



業績紹介：プロテアソームの4次構造形成にかかわるアッセンブリーシャペロン
Ump1 は天然変性タンパク質だった

“Backbone ^1H , ^{13}C , and ^{15}N assignments of yeast Ump1, an intrinsically disordered protein that functions as a proteasome assembly chaperone”

Yoshinori Uekusa, Keisuke Okawa, Maho Yagi-Utsumi, Olivier Serve, Yuki Nakagawa,
Tsunehiro Mizushima, Hirokazu Yagi, Yasushi Saeki, Keiji Tanaka, and Koichi Kato
Biomolecular NMR Assignments, in press (2013) DOI: 10.1007/s12104-013-9523-1

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)

プロテアソームは細胞内におけるタンパク質の分解を担っている巨大な酵素複合体である。その活性中心にあたる20Sプロテアソームは、7種類の α サブユニット($\alpha 1 \sim \alpha 7$)から構成される α リングと、7種類の β サブユニット($\beta 1 \sim \beta 7$)から構成される β リングが、 $\alpha\beta\alpha$ の順に重なったシリンダー状の構造をしている。こうした20Sプロテアソームの4次構造形成は、自発的には起こらず、専用のシャペロン分子(Pba1~Pba4)の介助を必要とすることが知られている(図1)。

Ump1は、 α リングおよび $\beta 2$ 、 $\beta 3$ 、 $\beta 4$ から構成されるプロテアソーム中間体および各1層の α リングと β リングのみからなるハーフプロテアソームと相互作用することが知られている。また、Ump1を欠損した酵母ではプロテアソーム形成効率が低下することが知られている。これらのことから、Ump1も20Sプロテアソームの形成を介助するアッセンブリーシャペロンの1つであると考えられている。しかしながら、Ump1が20Sプロテアソームの形成にいかんして関与しているかという分子メカニズムは明らかではない。

そこで本研究ではこの問題を探求する第一歩として、核磁気共鳴(NMR)法を基軸とするアプローチによるUmp1の構造解析を試みた。 ^{13}C および ^{15}N で均一に標識した酵母Ump1を大腸菌発現系を用いて調製し、各種NMR計測に供した。Ump1の ^1H - ^{15}N HSQCスペクトル上では、ほぼすべてのピークが ^1H 軸において約1 ppmの範囲で観測されていたことから、Ump1は明確な2次構造を有していない、いわゆる天然変性タン

パク質であることが示唆された。実際、Ump1の主鎖に由来するシグナルを帰属し、化学シフト値に基づいて $\delta 2\text{D}$ 法による二次構造解析を行った結果、Arg65からGln71にいたる領域が α ヘリックスを形成する傾向を示す以外には、本タンパク質は特定の2次構造を形成していないことが明らかとなった(図2)。

このことは、これまで知られている20Sプロテアソームのアッセンブリーシャペロンがいずれも2量体構造を形成して機能していることと対照的である。Ump1が天然変性タンパク質であることは、20Sプロテアソーム形成の最終段階において自らが最初の基質として円滑に分解除去されることにも関係している可能性がある。一定の立体構造を形成していないUmp1が、プロテアソームのアッセンブリー過程において果たしてどのような役割を演じているのか、今後の研究の展開が実に楽しみである。

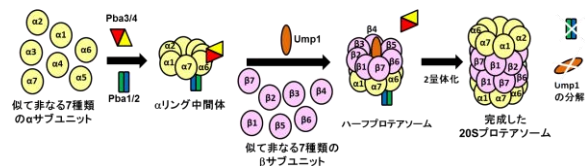


図1：アッセンブリーシャペロンに依存した20Sプロテアソーム形成過程の模式図。

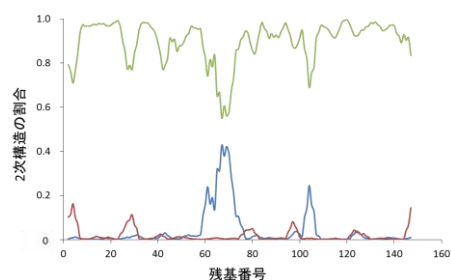


図2： $\delta 2\text{D}$ によるUmp1の2次構造解析結果。緑：コイル、赤： β シート、青： α ヘリックス。



業績紹介：先天性筋ジストロフィーの原因遺伝子産物の機能解明

“AGO61-dependent GlcNAc modification primes the formation of functional glycans on α -dystroglycan”

Hirokazu Yagi, Naoki Nakagawa, Takuya Saito, Hiroshi Kiyonari, Takaya Abe, Tatsushi Toda, Sz-Wei Wu, Kay-Hooi Khoo, Shogo Oka, and Koichi Kato

Scientific Reports, 3, Article number: 3288 (2013) DOI: 10.1038/srep03288

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)

生命分子システムの動的秩序の破綻は、ときに重篤な疾患の発症につながる。例えば、Walker-Warburg 症候群 (WWS) などの先天性筋ジストロフィー疾患においては、細胞膜上の α -ジストログリカン (α DG) の糖鎖構造の形成不全が細胞間コミュニケーションの異常をもたらし、これにより脳と目に重篤な病変を引き起こされる。 α DG 上の糖鎖は、ラミニンなどの細胞外マトリックスタンパク質との相互作用を通じて細胞の基底膜と細胞膜を繋ぎとめており、細胞の維持や細胞間相互作用に重要な役割を有しているからである。

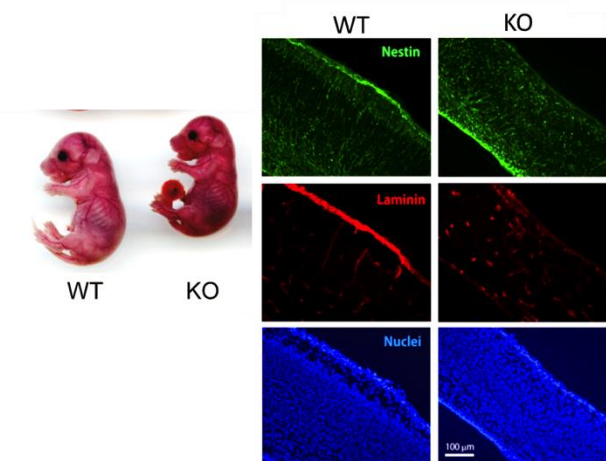
この糖鎖の形成には多数の糖転移酵素（および関連タンパク質）の秩序立った連携が不可欠であると考えられており、これらのタンパク質は筋ジストロフィーの原因遺伝子産物として同定されている。しかしながら、 α DG 上の糖鎖の形成における個々のタンパク質の役割は未解明であり、それらの協奏的活動を通じて形成される糖鎖構造の全体像も不明なままである。

最近、WWS 患者のゲノム解析により、AGO61 が本疾患の原因遺伝子の 1 つであることが報告された。本研究は AGO61 欠損マウスを作成し、生体内における AGO61 の機能を明らかにすることを目的としている。

AGO61 欠損マウスは正常な姿で生まれてくるにも関わらず、生後 1 日以内に死に至った (図左)。この遺伝子欠損マウスの胎児の脳を調べたところ、層形成の不全が起きていた。特に、大脳皮質において、放射状グリア線維の形態異常が認められるとともに、基底膜を構成するラミニンの形成異常が生じていた。一方、本遺伝子欠損マウスは、ラミニン結合性を示す糖鎖の発現が全くみとめられなかった (図右)。

さらに本論文では、 α DG 上の特定の位置に結合したマンノース残基への *N*-アセチルグルコサミン (GlcNAc) 修飾を AGO61 が担っていることを見出している。興味深いことに、その GlcNAc 修飾箇所は、これまでラミニン結合性糖鎖が発現していると報告されているスレオニン残基と一致していた。つまり、AGO61 は α DG 上のラミニン結合性を示す糖鎖が形成されるスタートとなる糖鎖構造を作る重要な酵素であることが明らかとなった。

以上の結果より、AGO61 の欠損に伴い α DG 上のラミニン結合性糖鎖の形成不全が起こり、筋ジストロフィーが発症することを明らかにすることができた。この成果は、 α DG 上の機能性糖鎖の形成にかかわるタンパク質集団の動的秩序を探求するうえでの重要な基盤を与えるものである。



図左：胎生 17.5 日目の野生型マウス (WT) および AGO61 遺伝子欠損マウス (KO)。

図右：胎生 17.5 日目の胎児の脳の免疫染色像。(緑) 放射状グリア線維、(赤) ラミニンタンパク質、(青) 核を示す。



「Sixth Korea-Japan Seminars on Biomolecular Science:
Experiments and Simulation」報告

山口拓実

(自然科学研究機構

岡崎統合バイオサイエンスセンター)

平成 25 年 11 月 25 日から 3 日間にわたり、分子研アジア連携研究会「日韓生体分子科学セミナー：実験と計算」が、本新学術領域と共催のもと、岡崎コンファレンスセンターにて開催されました。生体分子科学に関する日本-韓国間の研究交流を深めることを目的としたこのセミナーは、日本の分子科学研究所、韓国の Korea Institute for Advanced Study (KIAS) ならびに Korea Advanced Institute of Science and Technology (KAIST) に所属するメンバーが中心となり、日本と韓国で交互に開催してきたものです。第 6 回目の開催となった今回は、韓国からの 25 名を含む総勢 50 名の参加者を岡崎に迎え、39 件の発表を通して有意義な意見交換が行われました。

セミナーでは、実験分野とシミュレーション分野を専門とする研究者の双方が両分野の理解を深めるために、時には厳しい意見を交えながらも、活発な議論を展開しました。例えば、Jooyoung Lee 先生(KIAS)、Sun-Shin Cha 先生(KIOST)は、それぞれ“High-accuracy protein structure modeling and its application to molecular replacement of crystal phasing”、“Zinc-binding to the surface of proteins and its application to experimental phasing”という演題で、計算と実験の立場からタンパク質の X 線結晶構造解析における位相問題へのアプローチ法を提案されました。また、会の主軸は生体分子の物理化学を基盤とした研究におきながらも、化学・生物学などの多様な研究テーマに関する発表も盛んで、Jaehoon Yu 先生 (Seoul National Univ.) は “A peptide mimetic of apolipoprotein A-I that contains 2-naphthylamine residues enhances cholesterol efflux and sequesters oxidized LDL from macrophage cells” の講演で、タンパク質をモデルとした人工ペプチドの合成とその医療応用に関する研究を紹介されました。日本側からも、本新学術領域の加藤代表、佐藤啓文班員、上久保班員、稲垣班員、桑島評価委員をはじめ、分子科学者、

生物物理学者、生化学者、細胞生物学者など多彩な顔ぶれが参加し、会場では分野融合型の研究に関しても盛んに議論が行われました。本領域が取り組む生命分子システムにおける動的秩序形成の諸問題についても、両国間およびアジアにおいても今後ますます重要な課題となっていくであろうことを強く感じました。

セミナーの詳細なプログラムについてはホームページ (<http://seimei.ims.ac.jp/others/6thkoreajapan/>) をご覧いただければと思います。大学院生を含めた若手研究者のための発表枠も設けられ、私も、自身の研究について発表する機会をいただきました。学際的・国際的な場で、様々な研究背景をもつ方々と議論をすることができ、大変有意義な経験となりました。

セミナー会場を離れた後は、連夜お酒を酌み交わしながら、歌い合いながらの国際交流が盛んに行われ、親睦を深めました。韓国の先生方の中には、わずかな滞在期間にみるみる日本語を上達されていた方も多く、語らいの場は大いに盛り上がりました。国際的な緊張も伝えられる両国間ですが、サイエンス、そして研究者間の交流においてはそのような懸念は全くなく、日本と韓国の強い絆と高いアクティビティーが濃縮された 3 日間でした。次回の日韓生体分子科学セミナーは、2014 年の秋、韓国・ソウルで開催される予定です。



Sixth Korea-Japan Seminars on Biomolecular Science
集合写真



佐藤啓文グループの笠原健人さんが
第36回溶液化学シンポジウムにおいて優秀ポスター賞を受賞

佐藤啓文

(京都大学工学研究科・A01 計画研究代表者)

平成25年10月9日から11日まで、北海道大学学術交流会館で開催された第36回溶液化学シンポジウムにおいて、修士課程大学院生・笠原健人君が優秀ポスター賞を受賞しました。同シンポジウムは、溶液化学研究会の主催（日本化学会、日本分析化学会、日本高压学会および電気化学会溶液化学懇談会の共催）により毎年一回開催されており、物理化学、分析化学、無機・錯体化学といった幅広い分野から研究者が集い、溶液に関わる活発な議論が行われています。同賞は35歳以下のPDおよび学生のポスター発表講演者を対象に選考されるもので、今回は3件が選ばれました。笠原君の研究は「SSSV方程式の三次元化および電解質溶液への適用」と題するもので、佐藤との共同研究によるものです。

3D-RISM法や分子動力学法などを用いることで、蛋白質近傍あるいは内部の水の構造を理論化学・計算化学的に高精度で得ることが最近徐々に現実となってきました。我々のグループでも横川大輔博士（現：名古屋大学特任准教授）が中心となって並列化効率の極めて高い統計力学的手法（MC-MOZ法）を開発し、いくつかの蛋白質を含めた応用計算を展開しています[1]。ところがこうした液体の積分方程式理論の多くは平衡状態にある液体の分布関数や熱力学量を記述するための方法論であり、ダイナミクスを記述するための方法は未だ極めて限定されていると言ってもよいでしょう。

もちろん、凝縮系を記述する上で分子動力学法（MD法）は今日もっとも一般的で、強力な手法です。系のダイナミクスを記述するにあたっては数多くの初期状態から時間発展を追跡し、その統計平均を計算します。定量的な議論のためには、十分な数のトラジェクトリーから適切な時間相関関数を求め、これに基づいた議論が必須です。これに対して液体の積分方程式理論は系の解析的な記述を追求する立場を取っており、時間相関関数（van Hove関数）を直接的に得る方程式を

導き出すことを目的の一つとしています。1992年に平田文男先生（現：分子研名誉教授）によって提案されたSSSV（site-site Smoluchowski-Vlasov）理論は拡散方程式に基づき分子凝縮系のダイナミクスを取り扱うことが可能であることを初めて示しました[2]。



笠原健人君

しかしながら、多くの場合、積分方程式理論は動径分布関数に基礎を置いており、溶媒和構造やその変化も二原子（二粒子間）の距離に対する確率分布として表されます。これは上述のSSSV理論においても同様であり、笠原君は三次元空間内の分布関数に基づいて溶液内ダイナミクスを表現することで、より直接的・直感的な記述が可能になると考えました。とりわけ、ごく最近飯田健二博士（現：分子研）らがSSSV理論の拡張に成功しており[3]、今回の新理論開発に際しても大きな礎となりました。

自己組織化過程は、系を構成する分子の拡散的挙動によって集積化が進むはずですが、一連のSSSV理論による取り扱い、MD法とは全く異なるアプローチを提供し、長時間ダイナミクスの解析に大きな威力を発揮するものと期待されます。

笠原君の受賞を心からお祝いするとともに、基盤的物理学の立場から生体分子系の理解を進めるべく、一層の精進をはかっていきたいと考えております。

参考文献

- [1] (a) D. Yokogawa, H. Sato, T. Imai, S. Sakaki, *J. Chem. Phys.*, **130**, 064111 (2009). (b) K. Kido, D. Yokogawa, H. Sato, *Chem. Phys. Lett.*, **531**, 223 (2012). (c) K. Hirano, D. Yokogawa, H. Sato, S. Sakaki, *J. Phys. Chem. B*, **114**, 7935 (2010).
[2] F. Hirata, *J. Chem. Phys.*, **96**, 4619 (1992).
[3] K. Iida, H. Sato, *J. Chem. Phys.* **137**, 034506 (2012).



加藤班員らの研究成果が新聞に掲載される

A03 計画研究代表者の加藤晃一班員と名古屋市立大学大学院薬学研究科の矢木宏和博士らの共同研究の成果が中日新聞（11月22日）に掲載されました。

平成25年11月22日 中日新聞（日刊）第3面

筋肉や神経の細胞を体内で正しく並べる酵素の働きを、名古屋市立大学大学院薬学研究科の加藤晃一教授と矢木宏和講師らのグループがマウスの実験で解明した。この酵素がないと、筋力が衰える遺伝病の先天性筋ジストロフィーになることから、治療法開発につながる可能性があるという。英科学誌ネイチャーグループの電子雑誌に21日（英国時間）掲載された。

筋ジス治療 一歩

この酵素は「AGO 61」という。ゲノム（遺伝子情報）解析による

名大院チーム原因酵素解明

AGO 61の働きのイメージ

AGO 61がある場合



「糖鎖」によって秩序ある配列

AGO 61がない場合



「糖鎖」がないためバラバラ

カー・ワールブルグ症候群（WWS）に関する鎖のよばわるとされてきた。今回の実験では、遺伝子操作でこの酵素をなくしたマウスを作り、生まれた直前の胎児の脳を観察した。外側部分の大脳皮質などで神経細胞を効率的に移動させる神経線維の発達不全や、細胞が秩序を持って並ぶた

加藤教授は「WWSは人間の場合、ほとんどの一年以内に亡くなってしまう重篤な病気の仕組みを理解し、糖鎖の欠損を補う治療法開発の第一歩になれば」と話している。