
シンポジウム 発表要旨

Symposium Abstract

S-1

膜タンパク質の構造生物学
- これまでの 40 年、これからの 20 年 -

○加藤 英明

東大・総文・先進

膜タンパク質の高分解能構造が初めて決定されたのは 1985 年、今から約 40 年前のことである。私が大学院に進学した 2009 年当時も「膜タンパク質の構造解析は非常に難しい」、「5 年間の大学院生活で膜タンパク質の構造が 1 つ解ければ万々歳」などと言われていたが、そうした状況は今日大きく変わっている。実験的な構造決定技術の目覚ましい発展はもちろんのこと、昨年 7 月には Deepmind 社からタンパク質の高精度構造予測ソフトウェア AlphaFold2 がリリースされ、分野の進展の速さには目を見張るばかりである。そこで今回私は、タンパク質の構造生物学、特に膜タンパク質の構造生物学分野がこれまでどのようなスピード感で発展してきたのかを簡単に俯瞰するとともに、今後 10 年、20 年で同分野の研究がどのように進展し得るのか、時間の許す限りで議論をしたいと思う。

S-2

蛋白質（計算）科学から始まる生物学を目指して

○小杉 貴洋^{1,2,3,4}¹ 分子研・協奏分子、² 総研大、³ 自然科学・生命創成、⁴ JST・さきがけ

近年、蛋白質構造予測技術や蛋白質合理設計技術が急速に発展している。そういった中で、自分は何をしているのか、何をしたいのか、どんな未来を目指しているのか、20 年後を想像しながらお話しできたらと思う。

まず、機能を持った“新しい”蛋白質を創り出すことにより、蛋白質科学が対象とする範囲を広げていけたらと思っている。特に、既知の配列・構造情報の機械学習では予測できない蛋白質を“新しい”蛋白質の一つの指標と考え、物理化学的な視点から“新しい”蛋白質、特にその中でも機能を持ったものを計算機を用いて設計することを目指している。

次に、既存の蛋白質を改造し、その機能を自在に制御することにも取り組んでいる。特に、蛋白質複合体の協奏的な機能を制御することを目指している。これまでに、進化の過程で機能を失った擬似活性部位に注目し、その機能を計算機設計で蘇らせることにより、アロステリック部位を設計し、蛋白質複合体の協奏的な機能を制御することに成功した。擬似活性部位を含む擬似酵素は、自然界の蛋白質の 5-10% を占めるともいわれているため、このアプローチは多くの蛋白質複合体に適用することができると考えられる。また、計算機設計では、機能を蘇らせるだけでなく、他の機能を設計する（例えば、別の基質を結合させる）ことも可能であり、計算機設計技術をより発展させていくことで様々な制御が可能になると考えられる。これまでに成功している回転分子モーター V_1 -ATPase の結果（2021 年度若手奨励賞優秀賞受賞）を中心に、現在行っている研究や今後の展望などをお話したい。さらに、擬似活性部位を設計する以外の方法で複合体形成能を制御する研究にも触れたい。

こういった研究を通して、蛋白質の設計・制御ができるようになりつつあることを実感している。20 年後には、きっと誰もが自在に蛋白質を設計し、機能を制御できるようになっているであろう。また、その他の蛋白質科学の多様な技術も発展し、気軽に未知の蛋白質を発現・精製し、その機能・構造解析を行えるようになっていであろう。その時、どんな未来が待っているのだろうか。これまでの生物学の主流とは大きく異なる方法で生物学は進められるのではないだろうか。例えば、蛋白質（計算）科学から生物学を始められるかもしれないと考えている。そんな自分の目指している未来の話をしたいと思う。

S-3

分子はどのようにして生命を駆動するのか？

○竹内 恒

東大・院薬系

生命は、個体、組織、細胞という、外界とのつながりを保ちつつも適度に閉じた空間の中で、多様な分子がダイナミックに機能することで維持される。我々は、タンパク質を中心として、生命を支える生体分子の動的なふるまいを、核磁気共鳴 (NMR) 法を中心とする構造生物学的手法や物理化学的手法によりつぶさに観察し、適切な摂動を与えることで、その分子が、どのように生体機能に貢献しているのかを明らかにしてきた。

タンパク質の構造は本質的に動的であるため、その酵素活性や分子間相互作用は、様々な細胞内環境の変化によって調節される。我々は、ストレス応答性 MAPK である p38 α が、ATP に対する親和性が異なる構造間の平衡にあり、特定の基質の結合が ATP に高親和性の構造を安定化し、p38 α の活性を上昇させることを見出している (1)。この機構により、p38 α は ATP 濃度が低下するストレス環境下においても基質を効率的にリン酸化できる。このことは、シグナル伝達ネットワークの挙動を予測するためには、タンパク質構造の動的特性と環境を考慮した定量的なアプローチが必要であることを示している。

また、その際、タンパク質が多く分子が存在する細胞内環境で、非特異的な相互作用をも積極的に利用しながら機能することに注意が必要となる。例えば、多剤結合転写因子 (MDTR) は、多剤耐性遺伝子のオペレーター領域に nM オーダーの親和性で結合し、その発現を抑制するが、様々な薬剤に結合すると、オペレーター領域から“離れて”その発現を誘導する。しかし、薬剤結合に伴う親和性の低下はただ数倍であり、細胞内濃度を考えると、薬剤に結合しても MDTR はオペレーター領域から解離しえない。我々は、MDTR が DNA に対する非特異的結合を発揮することで、薬剤結合時にゲノム上での分布を変化させ活性を発揮することを見出しており (2)、非特異的結合にも機能的な意義があると考えている。

タンパク質の非特異性は、進化の過程でこれまでになかった新たな機能を獲得し、細胞内ネットワークの再編成を行う際の障壁を下げる役割も持つ。我々は、オミクス解析と構造生物学的を融合させた独自の解析により、細胞が活動に伴い生じるストレスに対抗する強靱性 - レジリエンス - をもたらす際に、特定の基質に対する選択性を失うことが重要であることを見出している (3-5)。

このようなタンパク質の動的特性や細胞内環境を考慮した解析は、近年の技術的の進展によって大幅に効率化が図れるようになってきた。今後は、このような解析が、分子の集合である生物が“なぜ死なないか”だけでなく“どのようにして生き続けられるのか”を定量的に明らかにする新たな蛋白質科学研究の道を拓いてくれると考えている。

1. Tokunaga et al., Nat Struct Mol Biol. (2014) 21:704-
2. Takeuchi et al., Sci Rep., (2017) 7:267
3. Takeuchi et al., FEBS J. (2016) 283:3556-
4. Sumita, Lo, Takeuchi et al., Mol Cell, (2016) 61:187-
5. Takeuchi et al., bioRxiv 2020.06.09.137430

S-4

機能未知遺伝子の機能推測から「遺伝子誕生学」へ

○岩崎 渉^{1,2,3,4,5,6}¹ 東大・院新領域・先端生命、² 東大・院理・生物科学、³ 東大・院新領域・メディカル情報生命、⁴ 東大・大気海洋研、⁵ 東大・定量研、⁶ 東大・微生物科学イノベーション連携研究機構

いま、私たちの目の前に広がる配列データの世界は、爆発的な速度で拡張が続いている。大規模プロジェクトに限らず、生物学系の個々の研究室において行なわれる日常的な研究においても、バイオインフォマティクスは必須のキーワードとなった。こうした大きな流れは現在も定常状態に達することがなく、2022 年現在でもシーケンス技術の急速なロングリード化・高速化・低コスト化が進んでいる。例えば、薄膜フィルム上の反応による蛍光試薬の極微量化など、近い将来にシーケンスコストを現状の 10 分の 1 から 100 分の 1 にさらに低下することを予感させる技術も報告されつつある。

さて、生物が持つ生理生態・分子機能的な多様性の大部分は微生物によってもたらされているが、地球上に存在する微生物の数は、およそ 10^{30} 細胞程度だと見積もられている。ここで、1 つの微生物のゲノムサイズをおおよそ 1 メガ塩基対 (10^6 塩基対) とすれば、地球上の微生物がコードする塩基配列データ、つまり、「微生物デジタルデータ」の総量は、 10^{36} 塩基対程度と推定することができる。そして、その果てしない数の細胞を仮に一列に並べれば、一つ一つの細胞の大きさをマイクロメートル程度として、 10^{24} m 程度の長さになる。銀河系の直径は 10^{21} m 程度であるから、その微生物の“ビーズストラップ”の長さはおよそ銀河系 1,000 個分程度、ということになる。それらの細胞は生きている限り、いまこの瞬間にも、そのゲノムを複製し、分裂している。ゲノムの複製には、熱力学的な反応としての自然な帰結として、そしてまた、進化装置自体の進化 (メタ進化) の結果として、必ず突然変異が伴う。新たに地球上に生まれた塩基配列は、遺伝的浮動や自然選択の作用によってその頻度を増やし、そうして生まれた膨大な新規遺伝子が、微生物配列の宇宙をさらに押し広げていく。

DNA 配列空間の宇宙は、どの程度の速さで広がり続けているのだろうか。

そしていま、地球上ではいったいどれだけの新たな新規機能遺伝子が生み出されているのだろうか？

本講演では、20 年後に何をやっているべきか、そのために現在何をやるべきか、バイオインフォマティクスの関連から議論させていただければと考えている。

若手奨励賞シンポジウム 発表要旨

Young Scientist Award Symposium Abstract

YSA-01

Deep Learning Extracts Protein Dynamics Information from Cryo-EM map

Shigeyuki Matsumoto¹, ○ Shoichi Ishida², Mitsugu Araki¹, Takayuki Kato³, Kei Terayama^{1,2,4}, Yasushi Okuno^{1,4}

¹Dept. of Med., Kyoto Univ., ²Dept. of Med. Life Sci., Yokohama City Univ., ³Inst. for Protein Res., Osaka Univ., ⁴RIKEN

To understand protein functions, investigations of the three-dimensional (3D) structure and dynamics of the protein are essential. As for the 3D structure, technical breakthroughs have allowed for three-dimensional (3D) cryogenic electron microscopy (cryo-EM) density maps to be generated at atomic or near-atomic resolution. However, investigating the dynamics of such proteins using cryo-EM has been technically challenging due to the large molecular sizes and complex structural assemblies involved. Our study focuses on the protein dynamic information that is included in cryo-EM density maps because the density map is reconstructed from particle images representing multiple protein conformations. To access this information, we developed DEFMap, a deep learning-based approach to directly extract the dynamics information associated with the atomic fluctuations. Using only cryo-EM density data, DEFMap predicts the dynamics that correlate well with data obtained from molecular dynamics (MD) simulations and experimental approaches. Furthermore, we have prepared the Google Colaboratory and Docker interfaces. DEFMap with such interfaces would be beneficial to various potential users.

YSA-03

Analysis of the mechanism amyloid fibril disaggregation by Hsp104

○ Kentaro Noi¹, Kyoka Shibata², Teru Ogura³, Masafumi Yohda², Kyosuke Shinohara²

¹Inst. NanoSci. Design, Osaka Univ., ²Dept. of Biotechnol., Tokyo Univ. of Agric. And Technol., ³Fac. Life Sci., Kumamoto Univ.

Neurodegenerative diseases are neurological disorders that develop when a group of nerve cells in the central nervous system of the brain are damaged. Amyloid fibril, which are one of the misfolded aggregates of a causative proteins, are involved in neurodegenerative diseases. For example, α -synuclein (α -syn) is causative factor for Parkinson's disease, huntingtin causes huntingtin's disease represented by polyglutamine disease. There is active research to identify compounds and proteins that inhibit the formation and degradation of amyloid fibrils. Among them, Hsp104, which is one of the molecular chaperones, has been reported to suppress the aggregation of α -syn and reduce the cytotoxicity. Here, we focus on Hsp104 from *Chaetomium Thermophilum* (CtHsp104), and disassembly of amyloid fibrils of α -syn and polyQ by CtHsp104 was observed using high speed atomic force microscopy (HS-AFM). From the HS-AFM observation results, CtHsp104 showed the severing and the dissolution of amyloid fibrils depending on amyloid fibril conformations. There results suggested that CtHsp104 was a stand-alone disaggregase for α -syn and polyQ amyloid fibrils.

YSA-02

Development a Method for Phototriggered Apoptotic Cell Death (PTA) Using the Light-Driven Proton Pump Protein Archaerhodopsin-3

○ Shin Nakao, Keiichi Kojima, Yuki Sudo

Grad. Sch. of Med. Dent. & Pharm. Sci. The Univ. of Okayama

Photoreceptive membrane protein rhodopsin regulates intracellular ion concentrations, leading to various cell responses. In addition, it serves as fundamental tools for optogenetics, a technology for optical control of biological phenomena [Nakao et al., (2021) Biol. Pharm. Bull., 44, 1357, review]. Noteworthy, it has been suggested that intracellular pH alkalization is related to apoptosis, a programmed cell death. Here, we developed an optical method to induce apoptotic cell death with outward proton pump rhodopsin, Archaerhodopsin-3 (AR3). The light-activated AR3 induced shrinking of human cultured cells with intracellular alkalization and biochemical analysis revealed that the intracellular alkalization triggered the apoptotic cell death. We then used the method with the nematode *Caenorhabditis elegans* as a model for living animals. Irradiation of transgenic worms expressing AR3 in chemosensing neurons significantly decreased their chemotaxis responses, suggesting that AR3 induced the cell death of the neurons and the depression of chemotaxis responses. Thus, the phototriggered apoptosis (PTA) method has a high potential to precisely control the cell death both in vivo and in vitro [Nakao et al., (2022) J. Am. Chem. Soc. in press].

YSA-04

Evaluation of free energy profiles for reactions catalyzed by metalloproteins

○ Toru Saito, Yu Takano

Dept. of Bio. Med. Info. Sci., Hiroshima City Univ.

Urease catalyzes the hydrolysis of urea to form ammonia and carbamate, causing a pH increase that affects both human health and agriculture. We performed QM-only and QM/MM MD investigations of the binding mode of urea and the successive mechanism of the urease-catalyzed hydrolysis reaction. On the basis of the potential energy profiles obtained from QM-only calculations using broken-symmetry density functional theory (DFT) and semi-empirical GFN2-xTB methods for the QM region, these two mechanisms were competitive. By contrast, the free energy profiles based on our QM(GFN2-xTB)/MM-MD simulations clearly revealed that urea hydrolysis via a bidentate complex is much more favorable than via a monodentate complex (23.1 vs 4.0 kcal/mol). This is true for the subsequent proton transfer steps. We also indicate that the bidentate coordination of urea fits the active site with a closed conformation of the mobile flap and can facilitate the stabilization of transition states and intermediates by forming multiple hydrogen bonds with certain active site residues.

YSA-05

Multiple-state monitoring of amyloid formation at atomic resolution by Rheology NMR spectroscopy

○ Daichi Morimoto¹, Erik Walinda², Masahiro Shirakawa¹, Ulrich Scheler³, Kenji Sugase⁴

¹Eng., Kyoto Univ., ²Med., Kyoto Univ., ³IPF, Germany, ⁴Agr., Kyoto Univ.

Amyloid fibrils are abnormal protein aggregates and their accumulation is associated with neurodegenerative diseases such as Alzheimer's disease and amyotrophic lateral sclerosis (ALS). Amyloid fibril formation entails the conversion of soluble native protein monomers via multiple molecular states. Although the mechanisms and structural properties of the fibrils have been extensively studied, no spectroscopic techniques have succeeded in capturing the transient molecular-scale events of fibril formation *in situ*. In this study, we have established high-sensitivity Rheology NMR spectroscopy to monitor residue- and state-specific fibril formation of an ALS-related protein SOD1. Under moderately denaturing conditions where NMR signals of folded and unfolded monomeric SOD1 are simultaneously observable, the cross-peak intensities of the folded species decreased faster than those of the unfolded species, and a 3₁₀-helix in folded SOD1 was shown to be deformed prior to global unfolding. Furthermore, *in situ* protein dynamics analysis identified residues involved in the core structure formation of amyloid oligomers. Our findings provide insights into local and global unfolding events in fibril formation.

YSA-07

Rational design of agonistic and antagonistic biparatopic antibodies against TNFR2

○ Hiroki Akiba^{1,2}, Satoshi Nagata², Tomoko Ise², Kentaro Nishiyama¹, Daisuke Kuroda³, Junso Fujita⁴, Tomoko Miyata⁴, Takayuki Kato^{4,5}, Hiroaki Ohno^{1,2}, Haruhiko Kamada^{1,2}, Kouhei Tsumoto^{2,3,6}

¹Grad. Sch. Pharm. Sci., Kyoto Univ., ²CDDR, NIBIOHN,

³Dept. Bioeng., Sch. of Eng., Univ. Tokyo,

⁴Grad. Sch. Front. Biol. Sci., Osaka Univ., ⁵Inst. Protein Res., Osaka Univ.,

⁶Inst. Med. Sci., Univ. Tokyo

Tumor necrosis factor receptor 2 (TNFR2) is activated by binding trimeric specific ligand followed by clustering. Both agonists and antagonists of TNFR2 are expected with therapeutic potential. However, conventional bivalent IgGs were all weakly agonistic. Here, biparatopic antibodies (BpAbs) are promising, which simultaneously bind two epitopes of TNFR2 and may form variety of immunocomplexes. We screened among 10 BpAbs and both strong agonists and antagonists without agonistic activity were found. When the size of immunocomplexes was analyzed by size-exclusion chromatography with multi-angle light scattering detector, large complexes were found for strong agonists, while only 1:1 complex was observed for the non-agonists including antagonists. Structural analysis suggested that two variable regions simultaneously bound single TNFR2 molecule for this 1:1 complex formation. This binding eliminates unwanted effects of bivalent binding by IgGs. We further determined the epitopes by mutagenesis and found that the size of the formed immunocomplex was dominated by relative position of the epitopes. These observations would lead to rational design of functional BpAbs.

YSA-06

Structural basis for channel conduction in the pump-like channelrhodopsin ChRmine

○ Koichiro Kishi¹, Yoon Kim², Masahiro Fukuda¹, Masatoshi Inoue², Tsukasa Kusakizako³, Peter Wang², Charu Ramakrishnan⁴, Toshiki Matsui¹, Keitaro Yamashita⁵, Takashi Nagata⁶, Masae Konno⁶, Tomoko Uemura⁷, Kehong Liu⁷, Mikihiro Shibata⁸, Norimichi Nomura⁷, So Iwata⁷, Osamu Nureki³, Keiichi Inoue⁶, Karl Deisseroth², Hideaki Kato¹

¹Komaba Institute for Science, The Univ. of Tokyo,

²Dept. of Bioengineering, Stanford Univ.,

³Graduate School of Science, The Univ. of Tokyo,

⁴CNC Program, Stanford Univ., ⁵MRC Laboratory of Molecular Biology,

⁶The Institute for Solid State Physics, The Univ. of Tokyo,

⁷Graduate School of Med., Kyoto Univ.,

⁸Institute for Frontier Science Initiative, Kanazawa Univ.

ChRmine, a recently-discovered pump-like cation-conducting channelrhodopsin, exhibits puzzling properties (unusually-large photocurrents, exceptional red-shift in action spectrum, and extreme light-sensitivity) that have opened up new opportunities in optogenetics. ChRmine and its homologs function as light-gated ion channels, but by primary sequence more closely resemble ion pump rhodopsins; the molecular mechanisms for passive channel conduction in this family of proteins, as well as the unusual properties of ChRmine itself, have remained mysterious. Here we present the cryo-electron microscopy structure of ChRmine at 2.0 Å resolution. The structure reveals architectural features never seen before in channelrhodopsins including trimeric assembly, a short transmembrane-helix 3 unwound in the middle of the membrane, a twisting extracellular-loop 1, large intracellular and extracellular cavities. We applied this structure to design a new protein (rsChRmine, for red-shifted) for more diverse applications in neuroscience. Our work provides insight into conduction and gating of pump-like channelrhodopsins, and points the way toward further structure-guided creation of novel channelrhodopsins for optogenetic applications across biology.

YSA-08

Molecular mechanism of protein folding into membranes by mitochondrial protein assembly gate

○ Hironori Takeda¹, Akihisa Tsutsumi², Masahide Kikawa², Toshiya Endo³

¹RIKEN, BDR, ²Gradu Schol of Med, Univ of Tokyo,

³Facul of Lif Sci, Kyoto-Sngyo Univ

The mitochondrial outer membrane contains β -barrel membrane proteins for communication between the cytoplasm and the mitochondrial interior. The insertion of the β -barrel protein into the outer membrane is carried out by the multi-subunit sorting and assembly machinery (SAM) complex, which shapes the substrate protein into a β -barrel structure and inserts it into the mitochondrial outer membrane. However, it has been unclear how the SAM complex catalyzes such a complex reaction. Here, we used cryo-electron microscopy to determine the structures of three different forms of the yeast SAM complex at a resolution of 2.8-3.2 angstrom, and performed biochemical analyses based on these structures. The SAM complex binds to the substrate protein by forming SAM dimer complex. Then, in the SAM-substrate complex, the lateral gate of the Sam50 channel is wide open, allowing the last β -strand (β -signal) of the 19-stranded Tom40 precursor. Tom40 is released into the outer mitochondrial membrane by Sam50, where it is replaced by the β -barrel membrane protein Mdm10. In this presentation, we will present the detailed folding mechanism of the substrate protein into the membrane by the SAM complex.

YSA-09

Structure of the Dicer-2-R2D2 heterodimer bound to small RNA duplex

○ Sonomi Yamaguchi¹, Masahiro Naganuma^{2,3},
Tomohiro Nishizawa⁴, Tsukasa Kusakizako¹,
Yukihide Tomari^{3,5}, Hiroshi Nishimasu⁶, Osamu Nureki¹

¹Dept. of Biol. Sci., Univ. of Tokyo, ²RIKEN, ³IQB, Univ. of Tokyo,

⁴Dept. of Med. Life Sci., Yokohama City Univ.,

⁵Dept. Comp. Biol. Med. Sci., The Univ. of Tokyo, ⁶RCAST, Univ. of Tokyo

In flies, Argonaute2 (Ago2) and small interfering RNA (siRNA) form a RNA-induced silencing complex (RISC) to repress viral transcripts. The RNase III enzyme Dicer-2 associates with its partner protein R2D2, and cleaves long double-stranded RNAs to produce 21-nucleotide siRNA duplexes, which are loaded into Ago2 in a defined orientation. Here we report the cryo-electron microscopy structures of the Dicer-2-R2D2 and Dicer-2-R2D2-siRNA complexes at 3.3-Å resolutions, revealing the detailed architecture of the Dicer-2-R2D2 heterodimer. Notably, the Dicer-2-R2D2-siRNA complex structure revealed that R2D2 asymmetrically recognizes one end of the siRNA duplex with the higher base-pairing stability, while the other end of the duplex is exposed to the solvent and accessible by Ago2. These structural findings explain how R2D2 senses the siRNA thermodynamic asymmetry and facilitates the siRNA loading into Ago2 in a defined orientation. Together, this study provided mechanistic insights into siRNA production and RISC assembly mediated by the Dicer-2-R2D2 heterodimer.

YSA-10

Structural basis for silicic acid permeation mechanism by rice silicic acid channel

○ Yasunori Saitoh¹, Namiki Mitani-Ueno², Keisuke Saito^{3,4},
Kengo Matsuki⁵, Sheng Huang², Lingli Yang¹, Naoki Yamaji²,
Hiroshi Ishikita^{3,4}, Jiang-Ren Shen^{1,5}, Jiang Feng Ma²,
Michihiro Suga^{1,5,6}

¹RIIS, Okayama Univ., ²IPSR, Okayama Univ., ³RCAST, The Univ. of Tokyo,

⁴Grad. Sch. of Eng., The Univ. of Tokyo,

⁵Grad. Sch. of Natural Sci. and Tech., Okayama Univ., ⁶JST, PRESTO

Silicon (Si), the most abundant mineral element in the earth's crust, is taken up by plants for acquisition of tolerance to various stresses. Plants uptake silicon in the form of silicic acid through their roots expressing silicic acid channel, Low silicon rice 1 (Lsi1). Lsi1 belongs to the Nodulin 26-like intrinsic protein subfamily in aquaporin family and shows high selectivity for silicic acid. To uncover the structural basis for this high selectivity, here we show the crystal structure of the rice Lsi1 at 1.8 angstrom resolution. The structure characterized by widely opened, and hydrophilic selectivity filter composed of five residues and special water molecules. We demonstrated that the selectivity filter is crucial for silicic acid permeation by loss-of-function and gain-of-function experiments. Furthermore, we used molecular dynamics simulation to confirm that the special water molecules in the selectivity filter remain stably and interact with silicic acid to enhance the selectivity. Our structural, functional, and theoretical investigations provide a solid structural basis for the Si uptake mechanism in plants, which will contribute to secure and sustainable rice production by manipulating Lsi1 selectivity for different metalloids.

蛋白質科学の基礎講座

Basic lecture of protein science

BL-1

AlphaFold 時代にこそ重要性を増す蛋白質分光学の基礎講座：概論

○高橋 聡

東北大学・多元研

DeepMind 社による AlphaFold や Baker 研の RoseTTAFold が公開され、蛋白質研究は大きな変化を遂げようとしています。このような時代に、分光学を使った蛋白質研究法は手間のかかる遅れた手法であるかのように感じられるかもしれませんが、しかし、そうではありません。確度の高い蛋白質構造が簡単に予想できるようになったからこそ、予想された構造が正しいのかどうかを確かめ、この構造がどのように運動することで機能を果たすのかを調べるが必要になります。さらには、一定の構造を持たない天然変性蛋白質が、不均一に集合分散する特性を調べる研究も重要性を増しています。これらの情報を得るためにもっとも切れ味良く使われるのが、さまざまな分光学的手法です。本基礎講座では、円二色性分光法、蛍光分光法と一分子蛍光分光法、NMR 分光法、振動分光法などを題材に、手法の基礎、データの特徴と解釈の方法、最新の研究例などを紹介します。概論では、どんな時にどんな手法を使えば良いかを、上記の手法に限らずに紹介します。

BL-2

AlphaFold 時代にこそ重要性を増す円二色性分散計の基礎講座

○鈴木 仁子

日本分光株式会社

近年、抗体医薬品の開発・製造・上市が盛んに行われている。抗体医薬品をはじめとする生物医薬品に対して ICH Q5E では製造工程変更前後での高次構造 (HOS) の同等性および同質性を評価することが規定されている。また、バイオシミラーの開発・上市の加速に伴い、FDA や EMA など世界各国のガイダンスではイノベーターおよびバイオシミラーの HOS の同一性を評価することが求められている。円二色性 (CD) 分光法は低濃度かつ簡便にタンパク質の二次構造および三次構造の情報を取得できる手法として知られており、上記目的で近年ますます広く応用範囲が広がってきた。装置の性能や機能を十分に生かして適切な結果を得るためには、装置の原理を理解することが大切である。ここでは、円二色性分散計の理解を深めるために、装置の原理や装置の構成と各構成要素の役割、そして正しい測定方法を解説する。

BL-3

AlphaFold 時代にこそ重要性を増すアンサンブルおよび一分子蛍光分光法の基礎

○高橋 聡

東北大学・多元研

π 電子を含む有機分子は、光吸収に伴って電子励起状態となった後に蛍光を発し、基底状態に戻ります。有機分子の蛍光は、試料の状態に関わらず、ごく低濃度でも感度良く観測可能であること、ピコ秒から分以上の幅広い時間分解能における観測が可能であることなどの特徴を持ちます。そのため、有機分子の示す蛍光はさまざまな新しい観測方法に応用され、蛋白質研究に大きく寄与してきました。本講演では、i) 蛍光発光現象の基礎、ii) 蛋白質に含まれるトリプトファンやチロシンが発する蛍光観測から得られる情報、iii) トリプトファンやチロシンの蛍光観測から得られる蛋白質の変性曲線の持つ情報、iv) Alexa などの蛍光色素を一分子ラベル化した蛋白質試料を用いた蛍光相関分光法の原理と特徴、v) ドナー色素とアクセプター色素の二種類を蛋白質試料にラベル化し色素間距離を推定する一分子 FRET 分光法の原理と特徴などを説明します。特に、iv) と v) に関しては、我々の研究グループによる最近の研究成果を紹介します。

BL-4

AlphaFold 時代にこそ重要性を増す NMR 分光学

○児嶋 長次郎

横浜国大・理工

蛋白質の立体構造を高い確度で予測する AlphaFold の登場は蛋白質研究者に大きな衝撃を与えており、その影響は立体構造を専門としない生物学者にまで及んでいます。本発表では NMR の基礎から AlphaFold を前提とした NMR の活用法まで紹介します。例えば、NMR は蛋白質の立体構造を原子分解能で実験的に決定できる数少ない手法ですが、AlphaFold による蛋白質の予測構造が正しいかどうか残基レベルで簡便に判定することができます。また、NMR が最も得意とするのが分子間相互作用や立体構造変化の検出であることから、AlphaFold による蛋白質の予測構造と組み合わせることで NMR の効率的な利用が可能になります。NMR は定量性と再現性の高さに優れ、代謝物解析、ナノ秒レベルでの分子運動の解析、化学反応のリアルタイム追跡などが可能です。専門家のサポートを受ける共用体制が整備されていることもその特徴の一つです。

BL-5

AlphaFold 時代にこそ重要性を増す振動分光学

○水谷 泰久

阪大院理

AlphaFold など、人工知能プログラムの進歩によって、タンパク質の立体構造をより高い精度で予測することができるようになった。そして、これらの人工知能プログラムの進歩は、今後も続いていくと期待される。このような状況であるからこそ、原子間の相互作用に敏感な振動分光法は、タンパク質科学研究においてより重要性を増していくと考えられる。本発表では、振動分光法のタンパク質科学研究への応用と可能性を、われわれの研究例を含めて紹介する。

ワークショップ 発表要旨

Workshop Abstract

WS1-1

先端プロテオーム解析技術を用いた生体内蛋白質間相互作用の大規模解析

○小迫 英尊

徳島大・先端酵素研・藤井セ

多彩な生命現象の制御機構を理解する上で、細胞内におけるタンパク質間の相互作用を大規模に明らかにすることは重要である。近年開発された BioID や APEX などの近接依存性ビオチン標識法は、生きた細胞や個体内で直近に位置するタンパク質をビオチン標識することにより、一過的で弱い相互作用因子や難溶性複合体の構成因子も同定できる強力な技術である。この技術の鍵となる TurboID や AirID などのビオチン化酵素の改良も進んでいる。しかし、ビオチン化タンパク質をストレプトアビジンなどで捕捉する従来の方法では、非特異的にブルダウンされるタンパク質も多く、バックグラウンドが高いという問題があった。最近我々は、ビオチンとの可逆的結合能を有する新規アビジン様タンパク質 Tamavidin 2-REV を用いることにより、ビオチン化ペプチドを特異的に濃縮・同定する簡便な手法を開発した。本ワークショップでは、近接依存性ビオチン標識法の概要と共に、様々なタンパク質に対する BioID や APEX 解析の応用例についても紹介したい。

WS1-2

新しいクロマチン基盤構造 H3-H4 オクタソームのクライオ電子顕微鏡解析

○野澤 佳世¹、滝沢 由政¹、七種 和美^{2,3}、明石 知子²、胡桃坂 仁志¹¹ 東大・定量研、² 横浜市大、³ 産総研

ゲノム情報はヌクレオソームを基本単位とするクロマチン構造の中に保存されており、通常、ヌクレオソームは H2A、H2B、H3、H4、2 分子ずつからなるヒストン 8 量体に DNA が左巻きに 1.65 回巻き付いた構造をとっている。一方、生体内にはサブヌクレオソームと呼ばれるヒストンの含有量や DNA の巻き付き方の異なる構造体が存在しており、クロマチンの高次構造とダイナミクスに多様性を与えている。特に、H3、H4 ヒストン・タンパク質から構成されるサブヌクレオソームは、ヌクレオソーム形成に必要な中間体であることが知られており、その構造の解明が待たれていた。これまで H3-H4 サブヌクレオソームは、ヒストン 4 量体に DNA が巻き付いたテトラソームを構成すると考えられていたが、本研究では、ヒトのリコンビナント・ヒストン・タンパク質を用いて、この複合体を *in vitro* で再構成し、クライオ電子顕微鏡像を得ることで、H3-H4 サブヌクレオソームが、H2A、H2B 非存在下でも、通常のヌクレオソームのようにヒストン 8 量体からなる安定な構造体 (H3-H4 オクタソーム) を形成することを明らかにした。H3-H4 オクタソームは通常のヌクレオソームに類似した概形を持つにもかかわらず、ヒストンのメチル化酵素やクロマチンリモデラーの足場となるアシディックパッチを持たないユニークなヌクレオソームである。この研究を皮切りに、H3-H4 オクタソームが新しいクロマチン基盤ユニットとして認知され、特異的なゲノム機能が解明される可能性がある。

WS1-3

新生ポリペプチド鎖のプロテオミクス

○今見 考志^{1,2}、内山 純貴¹、森川 和哉¹、石濱 泰¹¹ 京都大学大学院薬学研究所、² 理化学研究所 生命医科学研究センター

新生ポリペプチド鎖の化学修飾といった翻訳中の生化学イベントは、タンパク質のフォールディング、プロセッシング、オルガネラターゲティングなど、細胞内プロテオスタシスを制御している。したがって、翻訳後のみならず共翻訳的なプロテオームの制御・動態を理解することは重要である。現在、翻訳動態はリボソームプロファイリングや質量分析を用いて測定されているが、これらの方法では、新生鎖及び共翻訳修飾に関する直接的な情報は得られない。そこで、我々は伸長中の新生鎖を包括的に捉えるプロテオミクス手法 (pSNAP: Puromycin- and Silac-labeling-based NAscent polypeptidome Profiling) を開発した。pSNAP は、リボソームの精製や化学標識といった前処理を必要とせず、真の新生鎖と非特異タンパク質を区別することが可能である。本法を用いることで、翻訳のみならず新生鎖の修飾も捉えることが可能であり、タンパク質 N 末端アセチル化やリン酸化など、異なる修飾の組み合わせによって、リボソーム関連因子との相互作用を調節していることがわかった。このように pSNAP は新生鎖のプロテオーム解析のための有用な技術であり、共翻訳制御の解明に貢献することが期待される。

WS1-4

蛋白質科学におけるタンパク質化学

○中沢 隆

奈良女子大学

有機化学は 1950 年代の蛋白質科学においてアミノ酸配列解析という当時最も困難な課題を解決した。Frederick Sanger が、後に開発される Edman 分解を使わずに全 51 残基のインスリンのアミノ酸配列を数年かけて決定してからまだ 80 年に満たない。以後、タンパク質のアミノ酸配列解析は、DNA の塩基配列から推定するより容易で迅速な方法が主流となり、1990 年代のソフトイオン化法に基づく質量分析法の出現に至って Edman 分解を含めた化学的な方法はその役割を終えたといえる。さらに今後はクライオ電子顕微鏡観察によりアミノ酸の配列が「見える」ようになると、タンパク質化学は静的な構造生物学の研究よりも、化学反応を伴うタンパク質の構造変化、酵素の反応機構などが主要な研究対象となるであろう。高分子のタンパク質を化学的に扱うには質量分析法を用いることが不可欠である。NMR や質量分析法の出現によって初めてタンパク質が有機化学の研究対象となったといっても過言ではない。タンパク質の動的構造も NMR によるアミド・プロトンの水素/重水素 (H/D) 交換法とともに、質量分析版の H/D 交換法も有力な解析手段の一つとして確立している。DNA と異なる表現系のタンパク質の化学構造の解析には現在でもタンパク質化学の手法は有用である。タンパク質の化学反応が何らかの方法で直接「見える」ようになるまでは、タンパク質化学が蛋白質科学の重要な研究領域であり続けるに違いない。

WS1-5

トップダウン質量分析による細胞内プロテオフォーム解析

○武森 信暁

愛媛大・先端研究学術推進機構

細胞では1つの遺伝子から、選択的スプライシング、コーディング多型、翻訳後修飾などによってバラエティに富むタンパク質の形態が生み出される。その結果、生体内においてタンパク質は多様な化学的特性を示し、生命現象を制御する複雑なタンパク質間相互作用ネットワークが形成される。プロテオフォーム (proteoform) とは、特定の遺伝子から生み出されるすべてのタンパク質形態を表す用語であり、近年では様々な生命現象におけるプロテオフォームの機能的役割を明らかにする研究に注目が集まっている。しかし生体におけるプロテオフォームの全体像は現状ではつかめておらず、プロテオミクス領域の新たなフロンティアとして包括的なヒトプロテオフォームアトラスを構築する試みがスタートしている。現状のプロテオミクス研究ではタンパク質の酵素消化産物を解析するボトムアップ型の質量分析が解析の主流であるが、消化後の断片化ペプチドからオリジナルのプロテオフォームを正確に決定することは不可能であるため、高精度なプロテオフォーム同定を可能にする革新的手法の開発研究も急速に進展している。本発表では、プロテオフォーム研究の概要と、酵素消化をおこなわずプロテオフォームをインタクトのまま解析するトップダウン質量分析法について解説し、近年我々が開発した高深度プロテオフォーム解析のためのトップダウン質量分析ワークフロー「PEPPI-MS」を紹介する。

WS1-6

質量分析による蛋白質の構造・相互作用・構造変化の解析

○内山 進

阪大・工・生物学

質量分析の蛋白質研究における役割は大きく、基礎科学から産業など幅広い分野で利用されている。本講演では、質量分析による蛋白質の研究として、一次構造解析 (ペプチドマッピング)、相互作用解析 (水素重水交換質量分析、クロスリンク質量分析、ネイティブ質量分析)、立体構造解析 (水素重水交換質量分析)、などについて演者らの研究を中心に紹介する。

WS2-1

タンパク質分子の合理設計：天然のタンパク質の改造、ゼロからの創成

○古賀 信康

自然科学, ExCELLS

タンパク質分子機械は、立体構造形成、多量体形成、小分子結合、触媒活性、構造変化など複数の機能要素を組み合わせて動作する。望みのタンパク質分子機械を設計するためには、これら機能要素を設計する技術の開発、さらにはこれら機能要素を一つの分子に集積する技術の開発が必要である。我々は計算機を用いて、自然界のタンパク質を改造することや、タンパク質を主鎖構造を含めてゼロから設計することで、これら技術開発を行ってきた。講演では、これらの研究成果と今後の展望について議論する。

WS2-2

De novo 設計ナノポアによる一分子計測と分子ロボット工学への応用

○川野 竜司

農工大・工・生命工

生体ナノポア計測は、脂質二分子膜に再構成したポア形成タンパク質を通過する分子を電氣的に計測する方法である。近年ナノポア計測を利用し、一分子 DNA の高速シーケンスが可能となる、ナノポアシーケンサが実用化された。現在、次のターゲットとして一分子タンパク質のアミノ酸シーケンスの実用化に向けて研究が進められている。アミノ酸シーケンスをする場合、ナノポアと標的アミノ酸のサイズや化学的適合性が重要になる。本研究では、ポア自体を de novo 設計で作製することで標的に適合したナノポアをボトムアップ的に構築する手法の確立を目指している。本講演では、最近設計した β バレルナノポア構築と、それらを膜輸送体として分子ロボットのセンサへ応用する研究について講演したい。

[Ref. Nature Nano. 2022]

WS2-3

好熱菌ロドプシンから学ぶ膜タンパク質の耐熱化戦略

○村田 武士

千葉大・理・化

G タンパク質共役型受容体 (GPCR) は多くの疾病に関連するため、重要な創薬標的分子として知られているが、安定性 (耐熱性) が低いため精製することが難しい場合が多い。我々は独自の理論計算を用いた GPCR の耐熱化変異体予測技術を開発し、多くの耐熱化変異体を作製することに成功しているが、その大半は本来の活性を失ってしまうという問題点があった。そこで、耐熱性の高いロドプシンの立体構造情報を統計力学理論的に解析することにより、機能を保持しつつ高い耐熱性を保持できる3つの戦略を見出した。この戦略を使って、耐熱性ロドプシンの活性を保持しつつ、さらに13.5度耐熱化 (T_m 105度) することに成功した。現在、この戦略が GPCR を含む他の膜タンパク質にも適応できるかについて検証している。

WS2-4

ロドプシンエンジニアリングによる生命機能の光制御・操作

○須藤 雄気

岡山大学・医歯薬 (薬)

ほとんど全ての生物は、直接あるいは間接的に太陽光を「エネルギー」または「情報」に変換し、その生命活動を維持している。ここで、生物個体の内で太陽光を吸収する実体は、光受容タンパク質であり、可視光のエネルギー領域 (波長) に吸収を持つ発色団色素を、対応するタンパク質に結合させることで、可視光を受容している。ロドプシンは、ビタミンAのアルデヒド型であるレチナールを発色団とする7回膜貫通型光受容タンパク質であり、動物や細菌を含む多様な生物種に分布している。私たちの研究室では、新奇ロドプシンの「探索」「解析」と、それらに根ざした光による生命機能「操作」の3つの課題について取り組んでいる。本発表では、これらの集大成としての研究、すなわちロドプシンエンジニアリングによる生命機能の制御・操作について、幾つかの実例をあげて紹介したい。

[Refs. (2015, 2017, 2022) JACS, (2018, 2020) JPCL, (2019) PNAS, (2019, 2020ab, 2021) Sci. Rep., (2021) eLife]

WS2-5

生物分子モーターをいじり倒して一方向性の発現機構を考える

○古田 健也

情報通信研究機構

細胞の中では様々な生物分子モーターが物質輸送や細胞運動などを司っており、ミオシン、キネシン、ダイニンが知られている。このような動くタンパク質を一から設計して作るのはタンパク質科学の大きな目標の一つであると言える。近年、静的なタンパク質の構造予測は飛躍的な進歩を遂げたが、まだまだ動くタンパク質のダイナミクスをデザインすることは難しい。そこで我々は、生物がすでに持っている部品を使ってレゴブロックのようにモーターを再構成して機能を作ることで、分子モーターを設計するためのヒントを得ようと考えた。すでに我々は、微小管の上を動くダイニンの微小管結合部位を、アクチン結合タンパク質やDNA結合タンパク質に置き換えることで、それぞれアクチンフィラメント、DNAナノチューブ上を動くモーターの作製に成功している (Furuta et al., 2017; Ibusuki et al., 2022)。さらに我々は最近、キネシン、ダイニンをベースに新しいモーターを組み立てる一連の実験を行い、生物分子モーターの一方向性の運動を引き起こすメカニズムにフォーカスして実験を行っている。本講演では、最新の知見に基づき、複数の運動メカニズムの存在に関して議論したい。

WS2-6

リニア分子モーターキネシン1のエンジニアリング

○飯野 亮太^{1,2}¹ 分子科学研究所、² 総研大

キネシン1は2量体 (2本足) のリニア分子モーターで、後足が前足を追い越すいわゆる「ハンドオーバーハンド機構」で微小管の1本のプロトフィラメントに沿った直線運動を行う。我々は、キネシン1の2つのモータードメイン (足) のつなぎ方を変えることで、1. 新たな運動様式の創出、2. 人工分子とのハイブリッド化、に成功した。前者では、2本の足をコイルドコイルタンパク質と硬いリンカータンパク質で連結したキネシン-SCを作製し、微小管の長軸方向に沿った、ピッチサイズが非常に短い左回りの螺旋運動を実現することに成功した。後者では、2本の足を合成PEGリンカーで連結したキネシン-PEGを作製し、天然型と同様の高速でプロセスな直線運動を達成することに成功した。本講演では、これらの非天然型キネシン1の設計戦略と運動機構について議論を行う。

WS3-1

MD シミュレーションで考える抗原 - 抗体界面における塩橋の役割：合理的な抗体設計に向けて

○山下 雄史

東大・先端研

抗体は、免疫系において異物（抗原）を認識する役割を持つ。近年、この抗原認識能力を持つ抗体を医薬品として利用する事例も増えてきた。抗体を医薬品として利用するには、抗原と抗体の親和性が十分に高いことが重要となる。また、抗原に合わせて、親和性が高くなるように抗体を設計する技術開発にも期待が寄せられている。しかしながら、柔軟なタンパク質界面の性質を理解することの難しさから、抗原 - 抗体の親和性を自在に制御するのも難しい課題となっている。一方で、スーパーコンピュータ「富岳」の登場に象徴されるように計算機の演算性能が進化し、それに伴い分子動力学 (MD) シミュレーションがタンパク質間相互作用を研究する道具として実験と肩を並べられるようになってきた。本研究では、MD シミュレーションを活用し、その中からどのように設計のヒントを見出せるかを考えていく。近年、我々は肝臓がんが発現している ROBO1 を標的とする抗体 (B5209B) の改変設計を進めてきた。そこで行なった MD シミュレーションの解析により、ROBO1 と B5209B の間の塩橋の安定化が重要な因子であることを発見した。次に、塩橋の安定性を支配する因子を特定するために、構成論的な解析を開発し、トリプトファンやチロシンの疎水的な相互作用も重要であることを見出している。こうした MD シミュレーションに基づく解析を使うことで、抗体改変に有用な構造モチーフの発見やその改変方法のヒントが見出せると期待される。

WS3-3

実験とシミュレーションを統合したタンパク質ダイナミクスのモデリング

○松永 康佑

埼玉大・理工

タンパク質の機能に関わる構造ダイナミクスを精度良く観測し、メカニズムを理解することはチャレンジングな課題である。一般に、実験で計測されるタンパク質構造ダイナミクス情報は空間や時間解像度の制限がある。全原子モデルを用いた分子動力学シミュレーションは、原子レベルの情報を得ることができる一方で、現象によってはモデルパラメータの精度に限界がある。そこで我々は、統計数理・機械学習の手法を適用することで、実験・シミュレーション双方のデータを相補的に組み合わせて統合し、より高解像度な構造ダイナミクスを調べる統合モデリング手法を開発してきた。講演ではこれまでの取り組みについて触れるとともに、現在行っている高速原子間力顕微鏡データを用いた統合手法開発と応用研究の現状について紹介する。

WS3-2

計算科学により強化される蛋白質のリガンド結合に関する物理化学解析

○長門石 暁¹、津本 浩平^{1,2}

¹ 東大・医科研、² 東大院・工

蛋白質の相互作用を解析し制御することは、生命活動の理解から産業応用に至るまで、幅広い研究展開が見込まれる。中でも特異的な蛋白質とリガンドの結合を知ることは、蛋白質の機能制御において重要な位置づけにある。たとえば低分子化合物の結合に伴う蛋白質間相互作用の変化や、蛋白質のダイナミクス変化は、その機能制御を物理化学的に精密解析することにより、医薬品開発にも展開できると考えられる。本発表では、熱力学、速度論などの物理化学的な分析手法を活用して、リガンド結合における蛋白質の構造変化を捉え、機能制御を試みるアプローチについて最近の研究成果を紹介する。これらの解析を遂行する上で、さらに計算科学を導入することによって、よりリガンド結合の様式、および蛋白質の物性・構造変化を明確に捉えることに成功した。本研究における物理化学的な相互作用解析は、計算科学に裏打ちされたアウトプットによってさらに強化され、より合理的な蛋白質の機能制御を可能にする設計指針を与え得ると考えられる。

WS3-4

ヌクレオソームとその関連タンパク質との相互作用

○河野 秀俊

量研・量子生命

ヒトなど真核生物のゲノムは、細胞核内にクロマチンとして収納されている。クロマチンは、細胞内で時々刻々とその状態や構造を変化させる。その状態や構造は遺伝子の発現制御と密接に関連している。しかし、その状態や構造を変化させるメカニズムはよくわかっていない。クロマチンの基本構造は、ヌクレオソームと呼ばれるヒストンタンパク質 8 量体とそれに約 2 回巻き付いた 2 本鎖 DNA の複合体である。ヌクレオソームを構成する各ヒストンタンパク質には、バリンアントが複数存在し、また、ヒストン自体は翻訳後修飾を受けてその化学状態を変える。結果としてヌクレオソームと相互作用するタンパク質が変わる。近年、クライオ電顕による単粒子構造解析や電顕によるトモグラフィー解析により、ヌクレオソームとそれに結合する因子との複合体や核内でのクロマチンの構造が分かってきた。本発表では、これらの構造をもとに、全原子分子動力学シミュレーションによる我々の取り組みを紹介する。特に、ヒストンメチル化酵素のアミノ酸変異によるヌクレオソームメチル化の異常亢進メカニズムやヘテロクロマチン状態に多く存在する HP1 タンパク質とヌクレオソームとの相互作用について紹介し、これがクロマチンの状態や構造に与える影響について議論する。

計算蛋白質科学の現在と未来○池口 満徳^{1,2}¹ 横浜市大・生命医、² 理研・計算科学セ

スーパーコンピュータ「富岳」が共用開始になり、膨大な計算資源が活用できるようになった。この「富岳」によって、どのような計算蛋白質科学が可能になるのだろうか？

ごく最近、分子動力学 (MD) シミュレーション専用計算機 ANTON の新型である ANTON3 が報告された。それによると、ANTON3 は 100-200 $\mu\text{s/day}$ の計算が可能なのである。それに比べ、富岳は、いろいろな用途に用いられる汎用コンピュータであるため、単独の MD シミュレーションでは並列化効率に限界があり、ケースにもよるが、おおよそ 0.1-0.2 $\mu\text{s/day}$ の速度にとどまってしまう。一方で、富岳には膨大な CPU コアがあり、多数の MD を同時に実行すれば、トータルではかなりの量の計算ができる。つまり、いかにして、このような多数の MD を統合し、蛋白質科学に貢献するような計算を実現するかが問われているわけである。このような技術には、大きく分けて 2 通りあり、一つは、自由エネルギー地形を計算する熱力学的方法、もう一つは、時間の概念まで入れた速度論的方法である。両者とも、「富岳」のような超並列コンピュータには適した方法である。一方で、多数の MD の活用には、それぞれの初期構造をうまく構成する必要がある。そのような方法は、近年、発展が著しい人工知能の応用も考えられる。このような研究についても議論したい。

WS4-1

CO₂ 固定酵素 Rubisco の動的構造解明への挑戦

○溝端 栄一

阪大・工・応化

植物は光合成によって大気中の CO₂ を有機物に固定する。この CO₂ 固定反応は光合成暗反応の初発反応を担う酵素であるリブローズ 1.5 ビスリン酸カルボキシラーゼ/オキシゲナーゼ (Rubisco [ルビスコ]) によって触媒されている。Rubisco は一次代謝酵素としては触媒効率が極めて低いため (たとえば $k_{cat}=3/\text{sec}/\text{site}$)、光合成反応の全体を律速している。Rubisco の機能改良は、温暖化やエネルギー効率の問題を解決し、持続可能な社会の実現を目指すにあたって重要である。しかしながら、長年の研究を経ても、Rubisco の反応機構は、その動的構造の理解の不足のために十分に理解されてこなかった。Rubisco は、触媒反応中に活性部位のみならず、分子表面の構造が劇的に大きく変化する。そのため、結晶構造解析による反応中の動的構造決定が従来報告されてきたどの蛋白質よりもはるかに困難である。ここでは、SACLA の XFEL を利用して、Rubisco の動的構造機能相関を解明する試みについて紹介する。

WS4-2

二液混合シリアルフェムト秒 X 線結晶構造解析に基づく銅含有アミン酸化酵素触媒機構の解明

○村川 武志

大阪医薬大・医・生化

酵素タンパク質が化学反応を効果的かつ特異的に進めるには、触媒各段階での活性部位環境の最適化が必須であり、これにより活性化エネルギーの低減や、反応特異性などが可能となる。本研究では土壌細菌由来銅含有アミン酸化酵素 (AGAO) を対象とし、酵素微結晶液と基質溶液の二液混合によるシリアルフェムト秒 X 線結晶構造解析 (SFX) を実施し、触媒過程の可視化を目指す。

AGAO の触媒過程は、補酵素トパキノン (TPQ) の酸化還元状態に基づき、前半の還元的半反応と、後半の酸化的半反応に分けられる。触媒過程は ping pong bi-bi 機構により進行するため、無酸素条件下で基質アミンを加えると、前半の還元的半反応のみが進行する。SFX 測定に用いる本酵素の微結晶は、マイクロシーディング法とバッチ法の組み合わせにより大量調製した。また、試料類をあらかじめ嫌気化し、SFX 測定も嫌気条件下で行うことにより、本酵素の還元的半反応の測定を行った。

基質混合から XFEL 照射までの時間 (遅延時間) を変えたいくつかのデータセットの取得に成功し、現在、構造解析を行っている。遅延時間 1 秒のデータから、還元的半反応の終点であるセミキノン中間体のみが得られたことから、結晶内での還元的半反応は、1 秒以内に終了することが明らかとなった。本講演では、各遅延時間で得られたいくつかの構造データに基づき AGAO の触媒機構について議論する。

WS4-3

銅含有アミン酸化酵素におけるトパキノン補酵素の構造変化機構

○庄司 光男^{1,2}

¹筑波大 CCS、²ささがけ

銅含有アミン酸化酵素 (CAO) は種々の生理活性アミン類の酸化的脱アミノ反応を触媒し、動植物や微生物に広く存在している。CAO は活性中心にトパキノン (TPQ) 補酵素と銅イオンを保持し、特異的活性を発現している。バκτηリアの CAO (AGAO) は反応サイクルで TPQ のコンフォメーションを大きく変化させることが X 線構造解析により明らかになったが、より詳細な分子機構については解明がなされていなかった。さらに、TPQ 近傍には傘高い Asn381 が存在し、TPQ の構造変化を阻止しているように見えるが、保存残基として不可欠であることが実験的に示されたが、この矛盾する理由は明確でなかった。本研究では、量子古典混合計算法 (QM/MM) を用いて、TPQ の大きな構造変化の分子機構について理論解析した。その結果、構造変化過程の全貌の解明と Asn381 の役割が明らかになった。これまで酵素の活性中心では構造変化をほとんど起こさないのが通説であったが (鍵と鍵穴説や誘導適合説)、AGAO では構造変化を触媒反応に利用しており、全く新しい戦略を取っていることが明らかとなった。

WS4-4

CK2 の中性子結晶構造解析を通して見るタンパク質科学

○安達 基泰

量研・量子生命

中性子結晶構造解析が実現すると、水素・重水素に関する座標情報が得られることは、タンパク質科学界では広く知られている。ここでは、プロテインキナーゼとして最初の報告となったカゼインキナーゼ II (CK2) の解析例について紹介したい。CK2 は、細胞に広く存在するセリン/スレオニンキナーゼであり、細胞周期の進行や細胞の生存・増殖に関与することが知られている。CK2 の過剰な発現は、発癌や癌転移と関係があることが指摘されており、創薬標的タンパク質の一つとなっている。そこで、CK2 の触媒反応に係わる水素結合ネットワークの観測と、阻害剤開発に有効な水素・水和構造に関する立体構造的知見を得ることを目的として中性子結晶構造解析を行った。結果の一つとして、活性部位の触媒残基から反対側の溶媒表面へと、分子を縦断するような水素結合ネットワークを示すことができた。そこには、プロテインキナーゼで高く保存されているアミノ酸残基が関与していたことから、変異体を作製し X 線結晶構造解析と酵素活性を測定したところ、変異体は野生型に比べ約 50 % 活性が低下した。分子を縦断する水素結合ネットワークが、CK2 の酵素反応に重要な役割を担うことを示唆している。最後に、今回の中性子結晶構造解析を題材に、これからのタンパク質科学研究の一端や革新的技術について、議論できると幸いである。

WS4-5

タンパク質の機能を解明する分子シミュレーション手法の開発

○原田 隆平

筑波大・計

タンパク質の機能を解明するうえで分子シミュレーションは強力な研究手法である。計算技術の急速な進歩に伴い、分子シミュレーションを用いて複雑な生体機能を解明することが可能になりつつある。具体的には、分子動力学計算 (MD) はタンパク質のダイナミクスを高い時間空間分解能で追跡できる。しかしながら、機能発現に重要な時間スケールに到達することが依然として難しい。一般的に、生体機能に関わる興味深い構造遷移はミリ秒以上の長時間スケールで誘起されるため、従来 MD の到達限界であるマイクロ秒程度のシミュレーション時間では重要な構造変化 (レアイベント) を検出することが難しい。この問題に立ち向かうため、レアイベントを効率的に検出する分子シミュレーション手法 (レアイベントサンプリング法) を開発した。レアイベントを効率的に検出する戦略として、条件の良い異なる初期構造からピコ秒オーダーの短時間 MD を独立に実行することを繰り返す構造リサンプリングに基づき、生体機能に重要な構造遷移を効率的に誘起する。効率的に構造遷移を誘起する鍵は、条件の良い (遷移確率の高い) 初期構造をどのようにして選択するかである。構造選択には構造遷移を記述する適切な反応座標を定義する必要があるが、その選択は自明でない。本講演では、様々な反応座標を用いたレアイベントサンプリングの実例を具体的なアプリケーションと合わせて紹介する。

WS5-2

生きた細胞内部の分子構造動態を可視化するための In-cell AFM 技術の開発

○宮澤 佳甫^{1,2}、Marcos Penedo Garcia²、岡野 直子²、古庄 公寿²、市川 杜彦²、Alam Mohammad Shahidul²、宮田 一輝^{1,2}、中村 史³、福岡 剛士^{1,2}¹ 金大・理工、² 金大・WPI-NanoLSI、³ 産総研・機能性資源連携研究室

人体を構成する基本単位である細胞の表面や内部において、たんぱく質や核酸等のナノ動態を理解することは様々な生命現象を理解するために重要である。本研究では、液中でナノスケールの 3 次元立体構造を計測できる三次元原子間力顕微鏡 (3D-AFM) を応用し、従来の手法では困難であった非染色での細胞内部の液中 3 次元構造観察を実現する「In-cell AFM」の開発に取り組んでいる。In-cell AFM では、従来の円錐形の AFM 探針を細く加工することで直径 200 nm 以下、長さ数 μm 程度の円柱形のニードル探針を作製し、それを細胞内に直接挿入して生きた細胞内部の AFM 計測を行う。これまでに、我々は In-cell AFM を用いて、細胞内部でニードル探針が受ける 3 次元相互作用力を計測することで、細胞内部の構造を生きたまま可視化できることを実証してきた。本手法は、細胞内部を非染色かつナノレベルで直接可視化できる可能性があり、また、光学的手法では測定できない細胞内部の力学的な物性情報も測定できる可能性がある。さらに、細胞内に探針を再現性良く挿入できる手法の確立は、今後の細胞内における局所的な 2 次元・3 次元 AFM 計測の実現につながるため、超解像顕微鏡では見ることのできない 10 nm 以下のナノ動態を可視化できる可能性が高い。以上より、In-cell AFM では従来の手法では得られないナノレベルの新たな知見が得られ、細胞の基礎機能や、疾患、薬剤効果などの分子レベルでの理解の改善と、それに基づく医学・薬学技術の発展につながるものと期待される。

WS5-1

ゲノム編集法と in-cell NMR 法の融合による RAS 制御因子の細胞内活性の定量

○趙 慶慈¹、嶋田 一夫²、西田 紀貴¹¹ 千葉・薬・物化、² 理研・BDR

低分子量 GTPase RAS は細胞増殖のシグナル伝達における重要な分子スイッチであり、その細胞内での活性化状態は GTPase 活性化タンパク質 (GAP) やグアニンヌクレオチド交換因子 (GEF) などの制御因子によって制御されている。この制御因子の異常は様々な疾患の原因となることが報告されているが、各制御因子が細胞内の RAS の活性化状態にどの程度影響しているかは定量的に明らかにされていない。本研究では制御因子 GAP を解析対象に、ゲノム編集により特異的に GAP をノックアウトした細胞を用いて、細胞内 NMR (in-cell NMR) 観測を行った。in-cell NMR 法で得られる構造情報に基づき活性型 RAS の細胞内存在割合の変化を解析することで、特定の GAP の細胞内寄与の定量化を行った。その結果、複数の GAP ノックアウト細胞における活性型 RAS の細胞内存在割合の比較から、GAP の一種である内在性の NF1 が細胞内 RAS 活性化の抑制に大きく寄与していることが明らかになった。さらに、in-cell NMR に基づく数値シミュレーションにより、細胞内の内在性 NF1 が *in vitro* よりも高い酵素活性を持つことが示唆された。本解析手法は、実際の細胞内における特定の制御因子の寄与を定量的に捉えるものであり、GAP 以外にも様々な分子スイッチとその制御因子に対して適用可能であると考えられる。

WS5-3

クライオ電子顕微鏡で明らかになったカーゴ受容体 ERGIC-53 の柔らかな全長構造

○渡部 聡¹、木瀬 孔明²、米澤 健人³、清水 伸隆³、濡木 理²、稲葉 謙次¹¹ 東北大・多元研、² 東京大・院理、³ 高工ネ機構・物構研

カーゴ受容体 ERGIC-53 は、血液凝固第 V・VIII 因子など種々の分泌糖タンパク質 (カーゴ) を小胞体で捕捉しゴルジ体へ輸送する役割を担う。ERGIC-53 は、糖鎖結合ドメイン (CRD)、ストロクドメインおよび一回膜貫通ヘリックス (TM) で構成される。過去の研究から ERGIC-53 は補助因子 MCFD2 と複合体を形成し、細胞内で六量体として機能すると考えられてきたが、全長の分子挙動は不明であった。

本研究では、SEC-MALS/SAXS およびクライオ電子顕微鏡によって、ヒト由来全長 ERGIC-53 と MCFD2 との複合体の構造解析に取り組んだ。SEC-MALS/SAXS の結果、ERGIC-53 は従来提唱された六量体ではなく四量体として存在し、分子長が非常に長い (350Å) 構造を取ることが示唆された。実際クライオ電顕画像では、長く伸びたダンベル状粒子が観察された。まず全長 ERGIC-53 のヘッド領域について 2.5Å 分解能の電顕構造を決定し、CRD 同士の相互作用によってカーゴ結合部位が形成されることを明らかにした。一方 Topaz プログラムを利用して全長粒子の自動拾いに成功し、全長のクライオ電顕構造を決定した。四葉クローバーに類似した全長構造は CRD で構成されたヘッド領域、コイルドコイルで構成された細長いストロクドメインと TM 領域で構成されており、3D variability analysis からストロクドメインの柔軟な動きが可視化できた。またストロクドメインが 90 度近く湾曲した構造も二次元平均像から確認でき、長いストロクドメインの柔軟な動きによって効率的にカーゴを捕獲する機構が示唆された。

WS5-4

クロススケール計測が解明する細胞骨格ネットワーク構築とその破綻

○仁田 亮

神大・医・解剖

細胞骨格は微小管、中間径フィラメント、アクチンフィラメントの3つのタンパク繊維ファミリーで構成され、これらが独自に、また協調してフィラメントネットワークを形成し、細胞の形態形成、運動、強度を生み出す。そして細胞骨格ネットワークの異常により、認知症・腫瘍・心不全など様々な疾患を発症する。しかし、これまでの細胞生物学的実験系では、細胞骨格ネットワークの構築過程を細胞内で計測することは困難であり、その分子機構解明はほとんど進んでいない。学術変革領域(A)クロススケール新生物学では、動的・静的細胞内解析技術を結集し、この難題に挑戦する。本講演では、微小管ネットワーク構築のクロススケール解析、アクチンネットワーク形成のタイムラプスクライオEM解析、中間系フィラメントラミンのクロススケール解析と医学応用など、具体的な例をあげてその取り組みを紹介する。

WS5-5

クライオ電子顕微鏡によるクロススケール観察

○吉川 雅英

東大・医・生体構造

クライオ電子顕微鏡は、2013年以降、膜タンパク質やリボソームなどの生体分子の構造解析の標準的な手法となりました。クライオ電子顕微鏡で解いたPDBの寄託構造数は年間1.5倍のペースで増加しており、2023年にはX線結晶構造解析に追いつくと予測されています。私たちの研究室では、遺伝学とクライオ電子トモグラフィーを組み合わせ、真核生物の鞭毛や繊毛の構造と機能を解明してきた。近年では、クライオ電子顕微鏡の技術開発を進めることで、2Åを超える解像度を単粒子解析で実現したり、トモグラフィーでも10Å近い解像度を達成している。これらの技術と遺伝学を組み合わせ、本蛋白質科学会では、カラクシンと呼ばれる鞭毛内の蛋白質がどのようにダイニンの動きを制御しているのかを発表する。

WS5-6

Structure-Dynamics-Function Relationship of Proteins in Cellular Environments

○Yuji Sugita

RIKEN CPR

The effect of crowded cellular environments has been investigated extensively by experimental and computational studies. Our group has focused on the macromolecular crowding effect on protein stability, dynamics, and functions via molecular dynamics simulations on K, Fugaku, and Anton2 supercomputers. We have observed partially unfolded structures of proteins, reduced translational and rotational diffusions due to the transient protein aggregations. Our simulation results were compared with solution NMR spectroscopy and showed good agreements with experimental observations. Different binding mechanisms of a kinase inhibitor complex were also found between in dilute solution and crowded environments. Interestingly, the differences could be explained via population shifts of local conformational changes of proteins near the binding sites upon crowding. In addition to our research, other groups have also elucidated crowding effects on proteins caused by different types of crowder molecules, suggesting the importance of two key effects in the cellular environments: excluded volume effects and weak and non-specific molecular interactions.

WS6-1

シャペロンにおけるキネティクス - 活性相関

○齋尾 智英

徳島大・先端酵素

細胞内のタンパク質恒常性を保つ上で、新生タンパク質のフォールディングや輸送、変性タンパク質の除去などを制御するシャペロンは欠くことができない因子である。生体内には複数種のシャペロンが機能し、それぞれが特定の基質タンパク質に対して作用し、フォールディングを補助または抑制しているが、このようなシャペロンによるフォールディング制御のメカニズムは未解明である。シャペロンはそれぞれに固有の活性を持つにもかかわらず、シャペロンによる変性タンパク質の配列認識は特異性が低いことも知られている。すなわち、認識様式から機能の説明を試みる従来の戦略では、シャペロンの機能特性を理解することは困難であった。

本研究では、結合キネティクスの視点を取り入れた新たな戦略によって、シャペロンの活性特性のメカニズム解明に取り組んだ。特に、Trigger Factor (TF) シャペロンとSecB シャペロンを対象とした相互作用解析・立体構造解析によって、シャペロンの活性特性が、シャペロン-基質タンパク質間の結合速度と、基質タンパク質のフォールディング速度のバランスによって決定づけられることを明らかにした。さらに、TF シャペロンに対する詳細な解析から、シャペロンの多量体形成が結合キネティクスを変調する可能性も示された。本発表では、この「キネティクス-活性相関」について解説するとともに、その普遍性について議論する。

WS6-2

時間分解拡散法で捉える生体分子反応ダイナミクス

○中曽根 祐介

京大・院理

生命活動は個性的な生体分子に担われ、その本質は細胞内外での化学反応の連鎖であるため、その理解には時間分解能に優れた反応検出法が必要である。そこでタンパク質の高次構造に敏感な拡散係数に着目し、過渡回折格子法によりその時間変化を検出することで、様々な光センサータンパク質の反応を明らかにしてきた。近年では、人工的に光反応性を付与した分子の反応解析にも着手しており、フォールディングの制御機構、DNA と転写因子の相互作用、有機分子の超分子重合反応に関する速度論的情報を蓄積している。例えば、G タンパク質 B1 ドメインのヘリックス構造にアゾベンゼンを導入した人工タンパク質 AzoGB1 は、アゾベンゼンの光異性化反応を利用して、高次構造の形成・崩壊を光可逆的に制御できる。この反応を、分子シャペロンである SecB 共存下で測定することにより、両者の相互作用ダイナミクスを解析した。AzoGB1 単体では構造形成が 1 ms で起こるが、SecB 共存下では 17ms となり、顕著に遅くなることがわかった。SecB はほどけたペプチド鎖に結合して凝集を抑える働きがあるが、高次構造形成を促す際には解離する必要がある。17ms の時定数で拡散係数の顕著な増大が起るため、このステップで解離反応が起こり、同時にフォールディングが完了することが示された（解離が構造形成の律速過程）。このようにタンパク質の動作原理の解明には分子内・分子間反応の速度論的解析が必要であり、その高度化に向けた技術開発の展望についても発表する。

WS6-4

各階層における酸化的フォールディング触媒システムの理解

○奥村 正樹

東北大・学際研

「過渡的プロセス」は、タンパク質、オルガネラ、細胞など、様々な階層においてみられるが、それぞれ階層ごとに過渡的プロセスを追跡する試みがなされてきたが、階層間をつなぐ研究は殆ど報告されていない。こういった過渡的プロセスを理解する上で、タンパク質フォールディングにおいてフォールディング中間体構造とジスルフィド結合を関連付ける手法は強力なツールとして役立つだろう。そこで、本発表では、酸化的フォールディング触媒の速度論的解釈において、分子、相分離、細胞といった各階層での解釈をシームレスに繋げるべく最新のデータを紹介し、フォールディングのキネティクスについて議論することを目指す。

WS6-3

ヘム ABC トランスポーター ; BhuUV-T の膜輸送に関するキネティクス解析

○木村 哲就

神戸大・理・化学

ABC トランスポーターは ATP の結合・加水分解に伴って基質の膜輸送を行う膜タンパク質であり、ATP の反応に共役して起こる膜貫通ドメイン (TMD) の構造変化で膜輸送が実現されるという反応モデルが提案されている。しかし、輸送基質は輸送過程において化学的性質が変化しないことから、ATP の結合あるいは加水分解反応のいずれが構造変化を誘起するのか、加えてインポーターの場合はペリプラズムタンパク質 (PP) から基質を受け取る必要があるが、そのための TMD と PP の複合体形成がどのタイミングで起こり、どのようにして受け渡されるのかといった、時間軸に沿った分子機構の詳細は明らかにされていない。そこで、「輸送」を直接観察し、ATP の化学反応、構造変化という 3 つの現象を同一の反応軸で並べることで分子機構を明らかにすることを試みた。輸送の可視化には、結合状態に依存して吸収スペクトルが変化するヘムを輸送基質とする ABC トランスポーター複合体 ; BhuUV-T を用いた。ストップ・フロー法に加えて、マイクロ流路ミキサーを用いた時間分解顕微分光法を独自に組み立て、高精度測定と試料消費抑制を可能にした。そのキネティクス解析から、ヘムと結合した PP である BhuT がトランスポーター BhuUV と複合体を結合すると、ヘムが BhuU に受け渡され、その後、ATP の加水分解に伴ってヘムが BhuUV から溶媒に放出される様子が明らかにできた。本発表では輸送がどのような ATP の化学反応と構造変化の共役によって実現されているかを詳細に議論する。

WS6-5

キネティクス操作に基づく酸化的蛋白質フォールディング制御

○村岡 貴博

東京農工大・工・応化

近年、細胞内でのジスルフィド結合形成を伴う酸化的タンパク質フォールディングは、キネティクス特性の異なる複数の酸化還元活性を有する酵素が関与し、連携することで、効率的に進行することが明らかにされつつある。酸化還元活性を有する人工分子が、酸化的タンパク質フォールディングに作用することは知られるが、異なるキネティクス特性を有する酸化還元活性分子の設計指針は未確立であり、従って人工的なアプローチによるキネティクス特性まで含む酸化的タンパク質フォールディングの制御には至っていない。発表者は最近、キネティクス特性を大きく変える酸化還元活性分子の設計指針を独自に開発した。さらにこの指針に基づいて開発された合成化合物が、フォールディングに作用する酸化還元活性酵素と類似した機能を示すことを見出した。生体システムを模倣したキネティクス操作に基づく酸化的タンパク質フォールディング制御の実現につながる基盤技術として、酸化還元活性な低分子化合物のキネティクス特性制御方法と、その分子構造とフォールディング促進機能の相関について発表する。

WS6-6

機能性色素を用いた脂質膜の局所温度計測と熱的制御

○新井 敏、山崎 健、サルケア サティア

金沢大・WPI ナノ研

生命システムにとって、温度は最も重要な物理因子の1つである。細胞内で、無数に進行する化学反応が、もれなく熱力学の法則に支配されていることも私達は良く知っている。今まで、温度に纏わる生命科学研究の多くは、マクロな個体の体温に注目してきた。一方で、近年、細胞1個のミクロ空間の温度を測定する研究も盛んになってきた。本発表では、細胞内の複数の異なる場所の温度をサブセルレベルで計測する手法を報告する。具体的には、温度変化によって蛍光輝度や寿命が変化する、小分子の合成色素を用いる。これに、細胞内の狙った場所をターゲットできる機能を付与すると、細胞局所の温度を計測できる分子プローブとなる（蛍光顕微鏡下で使用）。分子サイズの蛍光温度センサーの代え難い利点は、ターゲット能力の高さにある。最近、脂質膜や油滴など、その他の温度測定法では到達できない場所の局所温度を計測できる蛍光温度センサーの開発に成功した。更に、高速蛍光寿命顕微鏡（Fast-FLIM）を導入することで、比較的定量性の高い温度測定が可能になった。これらを駆使して、熱産生細胞である褐色脂肪細胞の熱動態などを評価した。更に、局所の温度測定に加えて、脂質膜内部に光刺激で人工的に熱を発生させ（光熱効果）、脂質膜の動態を制御できる可能性を、人工二分子膜を用いて実証した。一連の最新の結果と併せて、分子から細胞レベルへ、異なる階層を横断する「細胞と熱」に関わる実験ツール開発の一端を紹介する。

WS7-1

機能を持った“新しい”蛋白質の設計

○小杉 貴洋^{1,2,3,4}¹分子研・協奏分子、²総研大、³自然科学・生命創成、⁴JST・さきがけ

近年、蛋白質構造予測技術や蛋白質合理設計技術の発展がめざましい。特に、AlphaFold2 の出現により、蛋白質構造予測問題の解決に大きな進展があったのは疑う余地はない。さらに、機械学習を利用した蛋白質設計技術も急速に発展してきている。今後、それらの技術を用いることにより、様々な有用な蛋白質が設計できるようになるであろう。一方で、私は既知の配列・構造情報の機械学習からでは予測することができないものを“新しい”ものであることの一つの指標として考え、その“新しい”ものをこそ設計したいと思っている。そのためには、既知の情報を最大限利用しつつ、(近似の範囲内で)あらゆるものに対して普遍的に成り立つ分子シミュレーションなどの物理化学的手法を用いることが重要であると考えている。

ここでは、現在の構造予測手法を用いても予測が難しい“新しい”蛋白質を実際に設計している例を紹介しながら、“新しい”蛋白質の設計に関して自分なりの考えをお話したいと思っている。

WS7-2

AlphaFold と分子シミュレーションの力学

○桜庭 俊

量科研・量子生命

2021 年 7 月に Deepmind から発表された AlphaFold [Jumper *et al.*, *Nature* 596, 583] はタンパク質のアミノ酸配列と配列の多重アラインメントを情報として用い、極めて多くのタンパク質構造を正確に予測することを可能にした。2021 年版 AlphaFold は Evoformer と Structure module の 2 要素から構成される。前者は主に残基間・配列間の関係性と配列自体の特性を抽出し、後者は Evoformer の出力を元に主鎖構造の三次元情報を改善することで実際の構造生成を行っている。本発表では AlphaFold Structure module での構造生成の数理的構造と、それを支える枠組みに焦点を当てる。AlphaFold の構造生成と古典的な構造最適化手法の共通点および相違点を軸に、AlphaFold の「力学」と古典的なエネルギーモデルでの力学との関係を説明すると共に、AlphaFold の「次」の時代を見据えた分子シミュレーションの展開を議論する。

WS7-3

分子動力学シミュレーションと機械学習を組み合わせたペプチド凝集予測

○亀田 倫史

産総研・人工知能

機械学習は、タンパク質やペプチドの物性を評価するのに有効な手法である。しかし、機械学習は大量の学習データが必要とする。学習データを得るためには多数変異体の実験が必要であり、大変困難である。本研究では、実験の代わりに機械学習と分子動力学 (MD) シミュレーションを組み合わせ、変異タンパク質の物性を予測する手法を開発した。本手法の実証として、配列空間が 16 万 ($=20^4$) である、4 アミノ酸ペプチドすべての凝集傾向を予測した。319 個のペプチドの全原子 MD シミュレーションの結果を機械学習の学習データとして使用した。その結果、N 末端がプロリンであるペプチドが高い AP を持つことが予測された。実験により、それらが針状結晶あるいは凝集体を形成することを確認し、その立体構造を X 線結晶解析によって決定した。機械学習と MD シミュレーションを組み合わせた我々の枠組みは、ペプチドやタンパク質の特性を評価するための有望な戦略であると思われる。

WS7-4

Computer-aided optimization and generation of antibodies

○Daisuke Kuroda

Research Center for Drug and Vaccine Development, National Institute of Infectious Diseases

In recent years, computational methods have garnered much attention in antibody engineering. A large number of computational methods have been developed to analyze the sequences and structures of antibodies and have been used to predict the various properties. However, despite the tremendous efforts of past decades, computational methods to predict the physicochemical properties of antibodies are still in their infancy. Experimental validations are certainly required for real-world applications, and the results should be interpreted with caution. In this talk, we show our recent efforts on computer-aided optimization of antibody structures on the basis of existing crystal structures. We have designed several variants of antibodies with point mutations, which was followed by physicochemical characterizations by surface plasmon resonance, circular dichroism, differential scanning calorimetry, molecular simulations, and machine learning. We will also present an algorithm to generate antibody sequences from scratch. Both successes and failures of the computer-aided antibody optimization and generation are discussed.

WS7-5

強化学習による分子シミュレーションの効率化と分子設計

○寺山 慧

横浜市・生命医

近年、様々な機械学習による分子シミュレーションの高精度化・高速化研究が進んでいる。本講演では、特に創薬・材料分野等において機械学習—特に強化学習—を用いることで、多数の計算候補対象から特に有望な候補を効率的に探索する手法について紹介する。具体的には、バンディットアルゴリズムやグレイボックス最適化を用いた、有望な薬候補化合物のポーズ推定、分子・結晶構造の高速化や、強化学習を用いた分子生成手法と分子シミュレーションの組み合わせによる新規光機能性分子・薬候補分子の設計などを紹介する。また時間に余裕があれば、分子シミュレーション・実験データ・深層学習を組み合わせたタンパク質のダイナミクス予測を行う手法等についても紹介する。

WS8-2

過渡的な複合体形成を伴うヒドロゲナーゼ鉄錯体の生成機構

○村木 則文^{1,2}、青野 重利^{1,2}

¹自然科学研究機構・生命創成、²自然科学研究機構・分子研

生命金属の重要な役割の一つに、金属酵素の活性中心が知られている。NiFe 型ヒドロゲナーゼは活性中心に有する金属クラスターの働きによって、水素の酸化反応とプロトンの還元反応を触媒する。その名が示すように、NiFe 型ヒドロゲナーゼの金属クラスターはニッケルと鉄から構成されている。活性中心のニッケルは酵素の3つのシステイン側鎖を配位子としており、鉄はシステイン側鎖に加えて、シアン化物イオンと一酸化炭素を配位子としている。このような複雑な金属錯体は自発的に形成されるわけではなく、複数のタンパク質が協調して段階的に作られる。好気性細菌の NiFe 型ヒドロゲナーゼでは、以下のような過程で鉄錯体が作られる。最初に、足場タンパク質である HypC/HypD 複合体が鉄を結合する。そこに、一酸化炭素生成酵素 HypX が一酸化炭素を供給する。さらに、シアン化物イオン生成を担う HypE/HypF 複合体がシアン化物イオンを2分子供給することで、Fe(CN)₂CO 錯体が完成する。このような緻密なシステムはタンパク質が過渡的な複合体を形成することによって成り立つと考えられる。我々はその初期過程である HypX から HypC/HypD 複合体への一酸化炭素輸送経路の分子機構の解明を目指して、結晶構造解析と溶液構造解析を行った。発表では、最新の研究成果を基に一酸化炭素の合成と輸送について議論したい。

WS8-1

各種分光計測を駆使した鉄活性中心における一酸化窒素還元酵素の反応機構の解明

○當倉 武彦

理研・Spring-8

生体内において、遷移金属元素は、酵素の活性中心として、様々な化学反応を行うことで生理反応を円滑に進めている。そのため、金属酵素の反応機構の解明は、生命現象を分子論的に理解するために重要である。本発表では、金属酵素の反応機構の解明を目指した研究として、各種分光計測を駆使した膜結合型一酸化窒素還元酵素 (NOR) の研究を紹介する。NOR は、ヘム鉄と非ヘム鉄からなる複核活性中心において、電子とプロトンを利用して、2 分子の NO から亜酸化窒素を生成する金属酵素である。本酵素反応は、微生物が嫌気下で生きるための嫌気呼吸のキーステップであり、病原菌が宿主に感染する際にも用いられる重要な反応である。本研究では、NOR の反応を観測するために、光照射により NO を発生するケージド NO を利用した分光計測により反応機構の解明に挑戦した。ケージド NO の光解離をトリガーとした時間分解可視吸収測定から、NOR の反応は、二つの短寿命反応中間体を経由した反応であることがわかった。時間分解赤外分光では、一つ目の反応中間体は活性部位に NO が結合した状態で、NO 伸縮を 1683 cm⁻¹ にもつことが示された。また、ケージド NO の低温光解離と昇温により反応中間体を捕捉し、電子スピン共鳴分光計測を行ったところ、一つ目の中間体は、全スピンの 3/2 の状態であることがわかった。これらの結果から、第一反応中間体は、非ヘム鉄に NO が結合した状態であることが示された。発表では、分光計測から考えられる NOR の反応機構に関して議論する。

WS8-3

ERp44 を介した亜鉛とレドックスホメオスタシスのクロストーク

○天貝 佑太、新井 千尋、稲葉 謙次

東北大・多元研

亜鉛は必須微量元素で、生体中の様々なタンパク質と結合しその機能を調節する。これまでに、小胞体から細胞質へ亜鉛イオン (Zn²⁺) を放出する ZIP7 亜鉛輸送体の発現抑制が、小胞体内に Zn²⁺ を集積し、小胞体内腔で酸化的タンパク質フォールディングを行う PDI の機能を阻害し、タンパク質品質管理機構が破綻することが報告された。しかしながらその詳細な分子機構はほとんど不明であった。

私たちは、PDI ファミリーメンバーの一つである ERp44 が、ゴルジ体において Zn²⁺ と結合することで、その基質タンパク質との親和性が増大することを見出してきた。さらに、新規亜鉛定量プローブを開発することで、小胞体遊離 Zn²⁺ は pM オーダーであるのに対し、ゴルジ体では数十 nM 程度に保たれていることを発見した。これらの解析から、ゴルジ体内の Zn²⁺ 制御が ERp44 機能制御に重要であることを解明した。

本研究において、ZIP7 機能阻害細胞を詳しく解析したところ、小胞体の遊離 Zn²⁺ 濃度は著しく上昇し、ERp44 は小胞体に偏在した。さらに、ERp44 は PDI の上流因子である Ero1 α と複合体を形成し、還元型の PDI が蓄積した。一連の結果から、ZIP7 の機能阻害によって小胞体中の亜鉛濃度が過剰となり、ERp44 が Ero1 α と結合し、Ero1 α による PDI 酸化反応が阻害されたものと考えている。以上の結果は、小胞体の Zn²⁺ 恒常性がレドックス恒常性に関わる機構の一端を明らかにするものである。

WS8-4

ZIP13 と鉄を介する新しい脂肪分解の制御機構

○福中 彩子¹、木村 徹²、齊藤 大祐^{1,3}、綿田 裕孝³、
深田 俊幸⁴、藤谷 与士夫¹¹ 群大・生調研、² 杏林大学医学部、³ 順天堂大学大学院医学研究科代謝内分泌内科学、⁴ 徳島文理大学薬学部

肥満は、多くの国で年齢を問わず増加の一途をたどっており、その病態の解明と新規治療薬の開発は急務である。脂肪組織はエネルギーの貯蔵や消費を調節する臓器であるため、脂肪細胞の性質を制御することが肥満改善の最も有効な手段の一つとして期待されている。亜鉛や鉄は、情報を伝達する因子として個々の細胞機能を制御することで、個体のエネルギーバランスに貢献していると考えられる。我々は、これまでに亜鉛トランスポーター ZIP13 がベージュ脂肪細胞分化 (ベージュ化) を抑制することを、全身で *Zip13* を欠損したマウスを用いた解析により見出している (Fukunaka A, PLoS Genet. 2017)。ベージュ化亢進の表現系が脂肪細胞で起きているか観察するために、成熟脂肪細胞特異的に *Zip13* を欠損したマウス (Adipo-*Zip13*-KO マウス) を作製し解析を行った。Adipo-*Zip13*-KO マウスでは、高脂肪食負荷時の肥満に抵抗性を示すが、ベージュ化亢進は観察できなかった。一方、予想外の発見として、このマウスでは脂肪細胞での脂肪分解が亢進し、抹消組織で脂質がより優先的に消費されることで、肥満に抵抗性を示すことを見出した。さらにその分子機序を調べたところ、ZIP13 は成熟脂肪細胞においては細胞内の鉄量を変化させて、脂肪分解を抑制する新規の機能を持つことが明らかとなり、ZIP13 は同じ脂肪細胞であっても、細胞分化に伴う細胞内微小環境の変化に応じて亜鉛と鉄を使い分けるといふ、新しいコンセプトが提唱できると考えられた。

WS8-6

次世代型定量プロテオミクスと金属輸送研究への応用

○内田 康雄

東北大院・薬

亜鉛、鉄、銅、マンガン、セレンなどの生体に必須の金属元素は、体外から消化管を通じて吸収され、各臓器や細胞へ分布し、排泄される運命を辿る。この金属動態は、金属輸送分子によって厳密に制御されていると考えられている。金属輸送において、金属トランスポーターは細胞内外の金属分布を制御する重要な役割を果たす。どのトランスポーターが、どの臓器で、細胞内のどこで、どのくらいの輸送活性で活躍しているかを合理的に推定・解明する技術は、金属動態研究を加速させる。我々は、次世代型定量プロテオミクス法を独自に開発し、トランスポーターなどの微量な膜タンパク質まで高精度に定量できる技術を開発してきた。細胞内オルガネラの分画法を組み合わせることによって、basolateral 側と apical 側の細胞膜に局在するタンパク質を一斉に同定することができる。また、特定の組織や細胞における、異なる金属トランスポーターの存在量の違いを一斉に定量することが可能である。これらは、(類似の) 各金属トランスポーターの役割の違いを理解するための手掛かりとなる。本ワークショップでは、これらの我々のプロテオミクス技術を紹介するとともに、金属輸送研究への応用例について講演したい。

WS8-5

オルガネラ選択的脂質ラベリングによる脂質制御因子の遺伝子スクリーニング

○田村 朋則、土谷 正樹、浜地 格

京大院・工

脂質は生体膜の主要な構成要素であり、その生合成、代謝、オルガネラ間輸送には多種多様なタンパク質が関与している。1957年に Kennedy らがリン脂質の生合成経路を見出して以降、脂質合成酵素についての研究が進み、現在では各脂質の生合成経路に関わるほぼ全ての酵素が明らかとなっている。しかし一方で、脂質の恒常性や細胞内分布を精密に制御しているタンパク質ネットワークの全容は未だ明らかではない。そこで本研究では、脂質の代謝や細胞内輸送を制御するタンパク質因子の網羅的同定を目指した遺伝子スクリーニング手法の確立を行った。具体的には、我々のグループがごく最近開発したオルガネラ選択的ホスファチジルコリン (PC) 蛍光標識法と CRISPR-knockout スクリーニングを組み合わせ、PC の細胞内存在量や局在といった表現型に摂動を与える遺伝子群を同定可能な系を確立した。特筆すべきことに本手法によってこれまで知られていなかったタンパク質が PC の生合成制御に関与していることが明らかとなった。本発表では、これら同定された制御因子と生命金属科学との関連性について議論する。

WS8-7

化膿レンサ球菌細胞表面由来金属結合タンパク質に対する機能阻害剤探索

○中木戸 誠¹、浅野 梨紗¹、竹内 美結¹、伊藤 翔²、相川 知宏³、
中川 一路³、津本 浩平^{1,4}¹ 東大院・工・バイオエンジニアリング、² 株式会社リガク応用技術センター ROD (単結晶解析) グループ、³ 京大院・医・微生物感染分野、⁴ 東大・医科研

化膿レンサ球菌は常在菌である一方でヒトに対する多様な病原因子を有しており、しばしば疾患を引き起こす。さらに近年、薬剤耐性菌の出現が確認されており、抗生物質に変わる新たな治療手法の開発が求められている。そこで、病原因子を標的とした抗菌剤開発を目指し、各種阻害剤の探索を行っている。本研究では特に、菌表面に発現する金属トランスポーター群に着目し、その機能阻害による抗菌剤開発を目指した。本発表では、標的分子に対する各種低分子化抗体を分子モダリティとして活用し、エンジニアリングによって高機能化した抗体を用いた標的蛋白質の機能阻害についてその分子機構とともに述べる。また、合わせて検証した抗菌活性評価と比較し、これまでに実施してきた低分子化合物を用いた阻害剤探索の結果と合わせ、化膿レンサ球菌に対する抗菌剤開発の戦略について議論する。

WS9-1

ストップコドンリードスルーの分子機構解明

浅野 航佑¹、原口 大輝²、須藤 愛莉咲²、松井 崇^{2,3}、
小寺 義男^{2,3}、小川 智久⁴、横山 武司¹、○田中 良和¹

¹ 東北大・院・生命科学、² 北里大・理、

³ 北里大・理・附属疾患プロテオミクスセンター、⁴ 東北大・院・農

リボソームは mRNA の開始コドンから終止コドンまでの遺伝情報をアミノ酸へと翻訳する。しかし、必ずしも終止コドンで翻訳反応が終結しない場合があることがわかってきた(これをリードスルーとよぶ)。リードスルーは翻訳エラーの一つであるだけでなく、生体内では非典型的な翻訳機構として巧妙に利用されており、また、一部の抗生物質はリードスルーを引き起こすことにより菌を殺傷する。加えて、遺伝性疾患のうち 10-15% 程度が未成熟終止コドンに起因することから、リードスルーの機構を理解し、未成熟終止コドンのリードスルーの頻度を上げることができれば、遺伝性疾患の解決につながる可能性がある。このように、リードスルーはさまざまな見地から意義深い生命現象である。先行研究にて我々は、GFP の N 末端領域に挿入した終止コドンが高効率(野生型配列に比べて約 25% 程度)にリードスルーされることを見出した。本研究では、リードスルーが起きる際に終止コドンに対してどのようなアミノ酸が運搬されるのかを同定し、さらにそれらのアミノ酸が運搬される分子メカニズムを最先端の構造解析技術で明らかにすることを目指している。本発表では、これまでに得られた知見を紹介するとともに、今後の展望について議論する。

WS9-2

翻訳停滞とリボソーム不安定化による非典型的翻訳現象の駆動と再構成

○茶谷 悠平¹、田邊 葵²、丹羽 達也^{1,2}、田口 英樹^{1,2}

¹ 東工大・研究院、² 東工大・生命理工学院

細胞内装置リボソームが、mRNA 上の開始コドンから終止コドンまでを規則正しく翻訳することは、正常なタンパク質発現と細胞内環境の秩序形成に重要であると考えられてきた。一方で、一部の遺伝子はその大原則を改変し、異なる機能をもつタンパク質レパートリーを発現させることが近年明らかになりつつある。T4 バクテリオファージ gene60 の翻訳途上では、ribosome hopping (translational bypassing) と呼ばれる現象によって、2つの ORF から一繋ぎのポリペプチド鎖が合成される。本研究ではこの非典型的翻訳について解析し、その発生条件の特定と再構成に成功したので報告する。上記 gene60 並びに新たに見出した大腸菌内在遺伝子での ribosome hopping について解析を行った結果、両者ともにリボソームの翻訳伸長停滞と、内部の新生ポリペプチド鎖による複合体構造の不安定化 (IRD: Intrinsic Ribosome Destabilization) が必要であることを見出した。この知見をもとに再設計した人工配列でも、ORF 間の距離によらず ribosome hopping の効率の駆動に成功した。Ribosome hopping を駆動し得る IRD 誘導アミノ酸モチーフは生物のゲノムに多数コードされており、栄養飢餓などの環境変化に応答してプロテオームを拡張、再編成している可能性がある。

WS9-3

非典型翻訳の試験管内再構成とそのメカニズムの解明

○町田 幸大、辻本 宗佑、砂川 真弓、今高 寛晃

兵庫県立大・工・応化

ハンチントン病の原因遺伝子である HTT exon1 は CAG リピートをコードしている。教科書に書かれた典型的な翻訳機構に従えば CAG リピートからはポリグルタミンのみが合成されるが、近年、ハンチントン病患者の脳組織ではポリグルタミン以外に、ポリセリンやポリアラニンなども凝集していることが明らかにされた。これはすなわち、in-frame の CAG リピート以外に、翻訳の読み枠がずれて「+1 frame: CAG → AGC リピートのポリセリン」や「+2 frame: CAG → GCA リピートのポリアラニン」が翻訳された結果であり、リピート配列においては、典型的な翻訳に加え、非典型的な翻訳が生じることを示唆する非常に興味深い知見である。我々の研究グループはこれまでに、ポリアミンの濃度上昇は特定遺伝子の翻訳をフレームシフトによって誘導することを明らかにしており、ポリアミンが上記の非典型翻訳にも関与しているのではないかとこの作業仮説を立てた。そこで、真核細胞で主要とされる 3 種のポリアミンがリピート配列の翻訳に与える影響を精査するため、我々が開発したヒト因子由来の再構成型試験管内翻訳系を利用して種々の解析を行った。その結果、ポリアミンが CAG リピート配列の翻訳に影響を与えること、またポリアミンの種類によってその効果が異なることが分かってきた。本発表では、これら新規の発見について最新のデータを交えながら紹介する。

WS9-4

小胞体におけるマルチドメインタンパク質の翻訳と共役した折り畳みを促進する仕組み

○門倉 広

東北大・多元研

ヒト全タンパク質の約半数以上はマルチドメインタンパク質である。試験管内の折り畳み実験ではこのようなタンパク質はドメイン間の相互作用によって凝集しやすい。しかし、細胞内ではこれらのタンパク質の多くは翻訳と共役して効率よく折り畳まれる。従って、その新生鎖上には、各ドメインの効率良い立体構造形成を促進するための、様々な未知の仕組みが隠されていると予想される。今回、そのような仕組みの一つについて紹介する。

我々はパルスチェイス実験、非還元・還元 2 次元電気泳動と立体構造特異的な抗体を組み合わせることによって、生細胞中のリボソーム上で翻訳合成されつつ、小胞体内に送り込まれてくる、マルチドメインタンパク質 LDL 受容体 (LDLR) の新生鎖にジスルフィド結合が導入される過程を観察するための系を構築した。興味深いことに、LDLR の翻訳の初期段階では、LDLR の N 末端に存在する R ドメインに、天然構造には見られないジスルフィド結合が導入されるが、この結合を天然型の結合へと組み換える反応は、R ドメインの遙か下流に存在する β プロペラドメインの中央部分をリボソームが翻訳する時に、開始することが分かった。更に、様々な変異体を利用した解析から、 β プロペラの 3 番目のサブドメインを含む領域に、上流ドメインの折り畳みを促進する配列が隠されていることを見出した。現在、マルチドメインタンパク質の新生鎖の立体構造形成を促進する、この新たな仕組みの実態について解析を進めており、紹介したい。

WS9-5

ミトコンドリア外膜に誤配送されたテイルアンカー型タンパク質の配送校正機構

○松本 俊介¹、小野 鈴花^{2,3}、遠藤 斗志也^{2,3}¹ 九大院・農・生化、² 京産大・生命、³ 京産大・タンパク質動態研

真核生物の細胞内で行われるタンパク質は、サイトソル、ミトコンドリア、核、小胞体、細胞膜等、働くべき場所が決まっている。これらの場所に各タンパク質が正しく運ばれることが、細胞の正常な機能に必須である。タンパク質の細胞内局在に間違いが起こると、誤配送されたタンパク質は機能できないだけでなく、毒にもなり得るので、速やかに分解除去されるものと考えられてきた。2014年に、ミトコンドリア外膜に存在する AAA-ATP アーゼ Msp1 が、ミトコンドリア外膜に誤配送されたテイルアンカー型 (TA) 膜タンパク質の除去に関与することが報告された。この報告を受けて、私たちは Msp1 がミトコンドリア外膜に誤配送された TA タンパク質を引き抜くことで、分解だけではなく配送やり直しの機会を与えることを新たに見出した (Matsumoto et al., Mol. Cell. 2019)。細胞内でのタンパク質配送には間違いが起こりうることで、間違いが起こってもそれをやり直すことで、タンパク質の正しい配送や、誤配送されたタンパク質の除去を行い、細胞機能への障害の発生を防いでいることを示した。こうした誤配送のやり直し、すなわち DNA の複製や翻訳に見られる「校正 (Proofreading)」という機構が、タンパク質輸送、とくにオルガネラへの標的化においても存在することを示唆している。本発表では、最近私たちが明らかにしてきたタンパク質配送の校正機構について、議論したい。

WS9-6

オートファジーにおける液-液相分離の機能

○藤岡 優子、野田 展生

北大・遺制研

オートファジーは細胞内の主要な分解経路であり、細胞内クリアランスや免疫応答など、その生理的な意義は多岐に渡っている。飢餓時には、オートファジーの始動点である前オートファゴソーム構造体 (PAS) から、隔離膜と呼ばれる脂質膜が新たに合成され、細胞質の一部を包み込みながら閉じることで二重膜のオートファゴソームが形成される。我々はこれまでその実体が不明であった PAS が、Atg タンパク質が液-液相分離することで形成された液滴であることを世界に先駆けて突き止めた。しかしながら、液滴の特性を利用して PAS でどのような反応が起こっているのかについては不明の点が多く残されている。我々は最近、精製 Atg1 複合体によって形成される初期 PAS 液滴に下流の Atg タンパク質を導入する *in vitro* 解析を行うことで、Atg タンパク質ごとに液滴内への導入効率に差があることを見出した。興味深いことに、オートファジーの中心因子 Atg8 の脂質結合反応系の E3 酵素である Atg12-Atg5-Atg16 複合体は液滴内に顕著に濃縮されるのに対し、Atg8 の脱脂質化酵素である Atg4 は濃縮されず、その結果液滴において脂質化 Atg8 の形成が促進された。PAS が液滴である理由の一つは、オートファジーに必須な酵素反応が効率的に起きる場を提供することであると考えられる。

WS10-1

細胞の環境変化に呼応した解糖系酵素 PGK による解糖流量調節機構

○八木 宏昌¹、葛西 卓磨¹、Elisa Rioual¹、池谷 鉄兵²、木川 隆則¹¹ 理研・生命機能科学研究センター、² 東京都立大・理学部

解糖系は生体を持つエネルギー獲得のための中心代謝経路であり、その流量 (解糖流量) は細胞環境によって厳密に制御されている。また多くの癌細胞では解糖系が亢進し解糖流量の増大が見られる。そのため、細胞の環境変化に呼応した解糖流量の調整機構を正確に理解するには、解糖系を構成する各酵素の活性制御機構を細胞内あるいは細胞環境に近い状態で解析する必要がある。解糖系酵素の一つであるホスホグリセリン酸キナーゼ (PGK) は、ADP にリン酸を付加することで ATP を合成し、同時に 3-ホスホグリセリン酸 (3PG) を産出する。また糖新生ではその逆反応を担い、両方向へのリン酸転移反応を触媒する酵素である。今回我々は、溶液 NMR と *in-cell* NMR を使うことにより、PGK はヌクレオチドと 3PG の基質結合協同性を巧みに利用することで、細胞内の ATP/ADP 濃度比に応じて触媒反応を制御していることを明らかにした。このことは、PGK は細胞内 ATP 濃度を感知しながら自身の活性をコントロールし、それによって解糖流量を調節していることを示唆している。さらに、この基質結合協同性は生理塩濃度下で最適に発揮できるよう精巧にチューニングされており、その自由エネルギー差は非常に小さいことが明らかになった。これらのことから、今回明らかになった制御機構は、細胞の環境変化に迅速に対応できるように両方向への反応を触媒する酵素に備わった、タンパク質レベルでの反応制御機構だと考えられる。

WS10-2

高感度・ハイスループットプロテオミクスがもたらすタンパク質研究の新展開

○松本 雅記

新潟大・医・システム生化学

生命システムは核酸やタンパク質、さらには代謝物よりなる極めて複雑な分子ネットワーク構造の上に成り立っている。特にタンパク質は生体内分子ネットワークの主要構成因子であり、その量や状態を正確に計測することは分子ネットワークの性質を理解する上で極めて有効である。

われわれは、これまでにタンパク質の発現量や翻訳後修飾、さらにはタンパク質間相互作用を網羅的かつ定量的に計測する様々な技術を開発してきた。例えば、タンパク質の精密絶対定量を可能とする画期的なプロテオーム解析プラットフォームである *in vitro* proteome assisted MRM for protein absolute quantification (iMPAQT) を独自に開発しており【Matsumoto et al. Nat. Methods 2017】、細胞がん化や老化における代謝ネットワークの計測に応用してきた【Morita et al. Cancer Cell 2018, Kodama et al. Nat. Commun. 2020, Johmura et al. Science 2021】。最近その利便性をより向上させた iMPAQT ver.2 の開発に取り組んでいる。

本ワークショップでは、iMPAQT ver.2 の原理や、更なる高感度化やスループット向上への取り組みを紹介し、より機能的かつ多様なタンパク質研究への応用の可能性を議論したい。

WS10-3

リアルタイム In-cell NMR 観測による細胞内タンパク質の活性制御機構の解明

○西田 紀貴

千葉大・院薬

細胞内は多種多様な生体分子が高濃度で存在する分子混雑環境であり、タンパク質の活性に大きな影響を与えることが知られている。また、細胞内には複雑な細胞内タンパク質ネットワークが構成されており、タンパク質の機能発現は固有のパートナータンパク質との相互依存関係の上に成り立っている。したがって、in vitro で計測したタンパク質の構造や活性は必ずしも細胞内における本来の状態を反映しない。この問題を解決するためには、実際の細胞内でタンパク質の構造情報を直接観測出来る in-cell NMR 法が非常に有効である。我々はこれまでに NMR 試料管内の細胞に一定の速度で培地を灌流させる新規バイオリクターシステムを開発した。この手法を用いることにより、細胞を生理的環境下に保ったまま長時間の in-cell NMR 測定を行うことが出来るだけでなく、培地に薬剤を添加して細胞に刺激を加え、それに伴って誘起される細胞内応答をリアルタイムに追跡することも可能である。本発表では、in-cell NMR 法を代表的な低分子量 GTPase である Ras に適用した結果について述べる。Ras や発癌性変異体の細胞内における活性型 (GTP 結合型) 割合をリアルタイム観測し、Ras の活性を規定するパラメーターの定量や Ras の非共有結合型阻害剤の反応の追跡などを行った。これにより、細胞内環境が Ras の活性を適切に制御する新しい機構が明らかになった。

WS10-5

神経細胞の分化における細胞内温度の関与

○原田 慶恵

阪大・蛋白研

我々はこれまでに高性能な蛍光性高分子温度センサーと高感度かつ高い定量性を備えた蛍光寿命イメージング顕微鏡を用いて、単一生細胞内の温度分布をイメージングする方法を開発した。開発した方法を使って行った実験から、細胞内の代謝が活発な G1 期では、核の温度が細胞質の温度よりも高いこと、一部のミトコンドリアや、中心体の温度が高いことなどが、明らかになった。このような細胞内温度の不均一性を保つメカニズムやその生理的意義はまだよくわかっていない。最近、RNA 粒子の形成など、細胞内温度変動が引き金となって起こる生理現象のメカニズムが解明され始めた。このことから我々は、『細胞自身が自発的な熱産生を行い、細胞内の局所温度を変化させることで機能を制御している』という仮説を立てた。この仮説を検証するために、我々は、細胞がタンパク質の発現パターンを劇的に変化させる「細胞分化」に着目し実験を行なっている。細胞の分化状態が細胞の形態変化から容易に判断できる、神経モデル細胞を用いて、細胞分化と細胞内温度について調べることにした。神経成長因子 (NGF) を添加し神経モデル PC12 細胞の分化を誘導すると、24 時間後には神経突起が伸長し、細胞内の温度は NGF 添加前に比べて上昇することが分かった。講演では細胞を局所加熱した実験や、転写や翻訳阻害剤の投与実験の結果を紹介し、神経細胞の分化における細胞内温度の関与について議論する。

WS10-4

相分離・相転移が制御する中心小体複製機構

○北川 大樹

東大・薬・生理

非膜系オルガネラである中心体は微小管形成中心として機能し、細胞分裂や染色体分配に重要な役割を果たしている。中心体は、中核構造体である中心小体とその周囲を取り囲む無定形のマトリックスにより構成されている。中心小体が一細胞周期に一度だけ複製されることで、中心体自体も倍加する。中心小体は特徴的なシリンダー型構造体であり、数十から百程度の種類のタンパク質により構成されている。特に、多くの構成因子は、コイルドコイルと天然変性領域に富んだ構造をもつことが知られている。中心小体は、細胞内に存在する有数の巨大で複雑な超分子複合体と捉えられるが、その形成機構の全容は未だ明らかにされていない。我々は中心小体形成の初期過程に着目し、進化的に保存された中心小体構成因子間の相互作用が、中心小体の複製を 1 コピーに制限するのに重要であることを明らかにしてきた。また、ヒト培養細胞における中心小体構成因子の超解像顕微鏡観察やダイナミクス解析、さらに精製タンパク質を用いた in vitro 再構成により、微小空間において中心小体構成因子が相分離することが複製起点の決定に重要であることを示してきた。現在は、複数の中心小体構成因子がもつ相分離や相転移の分子特性が、段階的かつ効率的な構造体のアッセムブリーに、どのように寄与しているのかを解明することを目指している。本講演では、複雑かつ精密な中心小体構造の形成機構を例に、分子夾雑下の細胞内における構造体構築の原理に関して議論したい。

WS11-1

Sec 複合体によるタンパク質膜透過の 1 ユニット動態観察

○塚崎 智也¹、長池 航²、板家 成良¹、春山 隆充¹、菅野 泰功¹、宮崎 亮次¹、市川 宗厳¹、内橋 貴之^{2,3}¹ 奈良先端大、² 名古屋大・理、³ ExCELLS

生体内における Sec 複合体を経由する新規に合成されたタンパク質の膜透過は、必須の生命現象である。バクテリアでは、SecY/E/G 複合体 (タンパク質膜透過チャネル) と SecA ATPase (タンパク質膜透過駆動モーター) が細胞質からペリプラズムへのタンパク質輸送のほとんどを担っているが、どのように構造変化を起こし機能しているのかについては不明である。この基本的な分子メカニズムを詳細に理解することは、構造生命システム科学の樹立のために欠かせない。SecY と SecA を融合させて調製した SecY-A/E/G 複合体は、タンパク質輸送活性を保持していた。そのため、1 ユニットの SecY-A/E/G 複合体をナノディスクに再構成し、基質タンパク質の輸送過程を、高速原子間力顕微鏡 (高速 AFM) を用いて、リアルタイム測定を進めている。その結果、SecA 側に大きく構造変化する領域が確認された。各種ヌクレオチド存在下での構造変化とこの領域の同定を進めている。これらの測定結果をもとに、最新の Sec タンパク質によるタンパク質膜透過機構のモデルについて紹介する。

WS11-2

タンパク質膜透過・輸送に関わる PpiD/YfgM 複合体の *in vivo* 光架橋解析○宮崎 亮次¹、鈴木 健裕²、堂前 直²、塚崎 智也¹¹ 奈良先端大、² 理研 CSRS

細胞質で合成されたタンパク質は、保存された Sec 複合体により膜を透過して輸送される。大腸菌においては、SecYEG 複合体がタンパク質膜透過孔を形成し、細胞質 ATPase である SecA と内膜のプロトン駆動型モーター SecDF 複合体が SecYEG を通じての基質ポリペプチド鎖の膜透過を駆動する。それらの因子に加えて、膜タンパク質複合体 PpiD/YfgM が膜透過反応で重要な働きをすることが最近報告された。PpiD/YfgM は、SecYEG 近傍で、SecDF と協働することで膜透過後期過程に働き、ペリプラズムのシャペロンに基質を受け渡すことが示唆されているが、具体的な役割は不明であった。本研究では、*in vivo* 光架橋法を中心に用いて、PpiD/YfgM の機能解析を行なった。

in vivo 光架橋法は、任意の部位に光反応性非天然アミノ酸 pBPA を導入した標的タンパク質を細胞内で発現させて行う架橋実験法で、生細胞内でアミノ酸残基レベルの高空間分解能でタンパク質間相互作用を解析することができる。

まず、PpiD と YfgM の全領域を対象に系統的に pBPA を導入し、光架橋解析を行なった結果、PpiD/YfgM と SecYEG、SecDF との相互作用様式を明らかにし、PpiD の基質結合に関わると推測される部位も同定した。さらに、予想外の因子が PpiD と相互作用することを見出した。これらの光架橋解析の結果や生化学的解析から、PpiD/YfgM の機能を議論する。

WS11-4

ゲノム構造を作るメガダルトン複合体の構造と機能の解明

○野澤 佳世¹、胡桃坂 仁志¹、安達 成彦²¹ 東大・定量研、² 高エネ研

我々は、遺伝子のオン・オフを規定する DNA の折り畳み構造の基本単位「DNA ループ」に着目して、研究を進めている。ヒトは約 2 万種類のタンパク質から構成されるが、細胞の分化や発生状態に応じた転写制御を行うために、エンハンサー DNA の数は数十万にもなる。興味深いことにエンハンサー DNA からの遺伝子活性化シグナルは、数キロから 1 Mbp もの長鎖 DNA を経て標的遺伝子のプロモーター DNA へと伝わり、この情報伝達は 2 つの DNA 領域が物理的に近接する DNA ループを作ることによって行われている。転写メディエーターは、このエンハンサー DNA とプロモーター DNA を対合させ、転写開始点に RNA ポリメラーゼ II をリクルートすることで、タンパク質産生をコントロールしている転写コファクターである。我々はこれまでに、分裂酵母の転写メディエーターの機能最小単位である、15 サブユニットの X 線結晶構造解析を行い、プロモーター側で RNA ポリメラーゼ II の転写開始に関わることを明らかにした (Nozawa et al., Nature 2017)。一方、近年の研究により、転写メディエーターとヌクレオソームやヒストンシャペロン、クロマチンリモデリング因子、コヒーシ複合体の相互作用が議論され、DNA ループの全貌は複雑になってきている。本セッションでは我々が構造生物学的なアプローチを通じて発見した知見を踏まえて、ゲノム構造による遺伝子制御機構について議論する。

WS11-3

分子動力学計算と実験データに基づくタンパク質複合体立体構造モデリング

○森 貴治

理研・開拓研究本部・杉田理論分子科学

細胞内の生命現象を理解するためには、各現象の過程で形成されるタンパク質複合体の構造およびダイナミクスを調べることが重要である。近年、単粒子解析やクライオ電子線トモグラフィー、高速原子間力顕微鏡などを用いることで複合体の高分解能構造あるいはダイナミクスのリアルタイム観測が可能になってきた。一方、実験データにはノイズが含まれていたり、局所的に解像度が低下していたりするため、このような不確かさも構造モデリングで考慮する必要がある。これまでに理研杉田グループでは分子動力学計算プログラム GENESIS を開発し、近年では分子動力学計算に基づくクライオ電験構造モデリング (フレキシブルフィッティング) にも取り組んでいる。本演題では、実験データ解析に関するこれまでの我々の開発および応用について紹介し、次世代構造モデリングプラットフォームの構築に向けた今後の展望について述べる。

WS11-5

ゲノム配列から大腸菌をまるごとモデリングする

○海津 一成^{1,2}、西田 孝三¹、高橋 恒一¹¹ 理研 BDR、² JST さきがけ

近年、細胞の測定と合成技術は急速に進歩し、1 細胞 1 分子レベルの測定技術や 1 塩基レベルでのゲノム合成が実現されてきた。より自由な細胞合成が可能になりつつある一方で、細胞を設計する方法については未だ十分な技術が確立されていない。そこで我々は、ゲノムを一から設計するため、大腸菌の細胞をまるごとシミュレーションする技術を開発している。全細胞シミュレーションは、特定のパスウェイに注目するのではなく、遺伝子発現・代謝・ゲノム複製などあらゆる細胞機能から 1 細胞をまるごとモデリングし、計算によってその動態を再現、予測することを目指す。さらに本研究ではゲノム設計への応用を目標に、バイオインフォマティクス技術と構造生物学など各種データベース上の情報を活用することによって、ゲノム配列から自動で細胞モデルを構築し、全細胞シミュレーションを行い、その結果の可視化までを行う仕組みを開発した。これにより、数理的なモデルの詳細を知らなくても、入力するゲノム配列を変更するだけで様々な遺伝型からその表現型を計算機上で評価することができる。また、細胞をまるごとモデル化したことで、各種オミクスデータと定量的に比較可能な 1 細胞全ゲノム規模のシミュレーション結果を得ることができる。最後に本発表では、この全細胞モデリング技術を利用した様々な合成ゲノムの仮想実験も紹介する。

WS11-6

複数構成因子からなる細胞機能・構造解析のための人工細胞システムの構築

○車 ゆうてつ¹、江藤 澄江²、松村 るみゑ¹、嶋根 康弘¹、
藤見 麻衣²、ベルハヌ サミュエル²、笠間 健嗣²¹ 海洋研究開発機構、² 東工大・地球生命研究所

分子の集合体として構成される細胞を最小限の分子と遺伝子から再構築する人工細胞研究では、転写翻訳やエネルギー生産などこれまでにさまざまな細胞機能が再現されている。中でも脂質膜小胞の内部で再構築し、生きた細胞と同じ時空間スケールで細胞機能を再現できることが大きな特徴と言える。我々はこれまでに、光依存的に ATP を合成する人工細胞の構築や、細胞分裂に関わる膜タンパク質複合体の膜内合成などを行ってきた。このような技術をさらに進化させることで、最近では試験管内で脂質合成を行う *in vitro* 系の構築に取り組んでいる。本発表では無細胞タンパク質合成系と人工脂質膜を利用した、複数の膜タンパク質から機能を発現する人工系について紹介する。また、このような人工細胞系の技術による他領域研究への応用の可能性についても紹介したい。

WS12-2

クラウド HPC によるスケーラブルな計算基盤を用いたクライオ電子顕微鏡単粒子解析手法

○宮本 大輔

アマゾンウェブサービスジャパン合同会社

クライオ電子顕微鏡単粒子解析が計算基盤に求める課題には、撮像結果や求める解像度によって必要となる計算量が異なる、ステップによりアクセラレータ (GPU) 利用の有無など求める計算リソースが変化する、大容量のデータを保管するだけでなく解析には高速なストレージが必要となる、複数のソフトウェアを組み合わせるため同一の環境を第三者が構築するために労力がかかるといった点がある。一方、クラウド環境には、必要な時に動的に計算リソースを確保できる、GPU の有無を含め多様なサーバ構成を選択できる、安価な保管用ストレージに加え解析用の高速なストレージを利用できるといった利点に加え、計算環境自体を他者に対して複製することも容易となっている。このような特徴によりクラウドの活用で単粒子解析の求める計算基盤の課題に対応することが可能である。

本発表では、Amazon Web Services (AWS) を例として、Slurm ジョブスケジューラと連動した HPC クラスタをクラウド上に構築するソフトウェアである AWS ParallelCluster や、高速なストレージサービスである Amazon FSx for Lustre、高耐久なオブジェクトストレージである Amazon S3 といったサービスについて紹介し、この環境上で単粒子解析を行うためのソフトウェアである Relion や cryoSPARC をどのように活用できるかについて概説する。

WS12-1

AWS ParallelCluster をハブとしたクライオ電子顕微鏡単粒子解析現場の IoT 化

○守屋 俊夫

高工ネ研

現在、創業の標的ではあるが結晶化の難しい膜タンパク質や超分子複合体等、X 線結晶構造解析法の適用が困難な対象の立体構造を原子分解能で可視化する手法として最も広く利用されているのはクライオ電子顕微鏡単粒子解析法 (以下、クライオ電顕法) である。近年、国内でも最新鋭クライオ電子顕微鏡の導入やデータ測定の効率化と自動化が進み、現時点においてもクライオ電顕法の利用は急速に広まっている。しかし、短期間で取得される膨大なデータを処理する計算資源の確保が喫緊の課題になっている。同時に律速となったデータ解析の効率化と自動化を進めることも求められている。そこで我々は、測定から高分解能構造の決定をシームレスにつなぐために、クライオ電顕、測定者、解析計算、解析者を繋ぐ構造解析現場の IoT 化である GoToCloud 環境の構築に取り組んでいる。現在、On-the-fly の前処理を介して、IoT 化のハブとして無尽蔵の計算資源を提供するパブリッククラウドを代表する AWS ParallelCluster へ自動でデータを転送し、そこで全ての解析計算を行うことで、その工程の全てを一元的にモニターできる仕組み作りを行っている。将来的には測定者と解析者のノウハウを蓄積し、これらの構造解析経験データを利用する深層学習で解析工程の完全な自動化を行う計画である。本発表では、我々のこれまで行った GoToCloud 環境の構築、ベンチマークテスト、Streptavidin (EMPIAR-10641) の 1.0 Å 台の分解能構造決定から得られた知見、そして今後の展望を紹介する。

WS12-3

GraFix 法を用いた化学架橋による不安定なタンパク質複合体のクライオ電顕単粒子解析

○加藤 公児¹、長尾 遼¹、秋田 総理¹、宮崎 直幸²、沈 建仁¹¹ 岡大・異分野基礎研、² 筑波大・TARA

クライオ電子顕微鏡 (電顕) 単粒子解析法は X 線結晶構造解析法や NMR 法と並んで、生体高分子の立体構造を決定する手法として用いられる。特に NMR 法が適用できない大きなタンパク質複合体や結晶化が困難な不安定なタンパク質複合体にその威力を発揮している。これらの構造解析手法において、安定なタンパク質複合体の調整法の確立が構造決定の鍵となる。我々のグループが対象としている光化学系タンパク質複合体は、複数のサブユニットと数多くのコファクターで構成される複雑な膜タンパク質複合体であるため、安定な複合体の状態で調整することが困難な場合がある。最近、分子量が 1.4MDa の光化学系 I 四量体をスクロース密度勾配遠心法とグルタルアルデヒドによる化学架橋を組み合わせた GraFix 法により安定に調整し、クライオ電顕単粒子解析でその全体構造を 3.8 Å 分解能で決定した。本発表ではその GraFix 法の詳細を紹介する。

WS12-4

多様な試料の構造解析への対応に向けた、クライオ電子顕微鏡構造解析の実践

○横山 武司^{1,2}¹ 東北大・生命、² 東北大・INGEM

クライオ電子顕微鏡は、生体高分子複合体を、液体エタンなどの寒剤で浸漬凍結しガラス状の氷の膜に包埋し、透過型電子顕微鏡で直接観察する手法である。試料のもつ固有の性質の違いで凍結の際に振る舞いが異なり、構造解析に適切なデータ取得の達成が左右される。その為、多様な試料の固有の性質に対応した、グリッド凍結条件の探索が、高分解能構造解析において重要な要素の一つである。本発表では、試料凍結や構造解析の現場で経験を基に、グリッド作成条件の最適化の実践をご紹介します。具体的には、発表者が取り組んでいる、リボソーム複合体においてはカーボン薄膜を貼付したグリッドを用いるのが一般的であるが、その実際の様子を紹介する。また、東北大では 2021 年度に最新のクライオ専用の透過型電子顕微鏡 CRYO ARM 300 II の導入を行った。1 年程度の運用を通して経験した、最新の知見についてもご紹介する。

WS12-5

螺旋分子複合体の単粒子解析：フィロウイルス核タンパク質-RNA 複合体の構造解析を例に

○藤田 陽子^{1,2}、杉田 征彦^{2,3}、野田 岳志^{1,2}¹ 京大・院・生命、² 京大・医生物研、³ 京大・白眉センター

生体内には螺旋構造を形成する分子が数多く存在する。T4 ファージ尾部に始まり、電子顕微鏡法を用いてたくさんの螺旋構造が解析されてきた。ウイルスタンパク質には螺旋複合体を形成するものが多数ある。ヒトに対して高い病原性を示すフィロウイルス科のエボラウイルスやマールブルグウイルスは、螺旋状の核タンパク質-ゲノム RNA 複合体から構成される転写・複製複合体を形成する。核タンパク質-ゲノム RNA 複合体のような螺旋分子複合体の透過型電子顕微鏡像には、さまざまな方向のサブユニットが投影されている。そのため、螺旋の繰り返しパターンがわかれば、球形分子複合体の単粒子解析と比較して、決定すべきパラメータが大幅に減る。しかし、螺旋分子複合体の解析パイプラインは十分には整備されておらず、解析法に関する情報も少ない。本発表では、フィロウイルスの核タンパク質-RNA 複合体を例に、クライオ電子顕微鏡法を用いた螺旋分子複合体の単粒子解析法や、研究成果について紹介する。

WS12-6

柔軟なタンパク質の構造解析のための工夫

○岸川 淳一

阪大・蛋白研

クライオ電子顕微鏡を用いた単粒子解析は、直接電子検出カメラの開発や解析手法の発展により、いまや蛋白質の構造解析の第一選択肢となりつつある。単粒子解析では、タンパク質溶液を急速凍結して観察するため、タンパク質の結晶化を必要としない。そのため、これまで結晶化が困難であった膜タンパク質や巨大な複合体などの構造が単粒子解析により次々と明らかになっている。また、溶液中のタンパク質が複数の状態（構造）を持つ場合には、一度にそれらの構造を決定できる可能性がある。一方で、複数の状態があると、画像解析過程において分類がうまくいかない場合や、フレキシブルなドメイン（得てして機能に重要な場合が多い）の分解能が上がらない場合などがあり、それらの場合には解析上の工夫が必要となってくる。本発表では、発表者が実際に解析した新型コロナウイルスのスパイクタンパク質などを柔軟に動くタンパク質の例として、解析上の工夫などを紹介したい。主に使用した解析ソフトウェア CryoSPARC は、ユーザーフレンドリーな GUI を持ち、使いやす一方で、パラメーターが複雑で初学者には最適化が難しい。発表者の経験を踏まえ、CryoSPARC を用いるうえでの Tips や解析結果の見方なども共有したい。

WS13-1

Theoretical study of protein structure and function based on the solvation theory of biomolecules

○Norio Yoshida^{1,2}¹ Grad. School of Sci., Kyushu Univ., ² Grad. School of Info., Nagoya Univ.

Biomolecules play their role under the influence of water, ions, and cosolvents in a living system. In these systems, chemical and physical processes such as chemical reactions, self-organization, and molecular recognition occur continuously. To handle these systems in the field of computational science, a multiscale treatment is required because of the complexity of the system. For example, quantum chemistry is needed to describe the rearrangement of chemical bonds, and molecular dynamics is needed to describe the structural change of molecules. In particular, the solution environment is a system consisting of complex interactions involving an infinite number of molecules, and the theory of statistical mechanics is effective in describing the structure and properties of the solution environment. In this talk, recent developments of multiscale methods based on the solvation theory of molecular liquids for protein structure and function prediction will be presented.

WS13-2

流れによる物理的摂動が駆動するタンパク質のアミロイド線維化機構

○菅瀬 謙治¹、岩川 直都¹、今田 航輔¹、森本 大智¹、
ヴァリンダ エリック²¹ 京大・工、² 京大・医

生体内は、血流や細胞内の流れなどが存在する非平衡な環境である。従来、生体内の流れは単なる物質の輸送とみなされているが、流体力学の観点からすると狭い空間の流れには物質を歪ませる力が伴う。そのため、生体内のタンパク質も流れによる力学的な摂動を受けていることが想像される。実際に、神経細胞内と同等の流れがタンパク質をアミロイド線維化させるという報告もある。アミロイド線維化に関わるタンパク質・低分子・イオンなどは数多く同定されているが、どのような作用が積極的にタンパク質をアミロイド線維化させているのかは明らかでない。ここにおいて流れによる物理的摂動がアミロイド線維化に及ぼす影響に興味を持たれる。とはいえ、流れの中でタンパク質がどのように振る舞うのかはよく分かっていない。そもそも、アミロイド線維化過程の各ステップは元を辿れば全て原子レベルのイベントであるが、既存の装置では流れの中の分子を原子レベルで解析できない。このような背景のもと、私たちは試料内に流れを発生させながら NMR 測定ができる高感度 Rheo-NMR 装置を開発し、同装置をタンパク質のアミロイド線維化過程のリアルタイム計測に適用した。本発表ではタンパク質のアミロイド線維化過程をリアルタイムに計測した結果、および流れがアミロイド線維化の各ステップに及ぼす影響について発表する。

WS13-3

ラマンイメージングを用いた液液相分離・分子夾雑環境の定量

○中林 孝和

東北大院・薬

液液相分離 (LLPS) の研究において、ラマンイメージングを用いて、ラベルフリーで単一液滴の状態での LLPS 計測ができることを提案している。本発表では、fused in sarcoma などの神経変性疾患関連蛋白質の液滴の濃度定量、周囲の環境による濃度変化を紹介し、液滴の消滅過程、また液滴から凝集体への変化の機構について検討する。また LLPS も細胞内の分子夾雑環境の一つとみなすことができ、細胞内の水のラマン測定によって、分子夾雑環境を定量できることを紹介する。LLPS の定量では、液滴のラマンイメージングにおいて、同時に観測される水のラマンバンドを強度標準とすることで、高精度で濃度定量ができることを提案した。液滴内でタンパク質が 100 倍以上濃縮され、pH や塩濃度によって液滴内のタンパク質濃度が変化することを示した。液滴形成が不利なる条件に従って液滴内のタンパク質濃度が減少し、液滴内のタンパク質濃度がある閾値以下になると液滴が消滅するモデルを提案した。液滴融解に用いられるヘキササジオール (HD) の添加においても、HD の添加によって液滴内のタンパク質濃度が減少し、ある閾値以下になると液滴が消滅した。しかし、液滴を作る溶液のタンパク質濃度を増加させても、液滴内のタンパク質濃度は変化せず、溶液全体の濃度増加は、液滴の数や大きさによって補償されることがわかった。得られた結果は相図を用いて説明することができ、理論計算との対応も可能である。

WS13-4

TIA-1 プリオン様ドメインの ALS 関連変異は高度に凝縮した病原体構造を引き起こす

○関山 直孝¹、高場 圭章²、眞木 さおり²、赤木 謙一³、
大谷 寧子¹、今村 香代¹、寺川 剛¹、山下 恵太郎⁴、
米倉 功治²、児玉 高志¹、朽尾 豪人¹¹ 京大・理・生物物理、² 理研・放射光科学研究センター、³ 医薬基盤・健康・栄養研究所、⁴ MRC 分子生物学研究所

T-cell intracellular antigen-1 (TIA-1) は、プリオン様ドメイン (PLD) を介して自己組織化し、ストレス顆粒の形成に中心的な役割を果たしている。TIA-1 の PLD には、筋萎縮性側索硬化症 (ALS) やウェランダー遠位型ミオパシー (WDM) などの神経変性疾患に関連するアミノ酸変異が確認されている。しかし、これらの変異が PLD の自己組織化特性にどのような影響を与えるのかは未解明である。本研究では、これらの変異によって引き起こされる病原体構造を明らかにした。NMR 解析では、PLD の動的構造が 5 残基単位のアミノ酸の物理化学的特性によって相乗的に決定されることがわかった。また、分子動力学シミュレーションや 3 次元電子線結晶構造解析、生化学的実験を行った結果、WDM 変異の E384K は周辺領域の粘性性を減少させ、ALS 変異の P362L と A381T は β シート相互作用を誘発して自己組織化を促進することがわかった。これらの結果から、E384K は相分離による分子分配の異常を、P362L と A381T はアミロイド線維化の可能性を高めることで疾患の発症に関与していることが示唆された。

WS13-5

生きた細胞という反応容器内の蛋白質ダイナミクスを見る・操る

○中村 秀樹^{1,2}¹ 京大・白眉センター、² 京大・工・合成生物化学

蛋白質科学は、濃度やその他の溶液環境要因の精密な操作が可能で試験管内の実験結果を基に、構造変化や相分離を含む多様かつダイナミックな蛋白質の振る舞いを明らかにしてきた。一方で近年、生きた細胞の中という蛋白質にとって生理的な溶液環境は、多くの *in vitro* 実験条件とは大きく異なることが分かってきた。つまり生きた細胞内での蛋白質の振る舞いは、これまで主流であった実験条件での結果からでは理解しきれない可能性がある。この問題を解決するひとつの方法は、試験管内に生きた細胞内の溶液環境を忠実に再現するというものだが、現段階ではさまざまな技術的課題があり実現に至っていない。これら従来の方法論を補完するものとして今回提案するのが、生きた細胞そのものをいわば「動的な反応容器」として用いるアプローチである。この方法では、細胞内の溶液環境の再現という課題を自動的にクリアできる。反面大きな課題となるのが、濃度や溶液環境を操作するという *in vitro* 実験では当たり前の操作すら困難になるという実験的自由度の低さである。本演題では、この課題の克服に向けた試みとして、生きた細胞内の蛋白質を時空間的に「操る」実験系の開発についてご紹介する。まず、小分子化合物の添加や光刺激によって生きた細胞内の蛋白質の局所濃度や集合・分散過程を自在に「操る」技術について、先行研究の内容と当該分野の現状を概説する。さらに、これら技術の活用に向けた展望と残された課題を検証したい。

天然変性タンパク質の産生・凝集と神経変性疾患

○森 康治

阪大・医・精神医学

神経変性疾患とはアルツハイマー病、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症、前頭側頭葉変性症、脊髄小脳変性症、ハンチントン病など脳や脊髄に存在する神経細胞が緩徐進行性に障害され、神経細胞死により脱落していく病気の総称である。神経変性疾患はしばしば脳や脊髄において凝集・蓄積するタンパク質の種類によって分類される。特に家族内発症の見られる遺伝型の神経変性疾患では、蓄積タンパク質をコードする遺伝子自身や蓄積タンパク質の産生や代謝に関わるタンパク質をコードする遺伝子に疾患関連変異が見いだされることが多い。これらの蓄積タンパク質の元来の生理機能は必ずしも十分に明らかになっているわけではないが、少なくともその一部は天然変性タンパク質としての性質を持つことが明らかとなってきている。本講演では神経変性疾患を引き起こす遺伝子変異が天然変性タンパク質の性質に与える影響、さらには神経病理所見や臨床表現型（病気としての現れ方）との関連について最近の知見を概説し、考察したい。

一般口頭発表 発表要旨

Oral Session Abstract

01-01

レドックス依存的相分離制御の理解

○鈴木 琴乃^{1,2}、金村 進吾³、渡部 マイ²、稲葉 謙次^{1,4}、奥村 正樹^{1,2}¹ 東北大・生命、² 東北大・学際科学フロンティア研、³ 関学大・理、⁴ 東北大・多元研

オルガネラのひとつである小胞体には全タンパク質の約1/3が挿入され、小胞体に局在するシャペロンや酵素によってジスルフィド結合形成を伴った酸化のフォールディング触媒を受ける。これまでフォールディング補助因子として20種類以上ものProtein Disulfide Isomerase (PDI) ファミリー酵素の構造機能相関の理解が進んできたが、近年ではこれら補助因子のうちPDIや他のPDIファミリー酵素が自身の会合状態を変えることでフォールディング触媒空間を創出し、基質のフォールディング状態を制御する反応場を提供することがわかってきた。これら酵素群は自身のレドックス活性部位を酸化型・還元型と変調することで、基質の酸化のフォールディングを触媒出来る。最近、我々研究グループではPDIファミリー酵素群から生物学的相分離する相分離因子Aを発見した。本発表では、相分離因子Aの液滴機能が活性部位依存的に制御される機序について議論する。

01-02

インスリン分解酵素による基質インスリンの分解機構の理解

○倉持 円来¹、金村 進吾¹、古川 蘭¹、山口 宏¹、荒井 堅太²、李 映昊³、奥村 正樹⁴¹ 関学大・理工、² 東海大・理、³ 韓国基礎科学支援研究院、⁴ 東北大・学際科学フロンティア研

インスリン分解酵素 (IDE) は、インスリン、アミリン、グルカゴン、ブラジキニンなどを分解し、細胞内外のペプチドホルモン濃度を適切に制御している。IDEはこれら以外にもアミロイド原性ペプチドAβなど多種多様な基質を選択的に分解することが明らかになっており、生体の恒常性の維持に重要な働きをしている。しかし、IDEによる基質認識メカニズムは未だ不明である。そこで本研究ではIDEによる種々の基質分解実験を行い、そのメカニズムの解明を目指した。基質の選定には、IDEの基質認識ポケットに入ることが出来る分子量が7~8 kDaであることを考慮した。その結果、IDEによって分解される基質として新たなペプチドホルモンを見出し、インスリンの分解速度と同程度であることがわかった。またIDEによるブラジキニン分解はMichaelis-Menten equationに沿う一方で、IDEによるインスリン分解はMichaelis-Menten equationに従わない結果を示した。これはインスリン自体がIDEの分解に対する耐性を示す制御機構の存在を示唆している。当日は、IDEによる特異的な基質認識および分解メカニズムについて発表する。

01-03

酸化型ガレクチン1の分子構造基盤

○金村 進吾¹、岡田 莉奈¹、黒井 邦巧²、松崎 元紀³、齋尾 智英³、山口 宏¹、伊藤 大⁴、李 映昊⁵、中林 孝和⁶、稲葉 謙次⁷、奥村 正樹⁸¹ 関学大・理、² 神院大・薬、³ 徳大・先端酵素研、⁴ 大邱慶北科学技術大・脳認知科学、⁵ 韓国基礎科学支援研究院、⁶ 東北大・薬、⁷ 東北大・多元研、⁸ 東北大・学際研

ガレクチンは、細胞シグナル伝達、細胞接着、免疫、アポトーシス、神経保護、血管新生など、様々な生命現象に関与する糖結合性タンパク質であり、哺乳類では15種類のガレクチンが同定されている。ヒトガレクチン1 (hGal-1) は、分子量14.5 kDaの球状タンパク質であり、細胞質で合成された後細胞外に分泌され機能を発現する。hGal-1の特徴として6つのシステイン残基を有していることが挙げられ、これまでの研究から、hGal-1内の6つのシステイン残基の酸化還元状態と、それに応じた構造変化が機能調節に重要であることが示唆されてきた。還元状態にある還元型hGal-1は糖結合活性を保有することで細胞間接着等の機能を有す。一方、6つのシステイン残基が分子内で3本のジスルフィド結合を形成した酸化型hGal-1は、二次構造変化を伴って糖結合活性を失い、神経軸索の再生という全く異なる生理機能を発揮する。しかしながら、hGal-1の酸化型構造は未だ決定されておらず、酸化還元調節メカニズムは不明である。そこで本研究では各システイン残基の酸化還元反応性、酸化還元依存的な構造変化、酸化還元状態の生理学的意義、hGal-1の酸化還元依存的調節因子を探索した。当日は、これらhGal-1の酸化還元機能制御機構について議論を展開する。

01-04

演題取り下げ / Withdrawn

01-05

天然変性領域の局所構造が Sup35 の液 - 液相分離の環境応答性を決定する

○大橋 祐美子¹、西奈美 卓²、白木 賢太郎²、茶谷 絵理¹¹ 神戸大院・理、² 筑波大院・数理

細胞内では、液 - 液相分離によって形成される多数の液滴が形成・解離を繰り返しており、それらは一連の酵素反応の制御等、様々な役割を担っている。しかし液滴を構成する蛋白質には凝集しやすい配列的特徴を持つものが多く、そのため細胞内液滴は環境の変化に応答して必要な時に素早く形成し、任務を終えると素早く解離する事が求められる。しかしその鋭敏な環境応答性のメカニズムはほとんど明らかになっていない。

そこで我々は、出芽酵母 *S.cerevisiae* 由来の翻訳終止因子 Sup35 の N 末端天然変性領域 (Sup35NM) を用い、液滴形成の温度感受性の分子メカニズムの解明を試みた。Sup35NM の液滴形成は温度感受性が高く、狭い温度範囲で液滴量が急激に変化する。我々は、その温度感受性が N 末端側の N ドメインに由来することを見つけ、さらに N ドメインの局所構造を持つ領域が関与する事を発見した。そこで、N ドメイン局所構造領域に多く含まれるチロシンの半分をアラニンもしくはフェニルアラニンに置換したところ、どちらも温度感受性の低下が見られ、温度感受性にチロシン残基が深く関与する事が分かった。さらに、アラニン置換体は局所構造が壊れ、分子が広がっている様子が観察された事から、チロシン残基が集合しコンパクトになっている事が温度感受性の獲得に関わる事が示唆され、一方、フェニルアラニン置換体は局所構造を維持していたが、液滴のゲル化が急速に進行することで、温度変化に抵抗性を持つ事が示された。

01-07

Study on the difference in aggregation process between A β 40 and A β 42○Satoru G. Itoh^{1,2,3}, Maho Yagi-Utsumi^{1,2,3,4}, Koichi Kato^{1,2,3,4}, Hisashi Okumura^{1,2,3}¹IMS, ²ExCELLS, ³SOKENDAI, ⁴Nagoya City Univ.

Amyloid- β peptides (A β s) tend to form oligomers and amyloid fibrils, which are associated with the Alzheimer's disease. A β has two isoforms, A β 40 and A β 42, and the difference between these isoforms is only two additional C-terminal residues. However, A β 42 rapidly forms aggregates. To investigate the difference in aggregation process between A β 40 and A β 42, we performed the Hamiltonian replica-permutation molecular dynamics simulations for these A β s. Thioflavin T fluorescence experiments were also conducted to validate of the computational results. We will discuss the role of the two additional C-terminal residues in the aggregation process.

01-06

カチオンチャネルロドプシン C1C2 のチャネル開閉におけるレチナールの構造変化とプロトン移動の役割

○井上 圭一¹、柴田 桂成¹、小田 和正²、西澤 知宏²、挾間 優治¹、小野 稜平^{1,3}、濡木 理²、秋山 英文¹¹ 東大・物性研、² 東大・理・生物科学、³ 群馬大・理工・環境創生理工

チャネルロドプシン (ChR) は、Na⁺、H⁺、Ca²⁺ などを非特異的に輸送する光開閉式カチオンチャネルである。ChR は 7 本の膜貫通型ヘリックスと 7 番目のヘリックスのリジン残基に共有結合したレチナール発色団からなる。近年 ChR はオプトジェネティクスに広く用いられている一方で、そのチャネル開閉機構の詳細はいまだ明らかとなっていない。その中で最近、代表的な ChR の一つである C1C2 について、高精度 QM/MM 計算および時間分解シリアルフェムト秒 X 線結晶構造解析により、チャネルが開く直前にレチナール発色団の大きなねじれと横方向の移動が見出された。しかし、チャネル開口時におけるレチナールの構造変化や、開閉を制御する要因は不明なままである。

そこで今回我々は、ChR の開口時のレチナールの構造と、より詳細なチャネル開閉のダイナミクスを調べるため、C1C2 に対して時間分解共鳴 Raman 分光と、レーザーフラッシュフォトトリップ法およびレーザーパッチクランプ法による H₂O および D₂O 中での速度論的同位体効果 (KIE) の測定を行った。その結果、開口状態において最も大きなレチナールのねじれが起きることが、Raman スペクトルの水素面外変角振動モードの変化から明らかとなった。さらに、H₂O 中と比べ D₂O 中で、チャネル開口の速度は H/D 置換にほとんど依存しない一方で、チャネルの閉じる速度が約 3 倍遅くなったことから、タンパク質部分からレチナールへのプロトン移動がチャネルの閉口を駆動することが示された。

01-08

ペリプラズム分子シャペロン HdeA/HdeB の線維化反応における構造多様性

○溝端 知宏、東末 剛己、北崎 悠人、金岡 瞳、本郷 邦広、河田 康志

鳥取大

大腸菌のペリプラズムには 2 種類の分子シャペロン HdeA と HdeB が発現されており、両者は大腸菌が低 pH 環境に耐える能力に寄与している。共にサブユニット分子量 1 万未満の蛋白質である HdeA と HdeB は中性では分子シャペロン活性を持たない 2 量体を形成するが、低 pH 環境では自らが酸変性し、その酸変性構造を分子シャペロン機能に利用するという珍しい「環境応答性」の分子機構を活用する。我々は、この様に不安定な酸変性構造をペリプラズム蛋白質の構造保護に活用している HdeA と HdeB は同じ低 pH 条件でアミロイド線維に酷似した凝集体を形成することを見だし、比較研究を進めている。低 pH で形成される HdeA と HdeB の線維は pH や塩濃度などの溶液条件に敏感であり、線維構造の多様性を見せる。また、両者の線維化反応において大変興味深い特徴として「可逆性」、つまり酸性環境で形成される規則正しい HdeA/B の線維は溶液を中和するとほぼ瞬時に再可溶化することが挙げられる。ところが、より詳細に実験を進めた結果、HdeA と HdeB の双方において、線維構造の多様性と線維化反応の可逆性が溶液の条件に強く依存してその性質が変化する事が次第に明らかになった。本発表では、HdeA と HdeB の線維化反応における「pH 依存性」「可逆性」「線維の二次構造」に特に注目し、様々な溶液条件がこれらの特性を時には大きく変化させる様子を紹介し、それを裏付ける分子機構について考察を進める。

01-09

人工タンパク質 AF.2A1 はストレスをうけた抗体 IgG が普遍的の持つ重鎖 C 末端の局所的な変性構造を認識する

○宮房 孝光¹、渡邊 秀樹²、千賀 由佳子²、広田 潔憲²、
本田 真也²¹産総研・生物プロセス、²産総研・バイオメディカル

治療用抗体は多くのバイオ医薬品に応用されているが、高次構造の評価は品質管理上の大きな課題の一つである。我々は、非天然構造に変化した IgG を特異的に認識する人工タンパク質 AF.2A1 をこれまでに報告しているが、AF.2A1 が認識する“変性構造”を特定するには至っていない。本発表では、様々な種類の IgG や抗体フラグメントと AF.2A1 との結合アッセイの結果を踏まえて、AF.2A1 が認識する“変性構造”を描像する。

AF.2A1 は、ヒト、マウス、ラットの酸ストレスを受けた IgG を認識したが、ウサギは認識しなかった。ヒト IgG1 フラグメントを用いた結合アッセイから、C 末端の 5 残基を欠失させることによって結合界面が発生することがわかった。さらに点変異体解析により、Trp417 を中心とした露出した疎水性コアがホットスポットであることがわかった。これらの結果は、抗体の変性と凝集の初期に C 末端の構造変化が起こることを示したこれまでの研究と一致するものであり、AF.2A1 が変性抗体の持つ common sign を認識していることを示している。

01-10

Strong acids induce amyloid fibril formation of β_2 -microglobulin○ Keiichi Yamaguchi¹, Kenshiro Hasuo², Masatomo So²,
Kensuke Ikenaka³, Hideki Mochizuki³, Yuji Goto¹¹MEI, Osaka Univ., ²IPR, Osaka Univ., ³Grad. Sch. of Med., Osaka Univ.

Among known methodologies to dissolve preformed amyloid fibrils, acid treatment has been used with the expectation that the acids will degrade amyloid fibrils similar to acid inactivation of protein functions. Contrary to the expectation, treatment with strong acids, such as HCl or H₂SO₄, promoted amyloid fibril formation of β_2 -microglobulin (β_2 m) or insulin relative to the concentration of acid. A similar promotion was observed at pH 2.0 upon the addition of salts, such as NaCl or Na₂SO₄. Although trichloroacetic acid, another strong acid, promoted amyloid fibril formation of β_2 m, formic acid, a weak acid, did not, suggesting the dominant role of anions in promoting fibril formation. In addition, strong acids induced the conformational change of β_2 m from an unfolded to a molten globule conformation with an increase in the acid concentration. Comparison of the effects of acids and salts confirmed the critical role of anions, indicating that strong acids likely induce amyloid fibril formation via an anion-binding mechanism. The results suggest that although the addition of strong acids decreases pH, it is not useful for degrading amyloid fibrils, but rather induces or stabilizes amyloid fibrils.

02-01

FMODB データ収集：高分解能 X 線結晶構造データに対する量子化学計算

○渡邊 千鶴^{1,2}、神坂 紀久子¹、今井 恭平³、滝本 大地³、
斎藤 涼祐³、栗田 典之³、岡山 友樹⁴、宮嶋 起徳⁴、吉本 耀⁴、
原田 一真⁴、川下 理日人⁴、藤井 真靖⁵、森 義治⁵、田中 成典⁵、
本間 光貴¹、福澤 薫⁶¹理研 BDR、²JST さきがけ、³豊橋技科大、⁴近畿大、⁵神戸大シス情、⁶星薬科大

フラグメント分子軌道 (FMO) 法とは、生体高分子をアミノ酸残基やリガンド単位の小さなフラグメントに分割することで系全体の電子状態計算を高速かつ高精度で実行出来る手法である。フラグメント分割することにより、フラグメント間相互作用エネルギー (IFIE) を定量的に見積もることが出来る。特に、リガンド-タンパク質間や、タンパク質-タンパク質間の分子認識について、アミノ酸残基単位で解析することが出来るため構造解析や創薬の支援ツールとして利用されている。本研究グループでは、FMO データを創薬研究や構造生物学等に広く活用可能な環境構築を目的とした FMO データベース (FMODB) [<https://drugdesign.riken.jp/FMODB/>] の開発を行っている。FMODB では、PDB ID 等を用いたデータ検索、各エントリデータの FMO 計算結果一式のダウンロード、加えて Web インターフェース上で簡易的な IFIE 解析を行うことが可能である。本取り組みでは FMO と構造生物学の連携に向けた最初の取り組みとして、高分解能 X 線結晶構造データを中心に FMO データ収集を行った。高分解能データに対する妥当な構造モデリングの条件検討や、これまで FMO 計算で取り扱いの難しかった金属含有タンパク質についても Zn²⁺ や Mg²⁺ を含む計算事例の蓄積を行った。これらの取り組みの詳細と、高分解能データに対する IFIE 解析事例を紹介する予定である。

02-02

HSV ウィルステグメントタンパク質 VP16 に対する転写因子 PC4 の天然変性領域の結合メカニズムの検討

○謝 祺琳¹、中野 雄大¹、酒井 佑介¹、笠原 浩太²、肥後 順一³、
高橋 卓也²¹立命館大・院・生命、²立命館大・生命、³立命館大・総研機構

転写因子 PC4 は、転写や複製、DNA 修復などの細胞内プロセスにおいて多様な役割を果たす重要なタンパク質である。例えば、PC4 は、単純ヘルペスウイルス (HSV) のテグメントタンパク質である virion protein16 (VP16) と相互作用することで、RNA polymerase II を活性化させる。これまでに行われた NMR 測定より、PC4 の N 末端ドメイン (PC4ntd) の Lys-rich 領域が VP16 と直接相互作用することが示唆されている。しかし PC4ntd は生体内において常に揺れ動く天然変性領域であり、その分子機構は原子レベルでは明らかになっていない。そこで、本研究では効率的に位相空間をサンプリングできる独自の分子動力学シミュレーション (MD) 手法である Virtual-system coupled canonical MD (VcMD) 法を用いることで、PC4ntd と VP16 の相互作用およびその結合メカニズムを明らかにした。計算には PC4-VP16 の複合体、および PC4 の Lys-rich 領域変異体と VP16 の複合体の 2 つの系を用いた。その結果、PC4 の K-rich 領域が VP16 と直接的に相互作用する点においては先行研究と一致した結果が得られた。また、Lys-rich 領域変異体は野生型に比べて VP16 に対する結合率が低下した。一方で、PC4ntd は複数の準安定構造を取りながら VP16 と相互作用していた。いずれの構造においても複数の塩橋が認められ、いわゆる polyelectrostatic interaction と呼ばれる、不特定の荷電性残基のペアによる多価相互作用による分子認識であると考えられる。

02-03

拡張アンサンブル手法を用いた中分子シクロスポリン A と E の動的構造探索

○浴本 亨¹、伊藤 朱里¹、山根 努²、池口 満徳^{1,2}¹ 横浜市大・生命医、² 理研

免疫抑制剤として使われている中分子医薬品シクロスポリン A (CsA) は、非天然アミノ酸を含む 11 残基の環状ペプチド分子であり、大きな分子量にも関わらず、高い膜透過性を持つ。CsA は親水溶媒中と疎水溶媒中のそれぞれで適した、open 構造と closed 構造をダイナミックに変化させながら膜透過すると推定されているが、膜透過メカニズムの詳細は明らかではなく、膜透過性予測は困難である。また、CsA の代謝物シクロスポリン E (CsE) では、主鎖の N メチル基の有無だけの違いしかないにも関わらず、膜透過性が CsA と約 10 倍異なる。CsA と CsE の膜透過過程の動的構造が明らかにできれば、構造変化の詳細や、膜透過性を決定する要因に迫ることができると期待できる。本研究では、全原子膜水系を用い、CsA と CsE の膜透過中の動的構造を拡張アンサンブル手法によって探索する。

02-04

PaCS-MD/MSM 法を用いたキナーゼ複合体の結合速度論解析

○竹村 和浩、北尾 彰朗

東工大・生命理工

複合体の親和性を表す結合自由エネルギーや結合状態の持続時間を表す解離速度定数は、複合体を形成する蛋白質の理解や関連した創薬を設計する上で非常に有用な情報である。我々はこれまでに複数の蛋白質複合体の解離シミュレーションを、サンプリング手法の一つである PaCS-MD 法を用いて行ってきた。PaCS-MD 法は、比較的短時間の分子動力学計算を同時並列で実行、得られた構造からターゲットに近い構造を選択、それらを初期構造として分子動力学計算を再度行う、というサイクルを繰り返す手法で、外力を与えることなしに蛋白質の構造変化や蛋白質複合体の結合・解離を誘起する。PaCS-MD で生成したトラジェクトリを MSM で解析する PaCS-MD/MSM 法では、様々な蛋白質-蛋白質、蛋白質-リガンド、蛋白質-ペプチド複合体の解離シミュレーションに成功しており、蛋白質-ペプチド複合体では、結合自由エネルギーだけでなく、結合・解離速度定数の正確な評価にも成功している。本研究では、PaCS-MD/MSM 法を用いて、キナーゼ複合体の結合速度論解析を試みた。これまでに蛋白質-蛋白質、蛋白質-リガンドなど複数のキナーゼ-阻害剤複合体の解離シミュレーションを行い、結合自由エネルギーの正確な評価に成功している。現在、解離速度定数評価の精密化および蛋白質-ペプチド複合体の解析を行っている。

02-05

蛋白質-金属錯体コンポジット構造研究における実験と計算

○秋津 貴城¹、中根 大輔¹、北西 健一¹、海野 昌喜²¹ 東理大・理・化、² 茨城大・院理工

蛋白質-金属錯体コンポジット材料である人工金属蛋白質は、金属錯体の機能を蛋白質に付与することで、今までにない機能材料を創出できる可能性があり、注目を集めている。通常は複合した単結晶を実験的に得たりその構造解析を行ったりすることは困難であるため、物性測定や計算化学を援用した設計や考察を行うことが多い。この原因として、リガンドが金属錯体の場合には、蛋白質の残基に配位するか、分子間相互作用でドッキングするか、ドッキング・シミュレーションによる予測が困難とされることがあげられる。これまでに、CSD 等で結晶構造既知あるいは密度汎関数法 (DFT) 計算による最適化構造を金属錯体リガンドの立体構造として、PDB に報告されているあるいは AlphaFold2 等の予測プログラムによる構造を蛋白質の立体構造として、設計や考察を行ってきた。ところが、我々のグループでも実験的に結晶構造も得られ始めてきたので、計算の役割が実験の考察に広がつつある。そこで本発表では、蛋白質-金属錯体コンポジット材料のいくつかの組み合わせによる、これまでの研究を振り返り、金属錯体に起因する機能物性への蛋白質の寄与の仕方と、その際にとくに立体構造に着目した実験と計算の適合・不適合について、得られている知見や (化学者としての興味を中心に) 今後の展望を報告する。

02-06

分子動力学法による自己集合性ペプチドの配列最適化

○佐藤 宏哉¹、笠原 浩太²、今村 比呂志²、高橋 卓也²¹ 立命館大・院・生命、² 立命館大・生命

自己集合性ペプチドは高い生体適合性を持つことからバイオマテリアルの一種として有用であり、盛んに研究がなされている。我々はこれまでに独自の計算科学的手法により、 β シート様の自己集合構造を持つ 12 残基のペプチド (以下ペプチド A とする) を同定した。本研究ではペプチド A を基本として、分子動力学法によって各種変異体の安定性を評価し、配列の最適化を行う。ペプチド A に対して一残基ずつアラニン置換を行って 12 種類のペプチドを作成し、その二量体が安定な構造をとるために重要な部位を探索する。分子動力学法で得られた結果より二次構造傾向や原子間の接触頻度に基づき、自己集合性を評価した。その結果、9 番目の K を A に置換した K9A 変異体、12 番目の K を A に置換した K12A 変異体では、 β -sheet 構造が増加し、接触頻度も増加した。このことより、これら 2 つの K 残基は自己集合を抑制する効果をもっていると考えられる。一方で 7 番目の F を A に置換した F7A 変異体では β -sheet 構造が減少し、接触頻度も減少した。このことから F7 残基は自己集合を促進していることが分かった。今後さらに様々な残基への変異を検討し、自己集合性を高める配列最適化を行っていきたい。

02-07

分子動力学計算によるトリプトファン合成酵素におけるアロステリック機構の解明

○伊東 真吾、八木 清、杉田 有治

理研・杉田研

トリプトファン合成酵素 (TRPS) は2つの α/β -サブユニットからなる酵素で、L-トリプトファン (L-Trp) 合成を触媒する。 α -サブユニットでは、インドール-3-グリセロールリン酸 (IGP) より L-Trp 合成の反応物であるインドールを生成し、 β -サブユニットでは生成されたインドールと L-セリン (L-Ser) を用いて L-Trp を生成する。興味深いことに α -サブユニットにおける IGP の結合は、 β -サブユニットの構造とリガンド結合親和性に影響を与え、その結果 β -サブユニットの酵素反応を促進させる。TRPS のアロステリーは数十年に渡り研究されてきたが、アロステリーが原子レベルでどのように制御されているのかは解明されていない。我々は、TRPS に対する全原子古典分子動力学 (MD) シミュレーションにより、apo, IGP|E(Ain), IGP|E(A-A) 状態でのサブユニットの構造変化に沿った平均力ポテンシャル (PMF) を解析し、アロステリック機構を調べた。IGP の結合により、2つのサブユニットの界面にある α G181- β S178 などの水素結合ネットワークが変化し、これが刺激となつて β -サブユニットの活性部位が大きく開き、L-Ser が入る経路ができることが分かった。また、 β T110- β H115 と E(A-A) 間の水素結合が β -サブユニットの活性部位の閉鎖を安定化させることも分かった。TRPS のドメイン間水素結合ネットワークがリガンド結合により変化するという結果は実験データと一致している。本研究は、マルチドメインタンパク質のアロステリック制御に関する原子レベルの理解を深めるものである。

02-09

統計熱力学計算と進化分子工学を融合した GPCR 耐熱化置換体の構築手法の開発

○安田 賢司^{1,2,3}、菅谷 幹奈¹、佐藤 慎吾¹、藤木 祐美¹、陳 思思^{1,2}、林 智彦⁵、小笠原 諭^{1,2,3}、木下 正弘^{1,2,4}、村田 武士^{1,2,3}¹千葉大・院・理学、²膜タンパク質研究センター、³分子キラリティー研究センター、⁴京大・エネ理工、⁵新潟大・工学

G タンパク質共役型受容体 (GPCR) は重要な創薬標的であるが、安定性 (耐熱性) が低いことが機能・構造解析を阻害する主な要因となっている。先行研究で我々は立体構造情報に基づく統計熱力学計算による耐熱化置換体の理論的予測法を開発した。さらに GPCR にはその残基の置換により得られる置換体の多くが耐熱化すると予測されるアミノ酸残基 (不安定残基と呼ぶ) があることを発見し、実際に不安定残基の置換により複数の GPCR の耐熱化に成功した。一方で構造未知の GPCR では、天然構造モデルをホモロジーモデリング法で作成するため、良い構造モデルが作成できない場合に予測精度が低下することがあった。そこで本研究では理論的予測法と進化分子工学を融合することで、大幅に耐熱化する置換体を効率的に創出する手法の開発を行なった。本手法ではまず、構造モデルに対し理論的予測法により不安定残基を選定する。次に、不安定残基とその周辺残基数カ所を進化分子工学によりランダムに置換した、耐熱化の可能性の高い置換体ライブラリを作製する。最後に、大腸菌に発現させた各置換体を末端に融合した蛍光タンパク質の蛍光値によりスクリーニングし、大幅に耐熱化したものを選び出す。このようにして、不安定残基とその周辺残基の最適な組み合わせの耐熱化多置換体を獲得することができる。本研究では、ヒトセロトニン 2A 受容体を用いて開発した手法を検証し、最終的に野生型より耐熱性が 15 度以上向上した多置換体の獲得に成功した。

02-08

蛋白質の荷電性残基が液-液相分離に及ぼす影響に関する粗視化分子動力学法による検討

○栗木 裕次¹、笠原 浩太²、肥後 順一³、高橋 卓也²¹立命館大・院・生命、²立命館大・生命、³兵庫県立大・院・シミュレーション

ある種の天然変性タンパク質は液-液相分離 (Liquid-Liquid Phase Separation, LLPS) によって液滴を形成することが知られているが、その分子・原子レベルのメカニズムは謎に包まれている。これに対し、粗視化分子動力学法 (coarse-grained molecular dynamics; CG-MD) による LLPS のシミュレーションが試みられている。本研究では、タンパク質 FUS の低複雑性ドメインの一部 (39 番目から 96 番目) をモデルとし、これに荷電性残基であるグルタミン酸 3 残基を様々な分布で導入し、ペプチド 100 分子からなる系について CG-MD によって荷電性残基の分布と集合体形成の関係性を検討した。トラジェクトリから時間ごとの分子同士の接触頻度や、集合体のサイズを調べ、相転移を引き起こす条件の検討を行った。その結果、温度の上昇に伴う集合体の不安定化が観測された。また、野生型では相分離が見られない温度条件においても変異型では相分離が観測され、荷電性残基が少なく、また局在化している配列ほど高い安定性を示した。これらのことより、荷電性残基の量だけでなく配置が荷電性残基の分布が LLPS の安定性に大きく寄与し、天然の蛋白質では配列上におけるリン酸化部位の位置が LLPS の制御に重要であると考えられる。

02-10

静電相互作用計算を高速化した自由エネルギー摂動法の開発

○尾嶋 拓¹、杉田 有治^{1,2,3}¹理研・BDR、²理研・R-CCS、³理研・CPR

自由エネルギー摂動法 (Free-Energy Perturbation: FEP) はリガンドの結合親和性や水和自由エネルギーを高精度に予測できるため、インシリコ創薬において重要な手法となっている。従来の FEP 法では、静電相互作用計算で PME 法を用いた場合、高速フーリエ変換 (FFT) が余分に必要となるため、通常の分子動力学 (Molecular Dynamics: MD) 計算よりも計算コストが高くなる。そのため、計算できる薬剤候補の個数や系の大きさが制限されてしまう。計算コストを削減するため、本研究では部分電荷に非線形なスケールリングを導入した FEP 法を提案する。このスケールリングは REST2 法等で用いられているものと同等で、FFT の計算回数を抑えることで静電相互作用計算を高速化できる。非線形スケールリング FEP 法を MD 計算ソフト「GENESIS」に実装し、水和自由エネルギーやタンパク質-タンパク質結合親和性の予測に応用した。非線形スケールリング FEP 法は、従来の FEP 法と同等の予測精度があり、GPU を用いた場合には最大 35% 高速に計算できた。並列計算では系が大きくなるほど FFT が律速になるため、本手法は大きな生体系で特に有効になる。現在、FEP 法をスーパーコンピュータ「富岳」に向けて最適化しており、「富岳」を用いることで、これまで不可能であった大規模な系でも創薬応用計算が可能になると期待される。

02-11

AlphaFold と分子シミュレーションによる耐酸性カルシウムイオンバイオセンサーの合理デザイン○岡崎 圭一¹、酒井 伸弥²、松田 知己²、永井 健治²¹ 分子研、² 阪大・産研

生体内で様々なイオンや低分子化合物の動態を観測するために、蛍光タンパク質間フェルスター共鳴エネルギー移動 (FRET) を検出原理に用いたバイオセンサーが開発されてきた。これらのバイオセンサーは、一般的にエネルギー移動のドナーおよびアクセプターとなる蛍光タンパク質を検出ドメインで繋いだ構造をとっており、観測対象の動態変化に伴う検出ドメインの構造変化を FRET 効率の変化として可視化している。ただし、生理機能イメージングには、観測対象の変化レンジで大きな FRET 効率の変化を起こすことが求められる。従来のバイオセンサー開発では、蛍光タンパク質 - 検出ドメイン間のリンカー配列の改良や蛍光タンパク質への円順列変異導入が有効であることが経験的に知られているが、どのような組み合わせで大きな変化率を示すバイオセンサーができるのかについては、「作ってみなければ分からない」という大変効率の悪いものであった。そこで、我々は、AlphaFold と分子シミュレーションを用いた構造ベースの計算手法により FRET 効率の変化の大きいものの予測を行う合理的かつ迅速なデザイン法確立を目指した。このようなデザイン法の可能性を示すために、カルシウムイオンを結合するトロポニン C を検出ドメインとして耐酸性緑色蛍光タンパク質と赤色蛍光タンパク質を繋いだもののデザインと実験での検証を行ったところ、バイオセンサーとして機能しうるものがデザインされたことが分かった。

02-12

Gas-phase structural analysis using coarse-grained model: Application to H2A-H2B dimerKazumi Saikusa^{1,2}, Satoko Akashi², ○ Sotaro Fuchigami^{2,3}¹NMIJ, AIST, ²Grad. Sch. of Med. Life Sci., Yokohama City Univ.,³Grad. Sch. of Science, Kyoto Univ.

Ion mobility mass spectrometry (IM-MS) can separate ionized molecules by mass and ion mobility, which can be converted into collision cross-section (CCS). Using IM-MS and all-atom molecular dynamics simulation, we have performed structural characterization of proteins in the gas phase. In the case of proteins with intrinsically disordered regions, however, it is quite difficult to simulate their conformational behavior computationally. In this study, we focused on histone H2A-H2B dimer with flexible histone tails, which CCS distribution was experimentally observed to be bimodal. We performed coarse-grained molecular dynamics (CG-MD) simulations of H2A-H2B dimer by changing the strengths of hydrophobic interaction and excluded volume interaction using two different reference structures. For each of the obtained conformational ensembles, we estimated its CCS distribution and compared it with the experimental one. In consequence, we identified appropriate strengths of two kinds of interactions such that the estimated CCS distribution was almost identical to the experimental one. To our knowledge, this is the first successful report on the gas-phase structural characterization of proteins using CG-MD simulation.

03-01

アルギナーゼ阻害剤を加水分解するためアルギナーゼのフレームワークを用いた DcsB の触媒機構

○小田 康祐¹、的場 康幸²¹ 広大・医、² 安田女・薬

アルギナーゼは活性中心に二核マンガンクラスターを持ち、L-アルギニンを加水分解して、L-オルニチンとウレアを産生する。一方、DcsB は抗結核抗生物質 D-サイクロセリンの生合成に関与し、アルギナーゼと比較的高い相同性を示すが、アルギナーゼの阻害剤である *N*^ω-ヒドロキシ-L-アルギニン (L-NOHA) を加水分解して L-オルニチンとヒドロキシウレアを産生する。またアルギナーゼと異なり、DcsB は酵素反応過程で一般酸塩基として機能する His 残基をもたない。本研究では DcsB の触媒機構の解明を目指した。2-(S)-アミノ-6-ボロノヘキサン酸 (ABH) はアルギナーゼに結合すると、活性中心でホウ素原子がふたつのマンガニオンを架橋する水酸化物イオンから求核攻撃を受けて四面体誘導体が形成され、酵素反応中間体の構造を反映する。ABH と DcsB の複合体構造を X 線結晶構造解析より明らかにしたところ、二核マンガンクラスター付近で Asp210 と Glu241 が結晶化母液に含まれる Mg イオンをトラップしていた。酵素速度論的解析の結果、DcsB は中性とアルカリ性条件下で異なる触媒機構をもつことが示唆された。中性条件下では L-NOHA の大部分はプロトン化されており、これが DcsB に結合すると、Mg イオン結合サイトにヒドロニウムイオンがトラップされる。ヒドロニウムイオンは特殊酸として働くことで、L-NOHA の酵素反応中間体を崩壊させ、酵素反応を促進させると考えられる。

03-03

HNMT 阻害剤複合体構造解析のためのハイスループットな結晶構造解析スクリーニングシステム構築への取り組み

○五代 乃々花^{1,2}、坂井 直樹¹、松浦 晃明¹、上野 剛¹、吾郷 日出夫^{1,2}、竹下 浩平¹、山本 雅貴^{1,2}¹RIKEN SPring-8 Center, 生物系 BL 基盤 Gr.²兵庫県立大, 生体高分子動的構造

ヒスタミンメチルトランスフェラーゼ (HNMT) は S-アデノシルメチオニンからヒスタミンへのメチル基を転移することでヒスタミン代謝に関与する酵素である。近年では脳内における HNMT の働きがアルツハイマーや神経精神障害などに関わることが報告されている。本研究では HNMT を標的とした阻害剤探索に資する結晶構造解析手法として、複合体結晶化スクリーニング法や構造解析手順の確立を目指している。様々な化合物との複合体結晶化スクリーニングを行うためには、高収量な生産系の確立、高効率な化合物複合体結晶の作成手法の確立が望まれる。HNMT の阻害剤複合体結晶における既報の手法では大腸菌発現系で調製された HNMT は阻害剤非共存下では結晶が得られないため共結晶化により複合体結晶が作成されておりスループット性に欠ける。我々は HNMT の収量を約 8 倍に向上させ、さらに基質非共存下で結晶を得ることに成功した。得られた結晶に阻害剤であるジフェンヒドラミンを浸漬し複合体結晶を調製した。得られた結晶を BL32XU の自動測定により大量データを取得することで、その複合体結晶構造を決定することに成功した。本手法は既報の手法よりも迅速に HNMT と化合物複合体の構造決定が可能であり、ハイスループットな新規阻害剤探索を可能にした一例になると考えられる。

03-02

オンライン SEC ネイティブ質量分析の構築

○七種 和美、絹見 朋也、加藤 愛

産総研

ネイティブ質量分析は溶液中における相互作用を維持したままタンパク質やタンパク質複合体の質量を取得できる分析手法であり、これまでに大腸菌破砕液などの夾雑物存在下でのタンパク質複合体の分析が行えるようになっている。しかしながら、このような分析は主に手動で行われており、低分子医薬品のスクリーニングなどハイスループットな分析へ展開するためには分析の自動化が重要となる。そこで、本研究では、ネイティブ質量分析の自動化を目指し、サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) と組み合わせたオンラインネイティブ質量分析システムを構築した。構築したオンラインネイティブ質量分析は、ネイティブ質量分析に適した微量なエレクトロスプレーイオン化 (nanoESI) を可能にするため、SEC 分析後にフローズブリッターにより流量を減少させるシステムとした。シトクロム C (12 kDa) と C 反応性タンパク質 (5 量体, 125 kDa) を用いて SEC 分析や nanoESI におけるイオン化に最適な流速を検討し、それぞれの流量を 200 μ L/min、1 μ L/min に設定した。また、使用した SEC カラムの分画分子量は 10 kDa から 500 kDa であったため、12 kDa から 300 kDa の分子量を持つ 5 種類のタンパク質の混合液を分析し、いずれのタンパク質も良好な分解能で分析できることを確認した。また、本システムを用いてオンライン溶媒交換されたタンパク質の分析を行い、従来の手動でのネイティブ質量分析の結果と同等の構造安定性を保ったまま分析できることを明らかにした。

03-04

ペプチドヒスチジンブレニル基転移酵素による基質認識の構造基盤

○濱田 恵輔¹、Zhang Yuchen²、Nguyen Dinh Thanh²、井上 澄香²、佐竹 真幸²、小林 俊介¹、岡田 千佳子¹、岡田 正弘³、後藤 佑樹²、菅 裕明²、緒方 一博¹、仙石 徹¹¹ 横浜市・院医・生化学、² 東大・院理・化学、³ 神奈川大・工・物質生命化学

ペプチドは医薬品のリード化合物などへの利用面で優れた可能性を持つが、一般的に膜透過性や生体内での安定性が低いという欠点を持つ。一方、天然の生理活性ペプチドには膜透過性が高く、生体内での安定性が高いものが少なくない。その要因として、生理活性ペプチドには、多様な化学修飾が導入されており、その一つに様々なアミノ酸のプレニル化が挙げられる。これまでにプレニル化の標的として、Ser, Thr, Tyr, Trp, Arg が知られるが、最近、我々は His の 2 位炭素 (C2) に対して、プレニル基の 1 つであるゲラニル基を導入する新規ペプチドブレニル基転移酵素、LimF を見出した。生化学的解析により、LimF は比較的広い配列選択性をもつことが示唆され、プレニル化 His を含む新規生理活性ペプチド創出への応用が期待される。LimF によるプレニル化ペプチドライブラリー構築には、His 特異的な触媒機構や配列選択性の解明が不可欠である。

本研究では、LimF の基質認識の構造基盤を明らかにするため、LimF とプレニル基供与体アナログであるゲラニルチオニリン酸 (GSPP)、およびペプチドとの複合体の X 線結晶構造解析を 1.9 Å 分解能で行った。その結果、LimF は類縁酵素と同様のバレル構造を持ち、ペプチドと GSPP は共にバレル中央の孔に結合していた。ペプチドの His の側鎖は保存性の高い Glu と LimF 特有の His による水素結合により固定され、反応性の C2 と GSPP のゲラニル基の 1 位炭素は近接していた。また、標的 His 前後のアミノ酸配列の選択性についても構造面から検討を行った。

03-05

Activation of adenosine A_{2A} receptor by lipids revealed by NMR○ Takumi Ueda¹, Takuya Mizumura¹, Keita Kondo¹, Masatoshi Kurita¹, Yutaka Kofuku¹, Mei Natsume¹, Shunsuke Imai^{1,2}, Yutaro Shiraishi^{1,2}, Ichio Shimada^{1,2}¹Grad. Sch. Pharm. Sci. The Univ. of Tokyo, ²RIKEN BDR

The lipid composition of the plasma membrane is a key parameter in controlling signal transduction through G protein-coupled receptors (GPCRs). Adenosine A_{2A} receptor (A_{2A}AR) exists in the lipid bilayers of cells, containing acyl chains derived from docosahexaenoic acid (DHA). For the NMR analyses, we prepared A_{2A}AR in lipid bilayers of nanodiscs, containing DHA chains and other acyl chains. The DHA chains in nanodiscs positively modulated the signaling activity of A_{2A}AR. Our NMR analyses revealed that the DHA chains redistribute the multiple active conformations of A_{2A}AR toward conformations preferable for G protein binding. In these conformations, the rotational angle of the transmembrane helix 6 is similar to that in the A_{2A}AR-G protein complex, suggesting that the population shift of the equilibrium in the active state causes the positive modulation of A_{2A}AR signaling. These findings provide insights into the biofunctions of A_{2A}AR and the effects of lipids on various GPCR functions.

03-06

Cu/Zn スーパーオキシドディスムターゼにおける金属イオン結合機構に関するネイティブ質量分析による解析

明石 知子¹、田尻 道子¹、○古川 良明²¹横浜市大・生命医科、²慶應義塾大・理工

Cu/Zn スーパーオキシドディスムターゼ (SOD1) は、サブユニット当たり 1 本のジスルフィド結合が形成され 1 個ずつの Cu²⁺ および Zn²⁺ と結合して、ホモ 2 量体として機能することが分かっている。過剰量の Cu²⁺ や Zn²⁺ の存在下でも、それぞれの適切な場所に金属イオンが結合することから、機能発現に必須な金属イオンの結合順序や結合部位の厳密な制御が行われていると考えられる。制御機構に関する知見を得るために、非共有結合を保ったままタンパク質をイオン化し正確な質量決定が行えるネイティブ質量分析を用いて実験を行った。その結果、ジスルフィド結合が還元されていると Cu²⁺ の結合サイトに Zn²⁺ が結合することはないが、ジスルフィド結合の形成後には、SOD1 ホモ 2 量体に最大 5 個の Zn²⁺ が結合することがわかった。このことは、リボソームで合成された還元状態のポリペプチド鎖では、まず Zn²⁺ が本来の結合サイトに結合し、続いてジスルフィド結合の形成と Cu²⁺ の結合が起こることを示唆している。還元および酸化された状態の SOD1 に Cu²⁺ や Zn²⁺ を滴下し調製した試料について、ネイティブ質量分析で観測される質量変化を解析することで、ICP 質量分析など汎用的な無機分析法ではわからない、機能獲得に向けたタンパク質の状態変化を追跡することができた。

03-07

グルコシド配糖体をアクセプターとする新規糖転移酵素の機能構造相関

小林 海渡¹、清水 久佳¹、田中 信清¹、倉持 幸司¹、中井 博之²、○中島 将博¹、田口 速男¹¹東理大・応生、²新潟大・農

【目的】β-1,2- グルカン、グルコオリゴ糖は天然に存在するものの希少な糖鎖であり、そのためにこれらの糖鎖の合成や分解に関わる酵素に関する報告は少ない。近年、β-1,2-グルカンをエンド型で加水分解するβ-1,2- グルカナーゼ (SGL) が同定されたことでこの酵素群の解析が容易になった。本発表では、SGL 遺伝子の近傍に形成される遺伝子クラスター中より新規な糖転移反応を触媒する酵素 (グラム陰性菌 *Ignavibacterium album* 由来 IaSGT) を発見したこと、また、その立体構造と機能との相関を報告する。

【結果】大腸菌を宿主として組換え IaSGT を生産し、精製酵素を以降の解析に供した。IaSGT は TLC による解析ではβ-1,2- グルコオリゴ糖に対してグルコース単位を転移する活性を示したが、この基質に対するカイネティックパラメータは糖質関連酵素と考える値ではなかった。そこで、グルコシド配糖体をアクセプター、β-1,2- グルコ二糖をドナーとしたところ、糖質関連酵素として一般的な高活性を示したことから、この酵素の新規な反応を確定することができた。また、さまざまなグルコシド配糖体との複合体構造を決定したところ、アグリコン部分の結合部位が存在し、その部分の構造に複数のパターンがみられた。このことからアグリコンの結合部位の構造が柔軟に動くことで様々な配糖体を基質として許容できることが示唆された。

03-08

小角散乱及び中性子準弾性散乱による Hef-IDR の構造・ダイナミクス解析

○井上 倫太郎¹、小田 隆²、中川 洋³、富永 大輝⁴、川北 至信⁵、佐藤 衛⁶、杉山 正明¹¹京大、²立教大、³原研、⁴総合科学研究機構、⁵J-PARC MLF、⁶横浜市大

長らく、タンパク質が正常な機能を発現するためには、正しい 3 次元秩序構造を有することが必要不可欠と考えられてきた。しかしながら、30 年ほど前より機能的に活性な状態であるにも関わらずに、本質的に折り畳まれた構造を有さない天然変性タンパク質 (IDP) の存在が報告された。特に、IDP は生物学的に重要な役割 (機能) を果たしているため今現在も注目されている。その「本質的に無秩序」な性質を反映した非常に柔軟な構造を持っているが故に、既存の測定手法の適用が著しく制限されており未だ機能発現のメカニズム解明には未だ至っていない。このような状況を打開するため、その IDP の柔軟な構造及びその柔軟な構造の引き掛けとなりうるダイナミクス情報を直接抽出可能な溶液散乱法の適用が必須と考えた。そこで、我々は溶液小角 X 線散乱法に加えて、タンパク質の内部運動に由来する熱揺らぎとほぼ同程度のエネルギーを有する低速中性子をプローブとしたダイナミクス測定手法である準弾性中性子散乱法の併用により IDP の溶液中の構造・ダイナミクス解析を試みた。本発表では、特に古細菌由来のタンパク質 Hef の天然変性領域である Hef-IDR をサンプルとして用い、Hef-IDR の溶液中の内部運動の異質性の起源、溶液環境を変化させた場合階層構造の応答及び構造と内部運動の相関に関する議論を行う予定である。

03-09

AlphaFold2 を用いた複合体構造予測におけるドッキングについて

○長尾 悠大

明治大・理工・物理

タンパク質の立体構造予測については現在まで様々な研究がなされており、特に昨年に公開された AlphaFold2 はその予測精度の高さから構造生物学をはじめとした様々な分野での応用が期待されている。また、当初は単量体のタンパク質についてしか構造予測ができなかった AlphaFold2 であったが、現在は複合体構造予測も可能になっている。立体構造が未知のタンパク質について調べるときに AlphaFold2 を用いて得られた予測構造を使ってその構造を推測しようとする、当然得られた予測構造をそのまま鵜呑みにするのではなく、その構造から得られる情報をいかに読み取るかということが重要になってくる。特に、タンパク質間の相互作用が絡んでくる複合体の構造予測については、AlphaFold2 が当初から複合体をターゲットとして想定されていなかったこともあり、その予測精度はまちまちであるのが現状である。そのため、AlphaFold2 を用いて複合体構造予測を行う場合、予測構造から得られる情報を吟味する必要がある。現在、AlphaFold2 で複合体構造予測を行うと単量体同士のドッキングの可否について判定するのは難しい。AlphaFold2 による予測構造から得られる情報をもとに、ドッキング判定を可能にするためには構造が既知の複合体タンパク質をサンプルとして、ドッキングを判定する指標を作る必要がある。今回はそのようなドッキング判定に関する研究を行った。

04-01

Engineering the beta-sandwich domain 1 of a hyperthermophile for improved soluble expression for novel binding

○Chukwuebuka Maxwell Ononugbo, Masahide Nagao, Hidekazu Kishi, Noriko Yamano-Adachi, Yuichi Koga, Takeshi Omasa

Dept. of Biotech., Grad. Sch. Eng., Osaka Univ.

The beta-sandwich domain 1 of a thermostable protease islandisin (SD1), is a small, single-domain protein, with surface loops to generate binding to targets. A promising non-antibody binding scaffold expressible in *E. coli*. Its insoluble expression limits its use for binding applications. This study focuses on engineering SD1 for improved soluble expression in *E. coli*. We engineer SD1 by directed evolution and rational design. We applied the change in free energy calculations on foldx to analyze mutations on SD1. Tango was used to analyze the aggregation-prone regions (APR). Identified mutants were confirmed by SDS-PAGE. Two mutants (S17G and S17G/I89V) were identified on screening of SD1 variants. Mutations (Y15K, W18R, S106R) on SD1 surface residues and APR (S26K, Q91P) improved its soluble expression. The most stabilizing mutation (S26I) in silico, did not contribute to solubility. These are promising results for the continued engineering of SD1 for novel binding applications.

03-10

ネッタイシマカの脱皮ホルモン生合成制御因子 Noppera-bo に対する阻害剤の作用機序に関する構造生物学的研究

○海老原 佳奈¹、稲葉 和恵²、千田 美紀³、小祝 孝太郎³、高谷 大輔⁴、渡邊 千鶴⁴、安孫子 ユミ⁵、今村 理世⁶、岡部 隆義⁶、小島 宏建⁶、佐久間 知佐子⁷、嘉糠 洋陸⁷、藤川 雄太⁸、井上 英史⁸、本間 光貴⁴、千田 俊哉³、丹羽 隆介⁹¹筑波大・理工情報生命、²筑波大・生命環境、³高工ネ研・物構研・構造生物、⁴理化学研究所 生命機能科学研究センター 制御分子設計研究チーム、⁵筑波大・医学医療、⁶東大・創薬機構、⁷慈恵医大・熱帯医学、⁸東京薬大・生命科学、⁹筑波大・TARA センター

本研究は、感染症を媒介する蚊に選択的に作用する新規殺虫剤開発を目指す。蚊が媒介する感染症による死者は年間 70 万人にも上る。そのため、蚊を適切に駆除することは世界的に重要な課題である。現在、重篤な感染症を媒介するネッタイシマカ *Aedes aegypti* の駆除に用いられる殺虫剤に対して、抵抗性を示す系統の出現が確認されている。したがって、既存薬剤とは化学構造や標的が異なる、新規殺虫剤の開発が強く望まれる。この問題の解決に向けて我々は、昆虫の発生・成長に必須の脱皮ホルモンの生合成に着目し、ネッタイシマカにおけるこの過程を阻害する薬剤の同定を目指す。昆虫で脱皮ホルモン生合成に関わる必須酵素は複数ある中で、グルタチオン *S*-転移酵素に属する Noppera-bo (Nobo) に注目している。ショウジョウバエの nobo 機能欠損個体はいずれも発育不全で致死であり、これまでに同定された Nobo 阻害剤は、例外なく、113 番目の酸性アミノ酸残基と強い相互作用を形成する。興味深いことに、この酸性アミノ酸が nobo の内在性の機能にとって必須であり、このアミノ酸を置換したショウジョウバエは胚性致死となる。今回の発表では、ネッタイシマカ Nobo タンパク質と新規酵素活性阻害化合物の複合体の X 線結晶構造解析、およびこの阻害化合物によるネッタイシマカの成長阻害効果に関する検討結果を報告する。

04-02

残基特異的な熱力学・速度論解析が明らかにする nukacin ISK-1 の構造変換機構

○林 成一郎、神田 大輔

九大・生医研・構造生物

我々は黄色ブドウ球菌由来の抗菌性ペプチドである nukacin ISK-1 の NMR 解析を行ってきた。nukacin ISK-1 は溶液中でトポロジーの異なる 2 つの状態の平衡にある。NMR を用いて残基毎の平衡定数 K と交換速度 k を決定して、 $\log k$ vs $\log K$ プロットを作ると直線関係が存在した。データ点が一本のポリペプチド鎖の中の複数の残基に由来するという点で、従来には報告がなかった新しいタイプの自由エネルギー関係 (Linear Free Energy Relationship; LFER) である。我々は、この残基特異的 LFER はポリペプチド鎖がスムーズな構造変化を起こすための物理化学的基盤の表れであると考えている。さらに、タンパク質の変性状態から天然状態への折れ畳みにおいても成立すると想定している。残基特異的 LFER 関係を使うと構造変換の遷移状態に関する情報を得ることができる。そのためには観測方法や解析方法に由来するバイアスや測定誤差を最小限にする必要がある。NMR の実験手法である EXSY(exchange spectroscopy)を使う場合には、EXSY 解析法として Π 解析 (Structure 16:1195, 2008) と HSQC 測定法として HSQC0 スペクトル (JACS 133:1662, 2011) の組みあわせが有効である。nukacin ISK-1 について測定と解析の詳細と、精度の高い LFER プロットから得られた遷移状態に関する知見を報告する。

Comm Biol 1:150, 2018; J Phys Chem Lett 11:1934, 2020; ibid 12:10551, 2021

04-03

ヌクレオソーム DNA の配列依存的アンラッピングの FRET 解析

○角南 智子、河野 秀俊

量研機構・量子生命

ヌクレオソームは真核生物のクロマチンの最も基本的な構成要素で、約 150bp の DNA がヒストンたんぱく質に巻き付いている。我々は以前の研究において酵母転写開始点の +1 ヌクレオソームの塩基配列解析を行い、AA/TT 配列が entry サイトによく観察されることを見出した。更に、酵母と同じ塩基配列を持つ +1 ヌクレオソームを再構成し、AA/TT 配列が MNase によって切断されやすいことを見出した。本研究では、この分子メカニズムをより詳細に解明するために、ヌクレオソームの entry/exit サイトに連続する AA/TT 配列、もしくはそのコントロールとして TA 配列を導入したヌクレオソームを設計し、塩添加によるアンラッピングのしやすさを調べた。TCSPC 法を用いて FRET を測定し、DNA の末端と dyad 付近に導入した蛍光分子間の距離とその分布を解析した。その結果、TA 配列を有するヌクレオソームは塩添加による感受性が低く、500 mM の KCl を添加した辺りから徐々に剥がれていった。一方、AA/TT 配列を有するヌクレオソームでは 300mM 添加付近から急速に DNA が剥がれ始めた。更に、EtBr を加えたヌクレオソームの分解アッセイからも、TA 配列に比べて AA/TT 配列を有するヌクレオソームがより分解されやすいことが分かった。これらの結果から、entry サイトの AA/TT 配列はヌクレオソームの巻き付いた状態の安定性を低下させるため、entry サイト側からの DNA の解離が起こると考えられる。

04-05

液 - 液相分離会合体の分子取り込みと並進拡散運動に関する分子文法解析

○鎌形 清人¹、岩城 奈々子¹、Yaakov Levy²¹ 東北大・多元研、² ワイスマン研究所

液 - 液相分離の特徴は、ホスト分子のドロップレットにゲスト分子を取り込むこと、その内部でゲスト分子が流動的に動くことにある。ゲスト分子のどのような特徴が、取り込み度や流動性を決めているのであろうか？本研究では、一分子蛍光顕微鏡を用いて、様々なゲスト分子の並進運動性や取り込み度を解析し、それらの分子文法の解明を試みた。がん抑制タンパク質 p53 をホストとして、ドロップレットを形成させ、その内部に蛍光修飾ゲストタンパク質を取り込ませ、解析を行った。当日は、ゲスト分子の取り込み度や運動性を決めている因子に関して紹介する。また、この取り込み度や運動性の特性はホストタンパク質にどの程度影響を受けるかを調べるため、RNA 結合タンパク質 FUS をホストにした解析も行った。

04-04

顆粒球コロニー刺激因子の局所的に不規則変化した構造の探索

○渋谷 理紗^{1,2}、山守 優³、富井 健太郎^{2,3}、本田 真也^{1,2}¹ 産総研・バイオメディカル、² 東大・新領域・メディカル情報生命、³ 産総研・人工知能研究センター

グアニジン塩酸塩 (GdnHCl) や尿素等の化学変性剤は、タンパク質の溶解度を上げ、凝集性を下げる。しかし、顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF) は変性剤濃度が低い (1-2 M GdnHCl; GdnHCl 中間濃度) と、0 M GdnHCl (天然状態) や 4-5 M GdnHCl (変性状態) よりも凝集しやすくなることが分かっている。

GdnHCl 中間濃度存在下で G-CSF の Trp 由来蛍光スペクトルを測定すると、天然構造とも変性構造とも異なるスペクトルが得られる。このことから、G-CSF はこの条件下で中間構造を形成すると推定されている。凝集しやすい条件と中間構造が観察される条件がどちらも GdnHCl 中間濃度存在下であるため、G-CSF は中間構造により凝集しやすいと記述されてきた。一方で、GdnHCl 中間濃度存在下の二次構造や溶媒露出面積は天然構造と同様であると考えられている。その他の詳細な三次構造は不明であり、上記の特徴を満たすグローバルな構造をイメージすることは困難であった。

我々は、GdnHCl 中間濃度存在下における G-CSF の構造を原子レベルの分解能で明らかにすることを目的として、分子動力学計算と解析を行った。その結果、変性剤存在下で局所的に変化した構造が存在することが分かった。この構造が GdnHCl 中間濃度存在下の構造であると考えられる。しかし、この構造がタンパク質の凝集に強く関わるという物理的特徴は見られなかった。G-CSF の凝集反応は、局所的に変化した構造ではなく、低溶解度の変性構造が駆動していると考えられる。

04-06

Insertion loop-mediated folding propagation of Tk-subtilisin, which governs efficient maturation in high-temperature environments

○Shun-ichi Tanaka¹, Ryo Uehara²,
Nanako Dan³, Hiroshi Amesaka¹, Takuya Yoshizawa³,
Yuichi Koga⁴, Shigenori Kanaya⁴, Kazufumi Takano¹,
Hiroyoshi Matsumura³¹ Grad. Sch. of Life Env. Sci., Kyoto Pref. Univ.,² Aichi Cancer Center Res. Inst.,³ Dept. of Biotech., Fac. of Life Sci., Ritsumeikan Univ.,⁴ Dept. of Material & Life Sci., Grad. Sch. of Eng., Osaka Univ.

Hyperthermophilic Tk-subtilisin possesses three insertion loops (IS1-IS3) on its structure surface, as compared to its mesophilic counterparts. Although IS1 and IS2 are required for efficient maturation of Tk-subtilisin at high temperatures where the source organism grows, the role of IS3 remains unknown. Here, CD spectroscopy revealed that IS3 deletion arrested the Tk-subtilisin folding at an intermediate state, in which the central nucleus was formed; however, the subsequent folding propagation into terminal subdomains did not occur. Alanine-substitution of the aspartate residue in IS3 disturbed the intra-loop hydrogen-bonding network as evidenced by crystallographic analysis, resulting in a compromised folding at high temperatures. Based on these observations, together with the high conservation of IS3 across hyperthermophilic homologues, we propose that the presence of IS3 is important for folding of hyperthermophilic subtilisins under the high-temperature environments [1]. In this presentation, we also summarize what we have learned from the maturation mechanism of Tk-subtilisin, and discuss a mechanistic strategy for protein thermal adaptation.[1] Uehara R., et al. *FEBS Lett.* **595**, 452-461. (2021)

04-07

**Photoactive Yellow Protein における 52 位を酸性
アミノ酸残基に置換した時のプロトン化状態**○米澤 健人¹、山崎 洋一²、片岡 幹雄²、上久保 裕生^{1,2}¹ 奈良先端大・デジタルグリーンイノベーションセンター、² 奈良先端大・物質

Photoactive Yellow Protein(PYP) は発色団 pCA を蛋白質内部に有する水溶性の光センサー蛋白質である。我々は、結晶中において pCA と E46 との間の特殊な水素結合 (LBHB) の近傍で、電気的中性アルギニン (R52) の存在を明らかにしてきた。R52 は pCA - E46 間を通常の水素結合に変えることでプロトン化状態が変化することを見いだしてきた。アルギニンの pK_a は約 14 であり、水溶液中では電気的中性の状態を通常はとれない。R52 が置かれている環境に着目すると、結晶構造からクレフトの底に位置しており、部分的に溶媒の水へ露出が遮断されている。クレフト内の環境が側鎖の pK_a に作用していると考え、本研究では、52 位にアスパラギン酸を変異導入し、その pK_a を測定することで検証した。R52D の発色団の吸収スペクトルは野生型と異なり 2 峰性の形状を示した。さらに、pH 滴定によってこの吸収スペクトルは 2 状態的な転移を示し、その pK_a は 7.5 であった。このような p H 依存性はアスパラギン酸を導入したことによって生じた変化であることから、D52 のプロトン化状態にしたものであると推測される。水溶液中におけるアスパラギン酸の本来の pK_a は 3.8 であることから、D52 の pK_a は大きく値が増加していると考えられ、52 番目のアミノ酸が存在するクレフト内は疎水的環境であることが示唆された。

04-09

**Src Kinase inhibitor binding free energy
landscape sampled by Molecular-dynamics
simulations: effect of ligand size and flexibility**○Ai Shinobu¹, Suyong Re², Yuji Sugita¹¹RIKEN, ²NIBIOHN

Protein kinases (PKs) are enzymes which mediate signaling transduction in cells and their dysfunction can lead to disease, hence PKs are important drug targets. To design a selective PK inhibitor, we must elucidate the regulatory mechanism at the atomic level including the binding pathway, intermediate states, the thermodynamic relations between the various states, as well as (un)binding events and their kinetics. Molecular dynamics (MD) simulations are useful for obtaining information on dynamic processes. Here we used the two-dimensional replica exchange method gREST/REUS to characterize the binding mechanism of PKs with their inhibitors. We examined two c-Src competitive inhibitors, PP1 and Dasatinib. The latter is larger and size and flexible in shape. Our results show that the general shape of the free energy landscape is conserved for Dasatinib. In addition, we show that both ligands circle the protein extensively before entering the bound pose, forming conserved interactions with specific protein regions. The effect of the ligand shape and size is apparent during the crucial step in which the ligand enters the binding site, and here, we quantitatively characterize the differences between the smaller and the larger ligands.

04-08

**The Effect of Molecular Weight on the
Formation of Fibroin Precursor and Nanofiber**○Kok Sim Chan¹, Kento Yonezawa², Takehiro Sato³,
Yoichi Yamazaki¹, Sachiko Toma-Fukai¹,
Hironari Kamikubo^{1,2}¹Division of Materials Science, Graduate School of Science and Technology, Nara Institute of Science and Technology,²Center for Digital Green-innovation, Nara Institute of Science and Technology, ³Spiber Inc.

Fibroin is a structural protein that constitutes spider silk. We uncovered the existence of a precursor responsible for fibroin nanofiber formation. The nanofiber could be a significant component of natural spider silk. However, the detailed structural characteristics of fibroin precursors remain unclear. To reveal this, we prepared two fibroin precursors with different molecular weights, 50 kDa and 200 kDa, carried out Dynamic Light Scattering (DLS) and Atomic Force Microscopy (AFM) to compare the structure of their precursors and nanofibers. The precursor of 200 kDa fibroin was prepared by the same method as for 50 kDa fibroin, and it was confirmed that nanofiber elongation also occurs in the precursor of 200 kDa fibroin. The size of the 200kDa fibroin precursor obtained from DLS and AFM was similar to that of 50kDa fibroin, despite the molecular weight being four times larger. This result suggested the precursor model of 200kDa fibroin may have short stacking β -sheets as the core structure and a long-disordered region at the end. This presentation will discuss the structural characterization of these two fibroin precursors.

04-10

**夾雑環境における $\beta 2$ ミクログロブリン線維形成反
応と透析アミロイドーシス発症リスク**○中島 吉太郎¹、山口 圭一¹、山本 卓²、後藤 祐児¹¹ 阪大・国際医工、² 新潟大・医

透析アミロイドーシスは長期透析患者に特異的なアミロイドーシスで、 $\beta 2$ ミクログロブリンのアミロイド線維が組織に沈着することにより発症する。これまでの研究で血清中の $\beta 2$ ミクログロブリン濃度の上昇と透析歴の長さが透析アミロイドーシスの発症リスク因子であることが報告されているが、その他にも潜在的な発症リスク因子があることが示唆されている。そこで本研究では、透析治療によって引き起こされる血清環境の変動が $\beta 2$ ミクログロブリンのアミロイド線維形成に調査した。実験においては、透析患者を含む被験者より採取した、100 検体以上の血清検体を $\beta 2$ ミクログロブリン溶液に添加し、血清成分が存在する環境下での $\beta 2$ ミクログロブリンの線維形成反応を独自に開発した超音波アミロイドアッセイシステムを用いてを調査した。実験結果から、透析患者の特徴である血清アルブミンの濃度低下が $\beta 2$ ミクログロブリンの血清中におけるアミロイド線維形成を促進していることが明らかになった。また、得られた結果から過飽和依存的なアミロイド線維形成モデルに基づく透析アミロイドーシスの発症予測モデルを構築し、透析アミロイドーシスの発症年月に対する各リスク因子の影響を調査した。

05-01

インスリン製剤由来のアミロイド形成に重要な相互作用評価

○土江 祐介¹、森 若子¹、リンドグレン ミカエル²、
バーハラストロン³、岩屋 啓一⁴、永瀬 晃正⁵、座古 保¹¹ 愛大・理・化、² ノルウェー科学技術大、³ リンショーピン大、
⁴ 佐々木研究所、⁵ 東京医科大・茨城医療センター

糖尿病治療患者において、インスリン注射部位に形成されるインスリンポリマーが問題視されている。インスリンポリマーは局在化したインスリンアミロイドが主成分であり、周辺組織への細胞毒性による壊死などの症例が報告されている [1]。我々はこれまでに、インスリンポリマーにおけるアミロイドの構造及び毒性多型について報告してきた [2]。またヒト由来のインスリンについて、疎水性相互作用、静電相互作用がアミロイド形成に関与することを見出している [3]。しかしながら、糖尿病治療に用いられるインスリン製剤にはアミノ酸配列の変更や修飾基が加えられたものが存在し、アミロイド形成に重要な相互作用がヒトインスリンと異なる可能性がある。そこで本研究では、添加剤を用いて、インスリン製剤由来のアミロイド形成に重要な相互作用評価を行った。相互作用評価する添加剤として、疎水性相互作用を阻害する Arg および 1,6-HD を用いた。透析した 7 種類のインスリン製剤を、添加剤存在・非存在下でインキュベートした。その後、ThT 蛍光測定による凝集量評価を行った。1,6-HD 添加実験では、degludec、detemir、glulisine については、10% 1,6-HD 存在下においても蛍光の減少は小さかった。degludec と detemir は疎水性基が修飾されており、より強い疎水性相互作用によってアミロイド形成するためであると考えられる。Reference [1] Nagase, T. et al. Lancet, 373, 184 (2009) [2] Yuzu, K. et al. RSC Adv., 10, 37721 (2020) [3] Mori, W. et al. submitted

05-03

新規ヒドロキシクロロキン結合タンパク質の同定とその機能解析

○刈屋 佑美、今野 雅大、涌井 秀樹、尾高 雅文、松村 洋寿

秋田大・産学連携推進機構

全身性エリテマトーデス (SLE) は、多臓器が障害される慢性進行性の難治性自己免疫疾患である。SLE の標準治療薬、第一選択薬としてヒドロキシクロロキン (HCQ) が使用されているが、病状の進行と共に、HCQ 単剤だけで病勢をコントロールすることが不可能となることがほとんどである。また、HCQ の作用機序は複数提案されているものの、詳細は不明な点が多く、標的分子も未だ同定されていない。そこで、我々は HCQ の作用機序解明を目的として、HCQ を用いたアフィニティクロマトグラフィーにより新規標的タンパク質の探索を行い、複数の HCQ 結合タンパク質を同定した。標的タンパク質候補の 1 つ (HCQ 結合タンパク質 X) を大腸菌発現系で発現させ精製したところ、SDS-PAGE と Western blotting 解析により、目的タンパク質の単一精製が確認されたにも関わらず、UV-vis 吸収スペクトルでは、核酸に相当する 260 nm 付近に吸収ピークが観測され、核酸と HCQ 結合タンパク質 X の結合が示唆された。本発表では、HCQ 結合タンパク質 X が核酸結合タンパク質として機能することによって SLE の発症や進行に関与しているのではないかと仮定し、HCQ 結合タンパク質 X と核酸との相互作用解析や機能解析を行った結果を報告する。

05-02

病原細菌 MFS 型薬剤排出トランスポーターの輸送メカニズムの考察

○田辺 幹雄

高工ネ機構・物構研・構造生物

細菌染色体上には多剤排出輸送体 (MDR トランスポーター) の遺伝子が数多く存在し、抗菌薬等を細胞膜外に排出することで、細菌を様々な化合物に対して耐性化させる。MdfA はそのような MDR トランスポーターの一つであり、プロトンの輸送と共役して薬剤を輸送する。X 線結晶構造と生化学実験、分子動力学シミュレーションを組み合わせて、その薬剤輸送の分子メカニズムの詳細を検討する。またこの輸送体の共通性と特異性に着目し、MdfA と類似性を持つグラム陽性病原菌の MFS 型 MDR 輸送体に着目し、構造解析を通じ薬剤輸送機構の解明を目指す。現在開発が進められているこれらの阻害剤の機構についても発表したい。

05-04

氷と細胞の双方に結合するタンパク質の分子機能解析

○新井 達也¹、楊 越¹、津田 栄²、三尾 和弘³、佐々木 裕次^{1,3}¹ 東大・新創域、² 産総研、³ 産総研・東大オペランド OIL

不凍タンパク質 AFP (Antifreeze protein) は、氷結晶に結合してその成長を抑制する不凍機能と、細胞に結合してそれを非凍結低温下で保護する機能を有している。しかし、後者の細胞保護機能についての詳細な分子メカニズムは現在までに調べられていない。本研究では、3 種類の魚類由来 AFP を用いてヒト血液由来の細胞株 (CCRF-CEM) に対する非凍結細胞保護機能を網羅的に調べた。まず、CCRF-CEM を AFP (0-20mg/ml) の存在下で 4℃ に 24 時間保存し、細胞生存率を比較した。その結果、全ての AFP が濃度依存的に細胞の生存率を上昇させることが明らかになった。AFP の氷結晶結合部位に 1 アミノ酸変異を導入した結果、細胞保護機能が大きく変化した。これは AFP が氷結晶結合部位を介して細胞に結合していることを示唆している。一方、不凍活性と細胞保護活性には相関がないことが明らかになった。次に、AFP の細胞に対する結合の強さを調べるために、AFP 溶液にインキュベートした細胞を AFP を含まない溶液で低温保存を行った。その結果、AFP を含む溶液で保存した細胞と同等の生存率となった。この結果から、AFP は細胞に不可逆的に結合して細胞を保護することが明らかになった。更に、分子動態計測法である回折 X 線明減法を用いる事で、AFP が結合した細胞表面の運動性を測定した。その結果、AFP が細胞膜の流動性を上昇させることが示唆された。以上の結果より、AFP は氷結晶結合部位を介して細胞に不可逆的に結合し、膜の流動性を保つことで細胞を保護していると考えられる。

05-05

サンゴ由来レクチンの赤血球に対する活性の制御

○郷田 秀一郎^{1,2}、上村 亮介²、古賀 萌子²、外山 諒²、
海野 英昭²、畠山 智充²¹創価大・糖鎖研、²長崎大院・工

サンゴの一種であるハイマツミドリイシ (*Acropora millepora*) がもつ2つのレクチン (AML36, AML49) は、ナマコ的一种であるグミ (*Cucumaria echinata*) 由来溶血性レクチン CEL-III に高いアミノ酸配列相同性を示す。CEL-III は、カルシウム依存性レクチンで糖特異性はガラクトース/N-アセチルガラクトサミンである。赤血球表面の糖鎖を認識、結合し、膜中に孔を形成することによって溶血活性を示す。本研究で用いる AML36 及び 49 は、大腸菌を宿主に用いて N 末端に His-tag を付加した組換えタンパク質として生産した。大腸菌体内で封入体として得られたため、変性剤による可溶化と巻き戻しを行い、金属キレートアフィニティークロマトグラフィーで精製した。得られたタンパク質をウサギ赤血球と混合させたところ、AML36 では赤血球凝集活性が確認され、AML49 では赤血球凝集、溶血ともに活性は確認されなかった。このことは糖鎖を認識し、結合できるものの膜孔を形成できないことを示唆していた。AML36, 49 のアミノ酸配列は CEL-III に対して C 末端領域で延長が見られることから、C 末端の赤血球に対する活性への影響を解析した。そこで延長した C 末端を切除した変異体を作成し、活性測定を行った。その結果、C 末端を切除した AML36 変異体は、赤血球溶血活性を示した。この溶血活性はガラクトース・ラク トース・GalNAc によって阻害され、糖特異性は CEL-III と同じであった。これらのことから、C 末端部分が AML の機能に大きく影響を与えていると考えられた。

05-07

Raman fingerprints of N501Y spike protein with angiotensin-converting enzyme 2

○ Izabela Rzeznicka¹, Shinji Kajimoto²¹SIT, ²Tohoku Univ.

Diagnosis of SARS-CoV-2 infection is currently based on PCR and antigen tests. While the latter is quick, it has sensitivity and reliability issues. PCR overcomes these drawbacks but need for genetic material amplification and specific fluorescent probes make it lengthy and costly. Recently, it has been shown that it is possible to differentiate different viruses based on Raman spectra [1]. To enhance Raman signal, gold or silver nanoparticles are used which produce varying background signal. Here, we have been successful in recording Raman signal of individual spike (N501Y), ACE2 protein and their mixture in liquid using a small volume of proteins. The main differences in Raman signal of the proteins are found in the region between 1000 -1200 cm⁻¹ and 1500 -1750 cm⁻¹. In the Raman spectrum of a mixture, some bands around 1000 -1300 cm⁻¹ are suppressed and a new band appears. In the talk, we will discuss the assignment of the observed bands, based on the current understanding of spike protein interaction with ACE2. [1] Y.T. Yeh et al. PNAS 117, 895 (2020)

05-06

CHO 細胞における抗体凝集の生細胞イメージング

○千賀 由佳子¹、戸井 基道¹、鬼塚 正義²、本田 真也¹¹産総研・バイオメディカル、²徳島大・社産理工研究部

抗体医薬品の商業的利用の拡大に伴い、有効性と安全性の担保された医薬品の製造が求められている。しかし、抗体医薬品は、製造工程（細胞培養、精製、製剤化）中に劣化しやすく凝集形成が問題視されている。精製と製剤化工程における凝集体形成メカニズムや品質評価に関しては、様々な研究が行われているが、細胞培養工程における細胞内/細胞外凝集メカニズムは十分に理解されておらず、抗体凝集体を評価することは容易ではない。その理由は、培養液中には抗体分子以外にも様々な培地成分や宿主細胞由来のタンパク質が含まれており、そのような混雑状況下で抗体分子を特異的に評価することが困難であることが挙げられる。本研究では、この問題を解決するために、産総研で開発された抗体医薬品の非天然型立体構造を特異的に認識する人工タンパク質 AF.2A1 を活用した抗体産生 CHO 細胞内の抗体凝集体モニタリング法の開発に取り組んだ。蛍光標識 AF.2A1 を CHO 細胞に導入することで、細胞内における抗体凝集体を特異的に検出することに成功した。この技術により、細胞や培養上清などの未精製サンプルに含まれる抗体凝集体の分析と、細胞内抗体凝集体の長期モニタリングが可能になった。また、細胞内と細胞外の抗体凝集体量の相関を観察した結果、様々な培養条件下で細胞内 IgG 凝集体を推定できるだけでなく、凝集体が最初に細胞内に形成され、次いで分泌される可能性が高いことが示唆された。本研究結果は、抗体医薬品の品質管理/品質高度化への応用が期待される。

05-08

Reevaluation of intrinsically disordered regions of coronavirus proteins

○ Ming Yang¹, Kentaro Tomii^{1,2}¹CBMS, Grad Sch of Frontier Sci. The Univ. of Tokyo, ²AIST

The ongoing pandemic is caused by emerging contagious SARS-CoV-2 variants, and it is mutating continuously. It has shown that intrinsically disordered proteins/regions (IDPs/IDRs) are existing in all coronaviruses, and that major mutations are observed in IDRs of SARS-CoV-2 proteins. However, functions of those IDRs remain unclear. Thus, it is worthwhile investigating the relationship between differences of IDRs in viral proteins and the viral pathogenicity.

In this study we reevaluate IDRs of SARS-CoV-2 proteins, based on experimentally confirmed ORFs including unannotated ones, using a recognition method for IDRs with AlphaFold to obtain a closer estimate of those IDRs. A recent study showed that combining the residue surface accessibility in a structure model by AlphaFold and the pLDDT score calculated by AlphaFold can provide an accurate prediction of IDR, exceeding the performance of 11 traditional predictors on the DisProt-PDB datasets. Based on this study, we identify IDRs in SARS-CoV-2 proteins. In addition, we present sequence comparison and structure comparison results to estimate functions of identified IDRs among the related viruses. The results of our study will provide a basis for understanding the function of those IDRs.

05-09

抗体を用いた膜タンパク質の精製・機能解析システムの構築

○小笠原 諭^{1,2}、陳 思思^{1,2}、中川 史²、渋谷 南美²、濱口 紀江²、佐久間 一輝²、宮下 靖臣²、安田 賢司^{1,2}、村田 武士^{1,2}¹千葉大院・理・膜タン研セ、²千葉大院・理・生体構造化学

【緒言】 膜タンパク質は、シグナル伝達、物質輸送、生体エネルギー産生・変換などの細胞機能において基幹的な役割を果たし、創薬標的としても非常に重要である。精製タンパク質が立体構造解析や化合物スクリーニングに必要であるが、近年では、膜タンパク質のフォーマットとしてナノディスクの有用性が高まっている。膜タンパク質研究センターでは、独自のモノクローナル抗体を開発し、膜タンパク質の精製・機能解析システムを構築したので紹介したい。

【精製系の構築】 当研究センター独自の高親和性抗 His-tag モノクローナル抗体を樹立した。この抗体を固相化したレジンをを用いて、HEK 細胞を宿主に発現させたヒト由来膜タンパク質を、界面活性剤中での精製、およびナノディスクへ再構成する系を構築した。これまでに複数の標的分子について成功している。

【機能解析系の構築】 ナノディスクを構成する MSP (membrane scaffold protein) に対する高親和性モノクローナル抗体を樹立した。この抗体をビアコアのセンサーチップに固相化することで、MSP を用いて再構成したナノディスクをキャプチャーできることを複数種類の膜タンパク質において確認し、さらにリガンドとの親和性測定に成功している。

【まとめ】 当研究センターが樹立したモノクローナル抗体を用いてアフィニティ精製系と機能解析系を確立・最適化した。これら一連のシステムは膜タンパク質の構造解析・機能解析において非常に有用である。

05-10

遺伝子つなひき法による異常翻訳停滞タンパク質の毒性評価

○柳澤 厚樹¹、伊野部 智由²¹富山大院・医薬理工、²富山大・学術研究部（工学系）

近年、タンパク質の翻訳は一樣に進行するのではなく、しばしば翻訳の停滞も起こることがわかってきた。突然変異などの異常によりタンパク質の翻訳がリボソーム上で停滞した場合、細胞はそのような翻訳停滞を検知し、除去するリボソーム品質管理機構（RQC）を発動する。RQC では、リボソーム内に取り残された異常翻訳産物の分解誘導のために、C 末端へ Ala と Thr が連続した CAT-tail が付加される。この CAT-tail によってリボソームの外へ押し出された異常翻訳産物が、ユビキチン化を受けることでプロテアソームによる分解を受ける [1]。一方で、翻訳の一時停滞が細胞の機能調節に利用されている例も多数見つかっている。このように翻訳停滞は細胞にとって一概に有害とは言えず、どのような翻訳停滞が許容され、どのような翻訳停滞が有害であるのか不明である。そこで遺伝子つなひき法 (gTOW 法) を用いて [2]、翻訳停滞の毒性を定量的に評価した。特に RQC により処理される翻訳停滞産物の毒性に注目し、gTOW 法による毒性評価を行った。その結果、RQC により翻訳停滞産物に付加される CAT-tail が強い細胞毒性を持つことがわかった。本発表では上記実験結果の詳細と、CAT-tail の強い細胞毒性の分子基盤を調べた結果も報告する。

1. Kostova *et al.*, *Science*, 357, 414-417 (2017)2. Makanae *et al.*, *Genome Res.*, 23, 300-311 (2013)

06-01

筑波大学クライオ電子顕微鏡施設紹介

○原田 彩佳¹、千田 俊哉²、岩崎 憲治¹¹筑波大・TARA、²高エネ機構・物構研・構造生物学研究センター

クライオ電子顕微鏡による単粒子解析がタンパク質の原子モデルを得る方法として産学問わず世界的に普及している。我が国においても最新鋭のクライオ電子顕微鏡の追加導入整備が昨年度大規模に行われた。筑波大学生存ダイナミクス研究センターでは、CRYO ARMTM 200 および CRYO ARMTM 300 II が AMED の BINDS 事業の一環として 2021 年 12 月に導入された。静電シャッターや冷陰極電界放出型電子銃など最先端の機能を備えた本施設は、民間企業の創薬支援を主眼に据え、アカデミアと産業界双方の比率が同程度となるような運営を目的に導入された。TCEF (Tsukuba Cryo-EM Fleet) としての KEK-SBRC との連携はもちろんのこと、中性子回折測定の可能な J-PARC、そして製薬企業の研究所の集まるこの地にて化学を基盤とした創薬への貢献を目指している。今回は、X 線結晶構造解析出身者によるゼロからの施設導入の記録を紹介するとともに、CRYO ARM やそれに付随する Biacore などの周辺機器利用方法について紹介を行う。

06-02

X 線小角散乱プロファイルと粗視化分子動力学計算に基づく 4 ドメインタンパク質 ER-60 の構造研究

○清水 将裕、奥田 綾、守島 健、柚木 康弘、井上 倫太郎、佐藤 信浩、裏出 令子、杉山 正明

京大・複合研

X 線小角散乱測定からは、タンパク質の溶液構造に関する情報を得ることができる。しかしながら、小角散乱プロファイル自体の情報量は多くないために、タンパク質の原子解像度の溶液構造を直接決定することはできない。そこで、既知の結晶構造情報や分子動力学シミュレーションを統合した構造解析が重要である。本研究では、マルチドメインタンパク質である ER-60 を対象として、X 線小角散乱プロファイルに合致する分子構造を粗視化分子動力学計算を用いて生成する試みを行った。本発表では、それに基づき、ER-60 の可能な液中構造、及び構造ダイナミクスについて報告する。

06-03

残基特異的 LFER 関係を使って蛋白質分子の構造変化の遷移状態を観る

○神田 大輔¹、林 成一郎¹、藤波 大輔²¹ 九大・生医研・構造生物、² 静大院・薬食生命

我々は溶液中で2つの状態の平衡にある生理活性ペプチドを使って、残基特異的 LFER 関係 (linear free energy relationship) を発見した (J Phys Chem Lett 12:10551, 2021)。NMR を用いて残基毎の平衡定数 K と交換速度 k を決定して log-log プロットを作ると、データ点 ($\log K$, $\log k$) が直線上に並ぶ。この関係は一本のポリペプチド鎖を構成する複数の残基が構造変化の最中に協調関係にあることを示唆する。我々はこの協調現象はスムーズに構造変化するためにポリペプチド鎖が持つべき物理化学的性質の反映であると考え。残基特異的 LFER が一般の蛋白質に広く成立していることを示すために、過去の文献を探索し、残基毎の K や k の値の実験例を集めた。新たに log-log プロットをつくって検討すると、LFER 関係を 10 例程度見つけることができた。IDP ペプチドのターゲットへの結合や、蛋白質の構造揺らぎなどが含まれており、残基特異的 LFER は蛋白質が関与する多くの現象に成り立っている。アポミオグロビン折れ畳み中間体では LFER 関係から外れた残基が多数存在した。例外残基を立体構造上にマップすると2本の α ヘリックスの接触部位に集中した。興味深いことに、当該ヘリックスは折れ畳み途中で一過的に“ずれる”ことが同一グループの別の実験で既に示されている。蛋白質がスムーズな構造変化をする性質は残基特異的 LFER 関係として顕れる。これを利用すると蛋白質の状態変化に関して新しい情報を得ることが可能になる。

06-05

病原性細菌由来ジペプチジルペプチダーゼの S2 サブサイト特異性の構造的基盤

○中村 彰宏¹、阪本 泰光²、鈴木 義之¹、六本木 沙織³、志田 洋介¹、田中 信忠¹、小笠原 渉¹¹ 長岡技科大院・工、² 岩手医大・薬、³ 岩手医大・医、⁴ 北里大・薬

2050 年には薬剤耐性菌による感染症の死者が、がんによる死者を超える予想されている。ジペプチジルペプチダーゼ (DPP) 7 と DPP11 は Family-S46 ペプチダーゼに属し、タンパク質を栄養源とする一部の薬剤耐性菌の生育に重要なタンパク質分解酵素である。Family-S46 ペプチダーゼは哺乳類には存在しないため、本酵素群は抗菌薬の標的分子として期待されている。DPP7 と DPP11 の S1 サブサイトの特異性は明確に異なるため、S1 サブサイトを標的とした阻害化合物はどちらか一方の酵素のみを阻害する化合物となる可能性が高い。

本研究では多剤耐性日和見感染菌 *Stenotrophomonas maltophilia* 由来 DPP7 (SmDPP7) の S2 サブサイト特異性を生化学的、構造生物学的、物理化学的に解析した。生成物 (ジペプチド) を用いた阻害試験は SmDPP7 の S2 サブサイトにおいて疎水性アミノ酸に加えて例外的に親水性アミノ酸のアスパラギンへの特異性を示した。SmDPP7 と各種ジペプチドの共結晶構造解析および等温滴定型カロリーメトリによる結合熱の解析は、S2 サブサイトにおける Asn と疎水性アミノ酸の特異性が水素結合ネットワークおよび疎水性相互作用に起因することを明らかにした。この S2 サブサイト特異性は他の病原性細菌由来 DPP7 および DPP11 においても保存されていたため、本研究結果は DPP7 および DPP11 の両酵素群を阻害する Family-S46 ペプチダーゼに対するユニバーサルインヒビターの開発へつながる。

06-04

糖代謝制御の分子機構の解明に向けた代謝産物センサータンパク質の構造解析

○大志田 達也¹、加藤 龍一¹、戒能 賢太²、関谷 元博²¹ 高工ネ機構・物構研・構造生物、² 筑波大・医学医療

糖代謝は多様な経路によって制御されているが、転写抑制因子 C-terminal binding protein 2 (CtBP2) は転写因子 FOXO1 の働きを抑制することによって糖新生を制御することが示されている。これは糖代謝異常の代表とも言える糖尿病の治療のターゲットとなりうるが、その作用機序の分子機構は未解明である。そこで CtBP2 と FOXO1 の複合体の立体構造解析を行い、糖代謝制御系の分子機構を構造学的視点から解明することを目的とした。

複合体構造解析の第一歩として、まず CtBP2 単体の発現、精製及び結晶化を行った。N 末端に GST タグ及び HRV 3C 配列を付加したヒト由来 CtBP2 のコンストラクトを用いて、大腸菌での大量発現に成功した。GST アフィニティークラム、PreScission Protease 切断、陰イオン交換カラム、ゲルろ過カラムで、精製タンパク質を得た。これを用いて結晶化スクリーニングを行ったが、良質な結晶は得られなかった。そこで二次構造予測で disorder 領域と推定された N 及び C 末端部分を除去したコンストラクトを作成し、同様の手順で発現、精製及び結晶化スクリーニングを行った。条件検討の結果、0.1 mm x 0.1 mm x 0.2 mm の単結晶を獲得した。得られた結晶を用いて X 線回折実験を行い、PDB ID: 2OME をモデルにした分子置換法によって構造を決定した。解析の結果、CtBP2 は結晶中で四量体を形成しており、結晶化の際に加えていないものにも関わらず NAD が結合していた。現在、CtBP2 と FOXO1 の共結晶を得るための検討を進めている。

06-06

Uphill energy transfer mechanism for photosynthesis in the Antarctic alga

○Makiko Kosugi¹, Masato Kawasaki², Yutaka Shibata³, Kojiro Hara⁴, Shinichi Takaichi⁵, Naruhiko Adachi², Toshio Moriya², Yasuhiro Kamei⁶, Yasuhiro Kashino⁷, Hiroyuki Koike⁸, Toshiya Senda²¹ Astrobiology Center, NINS, ² The High Energy Accelerator Res. Org., ³ Dept. of Chem., Tohoku Univ., ⁴ Dept. of Biol. Product., Akita Prefect. Univ., ⁵ Dept. Molecul. Microbiol., Tokyo Univ. of Agricul., ⁶ NIBB, NINS, ⁷ Dept. of Life Sci., Univ. of Hyogo, ⁸ Dept. of Life Sci., Chuo Univ.

Prasiola crispa, an aerial green alga, forms large layered colonies under the severe terrestrial conditions of Antarctica. Our present analysis showed efficient photosynthesis activation with far-red light was achieved in the cells of *P. crispa*. The result suggested that *P. crispa* achieves effective photosynthesis by low energy far-red light for photosystem II excitation by uphill excitation energy transfer. Here, we identified a novel far-red light-harvesting complex of photosystem II in *P. crispa*, Pc-frLHC (*Prasiola crispa* far-red light-harvesting Chl-binding protein complex), and proposed a molecular mechanism of uphill excitation energy transfer based on its cryogenic electron-microscopy structure. Pc-frLHC forms a ring-shaped homo-undecamer in which all chlorophyll *a* molecules are energetically connected and contains chlorophyll *a* trimers. It seems that the trimers are long-wavelength-absorbing chlorophylls for far-red light at 708 nm. The chlorophyll network in the ring-shaped complex should enable a highly efficient entropy-driven uphill excitation energy transfer using far-red light.

06-07

KEK クライオ電顕施設の運用と現状について○安達 成彦、川崎 政人、守屋 俊夫、池田 聡人、山田 悠介、
篠田 晃、千田 俊哉

KEK・物構研・構造生物

高エネルギー加速器研究機構 (KEK) では、2018 年 3 月、AMED/BINDS の支援により 200kV クライオ電子顕微鏡 (Tallos Arctica G2, Falcon4) を導入した。2018 年 10 月以降は以下 3 点をミッションとし、共同利用型クライオ電顕として運用している。

- (1) アカデミア / 企業ユーザーへのマシンタイム提供
- (2) グリッド凍結 / データ測定の実支援 (必要に応じた単粒子解析の実支援)
- (3) クライオ電顕実験に関する技術導入の支援

(1) について、KEK ではマシンタイムのほぼ 100% (年間 200 日以上) を外部ユーザーに提供している。アカデミアユーザーは BINDS 経由、企業ユーザーは共同研究契約 / 学術指導契約などで受け入れを行なっている。(2) について、KEK ではマシンタイムの提供だけでなく、KEK スタッフが付き添う形でグリッド凍結支援や測定支援も行い、zoom によるリモート実験にも対応している。また、KEK の場合、解析環境の立ち上げが完了していないユーザーも多いため、単粒子解析の実支援も必要に応じて行なっている。(3) について、グリッド凍結 / 測定については 4 日間の初期トレーニングを、単粒子解析については 2 日間の初心者講習会を開催し、KEK スタッフとユーザーの比率を 8:2 → 6:4 → 5:5 → 4:6 → 2:8 などとなるように徐々に移行する形で技術導入を支援している。

2021 年度は、アカデミア 38 グループ (159 日)、企業 11 社 (65 日)、内部ユーザー (34 日) が利用した。2022 年 2 月までに、5 オングストローム以上のマップが 60 種類得られ、KEK ユーザーから 11 報の論文が報告されている。

06-09

Integrated approach to reveal protein structure in polydisperse solution with analytical ultracentrifugation and small-angle scattering○ Ken Morishima, Aya Okuda, Nobuhiro Sato,
Rintaro Inoue, Masahiro Shimizu, Yasuhiro Yunoki,
Reiko Urade, Masaaki Sugiyama

KURNS, Kyoto Univ.

Small-angle X-ray and neutron scatterings (SAXS and SANS; collectively called SAS) offer overwhelming opportunities for structural analysis of a protein in solution. To study a high-resolution 3D structure and/or its dynamics in solution with modern computational simulation, it is essential to obtain a precise SAS profile from only a target protein. Hence, a sample is generally purified to be monodisperse solution before SAS measurement. Nevertheless, non-specific oligomers, namely aggregates, often remain in the solution. Even if the weight fraction of aggregates is a few percent, the experimental SAS profile is deteriorated by the aggregates. As the result, an incorrect structural model is derived as the target protein: This is the fatal problem to obtain high quality structural model.

To overcome this problem, a new integrated analytical approach, "AUC-SAS", was developed with analytical ultracentrifugation (AUC) and SAS. AUC-SAS derives the SAS profile of a target protein from the deteriorated experimental profile using the information provided by AUC. This approach successfully derived the precise SAS profile for various proteins and provided advanced structural insight.

06-08

Hydration dynamics and structural correlation of protein model peptide : Analysis based on MD simulations○ Takuya Takahashi¹, Takuya Fujisawa², Shingo Nobunaga²,
Yui Nakamura², Ryutarou Inou², Kota Kasahara¹¹Coll. Life. Sci., Ritsumeikan Univ., ²Grad. Sch. Life Sci., Ritsumeikan Univ.

Hydrated water on the surface of biomolecules is related to its structure and function, and many studies show the difference in behavior from bulk water. Calculations show that the hydrated water is easy to move, and that the hydrated water in the disorder region is harder to move than in the order region even in rotational motion. In this study, we focus on the secondary structure that is universally found in the natural state of proteins, and theoretically elucidate the dynamics of hydrated water. Multiple peptides were selected as targets for the protein model. Specifically, we used polyglutamic acid whose charged state is changed, alanine-based peptides whose helix preservation is different depending on the sequence, and signoline, which is called the world's smallest protein, and is composed of 10 amino acid residues having a beta structure. Using these peptides as protein models, we will analyze the dynamics of hydrated water in different structures. Unlike proteins, peptides do not have large and stable hydrophobic nuclei, and all atoms are exposed to a large amount of solvent, so they can be expected to be a useful model for clarifying the effects of water on the structure of proteins in detail.

06-10

Rational Elucidation of the Structure and Function for the Weak Interaction in Protein through a Pseudoazurin Met16X Variants○ Takahide Yamaguchi¹, Attila Taborosi², Seiji Mori¹,
Takamitsu Kohzuma¹¹Grad. Sch. of Sci. and Eng., Ibaraki Univ.,²Research Initiative for Supra-Materials, Shinshu Univ.

The rational structural and computational studies of a blue copper protein, pseudoazurin (PAz) and its Met16X (X = Phe, Leu, Val, Ile) variants gave clear functional meanings of the Noncovalent Interaction (NCI) through the second coordination sphere. The high-resolution X-ray crystal structures of Met16X PAz demonstrated the active site geometry are significantly affected by the substitution of Met16, which located within the NCI distance from the His81 imidazole ring at the copper active site. The side chains of Met16Phe, Met16Leu, Met16Val, and Met16Ile PAz were also confirmed to be interacted with the His81 imidazole. The clear NCI of S- π /CH- π , π - π , double CH- π , and single CH- π were identified and the regulation of active site properties was demonstrated in the second coordination sphere of Wild Type, Met16Phe, Met16Leu, and Met16Ile PAz, respectively.

06-11

シアノバクテリア概日時計の pH 依存性

○宮本 正洋¹、北沢 創一郎²、北原 亮³¹立命館大・薬学研究科、²立命館大院・薬、³立命館大・薬

シアノバクテリアは概日リズムを示す最も単純な生物である。シアノバクテリアの生物時計は3種類のタンパク質 KaiA、KaiB、KaiC および ATP のみで構成され、KaiC のリン酸化・脱リン酸化が約 24 時間の概日リズムを示す。このリズムは *in vitro* で再構築できるため、生物時計研究のモデルとして扱われている。これまでに外的環境の観点では、概日リズムの周期長が温度変化の影響を受けにくいこと（温度補償性）、数百気圧の圧力で周期長が早くなることが報告されている。しかし、溶液条件については pH、添加物など条件が多様であり、未解明なことも多い。そこで本研究では、シアノバクテリアの KaiC 野生型の pH による周期長の変化および ATPase 活性について調べ、pH 変化が及ぼす影響を調べることを目的とした。pH 6.6 ~ 8.0 の範囲では、pH と周期長の間に正の相関関係が見られた。また、pH と ATPase 活性の間にも正の相関が確認できた。つまり pH 変化においては、周期長と ATPase 活性が正の相関を示し、KaiC 変異体や圧力実験で見られた周期長と ATPase 活性の負の相関と逆の結果となった。

06-12

1 μm 未満の結晶を利用したタンパク質結晶構造解析○平田 邦生¹、安部 聡²、小島 摩利子²、上野 隆史²、松浦 滉明¹、河野 能顕¹、坂井 直樹¹、山本 雅貴¹¹理研 RSC、²東工大・生命理工

タンパク質の結晶構造解析では利用できる X 線ビームの微小化と高強度化、X 線検出器の感度や読み出し速度の向上などにより、ミクロンサイズの結晶を用いた構造解析が実現した。大型放射光施設 SPring-8 のビームライン BL32XU においては、1~10 μm サイズの高強度マイクロビームを利用することにより種々の解析困難な結晶構造解析を実現してきた。最近になり 1 μm 未満のサイズの結晶を利用した高分解能構造解析が実現した。無細胞タンパク質合成手法を用いた結晶化した多角体タンパク質は走査顕微鏡（SEM）により平均サイズが 0.58 μm のキュービク状の結晶を与えた。BL32XU の光学系を微小結晶に最適化した「ハイパーフォーカスモード」（1 μm 角 1012 光子/秒）に切り替え、高速 SSROX（Serial Synchrotron Rotation Crystallography）を利用したデータ収集を行った。SSROX 法は無数に微小結晶がのった試料ホルダを回転させながら X 線で走査しつつ、1 結晶 1 枚の回折像を取得する従来法とは一線を画した測定法の一つと言える。解析した結果、1 μm に満たないサイズの結晶から分解能 2.5 Å の構造決定に成功した。この実験結果は光学顕微鏡で見えないレベルの微小結晶からタンパク質結晶構造解析ができる可能性を示唆している。発表では実験や解析の詳細、微小結晶構造解析の今後の展望について議論したい。

07-01

転写因子 Ets1 天然変性領域を模倣する生理活性化化合物の探索

○福山 晴輝¹、笠原 浩太²、高橋 卓也²¹立命館大・生命、²立命館大・生命

がんの浸潤・転移に関与する Ets1 では天然変性領域に存在する Ser282, Ser285 がリン酸化されると、DNA 結合が自己抑制される。このときリン酸化によって天然変性領域の構造が変化し、DNA 認識ヘリックスの Arg394 と Arg391 にリン酸化セリンが結合すると考えられている。この機構をリン酸化ラッチ機構と呼び、またリン酸化部位を含む結合領域をラッチセグメントと呼ぶ。本研究ではラッチセグメントを模倣して Ets1 コアドメインと結合する低分子化合物の探索を目的とする。データセットに含まれる 5,434,894 個のリガンドから負電荷を持ちかつ、ラッチセグメントとの構造類似度が高い順に 20 個リガンドを絞り込み、Autodock によりドッキングを行った。すると、Arg391 と Arg394 の間に入り、相互作用するリガンドが 2 つ見つかった。一方のリガンドは Arg394 と 2 つの水素結合を形成し、他方のリガンドは Arg391 と塩橋を形成し、Arg394 とは 3 つの水素結合を形成していた。先行研究ではラッチセグメントは Tyr395 と π - π 相互作用していたが、本研究では Tyr397 が各リガンドの芳香環と π - π 相互作用していた。ラッチセグメントの結合様式と高い類似度が認められ、活性を示すと期待される。一方、ドッキング計算の予測精度は一般に高いとは言えないため、さらなる検証が必要である。本研究では PDB の統計情報に基づき、ドッキング構造の検証を行う新規方法論の開発も実施した。本手法により Ets1 表面に相互作用ホットスポットを調べた。今後、これを用いてさらなる検証を行っていく。

07-02

Study of protein design principles using a novel hybrid-scale simulation

○Hiromitsu Shimoyama, Yasushige Shigeta

CCS, Univ. Tsukuba

In recent years, DPP4 has been a major target in diabetic drug therapy; DPP4 is a serine protease and inhibition of this activity can alleviate the symptoms of diabetes. When simulating a protein, it is necessary to model the protein. Some models have high resolution, others have low resolution. In this study, the DPP4-inhibitor complex was simulated using a hybrid model that simultaneously uses the all-atom model (AAM) and the CaGo-like model, one kind of coarse-grained model (CGM). The results show that not only the hydrogen bonds of serine but also the hydrophobic core in the vicinity contribute to the serine protease activity of DPP4.

07-03

混合正規分布モデルを用いた電顕単粒子解析の3次元再構成

○川端 猛^{1,2}¹ 蛋白質研究奨励会、² 阪大院・生命機能

近年のクライオ電子顕微鏡の単粒子解析では近原子分解能の3Dマップが得られることもめずらしくない。しかし、良質な粒子2D画像数が不足した場合、妥当な初期3Dマップが得られず、引き続き精密化を行っても分解能が改善しないことがある。本研究では、比較的少ない枚数の画像から粗い分解能の初期3Dマップを得ることを目指し、混合正規分布モデル (Gaussian Mixture Model; GMM) を使った2D画像群からの3Dマップの再構成法の開発を試みたので報告する。Scheres ら (Nature Methods, 4, 27, 2007) が提案した実空間での基底関数群の最尤法の理論を用いる。Scheres らは基底としてプロブ関数 (一般化 Kaiser-Bessel 窓関数) をボックスの数だけ用いていた。一方、本研究では、数十個の3Dガウス関数を基底として採用し、重みだけでなく各ガウス関数の位置と向きも反復的に修正することで、より少ないパラメータ・計算量で初期マップに十分な分解能のマップを生成することを狙う。原子モデルから生成した擬似投影2D画像群による数値実験を行ったところ、元の3D密度マップに近いGMMを求めることができた。今後は、より実際の電顕2D画像群に近い条件での性能試験、再構成に必要な2D画像数の検討、複数モデルや柔軟性を持ったモデルへの対応、蛋白質らしさのブライアーについて検討していきたいと考えている。

07-05

特微量自動生成による GPCR 間相互作用ペア予測器の精度改善

○福島 碧唯¹、照瀬 裕章²、島村 幸稀英¹、藤 博幸²、根本 航¹¹ 東京電機大・理工、² 関学大・理工

Gタンパク質共役型受容体 (GPCR) は7回膜貫通領域を共通の構造モチーフとして持つタンパク質ファミリーであり、シグナル伝達に関与する。細胞膜上で GPCR 同士が相互作用することにより、GPCR 単量体の場合とは異なるシグナルを伝達することが報告されている。GPCR は承認済み医薬品の約35%が標的としており、GPCR 同士の相互作用も疾患の治療標的となる可能性がある。GPCR をコードする遺伝子はヒトゲノム中に存在する遺伝子の約4%を占めており、二量体のみを考えても組み合わせ数は膨大であり、網羅的実験にて GPCR 同士の相互作用可否を確認することは困難である。そこで、我々は以前に、Support Vector Machine (SVM) を用い GPCR 間相互作用ペア予測手法、GPCR-GPCR interacting pair predictor (GGIP) を開発した [1]。GGIP では、GPCR のアミノ酸配列と立体構造の特徴を定量化した特徴量と、GPCR ペアが相互作用するか否かの対応関係を学習させることで予測器を構築した。GGIP はウェブ上で利用可能である [2]。照瀬らは、以前に SVM に用いる特徴量の生成に Auto Encoder (AE) を利用すると、GGIP の精度が向上することを示した。その際、AE にアミノ酸配列と立体構造情報を入力し、次元数が最小となる中間層を抽出することで特徴量とした。本研究では、AE を適用するとともに、特徴量生成に利用する立体構造のコンフォーメーションの違いが予測精度に影響を及ぼすかどうかの検証を行った。

[1] Proteins vol.84,9(2016)1224-33

[2] <https://protein.b.dendai.ac.jp/GGIP/>

07-04

放線菌多世代変異株におけるミスセンス変異の影響予測

○大浦 弘貴¹、林 映里¹、木村 優斗¹、野村 祐介¹、中村 聡子²、柏木 紀賢²、荻野 千秋²、廣瀬 修一³、根本 航¹¹ 東京電機大・理工、² 神戸大院・工学、³ 長瀬産業株式会社・長瀬 R&D センター

我々は以前 *S.lividans* 1326 株へランダムに変異を導入し PLA2 生産量を指標にスクリーニングを行った。スクリーニングによって選択された株の PLA2 生産量をさらに向上させるために、再度ランダムに変異を導入した後、再度スクリーニングを行った。この操作を繰り返し、PLA2 を高生産する変異株を10世代に渡り作成した。ランダムに導入された変異のうち PLA2 高生産に寄与する変異の同定を試みたが導入された変異数が多く困難であった。コーディング領域に導入された変異について Gene Ontology (GO)、KEGG pathway そして STRING のデータベースを用いて解析を行なった。その結果、第1世代から第5世代、第6世代と第7世代、第8世代から第10世代の3つの時期で変異遺伝子の GO タームは互いに類似していた。また、いくつかの代謝経路上への変異の集積が統計的に有意であった。さらに、タンパク質間相互作用ネットワーク上で、任意の世代で変異が導入されたノードの1次近傍のノードに、次の世代で変異が導入される傾向にあった。しかし、タンパク質内のどのような領域にどのような変異が導入され、機能にどのような影響を及ぼしているか理解できていない。そこで本研究では InterProScan、DeMaSk 及び AlphaFold2 を用いて変異導入サイトがどのような領域に属し、タンパク質機能にどのような影響を及ぼすか予測し、PLA2 高生産に寄与した変異の理解を試みた。

07-06

How EGCG perturbs the interaction between MDM2 and N-terminal domain of p53

○Duy Phuoc Tran, Akio Kitao

Sch. Life Sci. Tech, Tokyo Tech

p53 is tumor suppressor protein and the interactions of its N terminal domain (NTD-p53) with MDM2 protein is in interest due to strongly related to cancer. Recently, experimental evidence shows that EGCG directly perturbs the MDM2/p53 complex [Nature Communications 2021 12, 1 (2021)], but atomic mechanism of this perturbation has not been fully understood. Here we performed the molecular dynamics simulation of MDM2/NTD-p53 in the EGCG high concentration environment to mimic the disruption of the interactions. We found that not only the direct perturbation in binding interface but also the allosteric pockets binding interfere the stability of the complex.

07-07

リボソーム翻訳開始前複合体と tRNA との相互作用におけるリボソームタンパク質の役割

○森 義治、田中 成典

神戸大院・シス情

タンパク質合成過程の翻訳開始段階においては、正確なタンパク質合成の開始を行うために翻訳開始前複合体が形成される。この複合体は tRNA を選択的に結合できるようにすることがその役割のひとつであると考えられている。また正確な tRNA の結合のためにはリボソームを構成するリボソームタンパク質のいくつかが積極的に関与していることが示唆されている。本研究においては、このような諸因子の役割を分子シミュレーションにより分子論的に解明することを目的とした。

本研究ではリボソーム翻訳開始前複合体を計算対象とした。この複合体はリボソーム小サブユニット、mRNA 1 分子、開始 tRNA 1 分子、および開始因子タンパク質から構成されている。リボソームタンパク質の存在が開始 tRNA の結合に関する安定性に対してどのように寄与しているかを理解するために、粗視化分子動力学シミュレーションを実行し tRNA 解離の自由エネルギー地形を計算した。さらにこのときのリボソーム・RNA 複合体の構造を解析することにより、リボソームタンパク質がリボソームにおける正確な開始 tRNA の認識にどのように関係しているかを解析した。

リボソーム系において tRNA の結合がほぼ完結した状態では tRNA 結合状態が安定であり、解離するための活性化障壁は高くなっていた。一方で tRNA 結合完結途中の状態では tRNA 結合状態と解離状態の自由エネルギー差が小さく、解離しやすいことが分かった。このような安定性の違いについてリボソームタンパク質などとの相互作用の関連を議論する。

07-09

Global analysis of heme proteins suggests the regulation of heme distortion by protein environment

○Hiroko X. Kondo¹, Hiroyuki Iizuka², Gen Masumoto³, Yusuke Kanematsu⁴, Yu Takano⁵¹Fac. of Eng., Kitami Inst. of Tech., ²Grad. Sch. Info. Sci., Hokkaido Univ.,³ISD, RIKEN, ⁴Grad. Sch. Info. Sci., Hiroshima Univ.,⁵Grad. Sch. Info. Sci., Hiroshima City Univ.

Heme is the active site of proteins and has diverse biological functions, such as electron transfer and oxygen transport and/or storage. Clarification of the mechanism for expression of diverse functions of heme is crucial in protein science. The distortion of heme porphyrin as well as the heme type, kinds of axial ligands, and propionate orientation is considered an important factor for the diverse functions of heme because it correlates with the physical properties of heme, such as oxygen affinity and redox potential. In order to examine the effect of protein environment on molecular structure of heme, we analyzed (1) the correlations between the tertiary structure of heme-binding pocket and heme distortion, (2) the fluctuation of the heme-binding pocket and heme distortion in hemoglobin and myoglobin, and (3) the structural difference in heme-binding pockets between apo (heme-unbound) and holo (heme-bound) structures of heme proteins. These analyses suggest that heme distortion is affected by its protein environment and fluctuates around its fitted conformation, leading to physical properties that are appropriate for protein functions.

07-08

光異性化によるチャンネルロドプシン分子内部のクーロン結合ネットワーク応答

○林田 拓登¹、大貫 隼²、広本 拓麻¹、高野 光則¹¹早大・先進理工・物理応物、²分子研

チャンネルロドプシンは光によって陽イオンを通す微生物ロドプシンである。内部のレチナールシッフ塩基 (RSB) が光を吸収して all-trans 型から 13-cis 型に異性化し、これがトリガーとなりイオンチャンネルのゲートが開くと考えられているが、RSB 異性化からゲート開口へとつながる分子メカニズムは未解明である。RSB 異性化について従来の「13-cis, C=N-anti」型の異性化に加えて「13-cis, C=N-syn」型異性化 (C13=C14 と C15=N の 2 箇所での異性化) も存在することが最近の研究で示されている。これら 2 つの異性化ではシッフ塩基プロトンの位置が大きく異なるため、その後の分子内反応に大きな影響を与えると考えられる。そこで本研究では新規の異性化状態である 13-cis, C=N-syn 状態でチャンネルロドプシン 2 (ChR2) の分子動力学 (MD) 計算を行い、異性化による ChR2 分子内部の応答を解析した。RSB と周囲の荷電・極性残基が関わるクーロン結合 (イオン結合) ネットワーク変化を解析したところ、RSB を起点として、チャンネルのゲートを構成する Glu90 につながるクーロン結合ネットワークの組み替えが見出された。Glu90 はそのプロトン脱着がゲート開閉を制御するとして注目されている。本発表では C13=C14 異性化と C=N 異性化の相関、RSB および Glu90 のプロトン脱着、13-cis, C=N-anti 異性化によるクーロン結合ネットワーク応答の解析結果も示し、異性化からゲート開口へとつながる分子内反応を議論する。

07-10

Computational studies on the structural analysis of the plant-type ferredoxin

○Tomoki Nakayoshi¹, Yusuke Onishi², Hideaki Tanaka³, Yu Takano¹¹Grad. Sc. Inf. Sci., Hiroshima City Univ.,²Sch. Pharm. Sci., Wakayama Med. Univ., ³Inst. Protein Res.

Ferredoxin (Fd) is a type of electron transfer protein containing an iron-sulfur cluster in the active center. Plant-type Fd includes a [2Fe-2S] cluster in the active center, and plays an important role in photosynthesis and metabolism. [2Fe-2S] cluster mainly can take two electron states, i.e., oxidized and reduced states, and play a role of single-electron carrier. To date, both the crystal structures of oxidized and reduced Fd have been resolved, however, it is suspected that both crystal structures are a mixture of oxidized and reduced states. In this study, molecular dynamics (MD) simulations and quantum chemical calculations were performed to analyze the structures of oxidized and reduced Fd. As results of MD simulations, the distortion of [2Fe-2S] cluster was larger in the reduced Fd than in the oxidized Fd, which qualitatively reproduced the experimental data. To elucidate the factors that cause [2Fe-2S] cluster distortion, model structures constructed, and quantum chemical calculations were performed. As a result, it was suggested that the distortion of [2Fe-2S] cluster is caused by the conformational change of the surrounding amino acid residues rather than the change of electronic states.

07-11

高電位鉄硫黄タンパク質の [4Fe-4S] 活性中心の構造と電子状態についての理論的解析

○堀 優太、佐藤 綾香、重田 育照

筑波大・計算セ

高電位鉄-硫黄タンパク質 (HiPIP) は、キューバン型構造をもつ $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$ クラスターを含み、鉄イオンの価数に応じて酸化や還元型に変化する。その機能の詳細を理解するためには、 $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$ クラスターの電子状態を理解する必要があるが、その電子状態は $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$ を取り囲むアミノ酸の電子的また構造の影響を受けることが予想される。本研究では、高分解能 X 線結晶構造解析から得られた還元型の HiPIP を取り上げ、 $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$ クラスターを取り囲むアミノ酸を考慮したモデルに対して、密度汎関数理論を用いて構造と電子状態について調べた。本研究では、それぞれ $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$ の第一配位圏と第二配位圏のアミノ酸を考慮した 2 つのモデル (A と B) を構築した。電子状態を決定するために、一重項状態に対応する 12 通りのスピン配置を考慮した。計算の結果、最も安定な電子状態が決定された。一方、X 線結晶構造と比較すると、モデル A では $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$ クラスターが膨張したのに対し、モデル B ではそれが抑制されており実験値に近い構造となった。4 つの Fe 原子のスピン密度を計算すると、2 つの Fe が強磁性的に結合した高スピン状態が 2 組形成され、それらは互いに反平行なスピンを持つことがわかった。自然結合軌道解析から、モデル B では 2 つの Fe の間に結合性軌道が形成されるが、モデル A ではそれが形成されなかった。以上のことから、 $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$ を取り囲むアミノ酸が、クラスターの構造安定性や、Fe 原子間の結合に伴うスピンの非局在化に影響を与えることが明らかになった。

08-01

重水内変性 / 再生操作したニワトリ卵白リゾチームの重水素化位置

○喜田 昭子、森本 幸生

京大複合研

タンパク質結晶の中性子線回折実験を行う際には、回折パターンを S/N 比向上のための試料の水素 / 重水素置換 (重水素化) は必須の手段である。重水素化タンパク質結晶の調製方法は様々あるが、一般的には緩衝溶液や結晶化試薬に重水素化試薬を用いたり、または結晶を重水素化母液に浸漬する方法がとられることが多い。われわれは、モデルタンパク質としてニワトリ卵白リゾチームを用い、重水内でタンパク質を変性させ、タンパク質内部の水素を重水素に置換してから構造を再生するという方法で、通常の浸漬法では重水素置換を受けないタンパク質内部の水素を重水素置換するという、効率の良いタンパク質重水素化法を模索してきた。そして重水内でそれぞれ酸、塩基、および熱による変性と構造再生を行った試料では、コントロール試料と比べて重水素化率が上がることで、また変性方法によって重水素化数が違うことを明らかにし、本方法が効率的な重水素化に利用出来ることを示した。引き続き、これら重水内変性 / 再生試料について中性子線結晶回折実験を行い、コントロール結晶 (非変性 / 再生試料) と比較することで、増加した各重水素化位置を明らかにした。これにより、リゾチームにおいては最もアミノ酸配列・立体構造が保存されている部位の一つが pH 変化に対する耐性が高い部位と一致することや、ジスルフィド結合が酸性環境における二次構造の安定性に寄与していることなど、興味深い結果が得られた。

07-12

Inverse Mixed-Solvent Molecular Dynamics for Visualization of Residue Interaction Profile of Molecular Probes○ Keisuke Yanagisawa¹, Ryunosuke Yoshino^{2,3}, Genki Kudo⁴, Takatsugu Hirokawa^{2,3}¹Dept. of Comput. Sci., Sch. of Comput., Tokyo Tech.,²Faculty of Med., Univ. of Tsukuba,³Transborder Med. Res. Center, Univ. of Tsukuba,⁴Grad. Sch. of Pure and Applied Sci., Univ. of Tsukuba

To ensure efficiency in discovery and development, application of computational technology is essential. Although virtual screening techniques are widely applied in the early stages of drug discovery research, the computational methods used in lead optimization to improve activity and reduce toxicity of compounds are still evolving. In this study, we propose a method to construct the residue interaction profile of the chemical structure used in the lead optimization by performing "inverse" mixed-solvent molecular dynamics (MSMD) simulation. Contrary to constructing protein-based, atom interaction profile, we constructed probe-based, protein residue interaction profile using MSMD trajectories. It provides us the profile of the preferred protein environments of probes without co-crystallized structures. We assessed the method using three probes, benzamidine, catechol, and benzene. As a result, the residue interaction profile of each probe obtained by MSMD was a reasonable physicochemical description of the general non-covalent interaction. Moreover, comparison with the X-ray structure containing each probe as a ligand shows that the map of the interaction profile matches the arrangement of amino acid residues in the X-ray structure.

08-02

FRB-FKBP 融合蛋白質のラパマイシン誘導型多量体の構造解析

坂口 瑠菜、○伊野部 智由

富山大院・理工

蛋白質の複合体の形成は様々な生命現象と関わっている。そのため、蛋白質の複合体形成を人工的に制御できれば、生命機能の人工制御につながる。蛋白質多量体化の人工制御システムとして、これまでラパマイシン依存的に多量体を形成する FKBP-rapamycin binding domain in FRAP (FRB) と FK506 binding protein (FKBP) の融合蛋白質が構築されている [1]。しかしながら、この FRB-FKBP 融合蛋白質の立体構造は未だ解明されていない。そこで本研究では、FRB-FKBP 融合蛋白質多量体の立体構造の解明を目指した。

結晶構造解析の結果、FRB-FKBP 融合蛋白質はラパマイシンを介して 3 量体を形成していた。この結晶構造の正確性を検証するために、生化学的手法や X 線溶液小角散乱で FRB-FKBP 融合蛋白質の多量体溶液構造を解析した。その結果、FRB-FKBP 融合蛋白質多量体の結晶構造と溶液構造には違いがあり、溶液中で結晶構造より大きな 4 量体を形成している可能性が示唆された。以上のことから、結晶構造でみられた FRB-FKBP 融合蛋白質 3 量体は、結晶化の過程で形成された構造であり、溶液中では FRB-FKBP 融合蛋白質は 4 量体を形成している可能性が高い。

[1] Inobe & Nukina (2016) *J. Biosci. Bioeng.*, 122, 40-46.

08-03

PF タンパク質結晶構造解析ビームラインにおける X 線回折実験の自動化

○山田 悠介^{1,2}、篠田 晃¹、松垣 直宏^{1,2}、引田 理英^{1,2}、
平木 雅彦^{2,3}、加藤 龍一^{1,2}、千田 俊哉^{1,2}¹ 高エネ機構・物構研・構造生物、² 総研大・高エネ研究科、
³ 高エネ機構・共通・機械工学

高エネ機構の放射光施設 Photon Factory(PF)には5本のタンパク質結晶構造解析(MX)ビームラインがあり、学術研究や民間企業による研究に利用されている。各ビームラインが特色を持つことで多様なMX実験をカバーする一方で、全てのビームラインが結晶交換ロボットを備え、同一のソフトウェアで制御されるなど、利用者の使用感は統一されている。ビームラインの測定技術開発は継続して続けられ、現在では全てのビームラインにおいて全自動測定やリモート実験が可能となっている。PF MX ビームラインにおける全自動測定は、クライオピン上に凍結された結晶試料を結晶交換ロボットにセットすると、結晶化ロボットによる回折計へのマウント、画像解析やX線回折スキャンによるタンパク質結晶のセンタリング、X線回折データの収集を連続的に全ての試料について行うものである。典型的なデータ収集条件では1時間あたり6個程度の結晶からデータセット収集が無人行われる。データ収集後は回折データ処理パイプラインが自動的に実行され、ユーザーは即座に分子置換法などの構造解析に進むことが出来る。最近では結晶化から回折実験への工程をより迅速かつ効率的に行うために、結晶化プレート上の結晶に直接X線を照射して回折データ収集を行うin situ測定の開発にも注力している。ビームラインBL17Aではin situ測定専用の結晶観察インキュベータや回折計が備わっており、それらを連動させることで結晶観察から回折実験までの全自動化を進めている。

08-05

迅速な結晶構造決定に向けた取り組み

○千田 美紀¹、川口 敦史¹、千田 俊哉²¹ 筑波大・医、² 高エネ機構・物構研・構造生物

感染症や疾患の治療薬開発に向けたリード化合物探索、分子生物学のためのケミカルプローブ創製、タンパク質工学による有用物質の産生、新規で発見されたタンパク質の解析等のためにタンパク質の構造情報は欠かせないものとなっている。それらのニーズに応えるためにはスピードが何よりも重視されるが、一日あたり数百セットの膨大なデータが収集できるX線結晶構造解析技術は迅速にタンパク質の構造情報を得るための最適なツールと言える。最近では新規のタンパク質の構造解析を行う場合であっても、既存の座標やAlphaFold2により得られた構造をモデルとして分子置換法により位相を決定できるケースが増えてきた。しかしながら、分子置換法で得られたモデルを少しずつ修正しながら構造精密化を進めるのは時間がかかり、迅速な構造決定には不向きである。一方、分子置換法とnative SAD法を組み合わせたMR-native SAD法では硫黄の異常分散効果を使い実験的な位相で計算した電子密度マップから半自動でクオリティーの高いモデルが構築できる。本発表では、我々のグループで迅速に結晶構造を決定するために行っている取り組みを実際の成功例を示しつつ紹介したい。

References

1. Watanabe-T, M. et al. (2021) Commn Biol.
2. Hirakawa et al. (2021) BMC Biol.
3. Konno et al. (2021) J. Med. Chem.
4. Kumano et al. (2021) PNAS
5. Mori et al. (2021) Nat. Communications
6. Inaba et al. (2022) BMC Biol.
7. Kamimura et al. (2022) New BIOTECHNOLOGY.

08-04

Substrate Recognition by the Src Protein Tyrosine Kinase

○Song-Ho Chong¹, Yuji Sugita^{1,2}¹RIKEN, BDR, ²RIKEN, CPR

Protein kinases regulate signal transductions through phosphorylation of their respective protein substrates. Protein kinases have long been therapeutic targets, and accurate knowledge of substrate interactions has the potential for improving drug selectivity. However, the number of substrate binding structural studies, in particular for tyrosine kinases, has been quite limited. Here, we investigate the association of a peptide substrate with cytosolic Src tyrosine kinase using an enhanced sampling simulation method called generalized replica exchange with solute tempering. We especially focus on the substrate orientation for which two distinct binding modes have so far been argued for protein kinase families. We will also analyze to what extent the substrate binding impacts the allosteric network underling binding cooperativity in Src kinase.

08-06

時分割構造解析に向けた SPring-8 BL41UX の高度化

○長谷川 和也¹、馬場 清喜¹、河村 高志¹、村上 博則¹、
増永 拓也¹、山本 雅貴²、熊坂 崇¹¹JASRI、²理研・放射光科学研究センター

BL41XUはSPring-8の供用開始と同時に稼働し高強度X線を用いた高難度試料の構造解析に利用されてきた。2013年度には微小結晶に対応するための集光光学系の改修や新しい回折計・ピクセルアレイ検出器(PAD)の導入が行われ現在に至る。その一方で2019年に同等のビーム性能を持つBL45XUのPX-BLとしての共用を開始し、ZOOシステムを用いた自動測定により高難度試料を含む幅広い試料のハイスループット測定を実現している。そこで、BL41XUでは通常の測定に加えて超高分解能測定などルーチンにのらない実験も行える環境の整備を進めてきた。現在そのような測定の1つとしてサブミリ秒程度の時分割測定の実現を目指し、以下のような高度化を進めている。(1) SACLAにおいてSFX法による時分割構造解析の実績のあるインジェクターの導入、(2) 固定ターゲットシリアル法の為の試料ホルダの作製と高速ステージの導入、(3) 反応開始トリガー用の波長可変ナノ秒レーザーの導入、(4) インクジェットを用いた基質ソーキングによる反応開始方法の開発、(5) シリアル法で得られる大量のデータをon-the-flyで処理するための計算機の整備。更に、これまで偏向電磁石ビームラインで行ってきたHAG法による非凍結状態でのデータ測定の設備、急速凍結による中間体捕捉を行うためのプレハブ試料準備室の整備も進んでいる。これらは準備が整い次第順次ユーザー利用に提供する予定である。

08-07

Na⁺,K⁺-ATPase と脂質二重膜との相互作用の結晶学的解析○金井 隆太¹、Vilsen Bente²、Cornelius Flemming²、豊島 近¹¹ 東大・定量研、² オーフス大・生物医学部

Na⁺,K⁺-ATPase は全ての動物細胞の形質膜に局在し、ATP 1 分子あたり 3 個の Na⁺ を細胞外へ、2 個の K⁺ を細胞内へ濃度勾配に逆らって輸送するイオンポンプである。イオンポンプはその能動輸送のために脂質分子を巧みに利用していることが筋小胞体膜カルシウムポンプ (SERCA) の構造研究から示されている。また、コレステロールが大量に含まれる局所的な膜構造体カベオラに局在した Na⁺,K⁺-ATPase はポンプとして機能せず受容体型として働くことが知られている。このように脂質二重膜は膜蛋白質が機能する足場としてだけでなく、積極的に Na⁺,K⁺-ATPase の反応機構に関わっている可能性がある。我々はこれまで Na⁺,K⁺-ATPase の能動輸送機構の解明のためにその構造研究を進めてきた。その過程で特異的に強く結合した一部のリン脂質やコレステロールの構造決定に成功したが、限定的であり、Na⁺,K⁺-ATPase と脂質二重膜との相互作用の十分な理解に至っていない。そこで、我々は脂質二重膜を含む Na⁺,K⁺-ATPase の構造決定に向けて、いくつかのアプローチを試みている。その結果、SERCA 結晶内の膜構造の可視化に成功した X 線溶媒コントラスト変調法を用いて Na⁺,K⁺-ATPase 結晶内の膜構造を示す予備的な電子密度マップを得ることができたので報告する。

08-09

クライオ電子顕微鏡像に基づく蛋白質動態の自由エネルギー地形推定法の開発と検討

○大出 真央^{1,2,3}、杉田 有治^{1,2,3}¹ 理研・CPR、² 理研・BDR、³ 理研・R-CCS

クライオ電子顕微鏡法 (cryoEM) では非晶質氷に様々な配向で包埋された多数の試料蛋白質分子像を観測し、平均化することで三次元密度マップを取得する。これら分子像は凍結された瞬間のコンフォメーションにトラップされるため、ドメイン運動のような構造揺らぎを示す生体分子について、その詳細な動態を実験データに基づいて理解できる。cryoEM データに基づく蛋白質動態解析手法はいくつか発表されているが、3D Variability Analysis (3DVA) という解析法が、現在多くの支持を得ている手法である。これは、試料分子の構造揺らぎを基準振動解析のように支配的な運動 (モード) の重ね合わせとしてモデル化し、これらのモードを三次元密度マップの連続的な変化として可視化する手法である。また、一枚一枚の分子像における各運動の度合いもわかるため、各モードを基底とした空間中で構造揺らぎの分布を得ることもできる。3DVA は蛋白質の構造揺らぎを直観的に理解できる極めて強力な手法であるが、構造揺らぎの分布について単なるガウス分布を仮定しており、3DVA から得られる分布が実際の分布を反映しているとは限らない。そのため、自由エネルギー地形解析といったより定量的な動態の解析のためには異なる手法が必要となる。この問題に対して、我々はより確からしく構造揺らぎの分布を推定できる解析法の開発を行っている。本発表では、手法の概要を説明するとともに、シミュレーションによって生成したテストデータを使った性能評価の結果を報告する。

08-08

化合物スクリーニングに向けたマイクロ流路デバイス開発

○上野 剛¹、舟久保 智瑛²、真栄城 正寿²、小西 真晶³、一町田 由貴²、坂井 直樹¹、山本 雅貴¹¹ 理研・放射光、² 北大・工、³ (株) リガク

創薬開発における Structure based Drug Design (SBDD) に代表される、タンパク質の構造情報を基にリガンド候補となる化合物を探索する研究においては、試料調製を含めた X 線結晶構造解析の迅速化への期待が大きい。タンパク質-化合物複合体の構造解析では、化合物を含む溶液にタンパク質結晶を浸漬するソーキング法などが用いられるが、人手による作業が大規模ハイスループット化の妨げとなっている。本研究では、結晶を含む結晶化溶液をマイクロ流路にそのまま注入して、結晶を流路内に設けたピット (穴) に固定して溶媒を任意に置換することで、結晶一つ一つを取扱うことなく簡便に化合物ソーキングを可能にするデバイスの開発を行っている。デバイスはそのまま回折実験に使用可能であり、人手のかかる試料調製の省力化により、作業効率の向上が期待できる。これまでに原理検証のため試験用一次元デバイスによる標準試料結晶の捕捉と SPring-8 BL26B2 での回折データ収集および構造解析、トリプシン結晶によるリガンドスクリーニング試験を行った (Maeki et al, 2020)。現在は大規模な化合物スクリーニングでの実用化を見据えた、流路設計の改良やデバイスの集積化、試料充填の自動化開発を行うとともに、ビームラインの装置開発や制御システムの高度化を進めている。

参考文献: Maeki, M., et al., Chemical Science 11 (2020) 9072-9087

08-10

SPring-8 BL45XU の自動測定で実現する高効率・高精度データ測定

○馬場 清喜¹、水野 伸宏¹、仲村 勇樹¹、長谷川 和也¹、奥村 英夫¹、河村 高志¹、村上 博則¹、増永 拓也¹、坂井 直樹^{1,2}、松浦 晃明²、平田 邦生²、山本 雅貴²、熊坂 崇¹¹ 公益財団法人高輝度光科学研究センター、² 理研 RSC

SPring-8 BL45XU は、アンジュレータの高強度ビームの特徴を生かし、BL32XU で開発された ZOO システム [1] を導入してタンパク質結晶の回折測定を自動化し、高効率に実施する共用ビームラインである。利用者の測定時間帯を事前には厳密に決定しないビームタイムのブロック運用により、測定時間が異なるユーザーの測定、特に短時間の利用を効率的に実施している。また、より高効率な運用を実施するために長時間 (72 時間) の連続運転を目指し、UNIPUCK を自動交換するバックストッカーを導入、調整中である。

ZOO システムによる自動測定は、結晶の形状や数により、(1) ループ内の複数結晶から small wedge (10° 程度) のデータを測定する「Multi」、(2) 結晶への照射位置を移動しながら測定する「Helical」、(3) 単点露光データ収集「Single」、(4) (1~3) を自動で組み合わせてデータ測定を行う「Mixed」(試験運用中)、の 4 種類の測定を選択できる。我々は、Multi 測定における高精度データ取得のため、結晶の吸収線量を変えて測定し精度を比較し、吸収線量として 5 MGy が最適であることを示した [2]。

[1] Hirata, K. et al., *Acta Cryst.*, (2019). **D75**, 138-150.[2] Baba, S. et al., *J. Synchrotron Rad.*, (2021). **28**, 1284-1295.

08-11

シアノバクテリアの光センサーのX線結晶構造解析と、NMRによるプロトン化状態の解析

○飯塚 佑介¹、永江 峰幸²、青山 洋史¹、伊集院 良祐¹、伊藤 隆³、広瀬 侑⁴、三島 正規¹¹ 東京薬大薬、² 名大院工、³ 都立大院理、⁴ 豊橋技科学大院工

シアノバクテリアは効率よく光を受容するために、補色順化と呼ばれる応答を示す。赤色光下では、赤色光を吸収する光合成色素を、逆に緑色光下では、緑色光を吸収する色素を合成する。これは、光受容タンパク質である RcaE タンパク質が、転写調節タンパク質を波長依存的にリン酸化することで制御されている。RcaE は、色素結合 GAF ドメインや C 末端にはヒスチジンキナーゼドメインを持つ。また、RcaE は光吸収を担う GAF ドメインのシステイン残基がテトラピロール発色団の1つであるフィコシアノビルリン (PCB) とチオエーテル結合で結合しており、赤色光/緑色光をそれぞれ吸収することで PCB のピロール環の1つに *cis-trans* 異性化 (*EZ* 異性化) を引き起こし、RcaE 全体に対しても構造変化を及ぼし、キナーゼ活性を制御すると考えられている。また、RcaE タンパク質は他の CBCR (シアノバクテリオクロム) や植物のフィトクロムとは異なり、発色団である PCB とタンパク質の相互作用におけるプロトン化・脱プロトン化が光吸収メカニズムに関与することが示唆されていた。そこで、私たちは未だ解明されていないプロトン化・脱プロトン化による光吸収メカニズムの解明を目的とし、赤色光吸収型 (Pr) と緑色光吸収型 (Pg) に対して溶液 NMR を用いた解析や、X線結晶構造解析を行った。立体構造と発色団のプロトン化状態について得られた知見について報告し、議論する。

08-12

SPring-8 PX-BL における結晶化プレート *in situ* 回折測定と化合物スクリーニングシステムの開発○奥村 英夫¹、坂井 直樹^{1,2}、村上 博則¹、水野 伸宏¹、増永 拓也¹、仲村 勇樹¹、上野 剛²、馬場 清喜¹、河村 高志¹、長谷川 和也¹、山本 雅貴²、熊坂 崇¹¹ JASRI、² 理研・放射光

近年、膨大な結晶化条件探索の効率化や薬剤候補化合物のスクリーニングとデータ測定の効率化への需要が増えている。そこで SPpring-8 タンパク質結晶構造解析ビームライン (PX-BL) では、結晶化プレート (以下プレート) 内の結晶で X 線回折測定を行う *in situ* X 線回折測定環境を開発し、BL26B1 で運用を行っている。回折測定に供するプレートを保持するプレートステージはビームラインの実験定盤上に設置され、プレート内の任意の結晶について、室温での *in situ* 回折測定を可能としている。また、プレートマウント・交換のための多軸ロボットおよび最大 54 枚のプレートを保管・供給するプレートストッカーから構成される自動プレート試料搬送系も備えており、ハッチ外からの操作命令による、マウントされるプレートの自動交換が可能となっている。測定では専用の GUI を使い、結晶位置を登録することで連続して測定を行うことができる。*in situ* 回折測定では結晶凍結工程を省略できるため、結晶を用いた化合物スクリーニングの高効率化が期待される。そこでアコースティック分注装置 ECHO を使用し、結晶化ドロップに直接化合物溶液を添加して化合物ソーキングを行い、プレート回折データを測定したところ、化合物の結合が観測できた。今後、測定の自動化開発を進め、高効率化を行う予定である。

09-01

放射光を用いた SPpring-8 創薬スクリーニングパイプラインの開発

○坂井 直樹^{1,2}、松浦 晃明¹、平田 邦生¹、竹下 浩平¹、奥村 英夫²、水野 伸宏²、村上 博則²、増永 拓也²、仲村 勇樹²、上野 剛¹、馬場 清喜²、長谷川 和也²、熊坂 崇²、山本 雅貴¹¹ 理研・放射光科学研究センター、² 高輝度光科学研究センター

放射光ビームラインにおける自動測定の実用化や自動データ処理および自動構造解析のパイプラインが整備されたことにより蛋白質結晶構造解析は大幅に効率化された。このようなハイスループット結晶構造解析技術の進歩に伴い、創薬標的蛋白質に結合する新規な化合物の合理的設計のため、構造の多様性を有する数百から数千種類の低分子化合物ライブラリーから結晶中で標的蛋白質に結合する分子をスクリーニングする手法が用いられるようになってきた。結晶を用いた化合物スクリーニングでは多種類の化合物を導入した標的蛋白質の結晶の X 線結晶構造解析が必要となる。そのために SPpring-8 では化合物を導入した結晶を効率よく調製し測定、データ処理、構造解析の各自動化システムと連結した SPpring-8 創薬スクリーニングパイプラインの開発を行っている。SPpring-8 ではアコースティック分注装置 ECHO を導入し、結晶化プレート上の結晶化ドロップに微量の化合物溶液を直接添加することにより結晶化プレート上で高効率にソーキングを実施する実験系を開発してきた。化合物を導入した結晶はクライオ処理し、自動測定によりデータ収集を実施している。また手動による結晶凍結作業を省き、結晶化プレート上の化合物を導入した結晶から *in situ* 回折測定によるデータ収集も実施している。発表では SPpring-8 創薬スクリーニングパイプラインの開発の現状とユーザー共用体制について報告する。

09-02

SPpring-8 MX-BL における自動化技術と高輝度微小ビームを駆使した構造多様性解析

○松浦 晃明、平田 邦生、坂井 直樹、竹下 浩平、當舎 武彦、河野 能顕、山本 雅貴

理研・放射光科学研究センター

SPpring-8 タンパク質結晶解析ビームライン (MX-BL) では ZOO システムによる自動データ収集の実現により、現状では 1 日あたり 200 個以上の構造決定も可能となっている。さらに、KAMO システムや NABE システムは、ZOO で得られた大量の回折データを自動で処理、解析し、測定結果を網羅的に俯瞰できるインタフェースを提供している。これによって、クライオプロテクタントやリガンドソーキングなどの網羅的な条件検討が容易になり、結晶調製等への迅速なフィードバックが可能になった。また最近では、複数の結晶から得られた回折データを階層的クラスタリングを用いて適切に分類することで、複数の構造 (構造多型) を捉えられることが示された。これまで ZOO では放射線損傷低減の観点からヘリカルデータ収集を推奨してきたが、SPpring-8 MX-BL の微小ビームを用いたヘリカルデータ収集と上記のクラスタリング解析を組み合わせることで、単一結晶内でも構造多型が得られるケースも見つかってきた。このように自動化技術の開発は、単に測定や解析の省力化にとどまらず、基本的に単一結晶からの構造決定を目指す従来の構造解析を越えて、複数の結晶から得られたデータの利用を前提とした構造解析という新たなフェーズを切り拓きつつある。本発表では SPpring-8 MX-BL で開発された自動化技術と高輝度微小ビームを活かした構造多様性解析の現状について、実際の解析例を交えて紹介したい。

09-03

エンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼ HS の立体構造と機能○倉内 郁哉¹、大倉 和貴¹、田中 里佳²、細川 千絵¹、伊藤 和央³、宮原 郁子¹、米澤 健人⁴、清水 伸隆⁴¹大阪市大・院理・物質分子、²大阪市大・工・X線測定室、³大阪市大・院理・生物地球、⁴KEK・物構研

エンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼ HS (Endo HS) は 1009 残基のアミノ酸からなるヒト唾液由来の酵素タンパク質である。本酵素は N-結合型糖鎖のうち複合型のみを認識して、加水分解・糖鎖転移反応を起こす。我々は Endo HS の立体構造から基質認識機構を解明することを試みた。

我々は Se-Met 置換体の結晶構造解析により、Endo HS が 5 つのドメインから構成されることを明らかにした。しかしながら、SAXS で計測された実験散乱曲線と結晶構造から計算した理論散乱曲線は異なっており、ドメイン I ~ III の部分とドメイン IV ~ V の相対配置が結晶中と溶液中では異なる可能性が示唆された。また、異なる条件で得られた Endo HS の結晶の構造では、C 末端のドメイン V が欠損していたが、ドメイン I ~ IV については Se-Met 置換体の結晶構造とよく一致していた。ドメイン V はアミノ酸配列から菌体外膜への移行シグナルとして機能すると予測され、また、欠損した変異体でも活性が保持されることから、直接活性には関与しないと考えられた。Endo HS の活性に対する各種金属イオンの影響を調べたところ、水銀イオン存在下でのみ活性が可逆的に阻害されることが分かった。また、水銀化合物をソーキングした結晶構造解析によりドメイン IV の Cys 837 が結合サイトであることが分かり、ドメイン IV は酵素活性のために重要な機能を担うと予想された。さらに、ドメイン V あるいは IV を欠損させた変異型 Endo HS の立体構造及び基質糖鎖の結合モデルから、それぞれのドメインの機能を考察する。

09-05

PF タンパク質結晶構造解析ビームライン AR-NW12A における顕微分光装置の開発

○引田 理英¹、山田 悠介¹、松垣 直宏¹、平木 雅彦²、千田 俊哉¹¹高エネ機構・物構研・構造生物学研究センター、²高エネ機構・共通基盤・機械工学センター

タンパク質の機能メカニズム解析研究において、タンパク質の分子・原子レベルでの立体構造は不可欠であり、高輝度放射光源を利用した X 線結晶構造解析法は、タンパク質の立体構造を原子レベルで解明するための強力なツールとして利用されている。一方、振動分光学的方法によれば、タンパク質を構成する原子の化学的諸性質を決定する化学結合を精密に解析することができる。これら X 線結晶構造解析法と振動分光法は相補的な手法として、タンパク質の機能メカニズム解析研究に用いられてきた。高エネ機構の放射光施設フォトファクトリー (PF) のタンパク質結晶構造解析ビームライン AR-NW12A では、X 線結晶構造解析法と振動分光法が同時に利用可能な拠点形成のため、結晶の分光測定が可能な顕微分光装置の開発及び利用環境の整備を行ってきた。現在では、ビームライン側室のレーザーブースに設置した、オフライン紫外・可視吸収測定装置やラマン分光装置が稼働を開始し、ユーザー利用に供している。本装置を利用した分光測定は、基本的に X 線回折実験に用いる結晶を使用して行うが、X 線回折実験に用いる結晶のサイズ、特に厚みは分光測定に適していないことが多い。また、結晶周りの溶媒や霜によるバックグラウンドの増加やノイズなどがスペクトルの測定精度に影響を与える。そのため結晶の厚みの最適化や霜の除去を深紫外レーザーによるタンパク質結晶加工機を使用して行い、バックグラウンドやノイズの低減を行っている。

09-04

Desulfovibrio vulgaris Miyazaki F 株由来 [NiFe]-ヒドロゲナーゼ酸化型の中性子 / X 線結晶構造解析

○玉田 太郎¹、廣本 武史^{1,2}、西川 幸志²、樋口 芳樹²¹量研・量子生命、²兵庫県大・院理

[NiFe]-ヒドロゲナーゼは Ni-Fe 活性部位、Mg 中心、および鉄-硫黄クラスターを有し、水素の合成・分解を両方向に触媒できる。Desulfovibrio vulgaris Miyazaki F 株由来 [NiFe]-ヒドロゲナーゼの Ni-Fe 活性部位は 4 つのシステイン残基由来の硫黄原子により配位された 2 つの八面体型配位錯体構造を形成しており、酸化型（不活性状態：Ni-A および Ni-B）では Ni-Fe 間には酸素種（OH⁻ イオン）が架橋していると考えられている。また、酸化型結晶中の一部の酵素分子において、Ni イオンが本来の位置から欠落していると考えられることを、最近実施した X 線結晶構造解析から確認している。酸化型の活性中心の詳細を明らかにするために、本研究では中性子および X 線結晶構造解析を実施した。Ni および Fe 原子の吸収端近傍で収集した X 線回折データから、結晶中の約 30 % の酵素分子において Ni イオンが Ni-Fe 活性部位の本来の位置から移動し、新たに平面四角型錯体構造を形成していることを明らかにした。一方で、2Å 分解能で実施した中性子結晶構造解析からは、架橋した OH⁻ / OD⁻ イオンを明瞭に確認できなかった。この結果は、重水環境で結晶化したにもかかわらず大多数が OH⁻ イオンのままで架橋しており、さらにある程度自由に回転できるコンフォメーションを持つことにより、水素原子が持つ負の散乱長密度分布により酸素原子の散乱長密度分布が打ち消されていることを示唆していた。

09-06

Cas3 の活性化機構についての構造的洞察

○尾松 美音^{1,2}、浜村 里美³、吉見 一人^{3,4}、清水 伸隆⁵、真下 知士^{3,4}、山本 雅貴^{1,2}、竹下 浩平^{1,3}¹RIKEN SPring-8 Center, 生物系 BL 基盤 Gr、²兵庫県立大, 生体高分子動的構造、³C4U株式会社、⁴東大医科研, 動物ゲノム、⁵KEK-PF

Cas3-CRISPR システムは、ニックース活性に加えヘリケース活性を有し広範囲ゲノム領域の編集に優れている。本システムは Cascade が PAM 配列を介して標的 DNA 配列に結合し、そこに Cas3 が結合することで標的 DNA を切断する。これまでに好熱菌由来 Cas3 (TfuCas3) が精力的に研究されているが、試験管内において TfuCas3 は Cascade 非存在下でも非特異的に ssDNA を切断することが知られている。本研究では大腸菌由来 Cas3 (EcoCas3) を対象とし、これまでに高効率な生産システムを構築し、高純度 EcoCas3 は、非特異的に ssDNA を切断しないことを確認し、Cascade の PAM 配列への結合依存的な特異的 DNA 切断活性を示す。このような活性の違いを調べるために小角散乱解析を行い、TfuCas3 に比べ EcoCas3 の分子内の揺らぎが大きいことが示唆された。TfuCas3 の結晶構造では発現系由来の artifact な ssDNA が結合しているが、EcoCas3 にはそのような DNA は結合していない。これらの結果を相補的に考察すると ssDNA が結合し構造が Rigid である TfuCas3 は非特異的に ssDNA を切断可能な活性化状態、EcoCas3 は静的な状態を示していると考えられる。しかし EcoCas3 も標的 DNA にニックを入れた後は二次的なニックース活性を示すことから、Cas3 に構造的な活性化機構が存在すると考えられる。

09-07

Synecocystis. sp. PCC6803 由来ジフラビン結合ジスルフィド酸化還元酵素の X 線結晶構造解析○平野 優¹、湊 悠²、梅田 菜帆²、鈴木 崇章²、玉田 太郎¹、
木村 成伸²¹ 量研・量子生命、² 茨城大・院理工

酸素発生型光合成を行うシアノバクテリアや植物において、NADP 依存型チオレドキシン還元酵素 (NTR) やフェレドキシン：チオレドキシン還元酵素 (FTR) が酸化ストレス耐性に重要な役割を果たしている。一方、FTR が欠損しているシアノバクテリアや藻類の一部においては、NTR とアミノ酸配列上高い相同性を持つにもかかわらず、NADPH ではなく還元型グルタチオン依存的に Riske 型フェレドキシンを還元するジフラビン結合ジスルフィド酸化還元酵素 (DDOR) が見つかって近年注目を集めている。DDOR は FAD を補因子として結合するフラビンタンパク質で、その生理的な電子受容体は不明である。DDOR については、X 線結晶構造解析が報告されており、結晶中では 1 分子あたり 2 分子の FAD を持つホモ二量体であることが示されている。我々は太陽菌発現系を利用して、*Synecocystis sp.* PCC6803 由来の DDOR を FAD の結合しない apo 体と FAD を結合する holo 体の両方を高純度かつ大量に調製することに成功した。この apo 体および holo 体 DDOR の結晶を作製し、X 線回折実験を実施し、それぞれ 2.8 Å 分解能および 2.2 Å 分解能の回折データ収集に成功した。立体構造精密化の結果、両者の構造を比較したところ、FAD 結合部位に大きな構造変化が見られた。2 つの FAD 結合部位の比較から、一方の FAD の結合によりもう一方の FAD 結合部位が形成される可能性が示唆された。

09-09

高速原子間力顕微鏡解析によって明らかになったミトコンドリアタンパク質搬入ゲート TOM 複合体の構造とダイナミクス九筈 加菜¹、小林 菜々子¹、今井 大達²、槇野 愛実²、稲津 明広¹、
古寺 哲幸²、遠藤 斗志也^{3,4}、○荒磯 裕平¹¹ 金沢大・保健・病態検査学、² 金沢大・ナノ生命研、³ 京産大・生命科学、
⁴ 京産大・タンパク質動態研

ミトコンドリアは外膜と内膜の 2 枚の膜構造を持つオルガネラで、生命活動に必要なエネルギー生産や様々な代謝反応を担っている。TOM 複合体は外膜に存在する膜透過装置で、β バレル型チャネル Tom40 と他の 6 つのサブユニットで構成される膜タンパク質複合体である。サイトゾルで合成された約 1,000 種類に及ぶ前駆体タンパク質は TOM 複合体を通してミトコンドリアへ取り込まれ、TOM 複合体を中心としたタンパク質輸送システムはミトコンドリアの機能発現の基盤といえる。近年、筆者らは TOM 複合体のクライオ電子顕微鏡構造を決定したが、今後はこの知見をもとに、動作中の TOM 複合体がタンパク質を取り込む仕組みを解明することを目指す。

そこで本研究では 100 ミリ秒の時間分解能とナノメートルの空間分解能で膜タンパク質の動的構造解析が可能な高速原子間力顕微鏡 (HS-AFM) を用いて、TOM 複合体のダイナミクスを一分子レベルで解析した。出芽酵母由来 TOM 複合体の分子動態を HS-AFM 観察したところ、Tom40 チャネルを 2 つ有する二量体粒子と、3 つ有する三量体粒子を可視化することができた。さらに、TOM 複合体が二量体から三量体、三量体から二量体へ構造変化する様子を捉えることに成功した。ラインプロファイル解析によって TOM 複合体粒子の大きさを測定したところ、三量体は等価な 3 つの単量体で構成されるのではなく、安定な二量体と不安定な単量体から構成されることが示唆された。これらの解析によって、TOM 複合体の構造変換機構の一端が明らかになった。

09-08

高度好熱菌 DNA 結合タンパク質 TkaP の機能と活性調節機構の解析井上 葵¹、高尾 和也¹、井上 真男²、○増井 良治¹¹ 大阪市大・院理、² 立命館大・生命科学

高度好熱菌 *Thermus thermophilus* の TkaP は、ribbon-helix-helix (RHH) 型 DNA 結合ドメインと機能未知の C 末端ヘリックスからなり、濃度依存的に高次会合体を形成する。その DNA 結合活性はリン酸化により失われるが、C 末端ヘリックスを欠失させるとリン酸化の影響を受けない。また、その遺伝子破壊株では細胞形状の異常や生育の遅滞が見られ、多くの遺伝子の転写レベルが変化する。RHH タンパク質の多くは転写因子だが、TkaP の働きは未だに不明である。本研究では、リン酸化による DNA 結合活性の調節や会合状態、さらに遺伝子破壊株の詳細な解析を通じて、TkaP の細胞機能の推定を目指した。まず C 末端ヘリックスに局在する負電荷を減少させた変異体は、リン酸化されても DNA と結合した。また、TkaP の高次会合状態はリン酸化によって変化した。さらに、TkaP の会合体の最小単位は二量体であった。これらの結果は、C 末端ヘリックス内の負電荷や高次会合状態がリン酸化による調節に関与することを示唆した。次に、*tkaP* 遺伝子の破壊株の生存率は野生株と同等だったが、コロニー形態の違いや急速な細胞沈降が見られた。また、破壊株の表現型は野生型 *tkaP* 遺伝子によって相補できたが、一部の変異体では相補できなかった。これらの結果などから、TkaP はリン酸化による DNA 結合活性の調節を介して転写にも影響を及ぼす核様体構成タンパク質である可能性が示唆された。

09-10

選択的 / 非選択的薬剤が結合した beta3 アドレナリン受容体の構造解析

○志南谷 渉、濡木 理

東大・理・生化

アドレナリンは、G タンパク質共役受容体 (GPCR である β アドレナリン受容体を活性化することで交感神経を刺激して、心拍数や血圧を上昇させる。β アドレナリン受容体には β1-3 の 3 種類が存在しており、β1 や β2 を標的とした薬剤は心臓病や喘息の代表的な薬である。一方、β3 受容体 β3 受容体は膀胱の平滑筋弛緩に関与しており、β3 受容体選択的の刺激薬であるミラベグロンが過活動膀胱の治療薬になっている。これまで β1 や β2 受容体の構造と機能の研究は進んでいるが、β3 受容体の立体構造だけは未解明であり、β 受容体刺激薬の選択性への理解は限られていた。

我々はクライオ電子顕微鏡を用いた単粒子解析によって、過活動膀胱治療薬ミラベグロンが結合した β3 受容体の立体構造を 3.2 オングストローム分解能で決定した。構造中では、ミラベグロンは細長い形をしており、β3 受容体の薬剤結合ポケットの中に垂直に収まっており、ミラベグロンと β3 受容体の相互作用の詳細が明らかになった。β3 受容体の構造を β1 や β2 受容体と比較したところ、薬剤結合ポケットの入口は β1 や β2 受容体と比べて狭く、ポケット全体が直線的な形であった。こうしたポケットの形の違いが、ミラベグロンの β3 受容体選択性に重要であることを明らかにした。全ての β アドレナリン受容体の立体構造が明らかになったことで、各受容体への選択性をより高めた、副作用の少ない β アドレナリン受容体標的薬の創製が期待される。

09-11

HIV-1 Vif と宿主タンパク質の五者複合体による抗ウイルス因子 APOBEC3G の脱アミノ化活性阻害の分子機構の解明

○神庭 圭佑¹、雲財 悟²、森下 了³、高折 晃史⁴、永田 崇^{1,5}、片平 正人^{1,5}¹ 京大・エネ理工、² 法政大・生命科学、³ セルフリーサイエンス (株)、⁴ 京大・医、⁵ 京大・エネ科学

APOBEC3G タンパク質 (A3G) は HIV-1 の cDNA を脱アミノ化し、HIV-1 を不活性化する。一方で、HIV-1 の Vif タンパク質は A3G を無力化する。Vif はヒト細胞内では、転写因子 core binding factor β サブユニット (CBF β)、ヒト E3 ユビキチンリガーゼ関連タンパク質 (Elongin B、Elongin C、Culin5) と 5 者複合体 (V β BCC) を形成する。V β BCC による A3G の無力化は、ユビキチン化を介したプロテアソーム分解が主だと考えられてきた。我々は最近、V β BCC が A3G の脱アミノ化を直接阻害することを見出した。また、この阻害においては、これまで着目されてこなかった V β BCC と A3G C 端ドメイン (A3G^{CTD}) の相互作用が重要であることを明らかにした。今回新たに、V β BCC から Culin5 を除いた 4 者複合体 V β BC では V β BCC より A3G^{CTD} の脱アミノ化活性阻害能が著しく減少することを見出した。また、NMR 結合実験は、V β BC、CBF β 、Elongin B/ Elongin C 複合体、Culin5 のいずれも、A3G^{CTD} と弱く相互作用することが示唆された。V β BCC による A3G^{CTD} の脱アミノ化活性阻害は、V β BCC の各成分と A3G^{CTD} との弱い相互作用の加算的効果である可能性がある。

09-12

汎用的 P1' 非依存的 TEV プロテアーゼの開発

○大恵 千翔^{1,2}、小杉 慎吾³、峯岸 恭孝³、吾郷 日出夫^{1,2}、熊坂 崇⁴、竹下 浩平¹、山本 雅貴^{1,2}¹RIKEN SPring-8 Center, 生物系 BL 基盤 Gr.²兵庫県立大, 生体高分子動的構造、³ニッポンジーン株式会社、⁴JASRI, 構造生物

ヒスタグのような親和性タグは組換えタンパク質の生産性を促進する。親和性タグを除去するためには目的蛋白質との間に切断配列を挿入しプロテアーゼ処理を行う。一般的に広く利用されるプロテアーゼにタバコエッチウイルス (TEV) プロテアーゼが知られ、よく用いられる TEV プロテアーゼは自己消化活性を欠損させた変異体 (aTEV) であり、その他にも溶解度を向上させた変異体や TEV 切断配列の P1' サイトの依存性を減少させた変異体などが報告されている。本研究では P1' サイト非依存的かつ溶解度が高く自己消化活性を欠損させた多重変異体の作成とそれらの基質特異性について調べた。aTEV を鋳型として溶解度を向上させる変異を導入した sTEV、さらに sTEV に P1' サイト非依存性を向上させる変異を導入した TEVx を作成し、P1' サイトを各アミノ酸に置換した基質蛋白質を準備し活性測定を行った。結果、sTEV は P1' サイトとして最も良く知られる Ser もしくは Gly では良好に切断するが、それ以外のアミノ酸では切断効率が aTEV に比べ 50% ほど低下していた。また、sTEV に R203G 変異を導入した TEVx では P1' サイトの非依存性は aTEV と同等に回復した。精製量は TEVx が最も高く、次いで sTEV、aTEV であり、熱安定性も TEVx および sTEV が aTEV に比べ 5℃ ほど向上していた。これらの結果から TEVx は汎用性の高い P1' 非依存的な TEV プロテアーゼであると考えられる。

010-01

長波長 X 線を利用したタンパク質結晶構造解析のパイプライン

○松垣 直宏¹、引田 理英¹、山田 悠介¹、平木 雅彦²、千田 俊哉¹¹ 高エネ機構・物構研・構造生物学研究センター、² 高エネ機構・機械工学センター

波長 3 Å 付近の長波長 X 線を照射することで、タンパク質に含まれるイオウなどの軽原子から比較的大きな異常散乱シグナルを得ることができる。タンパク質結晶構造解析においては重原子ラベルを必要としない位相決定、Native SAD 位相決定に有利に働くが、一方で物質との相互作用が大きな長波長 X 線による回折実験は測定上の困難のため一般的な方法とならなかった。高エネ機構フォトンファクトリーでは、長波長 X 線回折実験に最適化したビームライン BL-1A を運用し、試料結晶を最適な形・大きさに加工できる深紫外レーザーアブレーション装置と組み合わせることでこの方法の普及を進めている。これまでの実績から、分解能 3 Å 程度を与える結晶であれば、非対称単位分子量が 40 万にもおよぶ構造、あるいは 170 残基にイオウ 1 個程度しかないタンパク質の構造も、自動でほぼ完全な構造をモデリングできることが分かってきた。これは現在 SeMet などを用いた SAD 法で位相決定されている構造のほぼすべてが Native SAD 法でも位相決定可能であることを示している。ビームラインにおける試料結晶の自動スクリーニングから最適形状への加工、BL-1A での長波長 X 線を用いての低バックグラウンドかつ冗長性の高い回折データ収集、そして自動構造決定という流れをスムーズに進めることができるよう、施設のパイプラインとしての環境を整備している。

010-02

SPring-8 におけるクライオ電子顕微鏡について

○重松 秀樹^{1,2}、ゲーレ クリストフ¹¹ 理研・SPring-8、² 高輝度光科学研究センター

2021 年 9 月 (2021B 期) より大型放射光施設 SPring-8 では構造生物学研究及び創薬分野をはじめとする共用施設利用者の研究推進及び競争力強化に資することを目的としてクライオ電子顕微鏡 (CryoTEM) の供用を開始しました。本 CryoTEM は放射光ビームラインを利用する構造生物学の研究課題の実施において、付帯設備として利用でき、共用施設と同様に扱います。ご利用いただける CryoTEM は EM01CT: CRYO ARM 300 (K3) EM02CT: CRYO ARM 200 (K2 summit) で、結晶構造解析試料の溶液中での性状確認を主たる目的とし、必要に応じて 3 次元立体構造解析や構造多型解析が可能なデータの取得が可能です。現在、利用前講習としてグリッド作製や日本電子製ソフトウェア JADAS4 を利用したデータ取得、電子顕微鏡操作を体験していただけます。また、その後のユーザータイムでの経験を通して自律的にデータ取得が可能になるようにサポートします。さらに、結晶化が困難である試料に関しては、SerialEM での大量データの取得による高分解能溶液構造の取得についても、初心者講習を設定しサポートを行います。

010-03

Crystal structure of a 14-3-3 protein in complex with the doubly phosphorylated ADAM22 peptide

○ Yan Liu

Dept of Chem. Grad Sch of Sci. The Univ of Kyoto

ADAM22 is a membrane receptor for LGI1, a product of the gene responsible for autosomal dominant temporal lobe epilepsy (ADLTE). Ser832 and Ser855 on the C-terminal side of the cytoplasmic tail of ADAM22 undergo phosphorylation. The doubly phosphorylated ADAM22 at Ser832 and Ser855 can interact with 14-3-3 proteins, increasing the stability of ADAM22 on synaptic membranes. To understand the mechanism for this interaction, we determined the crystal structure of the complex of 14-3-3 and the double-phosphorylated ADAM22 peptide at 2.75 resolution.

010-04

炎症シグナルタンパク質 TAB2 の NZF ドメインによる K6 結合型ユビキチン鎖認識の構造基盤李彦君¹、尾勝圭²、○深井周也²、佐藤裕介³¹ 東大・新領域・メディカル情報生命、² 京大・理・化学、³ 鳥取大・工・GSC セ

炎症シグナル経路で働く TAK1-binding protein 2 (TAB2) は、C 末端の NZF ドメインを介して K63 結合型ユビキチン鎖に選択的に結合することが広く知られている。一方、最近では、TAB2 の NZF ドメイン (TAB2 NZF) が K6 結合型ユビキチン鎖にも結合できることを示す研究結果も報告されている。K6 結合型ユビキチン鎖との結合様式を明らかにすることを目的として、我々は、TAB2 NZF と K6 結合型ユビキチンとの複合体の結晶構造を 2 Å 分解能で決定した。TAB2 NZF は遠位側と近位側の両方のユビキチン分子と同時に相互作用し、Ile44 を中心とする疎水性の領域を認識していた。我々が以前に構造決定している K63 結合型ユビキチンとの複合体と比較したところ、遠位側ユビキチン分子の構造的に柔軟な C 末端テール以外は、ほぼ同様の立体構造であった。すなわち、遠位側ユビキチン分子の C 末端の柔軟性が K6 結合型ユビキチン鎖と K63 型ユビキチン鎖の両者に結合できる活性に寄与しているといえる。本研究は、TAB2 NZF が K6 結合型ユビキチン鎖に結合することを立体構造の観点から支持する結果であり、今後、この結合の生理的な意義を考える上で重要な手がかりとなると考えている。

010-05

細胞内 GTP センサータンパク質 PI5P4K β -膜複合体の立体構造解析に向けた結合親和性解析○長瀬里沙¹、中川史²、小笠原諭²、村田武士²、千田俊哉¹¹ 高工ネ研・物構研・構造生物、² 千葉大・理・化

PI5P4K β は細胞内の GTP 濃度を感知する GTP センサータンパク質である。PI5P4K β はイノシトールリン脂質 PI(5)P をリン酸化して PI(4,5)P を合成する酵素であり、その酵素反応に GTP を用いることがわかっている。さらに、GTP センサー機能をもつ本来の PI5P4K β を発現するがん細胞は増殖し腫瘍を形成するのに対して、GTP センサー機能を持たない PI5P4K β を発現するがん細胞は増殖せず腫瘍を形成しないことが明らかになっている。このことは、PI5P4K β の GTP センサー機能はがん細胞の増殖を制御していることを示している。これまで、我々は PI5P4K β の GTP センサーとしての機能を GTP の加水分解反応を指標として解析してきたが、PI5P4K β の活性発現には膜環境を必要とするため、酵素活性発現機構の詳細な解明には至っていない。そこで本研究では、PI5P4K β の膜上での活性型の立体構造を明らかにするため、脂質二重膜をアポリポタンパク質で安定化したナノディスク膜と PI5P4K β との複合体のクライオ電子顕微鏡による立体構造解析を試みることにした。そこでまず、複合体の安定性を解析するため、ナノディスクと PI5P4K β の結合親和性を表面プラズモン共鳴法にて測定した。その結果、脂質に PI(5)P を含むナノディスクと PI5P4K β との結合は数 μ M オーダーの解離定数を示した。今後はクライオ電子顕微鏡での観察に向けてさらなる解析を行っていく。

010-06

Lysozyme amyloid polymorphs with stronger cytotoxicity show enhanced side chain motions○Tatsuhito Matsuo^{1,2,3}, Alessio De Francesco^{2,4}, Judith Peters^{2,3,5}¹ IQLS, QST, ² ILL, ³ Univ. Grenoble-Alpes, ⁴ CNR-IOM & INSIDE@ILL C/O OGG,⁵ Inst. univ. France

Amyloid fibrils are closely related to the pathogenesis of amyloidosis. It has been shown that amyloid polymorphic fibrils of hen egg white lysozyme (HEWL) formed at pH 6.0 (LP60) are more cytotoxic than those formed at pH 2.7 (LP27). Regarding these polymorphs, it is recently proposed that structural fluctuation of LP60 may be enhanced compared with LP27. However, the validity of this hypothesis remains unclear. Here, to study possible dynamical differences between LP60 and LP27, we carried out the elastic incoherent neutron scattering (EINS) and the quasielastic neutron scattering (QENS) measurements. The EINS data showed that whereas the mean squared amplitudes of atomic motions are similar between the two samples, LP60 has a larger fraction of atoms moving with larger amplitudes than LP27. Furthermore, the QENS data showed that the jump diffusion coefficient of atoms is larger for LP60, suggesting that the atoms of LP60 move rapidly than those of LP27. Since the binding of fibrils to cell membranes is considered to trigger the cytotoxicity, the present results imply that differences in local mobility of polymorphs modulate the binding process between polymorphs and membranes, leading to different levels of cytotoxicity.

010-07

Overall structure of the fully assembled KaiABC complex in circadian system analyzed by an integrated experimental-computational approach

○ Yasuhiro Yunoki¹, Atsushi Matsumoto², Ken Morishima¹, Anne Martel³, Lionel Porker³, Nobuhiro Sato¹, Rina Yogo⁴, Taiki Tominaga⁵, Rintaro Inoue¹, Maho Yagi^{6,7,8}, Aya Okuda¹, Masahiro Shimizu¹, Reiko Urade¹, Kazuki Terauchi⁹, Hidetoshi Kono², Hirokazu Yagi⁸, Koichi Kato^{6,7,8}, Masaaki Sugiyama¹

¹KURNS, ²QST, ³ILL, ⁴UBC, ⁵CROSS, ⁶EXCELLS, ⁷IMS, ⁸NCU, ⁹Rits

The molecular machinery of the cyanobacterial circadian clock consists of three proteins: KaiA, KaiB, and KaiC. These proteins undergo an association-dissociation cycle in vitro. For better understanding the assembly mechanisms of oscillation systems, we attempted to obtain overall structure of the a periodically assembled large complex (ABC complex) by integrating experimental and computational approaches.

The small-angle X-ray scattering techniques coupled with size-exclusion chromatography (SEC-SAXS), enable us to provide the scattering data of ABC complex without any deterioration due to aggregates. In addition, the SEC-small-angle neutron scattering (SANS) with an inverse contrast matching technique were highlighted the spatial arrangements of the dynamically fluctuating KaiA subunits in ABC complex. In the analysis, computationally building structural models of ABC complex were screened out utilizing the constraints based on the scattering data and then were subjected to molecular dynamics simulations to examine their stabilities.

Herein, we demonstrate the utility of the integrative structural approach to resolve large complex structures.

010-09

CryoEM Reveals the Activation Motif of DNA Methyltransferase 1

○ Hiroki Onoda¹, Amika Kikuchi¹, Atsushi Yamagata², Mikako Shirouzu², Makoto Nakanishi³, Atsuya Nishiyama³, Kyohei Arita¹

¹Grad. School of Med. Life Sci., Yokohama City Univ., ²RIKEN BDR,

³The Inst. of Med. Sci., The Univ. of Tokyo

DNA methyltransferase 1 (DNMT1) maintains the methylation (mCG) pattern of genome, which regulates gene expression of individual cell. Aberrant DNA methylation pattern causes a variety of diseases, including cancer. After DNA replication, two hemi-methylated DNA are produced from a full methylated DNA. DNMT1 copy the methylation signal from template DNA (mCG) to nascent DNA (CG). The human DNMT1 structures of auto-inhibitory form (aa 351-1600) and the active form (aa 729-1600) are reported. The activation mechanism has been still unclear owing to the truncation of N-terminal domains. We captured the structure of DNMT1 with functionally complete length under intermediate state of DNA methylation by cryoEM. Intriguingly, we found that a novel activation motif, which is never seen in the previous activation structure owing to the truncation, invaded into the pocket of the catalytic domain, contributing to fully functional DNA recognition. Mutations in the activation motif largely impaired the DNA methylation activity, thus the activation motif is crucial for the methylation activity. Collectively, our cryoEM uncovers the molecular basis for the activation mechanism of DNMT1.

010-08

Multiple sub-state structures of SERCA2b reveal conformational overlap at transition steps during the catalytic cycle

○ Yuxia Zhang^{1,2}, Chigusa Kobayashi³, Satoshi Watanabe¹, Akihisa Tsutsumi⁴, Masahide Kikkawa⁴, Yuji Sugita³, Kenji Inaba¹

¹IMRAM, Tohoku Univ., ²Chinese Academy of Sciences,

³Computational Biophysics Research Team, RIKEN,

⁴Graduate School of Medicine, The Univ. of Tokyo

Sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase (SERCA) pumps Ca²⁺ into the endoplasmic reticulum (ER). Herein, we determined cryo-electron microscopy (EM) structures of three intermediates of SERCA2b: Ca²⁺-bound phosphorylated (E1P2Ca²⁺) and Ca²⁺-unbound dephosphorylated (E2Pi) intermediates, and another between the E2P and E2Pi states. Our cryo-EM analysis revealed that the E1P2Ca²⁺ state is present in low abundance and preferentially transitions to an E2P-like structure by releasing Ca²⁺, and that the Ca²⁺ release gate subsequently undergoes stepwise closure during the dephosphorylation processes. Importantly, each intermediate adopts multiple sub-state structures including those like the next one in the catalytic series, indicating conformational overlap at transition steps, as further substantiated by atomistic molecular dynamics simulations of SERCA2b in a lipid bilayer. The present findings provide insight into how enzymes accelerate catalytic cycles.

010-10

A high-resolution neutron structure reveals the nonplanarity of the peptide bond

○ Yuya Hanazono^{1,2,3}, Yu Hirano^{2,4}, Kazuki Takeda¹, Katsuhiko Kusaka⁵, Taro Tamada², Kunio Miki¹

¹Grad. Sch. of Sci., Kyoto Univ., ²Inst. for Quant. Life Sci., QST,

³Med. Res. Inst., Tokyo Med. Dent. Univ., ⁴PRESTO, JST,

⁵Front. Res. Cent. for Appl. Atomic Sci., Ibaraki Univ.

The peptide bonds have a planar structure because of their resonance stabilization with a separation of charge between the nitrogen and oxygen atoms. The planarity of the peptide bond is important for resistance to hydrolysis and forming secondary structures. However, substantial distortion of peptide bonds has been reported in several high-resolution structures and computational analyses. In addition, the deviations of the position of the amide protons from the peptide plane are not well understood due to the lack of structural data for hydrogen atoms. To investigate the peptide bond planarity, including hydrogen atoms, we determined a 1.2 Å resolution neutron structure of the oxidized form of high-potential iron-sulfur protein. The high-resolution neutron structure shows that the nucleus position of the amide proton is shifted away from the peptide plane and toward the acceptor atoms. The planarity of the H-N-C=O plane is strongly dependent on the pyramidalization of the nitrogen atom. Furthermore, the orientation of the amide proton of Cys75 is different between the reduced and oxidized states, possibly due to the electron storage capacity of the iron-sulfur cluster.

010-11

Allosteric Mechanism of Cyanobacterial Circadian Clock○ Yoshihiko Furuie^{1,2}, Atsushi Mukaiyama^{1,2}, Eiki Yamashita³, Takao Kondo⁴, Shuji Akiyama^{1,2}¹CIMoS, IMS, ²SOKENDAI, ³IPR, Osaka Univ.,⁴Grad. School of Sci., Nagoya Univ.

Circadian clocks are driven by a large number of chemical steps. Are there any simple principles existing behind the intricate combination of reactions in clock proteins? KaiC is a core protein in cyanobacterial circadian clock. In the presence of KaiA and KaiB, enzymatic activities of KaiC oscillate in a test tube. KaiC forms tandemly duplicated hexameric rings which bidirectionally regulate each other (C1 and C2). While C1 hydrolyzes ATP (ATPase), C2 undergoes cyclic (de)phosphorylation (phospho-cycle). The tight but complicated allostery between these reaction sites is an essential core of the oscillation. To reveal the C1-C2 allosteric mechanism, I determined crystal structures covering overall phospho-cycle, and identified three structural factors essential for the oscillation. The first was the coil-helix transition of the region sensitive to the S431 phosphorylation. The second was the quaternary structural change of the C1 ring coupled to the elementary steps of the ATPase reaction such as the ADP-ATP exchange and the arrangement of a lytic water molecule. The third was the hydrogen bond switch mediating these motions. The allostery behind the complicated coupling of ATPase, kinase, and phosphatase in KaiC was unexpectedly simple.

010-13

Solution structure analysis of the oxidative folding enzyme, ER-60 by small angle X-ray scattering

○ Aya Okuda, Masahiro Shimizu, Ken Morishima, Rintaro Inoue, Nobuhiro Sato, Yasuhiro Yunoki, Reiko Urade, Masaaki Sugiyama

KURNS, Kyoto Univ.

ER-60, an oxidative folding enzyme, is a multi-domain protein with the **a-b-b'-a'** domain structure. Depending on the redox state of the active centers in **a** and **a'** domains, ER-60 folds unfolded proteins through oxidation and reduction. In this process, ER-60 might have the appropriate domain conformations to function, and it is estimated that the structure fluctuates according to the redox state of the active centers in the solution.

To observe the structure of ER-60 in solution, the highly purified recombinant oxidized (ox) and reduced (red) ER-60 were prepared. Then, SEC-SAXS which combined size exclusion chromatography (SEC) and small angle X-ray scattering (SAXS), and sophisticated data processing were performed to remove the effects of contaminants and aggregates on the SAXS profiles. Comparing the high-precision SAXS profiles from these experiments with the one calculated from the crystal structure, it was found that the solution structures are different from the crystal structure. Furthermore, with Guinier analysis from these profiles, it was revealed that a significant difference in the radius of gyration (R_g) between ox- and red-ER-60, indicating that ox-ER-60 has a more extended structure than red-ER-60 in solution.

010-12

Crystal structure of MTHFR of *Sphingobium* sp. SYK-6 provides molecular evolutionary evidence of a new type of MTHFR induced by demethylation○ Hong Yang Yu¹, Naofumi Kamimura², Miki Senda¹, Eiji Masai², Toshiya Senda¹¹SBRC, IMSS, KEK, ²Nagaoka Univ. of Technology

Sphingobium sp. SYK-6 (SYK-6) is a unique bacterium capable of utilizing various types of lignin-derived compounds as the sole carbon source. In SYK-6, demethylation of vanillate is a crucial step for carbon anabolism and generates methyl-H4folate (CH₃-THF). While methylene-H4folate reductase (MTHFR) typically catalyzes the conversion of CH₂-THF to CH₃-THF, the reverse reaction occurs in SYK-6. To understand the mechanism of the unique catalytic reaction of SYK-6 MTHFR, we determined the crystal structure of SYK-6 MTHFR and revealed that three motifs, TFLP, CGxGxS and PFGGL, are responsible for the unique substrate specificity. Based on these results, our phylogenetic analyses showed homologs of S6MTHFR containing the above three motifs were widely distributed in taxonomy, forming a new cluster in the MTHFR family. Altogether, our study provides an example of how organisms have evolved to utilize demethylation reactions for survival.

010-14

Structure and engineering of the type III-E CRISPR-Cas7-11 effector complex○ Kazuki Kato¹, Wenyuan Zhou², Sae Okazaki¹, Yukari Isayama¹, Tomohiro Nishizawa³, Jonathan S. Gootenberg², Omar O Abudayyeh², Hiroshi Nishimasu^{1,4}¹RCAT, The Univ. of Tokyo, ²McGovern Inst. for Brain Res. at MIT,³Grad. Sch. of Med. Life Sci., Yokohama City Univ.,⁴Dept. of Biol. Sci., Grad. Sch. of Sci., The Univ. of Tokyo

The type III-E CRISPR-Cas single-protein effector Cas7-11 has dual RNase activities for precursor CRISPR RNA (pre-crRNA) processing and crRNA-guided target RNA cleavage, and is a new platform for mammalian RNA targeting. We report the cryo-electron microscopy structure of Cas7-11 in complex with a crRNA and target RNA. Cas7-11 adopts a modular architecture comprising seven domains (Cas7.1-Cas7.4, Cas11, INS, and CTE) and four interdomain linkers. The crRNA 5' tag is recognized and processed by Cas7.1, while the crRNA spacer hybridizes the target RNA, forming a guide-target duplex. Consistent with our biochemical data, catalytic residues for programmable cleavage in Cas7.2 and Cas7.3 are located around scissile phosphates before the flipped-out fourth and tenth nucleotides in the target RNA, respectively. We rationally engineered a compact Cas7-11 variant (Cas7-11S) capable of single-vector AAV packaging for transcript knockdown in human cells, enabling in vivo Cas7-11 applications.

010-15

Paip2 competitively dissociates PABPC1 from poly(A) by accessing RRM2 of the poly(A)-bound PABPC1Takeru Sagae¹, Mariko Yokogawa¹, Ryoichi Sawazaki¹, Yuichiro Ishii¹, Nao Hosoda², Shin-ichi Hoshino², Shunsuke Imai^{3,4}, Ichio Shimada^{3,4}, O Masanori Osawa¹¹Grad. Sch. Pharm. Sci., Keio Univ.,²Grad. Sch. Pharm. Sci., Nagoya City Univ.,³Grad. Sch. Pharm. Sci., Univ. of Tokyo, ⁴BDR, RIKEN

Eukaryotic mRNAs possess a poly(A) tail at their 3'-end, to which poly(A) binding protein C1 (PABPC1) binds and recruits proteins that regulate translation. PABP-interacting protein 2 A (Paip2A) effectively represses the translation by dissociating PABPC1 from the poly(A) tail, but the underlying mechanism remains unknown. This study aimed to reveal the functional mechanisms of Paip2A by characterizing the PABPC1-poly(A) and PABPC1-Paip2A interactions. ITC and NMR analyses indicated that both interactions were predominantly due to the RNA recognition motif (RRM)2-RRM3 regions of PABPC1. However, K_d of the isolated RRM2 are 200 to 4 μ M for poly(A) and Paip2A; K_d of the isolated RRM3 are 5 and 1 μ M for poly(A) and Paip2A, respectively. NMR analyses revealed that Paip2A binds to the poly(A)-binding interfaces of RRM2 and RRM3. We propose a functional mechanism for Paip2A as follows: Paip2A initially binds to RRM2 of the poly(A)-bound PABPC1, and the RRM2-anchored Paip2A effectively displaces the RRM3 region from poly(A), resulting in the dissociation of the whole PABPC1 molecule. Together, our findings provide new insight into the Paip2A repression effects and could aid in the development of novel anti-cancer and/or antiviral drugs.

011-02

Proteomic Analysis of Peripheral Blood Mononuclear Cell-derived Circulating Proangiogenic Cells after Treatment of Iron-Quercetin ComplexO Phakorn Papan¹, Jiraporn Kantapan², Nathupakorn Dechsupa², Puttinan Meepowpan¹, Padchanee Sangthong¹¹Dept. of Chem., Fac. of Sci., Chiang Mai Univ.,²Research Unit of Mol. Imaging Probes and Radio., Dept. of Radio. Tech., Fac. of Assoc. Med. Sci., Chiang Mai Univ.

Cell-based therapies are a promising treatment for regenerative medicine. Our research synthesized the paramagnetic agent of iron(III)-quercetin complex (IronQ). This IronQ acted as dualfunctions with enhancing peripheral blood mononuclear cell (PBMCs)-derived circulating proangiogenic cells (CACs) growth in the conventional cell culture without adding any specific growth factors for cells expansion and differentiation as well as cell tracking by MRI. In present study, proteomic approach applied to investigate the effect of IronQ on CACs obtained from PBMCs-treated healthy Thai donors (n=6) with IronQ using LC-MS/MS system for long cultivating time by day 7, 14 and 21. The results indicated that iron homeostasis of IronQ expressed by iron regulatory proteins such as FTL and FTH1. In regulation of cell death and stress, IronQ reduced apoptosis level by down-regulating the protein expression of BAX, TNFAIP8 and CASP3. IronQ promoted CACs expansion on angiogenesis by up-regulating protein including ITGB1 and ITGB2. Our study showed that IronQ could be enhanced angiogenic process. However, the protein expression levels will be validated by western blot analysis. IronQ might be used as an alternative agent in regenerative therapy.

011-01

再構成型無細胞タンパク質合成系 (PUREflex) を用いた糖タンパク質合成O 松本 令奈¹、丹羽 達也²、田口 英樹²、金森 崇¹¹ジーンフロンティア (株)、²東工大・研究院・細胞センター

PUREflex は、PURE system を基にした大腸菌でのタンパク質合成に関与する因子のみから再構成した無細胞タンパク質合成系である。PUREflex では、ポリペプチドの合成のみが行われるが、適切な追加因子を使用することで翻訳後修飾も可能である。本発表では、糖転移酵素および基質となる糖供与体を用い、PUREflex で N 型糖鎖修飾タンパク質の合成を行った。糖鎖修飾反応は Jewett らの方法を参考にした (Kinghtlinger et al.(2019))。初めに、大腸菌 Colicin-E7 immunity protein に N 型糖鎖付加配列を挿入したモデルタンパク質 (Im7-6)、ならびに数種類の糖転移酵素を PUREflex でそれぞれ合成し、これらと糖供与体を混合して Im7-6 の糖鎖修飾反応 (in vitro glycosylation (IVG)) を行った。反応後の SDS-PAGE および質量分析により、糖鎖付加配列中のアルギニン残基へのグルコース付加を起点とし、ガラクトース、GlcNAc、シアル酸の付加を確認した。さらに、Im7-6 と糖転移酵素の合成および糖鎖修飾反応を one-pot で同時に行ったところ、この方法でも糖鎖修飾された Im7-6 を確認できた。また、ジスルフィド結合を含むタンパク質や膜タンパク質に対しても、糖鎖付加が可能であることを確かめた。この結果より、PUREflex でも糖タンパク質を合成できることが示された。

011-03

新規小型発光酵素 picALuc のアプリケーション開発O 大室 有紀¹、松井 勇人¹、叶井 正樹¹、古田 忠臣²¹島津製作所・基盤研、²東工大・生命理工

我々は前回、ALuc を基に、明るい発光酵素の中で最小サイズの発光酵素 picALuc (13 kDa) を開発し、Cos-7 細胞からの分泌発現時、picALuc が ALuc・NanoLuc と同等の発光値・熱安定性を示すことを報告した。そこで今回は、picALuc の特性を生かした 2 つのアプリケーション開発を行った。

1 つ目のアプリケーションとして、picALuc を用いたタンパク質間相互作用検出系 (Protein-fragment Complementation Assay, PCA) の構築を行った。picALuc を 2 分割し、大腸菌を利用して作製した FKBP・FRB に融合した蛋白質 (2 断片プローブ) の相互作用検出を行った結果、12 倍の Signal/Background 比が示された。picALuc PCA の特長は、その断片プローブの小ささ (2 kDa, 11 kDa) にあると考えられる。次に 2 つ目として、picALuc を用いたプロテアーゼ処理による生物発光共鳴エネルギー移動 (BRET) の解消を試みた。融合タンパク質として picALuc (または NanoLuc (19 kDa)) -thrombin 認識配列-mCherry2 を作製し、thrombin 処理により BRET を解消させた結果、picALuc プローブの BRET 効率は、NanoLuc プローブより 2.5 倍高かった。発光酵素サイズ (すなわちその小ささ) が BRET 効率に影響したことを示唆している。その他、ALuc・NanoLuc と比較した塩基性条件における発光値の安定性および塩濃度依存的な発光値の減少なども認められた。これらの結果から、picALuc には様々な利用用途があると考えられる。

011-04

出芽酵母における翻訳エンハンサー dMac3 を用いたヒト GPCR の発現向上

○田村 佑樹、丹崎 航哉、島田 浩章、白石 充典

東理大・先進工・生命工

G タンパク質共役型受容体 (GPCR) は体内の組織や細胞に存在する内在性膜タンパク質であり、様々な疾患に対する重要な創薬標的となっている。GPCR に対する合理的な医薬品開発には原子分解能での構造解析が必要である。そのためには、GPCR を大量発現し、高純度に精製する必要があるが、異種宿主による発現・精製が困難である。また、膜の可溶化・精製において高価な界面活性剤を使用することから、GPCR をできるだけ高密度で細胞に発現させることが望ましい。本研究では、翻訳エンハンサー dMac3 を導入した GPCR 発現プラスミドを用いて、出芽酵母 (*S. cerevisiae*) 発現系による発現向上を目指した。dMac3 を導入したアデノシン A2a 受容体発現プラスミドでは発現が向上し、定量 PCR において酵母の mRNA 量に変化がなかったことから、翻訳が促進されたと考えられる。しかし同じアミノ酸配列でも、コドンが酵母に最適化され発現が向上しているものや、元来高発現が見られたヒスタミン H3 受容体については発現向上が見られなかった。また、*S. cerevisiae* ゲノムの複数箇所に存在するトランスポゾン配列をターゲットとする酵母染色体多部位組み込み型プラスミドに dMac3 を導入したところ、形質転換体のコロニーにおける発現量の差が小さくなることに加え、平均発現量が向上した。以上の結果から、翻訳エンハンサーは目的遺伝子のコドンが発現宿主に適していない場合や、コピー数が少ないゲノム組み込み型のプラスミドに対して発現向上の効果を発揮することが示唆された。

011-06

二次構造モチーフに着目したドメインスワッピング構造の計算機デザインによるタンパク質複合体の構築

○小林 直也、吉田 悠真、真島 剛史、廣田 俊

奈良先端大・物質

モノマータンパク質のタンパク質-タンパク質間相互作用面を計算機デザインすることにより、環状対称性やカゴ型構造を持つホモ及びヘテロ複合体が構築されてきた。しかしながら、これらのデザインはバンドル様の α -ヘリックス間相互作用や β -シートのエッジ部分同士の相互作用に基づいていたため、複合体デザイン可能なモノマータンパク質の種類は限られていた。そこで本研究では、二次構造モチーフに着目してドメインスワッピング構造を計算機デザインすることにより、様々な種類のモノマータンパク質からタンパク質複合体を簡便に構築する手法の開発を目指した。まず、望みの対称性の複合体の構築に適した二次構造モチーフを探索した。次に、Foldit Standalone 及び Rosetta を用いて、二次構造要素が連続するように二次構造モチーフを伸ばしたドメインスワッピング構造をデザインし、会合数やサイズが異なる複数種類の複合体構造を構築した。続いて、構築した複合体構造を安定化するアミノ酸配列を設計した。ColabFold を用いて設計したアミノ酸配列の立体構造を予測したところ、デザインモデル構造と一致するドメインスワッピング複合体構造が予測された。本研究のデザイン戦略は、特定の二次構造モチーフを含む様々なタンパク質に適用することができ、タンパク質複合体構造を設計するための汎用性の高い手法となることが期待される。

011-05

定量プロテオミクスを用いた大腸菌 GroE 依存基質の GroE 欠乏条件下における分解機構の解析

○丹羽 達也、茶谷 悠平、田口 英樹

東工大・研究院・細胞センター

大腸菌 GroEL/ES (GroE) は最もよく研究されている分子シャペロンの1つであり、数多くの研究によってその分子メカニズムから細胞内の基質に至るまで幅広く調べられている。これまでの研究により、「細胞内のフォールディングに GroE を必要とする基質」、すなわち細胞内 GroE 依存基質が約 70 種類存在することがわかっている。これらの基質は GroE が欠乏した細胞内でフォールディングできず、この条件下で強制的に過剰発現させると凝集を形成し、微弱に発現させると分解される傾向があることがわかっている。しかし、生理的な発現条件でこれらの基質がミスフォールドした場合にその運命がどうなるかははっきりとしていない。そこで SWATH-MS 法を用いた定量プロテオミクス解析によって GroE 欠乏によるプロテオーム変動を調べたところ、多くの GroE 依存基質で発現量が減少することが確認された。そこで主要な細胞質プロテアーゼである Lon、ClpXP、HslUV をそれぞれ欠損させて同様の解析を行なったところ、Lon 欠損でのみこの GroE 依存基質の発現量減少が解消された。この結果より、GroE 欠乏条件下における GroE 依存基質の分解には主に Lon が関わっていることが明らかとなった。一方、大腸菌のもう一つの主要なシャペロンである DnaK/DnaJ 欠損条件では Lon の有無にかかわらず GroE 依存基質特異的な分解はみられなかった。これらの結果から、GroE 依存基質は GroE 欠乏特異的に、凝集を形成する前に速やかに Lon などのプロテアーゼに分解される傾向があることが明らかとなった。

011-07

耐熱性シトクロム *c* のドメインスワッピング 2 量体構造の計算機デザイン

○吉田 悠真、小林 直也、真島 剛史、廣田 俊

奈良先端大・物質

好熱性水素細菌由来シトクロム *c*₅₅₂ (HT cyt *c*₅₅₂) をエタノール処理または大腸菌で過剰発現することにより、様々な会合数のドメインスワッピング多量体構造を同時に形成させることができるが、特定の会合数の多量体を選択的に形成させることは未だ困難である。そこで本研究では、HT cyt *c*₅₅₂ から選択的に特定の会合数のドメインスワッピング構造を創出することを目的として、HT cyt *c*₅₅₂ のドメインスワッピング 2 量体構造の計算機デザインを行った。まず、Rosetta を用いて、HT cyt *c*₅₅₂ の構造中のヘリックス-ループ-ヘリックスモチーフで α ヘリックスが連続するように、このモチーフのループ領域を 3 種類の異なる長さのヘリカルリンカーで置き換えることにより、ドメインスワッピング 2 量体構造をデザインした。次に、デザインしたヘリカルリンカー部分の主鎖構造の類似性と Rosetta スコアに基づいて、長さの異なるヘリカルリンカー毎にそれぞれ 5 構造ずつ選び、Foldit Standalone を用いて構造最適化を行った。最後に、Rosetta を用いて作成したドメインスワッピング 2 量体構造を安定化するアミノ酸配列をデザインした。ColabFold を用いて、デザインしたアミノ酸配列の立体構造を予測した結果、デザインモデル構造と一致するドメインスワッピング 2 量体構造が得られた。

011-08

CutA1 量体構造改変を基盤とした多価化分子認識素子の設計

○今中 洋行、山田 航大、石田 尚之、今村 維克

岡山大学・自然

超好熱菌 *Pyrococcus furiosus* 由来のホモ三量体タンパク質 CutA1 を用い、高次構造体の形成や多価化構造体取得のための分子設計を試みた。CutA1 の複数のサブユニット配列をリンカーを介してタンデムに連結した各種 scCutA1 (single-chained CutA1) 変異体を発現させた結果、いずれの連結数においても可溶化発現し、高い構造安定性を示した。また、ゲル濾過クロマトグラフィーに供したところ、三量体の整数倍の分子量分布が見られたことから三量体基本構造が維持された高次構造体の形成が示唆された。これらを固定化後、Enzyme-Linked Assay (ELA) により相互作用解析を行った結果、基板表面親和性ペプチドの複数挿入により様々な配向でリガンド提示分子が固定化され、リガンド提示面の有効相互作用サイト数を増加させることで、標的分子の検出感度向上が可能であることが示唆された。一方、リガンド提示分子の高次構造体形成および固定化配向制御が可能となるよう、Coiled-coil 構造の形成を利用する分子デザインを施したところ、リガンド-アナライト間相互作用の検出感度の顕著な向上がみられ、標的分子を効率よく捕捉しうるナノバイオ界面の設計が可能であることがわかった。これらの検討により、CutA1 が多価化分子認識素子の安定な取得と利用が期待できる分子プラットフォームとなり得ることがわかった。

011-10

Cockroach proteins as a source of sustainable food

○Leonard Chavas

Nagoya Univ.

Insects remain fascinating in their capacity to evolve and adapt to an ever changing world. The Pacific Beetle Cockroach, as the only reported viviparous cockroach, gives food to its offspring by secreting some highly energy rich mixture containing in vivo grown protein crystals. Inspired from this mastery of packaging energy through crystal formation, biomimetics are being engineered to propose sustainable food solutions in response to climate change and foreseen worldwide food shortages. In the current presentation, I will highlight the uniqueness of the protein structure constituting these naturally in vivo grown crystals, and develop further on the bio-engineering potential toward the design of sustainable food.

011-09

非天然型 L- ビオチンに特異的に結合する光学異性体ストレプトアビジンの開発

○菅沼 政俊¹、久保 卓也¹、石木 健吾¹、田中 康太¹、須藤 浩三¹、江島 大輔¹、豊田 真弘²、津本 浩平^{3,4,5}、佐藤 利幸¹、西川 洋一¹¹シスメックス、²大阪府大院・理、³東大院・工・化生、⁴東大院・工・バイオエンジ、⁵東大・医科研

ストレプトアビジン/ビオチンの結合反応は非常に高親和性かつ高特異性な結合反応として知られているが、生体試料に適用した場合に内在性の D- ビオチンの影響を受ける、「ビオチン干渉」の問題があった。我々はストレプトアビジン/ビオチンの厳密な分子認識性に着目して、そのキラル特異性が成立するとの仮説に基づき、天然体と鏡像関係にあるストレプトアビジンの実現によるこの問題の解決を試みた。天然の L- アミノ酸と光学異性の関係にある D- アミノ酸によって構成されるコアストレプトアビジン配列のペプチドを合成し、インビトロリフォールディングによって機能性の人工タンパク質を取得することに成功した。この人工タンパク質、D- コアストレプトアビジンについて、ゲルろ過クロマトグラフィー、円二色性スペクトル、熱変性実験を実施した結果、天然体のコアストレプトアビジンに対して同様の物性と、鏡像性の高次構造を持つことが示唆された。また、表面プラズモン共鳴法による相互作用解析において、L- ビオチン特異的な結合を確認するとともに、アビジン・ビオチン反応を用いたイムノアッセイにおいて D- ビオチン共存下でもその影響を受けないことを確認した。この新しい人工タンパク質と L- ビオチンの組み合わせは、天然体のストレプトアビジン・ビオチンを代替する新しい分子認識技術となる可能性がある。

011-11

Engineering of DNA Sliding Ability And Target Search Elucidation Of Cas-family Proteins Using Single-Molecule Analysis

○Trishit Banerjee^{1,2}, Hiroto Takahashi¹,
Dwiky Rendra Graha Subekti^{1,2}, Kiyoto Kamagata^{1,2}¹IMRAM, Tohoku Univ., ²Dep. of Chem., Grad. Sch. of Sci., Tohoku Univ.

The genome editing protein Cas9 faces engineering challenges in improving off target DNA cleavage and low editing efficiency. Thus, we aimed to engineer Cas9 to be able to slide along DNA, which might facilitate genome editing and reduce off-target cleavage. Two approaches were used to achieve this: reducing the sliding friction along DNA by removing Cas9-DNA interactions and facilitating sliding by introducing the sliding-promoting tail of Nhp6A. Seven engineered mutants of Cas9 were purified, labelled and their performance was tested with the aid of single-molecule fluorescence microscopy by using single-tethered stretched DNA arrays (DNA Garden) and Highly-Inclined Illumination (HILO). Comparison of the mutations enabled the identification of key residues of Cas9 to enhance the sliding along DNA in the presence and absence of single guide RNA (sgRNA). The attachment of the tail to Cas9 mutants enhanced sliding along DNA. The sliding ability of Cas9 was improved up to 8-fold in the presence of sgRNA. Further, we would elucidate the target search mechanism of other Cas family proteins such as Cas1 and Cas2 which plays a crucial role in acquisition of viral DNA in bacteria and storing it as a memory of past infection.

011-12

Specific peptide conjugation boosts effector function and improves thermal stability of therapeutic antibody by blocking Fc dynamics

○ Masato Kiyoshi¹, Makoto Nakakido², Hiroko Shibata¹, Satoru Nagatoishi³, Kouhei Tsumoto^{2,3}, Yuji Ito⁴, Akiko Ishii-Watabe¹

¹National Institute of Health Sciences,

²Dept of Bioengineering, School of Engineering, The Univ. of Tokyo,

³The Institute of Medical Science, The Univ. of Tokyo,

⁴Dept of Chemistry and Bioscience, School of Science and Engineering, Kagoshima Univ.

Antibody-drug conjugates are powerful tools for combatting a wide array of cancers. Drug-conjugations to a therapeutic antibody often change molecular characteristics such as hydrophobicity and effector function, results in a deterioration of quality of the antibody. Attempting to develop a drug-conjugation methodology while maintaining the molecular characteristics, we engineered a specific peptide for conjugation to the Fc region of an antibody. In our study, trastuzumab, and a chelator (DOTA) were used as a model antibody and a model payload. Intriguingly, the peptide- and DOTA-conjugated trastuzumab exhibited remarkably higher effector function. Moreover, the thermal stability of peptide- and DOTA-conjugated trastuzumab was increased. Detailed structural and thermodynamic analysis clarified that the conjugated peptide blocked molecular dynamics of the antibody like a wedge. We revealed the mechanisms of that (1) decreased molecular entropy results in the increased effector function, and (2) blockade of denature of the Fc results in the increased thermal stability. This peptide conjugation technology opened a new window for entropy-based antibody engineering and is expected to be applied to broad-spectrum of therapeutic antibodies.

011-13

大腸菌ジヒドロ葉酸還元酵素を基盤とする化合物遺伝学的 Cre-loxP 遺伝子組換え制御技術の開発

○河野 風雲、佐藤 守俊

東京大院・総合文化研究科

部位特異的遺伝子組換え系はその高い誘導効率と組換えの忠実度から、真核生物の染色体上にある遺伝子を組換えるためのゲノム工学を実現する強力な技術である。今日までに、化合物や光で遺伝子組換えを誘導できる条件付きの誘導型遺伝子組換え系が多く開発されてきている。そうした誘導型の遺伝子組換え系はその技術の頑強性から遺伝子機能解明に大きく貢献してきた一方で、現在の技術はいずれも化合物や光で誘導する前に遺伝子組換え反応が起きてしまう、いわゆる「反応漏れ」を起こす共通の問題点があり、以前として未解決のままである。そこで本研究では、トリメトプリム依存的にタンパク質分解が抑制される大腸菌ジヒドロ葉酸還元酵素由来のユビキチン化タンパク質構造不安定化ドメイン系を利用した化合物誘導型の Cre 遺伝子組換え技術 (Sando III, R. et al., Nat. Methods 2013) に着目した。そして本研究では、当該既存技術と分割体タンパク質近接相補化再構成法を組み合わせた SPEED (split-protein-based efficient and enhanced degradation) 法を開発し、当該法を基盤とすることで「反応漏れ」問題を克服した Cre-loxP 遺伝子組換えの誘導制御に成功した。本 SPEED 法は、強力で頑強な化合物誘導型遺伝子組換え制御の実現だけに留まらず、タンパク質分解誘導が困難であった分子サイズの大きいタンパク質に対しても厳密な機能制御を実現する強力な化合物遺伝学として、生命科学研究における幅広い基盤技術になり得ることが期待される。

012-01

Shifting mechanism of absorption energy in intermediate states of bacteriorhodopsin

○ Tomoyasu Noji¹, Hiroshi Ishikita^{1,2}¹RCAST, The Univ. of Tokyo, ²Dept of Applied Chem., The Univ. of Tokyo

Rhodopsin is attracting attention as a tool in optogenetics, and it is necessary to elucidate its reaction mechanism. Bacteriorhodopsin is the most prominent rhodopsin, is a light-driven proton pump membrane protein. The retinal binds covalently to a lysine residue and forms a protonated Schiff base. The intermediates of the photocycle of rhodopsin are characterized by different of absorption wavelengths. However, theoretical approaches have never been able to reasonably explain the mechanism of the absorption wavelength changes for each intermediate. Because protonation states assumed in the calculation are not consistent with that determined by experimental results. In this study, we calculated protonation states, and the absorption energies based on the crystal structures of the bacteriorhodopsin and 11 intermediates/mutants by a quantum mechanics/molecular mechanics containing polarizable continuum model. The calculated protonation states and absorption energies were reasonably explained experimental results. It was clarified that changes in absorption wavelength are caused by the magnitude of the intramolecular charge transfer of the retinal Schiff base and the difference in the protonation state of the protein.

012-02

Integrated Simulation for Antiviral Drug Discovery and Design

○ Kowit Hengphasatporn, Yasuteru Shigeta

CCS, U of Tsukuba

During the COVID-19 pandemic, we were the first to describe models of the anti-HIV drug (lopinavir/ritonavir) and the main protease based on the available 3D structures and the international guidelines for clinical trial purposes and to predict the susceptibility of the known antiviral drugs using an ab initio FMO approach. The stockpiling lopinavir/ritonavir can inhibit this virus mainly through van der Waals interaction with the SARS-CoV-2 3CL pro suggested by the MM method. The FMO-MP2/PCM calculation revealed these drugs could block this enzyme at the catalytic site and oxyanion hole. Mechanistic details of enzyme-catalyzed reactions on proteolytic cleavage in viral proteases and the binding interaction of these antivirals proposed in this study are valuable for designing the novel compound. Recently, the brominated baicalein screened from FMO-based technique has been proposed as a promising antiviral that can inhibit 3CL pro. Significant interaction stabilized this compound in the binding site is the halogen-hydrogen interaction disclosed by FMO-RIMP2/PCM and the single-point calculation at the M06-2X/def2TZVPP/PCM level, which could describe the enzymatic reaction, catalytic rate constant, and crucial residues in a more accurate way.

012-03

低分子量熱ショックタンパク質による新規熱ショック応答制御機構

○三輪 つくみ、田口 英樹

東工大・研究院・細胞センター

熱などのストレスによって生じるタンパク質凝集(凝集体)は蓄積すると細胞毒性を示す。凝集体の処理にあたるのがシャペロンなどの熱ショックタンパク質(Hsp)である。中でも低分子量熱ショックタンパク質(small Hsp; sHsp)は凝集体処理の初期ステップである凝集体の隔離を担っている。sHspはATPを必要とせず、凝集体との結合によりその機能を果たす。さらに大腸菌 sHspであるIbpAは、自身のmRNAと結合し転写後段階の発現制御因子として機能することが示された(Miwa et al., 2020)。またIbpAはもう一つの大腸菌 sHspsであるIbpBの発現も制御することがわかっている。これはIbpAが複数の遺伝子に対する発現制御因子であることを示唆している。そこで本研究ではIbpAにより発現が調節される遺伝子を探索した。比較定量プロテオミクスを用いた解析により、IbpA過剰発現が複数のHspの発現減少を引き起こすことが示された。次いで行った個別解析ではIbpA過剰発現によるHspの発現抑制は転写段階の制御であることが示された。これを受け、Hspの主な転写制御因子である $\sigma 32$ に着目して更に解析を行った。その結果、IbpAは $\sigma 32$ の発現を翻訳段階で抑制することが示された。IbpAによる $\sigma 32$ 翻訳制御が再構成型無細胞翻訳系でも再現されたことから、この抑制は他の因子を介さずIbpAにより行われていると示唆された。 $\sigma 32$ は転写や分解、mRNA構造変化などにより細胞内存在量が調節されている。それらに加えIbpAによる翻訳制御機構が細胞内の $\sigma 32$ 量調節をさらに厳密なものにしていると考えられる。

012-04

大腸菌内で発現した翻訳後修飾組換え蛋白質を調製する方法の開発

大場 梓帆、小林 正和、柴田 篤志、安藤 千尋、平林 佳、

○鳥越 秀峰

東京理科大・理・応用化学

蛋白質の翻訳後修飾は、蛋白質の安定性や他の生体物質との相互作用など蛋白質の生物学的機能を議論する上で重要である。通常、翻訳後修飾蛋白質を大腸菌内発現組換え蛋白質として発現できない。未修飾蛋白質と翻訳後修飾に必要な酵素を試験管内で混合して、翻訳後修飾蛋白質を調製できるが、両方の蛋白質を組換え蛋白質として調製する必要があるため、煩雑である。これに対して、未修飾蛋白質と翻訳後修飾に必要な酵素を大腸菌内で共発現することで、翻訳後修飾蛋白質を大腸菌内で発現できれば利便性が高い。

本研究では、生体内でCdk1, Cdk2によるリン酸化修飾を多くの蛋白質が受けるため、このリン酸化蛋白質を大腸菌内発現組換え蛋白質として調製する方法を開発することを目的とした。具体的には、染色体末端のテロメア領域に結合する出芽酵母Cdc13蛋白質のCdk1によるリン酸化と、マウスDNAポリメラーゼ α (Pol α)のCdk2によるリン酸化を対象とした。Cdk1, Clb5, Cak1遺伝子を同一ベクターに挿入したプラスミドを構築し、Cdc13の発現プラスミドと共に大腸菌内で共発現するとCdc13を大腸菌内でリン酸化できた。またCdk2, CyclinA, Cak1遺伝子を同一ベクターに挿入したプラスミドを構築し、Pol α の発現プラスミドと共に大腸菌内で共発現すると、Pol α を大腸菌内でリン酸化できた。リン酸化蛋白質に特異的なPhosタグアガロースで精製したところ、各リン酸化蛋白質を単離できた。

012-05

In vitro reconstitution of a coordinated Kinesin-1 activation○ Kyoko Chiba¹, Shinsuke Niwa¹, Richard J. McKenney²¹FRIS, Tohoku Univ, ²UC Davis

Kinesin-1 is a plus-end directed microtubule motor composed of two kinesin heavy chains (KHC) and two kinesin light chains (KLC). Autoinhibition is an important regulatory mechanism for Kinesin-1, however, the molecular details remain unclear. In addition to the intramolecular regulation, previous studies have suggested involvements of cargo adaptor proteins and/or non-motor MAP (Microtubule-Associating Proteins) in Kinesin-1 activation. To unveil the complicated regulatory mechanism of Kinesin-1, we performed in vitro TIRF (Total internal reflection fluorescence) assay using purified proteins. Using in vitro reconstitution, we show that the KLC strongly inhibits the kinesin-microtubule interaction via an independent mechanism from the tail-motor interaction within KHC. Kinesin cargo-adaptor proteins that bind to the KLC activated processive movement of the kinesin tetramer but the landing rate of these activated complexes remained relatively low. The addition of MAP7, which specifically binds to the KHC, strongly enhanced the activated motor motility. Our results suggest that Kinesin-1 is regulated by a two-factor mechanism comprised of intramolecular regulation, as well as intermolecular kinesin-adaptor and kinesin-MAP interactions.

012-07

Oligomeric state change of IRE1 senses the level of stress○ Motonori Matsusaki^{1,2,3}, Takeshi Yokoyama⁴, Atsushi Tsugita⁴, Shingo Kanemura⁵, Michiko Tajiri⁶, Satoko Akashi⁶, Tomohide Saio¹, Kenji Inaba³, Masaki Okumura²¹Inst. of Adv. Med. Sci., Tokushima Univ., ²FRIS, Tohoku Univ.,³IMRAM, Tohoku Univ., ⁴Grad. Sch. of Life Sci., Tohoku Univ.,⁵Grad. Sch. of Sci., Kwansei Gakuin Univ.,⁶Grad. Sch. of Med. Life Sci., Yokohama City Univ.

The mammalian endoplasmic reticulum (ER) is an organelle that produces secretory proteins such as insulin, collagen, and IgG. Sometimes, the accumulation of misfolded proteins (ER stress) is caused by external environmental changes or the production of secretory proteins in excess of acceptable levels. Since ER stress can cause various diseases, cells have an ER stress response mechanism (UPR) that regulates the amount of molecular chaperones. The ER stress sensor, IRE1, initiates the UPR by oligomer formation at a microscopic scale under stress conditions. Interestingly, cells regulate UPR depending on the level of stress, but the molecular mechanisms are unknown. In particular, it is completely unclear how IRE1 determines the "stress level" at the molecular level. In this study, we investigated the hypothesis that the more misfolded proteins there are, the larger oligomers of IRE1 are formed. In the presence of misfolded proteins, the IRE1 oligomeric state was investigated by electrophoresis, mass spectrometry, and so on. The results showed that IRE1 changes its oligomeric state depending on the amount of misfolded proteins. This change in the oligomeric state suggests that IRE1 senses the level of stress at the molecular level.

012-06

Label-Free Autofluorescence Lifetime Imaging Revealed Protein Structural Changes in Droplets Formed via Liquid-Liquid Phase Separation

○ Shinya Tahara, Uchu Matsuura, Shinji Kajimoto, Takakazu Nakabayashi

Dept. of Pharm. Sci., Tohoku Univ.

Liquid-liquid phase separation (LLPS) is a phenomenon forming liquid droplets containing highly concentrated solutes. The droplets of pathogenic proteins formed via LLPS are reported to promote aggregation and cause the onset of diseases. Fluorescent labeling is widely used to study the proteins inside droplets, but it impairs the intrinsic protein structure. In this study, we constructed a UV-excited autofluorescence lifetime imaging system and succeeded in observing protein structural changes in a label-free manner.

We measured fluorescence lifetimes of tryptophan residues (Trp) of ataxin-3, a causative protein of the neurodegenerative disease, and found that the fluorescence lifetime of the droplet was longer than that of the dispersed solution. This result indicates that the environment around Trp is different between droplet and dispersed conditions. Furthermore, the lifetime was shown to become longer with the formation of the aggregates. The fluorescence lifetime of each Trp was investigated by preparing mutants of ataxin-3, and changes in hydrophobicity around each Trp were successfully observed. The protein structural changes associated with the aggregation via LLPS were discussed based on the obtained results.

012-08

アミロイド線維前駆中間体の構造発達とその阻害 - インスリン B 鎖とフィブリノーゲンを用いた研究例 -○山本 直樹¹、茶谷 絵理²¹自治医大・医、²神戸大・理

アミロイド線維はタンパク質の異常凝集体であり、様々なアミロイドーシスや神経変性疾患の原因物質であると考えられている。アミロイド線維形成に先立って、しばしば中間体の形成が観測されるが、そこからアミロイド線維形成に至る過程についてはまだ不明な点が多い。その理由として、明瞭な中間体が著しく蓄積する系があまり存在しなかったことが挙げられる。このような背景において、我々はインスリン B 鎖において大量に中間体が蓄積することを見出した。そこで本研究では、様々な分光学的手法、散乱手法、および電子顕微鏡を用い、アミロイド線維形成へ至る B 鎖中間体の構造発達を追跡した。B 鎖の中間体は長さ数百 nm の wavy な繊維状であり、時間経過とともに伸長することがわかった。また、少なくとも 2 種類の中間体を経てアミロイド線維形成に至り、超音波パルスを用いた実験より、第 1 中間体に次いで形成される第 2 中間体がアミロイド線維形成に直接関与していることが明らかになった。また、この構造発達ならびにそれに続くアミロイド線維形成は、血液凝固に関連するタンパク質、フィブリノーゲンによって阻害されることも分かった。小角 X 線散乱や電子顕微鏡の詳細な解析から、フィブリノーゲンは中間体表面を覆うことによって中間体の伸長を妨げていることが示唆された。これらの結果は、中間体の構造発達阻害がアミロイドーシスや神経変性疾患治療法の一つになりうることを示している。

012-09

インフルエンザ菌由来アドヘシン膜貫通ドメインは BamA によってナノディスクへアセンブリされる○青木 英莉子¹、藤原 和夫²、池口 雅道²¹創価大・糖鎖研、²創価大・生命理学

グラム陰性菌の外膜タンパク質は、主に膜貫通βバレル型のタンパク質である。それらの外膜タンパク質は、βバレルアセンブリ装置 (BAM) 複合体によって外膜に挿入されると知られている。しかしながら、BAM 複合体による膜挿入メカニズムは完全には明らかになっておらず、特に多量体外膜タンパク質の外膜挿入メカニズムはほとんど明らかになっていない。本研究では、BAM 複合体の機能に特に重要であると考えられている BamA をナノディスクに挿入した BamA 挿入ナノディスクを用いて、三量体外膜タンパク質であるインフルエンザ菌由来アドヘシン膜貫通ドメイン (HiaTD) の膜挿入メカニズムを調べた。変性状態の HiaTD とタンパク質の挿入されていない空のナノディスクを混合した結果、三量体化した HiaTD はほとんど観察されなかった。一方、BamA 挿入ナノディスクを用いた同様の実験では、三量体化した HiaTD が観察された。また、BamA は膜貫通βバレルドメインと5つのポリペプチド輸送関連 (POTRA) ドメインから構成されている。POTRA ドメインを欠損した BamA を用いて同様の実験を行った結果、三量体化した HiaTD の割合が減少した。これらの結果は、HiaTD のナノディスクへの挿入に BamA が必須であり、POTRA ドメインは HiaTD の効率的な三量体化に必要であることを示す。発表では、POTRA ドメインと変性 HiaTD の相互作用についても報告する。

012-10

Relevance of amorphous and amyloid aggregates of the p53 to its DNA-binding activity○Emi Hibino¹, Takeshi Tenno^{1,2}, Hidekazu Hiroaki^{1,2}¹Grad. Sch. Pharm. Sci., Nagoya Univ., ²BeCellBar

The tumor suppressor protein p53 is a transcription factor that prevents tumorigenesis by inducing gene repair proteins or apoptosis under DNA damage. Since the DNA-binding domain of p53 (p53C) is aggregation-prone, the anti-oncogenic function of p53 is often lost in cancer cells. This tendency is rather severe in some tumor-related p53 hotspot mutants, such as R175H. In this study, we examined the effect of small additives such as KCl and glucose (Glc), on the aggregation of p53C by monitoring two distinct aggregates: amorphous-like and amyloid-like. The amorphous aggregates are detectable with 8-(phenylamino)-1-naphthalenesulfonic acid (ANS) fluorescence, whereas the amyloid aggregates are sensitive to thioflavin-T (ThT) fluorescence. We found that KCl inhibited the formation of amorphous aggregates but promoted the formation of amyloid aggregates in a p53C R175H mutant. Subsequently, the structural transition was assessed by 1D-NMR and tryptophan fluorescence, and the DNA binding ability was evaluated by gel shift assay. KCl also suppressed the structural transition and loss of the DNA-binding function of p53C. Our observations indicate the existence of multiple steps of p53C aggregation, probably coupled with the dissociation of Zn.

012-11

Introduction of inter-domain SS bond into Fab domain improve antibody stability without affinity change

○Tomofumi Nakada, Shingo Maeta, Nobuyuki Ide, Atsushi Fukunaga

Sysmex Corporation

Antibodies are widely used not only for therapeutics but also for diagnosis. They must exhibit favorable physical properties, especially high thermal stability. Conventional antibody stabilization technologies are required individual optimization of each antibody without compromising affinity. In this study, we investigated to introduce inter-domain SS bond into the antibody species which have been industrial applied.

The mutation positions capable of forming SS bond between domains were selected based on the crystal structure of Trastuzumab (PDB: 1N8Z). The mutant of LC-SS (LP80C-LS171C) was designed on the basis of rabbit antibody. The mutant of HC-SS (HG10C-HP209C) was newly designed in this study. LC/HC-SS (LP80C-LS171C, HG10C-HP209C) was introduced cysteine residues at the above 4 positions. DSC showed that T_m value of the mutants was improved to 3.4, 4.3 and 8.0°C, respectively. SPR showed that there was no apparent change of affinity in all mutants. Similar results were observed in mouse antibody model.

Our technology showed a remarkable effect of synergistical improving only the stability of antibody without compromising its performance. This method can contribute to the developability of industrial applied antibodies.

012-12

氷結合タンパク質の動的挙動に基づいた生体内機能解析

○倉持 昌弘

茨城大・理工

氷結合タンパク質 (Ice-Binding Protein, IBP) は、氷結晶表面に吸着し、その成長を阻害するユニークなタンパク質である。これまで IBP の構造や氷結合能といった物性が明らかに一方、生体内で IBP がどのように機能し、凍結耐性を獲得するかについては不明点が多い。そこで、モデル動物線虫 *C. elegans* に、様々な種類の IBP を遺伝的に発現させ、凍結環境下における生存率を評価した。驚くべきことに、-5°C で 1 日飼育した後の線虫生存率は、野生型線虫が 7% だったのに対し、担子菌 TisIBP8 を発現する線虫は 72% と約 10 倍生存率が改善した。IBP 変異体を用いた解析から、IBP の氷結合機能と線虫凍結耐性に一定の相関があり、IBP 分子の構造特異的な氷結合能が、生体内においても重要な意義をもつことがわかった。次に生体内で IBP 分子がどのように氷晶に作用するか明らかにするため、サブナノメートルレベルの分子動態を捉える回折 X 線ブリンキング法を開発した。このオリジナル計測法を用いて、生きた線虫体内の IBP 分子を測定した。興味深いことに、-10°C では野生型 IBP 分子の動きが低下し、一方で機能欠損 IBP 変異体の動きは上昇した。野生型 IBP が氷晶と結合し、運動低下を示すのに対し、変異体 IBP は氷晶と結合できず、運動が上昇したものと推察でき、複数の氷ドッキングシミュレーションとも一致することがわかった。IBP 分子の構造、動的特性、機能、生体内効果を個体レベルで検証し、新しい保存技術に向けた基盤研究を進めている。

学生口頭発表 発表要旨

Student Oral Presentation

S01-01

Molecular dynamics analysis of light-harvesting1-reaction center core complex using Diffracted X-ray Blinking

○ Tatsunari Ohkubo^{1,2}, Shoko Fujimura², Tatsuya Arai^{2,3}, Jaewon Chang^{2,3}, Kouhei Ichiiyanagi⁴, Shunsuke Nozawa⁴, Ryo Fukaya⁴, Kazuhiro Mio^{1,2}, Yuji C Sasaki^{2,3}

¹Life Sci., Yokohama City Univ, ²AIST-UTokyo OPERANDO-OIL,

³Adv. Mater. Sci., The Univ. of Tokyo, ⁴KEK

The light-harvesting-reaction center complex (LH1-RC) is thought to have a light-induced conformation change like breathing and rotating movements of LH1 domain. We have analyzed the dynamics of LH1-RC from the photosynthetic bacterium *Blastochloris tepida* using a diffracted X-ray blinking method (DXB). In the DXB method, proteins are labeled with gold nanocrystals. X-ray diffraction spots are generated by irradiating the samples with monochromatic X-rays. The X-ray diffraction from moving single nanocrystals indicates the motion of target proteins. DXB measurement was conducted using NW14A at KEK, and the exposure time per frame was set to 50 msec. Our study revealed the enhancement of LH1-RC fluctuation movement by white light with a continuous spectral wavelength. We also confirmed the wavelength dependent activation using the laser lights with different wavelength. Laser light with 532 nm and 980 nm wavelength enhanced motion of LH1-RC from *B. tepida* while the 980 nm laser did not activate LH1-RC from *Thermochromatium tepidum*, which correspond to the absorption wavelength of these chromatophores. Calcium ions were also shown to modulate the LH1-RC motion from the analysis of probability density distribution of decay constants.

S01-03

鉄還元膜タンパク質 101F6- ナノディスクにおける電子移動反応の分光分析

○山口 葵、鏑木 基成、木村 哲就

神戸大・院理・化

癌抑制遺伝子として同定された 101F6 は Cytochrome *b*₅₆₁ (Cytb561) ファミリーに属する膜タンパク質であり、内分泌小胞膜に存在する。Cytb561 は 2 つの *b*-type ヘムをもち、アスコルビン酸から電子を受け取り、鉄結合サイトで鉄還元を行うことが明らかとされている。一方で、101F6 を発現させた細胞では、鉄過剰かつ酸素存在下において“Ferroptosis”と呼ばれる脂質過酸化による細胞死が起きている可能性が示唆されている。本研究の目的は、101F6 が不飽和脂肪酸過酸化に関与しているのかを明らかにすることである。そこで、101F6 をナノディスクに再構成し、その還元型からの電子移動によって、ナノディスクを構成する脂質が過酸化された場合の質量変化を、MASS スペクトル解析を用いて明らかにすることを試みた。101F6 と膜骨格タンパク質 (MSP)、飽和脂肪酸を含むリン脂質 DMPC または不飽和脂肪酸を含むリン脂質 POPC 存在下で混合し、ナノディスクに再構成された 101F6 (101F6-nd) のみを単離した。101F6-nd を還元したところ、紫外・可視吸収スペクトル測定から Cytb561 に特徴的な 561 nm の吸収バンドが確認できた。また亜ジチオン酸ナトリウムを反応させた還元型 101F6-nd の自動酸化が 26.2 min の時定数で起こることを確認した。この 101F6-nd に対して、生体内還元分子であるアスコルビン酸を反応させた還元型 101F6-nd を調製し、鉄イオンあるいは酸素有無を比較した脂質過酸化を検討し、101F6 の Ferroptosis 誘引の分子機構を明らかにする。

S01-02

狂犬病ウイルス P 蛋白質と STAT 分子間相互作用の特異性解析

○南 未来、杉山 葵、姚 閔、尾瀬 農之

北大院・生命科学

狂犬病は狂犬病ウイルス (RABV) の感染により引き起こされる人獣共通感染症である。発症後の致死率は 100% であり、年間約 6 万人もの死者が出ているため新規治療薬の開発が強く望まれている。宿主細胞が RABV の侵入を感知すると、免疫経路である JAK-STAT シグナル伝達経路の活性化により、ウイルスの排除システムを起動する。一方、RABV の P 蛋白質の C 末端ドメイン (RVP CTD) は STAT 分子と相互作用することで宿主の JAK-STAT シグナル伝達経路を阻害し、RABV の増殖に有利な環境を作り出す。以前、RVPCTD が STAT1 と直接相互作用することを報告した。また、細胞を用いた先行研究により、RVPCTD が STAT2-STAT1 ヘテロダイマーや STAT3-STAT1 ヘテロダイマーを阻害することも報告されている。しかし、RVPCTD と STAT 分子の複合体構造情報はなく、RVPCTD が STAT 分子を認識する機構は明らかになっていないため、RVPCTD が STAT2 や STAT3 を認識する際に、STAT1 を介して相互作用するのか、直接相互作用するかは不明である。本研究では RVPCTD による STAT 分子認識機構を明らかにするため STAT2、STAT3 の全長や欠損変異体を精製し、分子間相互作用解析を行った。

S01-04

二重スピンラベル ESR 分光法を用いた ABC トランスポーター BhuUV-T の ATP 結合状態の解析

○仲 絢香¹、小堀 康博^{1,2}、城 宜嗣³、杉本 宏⁴、木村 哲就¹

¹神戸大・院理・化、²神戸大・分子フォト、³兵庫県・院生命理、

⁴理研・Spring-8

ABC トランスポーターは ATP の結合・加水分解反応を利用し、膜間輸送を行う膜タンパク質である。膜貫通ドメイン (TMD) とヌクレオチド結合ドメイン (NBD) からなり、インポーターでは、ペリプラズム結合蛋白質 (PBP) が TMD に基質を運搬する。輸送を実現するためには、ATP の結合・加水分解が誘起する TMD の外向き・内向きの構造変化が必要だとされる。しかし輸送の前後で基質は化学的に変化しないため、構造変化と基質輸送の相関関係は未解明である。そこで、基質の移動を紫外・可視光領域に吸収を持ち、結合状態によって吸収波長が変化するヘムの取り込みを行う BhuUV-T を用いて観察した。その結果、PBP から TMD に、両者が複合体を形成することでヘムが受け渡され、ATP 添加によりヘムが輸送されることを明らかにしている。以上のヘムの移動がどのような構造変化と共役しているかを明らかにするために、TMD の運動性を解析することを試みた。TMD のペリプラズム側あるいは細胞質側にニトロキシド由来のスピンを二重標識し、CW-ESR 測定からラベルの運動性を評価した。PBP の結合により、TMD のペリプラズム側では運動性が増加し、細胞質側では抑制されることが分かった。さらに、ATP の結合に伴って PBP が解離すると、ペリプラズム側の運動性が元の PBP 非結合状態に戻ることを示された。以上の結果から、TMD の構造変化が PBP や ATP の結合と共役しており、運動性の増加によってラベル間の距離が大きくなると考えられるため、BhuUV は PBP 結合時に外向き構造をとると推測できる。

S01-05

化膿レンサ球菌のマルトース / マルトデキストリン結合蛋白質 SPs0871 の機能を阻害する VHH 抗体による基質結合阻害機構の解明

○山脇 つくし¹、中木戸 誠²、相川 知宏³、カアペイロ ホセ⁴、
中川 一路³、津本 浩平^{1,2,5}

¹ 東大院・工・化生、² 東大院・工・バイオエンジ、
³ 京大院・医・微生物感染分野、⁴ 九大・院薬、⁵ 東大・医科研

化膿レンサ球菌 (*Streptococcus pyogenes*) が引き起こす感染症に対しては、抗生物質を用いる治療が主流であるが、耐性菌の出現が報告されており、これに代わる治療法が必要とされている。そこで低コストで加工が容易な VHH 抗体による標的蛋白質の制御に注目した。SPs0871 は化膿レンサ球菌由来のマルトデキストリン結合蛋白質であり、病原性に欠かれない炭水化物の代謝に必要なマルトース / マルトデキストリンを取り込む ABC トランスポーターの構成蛋白質であると考えられている。本研究では、SPs0871 特異的に結合しマルトデキストリン獲得を阻害する VHH 抗体を取得し、その阻害機構を解明することを目的とした。これまでに取得した、*in vitro* においてマルトデキストリンの結合を阻害する VHH 抗体について、エピトープを特定するため重水素交換質量分析を用いた解析を行ったところ、グリコシル認識残基に近い領域において重水素交換率が低下した。さらに、SPs0871 と VHH 抗体複合体の結晶構造解析により、長い CDR3 がマルトデキストリン結合ポケットに入り込んでおり、そのためにマルトデキストリンの結合が阻害されていることが示された。また、重水素交換率が下がった領域では複合体を組むための水素結合が多く形成されていた。これらの結果より、VHH 抗体が溶液中において SPs0871 のマルトデキストリン結合領域に結合し、競合的にリガンド結合を阻害することが示唆された。

S01-07

Multiple antibacterial actions of cryptdin-4 and its reduced form against *E. coli* via oxidative stress and membrane disruption

○Yi Wang, Yuchi Song, Rina Hiramine, Tomoyasu Aizawa

Grad. Sci. Life Sci., Hokkaido Univ.

Cryptidin-4 (crp4) is an enteric α -defensin, which is regarded as one of the main effectors to confer immunity to oral infections and define the composition of the ileal microbiota. Structurally, crp4 performs two states: oxidized form (crp4oxi) constrained by three disulfide bonds and reduced form (crp4red) with six free thiol groups. In the study of their mode of action, both peptides could bind with whole cells as the first interaction between peptides and bacteria membrane. Crp4red showed deeper insertion into the cytoplasmic membrane, leading to rapid loss of intracellular components, which was an irreversible death process. Crp4oxi induced the membrane vesicles specifically with lower membrane permeabilization. In addition, the bactericidal activity of crp4oxi was strongly enhanced in the presence of oxygen, which indicated the role of oxidative stress in its bactericidal mechanism. Such oxidative damages were confirmed to directly trigger the death of bacteria and could be restored by the intake of antioxidants. Our data proposed different antimicrobial activities and mechanisms by one peptide, which was dependent on the redox structure of the peptide and the environmental redox situation.

S01-06

新規抗体の機能解析に基づく抗 CFH 自己抗体による aHUS 発症機構モデルの提案

○横尾 尚典¹、田部 亜季²、中木戸 誠^{1,2}、長門石 曉³、
カアペイロ ホセ⁴、吉田 瑤子⁵、池田 洋一郎⁵、
南学 正臣⁵、津本 浩平^{1,2,3}

¹ 東大院・工・化生、² 東大院・工・バイオエンジ、³ 東大医科研、
⁴ 九大・院薬、⁵ 東大附属病院腎・内分泌内科

非典型溶血性尿毒症症候群 (aHUS) は、補体系、特に副経路の機能異常を伴う疾患である。CFH は 20 個のドメイン (CCP1-20) からなり、補体蛋白 C3 と細胞上シアル酸に結合し、CFI による補体不活化を促す。CFH の異常は、補体の過剰活性化と細胞毒性を引き起こし、aHUS においては変異や C 末端に対する抗 CFH 自己抗体の存在が報告されるが、自己抗体に関する分子レベルでの解析は不明な点が多い。本研究では自己抗体産生機構解明に向け、モダリティとして CFH に対する VHH 抗体を取得した。そのうちの 1 つ VHH4 は、CFH を pM オーダーの高い親和性で認識し、ヒト赤血球を用いた溶血試験より、CFH の赤血球上シアル酸への結合を阻害することが示された。さらに CFH-VHH4 複合体の X 線結晶構造解析から VHH4 は既報の抗 CFH 自己抗体のエピトープである CCP20 のループを認識することが明らかになった。MD シミュレーションより自己抗体及び VHH4 のエピトープが CFH18-20 の中で最も柔軟性の高い領域であることが示された。最後に、変異体解析より、複数の点結合に加えて CDR3 ループが形成するポケットに CFH のトリプトファンを強固に取り込む VHH4 の非常に特徴的な認識機構を明らかにした。本結果は、抗 CFH 自己抗体が、CCP20 のループを認識するために VHH4 と同様の分子機構を持ち、CFH のシアル酸への結合を阻害することで aHUS 発症に至る可能性を示唆するものである。

S01-08

Construction of the over expression system of recombinant cryptdin family derived from mouse and determination of antimicrobial activity

○Yuchi Song, Yi Wang, Shaonan Yan, Tomoyasu Aizawa

Grad. Sch. of Life Sci, Hokkaido Univ.

The cryptdin (crp) is an antimicrobial peptide found in mouse small intestine and there are six isoforms. For production of recombinant crp by *E. coli* with avoiding undesirable degradation, co-expression with an aggregation prone partner protein were used for accelerating the formation of stable inclusion body. For improving the expression efficiency of all crps, strain which has mutations in reduction mechanism was used to enhance the formation of inter-molecular disulfide bridges between the partner and target protein. By this method we could obtain inclusion bodies contain large amount of crps. After separation from the partner protein by using cation exchange chromatography, crps were successfully refolded *in vitro*. Using this method, we successfully prepared large amounts of crps other than crp5, and treated the by-products with acid hydrolysis, which further improved the yield. We also measured the antimicrobial activity of crps against Gram-positive bacteria and Gram-negative bacteria, respectively. The antimicrobial activities of crp family against different bacteria have completely different tendency.

S01-09

マウス嗅覚受容体のシャペロン非依存的な機能発現に重要なアミノ酸部位の同定

○金牧 怜奈、養王田 正文、福谷 洋介

農工大・院工・生命工

哺乳類の嗅覚受容体（以下 OR s）は G タンパク質共役受容体に属する 7 回膜貫通タンパク質である。多くの ORs はタンパク質の立体構造が不安定なため、異種細胞で発現させようとした際に小胞体で停留し細胞膜に局在できない。OR の機能発現には Receptor transporting protein 1S(RTP1S) の補助を必要とする。所属研究室では RTP1S の補助を受けずに単独で細胞膜に局在するマウス OR (RTP 非依存型 OR) の発見に成功している。本研究では、RTP 非依存型 OR の中でも特に高発現するマウス Olfr733 と、RTP 依存型 OR である Olfr733 とアミノ酸相同性 93% で立体構造モデルも非常に類似する Olfr732 に着目し、Olfr733 の RTP 非依存性発現に重要なアミノ酸の同定を目指した。Olfr732 に対し Olfr733 と異なる 22 箇所のアミノ酸をカバーする計 13 種の変異体を作製した。各 Olfr732 変異体を Hana3A 細胞に発現させ、Olfr733 が応答し、Olfr732 が応答しないヘキサナールで刺激したところ G112F と L148P の 2 つの変異体が応答を示した。さらに、G112F と L148P の両変異を加えると Olfr732 が RTP 非依存的に細胞膜に局在するようになり、Olfr733 とほぼ同様のヘキサナール応答を示した。そこで、Olfr733 の F112G、P148L 変異体を構築したところ、F112G は細胞膜局在への影響はなくヘキサナール応答が低下し、P148 は細胞膜局在性が顕著に低下した。このことから、Olfr733 の F112 がリガンド認識に、P148 が細胞膜局在性に寄与する立体構造安定性にそれぞれ重要な役割をすることが示唆された。

S02-01

イネ花成ホルモン蛋白質複合体の液-液相分離と花成制御

○榎本 麻由¹、安澤 すあい¹、小泉 優香¹、田岡 健一郎²、児玉 高志³、藤原 敏道³、辻 寛之²、児嶋 長次郎^{1,3}

¹ 横浜国大学大学院理工学府、² 横浜市立大学木原生物学研究所、³ 大阪大学蛋白質研究所

植物は最適な日長を感知して、フロリゲンという花成ホルモン蛋白質を葉で合成する。合成されたフロリゲンは茎頂分裂組織に運ばれて花成を誘導する。我々はイネのフロリゲン Hd3a がフロリゲン受容体および転写因子とフロリゲン活性化複合体 FAC を形成し花成を誘導することを明らかにしてきた。最近、辻らは超解像顕微鏡で Hd3a が核内で凝集体を形成することを観察したが、その分子機構や生理的意義は不明である。一方、近年蛋白質や RNA が液-液相分離による凝集体を形成して生理機能を発現することが分かってきた。そこで、本研究では Hd3a および FAC が相分離によって核内凝集体を形成し花成を制御しているのではないかと考え、Hd3a および FAC の試験管内での相分離を評価することでこの仮説の検証を進めることとした。試験管内で細胞内の分子混雑状態を再現するためポリエチレングリコール PEG8000 を用い、紫外可視領域での散乱によって相分離を評価する系を確立した。Hd3a では相分離が観測されたが、受容体 GF14c では相分離は起こらず、また、転写因子 OsFD1 は Hd3a ほど明確な相分離ではなかった。しかし、Hd3a および OsFD1 は GF14c 添加によって相分離は促進された。一方、FAC を形成できない Hd3a 変異体では、GF14c による相分離促進効果が抑制された。また FAC を形成できるのに花成促進できない変異体 Hd3a の中には、GF14c による相分離促進効果が見られないものがあつた。これらの結果から、花成には FAC 形成だけでなく、FAC の相分離が重要な役割を果たすことが示唆された。

S01-10

アンモニア応答 G タンパク質共役受容体の同定

○齋藤 芽生¹、福谷 洋介¹、江口 諒²、田澤 寿明²、養王田 正文¹

¹ 農工大・院工・生命工、² エステー株式会社

生物は環境中の様々な匂い分子を嗅覚によって知覚している。哺乳類の嗅神経細胞に発現する匂い分子に反応する G タンパク質共役受容体は嗅覚受容体 (OR) と微量アミン関連受容体 (TAAR) に分類される。OR と TAAR のアミノ酸保存性は異なるものの、共役する G タンパク質と下流のシグナルは共通する。特有の刺激臭を示すアンモニア (NH₃) は分子量 17 の最小の匂い分子であるが、NH₃ に反応する受容体は同定されていない。本研究では NH₃ に反応する受容体の探索と、NH₃ 応答性受容体の NH₃ 結合様式の解明を目的とした。319 種のヒト OR、6 種のヒト TAAR、12 種のマウス TAAR 発現細胞に対し、気相中のニオイ応答を評価できる気相刺激アッセイ法を用いて NH₃ 応答を評価した。その結果ヒトおよびマウス TAAR5 が唯一 NH₃ に対して応答を示し、NH₃ 気相濃度依存的な応答も確認した。次に他の TAAR でアミン結合部位と報告されているマウス TAAR5 の D114 変異体を構築した。D114 変異体は概ね細胞膜局在は変化をなかったが、NH₃ に対する応答が消失した。このことから TAAR5 の D114 が NH₃ 認識に関与すると考えられた。また、数種のアンモニウム塩溶液に対する TAAR5 の応答を評価したが特に応答を示さなかった。さらに NH₃ と孤立電子対を持つ低分子アミンの TAAR5 応答強度を比較したところ、NH₃ と同等の応答を示した。以上の結果から、TAAR5 が NH₃ 応答性受容体であることを同定し、そのリガンド結合には TAAR 間で保存されているアスパラギン酸が NH₃ 分子の認識に重要な役割をすることを明らかにした。

S02-02

Paenibacillus 属のべん毛固定子複合体の構造解析

○尾上 さくら¹、錦野 達郎²、竹川 宣宏³、岸川 淳一²、加藤 貴之²

¹ 阪大・生命、² 阪大・蛋白研、³ 阪大・理学部

多くの細菌は、菌体からのびる複数のべん毛を回転させることで遊泳運動の推進力を得ている。べん毛の根本には超分子複合体べん毛モーターが存在し、それは回転子とその周りを取り囲む固定子から構成される。固定子はイオンを細胞膜外から流入させる際のエネルギーを、回転エネルギーに変換することで回転子を回転させる。多くの細菌の固定子は H⁺ や Na⁺ 等の一価のカチオンを利用するが、*Paenibacillus sp.* TCA20 がもつ固定子複合体 MotA1B1 は Mg²⁺ や Ca²⁺ 等の二価カチオンを特異的に透過すると報告された (Imazawa *et al.*, 2016)。我々はこのモーターの機能を大腸菌内で解析するために、大腸菌がもつ H⁺ 駆動型固定子複合体 MotAB と MotA1B1 のキメラを作製した。機能解析を行ったところ、イオン選択領域である膜貫通ドメインが MotA1B1 であるにも関わらず、キメラ固定子複合体は H⁺ を利用していると示唆された (Onoe *et al.*, 2020)。本研究では、大腸菌内で機能したキメラ固定子複合体の構造を cryoEM による単粒子解析法を用いて解析したところ、3.0 オングストローム分解能の構造が得られた。5 量体の MotA1 リングと MotB1 の 2 本の膜貫通領域が観察された。MotA1 リングは、対称性が崩れたような構造が複数存在し、フレキシブルな構造変化の可視化に成功した。これまでに報告された固定子複合体と比較することで、機能について議論をしたい。

S02-03

Structure and engineering of the minimal type VI CRISPR-Cas13bt3

○ Ryoya Nakagawa¹, Soumya Kannan^{2,3}, Satoru. N Takeda¹, Atsuhiko Tomita¹, Hisato Hirano¹, Tsukasa Kusakizako¹, Tomohiro Nishizawa⁴, Keitaro Yamashita⁵, Feng Zhang^{2,3}, Hiroshi Nishimasu^{1,6,7}, Osamu Nureki¹

¹Dept. of Biol. Sci., The Univ. of Tokyo, ²Broad Inst. of MIT and Harvard,

³McGovern Inst. for Brain Res. at MIT, Massachusetts Inst. of Tech.,

⁴Grad. Sch. of Med. Life Sci., Yokohama City Univ., ⁵MRC lab. of Mol. Biol.,

⁶Structural Biol. Div., Res. Cst. for Advanced Sci. & Tech., The Univ. of Tokyo,

⁷Inamori Res. Inst. for Sci.

Type VI CRISPR-Cas13 effector enzymes catalyze RNA-guided RNA cleavage, and are harnessed for various technologies, such as RNA detection, targeting, and editing. Recent studies identified Cas13bt3 as a miniature Cas13 protein, which can be used for targeting and editing for target transcripts in mammalian cells. However, the action mechanism of the compact Cas13bt3 remains unknown. Here, we report the crystal structure of Cas13bt3-guide RNA binary complex and the cryo-EM structure of Cas13bt3-guide RNA-target RNA ternary complex. These structures, together with our mutational experiments, single-molecular analyses and molecular dynamics simulations, provide novel mechanistic insights into guide RNA recognition and target RNA cleavage by Cas13bt3. To improve the utility of Cas13bt3 in RNA targeting and editing technologies, we rationally engineered enhanced Cas13bt3 variants and ultracompact RNA base editors. Furthermore, we developed an accurate, rapid, and robust ssRNA detection platform, by combining CRISPR-Cas13-based RNA detection and microchamber-array technologies. Overall, these studies improve our mechanistic understanding of the CRISPR-Cas13 enzymes and pave the way for the development of Cas13-mediated RNA technologies.

S02-05

Structure and dynamics of Human Lysophosphatidic Acid Receptor 1

○ Hiroaki Akasaka, Tatsuki Tanaka, Fumiya Sano, Wataru Shihoya, Osamu Nureki

Dept. of Bio. Sci., The Univ. of Tokyo

Lysophosphatidic acid receptor 1 (LPA₁) is one of the six G protein-coupled receptors activated by the bioactive lipid, lysophosphatidic acid (LPA). LPA₁ is a drug target for various diseases, including cancer, inflammation, and neuropathic pain. Notably, LPA₁ agonists have potential therapeutic value for obesity and urinary incontinence. Here, we report the cryo-electron microscopy structure of the active human LPA₁-G_i complex bound to the newly developed LPA analog ONO-0740556. Our structure elucidated the details of the agonist binding mode and receptor activation mechanism mediated by rearrangements of transmembrane segment 7 and the central hydrophobic core. A structural comparison of LPA₁ and other phylogenetically-related lipid-sensing GPCRs identified the structural determinants for lipid preference of LPA₁. Moreover, we characterized the structural polymorphisms at the receptor-G-protein interface, which potentially reflect the G-protein dissociation process. Taken together, our study provides insights into the detailed mechanism of LPA₁ binding to agonists and paves the way toward the design of druggable agonists targeting LPA₁.

S02-04

Structural analysis of the hepatitis B virus entry receptor NTCP

○ Junta Asami¹, Kanako Kimura-Terakado², Yoko Fujita-Fujiharu^{3,4,5}, Hanako Ishida¹, Zhikuan Zhang¹, Yayoi Nomura², Kehong Liu², Tomoko Uemura², Yumi Sato², Masatsugu Ono², Masaki Yamamoto⁶, Takeshi Noda^{3,4,5}, Hideki Shigematsu⁶, David Drew⁷, So Iwata^{2,6}, Toshiyuki Shimizu¹, Norimichi Nomura², Umeharu Ohto¹

¹Grad. Sch. of Pharm. Sci., The Univ. of Tokyo, ²Grad. Sch. Med., Kyoto Univ.,

³Inst. Frontier Life and Med. Sci., Kyoto Univ.,

⁴Grad. Sch. Biostudies, Kyoto Univ., ⁵CREST, ⁶RIKEN Spring-8 Center,

⁷Dep. Biochemistry and Biophysics, Stockholm Univ.

Sodium-taurocholate co-transporting polypeptide (NTCP) is a nine-transmembrane protein expressed on hepatocyte membrane and functions as an entry receptor for hepatitis B virus (HBV) as well as a bile acid transporter. HBV attaches to NTCP on the host cell surface through the preS1 region of the viral surface membrane protein LHB. We determined the cryo-electron microscopy (cryo-EM) structure of human NTCP (apo-state) in complex with its conformation-specific antibody Fab at a resolution of 3.4 angstrom. NTCP is composed of core and panel domains conserved among family proteins, and has a transmembrane tunnel between these domains, through which the substrate might be transported. In addition, cryo-EM analysis in the presence of preS1 revealed the additional densities, possibly due to part of preS1, at the extracellular opening of the tunnel. Mutations at residues near the putative preS1-densities such as G158A and S267F were found to reduce the preS1 binding in the pull-down analysis. These results suggest that the extracellular region of the tunnel of NTCP can be used as one of the preS1 binding sites. These findings provide structural insights into the mechanism of HBV recognition by NTCP.

S02-06

理論計算と進化分子工学の融合によるリガンド結合非依存的に活性型ヘシフトする GPCR 変異体のスクリーニング

○山本 大生¹、笠井 倫志^{2,3}、肥喜里 志門¹、藤原 敬宏⁴、中野 僚介¹、菅谷 幹奈¹、安田 賢司¹、小笠原 諭¹、白石 充典⁵、木下 正弘¹、村田 武士¹

¹千葉大・理・化、²岐阜大・糖鎖コア、³京大・ウイルス再生研、

⁴京大・WPI-iCeMS、⁵東理大・先進工学・生シス

GPCR は生体内で活性型と不活性型の平衡状態で存在しており、ホルモンなどを含むリガンドのうちアゴニストが平衡状態の GPCR に結合することで、G タンパク質の結合に伴い細胞内シグナルが伝達される。このように GPCR は細胞内シグナルを制御することから重要な創薬ターゲットになりつつある。これを安定化することで構造解析が可能になり、構造ベースのドラッグデザインが可能になる。我々はすでに熱統計力学に基づいた独自の理論計算による安定化予測手法(エントロピー基盤法)を用いて不活性型構造の安定化に成功している。しかし、リガンド非結合状態での活性型構造の安定化には至っていない。そこで我々は理論計算と進化分子工学を融合し、リガンド非結合状態でも活性型に平衡がシフトする変異体のスクリーニング手法を開発した。今回はヒトアデノシン A2a 受容体をモデル GPCR として、理論計算で活性型安定化に寄与するアミノ酸を予測し、そのアミノ酸に対してランダムに変異導入することで変異ライブラリーを作製した。この変異ライブラリーを出芽酵母改変株による発現させた GPCR の評価系によってスクリーニングした。その結果、アゴニストの結合親和性は野生型と変わらないが、アゴニスト非存在下でも G タンパク質の結合活性が大きく向上した変異体を獲得した。構造予測からも変異体の G タンパク質結合活性は向上していることが示唆されており、アゴニスト非依存的に平衡が活性型に固定化されていることが明らかになった。

S02-07

細菌エンザイム型 RNase P (HARP) と基質 tRNA 前駆体複合体のクライオ電子顕微鏡解析

○児安 剛志¹、寺本 岳大¹、安達 成彦²、川崎 政人²、
守屋 俊夫²、千田 俊哉²、角田 佳充¹

¹ 九大・農・生機、² 構造生物学研究センター・KEK

リボヌクレアーゼ P (RNase P) は、前駆体 tRNA の 5' リーダー配列の切断を触媒するエンドヌクレアーゼである。RNA が触媒機能を担うリボザイム型 RNase P や真核生物のタンパク質が触媒機能を担うエンザイム型 RNase P (Protein-only RNase P: PRORP) は広く研究されているが、細菌や古細菌においては、エンザイム型 RNase P (HARP) による前駆体 tRNA の認識・切断メカニズムは不明である。そこで、我々は超高温性細菌 *Aquifex aeolicus* 由来の HARP を大腸菌を用いて発現させ、クライオ電子顕微鏡単粒子解析により構造決定した。この HARP は、約 23 kDa 程度の小さなタンパク質であり、一次配列情報から前駆体 tRNA 認識ドメインを持たないと考えられていたが、決定した立体構造により、HARP はヌクレアーゼドメインと 2 つの α ヘリックスで構成される PrH ドメインをもつことが明らかになった。予想に反して HARP は、PrH ドメインを介して二量体を形成し、6 つの二量体が集まることで 12 量体を形成していた。さらに、前駆体 tRNA とのドッキングモデルにより、HARP は 12 量体中の隣接する 2 つの二量体を用いて、一方の二量体が 5' リーダー配列の切断を、もう一方の二量体が tRNA に特有のエルボー領域の認識を担うことで前駆体 tRNA の特異的切断が達成されることが明らかになった。この認識様式は、巨大 RNA (110kDa) からなるリボザイム型の認識様式と類似しており、RNA の役割がタンパク質へ移行する過程で、最小のタンパク質で機能を持つための戦略であると考えられる。

S02-09

偏性嫌気性細菌由来 Mn-カタラーゼ様タンパク質の構造解析

○野村 葵¹、門倉 佳輝^{1,2}、庄村 康人^{1,3}

¹ 茨大・理工・量子、² 茨大・工・生体分子、³ 茨大・フロンティア

Mn-カタラーゼはこれまでに好気性真正細菌やシアノバクテリア由来のものしか報告例が無いが、近年のゲノム解析により一部の偏性嫌気性細菌も Mn-カタラーゼと相同性が高い遺伝子をもつことが明らかになった。本研究では、偏性嫌気性細菌 *Clostridium acetobutylicum* 由来 Mn-カタラーゼ様タンパク質を大腸菌発現系から調製し、その生理的機能の解明を試みた。

大腸菌によって産生したタンパク質を Strep-Tactin カラムと陰イオン交換カラムを用いて精製を行った結果、高純度の精製標品が得られた。室温で生成した結晶の X 線結晶構造解析の結果、C 末端領域と一部のループ領域の電子密度が観測されず、これらは一定の構造を取らずに揺らいでいる、もしくは結晶化の過程で切除された可能性が示唆された。そこで、精製試料を室温および 4 度で二か月間保管した後に SDS-PAGE で解析した結果、前者は複数の部位で切断されていたのに対し、後者は精製直後の状態を保っていたため、結晶化の過程で切除されたと結論付けた。また、C 末端領域の構造が Ca イオンとの結合によって安定化するかどうかを検討するため、Ca イオン存在下・非存在下で X 線小角散乱測定を行った。その結果、両者の散乱曲線の形状にはほとんど違いが無く、慣性半径や分子の最大長からは一定の構造を取らない領域の存在が示唆された。また、野生体と C 末端欠損体のカタラーゼ活性を測定したところ、どちらにも活性が見られなかったことから、このタンパク質の機能は別にあると考えられる。

S02-08

Structure of cyanobacterial photosystem I complexed with Cytochrome c6 and Ferredoxin

○Jiannan Li¹, Noriyuki Hamaoka¹, Fumiaki Makino²,
Akihiro Kawamoto¹, Keiichi Namba^{2,3,4,5}, Christoph Gerle^{1,5},
Genji Kurisu^{1,6}

¹ Inst. Prot. Res., Osaka Univ., ² Grad. Sch. of Front. Biosci., Osaka Univ.,

³ JEOL YOKOGUCHI Res. Alli. Lab., Osaka Univ., ⁴ RIKEN, BDR,

⁵ RIKEN, Spring-8, ⁶ OTRI, Osaka Univ.

The light-dependent reactions of oxygenic photosynthesis start from photon absorption and drive the electron originating from water to the downstream electron carrier proteins. Huge protein-pigment complex Photosystem I (PSI) is one of the most efficient energy converters in nature, which could execute charge separation using solar energy funneled by the surrounding antenna pigments. The activated electron is then delivered to the electron receptor Ferredoxin (Fd) at the stromal side of thylakoid through PSI-internal electron transfer chain. The electron-lost reaction center could then be reduced by obtaining electron from donor protein Cytochrome (Cyt) c_6 at the luminal side of thylakoid, and become ready for the next round of electron transfer.

For deeper understanding of the redox-dependent protein-protein interaction around PSI, structures of PSI together with its electron donors and receptors in higher resolution are required. In this study, together with the results of isothermal titration calorimetry measurements on Fd binding to PSI, we determined the structure of cyanobacterial PSI from *T. elongatus* BP-1 bound with its electron transfer partners Fd and Cyt c_6 by single particle Cryo-EM at an overall resolution of 1.97 angstrom.

S02-10

クライオ電子顕微鏡を用いた Cas13b-ADAR2 複合体の構造解析

○石川 潤一郎¹、加藤 一希²、岡崎 早恵²、西増 弘志^{1,2}

¹ 東大・理・生科、² 東大・先端研

原核生物の CRISPR-Cas 獲得免疫機構に関与する RNA 依存性 RNA 切断酵素 Cas13 はガイド RNA と複合体を形成し、ガイド RNA と相補的な RNA の存在下で活性化し 1 本鎖 RNA を配列非依存的に切断する。したがって、Cas13 は真核細胞における RNA ノックダウンや RNA 編集技術などに広く応用されている。RNA 切断活性を消失させた Cas13 (dCas13) と脱アミノ化酵素 ADAR2 の融合タンパク質 dCas13-ADAR2 を用いることにより、標的となる RNA 中の特定のアデニンをイノシン (グアニンとして翻訳される) に編集することができる。この RNA 編集技術は REPAIR (RNA Editing for Programmable A-to-I Replacement) とよばれ、G → A 変異に起因する遺伝子疾患の治療への応用が期待されている。しかし、dCas13-ADAR2 による RNA 認識・編集機構は不明であった。本研究ではクライオ電子顕微鏡を用いた単粒子構造解析により、dCas13-ADAR2-ガイド RNA-標的 RNA 複合体の立体構造を 3.7 Å 分解能で決定した。立体構造から、1) 2 つの HEPN ヌクレアーゼドメインはガイド RNA-標的 RNA 二重らせんと相互作用せずにデイスオーダーしていること、2) ADAR2 は RNA 二重らせんに結合しフリップアウトした標的アデニン塩基を認識していること、3) Cas13 がガイド RNA のリピート領域を特異的に認識していること、が明らかになった。今回決定した dCas13-ADAR2-ガイド RNA-標的 RNA 複合体構造は REPAIR による RNA 認識・編集機構を明らかにするのみならず、新規 RNA 編集ツールの合理的設計の基盤ともなることが期待される。

S03-01

構造サンプリングの効率化のための分子動力学法の開発とアミロイド β (16-22) ペプチドへの適用○福原 大輝^{1,2}、伊藤 暁^{1,2,3}、奥村 久士^{1,2,3}¹ 総研大、² 分子研、³ 生命創成探究センター

分子動力学法は分子を構成する原子の運動方程式を解くことにより、分子の運動や構造変化を調べることができる。タンパク質は複雑かつ様々な構造を取り得るので、通常の温度一定の分子動力学法ではその構造を網羅的にサンプルすることができない。レプリカ交換法によって頻繁に温度を変化させることにより、タンパク質の構造を変化させ、様々な構造をサンプルできるようになった。また、レプリカ交換法を発展させることで、レプリカ置換法や Replica exchange with solute tempering (REST) 法が開発されてきた。本研究ではレプリカ置換法と REST 法の二つの手法を組み合わせることで、タンパク質の構造サンプリングを効率的に行う新規計算手法 Replica permutation with solute tempering (RPST) 法の開発を目指した。その手法をアルツハイマー病の原因タンパク質であるアミロイド β (16-22) ペプチドに適用することで、従来の計算手法との比較を行った。その結果、新規手法は温度空間、構造空間ともに、最も効率よくサンプルできることが明らかになった。さらに、計算結果をもとにアミロイド β (16-22) ペプチド 2 分子の二量体化過程について探究した。その過程を考察することによって、アミロイド β ペプチドの凝集の初期段階の解明につながることが期待される。

S03-03

全原子分子動力学シミュレーションによるヒト L 型アミノ酸トランスポーター LAT1-CD98hc 複合体の基質輸送メカニズムの解析

○吉田 夏海¹、浴本 亨¹、山根 努²、池口 満徳^{1,2}¹ 横浜市大・生命医、² 理研・R-CCS

L 型アミノ酸トランスポーター 1 (LAT1) は、大型中性アミノ酸とそれらの誘導体を交換輸送する SLC トランスポーターの 1 つである。LAT1 は種々のがんで高発現し、必須アミノ酸の供給によってがんの増殖に寄与することからがん治療の創薬標的となっている。12 回膜貫通型タンパク質である LAT1 は、細胞外側が開いた outward-facing (OF) 構造と、細胞内側が開いた inward-facing (IF) 構造間を推移しながら、基質輸送を行うと考えられている。近年、クライオ電子顕微鏡法によって LAT1-CD98hc 複合体の立体構造が OF/IF とともに複数報告された。しかし、基質輸送中の OF から IF に至る構造変化と輸送の関係は明らかとなっていない。本研究では、LAT1 の構造変化とカップルする基質輸送過程を原子レベルで理解するため、全原子分子動力学シミュレーションによる基質輸送シミュレーションを実施した。基質である Phe の細胞内側への自発的な輸送イベントから、輸送過程と構造変化の関係を解析した。

S03-02

蛋白質構造情報に基づく化合物結合サイト予測の高精度化

○工藤 玄己¹、吉野 龍ノ介^{2,3}、重田 育照^{1,4}、広川 貴次^{2,3}¹ 筑波大・物理、² 筑波大・医学医療系、³ 筑波大・TMRC、⁴ 筑波大・CCS

蛋白質と化合物の相互作用は「鍵と鍵穴モデル」に称される。そのため、薬となるような合理的な化合物 (鍵) の設計においては、正確な蛋白質ポケット (鍵穴) の認識が重要となる。fpocket は代表的な蛋白質ポケット検出ソフトウェアの 1 つであり、化合物が結合し得るポケット箇所を高精度に予測することが可能である。一方で、予測されたポケット形状は実際の結合リガンド形状よりも過剰に見積もられることが多く、適切な化合物設計の妨げとなっている。本研究では、このポケット形状予測の誤差を改善するため、結合リガンド形状を目標に fpocket により予測されたポケット形状を補正する手法を開発した。具体的には、予測ポケットを構成する各 α 球の密度を計算し閾値よりも低い密度の α 球を削除する、トリミングアプローチを検討した。このトリミングの判定に必要な密度閾値に含まれるパラメータ等については、既知の複合体データセットを用いて最適化を行った。続いて最適化された閾値を用いて、テスト用複合体データセットによる本手法の妥当性の検証を行った。補正されたポケットとリガンドの形状比較を行った結果、約 80% の複合体で精度向上が確認され、本手法の有効性が示唆された。本発表では、このトリミングアプローチを Hit to Lead の複合体に適用した結果についても紹介する。

S03-04

転写開始複合体における TFIIH による DNA 開裂過程の分子シミュレーション研究

○篠 元輝、高田 彰二

京大・理・生物科学

近年、極低温電子顕微鏡や 1 分子実験等により、転写開始過程の分子機構が盛んに研究されている。真核生物におけるタンパク質コード遺伝子の転写は、DNA 上に RNA ポリメラーゼ II (Pol II) と 6 つの基本転写因子が集合する転写開始前複合体の形成と DNA 開裂に起因する。DNA 開裂では、基本転写因子のひとつである TFIIH の ATP トランスロカーゼサブユニット Ssl2 が、DNA 下流を Pol II の活性中心に向かって 1 塩基ずつ回しながら押し込むことにより、Pol II 内部で DNA 転写バブルが形成される。しかし、DNA 開裂が起こるまでにどのような過程を経るのか、詳細には判明していない。本研究では、アミノ酸を 1 粒子、ヌクレオチドを 3 粒子とする粗視化表現を用いた分子動力学シミュレーションによって、TFIIH Ssl2 の作用による DNA 開裂過程の研究を行った。複合体の構造モデルとして、極低温電鏡による酵母の DNA 開裂前にあたる Closed Complex (CC)、DNA 開裂後の Open Complex (OC) を用いた。Ssl2 による DNA の押し回転を模倣するために、DNA 下流にある特定の塩基の初期位置 (r_0 とする) を記録し、下流側隣にある塩基を r_0 まで移動させる操作を実行した。これを繰り返すことで、OC における DNA 転写バブルが形成されるまでにどの程度 DNA を回転させる必要があるか調べられる。その結果、少なくとも 10 回塩基を回転させることで DNA 転写バブル形成に到達することがわかった。

S03-05

転写因子 Nanog の二量体形成と液液相分離に関する全原子および粗視化シミュレーション研究

○水谷 淳生¹、Tan Cheng²、杉田 有治²、高田 彰二¹

¹京大・理・生物、²理研・計算科学

哺乳類胚性幹細胞の多能性維持や分化は Oct4、Sox2、Nanog 等のマスター転写因子によって制御されている。最近これら転写因子の転写制御機構として天然変性領域を介した液液相分離の役割が議論されている。本研究は Nanog を対象にその構造、動態、相互作用について研究を行った。Nanog タンパク質の特徴として、C 末端側の天然変性領域中に Trp 繰り返し (WR) 領域がある。先行研究からこの領域を介してホモ二量体を形成し、この能力が Nanog の機能発現には重要であることがわかっている。WR 領域の Trp の Ala 置換は Nanog の機能に強い影響を与える。本研究では全原子モデルによる WR 領域についての詳細な構造解析、およびアミノ酸 1 分子を 1 粒子とする粗視化モデルによる二量体形成および液液相分離のシミュレーションを行った。まず全原子モデルにより、WR 領域の野生型および Trp-Ala 置換体の構造サンプリングを行った結果、野生型は Trp の疎水性相互作用によってコンパクトな構造をとった。次に、粗視化モデルにおいて、最近の液液相分離計算に用いられることの多い Hydrophobicity scale (HPS) 相互作用を用い、そのパラメータを調節することで液液相分離現象を表現した。また、同じモデルにより、WR 領域を介した Nanog ホモ二量体の形成を確認した。さらに幾つかのアミノ酸置換体や欠損変異体でのシミュレーションを行い、その結果を野生型と比較する。

S03-07

分子動力学計算による F1-ATPase のリン酸放出経路の探索

○本橋 昌大¹、大出 真央²、杉田 有治²、宗行 英朗¹

¹中大・理工・物、²理研・開拓研究本部・理論分子科学研究室

F₁F₀-ATP 合成酵素の可溶性部分である F₁-ATPase は、ATP 合成・加水分解と共役し回転運動を行なう回転分子モーターである。六量体リング $\alpha_3\beta_3$ に回転子 γ が突き刺さった構造をしており、 $\alpha_3\beta_3$ に対して γ が 120° 回転するとともに、1 つの ATP を加水分解する。120° 回転はさらに 80° と 40° のサブステップに分けることができ、80° と 40° サブステップ前のポーズは、それぞれ binding dwell state、catalytic dwell state と呼ばれている。F₁-ATPase の反応スキームのほとんどは 1 分子計測により解明されたが、加水分解され生成物の無機リン酸 (Pi) の放出経路は未だ明らかではない。近年、クライオ電子顕微鏡法により明らかとなった好熱菌 F₁-ATPase の構造 (Sobti et al. 2021) では、ADP・Pi 状態の触媒部位から Pi がミオシンに見られるような back door を介して放出される可能性が指摘された。我々は、Pi の放出経路とそのタイミングを明らかにすべく、クライオ電顕で得られた好熱菌 F₁-ATPase の binding dwell state 構造を用いて長時間の分子動力学シミュレーションを行なった。さらに、分子動力学ソフトウェア GENESIS で利用可能な Enhanced Sampling 法を用いて F₁-ATPase の大規模構造変化とリン酸放出経路を探索した結果について報告する。

S03-06

木探索分子動力学法による Interleukin-2-inducible T-cell kinase 活性化経路の探索

○中居 雪菜¹、浴本 亨¹、山根 努²、小川 直樹¹、井上 雅郎¹、寺山 慧¹、池口 満徳^{1,2}

¹横浜市大・生命医、²理研 R-CCS

Interleukin-2-inducible T-cell kinase (ITK) は T 細胞受容体のシグナル伝達を担う非受容体型のチロシンキナーゼであり、免疫や炎症性疾患の治療標的として期待されている。これまでに報告されている立体構造の情報から、不活性型と活性型の構造特徴が明らかになっているが、両者を繋ぐ構造変化経路や活性化メカニズムについては未解明であった。本研究では、ITK の構造変化経路を得るため、強化学習と分子動力学 (MD) 計算を組み合わせた Tree-Search Molecular Dynamics (TS-MD) を適用した。その結果、ITK の活性型から不活性型までを繋ぐ構造変化経路を得ることに成功した。さらに、TS-MD で得られた全ての構造からスーパーコンピュータ「富岳」による大規模サンプリングを実施し、そのトラジェクトリ群を Markov state model (MSM) で統合することで、自由エネルギーランドスケープを得ることに成功した。その結果、TS-MD で得られた経路はエネルギー的に自然な構造変化であることがわかった。加えて、中間状態と不活性型の間にエネルギー障壁が存在することもわかった。

S03-08

ヘリオロドプシンの水素結合ネットワークと光反応におけるプロトン移動経路の解析

○千葉 義大¹、辻村 真樹¹、石北 央^{1,2}

¹東大・工・応化、²東大・先端研

ヘリオロドプシンはレチナール・シッフ塩基を色素として持つ膜タンパク質である。2018 年に発見されると、幅広い生物種が普遍的に持つことが分かり、生物が行う新たな光利用戦略の存在が示唆された。しかしヘリオロドプシンの機能は未だ明らかにされていない。ヘリオロドプシンにおいては、シッフ塩基と Glu107 が塩橋を形成し、その近傍には 7 つの水分子からなるクラスターが存在する。レチナールの光異性化に伴い、プロトンがシッフ塩基から Glu107 を経由して水分子クラスターへと至るプロトン移動反応がヘリオロドプシンの機能発現に重要であると考えられる。本研究ではまず、分子動力学法や quantum mechanical/molecular mechanical (QM/MM) 法による吸収波長解析などを用いて、水分子クラスターを含む水素結合ネットワークを解析した。次に QM/MM 法を用いて、ヘリオロドプシンで起こるプロトン移動反応を解析した。その結果、Glu107 に対するセリン残基による水素結合の供与の消失が、シッフ塩基から Glu107 へのプロトン移動を駆動することが明らかになった。さらに、Glu107 から水分子クラスターを経由して移動するようなプロトン移動経路の存在が示唆された。

S03-09

Substrate Unbinding Mechanism of *Candida rugosa* Lipase Explored by Parallel Cascade Selections Molecular Dynamics and the Markov State Model

○ Darin Flamandita, Akio Kitao

Tokyo Institute of Technology, School of Life Science and Technology

Candida rugosa lipase (CRL) is a significant commercial enzyme that catalyzes the non-specific hydrolysis of a wide range of substrate chains. As it is a mixture of several isoenzymes with distinct catalytic performances, insights into its binding mechanism are essential for improving the bioprocesses of desirable products. Thus, a combined technique of Parallel Cascade Selections Molecular Dynamics Simulation (PaCS-MD) and the Markov State Model (MSM) is proposed to explore the dissociation process of CRL-substrate complex and calculate binding free energy. AutoDock Vina was used for screening substrate libraries after conventional Molecular Dynamics (MD) simulation to build the complex with the solution structure of CRL. Subsequent substrate parameterization with Gaussian 16 on b3lyp/6-31G* was in good agreement with experimental values. Our results revealed that 30 parallel short MD simulations in PaCS-MD successfully enhanced the sampling to explore the complex dissociation which cannot be reached by a typical MD simulation. We built MSM for the merged PaCS-MD trajectories to generate the free energy landscapes of the complex. Hence, PaCS-MD/MSM gave us useful insights into the unbinding mechanism of an enzyme-substrate complex.

S04-02

Monomer-Dimer Equilibrium of a Tumor Suppressor PRELP Driven by the Hydrophobic Interface Regulates the Multi-Specific Interactions

○ Hirofumi Kosuge¹, Makoto Nakakido², Satoru Nagatoishi³, Tetsuya Fukuda⁴, Yasuhiko Bando⁴, Shin-ichi Ohnuma⁵, Kouhei Tsumoto^{1,2,3}

¹Dept. of Chem. Biotech., Sch. of Eng., Univ. of Tokyo,

²Dept. of Bioeng., Sch. of Eng., Univ. of Tokyo,

³Inst. of Med. Sci., Univ. of Tokyo, ⁴Biosys Technologies,

⁵Inst. of Ophthalmology, Univ. College London

Proline and arginine-rich end leucine-rich repeat protein (PRELP) is one of the small leucine-rich repeat proteoglycans (SLRPs) known as a tumor suppressor, although the molecular mechanism has yet to be fully elucidated. To investigate the molecular mechanism of PRELP-mediated tumor suppression, we firstly identified and validated new interactions of PRELP with multiple proteins including TGF β 1, IGFI-R and p75NTR, using candidate and proteomic approaches. Furthermore, we verified the influence of monomer-dimer equilibrium of PRELP on these interactions. Since the spatial aggregation propensity showed that the concave surface of PRELP is highly hydrophobic, we hypothesized that this hydrophobic surface forms the dimer interface of PRELP. To assess this hypothesis, we substituted the hydrophobic amino acid residues of PRELP with charged hydrophilic residues based on the energy calculation using Rosetta, resulting in the disruption of the rigid dimerization of PRELP. SPR and ELISA analysis elucidated that the monomerizing mutation of PRELP enhanced some interactions we identified, indicating that the hydrophobicity-driven dimerization of PRELP moderately regulates the biological functions relying on the multi-specific interactions.

S04-01

Antigen binding induces structural alterations in Fab portion of IgG that regulate its interaction with Fc γ RIIIa for immune responses

○ Yuki Yamaguchi¹, Natsumi Wakaizumi¹, Mine Irisa¹, Takahiro Maruno¹, Mari Shimada¹, Koya Shintani¹, Haruka Nishiumi¹, Rina Yogo^{2,3,4}, Saeko Yanaka^{2,3,4}, Daisuke Higo⁵, Tetsuo Torisu¹, Koichi Kato^{2,3,4}, Susumu Uchiyama^{1,2}

¹Grad. Sch. of Eng., Osaka Univ., ²ExCELLS, ³IMS,

⁴Grad. Sch. of Pharm. Sci., Nagoya City Univ., ⁵Thermo Fisher Scientific

Immunoglobulin G (IgG) consists of two antigen binding fragments (Fab) and one crystallizable fragment (Fc). The induction of IgG-mediated immune effector functions requires two interactions: antigen-Fab interaction and Fc-Fc γ receptor IIIa (Fc γ RIIIa) interaction. So far, antigen-Fab and Fc-Fc γ RIIIa interactions are considered as independent processes. Here, we investigate the thermodynamic and kinetic effects of antigen binding on IgG-Fc γ RIIIa interactions using bio-layer interferometry. Moreover, hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry and cross-linking mass spectrometry were conducted to clarify the structural influence of antigen binding on IgG and spatial arrangement of Fc γ RIIIa to IgG, respectively. Combined results revealed that antigen binding leads to structural alterations in the same segments as the binding sites for Fc γ RIIIa in Fab that stabilize the IgG-Fc γ RIIIa interactions via slower dissociation rate. The extent of the stabilization is dependent on antigen types, proteins or peptides. These results indicate that antigen binding regulate the immune effector functions through the structural alterations in Fab to stabilize the formation of the antigen-IgG-Fc γ RIIIa ternary complexes for Fc γ RIIIa activations.

S04-03

理論的設計法による細胞内光遺伝学ツール Magnet の改良

○ 吉村 匡隆¹、青野 侑基¹、林 勇樹¹、佐藤 守俊^{1,2}、新井 宗仁^{1,3}

¹東大・総合文化・生命環境、²JST・CREST、³東大・理・物理

Magnets は、タンパク質間相互作用を操作するための光遺伝学的ツールであり、細胞生物学において広く利用されている。Magnets は正電荷をもつ pMag と負電荷をもつ nMag からなり、青色光を照射するとヘテロ二量体を形成し、pMag と nMag のそれぞれに融合させたタンパク質間の結合を促進する。しかし、pMag と nMag の結合強度は弱いため、親和性を高めるためには pMag のタンデムリピートが必要であり、標的タンパク質の機能に影響を与える可能性がある。この問題を克服するため、本研究では pMag と nMag のタンパク質間相互作用を強化しうる変異体、および、p/nMag の単量体での安定性を向上させうる変異体を、計算機を用いて理論的に設計した。また、これらの変異を組み合わせた多変異体も設計した。次に、設計した変異体の二量体間の親和性を確認するため、Magnets 変異体とホタルシフェラーゼ断片を融合させて相補実験を行った。その結果、野生型 Magnets よりも強く結合できる Magnets 変異体を複数得ることに成功した。これらの変異体は今後、Magnets システムの有用性をさらに拡大すると期待される。また、本研究では二量体親和性の予測に複数の理論的手法を適用し、それらの予測を組み合わせることで高いヒット率を達成した。そのため、本研究で確立した二量体親和性向上のための方法論は、様々なタンパク質間相互作用の強化にも広く適用可能と考えられる。

S04-04

蛋白質連結による環状型小型二重特異性抗体 (Cyclobody BiTE) の構築と評価

○山田 梨沙¹、中原 維新²、中西 猛³、浅野 竜太郎²、
真壁 幸樹^{1,4}¹山形大・院理工・化学バイオ、²東京農工大・院・工・生命工、
³阪市大・院工・化生、⁴JST さきがけ

二重特異性抗体は、2種類の異なる抗原に同時に結合することが可能であり、さまざまな形が研究・開発されている。我々の研究室では、2種類の VHH からなる tandem VHH の両端をインテインによって環状に連結させた環状型小型二重特異性抗体 (Cyclobody) を作製し報告した (Biochem Biophys Res Commun., 2020)。このように環状に連結することで、分子配向の制御と安定性向上が期待できる。本研究では、この手法を拡張し、より汎用性の高い scFv からなる BiTE 型二重特異性抗体を環状化させた Cyclobody BiTE の構築を行った。蛋白質連結反応によって主鎖の環状化反応を誘導した (SICLOPPS 反応; Split Intein Circular Ligation Of Peptides and Proteins)。構築した Cyclobody Ex3 は、BiTE 型 Ex3 と同程度の熱安定性を示した。さらに、細胞傷害活性試験を行ったところ、構築した Cyclobody Ex3 は BiTE 型 Ex3 と比べて、より低い濃度で EGFR 陽性細胞に対して細胞傷害活性を示した。より低い濃度で細胞傷害活性が見られたのは、がん細胞、免疫細胞上の抗原との同時結合においてより適した配向となったためかもしれない。現在さらに物性調査を進めており、合わせて報告する。

S04-06

異なる二つの機能性構造を許容するタンパク質の設計とそのフォールディング挙動及びシャペロン依存性の解析

野島 達也¹、○池田 刀麻²、田口 英樹^{1,2}¹東工大・研究院・細胞センター、²東工大・生命理工

「タンパク質の立体構造はそのアミノ酸配列により一義的に決定される」という Anfinsen のドグマは、分子シャペロン・天然変性タンパク質・アミロイド・相分離構造などの発見を経た現在のタンパク質科学においても、いまだ有効な基本的指針である。我々はこのドグマに挑戦すべく二通りの立体構造をとりうるタンパク質の設計を行い、そのフォールディング挙動やシャペロン依存性について解析を行った。この達成のために我々は重複融合タンパク質 (Overlapping Fusion Protein, OFP) という方法論を開発した。OFP においては異なる構造と機能を持つ 2 種類のタンパク質が互いの末端を一部重複させて融合される。この重複領域はそれぞれの構造形成に必要な部位であり、この領域が片方のタンパク質の立体構造形成に利用された場合は、もう一方のタンパク質では機能的フォールディングが不可能となる。このため、それぞれのタンパク質のフォールディング速度論および天然構造での熱力学的安定性のバランスにより OFP のフォールディング挙動は決定されうる。分析の簡単のため、単量体タンパク質であることや天然構造の評価の簡便性 (酵素活性や蛍光強度など) を指標に OFP 作成のための候補タンパク質を選定した。そして GFP と DHFR を用いて OFP が実際に作成可能であることを確認された。コロニー評価法を用いた OFP の点変異体の分析、精製タンパク質を用いたフォールディングの解析、シャペロンの関与によるフォールディング挙動の変化などを分析した結果について発表を行う。

S04-05

単層βシートモデル蛋白質によるアミロイドを標的としたチオフラビンT骨格分子の結合特性評価

○三浦 唯奈¹、浪岡 沙英¹、相馬 洋平²、金井 求³、
真壁 幸樹^{1,4}¹山形大学・院理工・バイオ化学、²和歌山県立医科大学・薬学部、
³東京大学・院薬学系研究科、⁴JST さきがけ

アルツハイマー型認知症などに関与するアミロイドは蛋白質の凝集体でβシートに富んだ構造を持つ。Thioflavin-T (ThT) はアミロイドの蛍光プローブとして広く利用され、また金井らが開発した ThT 骨格を持つ光酸化触媒はアルツハイマー病の治療薬として研究が進められている。一方でこれらがアミロイドと特異的に結合する際の詳細な分子メカニズムは解明されていない。これは、アミロイドが不溶で不均一のため評価が難しいことが原因の一つである。我々はこれまでアミロイドのβシート構造を球状蛋白質中に模倣したモデル分子 PSAM (Peptide Self-Assembly Mimic) を作製し評価してきた。先行研究において、PSAM に変異導入し ThT との結合時に蛍光強度が増強する変異を報告した。本研究では結合の強さ、蛍光強度とアミノ酸配列の関係を明らかにすることを目指し、βシート上に多数の変異を導入した変異体を作製し、評価を行った。また、ThT 骨格を持つ光酸化触媒の結合特性評価も PSAM を用いて評価できることを見出し、結合平衡定数を決定した。現在、光酸化特性などについて PSAM を用いた調査を進めており、併せて報告する。

S04-07

蛋白質連結反応による二重特異性抗体の構築と評価

○菅野 菜津奈¹、森井 勇翔¹、浅野 竜太郎²、中西 猛³、
真壁 幸樹^{1,4}¹山形大・院理工・バイオ化学、²東京農工大・院工、
³大阪市大・院工、⁴JST さきがけ

二種類の異なる抗原と同時に結合できる二重特異性抗体の研究が進められている。抗体は2本の軽鎖と2本の重鎖がY字型に配置されているため、そこから作り出す二重特異性抗体は重鎖間と重鎖-軽鎖間が正しく組みあがる必要がある。このため、これまでに様々な抗体改変技術が開発されてきた。しかし、これらの改変技術は天然抗体とは異なった変異やドメイン構成を持つため不安定化するなどの問題があった。天然配列を持った二重特異性抗体の作製方法として、最近、蛋白質連結法を用いた作製方法が報告された (Han et al., Sci. Rep., 2017)。これは一方の Fab と残りの部位を別々に分離インテイン融合蛋白質として作製し、精製後に連結させるものである。別々に作製しているため、鎖間の誤対合の問題を回避できる。本発表ではこの方法を拡張し、2種類の Fab と Fc 領域を別々に作製しておき、one-pot で連結を実現する方法を報告する。この方法を用いて作製した、抗 HER2 抗体と抗 CD3 抗体からなる二重特異性抗体の抗原結合能 および細胞傷害活性について現在、測定を進めており、それらの結果について発表する。

S04-08

Typical metal-induced assembly of an artificial protein nanocage TIP60 and its applications for cargo encapsulations

○ Naoya Ohara¹, Norifumi Kawakami², Ryoichi Arai³, Naruhiko Adachi⁴, Toshio Moriya⁴, Masato Kawasaki⁴, Toshiya Senda⁴, Kenji Miyamoto²¹Grad. Sch. of Sci. & Tech., Keio Univ., ²Faculty of Sci. & Tech., Keio Univ.,³Faculty of Textile Sci. & Tech., Shinshu Univ.,⁴Inst. of Materials Struc. Sci., KEK

Protein nanocages have become popular materials to develop a drug molecule carrier owing to their structural homogeneity, biocompatibility, and large inner space. However, the process for encapsulation of drug molecules, in general, requires denaturation and refolding process of the protein nanocage, drastically decreasing the yield.

To overcome this problem, we have designed a protein nanocage that reversibly associates and dissociates without denaturation based on our developed protein nanocage, TIP60. Although original TIP60 is isolated as a 60-mer and could not dissociate without denaturation, we found that a mutant, K67E, can be isolated as a dimer and formed 60-mer only in the presence of Ca, Sr, and Ba ions. The 60-mer structure was decomposed to dimer by adding EDTA. Cryo-EM analysis showed the potential map corresponding to the Ba ions at the subunit interface around the K67E, suggesting that the Ba ions stabilized the subunits interactions.

Furthermore, we performed encapsulation experiments of single-stranded DNA molecules based on the metal-induced assembly system. As a result, the DNA molecule was incorporated in the inner space, although two additional mutations were necessary for facilitating protein-DNA interactions.

S04-10

高濃度 PEG 含有蛋白質結晶からの LC-MS によるアミノ酸配列解析

○大城 拓未¹、影山 大夢²、小野寺 かこ²、辺 浩美³、中島 寛也³、小川 智久^{2,4}、横山 武司²、酒井 隆一³、松井 崇^{1,5}、小寺 義男^{1,5}¹北里大院・理、²東北大院・生命科学、³北大院・水産科学、⁴東北大院・農、⁵北里大・理・疾患プロテオミクスセンター

現在の高精度な質量分析計 (MS) を用いることで、配列データベースによらない *de novo* シーケンス解析によるタンパク質の配列解析、翻訳後修飾解析が可能となってきた。しかし、高精度な質量分析を行うためには、生体試料の特性や解析対象に合わせた抽出方法を構築することが必須である。本研究では、希少試料であるために無駄に破壊検査することができない海綿から抽出した天然タンパク質であるレクチンについて、結晶構造解析で余った結晶を用いて MS でアミノ酸配列解析することを試みた。レクチンは 30% ポリエチレングリコール 4000 (PEG4000) を含む結晶化条件で結晶化している。そのため、結晶および結晶化ドロップ内には高濃度かつ様々な分子量を持つ PEG が含まれる。これらの PEG は LC-MS の C18 逆相カラムに吸着し、異なる保持時間でサイズの異なる PEG がカラムから溶出され、検出器である MS に送液され続ける。また、MS では高強度成分を優先的に MS/MS 解析するために、PEG に比べ低濃度の目的ペプチドは精度よく MS/MS 測定されない。したがって、PEG を含んだ状況ではレクチンの配列解析に影響を及ぼす。そこで、本発表では、結晶から PEG を除去し高効率にレクチンのみを抽出する試料調製法と、アミノ酸配列解析の結果について紹介する。

S04-09

大腸菌におけるヒ素凝集性内在タンパク質の網羅的探索

○大塚 康児¹、丹羽 達也²、阿由葉 里奈¹、佐藤 成樹³、梅野 太輔⁴、田口 英樹²、河合 - 野間 繁子¹¹千葉大学・院・工・共生、²東工大・生命理工・東工大大学院細胞センター、³千葉大・院・理・生物、⁴早稲田・理工・応化

As (亜ヒ酸) は危険性だけでなく有用性をも併せ持った元素であり、どちらの性質も、タンパク質のシステイン (-SH) と As との結合が引き起こすタンパク質凝集が一因と考えられている。この As による凝集は、主に folding 過程で生じると考えられてきた。ところが、最近、当研究室の研究から、As は成熟したタンパク質にも作用していることを示唆する結果が得られた。システインを複数含有する人工タンパク質が、As を介してタンパク質間の分子間凝集を引き起こし、機能をスイッチしていることが示唆された。そこで本研究では、自然界でも、このような As による凝集が機能スイッチを誘起しているタンパク質が存在すると考え、それらを網羅的に探索することを目的とした。モデル生物である大腸菌の破碎液を遠心分離し、全画分と不溶性画分に対して LC-MS 解析を行った。ヒ素添加により不溶性画分における存在量が増加しているタンパク質をヒ素凝集タンパク質として 74 個抽出した。その後、タンパク質間相互作用を可視化できる string 解析を使用し、相互作用するタンパク質を除去して、凝集する可能性のあるタンパク質を最終的に glgB、mprA、ppiC、ybeL、yciO、yggL の 6 つに絞った。これらは機能、構造、そしてアミノ酸配列で類似する点はなかった。しかし、システインを 2 個以上持つという共通点があり、これらシステインが As との結合に関与していると考えられる。

S04-11

システイン非含有タンパク質を用いたシステインデザインによるヒ素凝集機能スイッチシステムの創製

○山口 諒、河合 (野間) 繁子

千葉大学・工・共生応用化学科

ヒ素はシステインのチオール基との結合親和性が強く、タンパク質を凝集に導くことが知られている。当研究室では、システインを含有するクオラムセンサー制御因子 LuxR が、ヒ素とは全く機能的に関係がないにも関わらず、ヒ素で機能スイッチすることを見出した。それは、LuxR のシステインがヒ素により凝集したことが原因であった。つまり、システインがあればどんなタンパク質でも機能をヒ素によってスイッチすることができるはずである。そこで本研究では、システイン非含有タンパク質である転写抑制因子 BetI を用いて、システインを導入することで、ヒ素で BetI の機能をスイッチ可能であるか試みた。まず、BetI のシステイン導入箇所を選定するために、BetI の予測構造に基づいて、導入位置を 5 箇所に決定した。そして各置換箇所を組み合わせて、計 26 種類のシステイン置換体シリーズを作製した。これらの置換体のヒ素による機能スイッチを確かめるため、BetI の転写制御配列下流にレポーター遺伝子を配置したプラスミドと置換体発現プラスミドを大腸菌に導入し、ヒ素濃度 0 と 10ppm におけるレポーター遺伝子の発現を調べた。その結果、システインを 1 個導入するだけで、ほぼ全ての置換体がヒ素に応答した。さらにシステインの個数に応じてヒ素応答が上昇したが、同時に漏出発現も上昇した。今回の置換体においては、特定の 3 箇所の置換体が低漏出かつ出力比 3.2 倍という高スイッチ性能を示し、さらに、本来の機能にヒ素スイッチとしての機能を付与することができた。

S04-12

HSbody, a heat sterilizable antibody-mimetic - 加熱殺菌可能な新規抗体模倣分子の創生 -

○雨坂 心人、高野 和文、田中 俊一

京府大・院生環

近年、抗体や抗体模倣分子が医薬・医療分野で頻用されている。医薬・医療分野では高度な安全性が求められるため、その製造において、細胞培養発現の後、カラム精製、精密ろ過膜による除染が採用されている。一方で、これらの工程だけでは微小な病原体や毒素を除去しきれないという課題がある。この課題に対して加熱殺菌処理の導入が効果的であるが、従来の抗体や抗体模倣分子は高温下で不可逆的な変性状態となるため、その実現は難しい。そこで本研究では、高温下で変性状態となるが、常温に戻すと再び天然構造へと戻る Cold Shock Protein (CSP) に着目し、CSP を骨格とする加熱殺菌処理可能な抗体模倣分子の創生を試みた。本研究では、超好熱菌 *T. maritima* 由来 CSP をモデルに、その構造表面のループ領域アミノ酸を多様化した変異体ライブラリを構築した。そのライブラリの中から、ファージディスプレイと酵母表面ディスプレイによる選別を経て、6 種類の抗原分子それぞれに結合する変異体を取得した。得られた変異体に対して、生化学的・分光学的手法を用いて機能と物性を解析した。その結果、シングル nM オーダーの高親和性かつ特異性に優れた変異体を複数確認した。さらに、高温処理後に常温に戻すと、その構造と結合能がともに回復することも確認した。以上から、CSP を用いることで、加熱殺菌処理に耐え得る抗体模倣分子 (HSbody) の創出が可能であることが立証された。本発表では、HSbody の創出方法ならびに機能・物性解析の詳細を含めて報告する。

S05-02

乳がん特異的キナーゼ Brk 活性化機構の解析

○武井 梓穂¹、松尾 友樹²、神田 諒²、中迫 純希¹、前仲 勝実^{1,2}、松田 正^{1,2}、姚 閔^{1,3}、尾瀬 農之^{1,3}

¹ 北大院・生命科学、² 北大院・薬、³ 北大院・先端生命

乳がんは、日本人女性のがん部位別罹患数の一位であり、年間約 90,000 人が診断される疾患である。非受容体型チロシンキナーゼである Breast tumor kinase (Brk) は、浸潤性乳がん細胞において 86 % の割合で過剰発現が認められている一方で、正常な細胞では発現しないことから乳がん治療の標的分子としての可能性が検討されている。乳がん細胞で過剰発現した Brk は JAK/STAT シグナル伝達系などの正常なシグナル伝達を経ず、細胞増殖に関わる転写因子の STAT3、STAT5 を無秩序にリン酸化することで、乳がん細胞の異常増殖を引き起こすモデルが想定される。さらに、Brk の基質の一つとして近年同定されたアダプタータンパク質の Signal-transducing adaptor protein-2 (STAP-2) は、自身はリン酸化能を持たないが Brk のリン酸化能を亢進する機能が報告されており、これら 2 つのタンパク質が乳がん細胞のさらなる異常増殖を引き起こすと示唆されている。

そこで本研究では、Brk と STAP-2 が乳がん細胞の異常増殖を引き起こすメカニズムを分子レベルで明らかにすることを研究目的とした。本発表では、STAP-2 介在による Brk のリン酸化能亢進の直接観測及び定量化のための生化学的機能解析の結果と、両者タンパク質の結合様式解明を目指した分子間相互作用解析の結果を紹介する。

S05-01

揮発性硫黄化合物応答哺乳類嗅覚受容体の悪臭抑制香料の探索と抑制原理

○齊藤 遥¹、福谷 洋介¹、阿部 雅司¹、江口 諒²、田澤 寿明²、松波 宏明³、養王田 正文¹

¹ 東京農工大学・院工・生命工、² エステー株式会社、³ Duke 大学・医

哺乳類の嗅覚受容体 (Odorant receptors, 以下 ORs) は G タンパク質共役型受容体に属する 7 回膜貫通タンパク質であり、嗅覚における匂い分子応答の起点となる。揮発性硫黄化合物 (Volatile Sulfur Compound: VSC) であるメチルメルカプタン (MM) や硫化水素 (H₂S) は特定悪臭物質に指定されている。VSC の悪臭は嗅覚閾値が低く、これらの悪臭抑制技術の開発が求められている。これまで VSC に応答する ORs は同定されていなかった。そこで、当研究室で開発した Vapor stimulation assay 法により、常温気体分子である MM、H₂S に応答するヒト OR の網羅探索を行い、数種のヒト OR の同定に成功した。さらに、100 種以上の香料に対する OR の VSC 応答抑制作用を調べたところ、応答を抑制する香料を数種発見した。抑制作用を示した香料には、構造類縁体での応答抑制の変化や、特定の官能基の応答抑制作用が見られ、複数の阻害機構が考えられた。OR 応答抑制を示した香料に、コーヒーに含まれるフルフリルメルカプタン (FM) も含まれた。一般的にコーヒーは VSC であるニンニク臭を抑制する効果があるとされる。そこで、ニンニク臭の原因であるアリルメルカプタン (AM) に応答するヒト OR を探索し、FM による応答阻害作用を検証した。その結果、FM は OR の AM 応答も阻害した。FM もチオール基を有することから、VSC 応答 OR の SH 基結合サイトに対し FM が競合的に結合することで応答抑制が起きると考えられる。

S05-03

免疫抑制性タンパク質 HLA-G2 の新規受容体の探索と相互作用評価

○渡邊 紘士、黒木 喜美子、前仲 勝実

北大院・薬

ヒト白血球抗原 (HLA) -G は非古典的 HLA クラス 1 分子であり、複数のスプライシングアイソフォームを有する。その中の一つである HLA-G2 は重鎖 $\alpha 2$ ドメインを欠損し、非共有結合性のホモ二量体を形成する。HLA-G は、主に胎盤や腫瘍細胞等に発現し、妊娠時の母子間免疫寛容や腫瘍の宿主免疫逃避に関与することが知られている。主要なアイソフォームである HLA-G1 は、白血球に広く発現する抑制型受容体 LILRB1 及び LILRB2 に結合するため、広範な白血球機能を抑制する。一方、HLA-G2 は抗原提示細胞上に発現する LILRB2 にのみ、HLA-G1 よりも高い親和性で結合し、免疫寛容を誘導する。これまでに所属研究室では HLA-G2 の創薬応用を目指し、複数の自己免疫疾患モデルマウスにおける免疫抑制効果を明らかにしてきた。他方、LILRB2 以外の HLA-G2 受容体に着目した研究は進んでおらず、ヒト生体内での HLA-G2 作用点となりうる受容体の同定は必須である。本研究では、新規 HLA-G2 受容体の探索とその結合特性の評価を目的とした。これまでに HLA-G1 受容体として報告されてきた LILRB2 以外の受容体に着目し、表面プラズモン共鳴法によって HLA-G2 との相互作用を検討した。本発表では、HLA-G2 に対する新規候補受容体と既知受容体 LILRB2 との詳細な分子認識機構について議論したい。

S05-04

X線1分子計測によるSARS-CoV-2スパイク蛋白質内部運動と感染性の相関

○佐々木 大輔¹、新井 達也¹、関口 博史³、三尾 和弘²、
佐々木 裕次^{1,2}

¹ 東大・新領域・物質系、² 産総研・東大 OIL、³ 高輝度光科学研究センター

SARS-CoV-2 ウイルスのパンデミックにより世界の公衆衛生、経済に甚大な影響を与えている。昨年度から α (B.1.1.7)、 β (B.1.351)、 γ (P.1)、 δ (B.1.617)、 ρ (B.1.1.159) などの変異体が発生し、感染は世界各国でさらに拡大おり、感染メカニズムの詳細な解明が急がれている。本研究では、1 分子計測法の一つである X 線 1 分子追跡法 (Diffracted X-ray Tracking; DXT) を用いて、 α (B.1.1.7)、 δ (B.1.617) に変異のないサンプルを加えた 3 種の 3 量体スパイク蛋白質の分子動態を計測し、変異体ごとの感染力と分子動態の相関を考察した。DXT は 20~60nm の金ナノ結晶を蛋白質に標識し、その金ナノ結晶に X 線を照射して生じた回折点を時分割で撮影することで、蛋白質の内部運動を計測する手法である。運動は θ 方向 (傾斜方向) と χ 方向 (回転方向) の 2 つのパラメーターで評価する。測定は SPring-8 BL40XU で 10-100 μ s/f の時間分解能で行った。サンプルは、基板に固定したスパイク蛋白質に対して、その受容体である ACE2 に金ナノ結晶を標識し、基板に固定したスパイク蛋白質に結合させた。測定の結果は、3 量体の対称軸に垂直な χ 方向に注目すると δ 型の運動が変異のないものと比べ大きくなることが確認された。

S05-06

大腸菌フェリチンの鉄酸化・ミネラル化に及ぼす無機リン酸の影響

○桑田 巧、藤原 和夫、池口 雅道

創価大・理工・生命理学

生体内において、Fe²⁺ は過酸化水素と反応することでヒドロキシラジカルを生成し、細胞傷害を引き起こす。この為、生体内の余剰な鉄は 24 量体の球殻蛋白質フェリチン (Ftn) によって Fe²⁺ から Fe³⁺ に酸化され、直径 8 nm の Ftn 内腔に不溶性の鉄コアとして貯蔵される。Ftn 内腔に形成される鉄コアの特徴として、バクテリア由来の Ftn は、哺乳類由来の Ftn に比べ、鉄コア中の無機リン酸含有量が高いことが知られている。しかし、無機リン酸が Ftn の鉄酸化・鉄コア形成 (ミネラル化) に及ぼす影響は十分に理解されていない。本研究では、リン酸存在下、非存在下で、Stopped-flow 装置を用いて、Escherichia coli 由来フェリチン (EcFtnA) 溶液と硫酸アンモニウム鉄溶液を高速混合し、310・370・650 nm の吸光度を用いて、鉄酸化・ミネラル化反応の過程を観測した。混合後、Fe³⁺ の形成に由来する 310 nm の吸光度変化、反応中間体の形成に由来する 370 nm・650nm の吸光度変化が確認された。球殻 1 分子あたり 96 個以上の鉄原子を添加した場合、EcFtnA のフェロキシダーゼ活性サイトにより触媒される反応と Ftn 内腔に形成された鉄コアの表層で生じる酸化反応の 2 種類の反応が存在することが確認された。無機リン酸存在下と非存在下における吸光度変化と比較したところ、無機リン酸によって鉄酸化・ミネラル化反応が加速したことが示唆された。

S05-05

$\alpha 7$ nAChR twists in the opposite direction to its activated state in the presence of ivermectin

○Yue Yang¹, Tatsuya Arai^{1,2}, Hiroshi Sekiguchi³,
Kazuhiro Mio², Tai Kubo⁴, Yuji C. Sasaki^{1,2}

¹ Adv. Mater. Sci., GSFS., The Univ. of Tokyo, ² AIST-UTokyo OIL, ³ JASRI, ⁴ GlyTech Inc.

The alpha 7 nicotinic acetylcholine receptor ($\alpha 7$ -nAChR) is composed of five $\alpha 7$ subunits, arranged symmetrically around a central pore. $\alpha 7$ -nAChR is localized in the central nervous system and the immune cells, and could be the target for treating Alzheimer diseases and Schizophrenia. Acetylcholine (ACh) is a ligand to open the channel, whereas prolonged application results in a decrease of the response, desensitization. Ivermectin (IVM) was reported as one of the positive allosteric modulators, by binding of IVM to the channel enhance the ACh-evoked alpha 7 currents. The molecular dynamics of the ligand-bound state of $\alpha 7$ -nAChR have not been exhaustively studied. We performed diffracted X-ray tracking method in Spring-8 BL40XU beamline to monitor the twisting motion of $\alpha 7$ -nAChR with ACh or IVM with a time-resolution of 100 μ s. The X-ray diffraction spots from gold nanocrystals labeled with $\alpha 7$ -nAChR were recorded by an X-ray image intensifier and a CMOS camera. The results showed that $\alpha 7$ -nAChR twisted in counterclockwise order with the channel opening in the presence of ACh and twisted in clockwise order without the channel opening in the presence of IVM.

S05-07

油中微小液滴における新規蛋白質加水分解酵素検出基質の開発に向けた検証

○村山 祐樹¹、中村 彰宏¹、田中 裕真¹、鈴木 義之¹、
志田 洋介¹、津田 裕子²、日高 興士³、小笠原 渉¹

¹ 長岡技科大大学院・工、² 神戸学院大・薬、³ 神戸大大学院・保健

近年、デバイスを用いたマイクロ流体力学に基づく技術開発が盛んである。Water-in-oil droplet (WODL) は界面活性剤で覆われた微小な液滴 (ドロップレット) であり、そのナノリットルからピコリットルの非常に小さなドロップレット中で蛍光基質を用いた酵素アッセイを行うことができる。さらにマイクロ流体デバイスと組み合わせることで、超高効率な酵素活性の検出系が構築可能である。しかしながら、微小な液滴を油が取り囲む、特殊な環境から、使用できる基質の種類が限られている。例えば、ペプチダーゼ活性を検出する際に用いられる 7-amino-4-methylcoumarine (AMC) は疎水性が高く、WODL の外へ漏出することから、WODL を用いた酵素活性の検出に使用できない。

本研究では AMC のメチル基を親水性の官能基にすることで物質の極性を変更し WODL にて使用出来ることを検証した。検証した AMC 類似物質の中で、7-Aminocoumarin-4-acetic acid (ACA) は WODL に 7 日間の間、保持された。また、標的酵素としてジペプチジルペプチダーゼ (DPP) を精製し、ACA にジペプチドを付加したジペプチジル ACA 基質と DPP をドロップレット中で酵素反応させた結果、酵素反応より蛍光強度が上昇した。これらの結果は、WODL の中で検出可能な酵素活性を大幅に拡大する蛍光基質の開発につながる。

S05-08

Structural and functional characterization of DNA/RNA methyltransferase specificity

○ Yoshiki Ochiai, Paola Laurino

OIST

M.EcoGII is the only known bacterial methyltransferase that catalyze non-site-specific N6-adenine methylation on both DNA and RNA. However, the evolutionary origin of this unusual promiscuity is still unknown. Here, we performed ancestral sequence reconstruction to investigate the evolutionary origin of sequence specificity in M.EcoGII. Five ancestors of M.EcoGII were selected from a maximum-likelihood phylogeny for ancestral sequence reconstruction. These ancestral enzymes were expressed in *E. coli*, purified and characterized. In vitro methylation assays showed that all ancestors had a higher activity for RNA than M.EcoGII, with Anc284 showing a significant increase in selectivity for RNA. Multiple sequence alignment indicated the amino acid residues in charge of substrate specificity. Structural models of the ancestral proteins showed that these enzymes share high similarity (RMSD = 1.940). The results in this study will contribute to the understanding of the molecular mechanism of selective activity between RNA or DNA methyltransferases. In addition, the RNA selective M.EcoGII ancestor would be applicable to the epigenetic tools for changing RNA methylation states.

S05-10

Elucidation of the Mechanism by Which sHSP IbpA Regulates Its Own Expression at the Translational Level

○ Yajie CHENG¹, Tsukumi Miwa², Hideki Taguchi^{1,2}

¹Dept. of Life Science and Tech., Tokyo Tech,

²Cell Biology Center, Inst. of Innovative Research, Tokyo Tech

Inclusion body-associated proteins (Ibbs) are a type of small heat shock proteins (sHSPs) that sense misfolded and aggregating proteins. Ibbs co-aggregate with them and recruit other molecular chaperones to process the aggregates for refolding. In *Escherichia coli*, it has been found that oligomeric IbpA self-represses the *ibpA* translation and mediates its own mRNA degradation, but the detailed mechanism is unclear. In this project, we found that IbpA Arginine (R) 93 has an irreplaceable significance for self-regulation activity. R93 is a highly conserved in bacteria IbpA and its mutants in *E. coli* lost the inhibitory effects of IbpA on its expression levels. In a reconstituted cell-free translation system, PURE, purified *E. coli* IbpA R93A also had no inhibitory effect on the reporter translation processes. Additionally, the role of R93 on chaperone activity was investigated and we found that IbpA R93 cannot form co-aggregates with protein substrate MDH upon heat shock. Compared with wild-type IbpA, IbpA R93A has a weaker oligomerization ability, which might be the key to R93 functions. Overall, R93 is essential for IbpA activities. We expect to find out the detailed role of IbpA R93, and further explore the mechanisms of IbpA self-regulation.

S05-09

Physicochemical analysis of receptor recognition mechanism of anti-OX40 agonist antibodies

○ Kan Ujiie¹, Aki Tanabe², Satoru Nagatoishi³, Kouhei Tsumoto^{1,3,4}

¹Dept. of Bioeng. Sch. Eng., The Univ. of Tokyo, ²AIDS Res. Center, NIID,

³Inst. Med. Sci., The Univ. of Tokyo,

⁴Dept. of Chem. Biotech., Sch. Eng., The Univ. of Tokyo

Agonist drugs targeting the T cell activator OX40 (TNFRSF4), which belongs to the TNF receptor superfamily, are expected to be applied to cancer immunotherapy. However, the molecular mechanism of its signal transduction control has not yet been clarified.

In this study, we aimed to clarify important physicochemical parameters in the molecular recognition and control mechanism of five anti-OX40 agonist antibodies in clinical trials.

Kinetic intermolecular interaction analysis using surface plasmon resonance (SPR) revealed that the dissociation rate constant (k_{off}) of OX40 binding differs among antibodies. Furthermore, it was suggested that the binding rate constant (k_{on}) is rather important for the binding activity to OX40-expressing cells using the flow cytometry. In addition, binding analysis using domain-deficient mutants of OX40 revealed that antibody epitopes were classified into two types and the differences are related to their kinetic properties.

In this presentation, we plan to perform detailed epitope mapping and quantitative evaluation of T cell activation, and to consider the relationship between the molecular control mechanism and physicochemical interaction parameters.

S06-01

Vo 部分での回転によるプロトン輸送機構の分子基盤

○西田 結衣¹、岸川 淳一²、中西 温子³、中野 敦樹¹、横山 謙¹

¹京産大・生命科学部、²阪大・蛋白研、³阪大・高圧電顕センター

V-ATPase は可溶性の V_1 部分と膜内在性の V_0 部分からなる。 V_1 は ATP 駆動性の回転分子モーターであり、 V_0 は V_1 から伝達された回転力によりプロトンを輸送する。

V_0 部分において、プロトンは c-ring と a サブユニットの膜貫通型ヘリックスの界面にある 2 つのハーフチャネルを通して出入りし、c-ring の Glu 残基と a サブユニットの Arg 残基間の塩橋形成とその切断が c-ring の回転により連続的に起こり、プロトンが輸送されると考えられている (two channel model)。

しかし、 V_0 部分の高分解能情報が不足しているため、プロトン移動の全容は未だ明らかではない。また、現在発表されている V_0 部分の構造は、回転が停止している状態での構造であるため、実際にプロトンが移動している時の構造が反映されているかは不明である。

今回、ATP 存在下で回転中の好熱菌由来 V-ATPase の構造を解析することで、プロトン輸送中の中間体構造の解明を目指した。Titan Krios /K3 で撮影した V-ATPase の電顕画像から、V-ATPase の単粒子を抽出し、 V_0 部分に焦点を当てた方法で、 V_0 部分の高分解能の構造を得た。クラス分けにより複数の構造を得たが、粒子数の多いクラスから得られた密度マップに対してモデリングを行い、 V_0 部分の原子モデルを構築した。停止中の V_0 では、c-ring/Glu と a/Arg 間の塩橋が形成されていたが、今回得られた構造では、同様の塩橋は形成されていなかった。この構造を詳しく解析することで、two channel model で考えられるどの中間体構造に相当するのかを考察する。

S06-02

ヒト IgG-Fc 特異的に結合するモノクローナル抗体 37-9E の抗原認識機構の解明

○家森 健輔¹、金子 美華²、加藤 幸成²、有森 貴夫¹、高木 淳一¹

¹ 阪大・蛋白研、² 東北大・医

近年、ヒト IgG を利用した抗体医薬品の研究開発が盛んに行われており、生体試料中の抗体医薬品の検出等において、抗ヒト IgG-Fc 抗体を用いたイムノアッセイは広く利用されている。特に、マウスやラットだけでなくカンクイザル等の霊長類由来 IgG とも交差結合を示さない抗ヒト IgG-Fc 特異的抗体は、非臨床での抗体医薬品の血中濃度を測定する際に有用である。最近、我々はヒト IgG-Fc に結合する新規マウスモノクローナル抗体 37-9E を樹立した。この抗体について、直接 ELISA 法によりヒト IgG-Fc 特異性を検討した結果、37-9E はヒト IgG に特異的で、極めて相同性の高いカンクイザル IgG にも交差結合を示さないことが分かった。そこで我々は、この 37-9E をキャプチャー抗体として用い、我々が樹立した別の抗ヒト IgG-Fc 抗体 2-1B を検出抗体としたサンドイッチ ELISA 系を確立した。そして、この系によりサル血清存在下でヒト IgG1-Fc を特異的に検出・定量できることを確認した。次に我々は 37-9E とヒト IgG1-Fc の複合体の X 線結晶構造解析を行い、3.38 Å 分解能での構造決定に成功した。得られた構造では、37-9E はヒト IgG1-Fc の CH2 ドメインを認識しており、Fc の単量体にそれぞれ一分子ずつ結合していた。また、結合インターフェースにヒトとカンクイザル IgG1-Fc 間で異なる残基が存在していたことから、これが認識の種特異性の一つの原因であることがわかった。

S06-04

ATP 合成酵素 FoF₁ の ATP 駆動性回転における化学・力学共役機構の分子基盤

○中野 敦樹¹、岸川 淳一^{1,2}、中西 温子³、横山 謙¹

¹ 京都産業大学大学院・生命科学研究科、² 大阪大学蛋白研、³ 大阪大学超高压電子顕微鏡センター

FoF₁ は、可溶性で ATP の合成・加水分解を触媒する F₁ 部分と、プロトン駆動力で疎水的なリングを回転させる膜内在性の Fo 部分から構成される。Fo 部分でのプロトンの移動と F₁ 部分での ATP 合成が、中心にある回転軸の回転により共役する。F₀F₁ による ATP の加水分解は、ATP 結合、ATP 加水分解、リン酸放出、ADP 放出の 4 つの過程からなり、それぞれの過程で触媒サブユニットが構造変化し回転軸を回転させる。一分子観察により、ATP 結合後、ADP の放出を伴い 80° 回転し、その後分解された ATP のリン酸が放出され、40° 回転することが示されている。しかし、それぞれの反応過程に対応した中間体構造が全て得られておらず、それぞれの反応過程でどのように触媒サブユニットが構造変化し回転軸の回転が進むのかは未解決の問題である。

本研究では、クライオ電子顕微鏡による単粒子解析を用いて、それぞれの反応過程に対応した構造を決定し、加水分解反応サイクルに対応した構造変化を明らかにすることを目的とした。低 ATP、高 ATP 濃度条件下による二つの反応条件によって構造解析を行った。F₁ 部分に焦点を当てた構造解析を行うことにより、複数の反応過程に対応した構造を約 3 Å で決定することができた。さらに、クラス分けによる解析を進めることで、新たな回転角度を持つ中間体構造が得られた。得られた構造から F₁ 部分での化学・力学共役機構について議論する。

S06-03

SSX1 に示唆される新規の DNA 結合ドメインとその溶液中構造解析

○高橋 花南¹、古寺 哲幸²、宮ノ入 洋平³、加藤 広介⁴、西村 正宏⁵、堀越 直樹⁵、胡桃坂 仁志⁵、竹中 聡⁶、岩崎 憲治⁷

¹ 筑波大・数理、² 金沢大・ナノ生命研、³ 阪大・蛋白研、⁴ 筑波大・医、⁵ 東大・定量研、⁶ 大阪国際がんセ、⁷ 筑波大・TARA

滑膜肉腫 (SS) は、全軟部腫瘍の 7-10 % を占める希少がんであり、その全ての症例において病源性融合タンパク質 SS18-SSX が認められる。そして SS18-SSX が多くの遺伝子の発現制御に重要なクロマチンリモデリング複合体 BAF に結合し、異常 BAF 複合体を形成することが SS 発症の原因であると考えられている。しかし、SS18-SSX の構造や生化学的な特徴、さらには BAF 複合体との結合様式に関する報告は僅かであり、SS18-SSX を標的とした創薬化学研究が立ち遅れている。そこで類似構造を探索した結果、SS18-SSX1 の SSX1 領域に属する C 末端 34 アミノ酸領域が、亜鉛を配位するような残基は欠くものの、ジンクフィンガー様の折れたたみ構造を形成することが予測された。SSX1 は SS 発症の原因領域であることから、我々は SSX1 領域に注目し、その構造および機能解析を行った。まず、EMSA による相互作用解析の結果、SSX1 と DNA の相互作用が確認できた。特に、結合に濃度依存性があり、高 pH・低塩濃度条件下で最も強く相互作用したことから、この相互作用は主として配列非特異的な静電的相互作用であることが示された。また、SSX1 と DNA の混合溶液を高速 AFM によりイメージングした結果、同様の相互作用が確認できた。そこで、リンカー DNA を保有するヌクレオソームとの相互作用をヒドロキシルラジカルフットプリント法により検証した結果、リンカー DNA との結合が明らかになった。現在はクライオ電子顕微鏡単粒子解析と 2D NMR により相互作用様式を原子レベルで解析することを試みている。

S06-05

FoF₁-ATPase の非触媒サイトの役割を探る

○小林 廉、中野 敦樹、横山 謙

京産大・生命科学

F₀F₁-ATPase はバクテリアの形質膜やミトコンドリアの内膜に存在する超分子複合体で、可溶性の F₁ 部分と膜内在性の F₀ 部分から構成される。H⁺ 駆動力により F₀ 部分で生じた回転力が F₁ 部分に伝わり ADP と Pi から ATP を合成する。また逆反応として F₁ 部分で ATP を分解し、その回転力により F₀ 部分で H⁺ を輸送する。F₁ 部分は F₁-ATPase とも呼ばれ単独で加水分解を行うことができる。α および β サブユニットにはそれぞれヌクレオチド結合部位があり、β サブユニットでは結合した ATP が加水分解されるため触媒サイトと呼ばれ、α サブユニットでは ATP が分解されないため非触媒サイトと呼ばれる。ATP に対する親和性を欠いた非触媒サイトを持つ変異体 F₁ に ATP を加えると直ちに ATP 加水分解活性を失い、ADP 阻害状態になるという報告がある。この結果は、非触媒サイトへの ATP の結合が連続的な ATP の加水分解活性に必須であることを示すが、一方で類縁酵素である V-ATPase には非触媒サブユニットの ATP 結合能はなく、F₁ における非触媒サイトへの ATP 結合の役割は未だわからない。今回、非触媒サイトの ATP に対する親和性を欠いた変異体 F₀F₁ を作成し ATP 存在下で F₀F₁ のクライオ電顕画像を撮影した。得られた電顕画像から単粒子を抽出し、クラス分けにより ε サブユニットの up/down で分けた 6 つの構造が得られた。F₁ 部分で focused refinement を行った結果、F₁ 部分のそれぞれ 2 種類の高分解能の構造を得た。得られた構造を野生型の構造と比較することで、非触媒サイトへの ATP 結合の役割を考察する。

S06-06

Ni 置換型ルブレドキシン変異体の構造機能相関の解明

○遠藤 啓貴¹、横山 優花¹、松井 眞美²、飯塚 夏海²、庄村 康人^{1,3}

¹ 茨大・理工・量子線、² 茨大・工・生体分子、³ 茨大・フロンティア

【緒言】ルブレドキシンは、鉄と4つのCys配位子からなる酸化還元中心をもつ電子伝達タンパク質である。以前より人工的に鉄をニッケルに置換したNi置換型ルブレドキシン(NiRd)は水素合成触媒として機能することが報告されている。本研究では、好熱性細菌由来NiRdについて、配位子の1つのCysをHisに置換したNiRd変異体のX線結晶構造解析および水素合成活性のpH依存性の比較を行った。

【方法】大腸菌発現系を用いて、Rd変異体を産生し、アフィニティークロマトグラフィー、陰イオン交換クロマトグラフィーにて精製した。Niの挿入は、陰イオン交換クロマトグラフィーの前に変性剤処理によって行った。精製したNiRd試料を用いて、結晶化、X線結晶構造解析、およびガスクロマトグラフィーを用いた活性測定を行った。

【結果・考察】X線結晶構造解析の結果、配位子の一つがHisに置換されており、Niへの配位が正四面体構造のままであることを確認した。一方、ヒスチジン配位子のダブルコンフォメーション化といったような野生体には見られなかった構造的特徴が確認された。還元型および超酸化型の調製を試みたが結晶の色に変化は見られず、構造解析の結果でも大きな構造変化や酸化還元中心周りの電子密度に変化は見られなかった。このことから、還元剤や酸化剤によるNiの酸化状態が変化していないことが示唆された。また、三条件のpHで活性測定を行った結果、野生体と比較して変異体の比活性は変動が小さくなることが分かった。

S06-08

大腸菌内ユビキチン化システムによる活性型SETDB1の調製と評価

○船生 智子¹、小野田 浩宜¹、山形 敦史²、有田 恭平¹

¹ 横市・生命医、² 理研・生命機能

哺乳類のゲノムの約40%は動く遺伝子であるトランスポゾン由来の配列で占められる。その中で内因性レトロウイルス由来の配列は約10%を占め、その異常な発現はゲノム不安定性を引き起こし宿主にとって有害である。それに対する防御機構にヒストン修飾が存在する。本研究対象のSETDB1(SET domain bifurcated histone lysine methyltransferase 1)はヒストンH3K9をトリメチル化する酵素で、遺伝子発現、内因性レトロウイルスの転写を制御する。SETDB1のヒストンメチル化活性はC末端にある保存されたSETドメインが担い、ドメイン内に約300アミノ酸からなる長いinsertionが存在する。興味深いことに、SETDB1のinsertion内のK867のユビキチン化がヒストンメチル化活性に重要だと分かっている。しかし、ユビキチン化によるSETDB1の酵素活性化機構は不明である。本研究で、ユビキチン化によるSETDB1の酵素活性化機構を構造生物学的な研究で解明することを目的とした。我々はモノユビキチン化SETDB1を調製するため大腸菌内ユビキチン化プラスミドを構築した。SETDB1をコードする発現プラスミドとユビキチン化プラスミドを大腸菌内で共発現させ、部位特異的にSETDB1のK867のモノユビキチン化に成功した。精製したモノユビキチン化SETDB1を用いてin vitroヒストンH3メチル化実験を行ったところ、モノユビキチン化SETDB1でヒストンH3K9メチル化活性が見られた。本研究により、大腸菌内ユビキチン化システムで活性化型のモノユビキチン化SETDB1の調製に成功した。

S06-07

腫瘍性融合タンパク質SS18-SSX1におけるC末端領域のヌクレオソームへの結合様式

○小淵 里恵¹、堀越 直樹²、谷 一寿³、吉永 匡希¹、吉田 尚史⁴、竹中 聡⁵、胡桃坂 仁志²、岩崎 憲治⁴

¹ 筑波大・理工情報生命・数理、² 東大・定量生命科学研、³ 三重大医、⁴ 筑波大・TARA、⁵ 大阪国際がんセ

滑膜肉腫(SS)は、四肢関節を中心に全身に発症する悪性軟部腫瘍の一つであり、希少がんに分類される。その主な原因は、染色体転座の産物である腫瘍性融合タンパク質SS18-SSXである。SS18-SSXが遺伝子の発現の制御に重要なクロマチンリモデリング複合体BAFに取り込まれることで、転写調節異常が起き、腫瘍発生のトリガーとなる。現在、不適切な染色体リモデリングは、SS18-SSXのC末端34残基に相当するSSXRDドメインがヌクレオソームの酸性パッチ領域へ結合することで引き起こされるという仮説が提唱されている。この仮説を元に我々は実験計画を立てた。まず、EMSAによりGST-SSXRDとヌクレオソーム間の相互作用が確認できた。この相互作用は非常に弱いものであったが、適切な濃度のグルタルアルデヒドを用いることで明瞭に複合体のバンドが観察された。この相互作用はGSTのみとヌクレオソーム間では観察されなかった。GST-SSX1RDとヌクレオソームの複合体をGraFix法によって単離し、クライオ電子顕微鏡単粒子解析を行った。その結果、3.6Åの分解能で構造を決定することができた。その立体構造からSSX1RDドメインが酸性パッチに結合していることが明らかとなり、前述した仮説が正しいことが示された。さらに、SSX1RDによるDNAへの結合も電顕密度図から推測され、さらなる電顕密度図の改良により、真偽の確認を試みている。

S06-09

Recombinant production of the antimicrobial peptide cecropin P1 via a calmodulin-fusion system and structural analysis by NMR spectroscopy

○Hao Gu¹, Takasumi Kato¹, Hiroyuki Kumeta², Yasuhiro Kumaki², Takashi Tsukamoto², Takashi Kikukawa², Makoto Demura², Hiroaki Ishida³, Hans J. Vogel³, Tomoyasu Aizawa²

¹ Grad. Sch. of Life Sci., Hokkaido Univ.,

² Fac. of Adv. Life Sci., Hokkaido Univ., ³ Dept. of Bio. Sci., Univ. of Cal.

Cecropin P1 (CP1) isolated from *Ascaris suum* living in intestines of pigs is known as a model α -helical antimicrobial peptide (AMP). However, it is difficult to obtain large amounts of recombinant CP1 through the past recombination system using *Escherichia coli* because of the undesirable degradation and toxicity of this basic peptide (pI 10.56) to host cells. In this research, a new fusion partner called calmodulin which owns many successful cases on overexpress various AMPs was used to solve those problems. Compared to the traditional fusion system with thioredoxin, the yield significantly improved so that stable isotope-labeled CP1 was produced for structure analysis in membrane mimic environment by nuclear magnetic resonance. Although the N-terminal is important for the activity of the cecropin family, the C-terminal of CP1 was found to exhibit toxicity in recombinant expression in this research. By analyzing the three-dimensional structure and antibacterial activity of CP1 and its analogs, the activity of DNA binding may be the source of the potent toxicity of CP1.

S06-10

CRISPR-Cas12c2 の構造解析および生化学的解析

○栗原 新奈¹、中川 綾哉¹、平野 央人¹、西増 弘志^{1,2}、濡木 理¹

¹ 東大・理・生科、² 東大・先端研

CRISPR-Cas 機構は原核生物の獲得免疫機構であり、Cas12 はこの機構に関与するタンパク質のグループである。Cas12 はガイド RNA (crRNA および tracrRNA) と複合体を形成し、ガイド配列と相補的で、近傍に PAM と呼ばれる特定の配列をもつ二本鎖 DNA を切断する。Cas12 は、標的 DNA を切断する RuvC ドメインは保存されている一方、分子系統学的に分類されたグループ (Cas12a-Cas12k) によって、認識する PAM や DNA 切断様式などの性質が大きく異なる。このように多様な Cas12 の中で、Cas12c2 は最も単純な TN という PAM を認識し、特有の PAM 認識機構をもつことが示唆されていた。また、Cas12c2 は crRNA 前駆体 (pre-crRNA) を成熟させるプロセシング機構をもつ。しかし、これらの詳細な機構は明らかにされておらず、その生化学的特性は不明であった。

本研究では Cas12c2 の分子機構を明らかにするために、*in vitro* における生化学的解析およびクライオ電子顕微鏡による構造解析を行った。予想外に、Cas12c2 は他の Cas12 とは異なり、標的 DNA を切断せず、結合することで機能することが示された。また、Cas12c2-ガイド RNA 二者、および、Cas12c2-ガイド RNA-DNA 三者複合体の立体構造を決定した。得られた構造から、Cas12c2 による短い PAM の認識機構やガイド RNA 依存的な DNA 結合機構が明らかになった。さらにプロセシングに関しても、Cas12c2 は pre-crRNA の特定の配列を認識し、RuvC で切断するという特有の機構をもつことがわかった。以上の結果は、Cas12 の多様性の理解に貢献するものである。

S06-12

Structural analysis of a GroEL-like protein complex from the thermophilic hydrogen-oxidizing bacterium, *Hydrogenophilus thermoluteolus* TH-1

○Zengwei Liao¹, Takatoshi Arakawa^{1,2}, Masafumi Kameya^{1,2}, Masaharu Ishii^{1,2}, Shinya Fushinobu^{1,2}

¹ Department of Biotechnology, Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo,

² Collaborative Research Institute for Innovative Microbiology, The University of Tokyo

Hydrogenophilus thermoluteolus is a thermophilic aerobic hydrogen-oxidizing bacterium, which can grow either as a chemolithoautotroph on hydrogen or sulfur compounds or as a heterotroph on organic media. While its growth characteristics have been pursued, molecular mechanisms underlying the cellular metabolism remain to be solved. In this study, we focus on GroEL-ES chaperonin complex of *H. thermoluteolus* TH-1 to reveal the structures and dynamics for protein macrocomplexes. GroEL-like protein was extracted and purified from *H. thermoluteolus* TH-1 cultivated under a heterotrophic condition. Purified GroEL-like protein was then used for cryogenic electron microscopy (cryo-EM) screening and data collection. The images taken by Titan Krios G4 with K3 camera were processed with Relion-4 beta, in which the neural network-based particle picking pipeline TOPAZ and variable-metric gradient descent algorithm were utilized. A density map with a resolution of ~4 Å was reconstructed, and molecular model was built for comparison. The ortholog of *H. thermoluteolus* has a high sequence identity with *Escherichia coli* GroEL, and insights based on this structure analysis will provide significance for functionality and thermostability.

S06-11

ダイズ *Glycine max* 由来 L-メチオニン γ -リアーゼの X 線結晶構造解析

○橋本 沙樹¹、井上 朝晶¹、牧野 晴菜¹、横山 大輝²、大川 敦司²、手嶋 琢³、松井 健二³、稲垣 賢二²、志波 智生¹

¹ 京工繊大・院・応生、² 岡山大・院・環境生命、

³ 山口大・院・創成科学

L-メチオニン γ -リアーゼ (MGL) は、ピリドキサル 5'-リン酸 (PLP) を補酵素として、L-メチオニンの α 、 γ -脱離反応および α 、 β -脱離反応を触媒する。これまで植物由来 MGL の分子機構は、ほとんど解明されていなかった。本研究では、ダイズ由来 L-メチオニン γ -リアーゼ (GmMGL) の分子構造を明らかにするために、X 線回折実験を行った。

野生型 GmMGL1 の結晶化条件を探索したところ、PEG3400 を沈殿剤として使用し、単結晶を再現性良く得ることができた。生じた結晶を大型放射光施設 SPring-8 で X 線回折実験を行った。その結果、空間群は P41212、格子定数は、 $a = 125.1$, $c = 240.3$ 、分解能は 3.3 Å、非対称単位に GmMGL1 の四量体が 1 分子存在していた。シュードモナス由来 MGL (PpMGL) を分子置換法のモデルに使用し、構造決定を行った。その結果、活性部位に PLP の明瞭な電子密度が確認できた。PpMGL と比較して、活性部位を構成するアミノ酸残基はほとんど一致していた。しかし、PpMGL でみられる水素結合ネットワークが存在していなかった。また、GmMGL1 では、2 つのループ構造が活性部位を覆うように位置していた。このループは PpMGL では存在しなかったため、GmMGL1 は基質が入りにくくなり、PpMGL と比較して反応性が低下する可能性が示唆された。

S07-01

セルピン病治療薬開発の標的分子模倣体の創出と候補化合物の取得

○加島 祐希、品田 紗智子、恩田 真紀

大阪公大・理・生物化学

【背景と目的】セルピン蛋白質の変異体がポリマー化して発症する疾患をセルピン病と呼び、認知症 (ニューロセルピンの H338R 変異体: 以下 H338R) や肺炎腫 (α_1 -アンチトリプシン、COVID-19 重症化にも関与) がよく知られている。セルピンのポリマーは late-folding 中間体 M* から形成されることから、M* が治療薬開発の標的分子の 1 つとなっている。本研究では、H338R を利用した M* 模倣体の創出と、その分子構造、および薬剤候補について報告する。

【方法と結果】大腸菌封入体から調製した尿素変性 H338R を緩衝液で希釈して refolding させると、Native 型にまで戻れず中間体で folding が停止した。得られた分子種は凝集しやすく解析に不向きであったため、安定化のための S-S 結合を導入した変異体 H338R/T296C/E343C (以下 H338R_{s-s}) から folding 中間体を調製し、その諸性質を円偏光二色性や蛍光分析等で調べた。その結果、得られた分子種の構造は MD で予測されている M* のそれとよく一致しており、且つ単量体で長時間安定に存在できる、目的に適う模倣体であることが分かった。次に、HDX-MS でより詳細に構造を調べたところ、 β -ストランドで構成されるシャッターと呼ばれる領域が開いていることが示唆された。そこで、開いたシャッターに結合するよう *in silico* スクリーニングで見出した低分子化合物の作用を調べたところ、ポリマー化を抑止することが明らかとなった。

S07-02

セルピンポリマーの凝集における C 末端領域の寄与

○養方 萌詠、米倉 百音、恩田 真紀

大阪大・理・生物化学

【背景と目的】セルピン族の蛋白質はポリマー化しやすく、これが凝集して生体内に蓄積すると、認知症（ニューロセルピン）や肝硬変／肺気腫（ α_1 -アンチトリプシン）が発症する。セルピンのポリマー化機構については、X 線結晶構造解析に基づいた詳細な研究がなされているが、ポリマーどうしが lateral な相互作用により分解困難な凝集体を形成する過程はほとんど解析がなされていない。本研究では、アミロイド線維を形成するセルピンとして知られるオボアルブミン (OVA) と、病原性セルピン（ニューロセルピン、 α_1 -アンチトリプシン）をモデルとして、ポリマーからの凝集体形成について調べた。

【方法と結果】OVA のアミロイド線維形成過程は、チオフラビン T (ThT) をプローブとした DSF により追跡できる。病原性セルピンについても同手法で解析したところ、OVA と同様の ThT 蛍光の増大が見られた。セルピンの C 末端 30-40 残基は凝集傾向が高いアミノ酸配列になっており、且つセルピン間で高度に保存されている。この領域を除いたセルピン (H 鎖) を DSF および Native-PAGE で解析したところ、直鎖ポリマーの形成は可能なものの、凝集体の形成が起こらなかった。しかし、この H 鎖ポリマーに C 末端断片 (L 鎖) を添加すると、ThT と強く結合する凝集体を形成することが明らかとなった。L 鎖は H 鎖の特定の部位に特異的に結合しており、FRET 測定より、その部位を特定した。

S07-04

統計力学モデルの改良によるタンパク質のフォールディング反応経路の予測

○劉 潤晶¹、大岡 紘治²、新井 宗仁^{1,2}¹ 東大・総合文化・生命環境、² 東大・理・物理

タンパク質のフォールディング反応機構の解明は生命科学における重要課題のひとつである。Wako-Saitô-Muñoz-Eaton (WSME) モデルは一次元イジングモデルに基づく統計力学モデルであり、分子動力学計算と比べて遥かに少ない計算量にも関わらず、タンパク質の立体構造に基づいて自由エネルギー地形を描くことができ、フォールディング反応経路を予測できる。これまでに、プロテイン A の B ドメイン (BdpA) などの小型タンパク質のフォールディング経路をある程度正確に予測できている。しかし BdpA の場合、変性中点温度 (50℃ 付近) のような高温領域では予測精度が低下するという問題があった。そこで本研究では、室温から高温にわたる広い温度領域でフォールディング経路を正確に予測可能とするために、より精密な計算が可能な改良型 WSME モデルを構築した。モデル計算を厳密化するために、実験と同じ変異体の PDB 構造を使用し、残基間コンタクトエネルギーは AMBER 力場を用いて高精度で計算した。その結果、改良型 WSME モデルでは、25℃ と 50℃ 付近の両方において、BdpA の実験結果を再現しうる自由エネルギー地形を予測することに成功した。また、遷移状態での構造形成度の指標である ϕ 値を求めたところ、改良型 WSME モデルでは実験結果との整合性が大幅に向上した。今後、この改良型モデルを用いることによって、様々なタンパク質のフォールディング反応経路を正確に予測可能になることが期待される。

S07-03

薬剤開発に有用な熱安定型 α_1 -アンチトリプシン変異体の創出

○井上 栞里、勘澤 良介、綿谷 凌、恩田 真紀

大阪大・理・生物化学

【背景】 α_1 -アンチトリプシン欠乏症は、血漿蛋白質の α_1 -アンチトリプシン (AAT) の点変異により発症するミスフォールディング病で、肺気腫や肝硬変を引き起こす。AAT の変異は東アジアでは極めて稀であるが、南欧では 28%、北米では 10% の割合で存在し、肺組織の破壊が起こることから、COVID-19 重症化リスクの 1 つとなっている。本疾患の薬物治療は、これまで組換え型 AAT 補充療法が適用されてきたが、COVID-19 パンデミックにより、低分子薬剤のニーズが一気に高まった。

【戦略】AAT が属するセルピン族は、Native 構造が準安定で、最安定型である不活性型 (Latent 型やポリマー) へ容易に自発転移することから、SBDD には不向きである。セルピン族で唯一、低分子薬剤の開発に成功している PAI-1 では、熱安定型変異体 PAI-1_{am} を薬剤開発に利用する手法が標準となっている。そこで、AAT についても、同様の熱安定型改変体を調製した。

【方法】当研究グループは、ニューロセルピンの熱安定型改変体 NS_{GKI} を創出し、その X 線結晶構造解析にも成功している。ここで得られた構造データと、野生型 AAT の結晶構造を基に、AAT_{TE} (F189Y/T339E) を調製した。

【結果】AAT_{TE} の構造および活性は野生型のそれとよく一致しており、且つ、 T_m 値は狙い通り 5.8℃ 上昇した。この熱安定型改変体創出手法は、PAI-1_{am} を獲得したランダムスクリーニングとは異なり、他のセルピンにも応用できる画期的なものである。

S07-05

マルチドメイン型の銅・亜鉛スーパーオキシドディスムターゼにみられる機能的な連携

○目加田 祐道

慶大院・理工

銅・亜鉛スーパーオキシドディスムターゼ (SOD) はスーパーオキシドの不均化を促進する酵素で、バクテリアから哺乳類まで高度に保存されており、約 150 のアミノ酸残基から構成されるイムノグロブリンフォールドを有している。興味深いことに、NCBI のタンパク質配列データベースには、SOD と異なるドメインを融合した「マルチドメイン型」の SOD タンパク質がいくつか登録されているが、その構造や機能については明らかとされていない。そこで本研究では、Deinococcus 属細菌の SOD (DrSOD) が、 β プロペラフォールドと予想されるドメインを融合していることに着目し、その構造と機能について検討した。まず、DrSOD をコードする遺伝子をノックアウトした *D. radiodurans* を利用して、DrSOD がマルチドメイン型の SOD として発現していることを確認した。次に、大腸菌に発現させたりコンビナントの DrSOD タンパク質が、銅イオンと亜鉛イオンを 1 モル当量ずつ結合でき、ヒトの SOD と同程度の活性を呈することを見出した。一方で、SOD と融合した β プロペラドメインは、グルコノラクトナーゼである SMP30 の相同性を有していることがわかったものの、DrSOD がグルコノラクトナーゼ活性を発揮しうるのかは現在検討中である。また、DrSOD の結晶化には成功していることから、構造解析を進めることで、マルチドメイン型 SOD における機能的なドメイン間連携について議論する予定である。

S07-06

筋萎縮性側索硬化症における SOD1 への亜鉛イオンの異常な結合とミスフォールディング

○青木 拓門

慶大院・理工

銅・亜鉛スーパーオキシドディスムターゼ (SOD1) のミスフォールディングは、筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の発症要因になることが提案されている。しかし、SOD1 のミスフォールディング機序については、明らかでない点が多く残されている。通常、ホモ二量体として安定に存在する SOD1 は、それぞれのサブユニットに銅・亜鉛イオンが一つずつ結合しているものの、病変部位である脊髄に発現した SOD1 の一部は、銅イオンの代わりに亜鉛イオンを結合していることが報告されている。そこで、SOD1 の構造安定性を評価する新たな手法として見出した非加熱 SDS-PAGE を利用することで、銅イオン結合部位への亜鉛イオンの異常な結合が、SOD1 の構造に及ぼす影響について検討した。まず、金属イオンを結合していないアポ型 SOD1 について、非加熱 SDS-PAGE により解析したところ、変性した単量体として検出された。次に、銅イオンと亜鉛イオンを 1 モル当量ずつ添加して作製したホロ型の SOD1 を同様に解析したところ、ホモ二量体と示唆される位置に検出された。一方で、亜鉛イオンを 2 モル当量添加した SOD1 は、アポ型 SOD1 と同じ、変性した単量体として検出されることが分かった。よって、安定なホモ二量体の形成には銅イオンの結合が必須であり、亜鉛イオンでは代替できないことから、ALS に見られる亜鉛イオン結合型の SOD1 がミスフォールディングの起点となる可能性を提案する。

S07-08

タウのアミロイド線維形成に対する酸化還元状態の影響

○益井 歩未¹、柚 佳祐¹、山口 圭一²、後藤 祐児²、河田 康志³、茶谷 絵理¹

¹ 神大・理・化学、² 阪大・国際医工情報セ、³ 鳥取大・工・化生

タウタンパク質は微小管結合タンパク質の一種であり、細胞内でアミロイド線維を形成し沈着することで、神経変性疾患の発症に関わる。タウのアミロイド線維形成過程においては、毒性のあるオリゴマーが見られることが報告されている。疾患の予防や治療方法の確立のために、オリゴマー形成機構の解明が求められているが、詳細は明らかになっていない。そこで本研究では、試験管内でタウの凝集反応を進行させ、タンパク質分子の集合過程を動的光散乱法 (DLS) により追跡することで、オリゴマー形成機構の解明を試みた。タウのアミロイド線維形成は、線維化促進剤としてヘパリンを添加することで行った。タウは 2 つのシステイン残基を持ち、分子間および分子内で S-S 結合を形成するため、還元剤存在下・非存在下の 2 つの条件で反応を行った。反応初期の粒径発達を DLS 測定によって追跡したところ、どちらの条件下でもオリゴマーの形成が示唆されたが、還元剤の有無によってサイズ発達の挙動は異なった。線維形成反応の最終生成物を、原子間力顕微鏡観察とシーディング反応によって評価すると、還元剤存在下ではアミロイド線維の生成が観察された。一方、還元剤非存在下では、粒状のオリゴマーと短い棒状の非アミロイド性凝集物が観察された。従って、オリゴマー形成の経路は S-S 結合の状態によって変わることが考えられた。以上の結果をふまえ本演題では、タウのオリゴマー形成に先立つタンパク質分子集合メカニズム、および、オリゴマーの特性について報告する。

S07-07

高次多量体形成が駆動する heat shock factor-1 液滴の酸化的相転移

○川越 聡一郎^{1,2}、松崎 元紀³、石森 浩一郎^{1,4}、齋尾 智英^{2,3}

¹ 北大院・総化、² 徳島大・医科学、³ 徳島大・先端酵素、⁴ 北大・理学研究院

外部環境の変化に対処するため、生体内では種々のストレスセンサーが機能している。その一つである heat shock factor-1 (Hsf1) は、主に熱ストレスを感知して多量体化し、シャペロンの転写促進により細胞を保護する一方、ストレス時には長大なリピート配列からなるノンコーディング DNA 周辺に集積し、核内ストレス顆粒 (nSBs) を構成する。この nSBs は強いストレス下で液状からゲル状に相転移し、シャペロンの転写量低下とアポトーシスを誘導する。つまり、Hsf1 はストレスに依存して細胞保護と、nSBs の形成及び相転移によるアポトーシスという相反する効果をもたらすが、その詳細な機構は未解明である。そこで本研究では、まず、nSBs 形成機構を検討するため、精製した Hsf1 を共焦点顕微鏡で観察したところ、高濃度領域で液滴形成が認められ、Hsf1 の液-液相分離が nSBs 形成を駆動することを見出した。次に、nSBs をゲル状に相転移させる要因の解明のため、光褪色後蛍光回復法により Hsf1 液滴の流動性を評価した結果、酸化的雰囲気下でその流動性は著しく低下し、ゲル状に相転移することが示された。この相転移の機構を明らかにするため、屈折率イメージングと SEC-MALS により酸化的条件下での Hsf1 の会合状態を検討したところ、ジスルフィド結合により高次に多量体化した Hsf1 が液滴内部で観測された。これらの結果から、Hsf1 は酸化的ストレスをジスルフィド結合形成により検知し、その結果生じる Hsf1 の高次多量体が nSBs のゲル状への相転移を駆動すると考えられた。

S07-09

アミロイド線維形成における α シヌクレインの初期凝集機構の解明

○北野 さくら、柚 佳祐、笹田 航、木村 哲就、茶谷 絵理

神戸大・理・化学

アミロイド線維の形成は、核形成と伸長の 2 段階で進む。核が形成するとその核を鋳型として速やかに伸長するため、核形成は重要なステップであると考えられる。しかしながら、その間に進行する凝集の動態は不明な点が多い。また、初期過程において、毒性の強いオリゴマーを生じ、このことが疾患の発症に大きく関わるという報告もある。これらのことから、核形成における初期凝集の動態を明らかにすることが重要であると考えられる。

そこで本研究では、アミロイド線維を形成するタンパク質の一つである α シヌクレインの初期凝集の観測を試みた。ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) 存在下では、初期凝集が明確に見られるという過去の報告を参考にし、SDS 存在下で α シヌクレインの線維化を解析対象とした。チオフラビン T (ThT) による静置条件下での凝集反応の追跡の結果、SDS が存在すると凝集反応が進行し、SDS 濃度依存的にその挙動が異なることがわかった。特に、0.5 mM 付近の SDS 濃度では、ThT 蛍光強度の上昇が見られたが、生成物はシーディング能が見られない凝集物であった。しかし、振とうすると、速やかに ThT 蛍光強度が上昇したことから、線維化可能な線維前駆中間体の可能性がある。そこで、本凝集物に着目し、動的光散乱法により経時的なサイズ変化を追跡すると、ThT 蛍光強度の上昇の挙動よりも先に会合が進む様子が観察された。本発表では、得られた情報に基づき、SDS 存在下で生じる初期凝集の構造や進行プロセスの特徴を議論する。

S07-10

Amyloid fibril formation of fragmented transthyretin

○ Keisuke Yuzu¹, Misato Matsumura¹, Naoki Yamamoto², Masatomo So³, Keiichi Yamaguchi⁴, Eri Chatani¹¹Grad. Sch. Sci., Kobe Univ., ²Fac. Med., Jichi Med. Univ.,³Inst. Protein Res., Osaka Univ., ⁴MEI Center, Osaka Univ.

Transthyretin (TTR) is a tetrameric plasma protein synthesized mainly in the liver and functions as a transporter of thyroxine and retinol. TTR often deposits in tissues as amyloid fibrils due to aberrant aggregation, which induces the onset of serious diseases such as senile systemic amyloidosis and familial amyloid polyneuropathy. However, the formation of TTR amyloid fibrils is difficult to reproduce under physiological conditions in vitro because the tetrameric state is stable at neutral pH, and much remains unknown how TTR forms amyloid fibrils.

Recently, a TTR49-127 fragment, which is a N-terminal truncated TTR produced by proteolytic cleavage at the residue K48, has attracted attention as a fragment that can form amyloid fibrils. Thus, the fragmentation of TTR is considered as a key factor that facilitates the amyloid formation. In this study, we investigated TTR fibril formation using various TTR-derived fragments including TTR49-127. We found that TTR49-127 forms amyloid fibrils at neutral pH under shaking. In addition, shorter TTR-derived peptides, TTR16-35 and TTR81-127, also formed amyloid fibrils. Based on these findings, the amyloid formation mechanism of TTR induced by fragmented TTR will be discussed.

S07-12

真空紫外円二色性と分子動力学法による α シヌクレインの生体膜結合構造の解析○今浦 稜太¹、熊代 宗弘²、河田 康志³、松尾 光一⁴¹ 広島大・先進理工・物理、² 広島大・院理・物理、³ 鳥取大・工、⁴ 広島大・放射光

α シヌクレイン (α -Syn) の線維形成前の生体膜結合構造は、塩の有無などの溶媒環境により異なる。本研究では、真空紫外円二色性 (VUVCD) 法、直線二色性 (LD) 法、分子動力学 (MD) 法により塩 (100 mM NaCl) 存在下・非存在下における α -Syn の膜結合構造の違いを解析し、膜相互作用への塩の効果について考察した。VUVCD 法から塩非存在下の α -Syn は、脂質/タンパク質濃度比 (L/P)=100 付近でヘリックスリッチな膜結合構造を形成し、N 末端には膜結合するヘリックス領域を、C 末端には膜結合しないヘリックス領域を持つことが予測された。LD 法から N 末端の膜結合ヘリックスは膜表面に対し平行であること、また C 末端のヘリックス内のチロシン (Tyr) 残基が膜結合することが示唆された。塩存在下では、L/P=100 付近でヘリックスリッチな膜結合構造を形成したが、非存在下に比べてヘリックス含量が少なく、また N 末端の膜結合ヘリックスの領域やその配向は保持されたが、C 末端のヘリックスは形成されず Tyr の膜結合も観測されなかった。塩存在下・非存在下における α -Syn の膜結合性の違いを確認するため、生体膜中で C 末端領域の MD シミュレーションを実施した結果、塩非存在下では、静電的・疎水性相互作用による膜結合が確認されたが、塩存在下ではこれらの相互作用が強く抑制されることが分かった。塩の効果により、 α -Syn の C 末端領域の膜結合構造や膜相互作用が大きく異なることが分かった。

S07-11

トランスサイレチン 49-127 断片のアミロイド線維化反応における塩の影響

○中尾 星哉、柚 佳祐、松村 美里、大橋 祐美子、茶谷 絵理

神戸大・院理

トランスサイレチン (TTR) は 127 残基からなる血漿タンパク質である。TTR は異常凝集を起こすことによってアミロイド線維を形成し、老人性全身性アミロイドーシス (SSA) や家族性アミロイドポリニューロパチー (FAP) などの疾患を引き起こすことが知られている。生体内における TTR の詳細な線維化機構は未解明だが、SSA や FAP の患者のアミロイド沈着物にはタンパク質分解酵素による切断によって生成した TTR の C 末端断片由来の線維が含まれていることが分かっている。特に 49 番目以降のポリペプチド鎖断片である TTR49-127 断片については、それ自体を主成分とする線維が確認されており、生体内で自発的に線維化していると考えられている。しかし、その詳細な機構は明らかになっていない。

そこで本研究は、TTR49-127 断片の線維化反応をチオフラビン T (ThT) 蛍光強度測定や円偏光二色性測定等の手法によって調べた。TTR49-127 断片は静置条件では線維を形成しなかったが、振とう条件では線維を形成した。また、線維化反応に対する塩の効果について調べたところ、塩の存在下では振とう条件で生じる線維化反応の加速が確認された。さらに、初期段階で ThT 蛍光強度が微小に上昇することがわかった。これは、アミロイド線維の形成に先立って生じる凝集反応の存在を示唆するものである。本発表では、塩の存在下での線維化反応と凝集反応の特徴およびそれらの関係について報告する。

S08-01

植物由来短鎖シス型プレニルトランスフェラーゼに特有な N 末端領域の構造的特徴と酵素活性に与える影響

○今泉 璃城¹、三沢 柊人¹、片岡 邦重¹、廣森 美樹²、高橋 征司²、山下 哲¹¹ 金沢大・自然科学、² 東北大・工

イソプレノイドは、イソペンテニル二リン酸 (IPP) をイソプレノ単位として持つ化合物の総称であり、全生物に普遍的に存在し、植物の適応代謝産物としても大きな割合を占めている。シス型プレニルトランスフェラーゼ (cPT) は、アリル性プレニル二リン酸に対し、IPP をシス型に連続縮合する反応を触媒するが、アリル性プレニル二リン酸基質特異性や IPP の縮合回数の制御因子は未だ完全には理解されていない。我々は、短鎖 cPT に分類される *Solanum lycopersicum* (トマト) 由来ネリル二リン酸合成酵素 (NDPS1) の結晶構造を 1.94 Å 分解能で決定した¹⁾。本酵素は、cPT fold と呼ばれる基本骨格によるホモダイマー構造に加えて、N 末端の約 25 残基からなる付加配列によって構成されている。この N 末端領域は類似酵素にも保存されており、酵素活性への影響が示唆されている一方、構造は不明であった²⁾。今回、我々は、NDPS1 の N 末端領域の明確な電子密度を初めて確認し、その中に見いだした二つのジスルフィド結合の構造安定性への寄与および機能的な意義を推定している。本発表では、NDPS1 の N 末端領域構造の詳細および、ジスルフィド結合が形成されないように設計した変異体を用いた実験結果について報告する。

【参考文献】 1) R. Kutsukawa, R. Imaizumi, M. Suenaga-Hiromori, K. Kataoka, S. Yamashita, S. Takahashi et al., *FEBS J.*, in press 2) Y. Chan et al., *ACS Omega*, 2, 3, 930-936, 2017

S08-02

X線結晶構造解析によるがん特異的抗体 MMG49 の抗原認識機構の解明

○佐々木 優奈¹、有森 貴夫¹、保仙 直毅²、高木 淳一¹

¹ 阪大・蛋白研、² 阪大・医

がんの治療において、がん特異的抗原を認識する抗体は有用なツールとなる。MMG49 は多発性骨髄腫特異的抗体であり、これを使った CAR-T 細胞療法が考案されている。MMG49 の抗原であるインテグリン $\alpha 4 \beta 7$ は正常細胞にも発現しているが、MMG49 はがん細胞上のインテグリン $\alpha 4 \beta 7$ のみを特異的に認識するという特長を持つ。インテグリンは α 鎖と β 鎖から成る膜蛋白質であり、活性化状態により大きく構造変化することが知られている。がん細胞上ではインテグリン $\alpha 4 \beta 7$ が恒常的に活性化しており、MMG49 は活性化型コンフォメーションのインテグリン $\alpha 4 \beta 7$ を選択的に認識することでがん特異性を発揮すると考えられているが、MMG49 がどのような特殊なコンフォメーションを認識するのかの詳細は不明である。我々は、インテグリン $\alpha 4 \beta 7$ と MMG49 の複合体の X 線結晶構造解析により、これを解明しようと考えた。MMG49 は、結晶化と構造解析の成功率を飛躍的に高める「Fv-clasp」と呼ばれる小型抗体断片に変換した。ゲル濾過クロマトグラフィーでインテグリン $\alpha 4 \beta 7$ との複合体形成を評価したところ、インテグリン活性化因子の Mn^{2+} イオン存在下で両者は 1:1 で結合したため、MMG49 は Fv-clasp に変換しても活性を保ち、安定な複合体を形成することが分かった。また、MMG49 Fv-clasp 単体での結晶化を試みたところ、1.97 Å 分解能の構造決定に成功し、相補性決定領域も含めた高精度な構造が得られた。今後、複合体の結晶化と構造決定を行うことで、MMG49 の抗原認識機構を解明できると期待される。

S08-04

狂犬病ウイルス P 蛋白質による STAT 阻害機構解明のための、複合体クライオ電顕構造解析に向けた取り組み

○杉山 葵¹、南 未来¹、杉田 征彦²、廣瀬 未来³、喜多 俊介^{1,4}、有森 貴夫³、高木 淳一³、前仲 勝美^{1,4}、姚 関^{1,5}、尾瀬 農之^{1,5}

¹ 北大院・生命科学、² 京大・ウイルス・再生研、³ 阪大・蛋白研、

⁴ 北大院・薬、⁵ 北大院・先端生命

狂犬病は、狂犬病ウイルス (RABV) が引き起こす人獣共通感染症である。すべての食肉目に感染する非常に広い宿主域を持つうえ、発症すればほぼ 100% が死に至る。このような強毒性を示す要因の一つに、RABV が宿主の免疫機構を不活化する機構が挙げられる。このような免疫阻害は、RABV ゲノム中にコードされる P 蛋白質により起こる。さらに、阻害の主要な標的の一つは STAT 分子であることが分かっているが、STAT 分子を P 蛋白質が認識、不活化する機構は不明である。私達は、ウイルスの毒性発現要因を「ウイルスによる免疫分子阻害」の観点から論じる上でも、P 蛋白質による STAT 阻害の分子基盤解明を目的としている。これまでに、相互作用解析により、P 蛋白質による STAT 分子の認識領域を絞り込めたが、残基レベルでの阻害標的領域の特定には至っていない。そこで、クライオ電子顕微鏡を用いた、STAT-P 複合体の単粒子構造解析に着手した。高純度の複合体調製には成功したが、包埋された粒子の配向性に偏りがあるため、高分解能の三次元像は未だ得られていない。配向性の偏りを解消することを考え、STAT 分子のループ領域に着目した。気液界面との相互作用を変化させる目的で、このループ領域に NZ-1 抗体のエピトープ配列を挿入した。STAT-NZ-1 Fv-clasp 複合体を作製し、相互作用解析やネガティブ染色による電顕観察を行ったところ、P 蛋白質との結合に影響を与えていないことを確認した。

S08-03

新型コロナウイルス 3CL プロテアーゼ阻害剤が結合した P 糖タンパク質のクライオ電子顕微鏡単粒子解析

○濱口 紀江¹、安達 成彦²、今野 翔³、川崎 政人²、守屋 俊夫²、安田 賢司¹、小笠原 諭¹、林 良雄³、千田 俊哉²、村田 武士¹

¹ 千葉大・理・化、² 高工ネ機構・物構研・構造生物、³ 東葉大・薬

新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) はいまだ感染の収束を見せておらず、新型コロナウイルスを標的とした治療薬の開発が急務となっている。林らが開発した重症急性呼吸器症候群コロナウイルスの 3CL プロテアーゼ阻害剤 YH-53 は、新型コロナウイルスの増殖も抑制したが多剤排出トランスポーターである P 糖タンパク質 (P-gp) によって細胞外へ排出されることが示唆された。すでに 3CL プロテアーゼと YH-53 の複合体構造は明らかになっているため、YH-53 が結合した P-gp の立体構造が得られれば、3CL プロテアーゼへの親和性を保持しつつ P-gp による排出を回避できる化合物の設計が可能になると期待される。そこで本研究では、YH-53 存在下での P-gp のクライオ電子顕微鏡単粒子解析を行なった。動物細胞を用いてヒト P-gp を発現させ、界面活性剤で可溶化後、独自に開発した His タグ認識抗体を用いて精製した。そして YH-53 を過剰量加え、Titan Krios G3 (K3 camera) を用いて 3,564 枚の顕微鏡写真を撮影した。RELION3.1 プログラムを用いて単粒子解析を行い、3.9 Å の分解能で立体構造を決定することに成功した。化合物結合ポケットが存在する細胞膜貫通領域は局所分解能が最も高く、YH-53 と推定される密度が確認された。現在、得られた 3D マップへの原子モデルの構築を進めている。

S08-05

塩基除去修復に関与する DNA ポリメラーゼ β と PCNA の構造解析に向けた結晶化

○鈴木 楓也、菱木 麻美、原 幸大、橋本 博

静岡県・薬

遺伝情報を担う DNA は、内的、外的要因によりさまざまな損傷を受けるが、そのほとんどは、損傷に応じた修復機構によって修復される。塩基除去修復 (BER) は DNA の内因的に発生する脱塩基や修飾塩基部位を排除・修復する重要な経路である。BER には単一ヌクレオチドが置換されるショートパッチ経路と 2-10 個の新しいヌクレオチドが合成されるロングパッチ経路が存在する。ロングパッチ経路では、Pol β の他に Pol δ 、Pol ϵ の DNA ポリメラーゼが、ホモ 3 量体 DNA クランプである PCNA と共に DNA 鎖置換合成を行う。Pol δ や Pol ϵ は PIP ボックスと呼ばれる PCNA 結合モチーフを持つ。PIP ボックスには、グルタミン残基、疎水性アミノ酸残基、2 つの芳香族アミノ酸の 4 残基が保存されており、それぞれの側鎖が PCNA のポケットに結合する。Pol β は BER における DNA 合成に重要な役割を担っているが、PIP ボックスの有無や、どのように PCNA と結合し DNA を合成しているかは分かっていない。本研究は、Pol β と PCNA との複合体の結晶構造を決定し、その相互作用を明らかにすることを目的とする。そこで、Pol β と PCNA の調製、結合の確認、結晶化、X 線回折実験を行った。PCNA と Pol β は、大腸菌を用いて調製した。PCNA と Pol β をモル比 1:1 で混合し、ゲルろ過クロマトグラフィーを行った。複合体として溶出したフラクションを回収して濃縮し、シッティングドロップ蒸気拡散法にて結晶化条件を探索した。得られた結晶を用い、PF BL-5A にて X 線回折実験を行った。

S08-06

クリプト藻由来光駆動カチオンチャネルの単粒子構造解析

○田中 達基¹、志甫 谷 沙¹、細島 頌子²、片山 耕大²、
角田 聡²、神取 秀樹²、濡木 理¹¹ 東大・院理、² 名工大・院工

多くの生物において外界からの光の受容は不可欠であり、生体内においては主に光受容タンパク質がその役割を担っている。最も一般的な光受容タンパク質にロドプシンがあり、細菌から古細菌、真核生物に至る幅広い生物がロドプシンを利用して外界からの光を受容している。ロドプシンは配列、レチナルの異性化状態から微生物型と動物型ロドプシンに大別され、そのうち微生物型ロドプシンはイオンチャネルやポンプ、酵素など様々な機能を持つ。中でもイオンチャネルであるチャネルロドプシンは動物の神経細胞に発現させることでその活動電位を操作でき、広くオプトジェネティクスツールとして用いられている。近年 *Guillardia theta* の持つプロトンポンプ様カチオンチャネルロドプシン、*GtCCR* が報告された。*GtCCR4* は代表的なチャネルロドプシンである *CrChR2* に比べて高い光感受性と小さい不活化を示したほか、イオン選択性を持たない *CrChR2* とは異なり一価カチオンへの選択性が確認された。これらの特性より、*GtCCR4* はより優れたオプトジェネティクスツールとして研究がなされている。本研究では昆虫細胞を用いた *GtCCR4* の精製系を確立し、クライオ電子顕微鏡を用いて単粒子構造解析を行った。今後、得られた構造を基に変異体解析を行い、*GtCCR4* の機能及び特性のメカニズムをより詳細に解明する。

S08-08

核輸送因子 Kap β 2 の FUS に対する液-液相分離制御における Pro-Arg ポリジペプチドによる阻害機構の解明○川向 ほの香^{1,2}、齋尾 智英²、石森 浩一郎¹¹ 北大・総化、² 徳大・先端酵素・分生

RNA 結合タンパク質として機能する Fused in sarcoma (FUS) は、細胞内で液-液相分離することにより、DNA 修復や RNA 合成に関与する。この FUS の液-液相分離を制御するのが核輸送因子 Karyopherin β 2 (Kap β 2) であり、Kap β 2 の核局在化シグナル (NSL) 結合部位と FUS が相互作用することで相分離制御機構が機能する。一方、家族性 ALS 患者では、*C9orf72* 遺伝子への挿入配列から産生される Pro-Arg ポリジペプチド (PR_n) が、Kap β 2 による FUS の相分離制御を阻害すると報告されているものの、その詳細なメカニズムは明らかではない。そこで本研究では、PR_n と Kap β 2 との間の相互作用を検討することで、PR_n による Kap β 2 の液-液相分離制御機構の阻害メカニズムの解明を目指した。

まず、Kap β 2 と PR_n の複合体形成を分子量増加によって確認するため、Kap β 2 に PR_n を加えて SEC-MALS 測定を行った結果、Kap β 2 は 1 当量の PR_n を結合することが示された。Kap β 2 に対する PR_n の相互作用部位の同定には、Ile、Leu、Val、Met を同位体ラベルした Kap β 2 の NMR 信号に対して PR_n による化学シフト摂動を観測したところ、PR_n は Kap β 2 上の NSL 結合部位に結合することが示された。以上の結果から、PR_n は FUS と競合的に Kap β 2 と結合することにより、Kap β 2 の FUS に対する相分離制御を阻害することが示唆された。

S08-07

脂肪酸タンパク質 FABP3 と FABP7 の脂肪酸結合特性の解明

○並木 葉月¹、徳留 俊¹、野村 舞¹、林 史夫²、井上 裕介^{1,3}、
杉山 成⁴、松岡 茂⁵、村田 道雄⁶、園山 正史^{1,3,7}¹ 群馬大・院理工、² 群馬大・機器分析セ、³ 群馬大・食健康セ、
⁴ 高知大・理工、⁵ 大分大・院医、⁶ 阪大・院理、⁷ 群馬大・未来先端

脂肪酸結合タンパク質 (FABP) は、エネルギーの産出や膜の構成成分などとして働く脂肪酸を結合し輸送している。ヒトでは 10 種類が同定されているが、この中で脳に存在する FABP に着目した。これらは脳において必須である長鎖多価不飽和脂肪酸を主に輸送し、長鎖多価不飽和脂肪酸を用いた研究が行われている。しかし、FABP の結合特性の本質を知るにはより多くの脂肪酸との結合を調べることが必要である。本研究では、より類似性の高い FABP3 と FABP7 について多種の脂肪酸を用いて網羅的なリガンド結合特性を調べた。生体内では疎水性の高い脂肪酸は細胞膜に存在すると考えられているため、細胞膜の代わりに DMPC リポソームを使用して膜内環境を模倣した。Apo 体の FABP に蛍光分子 ANS を結合させて蛍光強度を測定した。FABP3 と FABP7 の両方において、飽和脂肪酸との結合親和性は短鎖の脂肪酸では疎水性に依存していたが、C14 以上の脂肪酸では依存は見られなかった。FABP3 の結晶構造を検討すると C13 の脂肪酸との結合様式に変化がみられた。不飽和脂肪酸では C18、C20 では二重結合の増加に伴い親和性が強くなった。結晶構造において二重結合の数で明確な違いは見られなかった。C22:1 と C24:1 では他の脂肪酸と異なり、残基が動く現象がみられ、これによって飽和脂肪酸に比べて高い親和性を示すことが示唆された。

S08-09

クライオ電子顕微鏡を用いたシトクロム酸化酵素とシトクロム c の複合体構造解析

○禹 昇完¹、香西 大輔²、西川 幸希^{3,4}、藤吉 好則^{3,4}、谷 一寿⁵、
島田 敦広¹¹ 岐大・応用生物・応用生命、² 名大・細胞生理、
³ 東京医科歯科大・高等研、⁴ CeSPIA、⁵ 三重大・院医

大部分の ATP は、呼吸鎖タンパク質がプロトンを膜間能動輸送 (ポンプ) することで生まれるプロトン駆動力を利用して、ATP 合成酵素によって生産されている。このプロトンポンプ反応は、呼吸鎖タンパク質間の電子伝達反応と高度に共役しており、呼吸鎖タンパク質間の電子伝達機構の解明は、生体エネルギー論分野における重要な課題である。先行研究によって、ミトコンドリア呼吸鎖の末端に位置するシトクロム酸化酵素 (CcO) と、CcO へ電子を供給するシトクロム c (Cc) の複合体構造が X 線結晶構造解析によって明らかとなった。しかし、Cc-CcO 結晶構造は、高濃度の氷晶防止剤や結晶パッキングの影響を受けており、生体内の構造を反映していない可能性が指摘されている。そこで、本研究では、クライオ電子顕微鏡を用いて Cc-CcO の溶液中での構造を決定した。pH 6.8 および 8.0 で Cc-CcO の複合体構造を各々 3.9、3.7 Å 分解能で決定した結果、いずれの pH でも Cc の CcO に対する結合位置は結晶構造とよく似ていた。しかし、Cc と CcO 間の水素結合数はクライオ電顕での構造の方が少なく、Cc 全体の温度因子も高かった。CcO は呼吸鎖の最終電子受容体である酸素を水に還元するために 4 電子を Cc から受容するが、Cc は一度に 1 電子しか供給できない。したがって、酸素を水に完全還元するためには Cc は素早く 4 度結合解離を繰り返す必要があり、本研究で明らかとなった Cc の不安定性は、Cc の CcO からの素早い解離を保証していると考えられる。

S08-10

Cryo-EM structure analysis of *C. difficile* binary toxin CDTa-bound CDTb-pore

○ Tomohito Yamada¹, Akihiro Kawamoto^{2,3}, Toru Yoshida^{1,4}, Takayuki Kato², Hideaki Tsuge^{1,5,6}

¹Fac. of Life Sci., Kyoto Sangyo Univ., ²Inst. for Protein Res., Osaka Univ.,

³Japan Sci. and Tech. Agcy, PRESTO,

⁴Dept. of Chem. and Biol. Sci., Fac. of Sci., Japan Women's Univ.,

⁵Inst. for Protein Dynamic, Kyoto Sangyo Univ.,

⁶Ctr. for Mol. Res. in Infect. Dis., Kyoto Sangyo Univ.

Binary toxin is a group of bacterial protein toxin which is composed of enzymatic A component and membrane binding B component. The B component forms ring-shaped pore with membrane spanning beta-barrel in host cell's acidified endosome. The A component is translocated into the cytosol through this pore and shows the enzymatic activity, resulting in damage to the cell. In previous study, it was revealed that the pore has a constriction site with a diameter of 6 angstrom on the translocation pathway. In order to access to a question, How the A component can be translocated through such narrow pore, we had determined the complex structure of *Clostridium perfringens* binary toxin. Comparing the structures of A component between apo state and complex state, exhibited the structural disorder of N-terminal alpha-helix, allowing A component to pass through the constriction site. We further studied the structure of another binary toxin CDT, which is produced by *C. difficile*. The complex structure of CDTa-bound CDTb-pore at 2.56 angstrom resolution, showed same unfolding aspect as *C. perfringens* binary toxin. Here we will show the conserved unfolding mechanism and the different aspects between binary toxins produced by *C. perfringens* and *C. difficile*.

S08-12

ヒト由来脂肪酸結合タンパク質 FABP4 の網羅的なリガンド結合特性～不飽和脂肪酸に焦点をあてて～

○寺脇 明芳¹、並木 葉月¹、徳留 俊¹、林 史夫²、井上 裕介^{1,3}、杉山 成⁴、松岡 茂⁵、村田 道雄⁶、園山 正史^{1,3,7}

¹群馬大・院理工、²群馬大・機器分析セ、³群馬大・食健康セ、

⁴高知大・理工、⁵大分大・院医、⁶阪大・院理、⁷群馬大・未来先端

私たちは脂肪酸結合タンパク質 (Fatty Acid-Binding Protein, FABP) の脂肪酸に対する結合特性を分子科学的手法によって詳細に調べている。その中でも FABP4 はヒトの疾病に関与しているとされ、その分子メカニズムの解明が期待されている。本研究では、FABP4 と多種類の飽和脂肪酸、不飽和脂肪酸における結合親和性を調べている。結合実験では膜内環境を模倣するため脂肪酸は事前に DMPC リポソームに取り込ませ、そこに Apo 体の FABP4 を作用させた。その後、疎水性蛍光色素 ANS を添加し、脂肪酸未結合 FABP4 に結合した ANS の蛍光強度を検出した。すべての FABP4 に ANS が結合したときの蛍光強度を 100% とし、蛍光強度が 50% となった時の脂肪酸濃度を EC50 と定義し評価した。炭素鎖長の異なる飽和脂肪酸 (C7 ~ C22) や不飽和度の異なる脂肪酸 (C18:1, C18:2, C18:3, C20:4, C20:5, C22:1, C22:6) を準備し、それらに対する FABP4 の結合親和性を調べた結果、(1) C7 から C13 において結合親和性が高まり C14 から C22 の脂肪酸では炭素数の増加に伴い結合親和性が低くなる傾向があった、(2) C18, C20, C22 のすべてにおいて不飽和脂肪酸の方が飽和脂肪酸と比べて 10 から 30 倍結合親和性が高くなったが不飽和度の違いによる結合親和性の違いはあまり見られなかった。

S08-11

Structural insights into substrate selectivity of ancestral chelatase CfbA

○ Shoko Ogawa¹, Yuma Oyamada¹, Masahide Hikita², Takashi Fujishiro¹

¹Dept. of Biochem. Mol. Biol., Grad. Sch. Sci. Eng., Saitama Univ., ²IMSS, KEK

Chelataes are enzymes catalyzing insertion of a divalent metal ion into substrate porphyrinoids. They are classified into three classes (class I, II, and III), and the class II is the largest group containing various kinds of chelataes. As an ancestral class II chelatase, CfbA was identified these days, which catalyzes a nickel insertion into sirohydrochlorin (SHC). Recently, we reported structures of SHC-bound CfbA and a reaction intermediate of CfbA with SHC and Ni(II) ions, and proposed its unique catalytic mechanism that an acetate group of SHC is bound to a Ni(II) ion and assists its insertion. Meanwhile, it was reported CfbA also used SHC analogs of uroporphyrin III (UPIII) and uroporphyrin I (UPI) as substrates.

To reveal SHC-type substrate selectivity of CfbA, we performed X-ray crystallographic analysis for each of the UPIII- and UPI-bound CfbA. Structural comparison of these CfbA with SHC-bound CfbA indicated the substrate selectivity of CfbA were affected by interactions between carboxy groups of the SHC-type substrates and polar amino acids in the active site. In addition, this comparison proposed a nickel chelatase activity was influenced by the possibility of a Ni(II) coordination by a carboxy group of SHC-type substrates.

S08-13

Insights into the light-driven ion-transport mechanism in microbial rhodopsins

○ Masaki Tsujimura¹, Keiichi Kojima², Yuki Sudo², Hiroshi Ishikita^{3,4}

¹Dept. Adv. Interdiscip. Studies, The Univ. of Tokyo,

²Grad. Sch. Med. Dent. Pharm., Okayama Univ.,

³Dept. Appl. Chem., The Univ. of Tokyo, ⁴RCAT, The Univ. of Tokyo

Microbial rhodopsins are membrane proteins that have a retinal Schiff base as a chromophore and are involved in light-dependent biological functions in microorganisms. Using a quantum mechanical/molecular mechanical approach, the light-driven ion-transport mechanism in microbial rhodopsins is investigated. The functions of microbial rhodopsins are directly associated with the absorption wavelengths, as both of these are predominantly determined by the three residues near the Schiff base. The desolvation of the Schiff base...carboxylate ion pair is the driving force of the proton transfer inside the protein. In anion channelrhodopsin-1 (ACR1), which functions as a light-gated anion channel, formation of the proton transfer pathway leads to the disconnection of the anion conducting channel. A red-shifted mutant ACR1 is highly demanded for the use in optogenetics. Based on calculations of the absorption wavelengths of 192 mutant ACR1 structures, which show that the removal of Thr101 increases the absorption wavelength, T101A ACR1 was expressed in HEK293 cells. Consistently, the measured absorption wavelength of T101A ACR1 is 10 nm longer than the wild-type ACR1. These results provide a basis of structure-based molecular design in optogenetics.

S09-01

低分子熱ショックタンパク質である α B-クリスタリンは、インスリンB鎖のアミロイド前駆体と複合体を形成し、成長を阻害する○國尾 祐貴¹、柚 佳祐¹、山本 直樹²、Carver John A.³、Hayashi Junna³、守島 健⁴、井上 倫太郎⁴、杉山 正明⁴、茶谷 絵理¹¹神戸大・理、²自治医大・医、³オーストラリア国立大・化、⁴京大・複合研

多くの重篤疾患に関連するアミロイド線維は、タンパク質の異常凝集によって形成される。そのため、ストレスに迅速にตอบสนอง凝集を未然に防ぐことは重要であり、生体内では様々な機構でタンパク質の恒常性を管理している。中でも低分子熱ショックタンパク質 (sHsp) は、細胞ストレスにตอบสนองして急激に発現誘導される分子シャペロン群であり、ATP に依存せずに変性タンパク質に結合し凝集を阻止することが知られている。しかしながら、アミロイド線維化反応における sHsp の分子機構は十分に理解されていない。そこで本研究では、哺乳類で代表的な sHsp である α B-クリスタリン (α B-C) のアミロイド線維形成阻害機構の解明を目指した。基質としては、アミロイド線維形成に先立ち形成される凝集体 (アミロイド前駆体) の成長過程を追跡できるヒトインスリン B 鎖を選択した。

B 鎖の凝集過程に α B-C を共存させると、 α B-C は B 鎖のモノマーではなくアミロイド前駆体に作用し、濃度依存的にその成長を抑制する挙動が見られた。反応生成物には、 α B-C と B 鎖の両方が含まれ、複合体を形成していることが確認された。透過型電子顕微鏡による観察では、複合体はアミロイド前駆体が短く切れたような形状をしており、小角 X 線散乱法からも、 α B-C の割合が高くなるにつれ短く太くなる傾向が見られた。超遠心分析、円偏光二色性スペクトル、プロテアーゼ耐性の結果も総合し、本発表では、複合体の構造特性とこれに基づいたアミロイド前駆体の成長阻害機構を議論する。

S09-03

ヒトコンセンサス嗅覚受容体の N 末端及び C 末端欠損の機能的発現に与える影響

○武藤 野乃子、福谷 洋介、中村 祐子、養王田 正文

農工大・院工・生命工

哺乳類の嗅覚受容体 (Odorant receptor, 以下 OR) は GPCR に属する 7 回膜貫通タンパク質である。一般的に、多くの OR は構造が不安定であり、異種細胞に発現させた際に小胞体で停留してしまう。そのため、ORs の精製は困難であり、生化学的解析は遅れている。当研究室では、同一ファミリーに属すヒト OR の中で保存性の高いアミノ酸配列で構成されたコンセンサス OR が非常に高い細胞膜発現性をもつことを発見し、コンセンサス OR をモデル OR とした詳細な生化学的解析を試みている。本研究では、特に高い細胞膜発現を示す chOR52 を用いて、OR の細胞外 N 末端と細胞内 C 末端の役割を調べることを目的とした。chOR52 の N 末端と C 末端欠損体を各々作製し、異種細胞発現における野生型との機能発現性の違いを調べた。その結果、N 末端側は細胞外に突出している 8 残基を欠損させると、chOR52 の細胞膜発現が著しく低下し、特に 5 残基目のアスパラギン酸欠損時の機能発現の減少が大きかった。C 末端欠損は chOR52 の細胞膜局在の大きな減少は見られなかったが、12 残基欠損をさせるとアゴニストであるノナン酸刺激時のシグナル伝達活性が消失した。この結果、細胞外 N 末端は他の GPCR と同様に N 型糖鎖修飾がコンセンサス OR の細胞膜輸送にも重要であることが示唆された。

S09-02

高熱安定性光駆動型内向き H^+ ポンプロドプシンの高温環境下での機能活性評価○川崎 佑真¹、今野 雅恵^{1,2}、井上 圭一¹¹ 東京大学・物性研究所、² JST・さがけ

微生物ロドプシンは光を吸収することによって、光開閉型チャネル、光駆動型イオンポンプ光センサーなどの様々な機能を示す光受容膜タンパク質である。一般に、タンパク質は高温環境では容易に変性し、その機能を失う。一方で、高い熱安定性を持ち、高温でも機能できる耐熱性タンパク質が高温環境に棲息する生物種から数多く発見されている。2021 年に我々は光駆動型内向き H^+ ポンプの 1 種であるシゾロドプシン (SzR) の内、高温環境に棲息するアーキアが持つ *MtSzR* と *MsSzR* が常温環境由来の SzR に比べ高い熱安定性を持つことを報告した。しかしこれまで *MtSzR*、*MsSzR* は高い熱安定性を持つが、高温環境下で機能できるかどうかは明らかになっていなかった。そこで本研究では、*MtSzR*、*MsSzR* の高温環境下での機能活性を調べた。微生物ロドプシンの機能は発色団の光吸収に伴うタンパク質の構造変化により引き起こされ、サイクリックな光反応 (フォトサイクル) を示す。そこで、25℃から 80℃の温度範囲で *MtSzR*、*MsSzR* の過渡吸収測定を行い、フォトサイクルの有無から高温環境下での機能活性を評価した。その結果 *MtSzR*、*MsSzR* が共に 80℃の高温環境下でもフォトサイクルを示したことから、これらが高温環境で機能する耐熱性光駆動型内向き H^+ ポンプであることを明らかにした。講演では、Eyring プロットから得られた熱力学パラメーターから高温環境におけるそれぞれのフォトサイクルの特徴についても議論する。

S09-04

人工デザイン TIM バレルタンパク質のフォールディング解析

○高橋 萌¹、田口 英樹²、三輪 つくみ²¹ 東工大・生命理工、² 東工大・研究院・細胞センター

近年のブレイクスルーを経て、合理的にデザインされたタンパク質の設計が可能となりつつある。これらの人工デザインタンパク質の多くは熱力学的に超安定である一方で、大腸菌などの細胞内で発現しなかったり、凝集になりやすかったりする例も多くある。これは設計段階で翻訳やフォールディングが考慮されていないことに起因する可能性がある。そこで本研究では、今まで見過ごされてきた人工デザインタンパク質のフォールディングについて調べることとした。その第一段階として、Baker らが設計した TIM バレルフォールドを持つ人工デザインタンパク質 (人工 TIM) を大腸菌および再構成型無細胞翻訳系 PURE system で発現させ、その可溶性を評価した。大腸菌野生株で人工 TIM を発現させた結果、熱力学的に安定になるように設計された人工 TIM であっても、細胞内では凝集傾向を示す場合があることが分かった。これは熱力学的安定性だけがフォールディングに影響するわけではないことを裏付ける結果である。次に PURE system で翻訳させたところ、細胞内で凝集する人工 TIM も含めて全て可溶性であった。これは、PURE system にはフォールディングを補助するシャペロンが含まれていないことを踏まえると意外な結果である。これらの結果から、人工デザインタンパク質のフォールディングは、天然とは異なる特徴を持つことが示唆された。今後は精製サンプルを用いたより詳細なフォールディング解析を進めていく予定である。

S09-05

Supercharging design with appropriate buffer selections can control physicochemical properties of antibodies

○ Keisuke Kasahara¹, Daisuke Kuroda^{1,2,3}, Raiji Kawade¹, Aki Tanabe⁴, Satoru Nagatoishi⁵, Kouhei Tsumoto^{1,2,3,5}¹Dept. of Bioeng., Sch. of Eng., The Univ. of Tokyo,²Med. Dev. Dev. Reg. Res. Center, Sch. of Eng., The Univ. of Tokyo,³Dept. of Chem. Biotech., Sch. of Eng., The Univ. of Tokyo,⁴AIDS Res. Center, NIID, ⁵Inst. of Med. Sci., The Univ. of Tokyo

Surface mutations with charged residues, called supercharging, have been suggested to improve physicochemical properties of proteins. However, details of the molecular mechanism remain unclear. **In this study, we explored how supercharging affects physicochemical properties of an antibody.** Starting from the WT Fab (net charge of -4), we computationally designed a supercharged Fab with the net charge of +10 (pos10).

Differential scanning calorimetry showed that thermal stability of pos10 was preserved in phosphate buffer (PB) at pH 8, while that of WT was decreased. Molecular dynamics simulations suggested that the phosphate ions interacted with the positively charged surface. We also measured zeta potential, and found that, although it was positively charged as intended and colloidal stability was improved in acetate buffer, pos10 was neutralized in PB. Interestingly, despite the fact that the antigen surface is positive, pos10 bound the antigen with a similar affinity to that of WT in PB. In contrast, pos10 bound the antigen with lower affinity than WT in the absence of phosphate ions. **Put together, our results suggested physicochemical properties of antibodies can be controlled by supercharging design with appropriate buffer selections.**

S09-07

真空紫外円二色性法によるβラクトグロブリン-脂質膜相互作用の時間分解計測

○橋本 聡¹、松尾 光一²¹ 広大・先進理工、² 広大・放射光

タンパク質は、生体膜相互作用などによる溶媒環境の違いに応じて立体構造を変化させ、様々な物理化学的現象を誘発する。本研究では、生体膜相互作用によるタンパク質の構造変化の解析に有効な真空紫外円二色性 (VUVCD) 法と時間分解測定法を組み合わせ、タンパク質-脂質膜相互作用過程の観測を試みた。タンパク質溶液と脂質膜溶液を低流速でかつ効率的に混合できるマイクロ流路セルを開発し、数十μmまで光を微小化できるシュバルツシルト集光系を実装したVUVCD装置に設置した。膜相互作用研究のモデルタンパク質としてβラクトグロブリン (βLG) を、また生体膜としてリゾホスファチジルグリセロール脂質を用い、脂質/タンパク質濃度比=50の条件で0.5~60秒間の時間分解VUVCD測定を260~180nmの範囲で行った。フロー状態で発生する直線二色性がCDスペクトルに影響しないことを確認した後、βLGの生体膜相互作用によるスペクトルの時間変化を解析した結果、βLGの二次構造は時間とともに、βストランドからαヘリックス構造に変化し、βLGは数秒程度で膜結合構造を形成することが分かった。また時間に依存したVUVCDスペクトルを特異値分解法で解析したところ、この構造変化は二状態転移であることが分かった。試料溶液の流速を連続的に変化させ波長固定で測定することで、タンパク質-脂質膜相互作用における速度定数などの導出も可能となった。

S09-06

クモ系フィブロインからなるナノファイバー構造の解明

○梶本 遥也¹、饗庭 楽理¹、岡本 悠介¹、米澤 健人²、佐藤 健大³、山崎 洋一¹、藤間 祥子¹、上久保 裕生^{1,2}¹ 奈良先端大・物質、² 奈良先端大・デジタルグリーンイノベーションセンター、³ スパイバー (株)

フィブロインはクモの糸の階層構造を構成する構造タンパク質である。我々は、試験管内において、フィブロイン三分子からなる前駆体を介したナノファイバー (NF) の伸長反応を見出してきた。NFの構造を詳細に調べることは、クモ糸の形成機構の理解、さらにはクモ糸の再構成に通ずると思われる。しかしながら、前駆体がどのように連結することでNFを形成しているのかは未解明のままである。この課題は、N末端にHis-tagを付加したフィブロインから調製したNFに対して、金ナノ粒子 (AuNP) を吸着させ、それらの位置関係を調べることで解決できると考えた。本研究では、NF上に吸着したAuNPの位置からNF中のフィブロインの位置を同定することによって、NFの構造を明らかにすることを目的とした。マイカ上に吸着させたNFにAuNPを添加しAFMで観察を行ったところ、NF表面にAuNPが等間隔で結合している様子が観察された。さらに、His-tagを切断する酵素を用いてAuNPが結合したNFを処理したところ、NF表面に存在していたAuNPの数が減少することがわかった。この事実より、AuNPがHis-tagに結合していることが確認された。本研究によって得られた結果から、NF中ではN末端が周期的に並んだ繰り返し構造をとっていることが示唆された。

S09-08

抗体医薬アダリムマブ Fab の定常領域における7種のPhe → Ala 変異体及びPhe-Pro配列上の6種のPro → Gly 変異体の熱安定性解析

○吉川 萌香¹、中村 仁美¹、上田 直子¹、植田 正²、大栗 誉敏¹¹ 崇城大・薬、² 九大院・薬

現在多くの抗体医薬品が開発され、ガンなど難治性疾患に高い効果を発揮している。しかし抗体IgG分子は哺乳類細胞系での生産となるため優れた技術と大きなコストが必要となる。一方で抗体フラグメントFabは酵母や大腸菌など微生物での生産が可能で、組織浸透性が高いという利点もあり、Fab製剤の開発が進んでいる。さらにFabへのアミノ酸変異導入による安定化が実現できれば、生産過程で生じる凝集が抑えられ、また保存期間の延長も期待できる。しかしながらFabの発現系構築は容易ではないためアミノ酸変異による解析例は少なく、安定化機構の知見は不十分である。これまで我々は、抗体医薬品アダリムマブ Fab の酵母 *Pichia pastoris* からの大量発現に成功している。そこで本研究では、Fab の定常領域の分子内部にPheが複数存在していることに着目し、それぞれのPheの安定性への寄与を調べる為にAla置換した7種の変異体を酵母を用いて作製した。DSCによる解析より、ほとんどの変異体で不安定化が見られ、PheがH鎖とL鎖のサブユニット間相互作用及び可変領域と定常領域をつなぐエルボー領域周辺の相互作用に寄与していることが分かった。さらにほとんどのPheの後にはProが位置しており、それらのProをGlyへ置換した6種の変異体を作製し、解析した。その結果、エルボー領域周辺での相互作用にProが安定性に大きく寄与していることが分かった。以上の変異体解析により、特にエルボー領域周辺での相互作用がFabの安定性に影響していることが分かった。

S09-09

溶解性と凝集抑制に必要な好熱菌由来アセチルキシランエステラーゼの天然変性領域

○佐々本 康平^{1,2}、下澤 勇弥¹、氷見山 幹基²、森芳 邦彦³、
大本 貴士³、上垣 浩一⁴、西矢 芳昭¹、中村 努²¹ 摂大院・理工・生命、² 産総研、³ 大阪産技研、⁴ 近大・農

酢酸セルロース (CA) は、人工透析の膜材料等に利用される汎用プラスチックである。CA はアセチル基置換度の増加に伴い熱可塑性を増すが、アセチル基の立体障害により生分解が抑制される。*Thermoanaerobacter tengcongensis* 由来アセチルキシランエステラーゼ (TTE0866) は、CA の脱アセチル化を触媒することで生分解促進が可能である。TTE0866 は、金属依存性糖脱アセチル化酵素が分類される carbohydrate esterase family 4 (CE4) に属し、N 末端側の役割不明な高親水性領域 (NTR: 113 aa) と、C 末端側の触媒領域 (CE4 ドメイン: 189 aa) から構成される。これまでの研究で、NTR と CE4 ドメインを含む野生型 TTE0866 (WT: 302 aa) の結晶構造を明らかにした。しかし、NTR の電子密度は観察されず、構造決定には至らなかった。本研究では、NTR フラグメントおよび NTR 欠失変異体 (deltaNTR) の構造・機能解析により、NTR の役割解明を目指した。

NTR フラグメントは、ランダム構造に特徴的な円偏光二色性スペクトルを示し、天然変性領域であると確かめられた。deltaNTR は WT と比較して、低塩濃度条件下において溶解性が著しく低下した。また、deltaNTR に NTR フラグメントを添加することにより、溶解性は回復した。これらの結果から、NTR の役割は CE4 ドメインの溶解性維持であると示された。なお、溶解性の低下した deltaNTR は特に沈殿剤を添加しなくとも保存中に結晶化し、WT の結晶と同様の結晶学的性質を表した。

S09-11

ABC トランスポーター BhuUV-T のヘム輸送機構に関する時間分解分光測定

○原 明穂¹、城 宜嗣²、杉本 宏³、木村 哲就¹¹ 神戸大・院理・化、² 兵庫県大・院理、³ 理研・SPRING-8

ABC トランスポーターは ATP の結合・加水分解に伴い基質の膜輸送を担うタンパク質である。その輸送機構については多くの基質に輸送前後で化学的変化がなく、輸送を可視化できないため詳細は未解明である。そこで、ヘムを基質とする BhuUV-T に着目し、ヘムの結合状態による吸収スペクトルの変化を観察することで輸送反応の追跡を行った。これまでにヘムと結合したペリプラズム結合タンパク質 BhuT が BhuUV と複合体を形成するとヘムが BhuUV に受け渡され ATP の添加で輸送が起こることを明らかにした。しかし、輸送反応のタイムスケールに関する情報は未解明であるため、本研究ではミリ秒の時間分解能を持つ Stopped-flow を用いて、ATP の混合後に起こるシングルターンオーバーの反応を追跡することを試みた。ヘムが BhuT から受け渡され BhuUV と結合した BhuUV-T と ATP を Stopped-flow により混合することでヘムの輸送を誘起し、それに伴うスペクトル変化を観察した。混合後約 1~2 秒、または約 4~5 秒経過した時点と反応開始前との差スペクトルを得たところ、410 nm 付近に溶液中の界面活性剤 DDM とヘムとの相互作用に由来する正のピークが観察された。この二つの差スペクトルはほとんど同一であったことから、ヘムは 2 秒以内に BhuUV-T から溶液中に放出され DDM と相互作用したと考えられる。さらに早い段階でのスペクトル変化を捉え、シングルターンオーバーを観測することで、より詳細な輸送機構について議論する予定である。

S09-10

Comparison of two different LLPS of the RNA-binding protein, fused in sarcoma: Pressure-temperature phase diagram and pressure-jump kinetics

○Shujie Li¹, Ryota Yamasaki², Fumika Ide³, Yutaro Shiramasa²,
Naoya Sasahara³, Tomoshi Kameda⁴, Takuya Yoshizawa³,
Ryo Kitahara²¹ Grad. of Phar. Sci., Ritsumeikan Univ., ² Phar., Ritsumeikan Univ.,³ Life Sci., Ritsumeikan Univ., ⁴ AIST

RNA binding proteins and intrinsically disordered proteins yield liquid condensates via liquid-liquid phase separation (LLPS) in vivo and in vitro. The fused in sarcoma protein (FUS) liquid condensates are known to be involved in neurodegenerative diseases-amyotrophic lateral sclerosis (ALS). The time-dependent transformation from the liquid condensates into the more condensed and less soluble phases is thought to be associated with the development and progression of ALS. In our study, two types of condensed phases of FUS, were observed at a low pressure (LP-LLPS) and high pressure (HP-LLPS), respectively. We used UV-vis spectroscopy coupled with pressurization to detect absorbances (turbidities) that could present the behavior of protein condensates and to generate a pressure-temperature phase diagram of LLPS. High-pressure microscopy was utilized to observe size and shape of the aggregates. In addition, pressure-jump experiments coupled with the UV-vis and microscope were performed to study formation and vanishing rates of LLPS. Interestingly, the liquid condensates in HP-LLPS are more condensed and less soluble than those in LP-LLPS. The formation and vanishing rates of HP-LLPS were two-fold and 20-fold slower than those of LP-LLPS.

S09-12

イクオリン -Ca²⁺ 間相互作用の熱力学的解析○黒木 麗¹、船橋 俊也²、大西 裕介³、中津 亨³、木村 哲就¹¹ 神戸大・理・化、² 京大・薬、³ 和歌山県医大・薬

イクオリン (AQ) は、Ca²⁺ と結合すると青色の光 (460 nm) を発光する化学発光タンパク質である。AQ は Ca²⁺ 結合部位を 3 つ持ち、そのうち 2 あるいは 3 分子の Ca²⁺ が結合することが発光に必要であるとされている。X 線結晶構造解析から Ca²⁺ 結合による構造変化が発光を誘起すると考えられるが、Ca²⁺ の結合が段階的に起こるかどうかが、またその親和性がどの程度なのかという詳細な分子機構は未解明である。そこで、本研究では等温滴定型カロリメトリー (ITC) を用いて Ca²⁺ の AQ への結合に伴う反応熱を測定することで、AQ-Ca²⁺ 結合の強さや性質を熱力学的に理解することを試みた。AQ 溶液に対して Ca²⁺ 溶液を滴定し、その反応熱を ITC を用いてリアルタイムで測定した。系に存在する AQ と Ca²⁺ のモル比に対して反応熱をプロットしたところ、シグモイド様のグラフを示したことから、1 分子の Ca²⁺ が 1 つの Ca²⁺ 結合部位に結合する 1:1 結合のモデルでフィッティングを行った。その結果、解離定数 K_D = 2.0 μM、結合エンタルピー変化 ΔH = -50 kJ/mol、結合エントロピー変化 ΔS = -60 J·mol⁻¹·K⁻¹ という値が得られた。ΔH が負であることから AQ-Ca²⁺ 結合は発熱反応であり、ΔS が負であることから Ca²⁺ 結合によって AQ の Ca²⁺ 結合部分の構造が固定されたと推定できる。今後、滴定濃度をより細かくすることで、2 あるいは 3 分子目の Ca²⁺ の結合の強さを検討し、AQ の Ca²⁺ 結合に関する分子機構について詳細な議論をする。

環状構造によるヘリックス形成促進機構

○柳田 侑樹、吉田 清美、藤原 和夫、池口 雅道

創価大・理工・生命理学

CHIBL Δ Fは、 β -ラクトグロブリンの残基 97-142 に相当するペプチド断片である。ジスルフィド結合 (Cys106-Cys119) を持ち、98-107 と 114-135 の領域で α ヘリックスを形成している。これまでに、1) ジスルフィド結合が切断されると α ヘリックスの量が減少する、2) 97-110 と 111-138 領域に相当する短いペプチド断片はヘリックス構造を形成しない、3) これら二つの断片がジスルフィド結合で連結されてもヘリックスを形成しない、ということが知られている。これらの結果から、ジスルフィド結合によってループが形成されると、ループ内のペプチド鎖が取りうるコンフォメーション数が減り、ヘリックスの核形成が促進されたと考えた。この仮説を確かめるために、CHIBL Δ F の残基 109 と 110 の間にそれぞれ 1 つ、3 つ、7 つの Gly 残基を挿入した 3 つの変異体 (G1、G3、G7) を作製した。CD スペクトルから、挿入した Gly 残基の数に応じて、ヘリックス量が減少することが示された。また、NMR から CHIBL Δ F と全ての変異体のヘリックス領域は同一であり、挿入する Gly の数を増やすごとに、全体的にヘリックスの形成割合が減少したことが確認できた。この結果は、ループ内の残基数が増えれば、可能なコンフォメーション数が増加し、ヘリックスの核形成確率が低下するという考えに一致しており、ループ構造の残基数とヘリックスの安定性には関係があることが示唆された。

S010-01

Ca²⁺ 結合ループ - グラフティングを基盤とする大腸菌異種タンパク質分泌生産系の開発○神谷 友華¹、雨坂 心人¹、上原了²、吉澤 拓也³、
松村 浩由³、高野 和文¹、田中 俊一¹¹ 京府大・院生環、² 愛知がんセンター研、³ 立命館大・生命

大腸菌による異種タンパク質の分泌生産は、大腸菌の高いタンパク質発現能力を保ちながら、細胞内生産で生じる課題の解決策として注目されている。本研究では、グラム陰性細菌の1型分泌装置(TISS)をモデルに、産業応用に繋がる技術開発を行った。TISSによる分泌タンパク質は折り畳みにCa²⁺依存性を持ち、Ca²⁺濃度の低い細胞内では高次構造を形成しない特徴をもつ。そのため、細胞内で高次構造を形成する異種タンパク質はTISSによる分泌が困難である。そこで本研究では、より広範な異種タンパク質の分泌を可能にするため、細胞内で折り畳みを抑制するアプローチを考案した。具体的には、標的タンパク質のβ-turnにCa²⁺-binding loop(CBL: GDGDGDGEAE)を移植し、細胞内ではCBL内酸性アミノ酸の静電反発によって構造形成を抑制する。一方、細胞外へ分泌されると、CBLは培地中に豊富なCa²⁺と結合し構造形成を促進する。TISSによる分泌が難しいRFPを先行モデルに、CBL移植の効果を検証した。その結果、CBL移植型RFPはmg/Lオーダーで分泌され、赤色蛍光を呈することを確認した。続いて、CBL移植型RFPの1.7Å分解能でのX線結晶構造解析に成功し、CBLとCa²⁺の結合、CBL移植部以外は野生型と同様の構造を保持していることを確認した。CBL移植が標的タンパク質自体の機能と構造に影響を与えないことは、本アプローチが広い標的に汎用できることを示唆する。本発表では、分子量や立体構造が異なる複数のタンパク質に対して行った汎用性の検証とあわせて報告する。

S010-03

新規抗 His タグ抗体 HisMab-1 と His タグの親和性解析

○人見 菜月¹、的場 京子¹、金子 美華²、加藤 幸成²、
高木 淳一¹、有森 貴夫¹¹ 阪大・蛋白研、² 東北大・医

アフィニティタグシステムは蛋白質精製を容易にする重要なツールである。その中でも His タグは最も広く利用されているタグシステムである。His タグを用いた精製法の主流は、簡単かつ安価な方法である固定化金属アフィニティ精製である。一方で、His タグ蛋白質には抗 His タグ抗体を用いたイムノアフィニティ精製も適用可能である。本研究では、我々が樹立した新規抗 His タグ抗体 HisMab-1¹⁾の精製ツールへの適用を検討した。固定化金属アフィニティ精製に利用するためには通常6~10残基の連続した His が必要になるが、HisMab-1はHis×4のペプチドでも結合が観測されるため¹⁾、HisMab-1を用いればよりタグを短くすることができ、タグ付加による蛋白質機能への障害を減らしたり、結晶化に際して切断が不要になることなどが期待される。

HisMab-1を使った精製や検出を可能にするために最低限必要な His 残基数を、Biacore を用いた表面プラズモン共鳴法により検討した。Fc を介して HisMab-1 をキャプチャーしたセンサーチップに His × 6 付加蛋白質を反応させたところ、HisMab-1 の実効親和性は数十 nM オーダーの K_D 値であることがわかった。しかし、センサーグラムを kinetics 解析したところ、うまくフィッティングせず、1:1 の単純な相互作用ではないことが示唆された。His 残基数を6残基から順次減らした His タグ付加蛋白質で Biacore 解析を行うことにより、結合モードを明らかにすることを試みている。

1) Asano T, *et al.*, Monoclon. Antib. Immunodiagn. Immunother., 2021

S010-02

ヒトセレノプロテイン P の異種発現系の構築とその構造物性解析

○梅 蓮弥¹、雨坂 心人¹、原 瑞穂¹、高野 和文¹、三原 久明²、
斎藤 芳朗³、田中 俊一¹¹ 京府大・院生環、² 立命館大・生命、³ 東北大・院薬

ヒトセレノプロテイン P (SeP) は、そのアミノ酸配列中にセレノシステイン (Sec) を10残基持ち、血漿中に分泌された後、必須微量元素 Se を様々な組織に運ぶ Se 輸送タンパク質である。SeP の N 末端ドメインは、血漿中と細胞内でグルタチオンペルオキシダーゼ様の還元酵素として働く。C 末端ドメインは、血漿中から細胞内へ移行後、Se 源の供給を担う。SeP の機能は生命の維持に不可欠であるが、近年、SeP の過剰発現が二型糖尿病を悪化させることが報告され、疾患の発症とも密接に関わることが分かってきた。一方、SeP の構造レベルでの研究は進んでおらず、SeP の機能や構造に関する知見は極めて限定的である。

そこで本研究では、SeP の大腸菌を用いた異種発現系の構築と、リコンビナント SeP の構造物性解析を試みた。大腸菌での Sec 導入は技術的に難しかったため、全ての Sec を Cys に置換した変異体 SeP^(Cys)を対象とした。SeP^(Cys)単独では不溶性の凝集体として発現されるものの、可溶性タグタンパク質 NusA との融合によって大部分が可溶性発現することを見出し、精製方法の確立にも至った。SeP^(Cys)について機能の異なる各ドメイン変異体も調製し、生化学的・分光学的手法を用いて構造物性解析を行った。その結果、いずれのドメインも天然型 SeP の物性を反映した状態であることが示唆された。この示唆は、天然型 SeP の構造的エピトープを認識する抗体様分子 (monobody) が、SeP^(Cys)を同様に認識したことからも裏付けられた。本発表では、これらの結果について詳報する。

S010-04

カイコ産生人工三量体 SARS-CoV-2 スパイクタンパク質に対するモノクローナル抗体の作製とその特性評価

○小山 浩輔¹、増田 亮津²、塚本 聖¹、越智 基太¹、吉永 晴哉¹、
塩見 敏生¹、海老原 健²、李 在萬³、日下部 宜宏²、植田 正¹¹ 九大・薬・蛋白、² 九大・農・昆虫ゲノム、³ 九大・農・昆虫産業

近年の畜産領域で SARS-CoV の感染拡大時に、我々はカイコ産生人工三量体 SARS-CoV スパイクタンパク質を作製し、動物実験により高い中和抗体誘導能があることを確認した。そこで、SARS-CoV-2 による感染症の拡大時に同様のデザインにより人工三量体 SARS-CoV-2 スパイクタンパク質 (S タンパク質) を調製した (Fujita *et al.* BBRC 2020)。本研究では診断薬等の開発を目的として、カイコ産生 S タンパク質や S タンパク質中の ACE 2 受容体と結合するドメイン (RBD) をマウスに投与し、マウスを用いたモノクローナル抗体の作製とその特性評価を行った。S タンパク質や RBD をマウスに投与し、一定期間経過後の抗血清を用いた ELISA の結果、予想通り S タンパク質および RBD を認識する抗体が産生された。次に、マウスの脾臓からハイブリドーマを作製し、S タンパク質および RBD 特異的なモノクローナル抗体を調製した。抗体の Protein G 精製後、ELISA にて ACE2 受容体と S タンパク質との結合を評価した結果、ACE 2 受容体と S タンパク質との結合を阻害する抗体も確認された。さらに、表面プラズモン共鳴にて抗体と S タンパク質や RBD との親和性を評価した結果、多くの抗体の K_D が数 nM と強く、数 10 pM の K_D をもつ非常に親和性の高い抗体も3種類得られた。今後は、複合体の構造解析などの結果から、アミノ酸残基に変異を導入し、さらなる親和性の向上を目指す予定である。

S010-05

CDR-Grafting によるヒト化 VHH の物性機能解析に基づくヒト化 VHH 人工合成ライブラリ構築

○木下 清晶¹、中木戸 誠^{1,2}、黒田 大祐^{1,2}、
カアペイロ ホセ M.M.³、津本 浩平^{1,2,4}

¹ 東大・院工・バイオエンジニア、² 東大・院工・化生、³ 九大・院薬、
⁴ 東大・医科研

ラクダ科由来の重鎖抗体の可変領域断片である VHH は、その抗体工学の容易さやバクテリアを用いた大量発現といった利点から様々な応用が期待され、近年研究が進められている。またヒト化 VHH を用いた抗体医薬品が上市されるなど、新たな抗体医薬品フォーマットとしての発展も期待されている。そこで本研究ではヒト化 VHH の取得をより迅速かつ効率的に行うため、ヒト化 VHH 人工合成ライブラリ構築を行った。合成ライブラリのフレームワークとして既報のヒト化 VHH2 つをフレームワークの候補として選択し、これらのフレームワーク領域を CDR-Grafting を通じて比較検討した。既報の抗 EGFR VHH をモデル VHH とし、CDR-Grafting により作製された合成ヒト化 VHH に対して熱安定性および親和性解析を行った。候補のヒト化 VHH のうち、合成ヒト化 VHH においてより高い熱安定性および親和性を示したものを合成ライブラリのフレームワークとして採用した。また PDB に登録されている VHH の配列に基づいて CDR のアミノ酸残基の多様性を設計し、ヒト化 VHH 人工合成ライブラリ構築を行った。構築したライブラリからファージディスプレイ法を用いて抗原特異的ヒト化 VHH の取得を行い、取得されたヒト化 VHH についての物性機能解析から、本ライブラリの有効性を評価した。

S010-06

化膿レンサ球菌由来金属結合蛋白質 MtsA に対するバイパラトピック抗体の設計と機能評価

○浅野 梨紗¹、中木戸 誠¹、竹内 美結¹、相川 知宏²、
中川 一路²、津本 浩平^{1,3,4}

¹ 東大院・工・バイオエンジニア、² 京大院・医・微生物感染分野、
³ 東大院・工・化生、⁴ 東大・医科研

バイパラトピック抗体 (bpAb) は、同一分子の異なるエピトープに同時に結合する二重特異性抗体である。2 つの機能が異なる Fab 抗体を用いて bpAb を作製することで、単一の抗体では成し得ない活性阻害を実現した例が報告されるなど、複数の抗体を連結することにより相乗的な高機能化が可能となることが期待される。

本研究では、化膿レンサ球菌の表層に発現する金属結合蛋白質である MtsA を標的蛋白質とした。MtsA は金属結合依存的に構造が変化するため、エピトープの異なる複数の低分子化抗体を連結した bpAb を用いることによって MtsA の構造を固定し、金属取り込み機能を阻害することを目指した。まず、MtsA と抗体との共結晶構造を基に scFv と VHH を性質や長さの異なるアミノ酸リンカーでつないだ bpAb を設計し、大腸菌発現系を用いて調製した。複合体の会合状態を解析したところ、bpAb のリンカーが短い場合には分子間結合を介した多量体複合体を形成するが、リンカーを長くしていくことにより分子内結合によるヘテロ二量体が見られ、リンカー長依存的に複合体の構造が変化することが示唆された。さらに、金属結合阻害を評価したところ、分子間結合を起こす bpAb、分子内結合を起こす bpAb の両方で金属の結合を阻害することが確認され、単独では阻害能のない抗体をつなぐことで新たな機能を付与することに成功した。

S010-07

Towards the development of novel single fluorescent protein-based biosensors for sugar phosphates

○Karl Matthew Lin¹, Fu Chai¹, Yusuke Nasu¹, Takuya Terai¹,
Robert E. Campbell^{1,2}

¹ Dept. of Chem., The Univ. of Tokyo, ² Dept. of Chem., Univ. of Alberta

Sugar phosphates (SPs) are integral to metabolic pathways such as glycolysis and the pentose phosphate pathway (PPP). For example, glucose-6-phosphate (G6P) is a precursor to other SPs, including glycerol-3-phosphate (G3P), which are used to produce metabolites, energy carriers, and lipids. Notably, recent studies report that sugar metabolism is dysregulated in certain neurodegenerative diseases. While biosensors for sugars and metabolites, namely glucose and lactate, have been constructed, no biosensors targeting SPs exist. The development of SP biosensors would aid in interrogating sugar metabolism at a finer level.

Here, we engineer single fluorescent protein (FP)-based biosensor prototypes for SPs by using a transposon-mediated approach for library construction. Briefly, a transposon is inserted into a gene encoding an SP binding protein at random sites and subsequently replaced with an FP. This generates a library of biosensors, which is narrowed down using high-throughput screening. Currently, we are focusing on the development of two biosensors based on the G6P-binding protein, afuA, and the G3P-binding protein, ugpB. Ultimately, we envision the application of our biosensors in neurodegenerative disease research.

S010-08

Development and applications of a series of genetically encoded GFP-based intracellular L-lactate indicators

○Saaya Hario¹, Giang Le Nguyen Truong^{1,3}, Yusuke Nasu¹,
Robert E. Campbell^{1,2}

¹ Dept. of Chem., The Univ. of Tokyo, ² The Univ. of Alberta,
³ The Univ. of Toronto

Genetically encoded indicators enable visualization of the spatiotemporal dynamics of molecules or ions of interest in cells and tissues. L-Lactate has long been considered as merely a waste product with minor biological significance. However, recent studies have shed light on a broader range of potential roles for L-lactate. Motivated by the growing interest in L-lactate, we developed a series of high performance genetically encoded GFP-based indicators of intracellular L-lactate. A prototype was obtained by inserting cpGFP into the L-lactate binding protein LldR such that binding to L-lactate induces a conformational change that affects the chromophore environment leading to an increase in fluorescence intensity. After linker optimization and directed evolution, we obtained a variant, iLACCO1, with $\delta F/F_0 = 18.1$ and apparent dissociation constant ($K_{D,App}$) of 277 μM . Considering the range of intracellular L-lactate concentrations under various conditions, low and high affinity variants, iLACCO1.1 ($K_{D,App} = 2.14$ mM) and iLACCO1.2 ($K_{D,App} = 81.1$ μM), respectively, were rationally engineered. The overall process of developing the iLACCO1 variants, and their characterization and potential applications, will be described in this presentation.

S010-09

calmodulin 融合発現系を用いた抗菌ペプチド cathelicidin ファミリーの生産とその NMR 解析への応用

○柴垣 光希、上田 和佳、加納 康平、谷 昊、相沢 智康

北大院・生命

ヒト由来抗菌ペプチド LL-37 は、脊椎動物に広く保存される cathelicidin ファミリーに属しており、幅広い抗菌スペクトルを有する α -helix 型の分子である。このファミリーに属する抗菌ペプチドは、共通の相同性の高い前駆体構造を有する一方、成熟型の活性部位は様々な立体構造を持ち、1つの種が多様なパラログを有することも多い。しかし興味深いことに、ヒトを含む霊長類ではただ一つの α -helix 型の分子しか有さない。現在まで、CD 分光法などを用いて構造活性相関についての議論が行われているが、原子分解能での議論は不十分である。そこで本研究では、当研究室が開発した目的ペプチドを安定に発現可能な新規の calmodulin 融合組換えタンパク質発現系を用い、LL-37 とそのオルソログの安定同位体標識試料を生産することで、高分解能 NMR 法を用いた脂質などとの相互作用解析を行い、詳細な構造活性相関の解明を進めることを目的とした。まず、カルモジュリンの C 末端側に、酵素エンテロキナーゼ切断配列及び、目的ペプチドの合成遺伝子を挿入した pET ベクターを構築した。これを用いて発現宿主 *E. coli* BL21(DE3) を形質転換させ、IPTG 誘導による目的融合タンパク質の大量発現を確認した。続いて IMAC 精製、エンテロキナーゼによるペプチドの分離、逆相 HPLC による最終精製を行い、ペプチドの単離に成功した。また安定同位体標識ペプチドの調製により良好な NMR スペクトル (^1H - ^{15}N HSQC) を得た。現在、NMR 実験による更に詳細な相互作用解析を進めている。

S010-11

Studies on Cry j 7, a Novel GRP Allergen from Japanese cedar

○Jingkang Zheng, Tomona Iizuka, Tomoyasu Aizawa

Grad. Sch. Life Sci., Hokkaido Univ.

Nowadays, pollinosis caused by Cupressaceae plants is one of the commonest allergic respiratory diseases in the world. Simultaneously, a novel gibberellin-regulatory protein (GRP) isolated from Japanese cedar, Cry j 7, was identified as pollen allergen to make cross-reactivity with food allergens cause pollen-food allergy syndrome (PFAS). The GRPs contain 12 cysteine residues forming 6 disulfide bonds, and it was previously reported that GRPs are allergenic in the cypress (Cup s 7), peach (Pru p 7), and pomegranate (Pun g 7). In our study, the amino acid sequence of Cry j 7 was searched in the FroestGen database and the N-terminal was predicted by homologous alignment of Cup s 7. After the recombinant Cry j 7 was successfully overexpressed by *Pichia pastoris*, pure proteins were produced for characterization analysis, elucidating the correct native structure of Cry j 7 was folded. The NMR analysis of the stable isotope-labeled Cry j 7 and other GRP allergens provided important data of the three-dimensional structures. Meanwhile, the immunoassay of Cry j 7 exhibited a strong antigenicity cross-related with fruit GRPs, which is of great significance to help us predict the epitopes of GRP allergens and clarify the mechanism of PFAS.

S010-10

主鎖環状化した G-CSF の環状化部分の長さの違いが構造と物性に及ぼす影響について○安澤 葉介¹、渋谷 理沙²、宮房 孝光²、千賀 由佳子²、本田 真也^{1,2}¹ 東大・新領域・メディカル情報、² 産総研・バイオメディカル

顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF) は、好中球の分化増殖を誘導するサイトカインであり、G-CSF 製剤は好中球減少症の治療薬として使われている。現在の G-CSF 製剤には薬効の持続時間や活性の点で問題点が残っている。そのため、活性を維持したまま安定性を高めて薬効の持続時間をのばした新たな G-CSF 製剤の開発が求められている。主鎖の N 末端と C 末端をつなぐ主鎖環状化によってタンパク質の安定性が向上する。特に G-CSF は N 末端と C 末端が近接しているため、三次構造に影響を及ぼすことなく環状化できる。G-CSF 製剤に適した環状 G-CSF を取得するために、環状化部分の長さを 1 残基ずつ変えた変異体を作製し、環状化部分の長さや受容体親和性、細胞増殖活性及び熱安定性についての関係を調べた。その結果、環状化によって受容体との結合動態が変化することも分かった。また、環状化部分の長さの違いが熱安定性に強く影響することが分かった。環状化部分の長さや熱安定性の関係について、PDB データベースに基づいた統計的な予測及びペプチド鎖をみみず鎖と仮定した計算による予測とは異なる実験結果が得られた。そのため、AlphaFold2 を用いて予測した環状 G-CSF の立体構造と直鎖状 G-CSF の既知の結晶構造を参考に、受容体親和性及び熱安定性の差異をもたらす構造要因について環状化部分の構造の違いを中心に研究を行った。本発表では、環状化部分の長さが物性に及ぼす影響とその構造的原因について述べる。

S010-12

Immunological research and structural analysis of a new 4 EF-hand polyclinalin in Cupressus sempervirens and its cysteine-to-serine mutation

○Shaokai Zhao, Tomoyasu Aizawa

Grad. Sch. Life Sci., Hokkaido Univ.

Polyclinalin is a kind of calmodulin-like protein mainly expressed in pollen, with pan-allergen potential which would cause IgE cross-activity because of their highly conserved EF-hand domains. Previous studies mainly focused on 2EF-hand polyclinalins and did not consider the effect of oxidative environment on the protein. In this research, we found a new 4EF-hand polyclinalin in *Cupressus sempervirens*, of which the pollen is an important allergen causing hay fever in Europe. We produced recombination protein in *Escherichia coli* and designed a C107S mutant protein to replace one of the cysteines. C107S mutant protein showed no dimer under oxidation environment, and by testing their binding capacity with IgE, we discussed the effect of disulfide bond on antigen sensitization. Using solution NMR, we obtained the 3D structure of Cup s 4, which is the first 3D structure of 4EF-hand polyclinalin.

Late-breaking Abstract

LBA-1

免疫チェックポイント分子 PD-1 を標的とした環状一本鎖抗体の作製と評価

Production and evaluation of cyclic single-chain antibodies targeting the immune checkpoint molecule PD-1

○亀澤 世奈 (Sena Kamesawa)¹、小川 瑞葵 (Mizuki Ogawa)¹、甲斐 勝成 (Shosei Kai)²、並河 真菜 (Mana Namikawa)²、富名腰 義基 (Yoshiki Funakoshi)²、佐藤 卓史 (Takashi Sato)¹、小橋川 敬博 (Yoshihiro Kobashigawa)¹、森岡 弘志 (Hiroshi Morioka)¹

¹熊大院・薬 (Grad. Sch. Pharm. Sci. Kumamoto Univ.)、²熊大・薬 (Sch. Pharm. Kumamoto Univ.)

抑制性シグナル伝達を担う免疫チェックポイント分子に対する阻害抗体は、多くのがん種に対して新たな治療法として利用されている。一方、その副作用と考えられる免疫関連の有害事象の報告も増加している。抗 PD-1/PD-L1 抗体は血中半減期が 2～3 週間程度と低分子医薬品に比べて長く、投与を中止しても抗腫瘍効果が持続する反面、副作用も持続する。抗体の可変領域を構成している VH ドメインと VL ドメインをペプチドリンカーで連結した一本鎖抗体 (scFv : single-chain Fv antibody) は分子量 27,000 程度であり、IgG に比べて 5 分の 1 と小さく、血中半減期が 2 時間程度と IgG に比べて短い。標的に結合していない scFv は速やかに体外に排出されるため、副作用の軽減が期待される。しかし、scFv には特有の会合凝集性の問題がある。近年、当研究室では、scFv の N 末端と C 末端をペプチド結合により連結した環状 scFv を創製し、会合凝集性を抑制する画期的手法の構築に成功した。そこで、本研究では抗 PD-1 抗体由来の環状 scFv と非環状の scFv を作製した。環状 scFv のタンパク質物性を物理化学的測定により調べた結果、環状化による熱安定性ならびに抗原結合活性の低下は見られず、凝集性は抑制されていた。培養細胞系による PD-1/PD-L1 結合阻害バイオアッセイにおいてもモノクローナル抗体と同等の活性を示していた。現在、さらなる高機能化を目指した改変を進めている。

LBA-2

Molecular mechanism of SbmA, a promiscuous transporter exploited by antibacterial peptides

Molecular mechanism of SbmA, a promiscuous transporter exploited by antibacterial peptides

○Inaba-Inoue Satomi (Satomi Inaba-Inoue)^{1,2}, Ghilarov Dmitry (Dmitry Ghilarov)^{3,4}, Stepień Piotr (Piotr Stepień)³, Heddle Jonathan (Jonathan Heddle)³, Beis Konstantinos (Konstantinos Beis)^{1,2}

¹Department of Life Sciences, Imperial College London (Department of Life Sciences, Imperial College London),

²Rutherford Appleton Laboratory, Research Complex at Harwell (Rutherford Appleton Laboratory, Research Complex at Harwell), ³Malopolska Centre of Biotechnology, Jagiellonian University (Malopolska Centre of Biotechnology, Jagiellonian University), ⁴John Innes Centre (John Innes Centre)

Some antimicrobial peptides hijack transporters of both the outer and inner membranes in Gram-negative bacteria and inhibit specific enzyme activities and lead to cell killing. The SbmA is involved in the uptake of structurally unrelated antimicrobial peptides. To establish the molecular mechanism of peptide transport and substrate promiscuity of SbmA, we determined the cryo-EM structure of SbmA protein in nanodiscs at 3.2-Å local resolution. The structure shows an outward-open conformation with a large cavity accommodating diverse substrates. SbmA is a homodimer consisting of eight transmembrane (TM) helices per protomer and composed of 2 TMO and a core TM domain which comprises 12 TM helices. The core domain includes conserved glutamate residues, forming a "glutamate ladder". The transport can only be initiated in the presence of both a proton gradient and the substrates. Based on analyses using glutamate mutants, a "glutamate ladder" plays a relay path role for proton movement. Given that the structural feature of SbmA is a previously unknown proton-driven secondary transporter fold, we proposed to define a new class of secondary transporters named SbmA-like peptide (SLiPT) transporter (Sci. Adv., 7, 2021).

MHC class I 様分子 CD1d と糖脂質複合体の X 線結晶構造解析

X-ray crystal structure analysis of MHC class I like molecule CD1d in complex with glycolipids

○喜多 俊介 (Shunsuke Kita)¹、秋田 穂 (Minori Akita)¹、日下 裕規 (Hiroki Kusaka)¹、田 聡 (Cong Tian)¹、田所 高志 (Takashi Tadokoro)¹、井貫 晋輔 (Shinsuke Inuki)²、新山 真由美 (Mayumi Niiyama)³、杉山 成 (Shigeru Sugiyama)⁴、村田 道雄 (Michio Murata)³、藤本 ゆかり (Yukari Fujimoto)⁵、前仲 勝実 (Katsumi Maenaka)¹

¹北大・薬 (Faculty of Pharm. Sci., Hokkaido Univ.)、²京大・薬 (Faculty of Pharm. Sci., Kyoto Univ.)、³阪大・理 (Faculty of Sci., Osaka Univ.)、⁴高知大学・理工 (Faculty of Sci. and Tech., Kochi Univ.)、⁵慶應・理工 (Faculty of Sci. and Tech., Keio Univ.)

CD1d は非古典的主要組織適合遺伝子複合体クラス 1 (MHC class I) の仲間であり、内在性および外来性の脂質・糖脂質を提示する分子である。CD1d-脂質複合体はナチュラルキラーT (NKT) 細胞の T 細胞受容体によって認識され、多様なサイトカインを誘導する。NKT 細胞のサイトカイン産生は CD1d 提示抗原に依存するが、抗原と対応するサイトカイン活性について詳細は明らかになっていない。近年、マウスの CD1d において、糖脂質 α -GalCer は Th1 と Th2 サイトカインを同程度に誘導することに対し、 α -GalCer のアシル鎖にアミド基を導入することで Th2 選択性を示すことが明らかにされた。そこで我々は、ヒト CD1d (hCD1d) およびマウス CD1d (mCD1d) とアミド型 α -GalCer 複合体の X 線結晶構造解析を行なった。mCD1d においてはアミド型 α -GalCer のアミド基と水素結合ネットワークを形成していること、マウスとヒトでアミド基の位置や CD1d との相互作用に差があることを見出した。さらに、各 CD1d と抗原複合体の示差走査熱量測定を行い、サイトカイン活性と熱安定性の相関を検証した。mCD1d では α -GalCer にアミド基を導入するだけでは熱安定性は変化せず、高い熱安定性を示すアシル鎖長が存在すると示唆された。他方、hCD1d では、アシル鎖が長いほど熱安定性が高くなった。mCD1d の結果は先行研究のサイトカイン産生能評価と傾向が一致しており、熱安定性を指標に抗原のデザインが可能となることを示唆している。

細菌アクチン MreB の繊維構造多型

Filament structural polymorphism of bacterial actin MreB

○高橋 大地 (Daichi Takahashi)¹、藤原 郁子 (Ikuko Fujiwara)^{1,2,3}、宮田 真人 (Makoto Miyata)^{1,2}¹大阪公大・院理 (Grad. Sch. Sci., Osaka Metropolitan Univ.), ²大阪公大・複合先端 (OMU Adv. Res. Cent. Natl. Sci. Tech., Osaka Metropolitan Univ.), ³長岡技大・物質材料 (Dept. Mater. Sci. Bioeng., Nagaoka Univ. Tech.)

スピロプラズマはらせん形の細菌であり、らせんの向きを交互に入れ替えながら液体中を運動する。この運動には、スピロプラズマ独自の細胞骨格タンパク質である fibril と、アクチンスーパーファミリーに属する 5 種類の MreB (MreB1-MreB5) が関わると考えられている。MreB5 は運動に必須で、その重合ダイナミクスによって主に fibril で構成されたらせん状の内部構造を構造変化させ、運動を駆動すると考えられている。MreB5 は細胞内でシート状の高次構造を形成し、膜や fibril と多面的に相互作用しながら運動を駆動すると考えられている。しかし、MreB5 繊維の高次構造形成機構や、それら現象の基盤となる繊維の電気的な性質は明らかになっていない。それらを解明するために我々は、MreB5 繊維の構造多型を解析した。様々な pH 及びイオン強度条件で MreB5 を重合させて負染色電子顕微鏡法で観察したところ、酸性及び中性の pH 条件では低イオン強度下のみで準結晶状の構造を、塩基性条件下ではイオン強度に関わらず幅数 μm のシート状の構造を形成した。静的光散乱測定を組み合わせ、準結晶構造は数十から数百秒の遅延段階の後に形成が開始され、その遅延段階では幅数 nm のシート状の構造が形成されることを示した。以上結果より、MreB5 のシート状構造は、塩基性条件において促進される相互作用で形成され、準結晶構造を形成しうる正負両電荷を持つことが示唆された。前述のモデルは、PROPKA によって得た MreB5 結晶構造の pH 依存的な表面電荷情報によっても支持された。

抗生物質リゾクチシンの生合成に関する RhiC タンパク質の構造機能解析
Structural and functional analysis of RhiC, an L-amino acid ligase

○坂井 みずき (Mizuki Sakai)¹、中村 顕 (Akira Nakamura)²、小島 修一 (Shuichi Kojima)^{1,2}

¹学習院大・院自然科学・生命科学 (Dept. of Life Sci., Grad. Sch. of Sci., Gakushuin Univ.)、²学習院大・理・生命科学 (Dept. of Life Sci., Fac. of Sci., Gakushuin Univ.)

リゾクチシンは *Bacillus subtilis* ATCC 6633 によって産生され、C 末端に非タンパク質性アミノ酸の L-2-アミノ-5-ホスホノ-3-シスペンテン酸 (APPA) を持つホスホン酸オリゴペプチドであり、A`D の 4 種類が確認されている。リゾクチシンはホスホエノールピルビン酸を出発物質として生合成され、オリゴペプチド輸送システムによって標的である真菌の細胞に入る。このとき、N 末端のアミノ酸が標的細胞への効率的な侵入に必要であり、その後ペプチターゼによってアミノ酸が切断され APPA が放出される。APPA は、スレオニンの前駆体である α -ホスホ-L-ホモセリンと構造が類似しており、真菌のスレオニンシンターゼを阻害する。本研究では、リゾクチシンの生合成に関与している酵素のうちアミノ酸リガーゼ RhiC について、結晶構造解析を行うとともにアミノ酸との反応を検討することでこの酵素が触媒するペプチド結合形成過程の詳細を明らかにすることを目的とした。

C 末端に His タグを付加させた RhiC タンパク質を精製し結晶化した。放射光 X 線を用いて回折強度データを収集し、2.77 Å 分解能で RhiC タンパク質の結晶構造を決定した。RhiC タンパク質は二量体を形成しており、ゲル濾過での分析結果とも一致していた。RhiC タンパク質とアミノ酸 (Val, Leu, Arg) との反応産物を質量分析した結果、RhiC タンパク質によって Val-Arg, Leu-Arg の組み合わせでのペプチドが形成されることが分かり、これらの反応がリゾクチシン B, D の生合成につながることを予想された。

免疫応答を利用したアルパカ由来シングルドメイン抗体の取得技術

The predictions of high affinity single domain VHH antibody through repeated immunizations.

○赤澤 陽子 (Yoko Akazawa)¹、松田 知成 (Tomonari Matsuda)²、宮崎 誠生 (Nobuo Miyazaki)³、清瀬 紀彦 (Norihiro Kiyose)³、伊東 祐二 (Yuji Ito)⁴、萩原 義久 (Yoshihisa Hagihara)¹

¹産総研 (AIST)、²京大 (The Univ. of Kyoto)、³アーク・リソース (株) (ARK)、⁴鹿大 (The Univ. of Kagoshima)

抗体は医療（治療薬や診断）などに広く用いられていますが、その構造の複雑さに由来する様々な問題が存在します。私たちはラクダ科動物由来シングルドメイン抗体である VHH 抗体の効率的な取得を目指して、ラクダ科動物アルパカへの抗原免疫と次世代シーケンサー解析を組み合わせた「ヒット抗体予測システム」を開発しました。本研究では、アルパカに複数回の抗原を免疫前後の血液試料から末梢血単核細胞を採取し、VHH 抗体配列の経時的なレパトア解析を実施しました。本システムによる目的抗原に結合する VHH 抗体の選抜的中率は高く、従来法のファージディスプレイによるスクリーニング方法に比べ多種多様な抗原結合能を有する VHH 抗体配列の取得が可能です。さらに、抗原に反応するクラスターの VHH 抗体の物性評価（抗原結合能や熱安定性）を解析した結果、免疫刺激による抗体成熟に伴い抗原結合能が上昇する一方で、熱安定性の低下傾向を認めました。抗体医薬品を代表とする産業応用においては、多様な候補抗体の取得と性質・性能の良い抗体の絞り込み作業が重要です。この「ヒット抗体予測システム」は抗原に結合する VHH 抗体や物性予測に活用でき、VHH 抗体の治療・診断用医薬や素材開発につながると期待しております。

Candidatus Pelagibacter ubique 由来基質結合タンパク質レパートリーの機能解析

Functional characterization of the solute-binding protein repertoire of Candidatus Pelagibacter ubique

○Clifton Ben E. (Ben E. Clifton)¹、Laurino Paola (Paola Laurino)¹

¹OIST・タンパク質工学進化 (Protein Eng. Evol. Unit, OIST)

α プロテオバクテリアに属する海洋細菌、SAR11 は世界中の海洋に広く分布し、その個体数は世界最大 (10^{28} 個) で、生態学的に重要な微生物である。SAR11 は低栄養条件下でのみ生育可能な貧栄養細菌であり、環境から栄養を得る際に、基質結合タンパク質 (solute-binding protein, SBP) 依存性 ABC 輸送体を利用していると考えられている。その膨大な個体数から、SAR11 由来 ABC 輸送体は海洋における栄養循環に大きく寄与していると考えられる。しかしながら、SAR11 の培養が困難であるため、その輸送機能のほとんどが不明である。本研究では、SAR11 の一種である *Candidatus Pelagibacter ubique* のゲノムに存在する SBP 全ての発現精製および機能解析を試みた。全 14 種類のうち、12 種類の SBP が大腸菌内で可溶性画分に発現することを確認し、11 種類の機能を示差走査蛍光定量法によって同定した。解析結果から、6 種類の SBP が配列類似性に基づいて予測されたものとは異なる機能を持つことを明らかにした。等温滴定カロリーメトリーを用いて様々な基質との相互作用解析を行った結果、多くの SBP が複数の基質に対して高い結合親和性および広範囲な結合特異性を兼ね備えていることが分かった。本研究の成果は、貧栄養細菌におけるゲノム縮小化に関する洞察をもたらし、世界で最も多い細菌の輸送能力に関する正確なオミックス解析を可能とするであろう。

クライオ電子顕微鏡法によるスピロプラズマ細胞骨格リボンの構造解析

Cytoskeletal ribbon of Spiroplasma revealed by cryo electron microscopy

○笹嶋 雄也 (Yuya Sasajima)¹、加藤 貴之 (Takayuki Kato)²、宮田 知子 (Tomoko Miyata)³、川本 晃大 (Akihiro Kawamoto)²、牧野 文信 (Fumiaki Makino)^{3,4}、難波 啓一 (Keiichi Namba)^{3,5,6}、宮田 真人 (Makoto Miyata)^{1,7}

¹大阪公大・院理 (Grad. Sch. Sci., Osaka Metropolitan Univ.)、²阪大・蛋白研 (IPR., Osaka Univ.)、³阪大・院生命機能 (Grad. Sch. Front. Biosci., Osaka Univ.)、⁴(株)日本電子 (JEOL Ltd.)、⁵理研・BDR & SPring-8 (BDR & SPring-8 Center, Riken)、⁶阪大・日本電子 YOKOGUSHI 協働研 (JEOL YOKOGUSHI Res. Alliance. Lab. Osaka Univ.)、⁷大阪公大・複合先端 (OCARINA, Osaka Metropolitan Univ.)

スピロプラズマはリボンと呼ばれる独自の細胞骨格を持つ。このリボンはフィブリルという、細菌ヌクレオシダーゼから進化したスピロプラズマ特異的な細胞骨格タンパク質から構成される。私たちはこれまでに、菌体から単離したフィブリルフィラメントの単粒子クライオ電子顕微鏡法により、フィブリルの新規原子構造を決定した。本研究では、新たに電子線クライオトモグラフィを用いてリボンを可視化し、その成り立ちをフィブリル原子構造をもとに議論する。氷包埋した細胞の傾斜撮影像から再構成したトモグラムは、細胞らせんを裏打ちするリボンを可視化した。リボンは 8-10 本のプロトフィラメントから構成され、幅約 50 nm、厚さ約 10 nm の扁平なシート状構造であった。次に、リボンからプロトフィラメント 3 本を含む密度を抽出しサブトモグラム平均を行ったところ、連なったリング状密度をシリンダー状密度が架橋するような繊維構造が、リングが重なるような形で 3 本並んでいた。これらの特徴は、フィブリルフィラメントを作るサブユニット間でフィブリルタンパク質の N 末端ドメイン同士が相互作用するシリンダー部分、C 末端ドメイン同士が相互作用するリング部分にそれぞれよく対応していた。また、リングの表裏の分子表面は電荷分布が偏り、表側は正電荷を、裏側は負電荷を帯びていた。このことから、複数本のフィブリルフィラメントは、互いに電荷を打ち消すように繊維の向きを揃えて配向し、リボンを形成している可能性が考えられる。

メゾスコピックシミュレーションによるシナプス後肥厚タンパク質 PSD95 と TARP の液液相分離

Liquid-liquid phase separation of postsynaptic density protein PSD95 and TARP by mesoscopic simulation

○山田 莉彩 (Risa Yamada)¹、高田 彰二 (Shoji Takada)¹

¹京大・理・生物科学 (Biol. Sci., Grad Sch. of Sci., Kyoto Univ.)

記憶や学習を司るシナプス可塑性は、シナプス前部後部のタンパク質ネットワークに由来する。シナプス後肥厚(PSD)の主要な足場タンパク質である PSD95 は、様々なタンパク質ドメインやシナプス後膜上の受容体と相互作用することで液液相分離を引き起こす。特に PSD95 は、長期増強や長期抑圧に関与する AMPA 受容体と、膜貫通 AMPA 受容体調節性タンパク質(TARP)を介して結合する。このため、これらのタンパク質はシナプス可塑性の重要な因子と考えられている。しかし、PSD95 が形成するタンパク質ネットワークがどの程度 AMPA 受容体の挙動に影響を与えているかは未解明である。本研究では、TARP と PSD95 との相互作用についてメゾスコピックモデルを構築し、反応拡散に基づいたソフトウェア ReaDy を用いて反応性分子動力学シミュレーションを行った。この手法ではタンパク質ドメイン間の相互作用を化学結合とみなすことで、ドメイン間相互作用の価数を固定することができる上に、ポテンシャル関数が無限大に発散することがないため、比較的長い時間ステップでも安定したシミュレーションを行うことができる。シミュレーションの結果このモデルによって液液相分離を表現することが示され、また相分離が起こるにはドメイン間の特異的な相互作用だけではなく比較的弱い非特異的な相互作用が必要であることが半明した。更に同様の手法を用いて受容体が膜に結合した状態を模してシミュレーションを行う。

クライオ電子顕微鏡によるヒトヌクレオソームの高分解能構造解析

High resolution structure of human nucleosome obtained by cryo-EM

○滝沢 由政 (Yoshimasa Takizawa)¹、佐藤 祥子 (Shoko Sato)¹、何 承翰 (Cheng-Han Ho)^{1,2}、ダネフ ラドステイン (Radostin Danev)³、胡桃坂 仁志 (Hitoshi Kurumizaka)^{1,2}

¹東大・定量研 (IQB, The Univ. of Tokyo)、²東大・理 (Grad Sch. of Sci., The Univ. of Tokyo)、³東大・医 (Grad Sch. of Med., The Univ. of Tokyo)

真核生物のゲノムDNAは、クロマチン構造を形成し細胞核内に納められている。クロマチンの基本構造は、ヌクレオソームと呼ばれる4種類のヒストン(H2A, H2B, H3, H4)が2分子ずつからなるヒストン8量体の周りに、約150塩基対のDNAが巻き付いた構造体である。ヌクレオソームの構造は、過去20年に渡りX線結晶構造解析により多数解かれてきた。また、近年クライオ電子顕微鏡構造解析の発展により、近原子分解能(3-4オングストローム)のヌクレオソームやその複合体のクライオ電顕構造が解かれるようになってきた。しかしながら、ヌクレオソームのクライオ電子顕微鏡構造解析による2オングストロームを上回る高い分解能の構造は未だ報告がなく、X線結晶構造解析においても数種類の構造が報告されるに留まっている。そこで我々は、ヒトヌクレオソームのクライオ電子顕微鏡による高分解能構造決定を目的に単粒子解析を行った。その結果、1.89オングストロームの分解能でヒトヌクレオソームのクライオ電子顕微鏡構造解析に成功した。得られたヌクレオソーム構造は、詳細な側鎖の静電ポテンシャルマップが得られており、特にフェニルアラニンやチロシンの芳香環の中央の穴やヌクレオソームDNAのプリン、ピリミジンを識別することができた。本構造解析により、ヌクレオソームのクライオ電顕単粒子解析を用いた高分解能構造解析のワークフローが示され、今後のクロマチン構造解析に貢献できると考えている。

LBA-11

DNA ループ形成に関与するヒトコヒーシンサブユニットのDNA 結合親和性の分子動力学シミュレーション

DNA binding affinity of human cohesin subunits participating in loop-extrusion mechanism studied by molecular dynamics simulation

○ グ チェンヤン (Chenyang GU)¹、ブランドーニ ジョバンニ (Giovanni Brandani)¹、寺川 剛 (Tsuyoshi Terakawa)¹、高田 彰二 (Shoji Takada)¹

¹京大・理・生物 (Dept. of Bio. Sci., Grad Sch. of Sci., Kyoto Univ.)

The non-random 3D folding of the eukaryotic genome into a small nucleus is important for many biological processes such as the regulation of gene expression. Topologically-associated domains (TADs) are key components of the hierarchical organization of chromosomes, and are believed to be established mainly by the cohesin SMC complex through the process of loop extrusion. Current theoretical models suggest that loop extrusion is based on complex dynamical interactions between DNA and cohesin during the ATP cycle, but the molecular details remain unclear. Using coarse-grained molecular dynamics simulations, we identify the key regions of cohesin participating in strong interactions with DNA and characterize their DNA binding kinetics. Our simulations provide insights into the mechanism that would be difficult to achieve with experiments alone, and lay the foundation for modeling the full cohesin holocomplex and its loop extrusion activity.

シアノバクテリア概日時計における尿素とトリメチルアミンN-オキシド(TMAO)の効果

Effects of urea and trimethylamine N-oxide on the circadian clock of cyanobacteria

○北原 亮 (Ryo Kitahara)¹、原 菜々花 (Nanaka Hara)²、宮本 正洋 (Masahiro Miyamoto)²、益田 歩実 (Ayumi Masuda)²、北沢 創一郎 (Soichiro Kitazawa)¹

¹立命大・薬 (Coll. Pharm. Sci., Ritsumeikan Univ.)、²立命大院・薬 (Grad. Sch. Pharm. Sci., Ritsumeikan Univ.)

シアノバクテリアは深海堆積物を含め様々な環境で生息が確認されている。シアノバクテリア概日時計は3種類のタンパク質 KaiA, KaiB, KaiC と ATP によって構成されている。概日時計の中心である KaiC が自己リン酸化と自己脱リン酸化活性を持っており、試験管内でリン酸化レベルが概日振動を示す。この KaiC リン酸化振動の周期は、温度変化には安定である一方、200 気圧程度で8時間ほど短縮する。また周期長は KaiC の ATPase 活性が上昇すると短縮することがわかっている。本研究課題では、シアノバクテリア生物時計に対する添加物効果について検討を行なった。タンパク質変性剤の尿素と安定化剤のトリメチルアミンN オキシド(TMAO)は、海洋生物の浸透圧調節物質でもある。尿素濃度が0.5 M まで増加するとき周期長が増加し、ATPase 活性及びリン酸化活性が減少した。TMAO が0.25 M まで増加するとき、周期長が短縮し ATPase 活性が増加した。また尿素と TMAO を混合するとき、周期長及び ATPase 活性の相殺効果があった。深海魚では尿素濃度が減少し TMAO 濃度が増加ことで、タンパク質の安定性を維持しながら、高い浸透圧を獲得している。深海生物において概日時計の存在は未だ不明であるが、タンパク質の安定性を保ちながら生物時計を維持することは可能なようだ。

in vivo 部位特異的光架橋法による BamA-BamC 相互作用解析

BamA-BamC interaction analysis by in vivo site-specific photocrosslinking

○丸野 友希 (Yuki Maruno)^{1,2}、ナカジョン テワサノ (Thewasano Nakajohn)^{2,3}、ジャーマニー エドワード (Edward Germany)²、塩田 拓也 (takuya shiota)²

¹宮崎大・農・応用生物科学 (Dept. of Biochem and Appl Sci. Fac of Agri. Univ. of Miyazaki)、²宮崎大学テニュアトラック推進機構 (Inst for Tenure Track Promotion. Univ of Miyazaki)、³宮崎大学農学研究科 (Grad School of Agri. Univ of Miyazaki)

β barrel Assembly Machinery (BAM) 複合体は、 β バレル型膜タンパク質の正しい立体構造形成と、外膜挿入を行なう。大腸菌の BAM 複合体は、 β バレル型膜タンパク質の BamA と、4 つのリポタンパク質 BamB, C, D, E で構成される。近年、様々な状態の BAM 複合体の立体構造が報告されており、その作動原理が議論されているが、BAM 複合体の生体内での挙動については不明な点が多い。特に、BamC は、すべての立体構造においてペリプラズム空間に存在するが、*in vivo* の解析では、部分的に細胞表層に露出していることが示唆されている。今回、*in vivo* で BamA のどの部位に BamC が相互作用をしているかを調べるため、*in vivo* 部位特異的光架橋実験を行なった。この手法は、光架橋性の側鎖を持つ非天然アミノ酸 p-benzoyl-L-phenylalanine (pBPA) を用いて、近傍タンパク質との相互作用をアミノ酸残基レベルで解析できる。BamA に pBPA を導入し、BamC と架橋される位置を決定した。BamC は、立体構造で示されている BamA のペリプラズム領域以外に、膜貫通部分や、細胞表層のループ領域と相互作用していることが分かった。さらに、基質輸送によって BamA-BamC の相互作用が動的に変化するかを調べるため、外膜の主要な β バレル型膜タンパク質である OmpC を基質として加えた膜画分で輸送状態を再構築し、架橋の変化を観察した。基質添加により、BamA の膜貫通部分において、BamC との相互作用が変化した。現在、BamC に pBPA を導入した実験についても進めており、当日はそちらも含めて報告したい。

β バレル型タンパク質の“折り目アミノ酸”最適化の試み

An attempt to optimize the “ORIME amino acid” of β barrel proteins

○千葉 かおり (Kaori Chiba)¹、藤巻 美稀 (Miki Fujimaki)¹、高木 愛海 (Aimi Takagi)¹、柳橋 希羽 (Kiwa Yanagibashi)¹

¹茨城高専 (Natl. Inst. of Tech., Ibaraki Coll.)

1次構造が完成されたタンパク質を使用したリフォールディング実験とは異なり、タンパク質の生合成過程では、リボソームによりポリペプチド合成が完了した先頭のアミノ酸から順にフォールディングを開始する。近距離相互作用で二次構造を形成できる α ヘリックスからなるタンパク質に比べ β バレル型タンパク質は、立体構造形成に一次構造上離れたアミノ酸との相互作用が必要なため、生合成過程においても正しくフォールディングするのが難しいと考えられる。一方、生命科学研究で多用されている緑色蛍光タンパク質(GFP)は β バレル型タンパク質であるが、上記の予想に反して、野生型では1LのLB培地あたり可溶性画分に50mg以上という高収率でタンパク質を得ることができる。我々はこれまで、タンパク質の分子内に形成された負の静電ポテンシャルにより、ペプチド結合が部位特異的に軟化する可能性について、中性子結晶構造解析およびNMRを用いて調べてきた。これらの結果をもとに、 β バレル型タンパク質では、ループ部分に配置された酸性アミノ酸の負電荷がループ部分のペプチド結合を軟化させ、これが、生合成されつつあるポリペプチドのフォールディングの「折り目」となり、高収率を実現しているのではないかと考えた。本研究では、ペプチド結合の軟化との関連が示唆された、アミド窒素のNMRのケミカルシフトが高磁場シフトを示すアミノ酸に着目したアミノ酸置換を行い、ループ部分に配置された酸性アミノ酸の「折り目」最適化による収率の向上を試みた。