonin cycle. It has been shown by Horovitz et.al. (1995) that ATP-induced allosteric transitions of GroEL consist of two phases with one at relatively low ATP concentrations ($\leq 100 \mu\text{M}$) and the second at higher concentrations of ATP with a midpoint in the range of 16 to 160 μM . Here we studied the effect of essential metal cofactor, potassium ion, on the ATP-driven allosteric transitions of GroEL by using a tryptophan mutated GroEL. Within the test range of potassium concentration, two distinct patterns of ATP-induced allosteric transitions were observed. We showed that at 50 mM potassium concentration, a remarkable increasing second-phase of ATP-induced allosteric transition was observed which is contrary to the decreasing phase at 10 mM potassium concentration.

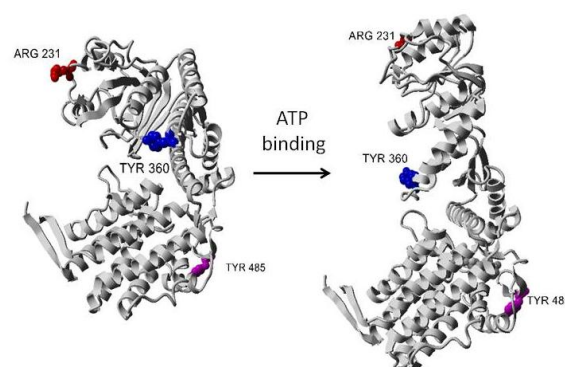


Fig. 1 ATP induced allosteric transition of GroEL.

References

- [1] Yifrach O, Horovitz A. Nested cooperativity in the ATPase activity of the oligomeric chaperonin GroEL. *Biochemistry*. 1995 , 34(16):5303-8.
- [2] Inobe T, Kuwajima K. Phi value analysis of an allosteric transition of GroEL based on a single-pathway model . *J. Mol. Biol.* 2004, 339(1): 199-205.
- [3] Poso D, Clarke AR, Burston SG. A kinetic analysis of the nucleotide-induced allosteric transitions in a single-ring mutant of GroEL. *J. Mol. Biol.* 2004, 338(5):969-77.

蛍光寿命測定による蛋白質フォールディングダイナミクスの観察

○木村哲就^{1,*}、Harry B. Gray¹、Jay R. Winkler¹

¹カリフォルニア工科大・ベックマン研、[#]分子研、^{*}総研大・物理科学

要旨：蛋白質フォールディングの分子機構を理解するためには、変性状態にあつて多様な構造を取り得るポリペプチド鎖が、均一性をもった天然状態構造をどのようにして獲得するのかを少なくともアミノ酸レベルで明らかにする必要がある。そこで我々は蛍光寿命測定から得られる蛍光エネルギー移動の情報をもとに、『ポリペプチド鎖の不均一性』と、構造を反映する『エネルギー供与体・受容体間の距離』を同時に得ることを試みた。4つのヘリックスから構成される ACBP という蛋白質について、供与体・受容体ペアを異なる位置に標識した変異体を複数用意することで構造変化を詳細に検討することを可能にした。さらに溶液混合装置を利用することで、ACBP のフォールディング反応を初期段階から追跡した。本発表では蛋白質フォールディングの実験と理論の比較も含めて議論する予定である。

([#]は現所属)

P-01

制がん性白金二核錯体が長鎖 DNA の持続長と folding の連続性におよぼす効果

○秋田谷 龍男¹、中井 唱²、佐藤 卓史³、神戸 俊夫⁴、村田 静昭⁵、吉川 研一⁶

¹名城大薬、²鳥取大院工、³大阪薬大薬、⁴名大院医、⁵名大院環、⁶京大院理

Antitumor dinuclear platinum(II) complex AMPZ was delivered from cisplatin, one of the most widely used antitumor drug, to improve pharmacological properties and a broader spectrum of activity to tumor. Most of studies on DNA-Ampz interactions have been performed at the level of nucleotide bases or DNA oligomers in terms of covalent bond formation. However, little attention has been paid to the higher order conformational changes of long (over several tens of kbps) DNA or non-covalent interactions. We have investigated the higher order structure of bacteriophage T4 genomic DNA (166 kbp) induced by AMPZ through single giant DNA observations using fluorescence microscopy, atomic force microscopy and transmission electron microscopy. We have demonstrated that AMPZ induced folding of T4 DNA, reduced persistent length and discreteness in folding of a single T4 DNA chain. These properties are firstly shown for the interaction of antitumor platinum compound to DNA.

P-02

血液凝固因子欠乏症の原因遺伝子産物間の協働的相互作用の構造基盤

○西尾美穂^{1,2}, 神谷由紀子^{1,2}, 水島恒裕¹, 若槻壮市³, 山本一夫⁴, 内山 進⁵, 野田勝紀⁵, 加藤晃一^{1,2,6,7}

(¹名市大・院薬, ²統合バイオ, ³高エネ研, ⁴東大, ⁵阪大, ⁶グライエンス, ⁷お茶大)

ERGIC-53 と MCFD2 は複合体を形成することによって糖タンパク質である血液凝固第V・第VIII因子の細胞内輸送を司る分子装置として機能している。ERGIC-53 は糖鎖を認識するレクチン活性を有する膜タンパク質である。一方、MCFD2 は EF ハンド構造を有する Ca²⁺結合型タンパク質である。本研究では ERGIC-53 と MCFD2 の複合体による血液凝固因子の輸送機構を明らかとするため、X 線結晶構造解析、超遠心解析、NMR 解析を駆使してこれら 2 つのタンパク質の複合体の 3 次元構造解析を決定した。興味深いことに MCFD2 における ERGIC-53 との相互作用部位は EF ハンドタンパク質に共通するリガンド結合部位とは異なっていた。さらに ERGIC-53 が結合することによって MCFD2 に立体構造変化が誘起されることも判明した。こうした構造変化を通じて MCFD2 は血液凝固因子に対する結合能を新たに獲得する可能性が示唆された。以上の結果に基づいて ERGIC-53 と MCFD2 による協働的な血液凝固因子の輸送機構とその破綻がもたらす疾患発症の構造基盤について議論する。

NMR 法による分子シャペロン Hsp47 とコラーゲンの相互作用解析

○良川須美^{1, 2}、矢木真穂^{1, 2}、山口芳樹^{1, 3}、栗本英治^{1, 4}、石田義人⁵、本間貴之⁵、寶関淳⁵、西川良美⁶、小出隆規⁷、永田和宏⁵、加藤晃一^{1, 2}

(名市大・院薬¹、自然科学研究機構・統合バイオ²、理研³、名城大・薬⁴、京大・再生研⁵、新潟薬大・薬⁶、早大・先進理工⁷)

Hsp47 はセルピンファミリーに属する分子シャペロンであり、小胞体内腔においてプロコラーゲンに特異的に結合し、そのアッセンブリーを補助することが報告されている。Hsp47 遺伝子のホモ欠損マウスは種々のコラーゲン異常を示し、胎生致死となることから、Hsp47 はコラーゲンの正常な成熟に必須であると考えられている。しかしながら、コラーゲンとの相互作用様式やシャペロン機能の発現メカニズム等、Hsp47 の作動機構の実体に関しては未だ不明な点が多い。本研究では Hsp47 とコラーゲンとの相互作用様式を解明するために、NMR 法を用いて Hsp47 上のコラーゲン結合部位を同定することを試みた。

まず、大腸菌発現系を用いて ¹⁵N で安定同位体標識を施したニワトリ Hsp47 を大量調製し NMR 測定を行った。さらに Hsp47 が結合すると報告されている Gly-Pro-Arg 配列を 1 箇所だけ含む 3 本鎖コラーゲンペプチドを化学的に合成し、Hsp47 に添加して NMR 計測を行った。その結果、コラーゲンペプチド添加に伴い Hsp47 の ¹H-¹⁵N HSQC スペクトルは明確に変化し、いくつかのシグナルに化学シフト変化もしくはシグナルの広幅化が観測された。そこで、特に大きな化学シフト変化がみとめられたトリプトファンとヒスチジンに着目して、アミノ酸選択的標識法と部位特異的変異体を組み合わせて帰属を行った。その結果、コラーゲンは Hsp47 の立体構造モデル上の長いループが隣接した・ストランドに富む領域に結合することが初めて明らかとなった。

X線小角散乱に用いる分子量標準タンパク質の品質管理

○秋山修志^{1,2,3}¹名大院・理, ²JST・PRESTO, ³理研・播磨

生体高分子の形状を水溶液中で検証する際、X線小角散乱は強力な分析手段となる。測定から見積もられる量に原点散乱強度 ($I(0)$) があるが、これを試料濃度 (g/l) について規格化した量 ($I(0)/c$) は重量平均分子量に比例するという性質を持つ。ゲルろ過クロマトグラフィーにおける溶出位置などと異なり、 $I(0)/c$ は対象分子の形状因子に依存しない分子量推定を可能とする。

実験手法としては、「分子量既知の標準タンパク質」と「分子量未知の対象タンパク質」について各々 $I(0)/c$ を記録し、「 $I(0)/c \propto$ 分子量」の関係式から未知タンパク質の分子量を決定するのが一般的である。分子量を定量的に見積もるためには、標準タンパク質を単分散状態で調製し、かつその濃度を精度よく定量する必要がある。本発表では、汎用性の高い標準タンパク質についてX線小角散乱や流体力学的諸性質を検証し、 $I(0)/c$ による分子量推定の限界や標準タンパク質の品質管理について議論する (*J. Appl. Cryst.* 2010. **43**, 237-243)。

時計タンパク質 KaiC の ATPase やリン酸化に依存した構造変化

角田明菜¹, 大迫政人¹, 近藤孝男^{1,3}, 〇秋山修志^{1,2,3,4}

¹名大院・理, ²JST・PRESTO, ³JST・CREST, ⁴理研・播磨

シアノバクテリアの生物時計は3種類の Kai タンパク質 (KaiA, KaiB, KaiC) で構成される。KaiC は時計の振り子の役割を担い, KaiA や KaiB との相互作用を通して状態を変化させる。KaiA が KaiC のリン酸化を促すのに対し, KaiB は KaiA を抑制することで KaiC の脱リン酸化を促す。3つの Kai タンパク質と ATP を混合すると, KaiC はリン酸化型と脱リン酸化型の間を 24 時間周期で往来する。

近年, リン酸化サイクルの周期が KaiC の ATPase 活性と相関することが示された。これは「周期を規定する ATPase」と「リン酸化」という2つの生化学反応が, KaiC というタンパク質構造の枠組み内でクロストークし, 互いに制御し合っていることを示す。KaiC については既に X線結晶構造が報告されているが, 静的な構造情報のみを頼りに, 動的な制御関係を読み解くことは不可能である。本発表では, X線小角散乱を始めとする各種分光法を用いて, ATPase やリン酸化に依存した KaiC の構造変化について検証した結果を紹介する。

三つの色素会合体内部での励起エネルギー移動の理論の構築

○木村明洋

名大院・理・物理

要旨：現在までに光合成アンテナ系の3次元構造は幾つか報告されており、内部に持つ色素の配置の仕方は様々である。色素間の励起エネルギー移動相互作用が十分に弱い極限では、その色素間の励起エネルギー移動速度はフェルスターの速度式を用いて表すことができる。一方、相互作用が強い極限では励起エネルギーがその色素会合体内部で非局在化し励起子状態を作る。二つの色素会合体の間の励起エネルギー移動速度はフェルスターの速度式を一般化したもので表わされる。我々は二つの色素会合体（ドナーとアクセプター）の間の距離が十分に離れており、その間を、それ以外の色素（もしくは色素会合体であるメディエーター）が仲介している場合の励起エネルギー移動の速度式の導出を試みた。特に励起エネルギー移動中のメディエーターでの励起状態が緩和を起こさない場合、つまり超交換機構の場合、その速度式は一般化されたフェルスターの速度式を修正した形で表わされる。

高速溶液混合法を用いたアポミオグロビンのフォールディング機構の研究

○水上琢也¹、槇互介¹¹名古屋大学・大学院理学研究科

要旨：アポミオグロビンは、フォールディング反応初期に蓄積する中間体 I から、ミオグロビンと類似の構造をもつ天然状態へとフォールディングすることが知られている。中間体 I は、穏和な変性条件下で蓄積する平衡論的中间体 I_{eq} と類似していることが知られている。

本研究では、ウマアポミオグロビンの安定性とフォールディング速度論の尿素濃度依存性を系統的に検討し、この蛋白質のフォールディング機構を探索した。pH 6.0、8 °C の平衡条件下において、尿素濃度 ~ 1.3 M で平衡論的中间体 I_{eq} を蓄積した。溶液混合法を用いた酸変性状態からのリフォールディング反応においては、混合装置の不感時間内に中間体 I' が過渡的に蓄積し、反応開始後 ~ 100 μ s の時間領域で中間体 I が蓄積することが示唆された。天然状態から尿素変性状態へのアンフォールディング反応には中間体の過渡的な蓄積は認められなかった。アンフォールディング反応速度定数の尿素濃度依存性から天然様の中間体 M の存在が示唆された。アポミオグロビンのフォールディングは、ほどけた状態 $\leftrightarrow I' \leftrightarrow I \leftrightarrow M \leftrightarrow$ 天然状態の 5 状態モデルを用いて説明することができた。平衡論的中间体 I_{eq} は、中間体 I を含むことが強く示唆された。

P-08

β2 ミクログロブリンのフォールディング機構と天然状態におけるプロリン異性化反応の解析

○向山厚¹、中村敬¹、真壁幸樹^{1,2}、榎互介¹、後藤佑児³、桑島邦博^{1,2}

¹岡崎統合バイオ、²総研大・物理科学、³阪大・蛋白研

要旨

β2 ミクログロブリン (β2m) は透析アミロイドーシスの原因蛋白質である。これまでの研究から約 50 倍程度の血中濃度の上昇が生体内における線維形成の主な要因であると考えられているが、まだ不明な点が多い。今回我々はβ2m のフォールディング機構を調べ、アミロイド線維形成に関する新たな知見を得ることを目的とした。蛍光を指標とし、ストップトフロー法を用いた解析、および実時間 NMR スペクトル測定の結果から、天然条件下においてプロリンの異性化に起因する二つの分子種が存在することが明らかとなった。今回の結果は天然条件下において、これら二つの分子種が存在することが生体内においてβ2m が他の蛋白質に比べて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。

P-09

海洋性細菌 *Vibrio alginolyticus* ベン毛モータータンパク質 PomA-FliG 間相互作用の解析

○吉住玲¹、林こころ²、小嶋誠司¹、須藤雄気¹、児嶋長次郎²、本間道夫¹

¹名古屋大・院理・生命理学、²奈良先端大・バイオ

【目的】 細菌は、運動器官であるベン毛を使って生育により好ましい場所へ移動する。ベン毛の回転エネルギーはイオンの流入により得られるが、イオン流入の経路やモーター回転のメカニズムは解明されていない。本研究では *Vibrio alginolyticus* のベン毛の回転力発生機構を明らかにすることを目的とし、固定子 PomA/B-回転子 FliG の相互作用を測定した。

【結果】 FliG 及び PomA-Loop の大量発現系を構築し、これらを用いて Pull-down Assay、NMR による解析を行ったところ、相互作用を検出することができた。さらに、PomAPotB を発現する大腸菌株において、PomA-Loop を過剰発現させると運動能の阻害が見られた。これは vivo において PomA-Loop が FliG と相互作用することを示唆している。本研究では、これまで明らかとなっていなかった PomA-FliG の相互作用を in vivo、in vitro 両方で、初めて検出することができた。

Proteorhodopsin の色を変える E-F ループの変異体

○山田啓介、川鍋 陽、吉次麻衣子、神取秀樹

(名古屋工業大学)

ロドプシンの波長制御機構は未だによく理解されていないが、レチナール近傍のアミノ酸が色を決めるというのがこれまでの常識であった。しかし我々は最近、海洋性バクテリアに存在するプロテオロドプシン (PR) の A178R 変異体において、中性で吸収極大が 20 nm 長波長シフトするのを発見した [1]。さらにシッフ塩基の対イオンの pKa においても上昇が見られた。Ala178 は細胞質側の E-F ループに存在し、レチナールから 25 Å も離れているため、そのメカニズムは興味深い。対応する部位のバクテリオロドプシン変異体 (M163R) では全く色が変わらなかったことから、観測された変異体効果は PR に特徴的であることがわかった [2]。この色の変化は 178 位において特異的に見られたことから [2]、今回 Ala178 を他の 19 種類のアミノ酸へと置換し、吸収波長やシッフ塩基の対イオンの pKa を調べた [3]。その結果、ほぼ全ての変異体において吸収極大の長波長シフトと pKa の上昇が観測された。Ala は最も個性のないアミノ酸と考えられがちだが、海洋中に存在している PR の色を青色側に保持するためには 178 位が Ala であることに意味があるのかもしれない。

[1] Yoshitsugu et al. *Angew. Chem. Int. Ed.* **47**, 3923 (2008).

[2] Yoshitsugu et al. *Biochemistry* **48**, 4324 (2009).

[3] Yamada et al. *Biochemistry*, in press (2010).

P-12

板状シリカメソ多孔体細孔中での好熱性シアノバクテリア光化学系 II コア複合体の機能

○野地智康¹、上滝千尋¹、川上恵典²、沈建仁²、神哲郎³、伊藤繁¹

¹. 名古屋大学大学院理学研究科、

². 岡山大学大学院自然科学、

³. 産業技術総合研究所 環境化学技術研究部門 高機能ガラスグループ

要旨

シリカメソ多孔体は内部にナノサイズの細孔を大量に持つ粉末状の無機素材である。我々はこれまでに、精製された紅色光合成細菌 *T. tepidum* のアンテナタンパク質 LH II をタンパク質サイズに適合した細孔内径をもつシリカメソ多孔体に導入する方法を開発した。LH II は細孔内で活性を保ち、より高い熱耐性を示した。さらに我々は、精製した好熱性シアノバクテリア *Thermosynechococcus vulcanus* 由来の光化学系 II (PSII) コア複合体 (分子量 756 kDa) がシリカメソ細孔内部へ吸着した事を示し、熱耐性を維持したまま細孔内部の PSII が酸素発生する事を示した。

本研究では、新素材の板状シリカメソ多孔体へ PSII を吸着させた。この素材は透明で粉末状のものとは異なり、可視領域の光を散乱させない特徴を持つ。吸着した PSII の吸収、蛍光スペクトルは変化せず、PSII の構造は維持されている事が示唆された。共焦点レーザー顕微鏡により、板状シリカメソ多孔体内部の PSII の分布を可視化した。板状シリカメソ多孔体内に吸着した PSII の活性を議論する。

クロロフィル *d*を持つシアノバクテリア *Acaryochloris marina* の

光化学系 I、II のタンパク質分析と分光特性

○山川壽伯¹、佐藤慶彦¹、西田康二¹、奥村小百合¹、菓子野康浩²、伊藤繁¹

(¹名古屋大・理・物質理学、²兵庫県立大・理・生命理学)

酸素発生型の光合成反応にはクロロフィル *a* が必須であると長らく思われてきた。しかし近年、クロロフィル *d* を主要色素に持つシアノバクテリア *Acaryochloris marina* が発見され、より低いエネルギーレベルで酸素発生を行う光合成反応中心の存在が明らかになった。

本研究では、*Acaryochloris marina* の細胞からチラコイド膜標品を単離し、さらに Clear Native-PAGE によって光化学系 I、II を分画してタンパク質分析を行った。また各分画成分の吸収スペクトル、定常蛍光スペクトル、ピコ秒時間分解蛍光スペクトル測定を行い、分光特性と励起エネルギー移動過程を解析した。また、細胞のパルス変調蛍光測定により光化学系 II 反応中心の電荷分離反応初期過程のエネルギーレベルを見積もった。