

# 「生体分子の形と機能」研究領域 領域活動・評価報告書

- 平成 16 年度終了研究課題 -

研究総括 郷 信広

## 1. 研究領域の概要

本研究領域は、遺伝情報が機能として発現するのを支えている物理的実体としての生体分子(タンパク質)に焦点をあて、物理学、化学等の物質科学の原理に基づき、その立体構造形成の仕組みや立体構造に基づく機能発現の仕組みを研究するとともに、今急速に蓄積が進んでいるゲノム情報等を対象としたバイオインフォマティクス的手法を用いた研究も対象とする。

具体的には、タンパク質等の立体構造の実験的決定、理論的予測、物性研究、相互作用や複数の分子からなる超分子構造体の解析に関する新しい研究方法の開発等の基礎的研究とともに、合理的薬物設計、生物的機能の工学的利用を目指した応用的研究が含まれる。

## 2. 研究課題・研究者名

別紙一覧表参照

## 3. 選考方針

選考の基本的な考えは下記の通り。

- 1) 選考は「生体分子の形と機能」領域に設けた選考委員8名と研究総括で行う。
- 2) 選考方法は、書類選考、面接選考及び総合選考とする。
- 3) 選考の基本的考え方は以下の通りである。

領域の定義は広めに捉える。

研究者自身による独創性のある研究構想であること。

知的財産の形成や新技術の創製につながるような、今後の科学技術にインパクトを与える可能性を有しているものと共に、当面の応用を意識しない基礎研究も重視する。

研究構想が現実的なものについては、3年間の構想を厳しく評価し、夢を追及するものに関しては、夢の質と研究者の資質を問う。

## 4. 選考の経緯

一応募課題につき研究総括および領域アドバイザー2名の計3名が書類審査し、書類選考会議において面接選考の対象者を選考した。続いて、面接選考および総合選考により、採用候補者を選定した。

選考	書類選考	面接選考	採用者
対象者数	98名	21名	10名

## 5. 研究実施期間

平成 13 年 10 月～平成 17 年 3 月

(当初は平成 16 年 11 月が終了時期であったが、期間中に延長制度ができた。)

## 6. 領域の活動状況

領域会議: 7回実施

たんぱく質関連領域合同シンポジウム： 1回実施(CREST「たんぱく質の構造・機能と発現メカニズム」領域との合同開催)

研究総括(または技術参事)の研究実施場所訪問： 研究開始後、研究総括が全研究者およびその上司を訪問し、研究場所の確認と研究者へのアドバイス、上司への協力依頼を行った。その後、研究の進展に伴う各課題については技術参事が訪問して対応した。

## 7. 評価の手続き

研究総括が個人研究者からの報告・自己評価をもとに、領域アドバイザーの協力を得て行った。また領域会議での研究進捗状況発表や外部発表の内容を考慮した。さらに一般公開の合同シンポジウムにおいての産官学の参加者からの意見、質疑応答の内容などを参考にした。

(評価の流れ)

平成 16 年 11 月	研究期間終了
平成 16 年 12 月	研究報告会開催
平成 17 年 2 月	研究報告書及び研究課題別評価提出
平成 17 年 3 月	研究総括による評価

(研究期間延長制度を利用した研究者も、評価はこの流れで実施した。)

## 8. 評価項目

- (1) 外部発表(論文、口頭発表等)、特許、研究を通じての新たな知見の取得等の研究成果
- (2) 得られた研究成果の科学技術への貢献

## 9. 研究結果

平成 13 年度に採択した研究者(第 1 期生) 10 名の研究分野は、結晶構造解析によるたんぱく質の立体構造研究が 5 名と最も多く、次いで光学手法等によるたんぱく質や脂質の機能発現機構研究が 3 名、バイオインフォマティクス手法を用いた構造機能予測ソフト研究が 2 名であった。研究の常として当初想定した環境が変化し、途中で目標を修正する苦労をなめた研究者もいたが、全員地道に研究を進め、領域会議をきっかけとして 1 期生同士、および 2 年目以降に参画した 2 期生、3 期生との交流も積極的に行った。

特に平成 16 年 12 月に実施した CREST「たんぱく質の構造・機能と発現メカニズム」領域との合同シンポジウムでは、CREST 代表者の報告に混じって、全員が 3 年間の成果を短時間ながら要領よく報告し、CREST の総括およびアドバイザーからその研究内容と積極的な姿勢が高く評価された。

立体構造研究分野では、水島恒裕研究者が糖鎖を目印として折りたたみ異常たんぱく質にユビキチンを付加する新規なユビキチンリガーゼ複合体の糖鎖認識領域の構造決定に成功し、糖鎖認識機構を明らかにした。直接たんぱく質の構造を決定して機能発現の仕組みを明らかにするという本領域の当初の構想における代表的な成果である。

この立体構造研究分野は、構造を決めれば評価される時代は過ぎ去り、今は機能等を強く意識した構造研究が求められているが、本領域は 2 期生以降も含めかなりの数の質の高い構造面、機能面、情報面の研究者を擁しているため、これらの研究者との間の情報交換や交流が活発になったことも研究推進に役立ったと思われる。

機能発現機構研究分野では、根本知己研究者が 2 光子励起を用いた顕微鏡による可視化解析技術を開発し、この技術を生体分子機能発現機構研究に応用して、「逐次開口放出」分泌機構の可視化に世界にさきがけて成功した。この分泌機構の異常により、急性肺炎やアレルギー性鼻炎が起こるメカニズムも解明した。本領域を生体分子の機能研究にも広げたいという当初のもう一つの構想の代表的成果である。

この分野も 2 期生以降も含めかなりの研究者が、蛍光たんぱく質などの発光体を用いて細胞内機能解析を進めたので、領域会議での討議やアドバイザーからの指摘が、研究を進める上で大いに参考になったと思われる。光増感物質を用いる生体機能不活性化研究を進めた永井健治研究者は、本来の目的には合わなかった蛍光たんぱく質を、発想を変えて機能指示薬に展開し、従来品を大きく凌駕する蛍光指示薬を開発して国内外特許 4 件に結びつけた。

構造機能予測ソフト開発研究分野では木下賢吾研究者が、たんぱく質立体構造情報から機能予測する手法の開発を進め、分子表面およびその表面上の静電ポテンシャルの類似性を利用して機能未知たんぱく質の機能を予測する機能部位データベース(eF - site)開発に成功した。このデータベースは国内外で高く評価され、日経サイエンスや Protein Data Bank でも取り上げられ、本領域にバイオインフォマティクス研究も取り入れたいという当初の狙いは達成できた。この研究は H16 年度 SORST に採択され、たんぱく質同士の相互作用による構造機能予測手法の開発を狙うことになった。

以上概観したように、「生体分子の形と機能」の領域をある程度広く捉えて多様な研究課題を採択し、研究者の交流や成長に寄与したいとの当初の思いはかなり達成できたと考えている。新鮮な発想とある程度の経験をもっている 30 代の研究者に国の支援を与え、自分のやりたいテーマを追求できる個人型研究「さきがけ」の制度は、若手研究者の育成の点からは非常に優れた制度であることを研究総括の経験から強調しておきたい。

#### 10. 評価者

研究総括 郷 信広 日本原子力研究所 計算科学技術推進センター 特別研究員

#### 領域アドバイザー氏名(五十音順)

北川 禎三	自然科学研究機構分子科学研究所 教授
桑島 邦博	東京大学大学院理学系研究科 教授
五條堀 孝	国立遺伝学研究所生命情報研究センター 教授
近藤 滋	名古屋大学理学部生命理学科 教授
板井 昭子*1	(株)医薬分子設計研究所 代表取締役社長
月原 富武	大阪大学蛋白質研究所 教授
中野 明彦	東京大学大学院理学系研究科 教授
西川 建*2	国立遺伝学研究所生命情報研究センター 教授
吉田 賢右	東京工業大学資源研究所 教授

\*1 平成 13 年 10 月～平成 14 年 4 月まで参画

\*2 平成 14 年 5 月～平成 17 年 3 月まで参画

(参考)

(1)外部発表件数

	国内	国際	計
論文	26	43	69
口頭	94	48	142
その他	14	2	16
合計	134	93	227

平成 17 年 3 月末現在

(2)特許出願件数

国内	国際	計
11	4	15

(3)受賞等

特記事項なし

(4)招待講演

国際 16 件

国内 49 件

## 別紙

## 「生体分子の形と機能」領域 研究課題名および研究者氏名

研究者氏名 (参加形態)	研究課題名 (研究実施場所)	現職 (応募時所属)	研究費 (百万円)
伊倉 貞吉 (兼任)	水と情報を取り入れた蛋白質相互作用解析法の確立 (東京医科歯科大学大学院)	東京医科歯科大学大学院 助教授 (キリンピール探索研究所ポスドク)	49
稲葉 謙次 (専任)	Oxidative Protein Folding に関わる細胞因子の構造・機能解明とその工学的利用 (京都大学ウィルス研究所)	科学技術振興機構さきがけ研究者 (同左 博士研究員)	40
井上 豪 (兼任)	2 種のプロスタグランジン合成酵素の構造解析と医薬品への応用 (大阪大学大学院工学研究科)	大阪大学大学院工学研究科 助教授 (同上 講師)	49
木下 賢吾 (兼任)	たんぱく質の構造機能相関を利用した構造からの機能予測法 (大阪大学蛋白質研究所)	東京大学医科学研究所 助教授 (横浜市立大学大学院 助手)	36
永井 健治 (兼任)	色素タンパク質による生体機能の時空間的な不活性化法の確立 (理化学研究所脳科学総合研究センター)	北海道大学電子科学研究所 教授 (理化学研究所 研究員)	53
長野 希美 (兼任)	新規機能創製を目指した酵素蛋白質の立体構造・触媒機構の系統的解析 (産業技術総合研究所)	産業技術総合研究所 研究員 (同上 特別研究員)	35
根本 知己 (兼任)	2 光子励起法を用いた生体膜融合分子機能の顕微解析とシステム化 (自然科学研究機構生理学研究所)	自然科学研究機構生理学研究所 助手 (同上)	43
早川 枝李 (専任)	機能性分子素子の構築を目指した脂質膜の物性に関する基礎的研究 (慶應義塾大学医学部)	科学技術振興機構 さきがけ研究者 (NIH NIAAA/LMBB/SFS ポスドク)	43
水島 恒裕 (兼任)	癌・パーキンソン病の解明を目指したユビキチンリガーゼ複合体の結晶構造に関する基礎的研究 (名古屋大学大学院工学研究科)	名古屋大学大学院工学研究科 助手 (大阪大学蛋白質研究所ポスドク)	44
水谷 泰久 (兼任)	タンパク質機能の構造揺らぎの検出と制御 (神戸大学分子フォトサイエンスセンター)	神戸大学分子フォトサイエンスセンター 助教授 (同上)	48

平成 17 年 3 月末現在

## 研究課題別評価

1 研究課題名: 水和情報を取り入れた蛋白質相互作用解析法の確立

2 研究者氏名: 伊倉 貞吉

3 研究の狙い:

蛋白質-蛋白質相互作用は、蛋白質の機能発現に必須の過程であり、その相互作用機構の解明は生物化学をはじめ周辺領域においても重要な問題となってきた。蛋白質のほとんどは細胞質等の水溶液中で機能するので、一般の分子やイオンなどと同様に常に水和しており、蛋白質間の相互作用もまた少なからず水和の影響を受けている。本研究では、このように蛋白質の機能に深く関わる水和に注目し、蛋白質間の相互作用における水和水の挙動を実験と計算機シミュレーションにより解析し、水和水を仲立ちとした蛋白質間の相互作用を解明することを目指した。また、水和情報を積極的に活用することにより、これまで定性的な議論しかできなかった相互作用予測法を定量的な評価が可能なものへと発展させられるのではないかと考え、新たな蛋白質間相互作用予測法の開発を行った。

4 研究成果:

(1) 蛋白質相互作用に伴う水和・脱水和の実験及び計算機シミュレーションによる解析

蛋白質間相互作用に伴う水和水の挙動を、バルナーゼとバルスターの相互作用をモデルとして解析した。既知の結晶構造によれば、両蛋白質とも複合体形成の前後でほとんど構造変化しないので、この系は水和状態の変化だけを解析するのに最適なモデルであると考えた。本研究では、まず、低温 X 線結晶構造解析法を用いて、バルナーゼとバルスターの複合体形成前後での相互作用界面の水和状態の比較を行った。解析の結果、バルナーゼの結合界面に存在する水和水のほとんどが複合体形成前後も保存されていること、複合体形成前の構造で温度因子が低い水分子のほうが複合体形成前後も水和している場合が多いことなどが明らかになった。また、計算機シミュレーションによる解析から、結合界面には結晶構造解析で検出された数の2倍を超える水分子が存在し、複合体形成に伴う脱水和はそのうちの40%にも満たないことが明らかになった。水分子と蛋白質との相互作用の多くは寿命が短かったが、比較的寿命の長いものは、実験で検出された水和水と極めてよい一致を示した。さらに、水和水の中には、複合体形成後の方が複合体形成前よりも安定した水和を形成するものが多数存在することがわかった。これらの水和水は水素結合ネットワークによって蛋白質間の相互作用を仲介していた。このことは、蛋白質間相互作用における水和水分子を介した間接的な相互作用の重要性を示している。

(2) 蛋白質の結合自由エネルギーにおける水和の寄与の定量的解析

蛋白質間相互作用を解析するには、蛋白質間の直接的な相互作用だけでなく、水和水を介した間接的な相互作用も考慮する必要があることが明らかになったため、それぞれの相互作用の寄与を実験から見積もった。本研究では、相互作用界面の水和状態の変化が結合自由エネルギーに及ぼす影響を解析することにより、直接的及び間接的な相互作用のそれぞれの平均的な寄与を求めた。引き続きバルナーゼとバルスターの相互作用をモデルに、相互作用界面のアミノ酸残基に変異を導入することで水和状態を変化させた。変異に伴う結合自由エネルギーの変化は表面プラズモン共鳴法で、また、変異体の複合体構造を X 線結晶構造解析によりそれぞれ決定した。変異はバルスターの4つのアミノ酸残基(D35、D39、E76、E80)に対して導入し、それぞれをアラニンに置換した。実験データに基づきバルナーゼとバルスターの相互作用を解析すると、相互作用に対する寄与の大きな因子として蛋白質間の直接的な相互作用、水和水を介した間接的な

相互作用、水分子の相互作用界面内への侵入或いは排除の効果の 3 種類が考えられ、それぞれ一個の相互作用あたり 2.5 kcal/mol、1.0 kcal/mol、-0.5 kcal/mol(侵入)と見積もることができた。

### (3) 蛋白質相互作用の定量的予測法の開発

蛋白質相互作用の定量的予測法の開発のための第一段階として、「既に相互作用をすることが知られている2つの蛋白質に対して、アミノ酸の変異に伴って相互作用がどの程度変化するかを定量的に予測する」という問いに対する回答を得ることを目標に方法論の開発を行った。ここでもバルナーゼとバルスターの相互作用をモデルとして用いた。結晶構造未知のバルスターの変異体 D39A とバルナーゼとの複合体の水和構造を予測するとともに、その予測構造に基づき野生型に対する相互作用自由エネルギー変化を-6.5 kcal/mol と見積もった。この値は、表面プラズモン共鳴法で求めた実験値-6.0 kcal/mol と 10%以内の差で一致しており、本方法論の実用性が期待できることを示していた。その後、バルスター-D39A の複合体の結晶構造を決定したところ、分子動力学シミュレーションの予測構造とよく一致していることがわかった。

### 5 自己評価:

これまで重要性が認識されながらも、解析の困難さゆえにほとんど手がつけられていなかった蛋白質相互作用における水和の寄与を、本研究で、限定された環境下ながらも定量化できたことの意義は大きい。これにより、蛋白質相互作用の定量的解析及び予測法の開発への可能性を見出すことができた。現状ではひとつのモデル系での成功に留まっているが、より一般的な系への対応を目指していく必要がある。

当初は、バルナーゼ、バルスター、及び、それらの複合体の X 線結晶構造解析がもっと迅速に進むと期待していたが、変異体ごとに結晶化条件や結晶の質が変わるなど、結晶化の段階で予想以上に時間を消費してしまった。方法論の一般化も計画していたのだが、そこまで手が回らなくなったことが悔やまれる。

### 6 研究総括の見解:

蛋白質相互作用への水和の影響は大変重要な課題であり、そこに着眼して地道に研究を進め、限定された環境下での定量化を行ったことは評価する。しかしこの分野は問題の重要性故に多くの研究者が多様な研究を展開している。その中でよい成果を挙げるためには、独自の視点をしっかり持ち、研究遂行上で現れる様々な問題を高い集中力で克服していかなければならない。いっそうの努力をして、高いレベルの成果を挙げて欲しい。

### 7 主な論文等:

#### 論文

Ikura, T., Urakubo, Y., Ito, N. (2004). Water-mediated interaction at a protein-protein interface. *Chemical Physics*, 307, 111-119.

#### 招待講演

Ikura, T. (2004) Effects of hydration on protein-protein interaction. Keihanna Conference of Molecular Biophysics, KSMB2004(Keihanna Symposium of Molecular Biophysics), "Physical Aspects of Protein Folding and Function", 6-8 January, Kyoto, Japan.

#### 学会発表等

国際 2 件  
国内 5 件

結晶構造登録 6件

## 研究課題別評価

1 研究課題名: Oxidative protein folding に関わる細胞因子の構造・機能解明とその工学的利用

2 研究者氏名: 稲葉 謙次

3 研究の狙い:

ジスルフィド結合の形成は、多くの分泌蛋白質や細胞表層蛋白質が安定な高次構造を保ち、機能を発現する上で非常に重要である。真核細胞・原核細胞を問わず、細胞内には効率よくジスルフィド結合を導入するシステムが備わっている。大腸菌の場合、そのシステムは DsbA(可溶性酵素)、DsbB(膜蛋白質)、そして呼吸鎖成分であるユビキノン分子によって構成されている。本研究では、生化学的および構造生物学的手法を駆使することにより、DsbA-DsbB-ユビキノンから成るジスルフィド結合導入システムの分子機構の完全理解を目指した。

4 研究成果:

1)ジスルフィド結合導入経路における酸化還元電位の逆転の発見

ジスルフィド結合の形成は二電子の移動を伴う電子移動反応であり、活性部位間の酸化還元電位の勾配により反応が駆動されていると考えられる。そこでまず、蛋白質ジスルフィド結合の酸化還元電位を普遍的に測定するための独自のアッセイ法を開発し、それにより DsbA および DsbB の活性部位の酸化還元電位を決定した。その結果、予想に反しDsbB の酸化力はDsbA に比べ著しく低く、DsbA からDsbB への電子移動反応は約0.13 V もの電位に逆らったものであることを世界に先駆けて発見した(図1)。つまりDsbA 再酸化因子であるはずのDsbB そのものにはDsbA を酸化する能力はほとんどなく、補酵素であるユビキノン分子(UQ)の強い酸化力がこの反応をドライブする源になっていると考えられる。以上の成果は EMBO J に掲載され、また Science 誌の Editor's Choice 上でも、大腸菌のジスルフィド導入システムのパラドックスとして注目を浴びた。

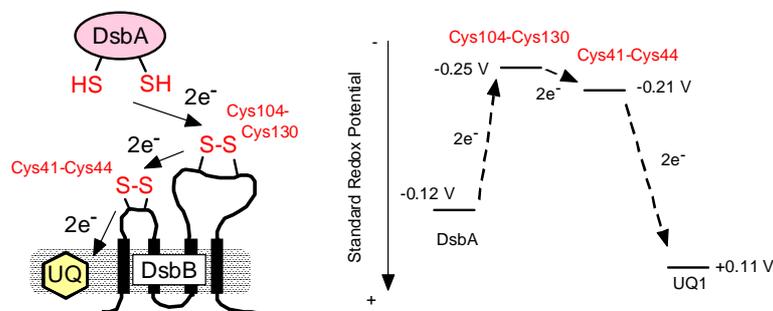


図1 DsbA-DsbB-ユビキノン間の電子の流れ(左)と各活性部位の酸化還元電位(右)

2)DsbA 再酸化反応中のユビキノン分子の電子状態遷移を発見

本研究者は、酸化還元電位の逆転にもかかわらず DsbB が DsbA を効率よく再酸化する分子メカニズムについて、さらに深く追求した。最も興味深い発見は、DsbA 再酸化反応中に DsbB に結合したユビキノン分子が、本来の 400 nm の吸収(弱い黄色)から 500 nm に強い吸収をもつ電子状態(強いピンク色)へと変化することである。この電子状態の変化は、DsbA-DsbB 間のコンプレックス形成によりフリーになった Cys44 がユビキノン分子と電荷移動錯体を形成することによって誘起されることを解明し、図2に示す新たな反応モデルを提唱するに至っている。この反応モデルは、エネルギー的には好ましいDsbB からDsbA への逆電子移動反応がDsbB 分子内のジスルフィド形成(Cys41-Cys130)およびCys44-ユビキノン間の共鳴構造の形成により妨げられ、図2中の中間状態が一連の酵素反応を正方向に進める上で非常に重要な意味をもつことを示している。以上の研究成果は変異体作製・分光学的測定・速度論的解析を駆使した結果成し得たものであ

り、DsbB の分子メカニズムを解明する決定的な仕事と言える (J. Biol. Chem. に掲載)。

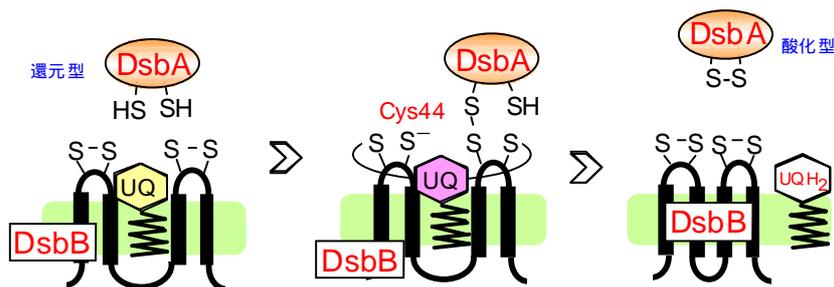


図2 DsbB-ユビキノンによる DsbA 再酸化反応の新たなモデル

### 3) 嫌気条件下での DsbA 再酸化反応機構の解明

本来大腸菌は半嫌気条件下で生育している原核細胞であり、嫌気条件下で酸化的なジスルフィド結合形成がどのように進行しているか興味もたれる。嫌気条件下では、メナキノン分子の生合成量が上昇し、メナキノンがユビキノンに代わって呼吸鎖電子伝達系の電子キャリアとして機能することが知られている。そこで DsbB による DsbA 再酸化反応がメナキノンによっても駆動されるか検討したところ、確かにメナキノンが DsbA-DsbB システムの電子アクセプターとして機能することを生化学的に示した。またメナキノンのみを合成するユビキノン合成欠損株中で DsbA は酸化型で蓄積していることから、細胞中でもメナキノンが DsbA 再酸化に関わることを示した。さらに DsbA-DsbB-メナキノン電子伝達経路について詳細な生化学解析を行ったところ、DsbA 再酸化反応中に 550 nm に強い吸収(すみれ色)をもつ DsbA-DsbB-メナキノン三者複合体が形成することを発見した(図3)。以上の研究により、メナキノンにより駆動される反応は、ユビキノンの場合とおよそ同一のメカニズムで進行することを明らかにした (J. Biol. Chem. に掲載)。



図3 DsbA-DsbB-キノン複合体でみられる発色

### 4) DsbA-DsbB-ユビキノン三者複合体の X 線結晶構造解析

上に示した DsbB とユビキノンによる DsbA 再酸化反応のメカニズムを検証する意味でも、構造生物学的な裏付けが極めて重要である。そこで本研究者は、さきがけ研究期間中、反応中間状態である DsbA-DsbB-ユビキノン三者複合体の X 線結晶構造解析に最も力を注いできた。異なる 20 種類近くの界面活性剤を用い、結晶化条件の網羅的探索さらには結晶化の妨げと予想されるフレキシブルな領域の切除等を行うことにより、図4に示す 200-300µm のサイズをもつ結晶が再現性良く得られた。この結晶について Spring-8 ビームライン BL44XU にてデータ収集を行ったところ、最大分解能 4.2 Å の回折データが得られた。データセットを収集し解析したところ、この結晶が空間群: C222<sub>1</sub>, 格子定数: a= 69.6 Å, b= 105.0 Å, c=238.2 Å をもつことが判明した。さらに 6.2 Å まで統計処理を行い、R-factor=5.5 % (29.0 %), Completeness = 85.5% (90.1 %) の統計値が得られるに至っている。

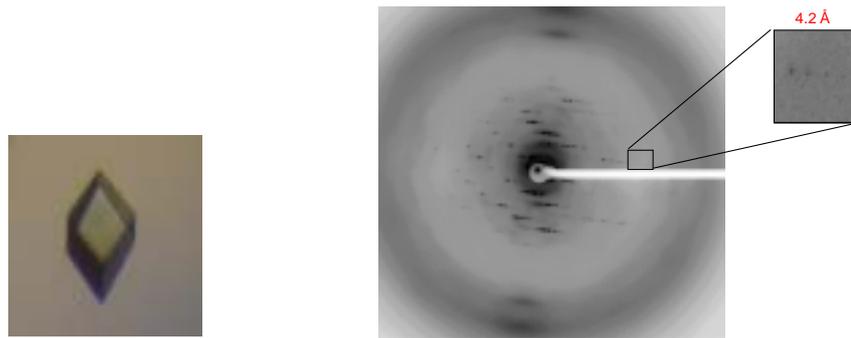


図4 DsbA-DsbB-ユビキノン三者複合体の結晶(左)とその回折データ(右)

さらにこの3ヶ月ほどの間に、さらなる結晶化条件およびコンストラクトの検討を引き続き行った。その結果大きな進展が得られ、図5に示す柱状の結晶が再現性良く得られた。この結晶について実験室系の装置 R-Axis によるデータ収集を行ったところ、最大分解能 3.5 Å の回折点が観測された。現在 Spring8 が停止中であるが、この結晶を放射光を用いてデータ収集すれば、これ以上の分解能が期待される。3 近いフルデータセットが収集できれば、構造決定も十分可能である。現在位相決定のための重原子置換体さらにはセレノメチオニン導入体も検討しており、次の Spring8 での放射光実験に向け、準備を整えている。

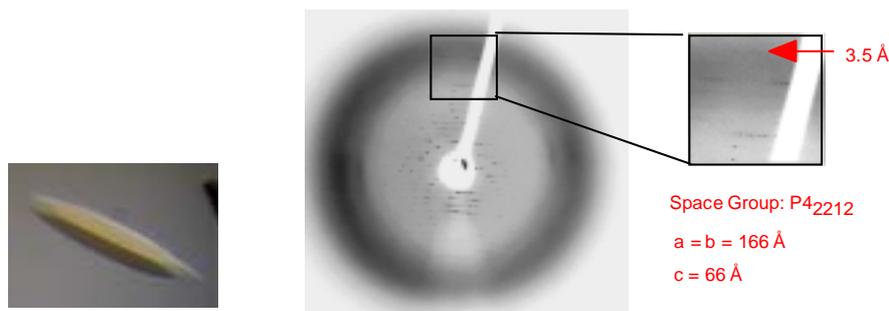


図5 最近得られた DsbA-DsbB-ユビキノン三者複合体の結晶(左)とその回折データ(右)

## 5 自己評価:

大腸菌さらには真核細胞の蛋白質ジスルフィド結合導入システムの反応機構の解明と、それら因子の高分解能構造解析を主要な目的として研究を遂行した。大腸菌のシステムの反応機構については緻密な生化学・分光学・遺伝学的解析を行うことにより、大きな進展が得られ、この分野では世界に先駆けて多くの事項を発見し論文に掲載した。また大腸菌ジスルフィド導入因子の複合体(うち1つは膜蛋白質)の構造解析についても、良質の結晶が再現性良く得られるに至り、構造解析を成就するまであと一步の段階まできている。残念ながらこのさきがけ期間中には構造を解く段階にまでは至らなかったが、来年度中には達成できる手応えをつかんでいる。一方、真核細胞のジスルフィド結合導入システムについては、海外のグループが相次いで構造や反応機構について報告し先を越された感がある。ただしこのシステムに関わる FAD 分子の機能的役割や、Protein Disulfide Isomerase の構造については未解明であり、今後も追求する価値のある仕事である。

## 6 研究総括の見解:

大腸菌の蛋白質ジスルフィド結合導入システムの反応機構解明に関しては良い成果を挙げ、論文は science 誌の記事で取り上げられる等の注目を浴びた。しかし、さきがけ研究での主目的はこの研究者にとっては未知の挑戦である構造解析であった。非常にまともなまっ正面からこの

課題に取り組んできたが、やはり結晶化が難しかった。しかし、最近良質の結晶が得られるようになったということなので、もう一息がんばって欲しい。構造解析というのはこのような分野なのであり、今のところ結果に結びついていないが、良い研究を達成しつつあると思う。評価側は、この段階で軽率な評価を下すべきでないと考えている。

#### 7 主な論文等:

##### 論文

1. Kenji Inaba and Koreaki Ito

"Paradoxical redox properties of DsbB and DsbA in the protein disulfide-introducing reaction cascade"

*EMBO J*, **21**, 2646-2654, (2002)

\* Science 誌 Editor's Choice に掲載される (Vol. 296, p1767 (2002))

2. Kenji Inaba, Yoh-hei Takahashi and Koreaki Ito

"DsbB elicits a red-shift of bound ubiquinone during the catalysis of DsbA oxidation"

*Journal of Biological Chemistry*, **279**, 6761-6768, (2004)

3. Yoh-hei Takahashi, Kenji Inaba and Koreaki Ito

"Characterization of Menaquinone-Dependent Disulfide Bond Formation Pathway of *Escherichia coli*

" *J. Biol. Chem.* **279**, 47057-47065, (2004)

##### 出版物

1. 稲葉 謙次、伊藤維昭

「Oxidative Protein Folding に関わる細胞因子」医学の歩み 印刷中

2. 稲葉 謙次

「Redox status の検出 / SH 基修飾剤」医学の歩み 印刷中

##### 招待講演

1. 稲葉謙次、伊藤維昭

シンポジウム「蛋白質分子のレベルでみるレドックス反応の生体内カスケード」  
「大腸菌における蛋白質ジスルフィド結合導入システムにおける生物物理化学」  
第75回 日本生化学会年会 (於 京都国際会議場) 2002年 10/14-17

2. 稲葉謙次、高橋洋平、伊藤維昭

ワークショップ「タンパク質機能化の細胞内インフラストラクチャー」  
「大腸菌の蛋白質ジスルフィド結合導入メカニズム:パラドックスとソリューション」  
第27回日本分子生物学会年会 (於 神戸ポートアイランド) 2004年 12/8-11

3. Inaba K., Takahashi, Y. and Ito, K.

"DsbB elicits a red-shift of bound ubiquinone during the catalysis of DsbA oxidation."  
Cold Spring Harbor Meeting "Molecular Chaperones and the Heat Shock Responses", New York USA, 2004

##### 学会発表等

1. 稲葉謙次、高橋洋平、伊藤維昭

公募型シンポジウム

「大腸菌における蛋白質ジスルフィド結合導入システムの分子機構」  
第3回 日本蛋白質科学会年会 (於 札幌コンベンションセンター) 2003年 6/23-25

2. Inaba K. and Ito, K.

"Paradoxical redox properties of DsbB and DsbA in the protein disulfide-introducing reaction

cascade.”

Gordon Research Conference on Bacterial Cell Surfaces, New Hampshire USA, 2002

3. Inaba K. and Ito, K.

“Paradoxical redox properties of DsbB and DsbA in the protein disulfide-introducing reaction cascade.”

FASEB Summer Research Conference “Protein Folding in the Cell”, Vermont USA, 2002

## 研究課題評価

1 研究課題名: 2種のプロスタグランジン合成酵素の構造解析と医薬品への応用

2 研究者氏名: 井上 豪

3 研究の狙い:

プロスタグランジン(PG)<sub>D2</sub>やPGF<sub>2</sub>は生体膜由来の局所ホルモンとして、それぞれ、アレルギー情報伝達、子宮平滑筋の収縮という機能を有し、造血器型PGD合成酵素(H-PDGS)およびPGF合成酵素(PGFS)によって生合成されている。本研究では、ヒト由来H-PDGSおよび感染性寄生虫トリパノソマ由来PGFS(TbPGFS)の立体構造をX線回折法により解明し、両酵素の立体構造をもとにした抗アレルギー剤やアフリカ睡眠病の特効薬の開発を目指す。

4 研究結果

I) ヒト由来H-PGDSのX線構造解析とドラッグデザインに関する研究成果

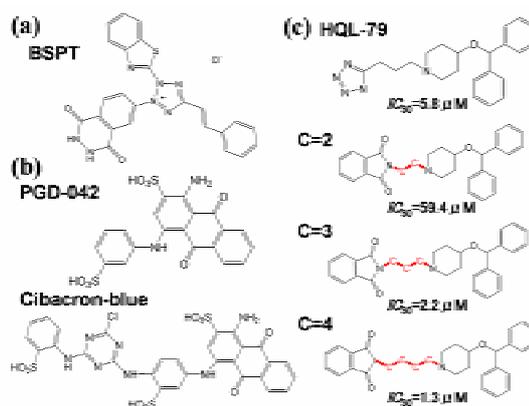
1) Ca<sup>2+</sup>およびMg<sup>2+</sup>結合型のNativeのX線構造を、それぞれ1.8、1.7分解能で解析し、2価イオンが酵素活性を約50%上昇させること、特に、Mg<sup>2+</sup>が補酵素グルタチオン(GSH)のK<sub>m</sub>値を4倍以上下げることを見出した。部位特異的変異の導入および宇宙でのMg<sup>2+</sup>結合型結晶の作製とその解析(1.28分解能)から、そのメカニズムを構造化学的に解明した。

2) 阻害剤BSPT、アントラキノン骨格を共通に有する阻害剤PGD-042とCibacron-blue、経口投与で抗アレルギー効果のあるHQL-79、およびその誘導体との複合体のX線構造解析をCa<sup>2+</sup>およびMg<sup>2+</sup>存在下で行った(右図)。

3) BSPT, PGD-042, Cibacron-blueの3つは、Mg<sup>2+</sup>存在下で阻害率が大きく低下したが、その理由を複合体のX線構造から検証した。生体中ではMg<sup>2+</sup>が高濃度に含まれ、これを考慮した阻害剤の開発が必要であることを提唱した。

4) HQL-79は経口投与で選択的にH-PGDSに作用して、PGD<sub>2</sub>の産生のみを抑制し、抗アレルギー効果のほかに、筋ジストロフィーや脳損傷に対する改善薬として機能することが判明した。1.45分解能の複合体のX線解析、BIACOREを使った表面プラズモン共鳴の実験によりHQL-79の結合様式を詳細に解明した。

5) 阻害剤HQL-79の誘導体3種を合成し、阻害率の測定および複合体の構造解析を行い、阻害率と構造との相関関係に関して知見を得た。



II) プロスタグランジンF合成酵素(PGFS)に関する研究

1) Trypanosoma bruce(Tb), Leishmania major(Lm), Trypanosoma cruzi(Tc)由来のPGFSの結晶学的研究に取り組み、TbPGFSおよびLmPGFSについては、それぞれ2.1、1.8分解能での構造解析に、TcPGFSについては2.0分解能までのデータ収集に成功した。

2) TbおよびLmのPGFSはAKRスーパーファミリーに属し、活性中心に保存するCatalytic tetradについてのMutation実験から、Catalytic dyadで反応が進行することを証明した。

5 自己評価:

H-PGDSについては、1997年にラット由来の構造がCellから報告されたが、ヒト由来の酵素でより高分解能の構造解析に成功し、金属イオンによる活性化の発見に至った。金属イオン周辺の

Mutation 実験や、宇宙で作製した結晶による 1.28 Å 分解能の X 線解析により金属イオン効果を構造化学的に解明することができた。しかし、種々の阻害剤との複合体結晶を  $\text{Ca}^{2+}$  および  $\text{Mg}^{2+}$  存在下で調製する必要が生じ、また、それによって複合体の構造が異なる場合があり、構造機能相関に関する議論が予想以上に困難となった。最終的には、阻害剤の  $\text{IC}_{50}$  値や  $\text{Kd}$  値と複合体構造との相関についての知見がいくつか蓄積され、強力な阻害剤の開発のための構造基盤が構築できた。中でも HQL-79 は、経口投与によるモデルマウスを使った vivo の実験で、抗アレルギー作用以外に、筋ジストロフィーや脳損傷に対する改善効果が観測でき、実用化を目指した誘導化の必要性を感じた。

一方、感染性寄生原虫による血中への大量の  $\text{PGF}_2$  の放出は流産の原因と考えられ、流産防止薬開発のため TbPGFS の X 線構造解析を行った。Mutation 実験の結果から、同じ AKR スーパーファミリーに属する酵素とは異なる反応機構を提唱したが、そのために欧文雑誌への発表が予想外に遅れた。また、結晶化に用いたクエン酸が活性部位に結合して酵素活性を阻害したため、阻害剤複合体結晶が得られず、阻害剤の開発が進展しなかった。最終年度で *Leishmania major* および *Trypanosoma cruzi* 由来 PGFS を PEG を使って結晶化し、今後これら 2 つの構造をもとにした阻害薬の開発を進める責任を感じている。

#### 6 研究総括の見解:

ヒト由来の酵素で高分解能の構造解析に成功し、金属イオンによる活性化の発見を行い、金属イオン効果を構造化学的に解明したことは、大いに評価できる。その後のプロスタグランジン D およびプロスタグランジン F 合成酵素の阻害剤の開発に向けた研究は、蛋白質の構造機能相関研究特有の複雑な問題に直面して難航しているようだ。そのような状況を集中力で突破することがこの分野の一流の研究者には求められていると思う。1 期生や学会のまとめ役も努め、組織にとってかけがえのない働きをしているが、傍の迷惑をも顧みず自分の研究に集中する悪魔的な面も時には研究には必要で、今後はこの難しい問題を克服していかなければならないだろう。

#### 7 主な論文等:

##### 論文

1. T. Inoue, D. Irikura, N. Okazaki, S. Kinugasa, H. Matsumura, N. Uodome, M. Yamamoto, T. Kumasaka, M. Miyano, Y. Kai & Y. Urade. (2003) Mechanism of Metal Activation of Human Hematopoietic Prostaglandin D Synthase. *Nat. Struct. Biology*, 10, 291–296.
2. H. Adachi, K. Takano, Y. Hosokawa, T. Inoue, Y. Mori, H. Matsumura, M. Yoshimura, Y. Tsunaka, M. Morikawa, S. Kanaya, H. Masuhara, Y. Kai, T. Sasaki. (2003) Laser Irradiated Growth of Protein Crystal. *Jpn.J.Appl.Phys.* 42, L798-800 (2003).
3. 井上豪、甲斐泰. (2003) ヒト由来プロスタグランジン D 合成酵素の金属イオン効果のメカニズム. *日本結晶学会誌*, 45, 190-195 (2003).
4. T. Inoue, Y. Okano, Y. Kado, K. Aritake, D. Irikura, N. Uodome, N. Okazaki, S. Kinugasa, H. Shishitani, H. Matsumura, Y. Kai & Y. Urade. (2004) The First Determination of the Inhibitor Complex Structure of Human Hematopoietic Prostaglandin D Synthase. *J. Biochem.*, 135, 279-283.
5. 井上 豪, 甲斐泰\*, 裏出良博. (2005) ヒト造血器型プロスタグランジン D 合成酵素の構造に基づく阻害剤の開発. *有機合成化学協会誌* (2005) 印刷中
6. 井上豪, 裏出良博. (2005) 2 種のプロスタグランジン合成酵素の構造を基にした阻害剤開発. *生物物理学会誌* (2005) 印刷中

##### 特許

1. 特願 2002-084603 プロスタグランジン D 合成酵素の 3 次元立体構造及びその使用

発明者:井上 豪、甲斐 泰、裏出良博、岡野洋介、衣笠茂浩、松村浩由、入倉大祐、  
早石修、山本雅貴、熊坂崇、宮野雅司

出願人:財団法人大阪バイオサイエンス研究所 出願日:平成13年3月25日

2. 特願 2002-171569 ヒト由来プロスタグランジン合成酵素阻害剤

発明者:井上 豪、板井昭子、武藤進、裏出良博、甲斐 泰

出願人:科学技術振興事業団 出願日:平成14年6月12日

3. 特願 2002-350569 プロスタグランジンF合成酵素の結晶化と構造、およびその利用

発明者:井上豪、岡野洋介、KUBATA Bruno Kilunga、裏出良博、甲斐泰

出願人:科学技術振興事業団 出願日:平成14年12月2日

#### 出版物

1. Y. Xie, T. Inoue, Y. Miyamoto, H. Matsumura, K. Kataoka, K. Yamaguchi, S. Suzuki, Y. Kai. (2003) Crystallization and preliminary X-ray crystallographic studies of mavycyanin from Cucurbita pepo medullosa. Acta Cryst., D59, 1474-1476.
2. T. Inoue, S. Suzuki, N. Nishio, K. Yamaguchi, K. Kataoka, J. Tobari, X. Yong, S. Hamanaka, H. Matsumura & Y. Kai. (2003) The significance of the flexible loop in the azurin (Az-iso2) from the obligate methylotroph Methylomonas sp. strain J. J. Mol. Biol., 333, 117-124.
3. Xie Y, Inoue T, Seike N, Matsumura H, Kanbayashi K, Deligeer, Itoh K, Kataoka K, Yamaguchi K, Suzuki S, Kai Y. (2004) Crystallization and preliminary X-ray crystallographic studies of dissimilatory nitrite reductase isolated from Hyphomicrobium denitrificans A3151. Acta Cryst., D60, 2383-2386.
4. Xie, Y. Inoue, T. Miyamoto, Y. Matsumura, H. Kataoka, K. Yamaguchi, K. Nojini, M. Suzuki, S. Kai, Y. (2004) Structural Evidence of pH-induced Change Potential of Mavycyanin form Cucurbita pepo medullosa (Zucchini) J. Biochem., (2005), in press.

#### 招待講演

1. 井上 豪、Structural analysis of Human Hematopoietic Prostaglandin D Synthase for Anti-allergic drug design、第4回アジア結晶学連合会議、(2001)バンガロール
2. 井上豪、ヒト由来造血器型 PGD 合成酵素の X 線構造に基づく阻害剤の開発、第75回日本生化学会大会、(2002)、京都
3. 井上豪、トリパノソーマ由来プロスタグランジン F2a 合成酵素の結晶構造:アルド-ケト還元酵素によるプロスタグランジン F2a の合成に関する知見、第3回日本蛋白質科学会年会、(2003)、札幌
4. 井上豪、ヒト由来プロスタグランジンD合成酵素の金属イオン効果を考慮した阻害剤の開発、平成15年度日本結晶学会年会シンポジウム、(2003)、熊本
5. 井上豪、ヒト由来 PGD 合成酵素の金属イオンによる活性化を考慮した抗アレルギー剤の開発、第26回日本分子生物学会年会、(2003)、神戸
6. 井上豪、造血器型プロスタグランジン合成酵素の X 線構造解析と医薬品への応用、理研構造生物学 IX シンポジウム、(2004)、理研播磨
7. 井上、プロスタグランジン合成酵素の構造を基にした阻害剤開発と創晶プロジェクト、第42回日本生物物理学会シンポジウム、(2004)、京都

## 研究課題別評価

1 研究課題名: たんぱく質の構造機能相関を利用した構造からの機能予測法

2 研究者氏名: 木下 賢吾

3 研究の狙い:

既に数多くの立体構造が明らかにされ、機能情報も十分に蓄積されているモノヌクレオチド結合たんぱく質を足がかりとして、構造と機能の関係を系統的に解析し、そこで得られた知見を利用して、機能未知たんぱく質の機能を推定する方法の開発を目指す。

4 研究成果:

この3年の間だけでも新たに100種以上の微生物以上のゲノムの塩基配列が明らかにされ、全ゲノム配列が明らかにされた生物種は合わせて200種を超えたが、これらゲノム上の遺伝子の約半数が機能未知遺伝子である。生物を分子レベルで理解するためには、これらゲノム上の遺伝子産物であるたんぱく質の機能を同定が急務である。そこで本研究では、従来の配列解析を超えた機能予測法を開発するために、配列 構造 機能という第一原理に則った、立体構造からの機能を予測する方法の開発を行ってきた。

これまでに、低分子との複合体で立体構造が明らかにされているたんぱく質の結合部位データベース (eF-site: <http://www.pdbj.org/eF-site>) を構築し、フォールドレベル、原子レベル、分子表面といった異なったレベルでの構造比較を併用し構造機能相関の系統的な解析を行ってきた。まずモノヌクレオチド結合たんぱく質でのモノヌクレオチド認識の構造的基盤を調べ、続いてたんぱく質機能の最初のステップである基質認識部位の予測法の開発へと発展させてきた。その結果特に、分子表面の形状と静電ポテンシャルの類似性に着目することにより、進化的類縁関係を超えたレベルの類似性を検出できることを見だし、実際に機能未知のたんぱく質に応用できる方法の開発を行うことができた。この方法は基質結合部位の予測であるが、複数の基質結合部位の情報を組み合わせることにより、機能未知のたんぱく質の生化学的な機能を推定できる可能性も同時に示すことができた。

以上の結果、低分子リガンドとたんぱく質の相互作用部位の予測に関しては実用レベルの方法を開発することができつつあり、実際に結構解析を行っている研究者との共同研究として、機能未知のたんぱく質に応用し、有望な結果を得ることができてきている。また分子表面の形状と物性に着目することにより、高い精度でたんぱく質のDNA結合部位を予測する方法を構築することもできた。

5 自己評価:

本研究テーマの期間中に予測法の開発という観点では非常に良い物ができつつあるが、構造機能相関に関する一般的なルールや知見の発見という観点ではまだ納得いく結果を得られていない点が心残りである。構造機能相関の一般論という大きなテーマに関しては、今後もねばり強く取り組んでいきたいと思っている。また今回開発した方法に関して、既知の物での性能評価は良い結果をあげることができているが、機能未知のたんぱく質に関する結果についての直接的な実験での証明が、まだ十分でないのが残念である。今後も継続して実験での検証を進め、方法の改善をしていきたいと考えている。今回構造からの機能予測法を開発してみて、改めてこのような研究の重要性を痛感するとともに、化学的な機能のみならず生物学的な機能に関しても構造から何らかの知見を得られるような方法の開発を模索していきたいと考えるようになった。

## 6 研究総括の見解:

分子表面および表面上の静電ポテンシャルの類似性に着眼して、機能未知蛋白質の機能を予測する機能部位データベースの開発に成功した。国内外で高く評価されている。ともすると安きに就きやすいバイオインフォマティクス研究において、よく頭を使った研究を進めていて、将来が期待できる。本研究はH16年度SORST研究に採択されたので、今後蛋白質同士の相互作用による構造予測法に繋がることを期待している。

## 7 主な論文等:

### 論文

1. Kinoshita, K and Nakamura, H. Identification of the ligand binding sites on the molecular surface of proteins, *Protein Science*, 2005 in press
2. Tsuchiya, Y., Kinoshita, K. & Nakamura, H. PreDs: a server for predicting dsDNA-binding site on protein molecular surfaces. *Bioinformatics*, 2005 in press.
3. Nameki N, Yoneyama M, Koshiba S, Tochio N, Inoue M, Seki E, Matsuda T, Tomo Y, Saito K, Kobayashi N, Yabuki T, Aoki M, Nunokawa E, Matsuda N, Sakagami N, Terada T, Shirouzu M, Yoshida M, Hirota H, Osanai T, Tanaka A, Arakawa T, Carninci P, Kawai J, Hayashizaki Y, Kinoshita K, Guntert P, Kigawa, Yokohaya S, Solution structure of the RWD domain of the mouse GCN2 protein, *Protein Science*, 13, 2089-2100, 2004
4. Tsuchiya Y, Kinoshita K, Nakamura H. Structure-based prediction of DNA-binding sites on proteins using the empirical preference of electrostatic potential and the shape of molecular surfaces, *Proteins: Struct. Funct. Bioinformatics*, 55, 885-894 (2004)
5. Koike R, Kinoshita K, Kidera A. Probabilistic Description of Protein Alignments for Sequences and Structures, *Proteins: Struct. Funct. Genetics*, 56, 157-166 (2004)
6. Kinoshita K and Nakamura H. eF-site and PDBjViewer: Database and Viewer for Protein Functional Sites. *Bioinformatics*, 20, 1329-1330 (2004)
7. Matsuda K, Nishioka T, Kinoshita K, Kawabata T, Go N. Finding evolutionary relations beyond superfamilies: Fold-based superfamilies, *Protein Science*, 12, 2239-2251 (2003)
8. Kinoshita K and Nakamura H. Identification of protein biochemical functions by similarity search using the molecular surface database, eF-site. *Protein Science*, 12, 1589-1595 (2003)
9. Handa N, Terada T, Kamewari Y, Hamana H, Tame JRH, Park SY, Kinoshita K, Ota M, Nakamura H, Kuramitsu S, Shirouzu M, and Yokoyama S. Crystal structure of the conserved protein TT1542 from *Thermus thermophilus* HB8. *Protein Science*, 12, 1621-1632 (2003)
10. Kinoshita K and Haruki Nakamura. Protein informatics towards function identification, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 13, 396-400. (2003)
11. Ota M, Kinoshita K and Nishikawa K Prediction of catalytic residues in enzymes based on known tertiary structure, stability profile, and sequence conservation., *J Mol Biol*, 327, 1053-1064 (2003)
12. Koike R, Kinoshita K, and Kidera A. Ring and zipper formation is the key to understanding the structural variety in all-beta proteins, *FEBS Lett*, 533, 9-13. (2003)
13. Kinoshita K, Furui J, and Nakamura H. Identification of Protein Functions from a Molecular Surface Database, eF-site, *J. Struct. Funct. Genomics*, 2, 9-22. (2002)
14. Matsushita K, Kinoshita K, Matsuoka T, Fujita A, Fujikado T, Tano Y, Nakamura H, and Kurachi Y. Intramolecular interaction of SUR2 subtypes for intracellular ADP-Induced differential control of K(ATP) channels, *Circ Res*, 90, 554-61. (2002)
15. Sawada Y, Kinoshita K, Akashi T, Aoki T, and Ayabe S. Key amino acid residues required

for aryl migration catalysed by the cytochrome P450 2-hydroxyisoflavanone synthase, *Plant J*, 31, 555-64. (2002)

#### 出版物

1. 木下賢吾、タンパク質の表面物性の類似性にもとづく機能予測、生物物理、44, 150-154 (2004)
2. 木下賢吾、中村春木、蛋白質構造から見た生物情報、バイオインフォマティクス、応用生命科学シリーズ9 (東京化学同人)、美宅成樹、榊佳之編、164-190, 2003
3. 中村春木、神谷成敏、肥後順一、木下賢吾、たんぱく質の立体構造に基づく物理情報学、応用物理、71, 1474-1480 (2002)
4. 木下賢吾、中村春木、タンパク質分子表面形状と物性のデータベースeF-siteによる分子機能類似性検索、生物物理、42, 20-23, (2002).
5. 木下賢吾、蛋白質立体構造と機能の関係についてのデータベースからの知見、蛋白質核酸酵素、47, 1064-1075、(2002).
6. 木下賢吾、蛋白質立体構造と機能の関係、医学の歩み、200、609-614、(2002)

#### 特許

1. 特願2003-279375 三次元構造データベースから特定のリガンドが結合した生体高分子を検索する検索方法、検索装置、検索プログラム及び記録媒体  
出願人: 科学技術振興事業団 出願日: 2003年7月24日、
2. 特願2002-365709 データ処理装置、データ処理方法、データ処理プログラム及び記録媒体  
出願人: 科学技術振興事業団 出願日: 2002年12月17日、

#### 招待講演

1. Kinoshita K, Identification of the ligand binding sites on the molecular surface of proteins., The Fourth KIAS Conference on Protein Structure and Function: Theories and Computer Simulations of Proteins, 2004
2. Kinoshita K. Identification of protein biochemical function from molecular surface analysis, International Workshop: Integrated Databases and DataGrid for Structural Biology and Molecular Biology, 2004
3. Kinoshita K. Identification of protein biochemical function from molecular surface analysis, , Second Asian Joint Workshop for Protein Informatics, 2003
4. 木下賢吾、Identification of protein biochemical function from molecular surface analysis, 生物物理学会, 2003年
5. 木下賢吾、分子表面の形状及び物性の類似性検索による蛋白質の生化学機能部位の推定, 蛋白質科学会, 2003年
6. Kinoshita K, Tsuchiya Y, Nakamura H. Analysis of complementarity of protein-DNA interactions using the molecular surface database, eF-site, ICSG2002, 2002

## 研究課題別評価

1 研究課題名：色素タンパク質による生体機能の時空間的な不活性化法の確立

2 研究者氏名：永井 健治

3 研究の狙い：

光増感物質は特定波長の光をあてると酸素の存在下で反応性の高い活性酸素を産生する。本研究は、cDNA にコードされた光増感物質を開発し、細胞内小器官やある組織中の任意の細胞種に特異的に発現させ、光照射によりそれらを破壊することにより、細胞内小器官や細胞の役割を調べる方法を開発することが狙いである。

4 研究成果：

特定の外界刺激に応じて、細胞内では特定のシグナル伝達反応が起こり、細胞の分化、形態変化、分裂、死などの現象が誘起される。こうした細胞内の情報伝達に関わる分子群とそれらの相互作用に関する知見は我々の頭では記憶できないほど蓄積している。ある分子種を過剰発現させたり、あるいは欠失させる実験により、どの分子がどの現象に関与しているのかも明らかになってきた。しかし、これらの知見からは生物の持つ“やわらかさ”や“堅牢さ”を理解することは難しい。情報伝達が時空間的にどのように広がっていくのか？、その過程で恣意的な摂動を加えたとき、細胞はどのように反応するのか？等々の知見を蓄積していくことにより、より包括的な生理現象への理解に踏み込むことができるであろう。細胞内の情報伝達がいつ、どこで、どの程度起きるのかを把握できる可視化技術が近年目覚しく発展しつつある。その一方で、ある分子を任意の時間と場所で思い通りに欠失させたり、過剰発現させる技術は未だ発展途上と言わざるを得ない。顕微観察装置(光技術)の発展もさることながら、蛍光タンパク質という、蛍光性が“遺伝子”にすべて書き込まれている分子の登場が可視化技術の発展に欠かせない1つの要因であった。ならば、ある分子の時空間的な生理機能も“遺伝子”と光の技術で操作することはできないであろうか？

蛍光物質は光のエネルギーを吸収し、そのエネルギーを蛍光というエネルギーの形で放出する。もし光のエネルギーを吸収するが、蛍光を出さなくなったら吸収したエネルギーはどうやって放出されるのであろうか？1つには熱として放出する場合が考えられる。あるいは光増感とよばれる過程により活性酸素などのラジカルを産生するエネルギーに使われる場合もありうる。活性酸素はその反応性の高さゆえ、それが発生した近傍の分子のみを破壊するに違いない。この発想に基づき、Daniel Jay は 1988 年に CALI(chromophore-assisted laser inactivation)法を開発した。CALI 法は 628nm に極大吸収をもつ無蛍光性のマラカイトグリーン色素を抗体に標識し、その抗体による特異的結合で標的分子を特定化し、その上で強光を照射すると色素から活性酸素が生じて標的分子を機能的に破壊するというものである。本方法を利用して、これまでいくつかの分子機能解析が行われてきた。しかしながら、標的分子の機能を阻害しない抗体を使用しなければならない、色素標識抗体をマイクロインジェクションにより細胞に導入しなければならない、出力の大きなレーザーを用いなければならない等々の制約があり、誰もが容易に使える技術にはなっていない。もしマラカイトグリーン色素と同等の能力を有する分子を遺伝子的に作成できれば、少なくとも上記制約の前2者は解決され、生物学研究の様々な分野で利用されるようになると期待される。このような背景から「吸光性は有るが蛍光性の無い“色素タンパク質”で尚且つ光増感活性(活性酸素産生能)を持つものを作成することにより光照射依存的に特異的生理機能を不活性化できる新技術を開発することができるかもしれない」と考えた。先ず無蛍光性変異体を得るためにオワンクラゲ由来緑色蛍光タンパク質およびその蛍光色変異体にランダム変異や点変異または円順列変異を導入した。その結果モル吸光係数の大幅な低下をもたらすことなく蛍光量子収率を減少さ

せることができた。特に、黄色蛍光タンパク質に円順列変異と幾つかの点変異を導入したものはモル吸光係数が約  $2 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ 、蛍光量子収率が 0.1 以下となり、希望に近い特性をもつものとなった。ところが、これらの蛍光・色素タンパク質が光照射依存的に活性酸素を産生するかどうか調べたところ、有意に産生するものは得られなかった。その理由は、産生した活性酸素のほぼ全てが自らの破壊に使われる、より詳しくは、使用した蛍光タンパク質の構造上(光吸収する色素団がタンパク質の中心にある)発生した活性酸素が色素団の破壊に使われ、タンパク質の外側に出て行かなかったからであると推測された。

しかしながら、この研究過程で作成した円順列変異蛍光タンパク質を含む多くの蛍光・色素タンパク質を捨ててしまうのはあまりにも忍びないため、何か他に用途はないものかと思案に明け暮れた。元来、私は蛍光タンパク質を用いた生理機能の可視化を専門としていたのだが、そのような技術の一つである FRET(蛍光のエネルギー移動)を用いた機能指示薬の作成に利用できるのではないかと考えた。その結果、シグナル変化量が極めて大きな GFP 間 FRET ベースのカルシウムセンサーを開発することができた。本方法は積極的にドナーとアクセプターの相対的角度を変える方法であり、FRET を利用したバイオセンサー開発にとって必須の方法論になるものと期待される。(Nagai et al., PNAS 2004)。本技術は原理的に蛍光タンパク質間の FRET を利用したあらゆる機能指示薬の開発に応用可能である。

さて、本業の光照射依存的な生理機能破壊については、アプローチの仕方を変え「強力な光増感活性を持つ有機化合物の探索と、その化合物を蛍光タンパク質に標識することにより複数種の生理機能の個別的破壊を“遺伝子的”に行う」技術の開発に専心した。その結果、現在 CALI 法における色素増感物質として頻用されている fluorescein よりも効率よく活性酸素(一重項酸素)を光照射により産生する色素として 5-bromo-fluorescein を見出した。さらに、緑色蛍光蛋白質(GFP)から光増感物質への蛍光エネルギー移動を利用して、光増感物質の最適波長とは異なる波長で励起させることにより活性酸素を産生し、複数種の標的生理機能を不活性化させる技術ならびに GFP の N 末側と遺伝的に連結した任意の標的蛋白質を発現する細胞に、光増感物質標識した GFP の C 末側を導入することで、GFP の構造を回復させ、GFP から光増感物質への蛍光エネルギー移動を利用して、光増感物質より活性酸素を産生させ、任意の標的蛋白質やオルガネラを不活性化させる方法を確立することができた(論文投稿準備中)。

## 5 自己評価:

申請時に提案した課題は方法論的には上手く行かなかったが、様々な試行錯誤を経て当初の目的になかった技術を開発することができた。さらに、その試行錯誤の過程で作成した蛍光タンパク質を利用することによって、GFP 間 FRET を利用した高性能バイオセンサーの作成技術を開発できた。何れの技術も汎用性の高い技術であり、多くの研究者が利用するものと思われる。

## 6 研究総括の見解:

当初は、狙い通りに中々進まず苦しい時期を経験したが、発想を転換して高感度の機能指示薬を開発し数件の特許出願に結びつけた。また色々試行錯誤して狙いの不活性化を達成するなど粘り強さは評価できる。領域会議やシンポジウムでも積極的に発言し後続の研究者にも良い影響を与えた。

## 7 主な論文等:

### 論文

- 1.Nagai T, Yamada S, Tominaga, T, Ichikawa M & Miyawaki A. Expanded dynamic range of fluorescent indicators for  $\text{Ca}^{2+}$  by circularly permuted yellow fluorescent proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 10554-10559, 2004
- 2.Okamoto K, Nagai T, Miyawaki A & Hayashi Y. Rapid and persistent modulation of actin dynamics

regulates postsynaptic reorganization underlying bi-directional plasticity. *Nat. Neurosci.* 7: 1104-1112, 2004

3. Nagai T & Miyawaki A. A high-throughput method for development of FRET-based indicators for proteolysis.

*Biochem Biophys Res Commun.* 319: 72-77, 2004

4. Takemoto K, Nagai T, Miyawaki A & Miura M. Spatio-temporal activation of caspase revealed by indicator that is insensitive to environmental effects. *J. Cell Biol.* 160: 235-243, 2003

5. Rekas A, Alattia JR, Nagai T, Miyawaki A & Ikura M. Crystal structure of Venus, a yellow fluorescent protein with improved maturation and reduced environmental sensitivity. *J. Biol. Chem.* 277: 50573-50578, 2003

6. Nagai T, Ibata K, Park ES, Kubota M, Mikoshiba K & Miyawaki A. A variant of yellow fluorescent protein with fast and efficient maturation for cell-biological applications. *Nat. Biotechnol.* 20: 87-90, 2002

他 8 報

#### 出版物

1. 永井健治、宮脇敦史 "GFP を利用した蛍光バイオセンサーの作成法と生体機能の可視化" 遺伝子医学 MOOK 別冊、Medical Do、印刷中

2. Miyawaki A, Nagai T & Mizuno H. Genetic Probes for Calcium Dynamics. Yeste et al. eds. *Imaging Neurons-A Laboratory Manual-*, CSHL PRESS, in press

3. Nagai T & Miyawaki A. Application of Green Fluorescent Proteins in Cell Biology. *Cytometry Research*, 13, 1-10, 2003

他 7 報

#### 特許

1. 特開2004-347430 標的物質の生理的機能を解析する方法

発明者: 永井健治、宮脇敦史 出願人: 科学技術振興機構・理化学研究所  
外国出願済

2. 特開2004-340663 光共焦点スキャナ

発明者: 永井健治、宮脇敦史・御厨健太、田名網健雄、関直樹  
出願人: 科学技術振興機構・理化学研究所・横河電機  
外国出願済

3. 特開2004-187544 FRETを利用した蛍光指示薬

発明者: 永井健治、宮脇敦史 出願人: 科学技術振興機構・理化学研究所  
外国出願済

他、4 件

#### 招待講演

1. Nagai T. Fluorescence imaging technologies for visualizing biological functions. The symposium on Imaging Technologies of Live Cells and Animals. Helsinki, Finland (2004.11)

2. Nagai T. Opening new windows for future biology by using GFP technologies. Blue Seminar at EMBL, Heidelberg, Germany (2003.8)

3. 永井健治 "GFPを用いた細胞機能のライブイメージング" 第25回日本分子生物学会ワークショップ、横浜、2002年12月

国際: 他 2 件

国内: 他 2 2 件

## 研究課題別評価

1 研究課題名:新規機能創製を目指した酵素蛋白質の立体構造・触媒機構の系統的解析

2 研究者氏名:長野 希美

3 研究の狙い:

従来の酵素の分類法では、酵素蛋白質の立体構造や触媒機構を考慮しているものが殆ど存在していなかった。そこで、酵素の機能である触媒機構を反応のタイプ、各反応ステップや酵素・補酵素・基質・産物の立体構造に基づいて系統的に解析・分類し、データベース化することを狙いとした。また、酵素の新規機能を開発することを目指すために、立体化学を考慮した触媒機構を可視化することも狙いとした。

4 研究成果:

(1) 酵素触媒機構の系統的解析

酵素の立体構造、リガンドの化学構造、酵素とリガンドの相互作用など様々な角度から酵素の触媒機構を詳細に理解することから、その酵素に特有な阻害剤・活性化剤などをデザインすることが可能となると考えられる。

しかしながら、酵素に関わる情報学はまだ十分に整理されているとは言えない。従来の酵素の分類である酵素番号は、主に基質・産物の化学構造や触媒反応に関わる補酵素などに基づいて分類が行われており、触媒機構において重要であるタンパク質の配列情報や立体構造に関する情報が全く考慮されていない。例えば、異なるフォールドやスーパーファミリーに属する酵素でも、類似の反応を触媒することもある反面、同じ配列ファミリーに属する酵素でも異なる戦略で触媒機能を担うこともある。酵素番号は、そのような詳細な触媒機構を反映した分類法ではない。また、酵素によっては、1種類の反応だけでなく、複数の基本反応を組み合わせた複雑な反応を触媒することもあるが、そのような場合、一つの酵素番号だけで触媒機構を表現するのは困難である。

他方で、蛋白質の立体構造のデータは、現在、Protein Data Bank (PDB) に2万エントリー以上、登録されている。このうち酵素の立体構造データには、蛋白質のみならず、基質・産物・補酵素や反応中間体、あるいはそのアナログ化合物や遷移状態のアナログなど重要なリガンド情報も多数含まれており、PDB そのものが、創薬を行う際の、リード化合物に関する有用情報の宝庫となっていると考えられる。それにも関わらず、PDB などの従来の立体構造データベースでは、酵素蛋白質とリガンドとの関係がアノテーションされていない。

そこで、構造生物学や創薬を支援する観点から、酵素の活性部位とリガンドの反応部位に特に注目し、酵素立体構造のPDB データにおけるリガンドのアノテーションから酵素触媒機構まで包括的に取り入れて、酵素の系統的な分類まで行った、酵素触媒機構データベース・EzCatDBを開発した。このデータベースに関しては、*Nucleic Acids Research* の Database 号に掲載された。

(2) 酵素に結合する化合物の解析

従来の酵素関連のデータベースでは、初期化合物である基質及び最終化合物である産物の化学構造などは解析・分類されているが、触媒反応の過程で生成する中間体、あるいは遷移状態の構造に注目されてはいなかった。しかしながら、酵素の触媒機構を考慮する上では、こうした途中過程の化合物の構造も解析しなければいけないと考え、EzCatDB では、そうした化合物やそれらの類似化合物を解析した結果を検索できるようにした。

PDB の酵素データを解析すると、中間体化合物もしくはその類似化合物(アナログ)が結合しているケースが非常に多いことが分かった。また、基質や産物のアナログ化合物だけでなく、こうした中間体・遷移状態などのアナログ化合物から阻害剤などもデザインできると考えた。

(3) 酵素触媒機構の階層的分類法の開発

本研究では、酵素の活性部位とリガンドの反応部位を考慮して、加水分解反応、転移反応に関して、次のような階層的分類(RLCP)を行った。

第1階層;基本反応(R)、

第2階層;リガンドの反応部位の構造(L)、

第3階層;触媒機構の種類(C)、

第4階層;酵素側の触媒残基、補酵素の種類など(P)

ここで、第1、第2階層は、基本的に従来の酵素番号と相関のある分類であるが、第3、第4層では、それぞれ、触媒機構、活性部位の構造を考慮している。ここで、第3層の触媒機構は、触媒機構を酵素・リガンド分子の分子内・分子間の小ネットワークとして捉え、触媒基がどのように作用しているかを記述することによって、分類を行っている。

この触媒機構分類 RLCP は、従来の酵素番号による分類と比べて、酵素活性部位の構造と機能との関係を大きく反映するということが分かってきた。

例えば、リガーゼ酵素類の場合、通常、燐酸転移反応の後にアシル基などの転移反応を触媒することが多い。リガーゼ類の活性部位の構造を解析すると、燐酸転移酵素の活性部位とアシル基転移酵素の活性部位の特性を併せ持つことが分かった。従来の酵素番号では、EC 2.-.-.-に分類される転移酵素とは全く別個に、リガーゼは、EC 6.-.-.-に分類される。しかしながら、本研究で構築した階層的触媒反応分類 RLCP を用いると、2種類の転移反応、燐酸転移反応とアシル基転移反応で記述することができる。

つまり、このような触媒機構の階層分類は、蛋白質のドメイン構造の階層的分類(SCOP、CATH)<sup>3,4</sup>と同様に扱うことができる。蛋白質立体構造の場合、各ドメインに対して、それぞれの構造分類を割り当てるのに対して、この触媒機構分類 RLCP では、各素反応に対して、触媒反応分類を割り当てられる。したがって、単一ドメイン、単一反応に対しては、一つで記述することができるが、複数のドメインから成るマルチ・ドメイン蛋白質、複数の反応で構成される触媒反応に対しては、複数の分類で記述することになる。従来の酵素番号が、酵素の名前に対応するのに対して、触媒機構分類 RLCP は各反応に対応することになる。

加水分解反応、転移反応と同様の手法で、脱離反応、付加反応など他の反応の解析・分類法の開発も進めた。

#### (4)3次元的な酵素触媒機構表示法の開発

PDB の酵素立体構造データは、触媒機構の一部のステップ、スナップショットしか示していない。また、従来の酵素触媒機構は、模式的な図でしか表現されていないことが多い。そこで、創薬を目指す観点からは、立体的な機構を考慮することも重要であると考え、酵素触媒機構の各ステップを三次元的なモデルで表現するシステム、3D-EzCat<sup>1,5</sup>も開発した。

本研究では、PDB に登録されている立体構造データを基に、このような触媒機構をモデリングし、さらに開発した 3D-EzCat で表示することに成功している。このように触媒機構を立体的に表現して解析することは、酵素の立体構造解析結果が増えていくにつれて、重要になってくると考えられる。

#### 5 自己評価:

本研究では、加水分解酵素、転移酵素、異性化酵素やリガーゼ酵素の反応に関して、各基本反応に分割すれば、酵素反応を系統的に記述・分類することを可能にした。

蛋白質のアミノ酸配列、立体構造に関しては、既に様々な比較方法が確立されてきているが、機能に関しては、比較することすら難しかった。本研究では、一見、複雑な酵素の触媒機能を小ネットワークとして捉えることにより、重ね合わせて比較することを可能にした。数多くの酵素蛋白質の触媒機構を解析し、試行錯誤の末に、このような酵素機能の比較方法を世界にさきがけて見出すことができた。また、解析した酵素触媒機構の分類結果をデータベース化し一般公開することも研究期間終了までに遂行することができた。また、このデータベースに関しては、*Nucleic Acids*

ResearchのDatabase号に掲載することもできた。こうした結果は、酵素蛋白質酵素蛋白質の立体構造や触媒機構を考慮して、酵素の触媒機構を分類しデータベース化するという当初の目標を達成したと言えると思う。この研究期間で得られた成果を更に発展させ、従来の酵素番号に替わる配列・立体構造を加味した新しい酵素の分類法へと発展させていくことができると考えている。また、蛋白質の立体構造と機能との関係を研究するのもにも貢献できると考えている。

また、酵素触媒機構表示システム、3D-EzCat を開発し、いくつかの酵素触媒機構を立体的に表現することができたので、立体化学を考慮した触媒機構を可視化するという目標に関しても達成することができたと思う。

#### 6 研究総括の見解:

たんぱく質の機能に関する比較方法に着目し、酵素触媒機構の分類データベースや表示システムという研究ツールを作成し公開したことは評価できる。研究課題に新規機能創製とあるように、今後は新規な機能を有する酵素のモデリング等が出来るよう、本研究を実用に向けて発展させてほしい。

#### 7 主な論文等:

##### 論文

1. Nozomi Nagano, Christine Orenge & Janet Thornton (2002) One fold with many functions - The evolutionary relationships between TIM barrel families based on their sequences, structures and functions. *J. Mol. Biol.* **321**, 741-765.
2. Nozomi Nagano. (2005). EzCatDB: The Enzyme Catalytic-Mechanism Database. *Nucleic Acids Research, Molecular Biology Database on-line compilation 2005*, 613, Online Journal, <http://www3.oup.co.uk/nar/database/summary/613>.
3. Nozomi Nagano. (2005). EzCatDB: The Enzyme Catalytic-Mechanism Database. *Nucleic Acids Research*, **33** Database Issue, D407-D412.

##### 特許

#### 1. 特願 2003-306705

蛋白質機能発現機構表示のための蛋白質構造三次元表示システム

発明者:長野希美 出願人:産総研・科学技術振興機構 出願日:2003年8月29日  
PCT/JP2004/012118(PCT出願日:2004/08/24)

##### 招待講演

1. 長野希美 Glycosidase TIM バレル・スーパーファミリーの立体構造に基づく機能・触媒機構、*GenProC2002 構造ゲノム科学としての情報生物学 - 代表タンパク質の全立体構造が明らかになるときに -*、東京・お台場、平成 14 年 1 月 13 日
2. 長野希美 TIM バレル型糖加水分解酵素スーパーファミリーの構造と機能、*第 218 回 CBI 学会研究講演会「生体高分子情報計算」*、東京・お台場、平成 14 年 5 月 20 日
3. 長野希美 Sequence, structure and function of glycosidase enzymes with TIM barrel folds. *Polish-Japanese Symposium on Bioinformatics*, Poland (Poznan), 平成 14 年 6 月 24 日 - 25 日
4. 長野希美 One fold with many functions- Overview of TIM barrel families (TIM バレル・ファミリーの構造機能分類) *DNA 工学研究会* 東京・お台場、平成 14 年 10 月 9 日
5. Nozomi Nagano. One fold with many functions The analyses of TIM barrel superfamilies based on sequences, structures and functions. *The Second Asian Joint Workshop for Protein Informatics*.大阪、平成 15 年 2 月 28 日

6. 長野希美 配列・立体構造・機能に基づくTIMバレル・フォールドの系統的解析、日本進化学会第5回大会「構造ゲノミクスの時代は分子進化研究にどのようなインパクトを与えるか？」ワークショップ(依頼講演)、九州大学(福岡)、平成15年8月3日
7. 長野希美 酵素触媒機構データベース: EzCatDB - 酵素機能解明から創薬へ 文部科学省科学技術振興費新興分野養成・バイオインフォマティクス第3回「産総研生命科学人材養成コース」シンポジウム、東京・台場・未来科学館 平成16年10月1日
8. 長野希美 酵素の立体構造に基づく触媒反応の解析・分類 第3回生物情報ネットワーク研究会(東京大学医科学主催) 東京・目黒・医科学研究所 平成16年11月25日
9. 長野希美 立体構造、文献情報に基づく酵素触媒反応の解析・分類法 生命知識研究会(SIGBMK) (依頼講演) 東京・台場・産総研 平成16年12月2日
10. 長野希美 酵素触媒反応の階層分類 第27回分子生物学会年会 (招待講演) 神戸・ポートピアホテル 平成16年12月11日

データベース:

1. 酵素触媒機構データベース: EzCatDB 平成16年10月4日公開  
<http://mbs.cbrc.jp/EzCatDB/>

## 研究課題別評価

1 研究課題名: 2光子励起法を用いた生体膜融合分子機能の顕微解析とシステム化

2 研究者氏名: 根本 知己

3 研究の狙い:

開口放出や細胞分画間の小胞輸送における生体膜融合過程は、広く進化上保存されている可溶性 N-エチルマレミド感受性因子 (NSF) 結合タンパク質受容体 (SNARE) 連関タンパク質群によって引き起こされると考えられている。特に、開口放出の初期に形成される融合細孔の形成に先立ち、小胞膜の v-SNARE (VAMP2) と細胞膜の t-SNARE (SNAP23, syntaxin2) が安定な4重ヘリックス構造を形成し、複合体を形成することが必要であると生化学・分子生物学的には提唱されている (SNARE 仮説)。しかし、生体組織においてこのSNARE仮説は真に成立し得るかといった点を含め、この超分子複合体がどのように物理的な脂質2重膜間の融合を引き起こすのか、その作用機序や生理的機能を含め未解明である。そこで、本課題では、先端的光学技術と遺伝子工学を組み合わせ、SNARE 分子及びその関連する分子の in vivo リアルタイム可視化を実現し、Ca<sup>2+</sup>依存性開口放出やその制御機構を解明することを目指した。

4 研究の成果:

本研究で用いた膵臓外分泌腺細胞は、極めて強い極性を持ち、基底膜上にはアゴニスト受容体、腺腔膜側には消化酵素源を濃縮貯蔵した直径 1µm もの分泌小胞が集積する。それ故、生合成、調節性開口放出等のモデルとして広く用いられてきた。アゴニスト刺激は細胞内カルシウム濃度 [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 上昇を惹起し、開口放出を引き起こす。本研究者は2光子顕微鏡を用いて構造として融合細孔形成と Ca<sup>2+</sup>波動の同時可視化に成功していた。さらに腺腔膜上で開口放出を起こした分泌小胞の膜が腺腔膜と融合し完全に平坦化する前に、隣の標的膜として供され、2次的な開口放出が生じることを世界にさきがけて明らかにしていた (逐次開口放出)。

### 膵臓外分泌腺初代培養法の確立

細胞の極性を損なうことなく真の開口放出現象を可視化する必要があるため、蛍光タンパク質と標的タンパク質の融合タンパク質の発現の為に、組織的な構造を保持し生理機能を維持できる初代培養細胞系を確立することが必須であった。しかし、既存の手法では、極めて短時間で形態変化からネクローシスを至る。そこで、極性を維持するためコラーゲン・ゲルでチェンバーをコーティングすることや、様々な培養条件を検討した結果、Waymouth's medium をベースにした培養液を用いることで、問題を解決した。さらに、プラスミドをコートした金粒子の高速打込やアデノウィルスを用いて旧来のインジェクション法よりも効率的に外来性遺伝子を発現することに成功した。

### SNARE 仮説と逐次開口放出分子モデルの検証

t-SNARE 分子は組織化学的には腺腔膜に局在することが示唆されていたため、SNARE 仮説が成立することを前提とした逐次開口放出の分子的なモデルを提出していた。即ち、syntaxin and/or SNAP23 が、連続化した小胞膜を側方拡散し、深部顆粒上の VAMP2 と SNARE 複合体を形成し、2次的な開口放出を起こすと想定した。

そこで、2光子断層イメージングの色収差が無く、かつスペクトルの広い同時多重染色性を活用し、蛍光デキストランにより細胞構造と他の蛍光分子の空間関係とを、高精度で判断することを可能とした。蛍光抗体法により syntaxin-2 が腺腔膜に局在することを確認した。さらに SNAP23 をクローニング、EGFP-SNAP23 発現用アデノウィルスを研究協力者に作成依頼した。この発現により SNAP23 の局在性を初めて示した。

さらに、SNARE 仮説の検証を行うために、遺伝子工学的に SNARE コアタンパク質の機能阻害を導入した。対照群 (野生型 syntaxin-2 を過剰発現) では盛んに逐次開口放出が観察された一方で、安定なコア複合体が形成できない syntaxin-2 変異体を過剰発現させた細胞では、構造発生が完全に阻害された。また、開口放出を起こした顆粒膜へ SNAP23 が拡散することを可視化することに成功した。逐次開口放出には融合した小胞膜への SNAP23 の側方拡散が重要である。

尚、この新規的な様式「逐次開口放出」は、本研究者の研究グループはもとより内外からも、膵臓細胞、副腎髄質クロマフィン細胞、PC12細胞など他の分泌細胞においても報告されつつあり、細胞生物学的に一般的で基本的な様式である可能性が出てきた。

#### 融合細孔形成の制御因子

##### -1. アクチン=バリア説の検証と急性膵炎の病因

細胞膜直下のアクチン被覆は、膜融合の物理的障壁となっているのではないかどうか(アクチンバリア説)は長年の議論の的であった。EGFP-アクチンと開口放出を同時可視化することに成功し、アクチンは開口放出を起こした顆粒膜で急激に重合することを初めて明らかにした。この被覆形成を阻害すると、構造は不安定化し、病理的な空胞形成が生じ、急性膵炎へと導かれていくことから、アクチン被覆は細胞極性の破壊を防ぎ、生理的な開口放出の進行に重要であることが判った。さらに、ケージドカルシウムの閃光活性化が可能なシステムを新たに構築することにより、開口放出の速度を定量的に計測した結果、腺腔膜直下のアクチンも顆粒膜のものも、開口放出の速度を遅くしているが、分泌可能顆粒のプールサイズには影響を与えなかった。ここで、開口放出への準備状態は最外層でも内部でもほぼ等しいことから、逐次開口放出のモデルでは、SNARE複合体の形成は刺激後に起きることを予言する。従って、アクチン被覆はt-SNAREの側方拡散係数を下げることを通じ、SNAREコア複合体形成に要する時間を長くするものの、複合体形成自体は阻害せず、被覆は十分に粗であることが示唆された。このように、古典的なアクチンの「バリア機能」を新たに再定義することに成功した。尚、本成果の図像は米国膵臓学権威の執筆する消化器学の標準的テキストに掲載を依頼された。

またアクチンは一過的に基底膜に斑点状に集積することを初めて可視化した。この集積はジアチルグリセロールより下流のシグナルによって惹起された。即ち異なる膜分画毎にそれぞれ固有のアクチン重合の動態を持っていた。意外なことに、異なる膜分画でも、small GTPase rhoに媒介されていた。さらに、PIP<sub>2</sub>がRho活性化に寄与している可能性が示唆されつつある。

##### -2. Rab3 エフェクターNoc2のCa<sup>2+</sup>依存性開口放出への関与

分泌顆粒の融合準備状態に関与するrab3タンパク質のエフェクターであるNoc2をノックアウトしたマウスを用い、Ca<sup>2+</sup>依存性開口放出への寄与を検討した。このマウスでは全身の多くの分泌細胞で調節性分泌の抑制が生化学的に認められた。しかし、Ca<sup>2+</sup>と開口放出の同時イメージングを行ったところ、意外なことに、ノックアウトマウスでは、Ca<sup>2+</sup>濃度自身が著しく抑制されていた。そこでケージドカルシウムにより人工的なCa<sup>2+</sup>濃度を与えたところ、開口放出数は70%以上回復した。以上から、Noc2は、アゴニスト刺激時の[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>上昇に必須であった。さらに、アゴニストによらず同様の結果を得たので、共通経路であるGqからIP<sub>3</sub>受容体までの経路において機能していた。

#### 蛍光シグナルの相関と融合細孔系の測定法

APDにより高効率で2光子励起蛍光光子を検出し、自己相関・相互相関の計測する系を確立し、蛍光分子濃度や拡散定数の解析系を確立した。また、様々な蛍光デキストランで細胞外を多重染色し、構造の蛍光シグナルの相互相関関数から、融合細孔直径を高精度で計測する解析手法を確立した。融合細孔は漸次拡張するが、20nmを越えることは無く極めて安定な構造体であることが示唆された。また、膵臓細胞の開口放出時の融合細孔形成過程を詳細に解析し、融合細孔は脂質によって形成されていることが強く示唆された。

#### 予期していない新たな技術や科学的知見 溶液輸送・ミトコンドリア活性状態

まず、水溶性蛍光色素を用いた細胞形態のイメージングからインタクトな鼻粘膜上皮腺における溶液輸送現象を実時間同時可視化する方法を確立でき、生体防御機能としてCa<sup>2+</sup>依存的な鼻粘膜液の産生機構の可視化解析が可能となった。アセチルコリンによる一方向性のCa<sup>2+</sup>波動の発生、溶液輸送、逐次開口放出が初めて同時可視化され、これらの時間的秩序関係が定量的に捉えることに成功し、この秩序関係が効率的な防御機能発現が実現されていた。また、同様の同時多重可視化は、唾液腺外分泌腺においても成功し、今後は様々な分泌腺組織の機能アッセイ法として用いられていくであろう。

次に、2光子励起自家蛍光像を検討することにより、ミトコンドリアに集積するNADHの集積状態の可視化に成功し、個々のミトコンドリアの活性状態の解析へつながった。中枢神経培養細胞に適用、電気化学的な呼吸状態の同時測定により、ミトコンドリアを介したCa<sup>2+</sup>依存性の迅速な

酸素代謝を初めて実証することに成功した。

#### 5 自己評価:

当初設定目標のうち、2光子励起法の、ケージド試薬閃光活性化法、FRET、FLIM、FCSへの適用による新たな定量解析系の確立と、遺伝子工学的手法による膵臓外分泌腺組織標本でのSNARE 連関分子の可視化はほぼ計画通り達成し、その結果、SNARE 仮説の検証、融合細孔動態の可視化解析、アクチン細胞骨格による制御に関して新たな知見を得、公表することができた。また、当初の計画の予想を超え、水分分泌、ミトコンドリア活性状態の新たな可視化解析法を生み出し、また、Noc2 という新規分子の思いがけない寄与も明らかにした。以上の成果は、急性膵炎、アレルギー性鼻炎などの臨床研究や創薬への展開も期待している。しかし、融合細孔形成に伴うSNARE 分子の拡散の可視化には成功したが、その時の真のSNARE 複合体形成の瞬間を、リアルタイム可視化するという目標は到達したとは言えない。現在も継続して実験を進めているので、今後の進展を見守っていただきたく、お願い申し上げる次第である。

SNARE 連関タンパク質は、その機能の一般性にもかかわらず、この数年でやっと生化学的・分子生物学的な概観の見えてきた段階であり、モータータンパク質のような機能を有する超分子複合体として研究対象となりつつある。本研究によりその潮流の一端を先駆的に担うことができたと思う。本研究者の明らかにしてきた逐次開口放出現象、提出した開口放出の分子モデルや細胞骨格による制御過程などは内外の他研究者によってその一般性が追認されつつある。また、開発してきた技術は、2光子励起顕微鏡法自身がレーザー光源の扱いが難しいために安易には使えないことや、ケージド試薬、FLIM、FCS の利用には更に高度な顕微鏡の改造が必要であることから、現在、どこの研究室でも行えるというものではないかもしれない。しかし、生の生物の試料の観察には、標本自身の改良を伴う多くの試行錯誤を要し、その標本を扱う研究者によって独自に進められるべきものであろう。本領域における研究終了後も生体膜融合連関分子の可視化解析を着実に進めており、将来へ向かって本研究を展開していきたい。

#### 6 研究総括の見解:

2光子励起顕微鏡による可視化技術を開発し、生体分子機能研究に応用して、逐次開口放出分泌機構の可視化に世界にさきがけて成功した。この分泌機能の異常が急性膵炎やアレルギー性鼻炎に結びつくメカニズムも解明し、米国消化器学の教科書にも採用された。物理学の深い理解に根ざした高い技術力とやわらかい生理現象への洞察力があいまって達成された成果である。本領域の機能研究における高い成果と評価できる。残る複合体形成のリアルタイム可視化を是非成功させたい。

#### 7 主な論文等:

##### 論文

1. "Two-photon microscopic analysis of acetylcholine-induced mucus secretion in guinea pig nasal glands", Akihiro Oshima, Tatsuya Kojima, Kenji Dejima, Yasuo Hisa, Haruo Kasai, and Tomomi Nemoto, **Cell Ca.** (2005, *in press*) (Corresponding author)
2. "Rapid Ca<sup>2+</sup>-dependent increase in oxygen consumption by mitochondria in single mammalian central neurons", Yasuyuki Hayakawa, Tomomi Nemoto, Masamitsu Iino, Haruo Kasai, **Cell Ca.** (2005, *in press*)
3. "Stabilization of exocytosis by dynamic F-actin coating of zymogen granules in pancreatic acini", Tomomi Nemoto, Tatsuya Kojima, Akihiro Oshima, Haruhiko Bito and Haruo Kasai, **J. Biol. Chem.**, vol.279 pp. 37544-37550 (2004) (Corresponding author)
4. "Fusion pore dynamics and insulin granule exocytosis in the pancreatic islet", Norkiko Takahashi, Takuya Kishimoto, Tomomi Nemoto, Takashi Kadowaki, Haruo Kasai., **Science**, vol. 297, pp. 1349-52 (2002)
5. "Switch to anaerobic glucose metabolism with NADH accumulation in the  $\beta$ -cell model of mitochondrial diabetes: Characteristics of  $\beta$ HC9 cells deficient in mitochondrial DNA transcription", Mitsuhiko Noda, Shigeo Yamashita, Noriko Takahashi, Kazuhiro Eto, Linming Shen, Kazuo Izumi, Samira Daniel, Yoshiharu Tsubamoto, Tomomi Nemoto,

- Masamitsu Iino, Haruo Kasai, Geoffrey W.G. Sharp, and Takashi Kadowaki, *J. Biol. Chem.*, vol. 277(44), pp. 41817-26 (2002)
6. "Two-photon excitation imaging of pancreatic islet with various fluorescent probes.", Noriko Takahashi, Tomomi Nemoto, Ryoichi Kimura, Akira Tachikawa, Akiko Miwa, Haruo Okado, Yasushi Miyashita, Masamitsu Iino, Takashi Kadowaki and Haruo Kasai., *Diabetes*, vol. Suppl.1, S25-8 (2002).
  7. "Dynamic actin reorganization in zymogen granule exocytosis in pancreatic acini mediated by Rho", Tomomi Nemoto, Tatsuya Kojima, Akihiro Oshima, Haruo Kasai, *Mol. Biol. Cell*, vol. 14 (Suppl.), p.355a (2003).
  8. "Two-photon imaging of insulin exocytosis in the pancreatic islets", Takahashi, N., Kishimoto, T., Nemoto, T., Kasai, H., *J. Pharmacolog. Sci.*, vol. 91, pp. 32P-32P (Suppl.), (2003).

#### 出版物

1. 畠山裕康、高橋倫子、根本知己、河西春郎、「インスリン分泌」第1章「インシュリン開口放出現象の可視化から何がわかるか」, pp.39-42、文光堂、東京、2004年5月
2. 根本知己「ナノテクノロジー大辞典」第8章「2光子顕微鏡」, pp. 781-785、工業調査会出版部、東京、2003年12月.
3. 河西春郎、根本知己、松崎政紀、早川泰之、「2光子励起法による神経機能研究」生物物理、vol. 42, No.2, 91-94 (2002).

#### 招待講演

1. Tomomi Nemoto, Tatsuya Kojima, Akihiro Oshima and Haruo Kasai, "Dynamic role of actin in zymogen granule exocytosis in pancreatic acini", *Gordon Research Conferences, Salivary Glands & Exocrine Secretion*, Feb 2-7, 2003, Holiday Inn Ventura, CA, USA. 招待ポスター. Co-chair 兼 judge for poster session として招聘を受け会議運営に参加。
2. 根本知己「多光子励起過程を用いた開口放出・分泌現象の可視化解析」日本分析化学会第66回分析化学討論会、2005年5月14, 15日、北見工科大学、北見(予定)。
3. 根本知己「2光子励起法による開口放出の可視化」基礎生物学研究会「生体シグナルの可視化を目指して」、2004年12月2, 3日、岡崎カンファレンスセンター、岡崎
4. 根本知己「多光子励起過程を用いた開口放出の解析法の開発と応用」基礎生物学研究会「光生物学の課題と光技術の展望」、2004年11月25, 26日、自然科学研究機構・基礎生物学研究所、岡崎
5. 根本知己「2光子顕微鏡によるCa<sup>2+</sup>依存性開口放出の解析」日本生物物理学会第41回年会シンポジウム、2003年9月23-25日、新潟。

#### 学会発表等

1. Tomomi Nemoto, Tatsuya Kojima, Akihiro Oshima, Haruo Kasai, "Dynamic Actin Reorganization in zymogen granule exocytosis in pancreatic acini mediated by Rho", **43<sup>rd</sup> annual meeting, the American society of cell biology**, Dec. 13-17, 2003, San Francisco, CA, USA.
- 他8件

## 研究課題別評価

1 研究課題名:機能性分子素子の構築を目指した脂質膜の物性に関する基礎的研究

2 研究者氏名:早川 枝李

3 研究の狙い:

生体膜構成二大成分の一つである脂質分子の形と機能に焦点をあてた。膜脂質の主要成分であるリン脂質は、固有の分子構造・容積をもち、極性頭部とアシル鎖領域の分子容の比は、自己組織化した際にとり得る膜構造を決定する重要な因子となる。異なる大きさの極性頭部を持つ脂質分子を、様々な比率で混合し作成した人工脂質二重層膜(リポソーム)は、一定の直径を与えると、様々な脂質膜 curvature stress を示す。しかし、膜 curvature stress が膜の物理的性質や膜タンパク質の活性に対しどのような影響を与えるかについてはほとんど知られていない。そこで本研究では第一の研究として、脂質分子の異なる形状の組み合わせにより誘導される脂質膜 curvature stress が、脂質膜の物性と膜タンパク質の活性にどのような影響を与えるかについて、人工脂質二重層膜と G - プロテイン結合型膜タンパク質であるウシロドプシンを用いて検討した。

日本国内における狂牛病発生の影響から、ウシ関連の生体試料の入手が不可能となったことをうけ、ウシの目玉から精製していたロドプシンを用いる研究の継続が困難になり、それに変わる別の研究として、脂質膜 curvature stress や脂質分子のパッキング条件の違いが、細胞内においてどのように利用されているかについて検討した。細胞における現象モデルとしてファゴソーム - ライソソーム膜融合阻害を伴う結核菌の宿主細胞内でのサバイバル機構を取り上げ、ファゴソーム膜類似人工脂質膜の膜構造ドメイン変化について、原子間力顕微鏡(Atomic Force Microscopy, AFM)と FRET を用いて解析した。

4 研究成果:

### 1:脂質の分子構造と組成の違いに誘導される脂質膜 Curvature stress の膜タンパク質の構造変化に対する影響

ロドプシンはウシ網膜の Rod Outer Segment から単離・精製し、あらかじめ組成を決めたリン脂質ベシクル(1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphor-choline (DOPC)、1,2-dioleoy-*sn*-glycerol-3-phosphoethanolamine (DOPE))中に再構築させ、ロドプシンの活性に対する脂質組成の影響を検討した。DOPC と DOPE の混在比率はそれぞれ 100:0、70:30、50:50 とし、全脂質とロドプシンの混在比率は 85:1 とした。全ての測定は K2 multifrequency crosscorrelation phase fluorometer (ISS)で行った。アシル鎖領域の packing free volume (fv) は 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene (DPH)の蛍光異方性(Anisotropy)の値と The Brownian rotational diffusion (BRD) model の組み合わせにより求めた。ロドプシンの MI-MII 構造変化は吸光光度計により検出、そこから平衡定数:  $K_{eq} = [MII]/[MI]$  を求めた。

ウシロドプシンは光刺激により活性化され、MI MII へと構造が変化する。MI、MII 型はそれぞれ 480nm、380nm に固有の吸収波長を持つため、吸光光度計を用いて各波長における吸光度を測定する事で、どれだけの割合が活性化されたかを検出することができる。PC と PE の混在系において、PE の割合が増加するほど膜 curvature stress が増大することがわかっている。DOPE を 0、30、50%と段階的に増加させたときの  $K_{eq}$  の値を比較すると、DOPE 存在下では DOPC のみの膜にロドプシンを再構築させた時よりも、MII 形成の割合がおよそ 70%増大していた。次に脂質膜のアシル鎖領域のパッキング状態に対する膜 curvature stress の影響を調べた。極性頭部の分子容の小さい DOPE の増加が脂質膜表面の空間密度を変化させることで、膜 curvature stress が変わり、この結果、アシル鎖領域の free volume の変化を誘導させたことがわかった。これらの結果は、膜 curvature stress の変化が異なる脂質分子間のパッキング状態を生み出し、また、ロドプシンが光

刺激を受けた時、膜 curvature stress が大きいほどフォトンによる活性化効率が高くなることを意味し、結果としてロドプシンの光反応能力が促進されることを示唆している。

## 2: 結核菌の宿主細胞内におけるサバイバルスキル

異なる相転移温度を持った脂質を混合させると、脂質ドメインが形成される。AFMはナノスケールで試料表面の高さの違いを検出できるため、脂質膜表面を AFM の探針(プローブ)で走査することにより、脂質膜の表面構造の検出が可能となる。ファゴソーム膜類似組成である DOPC+SM+Chol の系に対し、lipoarabinomannan (LAM)の有無による膜ドメインの構造変化を室温にて検討した結果、LAM が混在すると、個々の SM+Chol ドメインが細分化し、ドメインサイズが小さくなっていることが認められた。さらに、全体の膜エリアにおけるドメイン密度も高くなっていた。

次に、同上の脂質組成により構成された large unilamellar vesicles (LUVs、直径約 100nm)に膜融合誘導剤である Polyethylene glycol (PEG)を加え、その後の融合過程について FRET を用いて観察した。これは、一方のリポソーム膜に 2 種類の蛍光プローブ(Rho-PE と NBD-PE)を加え、もう一方のリポソームに何も加えず両者を混在させ、PEG により融合が進むと、リポソームの体積の増加から蛍光分子間の距離が大きくなり、結果として自己消光(Quenching)が解消され、エネルギー移動により Rho-PE の蛍光が検出できるようになる、という原理に基づく。この実験の結果、LAMの存在下では LAMがない系と比べて、PEG が共存するにもかかわらず膜融合が阻害されていることが、*in vitro*において初めて証明された。このように、LAM が SM-Chol ドメインのサイズと DOPC ドメインに対する密度を大きく変化させ、また PEG の存在下において脂質膜融合を阻害していたことは、結核菌のファゴソーム - ライソソーム膜融合(P-L fusion)阻害を伴った宿主細胞内サバイバル機構において、脂質分子のパッキング状態の違いが生み出した脂質膜内構造ドメインの変化と膜融合阻害という現象が関連している可能性を、初めて物理化学的側面から検討・報告できた。

現在、LAM が自己集合体を形成したときの物性について更なる検討をおこなうとともに、今までに得た研究成果のまとめとして、すでに論文作成を開始している。今後はできるだけ速やかに論文を完成・投稿したい。

## 5 自己評価:

本研究は脂質分子の形と、その異なる形の組み合わせにより生み出される脂質膜 curvature stress が、共存する膜タンパク質の活性にどのような影響を与えるかについて検討することを出発点とした。膜 curvature stress の概念はこれまでの研究において理論的には受け入れられてきたが、curvature stress の影響が脂質膜中のパッキング条件や膜タンパク質の活性を調節していることを、実験から直接示した報告例は皆無であった。しかし本研究の結果から、脂質が提供する膜環境の違いが、ロドプシンの活性・構造変化を調節することを証明できた。このことは、ロドプシンのみならず他の膜タンパク質に対する脂質分子の影響を検討する上でも、また、脂質 - タンパク質相互作用の一端を解明する上でも重要であると考えている。

第二に行った結核菌の膜融合阻害に対するメカニズムの解明についてだが、この研究は、本研究のコンセプトである脂質分子の形の違いにより生み出される膜内パッキング条件の違いが、実際の生体においてどのように利用されているか、より細胞・生物を意識して行った研究である。結核菌に対する研究・治療は、現在使用されている治療薬(抗生物質)からみても、タンパク質に対する検討のみである。しかし多剤耐性菌などの問題もあり、より根本的な治療法の確立が必要である。本研究は、結核菌のサバイバルメカニズムに対し、P-L fusion 阻害における脂質膜の構造・物理化学的性質の違いを検討した新しいアプローチであり、結核菌由来の脂質が、宿主細胞の膜内ドメイン(コレステロール - スフィンゴミエリンドメイン)構造を変化させ、結果として P-L fusion 阻害が引き起こされていることを、ファゴソーム膜類似モデルを用いて膜内構造を視覚化し、初めて証明した。本研究の結果は、今後、細胞レベルでの実験を経ることで、新たな薬の開発や

治療法などを検討する上で、まったく新しい可能性を示すための第一歩と考えられ、さらにインフルエンザ、HIV などの他の感染症も脂質膜を介して感染することから、結核菌に対する治療のみならず、細胞表面と菌・ウイルスとの接着・浸潤機構などのメカニズムの解明にも影響を与えうるものと考えている。

#### 6 研究総括の見解:

脂質の機能に着目した本領域では唯一の研究である。当初脂質膜物性と牛ロドプシン活性の関係究明を目指したが、原料入手の問題から、対象を結核菌宿主細胞に変更し、脂質膜物性や脂質分子の形と結核菌生存機構の関係解明を目指した。短期間ではあったが、結核菌由来の脂質が膜ドメイン構造を変化させ融合阻害を起こし生存するという仮説の端緒をモデル的に得た点は評価する。論文作成を開始したということなので、是非きちんとした論文に仕上げたい。論文にして初めて当該分野の研究者に成果を問うことも、批判を受けることもできる。

#### 7 主な論文等:

##### 学会発表等

1. 49<sup>th</sup> Biophysical Society Annual Meeting (Feb/12-17/2005) (in USA)
2. 44<sup>th</sup> The American Society for Cell Biology (Dec/04-08/2004) (in USA)
3. 6<sup>th</sup> Congress of International Society for the Study of Fatty Acids and Lipids (ISSFAL) (Jun/27-Jul/01/2004) (in Canada)
4. 47<sup>th</sup> Biophysical Society Annual Meeting (Mar/01-05/2003) (in USA)

## 研究課題別評価

1 研究課題名: 癌・パーキンソン病の解明を目指したユビキチンリガーゼ複合体の結晶構造に関する基礎的研究

2 研究者氏名: 水島 恒裕

3 研究の狙い:

ユビキチン - プロテアソームタンパク質分解経路は生体内において立体構造異常タンパク質や細胞周期において役割を終えた制御タンパク質を特異的に分解することにより細胞を維持する役割を担っている。この反応経路は分解すべきタンパク質に分解の目印としてユビキチンを付加するユビキチン経路とユビキチンの付加された標的タンパク質を分解するプロテアソームから構成されており、ユビキチン経路において分解すべきタンパク質を選び出しユビキチンを付加する役割を担うのがユビキチンリガーゼである。そして、生体内には標的タンパク質に対応した多くのユビキチンリガーゼが存在している。その中の SCF<sup>Fbs1</sup> は複合体を形成することにより獲得した合理的なシステムによりタンパク質の品質管理の役割を担い、Parkin は常染色体劣性遺伝性若年性パーキンソン症候群に参与している。本研究ではこれらユビキチンリガーゼを生体内で機能する状態で立体構造を決定することにより、タンパク質分解における標的タンパク質の認識機構の解明を目指した。

4 研究成果:

(1) 糖鎖認識ユビキチンリガーゼ複合体 SCF<sup>Fbs1</sup> における糖鎖認識部位の X 線結晶構造解析

SCF<sup>Fbs1</sup> はユビキチン - プロテアソームタンパク質分解経路において糖鎖を目印として分解すべき標的タンパク質にシグナル分子であるユビキチンを付加する役割を担っている。そして、この糖鎖をタンパク質分解の目印とする生体機能はこれまでにない新しい糖鎖の役割であり、ユビキチンリガーゼにおける新規の標識であった。本研究では SCF<sup>Fbs1</sup> の糖鎖認識サブユニットである Fbs1 の糖鎖認識領域を欠失した変異体を作製することにより決定し、X 線結晶構造解析により糖鎖認識部位単独および糖鎖との複合体として立体構造を決定した。

Fbs1 糖鎖認識部位の全体構造は 10 本の逆平行 シートからなる サンドイッチ構造であり、この構造はこれまでに知られていたレクチンと類似したものであった。しかし、Fbs1 ではこれまでに立体構造の知られたレクチンが シートで糖鎖と結合していたのに対し、分子先端のループ領域で糖鎖と結合しており糖鎖認識は異なるものであった。また、糖鎖との複合体構造より Fbs1 糖鎖認識部位は疎水性のポケットにより糖蛋白質の根元部分に当たるキトビオースを特異的に識別していることが明らかになった。そして、この結果は糖鎖結合部位を変異させたタンパク質を用いた結合実験と活性測定からも確認された。さらに、この特異的なキトビオースとの結合は水素結合により厳密に決定付けられており、Fbs1 は糖タンパク質の糖鎖の根元を厳密に認識し結合することにより標的となる糖蛋白質をユビキチン付加のために固定、配向させていることを明らかにした。

(2) SCF<sup>Fbs1</sup> ユビキチンリガーゼにおける Skp1-Fbs1 複合体の X 線結晶構造解析

SCF<sup>Fbs1</sup> は Skp1-Cullin1-Fbs1-Rbx1 から構成された 4 分子複合体であり、Fbs1 は Skp1 を介して複合体の骨格である Cullin1、Rbx1、ユビキチン結合酵素と複合体を形成することにより、ユビキチンリガーゼとして機能している。これまでに Skp1-Cullin1-Rbx1-Fbox の立体構造が報告されていることから SCF<sup>Fbs1</sup> の生体内における複合体様式を理解するため Skp1-Fbs1 複合体の X 線結晶構造解析を行い立体構造を決定した。

Skp1-Fbs1 は L 字型の全体構造をとり、この立体構造を基にした SCF<sup>Fbs1</sup> 複合体モデルの作製により糖タンパク質をユビキチン化するための機構を明らかにした。

## 5 自己評価:

ユビキチンリガーゼ SCF<sup>Fbs1</sup> の X 線結晶構造解析により、高分解能での糖鎖認識部位の立体構造、糖鎖との複合体構造を決定すると共に Skp1-Fbs1 複合体の立体構造を決定したことは、新しい糖鎖の役割を理解する上で重要な成果であった。また、これまでに立体構造が報告された他の SCF 型ユビキチンリガーゼでは活性に関与する領域などを抽出し不安定と考えられる部分を除いた状態で構造解析を行っていたのに対し、本研究による Skp1-Fbs1 複合体の構造解析では完全な状態で行った。しかし、当初の研究計画であった SCF ユビキチンリガーゼの完全な複合体状態の立体構造解析は構造決定には至らず、他のグループの結果を基にしたモデル構築となった。

常染色体劣性遺伝性若年性パーキンソン症候群に関与するユビキチンリガーゼである Parkin の構造解析では、タンパク質の発現や安定性の問題などから結晶化が行えず当初計画した立体構造解析および機能解析は行えなかった。しかし、Parkin では当初困難であった大腸菌による大量発現系をタンパク質の融合や共発現により確立した。そして、この結果は Parkin の機能解析において利用することができた。

さきがけ研究の一番の目標とした SCF<sup>Fbs1</sup> ユビキチンリガーゼの生体内で機能する完全な状態での立体構造を決定し、複合体形成により獲得した機能に迫るという目的は達成できなかったが、糖鎖認識部位と共に Skp1-Fbs1 複合体の立体構造を決定できたことは大きな成果であった。今後はさきがけ研究の経験を生かし、複合体や通常の方法では構造解析の困難なタンパク質の大量発現系構築および構造解析を行い、生体内で機能する完全な状態での立体構造を決定し機能の理解を進めていきたい。

## 6 研究総括の見解:

ユビキチンリガーゼ複合体の糖鎖認識機構領域の構造決定に成功し、糖鎖認識機構を明らかにした。X線結晶構造解析により直接蛋白質の構造を決定して、構造形成の仕組みを明らかにするという本領域の当初の構想における代表的成果と評価する。今後生体内での完全な状態での立体構造決定に挑戦してほしい。

## 7 主な論文等:

### 論文

1. Mizushima T, Hirao T, Yoshida Y, Lee S J, Chiba T, Iwai K, Yamaguchi Y, Kato K, Tsukihara T, Tanaka K, Structural basis of sugar-recognizing ubiquitin ligase. *Nat Struct Mol Biol.* **11**, 365-370, 2004

### 出版物

1. Mizushima T, Tsukihara T, The Proteasome as a Drug Target. *Protein Crystallography in Drug Discovery. Methods and Principles in Medicinal Chemistry*, Wiley-VCH, **20**, 83-98, 2003
2. ユビキチンリガーゼの構造生物学 水島恒裕, 実験医学, 羊土社 **22**, 29-36, 2004
3. ユビキチンシステムの構造生物学 水島恒裕, 医学のあゆみ, **211**, 17-22, 2004

### 招待講演

1. 水島恒裕 ユビキチン-プロテアソームシステムの構造機能と新しい創薬研究 名古屋大学超小型放射光シンポジウム, 名古屋, 2003年6月5日
2. 水島恒裕, Lee Soo Jae, 千葉智樹, 吉田雪子, 月原富武, 田中啓二 ユビキチンリガーゼ SCF<sup>Fbx2</sup> における糖鎖認識の構造学的理解 日本蛋白質科学会, 北海道, 2003年6月25日

### 学会発表等

6件

## 研究課題別評価

1 研究課題名: タンパク質機能の構造揺らぎの検出と制御

2 研究者氏名: 水谷 泰久

3 研究の狙い:

タンパク質はそのエネルギーポテンシャル面で多くのローカルミニマムを持ち、その階層的なポテンシャル構造は非常に幅広い揺らぎを絶えず生み出している。この特徴はタンパク質中で起こる化学反応を理解する上で極めて重要なものである。本研究では、機能に関連した構造揺らぎを、時間分解振動分光法によって直接捉え、揺らぎと機能との速度論的な関係を詳細に調べる。これによって、構造揺らぎとそれを生み出す不均一性の要因を明らかにする。タンパク質の構造がどのように機能を生み出すかという概念を動的な側面から肉付けすることを目指す。

4 研究成果:

(1) 速度論的ホールバーニングのラマン検出に向けた高感度ラマン分光装置の開発

速度論的ホールバーニング(KHB)法は、反応に伴い観測される、conformational substate (cs) ごとの反応速度の不均一性によるスペクトルバンド形変化を調べるものである。KHB のラマン検出には通常的时间分解共鳴ラマン測定と同様に、ポンプパルス(反応開始用パルス)とプローブパルス(ラマン測定用)の2種類のパルス光を用いる。測定の時間分解能および振動数分解能は実質的にはこれらパルス光のパルス幅およびスペクトル幅によって決まる。KHB のラマン検出においては、構造の不均一性と機能の不均一性との関係を、ラマンバンド形変化を通して検出するわけであるから、時間分解能と振動数分解能の両面について高い分解能が必要になる。また共鳴ラマン効果を最大限に活かすことができるようプローブパルスの波長可変性も重要である。さらに、微弱光であるラマン散乱を検出し、その微小なスペクトル変化を検出するためには、高感度の検出系が必要である。そこで、KHB のラマン検出に向けさらに波長変換システムの安定化、検出系の高感度化などを行った。その結果、波長変換システムについては、出力が35~40%向上し、パルス間の強度揺らぎが10%から7%に改善された。また、検出器に低雑音の液体窒素冷却型CCD検出器を用いることにより、検出感度を約2倍向上させた。このほか、測定試料を安定な状態に長時間保つための、機密性の高い回転セルの設計・製作、参照スペクトルの同時測定が可能な光学系の製作を行い、測定精度を向上させた。以上の装置上の改良を行うことによって、測定時間を従来の1/4~1/5に短縮することができた。これは単に測定時間を短縮するというだけでなく、同程度のS/N比を得るために必要な試料の量を減らすことにより、大量調製の困難な試料に対しても測定を可能にするというメリットを生んでいる。実際に、これによって、従来の性能では測定が不可能であった変異体試料についても、必要なS/N比をもったスペクトルの測定が可能になった。

(2) ミオグロビンの構造揺らぎと反応性

KHB法を用いて、ミオグロビン(Mb)のリガンド結合過程に関係する構造揺らぎを調べた。Mb、ヘモグロビン(Hb)において、ヘムの軸配位座にはヒスチジンのイミダゾール環が配位している。そのトランス位にCO、NO、O<sub>2</sub>といった二原子分子(リガンド)が結合する。ヘム平面からの鉄原子の変位には、相当な不均一性があることが、いくつかの実験および分子動力学計算から示唆されており、これがリガンド結合反応の反応速度不均一性を生んでいる可能性がある。そこで、鉄原子の変位に関係する分子振動として、鉄-ヒスチジン伸縮振動[ $\nu(\text{Fe-His})$ ]バンドに着目し、KHBのラマン検出を行った。NOの脱離後、時間分解共鳴ラマンスペクトルには解離形に由来する共鳴ラマンバンドが観測された。その後、再結合に対応して、解離形の $\nu(\text{Fe-His})$ バンドに強度減衰がみられた。減衰過程におけるバンド形変化を詳細に調べた結果、不均一性によって広がったバンド

全体のうち、早い段階で再結合する成分ほど高い $\nu(\text{Fe-His})$ 振動数をもっており、時間とともに再結合する成分の振動数が低下していくことがわかった。再結合の時間帯による振動数の違いは、Fe-His 結合の不均一な構造分布と再結合の速度分布に相関があることを意味している。また、高い $\nu(\text{Fe-His})$ 振動数をもつ cs ほど再結合が速いということは、Fe-His 結合にかかる張力が弱い cs ほど再結合速度が速いという予想と一致する。NO 再結合のキネティクスは非指数関数的振る舞いを示すことが知られており、これはヘムポケットの構造不均一性によるものと考えられている。今回の結果は、Fe-His 結合がそのような構造不均一性に大きく寄与していることを示すものである。さらに、時間差スペクトルでのバンド位置がこのように時間とともにシフトしていくという実験事実から、構造揺らぎの速度とリガンド再結合速度は同程度で、再結合の時間スケールでは cs の分布は平均化されていないということが明らかになった。

### (3) ヘモグロビンの構造揺らぎと反応性

Hb についても、Mb と同様に、NO 再結合速度と相関をもつ構造不均一性が観測された。不均一性の大きさおよび揺らぎの速度は、Hb と Mb との間で大きな違いはみられなかった。したがって、この不均一な構造分布と再結合の速度分布との相関は、Mb と Hb に共通する性質であると考えられる。Hb を構成する $\alpha$ 鎖、 $\beta$ 鎖の一方のみを選択的に置換したハイブリッド Hb を作成し、四量体内での $\alpha$ 鎖と $\beta$ 鎖の構造揺らぎを選択的に観測した。 $\alpha$ 鎖、 $\beta$ 鎖の間には揺らぎに差はみられなかったことから、Hb について観測された不均一性は、Hb が 2 種類のサブユニットから構成されているということからくる不均一性ではなく、サブユニット自身も持っている不均一性によるものであることがわかった。さらに、pH およびアロステリックエフェクターの濃度を制御し、四次構造が異なる状態で構造揺らぎを観測した。その結果、四次構造の違いによって揺らぎの大きさあるいは速度が異なることを新たに見出した。これは、サブユニット間相互作用が、Fe-His 結合に、平均構造の側面だけでなく、揺らぎの側面においても影響を与えていることを示している。

Mb、Hb のリガンド結合過程を対象に、機能の不均一性と構造不均一性とを、速度論的に関係付けることができた。これによって、従来手法にはなかった KHB のラマン検出手法としての特色を具体的に示すことができた。

## 5 自己評価:

本研究で行った KHB 法による揺らぎの観測には、用いる時間分解共鳴ラマン測定装置にきわめて高い観測感度が要求された。それに必要なレベルにまで装置を高感度化することに成功した点は満足できる点だと考えている。高感度化は予想以上に難しい作業ではあったが、いくつかの技術的な工夫を積み重ね、測定感度の向上を図ることができたのは、手ごたえの感じられる過程であった。この点に関しては、研究期間の早い段階で高額の実験装置の購入を認めていただいた、研究総括に大変感謝している。また、装置の計測性能を極限に高めることで、従来の装置では不可能であったいくつかの測定が可能になった。例えば、酸素脱離に伴う構造ダイナミクスの研究(酸素は生理的なリガンドでありながら、測定の困難さのためにほとんど行われていない)、量の少ない試料(変異体試料など)の測定が可能になった。このような本装置の新しい可能性も今後探っていきたい。

本研究においては、KHB のラマン検出を行うことで、タンパク質の不均一な構造分布と再結合の速度分布との相関を求める測定手法を確立することができた。これは、従来行われていた吸収や蛍光などの電子遷移を用いる検出からは本質的に困難なことであり、化学結合のレベルで構造情報を与える振動遷移を観測することによって初めて可能になったことがらである。測定感度の低さを克服して、これを可能にした点は大きな意義を持っていると考えている。しかし、全体として装置開発に時間がかかり、研究を当初計画していたスケジュールどおり進められなかった点が反省点として残る。未完了な部分に関しては今後も引き続き行い、できるだけ早く研究を完了させたいと考えている。それから、研究成果の論文発表が非常に遅れている点も大きな反省点である。現在、その作業を急いでいる。

#### 6 研究総括の見解:

独自の工夫を重ねた装置改造により、高感度観測を可能にして揺らぎの測定手法を確立したことは評価できる。分光学におけるフェムト秒分光グループの若手チャンピオンであり、国内では第一人者である。世界的には研究人口の多い分野であり、その中で重要な地位を占めるよう期待する。

#### 7 主な論文等:

##### 論文

1. Shigenori Nagatomo, Masako Nagai, Yasuhisa Mizutani, Takashi Yonetani, and Teizo Kitagawa, Quaternary Structures of Intermediately Ligated Human Hemoglobin A and Influences from Strong Allosteric Effectors; Resonance Raman Investigation, Biophys. J. in press.

##### 出版物

1. 水谷泰久、タンパク質の構造揺らぎと反応の相関 - 実験的研究法, 生物物理, 44, 222-225 (2004).

##### 招待講演

1. Yasuhisa Mizutani, Vibrational Energy Redistribution of Heme in Proteins Probed by Picosecond Time-resolved Resonance Raman Spectroscopy, XVIIIth International Conference on Raman Spectroscopy, Budapest, Hungary, 2002年8月25日-30日
2. 水谷泰久、時間分解共鳴ラマン分光法で観たミオグロビンおよびヘモグロビンの構造ダイナミクス、2003年分子構造総合討論会 (シンポジウム「分子科学と生体科学との接点」)、京都、2003年9月24日-27日
3. Yasuhisa Mizutani, Ultrafast Protein Dynamics of Myoglobin and Hemoglobin Studied by Picosecond Time-resolved Resonance Raman Spectroscopy, The 3rd Asian Conference on Ultrafast Phenomena, Beijing, P. R. China, 2004年3月18日-20日