



業績紹介：逆コントラストマッチング中性子小角散乱法による複合体形成中の天然変性タンパク質の構造解析

“Conformational Characterization of a Protein Complex Involving Intrinsically Disordered Protein by Small-angle Neutron Scattering Using the Inverse Contrast Matching Method: a Case Study of Interaction between  $\alpha$ -synuclein and PbaB tetramer as a Model Chaperone”

Masaaki Sugiyama, Hirokazu Yagi, Takumi Yamaguchi, Kentaro Kumoi, Mitsuhiro Hirai, Yojiro Oba, Nobuhiro Sato, Lionel Porcar, Anne Martel, and Koichi Kato

*Journal of Applied Crystallography*, **47**, 430-435 (2014) DOI:10.1107/S1600576713033475

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を形成する生命分子素子の構造変化を解明する上で、X線結晶構造解析は強力なツールとして用いられてきた。しかしながら、特定の2次構造を持たない天然変性タンパク質に対しては、その詳細な相互作用解析が困難である。私たちはこれまでに重水素標識を利用した中性子小角散乱(SANS)法により、タンパク質複合体中の特定の構成要素の構造情報を抽出し、そのダイナミクスと作動機構を探索することを試みてきた。本論文ではSANSを用いて、複合体を形成している天然変性タンパク質からの溶液散乱のみを選択的に観測し、X線結晶構造解析やNMR解析がもたらす情報と組み合わせ、相互作用の様式を明らかにした。タンパク質複合体のモデル系として天然変性タンパク質である $\alpha$ -synuclein( $\alpha$ SN)と古細菌由来のシャペロン分子であるPbaBホモ4量体を用いた。

中性子散乱の特徴は、生体分子中の軽水素を重水素で置換することにより散乱長密度を変化できることである。溶液中の溶質の散乱は、溶媒と溶質の散乱長密度の差(コントラスト)の2乗で与えられるため、溶媒とPbaBの散乱長密度を一致させれば、試料中のPbaBの散乱は観測されず、 $\alpha$ SNの散乱のみを抽出することができる。そこで、あらかじめPbaBのアミノ酸残基組成に基づいて、重水中でPbaBのコントラストが“ゼロ”になる重水素標識化率74.5%を求めた。次に、大腸菌発現系を利用して75%重水素標識を施したPbaBを調製し、これを非標識 $\alpha$ SNと混合した後、重水中でSANSを行った。期待通り、重水中では75%重水素化したPbaBのコントラストはほぼ0であり、複

合体中の非標識 $\alpha$ SNからの散乱のみを観測することができた。解析の結果、 $\alpha$ SNはPbaBに捕捉されることにより、慣性半径が単独の状態と比べ有意に小さくなることが明らかになった(図1)。また、 $\alpha$ SNは分子の一部に僅かながら2次構造を有しているが、PbaBの結合に伴いこの構造が崩れることも見出した。先行研究により、 $\alpha$ SNはN末端近くの領域に部分的に $\alpha$ -ヘリックスを形成していることが示されている。興味深いことに、本研究において実施したNMR解析により、 $\alpha$ SN上のPbaBの結合部位はこの領域と一致していることが明らかとなった。このようにSANSとNMRの連携を通じてPbaB4量体との結合に伴う $\alpha$ SNの構造変化を捉えることができた。

本論文で示したように、重水素化標識を用いたSANSは、複合体を構成する特定のタンパク質の構造変化を観測することが可能であるため、天然変性タンパク質を含むタンパク質集団の動的秩序形成におけるマイクロ-マクロ相関を探索する上で、強力なツールとなることが期待される。

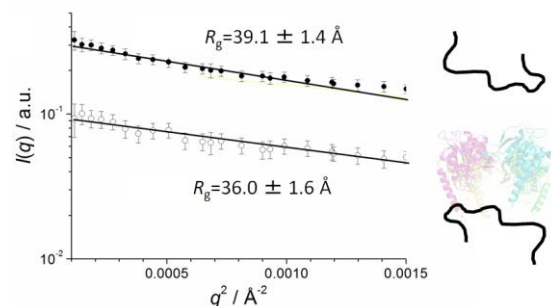


図1：ギニエプロットから導かれた $\alpha$ SN単独およびPbaBとの複合体中の $\alpha$ SNのみ慣性半径( $R_g$ )を示す。

●PbaB非存在下、○PbaB存在下



**加藤グループの年森隆泰さんが  
生物物理学会中部支部講演会にて優秀発表賞を受賞**

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)

2014年3月6日岡崎カンファレンスセンターにて開催された平成25年度生物物理学会中部支部講演会において、私たちの研究グループの年森隆泰さん(名古屋市立大学薬学部・生命薬科学科4年生)が「小胞体品質管理に関わるグルコシダーゼIIの基質認識機構の構造基盤」の研究発表によって、優秀発表賞を受賞いたしました。生物物理学会中部支部会は、8県(愛知、三重、岐阜、静岡、長野、福井、石川、富山)とその周辺地域における日本生物物理学会員の交流を深め、同地域の研究教育活動の振興を図るべく2003年に設立されました。この奨励賞は、生物物理学を学ぶ若手研究者の育成を目的として始まり、今年で第9回を数えます。そこで今年度の講演会において、多岐にわたる研究分野の発表の中から厳正な審査を経て、受賞者4名が選ばれました。

近年、細胞の中で生まれたタンパク質の運命(フォールディング、輸送、分解)は、タンパク質の主要な翻訳後修飾として付加されるN結合型糖鎖の構造変化によって決定されることが明らかになりつつあります。その中でも、小胞体で生合成されたタンパク質は、N型糖鎖の非還元末端に位置するグルコース残基を目印とした分子システムによって正しい立体構造を獲得しています。このシステムは工場に例えられ、小胞体品質管理機構とも呼ばれています。これまでに筆者らは、主に“輸送”および“分解”に関わる細胞内レクチンによる糖鎖認識メカニズムを明らかにしてきました

(Newsletter Vol. 6 「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」など)。一方、糖タンパク質の“フォールディング”に関わる小胞体品質管理システムのメカニズムは未だ不明な点が多く存在しており、ほとんど理解が

進んでいないというのが現状でした。

年森さんはこの状況に鑑みて、まず、この分子システムにおいてグルコース残基を取り除く糖加水分解酵素として機能するグルコシダーゼIIに着目し、そのX線結晶構造解析を行いました。その結果、グルコシダーゼIIの $\alpha$ サブユニット単体および阻害剤であるデオキシノジリマイシンとの複合体の3次元構造を明らかにすることに成功し、グルコシダーゼIIによる基質認識メカニズムの詳細が解明されました。

年森さんの今後の研究の進展によって、小胞体における糖タンパク質フォールディング装置の協奏的作動メカニズムが解明され、糖鎖を介した生命分子システムの動的秩序形成原理の理解がいつそう進むことが期待されます。



授賞式の様子。右から2人目が年森さん。



年森さん(左)と秋山修志支部長(右)の2ショット写真。



# “Dynamical Ordering & Integrated Functions” Newsletter Vol. 7

March, 2014

## 機能超分子化学ミニシンポジウム -分子自己組織化の制御と機能発現- を開催して

平岡秀一

(東京大学 A02 研究計画代表者)

3月11日午後より、本新学術領域「動的秩序と機能」の共催のもと「機能超分子化学ミニシンポジウム-分子自己組織化の制御と機能発現」を東京大学 駒場キャンパスで開催しました。招待講演者として高谷光先生(京都大学)、山中正道先生(静岡大学)、田原一邦先生(大阪大学)をお招きし、併せて私どもの研究室から2名の研究発表を加え、下記のプログラムで講演会を行いました。

### ミニシンポジウムプログラム

- 13:00- 固液界面における二次元自己集合体の制御と機能性 田原一邦 (大阪大学)
- 14:25- コーヒーブレイク
- 14:40- 金属錯体型自己組織化体の形成メカニズム 辻本裕也 (東京大学)
- 15:10- 分子自己集合により形成する超分子カプセル 山中正道 (静岡大学)
- 16:25- コーヒーブレイク
- 16:40- 交互型ヘキサフェニルベンゼン誘導体の新規合成法の開発 小島達央 (東京大学)
- 17:10- アミノ酸・ペプチドで操る金属集積 高谷光 (京都大学)

田原先生のご講演では、独自に開発された長鎖アルキル鎖を付与した $\pi$ 系平面状分子の表面基盤上に自己集合化に関するご講演を頂きました。溶液系における自己組織化と異なり、表面と言う2次元の場が加わることで、自己組織化体の形成はビルディングブロック間の相互作用や溶媒和に加え、基盤との相互作用とのバランスが大きく影響し、平面上に分子が並ぶという一見分かりやすい現象でありながら、実際にはビルディングブロックのわずかな構造変化により集合形式が変化する様子をご紹介頂きました。また、集合形態の転移現象の詳細な熱力学的解析に基づく解釈やメカニズム、さらにキラル分子の配列化や複数種のビルディングブロックの精密配列化に関する成果もご紹介頂きました。

山中先生のご講演では、キャビタンドと呼ばれるお椀状の分子を二量化させることで作られる分子カプセルに関するご研究をご紹介頂きました。キャビタンドを2量化し分子カプセルを形成する試みは世界的に幾



田原一邦先生

つかの研究グループで実施されていますが、山中先生のご研究のポイントはキャビタンドを連結する分子間相互作用として金属配位結合と水素結合の2種類を利用し、これら性質の異なる結合を選択的に結合-解離させることで分子カプセルに動的な特性を付与するというものです。NMR測定による非対称化された分子カプセルの構造解析やカプセル中に包接されるゲスト分子の交換速度の制御などを詳しく解説頂きました。加えて、最近開発に成功したキャビタンド以外の分子骨格による分子カプセルの形成と特異な $\text{Li}^+$ イオンの認識能についてのお話も頂きました。



山中正道先生

高谷先生のご講演では、メタル化ペプチドとその集積についてのご紹介を頂きました。人工ペプチドを利用した金属イオンの集積化の戦略とこれまでのメタル化ペプチドの研究を概観し、これらをもとに高谷先生の分子デザインを分かりやすくご説明頂きました。また、合成されたメタル化ペプチドが超音波やレーザー照射によりゲル化するという特異な特性をご紹介頂きました。温度因子によりゲル化が開始されることは無く、この他詳細な実験結果をもとに、ゲル化のメカニズムを分子論的な視点から議論されました。通常は分子間の相互作用を抑制した“セルフロック”の状態のビルディングブロックに外部刺激を与えると、セルフロックを解いた分子が部分的に生成し、これらが集合化して核形成が起こりゲル化を開始することが示されました。



高谷光先生

会場には学内外から研究者や学生さんにお集り頂き、十分用意したつもりの質疑応答の時間も短く感じられ、2回のコーヒーブレイクの時間も研究の議論が続く大変盛況にシンポジウムを終えることができました。ご講演頂きました3名の先生方に厚く御礼申し上げますとともに、シンポジウムにご参加頂きました方々にこの場を借りて感謝致します。





アジア学会見聞記

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)

今年の1月から2月にかけて、タイとインドの学術集会に参加しましたので報告します。特に、インドは日本で学事をはさんで2回の往復となりました。

今年の仕事始めはタイから

まず、1月5日にバンコクに向かいました。主な目的は筆者の所属する自然科学研究機構・分子科学研究所と学術交流の深い Kasetsart University 理学研究科との合同ワークショップ“Molecular Science towards Green Sustainability” (1月6、7日)に参加することでした。Kasetsart University は、タイのトップクラスの国立大学であり、国内最大の規模を誇る大学です。今回のワークショップは、Kasetsart University の Supa Hannonbua 博士と分子研の江原正博博士が中心となって企画を進められ、筆者を含めて5名の分子研メンバーが講演を行いました。特に、今回は生体分子科学、錯体化学、計算科学の講演が中心となり、人工光合成システムの構築を志向した金属錯体化学 (正岡重行博士)、ヘムセンサータンパク質の立体構造研究 (青野重利博士)、アミロイド繊維の分子動力学計算 (奥村久士博士) など、本新学術領域とも関連の深いトピックスがいくつか紹介されました。筆者もユビキチン-プロテアソーム系におけるタンパク質のアッセムブリーの話を提供しつつ、本新学術領域の理念と活動についても紹介してきました。一方、タイ側は、Kasetsart University に加えて Chulalongkorn University など、近隣の研究機関の若手研究者も発表に加わりました。創薬等を志向した実学的な話題が多いのが印象的でした。

2日間にわたる合同シンポジウムの翌日には、空路でコンケンに移動して Pure and Applied Chemistry International Conference (PACCON の略称で知られています) に出席しました。筆者は昨年に続いて2年連続での参加になります。この会議は、毎年1月に開催さ

れているタイ化学界の大きなイベントで、例年、Chulabhorn 王女 (Professor Dr. H.R.H. Princess Chulabhorn Mahidol) が出席されるという由緒ある国際会議です。Chulabhorn 王女は天然物化学の研究で学位をとられ、Chulabhorn 研究所の所長もつとめられています。あいにく今回はご公務と重なりご参加が叶わないということでしたが、開会式ではメッセージが伝えられました。今回の PACCON では、日本から巽 和行博士 (名古屋大学)、北川 進博士 (京都大学)、山下正廣博士 (東北大学) が基調講演をされました。

筆者らがタイに滞在していたときは、反政府運動の気運が高まっており、実際に日本に発った数日後には大規模な反政府デモが行われたと報道されています。しかし、実際の滞在中はデモのことがしばしば話題にこそなるものの、バンコクでも平穏な時間を過ごすことができ、インターネットを通じて入ってくる日本におけるセンセーショナルな報道とギャップを感じながら過ごしていました。ただし、大学教員も若手研究者も政治の動向に関しては真剣に向き合っており、皆さん実際に集会に参加するなどの活動を実践しておられるとのことでした。



分子研と Kasetsart University の合同ワークショップの夕食会にて。この会を主催された Supa Hannonbua 博士 (前列中央) をはじめ、タイは女性研究者の活躍ぶり (人数割合も含めて) が実に顕著です。



PACCON2014 でのポスター会場の風景。左手奥には Chulabhorn 王女の肖像画が飾られています。(タイでの写真はすべて分子研・奥村久士さんの提供によるものです。)



## “Dynamical Ordering & Integrated Functions” Newsletter Vol. 7

March, 2014



バンコクのチャオプラヤー川のほとりに佇むワット・アルンラーチャワラーームの夜景。三島由紀夫の小説「暁の寺」の舞台となった美しい寺院です。政治的動乱のさなかにいるとは思えない静かな夜でした。

1月10日の朝には日本に帰国しました。本新学術領域の国際シンポジウムに臨むために、その日の午後、京都に赴きました。

### コルカタで旧交を深め、新たな知己を得る

インドのコルカタでは 10<sup>th</sup> International Symposium on Cell Surface Macromolecules (ISCSM : 1月20-24日)に参加いたしました。この会合は細胞表層における生命分子(糖鎖・タンパク質・脂質)の機能研究を主題に3年に1度のペースで開催され、筆者は前回トリヴェンドラムでの会合に続いて2回目の参加になります。参加者の多くは、インドの研究者と海外で先端的研究を展開しているインド人研究者が主体の会ですが、海外からの外国人研究者も招待されています。なかでも日本人招待講演者は、組織委員をつとめられている菅原一幸博士(北大)ならびに谷口直之博士(理研)をはじめ、伊藤孝司博士(徳島大)、木下タロウ博士(阪大)、宮城妙子博士(東北薬科大)、山田修平博士(名城大)と、筆者を含めて7名の糖鎖科学研究者で、海外からの参加者の中で最も高い割合を占めています。糖鎖のNMRのバイオニアとして名高い Hans Vliegthart 博士(Utrecht University)ご夫妻、分子研にも滞在されて糖鎖プロファイリングの共同研究を行ってきた Bishunupada Chatterjee 博士(West Bengal University of Technology)をはじめ多くの友人と久闊を叙すことができました。今回の会合の主催者である Abhijit Chakrabarti 博士(Saha Institute of Nuclear Physics)とは初対面でしたが、筆者と同じく生物物理学をバックグラウンドとされており、また、その夫人の Chaitali

Mukhopadhyay 博士(University of Calcutta)は筆者らと同様にモデル膜系を用いて糖脂質クラスターを舞台とする分子間相互作用に関する研究を行っていることもあり、たちまち意気投合することができました。そういえば、この会期中にはその前週に京都で開催された国際シンポジウムでお招きした Jim Bamburg 博士と同じ Colorado State University から来られた G. George Barisas 博士(ナノ粒子を用いた好塩基球細胞株の細胞表層における免疫グロブリンE受容体の1分子計測の講演をされました)と食事を楽しむ機会がありました。お二人は旧知の仲だそうで、やはり世間は狭いものだなと思いました。

筆者は、糖鎖分子のダイナミクスと糖鎖クラスターを舞台とする分子間相互作用について、NMRを用いての研究内容を中心に講演しました。この会では、細胞のエンドサイトーシスにかかわるクラスリン被覆小胞の再構成実験(Indian Institute of Science Education and Researchの Thomas Pucadyil 博士)や生細胞膜における上皮成長因子に対する受容体分子のオリゴマー形成に伴う立体構造変化の蛍光共鳴エネルギー移動による解析(Swinburne University of Technologyの Andrew H.A. Clayton 博士)など、本領域とも関係する研究成果がいくつか報告されました。

この時期は、学位論文の審査会や大学院入試業務でシンポジウムにははじめの2日間しか参加できずに日本に戻って来なければなりません。コルカタはラマン効果の発見の地であり、当地の Indian Association for the Cultivation of Sciences の施設には Raman 博士がこの効果を見出すのに使った小さな分光器の実物が展示されていると増原 宏先生にうかがいました。今回はあいにく訪問する時間はありませんでしたが、次にコルカタに行く機会があれば、是非訪れたい場所です。

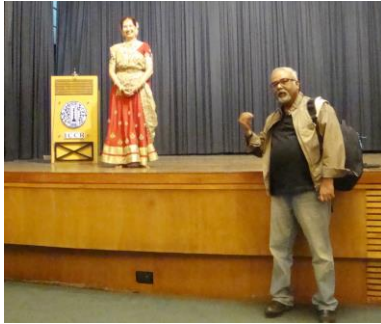


コルカタで開催された 10<sup>th</sup> ISCSM での集合写真。後方に見える舞台の場所は、前日までポスター会場でしたが、結婚披露宴のディスプレイに早変わりです。



## “Dynamical Ordering & Integrated Functions” Newsletter Vol. 7

March, 2014



今回の ISCSM の主催者の Abhijit Chakrabarti 博士。後方に控えておられるのは、高名なインド古典舞踊家の Amita Dutt さん (Rabindra Bharati University の美術学部長を歴任)。

### アッサムに世界の NMR 研究者が集う

日本に戻って 1 週間仕事をして再びインドに向かいました。今度の行先はアッサムです。目的は Tezpur University で開催された 20<sup>th</sup> Symposium of National Magnetic Resonance Society (NMRS-2014: 2 月 2-5 日) に参加することです。これは、インドの The National Magnetic Resonance Society が毎年主催している学術集会です。毎年、インド国内のみならず欧米を中心に各国から第一線の磁気共鳴研究者が招聘されています。招待講演者の中には、本領域の評価委員である Christian Griesinger 博士 (Max Planck Institute for Biophysical Chemistry) もおられました。また、Hans Vliegthart 博士ご夫妻とは 1 週間ぶりの再会となりました。今回、日本からは佐治木弘尚博士 (岐阜薬科大学) と筆者の 2 名の参加でした。

最寄りの Guwahati 空港から Tezpur University へは、一行はバスでの移動となりましたが、最寄りといっても 5 時間の長旅でした。明るく日からのプログラムは大変充実した内容で、生体系の NMR に限っても、Robert Griffin 博士 (Massachusetts Institute of Technology: 動的核分極を利用した生体分子の固体 NMR)、Gabriele Varani 博士 (University of Washington: RNA の NMR 構造生物学の創薬研究への展開)、Daniel Huster 博士 (University of Leipzig: 膜タンパク質の NMR)、Isabella C. Felli 博士 (University of Florence: 天然変性タンパク質の NMR)、Nico Tjandra 博士

(National Heart Lung and Blood Institute: 残余磁気双極子カップリング(RDC)のタンパク質構造解析への応用で著名。今回は 2 ドメインからなるアレルゲンタンパク質の構造解析について講演)、 Lucia Banci 博士

(University of Florence: 分子システム生物学における NMR)、Rolf Boelens 博士 (Utrecht University: NMR 情報に基づいたタンパク質ドッキングソフト HADDOCK などで著名。今回は DNA 修復に関わるタンパク質の分子認識について講演)、Stephan Grzesiek 博士 (University of Basel: タンパク質のフォールディングと動的分子認識)、Lyndon Emsley 博士 (Universite de Lyon: 粉末試料の高精度構造決定) はじめ、錚々たる顔ぶれが講演されました。特に、Donghan Lee 博士 (Max Planck Institute for Biophysical Chemistry) の講演は、タンパク質の緩和解析と RDC 解析に基づいて、異なるタイムスケールの内部運動の間の相関の有無を丹念に調べた成果で、極めて示唆に富む内容でした。しかしプログラム編成には若干無理があり、基調講演のあと別の建物にある分科会場への移動時間がまったく考慮されておらず、何となく人が集まったらセッションが始まるという長閑なところはお国柄でしょうか。

また、この会期中の友人たちとの雑談を通じて、欧州の主要な NMR 施設では 1.3GHz 超高磁場 NMR 装置を導入する計画が着々と進行している様子を窺い知ることができました。日本での所用があったため学会最終日を残して、Claire Grey 博士 (University of Cambridge: 電池の NMR で著名) と車で 4 時間の道中を楽しみながら空港に向かいました。今回は、パンジャブ州のアムリトサルで行われるそうです。



世界遺産カジランガ国立公園に集う生体系 NMR 研究者。左端が筆者。その隣が本領域評価委員の Griesinger 博士。朝 4 時に宿舎を出発してのツアーでした。その目的は右上の写真 (Katherine Belisle さん提供)。



# “Dynamical Ordering & Integrated Functions” Newsletter Vol. 7

March, 2014



NMRS-2014 のポスターセッション。小さいながら会場は熱気に溢れ、発表内容についての議論はもとより、ポスドク候補としてのアピールや、日々の実験に関する相談を受けます。

年明け早々から1か月の間の慌ただしいアジアの旅となりましたが、異文化のなかで育まれている若い研究者、とりわけ学生の皆さんのサイエンスへの情熱とひたむきな向上心が印象的でした。筆者らの岡崎の研究グループは学生が全員アジアからの留学生であることもあり、これからの生命分子科学において大きな役割を演じるに違いないアジアの息吹を、独特の感慨を持って肌で感じて参りました。



懇親会・交流会におけるダンスの演技。上から、PACCON2014 (コンケン)、10<sup>th</sup> ISCSM (コルカタ)、NMRS-2014 (アッサム)。

## 新学術領域「動的秩序と機能」関連シンポジウムおよび共催イベントの予定

- ・ 第14回日本蛋白質科学会年会ワークショップ  
「蛋白質における動的秩序形成と高次機能発現」  
ワークピア横浜 2014年6月26日(木)
- ・ 第3回国際シンポジウム  
合歓の郷(三重県) 2015年1月10日(土)~11日(日)