



業績紹介：ヘパリンによる β_2 -ミクログロブリンアミロイド線維形成促進・抑制機構の相図を用いた解釈

宗 正智 (阪大蛋白研・A02 連携研究者)
後藤 祐児 (阪大蛋白研・A02 公募研究代表者)

論文題目："Heparin-induced amyloid fibrillation of β_2 -microglobulin explained by solubility and a supersaturation-dependent phase diagram"

著者 : Masatomo So, Yasuko Hata, Hironobu Naiki, and Yuji Goto

雑誌巻号 : *Protein Science* 26, 1024-1036 (2017).

アミロイド線維は分子間で規則的な水素結合を形成してできた結晶性の凝集であり、様々な疾患に関わる。アミロイド線維形成過程では、蛋白質が溶解度を超えて溶けている過飽和状態が存在し、これが解消することにより、大規模な構造相転移が起きる[1]。NaClなどの塩では、低濃度では溶解度以下となり溶解していた蛋白質が、高濃度では結晶性の凝集が、さらに高濃度ではガラス性の不定形凝集が起こる。我々はこのような現象を、相図を用いたわかりやすい解釈を提案してきた。

アミロイド線維を促進・抑制する物質は数多く研究されているが、それらの多くは促進あるいは抑制のみに着目したものであり、濃度依存性について言及したものはほとんどない。抗血液凝固因子であるヘパリンは、硫酸基を多数持ったグリコサミノグリカンの一種であり(図 2C 挿入)、アミロイド線維形成を促進するといった報告や、出来上がったアミロイドを分解しオリゴマー形成を促進するといった報告があるが、アミロイド促進・抑制効果の包括的な理解はまだされていなかった。本論文では、ヘパリンが濃度依存的にアミロイド線維形成を促進・抑制することを示し、その分子機構について議論した。

本論文では、 β_2 ミクログロブリンをモデル蛋白質として、ヘパリン濃度や塩濃度を様々に変えて線維形成実験をおこなった(図 1)。塩のない試料ではヘパリン濃度が高くなるにつれて、アミロイド線維特異的に蛍光を発するチオフラン T(ThT)の蛍光強度が上昇し、線維形成にかかる時間(ラグタイム)が短くなった。さらに濃度を上げていくと逆に ThT 蛍光が減少し、ラグタイムも長くなかった。しかし、光散乱強度は高いままであるため、アミロイド線維でない凝集ができていることが示唆された。円二色性スペクトルや透過型電子顕微鏡画像でもこれを支持する結果が示された。

このように、ヘパリンも塩と同様の濃度依存性を示すことから、ヘパリンの硫酸基が塩として効いていることが示唆された(図 2)。実際に、NaCl 濃度を変化させるとヘパリン濃度依存性の山が左右にシフトするこ

とからも硫酸基が非常に重要であることがわかった。しかし、硫酸ナトリウムに比べると、硫酸基当たりの濃度ではるかに低い濃度で凝集を促進することから、塩としての効果に加え、高分子ポリマーである効果がさらに加わっていることが示唆された。

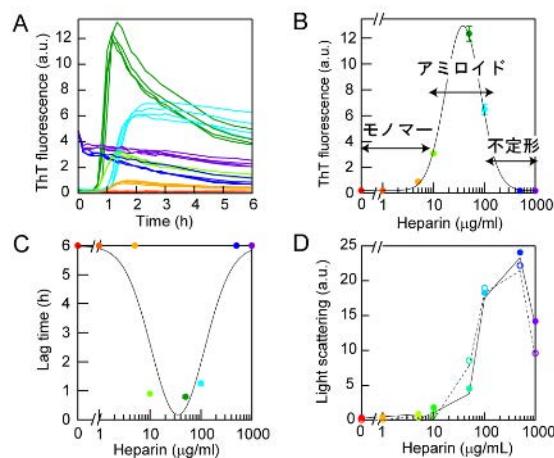


図 1 β_2 ミクログロブリンアミロイド線維形成における ThT の時間変化(A)と蛍光強度(B)、ラグタイム(C)、光散乱(D)のヘパリン濃度依存性。

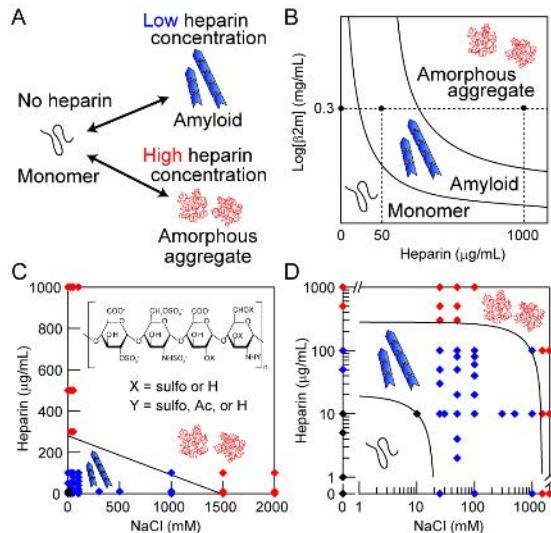


図 2 ヘパリンによる蛋白質凝集形成の経路(A)と相図(B, C, D)。

引用文献

- [1] M. So, D. Hall, and Y. Goto, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 36, 32-39 (2016).



業績紹介：光で働くホスホジエステラーゼ分子を自然界から発見 ～新しい光遺伝学ツールとしての応用に期待～

角田 聰（JST さきがけ・名工大・A01 公募研究連携研究者）

吉田 一帆（名工大・A03 博士課程学生）

神取 秀樹（名工大・A03 計画研究代表者）

論文題目："A unique choanoflagellate enzyme rhodopsin exhibits light-dependent cyclic nucleotide phosphodiesterase activity"

著者：Kazuho Yoshida, Satoshi P. Tsunoda, Leonid S. Brown, Hideki Kandori

雑誌巻号：J. Biol. Chem. 292, 7531–7541 (2017).

本論文において我々は、環状ヌクレオチドを光で分解するタンパク質分子(Rh-PDE)を発見した。環状ヌクレオチドである cAMP や cGMP は細胞内シグナル情報伝達物質であり、生体の代謝調節や細胞分化、増殖など、様々な生命現象を調節している。細胞内において環状ヌクレオチドは必要に応じてシクラーゼ (cyclase) により合成され、ホスホジエステラーゼ (phosphodiesterase: PDE) により分解されることで、細胞内での濃度が適切に保たれる。

一方、微生物型ロドプシンの仲間にはバクリオロドプシンのような光駆動イオンポンプや、チャネルロドプシンのような光開閉型イオンチャネル、またセンサー型の分子が知られていた。しかし近年、光依存的な酵素活性を示す微生物型ロドプシンの存在が明らかになり、このファミリーの機能の多様性が注目されている。実際、2014 年には光依存的に cGMP を合成する酵素型ロドプシン (BeGC1) が水生菌類 *Blastocladiella emersonii* から発見され^[1]、光遺伝学応用の可能性が報告された^[2]。では逆に「光依存的に cAMP や cGMP を加水分解する分子も存在するのではないか？」と我々

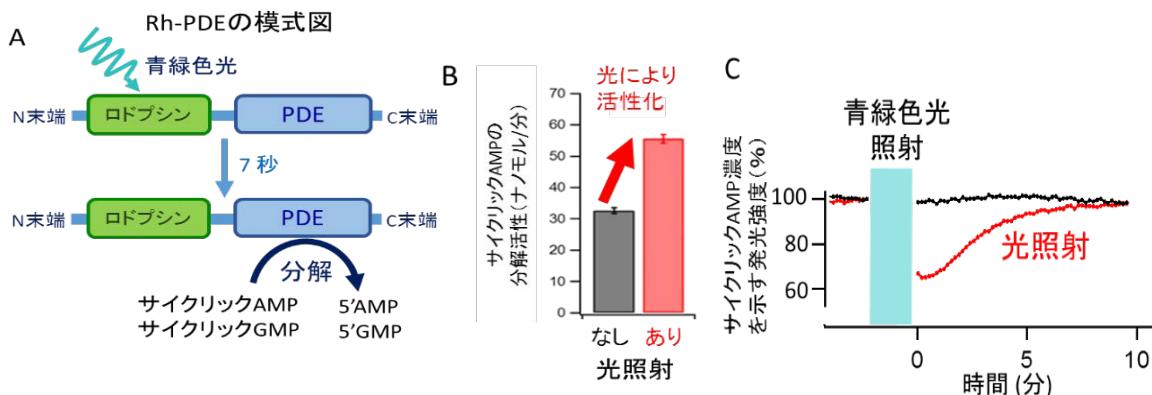
は予想した。そこでゲノム配列情報探索を行ったところ、襟べん毛虫の一種、*Salpingoeca rosetta* が微生物型ロドプシンとホスホジエステラーゼを連続してコードする遺伝子を持つことを発見した。次にこの遺伝子を哺乳類細胞(HEK293 細胞)へ導入したところ全長タンパク質を発現、精製することに成功し、この分子を Rh-PDE と名付けた（図 A）。そして *in vitro* において Rh-PDE の cAMP、cGMP 加水分解活性を測定すると、490 nm の青緑色の光照射依存的な活性化が観察された（図 B に cAMP の結果を示す）。

さらに光による活性化メカニズムを調べるために、単離精製した全長 Rh-PDE の分光測定を行った。その結果、Rh-PDE は暗状態で 492 nm に吸収極大を持ち、光吸収によってレチナールシップ塩基からプロトンが解離して M 中間体を生成する一方、M 中間体は室温で 7 秒の時定数で始状態へ戻ることがわかった。次に HEK293 細胞中で同じように発現させた Rh-PDE の機能を調べたところ、青緑色光照射に応じた cAMP 濃度の減少を観察することに成功した（図 C）。これらの結果を総合し、Rh-PDE は M 中間体の減衰に伴って活性化する一方、PDE 活性は数分で元の状態に戻ることを結論した。

以上の事実は細胞内環状ヌクレオチド濃度の光操作が可能であることを示しており、我々は本論文中で繰り返し光照射など応用に向けた可能性も検討している。今後、Rh-PDE を光遺伝学ツールとして細胞内シグナル伝達の光操作技術に応用すれば、代謝調節や細胞分化など生命現象の理解に役立つことが期待される。

[1] Aveler et al. Curr. Biol. 24, 1234–1240 (2014).

[2] Scheib et al. Sci. Signal. 8, 389, pp. rs8Sc (2015).





第 22 回ワークショップ「氷の分子科学」開催報告

山口 祥一(埼玉大院理工・A02 計画研究分担者)

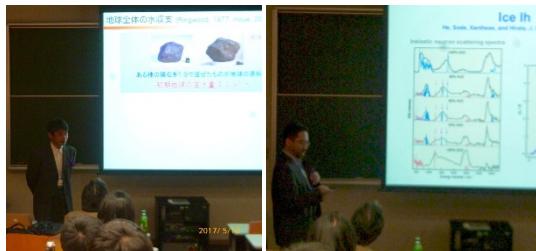
森田 明弘(東北大院理・A01 計画研究代表者)

第 22 回ワークショップ「氷の分子科学」が 2017 年 5 月 13 日に埼玉大学にて行われました。氷は古くから人類に興味をもたれてきた研究対象で、これまでに優れた研究が数多く残されてきました。例えば、マイケル・ファラデーの氷表面の疑似液体層の提案、中谷宇吉郎の人工雪の製作、ライナス・ポーリングの氷結晶の残余エントロピーの見積もりなどは、歴史的にも現代的にも重要な科学の金字塔です。現在でも地球惑星化学、宇宙化学、結晶成長、固体物性、分析化学など非常に学際的な広がりをもって研究が行われています。そのためまとまった形で氷の研究の全体を知る機会はむしろ乏しく、様々な分野で氷を研究対象にして活躍されている先生方をお招きした研究会を開催しました。参加者は講演者を含めて 59 名におよびました。

本研究会では、主催者の山口祥一教授(埼玉大)による全体説明に始まって、鍵裕之教授(東京大)は地球科学の観点から地球深部での水や氷の役割を研究されており、とくに広い温度・圧力領域での水の相図、未知の氷構造の探索や高压下での現象を講演されました。平田聰教授(イリノイ大)は ab initio 電子状態計算に基づく精密な振動スペクトルの計算手法の開発と、それを用いて氷・ドライアイスなどのバルク結晶の解析への応用をお話しされました。藤井朱鳥博士(東北大)はサイズ選別した大きな水クラスターの生成と分光を通して、氷の分光的・構造的な特徴が現れる起源について講演されました。古川義純教授(北大)は自然界で低温下での生物が用いている氷化阻害タンパク質の機能の解明に向けて、氷結晶成長面の精密な観測に基づく研究の進展について講演されました。石山達也博士(富山大)は分子動力学シミュレーションによる和周波分光の解析を通して明らかとなる氷表面構造の研究について、実験との共同での成果をお話しされました。岡田哲男教授(東工大)は氷 - 水界面を利用した新たなクロマトグラフィーや氷 - 水界面近傍での新規な現象の開拓についてお話しされました。杉本敏樹博士(京都大)は金属基盤に積層した氷の構造や相転移挙動を表面科学的な実験手法を用いており、バルクと表面の物性の違いを明らかにされました。また研究会終了後の意見交換会でも、活発な議論が続きまし

た。

本研究会でご講演いただいた先生方は、結晶成長学、地球化学、分析化学、理論化学、分子分光学、物性物理学と多岐にわたっていて、これだけバックグラウンドが違った方が同時に議論する機会はありません。しかし、それぞれの分野で目指す目標も研究内容もお互いに十分に理解しあうことができて、主催者としても大変に勉強のしがいがある興味深い研究会となりました。氷というキーワードはそれを可能にできるものであることを再認識しました。本新学術領域では、原子・分子の精密な理解を武器とする分子科学の研究者が、他分野の複雑な系に進出していくことを目指しており、氷という研究対象はそれにふさわしいと思いました。いろいろな分野で氷を研究されている研究者も、分子レベルの詳細な知見を強く必要としている点で共通点があるといえ、分子科学の貢献ができる余地が大きいと思います。最後に本研究会のために、お忙しいところわざわざお越しくださった講演者の先生方に改めて感謝申し上げます。



(上) 講演会場の様子、
(左下) 鍵裕之教授、(右下) 平田聰教授の講演。



領域代表の田原さんが平成 29 年度科学技術分野の文部科学大臣表彰 科学技術賞（研究部門）を受賞しました

竹内 佐年（理研・A02 計画研究分担者）

本新学術領域「柔らかな分子系」の領域代表者で A02 計画班研究代表者の田原太平さん（理化学研究所）が平成 29 年度科学技術分野の文部科学大臣表彰・科学技術賞（研究部門）を受賞されました。

文部科学省では毎年、科学技術に関する研究開発、理解増進等において顕著な成果を収めた方たちを「科学技術分野の文部科学大臣表彰」として顕彰しています。この大臣表彰には科学技術賞、若手科学賞、創意工夫労働者賞、創意工夫育成功労学校賞の 4 つの賞があり、さらに科学技術賞も幾つかのカテゴリーに分かれます。田原さんが受賞したのは科学技術賞のうち「我が国の科学技術の発展等に寄与する可能性の高い独創的な研究又は開発を行った者」を対象とする科学技術賞（研究部門）で、今年度は全分野から 42 名が受賞しました。田原さんの受賞業績は「新しい分光計測法の開発とそれを用いた複雑分子系の研究」というもので、まさにこの新学術領域「柔らかな分子系」の一環として理研で行なっている、超高速分光による光応答タンパク質の超高速ダイナミクスの研究、非線形分光による液体界面の研究、新しい単分子分光を用いた生体高分子の構造ダイナミクスの研究などが受賞理由です。



授賞式にて、開発部門で受賞した理研の研究者たちと一緒に。

私は長年、共同研究者として研究の苦楽をご一緒させていただき、最も近くで研究者はいかにあるべきかの良き範を示し続けていただきました。サイエンスに対する熱いハートを原動力にして、上述のように常に新しい研究分野に果敢に挑戦し続けてこられただけでなく、分野全体としての発展と新たなサイエンスの潮流の創出をめざされています。本新学術領域や理研でのプロジェクト課題「分子システム研究」を牽引してこられた情熱はまさにその現れであり、そうした田原さんのサイエンス愛が今回の受賞につながったものと思います。年齢を重ねると比例するように、問題の本質を見抜く洞察力と鮮やかな研究ぶりはますます冴えをみせています。

表彰式は松野文部科学大臣出席のもと、4 月 19 日に霞ヶ関の文部科学省の講堂で行なわれました。田原さんが受賞した科学技術賞（研究部門）の他、「社会経済、国民生活の発展向上等に寄与し、実際に利活用されている（今後利活用が期待されるものを含む）画期的な研究開発若しくは発明を行った者」を対象とする科学技術賞（開発部門）、「中小企業、地場産業等において、地域経済の発展に寄与する優れた技術を開発した者」を対象とする科学技術賞（技術部門）など、科学技術賞の他部門の受賞者や若手科学者賞の受賞者などに対して賞状と副賞の盾が授与されました。

田原さん、おめでとうございます！



授与された記念の盾



A02 班 田原グループの井上さんが日本化学会第 97 春季年会において優秀講演賞（学術）を受賞しました

田原 太平（理研・A02 計画研究代表者）

A02 計画班の田原グループ（理化学研究所）の博士研究員である井上賢一さんが、2017 年 3 月 16 日から 19 日まで開催された日本化学会第 97 春季年会で優秀講演賞（学術）を受賞しました。受賞対象の講演題目は、”Vibrational relaxation dynamics of free OH at the air/water interface revealed by time-resolved heterodyne-detected vibrational sum frequency generation spectroscopy”です。受賞対象となった発表の概要を以下に紹介します。

空気/水界面のスペクトルには、水素結合した OH の伸縮振動（HB OH）と空気側に水素原子を突き出して水素結合していない OH の伸縮振動（free OH）に帰属されるバンドが観測されます。井上さんは、界面にしか存在しない free OH が振動励起された後、どのように緩和するかを界面選択的な超高速分光法である時間分解ヘテロダイイン検出振動和周波発生分光法（Time-resolved heterodyne-detected vibrational sum frequency generation: TR-HD-VSFG）を用いて研究しました。

TR-HD-VSFG を用いて測定した時間分解スペクトルは解析の結果、励起状態の free OH に由来するスペクトルと励起光による温度上昇に由来する熱化スペクトルの 2 つの成分にうまく分解できることがわかりました。前者のスペクトル強度の時間変化から励起状態の free OH の緩和時間を見積もることができ、これによって空気/水 ($H_2O : 100\%$) 界面では 0.87 ± 0.06 ピコ秒で緩和することが明らかとなりました。さらに、同位体希釈した水 ($H_2O : 50\% + D_2O : 50\%$) を用いた同様の実験では 0.84 ± 0.09 ピコ秒という緩和時間が得られ、励起状態の free OH の緩和時間は同位体希釈してもほとんど変化しないことも明らかとなりました。

振動励起状態の free OH の緩和機構としては、図 1 に示すように(a) HB OH への分子内エネルギー移動、(b) 変角振動の倍音への分子内エネルギー移動、(c) 水分子の回転による HB OH の励起状態への転換、の 3 つの機構が考えられます。HOD 分子の OD 伸縮振動と変角振動の振動数は、 H_2O 分子の OH 伸縮振動と変角振動と比較して低波数に大きくシフトします。そのため HOD 分子では free OH との振動数の違いから (a)、(b) で挙げた分子内エネルギー移動は抑制されます。同

位体希釈すると一部の水分子は HOD 分子として存在するので、もし free OH が分子内エネルギー移動によって緩和するのであれば、同位体希釈によって緩和時間は長くなるはずです。しかし実験では同位体希釈によって free OH の緩和時間はほとんど変わらなかったことから、空気/水界面の free OH の振動励起状態は分子内エネルギー移動ではなく、主として水分子の回転によって緩和することが初めて明らかになりました。

バルクの水の HB OH は、効率的な分子間・分子内エネルギー移動によって振動緩和は 300 フェムト秒以下で起こることが報告されています¹。今回得られた結果は、界面の free OH がバルクの HB OH と比較してエネルギー的に孤立した状態にある特異的な OH 伸縮振動であることを端的に示しています。

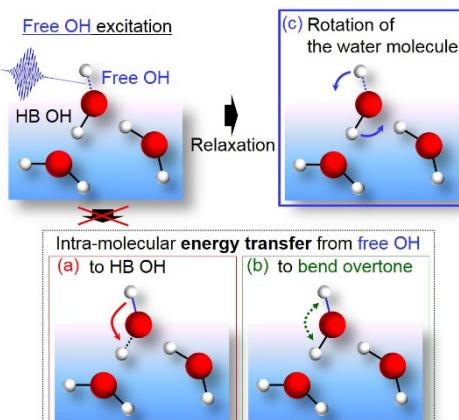
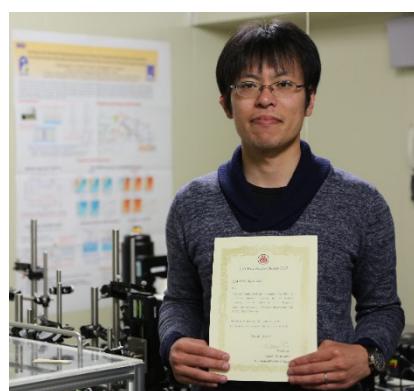


図 1：振動励起された free OH の緩和機構



優秀講演賞（学術）を受賞した井上さん

引用文献

- [1] K. Ramasesha et. al., *Nat. Chem.* **5**, 935 (2013).



A02 班 田原グループの浦島さんが日本化学会第 97 春季年会において 優秀講演賞（学術）を受賞しました

田原 太平（理研・A02 計画研究代表者）

A02 計画班の田原グループ（理化学研究所）の博士研究員である浦島周平さんが、2017 年 3 月 16 日から 19 日にかけて行われた日本化学会第 97 春季年会にて優秀講演賞（学術）を受賞したことを報告します。

受賞講演の演題は“Structure of the topmost water at charged silica/aqueous interfaces studied by heterodyne-detected vibrational sum frequency generation spectroscopy”です。この研究では、界面選択的な振動分光法であるヘテロダイイン検出振動和周波発生(HD-VSFG)分光法を帶電したシリカ／水溶液界面の適用し、その最表面水の構造を詳細に解析しました。

HD-VSFG 分光法は界面分子の振動スペクトルを選択的に観測できる優れた手法で、非帶電界面においてはその観測領域は界面からの深さ 1 nm 程度と考えられています。一方で帶電界面においては、界面電荷の作る電場の影響で界面から離れた分子も配向し、厚さ数十ナノメートル以上に及ぶ電気二重層全体が観測されてしまう場合があります。これは水のような小分子にとっては十分大きな厚みといえ、このような深い位置に存在する水はもはや界面最表面にある水の性質を示さないと考えられます。そこで浦島さんは、電気二重層の厚みは溶液のイオン強度に依存して変化することを利用し、帶電したシリカ／水溶液界面について測定された HD-VSFG スペクトルを最表面水分子由來の成分と電気二重層中の水分子由來の成分とに分解することを試みました。

スペクトルのイオン強度依存性を解析した結果、実験で得られたスペクトルを図 1 に示す 2 つの成分に分離することができました。電気二重層中のスペクトル（黒線）はバルク水の振動スペクトルとよく似ており、この領域の水はバルクの水とほぼ同様の性質をもっていることがわかります。一方、赤線で示した最表面水のスペクトルはそれとは全く異なっていて、シリカとの特異的な相互作用を反映しています。

この研究ではさらに、同様の実験を同位体希釈水 (HOD) についても行いました。これは、軽水(H_2O)の振動スペクトルは一般に振動カップリングの影響で複雑化しまい、解釈が困難であるためです。二つの水素分子の片方が重水素化された HOD ではこのよう

な問題は起こりません。実際に、電気二重層中の水由來のスペクトルは、バルクの場合と同様に振動カップリングの影響を受けていることが明らかになりました。一方、最表面水のスペクトルは同位体希釈の影響をほとんど受けないことがわかりました。これは、この界面では水分子(H_2O)の振動カップリングが自然に解けていることを示唆しており、珍しい結果です。これらの結果を総合的に解釈することで、帶電したシリカ／水溶液界面の最表面水の構造を明らかにしました。

非線形分光による界面研究において観測領域についての理解は本質的な問題で、この研究で考案されたスペクトル分解の方法は、今後多くの帶電界面における研究にも適応できると期待されます。

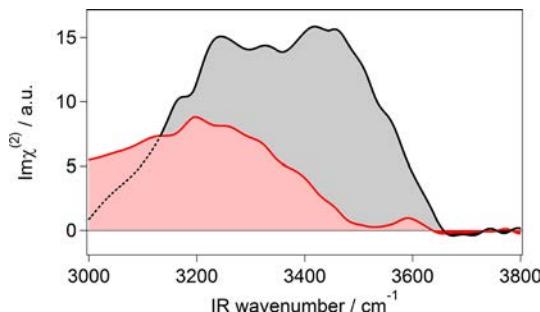


図 1. 本研究により分離された電気二重層分子由來のスペクトル（黒）と最表面水のスペクトル（赤）。



優秀講演賞（学術）を受賞した浦島さん