

「生体分子の形と機能」研究領域 領域活動・評価報告書

—平成18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、生物的功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) 選考にあたっては、下記事項を重視した。
 - ① 研究領域の趣旨に合致する必要があるが、領域の定義は広めに捉える。
 - ② 研究者自身による独創性のある研究構想であること。
 - ③ 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。
 - ④ 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、夢を追及する面のあるものに関しては、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	177 名	15 名	5 名

5. 研究実施期間

平成15年10月～平成19年3月

(当初計画は平成18年9月が研究終了時期であったが、期間中に延長制度ができ、3期生は4名が延長制度を利用し、1名は利用しなかった。)

6. 領域の活動状況

(1) 研究課題達成への取り組み

上記期間中に領域会議を7回実施して、研究進捗状況の報告と、領域アドバイザーや領域全研究者との間で、研究課題達成への問題点、方向性、指針等についての自由闊達な議論を展開し、研究の進捗を図った。

また、CREST「たんぱく質の構造・機能と発現メカニズム」領域とのたんぱく質関連領域合同シンポジウムを3回実施し、熱心な質疑応答が研究に生かされた。領域アドバイザーは研究者からの研究内容に関する相談があったときは、随時適確な指導・助言を行った。

(2) 研究遂行への支援

研究開始前に、全研究者の研究実施場所およびその上司を訪問し、研究実施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。研究開始後は、研究者が研究を最大限に促進できるための、迅速な物品購

入や進捗に応じた予算執行等の支援、研究成果の取りまとめや外部発表への積極的な支援、新技術創製に繋がる基礎的研究の特許出願促進等の支援を、領域事務所が本部と連携して行った。また、研究実施現場での諸課題については領域事務所職員が実地へ赴き、研究者と直接対話しながら適確に対応処理した。

(3) これらの領域活動が円滑に行われたのは、領域事務所が研究者とのコミュニケーションを図りながら支援しているところが大きく、さきがけ制度における領域事務所機能が十二分に発揮された結果と考えている。

7. 評価の手続き

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 18 年 9 月～	研究期間終了
平成 19 年 3 月	
平成 18 年 11 月	研究課題別評価提出
平成 18 年 12 月	研究報告会開催
平成 18 年 12 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

H13 年度に採択した研究者(第 3 期生)5 名の研究分野は、たんぱく質の超分子構造体解析研究が 1 名、光学手法等によるたんぱく質の機能発現機構研究が 3 名、シミュレーション解析研究が 1 名であった。研究の常として当初目指した最終目標が困難すぎて苦労した研究者もいたが、全員地道に研究を進め、領域会議をきっかけとして 3 期生同士の交流は無論のこと、1 期生および 2 期生との交流も積極的に行った。その結果 3 期生が加わった具体的な領域内共同研究が 6 件遂行され、中 2 件は既にその成果が有力誌に掲載された。

平成 18 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においては、CREST 研究代表者の報告に混じって、3 期生全員が 3 年間の成果をまとめて報告したところ、ユニークな発想や研究内容、および積極的な取り組み姿勢について参加者から好評を得た。3 期生の成長が客観的にも認められたものと受けとめている。

超分子構造体解析研究分野では、木下専研究者がセプテン系たんぱく質の研究において、当初目指した構造解析は難度が高く目標達成には至らなかったものの、セプテン分子の微細形態や生理・病理機能解析において成果を上げ、たまたま発見したセプテンリング欠損と雄性不妊症との関係についての Development Cell 誌論文が京大/JST からプレス発表され、マスコミの注目を浴びた。構造解析に関しては、優れた結晶化と構造解析の専門家である 2 期生の村上聡研究者と共同研究を行い、そのアドバイスも得ながらさらに追究しているが、対象が極めて凝集しやすい超分子複合体で国際的にも未だ成功していないので、このような領域内共同研究が大きな実を結ぶ可能性もある。

光学手法等による機能発現機構研究分野では、小澤岳昌研究者が、二分した発光たんぱく質をプロテインスブラisingにより再構成させるという独自の手法により、生きた細胞やマウス個体中でのたんぱく質の核内移行可視化や遺伝子の可視化技術創出に成果を上げ、日本化学会進歩賞や文部科学大臣表彰若手科学者賞を受賞した。また、宮田真人研究者は、寄生性細菌のマイコプラズマの滑走運動に魅入られ、この滑走運動が従来知られていた運動系では説明できないことに着目し、滑走たんぱく質の同定、分子形態や滑走装置及び支持構造の観察を行い、細胞内部の反応や運動メカニズムを突き止めるという大変ユニークな研究成果を上げた。このため日本細菌学会から平成 19 年小林六造記念賞を受賞することになった。本研究では日本原子力研究開発機構の弊研究室とも共同研究を行い、滑走たんぱく質のアミノ酸配列から構造を予測し、構造と機能の関係が理解できるようになった。

さらにこの分野では、西坂崇之研究者がたんぱく質 1 分子の運動を観察できる顕微鏡技術を開発し、回転分子モーター F1-ATPase の 1 分子の回転を可視化するというたんぱく質科学においてインパクトの高い成果を上げた。この研究の過程で微粒子の変異をナノメートルオーダーで三次元検出できる画期的な光学顕微鏡も開発でき、特許出願に結びつけ、外国出願も承認された。今後の 1 分子生理学への貢献が期待される。この分野も 1 期生及び 2 期生

も含めると、かなりの数の研究者が、蛍光物質などの発光体を用いて生体の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。西坂崇之研究者の顕微鏡技術を活用して2期生の佐藤健研究者、3期生の宮田真人研究者との領域内共同研究も実施されている。

シミュレーション解析研究分野では、林重彦研究者がさががけ採択前に開発していたハイブリッド分子シミュレーション法を用いて、局所的な化学反応における電子状態の変化が、たんぱく質の構造変化と機能発現を引き起こす様子の解析を行った。大域的な構造変化を解析する手法にはまだまだ未達であるが、光受容たんぱく質などの化学反応解析では、従来シミュレーションより有用であることを示した。特に1期生の稲葉謙次研究者との領域内共同研究で、たんぱく質ジスルフィド結合創生の基本化学原理を非経験的分子軌道法を用いて理論面から解明した。

H15年度は当領域の活動も軌道に乗った時期で、このように同じ「生体分子の形と機能」領域に属している研究者同士が自発的に共同研究を進める例が非常に増加し約10件を数えた。自らの研究課題の促進や障壁打破に活用することはもちろんのことであるが、中には新たなベンチャー創出のきっかけをつくるなどの領域内共同研究が生まれたことも、「さががけ」制度の大きな利点と考えている。また、3期生においても1期生、2期生と同様、殆どの研究者がさががけ研究期間中に昇格や昇任を果たしたことも特記したい。

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、新技術創製とともに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「さががけ」の制度は、新技術創製や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 日本原子力研究開発機構 量子ビーム応用研究部門 特別研究員

領域アドバイザー氏名(五十音順)

北川 禎三	豊田理化学研究所 豊田フェロー
桑島 邦博	東京大学大学院理学系研究科 教授
五條堀 孝*1	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
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	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17年7月まで参画

(参考)

(1) 外部発表件数

	国 内	国 際	計
論 文	4	50	54
口 頭	42	24	66
その他	13	3	16
合 計	59	77	136

(2) 特許出願件数

国 内	国 際	計
3	2	5

(3) 受賞等

- ・小澤 岳昌
- 日本化学会 進歩賞(H16.4)
- 文部科学大臣表彰 若手科学者賞(H17.4)

・宮田真人

日本細菌学会 平成 19 年小林六造記念賞(H19.3)

(4)招待講演

国際 21件

国内 42件

「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)
小澤 岳昌 (兼任)	タンパク質オルガネラ移行と遺伝子発現の非侵襲的時空間解析法の確立 (自然科学研究機構分子科学研究所)	自然科学研究機構分子科学研究所 助教授 (東京大学大学院理学系研究科 講師)	52
木下 専 (兼任)	極低温電子線断層法によるセプチン系超分子構造の解析 (京都大学大学院医学研究科)	京都大学大学院医学研究科 先端領域融合医学研究機構 助教授 (同上)	46
西坂 崇之 (兼任)	蛋白質1個における局所的構造変化の可視化 (学習院大学理学部物理学科)	学習院大学理学部物理学科 助教授 (同上)	52
林 重彦 (兼任)	ミクロな化学反応過程がもたらすマクロなタンパク質機能発現の分子物理 (京都大学大学院理学研究科)	京都大学大学院理学研究科 助教授 (京都大学福井謙一記念研究センター 研究員)	37
宮田 真人 (兼任)	マイコプラズマ滑走運動の分子メカニズム (大阪市立大学大学院理学研究科)	大阪市立大学大学院理学研究科 教授 (同上 助教授)	48

研究課題別評価

1 研究課題名: タンパク質オルガネラ移行と遺伝子発現の非侵襲的時空間解析法の確立

2 研究者氏名: 小澤 岳昌

3 研究のねらい:

環境変化等の細胞外刺激が引き起こす遺伝子の発現とタンパク質の細胞内諸器官(オルガネラ)への移行は、細胞が効率的かつ協調的に機能するための重要な仕組みである。オルガネラ特有の機能を解明するためには、細胞が生きた状態で、オルガネラに局在する生体分子の機能を解析する新たな技術が必要である。本研究では、二分した蛍光あるいは発光タンパク質を細胞内で再構成させる新たな手法を用いて、生きた細胞や動物個体内での遺伝子の発現とタンパク質のオルガネラへの移行の詳細を時空間解析する新しい研究手法の確立を目的とした。

4 研究成果:

(1) ミトコンドリア膜間腔移行シグナル配列の同定

ミトコンドリアの直径は $1\mu\text{m}$ 以下であるため、通常の光学顕微鏡では外膜と内膜で仕切られた空間を判別することはできない。ミトコンドリア内膜で囲まれるマトリックスに局在するタンパク質と、外膜と内膜で囲まれる膜間腔(IMS)に局在するタンパク質を、二分した GFP の再構成を利用して高速に判別する方法を開発した(図1左)。二分した GFP のC末側を含むプローブ(EGFPc-DnaEc)を作製し、マトリックスおよびIMSに局在させた細胞2種類を作製した。試験タンパク質には、GFPのN末側を含むプローブ(EGFPn-DnaEn)を連結した。もし試験タンパク質がマトリックスに移行すれば、図1左側の細胞のみが蛍光性となる。もし試験タンパク質がIMSに移行すれば、図1右側の細胞のみが蛍光性となる。

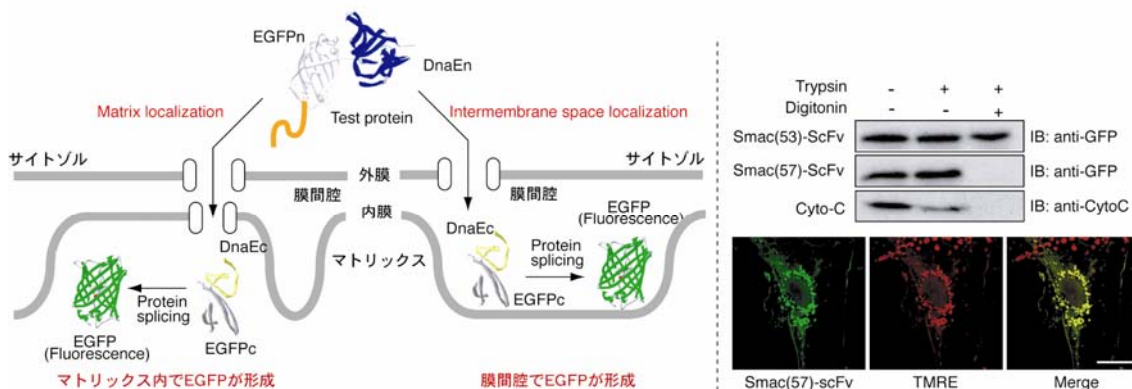


図1. ミトコンドリア内空間に局在するタンパク質の判別法の原理(左)とScFvのミトコンドリア膜間腔へのターゲッティング。

IMS 局在タンパク質の一つである Smac を用いて、Smac のどのアミノ酸が IMS 局在に重要であるか、IMS シグナル配列の同定を目的とした。Smac にランダムにアミノ酸置換を加え(Smac mutants), そのミトコンドリア内局在を解析した。その結果、N末から 50 番目の Met が Lys に、あるいは 53 番目の Cys が Arg に1アミノ酸置換するだけで、Smac はIMS からマトリックスに局在が変わることを明らかにした。またミトコンドリアへのシグナル配列として考えられてきたN末から 53 アミノ酸は、マトリックスへの移行シグナルとして機能していること、さらにそれに続く4アミノ酸-Ala-Val-Pro-Ile-を付加した 57 アミノ酸は、IMS へのシグナル配列として機能することを実証した。

このミトコンドリア膜間腔移行シグナル配列を、様々な機能を有するタンパク質プローブに連結した。GFP 変異体の酸化還元プローブ、GFP 変異体2分子を含むカルシウムプローブ、外部

基質でラベル可能な halotag, single chain antibody (ScFv) を IMS に局在させることが可能であることを実証した(図1右). この IMS へタンパク質を輸送する短いペプチド配列は, 本研究により初めて同定されたものである. IMS シグナルペプチド配列を様々なプローブに連結すれば, IMS の機能解析の進展が期待できる.

(2) mRNA を可視化する蛍光プローブの開発

RNA の塩基配列特異的に mRNA を認識検出する蛍光タンパク質プローブを分子設計し, 生きた細胞内 mRNA の動態を時空間解析する研究手法の開発を目的とした. 標的とする RNA は, ミトコンドリアゲノムから合成される NADH dehydrogenase subunit 6 (ND6)mRNA とした. RNA 結合タンパク質 Pumilio (wtPUM) の核酸認識アミノ酸に mutation を加え, NADH dehydrogenase subunit 6 の mRNA を特異的に認識する mutant PUM (mPUM1, mPUM2) を作製した(図2左). この mPUM1 と mPUM2 それぞれに, split した EGFP を連結した. mRNA の発現に伴い mRNA-mPUM1-mPUM2 三元錯体が形成される. この時 split した EGFP が近接して, EGFP タンパク質が折り畳まれ, その結果 EGFP の蛍光が回復する. EGFP の蛍光シグナルから mRNA の局在を蛍光顕微鏡により解析した.

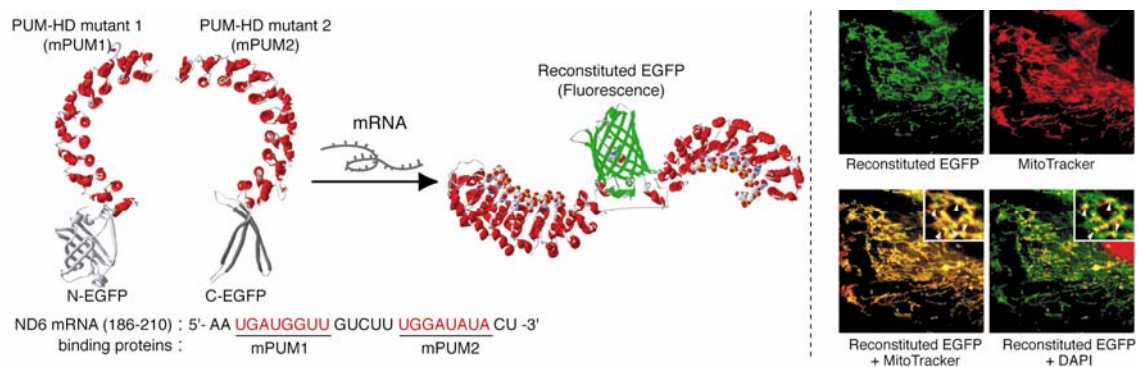


図2. mRNA可視化プローブの原理(左)とND6 mRNAのミトコンドリア内局在(右)

プローブをミトコンドリアにターゲットさせ, ミトコンドリアゲノムをDAPIで, ミトコンドリアを MitoTrackerで染色した後, RNAの局在を蛍光顕微鏡を用いて観察した. RNAはミトコンドリアに一樣に局在するが, ミトコンドリアゲノム近傍に多く局在することを明らかにした(図2右). 次に photobleaching法を用いて, ミトコンドリア内におけるmRNAの動態観察を行った. EGFPを bleaching後 30 分間の蛍光観察を行うと, EGFPはミトコンドリア内で殆ど移動しないことがわかった. これはミトコンドリアmRNAが自由には拡散移動できず, ミトコンドリア内で固定化された状態であることを示している. 次にphotobleaching直後にH₂O₂刺激を行い, 30 分間の蛍光観察を行った. その結果, ミトコンドリア自体のmotilityが停止した後, mtDNAが消失し, mtRNAのミトコンドリア内での拡散が観察された. 開発した分子は, 細胞内のmRNAの局在と動態観察が可能な新たな原理に基づくmRNA検出プローブである.

(3) マウス個体内でのタンパク質のオルガネラ内外移行検出法

細胞外刺激や環境の変化に伴い, タンパク質は核内外を移行する. 化学物質刺激に伴う男性ホルモン受容体(AR)のサイトゾルから核内への移行を, luciferase の再構成により定量・検出するプローブ分子を開発した. DnaE のN末に *renilla* luciferase のN末(RLuc-N)と核移行シグナル配列(NLS)を連結し, あらかじめ核内に局在させる(図3左). *Renilla* luciferase のC末側(RLuc-C)には DnaE のC末側と AR を連結し, サイトゾルに局在させる. 細胞に男性ホルモン(DHT)を添加すると, AR は DHT に結合して核内に移行する. この時 DnaE のN末とC末が相互作用してスプライシング反応が起こり, *Renilla* luciferase の発光能が回復する. この酵素活性を基質である coelenterazine により発光強度を測定する. DHT を 10pM から 10 μ M まで細胞に添加したところ, luciferase の発光強度は濃度依存的に増大した. また, プローブを導入した細胞をマウス個体に

移植し、マウス個体内での AR の核内移行を低侵襲的に検出できることを実証した(図3右)。開発した方法をさらに展開し、コルチコステロン受容体, STAT-3, SREBP2, NF- κ B の核内移行の検出を可能にした。またアポトーシスに伴うミトコンドリアからの Smac の放出を、マウス個体内で検出する方法を開発した。以上開発した方法は、オルガネラ内外を移行するタンパク質一般に応用可能である。

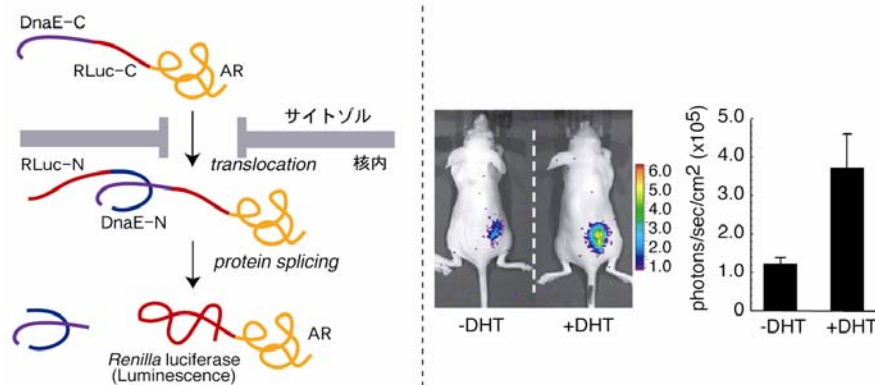


図3. Renilla luciferase再構成システムを利用したAR核内移行検出法の原理(右)と、生きたマウス個体内(皮下)におけるAR核内移行の検出(左)。

5 自己評価:

本研究はまず、タンパク質のオルガネラ移行を生きた細胞と動物個体内で可視化する新たな研究手法の開発に取り組んだ。採択以前の成果であるミトコンドリアタンパク質の網羅的解析法の発展研究として、生きた動物細胞内でミトコンドリアのマトリックスと膜間腔に局在するタンパク質を簡便に識別する方法を開発し、Smac タンパク質から膜間腔局在化シグナル配列を同定することに成功した。膜間腔に様々なプローブを局在させることが可能であり、今後膜間腔のイメージング研究に必要とされるペプチド配列であると考えている。当初は膜間腔局在タンパク質の収集を目標としたが、国際的にミトコンドリアプロテオームの競争が激しくなり、個人研究によるタンパク質収集と解析には限界が生じた。新規な膜間腔局在タンパク質を数分子同定はしたが、オミックス研究の成果として纏められなかった点は反省している。

またタンパク質の動態研究の一環として、タンパク質の核内移行とアポトーシスに伴うミトコンドリアからの放出過程を、マウス個体内で可視化する発光プローブを開発した。当初創案した検出の基本コンセプトを実験的に実証することに成功し、これまで組織切片標本を作製しなくては観察できなかった現象が、生きたマウス個体内から取り出せるようになったことは大きな成果であった。発光系を利用した分子イメージングの端緒が開かれたと考えている。検出の感度や空間分解能、また個体深部の臓器特異的な検出が可能であるかなど、克服すべき課題が多く残されている。今後はこれらの課題を解決していきたい。

遺伝子にコードされたプローブで mRNA を可視化する研究成果は、世界に先駆けて行われたものである。これまで標的 mRNA の配列に応じて、認識可能なタンパク質プローブは存在しなかった。開発したプローブが RNA 配列に応じてデザインできること、そしてミトコンドリア mRNA の動態を初めて捉えたことは、新たな RNA 研究法になると考えている。当初はサイトゾルで発現する mRNA をマウス個体内で検出することを目標に掲げた。しかしサイトゾルに多種類存在する mRNA の特異的な検出は、漸く活路が見いだせた段階である。さきがけ研究の成果を土台として、今後は生きた動物個体内の特異的 RNA 検出を実現する予定である。

6 研究総括の見解:

細胞外刺激が引き起こす遺伝子発現とタンパク質のオルガネラ移行の時間軸を含めたダイナミクスを非侵襲的に検出するという、非常に難度の高い、高度な技術レベルを要する研究課題であるが、本人の極めて緻密で地道な研究態度と高い研究能力により、タンパク質の核内移行の検出や初めて RNA 動態を検出できるプローブによる可視化は世界的にも第一級の質の高い成果

として評価できる。日本化学会進歩賞や若手科学者賞を受賞したように、客観的にも高い評価を得ている。

7 主な論文等:

論文 国際誌 14 件

- (1) High-Throughput Sensing and Noninvasive Imaging of Protein Nuclear Transport by Using Reconstitution of Split *Renilla* Luciferase. S. B. Kim*, T. Ozawa*, S. Watanabe, Y. Umezawa, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **101**, 11542–11547 (2004). (* Equal contribution to this work)
 - (2) A High-Throughput Screening of Genes that Encode Proteins Transported into the Endoplasmic Reticulum in Mammalian Cells, T. Ozawa, K. Nishitani, Y. Sako, Y. Umezawa, *Nucleic. Acids Res.*, **33**, e34 (2005).
 - (3) Genetically Encoded Stress Indicator for Noninvasively Imaging Endogenous Corticosterone in Living Mice. S.B. Kim, T. Ozawa, Y. Umezawa, *Anal. Chem.*, **77**, 6588–6593 (2005).
 - (4) A Short Peptide Sequence that Targets Fluorescent and Functional Proteins into the Mitochondrial Intermembrane Space. T. Ozawa, Y. Natori, Y. Sako, H. Kuroiwa, T. Kuroiwa and Y. Umezawa, submitted.
 - (5) Imaging Endogenous RNA in Single Living Cells; Dynamics of Mitochondrial RNA during Oxidative Stress. T. Ozawa, Y. Natori and Y. Umezawa, submitted.
- 他国際誌9件

受賞 2件

- (1) 小澤岳昌 日本化学会進歩賞 (2004)
- (2) 小澤岳昌 文部科学大臣表彰若手科学者賞 (2005)

招待講演 国際6件, 国内17件

- (1) “Visualization of Organelle-Localized Proteins in Living Cells Using Split-Reporter Reconstitution Analysis”, T. Ozawa, *The VIIth European Symposium of the Protein Society*, Stockholm, Sweden; scheduled in May, **2007**.
- (2) “Genetic Approaches to Identifying Mitochondrial Proteins and Their Localization”, T. Ozawa, *4th Asian Society for Mitochondrial Research and Medicine*, Seoul, Korea; scheduled in February, **2007**.
- (3) “Design of Split Reporter Proteins for Biomolecular Imaging”, T. Ozawa, *Korean Society of Medical Biochemistry and Molecular Biology*, Seoul, Korea; October, **2006**.
- (4) “Methods for Identifying Organelle-Targeting Proteins”, T. Ozawa, *The Second NIBB-EMBL Symposium*, Aichi, Japan; March, **2006**.
- (5) “Reporter Protein Reconstitution: In vivo Sensing of Organelle-Localized Proteins”, T. Ozawa, *32nd Annual Meeting of the American Society for Photobiology*, Seattle, USA; July, **2004**.

他国際招待講演1件, 国内招待講演17件

研究課題別評価

- 1 研究課題名: 極低温電子線断層法によるセプチン系超分子構造体の解析
— 複合体の構造と機能の解明及びその応用

2 研究者氏名: 木下 専

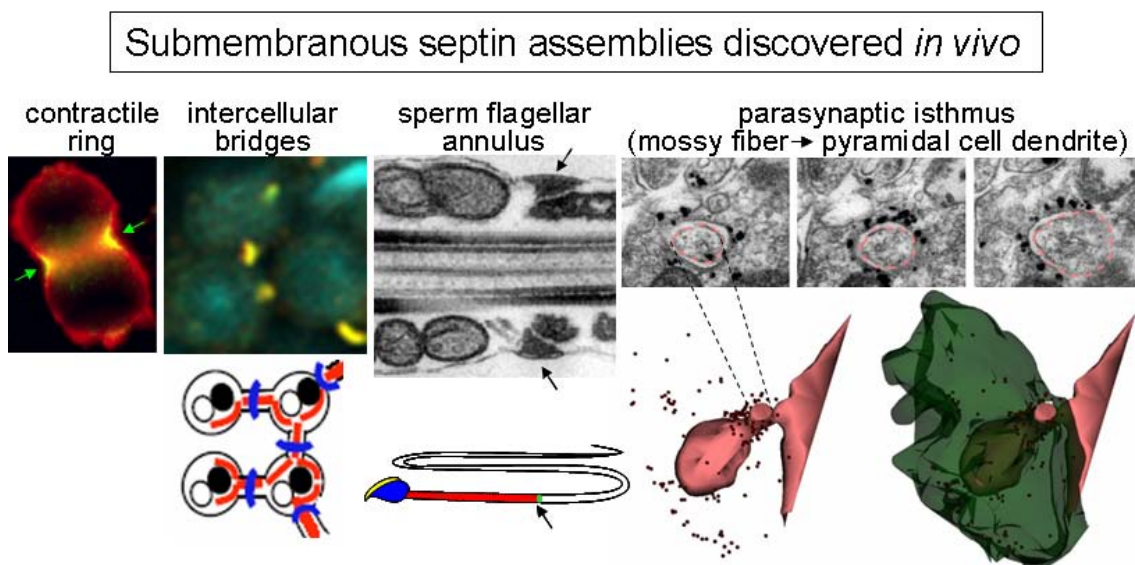
3 研究のねらい:

セプチンは、アクチンやチューブリンに次ぐ普遍的なヌクレオチド結合性細胞骨格蛋白質である。しかし、細胞内では多くの場合アクチン系・微小管系・膜骨格系に紛れて存在すること、変異体が致死となるか重複遺伝子によって代償されること、阻害剤がないことなどのために発見と解析が遅れた。また、アクチン・フィラメントが 1 種類、微小管が 2 種類のサブユニットの規則正しい重合体であるのに対し、セプチン・フィラメントは 3 種類以上のサブユニットから成るやや不規則な重合体である。その複雑さの故に、サブユニットの立体構造やフィラメント形成機構も謎に包まれている。本研究では、電子顕微鏡法、RNA 干渉法、遺伝学的手法を駆使してセプチン集合体の生理機能と関連病態を探索するとともに、再構成系を利用して多様かつユニークな高次集合状態を実現している構造基盤の解明を目指す。

4 研究成果:

(1) セプチン系超分子構造体の探索と機能解析

セプチン・フィラメントのサブユニット構成・局在・機能に関しては生物種や細胞系譜による多様性が著しく、未知の部分が多い(3)。従って、セプチン集合体の局在と機能的意義の探索は、現時点においてもこの分野の最重要課題の1つである。



細胞レベルの研究により、アクチン系とセプチン系の相互依存的な超分子複合体形成が細胞質分裂の際の収縮輪形成に必須の役割を果たすことを以前報告した。本研究では、細胞質分裂に先立つ染色体の赤道面への整列と紡錘体極への分配に動原体近傍のセプチン・スカフォールドが必須であることを、RNA 干渉法とライブイメージング法を用いて示した。すなわち、紡錘体赤道面付近のセプチン・クラスターを枯渇させると、染色体牽引モーター蛋白質 CENP-E が紡錘体赤道面に保持されず、両極へと迷走する。このため分裂中期に赤道面に整列すべき染色体の配列が乱れ、不等分配となる。この事実は、種々の悪性腫瘍で高頻度にみられるセプチン系の異常が染色体不安定化をもたらし、さらなる悪性化に加担する可能性を示唆するため、癌の進展において重要な意味を持つと考えられる(1、スタンフォード大学との共同研究)。

組織・個体レベルでは、脳のシナプス膜直下にセプチンが大量に集積していることを以前報告したが、詳細な分布様式や生理機能は不明であった。本研究では、免疫電子顕微鏡(金粒子標識+銀増感法)連続切片増から抽出した 2 次元デジタル画像のスタックをコンピュータ上で再構築して 3 次元空間におけるセプチンの分布を解析した。この技法により、例えば海馬では錐体細胞樹状突起棘の峽部を取り巻く苔状線維の前シナプス膜直下にセプチンが集積していることを明示することができた。セプチン集合体に特徴的な環状分布は小脳のシナプス近傍でも見られ、繊細な細胞形態の維持や膜蛋白質の組織化などの生理機能を反映すると推測された。そこで、脳特異的サブユニットである Sept4 に着目して逆遺伝学的手法による機能探索を行った。作製した Sept4 遺伝子欠損マウスにおいては、ドパミン神経のシナプス伝達が低下していた。その原因を探索したところ、前シナプス膜直下のセプチン系が神経伝達物質ドパミンの合成・分泌・再取り込みに必要な分子群(すなわち合成酵素、シタキシシン、トランスポーターなど)の組織化ないし安定化に必要であることがわかった。詳細な分子機構は解析中であるが、これまで推測の域を出なかった膜蛋白質のスcaffoldingとしてのセプチン系の意義がこの系で検証できるであろう。

ドパミン伝達障害を主徴とする神経変性疾患にパーキンソン病がある。その病理学的特徴として、責任蛋白質 α -シヌクレインが細胞質内凝集体(レビー小体)を形成することが知られている。Sept4 は α -シヌクレインと直接会合するため、パーキンソン病においてレビー小体に巻き込まれて共凝集することがわかった。さらに検討を重ねることにより、「Sept4 が前シナプス膜直下からレビー小体へと隔離されて欠乏することがドパミン伝達障害の一因である」という病態モデルを提案した(5)。

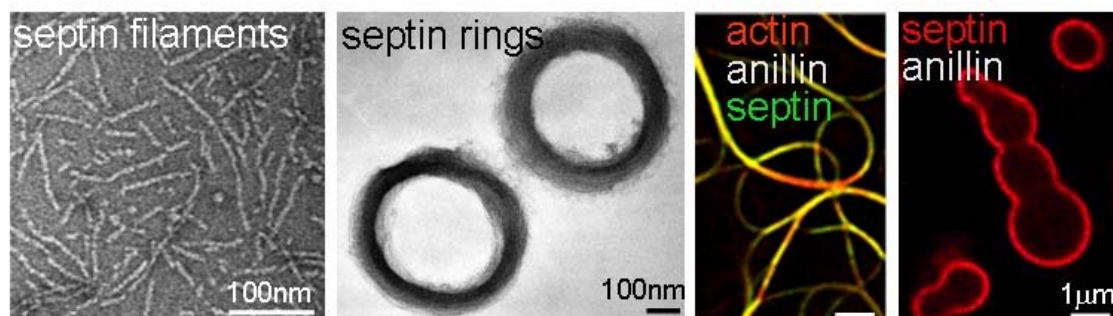
一方、海馬や小脳で見つかったセプチン環状集合体の形状や機能は Sept4 欠損のみでは破綻しなかったため(4)、その生理的意義は依然不明である。一方、このマウスの予想外の雄性不妊が精子鞭毛内のセプチン環状集合体の発見につながり、その破綻が鞭毛構造の脆弱化と鞭毛運動の微弱化をもたらすことがわかった。この知見に基づき、臨床家と共同で男性不妊患者の検体をスクリーニングしたところ、精子無力症(微弱鞭毛運動を主徴とする原因不明の疾患)の 25%においてセプチン環状集合体の破綻を検出した。セプチンは、本疾患初の分子診断マーカーとして、治療方針決定や原因解明に役立つと期待されている(2 および投稿中)。

これらの事例の蓄積により、セプチン系が単細胞レベルから高次脳機能まで多彩な生命現象を支えていることが認知されつつある。セプチン系は、アクチン系や微小管系のように細胞全体の形状を global に支持・制御する連続的な細胞骨格系ではなく、細胞内の微細構造ないし超分子複合体を支持・安定化する local な分散型 scaffolding システムであるという考えを提案した(3)。

(2) セプチン系超分子構造体の *in vitro* 再構成

上記のようなセプチン系の多機能性は、20 種類以上のサブユニットの組み合わせ多様性だけでなく、フィラメント状複合体のフレキシブルな高次集合性や蛋白質・脂質との相互作用による構造転換によって実現されていると推測される。この複雑系において、複合体形成や高次集合の一般原理に迫るためには、最も単純なセプチン複合体の *in vitro* 再構成が有用である。

Diverse septin assemblies reconstituted *in vitro*



この再構成系により、これまでに、複合体形成の組み合わせ原理、セプチン・フィラメントの環状自

己集合性、アクチン・セプチン超分子構造体形成の分子機構を発見・検証してきた。最近の展開として、細胞膜裏打ち蛋白質アニリンがセプチン集合体の形状やトポロジーを転換させることや、セプチン複合体が脂質 2 重膜リポソームの曲率を制御して多数の細管を突出させる変形活性を持つこともわかった(いずれも投稿準備中)。

複合体形成機構の解析の一環として、3 つのサブユニットから成る最も単純な再構成セプチン複合体のうち、1 サブユニットの GTP 結合領域(P-loop)に GTP 結合不能型の1アミノ酸置換変異を導入した変異型複合体を複数調製した。これらの高次集合性を検討したところ、予想に反していずれも野生型と同等の高次集合性を保持していた(J. Biochem 2003 および未発表)。従って、 α/β -チューブリンヘテロダイマーの重合・脱重合が β -サブユニットの GTP ターンオーバーと共役している事例とは異なり、セプチン複合体サブユニットの酵素活性が高次集合とは共役していない可能性が示唆された。この事実は、酵母のセプチン高次集合体はダイナミックに再編成する一方、GTP/GDP の代謝回転が観測できないという Harvard 大学グループの逆説的な報告とも符合する(J Biol Chem. 279, 3111, 2004; Nature 443, 466, 2006)。

(3) セプチン系超分子構造体の構造解析を目指して

上記のように、セプチンの不活発なヌクレオチド交換反応や重合・脱重合機構に関する謎を解くために、少なくともセプチンサブユニットの GTP 結合領域、できれば複合体丸ごとの構造情報が必要である。しかし、最も単純な再構成セプチン複合体であってもサブユニット数や形状が不規則であるため、電子線単粒子解析による高分解能の構造情報は期待できない。また、複合体・単一サブユニット・サブユニット断片のいずれをとっても、精製・濃縮の過程で重合ないし凝集してしまうため、結晶化に不適であることが判明した。(当領域第2期生、村上聡研究者の協力に感謝する。)同様に、チューブリンの構造解析に唯一成功した California 大学グループ、GTPase の構造解析を専門とする Max Planck 研究所グループなども酵母、線虫、ヒトのセプチンの構造解析を数年来試行してきたが、いずれも成功していない。このような国際研究状況の中、本研究者は特殊な培養細胞において Sept4 サブユニットが機能未知の加水分解酵素と安定な複合体を形成していることを見出した。この事実を利用して、Sf9 共発現系で両者の複合体を調製し、共結晶化による X 線構造解析の可能性を探っている。上記 California 大学グループや Zürich 工科大学グループとの国際共同研究により、さきがけ研究期間終了後も引き続きこの問題に取り組んでいく。

5 自己評価:

高等動物セプチン集合体の微細形態および生理・病理機能の解析においては国際競争に負けな研究ができた。これはひとえにさきがけの支援の賜物と考えている。しかし、機能と構造の二兎を追ったこともあり、構造解析においては重合性蛋白質の構造解析が一筋縄ではいかないことを再認識するにとどまった。残された問題は、共結晶化や目標を共有するグループとの共同研究などによって数年以内に解決したい。

6 研究総括の見解:

本研究課題は、多様な高次凝集構造をとるセプチン複合体を、京都大学藤吉研究室で開発中の極低温電子顕微鏡で解析することを当初目標に上げていたが、極めて凝集性の高い複合体のため凍結体での観察は無理と判断し、当領域の X 線結晶構造解析専門家の知恵も借りて共結晶化による構造解析に的を絞っている。その点は道途ばであるが、一方セプチン複合体の微細構造や機能解析においては見るべき成果をあげた点、評価できる。当初目標の構造解析の道は厳しいが、他のさきがけ研究者も 2 年後に目標達成した例もあるので是非チャレンジを続けて欲しい。

7 主な論文等:

論文

- (1) Spiliotis ET, Kinoshita M, Nelson WJ. A mitotic septin scaffold required for mammalian chromosome congression and segregation. **Science** 307, 1781-1785, 2005.

- (2) Ihara M, Kinoshita A, Yamada S, Tanaka H, Tanigaki A, Kitano A, Goto M, Okubo K, Nishiyama H, Ogawa O, Takahashi C, Itohara S, Nishimune Y, Noda M, Kinoshita M. Cortical organization by the septin cytoskeleton is essential for structural and mechanical integrity of mammalian spermatozoa. **Developmental Cell** 8, 343–352, 2005.
- (3) Kinoshita M. Diversity of septin scaffolds. (*In* Cell structure and Dynamics Review Series; eds. V. Small and M. Glotzer) **Current Opinion in Cell Biology** 18, 54–60, 2006.
- (4) Ihara M, Hagiwara A, Monypenny J, Okawa K, Kinoshita A, Kitano A, Tanigaki A, Kaneko R, Kawahara S, Kirino Y, Itohara S, Noda M, Kinoshita M. A postmitotic septin in Bergmann glia is required for cerebellar neuronal development and motor learning. (revised version submitted to **Molecular and Cellular Biology**)
- (5) Ihara M, Yamasaki N, Tomimoto H, Kitano A, Tanigaki A, Hikawa E, Noda M, Takanashi M, Hattori N, Miyakawa T, Kinoshita M. Sept4, a component of presynaptic scaffold and Lewy bodies, is required for the suppression of α -synuclein neurotoxicity (revised version submitted to **Neuron**)

(全 16 報)

特許・受賞
該当なし

招待講演 国際 5 件 国内 9 件

- (1) April 13–16, 2004, Kinoshita M. The 5th UK–Japan Cell Cycle Workshop. “The septin cytoskeleton is essential for the structural integrity and motility of mammalian spermatozoa” (Nara, Japan).
- (2) August 15–20, 2004, Kinoshita M. Gordon Research Conference on Macromolecular Organization and Cell Function. “The septin cytoskeleton is essential for structural and mechanical integrity of mammalian spermatozoa” (Oxford, UK).
- (3) May 28–31, 2005, Kinoshita M. “The Lord of the Rings: The Return of the Ring.” The 1st International Septin Workshop. (Aarhus, Denmark).
- (4) March 15–17, 2006, Kinoshita M. “Emerging roles of submembranous septin scaffolds in terminally differentiated mammalian cells” The 9th Membrane Research Forum (Kyoto, Japan)
- (5) June 11–16, 2006, Kinoshita M. “Emerging roles of septin scaffolds in developing and degenerating brain.” Gordon Research Conference on “Molecular and Cellular Neurobiology” (Hong Kong, China)

(全 14 件)

研究課題別評価

1 研究課題名: 蛋白質1個における局所的構造変化の可視化

2 研究者氏名: 西坂崇之

3 研究のねらい:

近年の顕微鏡技術の発展により、従来はマクロな分子の集団において研究されていた試料が、個々の分子を対象とし、その個性や不均一性が議論され始めた。これら1分子研究の流れを受け、本課題では、1個の生体分子の中で起きる構造変化や化学反応を、顕微鏡下で直接可視化することを目的とした。本研究によって考案された顕微鏡(特許取得済)は、独自の光学系によって全反射照明を実現しており、ガラス基板近傍の色素1分子の角度変化を $\sim 5^\circ$ の精度で検出することができる。この顕微鏡を実際に開発し、ダイナミックな構造変化を行う蛋白質に応用することで、蛋白質1分子の中の構造変化、さらには特定のサイトで起きる化学反応を定量的に明らかにする。最終的には、蛋白質の動作メカニズムに、1分子のレベルで踏み込む。この新しい手法は、様々な蛋白質を対象に応用され発展するというポテンシャルを持つ。

4 研究成果:

ガラス面に吸着したタンパク質を高感度の蛍光顕微鏡で観察し、その情報を1分子のレベルで取り出す新しい実験系の構築を行った。この実験系を用い、回転分子モーターである F_1 -ATPaseが、エネルギー源であるATPを取り込みながらステップ状に回転する様子を画像化することに成功した。またタンパク質の局所的な構造や、粒子の3次元的な動きを高速で検出するという、独自の光学顕微鏡の開発にも成功した。

(1) 新しい顕微鏡技術

蛋白質の活性を定量的に調べる場合、分光学的手法が主流であり、活性の指標となる分解産物に反応して光の吸収もしくは蛍光が変化するプローブが用いられる。この時、測定の対象とされる蛋白質は約 10^{12} 、一兆個にも達する。同じ光を用いるのであれば、分光器よりはるかに感度と空間分解の高い技術が存在する。それが光学顕微鏡である。カメラやフィルター、光学系の急速な技術の発展により、水の中の1個の蛍光色素を検出することが可能となっている。本研究では、1分子を観察する技術の中で、全反射型蛍光顕微鏡(total internal reflection fluorescent microscope, TIRF)に注目して顕微鏡技術の開発を行った。TIRFとは、色素の励起に用いるレーザー光をガラスと水の界面で全反射させ、ガラス近傍に発生するエバネッセント場により試料を観察する手法である。エバネッセント場は深さ ~ 100 ナノメートルで消光し水中に侵入しないので、水中に色素がある場合でも、通常の方法に比べ格段に背景光を抑えることができる。

研究者が開発した光学系では、エバネッセント場の偏光をxy方向に時間的に変化させることができる。蛍光色素は、色素固有の特定の波長によって励起されて光を放出するが、その励起効率、色素の振動モーメントの向きに依存する。色素の向きと励起光の偏光が一致している場合には信号は最大となり、直行する場合は最小となる。図の光学系では、エバネッセント場の偏光が時間と共に回転するようになっている(関連特許:3577514号、発明の名称「全反射型蛍光顕微鏡」、発明者 西坂崇之)。この光学系で1分子の蛍光色素を観察すると、色素はその向きを反映して明滅を行うことになる。

(2) 1分子の反応の画像化

この技術を用いて、 F_1 -ATPaseがATPを加水分解する瞬間の画像化を試みた。 F_1 -ATPaseはATP合成酵素の1部分であり、 $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$ のサブユニット構成になっている。'97年にATPを分解しながら一方向に回転する分子モーターであることが分かり、本研究では回転の最小単位である $\alpha_3\beta_3\gamma$ を用いている。

観察系では、基質であるATPを蛍光色素Cy3 で標識し、ガラス面上に固定した1分子の F_1 -ATPaseとATPが結合・解離する様子を高感度カメラで撮影した。 F_1 -ATPaseにはATPを結合する触媒部位が3カ所あるので、複数のATP/ADPから1回の反応を分離する必要があり、溶液には無標識のATPを混在させている。モーターの回転軸である γ の回転はポリスチレン微小球(ビーズ)によって検出する(論文 (3))。

この測定で特徴的なのは、独自の顕微鏡によってエバネッセント波の偏光が試料の xy 平面内において一定速度で回転しているという点である。結合後の Cy3-ATP1分子の強度を見ると、偏光の回転に応じて強度が明滅しており、ここから Cy3-ATP の色素の角度が決定できる。同じ分子を対象にして複数の Cy3-ATP によるステップを調べたところ、 γ の角度とATP の方向には明らかな相関があることが分かった。すなわち3つある触媒サイトのうち、どこに ATP が結合したのかを区別することができ、しかも回転軸 γ の向きはその触媒サイトによって決定されることが明らかになったのである。

(3) F_1 -ATPaseの回転メカニズム

本研究で用いた変異体タンパク質(文献 (4))では、無標識のATPでは1/3回転(120°)のステップを刻むが、Cy3-ATPを用いた時には、 120° の中に 80° と 40° という2つのサブステップを刻むという性質がある。この特徴を指標にして回転の解析を詳細に行った結果、中間状態まで含めた F_1 -ATPaseの回転スキームが完成された(論文 (1), (5))。ATPが結合して全ての反応が終了する度に、 γ 軸は 120° ステップを行い完了し、再びATP結合待ちの状態に戻る。中間状態に関する重要な結論として、「 40° サブステップは、(いまATPを結合したサイトから見て)1つ前のサイトにおける反応が支配している」ことが導かれた。

(4) 1分子の構造変化へ

以上の研究を通じて F_1 -ATPaseの回転における化学状態が詳細に明らかになったが、ATP加水分解反応に伴う駆動機構そのものは未だ明らかになっていない。近年解かれたいくつかの結晶構造から、触媒サブユニット β が複数のコンフォメーションを取りうることが予想されている。そこで偏光の向きが回転する全反射型顕微鏡を用い、回転中の β サブユニットの構造変化の検出を試みた。

3つある β 触媒サブユニットのうち、1つの β のC末端ドメインにのみに蛍光分子を標識したところ、Cy3-ATP の実験と同様に色素が明滅する様子が観察された。 β サブユニットが 120° おきの3箇所滞る時に、この信号を解析したところ、信号の位相が優位に変化することが分かった。このことから、 β の構造変化の検出に成功したといえる。具体的な角度変化の詳細については、取得したデータの完全な評価が完全に終わっておらず現在も解析中であるが、たった1つの分子に注目しながら、順々に起こる構造変化のひとつだけを見分ける事が可能になっている。これからは、活性を持った生きた酵素の局所的な構造変化について、結晶構造と照らし合わせて議論することが可能になっていくだろう。今後はさらに高速化を目指した測定に発展させる予定である(特許 (1))。

(5) 2次元から3次元へ

従来の顕微鏡観察では、試料の運動について二次元の情報しか含まれず、垂直方向の位置を正確に知ることはできなかった。そこで微粒子の変位をナノメートルオーダーで三次元的に検出する新しい光学顕微鏡、TdTIP (three-dimensional tracking by an insertion of prism) Microscope を開発した(特許 (2), (4))。この光学顕微鏡で捉えた蛍光単粒子の像は、プリズムによって二つに分けられており、それぞれの像の平行移動量から水平方向の変位、相対移動量から垂直方向の変位が、独立かつ同時に検出できるという特徴を持つ。蛍光微粒子もしくは1個の蛍光色素による標識によってあらゆる蛋白質に応用できるため、今後、一分子生理学への大きな貢献が期待される。現在、この手法を独自の暗視野顕微鏡(特許 (3))と組み合わせ、分子モーターの立体的な動きを定量的に検出するための実験系を構築しようとしている。

5 自己評価:

本課題において、回転分子モーター蛋白質“F₁-ATPase”の化学反応とダイナミックな構造変化が、その中間状態まで含めて1分子のレベルで明らかになった。特に基質の分解と力学反応が同時に観察された例はアクチオシン系に続く2例目であり、蛋白質科学全般への強いインパクトがあったと考えている。課題申請時に想定していた、ドメインの構造変化を3次元でとらえる研究については、装置系の開発が十分に進まず期待した成果は得られなかった。しかし2次元の構造変化については、結晶構造と比較して議論できるだけの優位なデータが出始めており、課題終了後すぐに成果を論文として発表する予定である。次の新しい研究へと続く十分な足がかりは得られたと考えている。

また申請当初は想定していなかった、粒子の動きを3次元的に検出する新しい顕微鏡が開発された。これは予期せぬ成果であり、顕微鏡開発を行っている研究者や技術者からも高い評価を得ている。確かな応用へと研究の方向性を定め、新しいサイエンスへ発展させていきたい。

6 研究総括の見解:

色素で標識したたんぱく質1分子の動きを、色素の角度を3次元的に検出するという発想で新しい全反射顕微鏡技術を開発し、当初目標に掲げた回転分子モーターたんぱく質の構造変化を1分子レベルで検出することに成功した点は評価できる。ただ関心が主に技術に向かっているのか、折角の観測を出発点に鋭く対象に迫ると言う発想に少し甘さがあつたのではないかな。

発想が非常にユニークで研究者として成長が楽しみである。副産物として非常に簡易な装置で3次元位置観測ができる光学顕微鏡を開発し、特許出願に結びつけた点もこの研究者ならではの気がする。

7 主な論文等:

論文等 5 件

- (1) Nishizaka, T., Oiwa, K., Noji, H., Kimura, S., Muneyuki, E., Yoshida, M. and Kinosita, K., Jr. “Chemomechanical coupling in F₁-ATPase revealed by simultaneous observation of nucleotide kinetics and rotation.” *Nature Structural and Molecular Biology* **11**, 142–148 (2004)
- (2) Yoshida, Y., Shimozawa, T., Nishizaka, T., Ishiwata, S. and Takeuchi, S. “Muscle proteins as high speed nano transporters on micro patterns.” *MEMS 2006*, 134–137 (2006)
- (3) Nishizaka, T., Mizutani, K. and Masaike, T. “Single-molecule observation of rotation of F₁-ATPase through micro beads.” *Methods in Molecular Biology*, in press.
- (4) Muneyuki, E., Watanabe-Nakayama, T., Suzuki, T., Yoshida, M., Nishizaka, T. and Noji, H. “Single Molecule Energetics of F₁-ATPase motor.” *Biophysical Journal*, in press.
- (5) 西坂崇之、政池知子「F₁-ATPaseの化学-力学カップリング:1分子の反応を顕微鏡でとらえる」*生物物理*, in press.

特許 国内 3 件、海外 1 件、海外出願申請中 1 件

(1) 特願 2005-101764

発明の名称:「高時間分解能画像化方法及び装置並びに全反射型蛍光顕微鏡」

発明者:西坂崇之 出願人:独立行政法人科学技術振興機構

出願日:平成 17 年3月 31 日特許出願

(2) 特願 2005-197049

発明の名称:「3次元位置観測方法及び装置」

発明者:西坂崇之 (80%)、水谷佳奈 (20%)

出願人:独立行政法人科学技術振興機構 (80%)、学校法人学習院 (20%)

出願日:平成 17 年7月6日特許出願

(3) 特願 2006-144050

発明の名称:「暗視野顕微鏡およびその調整方法」

発明者:西坂崇之 (75%)、安田涼平 (25%)

出願人:独立行政法人科学技術振興機構 (62.5%)、学校法人学習院 (37.5%)

出願日:平成 18 年5月 24 日特許出願

(4) PCT 出願

出願番号:PCT/JP2006/312958

特許の名称:「3次元位置観測方法及び装置」

発明者:西坂崇之 (80%)、水谷佳奈 (20%)

出願人:独立行政法人科学技術振興機構 (80%)、学校法人学習院 (20%)

(5) PCT 出願申請中 1件

研究課題別評価

1 研究課題名: ミクロな化学反応過程がもたらすマクロなタンパク質機能発現の分子物理

2 研究者氏名: 林 重彦

3 研究のねらい:

タンパク質のミクロな分子相互作用の総体から如何にマクロな機能が立ち現れてくるのか? これはポスト・ポストゲノム時代に必ず立ちはだかる問題である。本研究では、分子シミュレーションの手法を軸に、このタンパク質機能発現におけるマルチスケールな現象の分子物理的解明を試みる。特に光受容タンパク質や分子モータータンパク質などに見られる化学反応過程がもたらす機能発現の分子機構に注目し、どのように局所的な化学反応が大域的なタンパク質及びタンパク質複合体の動きを伴う機能発現につながっていくかを明らかにする。またその際、分子シミュレーションの持つ可能性の一つである、タンパク質構造と生化学、分光学および一分子測定実験などの多様な実験的アプローチの間の橋渡しを特に意識して研究を進め、機能発現の分子機構の理解を目指す。

4 研究成果:

(1) ロドプシン光受容タンパク質の光活性化

ロドプシタンパク質はレチナールシッフ塩基分子を発色団として持つ光受容体である。そのファミリーの代表的なものに、視物質ロドプシン(Rh)がある。Rh は眼の網膜に存在し視覚機能を担っている。Rh は G タンパク質結合型受容体タンパク質ファミリーの一つでもあり、光受容により G タンパク質を結合・活性化し、視覚のシグナル過程をスタートさせる。また、高度好塩菌の紫膜中には、光駆動型のプロトンポンプであるバクテリオロドプシン(bR)が存在し、光-化学エネルギー変換を担っている。

これらのロドプシタンパク質機能発現の初期過程は、ポリエン構造を持つ発色団分子の光異性化である。この光異性化反応は、タンパク質中では溶液中のそれに比べて非常に高速であり高い選択性を持つ。この特徴は、高い光反応生成物の収率(0.6~0.7)を与え、光受容体に求められる高い感受性を可能にしている。この超高速反応の動力学を調べるために、これまでに多くの時間分解分光法による研究が行われてきた。本研究では、このようなタンパク質内の反応に特徴的な反応動力学を明らかにするために、Rh の初期過程に対して非経験的分子軌道法を用いたハイブリッド QM/MM ハミルトニアンに基づく多電子状態間の遷移を含む分子動力学(MD)計算によるアプローチにより時間分解分光シグナルの背後にある分子動力学を明らかにすることを目的とした(投稿準備中)。

まず、計算した 14 本のすべてのトラジェクトリにおいて、光異性化反応は $C_{11}=C_{12}$ 結合の周りの回転に対して起き、およそ 200 fs の内に電子励起状態から基底状態への遷移が完了していることが見出された。これは実験で観測されている高い選択性と反応速度を再現している。図 1 に、時間分解放射スペクトルに対応する、トラジェクトリに沿った S_1 と S_0 状態のエネルギー差の時間発展を示す。光励起からエネルギー交差までの時間が 40~90 fs の短い時間領域に分布しており、強い熱雑音の環境中の反応にも関わらず、コヒーレントな反応動力学となっている。このような高速な反応動力学は、二つ以上の結合周りの回転が協調的に相関していることによる。また反応生成物の構造解析により、G タンパク質結合に重要であることが知られているヘリックスと反応直後から強く相互作用していることを見出した(論文投稿準備中)。

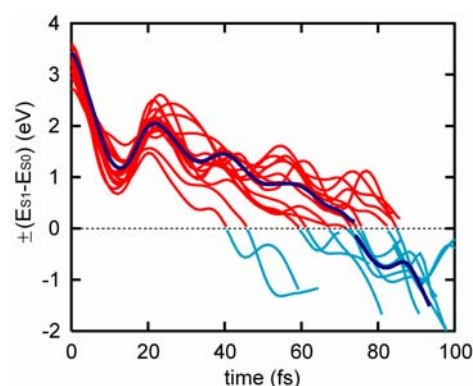


図 1 S_1 と S_0 状態のエネルギー差の時間発展

次に、bR において、初期過程である光異性化反応により発色団周辺のタンパク質環境の応答を分子レベルで解析した。bR は光駆動型プロトンポンプであり、光異性化に伴う発色団の構造変化により、吸収した光のエネルギーがどのような形でタンパク質に蓄えられているかを解明するのが、能動輸送の分子機構を理解する上で非常に重要である。本研究では、シミュレーションで得られた反応中間体モデルに対して振動解析を行うことにより、振動分光実験との対応を通して分子間相互作用の詳細を解析した。図 2 に光異性化反応前後のシッフ塩基周辺の構造と水及びシッフ塩基の O-D 及び N-D 伸縮振動の振動数を示す。計算された振動数は神取らの振動分光実験スペクトルを定性的に再現し、反応前では非常に振動数の低いモードが反応後には大幅に高振動数シフトしていることが見出された。これは、反応により水及びシッフ塩基の水素結合が大幅に弱められたことを意味している。さらなるエネルギー解析の結果より、このような水素結合の弱まりが、光エネルギー貯蓄に大きな役割を果たしていることが明らかにされた (Hayashi et al. 2004)。

稲葉らの変異体実験により、システイン残基とキノン分子のアルギニン分子を含む電荷移動錯体が示唆された。そこで、この推測される電荷移動錯体の発色電子状態を明らかにするために、非経験的分子軌道法を用いて、ベンゾキノ、チオレート及びアルギニン残基からなる電荷移動錯体分子モデルを構築した。得られた構造では、アルギニン残基により安定化されたチオレートアニオンがベンゾキノの π 軌道と強く相互作用をしている。さらに、この分子モデルの電荷移動励起状態を MCQDPT 法により計算した。その結果、電荷移動励起エネルギーは実験で得られている吸収波長及び強い吸収強度を再現し、このような電荷移動錯体が中間状態の発色の分子起源となり得ることがわかった。

図 2 (a) bR の活性部位の反応前後の構造と (b) 水及びシッフ塩基の振動数変化

さらに、この電荷移動錯体からチオレートベンゾキノンに接近させることにより、安定な付加物複合体が形成されることがわかった。この付加物複合体生成過程では、チオレートアニオン上の電子がキノンの O 原子付近へ電子移動を起こし、その電子を安定化させるべくアルギニン残基も構造変化をしている。これらの結果より、図 3 のような DsbB のジスルフィド結合交換とキノ還元の効率的な反応モデルが提案される。二つのチオレートアニオンのみの反応では静電反発等の理由により困難であったジスルフィド結合生成が、キノン及びアルギニンとの電荷移動錯体や付加物複合体形成により効率的に触媒される。

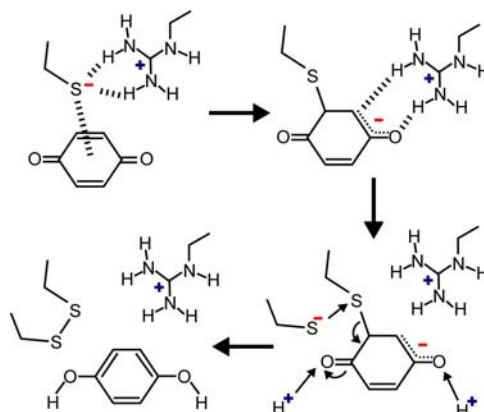


図 3 ジスルフィド結合交換及びキノン還元反応スキーム

(3) F₁-ATP合成酵素中のATP加水分解反応と化学-力学エネルギー変換の分子機構

F₁-ATP 合成酵素は 3 つのβサブユニットにおける ATP の逐次的な加水分解によりγサブユニットの回転を引き起こすモータータンパク質であることが一分子測定実験により明らかになった。しかし、局所的な ATP 加水分解反応の化学エネルギーがどのように大域的なサブユニットの力学的エネルギーに変換されるかについては依然明かな理解が得られていない。そこで、QM/MM 法を用いて、F₁-ATP 合成酵素中の ATP 加水分解反応の詳細を解析した(Dittrich et al., 2004)。

図 4(a)に計算により同定された反応遷移状態の構造を示す。特徴的なのは、γリン酸を求核攻撃する水分子に隣接する別の水分子がプロトンを受け取りH₃O⁺となることにより、多中心の遷移状態となっていることである。このATP加水分解反応の反応性を、それぞれγサブユニットの回転前後に対応するATP及びADP結合部位において解析した。図 4 (b)に反応に伴うエネルギー変化を示す。ATP結合部位においては反応障壁が高く、また強い吸熱反応となった。これはγサブユニットの回転前ではATP加水分解反応は起こらないことを意味している。一方、ADP結合部位においては、アルギニン残基の相互作用(アルギニンフィンガー)により、反応障壁が下がり、またほぼ等エネルギー反応となった。この結果は、ATP加水分解反応がトリガーとなって回転運動が引き起こされるのではなく、他の空いている結合部位へのATP結合に起因するγサブユニットの回転によりATP加水分解反応が引き起こされ回転の一方向性を得る、という機構を示唆している。

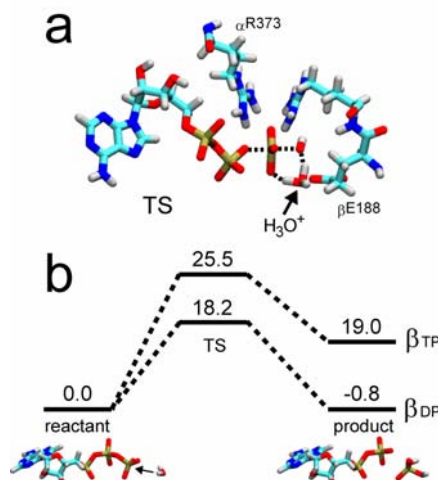


図 4 (a) 反応遷移状態構造と(b) 反応のエネルギープロファイル

(4) ミオグロビン中の CO 分子解離経路の探索

タンパク質中のリガンド分子の局所的な化学反応は、タンパク質の構造変化と相関し、機能へと繋がっていく。従って、化学反応後の長時間にわたるタンパク質構造変化の解析は、機能の理解にとって重要である。しかし、現在の分子シミュレーションでは、200 残基程度の大きさのタンパク質の場合であっても 100 ns 程度のシミュレーションが限界である。そこで、長時間にわたる現象を記述する方法論の開発が必須となる。本研究ではその一つの試みとして、いわゆる adaptive biasing 法と conformational flooding 法を組み合わせた手法(AB/CF 法)を開発し、ミオグロビン中の CO 分子解離経路の探索に適用した(投稿準備中)。

CO 分子をヘム分子に結合したミオグロビンの光照射により CO 分子がタンパク質から解離することが知られているが、近年の研究により、CO 分子はタンパク質の外に出る前にヘムの近位側

のキャビティーに移動することが明らかになっている。しかしながら、その移動経路はわかっていない。また、移動の時定数は μ 秒に近く、分子シミュレーションで直接的にその移動を追うことができない。そこで、新たに開発したAB/CF法によりCO分子の移動を促進し移動経路を同定した。またこの手法では、得られた移動経路の自由エネルギーを三次元にマップすることが可能であり、移動のボトルネック領域が明快に同定される。同定されたボトルネック領域では、静的な結晶構造では明確な経路が見当たらず、熱揺らぎによるtransientな経路の開きが重要であることが示唆される。

(5) カルモジュリンのカルシウムイオン結合に伴う大域的構造変化

タンパク質の自発的な大域的構造変化の解析は、タンパク質機能発現の分子機構を理解する上で重要であるが、そのような構造変化の時定数は直接的な分子シミュレーションで追跡できる時間よりはるかに大きく、非常に困難な問題として残されている。我々は、タンパク質の大きな揺らぎの運動を加速する手法を開発し、カルモジュリンの大域的構造変化に適用している。現時点では、実験で得られているような構造変化に近いトラジェクトリサンプルが得られているものの、強い局所的相互作用によるトラップからの脱出に問題が残り、また再現性についても十分な確認がなされていないため、さらなる研究を進めている。

5 自己評価:

本研究課題は、タンパク質機能における化学反応と大域的構造変化の分子機構の解明を目的として行われた。前者の化学反応の解析においては、我々の開発した手法の有用性が発揮され、分子シミュレーション研究の可能性を拡げることが出来たと考えている。特に、実験研究者との密接な連携により、個々のタンパク質機能の解明に向けて、理論・分子シミュレーションのアプローチによる確かな寄与が出来たと考えている。一方、大域的構造変化の解析に関しては、まだまだ途半ばである。F₁-ATP合成酵素の研究のように、化学反応だけを見ることにより、化学反応と大域的構造変化に対するある程度の知見を得ることは可能であったが、構造変化そのものの詳細を分子シミュレーションから得る手法の開発は期間内には終了しなかった。この問題は、大域的な構造変化において、調和揺らぎを超えた動きの相関をどのように理解するか、というタンパク質ダイナミクスの本質的な問題を内包していると考えられる。解決に向けて更なる研究を進めていきたい。

6 研究総括の見解:

さきがけ採択前に開発していたハイブリッド分子シミュレーション法を用いて、局所的な化学反応における電子状態の変化が、タンパク質の構造変化と機能発現を引き起こす様子の解析を行った研究であるが、本人評価の通り大域的な構造変化を解析する手法には至らなかった。光受容タンパク質などの化学反応解析では、従来シミュレーションより有用な手法であることを示したこと、および1期生の稲葉謙次研究者との領域内共同研究で、タンパク質ジスルフィド結合創生の基本化学原理を非経験的分子軌道法を用いて理論面から解明したことは評価できる。

7 主な論文等:

発表論文 : 7 件

主な発表論文

- (1) ATP hydrolysis in the b_{TP} and b_{DP} catalytic sites of F₁-ATPase. Markus Dittrich, **Shigehiko Hayashi**, and Klaus Schulten. *Biophysical Journal*, 87:2954-2967, 2004.
- (2) Role of hydrogen-bond network in energy storage of bacteriorhodopsin's light driven proton pump revealed by ab initio normal mode analysis. **Shigehiko Hayashi**, Emad Tajkhorshid, Hideki Kandori, and Klaus Schulten. *Journal of the American Chemical Society (communication)*, 126:10516-10517, 2004.

- (3) Mechanism of color tuning in retinal proteins: SAC-CI and QM/MM study. Kazuhiro Fujimoto, Jun-ya Hasegawa, **Shigehiko Hayashi**, Shigeki Kato, and Hiroshi Nakatsuji. *Chemical Physics Letters*, 414:239–242, 2005.
- (4) Critical role of a thiolate–quinone charge transfer complex and its adduct form in *de novo* disulfide bond generation by DsbB. Kenji Inaba, Yoh-hei Takahashi, Koreaki Ito, and **Shigehiko Hayashi**. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA.*, 103:287–292, 2006.
- (5) Theoretical Studies on the Color–Tuning Mechanism in Retinal Proteins. Kazuhiro. Fujimoto, **Shigehiko Hayashi**, Jun-ya Hasegawa, and Hiroshi Nakatsuji. *Journal of Chemical Theory and Computation*. In press.

特許：なし。

受賞：なし。

招待講演：国際学会 7 件、国内学会 6 件

主な招待講演

- (1) The 3rd Asian Conference on Ultrafast Phenomena (Beijing, China) 2004 年 3 月 18 日～19 日 **Shigehiko Hayashi**, Emad Tajkhorshid, and Klaus Schulten “Molecular dynamics simulation of bacteriorhodopsin’s photoisomerization using ab initio forces for the excited chromophore”
- (2) 11th International Conference on Retinal Proteins (Frauenchiemsee, Germany) 2004 年 6 月 20 日～24 日 **Shigehiko Hayashi**, Emad Tajkhorshid, and Klaus Schulten “Molecular dynamics simulation of bacteriorhodopsin’s photoisomerization using ab initio forces for the excited chromophore”
- (3) Pacificchem2005 Symposium “Photoisomerization Processes, Torsional Relaxation and the Hula-twist” (Honolulu, USA) 2005 年 12 月 15 日～20 日 **Shigehiko Hayashi** “Photoisomerization dynamics of retinal in rhodopsins studied by ab initio QM/MM MD simulations”
- (4) Theoretical Studies on Spectral Tuning and Photo-chemical Dynamics of Retinal Proteins (京都) 2006 年 5 月 27 日～ 29 日 **Shigehiko Hayashi** “Molecular Mechanism of the Primary Photochemical Reactions in Rhodopsin Photoreceptor Proteins”
- (5) 12th International Conference on Retinal Proteins (淡路) 2006 年 6 月 4 日～ 6 日 **Shigehiko Hayashi** “Theoretical Studies on Spectral Tuning and Photo-chemical Dynamics of Retinal Proteins”

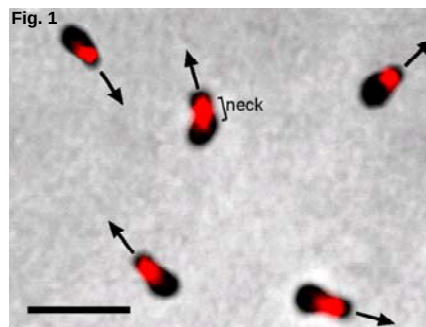
研究課題別評価

1 研究課題名: マイコプラズマ滑走運動の分子メカニズム

2 研究者氏名: 宮田真人

3 研究のねらい:

病原性のバクテリア(=細菌)の1グループであるマイコプラズマは、片方の極に形成される膜突起でガラスなど固形物の表面にはりつき、はりついたまま一方に動く“滑走運動”をおこなう(Fig. 1:矢印は運動の方向。Gli349(後述)が赤く染めてある。赤い部分が“neck”。スケールは2ミクロン)。本研究で主に用いたマイコプラズマ=モービレの場合、速度は毎秒 2-4.5 ミクロン(細胞長の約 3-7 倍)にも達する。しかし、どのマイコプラズマのゲノムを調べても、ミオシンなどのモータータンパク質の遺伝子も、運動性のバクテリアで一般的に見つかるべん毛や線毛などの遺伝子も見あたらない。これはマイコプラズマの滑走運動が、現在の生物学では説明できないミステリーであることを意味している。私はさきがけ研究開始時まで、マイコプラズマ=モービレについて、膜突起基部(neckと命名)表面に局在する2つの巨大タンパク質が重要な役割を果たしていること、またフリーズフラクチャー電子顕微鏡法で neck 部分に約 50 ナノメートルの“あし”の様な構造が観察されること、細胞が出す最大力が 27 ピコニュートンであることなどを明らかにしていた。本研究では、以下の(1)-(6)などに示す実験結果を得て、それをもとに滑走メカニズムのモデルを提案した。

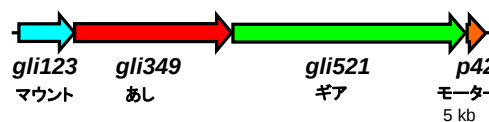


4 研究成果:

(1) 滑走タンパク質の同定

滑走運動に直接かかわる4つのタンパク質を同定した。それらはゲノム上にタンデムにコードされており、分子量はそれぞれ 123K、349K、521K、42K と予測される(Gli123, Gli349, Gli521, P42 と命名)(Fig. 2)。これらの滑走タンパク質のアミノ酸配列には既知のものとの類似性は見られなかった。抗体や変異株を用いた実験から、滑走タンパク質各々の数百分子が細胞 neck 上に存在して滑走装置を形成しており、Gli123、Gli349、Gli521、P42 のそれぞれがマウント、あし、ギア、モーターとして働いていると考えられた。

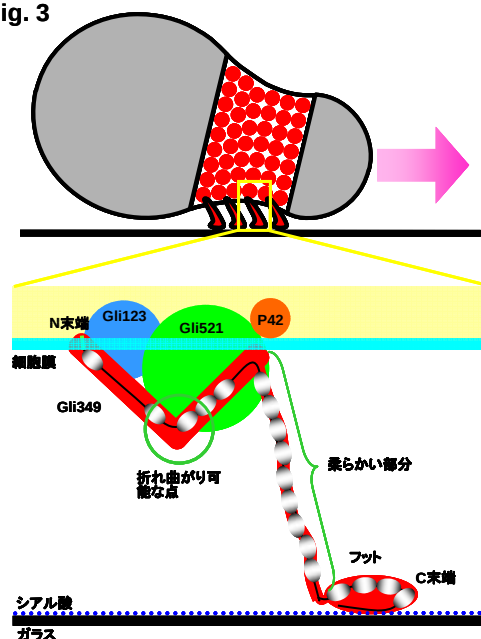
Fig. 2



(2) 滑走タンパク質の分子形態

Gli349 タンパク質を精製して電子顕微鏡および原子間力顕微鏡で観察したところ、その分子は全長約 100 ナノメートルの、3カ所のおれ曲がりをもつ“音符”のような形状をしていた(Fig. 3、上は細胞の模式図で、下は滑走装置を拡大したもの)。赤い棒状の分子が Gli349 タンパク質)。Gli349 分子は N 末端側で細胞に埋め込まれており、C 末端側でガラスなどの固形物表面に接してあしとして働いていると考えられる。Gli521 タンパク質分子は直径約 13 ナノメートルのほぼ球状で、2次

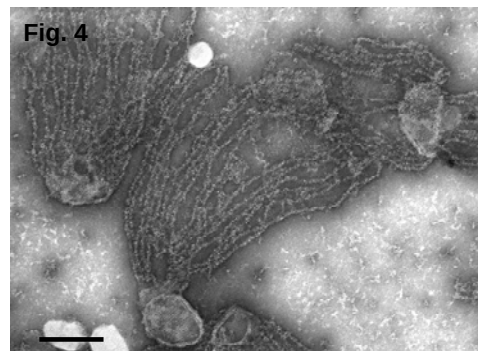
Fig. 3



元に重合する性質を持っている。このことはこの分子が細胞表面でシートを形成し、滑走のための力を支えていることを示唆している。

(3) 滑走装置とそれを支える構造

細胞表面を電子顕微鏡で詳細に観察すると neck 表面に繊維状の構造が観察される。これは、滑走のためのあし (Gli349) が固形物表面をつかんでいないときに細胞表面にはりついている状態が見えているものと考えられる。細胞から界面活性剤で細胞膜を除去すると、くらげ様の構造が観察された (Fig. 4: スケールは 0.2 ミクロン)。くらげの頭がマイコプラズマの細くなっている端に対応し、くらげの足に当たる部分が neck に対応している。くらげ構造が骨格としてマイコプラズマ細胞を支えているか、滑走装置形成の足場になっているものと考えられる。



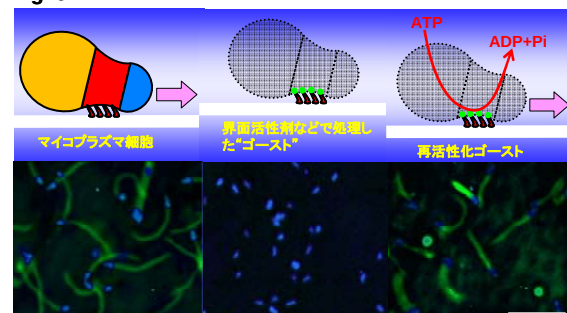
(4) 滑走における結合対象

マイコプラズマはガラス、プラスチック、動物細胞など様々な固形物表面に結合して動くことができる。しかし実際には、培地中に添加している血清中に含まれるシアル酸に結合して運動していることが、各種物質の滑走に与える影響を調べることで明らかになった。シアル酸は動物細胞表面に一般的に見られる構造で、インフルエンザウイルスやボツリヌス毒素などの病原因子が動物組織に結合する際の標的分子として知られている。

(5) 滑走ゴースト

マイコプラズマ細胞内部で起こっている反応を直接とらえるために、細胞膜を界面活性剤で透過化し、“ゴースト”を作製した (Fig. 5 中央カラム)。この図では左から右に向けて実験の段階が進行する。下図は2秒間の軌跡。スケールは 5 ミクロン)。このゴーストに ATP を加えることにより、生きた細胞と同じ速さで動かすことに成功した。この系を用いて、未知の ATP アーゼ (前出の P42 と考えられる) が ATP を ADP とリン酸に加水分解することで滑走運動が起こっていることを証明した。

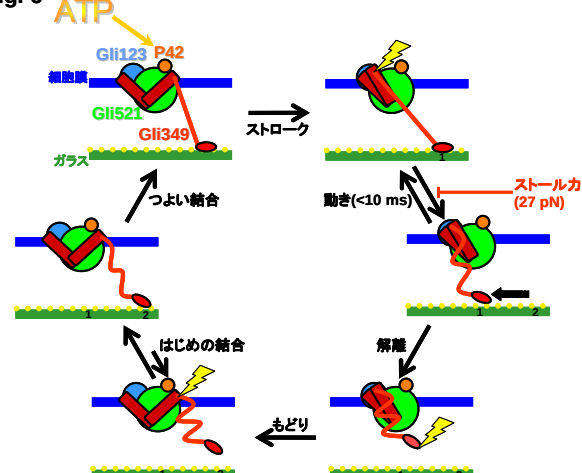
Fig. 5



(6) マイコプラズマ滑走運動の特徴とメカニズム

本研究により、マイコプラズマ滑走運動が既知の生体運動のものとは全く異なることが明らかになった。メカニズムをミオシンなどのモータータンパク質とくらべた場合、以下のことが特徴となる。(i)装置の半分は細胞外に存在している。(ii)ATP が加水分解される部位とガラス表面のシアル酸をつかんだり離したりする位置は 50 ナノメートルという長い距離で隔てられている。(iii)レールであるシアル酸には方向性がない。(iv)滑走装置 1 ユニットは熱ゆらぎレベルの弱い力しか発生していない。(v)あしは横方

Fig. 6



向の力に対して弱いため、メカニズムには引く過程しか存在しないと考えられる。これらの特徴と滑走装置の構造をもとに、Fig. 6 の様なモデル(作業仮説)を提出した。ここでの重要な仮定は、あしにかかる張力が変化することでステップが進行することである(Fig. 6 では稲妻で示してある)。これまでに調べた滑走やガラス結合に影響を及ぼす因子、すなわち抗体や変異の阻害効果と、それらの滑走装置における作用点の全てはこの作業仮説を支持している。

5 自己評価:

当初の研究目標は、(i)滑走にかかわる装置の構造を明らかにする、(ii)装置を構成しているタンパク質の構造を明らかにする、(iii)滑走にかかわる新たな構造とタンパク質を同定する、(iv)滑走のエネルギー源を特定する、(v)滑走の“あし”の実際の動きをとらえる、(vi)あしの固形物への結合を理解する、の6項目であった。研究はほぼ当初の計画に沿って展開し、5つの項目については目に見える形で結果を残すことができた。さらに、これらの結果は、今後に進むべき方向と手段を私に与えてくれた。残念なことに(vi)については期間中にはっきりとした結果を残すことができなかったが、実現に向けて、分子に関する情報と、計測技術と、ツールとして必要な分子、の3つの部分で確実な進歩を得た。さきがけ研究の期間は終了したが、ごく近い将来に結果を残せるものと思われる。

6 研究総括の見解:

従来知られている運動系と異なる運動系の研究で、非常にユニークで興味を引くテーマであり、本人のプレゼンテーション能力も優れていることもあって常に領域会議では議論が沸騰した。世界的に見てもこの系の研究者は他にまったく居ないと言う研究を推し進めている開拓者魂は、立派である。当初掲げた研究課題も地道に着実に進み、細菌関係の専門誌はもとより、米国科学アカデミー紀要(PNAS)の解説記事でも注目されたマイコプラズマの運動メカニズムの解明は高く評価できる。今年度のサイエンスチャンネル出演者として推薦し、現在成果ビデオが制作されているが、日本細菌学会のH19年小林六造記念賞も内定した様に客観的にも評価され始めている。

7 主な論文等:

論文 英文原著 15 報、英文総説 2 報、邦文 7 報

- (1) Shintaro Seto, Atsuko Uenoyama, and **Makoto Miyata**, “Identification of 521-kilodalton protein (Gli521) involved in force generation or force transmission for *Mycoplasma mobile* gliding” *Journal of Bacteriology*, **187**, 3502–3510, (2005)
- (2) Atsuko Uenoyama and **Makoto Miyata**, “Gliding ghosts of *Mycoplasma mobile*” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **104**, 12754–12758, (2005) (selected for cover illustration and commentary)
- (3) Jun Adan-Kubo, Atsuko Uenoyama, Toshiaki Arata, and **Makoto Miyata**, “Morphology of isolated Gli349, a leg protein responsible for glass binding of *Mycoplasma mobile* gliding revealed by rotary-shadowing electron microscopy” *Journal of Bacteriology*, **188**, 2821–2828, (2006) (selected for cover illustration)
- (4) Ryoichiro Nagai and **Makoto Miyata**, “Gliding motility of *Mycoplasma mobile* can occur by repeated binding to N-acetylneuraminyllactose (sialyllactose) fixed on solid surfaces” *Journal of Bacteriology*, **188**, 6469–6475, (2006)
- (5) **Makoto Miyata**, “Gliding motility of mycoplasmas –A mechanism cannot be explained by current biology” – Blanchard, A. & Browning, G eds. *Mycoplasmas: molecular biology, pathogenesis, and strategies for control*. Horizon Biocience, Norfolk. 137–163, (2005)

受賞 1件:平成 19 年小林六造記念賞(日本細菌学会)

招待講演 国際 3 件、国内 10 件:

- (1) 宮田真人、「細菌学における可視化技術—運動、細胞内構造、分子形態—」、第77回日本細菌学会総会 2004年4月1-3日、大阪
- (2) Makoto Miyata, “Motility Organ of Mycoplasma.” The 104th general meeting of American Society for Microbiology. May 23-27, 2004, New Orleans, USA.
- (3) 宮田真人、「滑走バクテリア、マイコプラズマ滑走運動の分子メカニズム」、第32回生体分子科学討論会 2005年6月24-25日、大阪
- (4) Makoto Miyata, “Molecular mechanism of mycoplasma gliding, a novel mechanism of biological motility.” 10th Keihanna Conference on Molecular Biophysics (KCMB2005). July 31-Aug 2, 2005, Keihanna, Japan.
- (5) Makoto Miyata, “Molecular mechanism of mycoplasma gliding, a novel system of cell motility.” The 2006 Biophysical Society Annual Meeting. Feb 18-23, 2006, Salt Lake City, USA.