



業績紹介：細胞移動のために動的分子集団が生み出す力の計測法

" Bayesian cell force estimation considering force directions "

Satoshi Kozawa, Yuichi Sakumura, Michinori Toriyama, Naoyuki Inagaki and Kazushi Ikeda

Neural Processing Letters, (2013) DOI:10.1007/s11063-013-9320-y

稲垣直之

(奈良先端科学技術大学院大学 バイオサイエンス研究科・A03 計画研究代表者)

細胞の移動は、神経回路網形成、原腸陥入、組織発生・再生、免疫反応、創傷治癒、がん転移といった様々な生体内の生理的・病理的な過程に関与している。細胞が方向性を持って移動するためには、移動のための力を生み出す必要がある。移動する細胞や伸長する神経軸索の先端では、アクチン線維が動的に重合と脱重合を繰り返して駆動力を生み出すと考えられている。このアクチン重合・脱重合による駆動力を細胞外基質に伝えて細胞移動のための力を生み出す分子基盤の同定は、重要な研究課題となっている。

細胞移動を引き起こす分子集団を同定し、そのメカニクスを解析するためには、移動のために発生する力を計測する必要がある。細胞が生み出す力の計測法として、弾性を持つゲル上に細胞を培養し、力の発生によるゲルの歪みをゲル内に包埋された蛍光ナノビーズの動きから計測する手法 (traction force microscopy) が考案されている (図1の青色矢印)。その際に、顕微鏡を用いたライブイメージングにより得られた蛍光ナノビーズの動きから、力の大きさと方向を正確に推定する必要がある。

これまでに、蛍光ナノビーズの動きから力を推定するためのいくつかのアルゴリズムが考案されてきた。しかしながら、これまでのアルゴリズムではゲル内のビーズの密度が低いと力の空間分布を正確に推定することができず、一方、ビーズの密度が高いとゲルの弾性が損なわれて力計測の正確性が損なわれるという問題点があった。

本論文では、低密度の蛍光ビーズの動きから細胞が生み出す力を正確に推定するアルゴリズムの開発を試みた。移動する細胞内のアクチン線維は、細胞の先端で重合し、細胞の中心方向に向かって移動して (図2

の黒矢印) 脱重合することがわかっている。このアクチン線維の重合・脱重合の方向から得られる力の方向性の制約を導入したベイズ理論を用いることより、細胞が生み出す力の計算が低密度のビーズを用いてこれまでの手法に比べてより正確に行うことが可能となった。

本研究成果により、細胞移動や軸索伸長を引き起こす生命分子集団の動的秩序系に対して、正確に力学的なアプローチを行う道筋が開かれた。

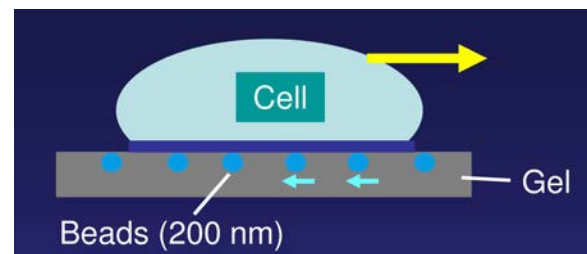


図1：ゲルと蛍光ビーズを用いた、細胞が生み出す力の計測法。弾性を持つゲル上に細胞を培養し、力の発生によるゲルの歪みをゲル内に包埋された蛍光ナノビーズの動きから計測して、力のベクトルを推定する。

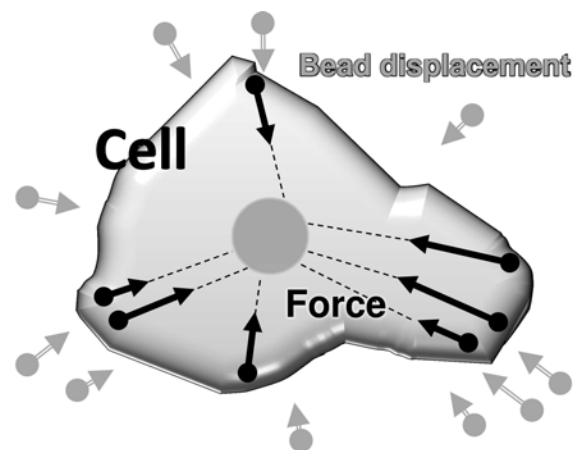


図2：アクチン線維の重合・脱重合の方向から得られる力の方向性の制約を導入した力の推定法。

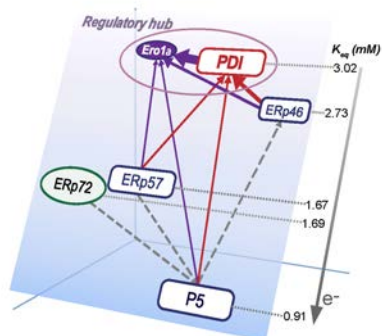


小胞体の電子伝達ネットワークのハブとなる分子複合体

Ero1- α and PDIs constitute a hierarchical electron transfer network of endoplasmic reticulum oxidoreductases

Kazutaka Araki, Shun-ichiro Iemura, Yukiko Kamiya, David Ron, Koichi Kato, Tohru Natsume, and Kazuhiro Nagata

Journal of Cell Biology, 202, 861–874 (2013) DOI: 10.1083/jcb.201303027



細胞内小器官の酵素集団は動的ネットワークを形成して秩序立ったシステムを形成し、高次機能を発揮している。例えば、小胞体内腔には 20 種類以上の酸化還元酵素が存在しており、これらは新生タンパク質のジスルフィド結合形成を促す酸化的フォールディングを担うとともに、小胞体内の酸化還元状態の平衡を保つ役割を果たしている。本論文は、小胞体酸化還元酵素 Ero1 を中心とした酸化還元酵素の反応カスケードに注目し、分子間相互作用と酸化還元電位の詳細な解析を行ったものである。その結果、Ero1

がプロテインジスルフィドイソメラーゼ(PDI)と複合体を形成し、これをハブとして他の酸化還元酵素との間に制御された電子伝達ネットワークが存在することを見いだしている。さらに、Ero1 と PDI の複合体形成に基づく活性調節と電子伝達メカニズムを NMR データに基づいて議論している。本研究は、一群の酸化還元酵素群の協奏的連携による小胞体内の酸化還元環境の秩序維持機構について重要な知見を与えるものである。

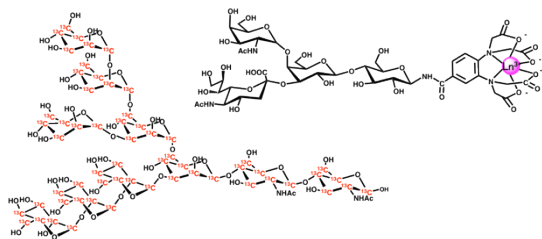
(加藤晃一 自然科学研究機構・A03 計画研究代表者)

糖鎖の構造と相互作用のダイナミクスに迫る NMR の新規アプローチ (総説)

New NMR tools for characterizing the dynamic conformations and interactions of oligosaccharides

Ying Zhang, Takumi Yamaguchi, and Koichi Kato

Chemistry Letters, 42, 1455–1462 (2013) DOI: 10.1246/cl.130789



糖鎖は、糖鎖同士やタンパク質とのダイナミックな相互作用を通じて、細胞内のタンパク質運命決定システムや、細胞間コミュニケーションのための超分子複合体などの形成に関わっている。糖鎖が関わる生命分子システムの高次機能発現メカニズムに関する理解を深めるためには、糖鎖の柔構造

とクラスター形成について詳細な知見を得ることが不可欠である。この総説は、糖鎖の立体構造・ダイナミクス・相互作用を解明するための NMR の新規方法論について概説したものである。常磁性プローブや安定同位体標識などの活用により、これまでは精密解析が困難だった水溶液中で一定のコンフォメーションをとっていない糖鎖(およびそのクラスター)に対しても、原子レベルの構造情報を得ることが可能となってきた。これにより、糖鎖を介して形成される生命分子集団の動的秩序系に対して分子科学的なアプローチを行う道筋が開かれてきた。

(加藤晃一 自然科学研究機構・A03 計画研究代表者)



加藤グループの Zhang Ying さんが糖鎖科学中部拠点奨励賞を受賞

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)

2013年9月、名古屋市立大学にて開催された「糖鎖科学中部拠点 第11回若手のカフォーラム」において、私たちの研究グループの Zhang Ying さん(総合研究大学院大学 博士後期課程)が糖鎖科学中部拠点奨励賞を受賞いたしました。

本フォーラムは、中部地方の糖鎖研究者が一同に会し研究者間のネットワークを強化するとともに、若手研究者による情報発信・交流を促し、次代を担う人材を養成することを目的に開催されているものです。糖鎖研究と一言で申し上げても、研究内容は理学から工学、医学まで、幅広い分野にまたがっており、その発展には化学と生物学との融合・連携が強く求められています。日本の糖鎖科学研究は国際的にも高い競争力をもって展開されていますが、名古屋を中心とした中部地域においても、糖タンパク質や糖脂質といった複合糖質全般を対象に、構造解析や機能解析、化学合成、医療応用といった多彩な領域での先進的な研究に取り組む研究者が多数います。こうした学際的な背景と地理的な結びつきから、フォーラムでは熱心な情報交換・研究交流が行われ、それぞれの研究の発展と連携研究について大いに議論が盛り上がりました。

Zhang Ying さんは、神経細胞膜に存在する糖脂質ガングリオシドの構造ダイナミクスの解析を主題とした研究に取り組み、本フォーラムにおいて Paramagnetism-assisted NMR for atomic description of dynamic oligosaccharides という演題で発表を行いました。ガングリオシドは、細胞膜上においてクラスター化し、特定のタンパク質や脂質とともに超分子集合体である脂質ラフトを形成する重要な生命分子です。しかしながら、高い構造柔軟性のために伝統的な構造生物学のアプローチでは解析が困難であることや、分子生物学手法による安定同位体標識試料の調製法が確立されていないことなどから、これまで十分に分子科学的研究が進展してきませんでした。こうした問題に対し Zhang Ying さんは、ランタニドイオンを常磁性プ

ローブとしてガングリオシドの糖鎖へ導入する手法を確立し、常磁性効果を応用した核磁気共鳴法と分子動力学シミュレーションの活用による、ガングリオシド糖鎖の立体構造解析法の開発に成功しました。さらに、有機化学反応や酵素反応を駆使して、選択的に安定同位体標識を施した試料の調製にも取り組んでいます。こうした研究により、一連のガングリオシド糖鎖構造の動的立体構造の解明や、糖鎖の分岐構造の差異がもたらすダイナミックなコンフォメーション変化を、原子レベルの分解能で明らかにしました。

細胞表層の脂質ラフトは、ガングリオシドをはじめとする個々の構成要素としてもまた集合体全体としても極めてダイナミックな分子挙動を伴い、その構造は一定の秩序と高い流動性とを併せ持っていると考えられます。また近年、脂質ラフトはシグナル伝達やアミロイド形成の舞台となっていることが明らかとなりつつあり、その生物機能が注目されています。Zhang Ying さんの研究成果は、このような膜系における動的秩序システムを対象とした分子科学研究の道を切り開くものであります。



Zhang Ying さん



佐藤啓文グループの松村祥宏さんが
分子科学討論会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 9 月 24 日から 27 日まで、京都テルサで開催された第 7 回分子科学討論会 2013 において、修士課程大学院生・松村祥宏君が分子科学会優秀ポスター賞を受賞しました。同学会は、分子科学会の主催により毎年一回開催されており、物理化学分野における最も大きく、権威ある討論会の一つです。同賞は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 14 件が選ばれました。松村君の研究は「溶液中における直鎖状分子の構造揺らぎのための積分方程式理論」と題するもので、佐藤との共同研究によるものです。

非常に簡単な分子を除けば、全ての分子は内部自由度に由来する複数の安定および準安定構造が存在します。これら複数の配座間の相対的安定性やそれに基づく相対分布は、分子を特徴づける基本的な性質と考えられますが、その複雑さ故に包括的な理解が進んでいないとは言えません。例えば、極めて多数の安定構造の中で最も安定な構造を見つけ出す問題は、蛋白質の折り畳み問題に他ならず、その解決が容易でないことはよく知られている通りです。また比較的少数自由度を持ち、ごく限られた数の安定構造を有する分子の場合でさえも、複数の構造間の相対安定性や、有限温度下でこれらに由来する構造エントロピーを特徴づけることは決して容易ではなく、それが溶液内での事象となると関与する自由度の数が飛躍的に増大し、問題は一層難しくなります。今日最も一般的な分子動力学法 (MD 法) では、柔軟な分子構造を持つ分子モデルを用いることで、こうした問題を直接明示的に意識することは少ないようです。しかしポテンシャル関数と、それに基づいて得られる配座間の相対安定性とを直接に結びつけるのは必ずしも容易ではありません。

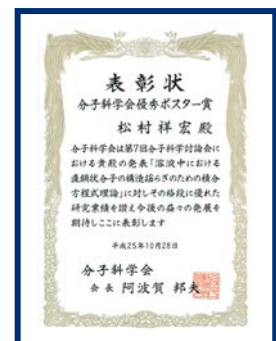
液体の積分方程式理論は系の解析的な記述を追求する立場を取っており、RISM 理論 (相互作用点モデル) では分子内相関関数 ω を入力情報とし、分子の構造を規定します。これを拡張すれば構造の柔軟性を取り扱うことが可能となるはずです。こうした考え方からこ

れまでに幾つかの理論が示されており [1]、我々のグループからも横川大輔博士 (現: 名古屋大学特任准教授) らが中心となって、新しい理論を提案しました [2]。この方法は一般的な分子を扱う上で極めて有用であり、例えば最近ではイオン液体を構成するカチオンのイミダゾリウム環についた直鎖部分の記述にも用いられています [3]。しかしながらこの方法は、一成分系 (純溶媒) のみを対象としたものでした。松村君は、実際に多くの場合で興味が持たれる溶質-溶媒系に着目して、新しい理論の開発に取り組みました。また対応する自由エネルギーの表式を得る事にも成功し、この表式の各項に対して物理的意味を対応させて、解析することを可能としました。今回の受賞はこうした達成によるものです。現時点では個々の分子の構造の柔軟性についてはモンテカルロ法を利用しており、周辺分子との多体相互作用に由来する部分を主に扱っており、今後の更なる改善が期待されます。

分子をユニットとする秩序形成過程では、構成要素の柔軟性がしばしば重要な役割を演じます。今回提案した理論は、適用できる系が限定されることは否めませんが、上述の非常に大きな問題に対する第一歩を踏み出した意義は大きいと考えています。松村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] 例えば、T. Munakata, S. Yoshida, F. Hirata, *Phys. Rev. E*, **54** 3687 (1996); S. Yoshida, F. Hirata, T. Munakata, *Phys. Rev. E*, **54** 1763 (1996).
[2] D. Yokogawa, H. Sato, S. Sakaki, *Chem. Phys. Lett.*, **487**, 241 (2010).
[3] S. Hayaki, Y. Kimura, H. Sato, *J. Phys. Chem. B*, **117**, 6759 (2013).





岡本祐幸グループの西川直宏さんが
1st International Symposium on Computational Materials and
Biological Sciences において Poster Presentation Award を受賞

岡本祐幸

(名古屋大学 大学院理学研究科・A03 計画研究代表者)

平成 25 年 9 月 10 日から 12 日まで、早稲田大学で開催された国際会議、1st International Symposium on Computational Materials and Biological Sciences において、筆者の研究室の博士前期課程 2 年生 (M2) の西川直宏さんが、”Molecular dynamics simulations for understanding the initial process of amyloid formations” という题目的のポスター発表によって、Poster Presentation Award を受賞いたしました。この国際会議は、昨年までに 5 回、ロシアの Dubna と Moscow で開催されてきた、Japan-Russia International Workshop on Molecular Simulation Studies in Material and Biological Sciences を早稲田大学の山本知之教授と慶應義塾大学の泰岡顕治教授が中心になって、日本で初めて開催したものでした。多岐にわたる研究内容のポスター発表の中から、受賞者 3 名が選ばれました。

西川さんの研究内容は、アルツハイマー病の原因とされる、アミロイド β ペプチド ($A\beta$) のアミロイド線維形成のメカニズムを分子シミュレーションによって探るものですが、簡単のために、ペプチドフラグメント $A\beta(16-22)$ を 5 本用意して、レプリカ交換分子動力学シミュレーションを実行しました。ポテンシャルエネルギーとしては、Philippe Derreumaux 氏らが開発した OPEP という粗視化模型のものを採用しました。その結果、まず、2 本のペプチドフラグメントが β シート構造を作り、それに 1 本ずつフラグメントが付いていくことによって、3 本、4 本、5 本のフラグメントからなる、より大きな β シート構造へと成長するのではなく、2 本のフラグメントが幾つか別々にできて、それらが更に合わさって大きな β シート構造を形成していくことが示唆されました。

西川さんは今年度、この研究内容を中心とした修士論文を仕上げ、来年 4 月からは同じ研究室で、博士後

期課程に進学する予定です。今後、益々の研究の進展を期待します。



会議の様



ポスタープレビューで発表する西川さん



賞状を受け取る西川さん



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科学新聞（12月6日）の1面に掲載されました。

平成25年12月6日 科学新聞 第1面

名古屋市大 先天性筋ジストロフィー 原因遺伝子の機能解明

名古屋市立大学大学院薬学研究科生命分子構造学分野の加藤晃一教授（岡崎総合バイオサイエンスセンター教授）、矢木宏和講師らの研究グループは、ノックアウトマウスを用いて、先天性筋ジストロフィーの原因

因遺伝子の機能を明らかにすることに成功した。ウォーカー・ワールブルグ症候群（WWS）は、脳と目に重篤な病変を伴う先天性筋ジストロフィーの一種。WWS患者は、細胞内と細胞外を繋ぎとめる役割を担うタンパク質である α ・ジストログリカン（ α DG）上の糖鎖の構造異常が認められる。昨年、WWS患者の全ゲノム配列解析により、 α GO61と呼ばれるタンパク質をコードする遺伝子がWWSの原因遺伝子の一つであることが報告されたが、 α GO61が、実際に生体内で α DG上の糖鎖の合成に関与しているかは不明だった。そこで、研究グループは、 α GO61の遺伝子が欠損したマウスを複製し、生体内における α GO61の機能を調べた。

この α GO61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日以内に死んでしまう。この遺伝子欠損マウスの胎児の脳を調べたところ、 α DG上のラミニン結合性を示す糖鎖が全く発現しておらず、脳の層形成の不全が起きていることがわかった。特に、大脳皮質において神経細胞の移動に関する放射状グリア線維の形態異常が認められ、基底膜を形成するラミニンの発現異常が生じていることを明らかにした。 α GO61欠損マウスに現れる異常は、他のアルファ・ジストログリカンパチー（ α DG上の糖鎖異常の結果、 α DGの機能が低下することにより、筋細胞変性、壊死が起きる筋ジストロフィーの総称）モデルマウスにも認められた。

次に、 α GO61がどのように α DG上の糖鎖の形成に関与するかを調べた。その結果、 α GO61は α DG上の特定の位置に結合したマンノース残基へN-アセチルグルコサミンを連結させる働きを担っていることが明らかとなった。その連結箇所は、これまでラミニン結合性糖鎖が発現しているところと報告されている場所と一致し、 α GO61が、 α DG上で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わかった。これらの実験により、この遺伝子の欠損に伴い糖鎖の形成不全が起これ筋ジストロフィーが発症することが突き止められた。

加藤教授の話「 α DG上の糖鎖がなくなる遺伝子欠損として、これまでに13個の遺伝子が同定されている。ただ、機能が未知な遺伝子産物が未だ多く存在し、 α DG上に発現している糖鎖の構造も明らかになっていない。今後は、本研究の成果を基に、 α GO61が働いてきた糖構造をもとに組み上げられる糖鎖の構造の全体像を明らかにすることを目指す。この糖鎖の構造およびその形成過程に関与する関連遺伝子が明らかになれば、難治性疾患であるジストログリカンパチーの新たな治療法の開発に寄与できるものと考えている」