



業績紹介：真核生物型グループ II 型シャペロニン研究のブレイクスルー

"Asymmetry in the Function and Dynamics of the Cytosolic
Group II Chaperonin CCT/TRiC"

Yohei Y. Yamamoto, Yuko Uno, Eiryu Sha, Kentaro Ikegami, Noriyuki Ishii, Naoshi Dohmae,

Hiroshi Sekiguchi, Yuji C. Sasaki, and Masafumi Yohda

PLOS ONE, in press, (2017), DOI: [10.1371/journal.pone.0176054](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176054)

養王田正文

(東京農工大学工学研究院・
A01 公募研究代表者)



シャペロニンは 2 重リング構造を形成し、リング内の空洞に構造形成中間状態のタンパク質を捕捉し、ATP 依存的な構造変化によりその構造形成を促進する。大腸菌の GroEL を代表とするグループ I 型シャペロニンは GroES/Hsp10 が空洞の蓋として重要な役割を担っている。古細菌や真核生物細胞質に存在するグループ II 型シャペロニンでは Apical Domain に存在する Helical Protrusion と呼ばれる領域が Built in Lid を形成し、ATP 依存的に開閉することで機能を制御している。グループ II 型シャペロニンの研究は、主に構造がシンプルで安定な古細菌の系で研究が進んでおり、真核生物型の研究は著しく遅れている。真核生物型 Group II 型シャペロニンは Chaperonin containing TCP1 (CCT) と呼ばれる。他のシャペロニンと同様に 2 重リングを形成するが、それぞれのリングが 8 種類のサブユニットから構成されるという極めて複雑な構造をしている。このため、遺伝子組換えでの発現、精製がほとんど成功しておらず、組織から精製して実験が行われていた。未だに高分解能の構造は解明されておらず、リング内のサブユニットの配置も、2012 年になってようやく解明されている。我々は CCT の機能を分子レベルで解明することを目的に好熱性真菌 *Chaetomium thermophilum* 由来 CCT(CtCCT)の大腸菌発現系を構築し、その構造変化機構の解析を行った。8 種類のサブユニットを同時に生産するために、薬剤耐性の異なる 2 つの発現ベクターにそれぞれ 4 つのサブユニットの遺伝子を導入し、

大腸菌に形質転換することで CtCCT を発現した。ホモオリゴマーを形成しないサブユニットに Strep Tag を付加し、Affinity Chromatography とゲルろ過クロマトグラフィーで精製することで、組換え CtCCT を精製した。組換え CtCCT はシャペロニン特有のリング状構造を形成し、質量分析により 8 つのサブユニットから構成されていることを確認した。この技術により、系統的な変異 CCT の構築と機能解析が初めて可能になった。我々は、以前、X 線分子追跡法 (DXT) で超好熱性古細菌由来 II 型シャペロニンの ATP 依存的構造変化が 2 段階であり、回転運動を伴うことを明らかにした。この実験では、基盤への固定化と金ナノ粒子付加のために Helical protrusion の先端に Cys を付加し、それ以外の表面の Cys を除く必要がある。我々は、Cys を付加する 2 つのサブユニットの組み合わせを変えた変異体を作成し DXT で運動を解析したが、古細菌型と同様に 2 段階の運動であり、ATP の結合能が高いサブユニット側から構造変化が起きること明らかにすることができた。今後、このシステムを用いて、構造解析や詳細な機能解析を進める予定である。



本研究で学位を取得した山本陽平さんとシャペロニンのイメージ



業績紹介：炭素と水素だけでできた分子で青色発光 OLED をつくる

"Efficient Blue Electroluminescence from a Single-Layer Organic Device Composed Solely of Hydrocarbons"

Tomoo Izumi, Yi Tian, Koki Ikemoto, Asami Yoshii, Takashi Koretsune, Ryotaro Arita, Hiroshi Kita, Hideo Taka, Sota Sato, and Hiroyuki Isobe

Chem. Asian J., **12**, 730-733, (2017), [DOI:10.1002/asia.201700198](https://doi.org/10.1002/asia.201700198)

佐藤宗太

(東京大学理学系研究科
・ A02 計画研究代表者)



中心部に「孔」をもつ、大環状芳香族分子に対して、特異な光学物性や、またファンデルワールス力による秩序化といった興味から研究を展開してきている。これまでに、 n 個のベンゼンをユニットとする [n]cyclo-*meta*-phenylene (CMP)分子を OLED 素子材料として用いれば、従来は多種類の分子を多層積層して構築してきた OLED 素子を、単相構造で構築できることを見いだした。また、Ir 錯体を用いることで、およそ 100%の効率でリン光発光することがわかった (ニュースレター28、31、44号)。今回、発光分子としても、金属を使わずに、炭素と水素だけからできている大環状芳香族分子を用いたところ、効率のよい青色蛍光発光型の OLED を構築することがわかった。

蛍光発光分子としては、3 分子のフェナントレンを環状に連結した [3]cyclo-3,6-phenanthrylene ([3]CPhen_{3,6}、図 1 左)を用いた。この分子の合成自体は 1965 年に最初の合成が報告されているものの、われわれの研究グループでさまざまな大環状芳香族分子を開発する中で、蛍光発光の効率 (量子収率) が高いことがわかった分子である。この発光分子を、これまでに単層型 OLED の構築に有用であることを見いだしている [5]CMP 誘導体 (図 1 右) と混合して用いた。高真空下で蒸着して OLED 素子を作製したところ、単層型という単純な構成で OLED 素子を発光させることに成功し、純粋蛍光発光型の OLED としては最高レベルの外部量子効率 4.7%を達成した (図 2)。従来型

の多元素有機物質を用いた純粋蛍光発光型 OLED では、2015 年に、最高値 4.4%が記録されているが、この値を、たった二種類の元素で凌駕できることを示す結果である。

OLED 素子の中では、有機分子は 10 nm オーダーの薄膜を形成しており、その薄膜中での分子間相互作用が OLED 性能を決定づけていることもわかってきた。この相互作用・秩序化をより積極的に制御する分子設計へとつなげていきたい。

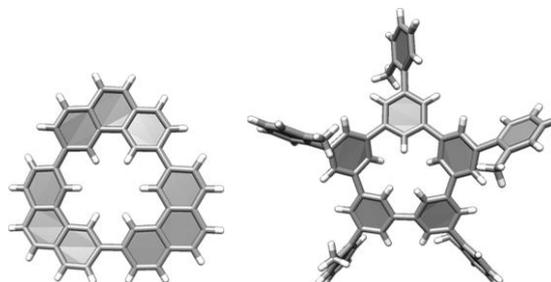


図 1：本研究で用いた炭素と水素のみからなる有機分子。OLED 中では、この 2 分子の混合膜を用いた。

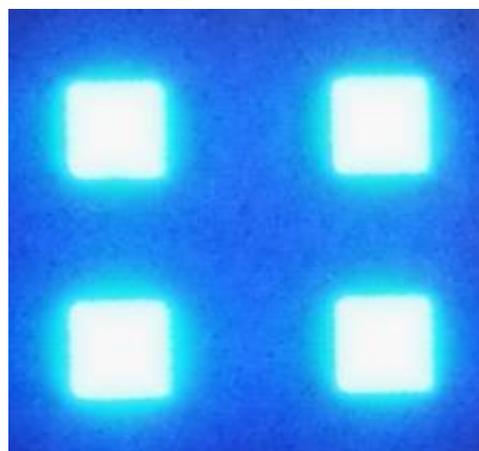


図 2：純粋蛍光発光型の OLED の写真。



業績紹介：サイボーグ超分子を用いて
細胞膜上糖鎖クラスターの動的相互作用機構に迫る

"Hyper-Assembly of Self-Assembled Glycoclusters

Mediated by Specific Carbohydrate-Carbohydrate Interactions"

Gengwei Yan, Takumi Yamaguchi, Tatsuya Suzuki, Saeko Yanaka,

Sota Sato, Makoto Fujita, and Koichi Kato

Chem. Asian J. **12**, 968–972, (2017), DOI: [10.1002/asia.201700202](https://doi.org/10.1002/asia.201700202)

山口拓実

(北陸先端科学技術大学院大学・
A03 計画研究分担者)

佐藤宗太

(東京大学理学系研究科・A02 計画
研究代表者)

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)



細胞膜上の糖鎖は、均一に分散するのではなく集積化し、動的な分子認識場として機能している。このようなマイクロドメインを舞台とした生命分子認識において、糖鎖は、相互作用点を多点化することによって高い親和性を獲得している。なかでも、単体では弱く過渡的ではない糖鎖同士の結合は、クラスター化を通して、細胞間接着をはじめとする秩序形成に重要な役割を果たしている。こうした糖鎖の機能メカニズムの解明やその制御を行うためには、生体膜上に集積する糖鎖クラスターを模倣した化合物を合成することが不可欠である。私たちは、人工設計に基づく超分子と生命分子を融合した、サイボーグ分子の創生に取り組んでいる。本研究では、神経細胞の分化に関わる Lewis X 糖鎖をハイブリッドしたサイボーグ超分子を合成し、これを用いて細胞膜上糖鎖クラスターの高次機能発現メカニズムの構造基盤解明を行った。

Lewis X 糖鎖 [Galβ1-4(Fucα1-3)GlcNAcβ]は、神経細胞において分化前の細胞に特異的に発現しており、その幹細胞性の維持を担っている。また、Lewis X 糖鎖は互いを認識し、糖鎖間相互作用を示すことが知られている。そこで、機能発現のためのグリコトープとして Lewis X を含む糖鎖構造を化学合成した後、こ

れを有機配位子と連結した。合成した配位子分子とパラジウムイオンとの錯形成反応により超分子錯体を調製した。これにより、直径およそ 40 Å の一義構造をもった球状分子表面に、24 個の Lewis X グライコトープを集積することに成功した (図 1)。

調製した Lewis X クラスターのマクロ挙動を、NMR および動的散乱法によって観測したところ、このサイボーグ超分子はカルシウムイオン依存的な糖鎖間相互作用によって、水中でより大きな会合体を形成することがわかった (図 1)。そこでさらに、常磁性 NMR 法を用いたマイクロ計測によって、糖鎖-金属イオン結合の構造基盤情報を収集した。その結果、超分子間会合を誘起するために必要な Lewis X とカルシウムイオンとの相互作用には、糖鎖の化学構造のみならず、その集積形態が重要であることが示唆された。

今後、合成した超分子 Lewis X クラスターを用いた、細胞機能の制御にも挑む予定である。このように、人工超分子と生命分子のハイブリッド化を通して、高次機能を発揮する新たな分子創生に取り組んでいきたい。

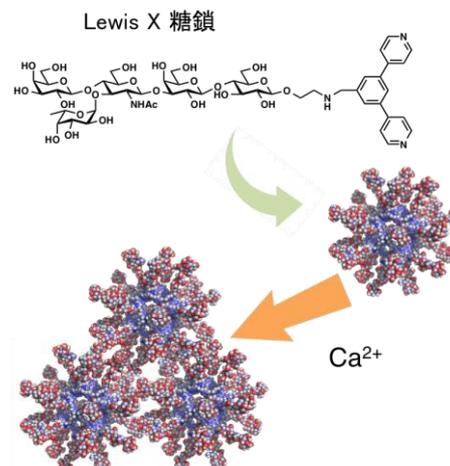


図 1. 細胞膜上の糖鎖-糖鎖認識能を付与したサイボーグ超分子の創生。



業績紹介：リウマチ治療用抗体と抗原の
ヒト血清中での相互作用様式を解明

"Analytical Ultracentrifugation with Fluorescence Detection System Reveals Differences in
Complex Formation between Recombinant Human TNF and Different Biological TNF
Antagonists in Various Environments"

Elena Krayukhina, Masanori Noda, Kentaro Ishii, Takahiro Maruno, Hirotsugu Wakabayashi,
Minoru Tada, Taeko Suzuki, Akiko Ishii-Watabe, Masahiko Kato, and Susumu Uchiyama

mAbs, in press, (2017), DOI:10.1080/19420862.2017.1297909

内山 進

(大阪大学工学研究科・A03 公募
研究代表者)



これまで、バイオ医薬品の一種である抗体医薬品の有効性や副作用発現を分子レベルで理解するため、抗原と抗体間の結合メカニズムに注目した研究が盛んに行われてきた。抗体医薬品が実際に投与されるのは血液中であるため、血液中での抗体医薬の振る舞いを知ることが重要である。ところが、血液は多くのタンパク質が存在する複雑な環境であるため、血液中での抗体や抗原の振る舞いを正確に調べることは難しく、実際の *in vivo* 環境での抗原-抗体結合様式には多くの不明点があった。

今回、我々は、蛍光検出器を備えた超遠心分析装置を用いた蛍光超遠心分析法により、3種類の抗 TNF 抗体と抗原である TNF について、リン酸緩衝液および血清中における抗体と抗原の相互作用様式を明らかとした。まず、抗 TNF 抗体の蛍光標識を行い、分散状態と TNF 結合能が標識前と比べて変化していないことを確認後、蛍光超遠心分析法によりリン酸緩衝液中での抗 TNF 抗体と TNF の相互作用を観測した。蛍光超遠心分析法は感度が高いため、従来の吸光度や干渉光学系を用いた超遠心分析法では不可能であった、医療用抗体が持つ解離定数 (nM 程度) 付近での相互作用解析が可能である。今回、nM 領域での抗原と抗体の複数の濃度比における沈降パターンの数値解析から、抗原と抗体 (免疫複合体) の化学量論を正確に決定することが出来た。また、抗 TNF 抗体の Fab と TNF との解離定数を ITC から求め、その値を用いて抗原と抗体の各濃度比での免疫複合体のサイズ分布の変化をシミュレートすることに成功した。この結果が

ら、抗原と抗体の濃度比がある一定の範囲になった場合には3分子の抗体に2分子の抗原が結合した大きな免疫複合体が主成分を占めることが分かった。更に、蛍光超遠心を用いて、同様の濃度域で血清中における抗原と抗体の相互作用様式の決定を試みた (図 1A)。その結果、リン酸緩衝液と同様に抗体の種類によって形成される複合体のサイズが異なっており、さらに、各抗体の複合体サイズの形成傾向もリン酸緩衝液中での傾向と同様であった (図 1B)。また、この研究過程で、血清中で抗体はアルブミンと弱く相互作用していることが確認され、この結果からアルブミンは血清中で抗体を安定化している可能性が示唆された。最後に、形成される免疫複合体の大きさと Fc 受容体を介した免疫細胞内における信号伝達の程度との関係を、Fc 受容体を発現する組換え Jurkat 細胞を用いたリポーターアッセイにより評価した。その結果、蛍光超遠心分析法で確認された免疫複合体サイズの大きさと、Fc 受容体を介した信号伝達との間には高い相関が観測され、特に大きな免疫複合体をリン酸緩衝液および血清中で形成する抗体では、強い信号伝達が観測された。この結果は、免疫複合体の大きさが大きくなる抗体医薬の場合、Fc 受容体を介した好ましくない信号伝達が起こる可能性を示唆している。

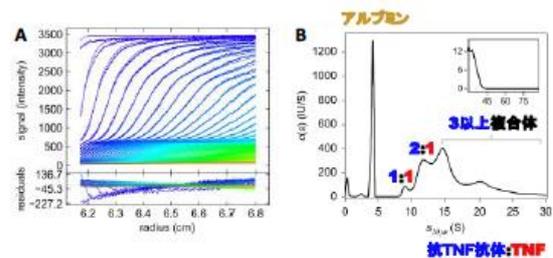


図 1 血清中での免疫複合体の蛍光超遠心沈降パターン (A) と免疫複合体のサイズ分布 (B)



業績紹介：鞭毛の振動運動を担うモーター分子ダイニンの集団は
外力に応答して滑り運動の状態を柔軟に変化させる

"Effects of External Strain on the Regulation of Microtubule Sliding Induced
by Outer Arm Dynein of Sea Urchin Sperm Flagella"

Hiroshi Yoke and Chikako Shingyoji

J. Exp. Biol., **220**, 1122-1134, (2017), DOI: [10.1242/jeb.147942](https://doi.org/10.1242/jeb.147942)

真行寺千佳子

(東京大学理学系研究
科・A03 公募研究代表者)



真核生物鞭毛の振動運動は、鞭毛軸系を構成するダブルレット微小管同士の間にもーター分子ダイニンがATP加水分解のエネルギーを利用して引き起こす滑り運動を原動力としており、多数のダイニン分子による滑り運動が時間的・空間的に協調的に制御されることによって周期的な屈曲波が生み出される。鞭毛軸系における滑り運動は、軸系に与えられる外力によって制御されることがこれまで多くの実験から示されており、ダイニンの活性は力学的刺激を介してフィードバック制御されていると考えられる。私たちは、ダイニン分子自身が、外力に応答して運動モードを変化させる能力を持つことを1分子の実験で示し、制御機構の基本がダイニン分子に内在しているという説を提示した (Cytoskeleton, 2015)。しかし、複数のダイニン分子が集まった時、滑り運動の状態が外力に応答して協調的に変化しうるのでどうかは不明であった。

本論文では、モーター分子の集団的なふるまいを調べる伝統的実験系“*in vitro motility assay*”系を改良し、ガラス面上に吸着させたダイニンによって滑り運動を起こす重合微小管にガラス微小針を用いて屈曲や外力を与え、反応を解析することのできる実験系を開発した (図 1A)。屈曲を与えない場合、以前から知られていたように、微小管はその極性に従って一方向への滑り運動を示した。屈曲を与えた場合も、多くの微小管は図 1B の連続写真の例に示すように一方向への滑り運動を継続した。一方、574 例の屈曲操作のうちの 136 例 (23%) において滑り運動の停止が誘導された (図 1C)。これは高濃度 (1 mM) ATP 存在下であるにもかかわらず、ダイニンが外力に応答して、微小管と相互作用を保ったまま滑り運動を停止する能力をもつこ

とを示している。また、4 例では逆方向の滑り運動が誘導された (図 1D)。さらに、図 1E のように滑っている微小管の解離も誘導された。

このような、複数分子のダイニンの集団が、外力に応答して柔軟に滑り運動の状態を変化させるという発見は、ダイニンの複数分子の協調的活性制御が鞭毛の振動運動機構の基礎となっていることを示唆する。

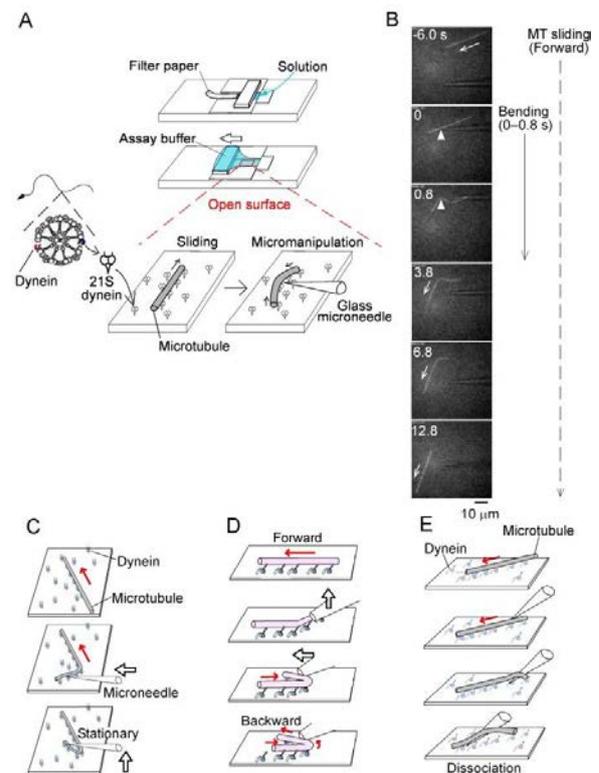


図 1. (A)実験系の模式図。(B-E)屈曲によって誘導された反応。一方向への滑りの継続(B)、滑りの停止(C)、逆方向の滑り(D)、および微小管の解離(E)。

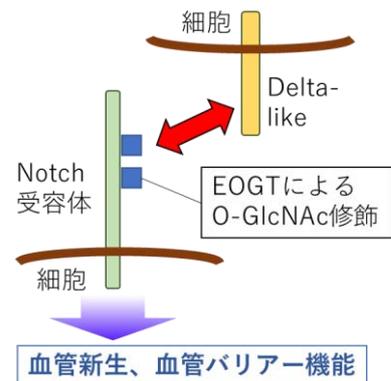


O-GlcNAc が担う相互作用ネットワークの破綻はアダムズオリバー症候群を引き起こす

O-GlcNAc on NOTCH1 EGF Repeats Regulates Ligand-induced Notch Signaling and Vascular Development in Mammals

Shogo Sawaguchi, Shweta Varshney, Mitsutaka Ogawa, Yuta Sakaidani, Hirokazu Yagi, Kyosuke Takeshita, Toyooki Murohara, Koichi Kato, Subha Sundaram, Pamela Stanley, and Tetsuya Okajima
eLife, 6, e24419(30pages), (2017), [DOI:10.7554/eLife.24419](https://doi.org/10.7554/eLife.24419)

シグナル伝達に関わる受容体への糖修飾は、シグナル伝達経路の精密な制御に重要であり、糖修飾システムの破綻は様々な疾患の原因となっている。例えば、Notch 受容体においては、糖転移酵素 EOGT により O-GlcNAc が修飾されるが、この EOGT の遺伝子変異はアダムズ・オリバー症候群を引き起こすことが知られている。本論文では、Notch 受容体のリガンドである Delta-like と Notch 受容体の相互作用を O-GlcNAc 修飾が正に制御し、Notch シグナル伝達を調節することを見出した。さらには EOGT 欠損マウスの解析により、血管内皮細胞において Notch シグナルの低下が引き起こされ、網膜の血管形成や血液網膜閉鎖の機能の異常が認められた。このように本論文では、O-GlcNAc 修飾による Notch シグナルの制御メカニズムを明らかにし、本修飾システムの破綻によってアダムズ・オリバー症候群が発症することを示すことができた。



(加藤晃一 自然科学研究機構・A03 計画研究代表者)

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
（沖縄県国頭郡恩納村字谷茶 1919-1）
<https://www.oist.jp/ja>



“Dynamical Ordering & Integrated Functions” Newsletter Vol. 45

May, 2017

活動報告 —研究会「凝縮系の理論化学 2017」開催—

東 雅大
(琉球大学理学部・A01 公募研
究代表者)



2017年4月8日(土)に沖縄青年会館にて、新学術領域「動的秩序と機能」共催のもと、研究会「凝縮系の理論化学2017」を開催しました。本研究会は、主に理論化学を専門とする学生や若手研究者が気軽に発表・議論できる場として、また琉球大学の学生が最先端の研究に触れる場として、私と柳澤将先生(琉球大)、吉田紀生先生(九州大)が中心となって、3年前から毎年開催している研究会です。今年は、本新学術領域から、佐藤啓文先生(京都大)、秋山良先生(九州大)、奥村久士先生(分子研)とその研究室のメンバーが参加しました。以下に発表題目と発表者を示します(敬称略)。

「レプリカ置換分子動力学法の定温定圧アンサンブルへの拡張」 山内仁喬^{1,2}, 奥村久士^{1,2} (1分子研, 2総研大)

「分子性二次元流体の積分方程式理論」 矢木智章, 佐藤啓文 (京都大)

「シトクロムcの多量体形成に関する理論的研究」 根木秀佳¹, 吉田紀生², 廣田俊³, 東雅大¹ (1琉球大, 2九州大, 3奈良先端大)

「配位駆動形自己集合過程の反応解析」 飯岡達也¹, 松村祥宏¹, 馬場絢子², 平岡秀一², 佐藤啓文¹ (1京都大, 2東京大)

「2成分剛体球系での固体表面への分子吸着における活性化自由エネルギー及び吸着量のモル分率依存性」 大島章生, 秋山良 (九州大)

「レプリカ置換法とそのアミロイドβペプチドへの応用」 伊藤暁 (分子研)

「全原子MDを用いたタンパク質間相互作用の粗視化モデルの構築」 川口一朋 (金沢大)

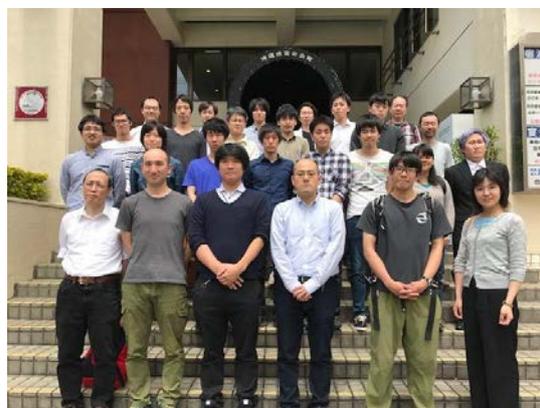
「素過程に立脚した時計タンパク質概日リズムの反応モデル: 反応から機能へ」 甲田信一 (分子研)

「統計力学的手法による2成分剛体球系の相挙動の研究」 末松安由美¹, 吉森明², 秋山良¹ (1九州大, 2新潟大)

「密度汎関数強束縛法に基づく大規模分子動力学計算手法の開発」 西澤宏晃 (分子研)

研究会の午前中は、修士の学生の発表がありました。恐らく学生の皆さんが研究会等で口頭発表を行うのは初めてかと思うのですが、皆さん発表時間の20分が足りないぐらいに堂々と発表し、質問にもきちんと答えていて驚きました。また、午後からは若手研究者の招待講演が行われました。それぞれの分野の最先端の研究が紹介され、その後の質疑応答でも大変活発かつ有意義な議論が展開されました。凝縮系の理論化学といっても、その取り扱い方は様々で、原子レベルのミクロな計算から、分子を1つの剛体球と見なしたモデル計算、さらに反応速度論に基づくマクロな計算まで、様々なスケールで議論されていたのが印象的でした。さらに、夜は沖縄居酒屋で懇親会を開催し、オリオンビールや泡盛を片手に遅くまで研究談義に花が咲きました。

このように、参加者の皆様のおかげで、本研究会は盛会のうちに終了しました。参加者の皆様と本新学術領域の支援に心より感謝致します。また来年も同様の研究会を開催予定ですので、よろしければ(実験系・理論系関わらず)皆様も是非ご参加ください。



本研究会の集合写真