



業績紹介：単分子蛍光計測によって明らかにされた、DNAへの非特異的な結合と 1次元スライディングへの p53 の柔らかなリンカーの役割

鎌形 清人（東北大学・A02 連携研究員）
高橋 聰（東北大学・A02 計画研究代表者）

論文題目："The disordered linker in p53 participates in nonspecific binding to and 1D sliding along DNA revealed by single-molecule fluorescence measurements"

著者：Dwicky Rendra Graha Subekti, Agato Murata, Yuji Itoh, Satoshi Fukuchi, Hiroto Takahashi, Saori Kanbayashi, Satoshi Takahashi and Kiyoto Kamagata

雑誌巻号：*Biochemistry* **56**, 4134-4144 (2017).

複数のドメインを持つ DNA 結合タンパク質では、“柔らかな” リンカーが異なるドメインをつないでいる。このリンカーは、一般的に、DNA 上の離れた部位にそれぞれの DNA 結合ドメインを結合することを可能にするだけでなく、1 つ目のドメインが DNA に結合した後、実効的な濃度を上げることで 2 つ目のドメインの DNA 結合を促進すると考えられる。つまり、リンカーは“間接的に” DNA 結合に関与する。一方で、リンカーが DNA と直接結合するという報告があり、DNA 結合タンパク質の機能においてリンカーの“直接的な” 関与が示唆される。本研究では、がん抑制タンパク質 p53 の機能におけるリンカーの役割を調べたところ、リンカーが非特異的な DNA 結合や標的配列の探索を直接的に制御していることが明らかとなった。

p53 は、DNA の標的配列に結合することで、細胞周期停止、DNA の修復、アポトーシスなどにより、細胞のがん化を防ぐタンパク質である。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 つである。p53 は、N 末端ドメイン、コアドメイン、4 量体形成ドメイン、C 末端ドメインから構成される。コアドメインは DNA に配列依存的に結合し、C 末端ドメインは非特異的に DNA に結合する。リンカーはコアドメインと 4 量体形成ドメインをつないでいる。これまでに、私達は、ガラス基板への DNA 整列固定法の開発や単分子蛍光顕微鏡による観測によって、p53 の DNA 上のスライディング運動を研究してきた[1]。しかし、リンカーの役割は依然として分かっていなかった。

我々は、まず、p53 のリンカーが直接 DNA に静電的に相互作用する、または、コアドメインの動きを制限することによって、p53 の非特異的な DNA 結合や標的配列の探索を制御すると仮説を立てた。これらの仮説を検証するため、1、2、3 倍の長さのリンカーを持つ p53 の変異体、および、リンカーの電荷をゼロにした変異体を作成した。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 変異体が標的 DNA や非標的 DNA への結合を調べたところ、どの p53 変異体も標的 DNA と同程度の結合力を示したのに対し、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った。次に、単分子蛍光顕微鏡を用いて、蛍光色素修飾 p53 変異体が DNA 上のスライディング運動を観測したところ、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った。さらに、リンカーの電荷がない変異体では 2 つのスライディングモードのうち遅いモードが観測されなかったことから、リンカーは 2 つのスライディングモードを制御することが明らかとなった（図 1）。

以上より、p53 のリンカーの役割として、“細胞質から核への移行” や “他の蛋白質の結合” が知られていたが、本研究により “DNA への結合” や “DNA 上のスライディング運動” への直接的な関与が明らかとなった。本研究で得られた知見はリンカーを含むタンパク質の機能のデザインなどに応用できると期待される。

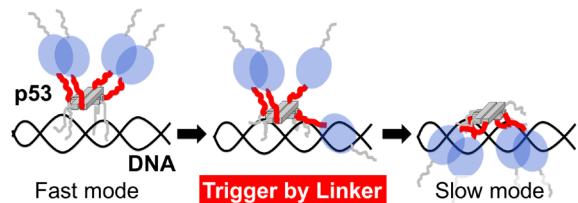


図 1 : DNA 上のスライディング運動における p53 のリンカーの関与

引用文献

- [1] A. Murata, Y. Ito, R. Kashima, S. Kanbayashi, K. Nanatani, C. Igarashi, M. Okumura, K. Inaba, T. Tokino, S. Takahashi and K. Kamagata, *J. Mol. Biol.* **427**, 2663–2678 (2015). など



業績紹介：人工金属酵素によるシクロプロパン化反応とカルベン中間活性種の観測

大洞 光司（大阪大学・A03 公募研究代表者）
林 高史（大阪大学・A03 公募研究連携研究者）

論文題目："Catalytic Cyclopropanation by Myoglobin Reconstituted with Iron Porphycene: Acceleration of Catalysis due to Rapid Formation of the Carbene Species"
著者：Koji Oohora, Hiroyuki Meichin, Liming Zhao, Matthew W. Wolf, Akira Nakayama, Jun-ya Hasegawa, Nicoli Lehnert, Takashi Hayashi

雑誌巻号：*J. Am. Chem. Soc.* **139**, 17265–17268 (2017).

エチルジアゾ酢酸エチルを使ったスチレンのシクロプロパン化反応に対し、近年、ヘムタンパク質を人工酵素として利用した系が多数報告されている。例えば、ミオグロビンやシトクロム P450 の変異体を用いた系では、高い収率、立体選択性を達成している[1]。また人工補因子として鉄クロリンやイリジウムポルフィリンを用いたミオグロビンの変異体では、それぞれ酸素下での高い触媒活性および内部アルケンのシクロプロパン化が達成されている。一方で、中間活性種として活性な金属カルベン種が提唱されているが、ヘムタンパク質中で捉えた報告はない。本論文では、ヘムの配位子であるポルフィリンの構造異性体であるポルフィセンの鉄錯体を含む再構成ミオグロビンの反応性と中間活性種の評価を行った。

まず再構成ミオグロビンを使ったシクロプロパン化の触媒活性を評価した。ミカエリスマンテン型の触媒評価が可能であり、興味深いことに天然のミオグロビンに比べて、触媒活性を示す k_{cat}/K_m は 26 倍高かった。また天然のミオグロビンではジアゾ酢酸エチルに対して、ミカエリスマンテンプロットは飽和しなかつたが、再構成ミオグロビンでは飽和し、天然のミオグロビンではジアゾ酢酸エチルとの反応が律速段階であることが明らかになった。

次にストップトフロー法を用いてジアゾ酢酸エチルとの反応を評価した。天然のミオグロビン、再構成ミオグロビンにおいても顕著な吸収スペクトル変化が確認された。基質の濃度を変化させ、吸収変化から二次速度定数を算出すると、再構成ミオグロビンは天然のミオグロビンに比べて 600 倍ほど反応が加速していることが明らかになった。また再構成ミオグロビンでジアゾ酢酸エチルと反応して得られる化学種にスチレン

を加えると、速やかに休止状態に戻りシクロプロパン化が起こっていることが明らかになった。このことから、得られた化学種が金属カルベン種であることが示された。また天然のミオグロビンでも同様の実験を実施したが、反応は起こらず、生成するカルベン種は速やかに不活性な化学種に変化することがわかった。

天然のミオグロビンと再構成ミオグロビンのジアゾ酢酸エチルに対する反応性の違いを評価するために DFT 計算によりエネルギーイアグラムを見積もった。反応において、金属カルベン種はどちらにおいてもシングレットが最安定であることがわかった。一方で、ポルフィセンはポルフィリンよりも強い配位子であり休止状態では天然ミオグロビンがクインテットであるのに対し、再構成ミオグロビンではトリプレットが再安定であった。このことに起因して、項間交差の少なく、さらにカルベン錯体形成の活性化エネルギーも小さい再構成ミオグロビンでは反応が加速していることが理論的にも支持された。

以上のように、近年盛んに行われているヘムタンパク質によるカルベン錯体経由のシクロプロパン化について、機構的な研究がほとんどされていなかった（本論で述べたように従来では難しかった）が、再構成ミオグロビンを用いて、本分野に一石を投じる結果を得た。今後はタンパク質マトリクスを柔らかな反応場として、さらなる高活性化を実施する予定である。

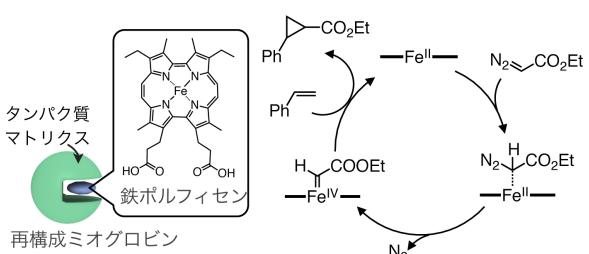


Fig. 1 再構成ミオグロビン（右）と想定される反応機構（左）

引用文献

- [1] a) F. H. Arnold, et al. *Science* **339**, 307-310 (2013). b) R. Fasan, et al. *Angew. Chem. Int. Ed.* **54**, 1744-1748 (2015). c) J. F. Hartwig, et al. *Nature* **534**, 534-537 (2016). d) N. Lehnert et al. *Inorg. Chem.* **56**, 5623-5635 (2017).



業績紹介：アルカンの水酸化反応に触媒活性を示す人工金属酵素の活性種の評価

大洞 光司（大阪大学・A03 公募研究代表者）
林 高史（大阪大学・A03 公募研究連携研究者）

論文題目："Manganese(V) Porphycene Complex Responsible for Inert C–H Bond Hydroxylation in a Myoglobin Matrix"

著者：Koji Oohora, Hiroyuki Meichin, Yushi Kihira, Hiroshi Sugimoto, Yoshitsugu Shiro, Takashi Hayashi
雑誌巻号：*J. Am. Chem. Soc.* **139**, 18460–18463 (2017).

我々のグループでは、本来の補因子であるヘムの代わりにマンガンポルフィセンを含む再構成ミオグロビンが、天然のミオグロビンでは全く活性を示さないアルカンの水酸化に触媒活性を有することを見出している[1]。ミオグロビンの種々の変異体や他の人工補因子を含む再構成ミオグロビンでは触媒活性を示さないのに対し、マンガンポルフィセンのみが触媒活性を示す理由を、中間活性種の評価と共に考察した(Figure 1)。

はじめに、触媒反応の pH 依存性を評価した。過酸化水素を用いてエチルベンゼンの水酸化を pH7.0–9.0 の条件で実施したところ、最も高い触媒回転数は 13 であり、pH8.5 のときであった。次にストップトロー法を用いて、メタクロロ過安息香酸との反応を吸収スペクトル変化により追跡した。2 秒ほどで新たな化学種に変化し、20–40 秒ほどの半減期で反応前の化学種に戻った。この化学種は酸化反応の良い基質である ABTS と速やかに反応することと、EPR 測定により Mn(V) であると帰属された。さらにこの半減期は pH に大きく依存していることがわかり、pH8.5において、最も長い半減期を有することが明らかになった。前述の通り、触媒的な反応においても pH8.5 が最適な pH 条件であったことから、活性種の寿命が触媒回転数に影響していることが強く示唆された。

さらに、この活性種に対して水溶性の基質を反応させることでシングルターンオーバーでの活性種の反応性評価を実施した。基質にはエチルベンゼンスルホン酸ナトリウムを用いて、大過剰の基質を加えたところ、休止状態に変化する吸収スペクトルが観測され、また当量の水酸化生成物を HPLC により確認した。この吸収の時間変化について擬一次反応条件で見かけの反応速度を算出し、その見かけの反応速度を基質の濃度に対してプロットして、25 °C における二次速度定数を

2.0 M⁻¹ s⁻¹ と決定した。さらに基質にトルエンスルホン酸ナトリウムおよびシクロヘキサンスルホン酸ナトリウムを用いて二次速度定数を同様に、0.29 および 0.092 M⁻¹ s⁻¹ と決定した。この速度定数の対数値を C–H 結合の結合解離エネルギーに対してプロットすると負の比例関係が得られた。その傾きは –0.13 であり、C–H 結合の活性化は律速段階の一つになっていることが明らかになった。一方でこの傾きは、これまで報告されている金属錯体の値に比べて緩やかであり、本系の反応性の高さが示唆された。またこの傾きの値は触媒的に反応させて求めた反応速度を基に評価したプロットと同様な値を示したことから、サイクルにおける他のステップ（過酸化水素との反応や生成物の脱離の段階）ではなく、活性種と基質の反応が律速になっていることが明らかになった。

以上のように、小さく単純なタンパク質であるミオグロビンを用いた人工酵素の機構的な研究について、活性種に注目して評価した。特に、通常では寿命が長い化学種は安定、つまり反応性が低く、この点から触媒活性は低いと考えられるが、ミオグロビンを用いた系ではむしろ高すぎる酸化反応活性はタンパク質による還元により速やかに失活すると考察される。これは天然の水酸化酵素であるシトクロム P450 でも提唱されており[2]、マンガンポルフィセンにおいても、水酸化活性を酸化還元電位ではなくオキソ種の塩基性で達成していると考えられる。これらの結果を基盤に、現在さらなる高活性化に向けて研究を実施している。

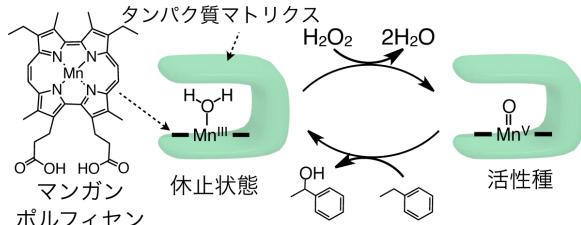


Fig. 1 再構成ミオグロビンによる C–H 結合水酸化と想定される反応機構

引用文献

- [1] K. Oohora, Y. Kihira, E. Mizohata, T. Inoue, T. Hayashi *J. Am. Chem. Soc.* **135**, 17282–17285 (2013).
[2] J. Rittle, M. T. Green, *Science* **330**, 933–937 (2010).



第 25 回ワークショップ開催報告

高橋 聰（東北大多元研・A02 計画研究代表者）
飯野 亮太（岡崎統合バイオ、分子研・A02 公募
研究代表者）

2017 年 9 月 20 日に、熊本大学において第 25 回ワー
クショップ「さまざまな環境下にて発現される生体
分子の柔らかさと機能」を開催しました。本ワー
クショップは、生物物理学会年会における共催シンポジウムとして企画したものであり、100 人以上の聴講者を
集めて活発な議論が交わされました。このワークショ
ップについて報告します。

本ワークショップは、異なる環境における生体分子の運動性の解明を中心テーマとして、分子動力学計算、in cell NMR、高速 AFM、光学顕微鏡観察などの新しい展開を担う研究者に、手法や研究対象についての展望を議論いただくことを目的としました。また、アカデミア・シニカ（台湾）所属の気鋭の若手研究者である Chia-Lung Hsieh 博士を招待し、日本人研究者との議論を通して親交を深めていただくことも目的としました。講演と議論は全て英語で行いました。

はじめに、首都大学東京の伊藤隆教授に講演をいた
きました。in cell NMR は、細胞内におけるタンパ
ク質の構造を原子レベルで観測できる唯一の手法です。
伊藤教授は in cell NMR 測定を可能とする感度向上や
データ解析のための数々の新手法を説明され、細胞中と溶液中におけるタンパク質の構造や安定性の違いを
議論されました。

次に、分子科学研究所の森俊文博士に講演をいた
きました。分子動力学計算の進展により、比較的小さ
いタンパク質であればミリ秒以上の長時間のダイナミ
クスの計算が可能です。森博士は、計算の結果得られる膨大なデータをどのように解釈するかという課題につ
いて、小タンパク質のフォールディングを例に報告され
ました。特に、フォールディング過程の不均一性や遷移状態を乗り越える時間の見積もりなどについて議論を行
いました。

第三に、Chia-Lung Hsieh 博士に講演をいたしました。
Hsieh 教授は膜タンパク質に金ナノ粒子をラベ
ルし、ビーズが発する散乱光を励起光との干渉現象を
用いて高感度検出する iSCAT 法を開発されてきました。
本手法を用いることで驚くほどの感度と位置精度でタンパク質の運動の観察が可能です。この手法の原

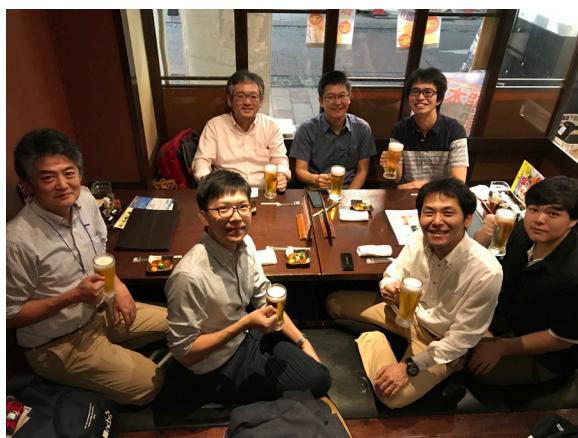
理と応用について説明されました。

第四は、分子科学研究所の安藤潤博士に講演をいた
きました。安藤博士は、アルキン修飾した小分子を用いて、アルキンの高波数のラマン散乱をバイオイメージ
ングや薬剤スクリーニングに応用することを目指して
います。手法の高感度化のために表面増感ラマン効果を組み合わせる取り組みが紹介されました。

第五に、名古屋大学の内橋貴之教授により講演をいた
きました。高速原子間力顕微鏡（高速 AFM）法は生体分子のダイナミクス研究のためにもっとも成功した手
法の一つです。内橋博士は、高速AFM法を Cas9 による DNA 切断機構の解明に用いた研究を発表されま
した。

最後に、ワークショップ企画者の 1 人でもある飯野
亮太教授による講演をいただきました。本講演では、
金ナノ粒子の散乱イメージングを用いてモータータン
パク質等のダイナミクスを高精度で観測した結果につ
いて議論がなされました。

本ワークショップを通じて、さまざまな手法による
生体分子のダイナミクス研究の発展が実感されました。
これには、本新領域研究のこれまでの成果も大きく寄
与しています。一方で、細胞や生体膜など、複雑で多
数の成分により構成される系の理解には、数多くの技
術的な課題が待ち受けています。各手法を掘り下げる
研究者の取り組みと、分野横断的な共同研究の両方が
求められます。また、国内だけでなく海外の研究者との
積極的な連携や共同研究が重要になると考えます。



写真：ワークショップ終了後に Chia-Lung Hsieh 博士
(前列左から二番目) を囲んでさらなる議論を行った。



城塚達也博士（森田 G 博士研究員）茨城大学助教に栄転

森田 明弘（東北大院理・A01 計画研究代表者）

本領域 A01 計画班の森田グループで博士研究員として活躍された城塚達也博士が、茨城大学工学部の助教のポジションを得て栄転されることになりました。城塚さんは 2014 年に私の研究室に博士研究員として加わり、それ以降本グループの界面分光の理論の発展において中心的な役割を果たしてきました。今回その成果を高く評価されて、昇進されたことを心よりお祝い申し上げます。

城塚さんは早稲田大学の出身ですが、京都大学理学研究科の大学院に進学して学位を取りました。大学院時代には谷村教授や安藤准教授（当時）のもとで、水溶液中のプロトン移動や振動ダイナミックスの理論研究をされていました。私とは彼がまだ京大の谷村研の大学院生だった頃に、広島での分子科学夏の学校で初めて知り合いました。私が講師をした界面分光の分科会に参加してくれて、休み時間中にも物おじせずに突っ込んだ質問をしてくれたことを思い出します。学位を取得後にフランスの Ecole Normale Superior の Damian Laage 教授のもとで博士研究員となり、溶液中の振動デコヒーレンスの量子効果の理論研究に従事しました。そこで国際経験と流暢な英語を身につけて、私の研究室に加わりました。

彼は私のグループに加わって、まず振動差スペクトルの理論計算の研究を成し遂げました。[1] 系のなかで一部のみ異なる 2 つのスペクトルの差は、その部分の情報を選択的に取り出す方法として、実験の測定でよく用いられます。しかし理論計算で微小な差スペクトルを解析しようとしても、微小な差を求めるには莫大な統計平均が必要で、実際には困難でした。我々は 2 つのスペクトルを求めて差をとるのではなく、差スペクトルそのものを直接に計算する一般的な理論手法を考案して、この困難をクリアしました。彼はそのプロジェクトにおいて、新たな理論の開発とプログラムの実装を完成させました。開発当初は困難の連続でしたが、持ち前の熱意で成功に導いてくれたのは彼の力です。この成功体験は、私からみても彼にとって大きな財産になったように思います。研究者として独り立ちする自信を身につけ、明らかに成長を遂げたと感じました。

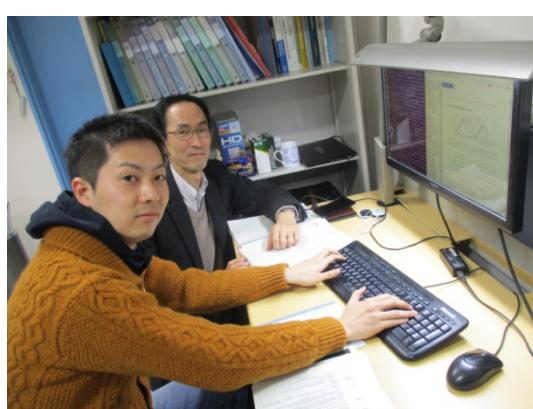
続いて、城塚さんは帶電した界面における SFG 分光法の 3 次の感受率の計算を世界的に初めて成し遂げて明らかにしました。[2] 帯電した界面での SFG は、電極界面やシリカなど多くの固液界面への応用で現れます、そのスペクトル中には帶電の効果が 3 次の寄与として含まれています。彼はその効果を理論計算で曖昧さなく明らかにできることを示し、固液界面の SFG から界面情報を得る解析をきれいに示しました。この成果は本新学術領域の Phys. Chem. Chem. Phys. 特集号で発表され、Hot Article にも選出されました。

（ニュースレター 54 号に掲載予定）

彼は普段から非常に研究熱心で、研究室内の学生からは兄貴分のような、ムードメーカーのような存在でいてくれました。本新学術領域の研究で成果を上げるために、物理化学のコミュニティーの中でも認知を上げていったと思います。最近では周りから目をかけていただいて、若手研究者としていろいろと招待講演にも呼んでいただきましたので、研究者ポジションを獲得するのは時間の問題だと思っておりました。これから独立した後も、理論化学の若手の代表格として、ぜひ活躍していってほしいと願っております。

引用文献

- [1] T. Joutsuka and A. Morita, *J. Chem. Theory Comput.*, **12**, 5026-5036 (2016); *J. Phys. Chem. B*, **120**, 11229-11238 (2016).
- [2] T. Joutsuka, T. Hirano, M. Sprik, and A. Morita, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, DOI: 10.1039/C7CP01978E (2018).



研究室でのディスカッションの様子



A02 班内橋グループの小財稔矢君が 第 55 回日本生物物理学会において学生発表賞を受賞

内橋 貴之 (名古屋大・A02 公募研究代表者)

A02 公募研究代表者・内橋グループ (名古屋大学) の小財稔矢 (金沢大学修士課程 2 年生; 名古屋大学の指導受託学生) 君が平成 29 年 9 月 19-21 日に熊本大学黒髪キャンパスで開催された第 55 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。

日本生物物理学会では、昨年度から学生発表賞を新しく設立し、年会において優れた発表を行った学生会員の顕彰を行っています。本年度は学会初日の午後に口頭発表を行った学生会員の中から 20 名が受賞しました。生物物理学会の年会では発表および質疑応答は英語で行われるため、学生にとって口頭発表はちょっと敷居が高いのか、ポスター発表で選考された昨年に比べ申込者が少なかったようです。昨年は 53 名の受賞者がいましたが、今年は 20 名と半分以下になっていました。

小財君は今回「高速 AFM で明らかにされた α 7 ホモ 14 量体の α 6 による解体過程」という講演題目で発表をおこないました。

真核生物の 20S プロテアソームを構成する α リングは α 1~ α 7 の 7 種類の異なるサブユニットからなるヘテロ 7 量体ですが、 α 7 サブユニットは単独で 14 量体に自己集合することが知られています。この 14 量体は α 7 のホモ 7 量体リングがスタッキングしたダブルリング構造を取っています。これまでに α 7-14 量体が α 6 サブユニットによって 7 量体に解体されることは超分子質量分析と超遠心解析で明らかにされていましたが、そのメカニズムは不明でした。 α 7-14 量体が α 6 サブユニットによってどのように解体されるのか実際に、高速 AFM で観察してみようということで、小財君は学部 4 年生時からこのテーマに取り組み、基板や最適な実験条件を検討して解体過程を可視化することに成功しました。観察の結果、 α 7-14 量体のダブルリング間のスタッキングがさほど密ではなく、数 nm の間隙が過渡的に発生することが分かりました。また、解体された α 7 のリング中心穴と α 6 が結合解離を繰り返し、さらに、時間とともに結合時間が長くなることがわかりました。要するに、 α -ダブルリングのリ

ング間隙に α 6 がグリグリと入り込んでリングを解体し、 α 6 が α 7 のリング中心穴に嵌まり込むことで、リングの再会合を防いでいると考えられます。分子の結合解離をその場観察できる高速 AFM の利点を存分に発揮することができたわかりやすい結果で、小財君の英語発表の特訓成果も相俟って受賞することができたと思います。この成果は論文としても発表し、ニュースレター No.51 にも掲載していただきました。小財君は今年度で修士課程を修了し、春にはスイスバーゼル大学の博士課程入学のために旅立ちます。今回の受賞を励みに、より一層研究に精進し、世界で活躍する研究者に育ってくれるものと期待しています。

また、本生物物理学会では、内橋が高速 AFM 装置のセットアップに協力し、共著者として発表した演題“Loss of Nuclear Pore Selective Barrier Revealed by High-Speed Atomic Force Microscopy in Colorectal Cancer Cells”でも発表者の Mahmoud S. Mohamed (金沢大学博士課程 2 年生) さんが学生発表賞を受容しましたので、あわせて報告いたします。この発表では、高速 AFM によるヒト大腸がん細胞の核膜孔の抗がん剤による核膜孔の形態変化について報告しました。本成果も論文発表されています (ACS Nano 11, 5567-5578 (2017))、ご興味が有る方はご一読頂ければと思います。



懇親会での日本生物物理学会会長 (名工大・神取秀樹先生) との記念撮影。一番手前が小財君。Mohamed さんは残念ながら懇親会に不参加でした。右が後日郵送されてきた賞状です。



Case Western Reserve 大 Palczewski 研究室との国際共同研究報告

片山 耕大(名工大・A03 計画研究連携研究者)
榎本 晓子(名工大・A03 計画研究協力者 M1)

柔らかな分子系における国際共同研究のための研究者派遣・招へい支援制度を利用させていただき、2017年12月5日から9日までハワイで開かれた GPCR workshop2017に参加し、10日から17日までM1の榎本さんとともに米国 Case Western Reserve 大学の Palczewski 教授の研究室で共同実験を行った。

ロドプシンは網膜の桿体細胞に存在する光受容タンパク質であり、我々の暗所視を担う。暗中では不活性状態で安定だが、光を吸収すると発色団であるレチナールが異性化し、タンパク質が構造変化することで活性状態になり、光刺激をシグナル伝達できるようになる。このようにロドプシンは、レチナール結合ポケットの“柔らかさ”を巧みに利用することで、高感度の光吸収を実現している。ロドプシンの変異は時としてその絶妙なバランスを崩し、夜盲症などの視覚障害を引き起す。T94I 変異体は夜盲症の原因として知られているが、その分子メカニズムはわかつていなかった。我々は高精度低温赤外分光法を T94I 変異体に適用することで、レチナール周辺の水分子を含む水素結合環境が野生型とは異なることを見出した。

この仕事を論文化するにあたり、T94I 変異体の G タンパク質活性化能を調べることはきわめて重要になる。そこで私が昨年度まで留学していた米国の Palczewski 研究室との共同研究を行うこととした。手法としては、G タンパク質がロドプシンと相互作用するとトリプトファン (Trp) の蛍光が消光される一方、GTP が結合すると G タンパク質がロドプシンから解離することで蛍光が上昇する現象を利用するものであり、測定そのものは難しくないが、G タンパク質をウシの網膜から大量に単離・精製できるのは Palczewski 研の強みである。

Palczewski 研の博士課程の学生、Sahil Gulati 君は信頼できる共同研究者であるため、当初は T94I 変異体を米国に送ることを考えたが、信号の小さな T94I 変異体の赤外分光データを頑張って測定してくれた榎本さんを実験の現場に立ち会わせたいと考え、本支援制度に申請させていただいた。幸い採択いただき、彼女とともにクリーブランドで活性実験を行うことができた。実験の結果、野生型と比較して T94I 変異体は高い常時

活性（光非依存的な活性）を示すことがわかった。暗状態でのロドプシン活性の増加は光に対する感度の悪化をもたらし、夜盲症の原因となるものと考えられる。榎本さんにとっては暗室で赤ランプのもと、英語のコミュニケーションを行う貴重な経験になったに違いない。現在、日本では赤外分光、米国では G タンパク質活性化に関する論文用のデータ解析中であり、今回の成果は、年内に論文としてまとめたいと考えている。

今回の国際共同研究派遣に際して、私は GPCR workshop2017 に参加し、視物質ロドプシンを含む GPCR (G-protein coupled receptor) の作動メカニズムに関する最新の知見を調査するとともに、"Photocyclic behavior of rhodopsin induced by an atypical isomerization mechanism" (光退色しない視物質ロドプシンのシグナル伝達機構の解明) という題目でポスター発表した。我々の網膜中で光を吸収したレチナールはロドプシンから解離するため（退色）、連続して光が吸収できるよう絶えずレチナールが供給されなければならない。もしレチナールの供給が遅れるとロドプシンが再生されず、網膜疾患につながる恐れがある。今回、私はレチナールの異性化をブロックした合成レチナール（アナログレチナール）を用いることで、光退色しないロドプシンの作成に成功し、このロドプシンが G タンパク質活性化能を維持していることを明らかにした。まさに“柔らかさ”が光に強いロドプシンの作成を可能にしたわけであるが、アナログロドプシンは光情報変換効率が低いという問題もあり、今後の網膜疾患の治療薬開発に向けて様々なディスカッションができた。

最後に、ご支援をいただいた
本新学術領域の
関係者の方々に
この場をお借り
して深く御礼申
し上げます。



暗室実験する榎本さん、Gulati
君 @ Case
Western Reserve
大学