



業績紹介：機能を生み出すドメイン間相互作用の時間分解計測

“Dynamics of the Amino-Terminal and Carboxyl-Terminal Helices of Arabidopsis
Phototropin 1 LOV2 Studied by the Transient Grating”

Kititoshi Takeda, Yusuke Nakasone, Kazunori Zikihara, Satoru Tokutomi,
and Masahide Terazima

J. Phys. Chem. B **117**, 15606–15613 (2013) DOI:10.1021/jp406109j

寺嶋正秀

(京都大学・A01 計画研究代表者)

反応に伴う分子間の構造形成や崩壊、また同様にドメイン間の相互作用は、機能を生み出すために必須であり、その時間分解検出は機能の分子論的理解のために非常に重要となる。しかし、そうした高次構造の時間分解検出法は限られており、時間分解能や検出感度の点で改良が望まれている。ここでは、我々が用いている過渡回折格子(TG)法によって、フォトトロピン(Phot)と呼ばれる光センサータンパク質の高次構造変化を高感度でとらえた結果について報告する。

Photは高等植物の光屈性や気孔の開閉といった生理機能を制御する青色光センサータンパク質であり、その構造はN末端側に光受容を担う2つのLOV(Light-Oxygen-Voltage)ドメイン(LOV1, LOV2)、C末端側にキナーゼドメイン、そしてキナーゼとLOV2を結ぶ領域のリンカードメインから成る。2つのLOVドメインのうちLOV2がキナーゼの活性を制御しており、その信号伝達にはLOV2のC末端側に位置するヘリックス($J\alpha$)の構造変化が重要だと広く認識されてきた。しかし近年、そうしたスキームに対して、N末端側の小さなヘリックス($A'\alpha$ ヘリックス)が $J\alpha$ ヘリックスの構造変化を制御しているのではないかという提案がMDシミュレーションなどをもとに提案された。ここでは $A'\alpha$ と $J\alpha$ の相互作用および $A'\alpha$ の構造変化ダイナミクスを明らかにするために様々な変異体を作成し、これらのドメイン間相互作用に関する反応ダイナミクスを調べた。

まずCDスペクトルの測定より、確かにPhotのLOV2から $A'\alpha$ ヘリックスを取り去ることによって $J\alpha$ ヘ

リックスの安定性が失われ、部分的にヘリックス構造が壊れることがわかった。

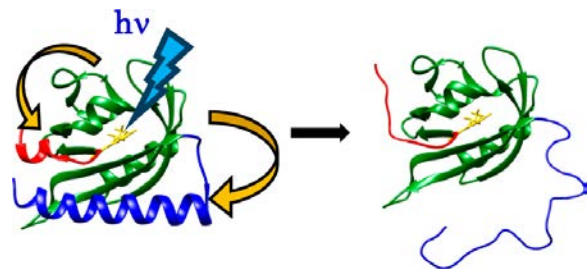


図1：N末端側のヘリックス(赤)の崩壊とC末端側のヘリックス(青)の崩壊は独立に起こり、それぞれがキナーゼドメイン(図では略されている)活性を制御している。

これはN末端側とC末端側のヘリックス間相互作用を実験的に示すものである。しかし、意外にも $A'\alpha$ ヘリックスを壊すような変異をかけても $J\alpha$ ヘリックスは壊れなかった。そこでTG法により、 $A'\alpha$ ヘリックスを壊した変異体や $J\alpha$ ヘリックスを壊した変異体について、それぞれの部位の構造が変化するダイナミクスを調べたところ、 $A'\alpha$ ヘリックスを壊した変異体でも $J\alpha$ ヘリックスの壊れる速度は変わらなかったばかりか、 $A'\alpha$ ヘリックスの壊れる速度の方が $J\alpha$ ヘリックスの壊れる速度よりも遅いことが明らかとなった。以上の結果などを総合的に考察し、これまでに報告されたスキームと異なり、 $A'\alpha$ と $J\alpha$ という二つのヘリックスはそれぞれ独立に構造変化しているという結論を導いた(図1)。

このように、TG法を使うことで機能にとって大切なドメイン間相互作用を時間分解で観測することに成功した。同様の手法により、分子間相互作用の時間分解観測も可能になるはずである。



業績紹介：交互置換型ヘキサフェニルベンゼン誘導体の新規合成法の開発

“Selective Alternate Derivatization of the Hexaphenylbenzene Framework
through a Thermodynamically Controlled Halogen Dance”

Tatsuo Kojima and Shuichi Hiraoka

Org. Lett. 16, 1024-1027 (2014) DOI: 10.1021/ol500041j

平岡秀一

(東京大学・A02 計画研究代表者)

有機化合物の合成法の開発は本新学術領域研究と無関係に思われるかもしれない。実際、今回ご紹介する研究成果が直接的に生命の動的秩序の何かを解明するものではない。我々は、本領域で人工的につくりだされた自己組織化体を対象に、弱い分子間相互作用が集合体へ及ぼす寄与を探索する研究を進めている。その中で、図1に示す2つのピリジニウムと1つのピリジンを持つ歯車状の分子が水中で自己集合し、箱型6量体”ナノキューブ” $[1_6]^{12+}$ を一義的に形成することを見出している。この集合体の形成の駆動力は疎水効果と分子間に働く van der Waals 力である。 $[1_6]^{12+}$ は 80 °C においても安定であり、1 μ M の低濃度でも解離することはない。また、ナノキューブの内部には 1 nm 径の疎水空間が存在し、小分子を取り込むことができる。本領域では、上記のナノキューブの持つ一義的な分子構造を利用し、分子間の”噛み合い”を定量的に解釈することを目的としている。

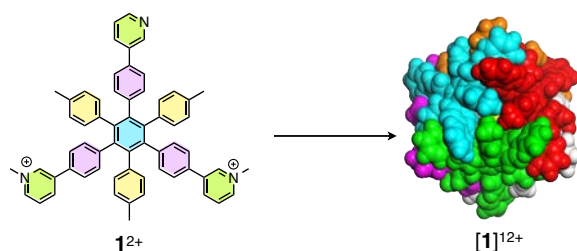


図1：ナノキューブの形成

この研究には、多様な歯車状分子を調整し、それぞれのナノキューブにおける噛み合いを評価する必要があるが、 1^{2+} に見られる C_{2v} 対称のヘキサフェニルベンゼン(HBB)骨格はこれまでの合成手法では手の届かぬものであった。というのも、 1^{2+} よりも対称性の高い交互型分子 **I** (図 2a) の合成は、これまで非対称アルキン **III** の三量化によって合成されており、望まぬ異性体 **II** が **I** の 3 倍も生成し、**I** の収率は実質 10%程度と極めて低い。この手法を用いて、 1^{2+} と同タイプの分子(**IV**)

を合成しようとする2種類の非対称アルキンが必要となり、目的とする **IV** は統計的に 11%生成し、これを全 12 種類の異性体の中から分離するという途方もない困難を伴うのである。事実、これまで **IV** タイプの合成報告はない。我々はこの問題を、入手容易な対称性の高い誘導体に対し選択的な低対称化を行う新手法を開発することにより解決した。

HBB に 6 つの臭素を導入した **2** に対して 6 当量の *t*-BuLi を作用させ、室温で暫く待つと、交互型の分子が高選択的に生成することが明らかとなった。これに対し様々な求電子剤を加えると、3 つの臭素を多様な置換基に変換できる。さらに、残る 3 つの臭素を足がかりに様々な C_3 対称性の分子の合成が驚く程簡便に達成できるようになった。一連の反応はグラムスケールで実施可能なため、従来法を塗り替える安価かつ簡便な合成ルートである(特願 2013-45547)。この手法を 5 つの臭素をもつ分子 **3** に対して行くと、**IV** タイプの分子を合成でき、本研究で目指す多様な歯車状分子の合成基盤が確立された。但し、現状では **3, 4** に示すように電子求引性の置換基を持つ分子に限られる。この問題を解決することでさらに本手法の可能性が広がることになり、現在、改良法の開発を進行中である。

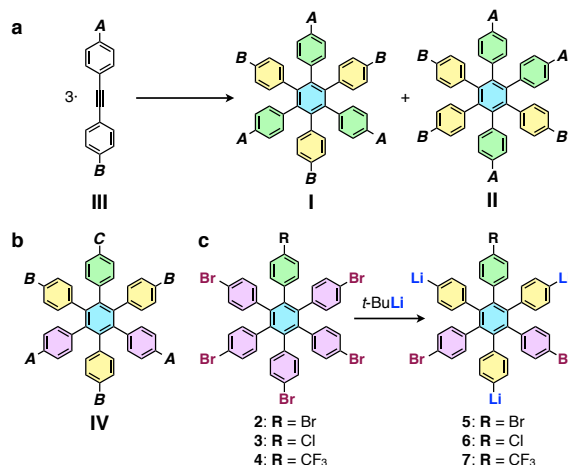


図2：交互型置換HBBの合成の従来法(a), 本研究で目的とする分子骨格(b), および新規合成法(c)



業績紹介：非天然アミノ酸の導入によるレクチン-糖基質結合の蛍光検出

"Incorporation of Fluorescent Nonnatural Amino Acid into Sialic Acid-Binding Lectin for
Fluorescence Detection of Ligand-Binding"

Yasutaka Ito and Takahiro Hohsaka

Bull. Chem. Soc. Jpn. **86**, 729-735 (2013) DOI:10.1246/bcsj.20120345

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)

レクチンは細胞表面の糖鎖を認識して細胞の機能発現に寄与するなど重要な生体分子である。その一方で、レクチンは多様な糖鎖を識別して結合することから、糖鎖分析における有用なツールとなる。通常、レクチンと糖基質の検出は、蛍光標識された糖基質や抗レクチン抗体などを用いて間接的に行なわれているが、本研究では、蛍光標識された非天然アミノ酸をレクチンの基質結合部位の近傍へ導入することで、糖基質の結合を蛍光強度変化として直接的に検出することを試みた。このような部位特異的な蛍光基の導入により、基質非結合時には、基質結合部位に存在する Trp 残基(糖結合タンパク質は糖基質との疎水性相互作用のために基質結合部位に Trp 残基を有していることが多い)によって蛍光基が消光されるが、基質の結合に伴い蛍光基が Trp 残基から離れて蛍光消光が解消されると予想された(図1)。

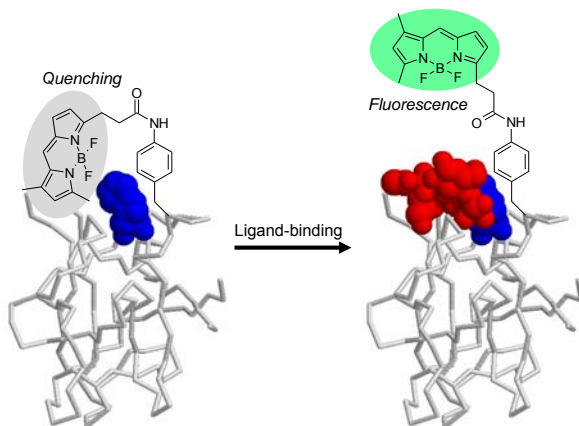


図1： 蛍光標識アミノ酸の部位特異的導入によるシアル酸結合レクチン-糖基質結合の蛍光検出。

今回はモデルタンパク質として、Earthworm 由来ガラクトース結合レクチンの改変により得られたシアル酸結合レクチンを使用した。アンバーコドンを用いた非天然アミノ酸導入技術を利用して、基質結合部位近傍の8ヶ所のアミノ酸残基部位に蛍光標識非天然アミノ酸として BODIPYFL-aminophenylalanine を導入した。基質となるシアリルラクトースの添加に伴う蛍光スペクトル変化を測定したところ、複数の部位で蛍光強度の増加が観察された。特に Thr38 部位に導入した場合には、3.7 倍の蛍光強度の増加が認められた(図2)。また、基質結合部位の Trp を Phe に置換した場合には蛍光強度の増加が低下したことから、蛍光変化は主に Trp による消光の変化によって生じていると考えられた。さらに、蛍光寿命測定から、基質非結合時には蛍光消光に由来すると思われる短寿命成分が観測され、基質の結合によりその成分比が減少しており、このことから蛍光消光が基質の結合により解消されたと考えられた。今後、本手法は、生命機能発現におけるレクチン-糖鎖間相互作用を直接的に計測するための有用なツールとなると期待される。

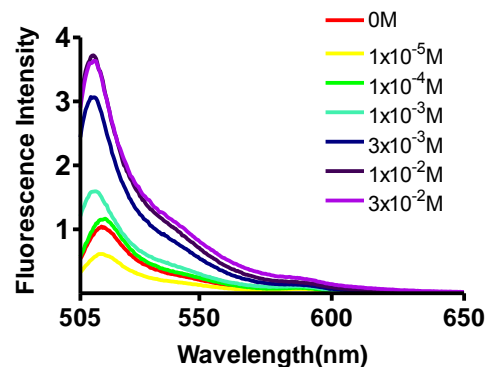


図2： 蛍光標識アミノ酸を Thr38 部位に導入したシアル酸結合レクチンの糖基質結合に伴う蛍光スペクトル変化。



業績紹介：積荷受容体 ERGIC-53 は同一の糖鎖リガンドに対して
2通りの異なった様式で相互作用する

“Structural Basis for Disparate Sugar-Binding Specificities in the Homologous Cargo Receptors
ERGIC-53 and VIP36”

Tadashi Satoh, Kousuke Suzuki, Takumi Yamaguchi, and Koichi Kato

PLoS ONE, 9, e87963 (2014) DOI:10.1371/journal.pone.0087963

佐藤匡史

(名古屋市立大学大学院薬学研究科・A03計画研究分担者)

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)

真核細胞の中には脂質 2 重膜によって仕切られた細胞内小器官 (オルガネラ) が存在し、それぞれのオルガネラは独自の機能を担っている。これらオルガネラは、輸送小胞を介して相互に積荷 (タンパク質や脂質など) のやりとりを行っている。タンパク質の主要な翻訳後修飾として付加される *N* 型糖鎖は、この細胞内輸送システムにおいて適正な完成品となって出荷するための荷札として機能している。すなわち、積荷受容体の多くは送り手側のオルガネラ内において *N* 型糖鎖を介した相互作用を介して積荷を積み込み、受け手側のオルガネラへと配送する運び屋タンパク質として機能している。小胞体-ゴルジ体間では、ERGIC-53 および VIP36 が積荷タンパク質の選別・積み込みを行う積荷受容体として機能している。

これまでに筆者らは、VIP36 はグルコース残基が取り除かれた高マンノース型糖鎖と特異的に結合すること、一方 ERGIC-53 の糖鎖結合特異性はあまり厳密ではなく、グルコース残基の有無を問わず α 1,2 結合したマンノース 2 糖を有する高マンノース型糖鎖と結合することを見出してきた。ERGIC-53 は小胞体ストレス応答性のタンパク質であることから、ERGIC-53 は小胞体ストレスなどの緊急時において、曖昧な結合特異性を介して糖タンパク質をゴルジ体へと輸送している可能性が示唆されている。

こうした異なる糖鎖結合特異性を有する積荷受容体の機能の理解を深めるためには、糖鎖と積荷受容体の相互作用様式の詳細を知ることが重要である。これまでに、筆者らによる VIP36 の立体構造解析を通じて、

高マンノース型糖鎖にグルコースが結合すると立体障害を引き起こすことが見出され、グルコシル化選別能のメカニズムが明らかにされている。

本研究では、3 糖からなる α 1,2 マントリオースと ERGIC-53 の複合体の立体構造を X 線結晶構造解析により解明した。ERGIC-53 は VIP36 の 261 番目のアスパラギン酸にあたるアミノ酸残基がグリシンに置換されており、そのため糖鎖結合ポケットは浅くなっている点の特徴であった。すなわちこのたった 1 残基のアミノ酸の違いを通じて、ERGIC-53 は幅広い糖鎖結合特異性を獲得していることが明らかとなった。

また興味深いことに、ERGIC-53 は 2 通りの異なった様式でモノグルコシル化した高マンノース型糖鎖と相互作用することが推測された (図 1)。このような 2 通りの結合様式が混在し、1 つのレクチンが同一の糖鎖構造に対して異なった認識の仕方をするという事象は、単一の糖鎖であってもそれが担うメッセージは多義的であるという可能性を示唆している。

本研究の成果は、積荷受容体を介した糖タンパク質の細胞内輸送システムの理解に通じるばかりではなく、糖鎖とタンパク質間の分子認識に代表される弱い相互作用を介した生命分子システムの動的秩序形成原理の理解に通じるものと考えている。

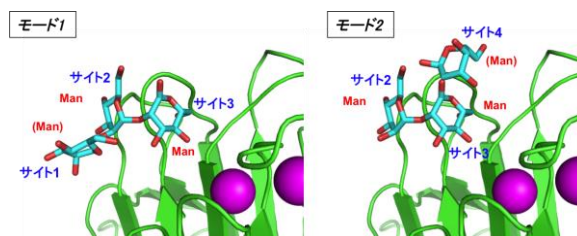


図 1 : ERGIC-53 による 2 通りの異なる糖鎖相互作用様式



研究解説:

パーキンソン病に關与する α -synuclein
オリゴマーの同定と構造解析

“Low-resolution Structure of a Vesicle disrupting α -synuclein Oligomer that Accumulates during Fibrillation”

Lise Giehm, Dmitri I. Svergun, Daniel E. Otzen, and
Bente Vestergaard

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **108**, 3246-3251 (2011).

[DOI:10.1073/pnas.1013225108](https://doi.org/10.1073/pnas.1013225108)

上久保裕生

(奈良先端科学技術大学院大学物質創成科学研究科・A01 計画研究代表者)

細胞内では、多種多様な蛋白質が協奏的に振る舞うことによって生理機能を実現している。物理化学的に言えば、複数の成分が(速度論的)平衡状態に有り、活性種の増減に伴って異なる平衡状態にシフトすることで生理学的な応答を示しているといえる。構造解析に代表される研究手法では、系の単分散性を前提としており、多成分系における蛋白質群の平衡状態を解析することは困難である。その中で、溶液散乱測定法は多成分からなる平衡状態を解析する上で有力な手法の一つといえる。実際、ヨーロッパ諸国では、溶液散乱測定を単なる構造解析法という枠組みではとらえておらず、生きた状態に近い蛋白質集団の評価手法として注目している。先の国際シンポジウムでは、Bente Vestergaard 博士をお招きしご講演いただいた。ここでは、博士の業績を取り上げ、溶液散乱測定法の活用法について紹介する。

博士は、特に蛋白質の繊維状凝集に注目し、X線溶液散乱法を活用した研究を展開している。この論文では、特にパーキンソン病の原因因子の一つと考えられている α -synuclein の繊維状凝集形成過程の詳細な解析結果を報告している。 α -synuclein 凝集は、単量体、二量体、オリゴマー、そして、繊維状凝集体などの様々な会合状態が関与する複雑な過程からなる。中でも、オリゴマーは細胞膜への毒性が報告されており、疾患の直接的な原因因子の一つであると考えられている。しかしながら、先に示したとおり凝集形成は複数の

成分が共存する過程で有り、各々の関連性や個々の会合体を分離して分析することは非常に困難であった。博士らは、凝集過程にある α -synuclein の X 線溶液散乱曲線を時系列に測定し、各成分由来の散乱曲線を同定し、その存在量の時系列変化を解析した(図1)。これは、形が異なれば異なる散乱曲線を示し、かつ、観測される散乱曲線は存在量で重みをつけた各散乱成分の単純な和で表される特徴を利用したものである。

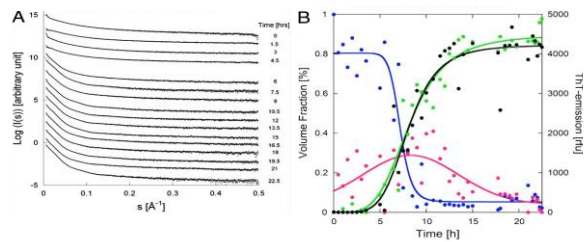


図1: (A) α -synuclein 繊維状凝集形成過程を時系列的に観測した X 線溶液散乱曲線。(B) 繊維状凝集形成(ThT 蛍光・緑)に先立って、オリゴマー(ピンク)が形成されていることがわかる。

通常、異なる成分を分離するためには、それぞれに異なる印をつける必要がある。一方、形を区別している X 線溶液散乱では、特別な印をつけることなく全ての成分を区別することができ、単量体、オリゴマー、繊維状凝集体に由来する成分を全て分離することが可能となる。

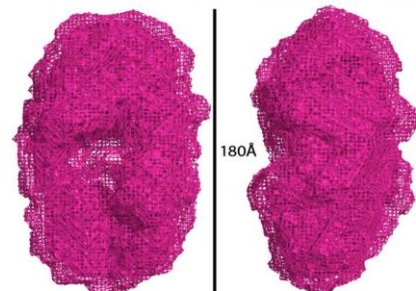


図2: 繊維状凝集体に先立って形成されるオリゴマーの溶液構造。排除体積から約 16 個の α -synuclein からなるオリゴマーであることがわかる。

この結果、オリゴマーが繊維状凝集体の前駆体であることが示されたのと同時に、その溶液構造が初めて明らかにされた(図2)。中央にくぼみのある花輪状の構造を示していることが見て取れ、細胞膜への作用機構が明らかにされつつある。この成果は、溶液散乱測定法が、我々が中心課題に据える、集合・離散を伴う様々な複合体が共存する系(動的秩序)を解析する上で有力な方法であることを示す良い実例であるといえる。