



業績紹介：サイボーグ超分子を使って病因として知られる  
凝集性タンパク質認識の観測に成功

“Self-Assembled Spherical Complex Displaying a Gangliosidic Glycan Cluster Capable of  
Interacting with Amyloidogenic Proteins”

Sota Sato, Yutaka Yoshimasa, Daishi Fujita, Maho Yagi-Utsumi,

Takumi Yamaguchi, Koichi Kato, and Makoto Fujita

Angew. Chem. Int. Ed., in press, (2015), DOI: 10.1002/anie.201501981R1

佐藤宗太

(東北大学 WPI-AIMR・  
A02 計画研究代表者)

加藤晃一

(自然科学研究機構  
岡崎統合 バイオサイエンスセンター・  
A03 計画研究代表者)



アルツハイマー病やパーキンソン病など神経変性疾患の発症の引き金となるのは、神経細胞膜の上で高密度に集まってクラスター化した糖脂質が、凝集性タンパク質を捕まえる現象であることがわかりつつある。アルツハイマー病に関わる凝集性タンパク質アミロイドβは、神経系に豊富に存在する糖脂質である GM1 ガングリオシドのクラスターによって認識され、選択的に補足される。その後、タンパク質の構造変性と凝集を経て、アミロイド線維が成長することが知られている。これまでの研究において、認識されたタンパク質は、疎水性の細胞膜中に折りたたんで埋め込まれることがわかってきており、この構造変化を受けたタンパク質が核となってアミロイド線維が成長していくことが明らかになっている。しかし、GM1 の糖鎖部分が、どのようにして選択的にアミロイドβを認識するのか、その機構の詳細は、糖鎖クラスターの良いモデルがないためにわかっていなかった。

今回、有機配位子分子と遷移金属イオンとの自己組織化によって形成される、球状の巨大自己組織化分子に、生体由来の GM1 ガングリオシドの糖鎖部分をハイブリッド化する手法を使い、サイボーグ超分子を構築した (図 1)。ガングリオシド GM1 の疎水性脂肪鎖を切り取ることで、凝集性タンパク質が捕捉されてしまう

疎水性部位がない糖鎖クラスターをうみだすことができた。このような分子設計により、糖鎖の数や位置・表面の曲率といった構造が厳密に制御された、24 個の GM1 糖鎖からなるクラスターをつくりだした。この糖鎖クラスターをアミロイドβタンパク質と混合し、NMR による解析を行ったところ、タンパク質の N 末端を選択的に認識する様相が明らかになった。また、パーキンソン病に関わるα-シヌクレインに対しても同様の解析によって、認識の様相を分子レベルで詳細に解明できることがわかった。GM1 糖鎖部位がタンパク質を認識する、病因の最初の段階を初めて観測することができた。

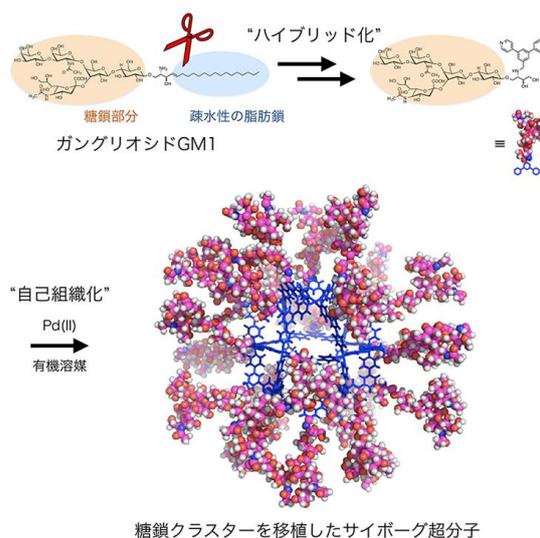


図 1: ガングリオシド GM1 の疎水性脂肪鎖を切断して配位子に連結した後に、Pd(II)イオンとの自己組織化によりサイボーグ超分子を調製した。



業績紹介 : Toll 様受容体 9 による微生物由来 DNA の認識機構の解明

" Structural basis of CpG and inhibitory DNA recognition by Toll-like receptor 9. "

Umeharu Ohto, Takuma Shibata, Hiromi Tanji, H., Hanako Ishida, Elena Krayukhina, Susumu Uchiyama, Kensuke Miyake, and Toshiyuki Shimizu

*Nature*, **520**, (7549), 702-705, (2015), DOI: [10.1038/nature14138](https://doi.org/10.1038/nature14138)

内山 進

(大阪大学大学院工学研究科、自然科学研究機構岡崎統合バイオサイエンスセンター・A03 公募研究代表者)



細菌やウイルスなどの病原体に対する感染防御機構として、ヒトの体には自然免疫機構が備わっており、TLR 受容体が重要な役割を担っている。DNA 配列のうち、CpG モチーフは哺乳類ではメチル化されることが多いのに対して、細菌やウイルスではメチル化されない。微生物由来の非メチル化 CpG モチーフは TLR9 を強く活性化してインターフェロンなどの産生を促し、抗ウイルス反応などを引き起こす。このため、TLR9 はウイルス感染やアレルギーに対する治療薬やワクチンのアジュバントなどの標的として注目されている。

今回、TLR9 による DNA 配列の認識機構と分子間相互作用状態を明らかにするため、TLR9 の細胞外領域を大量に調製、結晶化し、DNA 配列が結合していない TLR9、CpG モチーフを有する DNA 配列が結合した TLR9、その機能を阻害する DNA 配列 (アンタゴニスト DNA 配列) が結合した TLR9、の 3 つの状態の結晶構造を 1.6~2.8 Å の分解能で明らかにした。

構造解析の結果、TLR9 と CpG モチーフは 2 対 2 の比率で複合体を形成しており、TLR9 は 2 分子が結合して (2 量体構造) 活性化型の m 字型の構造をなしていた。CpG モチーフは TLR9 の N 末端側に存在する溝にはまり込んで結合しており、その周辺のアミノ酸残基と特徴的な相互作用を形成していた。CpG モチーフは伸びた形で 2 分子の TLR9 に挟まれることで TLR9 の 2 量体を安定化させていた。超遠心分析により 2 量体化の際の解離定数を決定したところ、 $20 \mu\text{M}$  と比較的弱い相互作用であることが明らかとなった。

一方で、TLR9 とアンタゴニスト DNA は 1 対 1 の比率で複合体を形成しており、超遠心分析でも 2 量体化は確認されなかった。構造面では、アンタゴニスト DNA は TLR9 の馬蹄型構造の内側にコンパクトなループ構造を作って結合しており、アンタゴニスト DNA は CpG モチーフよりも TLR9 に強力に結合していた。なお、それらの TLR9 上の結合部位は一部重なっていることから、アンタゴニスト DNA は CpG モチーフの結合を物理的に阻害することによって、TLR9 の機能を阻害していることが分かった。

本研究により、TLR9 を活性化するまたは不活性化 DNA 配列との結合様式と 2 量体化機構が分かったことで、ワクチンアジュバントやウイルス感染やアレルギーなどの治療薬の開発が進展するものと期待される。

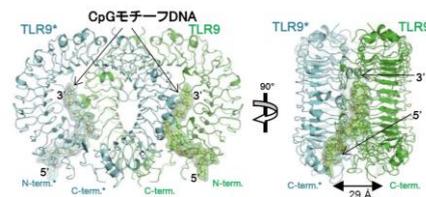


図 1 : CpG モチーフを有する DNA 配列と TLR9 との結合様式。

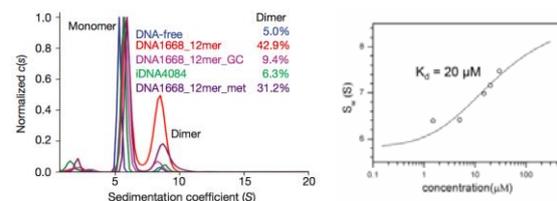


図 2 : 超遠心分析により 2 量体化が確認され、その解離定数は  $20 \mu\text{M}$  であった。



業績紹介：内分泌攪乱を引き起こす有機スズ化合物と核内受容体 PPAR $\gamma$  の相互作用基盤の解明

" Structural Basis for PPAR $\gamma$  Transactivation by Endocrine Disrupting Organotin Compounds. "

Shusaku Harada, Youhei Hiromori, Shota Nakamura, Kazuki Kawahara, Shunsuke Fukakusa, Takahiro Maruno, Masanori Noda, Susumu Uchiyama, Kiichi Fukui, Junichi Nishikawa, Hisamitsu Nagase, Yuji Kobayashi, Takuya Yoshida, Tadayasu Ohkubo, Tsuyoshi Nakanishi

*Sci. Rep.* **5**, 8520, (2015) DOI:10.1038/srep08520

内山 進

(大阪大学大学院工学研究科、自然科学研究機構岡崎統合バイオサイエンスセンター・A03 公募研究代表者)



有機スズ化合物であるトリブチルチン (TBT) やトリフェニルチン (TPT) は、漁網、船舶、等に海洋生物が付着するのを防ぐための防汚塗料として広く利用されてきた。ところがこれらの化合物はいわゆる内分泌攪乱物質であることが分かかってきており、実際、巻貝の雌が雄性化する現象が報告されている。内分泌攪乱作用の標的としては核内受容体が考えられ、le Maireらのグループは TBT が核内受容体である RXR のリガンド結合ドメイン (RXRLDB) と共有結合性の相互作用により結合し、RXRLDB の構造変化を引き起こすことを報告している。今回、我々は核内受容体として広く知られている PPAR $\gamma$  と TBT および TPT との相互作用について、PPAR $\gamma$  のリガンド結合ドメイン (PPAR $\gamma$  LBD) に関する結晶構造解析、複合体質量分析、活性測定を行い、幾つかの新たな知見を得た。

PPAR $\gamma$  LBD と TBT および PPAR $\gamma$  と TPT の複合体の結晶構造を、それぞれ 1.95 Å と 1.89 Å の分解能で決定した。いずれのスズ化合物も PPAR $\gamma$  LBD のリガンド結合ポケットに結合していたが、結合に伴ってヘリックス 12 に構造変化が起きており、コファクターのリクルートが示唆された。また、TBT や TPT のスズ原子の近傍には Cys 残基の硫黄原子が位置していたが、硫黄原子とスズ原子の距離は、2.74 Å であり、この距離からは PPAR $\gamma$  LBD とスズ化合物の結合は、RXRLDB の例とは異なり、非共有結合である可能性が示唆された。そこで、結合様式の解明のため複合体質

量分析を行った。その結果、PPAR $\gamma$  LBD-TPT 複体のシングルピークが得られた。さらにイオン化の加速電圧を上昇させ、スズ化合物が複合体から解離するか検証したところ、いずれの条件でもスズ化合物の解離は観測されなかった。この結果から相互作用は極めて安定であることが分かった。しかしながら、複合体を含む溶液にギ酸を添加し PPAR $\gamma$  LBD を変性させたところスズ化合物と PPAR $\gamma$  LBD のピークが別々に観測された。さらに、複合体を含む溶液を HPLC-LC-MS にて分析したところ、PPAR $\gamma$  LBD 単体が観測され、スズ化合物が結合した PPAR $\gamma$  LBD は検出されなかった。以上の結果から、スズ化合物と PPAR $\gamma$  の結合は安定ではあるものの、非共有結合により相互作用していることが明らかとなった。また、以上の結果は、細胞を用いた実験で TPT や TBT が PPAR $\gamma$  のアゴニストとして機能する結果を支持しているといえる。なお、過去の報告の検証のため、RXRLDB についても測定を行ったところ、過去の報告と異なり、RXRLDB もスズ化合物と非共有結合により相互作用していることが明らかとなった。

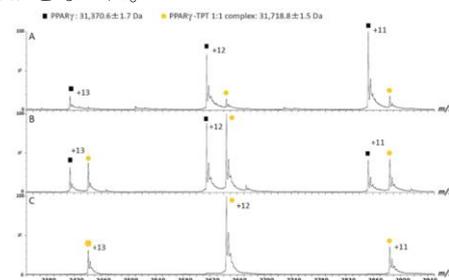


図 1：複合体質量分析の結果、PPAR $\gamma$  LBD と TPT が非共有結合性により相互作用することが見出された。



業績紹介：血管内皮細胞の力覚応答に関わる Rho-GEF の同定と機能解析

“Rho Guanine Nucleotide Exchange Factors Involved in Cyclic-stretch-induced Reorientation of Vascular Endothelial Cells”

Hiyori Abiko, Sachiko Fujiwara, Kazumasa Ohashi, Ryuichi Hiattari, Toshiya Mashiko, Naoya Sakamoto, Masaaki Sato, and Kensaku Mizuno

*Journal of Cell Science*, **128**, 1683-1695, (2015) DOI: [10.1242/jcs.157503](https://doi.org/10.1242/jcs.157503)

水野健作

(東北大学大学院生命科学  
研究科・A03 公募研究代表  
者)



組織を構成する細胞は、外環境からの機械的な刺激に  
応答して、生体の恒常性の維持や形態形成に寄与し  
ている。血管内皮細胞は、一層の細胞層として血管内  
の表層を覆う細胞であり、血流によるずり応力や心臓  
の拍動や血圧の変化による繰り返し伸展などの機械的  
な力の作用を常に受け、これらの機械的な刺激に適切  
に応答すること（力覚応答）で血管機能の動的秩序の  
維持に貢献している。その応答の一つとして、血管内  
皮細胞は、細胞の長軸とストレスファイバーを血流の  
流れと平行に、また、繰り返し伸展の伸展方向と垂直  
に配向することが知られている（図1）。これらの応答  
においてアクチン骨格の再構築は重要なステップの一  
つであるが、血管内皮細胞が機械的力の作用をどのよ  
うに細胞内の化学的なシグナルに変換し、アクチン骨  
格を再構築しているかは不明な点が多く残されている。  
私たちは、血管内皮細胞の力覚応答によるアクチン骨  
格の再構築の鍵となる低分子量Gタンパク質Rhoファミ  
リーの活性化因子である GTP-GDP 交換因子  
(Rho-GEF)の網羅的な探索を行った。ヒト臍帯静脈血  
管内皮細胞において63種類のDblファミリーに属する  
Rho-GEFの発現抑制を行い、繰り返し伸展刺激による  
細胞の配向に対する影響を解析した。その結果、繰り  
返し伸展刺激による細胞とアクチンストレスファイ  
バーの配向に寄与する11種類のRho-GEFを同定する  
ことに成功した（図2）。得られた11種類のRho-GEF  
の中で、RhoA/RhoCのGEFとして働き、ゼブラフィッ  
シュの発生において原腸陥入に関与することが報告さ

れているSoloに注目し、さらに研究を進めた。繰り返  
し伸展刺激によって細胞が配向する過程において、細  
胞間接着、又は、細胞-基質間接着のどちらのシグナル  
によってSoloが関与するかを検討した結果、Soloはカ  
ドヘリンに依存した細胞間接着からのシグナルによる  
細胞の配向に主に寄与することが明らかになった。さら  
に、カドヘリンの細胞外ドメインをコートした磁気  
ビーズを細胞に接着させ、磁気によって細胞に張力を  
負荷するとRhoAが活性化されたが、Soloの発現抑制は  
有意にその活性化を抑制することが明らかとなった。  
これらの結果から、Soloは、繰り返し伸展刺激による  
血管内皮細胞の配向と整列において、カドヘリン依  
存的な細胞間接着からの機械的シグナルによるRhoAの  
活性化を介して細胞の配  
向に寄与することが明ら  
かとなった。本研究の成果  
は、機械的シグナルによ  
ってRhoAを活性化する新  
たなRho-GEFの発見とそ  
の作用機構を明らかにし  
たものである。

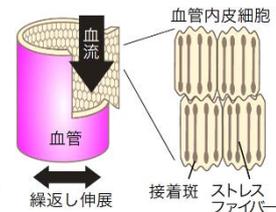


図1. 血管内皮細胞の機械的力負荷による配向

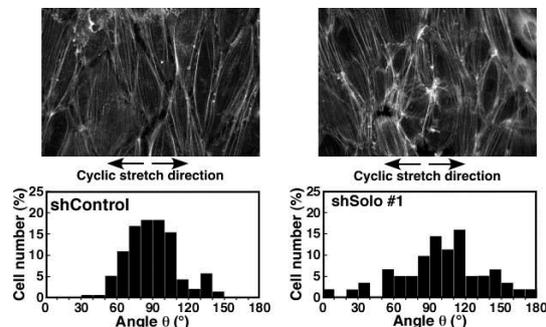


図2. 血管内皮細胞の繰り返し伸展刺激による配向に対するSoloの発現抑制の効果。(上段)コントロールshRNA、又は、Soloに対するshRNAを導入した血管内皮細胞をシリコンチャンバーに播種し、20%、1 Hz、1 hの繰り返し伸展刺激を行った後、固定して細胞内アクチン骨格を可視化した。(下段)上段の各細胞の輪郭を楕円に近似し、長軸と伸展方向のなす角度を測定し、細胞の配向角の分布を示した。

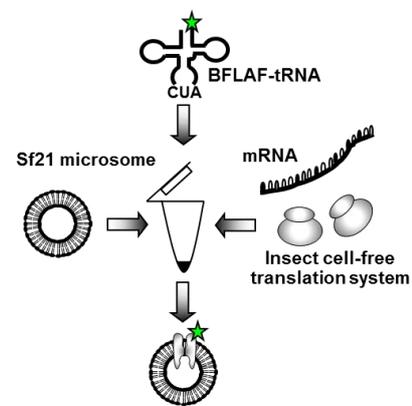


## 膜タンパク質の部位特異的蛍光標識法を開発

### A cell-free Translocation System Using Extracts of Cultured Insect Cells to Yield Functional Membrane Proteins

Toru Ezure, Kei Nanatani, Yoko Sato, Satomi Suzuki, Keishi Aizawa, Satoshi Souma, Masaaki Ito, Takahiro Hoshaka, Gunnar von Heijne, Toshihiko Utsumi, Keietsu Abe, Eiji Ando, Nobuyuki Uozumi  
*PLoS One.*, 9, e112874, (2014), [DOI: 10.1371/journal.pone.0112874](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0112874)

膜タンパク質を無細胞翻訳系により発現させる手法は、生細胞を用いる場合と比べて短時間で均質な膜タンパク質を発現させることが可能になる。本論文では、培養昆虫細胞 *Spodoptera frugiperda* 21 (Sf21) 由来の無細胞翻訳系とマイクロソームを用いることで、膜に埋め込まれた状態でタンパク質を発現するとともに、蛍光標識非天然アミノ酸を導入することを試みた。実際に、voltage-dependent K<sup>+</sup>channel (KvAP) などの膜タンパク質の発現を調べた結果、いずれも Sf21 由来マイクロソーム添加時のみ、膜に埋め込まれて糖鎖付加を受けることが確認された。さらに、アンバーコドンを用いて BODIPYFL などと標識された非天然アミノ酸を部位特異的に導入した場合にも、同様の発現が見られたことから、膜タンパク質の部位特異的な蛍光標識が可能であり、また蛍光分子がペプチド鎖の膜通過を阻害しないことも明らかとなった。本手法は今後、膜タンパク質の構造・機能の解析やトランスロケーション過程の解析などに応用できると期待される。



(芳坂貴弘 北陸先端科学技術大学院大学・A02 計画研究代表者)

### 新学術領域「動的秩序と機能」 今後の活動予定

#### 1. 平成 27 年度全体班会議

日時：2015 年 8 月 4 日（火）～6 日（木）

会場：兵庫県立淡路夢舞台国際会議場 住所：兵庫県淡路市夢舞台 1 電話：0799-74-1020

<http://www.yumebutai.org>

宿泊：ウエスティンホテル淡路 <http://www.westin-awaji.com/>

#### 2. 第 4 回国際シンポジウム

日時：2015 年 11 月 22 日（日）、23 日（祝）

場所：西新プラザ 住所：福岡市早良区西新 2-16-23 電話：092-831-8104

<http://www.kyushu-u.ac.jp/university/institution-use/nishijin/>



## 寺内グループの大山克明さんが生化学会近畿支部例会発表優秀賞を受賞

寺内一姫

(立命館大学・A03 公募研究代表者)

2015年5月16日に、立命館大学BKCキャンパスで開催された「第62回日本生化学会近畿支部例会」において、私たちの研究グループの大山克明君（博士後期課程）が発表優秀賞を受賞いたしました。

本会は、日本生化学会近畿支部が毎年開催し、今回で62回目となる歴史ある支部例会です。支部会員の研究発信と情報交換の場であるとともに、若手研究者育成を視野に若手研究者が発表議論をする場として開催されています。全国大会よりももちろん規模は小さいですが、近畿一円から多様なバックグラウンドの研究者が集まり、大学院生やポスドクなど若手研究者が多数発表し、活発に議論を行える環境を提供しています。今回は100名を超える一般発表の申し込みがあり、参加者は330名を超えました。また、シンポジウムには、ラスカー賞を受賞された森和俊先生（京都大学大学院理学研究科）や、長田重一先生（大阪大学免疫学フロンティア研究センター）、伊藤誠二先生（関西医科大学）のご講演、一般講演は口頭発表とポスター発表、またランチョンセミナーや高校生の研究発表もあり、大変盛りだくさんの例会となりました。今回、立命館大学での開催ということで、私も運営委員の一人としてお手伝いさせていただきました。学生と若手研究者の発表を促進するため、参加費や懇親会費を無料とし、さらに発表者には昼食としてお弁当を提供するなど、予算面では厳しかったのですが、予想を超える人数の参加で大盛會に終わり、安堵しているところです。

私たちは、シアノバクテリアの時計タンパク質の生化学的解析により、24時間周期で揺らぐタンパク質の仕組みを明らかにすることを目的として本領域に参画しております。今回の発表では、KaiC六量体の構造変化を生化学的に解析し、少なくともKaiC六量体には2状態があることを見出し、それぞれの状態とKaiAおよびKaiBとの相互作用の関係を解析した結果を報告しました。また、リン酸化状態と構造変化、ATPase活

性との関係も解析しました。この結果は、中心振動子と考えられているKaiCの時間同調の仕組みを解く手がかりとなるのではないかと期待しています。今後、さらに詳細な解析をすすめ、生物時計タンパク質の仕組み“タンパク質が時間を計る”分子基盤を明らかにしていきたいと考えています。

大山君は、3年前の修士1年生の時に、この同じ賞を受賞しています。また、昨年には日本光合成学会でもポスター賞を受賞し、今回はそれに続く受賞となり、彼の日頃の努力が認められ大変有り難く感じています。まだまだ多くの課題がありますが、今後も引き続き頑張っていきたいと気を引き締めています。



受賞の記念写真。大山克明君（中央）、寺内（左）と共同研究者の浅井智広氏（右）



# “Dynamical Ordering & Integrated Functions” Newsletter Vol. 22

June, 2015

## 前田大光グループの山門陵平博士が 日本化学会第 95 春季年会において優秀講演賞（学術）を受賞

前田大光

（立命館大学薬学部・班友）



平成 27 年 3 月 26 日から 29 日まで、日本大学理工学部船橋キャンパスで開催された日本化学会第 95 春季年会において、研究グループの山門陵平博士が優秀講演賞（学術）を受賞いたしました。この賞は春季年会における一般研究発表（口頭 B 講演）で満 36 歳に達しておらず審査を希望する講演を対象に選考を行い、発表内容、プレゼンテーション、質疑応答などにおいて優れた講演で、講演者の今後の一層の研究活動発展の可能性を有すると期待されるものに対して与えられる賞です。今年は 220 件の中から 44 件が選考されました。

山門さんは我々のグループのメインテーマである、 $\pi$  電子系にはたらくイオン間相互作用を利用した次元制御型集合体の構築に関する研究をすすめており、「アニオン応答性  $\pi$  電子系への直線状共役ユニットの導入と集合化」という演題で発表を行いました。我々のグループでは、電荷的に中性なアニオン応答性  $\pi$  電子系（レセプター）であるジピロリルジケトンホウ素錯体とアニオンを適切に組み合わせる（会合させる）ことで疑似的に  $\pi$  電子系アニオンを形成し、カチオンとのイオンペアからなる次元制御型集合体の構築をめざしています。山門さんは、ピロール  $\alpha$  位にさまざまなアリアルエチニル基が導入可能であることをあらたに見出しました。通常は  $\text{Cl}^-$  などのアニオンと [1+1] 型の平面状会合体を形成するのと対照的に、得られたエチニル置換レセプターは、[1+1] 型にくわえ、ゲストアニオン周辺の空間に起因して、溶液中で [2+1] 型会合体も安定に形成することが分かりました。一方、結晶状態において、[2+1] 型会合体の柔軟性を利用し、平面状カチオンや嵩高いアンモニウムカチオン、ジカチオンなどのさまざまなカチオン種と多様な集合体形態を構築することを単結晶 X 線構造解析から明らかにしました（図 1）。非常に興味深いことに、[2+1] 型会合体とテトラブチルアンモニウムカチオンとのイオンペアは、同一電荷種からなるレイヤーが交互に積層した **完全電荷種分離配置型集合体を構築** することが分かりました（図 1b）。この形成要因として、 $\pi$  電子系（レセプター）

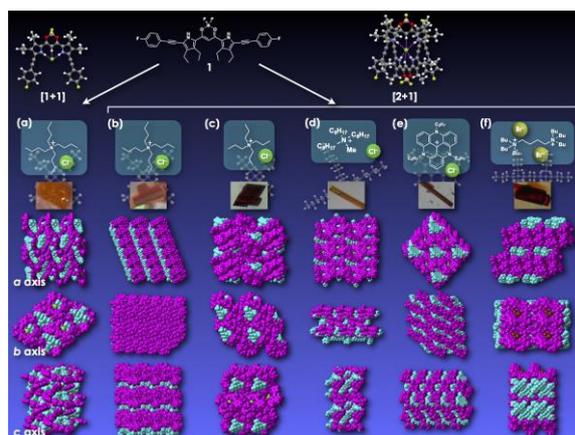


図 1: レセプター-アニオン会合体と対カチオンからなるイオンペアを基盤とした多様な集合体形態



山門陵平 博士

2 ユニットによってアニオンの負電荷が非局在化し、さらに [2+1] 型会合体の嵩高い構造に起因して同電荷種間の静電反発が緩和されたことが挙げられ、これまできわめて困難であった集合体形態の構築をはじめて実現することができました。さらに、周辺修飾によって、バルク状態における次元制御型集合体の構築にも成功しており、半導体特性を示すことも明らかにしています。

今回の山門さんの成果は、イオンペアを基盤とした次元制御型集合体におけるあらたな展開の道筋を開くものであり、非常に革新的な成果であるといえます。今後ますますの研究の発展を期待します。



### 佐藤班員、加藤班員らの研究成果が掲載される

A02 計画研究代表者の佐藤宗太班員、A03 計画研究代表者の加藤晃一班員らの共同研究の成果が日経バイオテクオンライン（5月29日）、財経新聞（5月30日）に掲載されました。

以下は日経バイオテクオンラインからの引用です。

### 東京大学、東北大学、サイボーグ超分子がときあかす病原物質の起源

2015年5月29日 10:26



東京大学 大学院工学系研究科 応用化学専攻の藤田誠教授と自然科学研究機構 岡崎統合バイオサイエンスセンター/分子科学研究所の加藤晃一教授、東北大学 原子分子材料科学高等研究機構の佐藤宗太准教授らの研究グループは、精巧につくられたサイボーグ超分子をつかって、病因物質であるタンパク質が細胞表面でどのように捕らえられているのか、詳細に明らかにすることに成功しました。

[プレスリリースはこちら](#)

---

<https://bio.nikkeibp.co.jp/article/pressrelease/20150529/185225/?ST=academic> より