

招待講演

生体分子科学計算と定量的構造活性相関

○ 中馬 寛

徳島大院・ヘルスバイオサイエンス研究部

hchuman@tokushima-u.ac.jp

【始めに】 タンパク質のような生体巨大分子の機能・活性発現のメカニズム解明は、生物学や化学の基礎科学分野のみならず、生体现象を対象とする医学、薬学等の応用科学分野で要求されている。ゲノム技術の進展により多くの重要なタンパク質の存在が明らかにされ、それらの立体構造も明らかにされてきている。タンパク質の立体構造に基づく創薬のコンピュータ（インシリコ）・スクリーニングが行われている。しかし、その多くの方法は信頼度の高くかつ物理化学的意味が伴う予測結果を必ずしも与えず、学術的および実用的観点から新しい論理的創薬の方法の提案と構築が望まれている。主に有機低分子系を対象とする非経験的分子軌道法は今や実験とほぼ同等な位置づけで幅広い研究分野で活用されているが、生体巨大分子系についてはその構造の複雑さ等から生じる数々の困難が存在する。その一つはその電子数の多さから評価すべき電子積分数が膨大になることによる計算時間の問題である。さらに構造の揺らぎや水和に起因するエントロピー項や疎水相互作用等の定量的評価も大きな問題となる。例えば、水和自由エネルギー変化に関しては連続溶媒和モデルや RISM(reference interaction site model)理論等の方法が提案されているが、薬物分子の水/溶液相の分配の指標として用いられている分配係数 ($\log P$) に関してこれらの方法による実測値の定量的再現能力は不十分であり、新たな方法論の構築およびその実用的観点からの工夫が必要とされている。

1990年代後半に北浦らによって発表された生体高分子をフラグメントに分割するフラグメント分子軌道(FMO)法や諸熊らの ONIOM 法はタンパク質-ligand 系への非経験的分子軌道法計算の適用を可能にした。一方、1964年に発表された Hansch と藤田の定量的構造活性相関(QSAR)解析では「薬物分子の置換基の変化の結合活性値への効果は自由エネルギー変化の線形則 (linear free-energy principle) に従う」を基本仮定としている。一般に QSAR 解析は ligand の構造 (置換基) 変化のみに着目しているが、現在まで創薬の現場で活用されてきている。

我々はこれら二つのアプローチを基盤とした新しい QSAR 解析法(linear expression by representative energy terms; LERE-QSAR¹⁻⁵)を提案している。本講演では LERE-QSAR 法の概要、その幾つかの応用例、今後の課題について紹介する予定である。

【分子科学計算を用いる新しい定量的構造活性相関解析法】

LERE-QSAR 式の導出において以下の三つの仮定を行う。(1) エネルギー変化の加成性 ($\Delta G_{\text{obs}} = \Delta G_{\text{bind}} + \Delta G_{\text{sol}} + \Delta G_{\text{others}}$)の成立。ここで ΔG_{obs} はタンパク質-ligand 複合体形成に伴う全自由エネルギー変化を、 ΔG_{bind} と ΔG_{sol} はそれぞれ狭義の結合(intrinsic binding)、水和(solvation)自由エネルギー変化を表す。 ΔG_{others} は上記のエネルギー項以外の変化である。(2) ΔG_{others} は代表エネルギー項(representative energy terms)の和に線形とする ($\Delta G_{\text{others}} = \beta (\Delta G_{\text{bind}} + \Delta G_{\text{sol}}) + \text{const}$,

$\beta < 0$ and/or $const > 0$). (3) エントロピー・エンタルピー補償則 ($T\Delta S^{\text{overall}} = \alpha \Delta H^{\text{overall}} + const$, $\alpha > 0$)の成立。ここで Generalized Born(GB)や Poisson-Boltzmann(PB)法のような連続溶媒和モデルを用いたときに ΔG_{sol} の極性項($\Delta G_{\text{sol}}^{\text{polar}}$)のほぼすべてがエンタルピー成分であることを考慮すると、以下の簡潔な表現 (LERE-QSAR 式)を得る。

$$\Delta G_{\text{obs}} = \gamma (\Delta E_{\text{bind}} + \Delta G_{\text{sol}}^{\text{polar}}) + const, \gamma = (1 - \alpha) (1 + \beta)$$

上式における ΔE_{bind} は FMO や ONIOM 法等により、 $\Delta G_{\text{sol}}^{\text{polar}}$ は GB、PB あるいは SCRF-MO PCM(polarizable continuum model) 法等により評価する。

我々は現在までに様々なタンパク質-阻害剤・基質系 (carbonic anhydrase, matrix metalloproteinase, influenza/human neuraminidases, serine/cysteine proteases 等) の阻害定数や触媒速度定数に LERE-QSAR 解析を適用し、ほぼすべての系において実測の全自由エネルギー変化 (ΔG_{obs})を“chemical accuracy” ($< RT \approx 0.6$ kcal/mol at room temperature)で再現可能なことを検証してきた。このうち幾つかの解析例を紹介する予定である。

LERE-QSAR 式の representative energy terms の評価には今後解決すべき課題が多々含まれているが、我々が最近取り組んでいる分散相互作用エネルギー (E_{disp})の新しい評価法⁶を最後に紹介する。一対の原子間の $|E_{\text{disp}}|$ は小さいにもかかわらず、タンパク質-ligand 間の相互作用対の数は膨大な数となり、一連の ligand 間の結合活性値の変動の支配要因となることがある。この問題に対して DFT(density functional theory)に古典的分散相互作用エネルギー項 (damping function $\cdot R^{-6}$)を組み合わせる種々の方法 (DFT-D あるいは DFT-LC)が最近提案されている。我々の提案する方法 (HF-D_{iq})は HF (Hartree-Fock theory)を基盤としているが、最近発表されている DFT-D 法と同程度の精度を有し、かつ E_{disp} の計算負荷は無視できる。実際タミフルと influenza neuraminidase 間の 253,660 原子対の E_{disp} を 0.1 秒以内に算出する。また HF エネルギーが E_{disp} を含んでいないため HF-D_{iq}を適用することで、分散相互作用エネルギー E_{disp} と E_{disp} 以外の ΔE_{bind} の全自由エネルギー変化に対する寄与を独立に見積もることが可能となる。

【終わりに】 LERE-QSAR は、薬物分子・受容体相互作用の電子・原子レベルでのメカニズムの解明を目指す “fundamental QSAR” とも言え、LERE-QSAR 解析は Hansch と藤田の QSAR の原典 “ ρ - σ - π analysis” (Hansch C., Fujita T., *J. Am. Chem. Soc.*, **86**, 1616–1626 (1964))の発展形の一つとも考えられる。現在使われている様々な論理的創薬の方法論のより強固な物理化学的意味づけやそれらの更なる発展に役立つことが期待される。

【引用文献】 1. Yoshida T., et al., *J. Chem. Inf. Model.*, **50**, 850–860 (2010)

2. Hitaoka S., et al., *J. Chem. Inf. Model.*, **50**, 1796–1805 (2010)

3. Hitaoka S., et al., *J. Chem. Inf. Model.*, **51**, 2706–2716 (2011)

4. Yoshida T., et al., *J. Phys. Chem. B*, **116**, 10283–10289 (2012)

5. Hitaoka S., et al., *J. Pestic. Sci.*, **38**, 60–67 (2013)

6. Yoshida T., et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **24**, 1037–1042 (2014)

ヒドロゲナーゼの構造・機能・進化

○ 樋口 芳樹

兵庫県大・院生命理

hig@sci.u-hyogo.ac.jp

【序】

ヒドロゲナーゼは、水素の分解と合成を触媒するタンパク質である。また、この酵素分子は H_2 (または D_2) と D_2O (または H_2O) の間での同位体交換反応や、オルト- H_2 -パラ- H_2 の変換反応を触媒することも知られている。本酵素は電子伝達体の種類でも区別できるが、活性部位の金属原子の構成に基づいて $[\text{NiFe}]$, $[\text{FeFe}]$, $[\text{Fe}]$ ヒドロゲナーゼと分類されることが通例である。最もよく研究されている $[\text{NiFe}]$ ヒドロゲナーゼにも 4 つのサブクラスがあるが、標準タイプとよばれる最小単位の $[\text{NiFe}]$ ヒドロゲナーゼはヘテロ 2 量体構造をもつ。

【実験】

我々は、これまで主に X 線結晶解析法を用いて $[\text{NiFe}]$ ヒドロゲナーゼの構造化学的研究を展開してきた。ヒドロゲナーゼは、細菌内で 8 種類以上の成熟化因子を必要とするため大量発現系の構築が極めて難しい。そこで、専ら酵素が見出された元細菌を培養して結晶化試料を調製している。 $[\text{NiFe}]$ ヒドロゲナーゼは、他の $[\text{FeFe}]$, $[\text{Fe}]$ ヒドロゲナーゼに比べて比較的酸素に安定であるため、短時間なら好気条件で結晶化可能な量の精製試料を調製できる。精製試料は、2-メチル,2,4,ペンタンジオールなどの沈殿剤を用いて蒸気拡散法にて結晶化した。結晶化にはシーディング法が特に有効である。好氣的に結晶化した酵素は、結晶状態で容易に水素還元できる。

【結果と考察】

標準タイプの $[\text{NiFe}]$ ヒドロゲナーゼの活性部位は酵素分子の奥深くに、また分子内電子伝達を担う 3 個の FeS のクラスターは、約 $10 \text{ \AA}$ の距離でほぼ直線上に分子表面へと配置されている (図 1a)。活性部位はニッケルと鉄原子からなる 2 核の金属錯体で、分子中のシステイン残基側鎖の硫黄原子によるニッケル原子への配位結合で保持されている。鉄原子は、他に 3 本の 2 原子分子 (CN 分子 2 本と CO 分子 1 本) を配位子としてもつ。これに加えて、ニッケルと鉄原子を架橋して脱着する配位子がある。この架橋配位子は酵素の不活性型では $\text{O}_2/\text{O}_2\text{H}$ (図 1b の Ni-A) または O/OH (図 1c の Ni-B)、触媒反応中の活性型では基質の水素であると思われる (図 1d の Ni-C)。酵素の活性部位が不活性な状態からどのような配位子変化を経て活性型に変化していくのかは、ほぼ明らかにできたが、実際に H_2 分子の合成や分解がどのような反応過程で進んでいるのかははっきりしていない。 H_2 分解反応では、最初にプロトンが引き抜かれヒドリドが生成されることが分光学的に示されている。その反応が実際には鉄原子で起こっているのか、あるいはニッケル原子で起こっているのか、さらには、3 通りほど考えられるプロトン経路のうちどれが利用されているのか、など詳しい反応機構は不明のままである。これらのことを明らかにするために $1.0 \text{ \AA}$ を超える超分解能の X 線結晶解析や水素原子を直接見るための中性結晶解析を進めようとして計画している。また、分光学的な手法で金属原子に配位している水素の挙動を調べつつある。

さて、先に述べたように、これまでよく研究されてきた標準タイプの[NiFe]ヒドロゲナーゼは、酸素があると不活性化される。近年、大気中と同程度の酸素濃度であっても水素があれば不活性化されない酵素が見つかった（酸素耐性酵素）。この酵素は、不活性化されるとNi-Bになるが、Ni-Aにはならない。種々の研究からNi-Aにならないことが酸素耐性に必須であることがわかってきた。我々は、ある種の細菌が有する酸素耐性[NiFe]ヒドロゲナーゼの結晶解析を行った。その結果、分子全体や活性部位の構造は標準タイプの酵素とほぼ同じであったが、3個のFeSクラスターのうちの1個が、

一般的な[4Fe-4S]-4Cysタイプではなくて、[4Fe-3S]-6Cysタイプの新規構造であることを見出した（図1e）。酸素に暴露された時、ニッケルと鉄原子の間に「O₂(H)」が配位しようとするが、このクラスターが余分の電子を活性部位に供給し、「O₂(H)」を「O(H)」に還元してNi-Bとなる。この時、クラスターは酸化されて超酸化状態となるが、構造変化を起こしてそれを安定化させると考えられる。

ゲノム解析の結果、多くの種の生物のゲノムが明らかにされ、いろいろな種類のヒドロゲナーゼが見つかってきた。それらの一次構造の相同性を考慮した結果、呼吸鎖電子伝達系複合体Iというタンパク質と[NiFe]ヒドロゲナーゼが進化的に結びつけられることが示された。複合体Iは、酸素呼吸によって地球表層で繁栄している生物達のエネルギー獲得にとって重要な役割を担っているタンパク質である。水素の分解と合成の両方を強く触媒する、NAD⁺還元型[NiFe]ヒドロゲナーゼ（4-6量体酵素）は、複合体Iの可溶性ドメインと相同性が見られる。一方、エネルギー変換型[NiFe]ヒドロゲナーゼ（6量体酵素）とよばれる酵素は、複合体Iの膜結合部位と相同性をもつ。すなわち、生命を維持するためのエネルギー獲得生体内システムではたらく最も重要なマシーナリーは、酸素呼吸をする生物でも嫌気呼吸をする微生物でも同じような仕組みが利用されている可能性が示唆される。これらのヒドロゲナーゼの結晶構造が明らかになれば、30億年以上にわたる地球上の生物のエネルギー代謝の進化についてその構造基盤を解明できるかもしれない。

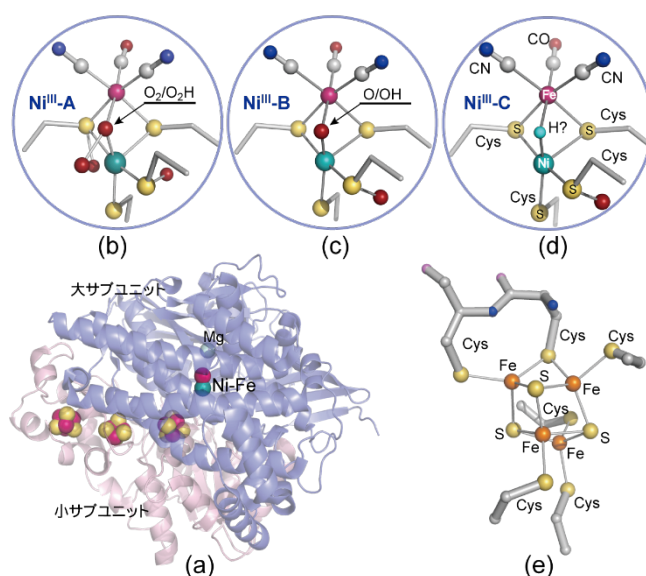


図 1 a : 標準タイプの[NiFe]ヒドロゲナーゼの分子構造, b-d : 不活性化された酵素の Ni-Fe 活性部位の Ni-A(b), Ni-B(c)および活性型の Ni-C(d)、e : 酸素耐性酵素の[4Fe-3S]-6Cys クラスターの構造

フルオロアルキル基を導入した両親媒性分子集合体の開発 ～膜タンパク質研究の基盤技術確立を目指して～

園山 正史

群馬大・院理工

sonoyama@gunma-u.ac.jp

【序】 膜タンパク質は、創薬のターゲットの半数以上を占め、各生物種の全 ORF の約 1/4 をコードすると考えられており、その動作機構の解明は現代生命科学の最重要テーマの 1 つである。膜タンパク質の構造・機能の解明を目指す *in vitro* 実験においては、2 種類の両親媒性分子、すなわち界面活性剤とリン脂質が必要となる。しかしながら、市販されている両親媒性分子を用いた実験では適切な条件の確立に困難が伴うことが極めて多いため、水溶性タンパク質に比べて、膜タンパク質研究は立ち後れた状況にあると言える。

そこで私たちは、炭化水素鎖の一部に、炭化水素と大きく異なる物性を示すことが知られているフルオロアルキルカーボンセグメントを導入した分子¹⁾に着目し、膜タンパク質研究への応用を目指して、新しい含フッ素両親媒性分子群の開発を行っている。含フッ素両親媒性分子の長鎖部分は、炭化水素鎖の末端にパーフルオロアルキル基 (Rf) を連結した構造を有しており、性質の全く異なる炭化水素ブロックとフルオロカーボンブロックをつなげた構造として模式的に表すことができる。それらの 2 種類のブロックの組み合わせを変化させることにより、両親媒性分子集合体の構造や物性を制御することを目指している。本講演では、一般的な二本鎖リン脂質 Dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC) を基本骨格とする、種々の Rf 鎖長の異なる部分フッ素化リン脂質分子群 (図 1) の膜物性および、バクテリオドロプシン (bR) をモデル分子とする膜タンパク質再構成試料に関する研究成果を紹介する。なお、一般式 $F(CF_2)_n(CH_2)_mCO-$ ($n+m=13$) と表されるアシル鎖を有する部分フッ素化リン脂質を、以下 Fn-DMPC と記すこととする。

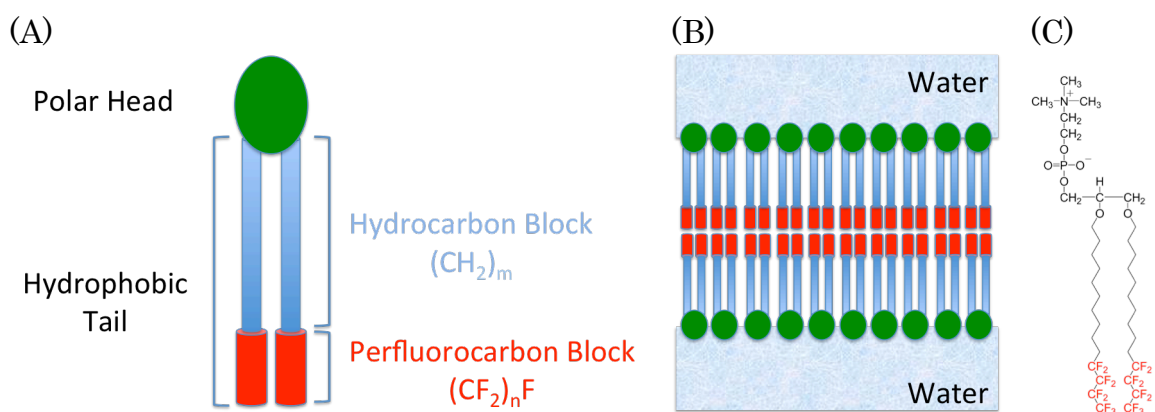


図. 1 (A) 部分フッ素化リン脂質の模式図、(B) 部分フッ素化リン脂質二分子膜の模式図、
(C) 炭化水素系リン脂質 DMPC の部分フッ素化アナログ分子 F4-DMPC の化学構造

【膜物性】脂質二分子膜の相挙動は、膜タンパク質へ応用する上で極めて重要な膜物性である。

図2の示差走査熱量曲線に示されるように、Rfが $n=6$ 以下の部分フッ素化リン脂質では、DMPCに比べてゲル-液晶相転移温度が低下し、特に $n=2, 4$ では約 $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ も低下する²⁾。相転移温度の低下は、アシル鎖に含まれるフルオロカーボンと炭化水素の分子断面積の違いに基づくパッキングの低下が原因だと考えられる。単一分子追跡実験から、F4-DMPC二分子膜は十分に高い流動性を有することがわかっている。

したがって、比較的短いRfの導入により、生理的温度で高い流動性を持つ、化学的に安定な脂質二分子膜の創製が可能であると期待される。ところがさらにRfを伸長したF8-DMPCでは、ゲル-液晶相転移温度が劇的に上昇し、F8-DMPCは安定な固い二分子膜を形成すると考えられる。これらの結果は、Rfの導入量により部分フッ素化リン脂質の膜物性を制御できる可能性を示している。また、二元系DMPC/F4-DMPC混合膜は強く相分離することを、DSC曲線から得られた相図の解析により明らかにしており³⁾、性質の異なる複数のドメインからなる人工脂質二分子膜を現在開発中である。

【部分フッ素化リン脂質再構成バクテリオロドプシン】F4-DMPCを用いたbR再構成実験を行ったところ、80%以上の高い収率で再構成試料を調製することに成功した。さらにゲル相、液晶相のいずれにおいても、再構成bRは天然紫膜類似の三量体を基本とする二次元結晶構造と光サイクルを有し、機能時も高い安定性を示すことを明らかにした⁴⁾。液晶相においても天然紫膜に類似した性質を示すことは、非含フッ素リン脂質再構成とは大きく異なる、F4-DMPC脂質膜再構成試料に特徴的なことであり、部分フッ素化リン脂質膜が膜タンパク質の研究において有用であることを示唆している。さらに強く相分離する二元系DMPC/F4-DMPC混合膜では、bRはF4-DMPCリッチドメインに優先的に再構成されることを見いだした。Rf鎖長をさらに伸ばした部分フッ素化リン脂質を含む強く相分離した混合膜も、部分フッ素化リン脂質のみの膜に加えて、膜タンパク質研究において重要な役割を果たすと期待している。

【今後の展望】膜タンパク質への応用を目指した、パーフルオロアルキル基を導入したリン脂質や界面活性剤に関する私たちの研究はまだ始まったばかりである。膜物性に対するRf鎖長依存性が顕著であり、しかも一定の長さを超えると劇的に性質が変化することが明らかになりつつある。これらの両親媒性分子集合体の特徴をさらに理解し、膜タンパク質研究へ広く展開を図るため、最も基本的な分子である脂肪酸単分子膜を含めて、Rf鎖長の異なる両親媒性分子群の系統的な合成と膜構造・物性の解析を行うことが重要であると考えている。

【引用文献】1. Krafft and Riess, *Chem. Rev.*, **109**, 1714-1792 (2009)

2. Yoshino, M., et al., *Chem. Lett.*, **41**, 1495-1497 (2012)

3. Takahashi, H., et al., *Chem. Phys. Lett.*, **559**, 107-111 (2013)

4. Yoshino, M., et al., *J. Phys. Chem. B*, **117**, 5422-5429 (2013)

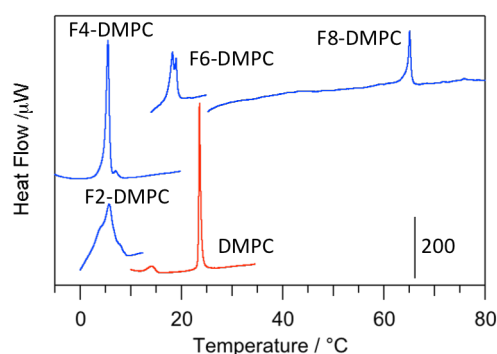


図.2 Rf 鎖長の異なる種々の部分フッ素化リン脂質の DSC 曲線

ドメインスワッピングを利用したヘムタンパク質の超分子化

○ 廣田 俊

奈良先端大・物質創成

hirota@ms.naist.jp

【序】 近年の超分子化学の発展は目覚ましく、金属配位などを利用して、高度な機能をもつ巨大超分子が作られている。生体内のタンパク質にもヘモグロビンやボルトなど超分子を形成して働くものも多い。一方、ジフテリアトキシンの2量体で、同一領域をタンパク質分子間で交換（ドメインスワッピング）した構造が明らかになってから、ドメインスワップするタンパク質が次々と見つかっている。そこで、我々は超分子のさらなる機能化を目指し、ドメインスワッピングを利用してヘムタンパク質超分子の作製を行っている。

【結果と考察】

ヘムタンパク質であるシトクロム *c* (cyt *c*) は3本の長い α ヘリックスを持ち、天然構造ではN末端 α ヘリックスとC末端 α ヘリックスが相互作用している。Cyt *c* はポリマー化し機能を失うことが50年以上も前に報

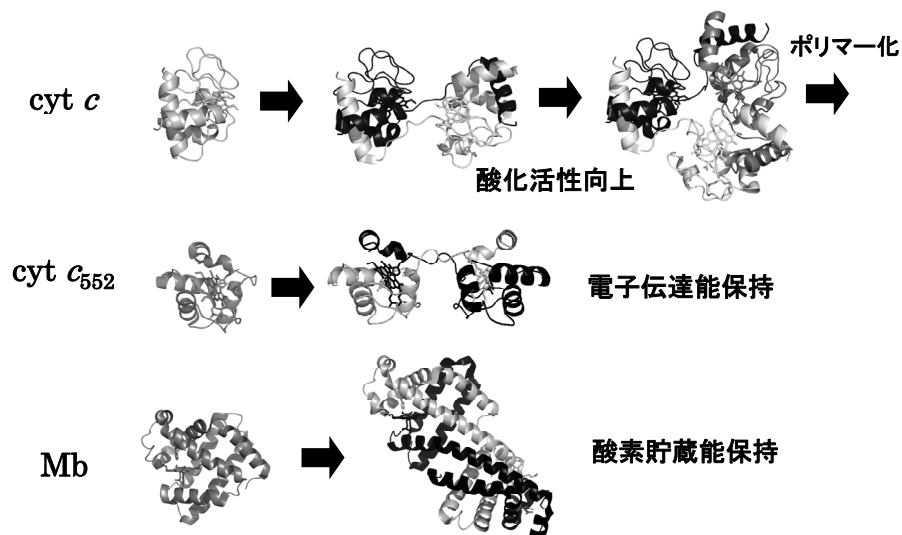


図 1 ドメインスワッピングによるヘムタンパク質の多量化

告されていたが、その機構は不明のままであった。我々はウマ cyt *c* をエタノールで処理することにより2~4量体を作製し、精製することに成功した。2量体および3量体は、cyt *c* のC末端 α ヘリックスが残りのタンパク質部分から解離し、別の cyt *c* 分子の対応する部位に結合するドメインスワップ構造を有することが判明した（図1）¹。水溶液中の cyt *c* 2~4量体は多量体数の増加とともに鎖状に連なって伸び、cyt *c* 3量体はPEGと $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ を加えると鎖状構造から環状構造に変化することがX線溶液散乱測定により判明した。また、cyt *c* 2量体および3量体では、ヘム鉄-Met結合が解離し、 OH^- がヘム鉄に配位していた。Cyt *c* は多量化により、シアン化物イオンのヘム鉄への配位が容易になり²、 H_2O_2 によるペルオキシダーゼ活性も向上した³。Cyt *c* 2~4量体はすべて約58℃で単量体に解離し、2量体、3量体および4量体が単量体に解離するときのエンタルピー変化 (ΔH) はそれぞれ約-40、-60および-80

kcal/mol であることが DSC 測定により判明した。この結果は、各多量体が単量体に解離するとき、プロトマー当たり約 20 kcal のエネルギーが放出されることを示しており、多量体の解離に伴い Met がヘム鉄に再配位することによる安定化エネルギーが大きく寄与すると推測された。エタノール添加により cyt c がドメインスワップする場合、ヘム鉄-Met 結合の解離が引き金となるが、cyt c のフォールディングを高タンパク質濃度で行ってもドメインスワップした多量体を得られた⁴。さらに、ドメインスワップした多量体は単量体よりも強くアニオン性脂質や HeLa 細胞の膜表面と相互作用し、膜構造を破壊することが分かった⁵。この結果は、ドメインスワッピングにより多量化したタンパク質が単量体と異なる生理機能や細胞毒性をもつことができることを示している。

好熱性水素細菌 (*Hydrogenobacter thermophilus*, HT) 由来シトクロム c_{552} (cyt c_{552}) は哺乳類の cyt c よりも小さいが、同じタンパク質スーパーファミリーに属し、3 本の長い α ヘリックスを持ち、N 末端と C 末端のヘリックスが相互作用している。酸化型 HT cyt c_{552} にエタノールを添加すると多量体を得られ、HT cyt c_{552} 2 量体では、N 末端 α ヘリックスとヘムを含む領域が別の HT cyt c_{552} 分子の対応する領域とドメインスワッピングし、Ala18、Lys19、Lys20 の位置が単量体での位置から大きくずれていた (図 1)⁶。HT cyt c_{552} では、ヘム鉄に配位する Met の周辺のループで比較的強い水素結合ネットワークが形成されているため、2 量化するとき、C 末端 α ヘリックスは残りのタンパク質部分から解離しなかったと推測される。さらに、HT cyt c_{552} の 2 量体の Met はヘム鉄に配位していたが、ヘムが属しているプロトマーとは別のプロトマーに属していた。2 量体の酸化還元電位 (E_m) は 213 ± 2 mV で、単量体 (E_m : 240 ± 2 mV) 同様、高い値を示した。

Mb 2 量体もエタノール処理により得られた。Mb 2 量体では、単量体で活性部位を形成する E および F ヘリックスと EF ループが 1 本の長い α ヘリックスを形成し、ドメインスワッピングすることが分かった (図 1)⁷。Mb 2 量体は単量体と同程度の酸素結合能を有することも分かった。

以上のように、タンパク質によって得られる多量体の大きさや機能変化の有無が異なることは興味深く、様々なタイプのタンパク質超分子が創成できる可能性を示唆する。今後、タンパク質をビルディングブロックとした新しい超分子が創成されるとともに、ドメインスワッピングによるタンパク質超分子の研究が *in vitro* 実験に加え、*in vivo* 実験でも展開されることを期待する。

【引用文献】 1. Hirota, S., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 12854-12859 (2010)

2. Nugraheni, A. D., et al., *J. Biol. Inorg. Chem.*, **18**, 383-390 (2013)

3. Wang, Z., et al., *Org. Biomol. Chem.*, **9**, 4766-4769 (2011)

4. Parui, P. P., et al., *Biochemistry*, **52**, 8732-8744 (2013)

5. Junedi, S., et al., *ChemBioChem*, **15**, 517-521 (2014)

6. Hayashi, Y., et al., *Biochemistry*, **51**, 8608-8616 (2012)

7. Nagao, S., et al., *Dalton Trans.*, **41**, 11378-11385 (2012)

一般講演

水素と水からの電子抽出

○ 小江 誠司^{1, 2, 3}

¹WPI・I2CNER、²九大・院工、³JST・CREST

ogo.seiji.872@m.kyushu-u.ac.jp

[序]

安全かつクリーンで持続可能なエネルギーを供給することは、21 世紀の重要な課題の一つであり、そのようなエネルギーとして水素と水が期待されている。自然界では、水素活性化酵素「NiFe ヒドロゲナーゼ」が水素から電子を、水活性化酵素「光化学系 II」が水から電子を取り出している。本講演ではこれらの酵素をモデルとした新規触媒システムを紹介する。¹⁻⁴

[実験]

Ni^{II}Fe^{II} アセトニトリル錯体[Ni^{II}LFe^{II}(MeCN){P(OEt)₃]₃](BPh₄)₂ {[1](BPh₄)₂, L = *N,N'*-diethyl-3,7-diazanonane-1,9-dithiolato}に、MeONa を含む MeCN/MeOH 混合溶媒中で、1 気圧の水素を反応させると、Ni^{II}Fe^{II} ヒドリド錯体[Ni^{II}L(μ-H)Fe^{II}{P(OEt)₃]₃](BPh₄) {[2](BPh₄)₂}が生成する。このヒドリド錯体[2](BPh₄)₂は、MeCN 中で methyl viologen (MV²⁺) と ferrocenium ion を電子還元し、10-methylacridinium ion (AcrH⁺) と H⁺をヒドリド還元する。

ビス(μ-オキソ)二核 Mn^{III,III} 錯体 [Mn^{III,III}]₂(tpa)₂(μ-O)₂](BPh₄)₂ {[3](BPh₄)₂, tpa = tris(2-pyridylmethyl)amine}を MeCN に溶かし、3,5-di-*t*-butyl-1,2-benzoquinone と triethylamine の存在下で光 (>550 nm) を照射すると、単核 Mn^{II} 錯体[Mn^{II}(tpa)(DTBSQ)](BPh₄) {[4](BPh₄)₂, DTBSQ = 3,5-di-*t*-butyl-1,2-semiquinonato}が生成する。この錯体[4](BPh₄)₂に MeCN 中で酸素を反応させると、錯体[3](BPh₄)₂が生成する。錯体[3](BPh₄)₂を montmorillonite K-10 に吸着させ、水中で(NH₄)₂[Ce^{IV}(NO₃)₆]を加えると酸素が発生する。H₂¹⁸O を用いると ¹⁸O₂が発生する。

[結果と考察]

これまで多くの NiFe ヒドロゲナーゼモデル錯体が合成されてきたが、NiFe 錯体を用いて水素をヘテロリティックに活性化した例はこれまで報告されていない。本研究では、新規 NiFe 錯体 **1** を用いて水素のヘテロリティックな活性化と水素からの電子抽出に初めて成功した(図 1)。¹⁻³ ヒドリドイオンを捉えた錯体 **2** の X 線構造解析により、ヒドリドイオンは Ni 原子よりも Fe 原子に近い位置に存在することを明らかにした。このヒドリド錯体 **2** は、種々の電子・ヒドリド受容体の還元能を有しており、H⁺との反応では水素が発生する(図 1)。

さらに、本研究では光化学系 II の酸素発生中心 (OEC) のモデル研究も行った。水から電子を抽出できる光化学系 II は現在最も注目の高い酵素の 1 つであるが、その複雑な触媒メカニズムは未だ解明されていない。特に、OEC の光阻害後の再生過程については全く解明されていない。本研究では、OEC モデル錯体 **3** を用いたモデル化学の観点から、OEC の光阻害・自己再生過程の新しいメカニズムを提案した(図 2)。⁴ すなわち、光照射により分解した活性中心が、水の酸化によって発生した酸素によって再生するというメカニズムである。

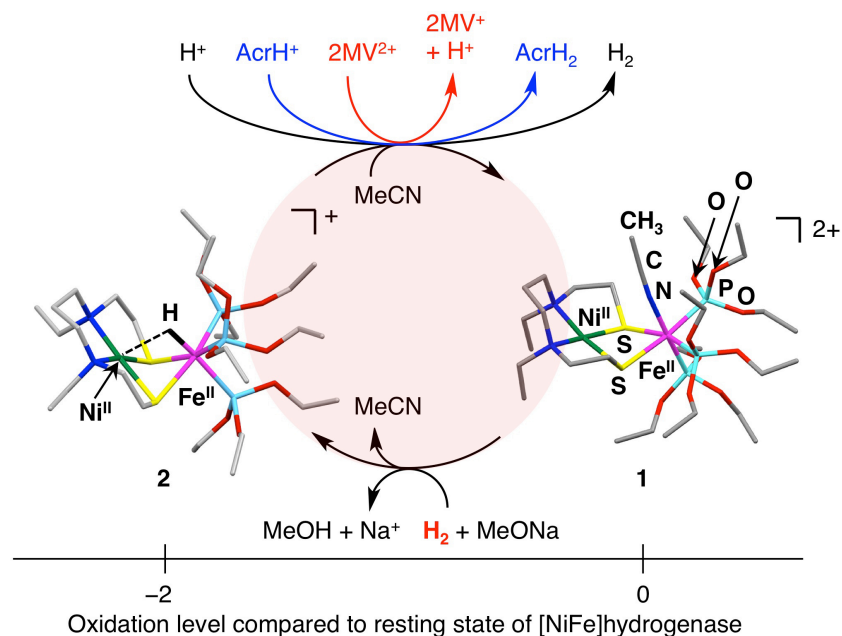


図 1 ヒドロゲナーゼモデル錯体による水素の活性化と水素からの電子抽出

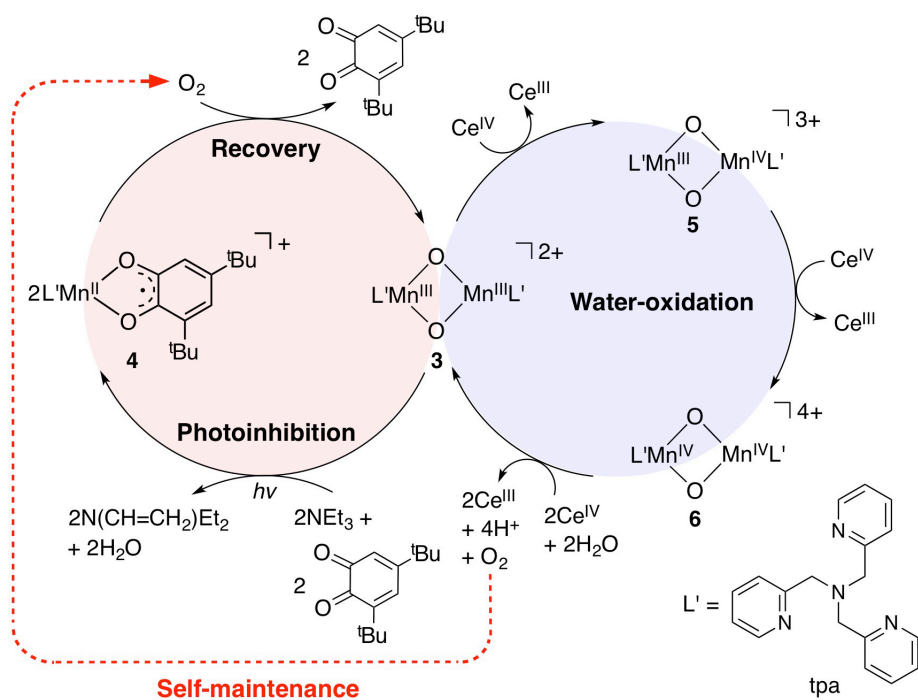


図 2 OEC モデル錯体による水の酸化と自己修復メカニズム

[引用文献]

1. Ogo, S. et al. *Science* **2007**, 316, 585–587, **2013**, 339, 682–684.
2. Ogo, S. *Chem. Commun.* **2009**, 3317–3325.
3. Ogo, S. *Chem. Rec.* in press (DOI: 10.1002/tcr.201402010).
4. Yatabe, T. et al. *Dalton Trans.* **2014**, 43, 3063–3071.

メチオニン合成酵素の構造・機能モデル

○ 林 高史¹、森田 能次¹、大洞 光司¹、久枝 良雄²

¹阪大・院工、²九大・院工

thayashi@chem.eng.osaka-u.ac.jp

【序】 メチオニン合成酵素は、メチル基転移反応をつかさどる酵素の一つとして知られ、ホモシステインからメチオニンへの分子変換を支援している。この酵素は、4つの大きなドメインから形成され、非常に複雑であり、全体の立体構造はまだ正確には解明されていない。ドメインの1つは、コバラミン（ビタミン B12 類縁体）を補欠分子として結合し、コバラミンのコバルト原子上でメチル基転移が進行する（図1）。コバラミンの中心に位置するコバルト原子には、側鎖のベンズイミダゾールではなく、コバラミン結合ドメイン内に存在するヒスチジンが軸配位子の役目を果たしていることが、結晶構造解析から明らかとなっている（base-off/His-on）。図1の触媒サイクルで示すように、*N*⁵-メチルテトラヒドロ葉酸がメチル基供与体となり、2つのコバラミン中間体が存在する。一つは、4配位コバルト1価種であり、もう一つはコバルト3価メチル錯体（メチルコバラミン）である。前者は、強い求核性を有することが知られているが、タンパク質中でのコバラミンの4配位構造はまだ明らかにされていない。一方、後者のメチル錯体から基質へのメチル基転移では、適切なモデル錯体を使った反応の再現は難しい。これらの課題を踏まえ、今回は、複雑な酵素および補欠分子のそれぞれを単純化したメチオニン合成酵素の新しい構造・機能モデルを報告する。

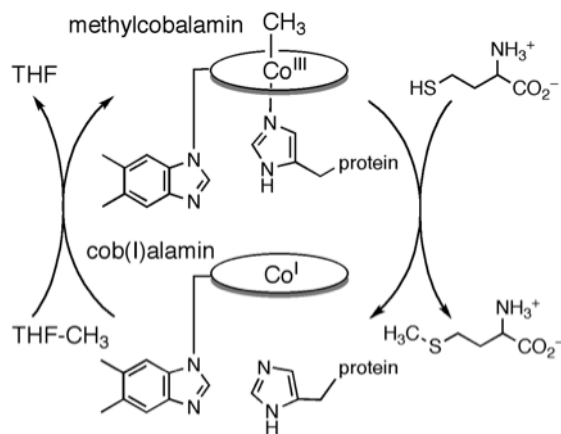


図1. メチオニン合成酵素内でのコバラミンの触媒サイクル

【実験】 コバラミンのモデル錯体として、図2に示すコバルトテトラデヒドロコリン $\text{Co}^{\text{II}}(\text{TDHC})$ の合成を行った。一方、タンパク質側は、メチオニン合成酵素のコバラミン結合ドメインのモデルとして、コバルト錯体と配位結合可能なヒスチジンを備えたアポミオグロビンに着目し、 $\text{Co}^{\text{II}}(\text{TDHC})$ をアポミオグロビンに挿入して、メチオニン合成酵素の

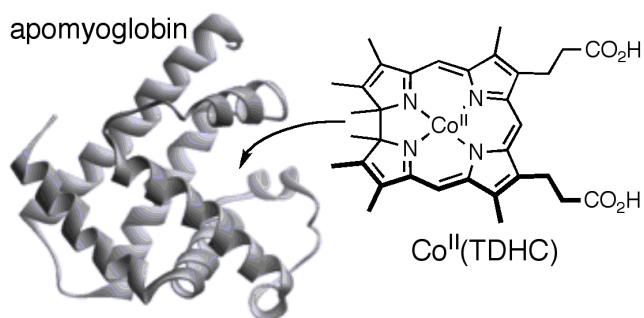


図2. メチオニン合成酵素モデルの調製 $\text{Co}^{\text{II}}(\text{TDHC})$ のアポミオグロビンへの挿入

モデルタンパク質 $\text{rMb}(\text{Co}^{\text{II}}(\text{TDHC}))$ を調製した（図2）。得られた再構成タンパク質を種々の手法で同定した後、ジチオナイトで還元し、 $\text{Co}(\text{I})$ 種を発生し、同様に同定を試みた。次に、 $\text{rMb}(\text{Co}^{\text{I}}(\text{TDHC}))$ にヨウ化メチルを添加し、ヘムポケット内でコバルトアルキル錯体の生

成を実施した。さらに、得られたメチル錯体 $\text{rMb}(\text{CH}_3\text{-Co}^{\text{III}}(\text{TDHC}))$ について、コバルト原子に結合したメチル基のタンパク質への転移を、MS および NMR を駆使して追跡した。

[結果] 再構成タンパク質は、UV-vis、CD、Mass、EPR、ICP によって生成を確認し、さらに X-ray 結晶構造解析の結果から、 $\text{Co}^{\text{II}}(\text{TDHC})$ がミオグロビンのヘムポケットに His64 が配位した 5 配位で結合していることが明らかとなった (図 3)。またタンパク質全体構造も、天然のミオグロビンの構造とほとんど一致していた (RMS 値; 0.223 Å)。次に得られたタンパク質をジチオナイトで還元したところ、 $\text{Co}(\text{I})$ 種が比較的安定に UV-vis および EPR で検出され、さらに結晶構造解析も可能となった。得られた三次元構造では、 Co-His64 の配位結合が解離し、 $\text{Co}^{\text{I}}(\text{TDHC})$ は、4 配位構造であることが判明した。さらに、この $\text{Co}(\text{I})$ 種にヨウ化メチルを添加したところ、光感受性種が得られ、ESI-TOF MS から、コバルトメチル錯体を含むタンパク質 $\text{rMb}(\text{CH}_3\text{-Co}^{\text{III}}(\text{TDHC}))$ の生成が確認された。また、このタンパク質溶液を室温で一晩放置することにより、His64 の残基にメチル基が転移することが明らかとなった (図 4)。これは、MALDI-TOF MS in source decay 法により、His64 の部分の分子量のみがメチル基分だけ増加したことにより示唆された。さらに、メチル転移が進行したタンパク質をトリプシンにより加水分解し、His64 を含むフラグメントを単離・精製し、 ^1H および ^{13}C NMR により詳細な同定を実施した結果、His64 のイミダゾール N ϵ 2 原子のメチル化が判明した。

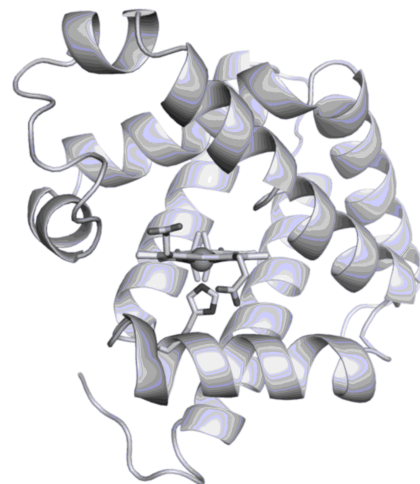


図 3. $\text{rMb}(\text{Co}^{\text{II}}(\text{TDHC}))$ の結晶構造 分解能 1.30 Å

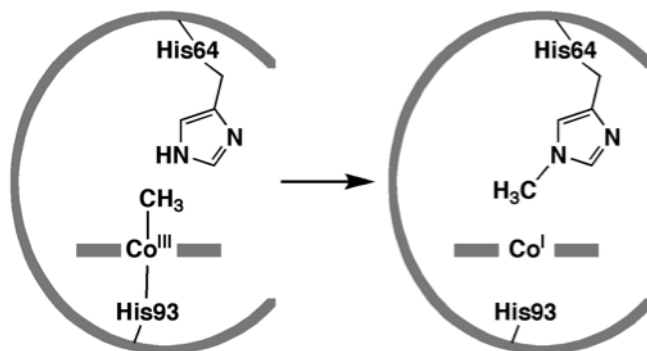


図 4. ヘムポケット内でのメチル基転移反応

[考察] コバラミンのモデル錯体を用いて、コバルト 1 価種の検出やコバルトアルキル錯体の合成に関する試みは、これまでに幾つか実施されている。しかしながら、一つのモデル化合物を用いて 2 つの目的を同時に達成した例はない。すなわち、 $\text{Co}(\text{I})$ 種が安定に存在する錯体では、アルキル錯体に移行する反応性が乏しいことに由来する。また、 Co-CH_3 結合を安定に形成するコバルト錯体においては、 $\text{Co}(\text{I})$ 種は不安定であり、結晶構造での同定は困難である。したがって、今回のミオグロビンとコバルトコリン錯体を用いた再構成タンパク質では、これらの問題点を全て克服したユニークなモデルと言える。さらに、図 4 に示すように、コバルト原子に結合したメチル基のヘムポケット内のイミダゾール環への転移は、実際の酵素におけるモデル反応として、極めて興味深い挙動である。

4つのヒスチジンからなる単核非ヘム鉄中心をもつタンパク質の酸化能

○ 藤枝 伸宇、石濱 謙一、谷口 勇希、伊東 忍

阪大・院工

shinobu@mls.eng.osaka-u.ac.jp

【序論】

非ヘム単核鉄酸化酵素は生体内に数多く存在し、二つのヒスチジンとアスパラギン酸が配位したナフトレンジオキシゲナーゼ、活性中心に3つのヒスチジンと1つのグルタミン酸が配位したキアセチンジオキシゲナーゼ、3つのヒスチジンが配位したシステインジオキシゲナーゼなどが報告されている。こうした酵素の金属活性中心に着目したモデル研究が数多く展開された結果、Tris(2-pyridylmethyl)amine (TPA) や *N,N'*-dimethyl-*N,N'*-bis(2-pyridylmethyl)-1,2-diaminoethane (BPMEN)などの窒素系四座配位子を用いて合成したシス位に空いた配位座をもつ鉄錯体は高原子価の鉄オキソ活性種を形成することで良好な酸化反応触媒となることが分かってきた。^{1,2} 我々のグループではこのような鉄錯体よりさらに高い位置選択性や不斉選択性、および触媒回転数を有する人工金属触媒の創製をめざし *Thermotoga maritima* 由来の TM1459 タンパク質を配位子とした鉄錯体の合成に取り組んできた。このタンパク質は4つのヒスチジンが配位し、*cis* 位には2つの水分子が存在する正八面体構造の単核マンガン中心を有していることが分かっている。この活性中心を鉄に置換することで、前述の鉄錯体に類似した配位環境を与えることが期待される (Fig.1)。

本研究では、このタンパク質の鉄置換体の分光学的特性、および酸化反応特性を評価するため、フェノールの水酸化反応について検討した。

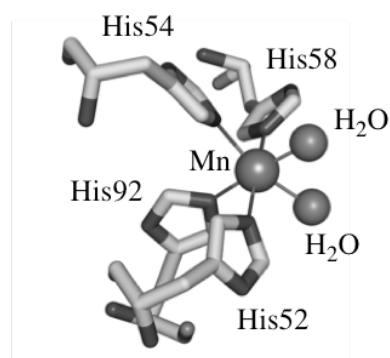


Figure 1. Structure of metal binding site of TM1459

【結果・考察】

野生型のタンパク質をコードする cDNA を有した発現プラスミドを大腸菌 BL21(DE3)株に形質転換後、クエン酸鉄を高濃度を含む培地中で発現誘導した。超音波で菌体を破碎後、アフィニティークロマトグラフィー、陰イオン交換クロマトグラフィーにより精製し、SDS-PAGE によって、均一な状態まで生成できたことを確認した。ICP 分析により、生成されたタンパク質はおよそ、0.8 等量の鉄が含まれていることが分かった。また、ESR スペクトルを測定した結果、その鉄はハイスピンの三価であることが分かり TM1459 ができたことを確認した。さらに、ハンギングドロップ蒸気拡散法により結晶化条件を広範に検索し、鉄置換型 TM1459 の単結晶を得た。その後、SPRING-8 のビームライン BL44XU にて X 線回折データを収集した。すでに報告されているネイティブ状態の構造 (PDB entry: 1vj2) を用いて、分

子置換法で鉄置換型 TM1459 の初期構造を決定した。精密化の結果、最終的に 1.1 Å の高分解能で構造を決定した。得られた構造ではホモ二量体を形成しており、その鉄中心は予想したように 4 つのヒスチジンが配位し、シス位に空いた配位座が二つ見られた。このように期待した配位構造を持つ鉄置換型の TM1459 タンパク質が得られたことを確認した。

一方で、金属中心から 3.5Å 離れた位置に存在する Cys106 の窒素原子周辺に余分な電子密度が観測され、翻訳後化学修飾されていることが示唆された。このことは、MALDI-TOF/MS 分析において、計算値に比べ 46 増加した質量が得られた結果と一致する。このように、鉄中心において酸素が活性化され、システインが酸化されたと推測される。このような鉄置換体の酸化機能について

てさらなる検討を行うため、野生型の TM1459 に還元剤である Tris(2-carboxylethyl)phosphine (TCEP)存在下で 4-ニトロフェノールを添加したところ、700nm に吸収極大が現れた(Fig.2)。このスペクトルは鉄置換型 TM1459 タンパク質に 4-ニトロカテコールを添加した際に現れるスペクトルと類似していたため、4-ニトロフェノールがニトロカテコールへと水酸化され、鉄中心に結合したことが示唆された(Fig.3)。さらに、鉄中心近傍の Arg39、Cys106 の二つの残基に着目し、基質結合部位の拡張を目的として、それぞれアラニンに変異させた R39A/C106A 変異体を作製した。この変異体についても、基質過剰条件下で野生型と同様にニトロフェノールの水酸化反応を行ったところ野生型と同様に反応し、一次反応速度定数は野生型に比べて約 7 倍大きくなることが分かった。4-ニトロフェノール濃度依存性を検討したところ、直線関係が得られた。無置換および 4-メトキシフェノールについても、同様の実験を行い、二次反応速度定数を比較した結果、置換基の電子供与性が高くなるにつれて反応速度が増加することが分かった。本発表ではこれらの結果をあわせ、反応機構および、芳香族炭素水酸化に関与する鉄オキシ活性種について議論する予定である。

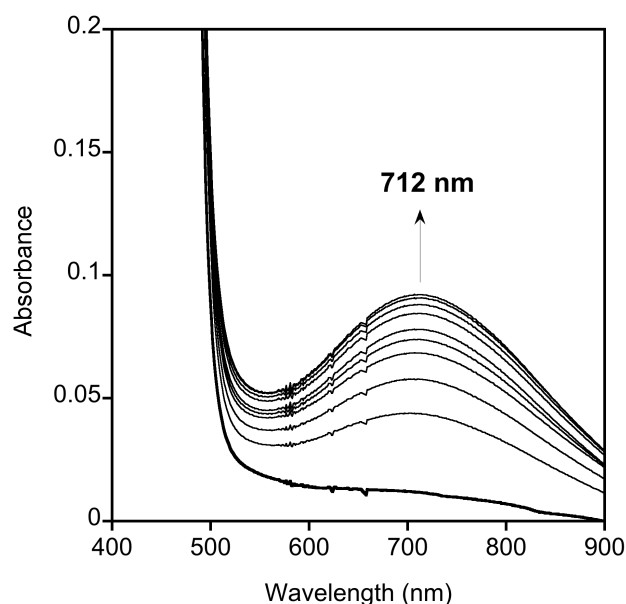


Figure 2. Visible spectral change during reaction with 4-nitrophenol.

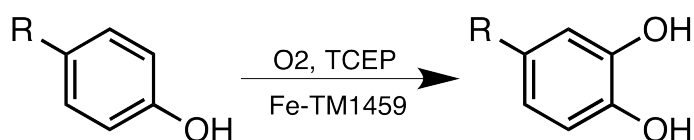


Figure 3. Schematic representation of phenol hydroxylation by TM1459 with dioxygen and reductant.

【参考文献】

- (1) L. Que, Jr. *et al.*, *Nature.*, **2008**, *455*, 333-339.
- (2) L. Que, Jr. *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **1996**, *118*, 4373-4379.

時間分解振動分光法でみたチトクローム酸化酵素の 反応初期過程での共役機構

○ 中島 聡¹・久保 稔[#]・石上 泉[§]・新澤-伊藤 恭子¹・吉川 信也¹・
小倉 尚志¹

¹兵庫県大院生命理ピコバイオロジー研・[#]現所属[#]理研播磨・[§]現所属[§] Albert

Einstein College

n_satoru@sci.u-hyogo.ac.jp

[序]

チトクローム酸化酵素(CcO)はミトコンドリアの内膜に存在する呼吸鎖電子伝達系の末端酵素で、酸素を水にまで還元する酸素還元反応を触媒しそのエネルギーを用いて膜間のプロトンポンプを行う機能を持つ。この機能のうち酸素還元反応に関してはその詳細が明らかにされてきているが、この反応がどのようにプロトンポンプ機能に共役しているかについてはいまだ推論の域を出ていない。我々はその反応初期過程に対応するCO光解離反応を時間分解赤外・共鳴ラマン分光法(TRIR・TR³)により調べ、蛋白質の複数の部位が協同的に働いて機能発現を行っている様子を反応の実時間で観測することに成功した¹。特にTRIRでは、高輝度のレーザ赤外光源を用いた新規の分散型赤外分光装置を製作して水溶液中生理条件下で反応を追跡することを可能にした¹。

CcO は詳細な X 線構造解析² (図 1) をもとにして共役機構に関していくつかの提案が行われている。まず H-pathway とよばれるプロトンポンプ経路に接する helix のみが、酸素還元反応の反応サイトの配位子結合状態によって変化することがわかっている。この helix X と呼ばれる α -helix では、反応の活性部位近傍に位置していてかつプロトンポンプ経路にあたる部分に bulge 構造とよばれる水素結合が一部外れてアミノ酸残基が外部に向けた特殊な構造をしているところがある。このアミノ酸残基(Ser382)がプロトンポンプ経路のゲートの開閉の役割をはたしているのではないかということが提唱されているが、これは反応開始時に相当する非配位還元状態の時にのみ開いていることがわかっている。一方、CO は生理機能の場合の配位子である O₂ analog であり、その光解離反応は通常の逆反応であるが、配位子の脱着にともなう蛋白質の動的過程を観測するためには有効な手法である。そこでこの CO 光解離反応を観測して、反応サイトで

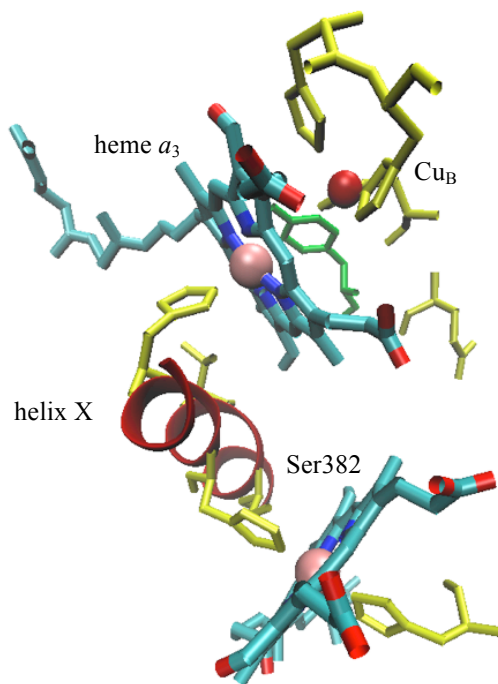


図 1 CcO の反応部位付近の構造

の配位子の結合様式やそれに伴う helix X の構造変化を観測した。

【実験】

既報の方法で精製した CcO を用いて、dithionite で還元した後 CO 雰囲気下で CO 型を生成して実験に使用した。共鳴ラマンの実験では再結合を遅らせるため N₂ を CO:N₂ = 1:9 の割合で混合した気体中に試料を封入して用いた。また試料は回転セルにいて測定を行いレーザ光によるダメージを避けた。TRIR・TR³いずれの場合も CO 光解離開始のために 532 nm の ns Nd:YAG を用いた。TRIR は自作のシステムを用いて行った。尖頭出力の極めて高いフェムト秒レーザを白色赤外光源として用い、分散型分光器でマルチチャンネル MCT 検出器により測定を行った。この時、正確な差スペクトルが測定できるように測定アルゴリズムを工夫した。このシステムでは軽水中で吸光度が 2 以上ある領域でも < 30 μO.D. の変化量を検出できた。これは CcO (～1800 残基) のような蛋白質で 1 つの残基の変化を検出できる精度に相当する。TR³ には ns Nd:YAG (プローブ用励起波長 435 nm) を用いて行った。

【結果・考察】

時間分解振動分光法による測定の結果、以下のような点が明らかになった。まず、heme a₃ の Fe²⁺ から光解離した CO はその対面にある Cu_B に配位して、2 μsec. 以内に外部に逃げていく。通常室温では CO は Fe²⁺ に配位する方が安定であるが、この過渡的な CO は Fe²⁺ に再結合することはない。また、この過程にともない heme a₃ に配位している His の ν_{Fe-His} が 221 cm⁻¹ から 215 cm⁻¹ へと低波数シフトした。さらに主鎖構造に由来する amide I の経時変化の解析 (図 2) から helix-X の bulge 構造が変化し過渡的に通常の α-helix 様の構造をとることがわかった。こうした結果と構造解析の情報により、helix-X の bulge 構造がプロトンポンプ経路の水素結合状態を感知していて、それにより heme a₃ の配位子に対する親和性を制御しているというモデルが示唆された。つまり、CcO はプロトンポンプ経路に酸素還元反応に十分なプロトンが供給されるかどうかを監視しており、準備ができた段階で Cu_B に配位した O₂ は親和性の上がった heme a₃ に配位して反応が開始され、同時に経路が閉まりプロトンのリークを防ぐというものである。

【引用文献】

1. Kubo, M., Nakashima, S., et al., *J. Biol. Chem.*, **288**, 30259-30269 (2013)
2. Muramoto, K., Yoshikawa, S., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **107**, 7740-7745 (2010)

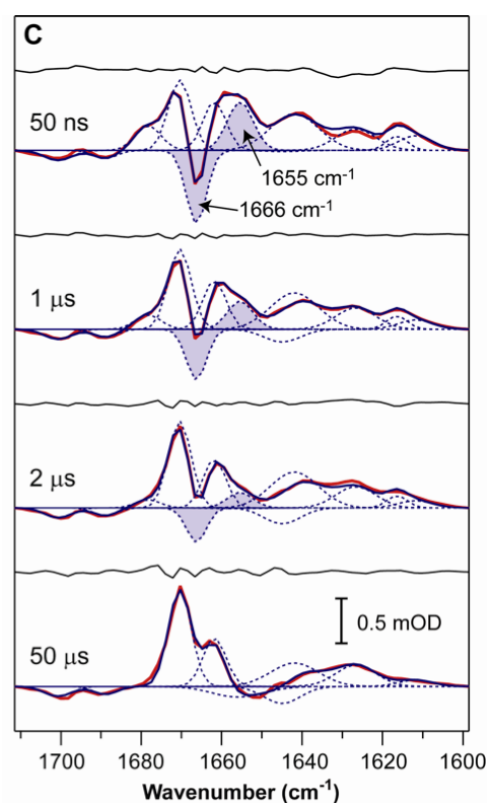


図 2 TRIR による amide I 付近の経時変化

青色光センサータンパク質 TePixD の高圧下における反応ダイナミクスの解析

○ 黒井 邦巧¹、岡島 公司^{2,3}、池内 昌彦²、徳富 哲³、猪股 孝史⁴、神山 匡⁴、寺嶋 正秀¹

¹京大院理、²東大院総合文化、³大阪府立大院理、⁴近大理工
kyk@kuchem.kyoto-u.ac.jp

【序】これまで多くのタンパク質複合体への圧力効果が調べられその構造安定性が議論されてきた一方でタンパク質反応における高次構造変化のダイナミクスへの圧力効果を調べた研究はほとんどない。しかし反応ダイナミクスへの圧力効果からは過渡種に関する構造情報など反応に関する新たな知見が得られることが期待できる。我々はこれまで過渡回折格子法 (Transient Grating method; 以下 TG 法と略称) を用いてタンパク質反応の高次構造変化のダイナミクスを検出することに成功してきた。この TG 法を高圧条件下で適用することで高次構造変化のダイナミクスへの圧力効果を調べるのが可能になる。

本研究では青色光センサータンパク質の一つである TePixD の高圧下における反応ダイナミクスを調べた。このタンパク質は TePixD 単量体 5 つが集まり環状の 5 量体を形成し、この 5 量体 2 つが重なった 10 量体構造をとることが知られている。TePixD の常圧における光反応ダイナミクスは TG 法を用いた研究からすでに分かっており図 1 のような光反応ダイナミクスを持つ[1]。すなわち暗状態において 10 量体構造と 5 量体構造の平衡が存在するが、10 量体においてのみ 4 ミリ秒の時定数で 5 量体へと解離反応を起こして最終生成物となる。光励起状態は約 5 秒の時定数で暗回復をして反応が完結する。本研究では特に 10 量体の解離過程への圧力効果を TG 法と、高圧下動的光散乱測定 (DLS) 及び高圧下部分比容測定などの定常状態測定を組み合わせで検討した。

【実験】 タンパク質試料として TePixD を大腸菌において発現、精製しバッファーに溶かしたものを試料溶液とした。この試料溶液を耐圧光学セル内で圧力を常圧の 0.1 MPa から 50 MPa まで変えながら TG 信号を測定した。TG 信号の測定は試料の励起に波長 462 nm のナノ秒パルスを用い、プローブ光として波長 840 nm の連続光を用いた。高圧下での DLS 測定においては同じ溶液サンプルを散乱光測定用の高圧セルを用いて 130 MPa までの圧力を加えながら溶質分子の拡散係数を求めた。またこのタンパク質の高圧化部分比容測定は文献[2]の方法により高圧が適用可能な振動式密度計 DMA512 を用いて常圧から 40 MPa まで 1 MPa おきの圧力で測定を行った。各実験における測定温度は全て室温であった。

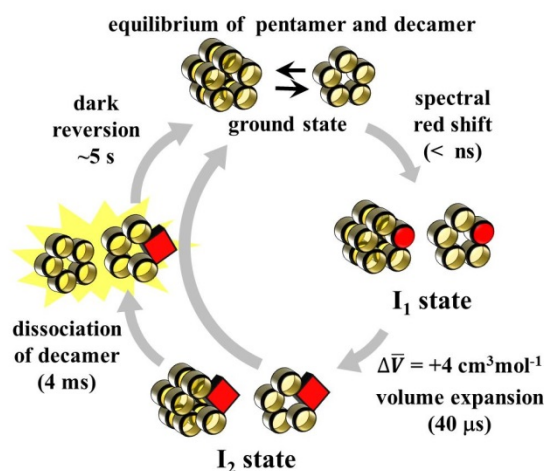


図 1 TePixD の光反応スキーム。
無色の丸はモノマーを表し、着色したものは励起されたモノマーを表す。

【結果と考察】図2に50 MPaまでの各圧力で測定した TePixD の TG 信号を示す。ここに示した山型の信号は TG 信号の分子拡散成分であり 10 量体から 5 量体への解離反応を表している。最も強度の大きな信号が常圧での信号であり、50 MPa までの比較的小さな加圧で信号強度が顕著に減少した。これは構造変化を起こす 10 量体反応物の量の減少を表している。また各圧力における分子拡散信号の解析から解離反応速度の圧力依存性が得られ、図3のように反応速度は圧力とともに顕著に増大することが分かった。

次に我々は 10 量体反応物の圧力による減少の原因は、基底状態における 10 量体と 5 量体間の平衡が圧力により 5 量体側へと移動したためであると予想し、これを確かめるために高圧下で DLS の測定を行った。DLS は溶液中の分子の拡散係数 (D) を測定する手法であり、ここでは 10 量体と 5 量体の 2 つの分子種の存在比で加重平均された平均の D が測定される。ところが圧力の増加に伴い平均の D は 10 量体の持つ値の方へとシフトしたため、我々の予想に反して暗状態における平衡は圧力によって 10 量体側へシフトすることが分かった。

これらのことから 10 量体の分子数は加圧により増加しているにもかかわらず解離反応が減少しているので、我々は解離過程の反応収率が圧力によって減少すると結論した。ところでこのような解離反応の阻害は 10 量体の多重励起によっても起こることが報告されており[3]、最近の我々の研究からその原因は過渡状態における圧縮率（すなわち体積揺らぎ）の大きさが多重励起により減少することであると見出している[4]。このことから反応収率減少の原因が基底状態における TePixD の圧縮率の加圧による減少なのではないかと予想し、高圧振動式密度計を用いて各圧力による部分比容を測定してその圧力微分の変化から圧縮率の圧力依存性を調べたところ、40 MPa までの圧力範囲で圧縮率の減少が示唆された。したがってこの圧縮率の減少が反応収率の原因であると結論した。

【結論】本研究において高圧下での TePixD の光反応ダイナミクスが調べられた。その結果 10 量体から 5 量体への解離反応は圧力に非常に敏感であることが分かった。比較的小さな圧力で解離反応の収率が大きく減少することが分かりその原因が初期状態の体積揺らぎの減少である可能性が示唆された。これは反応における構造揺らぎの重要性を示唆している。

【引用文献】[1] K. Kuroi. *et. al. Photochem Photobiol Sci.*, **12**, 1180-6 (2013) [2] K. Gekko *et. al. Biophys Chem.*, **144**, 67-71 (2009) [3] K. Tanaka. *et. al. FEBS Lett.*, **585**, 786-90 (2011) [4] K. Kuroi *et al*, to be published

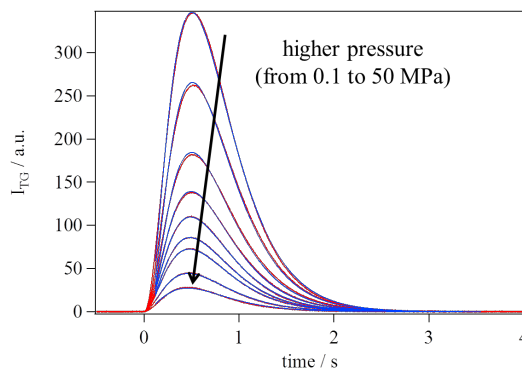


図2 分子拡散信号の圧力依存性

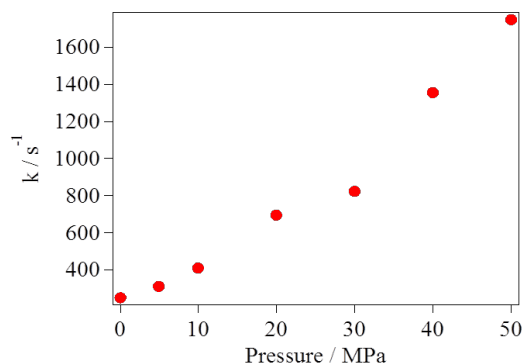


図3 解離反応速度の圧力依存性

酸素結合型ミオグロビンにおける量子化学的共鳴を通じた酸素親和性および自動酸化反応速度の調節

○西村 龍¹、西山 康太郎¹、松本 大地¹、柴田 友和¹、石上 泉²、小倉 尚志²、太 虎林³、長尾 聡³、松尾 貴史³、廣田 俊³、荘司 長三⁴、渡辺 芳人⁴、今井 清博⁵、根矢 三郎⁶、鈴木 秋弘⁷・山本 泰彦¹
¹筑波大院数物、²兵庫県大院生命理学、³奈良先端院大物創、⁴名古屋大院理、⁵法政大生命科学、⁶千葉大院薬、⁷長岡高専物工
 r.246ra@dmb.chem.tsukuba.ac.jp

[序論] ミオグロビン(Mb)は、補欠分子族としてヘム(Fig. 1A)をもつ酸素(O₂)貯蔵タンパク質である。Scheme 1 に示す通り、O₂ は、Mb の還元型ヘム鉄(Fe²⁺)に結合し、近傍の遠位ヒスチジン(His64)との水素結合の形成によりその結合状態が安定化されている(B)。なお、B では、Fe²⁺から O₂へ電子が移動した極限構造(C)の存在が提唱されている⁽¹⁾。このように、O₂が結合した Mb のヘムは、B と C の共鳴(B↔C)として存在すると考えられている。また、Mbが O₂と結合できるのはFe²⁺の場合のみであるが、O₂が結合すると“自動酸化反応”が起こり、Fe²⁺は徐々に酸化され O₂と結合できない Fe³⁺になる(E)。

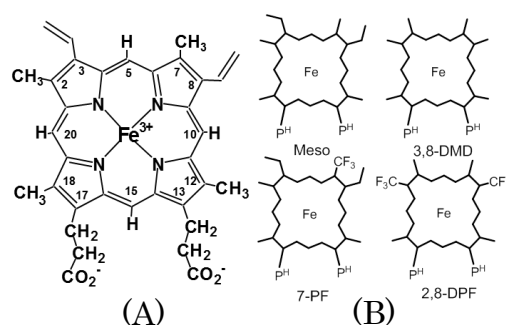
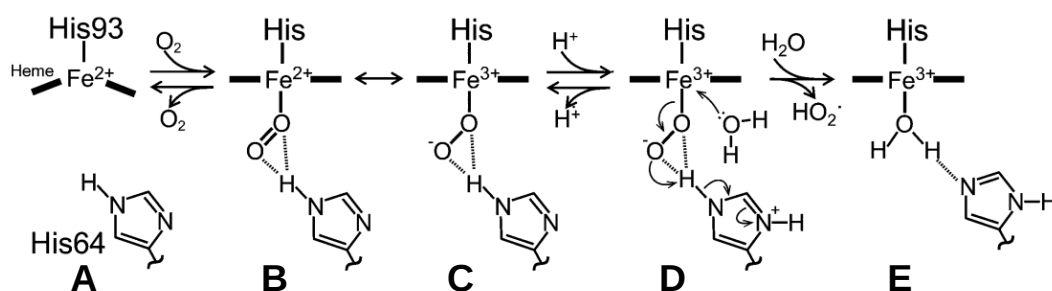


Fig. 1. (A)ヘムの分子構造。(B)本研究で使用した化学修飾ヘムの構造の模式図。Mesoと7-PF、そして3,8-DMDと2,8-DPFの比較により、それぞれCF₃ 1つそして2つの導入がMbの機能と構造に及ぼす影響を明らかにすることができる。



Scheme 1. Mb の O₂ 結合と自動酸化の反応機構。(A)O₂ 結合前。(B)O₂ が end-on 型で Fe²⁺ に結合し、His64 と水素結合を形成。(C)Fe²⁺ から O₂ へ電子が移った極限構造。(D)反応中間体。(E)酸化型(Fe³⁺)Mb。

私共は、ヘムの電子構造を通じた Mb の機能調節機構の解明のために、Fig. 1B に示す様々な化学修飾ヘムを用いた研究により、ヘム鉄の電子密度(ρ_{Fe})の減少(増大)に伴い Mb の O₂ 親和性は低下(上昇)すること、そして自動酸化反応速度(k_{ox})は減少(増大)することを明らかにした⁽²⁾。これらの結果は、 ρ_{Fe} が減少すると B↔C は B へ偏るため、O₂ 親和性は低下すると共に、自動酸化反応は抑制されることを示している。本研究では、His64 を Leu に置換した H64L 変異体では、His64 の除去により研究対象がヘム、O₂、His64 の三体問題から二体問題に簡略化されることを利用して、ヘムの電子構造を通じた Mb の機能調節機構をより詳細に解析した。

[実験] 大腸菌を利用して調製した H64L 変異体のヘムを、再構成法により化学修飾ヘムと置換した再構成 H64L を調製した。O₂ 結合反応の動力学的データは、フラッシュフォトリシス法、ストップフロー法により計測した。共鳴ラマン分光法により CO 結合型 H64L の CO 伸縮振動(ν_{CO})を計測した。 k_{ox} は、O₂ 結合型 Mb の紫外可視吸収スペクトルの経時変化の解析より求め、pH プロフィールを作成した。

[結果と考察] Mb のヘムの ρ_{Fe} を評価する指標: ヘム鉄に結合した CO における共鳴(Scheme 2)を考えると、ヘム鉄から CO への逆供与は ρ_{Fe} に依存することが予想される。たとえば、 ρ_{Fe} が減少するとヘム鉄から CO への逆供与は阻害され、Scheme 2 の共鳴が左に偏り、 ν_{CO} は増大すると考えられる。実際、CF₃ 基の導入により、 ν_{CO} は予想通り増大した⁽²⁾。

ヘムの電子構造の影響: Mb の場合同様に、H64L の場合も、 ρ_{Fe} の減少に伴って $k_{\text{off}}(\text{O}_2)$ は大幅に増大するが、 $k_{\text{on}}(\text{O}_2)$ はほぼ一定であった。Mb、H64L の $k_{\text{off}}(\text{O}_2)$ を ρ_{Fe} の指標である ν_{CO} に対してそれぞれプロットした結果、両者共に同様な傾きの直線関係が得られた(Fig. 2)。これらの結果から、 ρ_{Fe} を通した k_{off} の調節は His64 の有無、つまり His64 との水素結合の影響を受けないことが明らかとなった。つまり、ヘムの電子構造を通した O₂ 親和性の調節は、B $\leftrightarrow$ C の調節によって行われることが示唆された⁽³⁾。

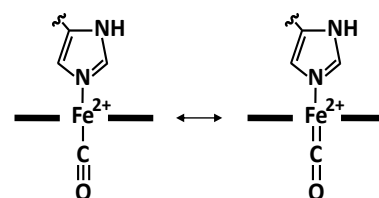
k_{ox} の pH 依存性: pH の低下に伴う k_{ox} の増大が確認されると共に、 ρ_{Fe} の減少に伴い k_{ox} は減少することが明らかとなった(Fig. 3)。また、 k_{ox} が上昇し始める pH は、 ρ_{Fe} に依存することも示された。理論計算では、ヘム鉄に結合した O₂ (Fe²⁺-O₂) の H⁺ 親和性は ρ_{Fe} の減少に伴い低下することが示されていることから、 k_{ox} は ρ_{Fe} を通した Fe²⁺-O₂ の H⁺ 親和性により調節されることが示唆された。

[結論] B $\leftrightarrow$ C は、ヘムの電子構造を通した Mb の O₂ 親和性および自動酸化の調節に重要な役割を担っていることが明らかになった。また、自動酸化反応速度の pH 依存性の解析から、Fe²⁺ と結合した O₂ は、H⁺ が付加した状態と解離した状態の平衡状態で存在することが示唆された。

[参考文献] 1. J. C. Maxwell et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **58**, 166-171(1974).

2. R. Nishimura et al., *Inorg. Chem.* **52**(6), 3349-3355(2013).

3. R. Nishimura et al., *Inorg. Chem.* **53**(2), 1191-1199(2014).



Scheme 2. CO 体の結合様式

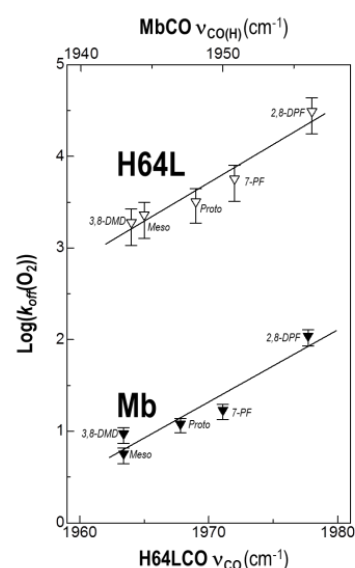


Fig. 2. Mb と H64L における $k_{\text{off}}(\text{O}_2)$ と ν_{CO} の相関関係。 ν_{CO} が増大(ρ_{Fe} が減少)すると $k_{\text{off}}(\text{O}_2)$ は増大する。

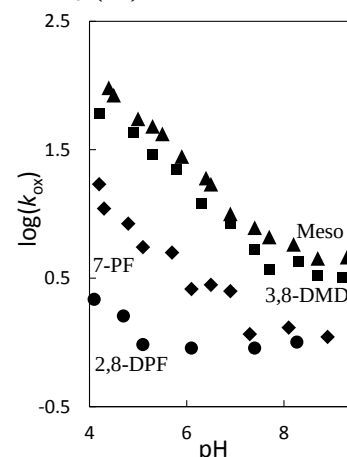


Fig. 3. H64L における k_{ox} の pH 依存性。

▲ : Meso、■ : 3,8-DMD,
◆ : 7-PF、● : 2,8-DPF

光子計数型時間分解吸収分光測定によるバクテリオロドプシンの M 中間体の挙動

○及川 健太郎、大谷 弘之

東工大・院生命理工

oikawa.k.aa@m.titech.ac.jp

〔序〕多量体を形成することが機能に大きな影響を与えるタンパク質は多く知られている。バクテリオロドプシン(bR)というタンパク質も生体中で 3 量体を形成しているが、その機能に対する影響はあまりよくわかっていない。

bR は高度好塩菌 *Halobacterium salinarum* の細胞膜中に存在するレチナールタンパク質である。発色団レチナールが光を吸収すると、吸収波長の異なる K, L, M, N, O という反応中間体を経て、再び bR に戻るという光化学サイクル反応を起こす。このサイクル反応では、L→M の過程でタンパクから細胞外側へプロトンが放出され、N→O の過程で細胞内からタンパク質内部にプロトンが取り込まれる。したがってこの光化学サイクルが 1 周回る毎にプロトンが 1 つ細胞内から細胞外へ輸送されることとなり、菌体内では bR は光駆動プロトンポンプとしての機能を持つ。

この光化学サイクル中の M 中間体には、寿命の異なる 3 種の M(M^{fast} , M^{mid} , M^{slow})が存在し、当てる光の強度によって各々の収率が変化する[1]。光の強度を落としていくにつれて、 M^{mid} , M^{slow} の収率は減少していくのに対し、 M^{fast} の収率はほとんど変化しない。したがって、強い光を当てていない本来の菌体の環境に近い条件下では、この M^{fast} を生じる光反応サイクルが主要な反応経路だと考えられる。一方、 M^{mid} の量子収率は定常光、パルス光にかかわらず、照射光強度が強いほど増大する。 M^{mid} に関してはその生成機構として以下の機構が提唱されている。3 量体のうちの 1 つしか励起されない場合、 M^{fast} のみを生じる。3 量体の内の 1 つが光化学サイクル反応を起こしている最中に、さらに同じ 3 量体内の 1 つが励起され光反応すると、3 量体内の相互作用の変化によって、寿命の長い M すなわち M^{mid} が生じる。このようにして M^{mid} の生成量子収率は照射光強度と共に増大すると考えられている。

本研究では、光の強度が 0 の条件下では各収率はどのようなになるのかという点に注目し、時間分解吸収分光測定の検出器にフォトンカウンターを用いることで十分に光の強度が弱い条件下での測定を達成したため、報告する。

〔実験〕試料には紫膜懸濁液(pH9)を用いた。試料を塩基性にした理由は、塩基性試料では各 M 中間体の寿命の差が顕著になるためである。装置には図 1 のような光学系を用いた。パルス励起光には Nd:YAG laser の第 2 高調波(532 nm)、検索光には定常点灯 Xenon lamp(380 – 780 nm)を用いた。検索光強度は

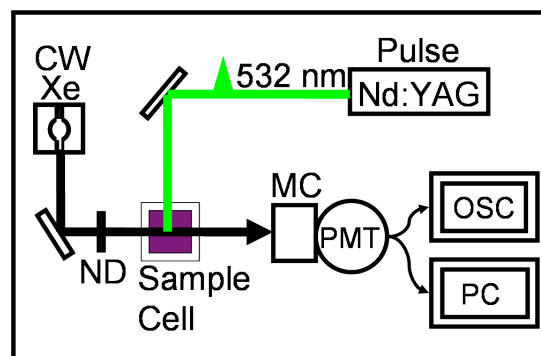


図 1 装置図

neutral density filter を用いて調節した。従来の検索光強度条件($0.7 - 70 \text{ mW/cm}^2$)では検出器にオシロスコープ(OSC)を、従来の 10 万分の 1 程度の強さに至る極微弱検索光強度条件($70 \text{ nW/cm}^2 - 0.7 \text{ mW/cm}^2$)では検出器にフォトンカウンタ(PC)を用いて測定を行った。

〔結果と考察〕塩基性紫膜懸濁液の検索光強度依存性($70 \text{ nW/cm}^2 - 70 \text{ mW/cm}^2$)を測定した結果、検索光が 0.7 mW/cm^2 以下の強度では各収率はほぼ一定になることがわかった (図 2)。次に、十分に弱い検索光強度条件下($0.7 \text{ } \mu\text{W/cm}^2$)で、パルス励起光強度依存性を測定した。実験の結果、光強度が 0 の極限においても M^{mid} の収量は 0 にはならず、生じた M のうち約 6% を占めることがわかった(図 3)。もし光強度が 0 の条件下で 3 量体内の相互作用が完全に整っている場合、 M^{fast} が 100% 生じ、 M^{mid} の収率は 0 になるはずである。したがってこの結果は、光強度に依らず 3 量体間の相互作用が乱れた状態の 3 量体が常に一定量存在することを示す。このことは、 bR は 3 量体を形成することによって M 中間体の寿命を短くしているということを示唆する。すなわち、単量体での bR の M 中間体の寿命は長く、 3 量体を形成することによって M 中間体の寿命が短くなる。そして、なんらかの影響によって 3 量体間の相互作用が乱されると、寿命の長い M が生じると考えられる。 bR では 3 量体を形成することによって M 中間体の寿命を短寿命化し、光サイクル反応の 1 周あたりにかかる時間を短くすることで効率よくプロトンポンプとして機能しているのではないかと我々は考えている。

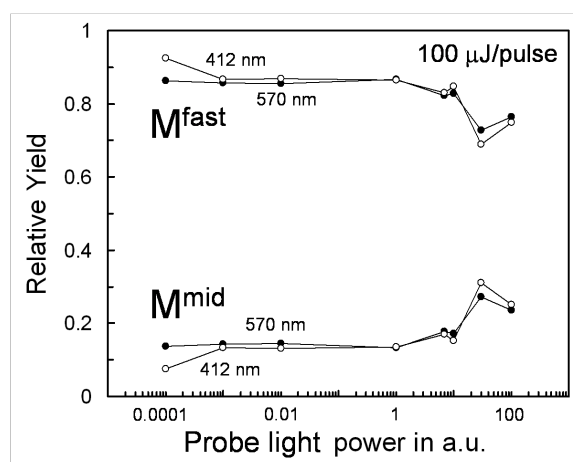


図 2 各 M 中間体の検索光強度依存性

横軸は 0.7 mW/cm^2 を基準とした相対値で示してある。観測波長は 570 nm 及び 412 nm である。励起光強度は $100 \text{ } \mu\text{J/pulse}$ である。

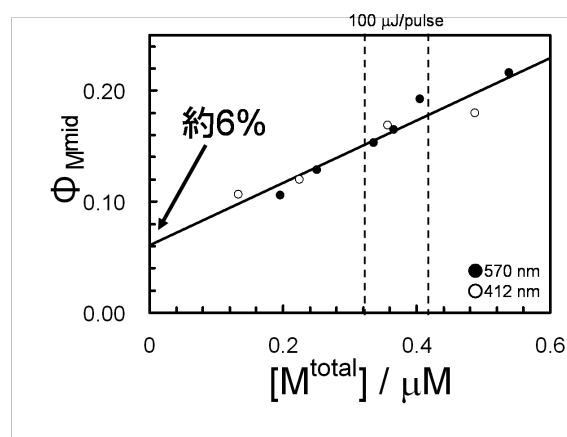


図 3 M^{mid} の相対収率の励起光強度依存性

観測波長は 570 nm 及び 412 nm である。近似曲線の切片から、励起光強度が 0 の極限においても M^{mid} は約 6% 残っていることがわかる。

〔引用文献〕 1. Shibazaki, C., Ohtani, H., *Chem. Phys. Lett.*, **488**, 77-80 (2010).

赤外分光によるタバコカルモジュリンの Ca^{2+} 配位構造解析 —合成ペプチドアナログによるアプローチ

○ 奈良 雅之¹、宮川 拓也²、今井 ファビアナ リカ²、田之倉 優²、
朽津 和幸³、清水 隆⁴、森井 尚之⁴

¹ 医科歯科大・教養、² 東大・院農生、³ 東理大・理工、⁴ 産総研
nara.las@tmd.ac.jp

[序] EF ハンドモチーフ (helix-loop-helix) はパルブアルブイン、カルモジュリン、トロポニンCなどに共通する Ca^{2+} 結合ドメインである。 Ca^{2+} 結合部位はアミノ酸 12 残基からなり、酸性アミノ酸残基の側鎖の酸素原子が Ca^{2+} の配位子に関わっている。赤外分光法 (FTIR) は Ca^{2+} 結合部位の金属配位構造を調べる有用な手法で、側鎖のカルボキシレート基 (COO^- 基) と金属イオンの配位様式を同定することが可能である^{1,2}。 COO^- 基の配位様式は一座配位型、二座配位型、ブリッジ型の 3 つのタイプに分類できる。ブリッジ型の 2 つの金属イオンのうち一つが水分子などに置き換わる場合を疑ブリッジ型という。 Ca^{2+} 結合部位の 12 番目に位置するグルタミン酸 (Glu) は結晶構造では二座配位型をとることが知られている。この配位様式をとると COO^- 逆対称伸縮振動バンドは低波数側にシフトするので、 Ca^{2+} 結合の指標として利用することができる。

タバコ由来のカルモジュリンには 3 種類のアイソフォーム (NtCaM1, NtCaM3, NtCaM13) が存在する³。正常のタバコの葉は NtCaM3 を含んでいるが、傷を受けると NtCaM1 や NtCaM13 が蓄積されることが知られている⁴。赤外スペクトルを調べたところ、これらのアイソフォームの Ca^{2+} 配位構造は似ているが、 Ca^{2+} による二次構造変化はアイソフォームで少し異なった⁵。本研究では、これらのアイソフォームの Ca^{2+} 結合ドメイン (Site I~IV) に相当する 28 残基のペプチドアナログ (表 1) をそれぞれ合成して、赤外分光法による Ca^{2+} 配位構造解析を行った。

[実験] Ca^{2+} 結合部位に相当するペプチドアナログは PSSM8 ペプチド合成装置 (島津製作所) を用いて固相法により合成した。ペプチドおよびタンパク質の主鎖の NH はすべて D 化し、重水溶液試料を準備した。全反射吸収 (ATR)/FTIR 測定は spectrum One もしくは 100 (パーキンエルマー) と ATR ユニット (パーキンエルマー) を用いて MCT 検出器で分解 2 cm^{-1} 、室温にて積算回数 200 回もしくは 500 回でデータを収集した。

[結果・考察] 28 残基のペプチドアナログについて、 Ca^{2+} フリー (アポ) 状態で 10 mM のペプチド濃度 (pD 7.4) を準備したところ、いずれのアイソフォームも Site I, Site II は可溶であったが、Site III は白濁した。また、NtCaM1 の Site IV は可溶であったが、NtCaM 3, 13 の Site IV は白濁した。図 1 には NtCaM1 の Site I~IV の赤外二次微分スペクトルを示す。Site III の Ca^{2+} 負荷状態のように、アミド I' 領域に $1620\text{--}1615\text{ cm}^{-1}$ 付近に強いバンドが現れた場合は、ペプチド間で会合が起きていると考えられる。赤外測定の結果をまとめると、 Ca^{2+} 負荷状態では、NtCaM1 の Site I, II, IV、NtCaM3 の Site I, II, III, IV、NtCaM13 の Site I, IV はいずれも $1555\text{--}45\text{ cm}^{-1}$ にピークを示し、12 位のグルタミン酸が Ca^{2+} と二座配位型で結

合することが示された。ところが、NtCaM1 と NtCaM13 の Site III は Ca^{2+} 負荷に伴うスペクトル変化を示さなかったため、会合により Ca^{2+} に対する結合性が失われたものと考えられる。また、NtCaM13 の Site II は Ca^{2+} 負荷状態で 1560 cm^{-1} にピークを示したことから、 Ca^{2+} 配位構造が NtCaM3 とは少し異なる可能性が示唆された。

会合による影響を回避するために、loop-helix に相当する 17 残基のペプチドアナログを合成して赤外スペクトルを試みたところ、NtCaM1 と NtCaM13 の Site III は白濁せず、 Ca^{2+} 負荷型の赤外スペクトルで 1552 cm^{-1} 付近にバンドが現れることが確認できた。ところが、NtCaM13 の Site I と Site II の 17 残基ペプチドアナログは、 Ca^{2+} 負荷型で溶液がゲル状になり、 1552 cm^{-1} 付近のバンドは観測されなかったため、会合により Ca^{2+} との結合性が失われたものと考えられる。

合成ペプチドアナログを用いることにより、タバコカルモジュリンの各サイトの Ca^{2+} 配位構造に関する情報が得られる。合成ペプチドアナログの問題点は、ペプチド間の会合や凝集により Ca^{2+} 結合性が無くなることであるが、ペプチド鎖長を変えることにより、この問題を回避できる可能性が高い。これまでに報告した EF ハンドモチーフのペプチドアナログの結果⁶も合わせて、合成ペプチドアナログの有用性について議論する。

表 1 タバコカルモジュリンの Ca^{2+} 結合ドメインのペプチドアナログ

calmodulin is of form Ca^{2+} -binding site		* * * * *
NtCaM1	I	Ac- FKEA FSLFDK DGDGC ITTKELGTVMRSL (-CONH ₂)
NtCaM1	II	Ac- LQDMI SEVDADQNGT IDFPFLNLMARK
NtCaM1	III	Ac- LKEA FKVFDK DQNGFI SAAELRHVMTNL
NtCaM1	IV	Ac- VDEMIREAD IDGDGQVNYEEFVRMMLAK
NtCaM3	I	Ac- FKEA FSLFDK DGDGC ITTKELGTVMRSL
NtCaM3	II	Ac- LQDMI NEVDADGNGT IDFPFLNLMARK
NtCaM3	III	Ac- LKEA FRVFDK DQNGFI SAAELRHVMTNL
NtCaM3	IV	Ac- VDEMIREADV DGDGQ INYEEFVKVMMAK
NtCaM13	I	Ac- LQEA FSLFDRDGDGC ITVEELATVIRSL
NtCaM13	II	Ac- LQDMI TEVD SDGNGT IEFTEFLNLMAKK
NtCaM13	III	Ac- LKEA FKVFDK DQNGYI SANELRHVMINL
NtCaM13	IV	Ac- VEQMI KEADLDGDGQVNFDEFVKMMMNIV

[引用文献]

1. Nara, M., & Tanokura M., *Biochem. Biophys. Res. Comm*, **369**, 225-239 (2008).
2. Nara, M. et al. *Biophys. Biochem. Acta*, 1828, 2319-2327 (2013).
3. Yamakawa, H., et al. *Eur. J. Biochem.*, **268**, 3916-3929 (2001).
4. Karita, E., et al., *Plant Cell Physiol.*, **45**, 1371-1379 (2004).
5. Suzuki, N., et al., *Biopolymers*, **99**, 472-483 (2013).
6. Nara, M., et al. *Biopolymers*, **99**, 342-347 (2013).

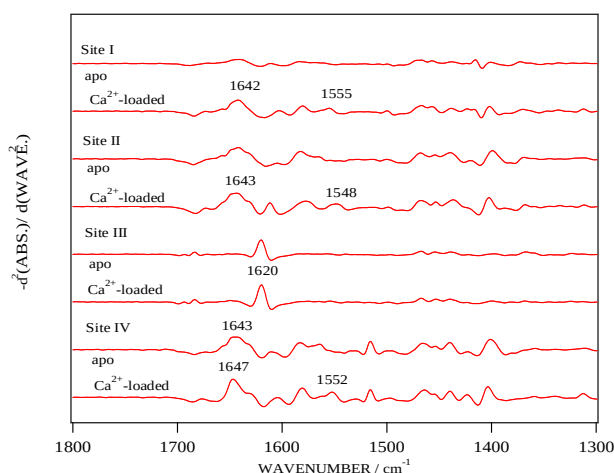


図 1 NtCaM1 Site I～IV の赤外二次微分スペクトル

DNA中における銀イオンを介したC-C塩基対の構造解析

○大樂 武範¹, 古板 恭子², 岡本 到³, 織田 修司¹, 山中 大地¹,
根東 義則¹, 小笹 哲夫⁴, 鳥越 秀峰⁴, Vladimír Sychrovský⁵, 小野 晶³,
児嶋 長次郎², 田中 好幸¹

¹東北大院薬、²阪大蛋白研、³神奈川大学工、⁴東理大理、⁵チェコ科学アカ
デミー
tanakay@m.tohoku.ac.jp

【序】近年、DNA 二重らせん分子中における金属を介した塩基対（メタロ塩基対）形成が数多く報告され、メタロ塩基対を構造基盤とした機能性分子開発の研究が盛んに行われている^{1,2}。DNA 二重らせん分子中の C-C ミスマッチは、Ag(I)イオンを選択的に補足し、Ag(I)イオンを介した C-Ag(I)-C 塩基対を形成することが知られている^{3,4}。天然型核酸塩基の形成するメタロ塩基対である C-Ag(I)-C 塩基対は、応用研究例が増加傾向にある注目のメタロ塩基対の一つである。これまでに NMR 分光法を用いた C-Ag(I)-C 塩基対の構造解析が行われてきたものの^{3,4}、その化学構造はいまだ決定されていない。そこで本研究では、構造未定の C-Ag(I)-C 塩基対について、¹⁵N NMR 分光法による構造決定をおこなった。

【実験】2011 年の本討論会にて、DNA 二重らせん分子中の C-Ag(I)-C 塩基対において、Ag(I)イオンが向かい合うシトシン塩基の 3 位窒素原子（N3）を架橋していることを報告した。しかし当時のデータからは C-Ag(I)-C 塩基対のアミノ基の構造（異性化の有無）が未定であった。そのため、以前の実験で使用した配列（図 1）を用いて、シトシン塩基の窒素原子がすべて ¹⁵N 標識された DNA 二重らせん分子を酵素合成により調製した。この ¹⁵N 標識 DNA オリゴマーと化学合成により調製した非標識 DNA オリゴマーを組み合わせ、二本鎖 DNA の一方の鎖のみが ¹⁵N 標識された DNA 分子を調製し、Ag(I)イオン結合時の一次元 ¹⁵N NMR スペクトルを測定した（図 2）。この際、Ag(I)イオン源としては、¹⁰⁹AgNO₃ を用いた（図 1）。以前の実験ではスピン量子数 $I = 1/2$ の ¹⁰⁹Ag および ¹⁰⁷Ag がほぼ 50%ずつ存在する天然存在比下で実験を行ったため、窒素核と銀核の J 値が $^1J(^{15}\text{N}, ^{109}\text{Ag})$ と $^1J(^{15}\text{N}, ^{107}\text{Ag})$ の重なりにより厳密な値が得られていなかった。そこで今回、単一の同位体からなる ¹⁰⁹AgNO₃ を用いることで、厳密な $^1J(^{15}\text{N}, ^{109}\text{Ag})$ の値が決定することを目指した。さらに、一次元 ¹⁵N NMR スペクトルで観測された $^1J(^{15}\text{N}, ^{109}\text{Ag})$ を理論計算により得られた値と比較した。

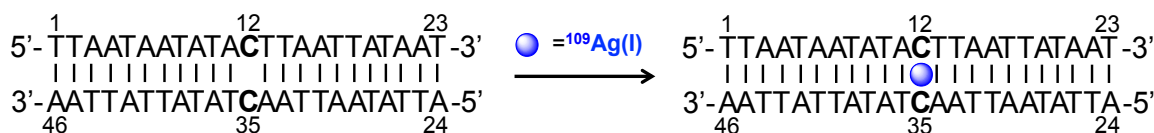


図 1 DNA の配列とナンバリング

【結果】DNA 配列中の 35 番目のシトシン（C35）のみが ¹⁵N 標識された DNA 二重らせん分子の一次元 ¹⁵N NMR スペクトルにおいて、3 位窒素核（N3）の ¹⁵N NMR シグナルは

$^1J(^{15}\text{N}, ^{109}\text{Ag})$ により、ダブルットに分裂していた。この時、アミノ基の ^{15}N NMR シグナルは $^1J(^{15}\text{N}, ^1\text{H})$ によりトリプレットに分裂していた (図 2 a)。一方、DNA 配列中の 12 残基目のシトシン (C12) のみが ^{15}N 標識された DNA 二重らせん分子の一次元 ^{15}N NMR スペクトルにおいても、N3 の ^{15}N NMR シグナルにおいて $^1J(^{15}\text{N}, ^{109}\text{Ag})$ が、アミノ基の ^{15}N NMR シグナルで $^1J(^{15}\text{N}, ^1\text{H})$ がそれぞれ観測された (図 2 b)。 J 値は、 $^1J(^{15}\text{N}, ^{109}\text{Ag}) = 82 \text{ Hz}$, $^1J(^{15}\text{N}, ^1\text{H}) = 89 \text{ Hz}$ であった。

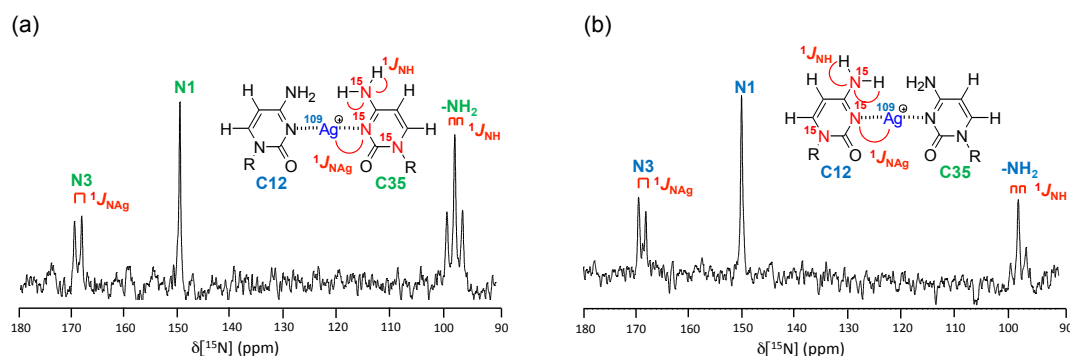


図 2 一次元 ^{15}N NMR スペクトル

【考察】C-Ag(I)-C 塩基対中の向かい合うシトシン塩基 (C12 と C35) のアミノ基の ^{15}N NMR シグナルは、どちらもトリプレットに分裂していた。その結果、C-Ag(I)-C 塩基対中のシトシン塩基は異性化していないことが明らかとなった。また、以前の実験と同様に、C-Ag(I)-C 塩基対中の向かい合うシトシン塩基 (C12 と C35) の両方の N3 から、N3-Ag 結合に由来する J -coupling が観測されたことから、Ag(I)イオンは向かい合うシトシン塩基の N3 を架橋している。以上から、今回の実験に用いた DNA 配列中の C-Ag(I)-C 塩基対の化学構造が決定された (図 2 中の化学構造)。以前の実験で、Ag(I)イオン源として天然存在比の硝酸銀 ($^{107/109}\text{AgNO}_3$; ^{107}Ag と ^{109}Ag の天然存在比は約 1:1; ^{109}Ag と ^{107}Ag の磁気回転比の違いは約 5%) を用いた場合、N3-Ag 結合に由来する見かけのスピン結合定数は 76 Hz であった。今回の実験で Ag(I)イオン源として同位体として純粋な ^{109}Ag のみを用いたことにより、初めて物理的に意味のあるスピン結合定数 $^1J(^{15}\text{N}, ^{109}\text{Ag}) = 82 \text{ Hz}$ を決定することができた。また、今回の実験で決定された C-Ag(I)-C 塩基対の化学構造をもとに行った理論計算においても、 $^1J(^{15}\text{N}, ^{109}\text{Ag}) = 83.6 \text{ Hz}$ となり、実験値と理論値はよい一致を示している。以上の実験より、C-Ag(I)-C 塩基対の化学構造を ^{15}N NMR 分光法により決定した。さらに C-Ag(I)-C 塩基対内のスピン結合定数 $^1J(^{15}\text{N}, ^{109}\text{Ag})$ の正確な値 (82 Hz) を決定した。

【引用文献】

1. Clever, G. H.; Kaul, C.; Carell, T. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 6226-6236.
2. Ono, A.; Torigoe, H.; Tanaka, Y.; Okamoto, I. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 5855-5866.
3. Ono, A.; Cao, S.; Togashi, H.; Tashiro, M.; Fujimoto, T.; Machinami, T.; Oda, S.; Miyake, Y.; Okamoto, I.; Tanaka, Y. *Chem. Commun.* **2008**, 4825-4827.
4. Torigoe, H.; Okamoto, I.; Dairaku, T.; Tanaka, Y.; Ono, A.; Kozasa, T. *Biochimie.* **2012**, *94*, 2431-2440.

NMR を用いたヒト腸管レクチン ZG16p と 結核菌糖脂質 PIM1, 2 の相互作用解明

○ 花島 慎弥^{1,2}、Sebastian Götze³、金川 真由美¹、
Yan Liu⁴、池田 明美¹、Ten Feizi⁴、Peter Seeberger³、
山口 芳樹¹
¹理研・糖鎖構造、²阪大・院理、³MPI Biomolecular
Systems、⁴Imperial College London
hanashimas13@chem.sci.osaka-u.ac.jp

【序】 ZG16p はヒト腸管に存在する分子量 16,000 の可溶性レクチンであるが、腸内における機能は不明であった。また植物レクチンと有意な相同性を有することからその糖鎖リガンドの探索がおこなわれ、近年マンノースと結合することが示された。一方で、古くからグリコサミノグリカンと相互作用することが示唆されてきたが、実際の結合様式は不明であった。われわれは、糖鎖アレイを用いてヒト ZG16p の糖鎖リガンドのひとつが結核菌の糖脂質糖鎖 phosphatidylinositolmannose(PIM)であることを明らかにし、今回その詳細な相互作用様式を NMR を用いて明らかにした¹。さらにグリコサミノグリカンとの相互作用部位を解析した²。ヒト ZG16p が構造の全く異なる二種類の糖鎖へ結合して腸内での病原菌の中和や排除に関係している可能性を示唆する結果が得られた。

【実験】 結核菌糖鎖 PIM1,2 は化学合成により得た。グルコースを出発原料として Ferrier 反応を経てサイクリトールへ変換した後、マンノースと順次グリコシル化反応をおこない、最後にリン酸化して、PIM1,2 を良好な収率で得た。

大腸菌発現により得られたヒト ZG16p と PIM の相互作用を飽和移動差(STD)-NMR ならびに ¹H-¹H NOESY を用いて解析した。さらに ¹⁵N-ZG16p を用いて ¹H-¹⁵N HSQC にて PIM1,2 の滴定実験をおこなった。各アミノ酸残基の主鎖アミドシグナルの化学シフト変化を定量的に解析することにより、PIM と相互作用するアミノ酸

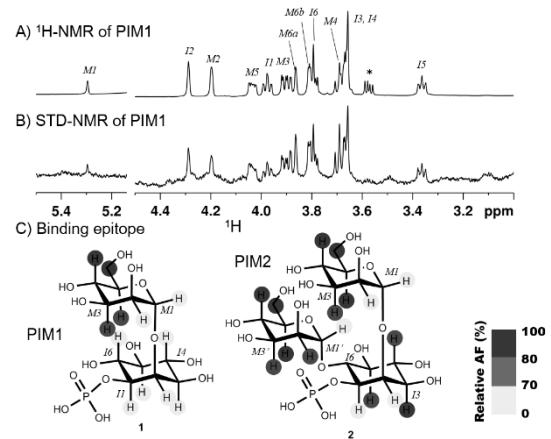


図1 PIM1 の STD-NMR スペクトル(A, B) と結合エピトープの構造式上へのマッピング(C)

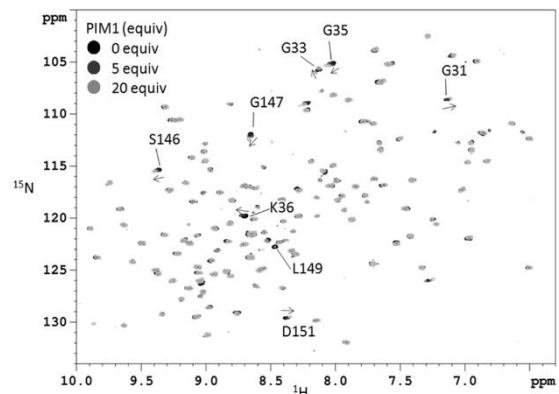


図2 PIM 滴定実験における ¹⁵N-ZG16p の ¹H-¹⁵N HSQC スペクトル

残基を決定した。ZG16p の主鎖アミドシグナルの帰属は ^{13}C , ^{15}N -ZG16p の各種三次元 NMR 測定をおこない決定した。また、短鎖ヘパリンを用いて同様の実験をおこない、グリコサミノグリカンと相互作用するアミノ酸残基を決定した。

Glide を用いたドッキングシュミレーションの結果得られたポーズのうち、NMR 解析の結果を満たす構造を PIM-ZG16p の複合体モデルとした。

【結果】 PIM1、PIM2 と ZG16p を用いた STD-NMR の結果より (図 1)、結合エピトープが PIM 上のマンノース残基の C3 から C6 位付近であることを明らかにした(図 1C)。また ^1H - ^1H NOESY 測定において ZG16p と PIM1 または PIM2 存在下、TR-NOESY シグナルを与え、測定条件下での PIM と ZG16p の相互作用を確認した。一方、ZG16p の D151N 変異体を用いた場合は TR-NOESY シグナルは観測されなかった。

各種濃度の PIM1,2 の存在下において ^{15}N -ZG16p の ^1H - ^{15}N HSQC シグナルの化学シフト摂動実験をおこない、PIM1, PIM2 とともに Gly28-Lys36(GG ループ)、Arg145-Ala152(binding ループ)のアミノ酸残基に化学シフト変化を観測した(図 2)。PIM2 では加えて Arg37 まで化学シフト変化を及ぼす領域が広がっており、またその程度も PIM1 と比べてより大きかった。一方、D151N 変異体とは有意な相互作用が確認できなかった。

化学シフト変化を示した残基を結晶構造³にマッピングすることで、PIM と相互作用する部位を決定した(図 3)。また、この化学シフト変化を定量的に解析した結果、解離定数(K_D)をそれぞれ PIM1 (5 mM)、PIM2 (3 mM)と見積もった。ヘパリン四糖との結合を同様に解析したところ、PIM とは異なり、表面を広く使って結合することを明らかにした²。

【考察】 NMR とドッキングシュミレーションをあわせた解析により得られた PIM と ZG16p の複合体モデルでは、PIM1 はそのマンノース残基を ZG16p 側に向け、Gly35、Ser148、Leu149、Asp151 と水素結合していた(図 4)。NMR では ZG16p の recognition ループのシグナルが同定できなかったが、この結果によりイノシトール基に結合したリン酸基との相互作用が示唆された。本研究結果は、ZG16p が結核菌糖鎖を受容することで、グリコサミノグリカンを介した新たな腸内の免疫機構に関与する可能性を示唆する。

【引用文献】 1. Hanashima S. et al. submitted; 2. Kanagawa M. et al. *J. Biol. Chem.* in press; 3. Kanagawa M. et al. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **404**, 201-205 (2011).

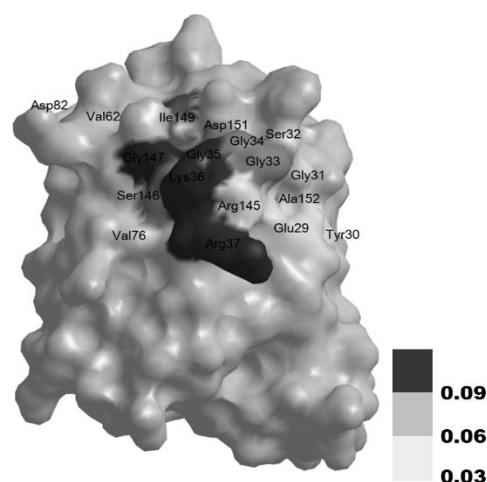


図 3 PIM 滴定実験で化学シフト変化を示した残基の ZG16p 立体構造上へのマッピング

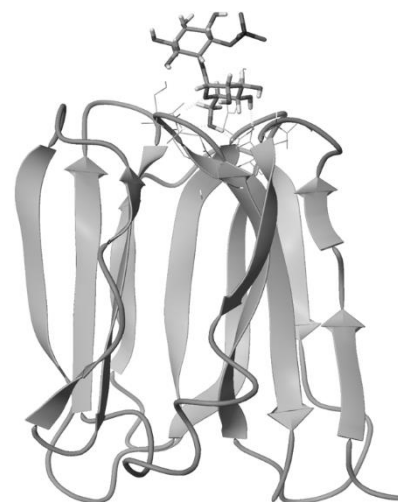


図 4 PIM1 と ZG16p の複合体モデル

シトクロム *c*–シトクロム *c* 酸化酵素間における 電子伝達複合体形成機構の浸透圧を用いた解析

○佐藤 航¹・今井 瑞依¹・内田 毅^{1,2}・伊藤-新澤 恭子³・
吉川 信也³・石森 浩一郎^{1,2}

¹北大院総化・²北大院理・³兵県大院生命理

wataru310b8109@ec.hokudai.ac.jp

〔序〕

ミトコンドリアでは一連のタンパク質間電子伝達により、生命維持に必須の分子 ATP を合成する。この「電子伝達系」においてシトクロム *c* (Cyt *c*) は電子をシトクロム *c* 酸化酵素(CcO) に渡し、CcO はその電子を用いて酸素分子を水分子に還元する。この生理的に重要な Cyt *c* から CcO への電子伝達機構の熱力学的解析から、Cyt *c*-CcO 電子伝達複合体の形成は、疎水性相互作用に伴うタンパク質疎水面からの「脱水和」に起因するエントロピー増大によって駆動されることが示されている。したがって、Cyt *c*-CcO 間の疎水性相互作用は、電子伝達複合体の安定化に大きく寄与し、その電子伝達制御における重要な機能を果たしていることが示唆されているにも関わらず、その詳細は未だ十分に検討されていない。そこで本研究では、この脱水和過程を浸透圧効果を用いることにより検討し、その解析を通して Cyt *c* のどの疎水性アミノ酸残基が疎水性相互作用形成に重要なのか、そしてこの脱水和によるエントロピー増大が複合体形成の安定化にどの程度寄与しているのかを定量的に検討することで、複合体形成過程の詳細な熱力学的解析を試みた。

〔実験〕

本研究ではタンパク質複合体形成に伴う脱水和を、その部分体積変化として捉え、その変化量から脱水和する水の分子数を見積もった。タンパク質自身の体積が変化しないと仮定すると、脱水和した水の体積を複合体形成前後のタンパク質周囲に存在する水和層の体積変化 ΔV_w は、複合体の解離定数 K_d の浸透圧依存性(Eq.1)から求めることが可能である。

$$\left(\frac{\partial \ln K_d}{\partial \pi}\right)_T = \frac{\Delta V_w}{RT} \quad (\text{Eq.1})$$

脱水和を伴う複合体形成の場合、タンパク質溶液中にグリセロールなどを添加すると浸透圧効果によってタンパク質に水和していた水がバルク層へ脱水和されやすくなり、その結果、複合体の形成が促進される。つまり、浸透圧の上昇によって解離定数は低下することになる。このような変化を引き起こす浸透圧調節物質としては、タンパク質との特異的相互作用が小さいグリセロール、スクロースなどを用い、これらを添加した溶液中で CcO による Cyt *c* の酸化反応を追跡した。Cyt *c* 酸化反応は、還元型 Cyt *c* 特有のピーク値である 550 nm の吸光度変化を Michaelis-Menten 式で解析し、得られた Michaelis 定数 K_M を Cyt *c*-CcO 複合体の解離定数 K_d とした。

〔結果〕

図 1 は各浸透圧における解離定数の自然対数をプロットしたものである。この図に示すよ

うに、浸透圧の上昇に伴い Cyt *c*-CcO 複合体の解離定数が低下、すなわち複合体が安定化していることが確認された。これは複合体形成時に CcO と疎水性相互作用が形成され、疎水性アミノ酸残基側鎖からの脱水和が生じていたことを示している。そして、複合体形成時に脱水和水の体積に相当する ΔV_w の値は Eq.1 より $-300 \pm 78 \text{ mL mol}^{-1}$ と算出され、疎水性残基に水和した 1 分子のモル容積を約 17.5 mL mol^{-1} と仮定すると、 17 ± 4 分子の水が脱水和したと考えられる。Cyt *c* の CcO との相互作用部位における疎水性アミノ酸残基としては、これまでの NMR を用いた解析[1]から Ile9, Ile11, Ile81 などが挙げられる。誘電分散測定[2]の結果から、これらの Ile 残基の側鎖には 8.6 分子程度の水が水和し、それぞれの残基の溶媒露出率がそれぞれ 15, 42, 85%であることを考慮すると、これらの 3 個の Ile 残基からは、それぞれ 1、4、7 分子の計 12 分子程度の脱水和が予想され、本研究の結果と

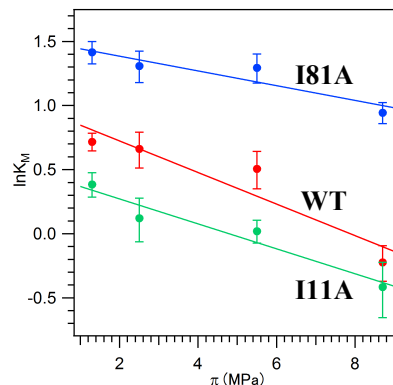


図 1 解離定数の浸透圧依存

対応する。更に、これら Ile 残基の脱水和水が脱水和していることを確認するため、同じ疎水性残基でより側鎖の水和数の少ない Ala に変異させた変異体 I11A, I81A について、その脱水和水分子数を見積もった。その結果、各変異体は野生型 Cyt *c* と比較して図 1 に示すように解離定数の浸透圧依存性が小さく、脱水和水分子数は I11A, I81A でそれぞれ 13 ± 3 , 8 ± 2 分子となり、野生型 Cyt *c* における約 17 分子に対し、それぞれ約 4、9 分子の減少を示した。Ile を Ala に変異させた場合の側鎖の水和分子数の減少が 6.8 分子であり、また、Ile11, Ile81 残基の溶媒露出率が 42, 85%であることを考慮すると、これらの残基を Ala に変異させた際の側鎖の脱水和水分子数の減少はそれぞれ 3、6 分子と予想され、これらの値は今回の結果とほぼ一致している。以上より、CcO との複合体形成においては、Cyt *c* の Ile11, Ile81 側鎖周辺から脱水和が生じ、これらの部位で CcO との疎水性相互作用が形成されると結論づけられた。

[考察]

一般に脱水和によるエントロピー変化 $^{\text{dehyd}}\Delta S$ は水 1 分子当たり $5.5 \pm 1.3 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ [3]であると報告されていることから、本研究で示された約 17 分子の水の脱水和による $^{\text{dehyd}}\Delta S$ は約 $94 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ と見積もることができる。一方、これまでの熱測定の結果からは $^{\text{dehyd}}\Delta S$ として約 $85 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ の値が報告されており、今回得られた $^{\text{dehyd}}\Delta S$ は、この値よりも大きな値となっている。つまり、Cyt *c*-CcO 電子伝達複合体形成に伴って形成される疎水性相互作用は、この複合体の安定化に対して従来想定されていたよりも、より大きく寄与することを意味している。したがって、Cyt *c* は疎水性残基を相互作用部位に位置することにより、CcO との複合体形成において、これらの疎水性残基が CcO 側の疎水性残基と近接することで脱水和を誘起し、その結果、電子伝達複合体を安定化する疎水性相互作用が形成されることが考えられた。

[引用文献]

- [1] Sakamoto, K., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 12271 (2011)
- [2] Suzuki, M., et al., *J. Phys. Chem. B*, **101**, 3839 (1997)
- [3] Makhatadze, G. I., et al., *Advan. Protein Chem.*, **47**, 307 (1995)

微生物型ロドプシンを鋳型とした光駆動性

G_s 活性型キメラタンパク質のデザイン

○ 吉田 一帆¹、井上 圭一^{1,2}、山下 高廣³、吉住 玲¹、

佐々木 賢吾¹、七田 芳則³、神取 秀樹¹

¹名工大・院工、²JST さきがけ、³京大・院理

k.yoshida.787@nitech.jp

[序]

G タンパク質共役型受容体 (GPCR) は7回膜貫通型膜タンパク質で、光・神経伝達物質・ホルモンなど様々な刺激を受け取ると細胞内 G タンパク質へと情報を伝達する。G タンパク質には G_s、G_i、G_q、G_tなどのサブタイプがあり、GPCR の種類によって活性化されるサブタイプが異なる。GPCR と同様の構造をもつ微生物型ロドプシンは G タンパク質を活性化する機能はないものの、発色団として全トランス型レチナールを結合しており、光を受容するとイオンポンプなど様々な機能を示す。我々は過去に微生物型ロドプシンと光受容体 GPCR であるウシロドプシンを組み合わせたキメラタンパク質を作製し、G_tを活性化することに成功した^{1,2}。本研究では、本来光では制御できない他のサブタイプの G タンパク質を光依存的に活性化する分子の創出を目指し、様々なデザインを行っている。

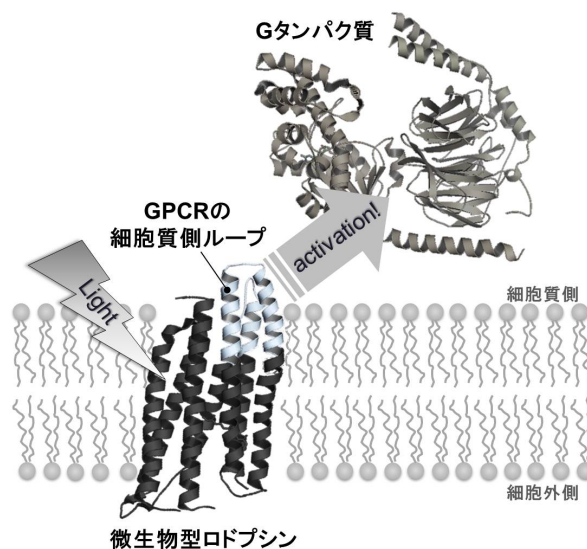


図 1 キメラタンパク質による光依存的な G タンパク質活性化

[実験]

本研究では、G_s 活性型キメラタンパク質の構築を目指し、 β_2 -アドレナリン受容体 (β_2 AR) の細胞質側ループを微生物型ロドプシンに組込んだ分子を構築した。活性化された G_s はセカンドメッセンジャーである cAMP の濃度を上昇させる。cAMP は記憶の形成に重要であると言われており、本ツールの作製はアルツハイマー病などの病理解明に貢献すると期待される。今回、鋳型となる微生物型ロドプシンには、プロトンポンプ型の *Gloeobacter rhodopsin* (GR)、クロライドイオンポンプ型の *Natronomonas pharaonis* Halorhodopsin (NpHR) およびナトリウムイオンポンプ型の *Indibacter rhodopsin 2* (IndiR2) を用いた。 β_2 AR のループの配列は遺伝子合成し、PCR 法によりキメラの遺伝子を作製した。作製した遺伝子を大腸菌 BL21 株または C41 (DE3) 株に導入し発現させ、Co カラムで His タグによる精製を行った。各キメラにおける G_s の活性化能は、放射性同位元素 (³⁵S) で標識した非加水分解型アナログ [³⁵S]GTP γ S の取り込みを測定することで評価し、過渡吸収法により光反応に関わる中間体の同定を行った。

[結果・考察]

各キメラにおける極大吸収と発現量を表 1 に示す。極大吸収をそれぞれの野生型のものと比較すると、GR キメラでは長波長シフト、IndiR2 キメラおよび *NpHR* キメラでは短波長シフトが見られた。今回挿入したループ部分は発色団であるレチナールから遠く離れた位置に存在しているが、ヘリックスの配向や内部の水素結合ネットワークが変化したことにより、遠隔的に波長が制御された可能性が考えられる。また、発現量に注目すると、GR キメラおよび *NpHR* キメラの場合、細胞質側第 2 ループを挿入したキメラの方が細胞質側第 3 ループを挿入したキメラよりも発現量が低くなったが、IndiR2 キメラのみ逆の傾向がみられた。挿入した β_2AR の配列は第 2 ループで 22 アミノ酸残基、第 3 ループで 55 アミノ酸残基であり、単純に考えると長いループを有する方が構造の揺らぎが大きくなり、より不安定化しそうであるが、今回の結果から、キメラにおける発現量は鋳型となる微生物型ロドプシン種類によっても大きく変動することが示唆された。

最後に、各キメラの光依存的な G_s タンパク質活性性能の測定を行った結果を図 2 に示す。分子設計を行った当初、イオン半径の大きなイオンを輸送する微生物型ロドプシンの方がヘリックスの動きが大きくなり、より高い活性を示すことが期待されていた。しかし実際には大変興味深いことに、 H^+ を輸送する GR キメラのみが光依存的な G_s の活性化を示した。さらに、各キメラのフォトサイクルを過渡吸収法により調べたところ、唯一 G_s 活性化能を示した GR キメラでは野生型とほぼ変わらないフォトサイクルを示した。その一方で、IndiR2 キメラでは野生型でほとんど見えていない L 中間体の蓄積が見られ、また *NpHR* キメラでは野生型に存在しない M 中間体の蓄積が見られるなど、野生型と大きく異なる反応過程を示した。発表ではこれらのキメラの更なる特性や将来的な応用の可能性についても議論する。

[引用文献]

1. Nakatsuma et al., *Biophys. J.*, **100**, 1874-1882 (2011)
2. Sasaki et al., *PLoS One*, **9**, e91323 (2014)

表 1 各キメラの極大吸収波長・発現量

Sample	$\lambda_{\max}$ (nm)	Expression Level (OD·mL / 1 L culture)
GR WT	540	12
GR / β_2AR -2nd	547	3.4
GR / β_2AR -3rd	544	9.1
IndiR2 WT	534	6.1
IndiR2 / β_2AR -2nd	529	0.42
IndiR2 / β_2AR -3rd	530	0.31
<i>NpHR</i> WT	577	12
<i>NpHR</i> / β_2AR -2nd	568	0.072
<i>NpHR</i> / β_2AR -3rd	574	1.7

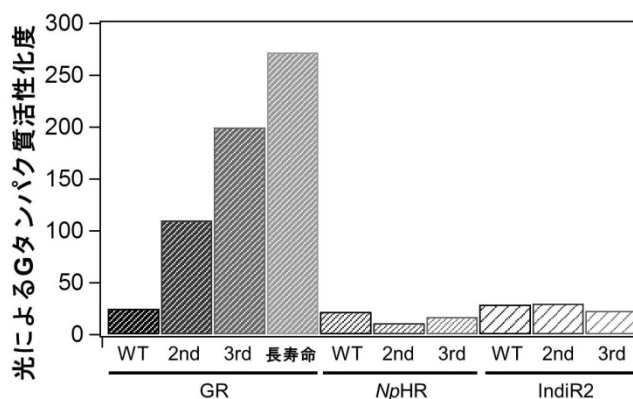


図 2 各キメラの G タンパク質活性化能

低分子二重特異性がん治療抗体の 機能的な構造形態に関する実験的考察

○ 浅野 竜太郎¹、永井 圭佑¹、瀧 慎太郎¹、梅津 光央¹、熊谷 泉¹

¹東北大・院工

ryutaro@prn.che.tohoku.ac.jp

【序】 抗体は、がんなどの難治療性の疾患に対する分子標的薬としても利用されてきたが、動物細胞を用いた製造に起因するコスト高が大きな問題となっているのが実情である。また従来型のIgG抗体では治療効果が限界との見方もある。このため様々な観点からより高機能な次世代型の人工抗体の開発が進められており、がん細胞とリンパ球を強制的に架橋することで特異的な抗腫瘍効果を発揮する二重特異性抗体、中でもその低分子型は最も期待されている人工抗体の形態の1つである(図1)。我々も、抗体の抗原結合ドメインのみで構成される低分子二重特異性抗体の開発に注力してきたが、その過程で、がん関連抗原であるヒト上皮増殖因子受容体(EGFR)とTリンパ球表面抗原であるCD3を標的としたEx3と名付けたヒト型化低分子二重特異性抗体が極めて効果的であることを見出した(図2a)。一方で、これまでに様々な形態の低分子二重特異性抗体が報告されているが、機能との相関に関しては十分な考察がなされていない。そこで、本研究では様々な形態のEx3を調製し、各種機能解析法を用いて、低分子二重特異性抗体の機能的構造形態に関する実験的考察を進めた。

【実験】 Ex3は、diabody (Db)と呼ばれる2つのポリペプチド鎖から構成される低分子二重特異性抗体であるが、まず人工のポリペプチドで連結させたsingle chain diabody (scDb)(図2b)と、同様に1つのポリペプチド鎖から調製されるが、single chain Fv (scFv)が縦列に連なっている構造であるtandem scFv (taFv)(図2c)を調製した。一方で、Db自体も配向性を考慮すると4種類の構造を取り得るため、残りの3種に関して、組換え体を調製し(図2def)、計6種類の低分子二重特異性抗体に関して比較検討を進めた。がん細胞傷害性試験は生細胞数測定法により評価し、各々の標的抗原であるEGFRおよびCD3に対する親和性評価は表面プラズモン共鳴法 (SPR)、および等温滴定型熱量測定法 (ITC)を用いて行った。また抗原間の架橋能評価を、可溶性の抗原

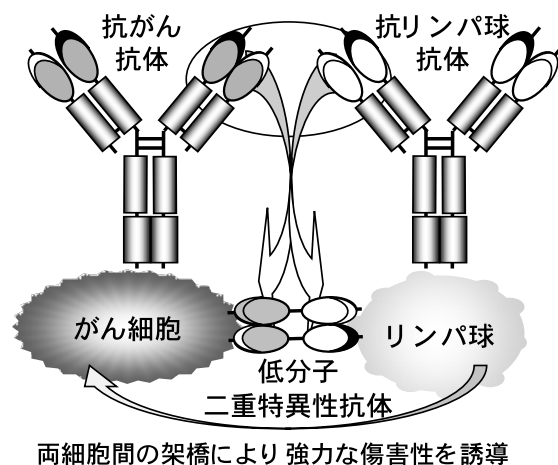


図1 低分子二重特異性抗体の模式図

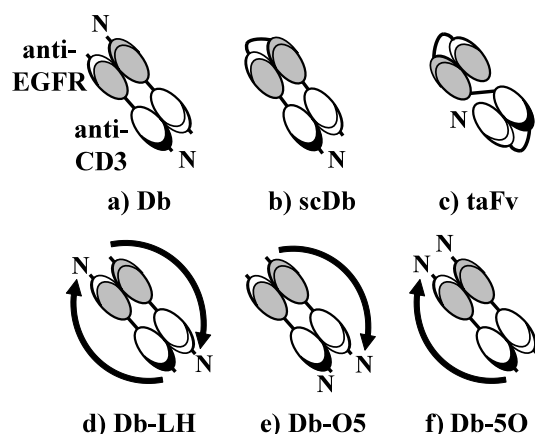


図2 各 Ex3 改変体の構造形態

間の架橋能に関しては SPR と ITC を用いて、標的細胞と可溶性の抗原間の架橋能に関してはフローサイトメトリー (FCS) を用いてそれぞれ行った。有望な分子種に関しては、ELISA による抗腫瘍性のサイトカインの分泌誘導能評価および担がんマウスを用いた *in vivo* 治療実験へと進めた。

【結果】 がん細胞傷害性試験の結果、Ex3 Db と scDb の活性は同等であったのに対し、taFv はより強い効果を示した。さらに配向性を改変させた Db はいずれもオリジナルの Ex3 Db よりも活性が高いことが分かり、軽鎖の抗原結合ドメイン (VL) を各々 N 末端に配置させた Db-LH に最も強い活性が認められた (図 3)。また taFv と Db-LH を比較したところ傷害活性は同等であった。これらの活性の違いを親和性から議論するために、固定化した EGFR に対して SPR を、また可溶性の EGFR と CD3 に対して ITC で評価した結果、違いはみられたものの必ずしもがん細胞傷害活性との相関はみられなかった。また SPR と ITC を用いて測定した可溶性の抗原間の架橋能にも差がみられなかったが、FCS で細胞を用いた架橋能を評価した結果、がん細胞傷害活性の高い taFv と Db-LH に明確な架橋形成が観察された。続いて細胞傷害活性が向上した要因を探るために各種抗腫瘍性のサイトカインの分泌誘導能を調べた結果、各 Ex3 とリンパ球のみを反応させた場合には、ほとんど分泌を誘導しなかったのに対し、がん細胞の共存下では、細胞傷害活性の強い分子種に顕著な分泌の亢進がみられた (図 4)。さらに早期がんモデルを用いた *in vivo* 治療実験に於いても、*in vitro* と相関する、即ち架橋能のより優れた分子種により強い治療効果が認められた。

【考察】 以上より低分子二重特異性抗体は、構造形態を改変させることで、また構造形態が同一でも配向性を改変させることで、その機能を向上させることが可能であることが明らかになった。活性向上には、サイトカイン分泌の惹起を促すための有利な細胞間架橋をもたらす構造形態であることが重要であることが示されたが、今後は他の低分子二重特異性抗体に関しても評価を行い機能的構造形態に関する実験的考察を深める予定である。

【引用文献】 1. Asano, R., et al., *J. Biol. Chem.*, **286**, 1812-1818 (2011)

2. Asano, R., et al., *Protein Eng. Des. Sel.*, **26**, 359-367 (2013)

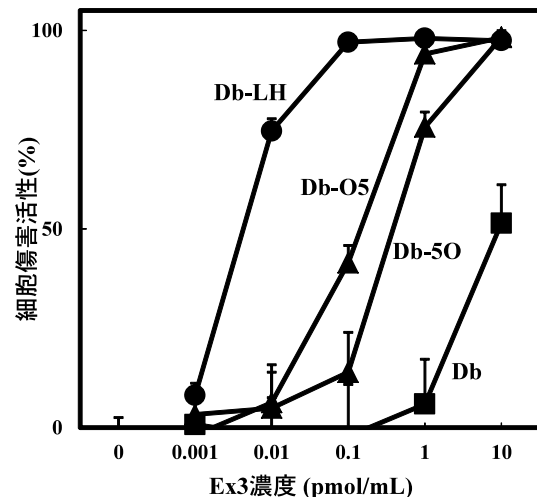


図 3 Ex3 改変体の細胞傷害活性の比較

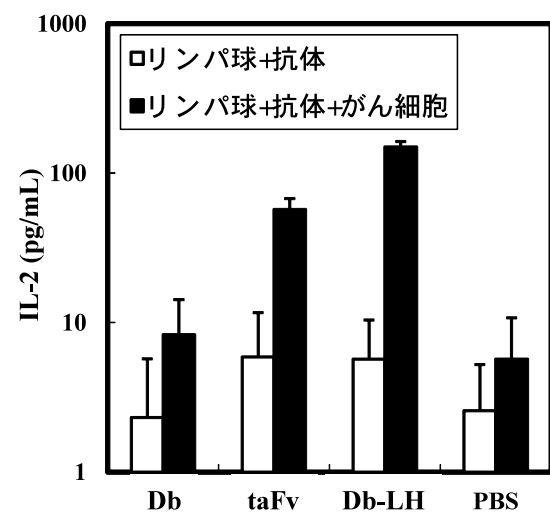


図 4 IL-2 の分泌誘導能の比較

タンパク質ナノ構造体 Encapsulin の特性とゲ ストタンパク質封入法の開発

○ 尾高雅文¹、田村彰朗¹、福谷洋介¹、藤井基子¹、高見拓²、村上
義彦²、野口恵一³、養王田正文¹

¹東農工大・院工・生命工、²農工大・院工・応用化学、³農工大・機器
分析施設

modaka@cc.tuat.ac.jp

【序】 ミトコンドリアや葉緑体などに代表されるように、ある種の代謝反応を行う酵素群を特定のコンパートメントに局在させた“区画”を形成することは、生命にもっとも本質的な現象の一つである。真核生物ではリン脂質二重膜で囲まれたオルガネラが発達しているのに対し、ある種の微生物はタンパク質のみで構成される中空のシェル構造体を形成して、特定の代謝反応を行っている。近年、好熱菌 *Thermotoga maritima* から分子量約 30 kDa のタンパク質が中空の外殻構造をもつタンパク質が単離、構造解析され、Encapsulin と名付けられた¹。Encapsulin に類似したタンパク質遺伝子は他のいくつかの微生物ゲノムにも存在しており、いずれの場合も、構造遺伝子上流に dye decolorizing peroxidase (DyP)あるいは ferritin-like protein (Flp)をコードしている。これらのタンパク質はC末端領域をシグナル配列として Encapsulin 内部に取り込まれ、細胞内の酸化ストレスに対応していると考えられている。我々は将来的に、Encapsulin をナノリアクターやドラッグデリバリーシステムとして利用することを考え、研究を進めている。昨年度の討論会において、我々は、放線菌 *Rhodococcus erythropolis* N771 由来 Encapsulin (ReEncapsulin)の組換え体発現系を構築し、光散乱法により ReEncapsulin が分子量 1.8 M の単一サブユニット 60 量体を形成すること、TEM 観察により直径約 20 nm 程度の中空の粒子を形成すること、動的光散乱法により約 50°C までの温度範囲で安定な粒子を形成することを報告した。本年度は、ReEncapsulin へのゲストタンパク質を封入法の開発について報告する。

【実験】 ReEncapsulin はC末端側に His-tag を付加した ReEncapsulin-His の発現ベクターを導入した大腸菌 BL21(DE3)を培養することで行った。EGFP と Firefly 由来 Luciferase (Luc)の発現系に関しては、ReEncapsulin 遺伝子上流に存在する DyP 遺伝子をクローニングして塩基配列を決定し、C末端37アミノ酸残基に相当する塩基配列をEGFPとFirefly由来Luciferase (Luc)のC末端に組み込み、N末端に Strep-tag 配列(WSHPQFEK)を挿入した遺伝子を pET30b に挿入し(それぞれ、EGFP-tags、Luc-tags)、大腸菌 BL21(DE3)に導入して発現させた。His-tag、Strep-tag によるカラムクロマトグラフィーは、それぞれ、GE 社製 Hitrap Ni-Chelating カラム、IBA GmbH 社製 Strep-Tactin Sepharose カラムを用い、添付のプロトコルにしたがって行った。透過型電子顕微鏡(TEM)観察はリンタングステン酸染色によるネガティブ染色をし、JEOL 社製 JEM-1400 を用いて行った。蛍光スペクトルの測定は日本分光社製蛍光光度計 FP6500 を用いた。

【結果・考察】 EGFP-tags または Luc-tags を ReEncapsulin-His と BL21(DE3)で共発現させ、

Ni-Chelating、ゲル濾過カラムクロマトグラフィーで精製した。その結果、EGFP-tags と Luc-tags のどちらも *ReEncapsulin*-His と同一フラクションに溶出し、どちらも *ReEncapsulin*-His と複合体を形成していることが明らかになった。得られた複合体を TEM で解析したところ、いずれも単独で発現させた *ReEncapsulin*-His と同様の粒子構造をとっていた。次に、EGFP-tags と Luc-tags が *ReEncapsulin*-His 粒子内部に存在することを確認するため、精製した複合体を **Strep-Tactin Sepharose** カラムにアプライしたところ、吸着されずに素通り画分として溶出された。単独で発現させた EGFP-tags と Luc-tags はいずれも同じカラムに吸着されることから、EGFP-tags と Luc-tags の Strep-tag 配列はいずれも粒子表面に露出していない、すなわち、EGFP-tags と Luc-tags はいずれも粒子内部に局在していることが確認された（図 1）。EGFP-tags または Luc-tags と共発現させた *ReEncapsulin*-His をトリプシンで 5 分間消化した後に SDS-PAGE を行ったところ、単独で発現させた EGFP-tags と Luc-tags はいずれも消化を受けていたのに対し、*ReEncapsulin*-His と共発現させた場合には、トリプシン消化を受けていなかった。*ReEncapsulin*-His はトリプシン消化に耐性を示すことから、EGFP-tags と Luc-tags が粒子に内包されることで消化を受けなくなったと考えられる。

ReEncapsulin-His と共発現させた EGFP-tags は野生型 EGFP と同様な蛍光スペクトルを示した。また、吸収極大の強度から、*ReEncapsulin*-His 53 分子当たり EGFP-tags、すなわち、*ReEncapsulin*-His 粒子 1 個当たり約 1 分子の EGFP-tags が内包されることがわかった。一方、*ReEncapsulin*-His と共発現させた Luc-tags の luciferase 活性を測定したところ、単独で発現させた Luc-tags よりも $1/10^4$ 以下の僅かな活性が検出された。*T. maritima* 由来 Encapsulin の結晶構造より、Encapsulin の粒子表面は密な構造をもち、直径 2-3Å 程度の穴しか観測されないことを考慮すると、基質として加えた luciferin や ATP の粒子外殻に対する透過性が低いために *ReEncapsulin*-His と共発現させた Luc-tags が低い luciferase 活性を示したと予想された。以上のことから、ゲストタンパク質の C 末端に DyP の C 末端 37 残基を融合させることで、*ReEncapsulin*-His 粒子に内包させる手法の開発に成功した（Biotechnology and Bioengineering に投稿し、Revise 中）。

現在、*ReEncapsulin*-His の凍結乾燥や変性・再構成等を試みている。発表では、最新のデータを交えて報告したい。

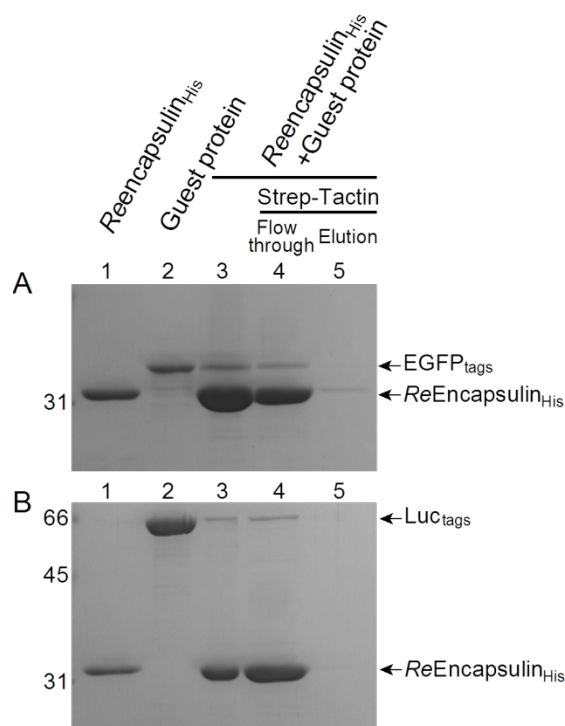


図 1 ゲストタンパク質と *ReEncapsulin* 共発現体の SDS-PAGE.
(A) EGFP-tags (B) Luc-tags

【引用文献】 1. Sutter, M. et al., *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **9**, 939-947 (2008).

電子伝達タンパク質による転写調節因子のシグナル変換

○ 中島 洋¹、宮崎 総司²、伊藤 誉明¹、渡辺 芳人²

¹名大・院理、²名大・物国センター

nakajima.hiroshi@f.mbox.nagoya-u.ac.jp

[序] 転写制御因子とは、細胞内において外界からの特定の刺激を感知し、その対応に必要な様々なタンパク質の生合成量を遺伝子の転写段階で制御するタンパク質である。感知の対象には、分子やイオンなどの物質のほか、光、温度のような物理量も含まれ、高感度・高選択的な刺激感知能は、センシング材料の観点からも魅力的である。多くの場合、転写制御因子による直接の出力は、特定 DNA 配列に対する結合の ON/OFF であり、その後「mRNA 合成酵素の活性変化 → mRNA 合成量変化 → タンパク質合成量の変化」を誘起する。この仕組みを *in situ* で利用する生菌センサーが研究されており、生成するタンパク質の蛍光や触媒活性を計測することで、転写制御因子による刺激感知を定量化する。この仕組みは、転写調節因子の生理的作用機構をそのまま利用するため、簡単な遺伝子操作で様々なセンサーを構築できる。一方、構築したセンサー機構とは別に、生菌がもともと有する外部刺激応答と適応が、センサーによる刺激感知を妨害することがあり、今のところ刺激感知の定量、定性の両面で再現性に課題が残る。こうした問題を避ける一つの方法として、転写制御因子の外部刺激感知機構を *in vitro* で、簡単に計測、定量化する仕組みを構築することが考えられる。

我々は、これまでに開発してきた電子伝達タンパク質（アズリン、シトクロム *c*, Cyt *c*）で構成されるシグナル変換機構¹（図 1）を利用し、転写制御因子による外部刺激応答を電気的なシグナルへと直接変換する仕組みの構築を目指している。本発表では、転写制御因子として、好熱菌 *Carboxydothemus hydrogenoformans* 由来の一酸化炭素（CO）感知 転写制御因子 CooA を用い、CO 依存的に CooA が電子伝達タンパク質間の見かけの電子移動速度を変化させる機構（図 2）を構築したので報告する。²

[実験] 図 3 に示す手法にしたがい、電子伝達タンパク質の一方であるアズリンの銅イオン（酸化還元活性中心）近傍に CooA の認識配列を含む 27bp（5'-GATAACTGTCATCTGGCCGACAGACGG-3'、下線部は CooA 結合部位）の 2 本鎖オリゴ DNA を導入したアズリン-DNA 複合体（Az-DNA）を調製した。Az-DNA に対する CooA の付加体生成は、ゲルモビリティアッセイ、並びに蛍光偏光解消法を用いて測定した。電子移動

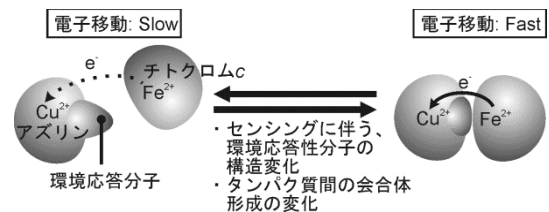


図1 電子伝達タンパク質を利用するシグナル変換機構の概念図。「センサー部位の変化→会合体形成能の変化→電子移動速度の変化」の過程により、情報変換を行う。

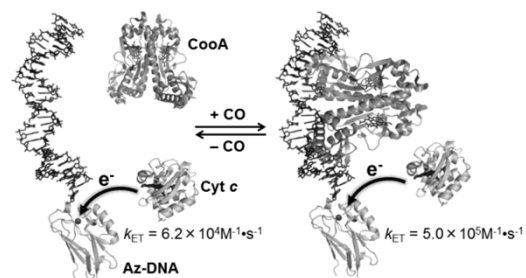


図2 電子伝達タンパク質を利用する転写制御因子のシグナル変換の概要。

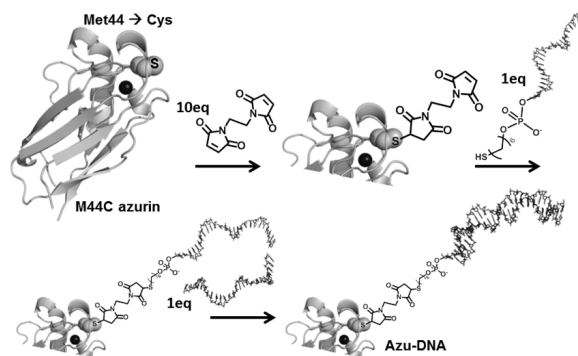


図3 Az-DNAの調製手順。

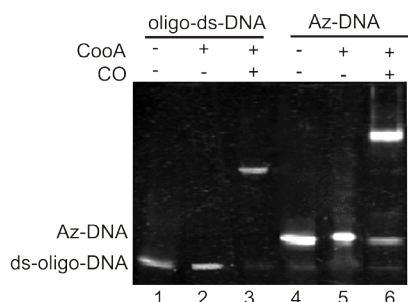


図4 CO依存的なCooA-Az-DNA付加体生成。CooAの結合配列を含む27bpの二本鎖(oligo-ds-DNA)との付加体形成と同様にAz-DNAもCooAに対し、CO依存的な付加体形成能を示す。蛍光偏向解消実験より、Az-DNA-CooA(CO型)付加体の解離定数 $K_d = 38\text{nM}$ が得られた。

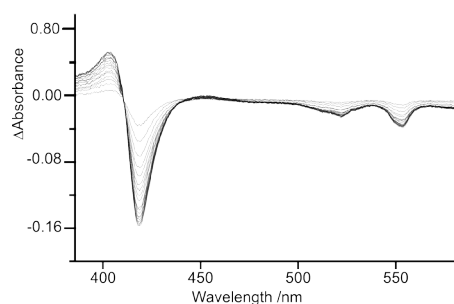


図5 チトクロム $c(\text{Fe}^{2+})$ からAz-DNA(Cu^{2+})への電子移動過程で観測される吸収スペクトル変化。チトクロム c の Fe^{2+} から Fe^{3+} への変化が観測されている。

る場合、速度定数に大きな変化はみられなかった。一方、付加体を形成するCO存在下では、速度定数の部分的な回復が観測された。発表では、この結果についても議論する。

反応は、 $10\mu\text{M}$ アズリン(Cu^{2+})あるいはAz-DNA(Cu^{2+})と $10\mu\text{M}$ Cyt c (Fe^{2+})を1:1で急速に混合した後、Cyt c の Fe^{2+} から Fe^{3+} への酸化に伴うスペクトル変化で追跡した。2次反応を仮定して解析をおこない、速度定数を求めた。

【結果と考察】アズリンおよびAz-DNAのEPR, UV-Vis スペクトル、酸化還元電位(Cu(I/II) , 270mV vs. SHE)は、ほぼ一致し、

DNAとの複合化は、アズリン銅イオンの性状に影響しないことがわかった。Az-DNAはCO存在下でCooAとの付加体を形成するが(ゲルモビリティアッセイならびに蛍光偏向解消実験、図4)、その状態でもスペクトル、酸化還元電位に変化はみられなかった。このことは、後述するCooAとAz-DNAとの付加体生成に伴う電子移動(Cyt c からAz-DNAへの一電子移動)の速度定数変化が銅イオンの性状変化によるものではないことを支持する。

図5に、Az-DNA(Cu^{2+})とCyt c (Fe^{2+})混合後の吸収スペクトルの変化を示す。423, 528, 552nmにおける吸光度の減少、412nmに等吸収点がみられCyt c (Fe^{2+}) $\rightarrow$ (Fe^{3+})の反応のみ進行すると考えられる。

表1 Cyt c からの電子移動速度定数

	$k_{\text{ET}}/\text{M}^{-1}\text{sec}^{-1}$		
	-CooA	+CooA	+CO,+CooA
アズリン	1.0×10^6	—	—
Az-DNA	6.2×10^4	7.0×10^4	5.0×10^5

表1にCyt c からアズリンおよびAz-DNAへの電子移動速度定数($k_{\text{ET}}/\text{M}^{-1}\text{sec}^{-1}$)を示す。もとのアズリンに比べ、Az-DNAへの速度定数は、大きく減少しており、銅イオン近傍に導入したDNAがCyt c からの電子移動プロセスを阻害していると考えられる。

- 【引用文献】1. Rosenberger, N., *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.* **48** 1946-1949 (2009).
2. Nakajima H., *et al.*, *Chem. Lett.* (2014) in press.

ATPase 活性調節の理解に向けた時計タンパク質 KaiC の機能的・構造的解析

○ 阿部 淳^{1,2}、檜山 卓也¹、向山 厚^{1,2,3}、山下 栄樹⁴、近藤 孝男⁵、秋山 修志^{1,2,3}

¹分子研・協奏分子システム研究センター、²理研・SPring-8、³総研大、⁴阪大・蛋白研、⁵名大・院理
jabe@ims.ac.jp

【序】 細菌から哺乳類にいたるさまざまな生物が、約24時間周期の内因性のリズム（概日リズム）を有している。概日時計を有している生物の中でもっとも下等な生物はシアノバクテリアであるため、概日時計の研究対象としてシアノバクテリアはよいモデル生物といえる。シアノバクテリアの概日時計はKaiA、KaiB、KaiCの3つのタンパク質から構成されている。KaiAはKaiCの自己リン酸化活性を促進し、一方でKaiBはKaiAの効果を抑制することでKaiCの自己脱リン酸化を促している。これら3つの時計タンパク質とATPを試験管内で混合すると、KaiCは約24時間の周期で自己リン酸化・自己脱リン酸化を繰り返す（リン酸化リズム）。このリン酸化リズムは概日時計にほぼ普遍的に見られる3つの特徴（自律的なリズム、周期が生育温度範囲で一定（温度補償性）、外界への同調能）を示す。

KaiCは自己リン酸化・自己脱リン酸化の機能だけではなく、ATPase活性も有している。近年の研究において、KaiCのATPase活性の特徴が明らかになってきた[1]。KaiCのATPase活性は1日に15個程度のATPを加水分解するという非常に低い活性を示す。またこの活性は温度補償性を示す。さらにKaiCのATPase活性はKaiA、KaiBとATPを混合すると、約24時間の周期で変動する。このように特徴的なKaiCのATPase活性はリン酸化リズムと相関があることが示された[1]。これは、高いATPase活性を示す変異体ではリン酸化リズムの周期が短くなり、低い活性の変異体では周期が長くなることを示している。このことから我々はKaiC単独のATPase活性が3つの時計タンパク質が作り出す周期の決定因子であると考え、さまざまな実験を通じて仮説の検証を試みてきた。

KaiC の ATPase 活性が関わる特異な活性の制御機構は、分子全体で実現されていると推測されるが、その分子メカニズムは全く明らかにされていない。我々は構造情報や生化学的解析を組み合わせ、KaiC の ATPase 活性を調節するメカニズムを解き明かすことを目的としている。

【実験】 機能解析に用いた KaiC のコンストラクトはシアノバクテリア *Synechococcus elongatus* PCC7942 株由来である。大腸菌で大量発現させ、既報に従って精製を行った[2]。KaiC の ATPase 活性は LaChromUltra システム（HITACHI）を用いて、加水分解に伴って生じた ADP の量を定量した。

構造解析に用いた KaiC のコンストラクトは高分解能な X 線構造解析が実現できるように一部のアミノ酸を削る工夫を行った。このコンストラクト（ΔKaiC）を大量発現させ、複数

回カラムにかけることで精製を行った。網羅的な結晶化条件のスクリーニングから結晶化条件をある程度しぼり、その条件の最適化を行った。

【結果と考察】 既報[3]の KaiC 全長の分解能 (2.8 Å) を上回る Δ KaiC の結晶構造の取得に成功した。このことにより、既報よりも側鎖の位置決定精度が格段に上昇した。短い周期、長い周期の変異体においても同様に結晶構造を取得することができた。 Δ KaiC WT と周期が異なる変異体の構造比較を行うと構造にほとんど差が見られなかったが、短い周期の変異体では温度因子が低く、長い周期の変異体では温度因子が高い傾向があることが示された。詳細に温度因子の比較を行うと、あるヘリックス (H) で上記の傾向が顕著であった。このことから Δ KaiC の周期の異なる変異体は H ヘリックスの安定性を変化させていると示唆される。

しかしながら、上記の構造データだけでは H ヘリックスの安定性と ATP の加水分解をつなぐ理解ができなかった。そこで、我々は H ヘリックスを中心とした ATP の加水分解へとつながる構造変化があるのではないかと期待し、さらに網羅的な結晶化条件のスクリーニングを行った。その結果 Δ KaiC WT において新しい晶系の結晶構造を得ることに成功した。晶系の異なる Δ KaiC WT において構造比較を行うと、H ヘリックスの構造変化が起点となり、数十 Å 離れた ATP 結合部位へ構造変化の伝搬があることを発見した。伝搬と関わりのあるアミノ酸残基の変異体を作成して ATPase 活性を測定することで、異なる晶系がそれぞれ高い ATPase 活性、低い ATPase 活性の状態であることが示された。このことは、KaiC は ATP 加水分解前の状態で ATPase 活性の異なる状態があることを示唆している。

- 【引用文献】** [1] Terauchi, K. *et al. PNAS*, **104**, 16377-16381 (2007)
[2] Nishiwaki, T. *et al. PNAS*, **101**, 13927-13932 (2004)
[3] Pattanayek, R. *et al. Mol. Cell*, **15**, 375-388 (2004)

酸化亜鉛認識ラクダ抗体の亜鉛イオン認識機構

齋藤 湧太郎¹、北沢 創一郎²、北原 亮²、田中 良和³、中澤 光⁴、
梅津 光央⁴、熊谷 泉⁴、○真壁 幸樹¹

¹山形大・院理工、²立命館・薬、³北大・院先端生命、⁴東北大・院
工

makabe@yz.yamagata-u.ac.jp

[序]

ファージ提示法をはじめとした、試験管内選択技術の進展によって、機能性蛋白質分子の選択が広く行われてきている。近年では、これを無機材料認識に拡張し、高度に制御された材料の開発へ応用が考えられている。

ラクダ抗体 4F2 は服部らによって作製された酸化亜鉛を認識する抗体クローンである (1)。相補性決定領域 (CDR) 移植に適していることが報告されているラクダ抗体、cAbBCII10 を足場タンパク質として、まず CDR1 ループに酸化亜鉛ペプチドを移植された (クローン名 ZnOBP1)。この酸化亜鉛結合ペプチドは梅津らによってファージ提示法によって単離された配列である (2)。さらに、CDR3 配列をランダム化し、酸化亜鉛に対する高い結合親和力を持つ、4F2 がファージ提示法によって単離された。このように、4F2 では CDR1 ループへペプチド配列の移植、CDR3 ではランダム化された配列からの選択と、二つのループに改変が加えられている。

本研究では固体の酸化亜鉛表面に結合する 4F2 が金属イオンに対して結合特性を有しているか評価するために、等温滴定型熱量計 (ITC)、多次元 NMR 法を用いて調査した。

[実験]

実験では、野生型 VHH (cAbBCII10)、CDR1 のみ酸化亜鉛結合ペプチドを移植した中間体クローン (ZnOBP1)、4F2 の三種類の抗体クローンを用いた。抗体クローンはすべて可変領域断片のみの発現ベクターとして構築し、大腸菌 BL21 (DE3) 株を組換えて作製した。作製した抗体断片の酸化亜鉛結合能について、酸化亜鉛粒子への結合能から評価した。

作製した抗体断片の熱安定性を評価するために、示差走査型熱量計 (DSC) を用いて変性温度を測定した。抗体断片の金属イオン結合特性を等温滴定型熱量計 (ITC) で評価した。金属イオンとして、亜鉛イオン、銅イオン、ニッケルイオン、コバルトイオンを用いた。アミノ酸残基分解能で金属イオン結合メカニズムを明らかにするために 4F2 の NMR シグナルの帰属を行った。試料は ¹⁵N, ¹³C ダブルラベルした 4F2 を用いて、HNCACB, CBCACONH 等、三次元 NMR 測定によって帰属を行った。亜鉛イオンを加えた 4F2 サンプルと加えていないサンプルの ¹H-¹⁵N HSQC スペクトル測定から、亜鉛イオンの結合部位を同定した。

[結果]

大腸菌の組換え体として 4F2、野生型 VHH、ZnOBP1 を作製し、高い純度で目的タンパク質を精製し、作製した 4F2 の酸化亜鉛結合活性を確認した。DSC を用いた安定性評価から、野生型

VHH、4F2、ZnOBP1の順で安定性が減少していた。つまり、CDR1へのループ移植が安定性を減少させたが、それに引き続くCDR3の改変が安定性を回復させていることが示唆された。

ITCを用いた、金属イオン結合活性の評価から、4F2は亜鉛イオンへの結合が観察できた(図1)しかし、野生型とZnOBP1は結合が見られなかった。また、4F2に関して、ニッケルイオンにも若干の結合が見られたが、コバルトイオンと銅イオンへは結合が見られなかった。以上から、4F2は亜鉛イオンに対して結合特異性を有しており、結合は主にCDR3ループが担っていることが明らかとなった。

安定同位体ラベルした4F2の多次元NMR測定によって、観測可能なアミドプロトン131残基のうち111残基まで帰属が完了した。これに基づいてHSQCスペクトルから亜鉛イオン部位を決定した。

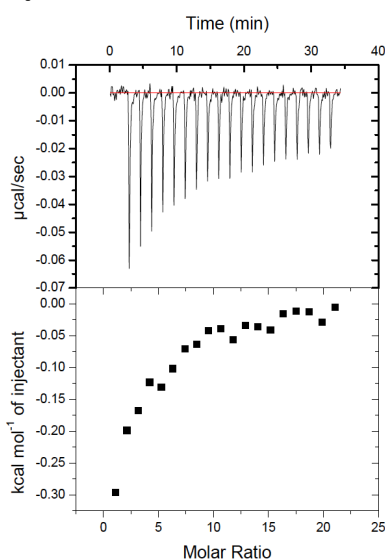


図 1 4F2 と亜鉛イオンの結合滴定曲線

[考察]

無機材料を認識する生体高分子は、その特異的な分子認識能を組み合わせることで、新しい材料の創成が可能となる。本研究では、酸化亜鉛認識抗体 4F2 の金属イオン認識機構について、詳細に検討した。ITC 測定から 4F2 の CDR3 ループが亜鉛イオンへの結合に重要であることが示唆された。CDR3 ループはアミノ酸配列が“HLGHGLHRVH”であり、ヒスチジンが4残基含まれていて、これらヒスチジンによる配位結合が亜鉛イオン結合に寄与していると考えられる。NMR 測定の結果からも CDR3 ループ近傍で、NMR ピークの消失が観察された。以上から、CDR3 ループが亜鉛イオンの配位に適した配座を取り、特異的に結合しているのだろう。今後、この認識機構がどのようにして酸化亜鉛表面の認識につながるのかについて研究を進める予定である。

[引用文献]

1. Hattori, T., et al., *J. Biol. Chem.*, **285**, 7784-7793 (2010)
2. Umetsu, M., et al., *Adv. Mater.* **17**, 2571-2575 (2005)

細菌べん毛繊維に学ぶナノスケールの構造変化制御機構

○林 史夫, 大澤 研二

群馬大・院理工・分子科学

fumio_hayashi@gunma-u.ac.jp

[序]

サルモネラべん毛繊維はらせん形をしたタンパク質超分子であり、そのらせん形態をダイナミックに且つ可逆的に変えることで、菌体の直進遊泳と方向転換を可能にする（図1左）。また、その形態変化は菌体から単離したべん毛繊維でも、pHや塩濃度等の環境変化によって再現することができる。このダイナミックな形態変化機構を原子・分子・エネルギーの言葉で説明し、形態変化を司る要素構造や要素概念を見つけ出すこと、そして、将来的には戦略的にデザインされた高次機能性超分子の創出に貢献することを目指している。

サルモネラべん毛繊維は直径23ナノメートル、平均長約10マイクロメートルであり、約30,000分子もの単一タンパク質“フラジェリン”から成っている（図1右）。繊維の形態変化は、フラジェリン間にある無数の弱い相互作用の中の、特定の相互作用の切り換えであることは容易に想像できる。しかしながら、フラジェリンを構成する494個のアミノ酸残基、約7,000の原子のうち、どのアミノ酸残基が、どの原子が、どのようなメカニズムで形態変化を導いているか、ほとんどわかっていない。我々はその分子メカニズムの解明に向けて、直線形べん毛繊維を用いたフラジェリン内抑圧変異解析という遺伝学的な方法を適用し、形態変化の鍵となるアミノ酸残基の決定を試みた。

[実験]

フラジェリンはタンパク質故の柔らかさを持っており、立体構造がわずかに異なる2つの構造---L型とR型---を可逆的にとることができる。L型/R型の存在比は平衡関係にあり、刺激や環境に応じて平衡が傾き存在比が変わることで、様々ならせん形態をとると考えられている。また、アミノ酸残基の変異も平衡を傾ける要因であり、フラジェリンのG426A変異

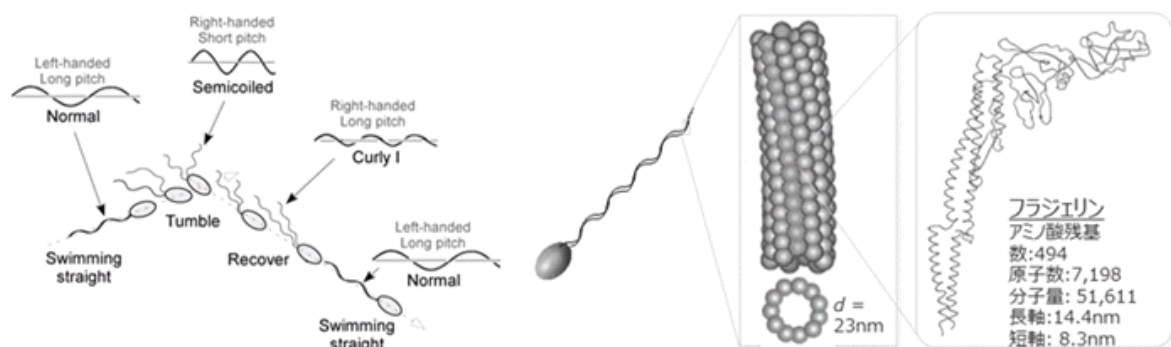


図1. サルモネラの遊泳とべん毛繊維 遊泳模式図とべん毛繊維形態の対応（左）。べん毛繊維構造の模式図（右）。

ではすべてL型フラジェリンからなるL型直線形べん毛繊維に、A449V変異ではすべてR型

フラジェリンからなる R 型直線形べん毛繊維になる．このような直線形べん毛繊維を持つサルモネラ変異体を親株として，更にもう一つ変異が入ることにより，べん毛繊維がらせん形になった復帰突然変異体（復帰体）を探し出し，それらのフラジェリン変異部位を決定すれば，その変異部位は形態変化に関わる鍵残基と言えると考えた．異なるアミノ酸残基の変異により直線形となったべん毛繊維を持つサルモネラ変異体を 4 種類準備し，それらから約 400 株の復帰体を単離した．変異部位は DNA シーケンサーで決定し，繊維形態解析と遊泳速度解析はそれぞれ暗視野顕微鏡と位相差顕微鏡による観察データに基づいて行った^{1,2)}．

【結果と考察】

鍵残基として Ser106, Asp107, Ala416, Gly426, Ala427, Arg431, Phe448 の 7 残基を提案するに至った．L 型/R 型直線形べん毛繊維の原子分解能の構造に基づく，これら 7 つの残基は 3 領域に大別できた．その中の一つが Gly426, Ala427, Arg431 から成る領域で，この領域は以下の理由--- 1) Gly426, Ala427, Arg431 に変異を持つ復帰体は，形態変化能力が低かった， 2) Ala427 や Arg431 に変異を持ついくつかの復帰体はノーマル型からセミコイル型への変換（図 1 左）の中間体と思われる繊維形態を提示した， 3) 隣接するフラジェリンサブユニットの境界面に位置し，サブユニット間相互作用を劇的に切り替える可能性が高かった---から形態変化の「分子スイッチ」として機能するのではないかと推察した^{1,2)}．

現在，分子スイッチとしてのメカニズムを解明するために，Gly426, Ala427, Arg431 それぞれに変異を導入した変異体を複数種作製し，繊維形態や形態変化能力を調べている．

【引用文献】

1. 林史夫ら，*高分子論文集*，67: 666-678 (2010)
2. Hayashi, F., *et al.*, *J. Bacteriol.*, 195: 3503-3513 (2013)

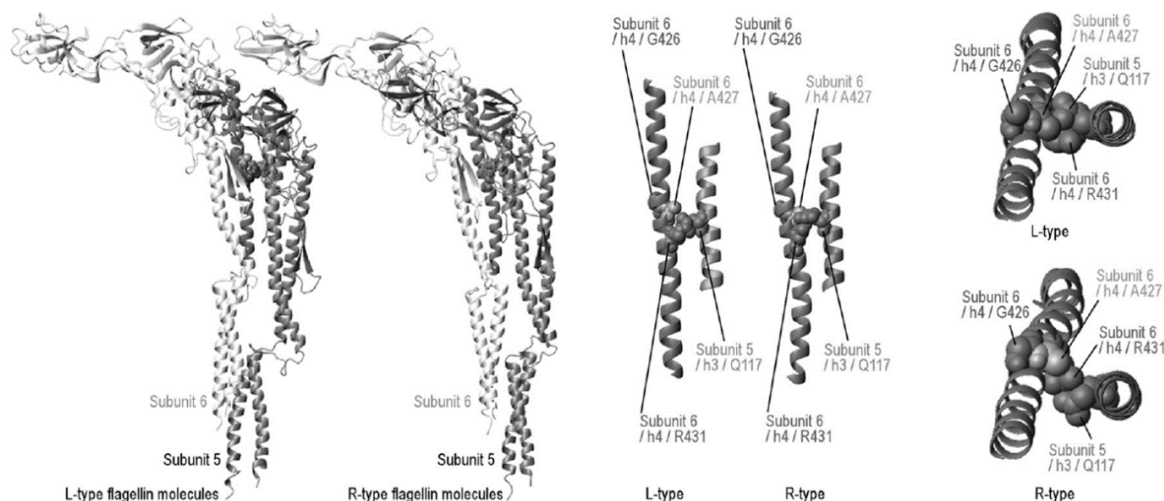


図 2. L 型/R 型直線形べん毛繊維中のフラジェリンの構造の違い 隣り合う 2 つのフラジェリン（サブユニット 5 と 6）をリボンモデルで表し，Gly426, Ala427, Arg431, Gln117 を CPK モデルで表した（左）． Gly426, Ala427, Arg431, Gln117 とそれらが在る α -ヘリックスを抜き出した（中）．「中」の構造を上方向から見た（右）．

理論計算によるナイロン分解酵素の機能解析

○ 重田 育照^{1,2,7}、馬場 剛史²、安東 寛之²、神谷 克政³、Boero M.⁴、
根来 誠司⁵、望月祐志⁶、中野雅由²

¹筑波大・院数理物質、²阪大・院基礎工、³神奈川工大・基礎教育セ、
⁴IPCMS, France、⁵兵庫県大・院工、⁶立教大・院理、⁷CREST JST
shigeta@ccs.tsukuba.ac.jp

【序】 酵素利用による物質生産や分解は、酵素の基質選択性に由来する高選択性、および、温和な条件下での反応の進行などの特徴から、低環境負荷の手法として期待されている。しかし、酵素の機能や物性は生体内環境に最適化されており、工業化するためには酵素の機能制御が不可欠である。近年分子生物学の発展によって、部位特異的アミノ酸変異実験を中心とした酵素デザインが盛んに行われており、多くのアミノ酸変異のデータが蓄積されている。しかしながら、その手法はランダム変異や結晶から得られた構造情報に基づく経験的なものであり、より効率的な酵素を設計するためにはその機能を詳細に知ることが肝要である。しかし、酵素反応は多段階かつ複雑である上、様々な素過程が存在する。典型的な素過程としては、図1に示すように、(1) ループ部位や基質などの移動により生じる構造変化、(2) 基質を認識する分子認識、(3) 基質に対する化学反応、(4) 反応後のすみやかな脱離である。従来の研究は、基質結合や酵素反応のエナジェティクスを中心に成されているが、酵素の機能改善や設計指針を構築する上で、これら全ての情報を正確に記述することが重要である。本発表では、分子動力学 (MD) 法、QM/MM 分子動力学 (QM/MM MD) 法、ならびに、フラグメント分子軌道 (FMO) 法の各種理論計算手法を用いて、図1に構造を示したナイロンオリゴマー分解酵素 (NylB) [1] の機能解析の結果を報告する。

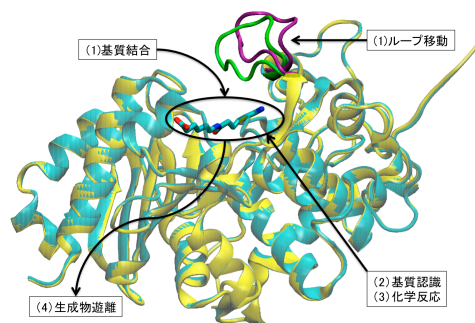


図1 酵素反応の素過程

【計算の詳細】 水溶液中での NylB とその変異体の構造安定性解析、および、基質結合後の誘導適合の詳細を明らかにするため MD および Parallel Cascade Selection (PaCS)-MD を行った [2, 3]。プログラムは Amber 12、amber ff99 力場を用いた。一方、酵素反応を記述するため、QM/MM Car-Parrinello MD 法によるメタダイナミクス (QM/MM CPMD Meta-D) シミュレーションを行った [4]。また、基質と酵素の結合の詳細を知るため、ABINIT-MP プログラムによる FMO2-MP2/6-31g(d) レベルでの計算を行い、その後、得られた情報により残基間相互作用 (IFIE) 解析を行った [5]。その際計算の都合上、タンパク質周りの水分子は基質から 15Å 以内のみを考慮に入れた。

【結果・考察】 MD法による構造安定性解析の結果、野生株(WT)では活性中心の構造が非常に強固であるが、結晶構造と比べ基質のC末端が大きくゆらぐことが判明した。結晶構造では氷晶防止剤であるグリセロールがこのC末端を安定化している。一方水溶液中では、脱プロトン化したC末端が反発的相互作用となることが大きなゆらぎの原因となる。本酵素の特徴であるTyr170をPheに置換したY170F変異体では、活性中心に水分子が侵入し、また、基質結合構造が大きくゆらぐことが判った。Tyr170がどの程度の安定化に寄与するのか、PaCS-MDによる自由エネルギー解析を行ったところ、その自由エネルギー差は誘導適合前後で高々2~3kcal/molであることが判った。よって本酵素のTyr170による誘導適合の役割は基質結合安定化以外にあることが予想される。

QM/MM CPMD Meta-D 法による自由エネルギー解析では、基質のアミド結合距離とセリン求核攻撃距離を反応座標に設定し、反応自由エネルギー差を評価した。図3のような2次元の自由エネルギー空間の詳細な解析から、遷移状態構造と対応する活性化エネルギー障壁を求めた。その結果、律速段階であるアシル化反応の活性化エネルギー障壁は約21 kcal/molであることが分かった。同様の解析を、誘導適合による安定化効果のないY170F変異体で行ったところ、その反応障壁差は10 kcal/mol程度となり、Tyr170は基質結合ばかりでなく、反応に大きく寄与していることが判明した[4]。

FMO法によるアミノ酸残基と基質との相互作用解析の結果を図4に示す。WTでは、負に帯電したAsp181残基が基質と大きく引力的な相互作用をしていることが判る。この残基を中性かつ疎水性のGlyに計算機上で変異をさせた構造を用いて解析したところ、基質との相互作用が極めて小さくなることが判明した。このことは、基質結合においてAsp181が極めて重要なアミノ酸残基であることを示している。実際にD181G変異体では分解活性が著しく低下することから、この計算結果の妥当性が判る。

以上の様に本研究では、NylBを対象にして、基質結合・誘導適合・酵素反応などの酵素が絡む様々な反応素過程を明らかにし、実験との検証を通じ、その妥当性を確認した。本研究で得られた結果により、さらなる高活性酵素の創出が期待される。

【引用文献】 [1] S. Negoro *et al.*, *J. Mol. Biol.*, (2007), 370, 142. [2] T. Baba *et al.*, *Chem. Phys. Lett.*, **507**, 157 (2011). [3] T. Baba *et al.*, *J. Comp. Chem.*, *in press* (2014). [4] K. Kamiya *et al.*, *J. Phys. Chem. Lett.* **5**, 1210 (2014). [5] H. Ando *et al.*, *Mol. Phys.* submitted.

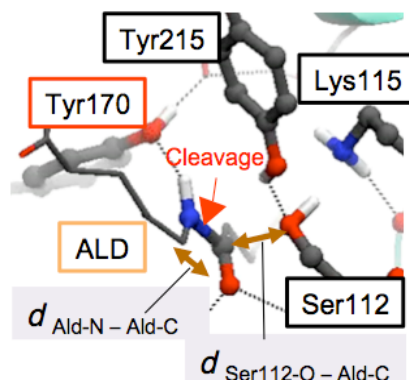


図2 活性中心のアミノ酸残基

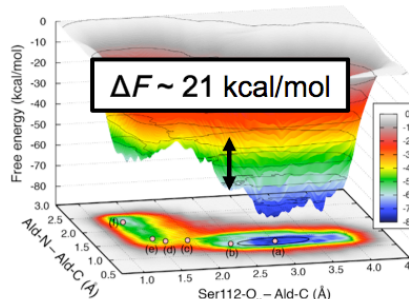


図3 自由エネルギー解析

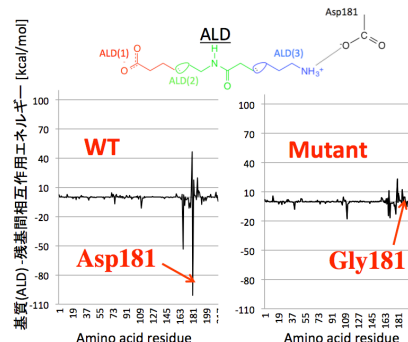


図4 相互作用の可視化

結核菌由来 MhuD の特殊なヘム分解メカニズム

○松井 敏高、南部 周介、齋藤 正男

東北大・多元研

matsui@tagen.tohoku.ac.jp

【序】 細菌におけるヘム分解反応は宿主からの鉄獲得に用いられ、その感染・増殖に重要である。近年、黄色ブドウ球菌の IsdG や結核菌の MhuD に代表される新たなヘム分解酵素ファミリー (IsdG 型酵素) が発見された。IsdG 型酵素に結合したヘムは異常に歪んでおり、その特異な構造と機能の相関に注目されている (図 1 左)。最近我々は、「IsdG と MhuD は CO を発生させずにヘムを分解し、従来型ヘム分解酵素 (HO 型) とは異なる生成物を与える」ことを示した (図 1 右)^{1,2}。この結果は、IsdG 型酵素の反応機構が HO 型とは大きく異なる事を示しているが、具体的なメカニズムや歪みによる反応制御に関する知見はほとんど得られていなかった。そこで本研究では、結核菌 MhuD によるヘム分解反応を詳細に検討し、特殊なヘム分解メカニズムの解明を試みた。

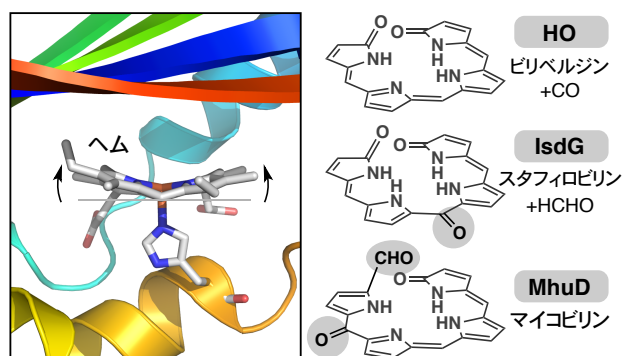


図 1 IsdG のヘム近傍構造と各ヘム分解酵素の生成物

【結果と考察】 まず、ヘム分解中間体を補足するため、MhuD 反応における吸収変化を測定した (図 2)。Fe³⁺ヘム-MhuD 複合体に還元剤を加えると、Soret 帯の吸収は 407 nm にシフトした後に大きく減少した。Soret 帯のシフトとともに、可視領域にも強い吸収が現れることから、反応初期における中間体の蓄積は明らかである。種々の特徴から、この中間体は O₂ 結合型 Fe²⁺ヘム (酸素体) と予想され、実際、定法に従って調製した “MhuD 酸素体” と吸収スペクトルがほぼ一致した。さらに共鳴ラマンスペクトルを測定したところ、この中間体は ¹⁸O₂ によって同位体シフトを示す 3 つのシグナルを与えた (表 1)。他のヘムタンパク質との比較から、各シグナルは、FeOO 変角、Fe-O 伸縮、O-O 伸縮の各振動に対応すると予想され、観測された中間体は酸素体と同定された。

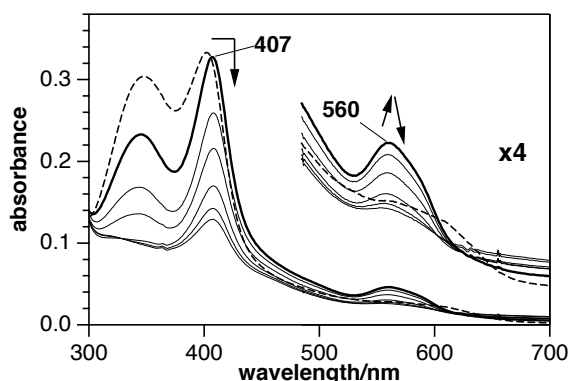


図 2 MhuD によるヘム分解反応における吸収変化

表 1 酸素体の各種振動 (cm⁻¹)

	$\delta(\text{FeOO})$	$\nu(\text{Fe-O})$	$\nu(\text{O-O})$
MhuD	(427)	567	1159
HbA	425	568	1130
rHO-1	414	565	1134
P450 _{cam}	402	540	1139

“MhuD 酸素体”の吸収スペクトルは、通常のヘムタンパク質の酸素体とは大きく異なっており、その要因はヘムの歪みと考えられる。一方、 $\text{Fe}-\text{O}_2$ の振動には歪みの影響はあまり見られなかったため、鉄上に活性酸素種が生成しても、歪みによる反応性への影響は小さいと考えられる。よって、ヘムの歪みによる反応制御に重要なのは、ポルフィリン環の状態変化か、あるいは、配位子とポルフィリン環の近接効果が主と考えられる。

次に、 H_2O_2 を用いたヘム分解反応を試みた。

Fe^{3+} ヘム-MhuD 複合体に H_2O_2 を加えると、Soret 体の吸収が消失し、550 nm 付近の吸収が顕著に増大した（図3）。HPLC 分析により、マイコビリ（図1、 O_2 +還元剤での生成物）が生成していることが示され、その異性体比も還元系の反応の場合とほぼ一致した。これらの結果から、 H_2O_2 を用いた分解と“ O_2 +還元剤”による分解は共通の機構で進行すると考えられる。また、嫌気状態でも H_2O_2 によって大部分のヘムは分解したが、550 nm の吸収増加は見られなかった。よって、マイコビルン生成には O_2 も必須であることが明らかになった。

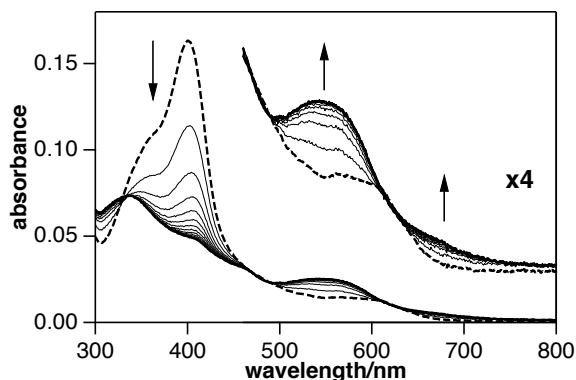


図3 H_2O_2 を用いたヘム-MhuD 複合体の分解反応

以上の結果により、MhuD 反応の初段階のメカニズムが明らかになった（図4）。初めに Fe^{3+} ヘムが還元されて O_2 が結合し、酸素体が生成する。さらなる還元によって H_2O_2 付加体に相当する中間体（おそらく FeOOH 中間体）が生成する。これらはヘム酵素に共通する酸素活性化過程であり、MhuD 特有の反応はまだ起きていない。HO 型ヘム分解酵素では FeOOH 中間体から水酸化ヘムが生成し、 O_2 との反応による CO 放出で分解が進行する。MhuD では CO が生成しないので、1) 水酸化ヘムが特殊な反応性を有するか、2) 水酸化ヘム以外の中間体 X が生成する、と予想される（図4）。現在、化学合成した水酸化ヘムと MhuD の複合体による反応を解析しており、講演ではこれらの結果もあわせて、メカニズムを議論する予定である。

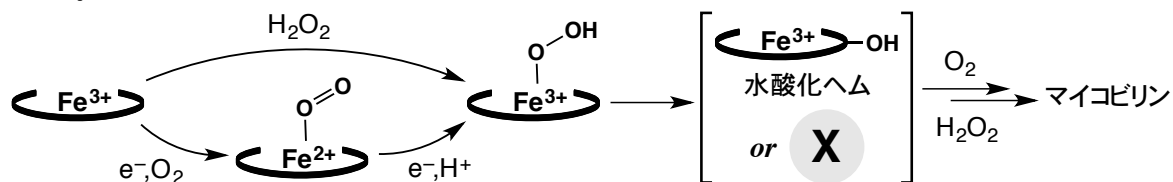


図4 MhuD によるヘム分解反応機構

[引用文献]

1. Nambu, S., et al., *J. Biol. Chem.*, **288**, 10101-10109 (2013)
2. Matsui, T., et al., *Biochemistry*, **52**, 3025-3027 (2013)

緑膿菌由来一酸化窒素還元酵素と亜硝酸還元酵素の複合体形成

○當舎 武彦¹、寺坂 瑛里奈^{1,2}、松本 喜慎^{1,2}、杉本 宏¹、城 宜嗣^{1,2}

¹理研・SPRING-8、²兵庫県大・院生命

ttosha@spring8.or.jp

【序】 嫌気下で生育可能な細菌は、酸素分子以外の化合物を電子受容体とした嫌気呼吸により、生きるために必要なエネルギーを得ている。日和見感染菌として有名な緑膿菌は、人体に感染した際、バイオフィルムを形成し、嫌気条件下にさらされるが、嫌気呼吸の一種である脱窒によりバイオフィルム内でも生育できる。脱窒とは、硝酸(NO_3^-)を、亜硝酸(NO_2^-)→一酸化窒素(NO)→亜酸化窒素(N_2O)という過程を経て窒素分子にまで段階的に還元する一連の化学反応であり、4つのタンパク質によって触媒される(図1)。

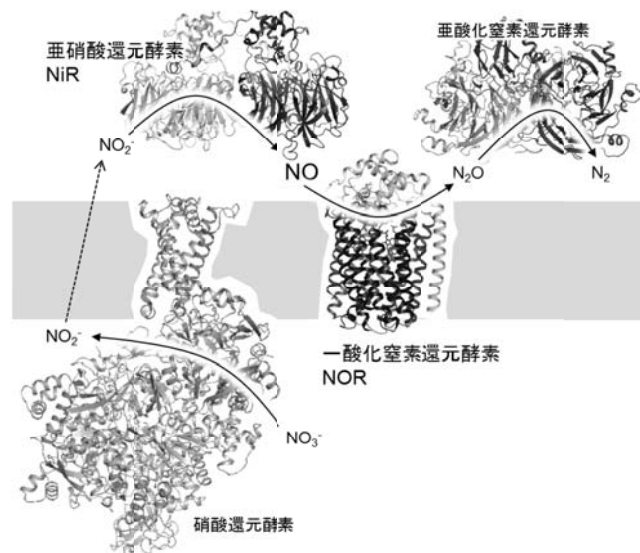


図1. 脱窒酵素群による脱窒。

このように、脱窒では、中間生成物として細胞毒性の高いNOが生成されるが、NOが細胞内に蓄積し、緑膿菌が死滅することはない。実際に、脱窒反応が行われているときの緑膿菌内のNO濃度はごく微量であり、古い研究では、脱窒はNOの生成を経ずに行われるとさえ考えられていた。以上のことから、脱窒には、NOを細胞環境に漏れ出させないために、NOが生成すれば直ちに分解するシステムが存在すると考えられる。そこで、NOを生成する亜硝酸還元酵素(NiR)とNOを分解する膜結合型NO還元酵素(NOR)が複合体を形成し、NiR-NOR間でNOの受け渡しを行い、効率よくNOを分解しているのではないかと仮説をたてた。予備的な実験によりNORに結合するタンパク質を緑膿菌の可溶性画分から分子生物学的に探索した結果、NiRがNORと結合する可能性が示唆された。本研究では、NiR-NOR複合体の構造を決定し、NiR-NOR間の相互作用の詳細を調べることで、脱窒にみられる効率の良いNOの生成・分解機構の解明を目的とする。

【実験】 緑膿菌を硝酸存在下で嫌気培養し、可溶性画分からNiRを、膜画分からNORを精製した。表面プラズモン共鳴(SPR)測定によりNiRとNORの相互作用を調べた。NiRとNORの混合溶液を用い、NiR-NOR複合体の結晶化条件を検討したところ、界面活性剤としてデシルチオマルトシドを用いた条件で、100 μm 程度の単結晶が得られた。SPRING-8にてX線回折実験を行い、分解能3.2 Åのデータを収集した。既知のNiRおよびNORの構造を用いた分子

置換により位相をつけ、NiR-NOR 複合体の構造を決定した($R/R_{\text{free}} = 0.202/0.255$)。

【結果と考察】 NiR-NOR 複合体の結晶構造解析の結果、NiR のシトクロム *c* ドメインと NOR のペリプラズム側の親水性ドメインが相互作用しており、結晶中では、ホモ二量体である NiR のそれぞれのシトクロム *c* ドメインに対し 1 分子の NOR が結合していた。NOR が膜タンパク質であること

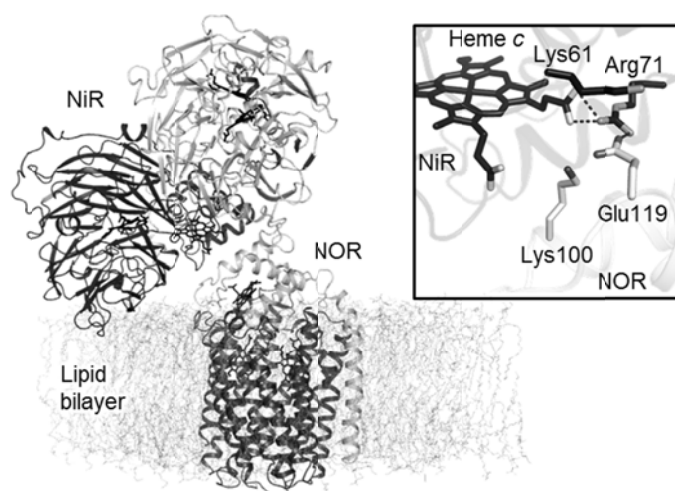


図 2. NiR-NOR 複合体の構造。右図は、相互作用部位。

を考慮すると、細胞内では、2 分子の NOR が NiR に結合するということは考えられず、図 2 に示すような 1:1 の NiR-NOR 複合体が形成されるものと推察できる。

NiR と NOR の相互作用部位には、NiR の Arg71 と NOR の Glu119 による塩橋がみられ、その周辺には、複数の電荷をもつアミノ酸残基が存在していた(図 2)。この静電的相互作用の重要性を検討するために、SPR 測定により相互作用解析を行った。センサーチップに NOR を固定化し、アナライトとして NiR を添加すると、NiR-NOR 複合体形成に由来する SPR シグナルの増加が観測された(図 3)。異なる塩濃度下で測定を行った結果、塩濃度の上昇に伴い NiR を添加した際の SPR シグナルの変化が小さくなり、50 mM の NaCl 存在下では、NiR と NOR の相互作用が検出されなくなった(図 3)。これらの結果は、Arg71-Glu119 間の塩橋を含む静電的相互作用が NiR-NOR 複合体の形成に大きく寄与していることを示している。

脱窒における効率的な NO 生成・分解機構を理解するために、NiR-NOR 複合体の構造をも

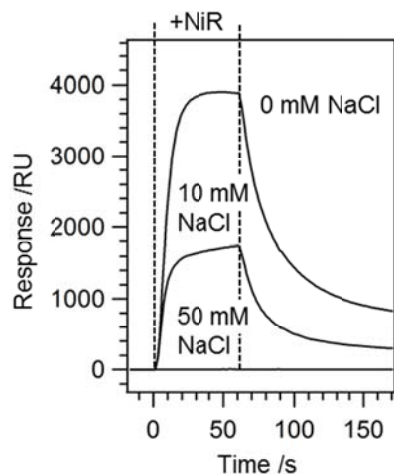


図 3. NOR を固定化し、NiR を添加した際の SPR シグナル。異なる塩濃度下での測定結果を示している。

とに、NO の伝達経路の探索を行ったが、NiR と NOR の活性部位をつなぐ NO 伝達経路は、みられなかった。このことから、NiR と NOR は、相互作用することで、NO 伝達経路を形成するのではなく、複合体形成により、NiR を NOR の近傍に位置させることに意味があると考えた。すなわち、NiR と NOR が複合体を形成すると、脂質膜近傍にて NiR が NO を放出することになり、NO が膜中に位置する NOR の活性部位へと容易に伝達され、速やかに分解されるのではないかと考えることができる。そのため、緑膿菌は、脱窒により NO を積極的に生成するにもかかわらず、そのせいで死滅することはなく、嫌気下での生育を可能にしているものと推察できる。

病原菌ヘムトランスポーターの X 線結晶構造解析

○ 杉本 宏¹、直江 洋一¹、中村 希^{1,2}、土井 章弘¹、城 宜嗣^{1,2}

¹理研・播磨、²兵庫県立大・院生命理

sugimoto@spring8.or.jp

[序]

鉄イオンは私たちヒトだけでなく、微生物にとっても必須の栄養源である。そのため病原性バクテリアは宿主（ヒト）体内に多く存在するヘモグロビンなどのヘムから鉄を奪い取って増殖する。グラム陰性菌の場合、外膜のレセプターによってペリプラズム空間へ移動したヘムは、可溶性のヘム結合タンパク質（periplasmic heme-binding protein: PP）によってヘムを捕獲してから内膜に埋もれている transmembrane subunit (TM) と nucleotide-binding subunit (NBD) からなる輸送装置に受け渡し、ATP の加水分解エネルギーを利用して膜輸送されることが知られている。本研究では、病原菌感染を治療するうえでも鍵となる鉄の取り込みに関するタンパク質の動きを原子レベルで理解することを目的として、日和見感染性のセノセパシア菌由来の膜タンパク質であるヘムトランスポーター複合体の X 線結晶構造解析を行った。その結果から考察されるヘムを輸送するための動的構造や過渡的なヘムの認識の特徴について報告する。

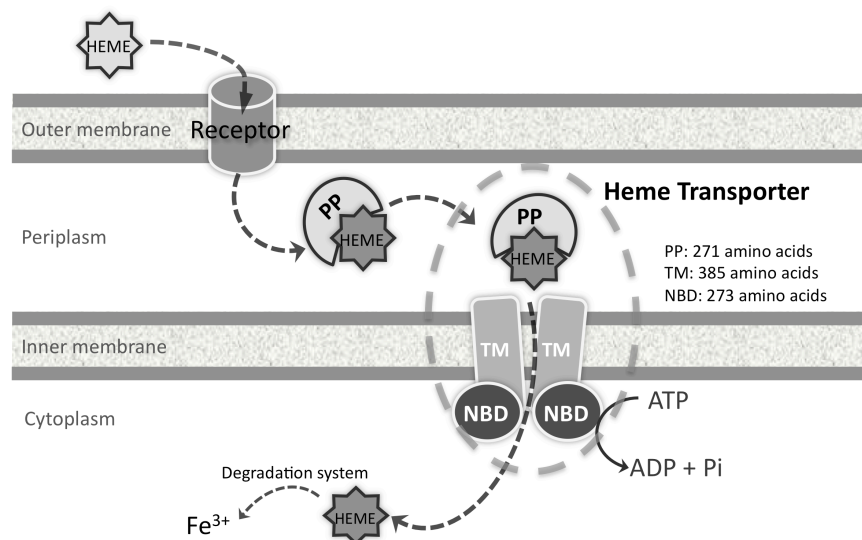


図1 病原性バクテリア（グラム陰性菌）におけるヘム獲得システムの概略 ヘムの細胞内への膜輸送はATPエネルギーを利用するABC型のトランスポーターが担う。

[実験]

大腸菌で発現させたセノセパシア菌由来のヘムトランスポーターのPP、TM、NBDの3種

類のサブユニットの 1:2:2 の複合体（ヘテロ五量体）の結晶化を行った。試料調製では、His タグ付きの TM と NBD の複合体を界面活性剤で可溶化後に Ni-NTA カラムに固定化した後に、別に発現させた過剰量の PP を含む溶液を混合することで複合体を形成させ、緩衝液で洗浄してから Ni-NTA カラムから溶出させた。その後でさらにゲルろ過による精製を行って良質な試料を得た。結晶の X 線回折データの収集は大型放射光施設 SPring-8 BL41XU ビームラインで行った。位相決定は同じ ABC ファミリーに属するビタミン B₁₂ トランスポーターの座標を利用した分子置換法で行った。構造精密化は 40-3.2 Å 分解能の回折データを利用してプログラム PHENIX で行った。構造比較では、ペスト菌由来のヘムトランスポーターの部分構造と比較するために、プログラム LSQMAN を用いてモーフィング解析による視覚化を行った。

[結果と考察]

ATP などのヌクレオチドが結合していない状態でのヘムトランスポーターの立体構造を決定した。輸送基質であるヘム存在化で結晶化を行ったが、結晶は無色であり、ヘムの電子密度も確認できなかった。膜貫通領域の合計 20 本のヘリックスの構造は、輸送のためのチャネルが細胞内側に口を開いた状態 (inward facing) のコンフォメーションを示した。これらのことから、決定した構造は輸送の完了状態の構造であると解釈できる。一方、ABC トランスポーター・ファミリーのなかで同一のタイプに属する大腸菌のビタミン B₁₂ トランスポーターやペスト菌のヘムトランスポーターの部分的な構造が報告されているが、それらはいずれも細胞の外側が開いた状態 (outward facing) である。これらの構造比較をすることで、ヘムの輸送に必要な膜貫通ヘリックスの大規模な再配置によるゲート機構、そして NBD サブユニットと TM サブユニットの間の構造変化の連動性が推測できる。つまり、細胞膜で隔てられた空間を輸送するための「動的構造」の一端が明らかとなった。さらに、PP サブユニット単独での結晶構造解析の結果、ヘムの結合と解離という過渡的な認識における多様な分子認識が明らかとなった。

中性子結晶構造解析で見るフェレドキシン依存性ビリン還元酵素 PcyA 基質複合体の水素化状態

○ 海野昌喜^{1,2}、須藤久美子²、日下勝弘²、玉田太郎³、萩原義徳⁴、杉島正一⁵、和田啓⁶、山田太郎²、石原真樹子²、福山恵一^{7,8}

¹茨大・院理工、²茨大・フロンティア、³原子力機構・量子ビーム、⁴久留米高専・生物応用化学、⁵久留米大・医、⁶宮崎大・TT 推進機構、⁷阪大・院理、⁸阪大・院工

unno19@mx.ibaraki.ac.jp

【序】 開環テトラピロール骨格を持つ phytyobilin は、光合成生物において光合成色素としてのみならず光受容体色素としても用いられる重要な化合物群である。シアノバクテリアの

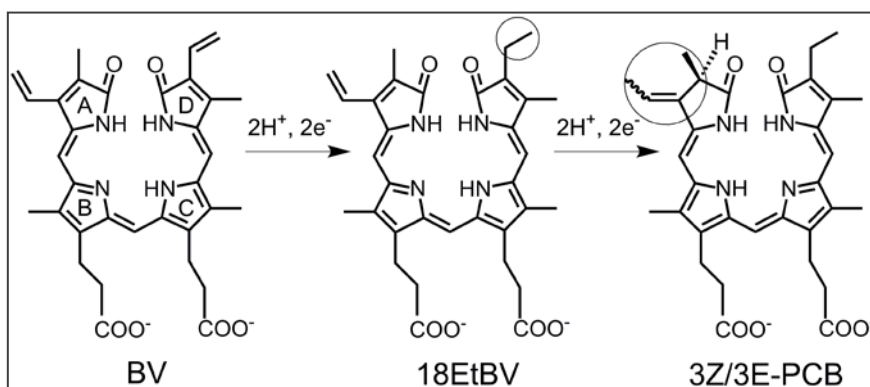


図 1 PcyA による BV 還元反応

phytyobilin の一つ、フィコシアノビルン (PCB) は、

ヘムオキシゲナーゼによるヘムの開環で生じるビリベルジン IX α (BV)がフェレドキシン依存的な酵素 phycocyanobilin:ferredoxin oxidoreductase (PcyA)によって還元され生成する (1)。

PcyA 反応の特徴は、BV の 2 箇所に位置選択的 2 電子供与・2 水素添加し、しかもこの二段階反応が一定の順序で起こる点にある (図 1)。また、補因子を持たず、反応の過程で比較的安定なラジカル中間体が生成することも知られている。このような特徴を有する PcyA の反応機構の解明には多くの研究者の興味が続がれており、PcyA の触媒反応において、各反応段階での「立体的な」水素位置を同定することは極めて重要である。

PcyA の部位特異的変異体の反応解析の結果、この反応には His88/Asp105 のペアが必須であることが明らかになった。また、PcyA-BV の X 線結晶構造解析からは、基質 BV の D 環近傍に存在する Glu76 と Asp105 がビニル基のプロトン化に関与すること、また D 環ビニル基還元後の A 環へのプロトン供給は、近傍に現れる水分子が関与することが示唆されていた。さらに、分光学的な解析結果から PcyA に結合した BV は A 環および D 環のラクタム (-HN-C=O) 構造がラクチム (-N=C-OH) 構造であり、それが反応性とも関与するという示唆や、BV が PcyA に結合するとピロール環がすぐにプロトン化を受け BVH⁺になっているという報告もある。しかし、それらの水素化状態は X 線結晶構造解析では明らかにできなかった。本研究では、PcyA-BV 複合体の中性子結晶構造解析により水素化状態を明らかにすることを目的とした。

【実験】 培養・精製は、既報の方法（2）とほぼ同様に行った。中性子結晶解析に必要な巨大結晶を得るために精製した試料を 120mg/mL と高濃度に濃縮後、BV と 1:1 で混合し、氷上でオーバーナイト静置した。得られた試料を、硫酸アンモニウムを沈殿剤とした条件で、シッティングドロップ蒸気拡散法により、20℃で結晶化した。得られた結晶を重水素化試薬で作成した重水素化結晶化溶液にソーキングし、キャピラリーに封入後、J-PARC の茨城県生命物質構造解析装置（iBIX）において中性子回折強度測定を行った。また、同結晶を短いキャピラリーに詰め直し、Photon Factory の BL5A で X 線回折強度測定を行った。中性子・X 線回折実験は常温で行った。結晶化以降の操作は全て、暗所で行い、最低限の照明には BV に影響を及ぼさない緑色光を用いた。X 線回折強度と中性子回折強度の両方を使って構造精密化を行ったが、若干の構造の違いが見つかった。そのような個所は、中性子散乱長密度の方に構造を合わせ、最終精密化構造を中性子構造とした。

【結果】 我々は、PcyA-BV（基質、図 1 左）複合体の中性子結晶構造解析を行い、世界に先駆けて、水素原子を含む確かな構造情報を 1.95Å 分解能（Bragg 回折角での換算）で得た（図 2）。BV の 4 つのピロール環の窒素原子全ての近傍に残余の中性子散乱長密度が見られ、これも重水素であると判断した。そのうち二つのピロール環（B 環と C 環）に結合した重水素の中性子散乱長密度はやや低く、それぞれの正味の占有率が 0.83 と 0.65 であった

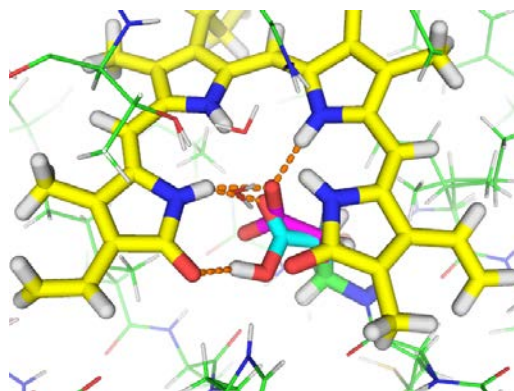


図 2 PcyA 基質結合部位の構造

（他の二つの占有率は両方とも 1）。一方、ラクタム酸素の周辺には残余中性子散乱長密度は見られなかった。この結果は BV がラクチム構造ではなく、ラクタム構造であることを示す。Asp105 は X 線低温構造と同様に二重配座をとっていたが、一方のコンフォメーションには水素（重水素）に相当する中性子散乱長密度が見られ、もう一方には無かった（図 2）。His88 は水素化しており、その水素が A 環のラクタム酸素と水素結合を形成していた。

さらに、同定できていなかった BV 近傍の水分子（H-O-H）の存在と配向が確認できた。その水分子の O が BV の A 環ピロールの水素と水素結合距離にあった。

【考察】 本研究では、BV と周辺のアミノ酸残基の水素化状態とその占有率から、BVH⁺/Asp105 の組み合わせと中性の BV/Asp105 の組み合わせがほぼ半々の割合で存在していることが示された。また、BV/Asp105 の状態の時、近傍の水分子が BV の A 環ピロールの水素原子と水素結合を形成していることが示唆された。これらの構造情報から、PcyA の BV 還元的第一段階の機構を考察する。

【引用文献】 1. Unno, M., et al., *Integrating Photofunction Hybrid Material for Energy and the Environment* (Ed. Akitsu, T.), pp. 47-67

2. Hagiwara, Y. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, (2006), **103**, 27-32

Corynebacterium glutamicum のヘム取込み系における ヘム結合タンパク質 HmuT の構造と機能

○ 村木 則文、青野 重利

自然科学研究機構・分子研・統合バイオ

nmuraki@ims.ac.jp

【序】 病原性細菌には宿主から鉄源としてヘムを取り込むものが知られている。ヘムの取り込みには細菌の膜外に局在する複数のヘム結合タンパク質が働いている。ヘム取込み系におけるヘム結合タンパク質はアミノ酸配列やヘム配位環境が多様性に富んでいる。1999 年、グラム陰性菌 *Yersinia pestis* からヘム取込みに関わるタンパク質マシナリーとして機能する HmuT-HmuUV が見出された [1]。HmuUV は、ヘムを輸送基質とする ABC トランスポーターとして、HmuT はトランスポーターである HmuUV へとヘムを輸送する基質（ヘム）結合タンパク質として機能する。*Yersinia pestis* 由来の HmuT (YpHmuT) については、その結晶構造がヘム結合型と非結合型の 2 状態について報告されている [2]。

外膜およびペリプラズム空間をもたず、厚いペプチドグリカン層を有するグラム陽性菌と、外膜と内膜に挟まれたペリプラズム空間を有するグラム陰性菌では、ヘム取込み系を担うタンパク質群は大きく異なっているが、HmuT-HmuUV はグラム陽性菌 *Corynebacterium diphtheriae* においても見つかっている [3]。しかしながら、YpHmuT と *Corynebacterium* 属由来の HmuT はアミノ酸配列の相同性が低く、アミノ酸配列上は、ヘムの配位子も保存されていない。本研究では、グラム陽性菌のもつ HmuT について YpHmuT との相違点に着目し、その機能を明らかにするために、*Corynebacterium glutamicum* 由来の HmuT の結晶構造解析を行った。

【実験】 *Corynebacterium glutamicum* 由来の HmuT (CgHmuT) のシグナル配列を除き、その C 末端に 6xHistidine tag を付加したコンストラクトを作製し、大腸菌組換え系を用いて大量発現した。大腸菌から単離精製した CgHmuT はヘム結合状態にあり、硫酸アンモニウムを沈殿剤とする条件で赤色の単結晶が得られた。大型放射光施設 SPring-8 のビームライン BL44XU を用いて、回折強度データを収集した。YpHmuT の結晶構造を使って初期モデルを作成し、Phaser-MR を用いた分子置換法により位相決定した。AutoBuild と Coot を用いて立体構造を構築・修正した後、phenix.refine による構造の精密化を行った。

【結果と考察】 CgHmuT の結晶構造 結晶は空間群 $P4_12_12$ に属し、格子定数は $a = b = 73.4$ 、 $c = 146.7$ 、非対称単位中に CgHmuT を 1 分子含んでいた。CgHmuT は N 末端ドメインと C 末端ドメインから構成されており、2 つのドメイン間に形成されたクレフトにヘム 1 分子が結合していた (図 1)。ヘムは N 末端ドメイン中の His141 と C 末端ドメイン中の Tyr240 を軸配位子とする 6 配位構造をとっていた。CgHmuT に結合したヘムは、ヘムの α - γ メソ炭素軸回りに互いに 180 度回転した二種類の配向が混在していた (図 2)。CgHmuT のヘム結合クレフト

には疎水性アミノ酸側鎖が存在しているが、いずれの結合様式においても、ヘムの側鎖と相互作用している残基は存在しない。また、ヘムプロピオン酸基と相互作用している残基も存在しなかった。これらの結果より、ヘム軸配位子として機能する His141 と Tyr240 が、CgHmuT によるヘム分子の認識・捕捉に中心的な役割を果たしていると考えられる。

CgHmuT と YpHmuT の構造比較

アミノ酸配列を比較すると、CgHmuT は YpHmuT に比較して N 末端が 50 アミノ酸程度長い。CgHmuT の N 末部分は、N 末端ドメインから C 末端ドメインへタンパク質全体を巻くように伸びていた。この点を除けば、両者の間に全体構造の大きな違いは見られなかった。しかしながら、ヘム結合部位には顕著な違いが見られた。YpHmuT がタンパク質 1 分子中に 2 分子のヘムを結合するのに対し、CgHmuT は 1 分子のみ結合している。ヘム結合型 YpHmuT の調製は、アポ型 YpHmuT に *in vitro* でヘムを再構成し

ているのに対し、本研究では大腸菌中でヘム結合型として発現している CgHmuT を用いている。両者のヘム結合数の差は試料調製法の違いに起因している可能性も考えられる。

YpHmuT では、クレフト中に 2 分子のヘムがスタックした状態で取込まれており、一方のヘムには Tyr70 が、もう一方のヘムには His167 が軸配位している。これに対して、CgHmuT は 1 分子のヘムを取込み、His140 と Tyr240 がヘムに軸配位している。アミノ酸配列のアライメント上では、ヘムの軸配位子は保存されていないが、ヘムに配位するアミノ酸残基の種類としては保存されていた。CgHmuT 中でヘム軸配位子として機能している Tyr240 は、近傍に存在する Arg242 と水素結合を形成していると考えられる。YpHmuT 中の Tyr70 と Arg72 との間にも、同様な水素結合が存在している。この水素結合が、HmuT のヘム結合親和性を制御している可能性が考えられるが、その詳細については現在検討中である。

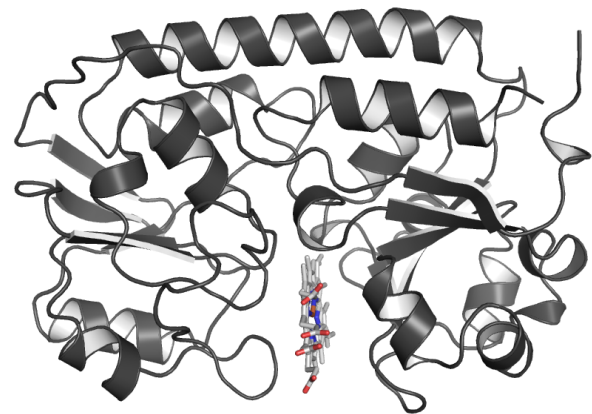


図 1. CgHmuT の全体構造
タンパク質主鎖をリボンモデルで、ヘムをスティックモデルで示す。

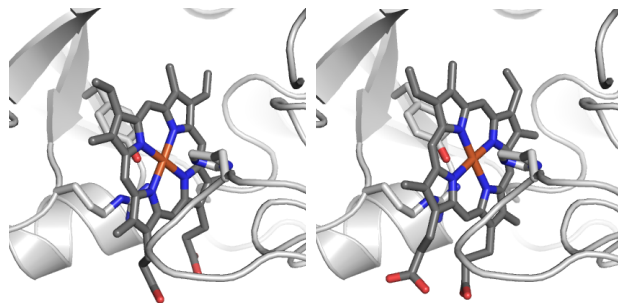


図 2. CgHmuT のヘム結合部位
結晶中で見られた CgHmuT に結合したヘムの二種類の配向を示す（左，右）

- [引用文献]** 1. Thompson, JM., et al., *Infect. Immun.*, **67**, 3879-92 (1999)
2. Mattle, D., et al., *J. Mol. Biol.*, **404**, 220-231 (2010)
3. Drazek, ES., et al., *Mol. Microbiol.*, **36**, 68-84 (2000)

光駆動型プロトンポンプから光ゲート型チャネルへの機能転換

○井上 圭一^{1, 2}、下野 和実³、鈴木 悠斗¹、谷ヶ崎 仁⁴、
宮内 正二³、林 重彦⁵、神取 秀樹¹、須藤 雄気^{6, 7, 8}

¹名工大・院工、²JST・さがけ、³東邦大・院薬、⁴名大・院理、
⁵京大・院理、⁶岡山大・院薬、⁷JST・CREST、⁸分子研
inoue.keiichi@nitech.ac.jp

【序】 微生物型ロドプシンは細菌などの微生物が持つ光受容型膜タンパク質であり、7回膜貫通型構造と共通の発色団である *all-trans* レチナールを持つ。そして微生物型ロドプシンは、光のエネルギーを使ったイオン輸送や細胞の走光性のための光センサーなど様々な機能を持つ。特にイオンを輸送するロドプシンには濃度勾配に逆らって能動輸送を行う光駆動ポンプと、濃度差や膜電位に応じて双方向にイオンを受動的に輸送する光ゲート型チャネルとして働くロドプシンが知られている。また近年では動物の神経細胞にこれらの微生物型ロドプシンを発現させ、神経の活動を光で制御するオプトジェネティクスと呼ばれる技術が神経生理学分野で大きな注目を浴びている。中でもカチオンチャネルであるチャネルロドプシン 2 を神経細胞に発現させ、光を照射すると、細胞の脱分極が起こり、光で神経細胞を興奮することができる。一方で光駆動型外向き H^+ ポンプや内向き Cl^- ポンプロドプシンは、イオンの輸送により細胞の脱分極を抑えるため、光による神経活動の抑制に用いられている。

このように微生物型ロドプシンは新たな光制御ツールとしても注目が高まっているが、そのメカニズムについては今なお不明な点が多い。例えばチャネル型のロドプシンと微生物型のロドプシンは、全体の構造は非常によく似ており、アミノ酸側鎖の違いだけで全く異なる機能の発現を可能にしていると考えられる。そこで今回すでに報告のあるチャネル型ロドプシン (C1C2) と、典型的な H^+ ポンプである bacteriorhodopsin (BR) の結晶構造を重ね合わせたところ、2つのロドプシン間でレチナールの β -イオノン環の位置に違いが見られ (図 1)、C1C2 の β -イオノン環は BR のものより細胞質側に位置していることがわかった。レチナール周辺の領域はロドプシンのイオンの輸送能を決める、非常に重要な役割を持つため、我々はこの構造の差異が機能の違いを生んでいると考えた。そこで今回 H^+ ポンプ型ロドプシンである AR3 をもとに、 β -イオノン環の細胞外側と細胞質側に、それぞれ野生型よりも大きい残基と小さい残基を導入した AR3 M128A/G132V 変異体を作製し、その機能について研究を行った。

【実験】 AR3 の野生型および変異体は全て大腸菌を用いて発現した。精製のため C 末に His タグを導入し、必要に応じて Ni-NTA カラムで精製した。AR3 の野生型および変異体のプロトン輸送活性は pH メーターを用いて、光照射に伴う pH の変化をみることで評価した。

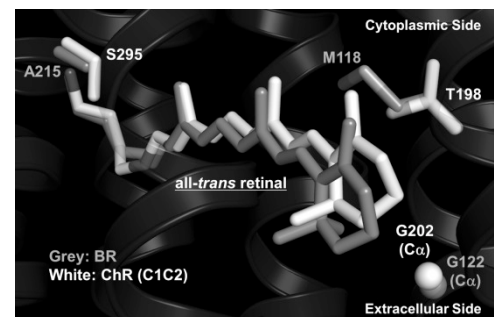


図 1 C1C2 と BR の
レチナール周辺の構造

【結果】 AR3 野生型および β -イオン環周辺に変異を導入した M128A/G132V の吸収スペクトルを図 2 に示す。驚くことにわずか二残基の違いにより野生型よりも 81 nm 短波長側に吸収が観測された。一方でチャネルロドプシンは 450 nm 付近に吸収を持つことから、今回の結果は β -イオン環付近の構造をチャネルロドプシン型に変化させることで、吸収波長もそれに近いものになることが分かる。さらに β -イオン環と反対側に位置するレチナールのシッフ塩基付近の Ala を Thr に変化させたところ、より大きな短波長シフトが生じ、チャネルロドプシンとほぼ同一の 455 nm に吸収を示した (M128A/G132V/A225T, 図 2)。チャネルロドプシンも同じ位置に、Thr と性質のよく似た Ser を有しており、これら三残基を変異させることで、比較的長波長に吸収を持つ H^+ ポンプロドプシンからチャネルロドプシン型の短波長シフトした吸収波長を達成できることが分かった。

次にこれらの変異体に対して pH メーターを用いたイオン輸送活性を行い、その結果を野生型 AR3 と比較した (図 3)。野生型 AR3 の場合、細胞外側へとプロトンが輸送されるため、光照射に伴い pH が低下する。一方で2種類の変異体は両方とも光照射に伴って大きな pH の上昇が見られた。このような性質を示すものとして、内向き H^+ ポンプと H^+ チャネルの2つの可能性が考えられる。そして前者の場合は能動輸送のため常に H^+ は細胞内へ輸送され続けるのに対し、後者の場合は膜電位によって輸送方向が変化する。そこでアフリカツメガエルの卵母細胞に今回の変異体を発現させ、膜電位を変化させたところ、0 mV を境として光電流の反転が起こった。このことは今回の変異体による H^+ の輸送は受動的なものであり、 β -イオン環周辺の残基を変異させることで H^+ ポンプからチャネルへ、機能の制御が成されることが示された。

【考察】 今回我々は初めて、ポンプ型ロドプシンからチャネル型ロドプシンへの機能転換に成功し、それにはレチナール周辺の残基が重要であることを示した。一方で β -イオン環周辺は疎水的で、イオンの輸送が行われるのはシッフ塩基側であることを考えると、 β -イオン環側の変異で機能転換が起こるのは非常に興味深い。これに対して我々は β -イオン環を変異させると、シッフ塩基側の親水性が上がることを見いだしており、遠隔的な影響があることを示唆している。講演ではそれらを含めて機能転換のメカニズムについて議論する。

【引用文献】 1. Sudo, Y., et al., *J. Biol. Chem.*, **288**, 20624-20632 (2013)

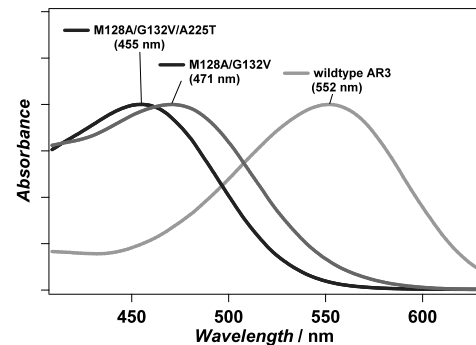


図 2 野生型 AR3 およびその変異体の吸収スペクトル

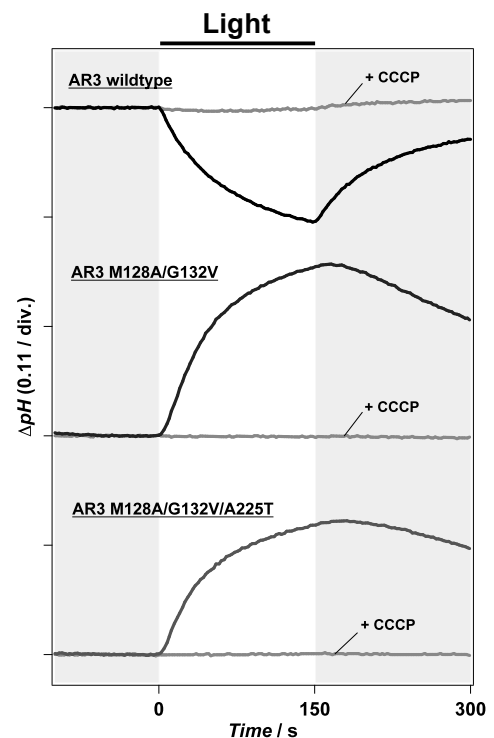


図 3 野生型 AR3 およびその変異体のイオン輸送活性

分子動力学シミュレーションによる真核生物 RNA ポリメラーゼ II の C 末端領域の構造特性の研究

○ 米澤 康滋¹

¹近大・先端研・高压蛋白センター

yonezawa2ipr@gmail.com

[序]

真核生物の RNA ポリメラーゼ II (Pol II) は大変複雑な構造と機能を持つ超複合体生体高分子マシンで転写全般に深く関わる。Pol II を構成する最大サブユニットの Rpb1 の C 末端領域 (CTD) は保存された 7 残基の繰り返し配列 (YSPTSPS) を持ち、その繰り返し回数は種に依存する。(酵母で 26 回、ヒトでは 52 回) CTD はこれまでの X 線結晶構造や NMR 分光実験によれば定まった立体構造を取らないことが報告されている。CTD は、その繰り返し配列中に含まれるセリン残基がリン酸化・脱リン酸化されることによって様々な転写因子酵素をリクルートし、転写開始、伸長、終結に深く関わる。CTD は真核生物の転写過程に於いて欠くべからざる重要な領域の一つであるが、その構造の不定性ゆえに CTD の転写因子リクルートの詳細なメカニズムは殆ど知られていない。

最近の計算機科学の進展とシミュレーション理論・技術の進歩によって分子シミュレーションは実験では観察する事が困難な原子電子レベルの生体高分子の動態を精密に観測できる能力を著しく高め、現在では実験を補完する重要な手段のひとつと見なされている。生体高分子のエネルギー地形は大変起伏に富んでいるためにボルツマン重みを使用する通常の分子シミュレーションは大きな自由エネルギー障壁に囲まれた局所的な安定状態にトラップされて大域的な構造サンプリングが極めて困難である。

マルチカノニカル法 (McMD) は系の温度を反応座標としてエントロピー補正を施す事で生体高分子の起伏に富むエネルギー地形を容易に探索することができる分子シミュレーション手法である。我々は McMD 法を様々なパターンにリン酸化された CTD の系に応用してその構造空間を分子シミュレーションで探索しその特性を研究した。本発表ではマルチカノニカル分子動力学シミュレーションを用いて CTD の構造空間を探索した結果に基づき、その機能との関わりについて報告する。

[計算方法]

計算シミュレーションには CTD の繰り返し基本配列を用い、その N 末端と C 末端にはメチルキャップを付けて静電相互作用による両末端間の引き合いを抑制した。CTD を構成するアミノ酸残基には Amber 力場を用い、CTD を取り囲む溶媒水分子には TIP3P モデルを用いた。中心に CTD ペプチドを設置して周りに TIP3P モデル水を置き一边が 40 Å に長さを持つ立方体の形を持つ系を構築した。真空中に系が露出することによる大きな表面熱力学的効果を取り除くためにこの系に周期的境界条件を課している。長距離静電相互作用は Particle Mesh Ewald 法を用いて、実空間の切断距離を 10 Å に設定した。また逆空間の Grid 長を 1 Å として

分子動力学シミュレーションを実施するために十分な精度を確保した。Vdw 相互作用の切断距離は 10 Å とした。初期平衡状態を得るために系を 3K から 310K まで徐々に温度を上げ、さらに 1ns の間平衡化した。時間刻み幅は 2fs として時間積分方式は Velocity Verlet 法を用いた。水素原子が関わる化学結合は SHAKE 法を用いて拘束を掛けた。使用する CTD は含まれるセリン残基が全くリン酸化されていない系と、2 番目または 5 番目のセリン残基がリン酸化された系、さらに 2 番目と 5 番目のセリン残基が両方ともリン酸化された系を構築してそれぞれについて同様なシミュレーションを実施した。

【結果】

様々なパターンにリン酸化された CTD の N 末端と C 末端間の平衡距離分布を比較したところ全くリン酸化されていない CTD は大きく伸びた状態からコンパクトな状態まで幅広い分布を示すのに対してリン酸化された CTD は大きく伸びた状態が強く抑制されることが解った。また CTD を構成するアミノ酸残基の 2 次構造分布解析からリン酸化は構造部分布を大きく変化させることが示された。特に 4 番目のプロリン残基の 2 次構造分布はリン酸化によってベータ構造成分が抑制されアルファヘリックスを形成する領域に局在化されることが示された。さらにリン酸化されたセリン残基のリン酸基とプロリン残基の次の残基間に準安定的な水素結合が作られてプロリン残基を中心とする特徴的なベータターン構造分布が著しく増大することを見出すことができた。さらにプロリン残基のシストランス異性化が CTD 構造に及ぼす効果を検証するために、6 番目のプロリン残基をシス状態にして行ったシミュレーション結果から、特徴的なベータターンを形成する水素結合分布が構造的に抑制されてベータターンが殆ど形成されないことが明らかになった。

【考察】

McMD 分子動力学シミュレーションによって見出された CTD の構造空間の特徴から、(1)リン酸化は CTD の構造をコンパクトな分布に誘導する。(2)そのコンパクトな構造の起源は、リン酸化による 2 次構造分布の変化とプロリンを中心とする特徴的なベータターン構造分布の誘導変化によるものである事、が明らかと成った。そして、(3)プロリンの異性化はこのベータターン構造形成のスイッチングを行っている可能性がある事等を明らかにすることができた。

我々はこれらの結果から CTD はリン酸化によってその構造分布空間が変化し（ポピュレーションシフト）、転写過程の各段階で結合能をダイナミックに調整して様々な転写因子を適切にリクルートしていると考えている。

【引用文献】 1. Yonezawa Y., *J. Phys. Chem.*, B118 , 4471-4478 (2014)

Sp1 亜鉛フィンガーの各フィンガードメインにおけるレドックス応答の非対称性

○根木 滋、福田あずさ、鎌手裕実香、杉浦 幸雄

同志社女子薬

snegi@dwc.doshisha.ac.jp

【序】

最近、転写因子の新たな機能としてレドックス応答性が言われており、細胞内部の酸化還元状態に転写因子の構造や機能が大きく影響を受けることが指摘されている¹⁾。特に、転写因子中の DNA 結合部位である亜鉛フィンガータンパク質(ZFP)がレドックス反応に重要な役割を果たしていると考えられている。Zn(II)は d^{10} 電子構造を有するため Zn(II)自体はレドックス不活性であるが、配列中に含まれる Zn(II)の配位に参与している Cys 残基の SH 基がレドックス反応に大きく関与していることが明らかとなってきた²⁻⁴⁾。つまり、細胞内において ZFP が転写やシグナル伝達に関する「レドックス・スイッチ」のような役割を果たしている可能性が示唆されている。

このような背景を受けて、これまでに当研究室において ZFP の酸化還元挙動に関する検討を行ってきた。今回は、ZFP の一つであるヒト転写因子由来 Sp1 ZFP を用い⁵⁾、その酸化反応性について詳細に検討を行った。Sp1 ZFP は 3 つの C_2H_2 型フィンガー(Sp1-F1, F2 および F3)から構成されている(Fig. 1)。Sp1 は 2 つの Cys と His が Zn(II)に配位することから Cys_2His_2 型のフィンガーと分類されており、Zn(II)が正四面体配位することで、 $\beta\beta\alpha$ の二次構造を誘起する。Sp1 ZFP の各フィンガーの構造、酸化還元反応性や Zn(II)に対する配位結合の安定性について評価し、Sp1 ZFP のレドックス応答の一義的な解明を目指す。

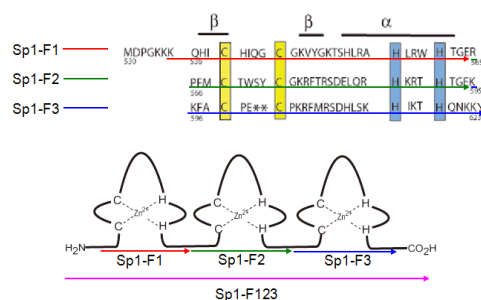


Figure 1. Primary sequence of Sp1 and tandem structure. The zinc coordinati

【結果および考察】

はじめに、還元型および酸化型の各フィンガードメインの CD スペクトルを測定した。その結果、アポ体では 200 nm 付近に極小値を示し、溶液中でランダム構造をとっていた。次に 1.2 当量の Zn(II)を還元型に添加したところ、いずれの場合も 208 nm および 222 nm 付近に負の吸収がみられたことから、ZFP に典型的な $\beta\beta\alpha$ 構造が誘起されたと考えられる。一方、酸化型の各フィンガーでは、いずれのアポ体も 200 nm 付近に極小値を示すことから、還元体と同様にランダム構造をとっていると考えられる。次に 1.2 当量の Zn(II)を酸化型に添加したところ、Sp1-F3 ではほとんど CD スペクトルに変化がなかった。一方、Sp1-F1 および F2 の酸化体においては CD スペクトルに変化が認められた。特に Sp1-F1 では大きな CD スペクトルの変化がみられたが、還元型の場合のような $\beta\beta\alpha$ 構造のようなはっきりとした二次構造誘起とは異なる CD スペクトルを与えた。酸化型のフィンガードメインは、2 つの Cys

残基の SH 基が分子内で S-S 結合を形成しているため Zn(II)と配位できず、安定な二次構造が形成できないと考えられる。しかし、酸化型となっても His 残基などと非特異的に相互作用が可能であり、特に Sp1-F1 では最も強く相互作用することが分かった。

次に、各フィンガードメインに対して Diazenedicarboxylic acid bis (*N,N*-dimethylamide)を酸化剤として酸化反応を行った(Fig. 2)。その結果、反応性は

Apo>>Sp1-F1>>Sp1-F2>Sp1-F3 であることが分かった。この反応性の違いは、UV 滴定や温度可変 ^1H NMR 測定の結果から、Zn(II)との配位結合の安定性やフィンガードメインの熱安定性の違いによるものと考えられた。また、Sp1-F123 の酸化反応挙動および酸化反応の DNA 結合への影響の検討により、酸化剤の濃度の上昇により DNA 結合能が低下すること(Fig. 3)、さらに HPLC 分析より酸化剤の濃度に応じてモノ、ジ、トリ酸化体がそれぞれ生成することが分かった。

本研究では、Sp1 の 3 つのフィンガーそれぞれの酸化反応性、さらに連結された 3 フィンガーの酸化反応の結果を組み合わせることによりタンデム型 ZFP の酸化反応メカニズムについて詳細に検討を行った。Sp1-F123 では、各ドメインの Zn(II)配位部位は同じ Cys₂His₂型であるにも関わらず、それらの酸化反応性は等価でなく、F1 部分が他のドメインよりも選択的に酸化されやすいことが分かった。このことから Sp1-F123 の場合、F1 部分が所謂“レッドクスセンサー”として機能していることが考えられ、タンデム構造を有する亜鉛フィンガーの酸化反応における非対称的な性質を初めて示せた。そして、この非対称性は配位結合やドメイン構造の安定性をファインチューニングすることによってもたらされていると考えられる。

[引用文献]

1. G. Leonarduzzi et al., (2011) *Curr. Pharm. Des.* **17**, 3994-4006.
2. E. Boulès et al., (2011) *Chemistry* **17**, 13762-13772.
3. DP Jones and YM Go, (2011) *Curr. Opin. Chem. Biol.* **15**, 103-112.
4. KD Kröncke and LO Klotz, (2009) *Antioxid Redox Signal* **11**, 1015-1027.
5. S. Negi et al. (2008) *Chem. Eur. J.* **14**, 3236-3249.

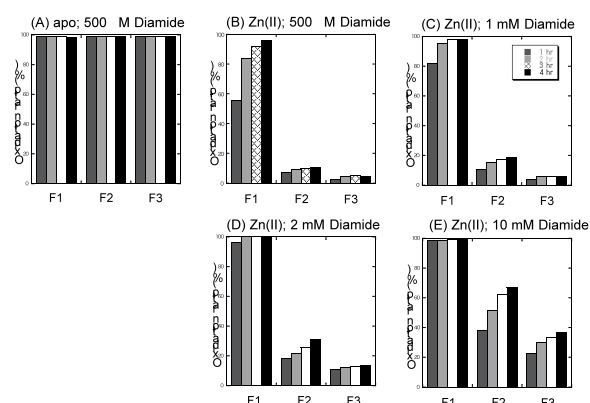


Figure 2. Oxidation ratio of 20 μM Sp1-F1, F2 and F3 peptides with time-elapse in the (A) absence or presence of 2.0 e.q. Zn(II) in (B) 500 μM , (C) 1 mM, (D) 2 mM and (E) 10 mM Diamide, 10 mM Tris-HCl buffer, 50 mM NaCl and 100 μM TCEP at 20 $^{\circ}\text{C}$.

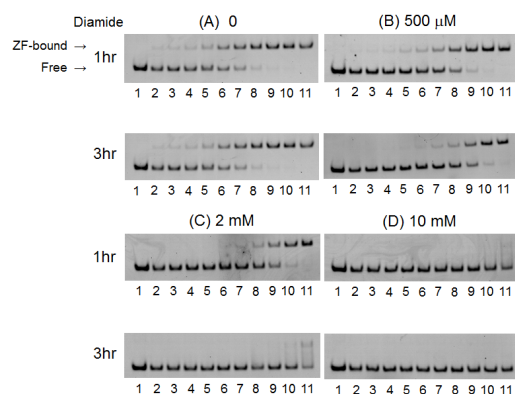


Figure 3. Electrophoretic mobility shift assay of Sp1-F123 incubated with a labeled DNA. Sp1-DNA complexes were resolved by electrophoresis on 8 % poly-acrylamide gels. Binding reactions contained no protein (lane 1), 2 nM protein (lane 2), 4 nM (lane 3), 8 nM (lane 4), 16 nM (lane 5), 31 nM (lane 6), 62 nM (lane 7), 125 nM (lane 8), 250 nM (lane 9), 500 nM (lane 10) and 1000 nM (lane 11).

超分子ヘムタンパク質モデル化合物による生体内COの除去

○ 北岸 宏亮¹、根木 滋²、勇村 亜希¹、杉浦 幸雄²、加納 航治¹

¹同志社大理工、²同志社女子薬

hkitagis@mail.doshisha.ac.jp

【序】 生体内における内因性一酸化炭素(CO)は、ヘムオキシゲナーゼ(HO)によってヘムが代謝分解される際に副生成物として発生し、シグナル伝達物質として機能することが知られている。近年、CO が抗炎症作用などの細胞保護に関わっていることが報告されているが、その詳細な機構は未だ明らかではない。

我々はこれまでに水中で機能するヘムタンパク質モデル(hemoCD, Figure 1)を開発し、水中・室温において酸素(O₂)およびCO と可逆的に結合することを見出している。以前、動物の静脈中に hemoCD を投与する実験を行ったところ、hemoCD が血中に存在する微量の内因性CO を捕捉し、その後 CO 錯体のままで尿中へと排出されることを報告した¹。hemoCD の CO 親和性はヘモグロビン(Hb)よりも約 1000 倍高く、そのため血中に存在する CO を定量的に捕捉することが可能であった。本研究では我々が開発した hemoCD の高い CO 結合機能を利用することにより、体内から CO を除去した検体を簡便に作製し、その検体の挙動を探ることによって hemoCD が CO の生理機能解明のためのツールとして利用できるかどうかを検討した。

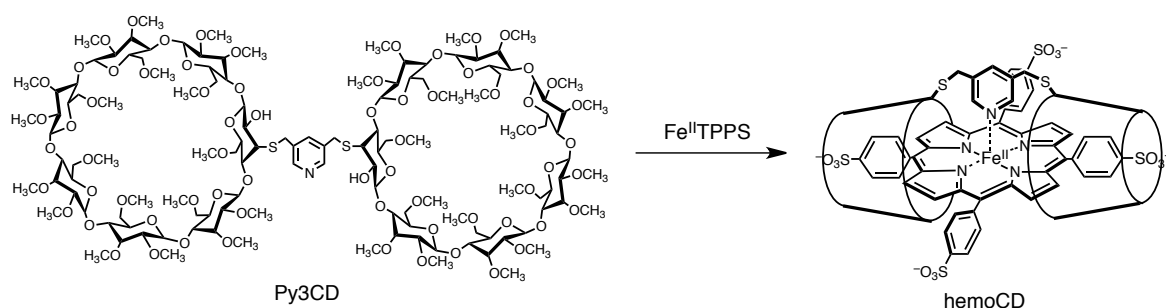


Figure 1. Structure of a supramolecular hemoprotein model complex, hemoCD.

【結果および考察】 hemoCD の酸素付加体(oxy-hemoCD)の PBS 溶液(0.5 mM, 0.15 mL)をマウス(C57BL/6N)腹腔内に投与すると、数分後に hemoCD を含む尿の排出が見られた。その尿を吸収スペクトルにより分析すると、CO 付加体(CO-hemoCD)が尿中に含まれていることが分かった。さらに同量の oxy-hemoCD 溶液を 30 分おきに計 4 回投与し、その直後における肝臓内の HO-1 の発現量を Real-Time PCR により定量した結果、通常時と比べて HO-1 の著しい発現誘導が観測された。すなわち一時的に CO が除去されたマウス体内において HO の発現が誘導され、CO の供給を促進しようとする作用が存在することを示唆する結果となった。

次に培養細胞を用いて hemoCD の添加効果を検討した。ヒト肝臓癌細胞(HepG2)に oxy-hemoCD を添加して 2 時間培養後、細胞内における HO-1 の発現量を逆転写 PCR により

定量した結果、マウスのときに見られたような hemoCD の添加による HO-1 の発現誘導は見られなかった。

培養細胞の系において hemoCD が CO のシグナル伝達系に影響を及ぼすかどうかについて検討するために、マウスマクロファージ(RAW264)細胞における炎症系サイトカインの発現量を測定した。RAW264 細胞における炎症系サイトカインの産生はリポ多糖(lipopolysaccharide; LPS)による外部刺激によって誘導されるが、これらの発現は CO により著しく抑制されることが報告されている²。実際に CO 存在下において LPS 刺激を与えた RAW264 細胞では炎症系サイトカインである TNF- α の発現があまり誘導されないのに対し、同様の細胞において oxy-hemoCD を培養液に添加しておくとも TNF- α が強く誘導された。したがって oxy-hemoCD の添加は培養細胞における CO のシグナル伝達系に影響を及ぼすことが分かった。

以上の結果から、マウス体内の CO 除去時における HO-1 の発現誘導について以下のような考察を行った。血中では Hb は主に赤血球内に存在しており、O₂ 運搬を行っている。赤血球の寿命により膜外に放出された cell-free Hb は、血中の活性酸素種(reactive oxygen species, ROS)により容易に酸化されて met-Hb となり、met-Hb は自身の補酵素であるヘムを保持する能力が低く、血中に鉄三価のフリーヘム(=ヘミン)を放出する。HO-1 の基質であるフリーヘムは、転写因子 Bach-1 への結合を介して HO-1 の発現を誘導する。HO-1 によるヘム代謝によって新たに CO が産生され、血中に放たれた内因性 CO は酸化される前の cell-free Hb に強く配位し、ROS による met-Hb 化を抑制する。したがって内因性 CO は cell-free Hb への配位を介して、血中におけるフリーヘムの濃度を調節する役割があるのではないかと考えられる。CO 除去剤である hemoCD をマウスに投与すると、hemoCD が血中の CO を奪うことによって cell-free Hb の酸化抑制が効かなくなり、血中でのフリーヘムの濃度が一時的に上昇するのではないかと考えている(Figure 2)。実際、フリーヘムにより発現量が増加する因子(ICAM-1、VCAM-1 および ALAS-1)は、hemoCD の投与によっても同様の増加傾向を示すことが DNA マイクロアレイによって確かめられた。

上記の仮説は、フリーヘムの血中濃度が上昇する疾患であるマラリアの症状が、適度な CO の吸入によって一時的に改善されるという報告³があることから妥当であると考えている。

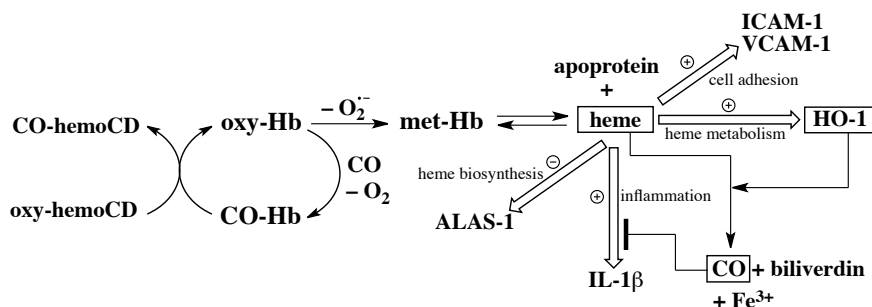


Figure 2. Proposed mechanism for the genetic response upon removal of endogenous CO by hemoCD.

【引用文献】 1. H. Kitagishi, K. Kano, et al. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, 49, 1312-1315.

2. R. Motterlini et al., *Br. J. Pharmacol.* **2005**, 145, 800-810.

3. Soares, M. P. et al., *Nat. Med.* **2007**, 13, 703-710; *J. Mol. Med.* **2008**, 86, 1097-1111.

鉄イオウクラスターを持つ転写因子 SoxR のスーパーオキシドとの反応性を支配する因子

○ 藤川 麻由、小林 一雄、古澤 孝弘

阪大産研

fujikawa55@sanken.osaka-u.ac.jp

[序] バクテリア内には、環境に応答して活性を持つ転写因子群 MerR Family が存在する。その中で SoxR は、センサー部位に [2Fe-2S] クラスターを持ち、その可逆的な酸化還元によって転写制御される (図 1)。SoxR は種々のグラム陰性菌に存在するが、その生理的役割は菌種によって大きく異なる。例えば *E. coli* 内では、酸化ストレスに応答して転写活性を持ち、スーパーオキシドディスムターゼ (SOD) を含む酸化ストレス防御タンパクの発現を制御している¹⁾。それに対して *P. aeruginosa* においてはピオシアニンに応答し、抗生物質輸送タンパクやモノオキシゲナーゼの発現に関わると報告されている³⁾。それぞれはアミノ配列が 62% identity とよく保存されているが、生体内での役割はこのように大きく異なる。今回我々は、*E. coli* SoxR あるいは *P. aeruginosa* SoxR との生理的役割の違いによって O_2^- との反応性に違いが見られるかをパルスラジオリシス法により検討した。また、その反応性の違いを決める因子について、変異体を用いた実験を行った。

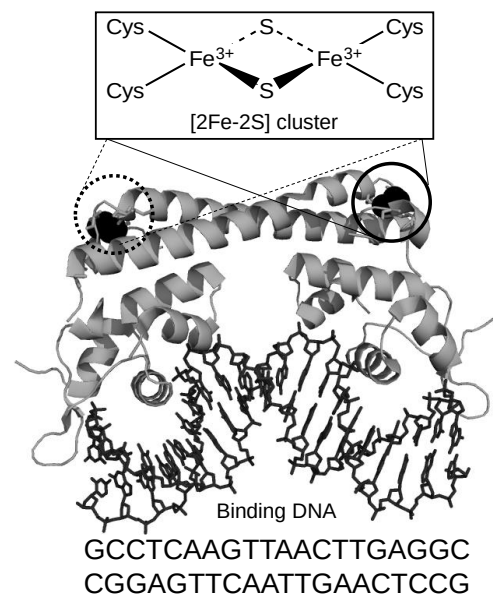


Figure 1. Stereoview of the overall structure of the SoxR-DNA complex.²⁾

[実験] SoxR の発現と精製

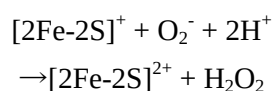
E. coli, *P.aeruginosa* SoxR は発現プラスミドを、鉄イオウクラスター合成オペロンを含むプラスミドと共に *E. coli* C41 (DE3) 中で大量発現を行い、P-セルロースカラムとゲルろ過カラムにより精製した。

パルスラジオリシス法

0.5 M KCl, 10 mM 酒石酸ナトリウム, OH ラジカルスカベンジャーとしてギ酸ナトリウム 0.1 M を含むリン酸緩衝液 (10 mM, pH7.0) を用いた。酸素飽和の緩衝液に SoxR (70 μ M) を加え、サンプルを調製した。電子線照射は阪大産研 L-band ライナックで行った。

[結果と考察] *E.coli* SoxR を含むサンプルへパルス照射すると、420 nm において、吸収がナノ秒領域で減少し、その後ミリ秒領域で再び増加した (図 2 (A))。この吸収変化は SoxR

の酸化型と還元型の差スペクトルとほぼ一致しているので (図 2 (B)), SoxR は水和電子により還元されその後再酸化することがわかった。この系にヒト SOD を 11 μM 加えると還元過程には変化がないが、再酸化の過程が消失したことから (図 2 (A))再酸化は O_2^- によって起こっていることがわかった。すなわち O_2^- が以下の式のように SoxR の鉄イオウクラスターを直接酸化することで、SoxR が転写活性を持つことを確かめた⁴⁾。



また O_2^- との反応速度を *E.coli* SoxR と *P. aeruginosa* SoxR で比較したところ、*E.coli* SoxR が $5 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、*P. aeruginosa* SoxR が $3.5 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ と大きく異なる結果となった (図 3)。この違いを検討するため、*P. aeruginosa* と *E. coli* とで異なるアミノ酸をそれぞれに対応するアミノ酸に置換した変異体を作製し、 O_2^- との反応速度を検討した。*E. coli* SoxR における鉄イオウクラスター周辺の変異体 K89A、K92A、D129A を作成し実験を行った結果、K89A、D129A では差が見られなかったのに対して、K92A において、 O_2^- との反応速度が $2.7 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ と速度が小さくなっていることが分かった。

[引用文献]

1. Hidalgo, E. et al., *Cell*, **88**, 121, (1997)
2. Watanabe, S. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **105**, 4121, (2008)
3. Dietrich I. E. P. et al., *Science*, **321**, 1203, (2008)
4. Fujikawa, M. et al. *J. Biol. Chem.*, **287**, 35702, (2012)

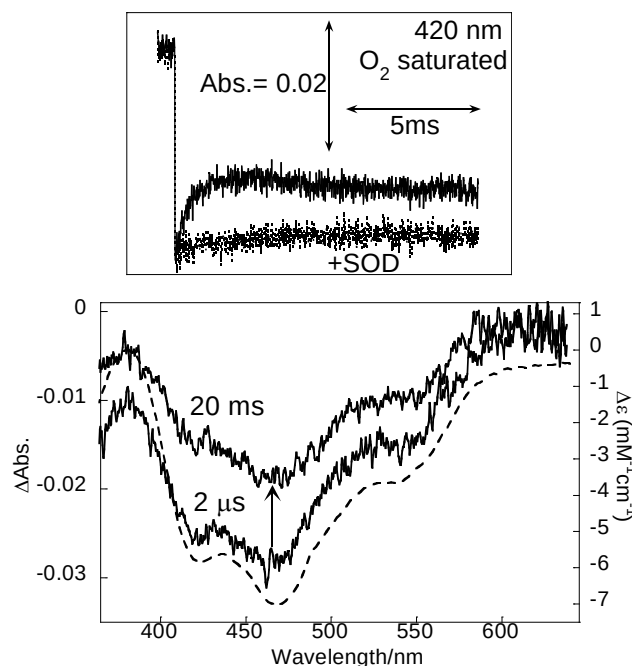


Figure 2. (A) Absorbance changes after pulse radiolysis of SoxR under O_2 saturated conditions in the absence (solid line) or presence (dot line) of human SOD (11 μM).; (B) Comparison of kinetic difference spectra after pulse radiolysis.

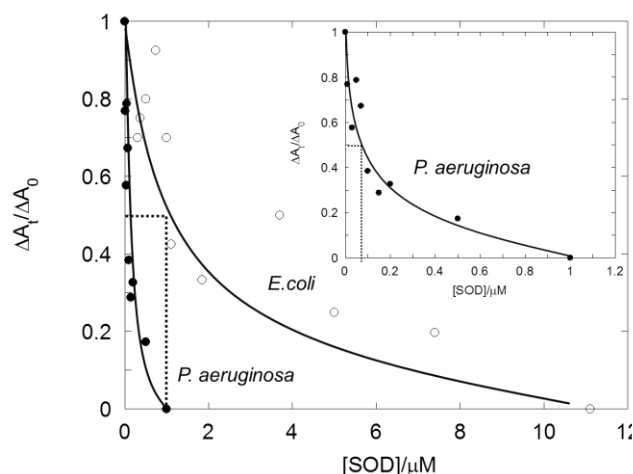


Figure 3. Comparison of SOD effects on the oxidation of SoxR. Ratio of oxidation of SoxR ($\Delta A_t / \Delta A_0$) are plotted against on the concentration of SOD.

ヒト癌抑制遺伝子候補 101F6 による細胞死誘導メカニズムの解析

○ 山添 貴子¹、岡野 弘明¹、朝田 晃一¹、小林 一雄²、古澤 孝弘²、
鏑木 基成¹、

¹神大・院理、²阪大・産業科学研究所

139s225s@stu.kobe-u.ac.jp

[序]

101F6 遺伝子は、ヒト肺癌において高頻度に欠損が観察される染色体 3p21.3 領域に存在する遺伝子の一つである。101F6 遺伝子が欠損している培養肺癌細胞に同遺伝子を導入しアスコルビン酸 (AsA) を添加すると、細胞はカスパーゼ非依存性のアポトーシスを起こすということが報告され [1]、101F6 は癌抑制遺伝子候補として考えられている。101F6 タンパク質は、相同性は低い (21%) が cytochrome *b*₅₆₁ (cyt *b*₅₆₁) と同じタンパク質ファミリーに属している。cyt *b*₅₆₁ は動物神経細胞の神経内分泌小胞において、小胞内腔の AsA 再生のために膜貫通電子伝達反応を行うヘムタンパク質である。101F6 と cyt *b*₅₆₁ との類似点としては、6 回膜貫通型構造を持つ高度に疎水的なタンパク質であること、2 つのヘム *b* を配位する 4 つの His 残基が保存されていること、AsA により素早く還元されること、AsA が 1 電子酸化されたモノデヒドロアスコルビン酸ラジカル (MDA・) に素早く電子を供与する能力を持つこと等があげられる。これらのことより、101F6 タンパク質は AsA、MDA・との酸化還元に伴う膜貫通電子伝達による新規なシグナル伝達経路により、アポトーシスを誘導している可能性が考えられた。そこで本研究では、101F6 タンパク質によるアポトーシス誘導メカニズム解明を目的として、細胞内局在解析、細胞内レドックス制御と細胞死誘導経路の分析、部位特異的変異体を用いた AsA からの電子伝達機構の解析を行った。

[実験]

101F6 の細胞内局在解析：哺乳類細胞での発現 vector pcDNA3.1/V5-His-TOPO にヒト 101F6 遺伝子 (101F6) 及び *Emerald Green Fluorescent Protein* 遺伝子 (*EmGFP*) を導入した。立体構造やシグナル配列への影響を考慮し、*EmGFP* を 101F6 の N 末端に融合させたもの (N 末型) と C 末端に融合させたもの (C 末型) を作製した。これらのプラスミド DNA を、101F6 が欠損している培養細胞 A549 (ヒト肺胞基底上皮腺癌由来細胞) にトランスフェクションし、発現した 101F6 タンパク質の局在を蛍光により観察した。また、*EmGFP* よりもはるかに小さいペプチドを tag として融合させれば、101F6 の正規の folding 過程に影響を与えにくいと考え、既存の tag を欠損させた同 vector に 101F6 及び 3×FLAG-tag を導入したもの (3×FLAG 型) も作製した。このプラスミド DNA を用いて、tag と抗体を用いた免疫蛍光染色法により 101F6 タンパク質の局在を観察した。

101F6 による細胞内レドックス制御と細胞死誘導経路の分析：Nrf2-Keap1 複合体の酸化ストレス応答システムに注目した。Nrf2 は酸化ストレスを感知した Keap1 から離脱し、PERK によって直接または間接的にリン酸化された後、核へ移行する。核では Nrf2 によって抗酸化

遺伝子群の発現が誘導される。また PERK は小胞体 ER ストレスを感知し、eIF2 α をリン酸化してファゴサイトーシスの形成を促進する働きをもつ。これらの遺伝子と 101F6 との関連を、101F6 欠損及び *Keap1* 変異 (G333C) 株である培養細胞 A549 を用いて調べた。

101F6 変異体を用いた電子伝達機構の解析：神経型 cyt *b*₅₆₁ とのアミノ酸配列比較より、101F6 では AsA からの電子受容に重要と考えられる 3 つのアミノ酸残基が保存されていないことに注目した。神経型 cyt *b*₅₆₁ では、DEPC (diethylpyrocarbonate) 修飾による carboxy 化によって AsA からの電子伝達が阻害されることが知られているが、101F6 は DEPC 修飾による阻害を受けない。そこで、101F6 では保存されていなかった 3 つのアミノ酸残基を、神経型 cyt *b*₅₆₁ のアミノ酸残基へと変異させた 7 種の 101F6 変異体 (F67Y、S68R、A83K、F67Y/S68R、F67Y/A83K、S68R/A83K、F67Y/S68R/A83K) を発現・精製し、DEPC 修飾の影響を紫外可視吸収スペクトル及び AsA からの電子受容能により解析した。

[結果と考察]

101F6 の細胞内局在解析：EmGFP 融合 101F6 タンパク質の発現局在を蛍光により観察をしたところ、小胞体 ER に発現していることが確認された。また同 vector に 101F6 及び 3×FLAG-tag 遺伝子を挿入し、免疫蛍光染色法にて発現局在を観察したところ、同様の結果が得られた。よって、101F6 タンパク質は小胞体 ER 膜中に発現しており、その N 末端、C 末端をいずれも細胞質側に面した状態で正規の folding をしているものと考えられる。なお、EmGFP 融合 101F6 タンパク質の発現局在は、N 末型、C 末型で大差ないことから、101F6 のターゲティングシグナルは各末端部分に存在する可能性は低いと考えられる。

101F6 による細胞内レドックス制御と細胞死誘導経路の分析：A549 細胞に 101F6 を発現させ、AsA と tBHQ を同時に A549 に暴露したところ、両者による相加的な細胞増殖抑制効果が確認された。また tBHQ による Nrf2 の活性化により発現誘導されることが知られている *HO-1* 遺伝子の発現を調べたところ、101F6 を発現した細胞に AsA を添加すると *HO-1* 遺伝子の発現が促進されることがわかった。よって、101F6 は Nrf2 や eIF2 α のリン酸化を担う PERK を活性化する可能性が示唆された。すなわち、101F6 が小胞体 ER でのレドックスセンサーとして機能し、細胞の癌化抑制に貢献しているのではないかと考えられる。

101F6 変異体を用いた電子伝達機構の解析：F67Y 変異が導入された変異体では、他の変異体と比較した場合、還元型での α 帯の吸収スペクトルが野生型 101F6 とは大きく変化しており、細胞質側へム周辺の環境が微妙に変化していることがわかった。また、F67Y 変異が導入された変異体 4 種でのみ、DEPC 修飾による AsA からの電子伝達阻害が起こることがわかった。これらのことより、101F6 での AsA からの電子伝達機構は神経型 cyt *b*₅₆₁ において提唱されている機構とは大きく異なることが確認された。神経型 cyt *b*₅₆₁ において細胞質側へムの近傍に位置すると考えられる Tyr が Phe に置換されていることが、101F6 の特異性を生じさせているのではないかと考えられる。

[引用文献]

- [1]. Shoichiro Ohtani, et al., *Cancer Res.*, **67**, 6293-6303 (2007)

異種生物種由来 HO 反応のへム分解速度決定要因

○ 右田 たい子、三宅 倫生

山口大・農

ctmigita@yamaguchi-u.ac.jp

[序] 生体内電子伝達、酸素分子の活性化、NO や CO などのシグナル分子の受容体として多くの生理作用に関わるへムは、へムオキシゲナーゼ(HO)により分解される。へムの補欠分子族としての多彩さゆえに、原核生物から真核生物まで、幅広い生物種がへムを何らかの形で利用しており、そのため生物種ごとに独自の HO を発現しへムの代謝に用いている。我々は生物種固有の HO 活性が、その機能する場とへム分解の目的に応じてどのように微調節されるのかに注目し研究を行っている。HO によるへム分解は、へム自身を酸素活性化因子とする多段階の自己酸素化反応であり、素過程の大半で酸素分子と電子を必要とする。これまで酸素分圧の違いによる HO 活性が生物種によりどのように変わるか、等について報告してきたが、本報では異なる生物種 4 種由来の HO 反応の pH 依存性を調べ、電子供与体タンパクの違いで異なる傾向を示すことを見出した。HO への電子伝達が pH の変化で変調されると、HO の代謝回転へ影響を与え、その程度が生物種によって大きく異なることが明らかになった。

[実験] 用いた HO は、ラット、フグ、ダイズ、およびシアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 由来の可溶性再構成タンパクで、以下それぞれ、rHO1、TfHO1、GmHO1、SynHO1 と記す。反応溶液の pH は、6-8 の範囲ではカリウムリン酸緩衝液(0.1 M)、8-9.5 の塩基性領域は、Tris または CHES 緩衝液(0.05 M)で調製した。HO 反応はへムおよびその誘導体の特性吸収を分光法でモニターし、また、電子供与体タンパク CPR (動物 HO について) および Fd (フェレドキシン、植物・シアノバクテリア) と HO との相互作用は、CPR と Fd のトリプトファン自然蛍光の消光をモニターして求めた。

HO 反応に必要な電子(還元当量)は、生体反応ではすべて NADPH から供給され、動物酵素では NADPH→CPR→HO-heme、植物・シアノバクテリアでは、NADPH→FNR (ferredoxin reductase)→Fd→HO-heme と伝達される。比較のために、電子供与体としてアスコルビン酸を heme-HO 複合体に対して過剰量(600~10000 eq) 用いた実験も行った。

[結果と考察]

図 1 に生理的条件下でのへム分解初速度の pH 依存性を示す。動物 HO についてはへム-HO 複合体に対して CPR を 1/20 当量、NADPH を 4 当量で反応させ、植物系 HO では、へム複合体に対して、FNR を 1/6、Fd を 1/7 当量、NADPH を

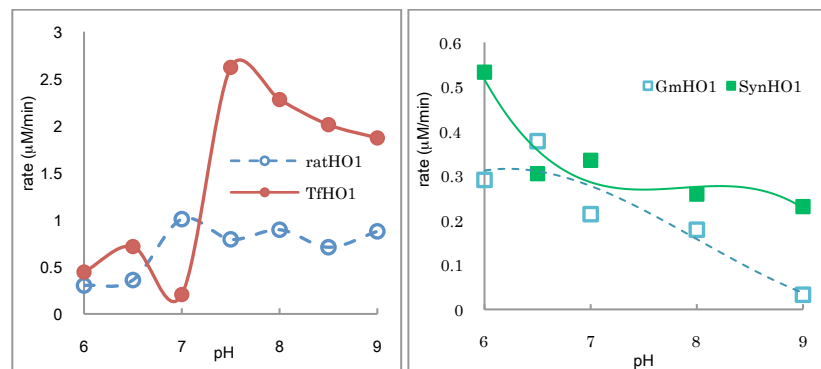


図 1 NADPH 電子供与によるへム分解反応の pH 依存性

動物 HO では CPR、植物系 HO では FNR-Fd が電子輸送を仲介。

9 当量で反応させ (25°C) 比較した。見かけの初速度については、動物 HO と植物 HO では全く異なる pH 依存性を示すことが分かった。比較のため、アスコルビン酸を還元剤とした反応での pH 依存性を求めると、動物系、植物系 HO 反応で、それぞれ対照的な結果が得られた。

HO によるヘム分解過程については、一部を除いてその詳細が解明されている。¹ pH の影響を受ける可能性がある反応過程として、

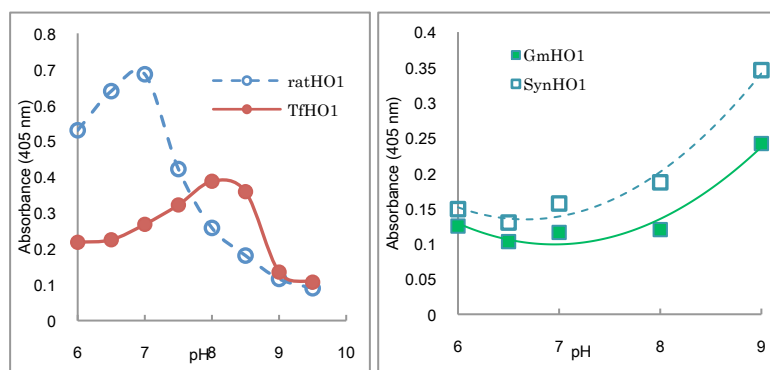


図2 アスコルビン酸を電子供与体とするヘム分解反応の pH 依存性. 動物 HO1 では 600 当量、植物 HO では 10⁴ 当量使用。

1) ヘム配位水のプロトン化 / 脱プロトン化、2) 遠位残基によるオキシヘムの水素結合による安定化、3) ペルオキシヘムへのプロトンリレー、4) H₂O-ベルドヘム中間体の安定化、5) Fe³⁺-ビリベルディン複合体の安定化、6) ビリベルディン分子の生成、が挙げられる。さらに、反応系の pH は電子供与体タンパクと HO 自身の表面電化分布を支配し、タンパク間相互作用、すなわち電子伝達速度に影響を与える可能性がある。一方、アスコルビン酸還元系を使用した場合は、系の pH はアスコルビン酸の酸化還元電位を変化させ、HO 複合体のヘムの還元($E_{1/2} \sim -60$ mV)に十分とはいえない還元力は、酸性側でより弱くなる。生体反応での還元剤である NADPH の電位も pH に依存するが、pH 6-9 の範囲では十分低く、ヘム-HO を還元できる。HO 反応のほとんどの過程で電子とプロトンは同時に必要とされるので、HO 内のヘムポケットの構造を変えない範囲の pH では、ヘム分解は酸性側で有利であるように思える。しかし、図 1 の結果からは、植物、シアノバクテリア HO ではこの傾向がみられるのに対し、動物の HO では、明らかに塩基性側で見かけのヘム分解速度が速くなっている。CPR-TfHO1 間のタンパク相互作用の pH 依存性について、CPR のトリプトファン蛍光の消光をモニターすることで調べたところ、塩基性側で蛍光強度を半減させるヘム-HO 複合体の量が増加し、CPR-HO 相互作用が弱くなる可能性があることが分かった。分子モデリングで推定された CPR と HO の相互作用部位は、CPR 表面の Asp 集合部位と HO のヘム周辺表面の Lys や Arg であると報告されている。² pH~9 程度でも HO 側の表面塩基性残基への影響は少なくないと考えると、塩基性側で CPR-HO のターンオーバーが速まり電子伝達速度を上昇させると解釈することが可能である。これに対して Fd は表面での酸性残基の割合が高く、HO 側の表面電荷分布の影響を受けにくいものと考えられる。Fe³⁺-ヘム HO 複合体のヘム鉄には第 6 配位座に水分子が存在しており、アルカリ側では水酸化物イオンとなり鉄(III) イオンを安定化し酸素分子の配位を妨害する。ヘム配位水の pKa は HO によってかなり差があり、反応場の pH 変化はこの点への影響も大きいと考えられる。

【引用文献】 1. Matsui T., et al., *Acc. Chem. Res.*, **43**, 240-247 (2009)

2. Higashimoto Y., et al., *J. Biol. Chem.*, **280**, 729-737 (2005)

NADPH-シトクロム P450 還元酵素とヘムオキシゲナーゼの複合体構造

○杉島 正一¹、佐藤 秀明¹、東元 祐一郎¹、原田 二郎¹、坂本 寛²、
安永 卓夫²、和田 啓³、福山 恵一⁴、野口 正人¹

¹久留米大・医、²九工大・院情報工、³宮崎大・TT 推進、⁴阪大・院工

sugishima_masakazu@med.kurume-u.ac.jp

[序] NADPH-シトクロム P450 還元酵素(CPR)は小胞体膜上に存在し、シトクロム P450 を始めとする様々なヘムタンパク質へと電子を受け渡す。CPR は補酵素として FMN と FAD を一分子ずつ、それぞれ FMN 結合ドメイン、FAD 結合ドメインに結合している。NADPH からの還元力は $\text{NADPH} \rightarrow \text{FAD} \rightarrow \text{FMN} \rightarrow \text{ヘムタンパク質}$ と受け渡されると考えられているが、近年、CPR は open と close のふたつの状態を取ることが明らかとなりつつある。close 型は FAD と FMN が近接している状態、open 型は FAD と FMN が離れており、FMN が溶媒に露出した構造である。その立体構造から close 型は CPR 内部の電子伝達反応、open 型はヘムタンパク質との電子伝達反応に都合が良いと考えられてきた(1)。しかし、CPR にヘムタンパク質が結合した状態の立体構造は決定されておらず、CPR からヘムタンパク質へどのように電子が受け渡されるかについては不明な点が多かった。哺乳類のヘムオキシゲナーゼ(HO)は、CPR と同様に小胞体膜上に存在し、CPR からの還元力を用いて、ヘムをビリベルジン、鉄、一酸化炭素へと分解する。本研究では CPR-ヘム-HO 複合体の立体構造を X 線結晶解析で明らかにすることで、CPR からヘム-HO 複合体への電子伝達過程を明らかにすることを目的とした。

[結果] ラット CPR の FMN 結合ドメインと FAD 結合ドメインをつなぐヒンジ領域の連続する 4 残基(TGEE)を切除した変異 CPR(ΔTGEE)では、open 型が安定化されることが分かっている(2)。まず ΔTGEE とヘム-ラット HO-1 複合体の親和性を表面プラズモン共鳴によって測定したところ、野生型 CPR と比べて 10 倍以上高い親和性を示し、ゲルろ過クロマトグラフィー中も分離されない安定な複合体を形成することがわかった。一方、ヘムが結合していないアポ HO-1 は、野生型 CPR と同様に ΔTGEE と結合しなかった。 ΔTGEE とヘム-HO-1 複合体を共結晶化したところ、ヘムとフラビンの色が混じりあったオレンジ色の結晶が得られ、SPRING-8 BL44XU の放射光を用いて、分子置換法による構造決定を行なった結果、4.3 Å 分解能で ΔTGEE -ヘム-HO-1 複合体の立体構造決定に成功した(図 1)(3)。また、SAGA-LS BL11 での X 線小角散乱実験から作製した粗視化モデルを結晶構造と重ねあわせ

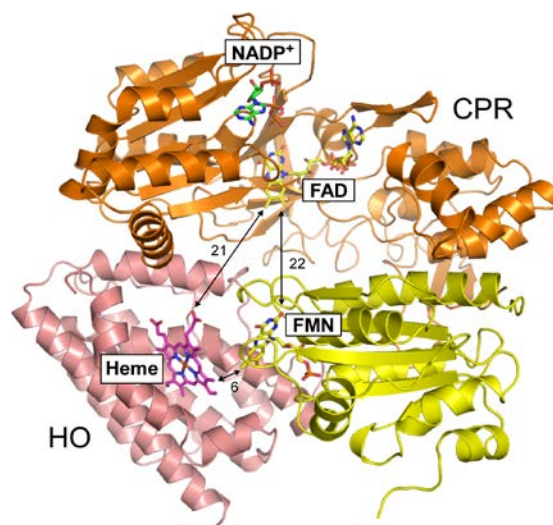


図 1 ΔTGEE -ヘム-HO-1 複合体の結晶構造

た結果、溶液中でも Δ TGEE-ヘム-HO-1 複合体は同様の構造であることを確かめた。さらに野生型 CPR-ヘム-HO-1 複合体のクライオ電子顕微鏡単粒子解析から得られた低分解能電子密度と Δ TGEE-ヘム-HO-1 複合体の立体構造との重ね合わせ、および結晶構造から予測される野生型 CPR と HO-1 の接触表面にシステインを導入した架橋実験により、多少の違いはあるものの、野生型 CPR もほぼ同様の結合様式で HO と結合することを確認した。

【考察】 Δ TGEE-ヘム-HO-1 複合体の結晶構造解析から、CPR は open 型でヘム-HO-1 複合体に結合し、CPR に結合している NADP^+ , FMN, FAD とヘムの位置関係が明らかになった。FMN とヘムの距離は最短で 6 Å 程度であり、直接電子伝達可能な距離にあるが、FAD と FMN、ヘムは 20 Å 以上離れており、FAD から FMN への直接の電子伝達は難しい距離であった。従って、open 型 CPR が HO に結合したまま、電子伝達反応および HO 反応が進行することは難しく、CPR から HO への電子伝達反応は以下のスキームで進行すると考えられる(図 2)。

①close 型 CPR に NADPH が結合し、 $\text{FAD} \rightarrow \text{FMN}$ と還元する。②FMN の還元を引き金として、CPR は open 型へ構造変化する。③open 型 CPR にヘム-HO 複合体が結合する。④還元型 FMN からヘムへ電子が受け渡される。⑤FMN の酸化を引き金として、CPR は close 型 CPR に構造変化する。⑥close 型へと CPR が構造変化すると、HO と CPR の FAD 結合ドメインは立体的に衝突する。その結果、HO は CPR から解離する。

X 線小角散乱およびイオンモビリティ質量分析による解析(4,5)から CPR の構造変化が FMN の酸化還元状態に依存することが示唆されており、本スキームはそれと合致する。HO がヘムをビリベルジンまで分解するには 7 当量の還元力が必要で、HO 反応が一回完結するためには、①から⑥の過程が複数回繰り返される必要がある。

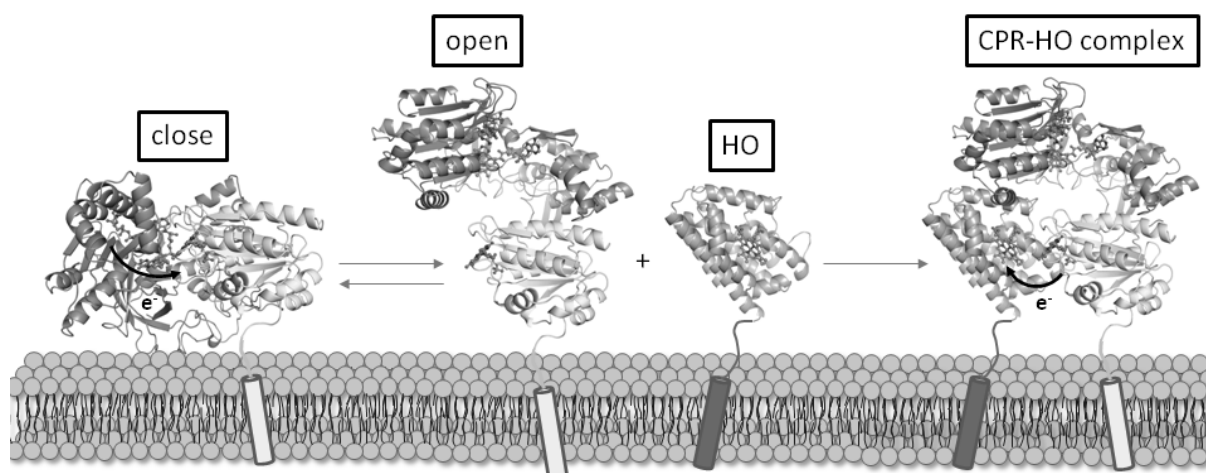


図2 CPR のダイナミックな構造変化を伴う HO への電子伝達機構

【引用文献】1. Iyanagi, T., et al., *Arch. Biochem. Biophys.*, **528**, 72-89 (2012).

2. Hamdane, D., et al., *J. Biol. Chem.*, **284**, 11374-11384 (2009).

3. Sugishima, M., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **111**, 2524-2529 (2014).

4. Huang, W. C., et al., *Structure*, **21**, 1581-1589 (2013).

5. Jenner, M., et al., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **50**, 8291-8294 (2011).

生体高分子系の相挙動

○山下 祐太朗、柳澤 実穂、鵜田 昌之

九大院理

yamashita@phys.kyushu-u.ac.jp

[序]ゼラチンはゼリーなどの食品や医療用カプセルなどの医薬品、さらには工業的にも使われる我々に非常に馴染みの深い物質である。ゼラチンは、生体高分子であるコラーゲンを変性して得られる高分子電解質であり、水に非常に良く溶解する。このゼラチン水溶液は高温では溶液状態にあるが、温度を下げていくとゲル状態に転移することが知られている。そして、ゼラチンゲルの架橋点は、ゼラチン分子間にコラーゲン様の3重らせん構造が部分的に形成したものであると考えられている[1]。ゼラチン水溶液ではゾル-ゲル転移が起こることが知られているが、このゼラチン水溶液に対して別の水溶性高分子であるポリエチレングリコール (PEG) を添加することにより相分離が起こる [2, 3]。しかしながら、このような3成分高分子混合溶液系の相転移現象は十分に解明されていない。そこで我々はこの現象の解明を目的に研究を行った。

[実験]試料のゼラチン (Merck, M_w :69,000) とポリエチレングリコール (PEG) は購入したものをそのまま用いた。試料は次の手順で調整した。はじめに所定の濃度の PEG 水溶液を調製した。そして、この PEG 水溶液にゼラチンを混合して約 60℃で溶解した。このようにして調製したゼラチン-PEG-水3成分系は温度を下げていくと白濁が強まる。さらに、試料を低温で保持することによりゲル化する。我々は、はじめに曇点とゲルの融点を測定した。曇点は降温過程で目視により決定した。また、ゲルの融点は昇温過程で落球法により決定した。このような測定を、ゼラチンの濃度と PEG の分子量を変化させて行った。さらに、曇点における相分離のメカニズムを明らかにするために顕微鏡による観察と小角光散乱測定を行った。

[結果と考察]図1に曇点 (○) とゲルの融点 (●) をゼラチンの濃度に対してプロットした相図を示した。図1(a)-(c)は、共存する PEG の重量濃度は一定であるが PEG の分子量が異なる。図1(a)は共存する PEG の分子量が 106 (EG-2) の系の相図である。この場合には、単純なゾル-ゲル転移が起こることがわかる。図2(b)は共存する PEG の分子量が 400 の系の相図である。この場合には、ゾル-ゲル転移に加えて曇点が観測された。さらに、PEG の分子量を 1000 (図1(c)) とすると、PEG の分子量が 400 の場合に比べて曇点が高温側に移動することが明らかとなった。このように、低分子量の PEG が共存する場合には相分離は観測されないが、PEG の分子量が大きくなるにつれて相分離点が高温側に移動することが明らかになった。このことは、PEG の分子量が大きくなるにつれて、PEG 水溶液がゼラチンにとって貧溶媒になることを示唆していると考えられる。

次に、図3(c)の系について顕微鏡による観察と小角光散乱測定を行った。その結果、曇点がゼラチンゲルの融点よりも高温側にある領域、すなわちゼラチンの濃度が低い領域では核

形成・成長により相分離が進むことが明らかとなった。一方、曇点がゲルの融点よりも低温側にある領域では核形成・成長は観察されず、スピノーダル分解で観測されるような揺らぎが観測された。このことは、ゲルの網目構造が形成した後も相分離は起こるが、核形成・成長による巨視的な相分離はゲルの網目構造により妨げられることを示していると考えられる。詳細は当日報告する。

【引用文献】

- [1] M. Djabourov, J. Leblond, P. Papon, *J. Phys. France.*, **49**, 319 and 333(1988).
- [2] T. Nezu, H. Maeda, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **64**, 1618(1991).
- [3] M. Yanagisawa, et al., *J. Mol. Liq.*, **In Press**(2013)
- [4] Y. Yamashita, M. Yanagisawa and M. Tokita, *J. Mol. Liq.*, **In Press**(2014)

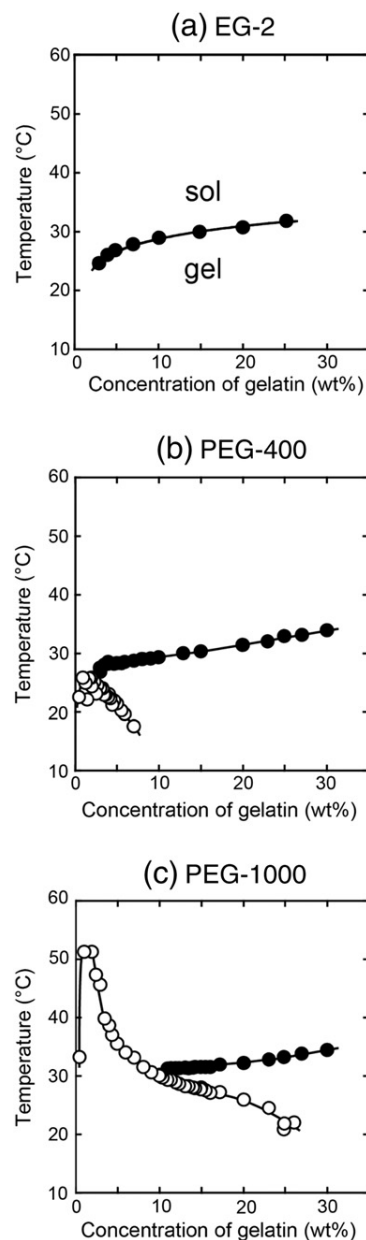


図 1 : ゼラチン - PEG - 水系の相図 [4] 曇点 (○) とゼラチンゲルの融点 (●) をゼラチンの濃度に対してプロットした。PEG の濃度は 10wt% であり、PEG の分子量は(a)106、(b)400、(c)1000 である。

計算ミューテーションによる酵素反応の最適化

○ 土井富 一城¹、田中 宏昌²、蒲池 高志¹、虎谷 哲夫³、
吉澤 一成^{1,2}

¹九大・先導研、²京大・ESICB、³岡山大・工

dtomi@ms.ifoc.kyushu-u.ac.jp

【序】

Site-Directed mutagenesis はタンパク質のアミノ酸残基を置換する手法のひとつである。この方法は酵素の反応機構の解明、活性中心近傍のアミノ酸残基の役割の解析に有用な手段である。また、この方法を用いることによる酵素活性の改変も期待されている。しかし、この解析により与えられる結果は様々な影響が複雑に絡み合っているため解釈することが難しい。我々は QM/MM 法を用いた計算ミューテーションという手法によりミューテーションの影響を解釈してきた。QM/MM 法は活性中心近傍に高精度な量子化学(QM)計算、それ以外の領域に安価で高速な分子力場(MM)計算を適用する計算手法である。今回、この方法を用いて野生型および変異型ジオールデヒドラターゼによる 1,2,3-プロパントリオール（グリセロール: GOL）の脱水反応の計算を行った。本研究で用いたジオールデヒドラターゼは 1,2-プロパンジオールの脱水反応を触媒する酵素であるので本来の基質ではない GOL を触媒すると不活性化しやすいことが知られている。図 1 に GOL が結合したジオールデヒドラターゼの結晶構造を示す。1,2-プロパンジオールにはない GOL の 3 つ目の水酸基が Gln336、Ser301 の近傍に存在する。最近、虎谷らはこの Gln336、Ser301 を置換した Gln336Ala および Ser301Ala 変異型が野生型よりも不活性化しにくいと報告した。本研究では野生型よりも変異型が不活性化しにくい理由について計算ミューテーションを用いて検討した。

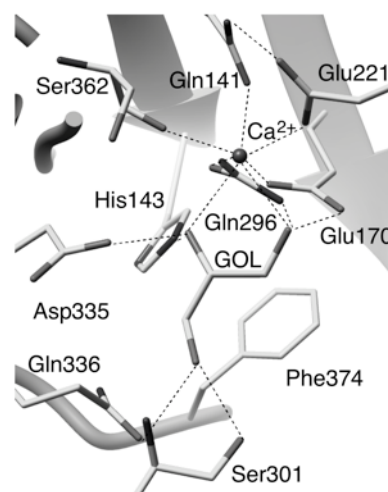


図 1. 活性中心近傍の構造

【計算方法】

QM 領域の原子は図 1 に示す反応に重要な 10 個のアミノ酸残基、金属イオン(Ca^{2+})、GOL、アデノシルラジカルのリボース部位とした。変異型の計算は Gln336、Ser301 をそれぞれアラニンに置換して行った。QM 領域では TURBOMOLE プログラムを用い、計算レベルは B3LYP/TZVP//B3LYP/SV(P)とした。それ以外の領域を MM 領域として力場に CHARMM を適用し、計算を DL_POLY プログラムで行った。計算のインターフェイスとして ChemShell プログラムを用いた。

[結果・考察]

図 2 に示すのは脱水反応と不活性化に寄与する副反応の反応機構である。どちらの反応でも最初にアデノシルラジカルによる水素の引き抜きが起き、反応物ラジカルが生成する。この反応物ラジカルから脱水反応に寄与する水酸基転移反応と不活性化に寄与する水素移動反応が競争的に進行する。水酸基転移反応では 2 位の水酸基が 1 位に転移する。水素移動反応では 3 位の水酸基の水素が C1 ラジカルに移動する。

GOL はアキラルな物質であるが、GOL が酵素に結合した構造は GS と GR のふたつがあることが知られている。GR 構造では脱水反応のみが進行し、GS 構造では不活性化が起きやすい。野生型の GR と GS 構造それぞれにおける水酸基転移反応と水素移動反応の活性化エネルギーを図 3 に示す。それらのエネルギーの差は GR、GS 構造でそれぞれ 14.1、10.0 kcal/mol である。GS 構造ではこのエネルギー差が小さく、不活性化が進行しやすいと判明した。

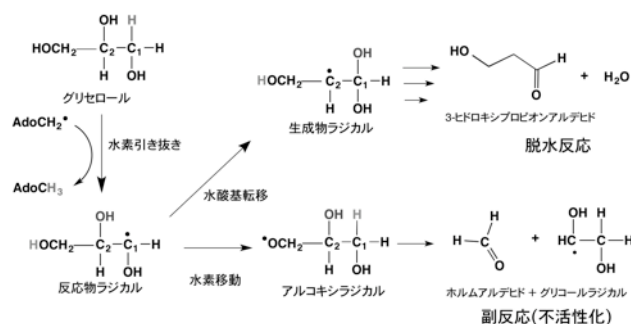


図 2. 脱水反応(上)と副反応(下)の機構

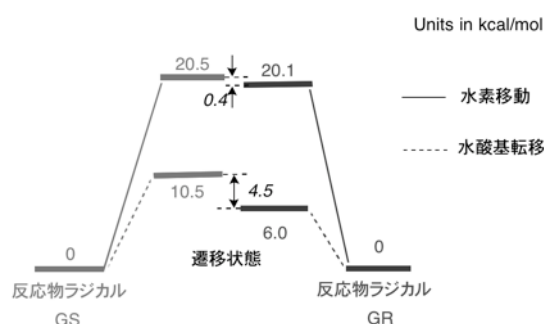


図 3. 水素移動反応と水酸基転移反応の活性化エネルギー

変異型についても野生型と同様の反応機構で検討した。変異導入により GOL と Ser301 の間の水素結合に変化が見られた。また、Val300 と GOL の立体反発が基質の結合構造の選択に重要な役割を果たすことが明らかになった。当日はこれまでに得られた知見を基に変異型が野生型よりも不活性化しにくい理由について議論する。

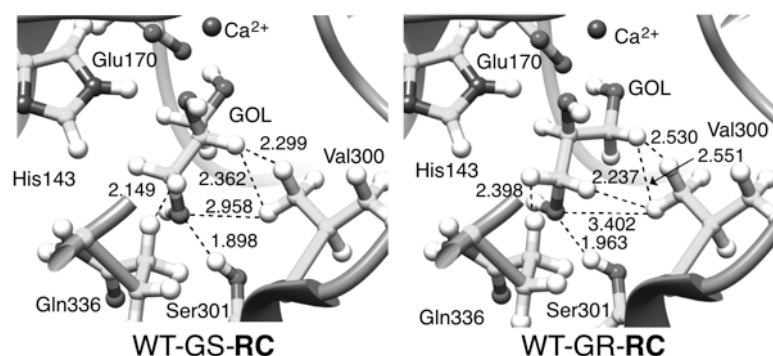


図 4. QM/MM 計算により最適化された野生型の基質結合構造

[引用文献]

1. Doitomi, K., et al. *Biochemistry* **51**, 9202-9210 (2012)
2. Doitomi, K., et al. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* submitted