



業績紹介：ヘテロ二量体 ABC トランスポーター TM287/288 の構造ダイナミクス

古田 忠臣 (東工大・A01 公募研究協力者)
櫻井 実 (東工大・A01 公募研究代表者)

論文題目：" Structural Dynamics of the Heterodimeric ABC Transporter TM287/288 Induced by ATP and Substrate Binding"

著者 : Tadaomi Furuta, Yukiko Sato, and Minoru Sakurai
雑誌巻号 : *Biochemistry* 55, 6730-6738 (2016).

ABC (ATP-binding cassette) トランスポーターは、すべての生物に存在し、ATP の結合・加水分解エネルギーを用いて膜輸送を行う大きなスーパーファミリーの一つであり、その多剤耐性などから医学・薬学的にも大変注目されているターゲットである。その基本構造は、ATP 加水分解エンジンである 2 つの NBDs (nucleotide-binding domains) と基質輸送経路である 2 つの TMDs (transmembrane domains) からなる(図 1A)。その輸送サイクルは次の様な過程を経ると考えられている：内向き構造において、①基質を TMDs 内部に捕らえ、ATP が各 NBD に結合することに伴い NBDs が二量体化する。②この構造変化が TMDs へと伝播し、外向き構造への構造遷移に至る。③その後、基質が細胞外へと排出され、ATP 加水分解・ADP/Pi 解離に伴い元の内向き構造へと戻る。

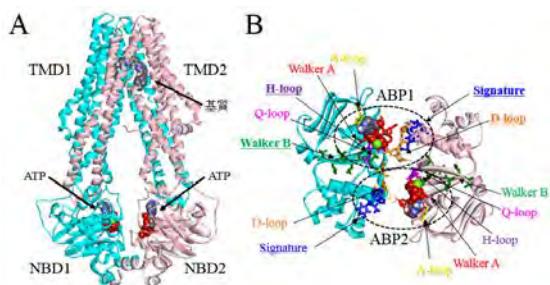


図 1. A: TM287/288 全体図, B: NBDs 内の ABPs (上から)

NBD 二量体には、保存されたモチーフからなる 2 つの ATP 結合ポケット(ATP-binding pockets, ABPs, 図 1B)があり、Sav1866 などホモ二量体 ABC トランスポーターでは双方が加水分解可能となっている。一方、TAP1/2 などヘテロ二量体 ABC トランスポーターでは、結合モチーフ(Walker B, H-loop, D-loop, Signature)の変異により片側のポケット(ABP1)が非加水分解型となっている。近年、Hohl らによりヘテロ二量体としては

はじめてとなる TM287/288 の結晶構造が解析された [1] (構造は、ABP1 に ATP アナログを結合した内向き構造であり、ここでは ATP アナログ→ATP 変換したものを 1ATP 状態と呼ぶ)。これまで、Sav1866, MsbA などホモ二量体の結晶構造や CFTR などヘテロ二量体のホモロジーモデル構造に基づくシミュレーション解析はあるものの、結晶構造に基づくヘテロ二量体のシミュレーション解析は未だない。そこで、本研究では、ヘテロ二量体 TM287/288 を対象として、ATP の各ポケットへの結合および基質結合に伴う構造ダイナミクスに関する分子シミュレーションを用いた解析を行った。

apo 状態と 1ATP 状態の比較の結果、1ATP 状態は安定なもの、apo 状態では NBDs 内の helical subdomain が近づき core subdomain が溶媒に露出した ATP 結合に適した構造が観測された。そこで本研究では、この得られた NBDs 構造を輸送サイクルにおける apo 状態での”Core-Exposed”モデルとして提案した(図 2)。

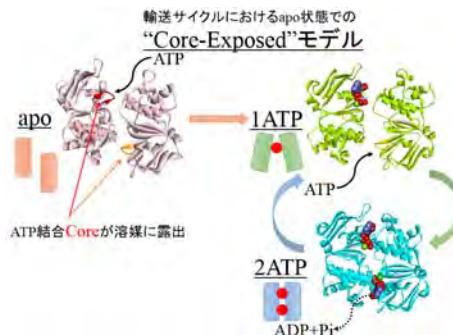


図 2. 輸送サイクルにおける“Core-Exposed”モデル

また、1ATP 状態、2ATP 状態、2ATP+S(基質)状態の比較の結果、1ATP 状態では ABP2 ポケット形成は見られないものの、ATP が 2 つある 2ATP や 2ATP+S の状態では実行した半数近くで ABP2 形成・NBD 二量体化が観測された。ATP が“分子糊”としての役割を果たしていると思われる。その他、2ATP 状態と 2ATP+S 状態の比較により、TMDs 部での基質結合がアロステリックに影響し、NBDs 部における ATP-Signature 間の距離分布確率が変化するといった面白い結果も得られた。本研究で得られた知見は、ABC トランスポーターの輸送サイクルに重要な洞察を提供するであろう。

引用文献

- [1] Hohl et al., *Nat. Struct. Mol. Biol.* 19, 395-402 (2012).



業績紹介：新しい環化重合による環状構造が集積したポリマーの合成

井原 栄治（愛媛大院理工・A03 公募研究代表者）

論文題目："Cyclopolymerization of Bis(diazocarbonyl) Compounds Leading to Well-Defined Polymers Essentially Consisting of Cyclic Constitutional Units"

著者 : Hiroaki Shimomoto, Misaki Kikuchi, Junya Aoyama, Dai Sakayoshi, Tomomichi Itoh, and Eiji Ihara*

雑誌巻号 : *Macromolecules* **49**, 8459-8465 (2016).

1 分子に 2 つの重合可能な官能基を持つ 2 官能性モノマーの重合を行うと、通常は 2 つの官能基が独立して重合することにより、架橋構造を形成しながら主鎖が 3 次元的に伸長して網目状の高分子が得られる。ジビニルベンゼンとスチレンのラジカル共重合による架橋ポリスチレンの合成はそのような 2 官能性モノマーの反応性を利用しておらず、この共重合により得られた溶媒に不溶な生成物は、高分子材料としてイオン交換樹脂を始めとする各種の用途に利用されている。

一方、2 官能性モノマーの 2 つの官能基の連続した分子内環化成長反応と分子間での通常の成長反応を交互に行わせることができれば、生成物は環状構造が主鎖中に組み込まれた構造を有する直鎖状のポリマーとなる。そのような、成長反応に環化を伴う重合は環化重合と呼ばれ、2 つの官能基の分子内での連続的な成長反応を有利にする分子設計や、分子間での架橋反応を抑制するための低濃度条件の設定といった工夫によって実現することができ、実際、各種のジビニル化合物の環化重合が報告されている（図 1 A）。そして、環化重合により得られるポリマーには、環状構造が主鎖の運動性を制限するためガラス転移温度が上昇するといった特徴が発現することから、高分子材料としての応用が可能となる。

我々は、独自に開発してきたジアゾ酢酸エステルの重合反応の応用として、1 分子内に 2 つのジアゾカルボニル基を導入した化合物をモノマーとする環化重合の実現を試みた（図 1 B）。ジアゾカルボニル基の重合では主鎖の炭素一炭素結合が 1 炭素ユニットから構築されるため、この環化重合で得られるポリマーは、その主鎖に無置換の CH₂ がまったく存在していない、すなわち主鎖のすべての炭素が環を形成するための分岐点になっているという、従来報告されてきた環化重合

体ではない、独特の構造的特徴を有することになる。

実際の重合では、2 つのジアゾカルボニル基を連結するリンカー部の構造がビナフチル（Bin）の場合には、希薄条件下での反応においても架橋反応を抑制することができなかった。しかしながら、そのリンカー部を *trans*-シクロヘキシル（Cy）や *o*-フェニレン（Ph）として、2 つのジアゾカルボニル基の空間配置が分子内環化成長反応に有利になるようにした結果、目的の環化重合が選択的に進行し、構造の明確な環化重合体を得ることに成功した。ここで得られた環状構造が集積した構造のポリマーには、各種イオンの捕捉材等への応用も期待できる。

既にジアゾ酢酸エステルの重合において、分子量の制御（NL No. 23 で報告）[1]、水酸基（NL No. 11）[2] やオキシエチレン鎖（NL No. 28）[3] を導入したモノマーの重合を報告している。今回の特徴的な環化重合体合成の成功によって、”官能基集積型機能性高分子”的開発のための新たな手段を確立することができた。

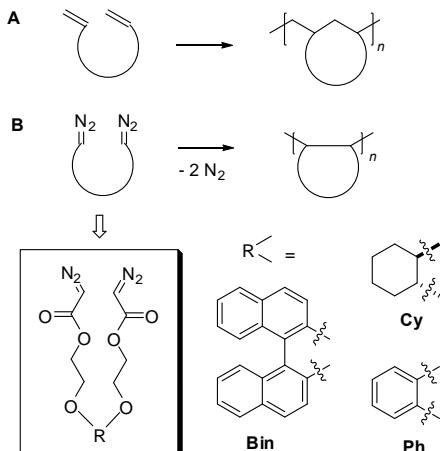


図 1 ジビニル化合物とビスジアゾカルボニル化合物の環化重合

引用文献

- [1] H. Shimomoto, E. Ihara et al., *Polymer Chemistry* **6**, 4709-4714 (2015).
- [2] H. Shimomoto, E. Ihara et al., *Macromolecules* **47**, 4169-4177 (2014).
- [3] H. Shimomoto, E. Ihara et al., *Polymer Chemistry* **6**, 8124-8131 (2015).



業績紹介：フォトクロミック分子の立体選択的光異性化反応 ～ベンゾホスホールオキシドの構造を活かした分子コンフォメーションの制御～

森本 正和（立教大理・A03 公募研究代表者）

論文題目："Diastereoselective photocyclization of a photochromic diarylethene having a benzo[*b*]phosphole *P*-oxide group"

著者：Tomohiro Ichikawa, Masakazu Morimoto, Masahiro Irie

雑誌巻号：*Dyes Pigm.* **137**, 214-220 (2017).

光により異性化反応を起こして可逆的に色を変化させるフォトクロミック分子は、分子科学の基礎のみならず、光メモリや光スイッチなどの光機能分子デバイスとしての応用の観点からも広く研究されている。ジアリールエテンは紫外光と可視光の照射により開環体と閉環体の間で異性化することで色変化するフォトクロミック分子である[1]。ジアリールエテン開環体においては 2 つのヘテロアリール環と中央のエテンとを結ぶ単結合の回転が可能であり、ジアリールエテンの機能を引き出すためには分子コンフォメーション変化（分子の柔らかさ）を巧みに制御することが重要である。著者らは、ジアリールエテンの新しい光機能を創出するための分子骨格としてベンゾホスホールオキシドに着目して研究を進めている[2]。本論文では、ジアリールエテン **1**（図 1）について、ベンゾホスホールオキシドの立体構造が分子コンフォメーションと光反応挙動に及ぼす影響を検討した。

開環体 **1a** においては、ベンゾホスホールオキシドとベンゾチオフェンの配向によって 4 種のコンフォマーが存在する。そのうち 2 つ（parallel 型）は光反応不活性であり、残りの 2 つ（anti-parallel 型）は光反応活性である。

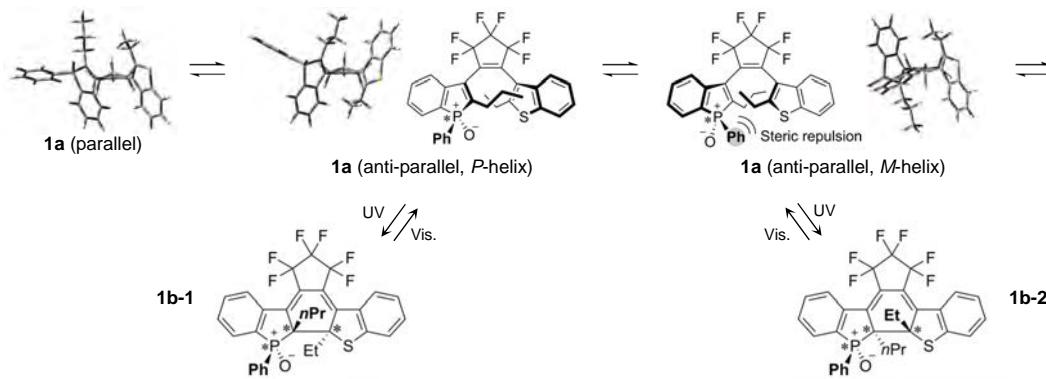
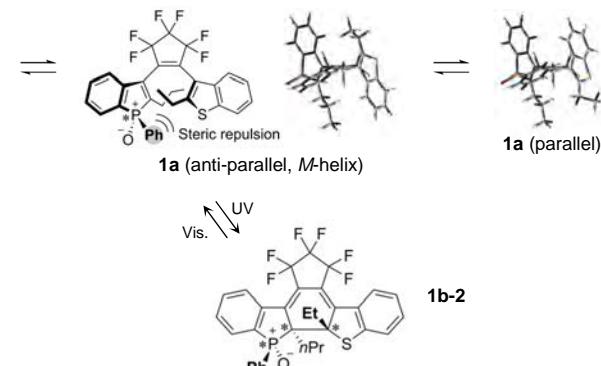


図 1 ベンゾホスホールオキシドを有するジアリールエテン **1** の光異性化反応

性である。開環体の anti-parallel 型コンフォマーにおいては、中央のヘキサトリエンが右巻きらせん（*P*-helix）になったものと左巻きらせんになったもの（*M*-helix）が存在する。ベンゾホスホールオキシドのリン原子は不斉中心であるため、*P*-helix と *M*-helix のコンフォマーが光閉環反応を起こすと、互いにジアステレオマーの関係にある閉環体（**1b-1** および **1b-2**）が生成する。開環体 **1a** の溶液に紫外光を照射したときの生成物を分析した結果、光反応の転換率が低い初期段階においては **1b-1** の方が **1b-2** よりも優先的に生成し、立体選択的光反応が起こることが分かった。これは、**1b-2** を与える *M*-helix コンフォマーはベンゾホスホールオキシドのリン原子上のフェニル基とベンゾチオフェンとの立体反発のために不安定であり、**1b-1** を与える *P*-helix コンフォマーの方が溶液中に多く存在するためであることが、量子化学計算により示唆された。また興味深いことに、紫外光の照射を続けて転換率が高くなると生成物の選択性が逆転し、**1b-2** の方が **1b-1** よりも多くなることを見出した。この立体選択性の逆転は閉環体ジアステレオマー **1b-1** と **1b-2** の間で逆反応（光閉環反応）の量子収率が異なるために起こることを明らかにした。ベンゾホスホールオキシドの構造によってフォトクロミック分子の柔らかさと光反応挙動を制御できることが示唆された。

引用文献

- [1] M. Irie, T. Fukaminato, K. Matsuda, S. Kobatake *Chem. Rev.* **114**, 12174-12277 (2014)
- [2] T. Ichikawa, M. Morimoto et al. *Dyes Pigm.* **126**, 186-193 (2016).





A01 北尾グループの TRAN P. Duy さんが 第 54 回日本生物物理学会年会において学生発表賞を受賞しました

北尾 彰朗（東大分生研・A01 計画研究代表者）

第 54 回日本生物物理学会年会が 2016 年 11 月 25～27 日、つくば国際会議場で開催され、東京大学新領域創成科学研究科メディカル情報生命専攻博士課程 3 年の TRAN Phuoc Duy さんのポスター発表 “Flexible-Body Protein-Protein Docking: an Application of Parallel Cascade Selection Molecular Dynamics” が、2016 年日本生物物理学会学生発表賞を受賞した。

この研究は、我々の研究室でこれまで開発してきた効率的な分子シミュレーション法である Parallel Cascade Molecular Dynamics (PaCS-MD) (ニュースレター 平成 27 年 11 月号参照) を更に発展させたものである。PaCS-MD は、並列に多数の独立な分子動力学計算を実行し、得られたトラジェクトリから初期構造を選択して新たな分子動力学を開始するというサイクルを繰り返すことで、立体構造空間を効率的にサンプリングすることができる分子シミュレーション法である。PaCS-MD が効率的である理由は、次のサイクルの初期構造として構造分布の端にあるまれなゆらぎを選択することによって、構造転移を飛躍的に起こりやすくしていることにある。これによって効率的な立体構造サンプリングを可能にし、通常の分子動力学では長時間のシミュレーションが必要な現象でも、短い実行時間で観察することを可能にする。この方法をうまく応用するには、どのようなまれなゆらぎを選択してサンプリングを効率化するのかをよく検討する必要がある。

TRAN さんは、既に PaCS-MD をタンパク質-低分子複合体の解離シミュレーションに応用し、得られたトラジェクトリをマルコフ状態モデル (Markov State Model, MSM) を用いて解析し、解離に伴う自由エネルギー変化を計算して、実験で得られる結合自由エネルギーとほぼ同じ値が得られることを示していた。通常のシミュレーション時間では、安定した複合体はなかなか解離しない。一方、バイアスを加えて無理に解離を起こそうとすると、そのストレスによって不自然な構造が生じ、エネルギーが高くなりすぎてしまうことが知られている。TRAN さんは分子間距離を指標に PaCS-MD でまれなゆらぎを選択していくことで、タンパク質と低分子を簡単に、しかもバイアスを与えることなしに解離させられることをすでに明らかにして

いた。受賞した研究で、TRAN さんはこの方法を更に 2 つのタンパク質、MDM2 と p53 の N 末端部位の複合体に応用し、解離過程を解析し、解離エネルギーが実験で得られた結合エネルギーとほぼ一致することをみいだした。TRAN さんは既に大きなタンパク質-タンパク質複合体でも解離シミュレーションに成功しており、この方法による解離自由エネルギー計算に広い応用の可能性があることが期待されている。

この研究では更に、PaCS-MD を MDM2 と p53 の結合シミュレーションにも応用して、その可能性を探ったところがもう 1 つの大きな進展である。結合予測を目指したシミュレーションでは、PaCS-MD を用いて結合・解離のサイクルを繰り返すことでターゲット結合部位をあらかじめ知らなくても、正しい結合サイトを探索できる可能性を示しており、今後の発展が期待される。今後もこの調子で頑張ってもらいたいと、TRAN さんの更なる飛躍に大いに期待している。





A01 北尾グループの佐藤千夏さんが

第 54 回日本生物物理学会年会において学生発表賞を受賞しました

北尾 彰朗 (東大分生研・A01 計画研究代表者)

第 54 回日本生物物理学会年会が 2016 年 11 月 25~27 日、つくば国際会議場で開催され、東京大学新領域創成科学研究科メディカル情報生命専攻修士課程 2 年の佐藤千夏さんのポスター発表 “Accurate and efficient protein-ligand docking method using all-atom molecular dynamics at high concentration of ligands” (「高濃度リガンド条件による蛋白質-リガンド結合部位および経路の効率的探索」) が、2016 年日本生物物理学学会学生発表賞を受賞した。

低分子化合物が蛋白質のどの部位にどのように結合するのかを計算で予測することは効果的な医薬品の開発に重要である。従来のドッキングプログラムの多くでは溶媒を露には考慮しない近似計算をおこなっているので、相互作用が正確に評価できない場合も多く、また結合経路に関する情報は得ることはできない。より正確に複合体構造を予測するためには、シミュレーションで取り扱うシステムに溶媒を露に含め、全原子モデルでシミュレーションを実行することが必要となる。しかし、蛋白質 1 分子に対しリガンド 1 分子の比でモデルを構築し、最適な結合部位を探査するには分子動力学シミュレーションを一回当たり最低でも 10 億ステップ程度、通常ではおそらく 100 億ステップ程度実行する必要があると予測される。この欠点を克服するために、佐藤さんはこの研究で、1 つの蛋白質に対し、リガンドを複数個配置した高濃度で計算を実行する方法を試みた。

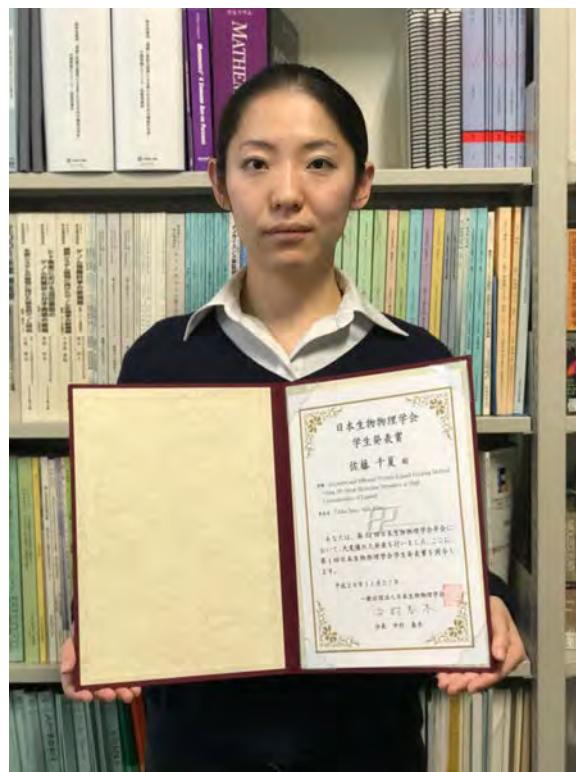
しかし、単にリガンドの濃度を上げてシミュレーションを実行すると、リガンド同士が強く相互作用してクラスターを作ってしまうことがある。佐藤さんが開発したシミュレーション法では、リガンド同士が接近することによるサンプリング効率低下を防ぐため、リガンドの重心同士にのみ働く反発力を加えて、リガンド同士が近づき過ぎないようにした。これにより、蛋白質表面とリガンドが相互作用する可能性がより均等になり、様々な表面と相互作用する機会を増やすことができた。最初のテストケースでは、リガンド 32 分子配置した比較的低濃度の条件 (~60 mM) では 100 ns の計算時間で結合部位予測が出来なかったのに対し、リガンド 64 分子 (~120 mM) 配置した高濃度条件ではリガンドが結合する様子を確認でき、リガンドが結合

した蛋白質残基の割合から蛋白質のリガンド結合部位を予測することが出来た。この予測計算は 100ns (5000 万ステップ) と短い時間で行えるため、リガンドの初期配置が異なる 10 セットを計算し、結合部位予測にはこれらの平均を用いることで、信頼度の高い結果を得ることができた。

佐藤さんは更に、この結合予測部位に結合するリガンドを抽出してクラスタリングを行うことで結合構造予測も行い、結晶構造と近い複合体構造を得ることに成功した。また、結合予測部位に結合するリガンドの結合経路を複数解析することで、典型的な一過性結合部位や特定の結合経路についても明らかにした。

この研究で、3 種類の蛋白質-リガンド複合体に対して結合予測を行い、それぞれにおいて結晶構造に近い結合構造と様々な結合経路を短時間の分子動力学シミュレーションで特定することに成功した。

佐藤さんは、3 月の修士修了後に就職する予定だが、今回の経験を活かして、今後も活躍してほしいと願っている。





A01 林グループの金曾将弘さんが 第 54 回日本生物物理学会年会において学生発表賞を受賞しました

林 重彦（京大院理・A01 計画班、研究代表者）

本領域 A01 班の林グループの大学院生である金曾将弘さん（修士課程一回生）が、平成 26 年 11 月 25 日より行われた第 54 回日本生物物理学会年会において、学生発表賞を受賞したことを報告する。

受賞した発表のタイトルは、「HIV-1 protease の触媒的加水分解反応に関する理論的研究」である。HIV-1 protease は、HIV-1 ウィルスの感染時に、ウィルスの遺伝子により合成された未成熟段階のポリタンパク質を切断することにより、ウィルスの成熟化を行う。このペプチド切断機能を阻害することによりウィルス感染が抑止できるため、HIV-1 protease は AIDS 治療の標的タンパク質となっている。現在、治療に用いられている薬剤分子の多くは、ペプチド切断反応の予期される遷移状態を模した遷移状態アナログ分子である。

しかしながら、HIV-1 ウィルスの活発な変異体生成が引き起こす薬剤耐性が深刻な問題となっている。この薬剤耐性は、分子論的には、変位導入による阻害剤の結合能の低下が、酵素活性の低下、すなわち天然基質分子の遷移状態の結合能の低下を大きく上回ることであると理解される。従って、このような薬剤耐性の分子機構を理解するためには、酵素反応の遷移状態の構造と相互作用を正確に描き出す必要がある。

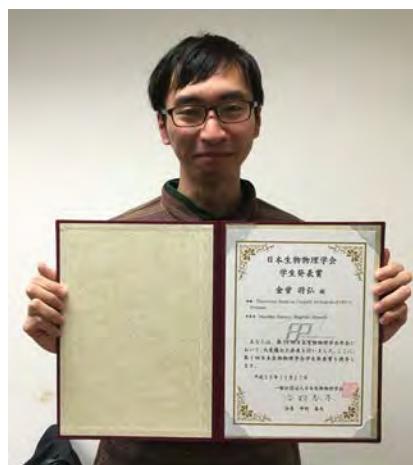
金曾さんは、HIV-1 protease の酵素活性及びその薬剤耐性の分子機構に対して、分子シミュレーションを用いた研究を行っている。その研究を進める上で、次の点が克服すべき問題となる。まず、このタンパク質はホモ二量体であり、活性部位はそのインターフェースに存在する。また、天然基質分子の解離定数は非常に大きいことが実験で示唆されている。従って、反応遷移状態生成の際に、基質分子及びタンパク質の大きな構造変化が伴うことが予想される。また、薬剤耐性の解析には変異体の正確なモデリングが必要となる。

そこで、金曾さんの研究では、我々の研究室で開発しているハイブリッド分子シミュレーション法である QM/MM RWFE-SCF 法を用いて、酵素反応機構の解析を進めている。この手法は、反応部位を記述する精度の良い量子化学的手法と長時間のタンパク質の分子動力学シミュレーションを組み合わせることを可能に

し、上記の問題が克服されると期待される。

金曾さんは、まず、酵素活性に関わる二つのカルボン酸側鎖のプロトン化状態を調べるために、異なるプロトン化状態のタンパク質系に対して分子動力学計算を行い、それらの安定性を検討した。そこで得られた安定な構造を保つプロトン化状態の系に対して、タンパク質の構造変化を十分取り込むことが出来ない従来の QM/MM ハイブリッド法により、反応エネルギープロファイルを見積もった。その結果、反応障壁は、実験値より非常に高く見積もられた。これは、遷移状態生成に大きなタンパク質構造変化が伴っていることを強く示唆している。現在、金曾さんは、得られた反応遷移状態に近い中間体の構造を出発点として、QM/MM RWFE-SCF 法を用いて自由エネルギー構造最適化を行っている。現時点で、構造最適化サイクルが 2 マイクロ秒を超えて継続中であり、反応に伴い大きな構造変化が引き起こされていることが明らかになっている。

実は、金曾さんが当学生発表賞に応募したことは、私は全くもって閑知していなかった（私はボーッとしていたが、当領域でもお世話になった元研究員の長谷川さんに勧めら（唆さ）れたらしい）。実際に、研究はまだ道半ばである。今回の受賞は、今後の研究の発展を叱咤激励された、ということであろう。私も今後の発展に期待するところである。





A01 櫻井グループのクライヤー篠塚一帆君が 第 54 回日本生物物理学会年会において学生発表賞を受賞しました

櫻井 実（東工大バイオセンター・A01 公募班）

A01 柔らかな分子系解析 公募研究 櫻井研究室に所属する東京工業大学生命理工学院のクライヤー篠塚一帆君(修士課程 1 年)が、平成 28 年 11 月 25 日(金)から 27 日(日) の期間に、つくば国際会議場で開催された第 54 回日本生物物理学会年会 (The 54th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan) において、学生発表賞を受賞したことをご報告いたします。

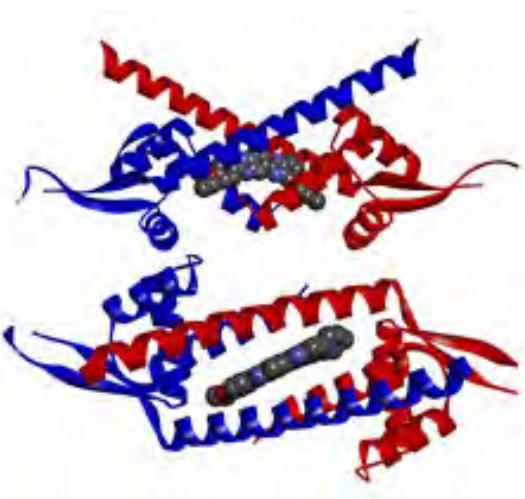
クライヤー君の発表内容は、乳酸菌 *Lactococcus lactis* のもつ多剤認識転写因子 Lactococcal murtidrug resistance Regulator (LmrR) における薬剤認識機構の計算化学的解析です。

LmrR は多剤排出トランスポーター LmrCD の発現を抑制する転写因子であり、菌体内に現れた薬剤分子を認識・結合することで DNA から解離し、下流の多剤排出トランスポーターを発現させます。つまり、LmrR は *L.lactis* における薬剤分子のセンサーおよび多剤耐性発現のスイッチのような役割を果たしています。

LmrR は結晶構造から、1 つの化合物結合サイトが柔軟に構造変化することで複数種類の薬剤分子を認識していること、また ITC 測定から、薬剤認識過程がエントロピー支配的に行われていると予想されていましたが詳細は不明でした。そこで、クライヤー君は、このエントロピー支配的な薬剤認識のメカニズムを調べるために、分子動力学シミュレーションを LmrR に対して行い、薬剤分子結合に伴うダイナミクスの変化を観測しました。

その結果、LmrR では薬剤分子の結合に伴いタンパク質の增加しており、それが構造の自由度の増加としてエントロピー的に薬剤結合に寄与を果たしていることがわかりました。また、薬剤分子種に関わらず共通して增加した部位を調べた結果、薬剤分子と直接相互作用する部位のみならず、薬剤分子から距離的に離れた DNA 結合サイトにおいてもアロステリックに增加が起こっていることが分かりました。この DNA 結合サイトでの增加は LmrR と DNA との相互作用を弱め、DNA からの解離を誘起すると考えられます。つまり、LmrR は(i)薬剤分子との結合、(ii)DNA からの解離という 2 つの機能を持つ

ていますが、そのいずれにおいてもタンパク質の構造は安定化する』という一見常識のような考え方ですが、必ずしもすべてのタンパク質に通用するわけではない。このことを示唆してくれた LmrR は、非常に興味深いタンパク質であると思います。クライヤー君も今回の受賞を弾みに、今後の研究もがんばってくれるものと期待します。



LmrR の構造



第 54 回日本生物物理学会で学生発表賞を受賞した
クライヤー篠塚一帆君



A01 高田グループの清水将裕さんが 第 54 回日本生物物理学会年会において学生発表賞を受賞しました

高田 彰二 (京大院理・A01 公募班第 1 期研究代表者)

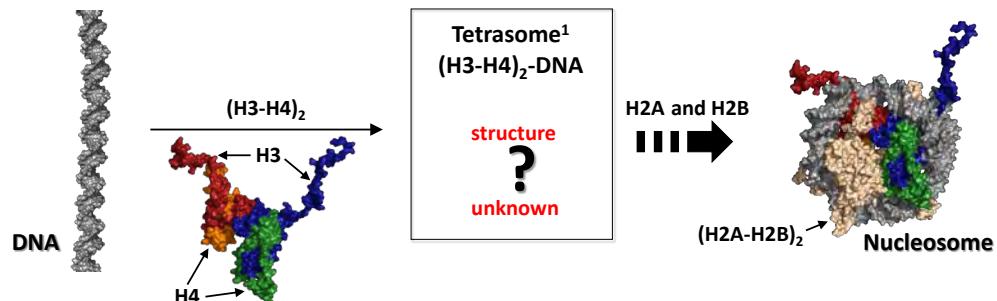
柔らかな分子系 A01 班 高田グループの博士課程大学院生の清水将裕さんが、2016 年 11 月 24 日～26 日に行われた第 54 回日本生物物理学会年会に新設された学生発表賞を受賞しました。

清水君の発表演題は、Structural modeling of the subnucleosome using coarse-grained molecular dynamics simulations (粗視化分子動力学計算によるサブヌクレオソームの構造解析) です。まず、ヌクレオソームは、真核生物のゲノムを高度に集積するために使われている糸巻きのような構造で、ゲノム高次構造の基本的なユニットです。通常安定なヌクレオソームは、ヒストン 8 量体の周りに約 150 塩基対の DNA が巻き付いて安定な構造体になっています。ヌクレオソームの代謝（分解、再構成）の過程で、中間体としてさまざまな部分構造をとるものと考えられていますが、その構造、自己組織化の経路など、未解明の点が多い問題です。これらヌクレオソーム形成途中の部分構造をここでは、サブヌクレオソームと呼んでいます。

サブヌクレオソームのなかで、最初に形成されるものは、ヒストン H3, H4 を 2 分子ずつ含んだヒストン 4 量体に DNA が結合したテトラソームと考えられています。清水君は、当研究室で開発中の粗視化分子シミュレーションソフトウェア CafeMol を用いて、テトラソームの構造動態についてシミュレーションを行いました。粗視化シミュレーションの結果は、テトラソームは特徴的な大きさ、複合体に含まれる DNA の塩基対数をもち、ある程度安定な複合体構造をとること

を示唆しています。通常のヌクレオソームに比べたはるかに柔らかく、ゆらぐ分子であるため、現在のところ実験的知見が限られており、今後、清水君のシミュレーション構造を

ヒントに実験的構造解析が進むことを期待しています。





A02 高橋グループの斎藤雅崇君が 第 54 回日本生物物理学会年会において学生発表賞を受賞しました

小井川 浩之（東北大多元研・A02 計画研究連携研究者）

高橋 聰（東北大多元研・A02 計画研究代表者）

A02 柔らかな分子系計測班（計画研究）高橋聰研究室（東北大学多元研物質科学研究所）に所属する斎藤雅崇君（博士後期課程 3 年生）は、平成 28 年 11 月 25-27 日につくば国際会議場で開催された第 54 回日本生物物理学会年会において学生発表賞を受賞しました。以下に研究内容を紹介します。

“Significant Heterogeneity and Slow Dynamics of the Unfolded Ubiquitin Detected by Single-Molecule Fluorescence Spectroscopy”

Masataka Saito, Kamonprasertsuk Supawich, Keiichiro Kushiro, Madoka Takai, Eric H.-L. Chen, Po-Ting Chen, Rita P.-Y. Chen, Hiroyuki Oikawa, Satoshi Takahashi

この発表において、斎藤君は一分子蛍光分光法を用いて、ユビキチンのフォールディング転移を調べました。ユビキチンは、バルクレベルの計測では、二状態的なフォールディング転移を示すとされるタンパク質です。本研究では、ユビキチンに蛍光色素を二重ラベル化した試料について、ラインフォーカス型の共焦点顕微鏡を用いて一分子観測を行いました。

本実験にあたり、一分子観測したデータの再現性を得るための試行錯誤が長く続きました。最終的に、装置の流路の内表面のコーティングに MPC ポリマーを用いることで、再現性の高い一分子データの観測が初めて可能になりました。得られたデータは、ユビキチンの変性状態の構造が不均一であること、また、異なる構造間の転移が、ミリ秒以上のゆっくりとした時間領域で起こることなどを示しました。すなわち、これまでの常識と大きく異なり、ユビキチンの変性状態が大変不均一であることを示します（以上は論文発表を行い、当ニュースレターにも報告しました）。

斎藤君はさらに、ミリ秒以内に二液を混合できる高速溶液混合装置を開発し、ラインフォーカス型の一分子蛍光観察法と組み合わせることで、変性状態にある

ユビキチンについて、溶液混合直後に引き起こされるフォールディング運動の一分子観察を行いました。

これまでの一分子測定は、さまざまな変性剤濃度の溶液中において平衡状態にある試料を対象としていました。しかし、そのような観測では、折り畳んだ状態と変性した状態の間のジャンプの過程を直接観察することが困難でした。そのため、あらかじめ変性状態にあるタンパク質試料を用意し、試料溶液の変性剤濃度を急激に低下させることで、フォールディングする瞬間を観察することを狙いました。

得られたデータは、変性状態の不均一性を維持したままユビキチンがフォールディング転移を示すことを示唆しています。また、変性状態の平均的な構造が、溶液混合の直後に収縮することも示しました。一方で、明らかにフォールディング転移を観察したと言えるデータは得られておらず、今後のさらなるデータの蓄積が必要です。

一分子蛍光観察と溶液混合を引き金とした速度論実験を行うことで、フォールディング転移の不均一性と協同性がどのように両立するのか、明らかになると期待されます。





A02 高橋グループの伊藤優志君が 第 54 回日本生物物理学会年会において学生発表賞を受賞しました

鎌形 清人（東北大多元研・A02 計画研究連携研究者）
高橋 聰（東北大多元研・A02 計画研究代表者）

A02 柔らかな分子系計測班（計画研究）高橋聰研究室（東北大学多元研物質科学研究所）に所属する伊藤優志君（博士後期課程 2 年生）が、平成 28 年 11 月 25-27 日に、つくば国際会議場（茨城県つくば市）で開催された第 54 回日本生物物理学会年会において学生発表賞を受賞したことを報告します。発表の内容は以下の通りです。

“Ultrafast intersegmental transfer of a tumor suppressor p53 investigated by ensemble and single-molecule measurements”

Yuji Itoh, Agato Murata, Satoshi Takahashi and Kiyoto Kamagata

p53 は、DNA の標的配列に結合する転写因子です。標的 DNA への結合が阻害された p53 の変異体は、しばしば細胞のがん化を引き起こすことが知られています。そのため、p53 はがん抑制タンパク質とも呼ばれます。私達の研究室では、p53 が非特異的な配列の DNA に結合し、その上をスライディングする運動を調べてきました。本研究では、p53 による新しい標的配列の探索運動として、DNA のある部位から別の部位へ乗り移る “セグメント間移動” について、現象の有無の検証と分子機構の解明を目的としました。

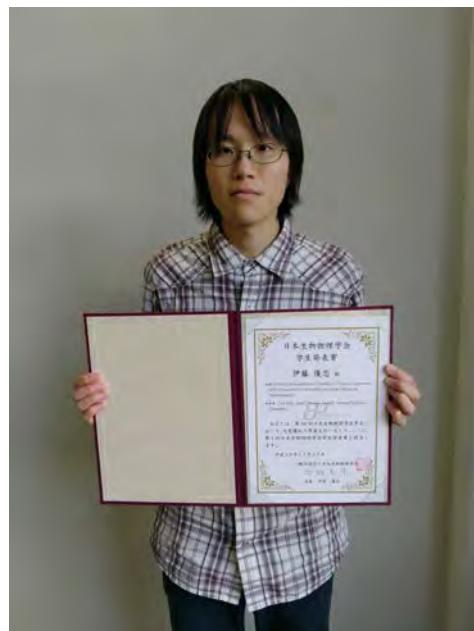
伊藤君は、始めに蛍光異方性をプローブとしたストップフロー装置を用い、蛍光色素で修飾した非標的 DNA に結合させた p53 を、過剰量の無標識の標的 DNA と混合することで、p53 が非標的 DNA から外れる過程を観測しました。このときの解離速度定数は、無標識 DNA の濃度に比例することがわかりました。これは、p53 が標識 DNA から非標識 DNA に直接乗り移っていることを示唆します。さらに、濃度依存性を解析することで、p53 は拡散律速に近い速度で非標的 DNA から別の DNA へのセグメント間移動を起こすことがわかりました。一方で、標的 DNA からのセ

グメント間移動は観測されませんでした。

次に、p53 が持つ 2 つの DNA 結合ドメインであるコアドメインと C 末ドメインのどちらかを欠損させた変異体を作成し、同様の実験を行いました。その結果、天然変性領域である C 末ドメインが、p53 のセグメント間移動を可能にすることがわかりました。

さらに、二本の DNA が十字に交差するように、DNA の両末端だけを光学基板上に固定化する方法を開発し、単分子レベルでの p53 のスライディング運動の観察を行いました。得られたデータの中に、p53 が DNA の交差部分でスライディング運動の方向を変える場合があることを観察しました。これにより、p53 のセグメント間移動が直接観察されたことになります。

以上のデータから、p53 は柔らかな C 末ドメインを使って二本の DNA 間でのセグメント間移動を行うことが明らかになりました。細胞内は混雑しているため、p53 は DNA 上の障害物を避けながら標的配列を探す必要があります。本研究で明らかになった超高速セグメント間移動により、p53 は DNA 上の障害物を回避し、効率的な標的配列の探索を行うと考えられます。





A02 高橋グループの Dwiky Rendra Graha Subekti 君が 第 54 回日本生物物理学会年会において学生発表賞を受賞しました

鎌形 清人（東北大多元研・A02 計画研究連携研究者）
高橋 聰（東北大多元研・A02 計画研究代表者）

A02 柔らかな分子系計測班（計画研究）高橋聰研究室（東北大学多元研物質科学研究所）に所属する Dwiky Rendra Graha Subekti 君（博士前期課程 2 年生）が、平成 28 年 11 月 25–27 日に、つくば国際会議場（茨城県つくば市）で開催された第 54 回日本生物物理学会年会において学生発表賞を受賞したことを報告します。発表の内容は以下の通りです。

“Elongation of Intrinsically Disordered Linker in p53 and the Effects on DNA Binding and Sliding Ability”

Dwiky Rendra Graha Subekti, Agato Murata, Yuji Itoh, Satoshi Takahashi, and Kiyoto Kamagata

p53 は、細胞に対するストレス等に応答し、DNA の標的配列に結合することで、細胞周期停止、DNA の修復、アポトーシスなどを制御し、細胞のがん化を防ぐ蛋白質です。p53 の標的 DNA への結合が阻害されると細胞のがん化することから、p53 の DNA への結合や DNA 上のスライディング運動は生物学的に重要な反応の 1 つです。p53 は 4 量体構造を持ち、それぞれのモノマーはさらに、DNA に特異的に結合するコアドメイン、揺らいだリンカードメイン、4 量体化ドメイン、DNA に非特異的に結合するための C 末端ドメインにより構成されます。そのため、p53 は 4 個のコアドメインがリンカーにより 4 量体化ドメインに繋がったクモのような形状を持ちます。本研究では、p53 の “柔らかな” リンカーの長さと電荷に着目し、それらが p53 の DNA への結合や DNA 上のスライディング運動に与える影響を明らかにすることを目的としました。

Subekti 君は、1、2、3 倍の長さのリンカーを持つ p53 の変異体、さらに、リンカーの電荷をゼロにした変異体を作成しました。次に、蛍光異方性をプローブとした自動滴定装置を用いて、それぞれの p53 変異体

について、標的 DNA や非標的 DNA への結合を調べました。その結果、どの p53 変異体も標的 DNA と同程度の結合定数を示したのに対し、リンカーの電荷が多い変異体ほど非標的 DNA と強く結合することが明らかとなりました。次に、単分子蛍光顕微鏡を用いて、蛍光色素を修飾した p53 変異体が DNA 上をスライディングする運動を観測しました。その結果、リンカーの電荷が多い変異体ほど遅くスライディング運動をすることが分かりました。一方で、リンカーの長さに関しては、結合定数についてもスライディングの拡散定数にしても、明らかな相関はありませんでした。

これまでの研究から、p53 のリンカー部分の役割として、細胞質から核への移行や他のタンパク質との結合などが知られていました。本研究は、このリンカー部分が非特異的な DNA と直接相互作用し、p53 の DNA への結合や DNA 上のスライディング運動に関与することを明らかにしました。本研究で得られた知見は、リンカーを含む蛋白質の機能のデザインなどに応用できると期待されます。





A02 高橋グループの御子柴直紀君が

第 54 回日本生物物理学会年会において学生発表賞を受賞しました

小井川 浩之（東北大多元研・A02 計画研究連携研究者）

高橋 聰（東北大多元研・A02 計画研究代表者）

A02 柔らかな分子系計測班（計画研究）高橋聰研究室（東北大多元研物質科学研究所）に所属する御子柴直紀君（博士前期課程 2 年生）が、平成 28 年 11 月 25-27 日につくば国際会議場で開催された第 54 回日本生物物理学会年会において、学生発表賞を受賞しました。以下に研究内容を紹介します。

“Construction of Fluorescent Phages Based on Split GFP for the Phage Sorting Technique”

Naoki Mikoshiba, Yuki Shimizu, Rie Kiriguchi, Seiji Sakamoto, Hiroyuki Oikawa, Kiyoto Kamagata, Takehiko Wada, Satoshi Takahashi

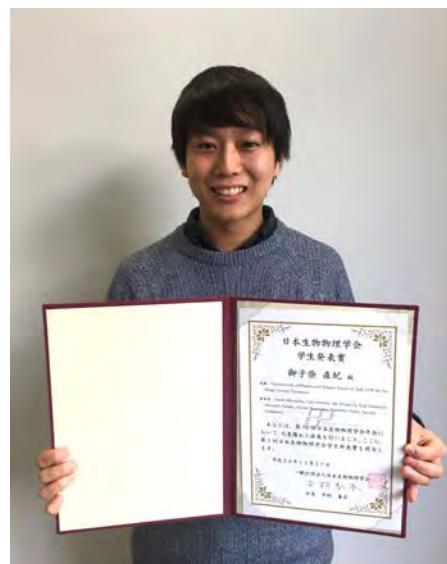
御子柴君の研究では、ファージディスプレイ法を応用した新しいタンパク質のデザイン方法として、ファージ表面に蛍光タンパク質を発現させ、当研究室で開発した蛍光ファージソーターにより、目的の発光特性を持つファージのみを選別する手法の開発を目指しています。特に、ファージ表面に GFP を提示し、ファージソーターで一粒子蛍光検出が可能なファージを開発することを目的としました。

御子柴君の研究では、M13 ファージを使用しました。M13 ファージはファージディスプレイ法においてよく使用される纖維状ファージであり、外殻タンパク質である g3p、または g8p のどちらかに、低分子量のタンパク質やペプチドを融合させて提示することができます。GFP の全長はファージに提示させるには長すぎるため、分割型 GFP の C 末端側 16 残基の断片を提示し、後で残りの N 末端断片と混合することで、GFP ファージを作製しました。

最初に作製したファージは g3p に GFP C 末端断片を提示していました。しかし、g3p は一ファージあたり 5 分子しかないように、このファージの蛍光強度が非常に弱く、ファージソーターで十分な強度の信号を検出することができませんでした。そこで次に、提示

場所として使用できるもう一つの外殻タンパク質 g8p に GFP の C 末端断片を提示したファージを作製することを考えました。g8p はファージ一粒子あたり約 2700 分子存在しますが、その全てに C 末端断片を提示してしまうと、大腸菌によるファージ構築に問題が生じるため、適度な割合の g8p に提示されるように、ヘルパーファージを使用した方法を導入しました。この手法を導入することで、一ファージ当たり数百分子の GFP 提示させることに成功し、十分に強く発光するファージを作製できました。作製したファージが、ファージソーターで観察可能であることを確かめました。

また、作製した蛍光ファージを評価する過程で、ファージに提示された GFP の C 末端断片と混合する N 末端断片とが再構成され蛍光を発するまでの時間が g8p に発現した場合と g3p に発現した場合とで大きく異なっていることがわかりました。このことはこの再構成反応が、C 末端断片が融合しているタンパク質の種類や、C 末端断片と融合タンパク質間のリンカーの配列や長さに大きく影響されることを示しています。今後、C 末端断片やリンカーをランダム変異させたファージライブラリーを作り、より速く再構成反応が終了するようなファージを選別する実験を行いたいと考えています。





A02 川村グループの金田志穂さんが 第 54 回日本生物物理学会年会において学生発表賞を受賞しました

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（横浜国立大学）の研究協力者である横浜国立大学 大学院工学府の金田志穂さん（博士課程前期 2 年）が、平成 28 年 11 月 25 日（金）から 27 日（日）の期間に、つくば国際会議場で開催された第 54 回 日本生物物理学会年会において、今年から新設された第 1 回の学生発表賞を受賞されたことをご報告いたします。

日本生物物理学会で取り扱っている研究分野は蛋白質の構造・物性、核酸結合蛋白質、細胞生物学、計測、膜タンパク質、生体膜・人工膜、バイオエンジニアリングなどを広く網羅しており、今回の第 54 回年会では 34 のシンポジウム、937 件のポスター発表を通して、活発な議論が行われました。

金田さんの発表タイトルは、”カチオン性抗菌ペプチド ボンビニン H2 および H4 のリーシュマニア原虫模倣膜との特異的な相互作用”です。固体 NMR 分光法は試料状態に依存することが少なく、細胞膜中に存在する生体分子であっても NMR 測定が可能であるという長所があります。金田さんの研究では特に ^{31}P 固体 NMR を駆使して、ペプチドの抗菌性メカニズムを解析しました。

ボンビニン H2 および H4 はキバラスズガエル *Bombina variegata* の皮膚分泌物に含まれるカチオン性の抗菌性ペプチドであり、世界保健機関 WHO 指定の深刻な感染症のひとつであるリーシュマニア症の原虫をはじめとして、幅広く抗菌性を示し、ほとんどのケースで H2 よりも H4 が強い活性を示すことが報告され、特にリーシュマニア症の治療薬として期待されています⁽¹⁾。しかしながら、これらのペプチドがなぜ抗菌活性を示すのか、また、たった 1 アミノ酸残基の立体異性の違いによってなぜ活性が変化するのか、その理由は解明されていません。金田さんは、 ^{31}P 固体 NMR を用いて、リーシュマニア症原虫模倣膜に対するボンビニンの作用を調べることで、抗菌メカニズムを解析しました。リーシュマニア原虫模倣膜は DOPC, DOPE, DOPI, DOPS、エルゴステロールなどの混合脂質であり、ペプチドと脂質の比率を変化させた ^{31}P 固体 NMR

測定を行いました。その結果、ボンビニン H2 および H4 はリーシュマニア原虫模倣膜に対して濃度依存的な膜分断能を持つことが明らかとなりました。さらに、エルゴステロールを含まないリーシュマニア原虫模倣膜を調製し、高いペプチド濃度であるにもかかわらず、 ^{31}P NMR の膜分断ピークの割合が大幅に減少しました。これより、ボンビニン H2 および H4 はリーシュマニア原虫模倣膜中でエルゴステロールに対して選択的に相互作用をし、抗菌活性を示していることが示唆されました。

日本生物物理学会では優れた研究内容と発表を行った学生に対して学生発表賞を授与しており、金田さんが行ったショートプレゼンテーションとポスター発表により、優秀な発表と認められ、学生発表賞を受賞されました。今後の益々の研究の発展が期待されます。

引用文献

- (1) M. L. Mangoni, *Current Protein and Peptide Science*, 13, 734-743 (2013).



写真：日本生物物理学会の学生発表賞を受賞した金田志穂さんと本研究に使用した 600 MHz 固体 NMR 分光計



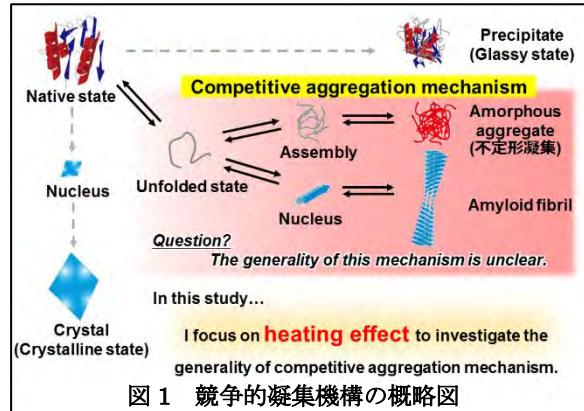
A02 後藤グループの足立誠幸さんが

第 54 回日本生物物理学会年会において学生発表賞を受賞しました

足立 誠幸(阪大・蛋白研・構造形成研究室 D2)
後藤 祐児(阪大・A02 公募研究代表者)

2016 年 11 月に開催された第 54 回日本生物物理学会年会において、後藤グループ(A02 公募研究)の足立(博士課程 2 年)が学生発表賞を受賞しました。発表の題目は「競争的凝集形成機構に基づいた蛋白質異常凝集の理解」です。研究内容の概要を以下に紹介いたします。

「ゆで卵」は生卵に熱を加え固まることでできることが知られているように、”蛋白質が凝集する”性質は私たちの生活に密接に関係しています。近年、蛋白質の凝集が体内に蓄積することが原因の疾患(アルツハイマー病、パーキンソン病、白内障など)が発見されてきました⁽¹⁾。そして、数多くの蛋白質の凝集に関する研究により、凝集体は秩序だった構造のアミロイド線維と、アモルファス(不定形)凝集の 2 種類が存在することが明らかとなりました。しかし、これらの凝集体がお互いにどのような関係で形成されるのかについては不明瞭です。我々は以前



に、「透析アミロイドーシス」と呼ばれる疾患の原因となる β_2 -ミクログロブリン(β_2 m)を用いて、凝集機構に関する実験を行いました。その結果、蛋白質の溶解度が重要な因子となり、結晶性を持つアミロイド線維とガラス性のアモルファス凝集が塩濃度に依存して競争的に生じることを報告しました⁽²⁾。しかし、このような競争的機構の一般性は不明であり凝集形成に関する理解を確立するためにはさらなる研究が必要です(図 1)。

そこで、我々は「温度」に着目しました。蛋白質の凝集は温度上昇により加速します。これは高温状態

では蛋白質の変性が引き起こされ、疎水性相互作用が強まるためであると考えられています。そこで、塩濃度に依存した実験を発展させ、温度についても同様の実験を行えば、競争的機構の普遍性を検証できると考えました。本研究では特に、”昇温速度”に着目しました。つまり、昇温速度が速いと急激に蛋白質間相互作用が強まり、乱雑な凝集(アモルファス凝集)が形成し、一方で、徐々に昇温すると、規則正しい構造の凝集(アミロイド線維)が形成することが予測されます。

これまでの研究で用いてきた β_2 m について、凝集形成に対する昇温の効果を蛍光測定によって調べました。その結果、急激に昇温(3°C/min 以上)することで、アモルファス凝集が先行して形成されました。その後、高温で形成されたアモルファス凝集は溶解し、アミロイド線維への変化が観察されました。一方で、昇温速度を低速(~3°C/min)にすると、アモルファス凝集の形成は見られず、アミロイド線維のみが形成されました。そして、さらに高温(80°C 以上)で形成されたアミロイド線維は崩壊する変化が観察されました。

以上の結果より、凝集形成に対する昇温の効果として、①急激な温度上昇は蛋白質間相互作用を著しく強め、アモルファス凝集を形成すること、②高温ではアモルファス凝集を溶解し、アミロイド線維を安定化すること、③さらに高温では、アミロイド線維も溶解することの 3 つが考えられました。従って、昇温によつてもアミロイド線維とアモルファス凝集の形成は競争的であることが示唆されました。



【引用文献】

1. Chiti, F., and Dobson, C. M. (2006) *Annu Rev Biochem* **75**, 333-366
2. Adachi, M., So, M., Sakurai, K., Kardos, J., and Goto, Y. (2015) *J Biol Chem* **290**, 18134-18145



A03 神取グループの伊藤獎太さんが 第 54 回日本生物物理学会年会において学生発表賞を受賞しました

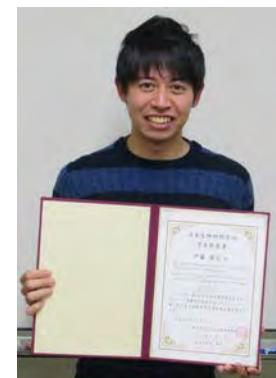
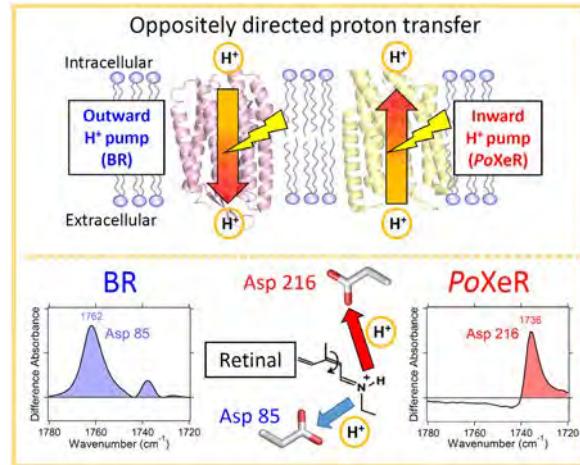
神取 秀樹 (名工大・A03 計画研究代表者)

A03 計画班神取グループ (名工大) 研究協力者の伊藤獎太さん (D3) が、平成 28 年 11 月 25 日 (金) から 27 日 (日) まで筑波で開催された第 54 回日本生物物理学会年会にて学生発表賞を受賞しました。

伊藤さんの研究は、「光駆動内向きプロトンポンプの赤外分光法による輸送機構解析」です。1970 年代から構造生物学・分光学・理論計算などにより、これまでに最も研究の進んでいるタンパク質の一つである光駆動外向きプロトンポンプ BR とは対照的に、内向きプロトンポンプは生物にとって ATP 合成に必要なプロトン濃度勾配を解消する方向にプロトンを輸送してしまうために存在しないと考えられてきました。しかし我々のグループは A02 内橋グループとともに 2016 年に内向きプロトンポンプ PoXeR を論文発表し、その分子機構を明らかにしつつあります。この中で伊藤さんは低温トラップ光誘起赤外分光測定と部位特異的アミノ酸変異体を組み合わせ、内向きプロトンポンプのプロトン輸送経路と発色団レチナールの異性化機構を明らかにしました。外向きプロトンポンプ BR では、プロトン化レチナールシップ塩基のプロトンが光異性化後、細胞外側の Asp85 に輸送され、さらにその後細胞質側から再プロトン化されることで、外向きへのプロトン輸送を実現しています。一方、内向きプロトンポンプ PoXeR ではプロトン化レチナールシップ塩基

は同様に光異性化するものの、そのプロトンは細胞質側の Asp216 に輸送されており、細胞外側から再プロトン化が起こることが赤外分光測定の結果より明らかになりました。さらに、再プロトン化の過程において、レチナールが 13-cis, 15-syn の異性化状態をとることでプロトン受容基を細胞外側へと配置し、再プロトン化を可能にしているのではないかと結論付けました。BR と PoXeR では、同様にプロトン化レチナールシップ塩基のプロトンがポンプされるのにも関わらず、輸送方向の逆転が起こっています (プロトンのスタート位置は同じだが、ゴールの方向が逆)。プロトン輸送がどのように制御されているのか、タンパク質の柔らかさ研究の一つのモデルシステムとして更なる研究が期待されます。

実は伊藤さんは、若手研究者(35 歳以下)の登竜門でもある生物物理若手奨励賞にも同研究にて申請をしていました。残念ながら書面審査にて落選し、学生発表賞に回りましたが、伊藤さん自身は奨励賞講演を聞きながら、"あそこで勝負をしたかった。良い勝負ができたはず"と更なるモチベーションを感じていたようです。また学生発表賞のポスター発表では、自身の研究の面白味を簡潔に伝えるとともに、審査員の先生方だけでなく多くの研究者と深い議論を交わしていました。今回の若手奨励賞の落選と学生発表賞の受賞を今後の糧に、更なる面白いサイエンスを発展させてくれるものと私自身、楽しみにしています。



左図：BR と PoXeR のプロトン輸送機構の一端
右図：表彰状を受け取る伊藤さん



A03 神取グループの中村駿太さんが 第 54 回日本生物物理学会年会において学生発表賞を受賞しました

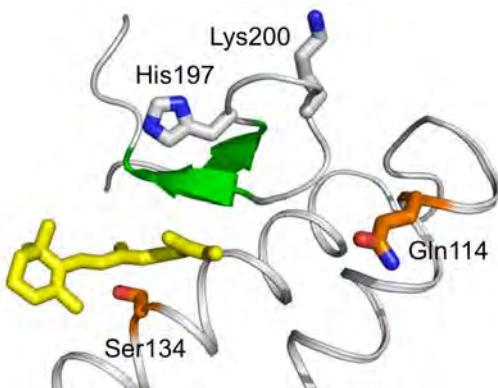
神取 秀樹 (名工大・A03 計画研究代表者)

A03 計画班神取グループ (名工大) の中村駿太さん (M2) が、平成 28 年 11 月 25 日 (金) から 27 日 (日) まで筑波で開催された第 54 回日本生物物理学会年会にて「低温赤外分光法によるサル緑感受性視物質がもつ塩化物イオン結合部位の構造解析」という題目で学生発表賞を受賞しました。これまでに私たちのグループは、京都大学靈長類研究所の今井准教授との共同研究によりサルの赤と緑感受性視物質の構造解析に成功し、その波長制御メカニズムの解明に大きく貢献してきました。今回、中村さんは、この研究をさらに進展させ、赤と緑感受性視物質が共通してもつ Cl^- 結合部位の構造について新たな知見を得ました。

私たちヒトをはじめとする靈長類は、色覚を形成するために、赤・緑・青に感受性をもつ 3 種類の異なるタンパク質 (視物質) を持っています。中でも赤と緑を感受する視物質は 1 つの同じ遺伝子から遺伝子重複により生じたため、わずか 15 アミノ酸残基しか違いません。これら赤・緑感受性視物質はともに生体内において、 Cl^- の結合によって吸収の長波長化を実現しています。中村さんは、どのように Cl^- が波長制御を行っているかを明らかにするために、変異体を用いた構造解析を取り組みました。しかしながら、色覚視物質の構造情報は実験的に皆無であったため、 Cl^- 結合部位を予測することは困難でした。そこで、中村さんは赤外

分光法を用いて、得られた分子振動から Cl^- 結合部位の予測を試みました。過去の研究で、 NO_3^- はタンパク質に結合するが、視物質の吸収波長は変化しないことが報告されています。このことから、 Cl^- と NO_3^- 、2 つの異なるアニオンが結合した状態に対して赤外分光解析を行い、アニオンの違いによって変化が生じる分子振動モードに着目したのです。その結果、これまでに報告されていた His197 と Lys200 に加え、Gln114 と Ser134 が Cl^- 結合に関与していることを明らかにしました。これまでの研究結果から、His197 と Lys200 が存在する細胞外第 2 ループが Cl^- 結合に重要であるという考えが一般的でしたが、中村さんが新たに発見した 2 つのアミノ酸はどちらもヘリックス内部に存在していました。これらは、ホモロジーモデルから予測することは難しく、実際に分子振動を捉えることで同定することのできたアミノ酸であるといえます。変異の影響で内部結合水が大きく変化することまで明らかになっており、現在は同位体標識した水を用いて水素結合環境を調べるなど、さらに詳しい構造解析に取り組んでいます。

色覚視物質の研究は得られる試料が限られていることから、X 線結晶構造解析は実現していません。このような状況下で、赤外分光法は分子構造を解き明かすことのできる強力な手法であり、今後さらに構造解析がすすむことが期待されます。



図：サル緑感受性視物質のホモロジーモデル
(PDB: 1KPW)





A03 神取グループの野村祐梨香さんが 第 54 回日本生物物理学会年会において学生発表賞を受賞しました

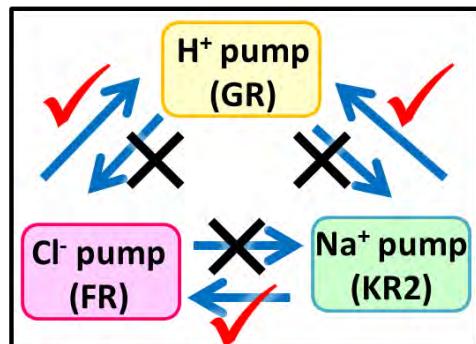
神取 秀樹（名工大・A03 計画研究代表者）

A03 計画班神取グループ（名工大）研究協力者の野村祐梨香さん（博士前期課程 2 年生）が、平成 28 年 11 月 25 日（金）～27 日（日）につくば国際会議場で開催された第 59 回日本生物物理学会年会において学生発表賞を受賞しました。

日本生物物理学会は、1960 年に設立され、生物物理学の研究で非常に歴史の長く大きな規模の学会であり、第 54 回目となる今年は 11 月 25 日～27 日に茨城県つくば市のつくば国際会議場において行われました。本年会では例年すべての発表は英語で行われ、34 件のシンポジウムと 937 件の一般発表（ポスター発表）に加えて、日中、日韓、日豪の 3 つの二国間交流シンポジウムが行われました。

今回、野村さんが受賞した学生発表賞は本年会において新たに創設された賞です。この賞は大学院や学部学生を対象に優秀なポスター発表を表彰するもので、若手奨励賞の受賞者がほとんどドクター取得者である中、より若い年齢層の学生会員に対する積極的な表彰を行う目的でつくられました。一次選考の応募書類と二次選考のフラッシュトークおよびポスター発表による選考の結果、野村さんの行った研究内容が生物物理学の発展に貢献しうる若手会員の優秀な発表として今回の受賞に選ばれました。

野村さんの発表内容は「真正細菌のポンプ型ロドプシンの機能転換およびその分子メカニズムについての研究」です。この研究では海洋などに棲息する真正細菌の持つ、光駆動型 H^+ 、 Cl^- 、 Na^+ ポンプ型ロドプシン [1]について、それぞれのアミノ酸を互いに入れ替える



今回の研究で明らかになった
機能転換の非対称性

機能の転換を行うことで、三種類のロドプシンの機能の違いを生み出す要因を明らかにすることを目的としています。

野村さんは、ロドプシンを構成する約 300 アミノ酸のうちわずか 1 %に当たるアミノ酸変異により $Na^+ \rightarrow H^+$ 、 $Na^+ \rightarrow Cl^-$ 、 $Cl^- \rightarrow H^+$ の三つの機能転換を達成することができました[2]。しかしそれらの逆については更に多くの変異を加えても機能転換されず、機能転換には非対称性があることがわかりました。この機能転換の非対称性を、ロドプシンの進化系統樹と比較したところ、機能転換が可能であるのは進化を逆戻りする方向に対応し、逆に進化を進める方向の機能転換が極めて難しいことがわかりました。野村さんはさらに過渡吸収測定や FTIR 測定により、これらの機能転換の分子メカニズムについても解析を進め、真正細菌と古細菌のタンパク質内部の水分子の水素結合ネットワークの違いが機能転換の方向性に関わることを明らかにしています（論文準備中）。

本研究で試みたロドプシンの機能転換は、本領域における神取グループの中心テーマの 1 つです。タンパク質機能の柔軟性に切り込む研究の過程で、柔らかさが分子の進化に関わるという新たな発見をすることができました。今後はこれらのアミノ酸残基が機能を決める機構の解明や、更なる機能転換の達成に向け、野村さんの研究の更なる発展が期待されます。

[1] Inoue, K.; Kato, Y.; Kandori, H. *Trends Microbiol.* **2015**, 23, 91-98.

[2] Inoue, K.; Nomura, Y.; Kandori, H. *J. Biol. Chem.* **2016**, 291, 9883-9893



第 54 回日本生物物理学会年会で
学生発表賞を受賞した野村祐梨香さん



A03 班 片平グループの万里さんが

第 54 回日本生物物理学会年会において学生発表賞を受賞しました

片平 正人（京都大・A03 公募班 研究代表者）

A03 公募班の片平グループ（京都大学エネルギー理工学研究所）の博士後期課程 3 年生の万里君が、2016 年 11 月 25 日（金）から 27 日（日）の期間に、つくば国際会議場で開催された第 54 回日本生物物理学会年会において学生発表賞を受賞したことをご報告致します。

日本生物物理学会は、1960 年 12 月 10 日に設立され、初代会長は小谷正雄先生が務められました。同学会はこれまで、日本における生物物理学の発展に寄与してきました。学会の活動としては、年会の開催と、学会誌「生物物理」と欧文学会誌「Biophysics and Physicobiology」の発行を中心としています。また本学会は International Union of Pure and Applied Biophysics(IUPAB)に加盟しており、国際的な枠組みの中での活動も行っています。今年の年会では一般発表演題が 937 件あり、すべてポスター発表の形式で行われました。本年会では、今回新たに学生発表賞が創設されました。これは大学院生や学部生を対象に、優秀なポスター発表を表彰するものです。従来からあった本年会の若手賞と比べ、より若い年代の会員をエンカレッジすることを目的としています。

万里君は、中国からの留学生です。万里君の研究対象である APOBEC3B (A3B) タンパク質は、DNA 鎮中の TC 配列中のシトシン塩基に作用し、これを脱アミノ化する事でウラシル塩基に変換します。変換されたウラシル塩基はチミン塩基と同様に振る舞うため、A3B は DNA に変異を生じさせた事となります。A3B によるヒト DNA への変異の導入が、癌を引き起こしている事が、最近分かってきました。万里君は、A3B による脱アミノ化反応を、NMR シグナルを用いる事でリアルタイムで追跡する事に成功しました（図 1 左）。そして DNA 鎮の中央付近に位置する標的配列 TC は、鎮の 5' 端あるいは 3' 端付近に位置する標的配列 TC に比べて、A3B による脱アミノ化反応をうける効率が高い事を見出しました。研究が進んでいる類縁タンパク質 APOBEC3G(A3G)においては、DNA 鎮の 5' 端付近に位置する標的配列ほど、脱アミノ化反応を受ける効率が高い事が示されてきました。今回 A3B に関して見出された事はこれとは異なり、予想外のものでした。

さらに万里君は、A3B の DNA への親和性が A3G と比べるとかなり低い事に基づいて、この予想外の結果を合理的に説明する事に成功しました。これらの成果が評価され、学生発表賞の受賞に至りました。

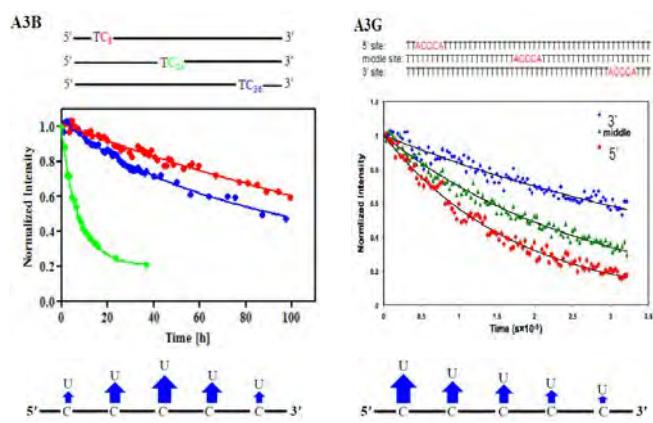


図 1. 標的配列の DNA 鎮中における位置に依存した脱アミノ化効率の違い：A3B(左)と A3G(右)の比較。標的シトシン塩基の NMR シグナルの強度(縦軸)が、脱アミノ化反応の進行に従って減弱していく様子を、時間軸に対してプロットした。A3B の場合、標的配列が一本鎖 DNA の中央付近に位置するほど、脱アミノ化される効率が高い事を見出した(左)。一方これまで研究が進んでいた A3G の場合、標的配列が一本鎖 DNA の 5' 端付近に位置するほど、脱アミノ化される効率が高い事が示されていた(右)。





A03 廣田グループの小林紀君が 第 54 回日本生物物理学会年会において学生発表賞を受賞しました

長尾 聰(奈良先端大・A03 公募研究連携研究者)
廣田 俊(奈良先端大・A03 公募研究代表者)

A03 柔らかな分子系創成 公募研究 廣田グループ(奈良先端大)の研究協力者である奈良先端科学技術大学院大学 物質創成科学研究科の小林紀さん(博士課程後期 2 年)が、平成 28 年 11 月 25 日(金)から 27 日(日)の期間に、茨城県つくば市のつくば国際会議場で開催された第 54 回日本生物物理学会年会において、学生発表賞を受賞されたことをご報告いたします。

小林さんの発表タイトルは、"Solution NMR characterization of the interaction between cyt c and cardiolipin-incorporated bicelles"であり、ミトコンドリア膜間部に存在する電子伝達タンパク質であるシトクロム(cyt) c のリン脂質カルジオリピン(CL)相互作用部位を溶液 NMR によって解析した内容の発表です。Cyt c と CL の相互作用は cyt c を電子伝達タンパク質から酸化酵素へと変貌させ、細胞死であるアポトーシスを引き起こす生理的に重要な化学反応を引き起こしますが[1]、これまで cyt c の CL 相互作用部位の詳細は明らかではありませんでした。溶液 NMR は分子の構造情報が原子レベルで得られる測定法ですが、観測する対象分子の分子量が大きくなる程シグナルがブロードニングして解析を妨げるため、脂質膜のような巨大分子とタンパク質の相互作用解析への利用が難しいという問題があります。今回小林さんは、モデル脂質膜として分子サイズが小さく均一な脂質二分子膜であるバイセルに CL を導入することで、膜結合した cyt c の NMR シグナルを先鋭かつ感度良く検出し、cyt c の CL 相互作用部位をアミノ酸残基レベルで明らかにすることに成功しました。

具体的には、CL 含有バイセルと ¹⁵N 標識 cyt c を混合して ¹H-¹⁵N 相関 HSQC スペクトルを測定し、CL 含有バイセルの添加による cyt c の主鎖 NH シグナルの化学シフト摂動(CSP)を算出しました。その結果、cyt c の N 末端領域と Lys72/Lys73 周辺の広い領域に CSP が観測されました。CSP が観測されたアミノ酸残基を cyt c の立体構造上にマッピングすると、これらのアミノ酸残基は cyt c の同一面上に存在しており(図 1)、cyt c は分子表面の広い領域のアミノ酸残基を介して CL 含有バイセルと相互作用していることが

示唆されました。CSP より推測される CL 含有バイセルとの相互作用部位には正電荷を有する複数の Lys 残基が存在しており、cyt c は複数の Lys 残基を介して CL と相互作用することも分かりました[2]。また、この相互作用部位は bc₁ 複合体やシトクロム c 酸化酵素との相互作用部位と良く対応していました。本手法はタンパク質と膜の相互作用を調べる新しい方法となることが期待されます。

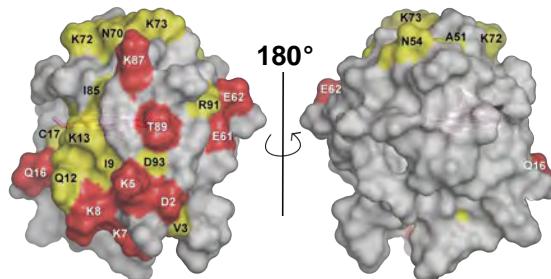


図 1 Cyt c の CL 相互作用部位。



写真：廣田グループの小林紀さん

引用文献

- [1] V. E. Kagan *et al.*, *Nat. Chem. Biol.* **1**, 223-232 (2005).
- [2] H. Kobayashi *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.* **55**, 14019-14022 (2016).



A03 新井グループの工藤恒君が 第 54 回日本生物物理学会年会において学生発表賞を受賞しました

新井 宗仁（東大総合文化生命環境・A03 班友）

A03 項目の班友 新井グループ（東大）研究協力者の工藤恒君（博士課程 1 年）が、平成 28 年 11 月 25-27 日につくばで開催された第 54 回日本生物物理学会年会において、第 1 回学生発表賞を受賞しましたので、ご報告いたします。

受賞の対象となった研究発表のタイトルは「ラン藻由来アルカン合成関連酵素の構造機能解析」です。植物の葉緑体の起源とされる微細藻類のラン藻は、大気中の二酸化炭素を材料として、軽油相当の炭化水素を合成できることが知られています。軽油燃料の燃焼によって二酸化炭素が発生しても、ラン藻はそれを吸収して再び燃料を生産できるため（カーボンニュートラル）、ラン藻が合成する炭化水素燃料は、次世代の再生可能エネルギーの一つとして注目されています。この炭化水素の合成反応は、アシル ACP 還元酵素 (AAR) とアルデヒド脱ホルミル化オキシゲナーゼ (ADO) の 2 つの酵素によって触媒されます [1,2]。具体的には、AAR は脂肪酸合成の中間体であるアシル ACP をアルデヒドに還元し、これを ADO がアルカンまたはアルケンへと変換します。これらの酵素を大腸菌に導入すると大腸菌が炭化水素を合成できるようになりますから、これらの酵素は生物による炭化水素合成の鍵となる酵素です。しかし、AAR と ADO の酵素活性は非常に低いため、バイオ燃料生産に応用するためには、これらの酵素の高活性化が重要です。そこで、この研究では、立体構造が未知である AAR の活性を改善し燃料の生産効率を向上させるために、(1) AAR の特性に重要なアミノ酸残基の解明と、(2) AAR の概形構造の解明を目指しました。

(1)の研究では、まず、さまざまなラン藻に由来する AAR の活性や可溶性等を比較しました。その結果、高活性型と低活性型の AAR が存在することを見出しました [3]。また AAR の基質特異性が、由来するラン藻の生育環境の違い（海洋性環境と淡水性環境）によって異なることを明らかにしました [3]。次に、低活性型 AAR を高活性型 AAR のアミノ酸配列に近づけるようなアミノ酸変異解析を行いました。計 70 個ほどの変異体を作製して解析した結果、AAR の可溶性発現量、活性それが大きく向上した変異体を獲得することができました。さらに、これらの変異を組み合わせる

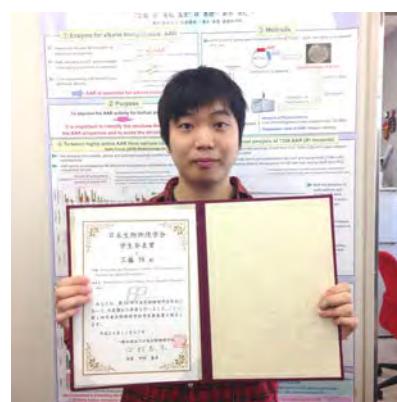
ことによって、最終的に低活性型 AAR の炭化水素合量を約 30 倍も向上させ、高活性型 AAR と同程度まで近づけることに成功しました。この一連の変異解析を通して、AAR の可溶性、発現量、活性などに重要なアミノ酸残基の解明に成功しました。

(2)の研究では、AAR タンパク質は非常に凝集しやすいため精製が困難でしたが、好熱性ラン藻由来の AAR を用いることにより、つくばの KEK で X 線溶液散乱測定に成功しました。その結果、AAR は 3 つのドメインを持つハート型の構造をとることが明らかになりました。

今回の受賞した工藤君は、新井研究室の最初の博士課程学生の一人であり、大量の変異体作製などに粘り強く取り組んだことが評価され、受賞につながったと思われます。彼が第一著者として昨年 11 月に発表した論文[3]は東大からプレスリリースされ、日刊工業新聞などに掲載されました。また、今回の学会発表以外にも大量のデータがあるため、今後、数多くの論文が出ることが期待されます。AAR という一つのタンパク質について、あらゆる手法を用いて徹底的に調べつくす基礎研究を行い、最終目標であるバイオ燃料生産の実用化につなげていきたいと工藤君は語っており、今後の活躍が期待されます。

引用文献

- [1] Schirmer A, Rude MA, Li X, Popova E, & del Cardayre SB, *Science*, **329**, 559-562 (2010)
- [2] Hayashi Y, Yasugi F, & Arai M. *PLoS ONE*, **10**(4), e0122217 (2015)
- [3] Kudo H, Nawa R, Hayashi Y, & Arai M. *Biotechnology for Biofuels*, **9**, 234 (2016)





A03 新井グループの和田愛未君が 第 54 回日本生物物理学会年会において学生発表賞を受賞しました

新井 宗仁（東大総合文化生命環境・A03 班友）

A03 項目の班友 新井グループ（東大）研究協力者の和田愛未さん（博士課程 1 年）が、平成 28 年 11 月 25 日（金）から 27 日（日）までつくば国際会議場で開催された第 54 回日本生物物理学会年会において学生発表賞を受賞しました。

和田さんは今回、進化工学的手法による酵素の改良について発表を行いました。昨年 4 月から自身が提案した研究テーマで実験を進め、語学力を生かしたフレッシュトークで研究内容をアピールしました。

リンは植物の生育に必須の元素のひとつですが、リン肥料の原料であるリン鉱石は今後 100 年の間に枯渇するとの予測がなされています。また、日本ではリン鉱石は産出されておらず、海外からの輸入に頼っています。そのため、食糧生産を持続的に行うためには、リン肥料の有効利用が必要です。しかし、土壤に施用された肥料中のリンは、有機態リンという、植物が利用できない形態で蓄積する傾向があります。有機態リンの中でも多く存在するのが、フィチン酸とその塩であるフィチン酸塩であり、土壤中の全リンの最大 80% を占めます。したがって、これらの化合物から効率的にリンを取り出すことが必要となっています。

これらの化合物から加水分解によってリンを取り出すことができるが、フィターゼと呼ばれる酵素です。そこで和田さんは、フィターゼの中でも高い酵素活性を有する大腸菌由来フィターゼ AppA に着目しました。しかし AppA は土壤温度において最大活性の 30% 未満しか活性を発揮できないため、土壤温度における AppA の活性を、進化分子工学的手法を用いて向上させることを目的として研究を行いました。

具体的には、Error-prone PCR (epPCR) 法により *appA* 遺伝子にランダムな変異を加え、活性の上昇した変異体酵素を選抜するプロセスを繰り返すことによって高活性化 AppA を取得することを目指しました。まず、大腸菌で AppA を過剰発現させる系を構築し、モリブデン・ブルー法により酵素活性を確認しました。次に、PCR におけるアニーリング温度や錆型量、PCR サイクル数を検討し、変異導入の条件を決定しました。また、epPCR によって *appA* にランダム変異を導入し、変異プラスミドで大腸菌を形質転換することで変異体ライブラリを作製しました。構築した変異プラスミドを無作為に 5 つ選び、シーケンス解析をしたところ、平均

して 2.4 のアミノ酸置換が起こっていることが確認されました。さらに、作製した変異体の 1 次スクリーニングとして、ろ紙上で酵素反応と発色を行う方法を採用しました。2 次スクリーニングでは、選抜した変異体を液体培養し、菌体破碎上清を用いたモリブデン・ブルー法により酵素活性を定量的に測定しました。以上のようにして、進化分子工学的手法によって AppA を高活性化させうるシステムを確立させました。

今後は、構築したスクリーニング系を用いて、低温条件における AppA の活性を向上させる予定です。高活性化 AppA は、植物が効率的にリンを取得するのに役立ち、リン肥料使用量の削減に寄与すると期待されます。

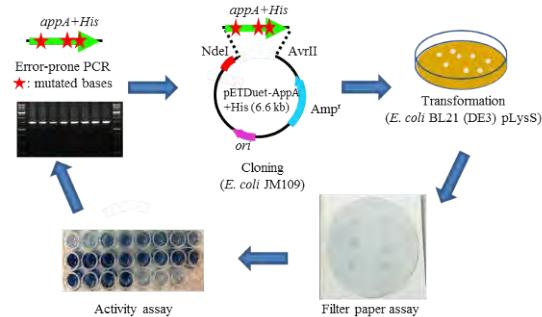


図 1. 構築したスクリーニング系

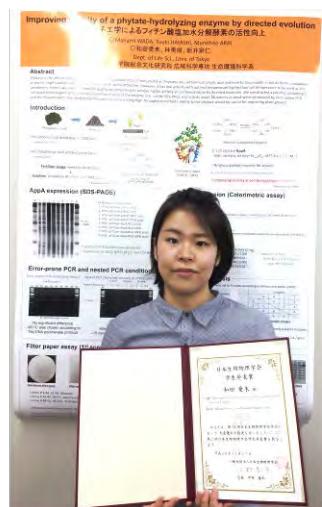


図 2. 学生発表賞を受賞した和田さん



A03 新井グループの河合秀信君が 第 54 回日本生物物理学会年会において学生発表賞を受賞しました

新井 宗仁（東大総合文化生命環境・A03 班友）

A03 項目の班友 新井グループ（東大）研究協力者の河合秀信君（修士 2 年）が、平成 28 年 11 月 25 日（金）～27 日（日）につくば国際会議場（茨城県つくば市）で開催された第 54 回日本生物物理学会年会において、学生発表賞を受賞しましたのでご報告いたします。

生物物理学会にはこれまで、若手奨励賞は存在していましたが、受賞者の多くは助教やポスドクなどの博士号取得者であり、学生が受賞することは困難でした。そこで、学生の研究を奨励するために、今回の年会から、学生を対象とした「学生発表賞」が新設されました。この「学生発表賞」では、応募時に研究の要旨（英文）を提出し、年会当日はスライド 1 枚を使って英語で 2.5 分間のフラッシュトークを行い、その後、英語でのポスター発表を行うことによって審査されました。その結果、新井グループからは今回、4 名の大学院生が学生発表賞を受賞しました。

そのうちの一人の河合君は、「天然タンパク質の立体構造物性に関する統計解析」という演題で発表を行いました。これは、高分子物理学を背景として、タンパク質の構造と機能に関する物理的なルールを見出すことを目指した理論的な研究です。特に、Flory のスケーリング則において重要な物理指標である慣性半径 R_g (radius of gyration) とタンパク質密度 ρ について、Protein Data Bank の大規模なデータセットを用いて網羅的にバイオインフォマティクス解析を行いました。その結果、タンパク質の構造と機能に関して、いくつかのルールを明らかにしました。

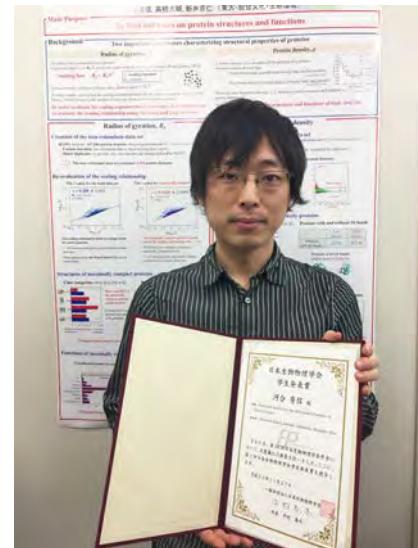
まず、天然タンパク質の R_g とアミノ酸残基数 N を網羅的に計算し、 N に対して R_g をプロットした結果、各残基数 N において最小の R_g が存在しており、それらのタンパク質がスケーリング則 ($R_g = R_0 N^\nu$) を厳密に満たすことが明らかになりました。そこで、これらのタンパク質を「最小構造タンパク質」という新たなカテゴリーと定義し、その構造と機能特性について解析しました。その結果、最小構造タンパク質のスケーリング指数 ν は約 1/3 であり、貧溶媒中で凝縮した高分子鎖と同等であることが明らかになりました。また、最小構造タンパク質には β シート構造やジスルフィド

結合が多いことや、加水分解酵素などが多いことも明らかになりました。

次に、タンパク質密度 ρ をアミノ酸残基数 N に対してプロットした結果、残基数が少ないほど高密度のタンパク質が多いという特徴が見られました。また、高密度タンパク質と低密度タンパク質には、それぞれ、特徴的な構造と機能が存在することが明らかになりました。

以上のようなルールは、タンパク質の物性解明に寄与するのみでなく、今後、産業や医療などに役立つ新規タンパク質をデザインする際にも有用であると期待されます。

河合君は、これらの研究内容についてポスター発表を行うだけでなく、シンポジウム「Frontiers in protein organization and disorganization (蛋白質の秩序化-脱秩序化の最前線)」において口頭発表も行い、好評でした。今後のさらなる活躍が楽しみです。





A03 新井グループの末松佑磨君が 第 54 回日本生物物理学会年会において学生発表賞を受賞しました

新井 宗仁（東大総合文化生命環境・A03 班友）

A03 項目の班友 新井グループ（東大）研究協力者の末松佑磨君（修士 1 年）が、2016 年 11 月 25 日から 27 日までつくば国際会議場で開催された第 54 回生物物理学学会年会において、学生発表賞を受賞しました。受賞対象となった発表のタイトルは「アルカン合成酵素の NMR と分子動力学シミュレーションによるダイナミクス解析」というものです。以下に研究の概要と、受賞にいたるまで取り組みを紹介します。

我々のグループでは、ラン藻（シアノバクテリア）が持つ 2 つの酵素 ADO (aldehyde deformylating oxygenase) と AAR (acyl-(acyl carrier protein) reductase) に注目しています。ラン藻は ADO と AAR を使用して、軽油相当の炭化水素を生産しており、その炭素源は光合成により吸収される大気中の二酸化炭素です。それゆえ、ラン藻によって生産される炭化水素は、カーボンニュートラルな環境にやさしいバイオエネルギーとして注目されています。

しかし、これらのタンパク質に関する知見は少なく、機能発現機構は未だ明らかにされておらず、産業応用には至っておりません。一般的にタンパク質はそのダイナミクス（構造揺らぎ）が機能発現機構において大きな役割を担っていることが知られています。そこで本研究では、すでに構造が明らかにされている ADO に着目し、ADO のダイナミクスを NMR と分子動力学シミュレーションを用いて明らかにすることで、機能発現機構の知見を得ることを目的としました。

まず、ADO (232 残基) の NMR 測定については、岐阜大・生命科学総合研究支援センターの鎌足雄司助教との共同研究により、cryo-probe 付きの 800 MHz NMR 装置で測定を行いました。当初用いた ADO は凝集しやすい傾向が見られたため、好熱性ラン藻由来の ADO を用いた結果、高濃度に濃縮でき、きれいな NMR スペクトルを得ることができました。そこで、各残基のダイナミクスを見るために T_1 , T_2 , NOE 測定を行いました。その結果、ADO の各残基がマイクロ秒からミリ秒の様々なダイナミクスを持ち揺らいでいることを観測でき、さらに基質アナログを結合させるとそのダ

イナミクスが変化する様子が観測されました。今後、ピークの帰属を行い、部位特異的にダイナミクスを解析する予定です。

次に、AMBER ソフトウェアを用いて ADO の分子動力学シミュレーションを行いました。その結果、結晶構造では構造が未決定だった N 末端側残基については、ヘリックス構造を形成することがわかりました。さらに、N 末端が大きなダイナミクスを持ちながらも基質進入部位周辺と相互作用し、基質進入部位の開閉を制御している可能性が示唆されました。また、このようなダイナミクスは、金属（鉄）の結合によって変化することも示唆されました。今後は、さらに長時間のシミュレーションを行うとともに、基質存在下でのシミュレーションを行い、ADO の立体構造ダイナミクスについて、より詳細に明らかにしたいと考えております。





国際共同研究・派遣プログラム 活動報告

小川 卓（九大院工・A03 班 楊井グループ・博士後期課程）

2016 年の 10 月 10 日から 12 月 12 日までの間、カリフォルニア大学サンタバーバラ校の Quyen 教授のもとを訪ね共同研究を行った。Quyen 研究室は有機薄膜を用いたデバイス作成や、実測と理論計算に基づく光励起子拡散の解析分野を牽引する世界的権威である。私の研究は三重項を利用して長波長の光を短波長に変換するフォトン・アップコンバージョン (UC) であり、自身の合成した UC 材料の励起子ダイナミクスの解析を志してサンタバーバラを訪れ、現地学生である Brett 氏の協力の下、二ヶ月間実験に取り組んだ。

通常の固体 UC 材料を用いる場合、材料中の励起子拡散挙動を解析することは困難である。なぜなら、三重項の増感剤であるドナー分子が UC 発光を示すアクセプター分子と相分離を起こすことで、材料が不均一化して発光効率が著しく低下する上、異なった環境に由来する様々な励起子の成分が解析を複雑化させるためである。しかし一方で、材料中の三重項や一重項励起子の拡散過程や距離を解析する事ができれば、UC 量子収率を低減させる要因である、ドナー分子による再吸収を抑制させるデバイス設計への手掛かりが得られ、非常に魅力的である。今回の共同研究は、当研究室で合成した、均一にドナー分子を分散させる UC 材料と、Quyen 研究室の持つ高い測定・解析技術を組み合わせてこの課題を解決しようという試みである。

滞在中は、スピンドルによる UC 材料の薄膜化とその膜厚制御、また多角的なアプローチによる一重項・三重項励起子の拡散ダイナミクス解析のための測定に尽力した。特に Monte Carlo 法によるシミュレーションを活用した一重項拡散挙動の解析は非常に強力な手法となり、薄膜中の励起子が主にエキシマーの拡散によって支配され、40 nm に迫る長距離を移動しているという興味深い結果を得ることができた。一方で三重項の拡散についてはその寿命の長さから、当初想定していた解析手法は用いることができず、現地学生の Brett 氏とともに手探りで解析方法を模索することとなった。解析に必要な情報は現在もアップデートを続けているが、その中で固体試料に特有の励起子の減衰挙動が新たに明らかになりつつあり、UC 材料研究の発展に一石を投じられる結果となると期待している。



a) Quyen 教授と。b) 現地学生である Brett 氏と装置の前で。c) 研究室メンバーとの昼食会の様子。

現地の研究生活においては、その自由で大らかな姿勢に非常に感銘を受けた。「明日はガールフレンドに会いに行くから研究室を休むんだ」と言って木曜日に帰っていましたが、その一方、発表会で彼が示すデータの質・考察の精度には、より舌を巻かされた。このように、現地の学生の立ち位置はただ実験を行うだけの測定者ではなく、「自立した一人の研究者」であり、Visiting Scholar である私にも、それが求められていた。ガールフレンドに会いに行く、ではないが、質の高いアイデアと研究の裏には、適度な息抜きと、それ以上に自分を律することのできる高い集中力が必要なのかもしれない。

最後に、海外派遣プログラムへの採択により今回の訪問を支援していただいたことを深く感謝いたします。特に手続きの関連で名工大 神取研究室の中井さまには大変お世話になりました。