

【領域番号】 2006

【領域略称名】 揺らぎと生体機能

【領域代表者（所属）】 寺嶋正秀（京都大学・大学院理学研究科・教授）

A01 項目：揺らぎの検出

A01 班では、揺らぎの新しい検出手法を開発し、それを生体分子の化学反応解明へ適用すること、あるいは従来の検出法でもこれまで考えられなかった応用を提出することが主目標となっている。この目標のもとで、以下のような成果が出ている。手法は融合的なものも多いが、ここでは簡便のために、ベースとなる手法によって、1分子検出、熱力学・分光手法、NMR法、理論開発に分類している。

(a) 1分子検出

アンサンブル平均では消えてしまう揺らぎを検出するうえで、ここの分子の動きをとらえられる1分子検出法は有用である。1分子検出法で揺らぎを検出するための種々の手法を開発することに成功した。蛍光相関分光法(FCS)は、蛍光の揺らぎを1分子レベルで観測することで分子の拡散や分子内の自発的な構造揺らぎをとらえる方法である。石井は、蛍光寿命の揺らぎの相関分光法で揺らぎを検出する手法の開発を行った。蛍光寿命を利用したFCSを一般化した解析法を考案し、二次元蛍光相関分光法を提出した。寺嶋は、蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)による新しい1分子蛍光検出解析法を開発し、DNA構造揺らぎを明らかにした。高橋は、蛍光色素をラベルしたタンパク質をフローセルに1分子レベルで流し、フローセルに励起レーザーを導入することで基板に固定しない1分子の連続観察を目指し、極めて実用的な1分子観察装置を開発した。原子間力顕微鏡(AFM)を用いての揺らぎ検出に、川上が成功した。関口はタンパク質の分子内運動を精度良く検出可能なX線1分子追跡法に着目し、情報伝達に関わる分子として重要な膜タンパク質の揺らぎを伴う分子内構造変化を高精度(ピコメートル精度)、且つ高速(数マイクロ秒)に計測する基盤技術開発を行うことに成功した。

(b) 熱力学・分光手法

揺らぎを検出するうえで、熱力学や分光法はそのダイナミクスに関する有用な情報を与えてくれることが期待される。寺嶋は、この熱力学法を短寿命中間体にも適用できるよう、新規な時間分解熱力学法を開発することに成功している。神山は、蛋白質の巨視的な構造揺らぎを検出する手段として等温圧縮率を用い、超高感度密度測定システムの開発とともに、蛋白質の構造的な体積揺らぎの定量化、揺らぎを指標とした蛋白質の分類化、“構造-揺らぎ-機能”の相関解明を行った。山村は、精密な熱容量の測定によって膜の揺らぎを明らかにするため、最も精確度の高い熱容量測定ができる断熱型熱量計を開発している。石森は、蛋白質機能の分子論的機構を考える上で重要な構造的揺らぎを、蛍光を利用したFRETの圧力依存性から、部位特異的な定量的評価を行った。山口は、溶媒への露出など環境によって大きく変化する燐光寿命を計測することで、構造と揺らぎを検出することを試みた。後藤は、アミロイド線維形成中間体の立体構造と揺らぎの解明に取り組む、超音波処理によって微細で均質な線維を作製することに成功した。今元は、代表的なG蛋白質共役型受容体であるロドプシンの側鎖のH/D交換反応をFTIRで検出することから、その構造揺らぎを調べることができた。

(c) NMR法

NMRは、結晶中でなく、実際に機能している溶液中の構造とその揺らぎを検出できるという意味で、大きな発展が期待されている。加藤はNMRを駆使して、溶液中で決まった構造をとらない生体分子の構造と揺らぎを明らかにする手法を開発した。北原は、開発した高圧NMRを用いて、圧力・温度摂動によりタンパク質の基底構造から変性構造までの広く大きな構造揺らぎを捉えるとともに、準安定状態の構造及び機能解析を行った。菅瀬は、 μs - ms の揺らぎを検出できるNMRの緩和分散法を用いて、iPS細胞を樹立するために用いられる転写因子Oct3/4とSox2の揺らぎを示した。櫻井は、アミロイド線維形成のモデルサンプルとして $\beta 2$ ミクログロブリンを、折り畳みのモデルサンプルとして β ラクトグロブリンを用い、中間体構造のキャラクタライズをNMRを用いて行った。西村はNMRのCLEANEX-PM法を用いて、天然変性蛋白質のアルファヘリックスの揺らぎ構造を評価することに成功した。

(d) 理論解析

実験的に得られたデータを分子レベルで解析するためには、揺らぎに着目した理論の開発が重要である。岡本は、分子シミュレーションに適した、多くの拡張アンサンブル法と総称される強力なシミュレーション手法を開発した。高田は、蛋白質の自発的状態間遷移のような大振幅揺らぎを、構造的およびエネルギー的観点から理論的に解析するための方法を開発し、大振幅揺らぎに対する新しい概念を確立した。木寺は、揺らぎに関係する一つのねじれ角による運動が、球状構造を維持するために、他の多数のねじれ角の運動によって補償されることを示した。佐藤は、計算機の並列化効率が極めて高い新しい積分方程式理論

を開発し、効率良く構造揺らぎの効果を取り入れることに成功している。北尾は、タンパク質の複合体形成や解離のメカニズムを、構成する原子の集団的自由度（モード）間のカップリングというコンセプトを踏まえて、これまでの **Induced-fit** や **pre-existing** モデルよりも詳細なレベルで明らかにするシミュレーション手法を開発した。林(久)は非平衡ゆらぎの性質を利用し、実験で得られたイメージングから非破壊に生体分子の出す力を測定するユニークな理論を構築することに成功した。

以上のように、A01 班では、新規で独創的な検出方法・解析の開発を行い、揺らぎを検出するための様々な手法を提出してきた。また、シミュレーションをベースにした理論的解析法の提出により、得られた実験データの分子論的解析を可能にした。後述のように、これらの手法で多くの成果を出している。

A02 項目：揺らぎの制御

A02 班では、変異や化学修飾を駆使して、揺らぎを増したり抑制したりすることで、立体構造形成や機能発現を制御する研究を推進している。生理的条件下で変性構造にありながら酵素活性を有する変異体や、立体構造を保持し安定性が向上していながら酵素活性が低下する変異体など、以下のような揺らぎが関わる興味深い研究成果が得られている。

片岡は、黄色ブドウ球菌核酸分解酵素に対して、生理的条件下では変性構造にあるが、酵素活性をもつという天然変性蛋白質のモデル系となる変異体を数種作製し、リガンド誘導折り畳み機構について、折り畳み→結合機構と結合→折り畳み機構の2種類が実現していることを示した。芳坂は、開発してきた4塩基コドンによる非天然アミノ酸導入技術をマルトース結合蛋白質に適用して、その基質結合に伴う構造変化を **FRET** を用いて計測する手法を確立した。新井は、ジヒドロ葉酸還元酵素の活性部位内にあり、高い温度因子を持つ R44 の網羅的置換変異による研究を行い、R44 の変異によって揺らぎを制御することに成功し、活性と安定性の間にトレードオフ関係が存在することを明らかにした。今西は、システインをアスパラギン酸に置換した CDH2 型ジンクフィンガーの Zn(II)結合親和性が野生型に比べ、約 500 倍低下することを明らかにし、揺らぎをコントロールすることによって、天然にはない新しいスイッチ機能の獲得に成功した。黒田(裕)は、ウシ膵臓トリプシンインヒビターについて、安定化と主鎖構造の局所的な構造変化や揺らぎの関係を調べるために、示差走査型熱量計 (DSC) を用いて構造安定性の熱力学パラメータを測定し、変異体の結晶構造解析から、この安定化は主鎖構造の局所的な揺らぎの制御によることを明らかにした。楯は、ジヒドロ葉酸還元酵素を用いて、揺らぎを選択的に変調させ機能を制御することに成功した。水口は、遺伝性精神遅滞の発症に関与するタンパク質である核内蛋白質 PQBP-1 が、大きな変性領域と小さなフォールドしたコアからなる部局的な天然変性タンパク質であることを明らかにした。湯浅は、蛋白質の構造揺らぎの変化を検出するための発光性希土類プローブの開発を行った。寺内は、体内時計機能を持つ Kai タンパク質の周期的な揺らぎを引き起こすメカニズムについて、タンパク質に変異をかけて揺らぎを制御することによって調べることに成功した。

このように A02 班では主に変異体作成によって揺らぎを制御し、それを用いて構造形成や機能発現に与える揺らぎの重要性を示すことができた。

A03 項目：揺らぎと機能

A03 班では、膜・蛋白質・DNA など生体分子全般にわたり、機能に直結する揺らぎを検出し、機能との関連に重点をおいて研究した。一方、分子動力学シミュレーションと統計力学を用いた二方向から、揺らぎと機能を結び付ける理論構築を行い、生命現象を「説明する」だけでなく、「予測」する理論を発展させた。領域内共同研究を進めることで、がん細胞膜の揺らぎを標的にした新しい制がん剤であるハイブリッドリポソーム：HL の動物実験、臨床応用が行われ、制癌機構に迫る成果が得られた。

(a)膜の揺らぎと機能

上岡は、リン脂質と界面活性剤を緩衝水溶液中で超音波照射するだけで容易に得られる生体適合性の人工細胞膜である HL を開発した。HL の制がん効果において、がん細胞への HL の融合蓄積には膜の揺らぎ（流動性）が影響し、膜流動性の高いがん細胞ほど、HL が多く蓄積し、増殖抑制効果が増大する「膜の揺らぎと制がん効果」の関係を明らかとした。岡田は、細胞膜の揺らぎがヒトの正常造血、ウィルス感染症及び造血管腫瘍へ及ぼす影響を解明し、その成果を造血障害や造血管腫瘍の治療に応用する研究を行った。鈴木(元)は、多くの癌で、ゲノム変異の発生率が極端に高いことから、「遺伝的揺らぎ」と発癌発生機序との関連について、塩基認識を欠損した L864F 変異 DNA ポリメラーゼ α を用いて解析を行った。遺伝的揺らぎの抑制遺伝子の肺癌進展における役割を明らかにした。松本は細胞膜の揺らぎ制御による新しい作用機序を有する疾患治療を目指し、HL の膜流動性とがん細胞増殖抑制効果との相関性やカチオン HL の制がん効果を示した。手老は、微小領域における脂質分子の揺らぎがメソスケールの膜構造や反応活性に及ぼす影響を明らかにするために、一分子追跡計測を行うための蛍光顕微鏡装置を開発し、 μm ・ミリ秒オーダーから、幅広い空間・時間スケールでの分子挙動をその場観察することを可能にした。岡村は、高分解能溶液 NMR とパルス磁場勾配法を組み合わせ、膜中の薬物や脂質分子の運動を *in situ* で観測し、定量

化する方法を独自に開発した。矢野は、全反射蛍光顕微鏡を用いた一分子蛍光計測で、膜貫通ヘリックスの会合-解離の揺らぎを直接測定し、脂質組成が膜タンパク質構造形成過程のダイナミクスに大きく影響することを実証した。鈴木は、オレイン酸からなるらせん構造体が、構造体内部の揺らぎの伝搬によって、自発的に動きが生まれる現象の解明をめざし、外的因子によるらせん構造制御の実験を行った。中野は、膜揺らぎを調べるために、時分割小角中性子散乱法並びに蛍光法を用いて脂質のフリップフロップの計測を行った。野口は、膜動輸送などの生体機能や、ハイブリットリポソームのがん細胞への導入などにおいて、重要な素過程である膜融合経路に見られる準安定な中間体の一つである中間体に注目し、その自由エネルギーを線張力として分子シミュレーションにおいて計算する方法を提案した。

(b) タンパク質の揺らぎと機能

桑島は、シャペロニンの構造揺らぎとフォールディング介助機能についての関係を物理化学的に明らかにするために、ジメチルスルフォキシド停止水素重水素交換法と二次元 NMR を駆使している。元島は、シャペロニン援助フォールディングにおけるタンパク質の揺らぎ制御を行った。飯野は、1 分子観測のための新しいレーザー暗視野光学系を開発し、F₁-ATPase の回転モーター蛋白質の高時間・高空間分解能計測に適用した。こうした分子モーターの運動にも、揺らぎが不可欠であることを示すデータを得た。井出は、蛍光分子テトラメチルローダミンで特異的に標識された細菌の K⁺選択性イオンチャネルである KcsA チャネルの構造変化を、蛍光強度の変化により、チャネルゲート活性化と不活性化条件下で測定し揺らぎとの関連を見出した。老木も、KcsA チャネル蛋白質の 1 分子測定による機能ゆらぎと構造ゆらぎを、脂質平面膜法による 1 分子機能測定 (イオン透過・ゲーティング) と、回折 X 線追跡法により 1 分子レベルで測定することに成功している。黒田(玲)は、アミロイドシス関連蛋白質の分子ダイナミクスについて、独自に開発した Stokes-Muller matrix 理論に基づくキラリティー計測システムを用いて解析した。戸谷は、生体環境に基づく人工揺らぎ反応場が酵素に与える影響を検討するために、細胞内と同様に、蛋白質で混み合って不均一な揺らいだ環境「分子クラウディング環境」を構築して揺らぎの影響を明らかにした。相沢は、タンデムリピートを持つ新規天然変性 DNA 結合ドメインの揺らぎと分子認識機構の解明を行った。FCS 測定を行うことで、DNA 認識に関する解析を成功させた。プロテアソームによる効果的なタンパク質の分解には、ポリユビキチン鎖に加えて、基質内の構造をとらないフラフラと揺らいだ領域が必要であることを示した。伊野部は効率的な分解に必要な変性領域の物理化学的性質を特徴づけてきた。大橋は、蛋白質の揺らぎとアミロイドの構造の関係を明らかにするために、酵母プリオン Sup35 の NM ドメインをモデルタンパク質として、アミロイド形成前のモノマー及びオリゴマーの構造や揺らぎの解析を行った。原核生物は様々な薬剤に対して耐性を獲得するため、細胞膜上に多剤耐性トランスポーターを発現させていることを示した。竹内は、LmrR の薬剤非結合状態、結合状態における運動性を比較することで、分子の揺らぎと多剤認識機構との関係を NMR を用いて解析した。濱田は、病態のメカニズムには個々の軽鎖の配列多様性に起因する「構造の揺らぎ」の程度や質の違いが関与すると予想し、抗体の軽鎖可変 (VL) ドメインをモデルとし、疾患症状を決定する凝集体形状を決定する蛋白質の「状態間揺らぎ (状態転移)」と「状態内揺らぎ」の役割について明らかにした。廣田は、揺らぎによるシトクロム c 多量体形成と機能を明らかにするために、変異体作成と SAXS などを用いて調べ、cyt c が多量化する際、Met80 の周辺領域の立体構造が崩れるが、二次構造を保持したまま構造変化することを見出した。

(c) DNA の揺らぎと機能

出羽は、核酸医薬として有望視されているカチオン性脂質と核酸からなる複合体(Lipoplex)の揺らぎと機能に関しての研究を行った。松下は、細胞のがん化や老化に関わる重要な構造体であるヒトテロメア DNA の四重らせん構造形成における揺らぎと機能を明らかとするために、種々の金属陽イオンが、この四重らせん構造形成に与える影響について解析した。

(d) 揺らぎと機能を結び付ける理論解析

平田は、分子認識の統計力学理論の構築を行い、統計力学理論の「創薬」への応用を可能とした。吉田は、近年注目されている DNA 電流を利用したスイッチングデバイス開発の基礎研究として、平面芳香族分子 (プロフラビン) の DNA 塩基対間へのインターカレーションの理論的解析を行った。米谷は、DNA の構造揺らぎと水和の塩基配列依存性を明らかとするために、すべての 4 塩基配列 (136 通り) について分子動力学シミュレーションによる解析を行った。林(重)は、タンパク質中の pKa を計算する分子シミュレーションの手法を開発し、機能に関わるタンパク質の揺らぎ・構造変化と荷電状態の相関の分子機構を解明した。

このように A03 班では、生体膜、タンパク質、DNA など機能する生体分子全般にわたり、その揺らぎと機能との関係を明らかにした。特に、癌など疾病の治療に揺らぎを利用した方法が有効であることが臨床的にも示され、医学関係へのインパクトも大きいであろう。また、こうした揺らぎと機能との関係を明らかにするための理論構築も非常に進展している。

以上のように、各項目ごとに世界をリードする独自の成果があがり、共同研究を通じて融合的な研究も進展している。揺らぎをキーワードとした生体分子研究は、世界的に見ても、先見の明のある研究者によ

って個々のレベルで行われているだけであり、領域として発展させる試みは他に類を見ない。しかし、静的な生体分子構造決定が進んだ段階では、必ずやこうした研究が必要になり、次のターゲットとして推進すべき分野であるため、我が国が現在この分野を推進していることは、将来の学術水準向上・強化につながるものである。