



業績紹介：ダイナミックなドメイン間相互作用

“Time-Resolved Fluctuation during the Photochemical Reaction of a Photoreceptor Protein:
Phototropin1LOV2-Linker”

Kunisato Kuroi, Francielle Sato, Yusuke Nakasone, Kazunori Zikihara, Satoru Tokutomi, and
Masahide Terazima,

Phys. Chem. Chem. Phys., **18**, 6228-6238, (2016), DOI: [10.1039/C5CP07472J](https://doi.org/10.1039/C5CP07472J)

寺嶋正秀

(京都大学理学研究科・
A01 計画研究代表者)



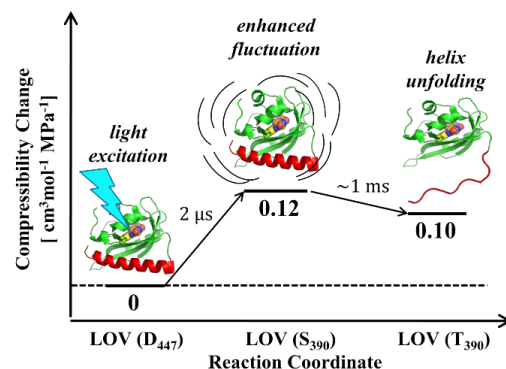
ドメイン間相互作用の時間分解検出は生体分子の反応の理解のためには非常に重要である。特にタンパク質は一般に不完全なパッキングにより生じる多くのキャビティーを持つため、その構造は自由度の高い柔らかな構造であり、ドメイン間反応に揺らぎが関与していると考えられる。しかし従来手法では、短寿命中間体の揺らぎ測定は不可能であった。そこで我々は高い時間分解能で揺らぎを捉えるべく、過渡回折格子法 (Transient Grating; TG 法) および過渡レンズ法

(Transient Lens; TrL 法) による測定を高圧条件下で行った。本研究では植物由来の青色光センサータンパク質であるフォトトロピンの LOV2-linker の光反応に伴う LOV2 ドメインと linker ドメイン間の相互作用変化に、揺らぎがどのようにかわるかを、中間体の圧縮率の変化として調べた。

LOV2-linker は、光励起に伴って発色団と LOV ドメイン内部のシステイン残基が共有結合を形成して S₃₉₀ 状態となり、最終的に linker がアンフォールディングを起こしてシグナリング状態 T₃₉₀ となるのがこれまでの我々の研究で明らかとなっている。この反応に対して、TrL 信号を圧力を 0.1 MPa から 200 MPa まで変えて測定した。この信号は約 1 ms の時定数で起こる linker ドメインのアンフォールディングに伴う体積変化に起因し、その信号強度は体積変化量に比例する。したがって信号強度の圧力依存性を解析することにより、圧縮率 (体積揺らぎ) の変化を求めることができる。測定の結果、T₃₉₀ 状態と基底状態の体積揺らぎの差が求められ、+190 (ml/mol)² であった。すなわち T₃₉₀ 状態は基底状態よりも大きく揺らいでいることが分

かった。更に、TG 法を用いて LOV ドメインと発色団の間の共有結合形成過程における体積変化を 0.1 MPa から 150 MPa までの圧力範囲で測定し、その圧力依存性から、S₃₉₀ 状態に移る過程において体積揺らぎがすでに大きく増大していることが分かった。こうした測定から下図のように各中間体における体積揺らぎを求めることに成功した。

揺らぎは初期過程において大きく増幅し、その後減少する様子が観測されたが、これは分子内のキャビティー量の変化や、溶媒分子との水和状態が反応に伴い変化した結果であると考えられる。X 線結晶解析では LOV ドメイン自身は光励起で大きな構造変化を起こさないことが知られているが、今回の結果から平均構造が変わらなくとも励起状態においてより柔らかな構造となっていることが示唆され、それが linker ドメインの LOV2 ドメインからの解離を引き起こすトリガーになっているのではないかと推測される。これは「揺らぎ」が反応を引き起こす駆動力であることを示しており、「揺らぎ」がドメイン間相互作用にも重要であることを直接的に初めて捉えたものである。



図：時間分解でとらえたフォトトロピンの LOV2-linker 反応過程における圧縮率変化。緑で示した部分が LOV2 ドメインで、赤の部分が linker ドメインである。



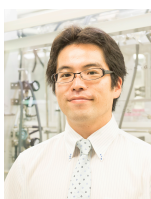
業績紹介：巨大分子集合体の動的秩序化
～世界初の4価のゴールドバーク多面体を発見～

“Self-assembly of Tetravalent Goldberg Polyhedra from 144 Small Components”

Daishi Fujita, Yoshihiro Ueda, Sota Sato, Nobuhiro Mizuno, Takashi Kumasaka, and Makoto Fujita

Nature, **540**, 563-566, (2016), [DOI:10.1038/nature20771](https://doi.org/10.1038/nature20771)

佐藤宗太
(東北大学 WPI-AIMR・A02
計画研究代表者)



折れ曲がった二座の有機配位子(L: ligand)と、平面四配位の遷移金属イオン(M: metal ion)との秩序化の原理を探求してきている。全ての結合が生じると M_nL_{2n} 組成であり、閉じた安定な構造を考えると、プラトンの立体(正多面体:面が同一の正多角形)またはアルキメデスの立体(半正多面体:面が複数種の正多角形)が得られると予測され、この幾何学的な制約により $n = 6, 12, 24, 30, 60$ に限定される(図1)。実際に、 $n = 6, 12, 24$ の分子を合成し、2016年には「正三角形」と「正五角形」の面で構成される $n = 30$ の分子の合成を達成した(*Chem*誌;ニュースレター2016年8月号)。これらの分子は熱力学的に最安定な構造であり、従来型の自己組織化の機構で形成されたものと考えられる。

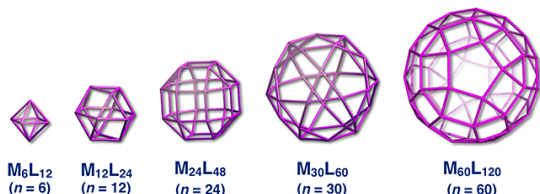


図1: プラトン/アルキメデスの立体的な M_nL_{2n} 分子。

今回、折れ曲がり角度を従来型からわずか 3° だけ広げて 152° とした有機配位子を合成した。Pd(II)イオンとの秩序化を検討したところ、 $n = 30$ の分子が得られたが、驚いたことに、正三角形と正四角形の面で構成され、既報の構造と異なるものだった(図2)。これまでに予測した幾何学的な制約が破れたことを意味する。

この多面体が何故生じたのか、幾何学的に考察したところ、グラフ理論により記述される4価のゴールドバーク多面体であることがわかった。3価のものはウ

イルス殻やフラーレンが該当するが、4価のものが分子合成された例は初めてである。この多面体の予測に基づくと、もう一回り大きな構造は $M_{48}L_{96}$ 分子である。

$M_{30}L_{60}$ と $M_{48}L_{96}$ 分子をモデルすると、 $M_{30}L_{60}$ は歪みが大きく、動的に秩序化した中間体と考えられる。調製条件を精査し、 $M_{48}L_{96}$ 分子を得た。100 を超える構成成分の人工秩序化分子の初めての例である。

$M_{30}L_{60}$ と $M_{48}L_{96}$ 分子の構造は、放射光 X 線結晶構造解析により明瞭に決定できた(図2)。KEK PF BL1A での予備測定を経て、Spring-8 BL38B1 と BL41XU にて回折データを得た。140 Å を超える格子長を有し、77 万 Å³ に達する格子体積の7割を激しくディスオーダーした溶媒分子が占めるために、測定から解析まで極めて困難であったが、MEM を併用した電子密度の解析により、信頼できる構造決定を達成した。

構成成分が大きくなると、4価ゴールドバーク多面体が動的に秩序化することがわかり、このシリーズは無限に大きな多面体が予測される。巨大分子の人工秩序化に新たな局面をもたらしたと自負している。

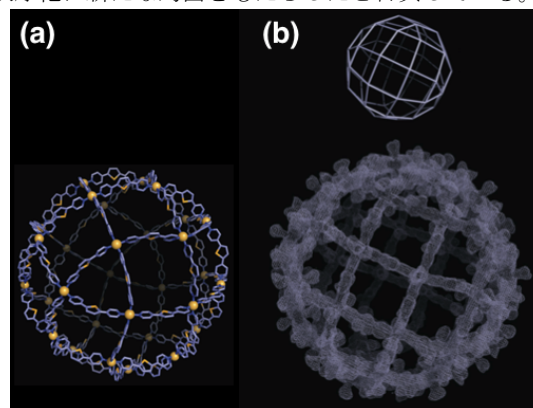


図2: 放射光 X 線を用いた単結晶構造解析により決定した(a) $M_{30}L_{60}$ と(b) $M_{48}L_{96}$ 分子の構造。

なお、本成果は、東大・JST・JASRI・東北大・KEK の共同発表としてプレスリリースを行った。



業績紹介: リポソームディスプレイを用いた大腸菌 EmrE トランスポーター
の実験室進化システムの構築

“Construction of an in Vitro Gene Screening System of the *E. coli* EmrE
Transporter Using Liposome Display”

Atsuko Uyeda, Shintaro Nakayama, Yasuhiko Kato, Hajime Watanabe, and Tomoaki Matsuura*

Anal. Chem., **88**(24), 12028-12035, (2016), 10.1021/acs.analchem.6b02308,

松浦友亮

(大阪大学工学研究科・
A02 公募研究代表者)



変異と選択を繰り返す進化分子工学的手法は、生体高分子の性質を改良、進化させることができ、タンパク質の機能解析や有用タンパク質の創出に大きく貢献してきた。しかし、標的とされるタンパク質は可溶性の酵素や抗体がほとんどであり、難溶性で、異種細胞での発現が困難な膜タンパク質を対象とした例は稀であった。

我々は近年、細胞サイズのリポソーム内で無細胞翻訳系を用いて1分子のDNAを鋳型として膜タンパク質を合成するリポソームディスプレイ法を開発し、ポア形成膜タンパク質である α ヘモリシンの機能を約30倍向上させることができた。 α ヘモリシンは、溶液中でモノマーとして存在する可溶性タンパク質であることから、より一般的な膜タンパク質の特徴(脂質不存在下では不溶性)を有する、大腸菌由来多剤排出トランスポーターEmrEのスクリーニング法の確立と実験室進化をめざした(図1)。

EmrEは110アミノ酸からなる4回膜貫通タンパク質で、EtBrをはじめとする多くの基質を認識する。そのため、生体毒物を検出するセンサー素子としても期待できる反面、基質に対する親和性が μM オーダーと低く、低い人工脂質への挿入効率も含め改善が望まれる。

本研究では、EmrEのトランスポーター活性(EtBr輸送)と膜挿入活性の両者を指標とし、野生型EmrEと活性のない変異型EmrEを一定の割合で混合した模擬的ライブラリーから、セルソーターを用いて野生型遺伝子の割合を10倍から35倍の濃縮効果が得られ、理論値とよく一致した(図2)。また、ランダム変異を導入した遺伝子ライブラリーから3回スクリーニングを行ったところ野生型よりも活性の高い遺伝子プール

を取得することができた。

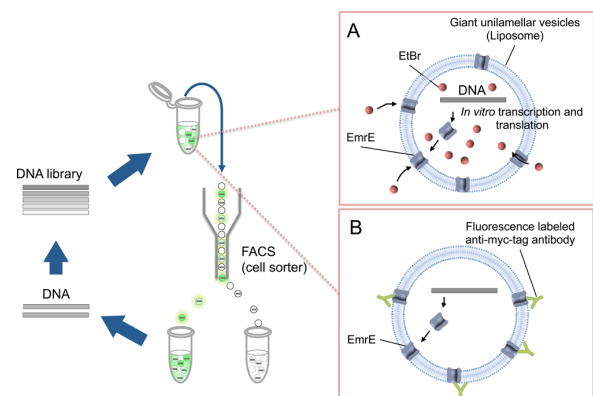


図1 Liposome display を用いた EmrE の試験管内スクリーニング法の概要 (A: EtBr 取り込み活性、B: 膜挿入活性を指標とするスクリーニング実験の概要)

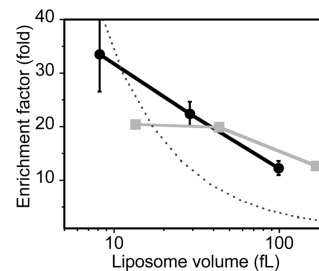


図2 ソートした liposome 体積と濃縮係数の相関 (破線: 理論値、黒実線: EtBr 輸送活性に基づくソート、グレー実線: 膜挿入活性に基づくソート)

膜タンパク質は、細胞がコードする遺伝子の30%近くを占め、細胞表面に存在して、細胞への物質と情報の出入りをコントロールすることから、細胞の機能や疾病に直接的に関与し、重要な創薬ターゲットとなっている。今後、この手法によりこれまで機能解析が困難であった膜タンパク質の発現上昇や安定化により結晶構造解析を推進できるほか、基質に対する親和性向上などが様々な進化工学が可能となることが期待される。



業績紹介：アミロイド線維の末端構造の理論的予言：
A β アミロイド線維は片方の末端だけ揺らいでいる

“Structural and Fluctuational Difference between Two Ends of A β Amyloid Fibril:
MD Simulation Predicts Only One End has Open Conformations”

Hisashi Okumura and Satoru G. Itoh

Sci. Rep., 6, 38422(9 pages), (2016), DOI: 10.1038/srep38422

奥村久士

(分子科学研究所
計算科学研究センター・
A03 公募研究代表者)



アミロイド線維はタンパク質が間違っ折りたたみ、凝集することによってできた不溶性の線維である。アミロイド線維は 40 種類以上の病気の原因となっている。例えば、アルツハイマー病はアミロイド β (A β) ペプチドが凝集してできたアミロイド線維が原因ではないかと言われている。A β のアミロイド線維は図 1 のように 2 枚の β シート構造 ($\beta 1$ と $\beta 2$) からなっており、その末端に A β が 1 分子ずつ順次結合して β シート構造に変化することで伸長する。

一般的にバルク領域と界面では構造や揺らぎが異なることが広く知られている。アミロイド線維の場合、バルクとはアミロイド線維の中心部分に相当し、界面とはアミロイド線維の末端に相当する。アミロイド線維の伸長は末端で起きるため、末端構造を明らかにすることはアミロイド線維形成を理解する上で重要である。しかし、アミロイド線維の末端領域は 1~2 分子しかないため、実験では観察困難である。そこで分子動力学シミュレーションによりアミロイド線維末端の構造を調べた。

その結果、図 1 の右端 ($\beta 1$ の奇数番目の CO および NH が露出していることから奇数端と呼ばれる) では 2 枚の β シートが開いたり閉じたりして大きく揺らいでいるのに対して、左端 ($\beta 1$ の偶数番目の CO および NH が露出していることから偶数端と呼ばれる) では閉じたままになっていることを発見した。またこの現象は 2 枚の β シート、 $\beta 1$ と $\beta 2$ の水素結合の強さの違いと A β アミロイド線維の形状に起因していることも解明した。

A β アミロイド線維は一方にしか伸長しないことがこれまでの実験で分かっている。今回のシミュレーションで示したように構造と揺らぎが両末端で違うことが伸長しやすさの違いの原因ではないかと考えられる。実際、違う種類のアミロイド線維ではあるが、内橋班員らは最近高速 AFM による実験でアミロイド線維の両末端の構造と揺らぎが我々のシミュレーションのように異なり、揺らぎの小さい方の末端にタンパク質が結合して伸長する過程を観察している。今回得られたアミロイド線維末端についての分子レベルの知見は今後アミロイド線維の伸長機構を理解するのに役立つと考えられる。

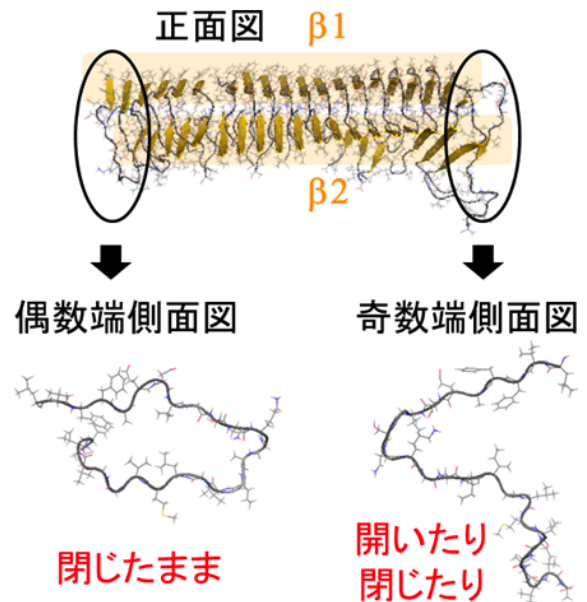


図 1: A β アミロイド線維の一方の末端では 2 枚の β シート構造はいつも閉じているのに対し、もう一方の末端では 2 枚の β シート構造は閉じたり開いたりして揺らいでいる。



“Dynamical Ordering & Integrated Functions” Newsletter Vol. 42

February, 2017

概日時計システム研究を加速するための工夫

Accelerating in Vitro Studies on Circadian Clock Systems Using an Automated Sampling Device

Yoshihiko Furuike, Jun Abe, Atsushi Mukaiyama, and, Shuji Akiyama

Biophysics and Physicobiology, **13**, 235–241, (2016), DOI: [10.2142/biophysico.13.0_235](https://doi.org/10.2142/biophysico.13.0_235)

自律的に約24時間（概日）周期のリズムを奏でる概日時計システムの研究には、オートサンプラーなどの導入による実験の半自動化が有効である。我々が独自開発したオートサンプラー、高精度温度制御・多チャンネル試料ホルダ、電気泳動パターン解析ソフトウェアを一体として利用することで、精度を落とすことなくタンパク質時計の研究スループットを向上させることができる。高精度温度制御・多チャンネル試料ホルダの採用により概日時計システムの温度補償性を一度の実験で評価できるため、周期変異体だけでなく温度補償変異体の評価やスクリーニングにも役立つものと期待される。

(秋山修志 自然科学研究機構分子科学研究所・A01 公募研究代表者)

新学術領域研究「動的秩序と機能」 今後の活動予定

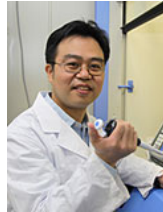
- ・平成29年度全体班会議
日時：2017年6月2日（金）～5日（月）
場所：沖縄科学技術大学院大学
<https://www.oist.jp/ja>



新井亮一グループの木村尚弥さんが
第 39 回日本分子生物学会年会において優秀ポスター賞を受賞

新井 亮一

(信州大学 繊維学部 / 菌類・
微生物ダイナミズム創発研究
センター・A02 公募研究代表者)



平成 28 年 11 月 30 日～12 月 2 日にパシフィコ横浜
で開催されました第 39 回日本分子生物学会年会にお
いて、私達の研究グループの木村尚弥さん（信州大学
大学院理工学系研究科応用生物科学専攻修士 2 年）が
優秀ポスター賞を受賞致しました（図 1）。木村さんの
受賞演題は「蛋白質ナノブロック用超安定化人工蛋白
質 SUWA (Super WA20) の特性解析及び構造解析」で、
本年度は全 2,717 件のポスター演題のうち 282 件が優
秀ポスター賞に選出されました。

私達のグループでは、これまでに、分子間フォル
ディング（ドメインスワップ）4 本ヘリックス二量体
構造を形成する新規人工蛋白質 (*de novo* protein)
WA20 を用いた蛋白質ナノブロック (Protein
Nano-building Block: PN-Block)を開発し、多様な自
己組織化超分子ナノ構造複合体の創出に成功してきま
した(Kobayashi N. et al., *JACS*, 2015)。

そこで、本研究では、将来のナノマテリアル等への
応用に向けて、WA20 の疎水性コア増強等の 5 アミノ
酸残基置換変異を合理的に導入した改変体 **Super
WA20 (SUWA)**を設計開発し、さらに詳細な解析を行
いました。まず、加圧セル CD 測定による熱変性実験
より、WA20 の変性中点温度 T_m は 75°C であるのに対
し、SUWA の T_m は 122°C と極めて高く、47°C もの大
幅な熱安定化が示されました。次に、変性剤(GdnHCl)
に対する構造安定性を検討したところ、WA20 の変性
中点濃度は 3.5 M であるのに対し、SUWA は 6 M と
非常に高く、大幅な変性剤耐性の向上も明らかとなり
ました。また、X 線結晶構造解析により立体構造を解
明したところ、WA20 と同様に、長い α -ヘリックス 2
本とループからなる、言わば“ヌンチャク型”構造の
分子がお互いに分子間で挟み込むように分子間フォル
ディング（ドメインスワップ）して 4 本ヘリックス
バンドル二量体を形成した“クロスヌンチャク型構造”
であることがわかりました（図 2）。さらに、この

SUWA を利用した PN-Block として SUWA-foldon を
作製し、Native PAGE, SAXS, SEC-MALS 解析等
を行ったところ、複数の自己組織化超分子ナノ構造複
合体形成が示されました。また、熱変性実験を行っ
たところ、これらの超分子ナノ構造複合体においても構
造安定性の向上が示され、さらに部分的熱変性・再構
成による動的秩序構造の形成も示唆されました。今
後、PN-Block を用いた超分子複合体ナノバイオマテ
リアル開発等への応用も期待されます。

以上の研究成果が高く評価されて今回の受賞に至
ったと考えられ、今後、蛋白質工学や、合成生物学、
超分子化学、ナノテクノロジー分野等、基礎研究のみ
ならず応用研究へ向けた発展も期待されます。

なお本研究は、信州大の小林直也研究員、佐藤高彰
准教授、プリンストン大の Michael Hecht 教授、分子
研の古賀信康准教授、東京薬科大の山岸明彦教授、早
稲田大の赤沼哲史准教授ら多くの方々の御協力のもと
に行われ、また本新学術領域等の科研費助成や、共同
利用研究として KEK Photon Factory や分子研協力研
究の御支援も受けました。厚く御礼申し上げます。

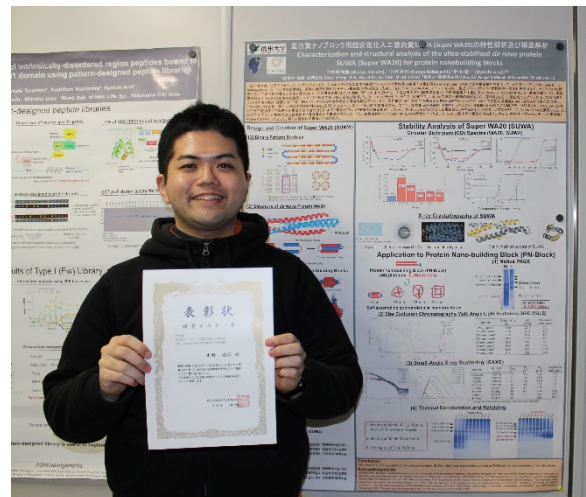


図 1：賞状を手にする木村さん

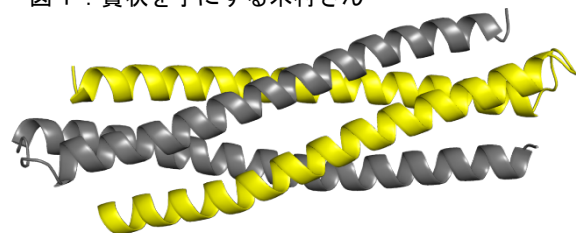


図 2：超安定化新規人工蛋白質 SUWA の結晶構造