



第三回ワークショップ報告

高橋 聰 (東北大・A02 計画研究代表者)

石井邦彦 (理研・A02 計画研究分担者)

水谷泰久 (大阪大学・A02 計画研究代表者)

2014 年 6 月 28 日に、東工大すずかけ台キャンパスにおいて、国際ワークショップ“Over the Barriers of Transition Paths: Dynamical Processes in Proteins and Complex Molecular Systems”を開催しました。この WS は、前日まで開催された日本蛋白質科学会年会に招待された NIH の William Eaton 博士とスタンフォード大学の Vijay Pande 教授を囲み、インフォーマルな雰囲気の中で議論を行うために企画したものです。残念なことに、Pande 博士が急病のために来日をキャンセルされたため、海外からの招待参加者は Eaton 博士のみとなりましたが、当日は活発な議論がかわされました（写真）。この WS について報告いたします。

変性したタンパク質が示す運動のほとんどは、変性状態における熱揺らぎ運動です。しかし、ある瞬間に、タンパク質は折り畳むための運動を開始し、短時間内に折り畳み状態に転移します。この運動は、化学反応速度論における遷移状態を乗り越える過程に対応します。Eaton 博士は、一分子蛍光分光法によりこの過程を観察し、転移に必要な時間（transition path time）をはじめて決定しました。遷移状態は大切な概念ですが、その特徴について、小分子系でも十分に研究されているとは言えません。本 WS は、遷移状態をキーワードとして、小分子の研究者とタンパク質の研究者が議論を行うことを目的としました。

WS の最初の講演は、京都大学の安藤博士にお願いしました。安藤博士は、1940 年に最初に提案された Kramers の溶液中の反応理論から始まり、反応座標を二次元化した住-Marcus の理論とその数値解析などについて復習いただきました。さらに、安藤博士が展開されている分子動力学計算に対する量子効果をご発表いただきました。

次の講演は、理化学研究所の竹内博士にお願いしました。竹内博士は、光励起をトリガーとして、励起状態における分子構造の変化をリアルタイムで追跡する実験を展開されています。ご講演では、



写真：ワークショップの様子。演者は Eaton 博士。

シアニン色素やスチルベンにおける光異性化反応を取り上げ、異性化に伴い、励起状態上を波束が運動する過程を報告されました。

第三の講演は、岡山大学の松本博士にお願いしました。松本博士は、水の凍結や溶解などの相転移現象を MD 計算により再現し、計算結果を独特的の視点から解析された結果を報告されました。例えば、氷の溶解において、水素結合の “defect pair” の間の距離を導入することで、現象の見通しがつくことなどをご説明いただきました。

昼食を挟んで、Eaton 博士にご講演をお願いしました。Eaton 博士は、1999 年に自らが提案した理論モデルについて主に説明されました（Munoz, Eaton, Wako & Saito モデルなどと呼ばれます）。このモデルは、郷信広先生が 1970 年代に提案された郷ポテンシャル（折り畳んでいるときに接触する残基間にのみ引力を想定するポテンシャル）を仮定したもので、このモデルが、多くのタンパク質の性質を説明可能であることを説明されました。さらに、タンパク質フォールディングにおける transition path time の計測結果が報告され、人間がデザインしたタンパク質と自然界に存在するタンパク質では、この値が大きく異なることなどが説明されました。

Eaton 博士の次に、京都大学の高田博士にご講演をお願いしました。高田博士は、これまで開発されてきたタンパク質運動の粗視化計算プログラムを用いて、様々なタンパク質について、transition path time を計算した結果を報告しました。高田博士の手法も郷ポテンシャルを仮定したものです。この計算を行うと、Eaton 博士が計測された実験データを定性的に良く再現できました。高田博士の報告も、郷ポテンシャルが、驚くほど正確にタン



パク質の運動性を記述することを示しています。

次に、オーガナイザーの一人でもある石井から、二次元蛍光相関分光法について報告を行いました。この分光法は、マイクロ秒の時間領域におけるタンパク質の運動を計測できると共に、複数の状態間における転移を可視化できる手法です。手法の原理についての説明の後に、DNA ヘアピンの構造形成やシトクロム c のフォールディングについての応用例が説明されました。さらに、タンパク質の遷移状態をこの手法で解析できるかどうかという可能性が議論されました。

次の 2 件の講演では、若手研究者による短い発表をお願いしました。はじめに、東北大学の小井川博士から、酸素分子をクエンチャーとして用いることで、高時間分解能の一分子時系列データを取得する手法の発表がなされました。次に、北海道大学の寺本博士は、生体分子とその周囲の水を取り込んだ協同的な運動モードを解析的に求める手法の提案を行い、手法を Met-enkephalin に適応した結果を報告しました。

最後の講演では、大阪大学の肥後博士により、分子動力学計算を用いてタンパク質の運動を解析する研究の説明がなされました。特に、天然変性タンパク質である pKID や NRSF が、パートナーであるタンパク質と結合することで折り畳まれる過程について報告されました。

WS 後の懇親会にて、Eaton 博士に簡単なスピーチをお願いしました。この中で特に印象深かったのは、博士が curiosity driven research の重要性を強調されたことです。Eaton 博士は、これまでに「タンパク質における内部摩擦効果」や「フォールディングの速度上限」など、数々の魅力的なコンセプトを提案されてきました。これらの提案に至ったモチベーションとして「こんなことを調べたら面白いのではないか」という強い好奇心があったことを、改めて認識しました。(蛇足かもしれませんが、Eaton 博士が、自らが面白いと感じる現象の重要性を、大変教育的な論文で説明してきたことも指摘したく思います。)

WS のタイトル「Over the barriers of the transition paths」は、オズの魔法使いのテーマソングのイメージを借りてつけました。しかし、WS が進むにつれ、barrier とは、小分子とタンパク質の研究者の違いや、理論家と実験家の違いも（意図せずに）意味していたのかもしれないと思いました。「barrier

を越える」研究が、本新領域研究から数多く生まれることを願っています。

最後になりましたが、魅力的なご講演を準備いただいた演者の皆様と、活発な議論をいただいた参加者の皆様、WS の立案から運営にいたるまで全面的なサポートをいただいた藤井先生および事務局の方々に、改めて御礼を申し上げます。



業績紹介：光駆動ハイブリッド（ナトリウム/プロトン）型ポンプの低温赤外分光

神取 秀樹（名工大・A03 計画研究代表者）

論文題目："FTIR spectroscopy of a light-driven compatible sodium ion-proton pumping rhodopsin at 77 K"

著者：Hikaru Ono, Keiichi Inoue, Rei Abe-Yoshizumi, and Hideki Kandori

雑誌巻号：*J. Phys. Chem. B* **118**, 4784-4792 (2014).

光駆動イオンポンプとして機能する微生物型ロドプシンの内部には、正負 2 個の電荷からなる電気四重極が存在し、イオンのベクトル輸送に関わることが知られている [1]。下図左にはプロトンポンプとして有名なバクテリオロドプシンの例を重水中での水素結合構造 [2] とともに示した。光を吸収するレチナールはシップ塩基がプロトン化しているため正電荷を持っており、レチナールの光異性化が起こるとマイクロ秒の時間領域で Asp85 へプロトンが移動し、図で下向きのプロトンポンプが実現する。クロライドポンプは Asp85 が中性化された部位にクロライドが結合して電気四重極を構成し、光異性化後に図で上向きにクロライドが移動する結果として実現する。このように正電荷をもったレチナール発色団との相互作用変化がプロトンやクロライドのポンプを担うため、光駆動のナトリウムポンプは存在しない、というのが長い間の分野の常識であった。

ところが光駆動ナトリウムポンプは存在した。それを見た我々は昨年の 4 月に報告したのであるが、その存在に加えて 2 つの意外な事実が明らかになった [3]。

- 【1】ナトリウムイオンの結合部位は出口（細胞外）側表面にあるが、アミノ酸変異により結合できなくなさせてもポンプ機能は残る。
- 【2】ナトリウムイオン以外にリチウムイオンもポンプできるが、陽イオンがカリウム以上の大きさに

なるとプロトンポンプになる。

分子メカニズムを明らかにするためには構造や構造変化の情報が必要となる。そこで本論文では、我々が得意とする低温赤外分光解析を光駆動ハイブリッド型ポンプである KR2 に対して試みた。実験では、ナトリウムポンプとしてはたらく NaCl、プロトンポンプとしてはたらく KCl の存在下で水和フィルムを作製し、レチナール近傍の構造変化が捉えられる 77 K で赤外差スペクトルを測定した。

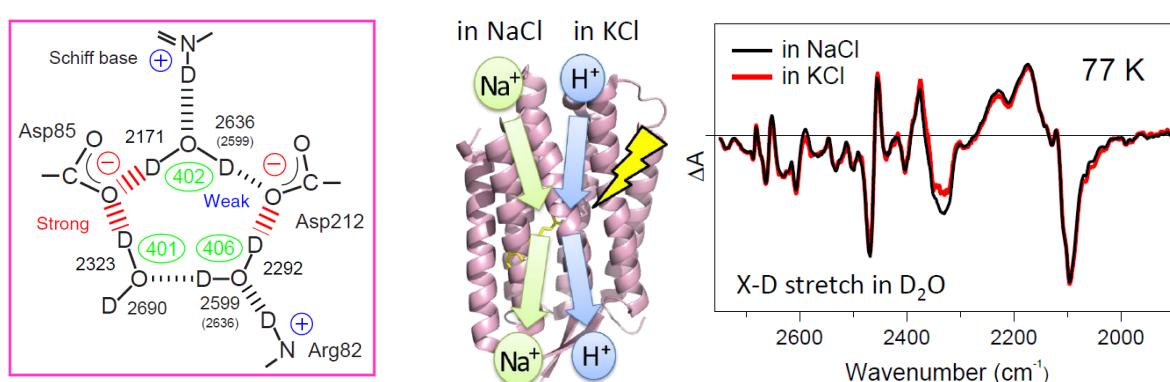
その結果、全トランスから 13 シス型への異性化反応とそれに伴うレチナール分子の捻れ、水分子を含む水素結合構造の変化が観測され、KR2 も他の微生物型ロドプシンと同様の光誘起初期反応を示すことが明らかになった。一方、驚いたことに、NaCl 中と KCl 中で全く同一のスペクトルが得られた。水和フィルムの光反応サイクルは異なっていたので、初期反応における構造変化が同一であると結論できる。ナトリウムの結合部位は出口側表面に存在するので妥当な結果に思えるかもしれないが、バクテリオロドプシンにおいて 77 K でレチナールから 11 Å 以上離れた部位の構造変化が観測されており[4]、機能の異なる二状態が同一の初期反応を示すという事実は興味深い。このロドプシンは、光異性化をした段階では自分がどのイオンをポンプするのかわからない、とも言えるかもしれない。ただし異性化後の安定構造は同一だとしても、二状態の光反応ダイナミクスは詳しく検討する必要があり、本領域内の共同研究として行いたいと考えている。

[1] 神取秀樹, *Mol. Sci.* **5**, A0043 (2011); O. Ernst et al. *Chem. Rev.* **114**, 126 (2014).

[2] M. Shibata, H. Kandori *Biochemistry* **44**, 7406 (2005).

[3] K. Inoue et al. *Nature Commun.* **4**, 1678 (2013).

[4] H. Kandori et al. *PNAS* **97**, 4643 (2000).





業績紹介：水酸基が主鎖の周囲に集積した新しい親水性ポリマーの合成

井原 栄治（愛媛大院理工・A03 公募研究代表者）

論文題目："Polymerization of Hydroxy-containing Diazoacetates: Synthesis of Hydroxy-containing "Poly(substituted methylene)s" by Palladium-mediated Polymerization and Poly(ester ether)s by Polycondensation through O-H Insertion Reaction"

著者:Hiroaki Shimomoto, Erika Itoh, Tomomichi Itoh, Eiji Ihara,* Naohiro Hoshikawa, and Naoki Hasegawa

雑誌巻号：*Macromolecules* 47, 4169-4177 (2014).

炭素-炭素結合(C-C)を主鎖骨格とするポリマーは、合成高分子の中で最も一般的なものであり、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリスチレン、ポリMMAを始めとする様々なポリマーが有用な高分子材料として利用されている。これらのポリマーは従来、炭素-炭素二重結合(C=C)を含む化合物（ビニルモノマー）の付加重合（ビニル重合）によって合成されてきたが、筆者らは主鎖のC-Cを1炭素ユニットから構築する新しい合成法（ポリ[置換メチレン]合成）の開発に取り組んでいる。そしてこれまでに、Pd錯体を開始剤とするジアゾ酢酸エステルの重合による、主鎖の全ての炭素にアルコキシカルボニル基（エステル）が結合したポリマー[ポリ(置換メチレン)]の合成法の開発に成功している。

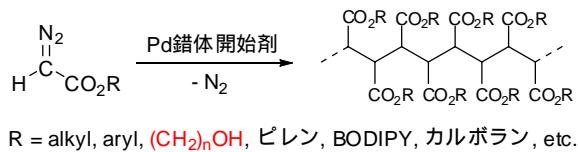


図1 ジアゾ酢酸エステルの重合。

この手法により得られるポリマーの特徴は、エステル置換基がポリマー主鎖の周囲に高密度に集積していることであり、この特徴を活かした新しい機能性高分子（官能基集積型機能性高分子）の開発にも取り組んでいる。今回の論文は、そのエステル部に水酸基を有するモノマーの重合についての報告であるが、これは親水性置換基を有するジアゾ酢酸エ斯特ルの、初めての重合例となる。

まず、この重合の生長末端の活性種となる C-Pd 結合とモノマーの水酸基との副反応の可能性を考慮して、水酸基をシリル基で保護したモノマーを重合し、重合後にその保護基を除去することを試みた（ルート1）。その結果、水酸基の集積したポリマーを得ることに成功した。さらに興味深いことに、水酸基を保護していないモノマーの重合を試みたところ、このモノマーも水酸基を保護したモノマーと同様の反応性を示し、ルート1の場合と同じ構造を有するポリマーが得られた（ルート2）。こうして得られたポリマーは、その主鎖周囲への水酸基の集積に由来する特徴的な親水性を示した。

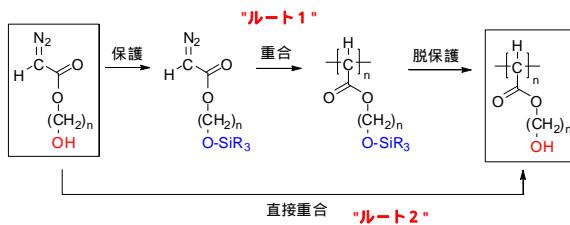


図2 水酸基含有ジアゾ酢酸エステルの重合。

今回の論文では、水酸基を有するモノマーの重合について報告しているが、これ以外にも様々なエ斯特ル置換基を有するジアゾ酢酸エ斯特ルの重合を現在行っている。そして、多様な官能基をポリマー主鎖周囲に集積させることにより得られる高分子を、独自の「柔らかな分子系」として確立することを目指している。特に本学術領域の研究課題としては、ピレン、BODIPY、カルボラン、ペリレンといった共役系の官能基を有するジアゾ酢酸エ斯特ルをモノマーとして用いた、光機能性高分子の開発をターゲットとしている。各種の

共役系置換基を、その主鎖周囲における連鎖配列を制御して重合することにより、主鎖に沿った高効率のエネルギーや電子の移動の可能性を検討する予定である。

その研究計画において、今回その反応性を明らかにした水酸基含有モノマーの利用は、光機能性モノマーとの共重合により、得られる光機能性高分子の溶解性や各種の環境における集合状態の制御のための有効な手段となることが期待できる。



川村グループの西川亮汰さん、豊田修平さんが 第 14 回 日本蛋白質科学会年会でポスター賞を受賞

川村 出（横国大・A02 公募班 研究代表者）

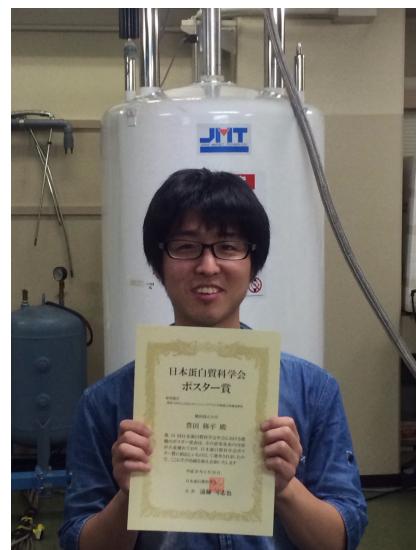
A02 柔らかな分子系計測 公募研究 川村グループ（横国大）の研究協力者である横浜国立大学の西川亮汰さん（修士課程 1 年）、同じく研究協力者の豊田修平さん（修士課程 1 年）が平成 26 年 6 月 25 日（水）から 27 日（金）までワークピア横浜/横浜産貿ホール マリネリアで開催された第 14 回 日本蛋白質科学会年会においてポスター賞を受賞されたことをご報告いたします。

西川さんは固体 NMR の ^{13}C スピン拡散法を利用した実験により、光センサー機能をもつフオボロドブシンの機能発現に重要な Tyr174 について、発色団レチナールとの相関ピークを巧みに観測しました。また、T204A 変異体の NMR 信号と比較すると、Tyr174 との水素結合が切断された影響でレチナールおよびその近傍に存在する Tyr174 の構造変化を観測し、基底状態でのレチナール-タンパク質間相互作用の重要性を示しました。この研究内容は A03 神取グループの連携研究者である須藤教授（岡山大）との共同研究で進めている内容です。

豊田さんはヒトカルシトニンのアミロイド線維立体構造について、固体 NMR および MD シミュレーションによる構造解析を行った内容を発表しました。まず、ヒトカルシトニンの特定のアミノ酸残基に ^{13}C と ^{15}N の安定同位体標識を施し、C-N 間の磁気双極子相互作用を利用することで原子間距離を決定できる回転エコ一二重共鳴 REDOR 法を用いて、試料が線維を形成した場合の分子間の距離情報を観測しました。その結果、中性条件では分子間で 1 残基離れた逆平行 β シート構造を形成していることを明らかにしました。それをもとにした MD シミュレーションの結果、この逆平行 β シート構造が最も安定な構造であることを示しました。

この賞は蛋白質科学にかかわる若手研究者を奨励することを目的としたポスター賞であり、年会当日の 2 分間のフラッシュトークとポスター会場での発表をもとにして、優秀な発表をした学生に与えられる賞です。当日はポスター会場全体で熱気あふれるディスカッションが繰り広げられておりました。その中で 95 件のポスター賞へのエントリーの中から 12 件のポスター賞が選ばれ、そのうちの 2 件に川村グループの学生が選出されました。

今回の 2 つの研究成果はいずれも固体 NMR 分光法の特長的な手法を利用した研究であり、これにより分子間相互作用を巧みに解析しました。この成果は生体分子をはじめとする柔らかな分子系を理解するための先端計測の発展につながることが期待されます。



第 14 回 日本蛋白質科学会でポスター賞を受賞した
西川さん（上）と豊田さん（下）