

生物物理関東地区研究会

プログラム・要旨集



会期：2013年3月4日（月）・5日（火）

会場：東京農工大学小金井キャンパス・11号館5階会議室（L1153）

## 生物物理関東地区研究会（第2回生物物理関東支部研究会）へのお誘い

皆様の昨年のご協力が実って、今年は、生物物理学会の運営委員会から認められ、生物物理の関東支部会を正式開催することになりました。

研究会のスタイルは、全員で1つの発表をじっくり聞くというものです。時間の短いA発表と時間の長いB発表のどちらかを選ぶことができます。ある程度まとまった話をじっくり議論したい場合はB発表を、予備的な話だが反応を見たいとか、学生のトレーニングの機会としたいなどの場合はA発表を選ぶのがよいかもしれません。もちろん、学生さんがB発表に申し込んでいただくのも歓迎します。

事務局：東京農工大学・大学院工学研究院・生命工学専攻  
太田善浩 Email: ohta @cc.tuat.ac.jp

日 時：3月4日（月）10：30～・5日（火）10：00～

（初日は第一発表20分前、二日目は10分前から受付を開始）

懇親会：3月4日：17:30～19:30

場 所：東京農工大学小金井キャンパス・140周年記念会館（エリプス）3階会議室

参加費：事前申し込み3000円（学生0円）懇親会金額 3000円（学生2000円）

当日申し込み4000円（学生1000円）懇親会金額 3000円（学生2000円）

懇親会費は準備の関係3月4日13：30までにお支払い下さい

それ以降ご参加の方は会場で懇親会費を頂きますので事前に連絡を下さい

参加資格：生物物理に興味がある人（生物物理の学会員であるかどうかは問いません）

## 参加者へのご案内

- 発表形式：日本語による口頭発表（外国の方は英語も可）、液晶プロジェクター使用

A 発表：講演 7 分・質疑応答 3 分

B 発表：講演 15 分・質疑応答 10 分

以下の通りベルを鳴らします。タイムキーパーは座長が務めます。

ベル 1 回：講演時間終了、質疑応答開始

ベル 2 回：質疑応答終了

時間厳守で講演を進めてください。次に発表する方は前の発表が終わり次第、速やかにパソコンの接続準備等をしてください。

- 各自パソコンをご持参ください。

パソコンを持ち込まれる際のご注意

※会場のプロジェクターとお持ち込みのパソコンとの接続は **D-sub15** ピンとなります。付属のコネクターが必要な場合、お忘れなくご持参ください。

※バッテリー切れに備え、必ず電源アダプターをお忘れなくご持参ください。

※発表中にスクリーンセーバーや省電力モードにならないよう、設定してください。



パソコン側（メス）



接続ケーブル側（オス）

- 事務局で予備のパソコンを用意します。（仕様：OS:Windows7/パワーポイント 2003）上記仕様に対応するパワーポイント資料を **USB** にてご持参ください。

- 昼食はエリプス、大学生協食堂・パンショップがご利用になれます。

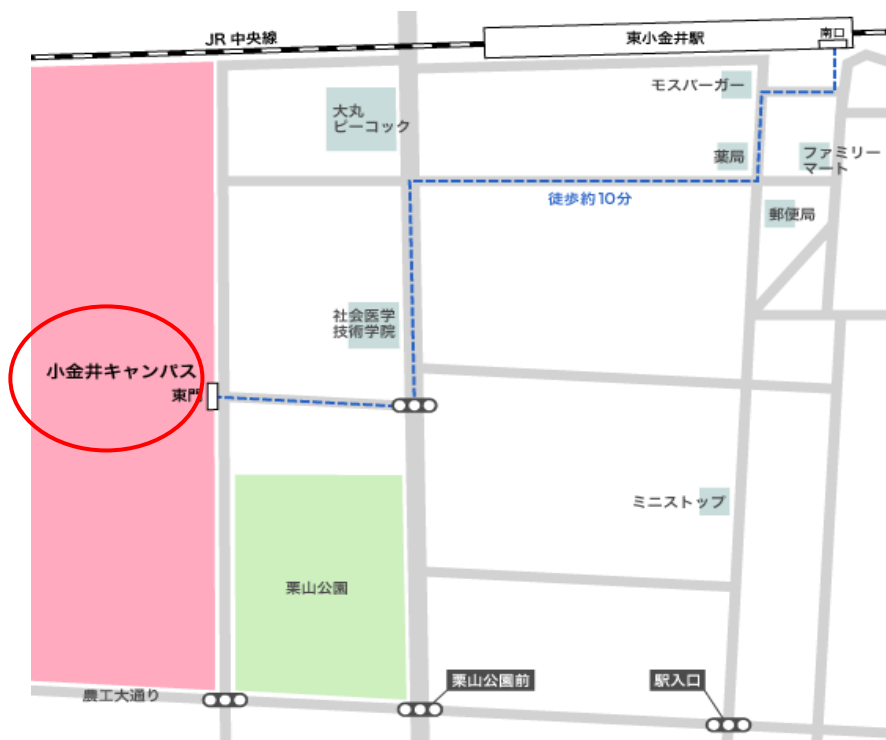
春休み営業です：エリプス 11：00～14：00、食堂 11：30～13：30

- 会場内に無線 LAN でインターネットの接続が可能です。無線 LAN 接続に必要な **ESSID**、**WEP** キー、**認証 ID**、**パスワード** は当日お知らせいたします。

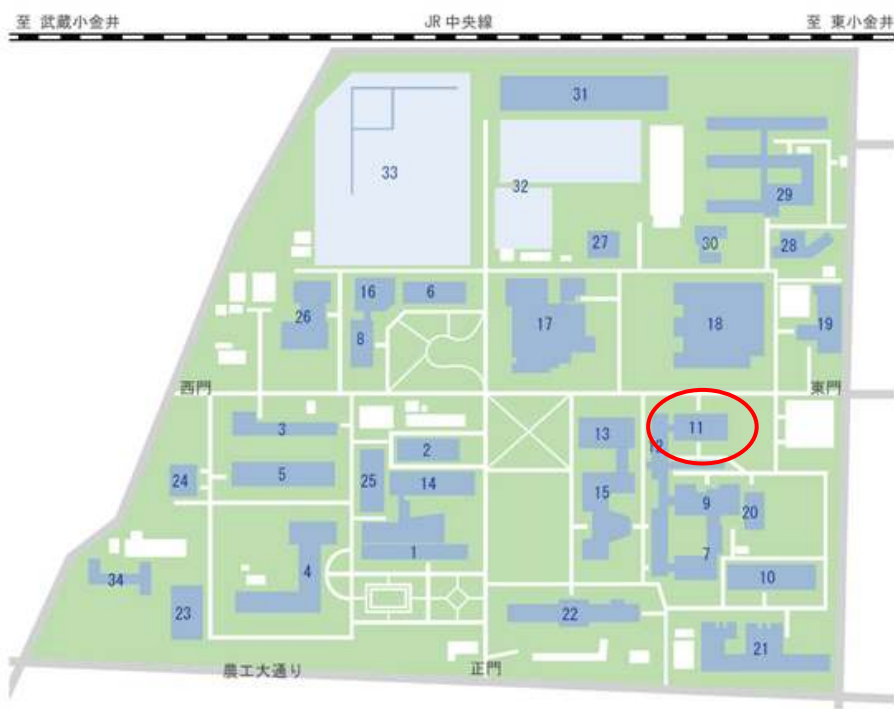
交通及び会場のご案内

交通案内：JR 中央線「東小金井駅」下車、徒歩約 10 分

➤ 住所：184-8588、東京都小金井市中町 2-24-16



キャンパス案内：11号館5階会議室



## プログラム

2013年3月4日(月)

座長 由良 敬(お茶の水女子大学・生命情報学教育研究センター)

諏訪 牧子(青山学院大学・理工学部)

### 【4AM1】10:35~11:55

- ① サポートベクターマシン(SVM)を用いたヘリカルリンカー領域の予測(10分) p.8  
鈴木 涼祐(東京農工大学・工学部・生命工学科)
- ② 多数ペプチド系の全原子分子動力学シミュレーションを用いた凝集の解析(10分) p.8  
佐藤 雄士(東京農工大学・工学部・生命工学科)
- ③ タンパク質の二次構造と糖鎖修飾の相関(10分) p.9  
越中谷 賢治(明治大学・理工・電気電子生命)
- ④ GPI修飾要因の検討および修飾位置予測法の確立(25分) p.9  
田中 大貴(明治大学・大学院・電気工学専攻)
- ⑤ GPCR-G タンパク質の選択的結合に寄与する構造領域(25分) p.10  
諏訪 牧子(青山学院大学・理工学部)

～ 昼 食 ～

座長 田端 和仁(東京大学・大学院工学系研究科・応用化学専攻)

貝塚 芳久(独立行政法人 物質・材料研究機構)

### 【4PM1】13:00~14:25

- ① ミトコンドリアの一時的脱分極の細胞内における誘導と観察(10分) p.10  
海内 寛嗣(東京農工大学・工学部・生命工学科)
- ② Cyclophilin D の PPIase 活性によるミトコンドリアの質と量の変化(10分) p.11  
小林 明日香(東京農工大学・工学部・生命工学科)
- ③ DNAを回転子を持つ新規回転分子モーターの創製(10分) p.11  
岩本 康甫(東京大学・工学部)
- ④ FoF1-ATP合成酵素のFoモーターの構造対称性を反映したステップ回転の計測(10分) p.12  
森泉 芳樹(東京大学・工学部・応用化学科)
- ⑤ 1分子蛍光観測による次世代リニアモータータンパク質セルラーゼのセルロースへの吸脱着ダイナミクスの解明(10分) p.12  
柴藤 祐介(東京大学・大学院 工学系研究科)
- ⑥ RasGTP/GDP交換因子 Sosの一分子解析を用いたRas/Sos positive feedback機構の解明(10分) p.13  
中村 由樹(大阪大学・大学院生命機能研究科)
- ⑦ 細胞膜の分子組織化とシグナル伝達制御(25分) p.14  
貝塚 芳久(独立行政法人 物質・材料研究機構)

～ 休 憩 ～

座 長 赤沼 哲史 (東京薬科大学・生命科学部)

鳥越 秀峰 (東京理科大学・理学部)

**【4PM2】 14 : 35～15 : 45**

- ① システインを含むタグ配列と溶解性向上タグ配列の挿入による GLuc リフォールディングへの影響 (10 分) p.15  
鈴木 郁也 (法政大学・生命科学部)
- ② ガウシアルシフエラーゼのスクリーニングによる改変 (10 分) p.15  
Wu Nan (東京農工大学・工学府・生命工学専攻)
- ③ T4 ファージのアンチホーリンはホーリンの重合を阻害することで溶菌阻止を引き起こす (25 分) p.16  
金丸 周司 (東工大・院・生命理工)
- ④ 分子クラウディング環境における出芽酵母テロメア DNA 配列の 4 本鎖 DNA 構造とテロメア結合蛋白質との相互作用 (25 分) p.16  
鳥越 秀峰 (東京理科大学・理学部)

～ 休 憩 ～

座 長 吉村 英恭 (明治大学)

大友 未央 (創価大学工学部)

**【4PM3】 15 : 55～17 : 20**

- ① 球殻状タンパク質への酸化チタンの導入 (10 分) p.17  
仲村 龍一郎 (明治大学・理工学部・生物物理第三研究室)
- ② 球状タンパク質を鋳型とした希土類蛍光体ナノ粒子の作成 (25 分) p.17  
原田 知明 (明治大学)
- ③ フェリチンを用いたナノ粒子の 2 次元結晶化 (25 分) p.18  
引地 祐介 (明治大学・大学院)
- ④ 時間分解 X 線小角散乱法によるアポフェリチン・アセンブリ機構の研究 (25 分) p.18  
佐藤 大輔 (創価大学・工学研究科)

17 : 30～19 : 30

～ 懇 親 会 ～

2013年3月5日(火)

座長 小松崎 良将 (日本大学・理工学部・物理学科)

太田 善浩 (東京農工大学・大学院工学研究院)

**【5AM1】 10:00~11:25**

- ① 老化による海馬の性ステロイド合成系の変化 (25分) p.19  
吉田 広太郎 (東京大学・総合文化研究科)
- ② モノアラガイの味覚嫌悪条件付けに伴う GABA 神経の関与 (10分) p.19  
加藤 功弥 (日本大学・理工学部物理学科)
- ③ 海馬神経シナプスに及ぼすストレスホルモンの効果 (25分) p.20  
池田 宗樹 (東京大学・総合文化研究科)
- ④ 海馬スパインにおけるアンドロゲンとエストロゲンの効果 (25分) p.20  
吉屋 美雪 (東京大学・総合文化研究科)

～ 休 憩 ～

座長 園山 正史 (群馬大学大学院・工学研究科・応用化学生物化学専攻)

**【5AM2】 11:35~12:20**

- ① NAD<sup>+</sup>のアデニン環と相互作用する非極性アミノ酸残基の置換による好熱菌由来グルコース脱水素酵素の低温高活性化 (10分) p.21  
柳生 一樹 (東京薬科大学・生命科学部)
- ② 等温滴定型熱量計による大腸菌由来多剤輸送担体 EmrE の基質結合様式の解析 (25分) p.21  
下野 和実 (東邦大学・薬学部)
- ③ 触媒部位改変と人工基質を用いた F1-ATPase のトルク発生機構の解明 (10分) p.22  
湯川 絢子 (東京大学・工学部・野地研究室)

～ 昼 食 ～

座長 内藤 晶 (横浜国立大学・大学院工学研究院)

鈴木 悠 (東京農工大学・大学院)

**【5PM1】 13:30~14:35**

- ① 新規部分フッ素化リン脂質に再構成したバクテオロドプシンに対するアシル鎖のフッ素化の影響 (25分) p.22  
吉野 賢 (群馬大学・大学院)
- ② 光照射固体 NMR によるバクテリオロドプシンの光励起過程における局所構造変化の解析 (10分) p.23  
重田 安里寿 (横浜国立大学・工学部)
- ③ *In situ* 光照射固体 NMR による光受容膜タンパク質 ppR / pHtr II 複合体の光活性状態の解明 (10分) p.23  
楨野 義輝 (横浜国立大学・工学部)
- ④ 光照射固体 NMR による光受容膜タンパク質 SrSRI の光反応過程と光中間体の構造解析 (10分) p.24

内藤 晶 (横浜国立大学・大学院工学研究院)

- ⑤ 家蚕液状絹の溶液 NMR 構造解析 (10 分)

p.24

鈴木 悠 (東京農工大学・大学院)

～ 休 憩 ～

座 長 加藤 薫 (産業技術総合研究所)

太田 善浩 (東京農工大学・大学院工学研究院)

**【5PM2】 14 : 45～16 : 05**

- ① 核内構造体の運動メカニズムの解析 (細胞核内を動く粒子の運動解析) (25 分)

p.25

内堀 そよみ (筑波大・大学院 (産総研))

- ② 細胞分裂時のミトコンドリア膜電位のモニタリング (10 分)

p.25

蛭崎 琴絵 (東京農工大学・工学部・生命工学科)

- ③ F1-ATPase の協同的 ATP 結合能を利用したリニアモーター化の試み (10 分)

p.26

城所 柊朋 (東京大学・工学部・野地研究室)

- ④ 腸内連鎖球菌由来 V1-ATPase の 1 分子回転観察 (10 分)

p.26

皆川 慶嘉 (東京大学・工学系研究科・応用化学専攻)

- ⑤ ミトコンドリアの屈折率と機能の相関 (25 分)

p.27

長谷田 圭亮 (東京農工大学・工学府・生命工学専攻)

～ 終 了 ～



座長 由良敬（お茶の水女子大学・生命情報学教育研究センター）

諏訪牧子（青山学院大学・理工学部）

【4AM1】10：35～11：55

### ① サポートベクターマシン(SVM)を用いたヘリカルリンカー領域の予測

○ 鈴木涼祐<sup>1)</sup>、蝦名鉄平<sup>2)</sup>、黒田裕<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> 農工大・工・生命工、<sup>2)</sup> 理化学研究所・BSI

構造未知タンパク質のドメイン領域をそのアミノ酸配列から予測する手法、特に配列特徴が単純で検出の容易なドメイン境界を対象とする予測法は、その予測効率の高さから新規ドメインの同定に大きく貢献してきた。しかし、予測機構築の学習データとして利用するドメイン境界の多くがループ構造を取る事から、従来の方法ではヘリックス構造をもつ境界領域（ヘリカルリンカー）の予測は困難であった。そこで本研究では、ヘリカルリンカーに特化した学習データセットの構築および、この領域を対象とした予測機の開発を目指す。はじめに、SCOP から取得した多ドメインタンパク質を対象にドメイン境界とドメイン領域の残基間相互作用を算出し、ドメイン領域と相互作用を持たない独立したヘリカルリンカーを同定した。次に、ヘリカルリンカーの配列特徴を RandomForest と Stepwise Selection 法によって決定し、これを SVM による同領域の予測法開発に利用した。結果、開発した予測法の検出感度、精度は48%で、ランダムに予測した場合（12%）よりも高い予測効率となった。これにより、既存の予測機では対応できなかったヘリカルリンカー領域予測が可能となった。

### ② 多数ペプチド系の全原子分子動力学シミュレーションを用いた凝集の解析

○ 佐藤雄士<sup>1)</sup>、末永敦<sup>2)</sup>、秋山沙織<sup>1)</sup>、黒田裕<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> 東京農工大学工学部生命工学科、<sup>2)</sup> 産業技術総合研究所 生命情報工学研究センター

現在、凝集の物理化学的解析はアミロイド形成の解析が中心で、非アミロイド系の凝集に焦点を絞った解析は極めて少ない。そこで本研究ではアミノ酸側鎖の違いが非アミロイド系の凝集に与える影響を分子レベルで解析することを目的として10種類の4残基のモデルペプチド（ILE<sub>4</sub>、VAL<sub>4</sub>、ARG<sub>4</sub>、LYS<sub>4</sub>、ALA<sub>4</sub>、ASP<sub>4</sub>、ASN<sub>4</sub>、GLU<sub>4</sub>、GLN<sub>4</sub>、SER<sub>4</sub>）の分子動力学シミュレーションを行った。各モデルペプチドを27分子、一辺が約104Åの立方体の内に配置し、約30,000個の水分子で系を満たした。50ナノ秒のシミュレーションから分子会合（クラスター）をペプチドの原子間距離から定義し、クラスター形成の挙動を解析した。ILE、VAL、ASN、GLNでは大きなクラスターが形成され、ALA、ARG、LYS、ASP、GLU、SERではほとんどが単量体もしくは2~3量体の小さなクラスターしか形成しなかった。その中でも、ARGはシミュレーション時間中殆どの分子が単量体で存在し、逆にILEは大きなクラスターを安定的に形成していることから、「水に溶けないアミノ酸」という性質が裏付けられた。以上の結果から、親水性や疎水性といったペプチドの性質によって凝集性を分子レベルで解析できる可能性が示された。

### ③ タンパク質の二次構造と糖鎖修飾の相関

○越中谷賢治、池田(向井)有理

明大院・理工・電気電子生命

近年、第3の生命鎖とされている糖鎖に注目が集まっている。生体内には糖鎖修飾を受けた糖タンパク質や糖脂質などが数多く存在し、これらがシグナル伝達系や機能活性、細胞骨格形成などの生命現象に深く関わっている。生合成されたタンパク質は、ゴルジ体に移行後、糖転移酵素による修飾を受け、Thr / Ser 残基に糖鎖を付加される。ところが、必ずしも全ての Thr/Ser 残基が修飾されるとは限らず、糖転移酵素による選択性が存在すると推測される。そこで本研究では、ゴルジ体で主に行われる O 結合型糖鎖修飾について、二次構造と糖鎖修飾との相関性抽出を目的とした。まず、データベースより糖鎖修飾位置周辺の配列、3次元座標を入手し、付加されている糖ごとに分類した。次に、抽出した3次元座標情報を元に、露出度や二次構造について位置特異的出現傾向を算出し、糖の種類との相関性を抽出した。その結果、糖の種類に依存した二次構造の出現が確認された。また、露出度の傾向から、フォールディング前に糖鎖修飾を受けていることが考えられ、糖鎖修飾が二次構造形成に関与している可能性が推測された。

### ④ GPI 修飾要因の検討および修飾位置予測法の確立

○田中大貴<sup>1</sup>、小西達也<sup>1</sup>、佐々木貴規<sup>1,2</sup>、池田有理<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>明大院・電気、<sup>2</sup>明大・理工・電気電子生命

真核生物の生命活動に本質的な翻訳後修飾に糖脂質 GPI がある。GPI は小胞体内でタンパク質の特異的なアミノ酸 ( $\omega$ -site) に結合する。GPI と結合したタンパク質は GPI アンカー型タンパク質 (GPI-anchored protein, GPI-AP) とよばれ、細胞膜表面に局在化することがわかっている。GPI-AP の研究の進展は、真核生物の生命活動や、難治疾患の分子メカニズムの解決に役立つと考えられている。しかし、未知の GPI-AP が多く存在しているため、新規 GPI-AP の同定及び GPI 修飾メカニズムの解明が急務とされている。我々はこれまでに、機械学習を用いた方法で、未知 ORF から高精度に GPI-AP を判別する方法を確立してきた。本研究では、 $\omega$ -site 及び周辺のアミノ酸出現傾向を調べることにより、GPI 修飾要因の検討、および修飾位置予測法の確立を試みた。 $\omega$ -site が存在する C 末端側の配列の疎水性スクリーニングを用いてデータセットを生成し、位置特異的アミノ酸出現頻度を計算した。さらに、位置特異的アミノ酸出現頻度より算出されたスコアをニューラルネットワークに適用し、4 分割交差検定を行った。その結果、精度、選択性ともに 95%を超える精度で予測することが可能となった。また、 $\omega$ -site の決定要因についても調査した。

## ⑤ GPCR-G タンパク質の選択的結合に寄与する構造領域

○諏訪 牧子<sup>1,3</sup>、Ana-Nicoleta Bondar<sup>2</sup>、杉原 稔<sup>3</sup>

<sup>1</sup>青山学院大学 理工 化学生命、<sup>2</sup>FB Physik, Freie Universität Berlin、<sup>3</sup>産総研 CBRC

G タンパク共役型受容体 (GPCR) が細胞外からのリガンド分子と結合した後、細胞内側の G タンパク質を活性化させ、シグナル伝達を行う一連のメカニズムを解明することを目的とする。まず 48 生物種の 1272 本の GPCR 配列より、GPCR 全体で保存される構造領域を抽出したところ、リガンド結合部位から細胞質へ向う”小道“(Path-ドメインと命名)が見出された。GPCR のモデルとして知られるロドプシンに於いて結合 G タンパク質種が異なる 2 つのロドプシン(ウシとイカ)の立体構造で Path-ドメインに沿った領域の安定性を分子動力学法で解析ところ、両者で Path-ドメイン周囲の水素結合ネットワークと細胞質側ループの塩結合に重要な差異がみられた。また天然の G-タンパク質は、ウシロドプシンの Arg135 と相互作用して最安定になったが、他タイプの G タンパク質に変えた場合は、元の構造から大きく外れた。以上の結果は、Path-ドメイン周囲の領域での構造安定性の差異が G タンパク質結合選択性に関連する可能性を示唆している。

座長 田端和仁(東京大学・大学院工学系研究科・応用化学専攻)

貝塚芳久(独立行政法人 物質・材料研究機構)

【4PM1】13:00~14:25

## ① ミトコンドリアの一時的脱分極の細胞内における誘導と観察

○海内 寛嗣、太田善浩

東京農工大・工学部・生命工学科

**背景・目的:** ミトコンドリアは活性酸素種(ROS)を発生させる主要な細胞内器官である。高濃度の ROS は細胞にダメージを与えるため、ミトコンドリアで過度に ROS を発生させない機構は、生物にとって重要だと考えられる。我々は、単離ミトコンドリアを用いて、ミトコンドリアの一時的脱分極がマトリックスのプロトン不足を防ぐことで ROS の発生を抑制することを見出してきた。本研究では、細胞内でマトリックスのプロトン不足を誘導し、同様の脱分極が生じるか検証した。

**方法:** ラット心臓横紋筋由来の細胞株 H9c2 を用い、膜電位変動の頻度を計測した。マトリックスのプロトン不足は、細胞にオリゴマイシン (FoF1-ATP 合成酵素阻害剤) を添加することで誘導した。ミトコンドリアの膜電位変動は、ミトコンドリアを膜電位感受性蛍光色素 TMRE で染色することで検出した。

**結果:** ミトコンドリアの脱分極頻度はオリゴマイシンの添加により上昇したが、脱共役剤 CCCP を作用させると低下した。この結果は、細胞内においても、マトリックスのプロトン不足は一過性脱分極を誘導することを示唆している。

## ② Cyclophilin D の PPIase 活性によるミトコンドリアの質と量の変化

○小林 明日香、中里 眸、大崎 光、太田善浩

東京農工大学・工学部・生命工学科

**背景・目的：**Cyclophilin D(CypD)は、ミトコンドリアマトリクスに存在するプロリン異性化酵素である。CypD は、疾病やネクロシスへの関与は多く調べられているが、細胞の生理機能に及ぼす影響は不明であった。そこで、本研究は細胞の生理機能に及ぼす影響を調べることを目的とした。

**方法：**ラット C6 glioma 細胞とアストロサイトで、野生型 CypD の過剰発現株、酵素活性欠損 CypD (R97A) 過剰発現株、及びベクターコントロール細胞株を樹立し、それらのエネルギー代謝を、乳酸生成速度、呼吸速度、細胞内 ATP 量、ミトコンドリアタンパク量を比較した。

**結果：**C6 glioma 細胞では、野生型 CypD の過剰発現株では R97A 過剰発現株と比べて呼吸速度が大きく、乳酸生成速度が低かった。ミトコンドリア電子伝達系の阻害剤ロテノンの存在下では、両者とも同程度の乳酸生成速度を示した。また、ミトコンドリアの蛋白質量は、R97A 過剰発現株のほうが野生型過剰発現株より大きかった。このことから、CypD がミトコンドリアのピルビン酸代謝活性を質的に上昇させていることがわかった。

## ③ DNA を回転子を持つ新規回転分子モーターの創製

○岩本康甫<sup>1</sup>、飯野亮太<sup>2</sup>、山内里紗<sup>2</sup>、内橋貴之<sup>3</sup>、野地博行<sup>2</sup>

<sup>1</sup>東京大・工学部、<sup>2</sup>東京大・院・工学系研究科、<sup>3</sup>金沢大・理工研究域

F<sub>1</sub> は ATP を加水分解しながら一方向に 120° ステップして回転する分子モーターである。固定子 α<sub>3</sub>β<sub>3</sub> に対して回転子 γ が回転するとき α<sub>3</sub>β<sub>3</sub> と γ は界面で特異的に相互作用している。これまでこの相互作用が F<sub>1</sub> の一方向の回転に不可欠であると考えられてきた。しかし高速 AFM を用いた実験でその説は覆され、α<sub>3</sub>β<sub>3</sub> だけでも 3 つの触媒サブユニット β は一方向性の回転触媒を示すことが明らかになった。そこで回転子を他の物質に置き換えた F<sub>1</sub> でも一方向に回転できるという仮説を立て、DNA を回転子を持つ新規回転分子モーターの創製に取り組んだ。正電荷を持つアミノ酸残基で α<sub>3</sub>β<sub>3</sub> の一部を置換し、静電相互作用による DNA 導入を試みた。DNA はリングの内側と共有結合させた。吸光度を用いた計算と SDS-PAGE、高速 AFM の 3 つの結果から α<sub>3</sub>β<sub>3</sub> 変異体への DNA 挿入を確認した。金ナノロッドをプローブとして 1 分子観察したところ、3 箇所では停止しながら前後に確率的に回転する分子が見つかった。明確な一方向性を持つ分子はまだ見つかっていない。

#### ④ F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATP 合成酵素の F<sub>0</sub>モーターの構造対称性を反映したステップ回転の計測

○森泉芳樹<sup>1</sup>、渡邊力也<sup>1</sup>、田端和仁<sup>1</sup>、野地博行<sup>1</sup>

<sup>1</sup> 東京大学・工・応用化学科

F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATP 合成酵素 (F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>) は、ATP の加水分解エネルギーを利用してプロトン輸送と共役した回転運動を行う。そのメカニズムを解明すべく F<sub>0</sub>F<sub>1</sub> の一分子回転観察実験が行われてきた。3 回対称構造を持つ F<sub>1</sub> の 120° ステップ回転は既に計測されているが、10 回対称構造を持ちプロトン輸送を担う F<sub>0</sub> の律速ステップ回転は計測されていない。その原因として挙げられるのは観察系の角度分解能が悪い点と、今までの観察系が生理的条件と異なる界面活性剤を含んだ系であったために必ずしもプロトン輸送と共役していない点である。そこで本研究では、サポート膜に、大腸菌由来の F<sub>0</sub>F<sub>1</sub> (EF<sub>0</sub>F<sub>1</sub>) よりも構造ゆらぎの小さい好熱菌由来の F<sub>0</sub>F<sub>1</sub> (TF<sub>0</sub>F<sub>1</sub>) を再構成した系で回転計測を試みた。低濃度 ATP 存在下で結合律速のステップ回転を観測し、停止時のゆらぎから系の硬さを見積もると EF<sub>0</sub>F<sub>1</sub> の約 2 倍の硬さが示された。そして高濃度 ATP 存在下で観察した結果、10 回対象のステップ回転の計測に成功した。今後は H<sup>+</sup>輸送との共役に関して解析を進めていく。

#### ⑤ 1 分子蛍光観測による次世代リニアモータータンパク質セルラーゼのセルロースへの吸脱着ダイナミクスの解明

○柴藤祐介<sup>1</sup>、中村彰彦<sup>2</sup>、五十嵐圭日子<sup>2</sup>、野地博行<sup>1</sup>、飯野亮太<sup>1</sup>

<sup>1</sup> 東大院工・応用化学、<sup>2</sup> 東大院農・生物材料科学

【背景】セルロース等のバイオマスはバイオエタノールの原料として期待されている。しかしながら分解処理の困難さが有効利用の障壁となっており、セルロースを温和な条件で分解できるセルラーゼが注目されている。

【目的】セルラーゼはセルロースを分解しながら運動する新しいリニアモーターであることが明らかになっているが、作動機構の詳細は明らかでない。本研究では、1 分子観察によってセルラーゼの作動機構を明らかにする。

【方法】1 分子蛍光計測に適した Cys 導入セルラーゼ変異体を作製・発現・精製し、蛍光色素 Cy3 で標識した(標識率 90%)。カバーガラスに固定したセルロースへのセルラーゼの吸脱着を TIRFM で観察した。

【結果】Cy3 標識セルラーゼのセルロース分解活性の保持と結晶性セルロースへの特異的な結合を確認した。セルラーゼの結合持続時間の分布から、短い結合と長い結合が存在することが明らかとなった。具体的には、I<sub>a</sub> 型セルロースおよび III 型セルロースからの解離の時定数には、1.2 s と 8.6 s および 1.4 s と 7.1 s の二成分が存在した。これらは、セルロースの分解を伴わない結合と分解を伴う結合であると考えられた。

## ⑥ RasGTP/GDP 交換因子 Sos の一分子解析を用いた Ras/Sos positive feedback 機構の解明

○中村由樹<sup>1,3</sup>、日比野佳代<sup>2</sup>、佐甲靖志<sup>3</sup>

<sup>1</sup>大阪大学大学院生命機能研究科、理化学研究所 <sup>2</sup>生命システム研究センター <sup>3</sup>基幹研究所

Small GTPase Ras は、Epidermal Growth Factor (EGF) による細胞増殖を制御している重要な因子の1つである。Ras 活性化は、結合する GDP が GTP に交換される事によって起こり、この GDP/GTP 交換反応を促進するタンパク質の1つが Son of sevenless (Sos) である。これまで in vitro 計測から、活性化型 Ras-GTP が増えると、Sos の REM ドメインと Ras-GTP の相互作用を介して、Ras の GDP/GTP 交換反応が促進されて Ras がより活性化する positive feedback 機構の存在が示唆されている。しかし、生細胞内での positive feedback 機構の作用機序は明らかでない。

これを解決する為、全反射蛍光顕微鏡を用いて蛍光ラベルした Sos を HeLa 細胞内で一分子観察し、EGF 刺激前後での野生型 Sos の膜からの解離反応キネティクスを構築した。次に positive feedback 機構が Sos の膜局在に与える影響を調べる為に、positive feedback に必須である Ras-GTP との結合能を欠損した変異体 (REM 変異体) の解離反応キネティクスを解析し、野生型と比較した。その結果、REM ドメインと Ras-GTP との相互作用が Sos の膜滞在の持続に寄与する事が示唆された。一方、REM 変異体は、刺激後の Sos の膜局在を長時間維持しなかった。以上から、positive feedback 機構は細胞内で機能しており、その役割は Sos の膜滞在を EGF 刺激後長時間持続させる事が分かった。また、野生型では細胞ごとに positive feedback の強さが異なり反応性に個性があった事から、今後は Sos の feedback loop に注目して細胞の個性を議論したい。F<sub>1</sub> モーターは ATP 加水分解を駆動力として回転するタンパク質分子モーターである。先行研究により、加水分解の各反応素過程で反応速度及び平衡定数が回転角度に応じて変化することが判明した。それにより各反応素過程の平衡定数の角度依存性から、その素過程のトルクへの寄与を推算することは出来たものの、その関係の実験的な検証は為されていない。一方で、固定子と回転子の間で強く相互作用する DELSEED 領域と呼ばれる部位の残基をグリシンにすることで、野生型 F<sub>1</sub> に対して反応速度は変化せずトルクが約半減する変異体 F<sub>1</sub> が谷川原によって発見された。本研究では、その変異体 F<sub>1</sub> を用いて ATP 結合・解離及び ATP 加水分解・合成の平衡定数の角度依存性を調べている。ATP 結合・解離については、ATP 結合速度定数の角度依存性は野生型 F<sub>1</sub> と変わらないが、ATP 解離速度定数の角度依存性が大きく失われていた。その結果、平衡定数の傾きが小さくなり、ATP 結合過程で発生するトルクが減少したことが明らかとなった。現在は ATP 加水分解・合成について検証を進めており、その最新の状況も合わせて報告する。

## ⑦ 細胞膜の分子組織構造とシグナル伝達

○貝塚芳久, Gabriela Furlan, Li Huang

独立行政法人 物質・材料研究機構

細胞膜のタンパク質がドメイン構造を形成してシグナル伝達を行う様子が、多くの細胞系・シグナル系で観察されている。本研究で例とする免疫細胞（T細胞）ではリガンドと結合したレセプターが細胞膜上でドメイン構造を形成すると同時にリン酸化されてシグナルを伝達する。T細胞のレセプターには酵素活性は無く、そのリン酸化はキナーゼのLCKと脱リン酸化活性を持つフォスファターゼCD45により制御されることが知られるが、どのようにリン酸化がトリガーされるのか、その分子機構は未だにわかっていない。最近の研究ではレセプターのドメイン・クラスター化に伴い、これらのシグナル分子も同様に組織構造化されてシグナル伝達を制御することが示唆された。このT細胞膜における分子組織構造による生化学反応の制御機構を細胞イメージングと生化学実験で解析・検証する研究について紹介する。

座長 赤沼哲史(東京薬科大学・生命科学部)

鳥越秀峰(東京理科大学・理学部)

【4PM2】14:35~15:45

① システインを含むタグ配列と溶解性向上タグ配列の挿入による GLuc リフォールディングへの影響

○鈴木郁也<sup>1</sup>、今井清博<sup>1</sup>、黒田裕<sup>2</sup>

<sup>1</sup>法政大学・生命科学部、<sup>2</sup>東京農工大学工学部生命工学科

生物発光を触媒するルシフェラーゼの一種に、海洋性カイアシ類 *Gaussia princeps* 由来のもの (*Gaussia* Luciferrase, GLuc) がある。GLuc はレポーター蛋白質への応用が期待されているが、その配列に 10 個ものシステイン (Cys) が含まれており、天然型ジスルフィド結合を形成するのが難しく、大腸菌を宿主とした可溶性画分での発現が難しい。先行研究で、GLuc の C 末端に溶解度向上タグを付加することで、封入体形成を低下できることが示されている (Tharangani et al, BBA Proteins and Proteomics, 2011)。本研究では、自然界の GLuc に Cys を含む分泌シグナル配列が N 末端にあることから、その Cys が GLuc の巻き戻りを促進させると考え、可溶化タグに加えて N 末端に Cys を含む人工的なタグ配列を組み込み、リフォールディング効率への影響を調べた。その結果、タグ配列を両末端に付加した GLuc は、発現誘導後に、野生型の GLuc に比べて、不溶性画分へ落ちる割合が低下していることが示された。また、逆相 HPLC、発光活性においても、野生型のものと同様の結果が得られた。以上の結果は、C 末端に付加したタグ配列が溶解度を向上させると同時に、N 末端の Cys が非天然型 S-S 結合の組換えを促進し、GLuc が天然構造へ巻き戻る効率を増加させた為と考えられる。

② ガウシアルシフェラーゼのスクリーニングによる改変

○WuNan、上岡哲矢、黒田裕

東京農工大学工学部生命工学専攻

今まで知られているルシフェラーゼの中で最も小さい酵素であるガウシアルシフェラーゼ (Gluc) の発光活性は他のルシフェラーゼ (Fluc, Rluc) より数倍強いことが報告されている。しかし、微生物を宿主とした大量発現が難しいことや Gluc の立体構造が未知であるため、発光活性部位に変異を導入して活性を改良することが難しく、レポータータンパク質としてはまだあまり普及していない。Gluc の実用に向けて、発光色 (波長) が野生型のものとは異なる変異体を作製することは重要な課題である。本研究では Gluc の発光機能を改変した変異体を同定することを目的とし、スクリーニング実験を行った。ランダム変異は、Swiss-Prot に対するホモロジー検索と親水性領域で保存性が中程度の配列領域から、発光活性に関わると推測したアミノ酸 4 残基をランダムプライマーを用いて変異させた。ランダム変異を導入したプラスミドをスクリーニングした [鋳型には緑の発光色を持つ *Monsta* 変異体 (2011, Kim et al, Anal Chem) を利用した]。その結果、発光強度が二倍増加した変異体と、最大波長が 3 nm 赤色偏移した変異体を同定した。今後は、この方法を用いて、Gluc をさらに改変し、色が変わる変異体を作製する。



### ③ T4 ファージのアンチホーリンはホーリンの重合を阻害することで溶菌阻止を引き起こす

○金丸周司、伊藤悠太、有坂文雄

東工大・院・生命理工

T4 ファージの溶菌は、ホーリン(gp t)が内膜上で会合して環状の穴を形成し、その穴を通してリゾチーム(gp e)がサイトプラズムからペリプラズムに移行し、ペプチドグリカン分解するため起きると考えられている。しかし、最初の感染から10分以内に重複感染させると溶菌するまでの時間が数時間遅延する溶菌阻止現象が起こる。溶菌阻止は、T4 ファージのアンチホーリン(gp rI)が、重複感染のシグナルを受け取り、gp tと相互作用することで起きていると考えられている。本研究では、溶菌阻止のメカニズムを解明することを目的として、gp t、gp rIの相互作用部位と考えられるC末端ペリプラズムドメイン(以下gp t<sup>CTD</sup>、gp rI<sup>CTD</sup>)に着目し、これらの相互作用解析を行った。その結果、gp t<sup>CTD</sup>とgp rI<sup>CTD</sup>を混合すると2:2の複合体を形成し、gp t<sup>CTD</sup>の凝集・沈殿を抑制することが分かった。gp t<sup>CTD</sup>の凝集は、感染時に起こるgp tの会合による内膜上の穴の形成と関連づけられ、今回の結果は、gp rIがgp tに結合し、複合体を形成することでgp tの会合を抑制し、溶菌を防いでいることを示唆している。

### ④ 分子クラウディング環境における出芽酵母テロメア DNA 配列の4本鎖 DNA 構造とテロメア結合蛋白質との相互作用

今崎麻里、久保周太郎、野村祐介、○鳥越秀峰

東京理科大・理

真核生物の染色体末端のテロメア DNA は G 塩基に富む反復配列を有し、4本鎖 DNA 構造を形成する。4本鎖 DNA 構造は、G 塩基4個が水素結合を介して同一平面に環状に配置した G-quartet が積み重なった構造であり、Na<sup>+</sup>や K<sup>+</sup>存在下で形成する。脊椎動物由来などの完全に規則的な繰り返し単位を有するテロメア DNA の4本鎖は十分に解析されているが、出芽酵母や分裂酵母由来の不完全な繰り返し単位を有するテロメア DNA の4本鎖は未解析である。本研究は、出芽酵母由来のテロメア DNA 配列の4本鎖を150 mM K<sup>+</sup>存在下で解析し、4本鎖とテロメア結合蛋白質の相互作用も解析した。

いずれのテロメア DNA も分子内4本鎖を形成した。また、出芽酵母テロメア結合蛋白質 Cdc13 は4本鎖をほどく活性を有した。細胞内で様々な分子が凝縮する分子クラウディング環境は、希薄緩衝液にポリエチレングリコール200を添加すると擬態化できる。この環境下で、4本鎖の構造安定性は上昇し、Cdc13が4本鎖をほどく活性は低下した。以上より、K<sup>+</sup>が多量に存在する細胞核で4本鎖が安定に形成され、テロメア結合蛋白質で4本鎖はほどかれにくいと考えられた。

座長 吉村英恭（明治大学）  
大友未央（創価大学・工学部）

【4PM3】15：55～17：20

### ① 球殻状タンパク質への酸化チタンの導入

○仲村龍一郎<sup>1</sup>、吉村英恭<sup>1</sup>

<sup>1</sup>明治大

空気や水などへの浄化作用が期待される光触媒の開発を目標とし、光触媒として酸化チタンナノ粒子の作製を目指す。フェリチンと呼ばれる外径 13 nm, 内径 7 nm の球殻状のタンパク質を用いてその内部に酸化チタンナノ粒子を作製する。フェリチンの 2 次元で六方最密に配列するという性質を利用して酸化チタンの反応できる表面積の拡大を目指す。

MOPS(pH7.5) 100 mM, fer0 0.5 mg/ml, シュウ酸ナトリウム 0.25 mM, チタンエトキシド 0.5 mM, HCl 0.5 mM を一晩反応させた。透過型電子顕微鏡を用いて観察すると、フェリチン内に粒子が確認できた。

しかし、フェリチン内に取り込まれた粒子がかなり少ないためか元素分析でチタンは確認されないため、より多くのチタンをフェリチン内に取り込むことが課題である。

### ② 球状タンパク質を鋳型とした希土類蛍光体ナノ粒子の作成

○原田知明<sup>1</sup>、吉村英恭<sup>1</sup>

<sup>1</sup>明治大・院

蛍光体ナノ粒子は、白色 LED、ディスプレイ、分子マーカーとしての応用が期待されている。そこで多種のミネラル化に成功している、7 nm の空洞内を持つ球状タンパク質フェリチンを鋳型として使用し、その空洞内に均一な径の希土類蛍光体ナノ粒子の作成をした。赤色蛍光体としては、Eu<sup>3+</sup> をドーピングした Y<sub>2</sub>O<sub>3</sub>、緑色蛍光体としては、Tb<sup>3+</sup> をドーピングした Y<sub>2</sub>O<sub>3</sub> に着目した。イットリウム硝酸塩とユウロピウムまたはテルビウム硝酸塩を、フェリチンが入った MOPS (pH 7.0) 溶液中に入れることにより作成した。透過型電子顕微鏡(TEM)により、ナノ粒子がフェリチン空洞内で形成されたことを確認した。高分解能 TEM 像により、5%の結晶と 95%のアモルファス粒子であることが観測された。エネルギー分散型 X 線分析により、それぞれの元素の特異的ピークが得られ、混合物であることが確認された。電子線回折により、フェリチン内に形成された結晶性の粒子から、Y<sub>2</sub>O<sub>3</sub> の回折パターンが得られた。そして、赤色蛍光体ナノ粒子からは、Eu<sup>3+</sup>由来の、590, 614 nm の蛍光と、緑色蛍光体からは、Tb<sup>3+</sup>由来の、488, 543, 581 nm の蛍光が確認された。

### ③ フェリチンを用いたナノ粒子の2次元結晶化

○引地祐介<sup>1</sup>、吉村英恭<sup>1</sup>

<sup>1</sup> 明治大学大学院

電子デバイスは近年ますます小型化、高性能化しており、さらなる発展のためには数ナノサイズでの微細加工技術が必要となっている。そこで、フェリチンを用いることで数ナノサイズのナノパターンの作製を試みている。フェリチンは直径 13 nm の球状タンパク質で内部に 7 nm の空洞を持っている。空洞内には最大で 7 nm の金属ナノ粒子を形成することができる。そのためナノ粒子を内部に形成したフェリチンの2次元結晶を作製することで、ナノ粒子の配列パターンを得ることができる。

最も大きな2次元結晶は、強磁性体である Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 内包フェリチン 8.75 µg/ml、ヘキシルアミン 200 個/ferritin、HEPES(pH8.0) 0.5mM、の溶液 3 µl を 4 mm×4 mm の親水表面 Si 基板に滴下して 4℃で乾燥することにより得られた。ヘキシルアミンを加えることにより、フェリチンと Si 基板およびフェリチン間の相互作用が最適化され大きな2次元結晶ができるようになった。現在の2次元結晶は 1 µm 四方程度であるため、さらに大きな2次元結晶を作製することを目指している。

### ④ 時間分解 X線小角散乱法によるアポフェリチン・アセンブリ機構の研究

○佐藤大輔<sup>1</sup>、砂戸歩美<sup>1</sup>、大友秀明<sup>1</sup>、井上正義<sup>1</sup>、山田好輝<sup>2</sup>、藤原和夫<sup>1</sup>、中川香奈子<sup>1</sup>、池口雅道<sup>1</sup>

<sup>1</sup> 創価大学、<sup>2</sup> JASRI/SPring-8

生体内にはサブユニットが多数結合して形成される超分子構造体が数多く存在する。例として、フェリチン、Dps、ウイルス・キャプシド、Vault、GroEL、などがある。これら超分子複合体のアセンブリメカニズムを明らかにすることは非常に興味深い。

本研究の目的は、大腸菌 Non-heme ferritin (Ftn) のアセンブリメカニズムを明らかにすることである。Ftn は 24 量体の球殻状タンパク質である。酸性 pH で 2 量体に解離し、中性 pH に戻すことで 24 量体へリアセンブリ可能なことが分かっている。

酸性解離した Ftn 溶液と高 pH の緩衝液を混合することでリアセンブリを開始し、時間分解 X線小角散乱法で追跡した。

Ftn のリアセンブリ速度は pH に依存し、測定した範囲では (pH 6.4 - 8.0) pH が低いほど速くなった。初速度法により、反応次数を見積もるためにリアセンブリ速度のタンパク質濃度依存を測定した。律速段階の反応次数を見積もったところ、2-3 次となった。この結果より、アセンブリ中間体は 4 量体か 6 量体のいずれか、もしくは両方であることが分かった。

座長 小松崎良将（日本大学・理工学部・物理学科）  
太田善浩（東京農工大学・大学院工学研究院）

【5AM1】10：00～11：25

## ① 老化による海馬の性ステロイド合成系の変化

○吉田広太郎、川戸佳

東京大学総合文化研究科広域科学専攻

老化によって、記憶・学習などの認知機能が低下することはよく知られている。だがその根拠となる事象は定かではないのが現状である。また、最近では性ホルモンと認知機能の関係が注目されているが、老化によって精巣・卵巣などの内分泌器官から脳に運ばれる性ホルモンの低下が、認知機能の低下に関与しているというのが従来の考え方であった。しかし、本研究室の先行研究により、海馬内では、性ステロイドを独自に合成しており、その働きが注目されている。本研究では、海馬が合成する性ステロイドに着目し、老化によってどのような影響が現れるのかを調べた。

若齢として3ヶ月齢、老齢として24ヶ月齢のオスラットの海馬を使用し、比較した。その結果、性ステロイド合成系では、P450(17 $\alpha$ )、17 $\beta$ -HSD3、5 $\alpha$ -reductase2がいずれも発現量が減少した。性ステロイド受容体では、男性ホルモン受容体であるARと、女性ホルモン受容体であるER $\beta$ がいずれも発現量が減少した。また、性ステロイド濃度では、男性ホルモンであるテストステロン、ジヒドロテストステロンが激減し、女性ホルモンであるエストラジオールも減少した。

この結果により、老化によって海馬内の性ステロイド合成系の発現量が減少することが、海馬内の性ステロイド濃度の減少に関与していることが示唆された。また、海馬内性ステロイド濃度の減少と性ステロイド受容体の発現量の減少が、記憶・学習などの海馬機能の低下に関与することも示唆された。

視床下部・大脳皮質・小脳 の解析しており、結果は海馬と異なる様相を示すので、併せて紹介する。

## ② モノアラガイの味覚嫌悪条件付けに伴う GABA 神経の関与

○加藤 功弥<sup>1</sup>、小松崎 良将<sup>2</sup>

<sup>1</sup>日本大・院・理工学、<sup>2</sup>日本大・理工・物理

軟体動物モノアラガイは11個の神経節を含む中枢神経系を持ち、味覚嫌悪学習などの連合学習をすることが知られている。モノアラガイに嗜好性味覚物質を与えると活発な咀嚼運動を示すが、味覚嫌悪条件付けされた味覚刺激を与えると、その咀嚼運動は長期にわたり抑制される。この咀嚼運動を調節するニューロンCGC(cerebral giant cell)は、エサの味覚刺激に応じてスパイク活動が増加し、食餌行動(咀嚼運動)を促す。本研究では、条件付けされた個体のCGCのスパイク活動を電気生理学的手法により測定し、記憶形成に伴う影響を調べた。

味覚嫌悪学習では、条件刺激としてショ糖、無条件刺激として塩化カリウム(忌避物質)を与えた。この後、条件刺激に対する嗜好性を咀嚼回数で測ることにより、学習効果を定量的に評価した。学習を

行ってから 24 時間後に、モノアラガイの中樞神経系を単離し、CGC に微小ガラス電極を刺入して、その細胞内電位を記録した。

連合学習が成立した群、不成立群、未学習群に対してのそれぞれの脳に GABA (GABA を投与すると咀嚼運動が昂進する) を投与した。その結果、学習成立群のみ GABA により CGC のスパイク活動が抑制されることが分かった。

### ③ 海馬神経シナプスに及ぼすストレスホルモンの効果

○池田宗樹、川戸佳

東京大学総合文化研究科広域科学専攻

コルチコステロン(CORT)はストレス刺激後、視床下部→下垂体→血中への ACTH 分泌に応答して副腎皮質から大量に分泌される。

本研究では CORT による、神経スパイン密度と形態への急性的な (1 時間以内の) 影響を、海馬スライスを用いたスパイン可視化解析により明らかにした。取り出した海馬スライスに 100-1000nM の CORT を投与したところ、CA1 錐体細胞のスパイン密度が急性的に増加することがわかった。スパインの頭部直径別にみると、middle-head (頭部直径 0.4-0.5 $\mu\text{m}$  の) スパイン密度は 400-1000nM の CORT によって増加した。large-head (0.5-1.0 $\mu\text{m}$  の) スパイン密度は 1000nM の CORT によってのみ増加した。グルココルチコイド受容体(GR)の阻害剤を同時に投与すると、CORT による影響は消失した。MAPK, PKA, PKC, PI3K などのリン酸化酵素を阻害することにより、CORT によるスパイン新生の効果は抑制された。これらの結果は、CORT が、シナプス上の GR と複数のリン酸化経路を介してスパイン新生を引き起こすことを示唆している。

### ④ 海馬スパインにおけるアンドロゲンとエストロゲンの効果

○吉屋 美雪、川戸 佳

東京大学大学院・総合文化・広域科学

樹状突起スパインはシナプス後部であり、海馬神経の記憶の貯蔵部位である。我々は既に、性ホルモンは海馬でも合成されていることを示した。今回は、シナプス可塑性について、テストステロン (T), ジヒドロテストステロン (DHT), エストラジオール (E2) の急性作用に焦点を当て、その効果を検討した。成獣海馬ラット脳スライスに性ステロイドを作用させ、単一神経細胞に蛍光色素を注入し可視化した。共焦点レーザー顕微鏡を用いて 3D イメージを取得し、数理解析ソフト Spiso-3D を用いて単一スパインの解析を行った。T, DHT, E2 を 2 時間作用させた結果、海馬の CA1 領域においてスパイン密度 (約 1.0 spines/ $\mu\text{m}$ ) がコントロール群に比べ 1.3 倍に増加した。またそれぞれの性ステロイドはスパイン頭部直径において異なる効果を示すことが分かった。次に、性ステロイドの下流シグナルを検討するためキナーゼ阻害剤を作用させた。その結果、PKA, PKC, MAPK がスパインの増加に関与していることが分かった。これらのことから、性ステロイドはシナプス中の受容体→キナーゼ→アクチン重合→シナプス増加を生じさせていることが示唆された。

座長 園山正史（群馬大学大学院・工学研究科・応用化学生物化学専攻）

【5AM2】11：35～12：20

① NAD<sup>+</sup>のアデニン環と相互作用する非極性アミノ酸残基の置換による好熱菌由来グルコース脱水素酵素の低温高活性化

○柳生一樹<sup>1</sup>、下田有希子<sup>1</sup>、赤沼哲史<sup>1</sup>、山岸明彦<sup>1</sup>

<sup>1</sup>東京薬科大学・生命科学部

好熱菌由来酵素の高い安定性は工業利用に適している。しかし、低温での活性が低いという欠点もある。本研究では、NAD(H)のアデニン環と相互作用する非極性アミノ酸を他のアミノ酸に置換することで、いくつかの好熱菌脱水素酵素の低温活性の改善に成功した。本研究では、補酵素のアデニン環と相互作用する非極性アミノ酸の置換が、超好熱菌 *Sulfolobus tokodaii* 由来グルコース脱水素酵素（GDH）の低温活性に与える影響を解析した。*S. tokodaii* 由来 GDH のアデニン環と相互作用する非極性アミノ酸を置換した I189V 変異体と V254I 変異体を作製した。反応速度論解析の結果、*S. tokodaii* 野生型 GDH と比較して、I189V 変異体の 25°C における  $k_{cat}$  値は 1.1 倍、10°C では 1.3 倍に上昇した。V254I 変異体はさらに大きく低温活性が改善され、10°C における  $k_{cat}$  値が野生型酵素の 2 倍であった。10～80°C における  $k_{cat}$  値から活性化エネルギーを算出したところ、I189V 変異体（69 KJ/mol）、V254I 変異体（62KJ/mol）ともに野生型 GDH（71 KJ/mol）よりも小さい値を示した。この結果から、アデニン環と相互作用する非極性アミノ酸の置換が、様々な好熱菌由来脱水素酵素に有効な汎用的な低温高活性化設計法である可能性が高いことがわかった。

② 等温滴定型熱量計による大腸菌由来多剤輸送担体 EmrE の基質結合様式の解析

○下野和実<sup>1,2,3</sup>、森喜郎<sup>2</sup>、奈良敏文<sup>4</sup>、染谷友美<sup>3</sup>、白水美香子<sup>3</sup>、横山茂之<sup>3</sup>、宮内正二<sup>1</sup>

<sup>1</sup> 東邦大・薬・薬物動態、<sup>2</sup> 松山大・薬・薬剤、<sup>3</sup> 理研・生体分子システム基盤研究、<sup>4</sup> 松山大・薬・生物物理

【目的】EmrE は、脂溶性カチオンを排出するプロトン共役型多剤輸送担体である。本研究では、荷電性アミノ酸残基の基質結合における役割を明らかにするために、野生型及び変異 EmrE と基質（tetraphenyl phosphonium ion、TPP<sup>+</sup>）との結合認識機構を等温滴定型熱量計（ITC）により解析した。【方法】界面活性剤（ジギトニン）と大腸菌極性脂質を共存させた無細胞合成系を用いて EmrE を大量合成し、可溶化精製試料を ITC 測定に用いた。【結果・考察】イオン化熱が異なる緩衝液での測定から基質結合の駆動力を解析した結果、野生型では、pH 増加に伴いエンタルピー（ $\Delta H$ ）駆動からエントロピー（ $\Delta S$ ）駆動型結合へと変化した。ある残基が脱プロトン化していると、 $\Delta S$  駆動型結合となると考えられる。pH6.5 で算出された放出 H<sup>+</sup>数から E14D の Asp14 は、脱プロトン化状態と考えられるが、基質結合は、野生型と同様に  $\Delta H$  駆動型であった。E25Q では、pH7.4 において  $\Delta H$  の寄与が小さくなった。従って、Glu25 が、基質結合を駆動するエネルギー変化に関与していると考えられる。本講演では、これらの知見から EmrE の基質輸送分子機構について議論したい。

### ③ 触媒部位改変と人工基質を用いた F<sub>1</sub>-ATPase のトルク発生機構の解明

○湯川絢子<sup>1</sup>、松陰悠希<sup>2</sup>、岩立竜<sup>3</sup>、渡邊力也<sup>4</sup>、神谷真子<sup>3</sup>、浦野泰照<sup>3</sup>、野地博行<sup>4</sup>

<sup>1</sup>東大・工・応用化学、<sup>2</sup>阪大院・工・生命先端工学、<sup>3</sup>東大院・医・生体物理医学

<sup>4</sup>東大院・工・応用化学

F<sub>1</sub>-ATPase (F<sub>1</sub>) は ATP 加水分解反応を駆動力として回転するタンパク質分子モーターである。ATP が F<sub>1</sub> の触媒部位である β サブユニットに結合すると、induced-fit 型の構造変化が起こり、トルクが発生する。ATP は塩基、リボース環、リン酸の 3 部位から構成され、塩基はトルク発生に積極的に寄与しないことが示唆されているが、リボース環・リン酸と触媒部位の相互作用がトルクに与える影響は明らかにされていない。従って基質のどの部位がトルク発生に重要かは未だ解明されていない。そこで、触媒部位 β とリン酸との静電相互作用を除去した F<sub>1</sub>(8K164A) 変異体 (8K164 : p-loop のリジン残基) の作製及び、ATP の塩基を除去した人工基質 RTP (ribose-triphosphate) の合成を行い、1 分子観察を行った。F<sub>1</sub> (8K164A) 変異体は極めて低速だが反時計方向に回転し、野生型に比べ基質結合定数は約 1/10<sup>5</sup> 倍、トルクは約 1/4 倍となった。また RTP を基質とすると、1 方向に回転した F<sub>1</sub> が見つかった。その結果から概算された結合定数は、ATP の結合定数の約 1/10<sup>5</sup> 倍となったが、トルクの大きな減少は見られなかった。従って、リン酸はトルク発生に重要であるが、塩基は基質結合のみに重要で回転駆動には影響を及ぼさないことが示唆された。

座長 内藤晶 (横浜国立大学・大学院工学研究院)

鈴木悠 (東京農工大学・院・生命工)

【5PM1】 13 : 30 ~ 14 : 35

### ① 新規部分フッ素化リン脂質に再構成したバクテリオロドプシンに対するアシル鎖のフッ素化の影響

○吉野 賢<sup>1</sup>、菊川 峰志<sup>2</sup>、高木 俊之<sup>3</sup>、高橋 浩<sup>1</sup>、横山 泰範<sup>4</sup>、網井 秀樹<sup>1</sup>、馬場 照彦<sup>3</sup>、金森 敏幸<sup>3</sup>、園山 正史<sup>1</sup>

<sup>1</sup>群馬大・院工、<sup>2</sup>北大・院生命科学、<sup>3</sup>産総研、<sup>4</sup>名大・院工

両親媒性分子へのフッ素原子の導入は、形成する分子集合体の高い剛直性や生体分子との相互作用を弱くするなど特徴的な性質をもたらすことが知られている。高木らは含フッ素リン脂質を膜タンパク質研究へ応用することを目標に、種々の部分フッ素化脂質群を設計・開発した。本研究ではリン脂質ジミリストイルホスファチジルコリン (DMPC) の 2 本の疎水鎖末端ブチル基水素を全てフッ素に置換した、新規部分フッ素化ホスファチジルコリン (diF4H10-PC) を用いて、膜タンパク質バクテリオロドプシン (bR) の再構成を行い、その構造・機能を解析した。脂質膜のゲル・液晶相転移に伴い二次元結晶の融解の起きる DMPC 小胞中の bR に対し、diF4H10-PC 小胞中の bR はゲル相、液晶相共に三量体構造を保ち、天然紫膜と類似の挙動を示した。また、DMPC と diF4H10-PC の混合脂質膜中に再構成を行った場合、混合膜中で bR は DMPC 膜に選択的に取り込まれた。これは bR と diF4H10-PC の相溶性の低さによることが示唆された。

## ② 光照射固体 NMR によるバクテリオロドプシンの光励起過程における局所構造変化の解析

○重田安里寿<sup>1</sup>、宮佐亮太<sup>2</sup>、堀籠美也子<sup>2</sup>、川村 出<sup>2</sup>、沖津貴志<sup>3</sup>、和田昭盛<sup>3</sup>、辻 暁<sup>4</sup>、内藤 晶<sup>2</sup>  
<sup>1</sup>横浜国大・工、<sup>2</sup>横浜国大・院・工、<sup>3</sup>神戸薬大、<sup>4</sup>兵庫県立大・院・理

バクテリオロドプシン(BR)は高度好塩菌の紫膜に存在する光駆動型プロトンポンプ機能を持つ膜タンパク質である。光照射により all-*trans* (AT)は K, L, M, N, O 中間体を経て AT に戻り、この間 H<sup>+</sup>を細胞外に輸送する。一方 13-*cis*, 15-*syn* (CS)は別の中間体を経て AT に変化すると考えられている。本研究では特に CS の光励起過程の解明を目的とする。測定では、[1-<sup>13</sup>C]Tyr-, [<sup>15</sup>N]Pro-, [15, 20-<sup>13</sup>C]Retinal BR に 520 nm の光を照射し、20°Cと-20°Cにおいて Dark→Light→Dark(D2)の過程の <sup>13</sup>C CP-MAS スペクトルを測定して、レチナールとタンパク質の構造変化を解析した。

まず、20°Cで光照射することにより、暗順応状態(AT (13 ppm) : CS (22 ppm) = 1:1)から明順応状態(AT)に変化した。次に-20°Cで、光照射すると CS の信号強度が減少し、AT の位置と異なる位置(19 ppm)にピークが成長した。この結果は CS とは別の 13-*cis* 型の光中間体(C\*)に変化したことを示している。次いで、光照射を切り D2 状態にすると C\*のピークは6時間以内に AT に変化した。

以上の結果から、光照射により CS から直接 AT に変化するのではなく、C\*を経由して AT に変化することがわかった。タンパク質側の[1-<sup>13</sup>C]Tyr-の NMR 信号の変化について観測した結果、C\*状態では random coil から  $\alpha$ -helix への大きな構造変化が観測された。

## ③ *In situ* 光照射固体 NMR による光受容膜タンパク質 ppR / pHtr II 複合体の光活性状態の解明

○榎野 義輝<sup>1</sup>、友永雄也<sup>2</sup>、柴藤祐介<sup>1</sup>、日高徹朗<sup>2</sup>、川村 出<sup>2</sup>、沖津貴志<sup>3</sup>、和田昭盛<sup>3</sup>、須藤雄気<sup>4</sup>、加茂直樹<sup>5</sup>、内藤 晶<sup>2</sup>  
<sup>1</sup>横浜国大・工、<sup>2</sup>横浜国大・院・工、<sup>3</sup>神戸薬大、<sup>4</sup>名古屋大・院・理、<sup>5</sup>北海道大・院・薬

ppR はレチナールを発色団に持つ 7 本膜貫通型の光センサー膜タンパク質であり、固有の transducer タンパク質である 2 本膜貫通型の pHtr II と生体膜中で 2 : 2 の複合体を形成する。pHtr II は ppR からの信号を受け取り下流に伝達し、光活性状態で負の走光性を示す。本研究ではこの複合体の光活性状態の構造変化を解明することを目的とする。

ppR の retinal 光異性化反応と pHtr II のタンパク質構造変化を同時に観察するために、*E.coli* BL21 株を用いて、[15-<sup>13</sup>C, 20-<sup>13</sup>C]retinal 標識 ppR 及び[1-<sup>13</sup>C] Val, [2-<sup>13</sup>C] Gly, [3-<sup>13</sup>C] Ala 標識 pHtr II (1-159) をそれぞれ発現させ、Egg-PC 脂質膜に 1 : 1 のモル比で再構成した。NMR 測定は独自に開発した *in situ* 光照射固体 NMR を用いて 520 nm の光照射下で行った。

その結果、ppR の活性状態である M 中間体の生成による [20-<sup>13</sup>C]retinal の <sup>13</sup>C NMR 信号変化を観測し、複数の M 中間体の存在が明らかになった。また、[3-<sup>13</sup>C]Ala-pHtr II の観測により、活性状態の M 中間体の生成に伴い、 $\alpha$ -ヘリックス構造を示す信号が減少し、ランダムコイル構造を示す信号が増加する大きな化学シフト変化を観測した。

これらの結果より ppR/pHtr II 複合体は光活性状態で複数の中間体を取り、信号が pHtr II に伝わり膜貫通領域で大きな構造変化が起きることが判明した。



#### ④ 光照射固体 NMR による光受容膜タンパク質 SrSRI の光反応過程と光中間体の構造解析

○内藤 晶<sup>1</sup>、四方田洋紀<sup>2</sup>、槇野義輝<sup>2</sup>、友永雄也<sup>1</sup>、日高徹郎<sup>1</sup>、川村 出<sup>1</sup>、沖津貴志<sup>3</sup>、和田昭盛<sup>3</sup>、須藤雄気<sup>4</sup>

<sup>1</sup>横浜国大・院・工、<sup>2</sup>横浜国大・工、<sup>3</sup>神戸薬大、<sup>4</sup>名古屋大・院・理

SrSRI(Salinibacter ruber sensoryrhodopsin I)は真正細菌由来のロドプシンであり、正と負の光走性機能をもつ光受容膜タンパク質である。光を照射することにより、K,L,M-中間体を経て元に戻る光反応回路に加えて、2光子吸収により、M-から P-中間体を経て元に戻る光反応過程が存在する。この光反応経路や中間体の構造の詳細を明らかにする目的で、新規に開発した光照射固体 NMR により光中間体を観測する研究を行った。SrSRI は大腸菌発現系に[20-<sup>13</sup>C]retinal を加えて発現し、P G膜に再構成して測定試料とした。光照射固体NMRはLEDから発生した2波長の光(365 nm, 520 nm)を光ファイバーで固体NMR分光器に導入した条件でCP-MAS法により固体NMRスペクトルを観測した。G-状態で520 nmのLED光を照射したところ、13.8 ppmに観測されていた20-<sup>13</sup>C NMR信号が19.8 ppmに移動したことからM-中間体(13-cis, 15-anti, 脱プロトン)に変換されたことが判明した。このM-中間体に365 nmのLED光を照射したところ、今度は24.8 ppmに信号が移動したことから、2光子過程を経てP-中間体(13-cis, 15-anti)に変換したことが判明した。さらに、G-状態に365 nmのLED光を照射したところ、直接P-状態に励起される1光子過程の存在が本実験で初めて明らかになった。

#### ⑤ 家蚕液状絹の溶液 NMR 構造解析

○鈴木悠<sup>1</sup>、山崎俊正<sup>2</sup>、朝倉哲郎<sup>1</sup>

<sup>1</sup>東京農工大・院・生命工、<sup>2</sup>農業生物資源研

**【背景】**1950年にX線回折により提案された家蚕絹フィブロインの繊維化前構造(Silk I構造)は、モデルペプチドを用いた固体NMR測定によりtype II  $\beta$ -turnの繰り返し構造と決定されたが、実際の環境である水溶液中では、いまだSilk I構造の観測されていない。そこで本研究では、溶液NMR測定を用いて中部絹糸腺に蓄えられた液状絹中のSilk I構造の発現に関する構造解析を行った。

**【結果・考察】**帰属はTOCSY, NOESY, <sup>15</sup>N HSQC, HNCQ, HCACOスペクトルを用いて行い、家蚕絹フィブロインに特徴的な繰り返しモチーフであるGAGXGAGA(X=S, Y, V)GAAS配列について、各残基の<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, <sup>15</sup>Nの化学シフトが得られた。そこで、二面角値予測プログラムtalos+を用い各モチーフの二面角値を求めた結果、GAGXGAGA(X=S, Y, V)配列において、type II  $\beta$ -turnの二面角値と極めて近い値が繰り返された。一方、GAAS配列はランダムコイルと推定された。<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H NOESYからもこの結果を支持するシグナルが得られた。

座長 加藤薫 (産業技術総合研究所)  
太田善浩 (東京農工大学・大学院工学研究院)  
【5PM2】14:45~16:05

### ① 核内構造体の運動メカニズムの解析 (細胞核内を動く粒子の運動解析)

○内堀そよみ<sup>1,2</sup>、廣島通夫<sup>3</sup>、三松沙織<sup>1,2</sup>、倉持麻衣子<sup>1,2</sup>、小島亜矢子<sup>1,2</sup>、小林恵美子<sup>1,2</sup>、佐甲靖志<sup>3</sup>、加藤薫<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>筑波大院・生命環境、<sup>2</sup>産総研・バイオメディカル、<sup>3</sup>理研・佐甲細胞情報研

細胞核は遺伝情報の集積の場である。DNAの遺伝情報はmRNAに転写され、細胞質へ運ばれ、タンパク質が合成されるが、細胞核内部の物質の輸送は、拡散に依るとされ、能動的運動が存在する証拠は得られていない。

我々の研究室では特殊な位相差顕微鏡を用いて、細胞周期によって振る舞いを変える、未同定の核内粒子可視化することに成功し、解析を進めてきた。本研究では、核内粒子の運動をコンピュータを用いてトラックし、数値解析した、核内粒子の運動が、従来から報告のある『拡散』か、分子モーターのような方向性のある『方向性のある運動』か、検討したので報告する。

### ② 細胞分裂時のミトコンドリア膜電位のモニタリング

○蛭崎 琴絵、太田善浩

東京農工大・工学部・生命工学科

**背景・目的：**細胞分裂時には、細胞のエネルギー供給源であるATPは多量に消費されると考えられるので、その生産・消費バランスや生産調節機構は細胞にとって重要だと考えられる。そこで本研究では、細胞分裂時のエネルギー状態に関する基礎的知見を得ることを目的として、細胞分裂時のミトコンドリア膜電位をモニターした。

**方法：**C6 glioma 細胞を対象に、細胞分裂中のミトコンドリアの膜電位の変化を膜電位感受性蛍光色素であるTMREで観察した。更に、観察された変化がミトコンドリアの膜電位の変化によることを確認するために、GFPをC6 glioma 細胞のミトコンドリアに発現させ、細胞分裂時の輝度をモニターした。

**結果・考察：**TMREではミトコンドリアの輝度に変化があり、GFPでは変化が無かった。このことは、細胞分裂時にはミトコンドリア膜電位に変化が生じていることを示している。ミトコンドリアの膜電位は細胞内ATP濃度と密接に関わっているので、観察された膜電位の変化は細胞内ATP濃度の変化を示しているのかもしれない。

### ③ F<sub>1</sub>-ATPase の協同的 ATP 結合能を利用したリニアモーター化の試み

○城所柊朋<sup>1</sup>、池田朋宏<sup>1</sup>、野地博行<sup>1</sup>

<sup>1</sup> 東京大学・工・応用化学

F<sub>1</sub>-ATPase (F<sub>1</sub>) は、ATP 加水分解を駆動力とする回転分子モーターであり、3つの $\alpha$ サブユニットと $\beta$ サブユニットが交互に並んだ $\alpha_3\beta_3$ 固定子リングを回転子である $\gamma$ サブユニットが貫いた構造をもつ。触媒反応部位は $\beta$ に存在し、3つの $\beta$ は順番に ATP を結合・加水分解し ADP 解離することで $\gamma$ を一方方向に回転させる。本研究では、F<sub>1</sub>の $\beta$ 間で見られる触媒反応の高い協同性を利用した分子運動システム構築を目指している。すなわち、短いポリマーを介して ATP を固体表面上に並べ、そこに F<sub>1</sub> を結合させる。このとき、F<sub>1</sub> は新しい ATP を結合すると同時に一定の向きから ADP を解離するため、分子全体が回転しながら並進運動することが期待される。特に、ATP を一直線上に並べることで一方向性が生まれると期待される。本研究では、まずリボース環を PEG で修飾された ATP(PEG-ATP)を合成・精製し、この PEG-ATP を F<sub>1</sub> が基質として認識するのかを 1 分子回転アッセイで評価した。その結果、PEG-ATP の速度定数は ATP に比べ 20%程度ではあるものの、一方向の回転を引き起こすことが確認された。現在、この PEG-ATP をガラス基板上に固定化し、その上における F<sub>1</sub> の並進運動観察を試みている。

### ④ 腸内連鎖球菌由来 V<sub>1</sub>-ATPase の 1 分子回転観察

○皆川 慶嘉<sup>1</sup>、上野 博史<sup>2</sup>、村田 武士<sup>3</sup>、野地 博行<sup>1</sup>、飯野 亮太<sup>1</sup>

<sup>1</sup> 東京大・院・工学系研究科、<sup>2</sup> 中央大・院・理工学科、<sup>3</sup> 千葉大・院・理学研究科

V<sub>1</sub>-ATPase は ATP 加水分解によって回転する回転分子モーターである。腸内連鎖球菌(*Enterococcus hirae*)由来の V<sub>1</sub>-ATPase(Entero-V<sub>1</sub>)は最近 X 線構造解析によって詳細な構造が解明された(S. Arai *et al.*, *Nature*, 2013)。また解明された構造から、ATP の加水分解によって得られる化学エネルギーを力学的な回転運動に変換・伝達する仕組みの大枠が提案されている。本研究は、詳細に解かれた構造の結果を踏まえ、1 分子観察の観点から Entero-V<sub>1</sub> の回転機構を解明することを目的とする。1 分子観察の結果、Entero-V<sub>1</sub> の回転軸が一方方向に回転する様子を観察することに成功した。更に、金コロイドをプローブとして用いて、無負荷条件下における回転速度の ATP 濃度依存性を測定した。得られた結果に対して、ミカエリスメンテン式でフィッティングすることで、最大回転速度( $V_{max}$ )は 113 rps、 $K_m$  は 52  $\mu$ M と見積もられた。本発表では上記の実験結果について報告する。

## ⑤ ミトコンドリアの屈折率と機能の相関

○長谷田圭亮、兼松啓太、太田善浩

東京農工大・大学院工学府・生命工学専攻

**背景・目的：**細胞内の屈折率分布の計測は、細胞の構造や構成物に関する有用な情報を与えると考えられている。しかし、屈折率計測の結果を有効に利用するには、屈折率と細胞内構造やその機能との関係を明確にする必要がある。そこで本研究では、ミトコンドリアの屈折率を計測し、ミトコンドリアの屈折率と機能活性の相関を調べることを目的とした。

**方法：**ミトコンドリアの屈折率は、位相変調微分干渉顕微鏡を用いて計測した。ミトコンドリアの機能は、膜電位感受性蛍光色素 **TMRE** の輝度により評価した。また、ミトコンドリアの内部密度は屈折率の値により評価した。

**結果・考察：**ミトコンドリアの屈折率は 1.422 であり、細胞で報告されている屈折率の値 (1.35-1.37) より、大きな値を示した。また、屈折率の大きなミトコンドリアは高い **TMRE** 輝度を示し、内部密度の高いミトコンドリアが高い活性を示すことがわかった。ミトコンドリアは細胞内で伸縮を行っているため、上記の結果は、ミトコンドリアは収縮により局所的に高い活性を持つ状態になる可能性を示唆している。