



業績紹介：プロテアソームアッセンブリーシャペロンの
二量体形成を阻害する化合物の作用原理の解明

**"Total Synthesis and Characterization of Thielocin B1
as a Protein-Protein Interaction Inhibitor of PAC3 Homodimer"**

Takayuki Doi, Masahito Yoshida, Kosuke Ohsawa, Kazuo Shin-ya, Motoki Takagi, Yoshinori Uekusa,
Takumi Yamaguchi, Koichi Kato, Takatsugu Hirokawa, and Tohru Natsume

Chemical Science, in press (2014) DOI: 10.1039/C3SC53237B

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)

生命システムの維持には、構成要素である分子素子間の秩序だった相互作用が必要不可欠である。例えば、細胞内におけるタンパク質分解を司るプロテアソームは、多様なサブユニットから構成される巨大な酵素複合体であり、さらにその形成過程には一過的に複合体に組み込まれては外れていくシャペロンタンパク質 (proteasome assembling chaperon: PAC) がいくつも関与している。こうしたタンパク質間の相互作用を標的としその阻害を引き起こす化合物の開発研究は、従来とは異なる作用機構をもつ新規医薬品の開発につながるとともに、生命分子システムの動的秩序形成メカニズムの理解を促すことが期待される。

Thielavia terricola に由来する天然有機化合物 thielocin B1 (TB1) は、プロテアソームアッセンブリーシャペロンの 1 つである PAC3 の二量体形成を選択的かつ強力に阻害する (IC₅₀, 20 nM)。それゆえ、TB1 は PAC3 の機能を阻害し、それによりプロテアソームの働きを抑える新規抗がん剤のリード化合物としても期待される。しかしながら、その作用メカニズムの詳細については明らかではなかった。本研究では、NMR によるマイクロ構造情報の収集と計算科学手法による分子システムのシミュレーションを実施し、TB1 によるタンパク質間相互作用の阻害機構の解明に取り組んだ。

本論文では化学的に全合成した TB1 と安定同位体標識を施した PAC3 を用いて両者の NMR 相互作用解析を行った。その結果、TB1 の添加にともない PAC3 二量体のプロトマー間の界面近傍に位置するアミノ酸

残基に化学シフト変化が生じることが明らかとなった。さらに、TB1 に常磁性プローブとしてニトロキシルラジカルを導入することで、PAC3 二量体との過渡的な分子間相互作用を反映する常磁性緩和促進効果を解析した。その結果、PAC3 ホモダイマーの三次元構造上の TB1 結合部位に関する情報を得ることができた。

これらの NMR 実験結果から得られた情報を基にドッキングシミュレーションを実施した。その結果、TB1 が一旦 PAC3 二量体の表面に相互作用した後、界面を形成する β シートへと結合することでプロトマー間の相互作用を弱め、その解離を促すという作用機構が明らかとなった (図 1)。

このように本研究の成果は、NMR 実験と計算科学的アプローチの連携を通じて、生命分子の離合集散を制御するシステムを標的とする創薬の構造的基盤を与えるものである。

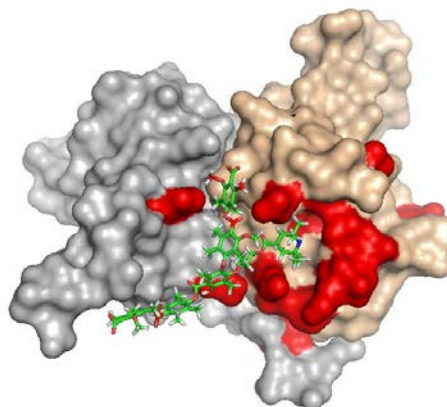


図1: PAC3 二量体と TB1 のドッキングシミュレーションモデル。赤色は常磁性 NMR 解析により見出された TB1 結合部位。



“Dynamical Ordering & Integrated Functions” Newsletter Vol.5

January, 2014

第2回国際シンポジウム 報告

佐藤宗太

(東北大学 原子分子材料科学高等研究機構
(WPI-AIMR)・A02 計画研究代表者)

大寒を控えた2014年1月11・12日に、京都駅からほど近いキャンパスプラザ京都にて、新学術領域「生命分子システムにおける動的秩序形成と高次機能発現」第2回国際シンポジウムが開催されました。2日間にわたり、きりつと肌寒いながらも天候にめぐまれ、本シンポジウムには、国内外より百数十名の参加者の皆様にお越しいただきました。皆様にこの場を借りて深く御礼申し上げます。



1月12日朝、晴天下のキャンパスプラザ京都。「大学のまち京都」のシンボル施設として、市民、地域社会、産業界、大学の交流のために京都市が設置したそうです。

本新学術では、
Newsletter でご

報告してきておりますように、これまでにサマースクールと国内むけの公開シンポジウムを開催してきております。今回、海外から関連領域でトップクラスの研究成果を挙げられている著名な先生方をお招きし、国際シンポジウムを開催する運びとなりました。本領域の研究を紹介させていただくとともに、世界的視野からの評価・議論を通じて、インパクトの大きな研究成果につなげたいと願い企画させていただきました。実は本領域の国内外の評価委員は、みな現役の研究者で、相互理解を深めるためにも本シンポジウムで最新の研究成果をご紹介いただきたく講演をお願いしたところ、ご快諾いただけました。本領域の研究内容に深く関連する8件の招待講演に加えて、加藤領域代表(自然科学研究機構)はじめ9名の研究計画代表者が講演いたしました。ポスター発表では、研究者・学生の皆様から百件にせまる発表をお寄せいただき、本シンポジウムの層の厚さを実感いたしました。

本稿では、紙面スペースの都合上、シンポジウムの全てを紹介することができませんので、代わりにプログラムを紹介させていただきます。

プログラム

新学術領域「生命分子システムにおける動的秩序形成と高次機能発現」第2回国際シンポジウム

2014年1月11～12日 キャンパスプラザ京都にて

【1日目】

9:20-10:00

領域紹介、“Exploration of micro-macro relationships in dynamic ordering of biomolecular systems and their underlying design principles”

領域代表・加藤晃一(自然科学研究機構)

10:00-10:30 “Incorporation of nonnatural amino acids into proteins and its application to regulation and analysis of proteins”

芳坂貴弘(北陸先端大)

10:50-11:20 “Signal-force transduction in axon outgrowth and guidance”

稲垣直之(奈良先端大)

11:20-12:00 “ADF/COFILIN proteins: dynamic regulators of actin function in health and disease”

Jim Bamburg (Colorado State Univ.)

13:30-14:30 ポスターセッション1

14:30-15:10 “Molecular self-assembly to functional nanomolecules and nano-objects”

Kari Rissanen (Univ. of Jyväskylä)



加藤領域代表から本領域の概要が説明されました。「分子の自発的な集合と離散がダイナミックにおこること」それが生命現象の特質ですが、いまだ説明されていない部分が多くあります。本領域では、分子に着目し、生命システムそのものや人工分子をつかって、最先端の実験的・理論的なアプローチの両面からこの課題解決にとりくみ、高次機能の発現のメカニズムに迫ります。



“Dynamical Ordering & Integrated Functions” Newsletter Vol.5

January, 2014

15:10-15:40 “Development of dynamical ordering of
artificial molecules by mimicking biomolecular systems”

佐藤宗太 (東北大学)

15:40-16:10 “Experimental investigation of the formation
mechanism of a self-assembled coordination capsule”

A02 班長・平岡秀一 (東京大学)

16:30-17:00 “Emergence of active site for self-reproducing
dynamics in vesicle-based protocell”

菅原正 (神奈川大学)

17:00-17:30 “Problems of protein folding and non-folding”

桑島邦博 (総合研究大学院大学)

17:30-18:10 “Dynamics of biomolecular systems studied
by NMR and further biophysical techniques”

Christian Griesinger (Max Planck Institute)

18:30-20:30 研究懇談会

【2日目】

9:30-10:10 “Solution SAXS analysis as a central method
for structural investigation of protein and peptide
fibrillation - published and emerging results”

Bente Vestergaard (Univ. of Copenhagen)

10:10-10:40 “Exploring regulatory association and
dissociation processes of biological molecules
constituting a functional module”

上久保裕生 (奈良先端大)

11:00-11:30 “Studies on molecular mechanism of dynamic
ordering and disassembling of biomolecular systems, and
development of time-resolved detection methods”

寺嶋正秀 (京都大学)

11:30-12:00 “A millimeter-size assembly of amino acids in
solution formed by laser trapping”

増原宏 (台湾国立交通大学, 奈良先端大)

13:30-14:30 ポスターセッション 2

14:30-15:00 “Molecular theories for self-organization and
order formation”

A01 班長・佐藤啓文 (京都大学)

15:00-15:30 “Generalized-ensemble simulations of
biological molecular assembly and artificial molecular
assembly”

岡本祐幸 (名古屋大学)

15:30-16:10 “Function of molecular chaperone GroEL
follows the Iterative Annealing Mechanism”

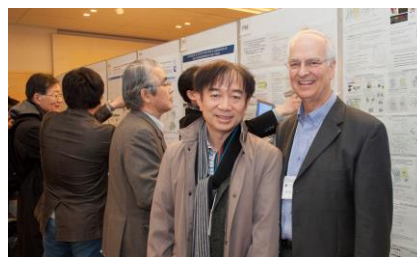
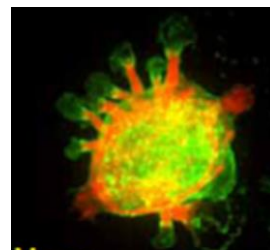
Dave Thirumalai (Univ. of Maryland)

16:10-16:15 まとめ

講演の紹介

招待講演を中心に本シンポジウムの内容を簡単な
ら紹介させていただきます。

アメリカのコロラド州立大学からお越し頂いた Jim
Bamburg 先生は、神経細胞の突起（軸索）が伸びてい
く機構を研究されており、コフィリンというタンパク
質を世界で初めて発見されました。軸索はアクチンと
いう細胞骨格タンパク質が集まって重合し、線維と
なって一方向にどんどん伸びていくのですが、同時に
根本のほうからはアクチンが脱重合してばらばらにな
り、原料が再び供給されるというエコなリサイクルシ
ステムが働いています。コフィリンはアクチン線維と
相互作用して脱重合過程、ひいては重合過程を制御す
るだけでなく、アクチン線維上を一方向に移動する
モータータンパク質であるミオシンとも競合すること
で複雑な細胞システムの調
和を司っています。右の写
真は遺伝子操作によってコ
フィリン発現しないよう
にした細胞の写真で、赤色
がアクチン線維、緑色が細胞
膜を示しています。コフィ
リンの働きが無くなること
で、細胞形態に異常が生じ
ることがわかります。細胞
内の動的な分子の集合・離
脱に関する基礎的な知見が
、病気の原因究明にも役立
つ一例だとよくわかりまし
た。



ポスター会場にてディスカッション中に、分野の関連が深い稲垣班員（奈良先端大）と一枚、記念撮影させていただきました。



“Dynamical Ordering & Integrated Functions” Newsletter Vol.5

January, 2014

フィンランドのユバスキュラ大学から来日して頂いた Kari

Rissanen

先生からは、主として単結晶 X 線構造解析手法を使って明らかになって



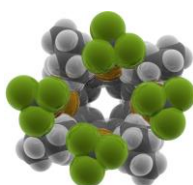
熱く講演される Rissanen 先生。長く柔軟な分子が精密に絡み合っコンパクトに固くまとまる様子を自分のベルトを使い分かりやすく解説していただきました。

きた、分子と分子の間に働く相互作用に関する研究をご紹介します。タンパク質とタンパク質が相互作用するとき、DNA の二重らせんが形成されるとき、大きなかご状分子に小さな分子が閉じ込められるとき、などなど、秩序が産まれるときには、必ず分子間の相互作用がはたらいています。水素結合や静電相互作用は古くからよく知られていますが、近年ではハロゲン結合やカチオン- π 相互作用、アニオン- π 相互作用なども知られるようになり、それらの弱い相互作用が巧みに組み込まれた、複雑で美しい分子集合体を自由自在に作り出せるようになってきています。例えば、ハロゲン結合と水素結合を組み合わせることで、右図のような花

瓶型の分子を 5 つの分子を組み合わせ



横から見た図



上から見た図

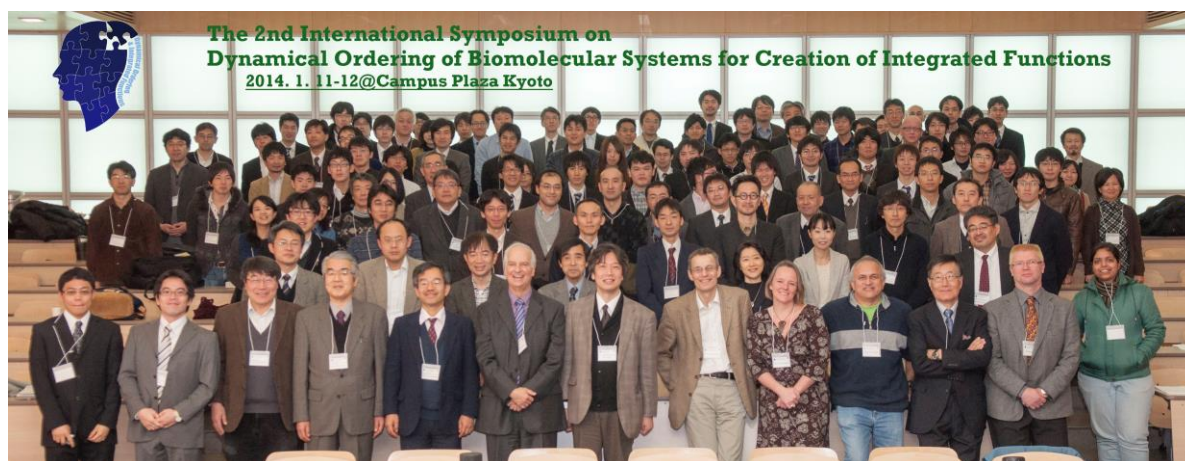
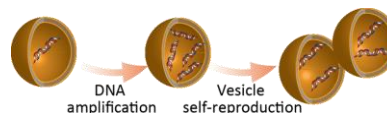
できます。立体的な分子の形をそのまま見られる単結晶 X 線構造解析の結果は、ただ眺めているだけでも楽しいですね。

評価委員も勤めていただいている神奈川大学の菅原正先生からは、あたかも生き物のように増殖する不思議な人工細胞の



研究懇談会でも、菅原先生のご研究について質問させていただきました。誰にもできなかった人工細胞の増殖コントロールについて嬉しそうに話っていました。

研究をご紹介します。細胞の人工モデルであるジャイアントベシクルの中に DNA と DNA 複製の酵素系を包み込んでおいて、温度昇降を繰り返すと人工細胞の中で同じ DNA が増えていきます。そこに細胞膜をつくる前駆体分子を加えるだけで、前駆体が加水分解されて人工細胞が自然と分裂して増殖します。DNA・カチオン性膜分子・両親媒性触媒で形成される活性中心が重要な役割をはたしているとのことです。興味深いことに、分裂したベシクルにも複製された DNA が分配され、同じ人工細胞がどんどん増殖します。人工系でも自然界のしくみをうまく真似てあげると、動的な物質の出入りを制御でき、細胞増殖まで精緻にコントロールして再現できることが印象的でした。



溢れんばかりの集合写真。多くの方にご参加いただきました！！



“Dynamical Ordering & Integrated Functions” Newsletter Vol.5

January, 2014

評価委員も
勤めていただ
いている総合
研究大学院大
学の桑島邦博
先生は、タン
パク質の折り
たたまれた 3
次元構造

(フォール
ディング構造)
の形成と、非

フォールディング構造への変化、その生体内での機能
をご研究されています。フォールディングにより生理
機能が生まれ、その構造は熱力学的に最安定な構造で
ある、ということは大学の学部授業でも習う基礎的な
“常識”なのですが、必ずしもあてはまらない不思議
な例があります。一例として、 α -ラクトアルブミン-
オレイン酸複合体は、フォールディング構造が部分的
に失われた状態でがん細胞に対する選択的な細胞毒性
が発現することがわかってきました。このようなご研
究においては、世界最大級の強磁場をもつ高分解能な
920 MHz NMR を使った構造解析が役に立ち、オレイ
ン酸が結合する部分を世界で初めて決定することがで
きたとご紹介いただきました。また、示差走査熱量測
定 (DSC) を解析することで、非フォールディング構
造への速度論的な変成過程を研究できるようになり、
“常識”に反する、重要なタンパク質の構造・機能を
解明できるとのことです。広く信じられている高い秩
序構造ではなく、部分的に秩序の失われた構造に生体
機能が宿る実例を目の当たりにして、常識にとらわれ



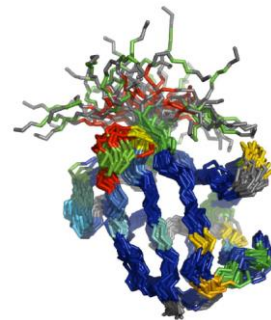
会場から質問される桑島先生。的確なご質問をいくつもいただき、本国際シンポジウム全体を盛り上げていただきました。



ポスターセッションでも熱心にディスカッションされている Griesinger 先生。気さくな方で、セッション以外でも色々とお話させていただきました。

ず重要な研究をすることの価値を再認識させられました。

評価委員も勤めていただいているドイツのマックス・プランク研究所からお越しいただいた Christian Griesinger 先生は、さまざまな NMR 解析手法を駆使し、他の生物物理学的な手法と併せて、ピコ秒から秒にわたる広いタイムスケールでおこるタンパク質の動
的な変化を明らかにされてきています。タンパク質の
3 次元構造は特定の単一構造ではなく、実は、相互に
変換されているいくつかの安定構造があります。たと
えばユビキチンというタンパク質の溶液状態における
安定な構造を、NMR を
中心に解析すると、右図
のように比較的構造が固
まった部分 (下半分) だ
けではなく、いくつかの
異なる構造をもった部分
(上半分) からなること
がわかります。このよう
な動的構造を理解するこ



とで、従来のモデルでは理解され得なかった生命現象
のメカニズムに迫ることができ、さらには、タンパク
質の変成が関与する病気の原因を特定できるなど、極
めて重要な知見が得られます。専門的な測定法をうまく
組み合わせると、独自の美しい結果が得られる
ことが印象的でした。

デンマークのコペンハーゲン大学よりお越しいただ
いた Bente Vestergaard 先生は小角 X 線散乱解析とい
う手法を駆使し、タンパク質やペプチドの線維化現象
について研究
を展開されて
きています。こ
のような線維
化は、パーキン
ソン病やアル
ツハイマー病
の原因となる
ので、その生成
過程を調べる
ことは重要で



シンポジウムの 2 日目の最初にご講演いただいた Vestergaard 先生。2 日目も変わらず盛況な会場で、熱心な討論がなされました。



“Dynamical Ordering & Integrated Functions” Newsletter Vol.5

January, 2014

す。しかし、溶液に溶けていたタンパク質やペプチドが、比較的小さな中間体構造を経た後に、無限構造をもつ固体へと多段階で変化していくので、研究するのが難しい対象でもあります。本講演では、溶液中に溶けている物質の大きさや形状を計測できる小角X線散乱解析によって、線維化の途中段階を調べる研究についてご紹介いただきました。基本的に同じ出発物質からスタートしても違う形状の線維が最終的に得られることがあり、実は比較的小さな中間体が最終生成物の形状を決定していることを拝聴しました。一見、不可解な現象でも、適切な実験手法・考え方をつかって取り組むことで、複雑な秩序化システムを一つ一つ納得の行く形で理解できるようになることがわかりました。

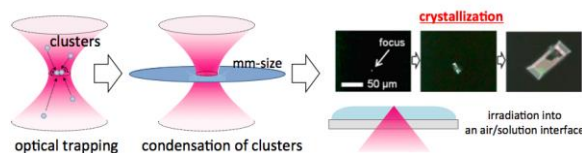
評価委員も勤めていただいております。台湾からお越し頂いた**台湾国立交通大学・奈良先端大の増原宏先生**は、光で分子の結晶化を操る研究をされています。分子同士が規則正しく並んで固体になると、宝石のように透過した多角形の美しい結晶が得られます。しかし、この分子の秩序化を制御することは、とても小さな分子の集まり（クラスター）からなる結晶の種を作り出し、次にそれを大きく成長させる2段階の過程を厳密に制御しなければならないために、必ずしも容易ではありません。



台湾国立交通大学の写真を前に質問に答える増原先生。楽しそうに研究の話をされる姿が印象的でした。

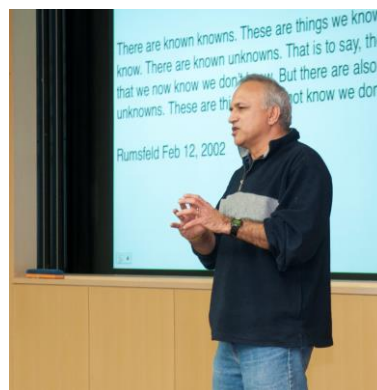
増原先生は、下図のように近赤外レーザー光をアミノ酸の溶液に照射することで、光の焦点でクラスターをつかまえ、溶液と空気との境目や、溶液と基板との境目を活用してクラスターを濃縮し、平面的に成長させることに成功しています。溶液を濃縮するなどの通常の方法では0.1ミリくらいの結晶であれば比較的容易に作れますが、この手法を使うと、ミリメートルにもおよぶアミノ酸の美しい単結晶を確実に作れます。光と界面とを組み合わせる独特な方法で、分子の集合を

コントロールして、目に見える大きさの秩序を生み出す美しさを感じました。



アメリカのメリーランド大学から来日された Dave Thirumalai 先生は、コンピューターを使って分子の動きを予測する研究をされており、特に、大きなタンパク質を対象とした独自の計算アプローチを開発されてきております。細胞内では、できかけのタンパク質や熱的に壊れかけたタンパク質などの、3次元構造が部分的にほどけたタンパク質を包み込み、内部で「修復」してくれる（自然の立体構造への正しい折り畳みを完成させてくれる）分子シャペロンと呼ばれるタンパク質があります。大きなタンパク質を、もっと大きなタンパク質が閉じ込める機構が存在し、そこでは、変性して疎水性部分が表面に露出したタンパク質を分子シャペロンが認識する相互作用が生じています。

Thirumalai 先生は、分子シャペロンが一発で変性を治すのではなく、変性タンパク質を閉じ込めたり離したりすることを繰り返して行くと、最終的にきちんと秩序だった構造のタンパク質へと導いていく様相を計算化学の手法で明らかにされました。このモデルは、実際の細胞システムで観測される現象ともよく一致します。非常に大きな構造の複合体なので複雑で、計算に組み込まなければいけない要素が数多くある生体システムから、重要なポイントをピックアップして独自の手法を生み出す力強さに圧倒され、また、理論化学がここまで強力な生命科学のツールになることに驚きました。



ご講演中の Thirumalai 先生。最後に Donald Rumsfeld の言葉を引用して、化学者には自明のことと、不明のことがありますが、もっと重要な事には、わたくし達が理解できていない、ということすら気づいていない未知の現象があるのだ、ということ forcefully いただきました。どこに根源的な科学の問題があるのか、考えさせられるご講演でした。

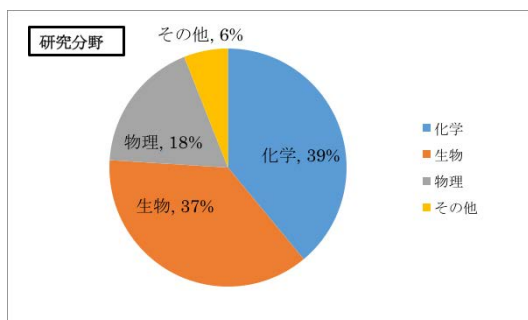


“Dynamical Ordering & Integrated Functions” Newsletter Vol.5

January, 2014

アンケート

本国際シンポジウムでご記載いただいたアンケートの結果についてご紹介いたします。150名余りの参加者の内、75名の方から回答を頂きました。本新学術領域は、生命科学、超分子化学、理論化学を中心として、幅広い学問分野にわたり展開することを計画しております。参加者のバックグラウンドとなる研究分野も、下の円グラフにありますように、呼応して幅広いものとなりました。シンポジウム会場で見知らぬ研究者が多い、という感想をお聞きしており、このような、普段は混ざり合わない研究者の相互作用を通じて、興味深い結果が秩序だって得られるようになることを切に願っております。



アンケート集計

1. 本領域の研究目的について
よく理解できた 25名
理解できた 33名
ふつう 9名
あまり理解できなかった 4名
2. 本シンポジウムを終えて本領域に対する関心
とても関心がある 47名
関心がある 24名
ふつう 2名
3. 本領域とご自身の研究との関わりについて
とても近い 31名
ある程度近い 31名
ふつう 6名
ややかけ離れている 4名
4. 本シンポジウムについて
大変満足した 45名
やや満足した 23名
ふつう 4名

参加者の皆様から、本国際会議につきまして、概ねご好評いただけたことがわかりました。アンケートへのご協力、ありがとうございました。

アンケートの詳細を拝見いたしますと、海外から招待講演に来て頂いた先生方の研究が面白いという声や、講演に対するディスカッションの時間不足やポスター発表時間の不足を指摘いただく声が寄せられておりました。優れた発表に対して、分野が幅広い分だけ、相互理解のためにはより時間をかけた討議が必要であるということがわかりました。今後、様々な形態で、本領域に関連するシンポジウムやワークショップを企画させていただきます。より有意義な会になるように、皆様の声を運営に反映させていただこうと思っておりますので、今後とも忌憚のないご意見を賜りますようお願い申し上げます。

おわりに

本シンポジウムは、成人の日で華やぐ連休の京都で開催させていただきました。参加者の皆様には混雑する中ご迷惑をおかけすることもあったかと思いますが、この時期ならではの京料理などもご堪能いただけたのではないかと考えております。「和食」がユネスコの無形文化遺産に登録されたのは記憶に新しいところです。海外からいらした講演者の方々と食事をご一緒した時にも、お正月にふさわしい縁起の良い和食器に盛りつけられたお料理をいただきました。

ひとつひとつの食材に特別な意味が込められていることに、とても興味をもっていただけました。



本領域は、やっと立ち上がったばかりの新成人。加藤代表からもご紹介いただきましたが、web上で「秩序」で検索すると、本領域は百科事典サイトなどを除いてトップでヒットするようになりました。本国際シンポジウムを門出に、世界中からも注目される力強い研究領域になるよう、これからも良い研究成果を目指して邁進させていただく所存でございます。



第2回国際シンポジウム印象記

桑島邦弘

(総合研究大学院大学・評価委員)

本年1月11日(土)と12日(日)に京都で開催された、本新学術領域研究のシンポジウムは、大変すばらしいものでした。お世話をされた佐藤先生(京大)を始めスタッフ、大学院生の皆さんに感謝申し上げます。

さて、本新学術領域研究「生命分子システムにおける動的秩序形成と高次機能発現」の特色は、生命分子科学の領域と超分子化学の領域の融合を目指そうとしている点にあると思います。シンポジウムにおいても、これら二つの領域と、これらに関わる理論やシミュレーションの発表が沢山ありました。しかし、現段階ではまだ、各研究領域の発表が、それぞれ、独立で全体がまだ模様になっている印象を受けました。今後、これらの研究領域間の、また、それらを結びつける理論シミュレーションの研究との相互作用が深まり、全体がまだ模様ではなく、より一層の輝きを増すようになることを期待します。



会期中に総括班会議を開催しました。

そのためには、異なる研究領域間の共同研究を、新学術領域研究として奨励ないしは募集し、採択された共同研究には総括班からサポートをするなどの試みが有効かも知れません。事実、このような試みは、筆者が計画班員として活動した新学術領域研究「揺らぎと生体機能」でなされ、うまく機能したと理解しています。また、筆者が領域代表をつとめた特定領域研究「水と生体分子」では、このような共同研究を、領域発足当初より、コア研究プロジェクトとして位置づけ奨励していました。

最後に、今回のシンポジウムで気付いたこととして、ポスター発表の時間が挙げられます。時間が1時間しかなかったため、全部を丹念に見て回ることが出来ませんでした。特に、次回からは、公募研究の班員がポスター発表し、これが班員の成果発表となるわけですから、少なくとも2時間はポスター発表に割くべきかと思います。そのためには、招待講演者の数を減らす、シンポジウムの時間を延長するなどの工夫が必要かも知れません。

全体としては、すばらしいシンポジウムでした。今後の展開、期待致します。

新学術領域「動的秩序と機能」関連シンポジウム 今後の予定

- ・機能超分子化学ミニシンポジウム

東京大学 3月11日(火)

- ・ Science of Molecular Assembly and Biomolecular Systems 2014

名古屋大学 3月12日(水) - 13日(木)

- ・ Nagoya Symposium on Depletion Forces: Celebrating the 60th Anniversary of the Asakura-Oosawa Theory

名古屋大学 3月14日(金) - 15日(土)