

第 3 回日本生物物理学会 関東支部研究会

プログラム・要旨集



会期：2014年3月6（木）・7日（金）

会場：明治大学中野キャンパス

参加者へのご案内

学部生や院生に研究成果を日本語で発表する機会を与え、また自分の専門分野以外の研究を聞いて知識を深めることを目的に関東地区での研究会を開催します。

日時：2014年3月6日（木）、7日（金）、懇親会3月6日（木）

会場：明治大学中野キャンパス 3階312教室

（JR中央・総武線、東京メトロ東西線／中野駅下車 北口より徒歩約8分）

発表形式：日本語による口頭発表（外国の方は英語も可）

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

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

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

- * 事務局ではWindows7・Microsoft Office2010のパソコンを用意しますのでUSBメモリーをご持参ください。
- * 各自パソコンをご持参くださっても結構です。
（交代時間を節約するため立ち上げた状態で待機ください）
- * 昼食は1階の学生食堂を利用できます。



プログラム

3月6日(木)

10:00

開会の挨拶 関東支部長 太田善浩(東京農工大学・大学院工学研究院)

【6AM1】(10:05~11:45)

座長:太田善浩(東京農工大・院工)

1. メスラットの海馬は、独自に性周期を作り出せるのか? (25分)
加藤麻紗実(東大院・総合文化)
2. 老化による海馬の記憶シナプスの劣化と男性ホルモン低下 (25分)
酒井英子(東大院・総合文化)
3. オス海馬が合成する女性ホルモンによる記憶増強作用 (25分)
小島大樹(東大院・総合文化)
4. 匂い刺激時におけるナメクジ嗅覚中枢・前脳葉の神経活動解析 (25分)
江藤 多門(日大院・理工)

昼食(11:45~13:00)

【6PM1】(13:00~14:05)

座長:川岸郁朗(法政大・生命科学)

5. $\beta 2$ アドレナリン受容体-G α 間における結合要素の解析 (25分)
榊秀憲(青学大院・理工)
6. シグナルペプチド配列と成熟タンパク質の細胞内局在との相関性 (10分)
濱田康太(明大院・理工)
7. カフェインとクロルゾキサゾンのホスファチジルコリン膜への吸着・結合について (10分)
山田安由美(群馬大院・理工)
8. NMR, QCM, MD シミュレーションによる κ -オピオイド受容体細胞外第2ループとダイノルフィンとの相互作用解析 (10分)
内藤晶(横浜国大・院工)
9. Bio-molecular recognition of RecA proteins for the DNA-modified Single-Walled Carbon Nanotubes (10分)
大浦秀介(東理大・理)

休憩(14:05~14:20)

【6 PM2】 (14:20～15:20)

座長：大澤研二（群馬大・工）

10. 大腸菌走化性受容体 Tar ドメイン欠失変異体の温度受容能（10分）
西山宗一郎（法政大・生命）
11. サルモネラ属細菌走化性受容体 Tcp によるクエン酸認識機構（10分）
城井哲也（法政大・院工）
12. 大腸菌べん毛の回転方向制御に対する高圧力の影響（10分）
高木智彦（法政大・生命）
13. 二次元セルプロット法の開発（10分）
永島啓矢（明大院・理工・電気）
14. オクタリピートプリオンペプチドと金属イオンの競合結合（10分）
八木正浩（明大院）
15. 微小反応容器を用いた ATP 加水分解反応の高感度計測の開発（10分）
湯川豪（東大・工・応用化学）

休憩（15:20～15:35）

【6 PM3】 (15:35～16:50)

座長：内藤晶（横浜国大・工）

16. 単独で構造を取りうる構造ドメインデータベースの作成（10分）
井出宗一郎（東京農工大・工）
17. 膜タンパク質の顕微鏡画像と立体構造データとの照合用データベースの構築
井上伍央（青学大院・理工）（25分）
18. 人工4ヘリックスバンドルタンパク質上に創出した白金結合ループの解析
新納寛也（東薬大・生命）（10分）
19. 人工タグを用いたガウシアルシフェラーゼのフォールディング効率の向上
鈴木郁也（東京農工大・工）（10分）
20. ペプチド系溶解性制御タグ（SCP タグ）を用いたタンパク質溶解性の制御
黒田裕（東京農工大学・工）（10分）
21. タンパク質の末端に付加した少数残基が凝集体形成に及ぼす影響の解析（10分）
如澤浩樹（東京農工大・工）

懇親会（17:00～19:00）6F プレゼンスペース

3月7日（金）

【7AM1】（10:00～11:00）

座長：赤沼哲史（東京薬科大・生命科学）

1. 細胞内ミトコンドリア移動の評価法の開発（10分）
杉本雄生（東京農工大学・工・生命）
2. ミトコンドリア新規単離法の検討（10分）
柴田貴弘（東京農工大・工・生命）
3. 2つの細胞集団に分化する人工的な哺乳類細胞間コミュニケーションシステムの設計（10分）
張子聡（東工大・総理工）
4. 細胞運命決定過程における細胞内状態変動のラマン分光分析（10分）
高根沢（理研・佐甲細胞情報研）
5. 複合酵素に見られる基質輸送経路の新規探索手法の開発（10分）
矢野緑里（お茶大・院人間文化）
6. 脂質膜デバイスを用いた膜輸送体の高感度活性計測（10分）
大舘真也（東大・工・応用化学）

休憩(11:00-11:15)

【7AM2】（11:15～12:20）

座長：佐甲靖志（理化学研究所・細胞情報研究室）

7. ヒトカルシトニンの酸性膜との相互作用に依存したアミロイド線維形成機構の解明（10分）
浅野洸（横浜国立大・院工）
8. 可溶性タンパク質の表面に疎水性アミノ酸を導入することで低下した溶解度の酸性アミノ酸の導入による回復（25分）
八木創太（東京薬科大・生命）
9. フェムトリットドロップレットアレイを用いたアルカリフォスファターゼ1分子観測（10分）
大林祐介（東大・工・応用化学）
10. 超音波が誘導するがん細胞死（10分）
藤里砂（明大院）
11. 表面増強ラマン分光（SERS）イメージングによるヌクレオチド検出法の開発
中川佳史（東大・工）（10分）

昼食（12:20～13:30）

【7 PM1】 (13:30～14:35)

座長：吉村英恭（明大・理工）

- 12.円偏光二色性法と示差走査蛍光定量法を用いた BPTI 変異体の熱安定性の評価
小須田慧司（東京農工大・工）（10分）
- 13.大腸菌の細胞壁合成阻害による自己溶菌を利用した組換えタンパク質抽出法の開発（10分）
二宮拓也（東京農工大・工）
14. サルモネラ菌べん毛繊維の多型変換のメカニズムに関わるアミノ酸残基の推測（10分）
氏家篤（群馬大・工）
- 15.部分フッ素化・非フッ素化二成分系脂質膜中におけるバクテリオロドプシンの分配（25分）
吉野賢（群馬大・院理工）
- 16.バクテリオファージMuネックサブユニットの構造解析（10分）
武田茂樹（群馬大・理工）

休憩（14:35～14:50）

【7 PM2】 (14:50～15:55)

座長：平岡和佳子（明大・理工）

17. 金ナノ粒子を用いた投影型 X 線顕微鏡の分解能の向上（10分）
茂木貴大（明大・理工）
18. アポフェリチンのアセンブリにおける静電相互作用の役割（25分）
佐藤大輔（創価大学・院）
19. 金属ナノ粒子の二次元配列法の開発（10分）
萩村史佳（明大・理工）
20. ウマ H 鎖フェリチンを用いた鉄ナノ粒子の形成（10分）
根本舞

【要旨】

3月6日(木)

【6AM1】 (10:05~11:45)

1. メスラットの海馬は、独自に性周期を作り出せるのか？

○加藤麻紗実、北條泰嗣、川戸佳

東京大学大学院 総合文化研究化 広域科学専攻

メスラットの性周期は、卵胞期、排卵期、黄体期1、黄体期2の4日で1周する。卵巣の作り出す性周期に伴って、血中では女性ホルモン(プロゲステロン(PROG)とエストラジオール(E2))の濃度変動が起こる。川戸研究室の研究から、海馬神経には男性・女性ホルモン合成酵素が発現していることがわかったので、今回メスラットの海馬は自分自身で脳の性周期を作れるのではないか？という問題解決に挑戦した。本研究では、メス海馬における女性ホルモン濃度とその合成酵素及び性ホルモン受容体の mRNA 発現量を調べ、神経シナプスなどに現れる海馬の性周期を明らかにすることを目的とした。海馬内の女性ホルモン濃度は、性周期に伴って周期的に変動した(その濃度は血中よりはるかに高い)。ところが、海馬の合成酵素や受容体の mRNA 発現量は、性周期に伴う変動がなかった。これをまとめると、メスの海馬独自の女性ホルモン合成能は一定であるが、海馬に性周期で振動する血中の PROG が流入してきて振動を作り出し、その下流の E2 にも濃度振動が出来上がる。この海馬のホルモン振動に伴って、神経のスパイン密度が周期的に増減することを説明する。

2. 老化による海馬の記憶シナプスの劣化と男性ホルモン低下

○酒井英子、平櫛絢子、北條泰嗣、川戸佳

東京大学大学院・総合文化・広域科学

老化により海馬が司る記憶能力が低下する。性ホルモン補充療法で回復することから認知機能と性ホルモンは密接に関わっている。川戸研究室で性ホルモンが海馬でも合成されていることを既に示している。老化によりオスラット海馬内の男性ホルモン濃度が大きく低下することも明らかにした。今回は海馬内に存在する男性・女性ホルモン合成系に関わるタンパク質であるシトクロム P450_{scc}、P450(17 α)、P450_{arom}、及び男性・女性ホルモン受容体、シナプスのマーカータンパク質 PSD-95 などの発現量の解析、および、記憶貯蔵部分である神経シナプスの密度解析を行った。その結果、老化によりオス海馬内の男性ホルモン合成系のタンパク質の発現が軒並み低下していること、PSD-95 の発現が低下していることがわかった。また、老化により神経シナプスの密度がはっきりと低下していた。ここで正常な老化では海馬の神経細胞数は減少しない。代表的な神経栄養因子 BDNF は全く減少しないことなどから、オスの記憶シナプスの劣化には男性ホルモンの低下が関わっているということが示唆された。

3. オス海馬が合成する女性ホルモンによる記憶増強作用

○小島大樹^{1,2}, 堀田佳佑^{1,2}, 長谷川賢卓^{1,2}, 川戸佳^{1,2}

¹東京大学大学院 総合文化・広域科学, ²東京大学大学院 理学系・物理

女性ホルモン (E2: estradiol) はオスの海馬でも局所的に合成され, 記憶学習に好影響を与える. 海馬では記憶の素過程として長期増強 (LTP: long-term potentiation)が起きる. E2 が LTP に影響を及ぼす研究は多くの研究室が挑戦したが, E2 の効果をうまく検出できていなかった.

本研究では, 海馬 CA1 弱いシータバースト刺激 (weak-TBS) により誘導した weak-LTP に対し, E2 の効果を検証した. 成獣ラットの海馬急性スライスに 10 nM E2 を 30 分間作用させた後, weak-TBS で刺激すると LTP の増強率は, 116% → 135% となり, E2 は急性的に weak-LTP を増強することがわかった. また, この E2 の効果がエストロゲン受容体 ER α /ER β の阻害剤によって阻害され, アゴニストによって E2 の効果は再現された.

更に, リン酸化酵素 (MAPK, PKA, PKC) の阻害剤や, NMDA 受容体サブユニット NR2B の阻害剤を E2 と同時に作用させることにより, E2 の weak-LTP 増強効果が阻害された. また, E2 を 30 分作用させた後, CaMK II の阻害剤を灌流しながら LTP の測定を行うと, E2 の weak-LTP 増強効果が阻害されることもわかった.

以上の結果より, E2 → ER α /ER β → PKA & PKC → MAPK → NMDA 受容体のリン酸化 → weak-TBS による後シナプスへの Ca²⁺流入量増大 → CaMK II 活性化 → AMPA 受容体リン酸化 → weak-LTP 増強=LTP 成立, という信号伝達系路が考えられる.

4. 匂い刺激時におけるナメクジ嗅覚中枢・前脳葉の神経活動解析

Analysis of odor-evoked neuronal activities in the procerebral lobe of a slug

○江藤 多門¹, 芳賀 祥平¹, 斎藤 稔², 小松崎 良将³

¹日大院・理工・院 (前)・物理, ²日大・文理・物理生命システム, ³日大・理工・物理

軟体動物ナメクジは, 発達した嗅覚系を持ち匂い嫌悪味覚連合学習などの高度な学習を行うことが知られている. その脳嗅覚中枢である前脳葉では 0.6~0.8 Hz の周波数を持ったスパイク振動活動が記録できる. この振動活動は触覚に匂い物質を与えるとその周波数が変動することから, 匂い情報が振動活動の時間パターンとして表現されていると考えられる. そこで本研究では, 匂い味覚連合学習を行ったナメクジ前脳葉の活動を電気生理学的手法により取得し, そのスパイク間隔の時系列データを tone-entropy 法 (TE 法) を用いて解析した. あるスパイクの直前のスパイクとの周期変化を百分率で表し Percentage Index (PI) とし, PI 分布の平均値を tone, PI 分布の情報量を entropy と定義して評価した. 条件付けを行った群の触角に匂いを投与したところ, 前脳葉のスパイク周波数には特に変化は見られなかった. 一方, このスパイク周期時系列データについて TE 法で解析したところ tone は匂い投与により -0.028 から 0.004 に有意な増加が見られた. また, entropy も 3.34 [bit] から 4.04 [bit] に有意に増加していた. 以上の結果から, 学習を行ったナメクジに匂い投与したときの前脳葉の活動変化を, TE 法により捉えることに成功した.

【6 PM1】 (13:00~14:05)

5. $\beta 2$ アドレナリン受容体— G_{α} 間における結合要素の解析

○榎秀憲¹、池田修己²、諏訪牧子^{1, 2}

¹青学大院・理工, ²青学大・理工

G タンパク質 α サブユニット (G_{α}) は、4 種 (G_s , $G_{i/o}$, $G_{q/11}$, $G_{12/13}$) に大別され、G タンパク質共役型受容体 (GPCR) が、これらいずれと結合するかにより下流のシグナル伝達経路は大きく異なるため、GPCR と結合する G_{α} 種の予測は重要である。そこで、GPCR— G_{α} 間の結合選択性に関する要素を解析した。

GPCR の $\beta 2$ アドレナリン受容体 (b2AR) と G_s の結合構造 (PDB ID : 3SN6) を基に、比較モデリングにより G_{α_s} を他の 3 種に入れ替えた非天然状態モデルを作成し、これらを分子動力学 (力場: AMBER99) により比較した。

その結果、天然状態の b2AR— G_{α_s} 間の相互作用エネルギーが最も低く、安定であり、特異的条件下では結合する b2AR— G_{α_i} 間でも近いエネルギーを示した。一方、非天然状態である b2AR— $G_{\alpha_{12}}$ 間、b2AR— G_{α_q} 間では、これらより 300~350 (Kcal/mol) 不安定になった。このようなエネルギー差に関するものは主に b2AR(R131)— G_{α} (E392) 及び b2AR(T136)— G_{α} (R380) 間での水素結合と静電相互作用であることを見出した。

6. シグナルペプチド配列と成熟タンパク質の細胞内局在との相関性

○濱田康太¹、越中谷賢治¹、南部龍平¹、向井有理¹

¹明大院・理工

多くのタンパク質は、シグナルペプチド (Signal Peptide: 以下 SP) と SP を認識するシグナル認識粒子の働きにより、一時的に小胞体へ輸送され、SP は小胞体輸送後に切断を受ける。SP が切り離された後の成熟タンパク質は小胞体を出発し、目的のオルガネラに到達する。本研究では、SP のアミノ酸配列のバリエーションに着目し、SP 配列が成熟タンパク質の細胞内局在に及ぼす影響を調査した。まず、UniProtKB/Swiss-Prot Release 2013_04 から、哺乳類由来タンパク質の SP 配列および成熟タンパク質の細胞内局在情報を抽出した。抽出した各 SP 配列について、アミノ酸出現頻度解析、配列の物理化学的性質解析や疎水性解析を行った。その結果、SP 疎水性領域直前において、細胞外局在タンパク質の Pro 残基の出現傾向が低く、細胞内局在タンパク質の Pro 残基の出現傾向が高いことが分かった。また、SP の切断部位付近において、局在別での Pro 残基の出現傾向に差異が見られた。Pro が存在する SP のみ屈曲構造が形成され、その構造の違いをシグナル認識粒子が認識している可能性が考えられた。

7. カフェインとクロルゾキサゾンのホスファチジルコリン膜への吸着・結合について

○山田 安由美¹、高橋 浩¹

¹群馬大院・理工

多くの薬が直接作用するのは受容体蛋白質であるが、生体膜の脂質へも結合する可能性があり、それは薬剤の代謝過程において重要な意味を持つ。その一例が、肝臓に存在する膜蛋白質シトクロム P450 (CYP) が関係する薬剤代謝で、薬は膜部分に結合した後に、CYP に運ばれることが最近示唆されている。これに関連し、最近の分子動力学計算は、CYP の基質であるカフェインはリン脂質 (ホスファチジルコリン、PC) 膜の疎水部分まで浸入すると示した。一方で、NMR 測定からは、膜表面に吸着する程度でしか、カフェインは PC 膜と相互作用しないと報告され、最終的な決着は付いていない。本研究では、題目にある 2 つの薬剤と PC 膜の相互作用を実験的に検討した。紫外可視吸光測定からは、定性的ではあるが、カフェインは PC 膜と結合することが結論された。X 線回折像は、カフェインは膜の疎水部分まで侵入せず、膜表面と吸着する程度と解釈できるものであった。また、クロルゾキサゾンは膜内部まで到達している可能性を熱測定の結果は示唆した。

8. NMR, QCM, MD シミュレーションによる κ -オピオイド受容体細胞外第 2 ループとダイノルフィンとの相互作用解析

吉良敦史¹、Namsrai Javhlalantugs¹、宮森丈敬¹、佐々木慶幸¹、江口政幸¹、川村 出¹、上田一義¹、○内藤 晶¹

¹横浜国大・院工

κ -オピオイド受容体 (KOR) はオピオイド受容体ファミリーに属し、オピオイドペプチドダイノルフィン (Dyn) と選択的に結合し、鎮痛作用を示すことが知られている。この κ -オピオイド受容体細胞外第 2 ループ (ECL-II) は Dyn のアドレス部位と相互作用することが予想されている。我々は Dyn の膜結合構造は N-末端が α -ヘリックス構造を形成し脂質膜に膜法線に対して 21 度の角度で膜中に挿入している膜結合構造を決定した (1)。本研究では脂質膜に結合した ECL-II と Dyn の相互作用を NMR, QCM, MD シミュレーションにより解析した結果を報告する。Gly3, Val6, Val10, Val12, Ile13, Ala15 を $1\text{-}^{13}\text{C}$ 標識した ECL-II (1-33, KOR (196-228)) をバイセルに結合させて NMR スペクトル測定した結果、ECL-II は Val10-Ala15 の領域で Dyn と相互作用していることが明らかになった。QCM で ECL-II と Dyn の結合定数を解析した結果、Dyn は脂質膜より ECL-II に対して 60 倍高い親和性を示すことが判明した。MD シミュレーションの結果、Dyn の Trp14 と ECL-II の Val10, Ile13 と疎水相互作用を示し、この相互作用は Dyn の Lys11, Lys13 と RCL-II の Glu14, Gln18 との親水相互作用と動的に入れ替わることが判明した。以上の解析結果はオピオイド受容体とオピオイドペプチドの選択的な相互作用機序に対して分子論的基盤を与えるものである。

(1) T. Uezono et al., J. Mol. Struct. 749 (2005) 13-19.

9. Bio-molecular recognition of RecA proteins for the DNA-modified Single-Walled Carbon Nanotubes

○大浦秀介、二井大輔、梅村和夫

東理大・理

水に不溶な単層カーボンナノチューブ(SWNT)は、DNA溶液中で超音波分散することにより、DNA-SWNT複合体を形成し水に可溶となる[1]。しかし超音波処理を施す工程は、DNAにダメージを与えてしまうことが懸念されている。そこで本研究では、DNA結合蛋白質として知られているRecA蛋白質[2]を用いて、SWNT表面のDNAの生物学的機能が損なわれていないかを、AFM(原子間力顕微鏡)による表面の形状解析およびアガロースゲル電気泳動法により検証した。これは換言すると、SWNT表面のDNAに対する、RecA蛋白質の生体分子認識の実験である。

RecAと反応させたssDNA-SWNTについて、AFM観察及び電気泳動を行った。AFMによる直径分布の解析からは、反応前のssDNA-SWNTより大きい直径を持つことが分かった。電気泳動からは、DNA-SWNTに対するRecAの割合を増やすにつれて、ssDNA-SWNTがウェルに詰まりやすくなり、泳動されなくなるとの結果が得られた。以上より、RecA蛋白質はssDNA-SWNT表面のDNAを分子認識して、DNA-SWNTに結合すると考えられる。

[1] M.Zheng, et al.,*Nat.Matter.*2(2003)338-342.

[2] Savir Y & Tlusty T *Molecular Cell* (2010): 388-96.

【6 PM2】 (14:20~15:20)

10. 大腸菌走化性受容体 Tar ドメイン欠失変異体の温度受容能

神宮寺 将晃, ○西山 宗一郎, 曾和 義幸, 川岸 郁朗

法政大・生命科学・生命機能

大腸菌は温度勾配が存在するときに暖かい方へ移動していく性質(走熱性)をもつ。その温度受容体は、アミノ酸や糖などを感知する走化性受容体そのものである。温度受容シグナリングの本質は、温度受容タンパク質の可逆的な構造変化にあると思われるが、その実態は不明である。本研究では、走化性受容体 Tar の温度受容領域を特定することを目的として、ペリプラズムドメインをほぼ完全に欠失した Tar (以下 Tar^oと呼ぶ)を解析した。Tar^oはそのままでは機能しないが、細胞質ドメインに変異を導入すれば phenol 受容能を示す。解析の結果、変異 Tar^oは温度受容能を保持していた。ただし、同じ変異を全長 Tar に導入すると Tar^oとは逆の温度応答を媒介した。以上の結果は、温度受容能にペリプラズムドメインが必須でないこと、細胞質ドメインが重要であること示唆するものである。そこで、細胞質内フラグメントを作製した。高発現ベクターを用いて十分量の発現を確保した上で解析したが、野生型・変異型フラグメント共に温度応答を媒介しなかった。この結果は、膜貫通領域そのもの、あるいは膜へのアンカリングの重要性を示唆している。今後はこの点について検討していきたい。

11. サルモネラ属細菌走化性受容体 Tcp によるクエン酸認識機構

○城井 哲也¹, 今田 勝巳², 岩間 智徳³, 川岸 郁朗^{1,4}

¹法政大・院工, ²大阪大・院理, ³岐阜大・応用生物科学, ⁴法政大・生命

サルモネラ属細菌は、近縁の大腸菌と異なり、クエン酸を唯一の炭素源として生育できるだけでなく、クエン酸に対して走性も示す。菌がクエン酸に対し適応した後、二価金属イオンを加えると再び誘引応答を示すが、二価金属イオンだけに対する応答は示さない。クエン酸走性受容体 Tcp を大腸菌に発現させても同様の性質が見られることから、Tcp はクエン酸とクエン酸-二価金属イオン複合体を異なる誘引物質として認識すると示唆されている。本研究では、Tcp 発現大腸菌のクエン酸応答が EDTA 添加により減弱し、二価金属イオン添加により回復することを見出した。さらに、等温滴定型熱量計測定を用いた結合解析を行ったところ、Tcp リガンド結合ドメインへのクエン酸の結合は二価金属イオン存在下でのみ検出され、二価金属イオンとの結合はクエン酸非存在下でも検出された。以上の結果から、Tcp はクエン酸に対する応答を媒介するが、Tcp がクエン酸に結合するためには二価金属イオンが必須であること、二価金属イオンはクエン酸がなくても Tcp に結合しうることが示唆された。これを踏まえて、Tcp によるクエン酸応答の分子機構に関する新たなモデルを提唱する。

12. 大腸菌べん毛の回転方向制御に対する高圧力の影響

○高木 智彦¹, 西山 雅祥², 梅村 徹¹, 川岸 郁朗¹

¹法政大・生命, ²京都大・白眉センター

大腸菌走化性において、応答調節因子 CheY はリン酸化により活性化されてべん毛モーターに結合して回転方向を制御する。すなわち、CheY が結合しないときべん毛モーターは左回転 (CCW) し、べん毛が束ねられて、菌は直線的に泳ぐ (ラン)。一方、リン酸化型 CheY がべん毛モーターと結合すると、右回転 (CW) が誘発されてべん毛の束がほどけ、菌は方向転換する (タンブル)。この CheY 結合による回転方向変換は非常に短い時間で起こるが、そのメカニズムは明らかになっていない。本研究では、モーター回転方向制御のメカニズムに迫ることを目指し、圧力という変調をかけた際の影響を調べた。野生型大腸菌べん毛モーターの CW 回転バイアスは圧力が高くなると徐々に低下し、約 800 気圧において CCW に固定された。この現象は全走化性シグナル伝達蛋白質欠損株に野生型 CheY を大量発現させても見られたが、リン酸化部位を変異させた CheY では見られなかった。一方、構成的活性型変異 CheY を発現させると、高圧力でも CW 回転が見られ、そのバイアスは変異 CheY 発現量が高いほど高くなった。したがって、高圧下ではリン酸化型 CheY とモーターとの相互作用が阻害されることが示唆された。

13. 二次元セルブロット法の開発

Development of II-D Cell Blot Method

○永島啓矢、シティ マイサラ、向井有理、寺崎武夫
明大院・理工・電気

細胞に対して機能を持つタンパク質を簡便かつ網羅的に解析する新しい方法（二次元セルブロット法）を開発した。以前に Hayman らが報告した SDS-PAGE セルブロット法では、SDS によるタンパク質変性が問題であった。そこで我々は、モンシロチョウ体液中の細胞死（アポトーシス）誘導タンパク質を対象とし、界面活性剤を用いないセルブロット法の開発を試みた。まず、非変性二次元電気泳動法でモンシロチョウ体液中の全タンパク質を分離し、PVDF 膜上に転写した。次に、その膜上で HeLa 細胞を一晩培養した後、膜上のタンパク質と細胞を染色した。その結果、タンパク質の分離状態と細胞の分布状態が 1 枚の膜上に観察された。さらに 1 つのスポットに細胞を死滅させる活性を見出した。すなわち、細胞に対して生理活性をもつタンパク質を二次元電気泳動により分離し、そのタンパク質の位置を確定する方法を確立した。MALDI/TOFMS 等の方法で、スポット上のタンパク質を同定できることから、当該方法との組み合わせにより、細胞の形態変化に関わるタンパク質の網羅的な解析が可能である。また、微量なタンパク質の機能解析にも応用できると考えられる。

Keiya Nagashima, Siti Maisarah, Yuri Mukai and Takeo Terasaki, Grad. Sch. Sci. & Tech., Meiji Univ.

14. オクタリピートプリオンペプチドと金属イオンの競合結合

○八木正浩、岩間和也、平岡和佳子
明治大学大学院基礎理工学専攻物理系

プリオンタンパク質のフレキシブル領域にあるオクタリピート配列には、高い親和性をもって銅イオンが配位することが知られている。本研究では、ヒトのオクタリピート配列(PHGGGWGQ)と金属イオン(Cu^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Co^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Mn^{2+})との結合性について、分光学的解析を行った。 Cu^{2+} ・ペプチド錯体は従来より 3 種類の構造をとりうる可能性が指摘されてきたが、電子スピン共鳴法(ESR)による実験から、オクタリピート配列では、Component 1、Component 2 と呼ばれる 2 つの構造が混在していることが明らかとなった。各金属を含むペプチド水溶液を円偏光二色性(CD)測定を行ったところ、金属・ペプチド錯体に由来する CD 吸収ピークが Cu^{2+} でのみ観察された。 Cu^{2+} ・ペプチド錯体に対して各金属イオンの競合結合実験を行ったところ、 Ni^{2+} 、 Co^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Mn^{2+} の金属イオンは銅イオンに対してペプチドと競合結合することが明らかとなった。今後は、競合反応の pH 依存性、錯体構造の解明を進めていく。

15. 微小反応容器を用いた ATP 加水分解反応の高感度計測の開発

○湯川豪¹、柳沼秀幸²、渡邊力也²、野地博行²

¹東大・工・応用化学, ²東大院・工・応用化学

ATP は「生体のエネルギー通貨」と呼ばれ、生体内のあらゆる反応に使われる。それゆえに生体反応のメカニズム解明には ATP の濃度変化を高感度かつ定量的に検出することが必要とされている。近年我々は ATP を消費せず濃度を定量的に測定できる「QUEEN」という ATP センサーを開発した。QUEEN を用いた測定では定量的な測定は成功しているが高感度計測はまだ実現していない。本研究では ATP 加水分解酵素 (F₁) の ATP 加水分解を研究対象として約 50 fL の微小反応器と QUEEN を組み合わせて ATP 加水分解反応を高感度に検出することを試みた。反応での ATP 消費個数が少なくても反応器の小ささのために、短時間で大幅な ATP 濃度減少が期待できる。

微小溶液でも QUEEN のシグナルを得ることができ、F₁により ATP が分解され時間が経つにつれて ATP 濃度が減少していくことが示された。各微小溶液に平均で 2 個入っている条件のときも ATP 濃度濃度の変化をとらえることができた。

将来的にはこの系を用いて酵素一分子が検出でき分解活性を求められると期待できる。

【6 PM3】 (15:35~16:50)

16. 単独で構造を取りうる構造ドメインデータベースの作成

梅澤祐貴¹、○井出宗一郎¹、蝦名鉄平²、黒田裕¹

¹東京農工大・工・生命工, ²理化学研究所・BSI

プロテオミクス研究において巨大タンパク質の解析を迅速に行うための実験条件の検討は困難である。そのため、単独で構造を取りうる「構造ドメイン」をアミノ酸配列から計算的に同定し、タンパク質を分割する手法が用いられている。しかし、その計算に必要な独立性のある構造ドメインの一貫した定義は広く認められているドメインデータベースである SCOP や CATH においてすら存在していなかった。そのため、我々は独自の構造ドメイン定義を検討し、独立性のある構造ドメインデータベース構築を目指した。まず、我々は独立性のある構造ドメインは他のドメインとの接触が少ないと考え、ドメイン間相互作用に着目した。そこで、多ドメインタンパク質内において近傍のドメインと「相互作用」を原子座標から算出し、相互作用が少ないドメインが独立に構造を取り得ると定義した。次に、定義の妥当性を、ドメインが単独で結晶化され、実験的に単独で構造を形成することが確認された構造ドメインとそうではないドメインをテストデータに用いて、検証した。その結果、我々の定義によるドメインデータベースは、実験的に結晶化が確認されたドメインの割合が SCOP、CATH と比較して最大 16%向上していた。

17. 膜タンパク質の顕微鏡画像と立体構造データとの照合用データベースの構築

○井上伍央¹、池田修己²、諏訪牧子^{1,2}

¹青学大院・理工, ²青学大・理工

X線構造解析や NMR では構造を得にくい膜タンパク質同士の相互作用状態の可視化は、それらの機能を理解するために重要である。我々は電子顕微鏡画像に対して、膜タンパク質の立体構造を膜界面に投影した断層画像を比較・照合することにより、膜表面のタンパク質の種類を同定することを目的に研究を進めている。

現在までに 802 エントリー (2,209 チェイン) の立体構造について構造の特徴量 (断層画像及び、面積、周囲長、円形度、凹凸度、針状度) を収めたデータベースを構築した。EMDB に登録されている電子顕微鏡マップデータから作成した投影像と、前述の計算処理によって生成した断層画像とを比較した。その結果、断層画像の表示の際、ファンデルワールス半径に加え、溶媒露出表面積 (ASA) を考慮すると、電顕画像との類似度 (画像間の各特徴のユークリッド距離) を高くすることができた。例えば、シェーカー型カリウムチャンネル (EMDB : 1367、PDB : 1BL8) の場合、類似度は 0.7053 から 0.0013 に改善した。

今後はより多くのタンパク質構造を用いて電顕写真の分解能と最適類似度を与える ASA 半径の相関を求める。

18. 人工 4 ヘリックスバンドルタンパク質上に創出した白金結合ループの解析

○新納寛也¹、赤沼哲史¹、山岸明彦¹、秋山勇人¹、内田達也¹

¹東薬大・生命

金属結合能をもつタンパク質やペプチドはバイオセンサーの重要な構成要素である。例として、グルコースオキシダーゼが、血糖値測定用グルコースセンサーの白金電極上に固定されている。さらに高感度なバイオセンサーを作るためには、タンパク質やペプチドを直接金属表面に固定する必要がある。これまでに金属結合能を持つ人工ペプチドがいくつか作製されてきたが、タンパク質表面上に金属結合部位を創出した例は報告されていない。本研究で私たちは、人工 4 ヘリックスバンドルタンパク質 LARFH のループ上に白金結合部位を創出した。LARFH は大腸菌由来 Lac repressor の C 末端 α -ヘリックスから作成されたタンパク質で、 α -ヘリックス 4 つを SGQGGS の配列を含むループでつなぎ作製した。私たちは SGQGGS のコドン NVS NVS NVS GGT NVS NVS (N= A+C+G+T; V= A+G+C; S= C+G) と置き換えることによって LARFH 遺伝子ライブラリを構築し、T7 フェージディスプレイを用いることで白金と相互作用する LARFH 変異体を選択した。選択された変異体の一つを精製し、AFM と QCM 解析を用いることで変異体の白金結合力を評価したところ、この変異体は野生型に比べて強く白金と相互作用することが明らかになった。現在、より詳細な生物物理学的な解析を行っている。

19.人工タグを用いたガウシアルシフェラーゼのフォールディング効率の向上

○鈴木郁也¹、黒田裕²

¹東京農工大・工・産業技術、²東京農工大・工・生命工

Gaussia Luciferase (以下、GLuc) は、海洋性カイアシ類 *Gaussia princeps* 由来の生物発光を触媒する酵素であり、分子量が2万ダルトンと小さいことや熱安定性が高いため、次世代のレポーター蛋白質への応用が期待されている。しかし、配列中に10個ものシステイン(Cys)が含まれており、大腸菌を宿主に用いて従来の手法で発現させたGLucでは、天然型ジスルフィド結合(S-S結合)形成率が低いという問題がある(天然型S-S結合の形成は発光活性に必須である)。そこで本研究では、天然型S-S結合の形成効率を向上させるペプチドタグをGLucの末端に付加し、GLucが天然状態で発現する効率の増加を目的とした。今回着目したのは、GLucの分泌シグナル配列である。分泌シグナル配列は最終的に除去されるが、そこに含まれる1個のCysが、文献1で提唱されたように天然型S-S結合を促進させる役割を果たすと考えた。そこで、人工的設計したCysを1個含むペプチドタグをGLucのN末端に付加し、S-S結合形成への影響を、逆相HPLCの波形と発光活性を用いて評価した。その結果、タグ無のGLucでは半分以上の分子が非天型のS-S結合を形成していたのに比べ、タグを付加したGLucでは天然構造を形成するタンパク質の割合が大きく増加していた。

文献1: Weissman JS, Kim PS, The pro region of BPTI facilitates folding. Cell. (1992) 71, 841-51.

20. ペプチド系溶解性制御タグ (SCP タグ) を用いたタンパク質溶解性の制御

○黒田裕、Alam M Khan、Monirul M Islam

東京農工大学・工・生命工

溶解性はタンパク質の重要な性質であるが、その物理化学的な解析は殆ど進められていない。発表では、5残基のSCPタグ(Solubility Controlling Peptide タグ)を目的タンパク質の末端に付加することでタンパク質の溶解性を制御し、親水性・疎水性と異なる視点に立て規定したアミノ酸の「溶解傾向性」(又は相対的な溶解性)について述べる。さらに、SCPタグを用いたタンパク質の溶解性を向上させた例を紹介する。我々の提案するSCPタグはわずか5~12残基と、従来の融合タンパク質と比べて分子量が格段に小さい。そのため、SCPは、溶解性のみを制御することができる汎用的な技術として実用化が期待される。

1. 黒田裕、ペプチド系溶解度向上タグ「SEPタグ」によるタンパク質の溶解性の解析と制御、月刊「バイオインダストリー」、p. 9-14、(特集:タンパク質生産と溶解度制御)、シーエムシー出版(2013年7月特集号)
2. 加藤淳、泉川直重、黒田裕、タンパク質溶解性向上技術 ~SEP-tag について~, 生物物理, 48, p185-189、(2008)

21. タンパク質の末端に付加した少数残基が凝集体形成に及ぼす影響の解析

○如澤浩樹¹、座古保²、前田瑞夫²、黒田裕¹

¹東京農工大・工・生命工、²理化学研究所・前田バイオ工学研究室

タンパク質凝集のメカニズムを理解することは、タンパク質工学や医学および創薬の分野にまたがる重要な研究テーマである。本研究は、タンパク質の末端に付加したアミノ酸がタンパク質の塩依存的凝集体形成に及ぼす影響を解析することを目的とした。モデルタンパク質として、ウシ膵臓トリプシン阻害タンパク質 (BPTI) の C 末端に同一のアミノ酸 (セリン、アラニン、アスパラギン酸) を 5 個付加した変異体を蛍光色素で標識したものをを用いた。これらの変異体は、先行研究により溶解性が異なることが示されている[1]。本研究では、動的光散乱法と光散乱法、蛍光法および FRET で、100mM~1500mM NaCl 存在下で形成される凝集体の測定を行い、凝集性および凝集体のサイズを変異体間で比較した。その結果、電荷を持つアスパラギン酸を付加した変異体は凝集しないが、それ以外の変異体は凝集しやすいことが分かった。また、アモルファスな凝集としては初めて、1 種類の蛍光色素のみで凝集シグナル変化を観測し、FRET で得られた分子間相互作用と完全に相関することを示した。さらに、凝集していない状態においても FRET のシグナルに変化が見られたことから、タンパク質同士の分子間相互作用の違いが凝集形成に影響を及ぼすことが示唆された。

[1] AM Khan, MM Islam, Y Kuroda, Analysis of protein aggregation kinetics using short amino acid peptide tags. *Biochim Biophys Acta Proteins and Proteomics*, 1834(10):2107-15 (2013)

3月7日（金）

【7AM1】（10:00～11:00）

1. 細胞内ミトコンドリア移動の評価法の開発

○杉本雄生、太田善浩

東京農工大学・工・生命

背景：本研究では、落射蛍光顕微鏡で連続撮影したミトコンドリア画像から、薬物などのミトコンドリアの移動への影響を効率よく評価する方法の開発を目指した。ミトコンドリア変性疾患において異常なミトコンドリアダイナミクスが観察されることから、ダイナミクスの評価は細胞内異常を見つけるのに有用と考えられる。移動を解析する従来法は単一粒子追跡法を利用したものが多く、重なり合っている糸状のミトコンドリアの移動を解析するには不向きであった。本研究では落射蛍光顕微鏡で撮影した連続画像から画像間の輝度の差をとるという簡単な方法で水平方向の線維状のミトコンドリアの移動や変形を調べることができる手法を採用した。実験では C6 glioma 細胞を用い、室温と 37°C でミトコンドリアの移動に差があるか調べた。

結果・考察：室温と比べ 37°C ではミトコンドリアがよく移動していることが示され、本方法が使えることがわかった。今後は、解析を通してその条件等を明確にし、さまざまな薬物の影響を計測して本方法の有用性を示していきたい。

2. ミトコンドリア新規単離法の検討

○柴田 貴弘，山根 理絵，太田 善浩

東京農工大・工学部・生命工学科

【背景・目的】 本研究は、外膜の損傷が少ないミトコンドリアを単離する方法を検討したものである。外膜の損傷が少ないミトコンドリアを単離することが出来れば、ミトコンドリア外膜を介した輸送調節の解明に役立つと考えられる。従来の方法では、組織や培養細胞を破碎する手法を採っていたため、ミトコンドリアが損傷を受けていると考えられ、細胞内では糸状に見えるミトコンドリアが、単離することですべて球状になっていた。そこで、本研究では、破碎と再懸濁を行わず、細胞膜に穏やかに孔を開けてミトコンドリアを取り出し、光学顕微鏡でミトコンドリアを観察した。

【方法・結果】 ほとんどのミトコンドリアが球状であったが、細胞内で見られるような糸状のミトコンドリアも存在した。蛍光色素 Calcein で染色したところ、糸状のミトコンドリアは球状のミトコンドリアに比べて高い蛍光輝度を示し、蛍光色素 TMRE で染色した場合も同様の結果が得られた。しかし、基質を加えてから TMRE の蛍光輝度が最大に達するまでの時間は糸状のミトコンドリアの方が長かった。このことは、糸状のミトコンドリアは内膜、外膜ともに損傷が少ないことを示唆している。

3. 2つの細胞集団に分化する人工的な哺乳類細胞間

コミュニケーションシステムの設計

○張子聡¹、鶴間章典¹、鮎川翔太郎²、木賀大介¹

¹東工大・総理工、²東工大・情報生命

近年、遺伝子を天然にはない様式で組み合わせることによって、人工遺伝子回路を細胞内に構築する研究が可能となった。特に、哺乳類細胞内で動作する人工遺伝子回路の研究は、遺伝子治療や再生医療への応用が期待される。現在、単一の哺乳類細胞内で動作する数々の人工遺伝子回路が実現されているが、その一方で哺乳類などの多細胞生物は、細胞間コミュニケーションによって専門化した細胞集団を作り、発生や分化などの高度な生命現象を可能にしている。そのため、人工遺伝子回路を用いてより高度な機能を実現するためには、人工的な細胞間コミュニケーションシステムの構築が必要となる。

本研究では、哺乳類細胞同士が拡散性シグナル分子のやり取りによって、細胞集団が2つの状態に分化する細胞間コミュニケーションシステムの設計を行った。実際に分化させる2つの状態は、拡散性シグナル分子産生状態とシグナル分子依存状態の2つになるように設計している。本研究の哺乳類細胞間コミュニケーションシステムの開発は、これからの人工遺伝子回路構築の複雑化や生命現象の解明に貢献できると期待する。

4. 細胞運命決定過程における細胞内状態変動のラマン分光分析

○高根沢 聡太^{1,2}、盛田 伸一³、尾崎 幸洋²、佐甲 靖志¹

¹理研・佐甲細胞情報研、²関学・理工、³東北大・理

細胞外因子による細胞運命決定において、同一の遺伝子・環境を持つ細胞でさえも細胞運命は異なる。このような確率的な振る舞いは、恐らく細胞内部の化学的状態（化学組成、分子数）の違いによって起きている。個々の細胞状態を定義し、その変遷を追跡することで、細胞運命決定までの経路を見出す可能性がある。遺伝子・タンパク質発現を網羅的に解析し、細胞状態を定義することもできるが、現在のところ破壊的であり、容易ではない。それに対し相補的な方法の一つとして、包括的な細胞の化学的状態を非破壊で定義出来るラマン分光法がある。本発表では、顕微ラマン分光法を用いて、細胞分化・増殖過程における細胞の内部状態変化を追跡した結果について報告する。

細胞運命決定のモデル細胞として MCF-7 を採用した。MCF-7 は Heregulin (HRG) および Epidermal growth factor (EGF) によって分化、増殖が誘導される。我々は、HRG・EGF 刺激直後と刺激後 1 日経過した細胞を、ラマン分光法で 2 時間追跡した。得られたスペクトルを解析した結果、分化・増殖過程の化学的状態は未刺激のそれと比べ激しく変化した。また、分化過程では刺激前の化学的状態に依存して、応答後の内部状態の変化の大きさが決定されている可能性が示された。

5. 複合酵素に見られる基質輸送経路の新規探索手法の開発

○矢野緑里¹, 由良敬²

¹お茶大・院人間文化, ²お茶大・生命情報セ

代謝パスウェイを構成する複合酵素において、ひとつの酵素の生成物が次の酵素の基質として渡される際に、酵素の外を経由せず、複合酵素の両反応部位をつなぐ経路（基質トンネル）を通過して輸送される場合がある。たとえば、トリプトファン合成酵素における触媒反応では、 α サブユニットで生じたインドールが、基質トンネルを通過して β サブユニットに輸送され、トリプトファンが生成される。基質の拡散防止や水と接触することで分解される中間産物の保護などのために、基質トンネルの存在は合理的である。多くの酵素の立体構造、およびそれらの酵素の複合体構造が実験あるいは計算によって明らかになってきている現在、代謝パスウェイに基質トンネルがどの程度存在するかを明らかにすることは可能なはずである。しかし、基質トンネルは、コンピュータグラフィックスの目視により発見されてきており、大量のタンパク質立体構造データから、自動的に基質トンネルを見いだす手法はない。そこで、本研究室では任意のタンパク質複合体データから、基質トンネルを高速で探索する手法を開発した。本発表では、その手法とトリプトファン合成酵素に対する適用結果を考察する。

6. 脂質膜デバイスを用いた膜輸送体の高感度活性計測

○大舘真也¹, 曾我直樹¹, 渡邊力也¹, 野地博行¹

¹東大・工・応用化学

膜輸送体は細胞膜を介した物質輸送を行う膜タンパク質であり、生理的に重要な役割を担っている。膜輸送体には受動輸送体と能動輸送体があり、受動輸送体に比べ輸送活性の低い能動輸送体は一分子単位の輸送計測法が確立されておらず理解が遅れている。そこで、本研究では微小反応容器を用いて能動輸送の検出にむけた高感度デバイスを開発し、能動輸送体の一種である Ca^{2+} -ATPase (SERCA) の活性計測を目指した。まず、微小反応容器 (40fL) をパターンしたデバイスを作成し、その容器の入り口を脂質二重膜で覆った。次に、SERCA をデバイスに導入し SERCA の ATP 加水分解に共役した容器内への Ca^{2+} 輸送の計測を試みた。微小容器では能動輸送によるわずかなイオン流入でイオン濃度が大きく変化する。そのため、容器内の Ca^{2+} 濃度応答を示す蛍光指示薬の蛍光強度変化の計測で、高感度に SERCA の活性計測ができる。実際に、SERCA を導入したデバイスに ATP を加えると蛍光指示薬の蛍光強度が増大し、 Ca^{2+} 濃度上昇が確認された。すなわち、本研究によって SERCA の活性計測に成功した。

【7 AM2】 (11:15~12:20)

7. ヒトカルシトニンの酸性膜との相互作用に依存したアミロイド線維形成機構の解明

○浅野 洗¹、阿部友樹¹、石島 (上平) 美弥²、渡辺 (伊藤) ひかり¹、川村 出¹、Ayyalusamy Ramamoorthy³、内藤 晶¹

¹横浜国立大・院工、²兵庫県立大・院理、³ミシガン大・化

ヒトカルシトニン (hCT) は32アミノ酸残基からなるペプチドホルモンであり、水溶液中で容易にアミロイド線維を形成する。しかし、その線維形成機構の詳細については未だに不明な点が多い。我々は、固体NMRを用いて中性および負電荷をもつ酸性の脂質二重膜 (バイセル) 存在下でのhCTの線維構造および線維形成速度を解析した。その結果、膜の組成により、異なる線維構造をとることが判明した。そして、膜の酸性度の上昇に伴い、線維形成速度が変化し、細胞毒性が高い線維核状態が保持されることが判明した。また、我々は、溶液NMRを用いて、ミセルとhCTとの結合様式および線維形成速度について解析した。その結果、hCTのミセルに対する結合様式は、酸性ミセルと中性ミセルとは異なることが判明した。そして、それに伴い、線維形成速度も変化し、異なる線維形成機構を持つことが判明した。これらの負電荷をもつ酸性膜の線維形成への影響は、hCTの膜との静電相互作用および膜上での濃縮によるものと考えられる。酸性膜の存在がhCTの線維形成を促進し、その細胞毒性を高めることが示唆され、病気の原因として、酸性膜が関与していることが示された。

8. 可溶性タンパク質の表面に疎水性アミノ酸を導入することで低下した溶解度の酸性アミノ酸の導入による回復

○ 八木創太、赤沼哲史、山岸明彦

東京薬科大学 生命科学部

タンパク質表面に露出した疎水性残基は他のタンパク質や脂質、リガンドとの相互作用に重要な役割を果たしている。しかし、タンパク質表面の疎水性領域の存在はタンパク質自体の溶解度の低下や凝集を誘発する。本研究では、電荷アミノ酸の導入により分子間の静電的反発を誘発することで、疎水性表面を持ったタンパク質の自己凝集を抑制し、可溶性を回復できるか検討した。始めに、可溶性タンパク質であるスレリスリン表面に6つのLeuを導入した変異体6Lを作製した。予想通り、6Lは不溶性の凝集体を形成した。6Lの疎水性表面近傍に塩基性アミノ酸であるArgもしくはLysを5つ導入した変異体は6Lと同様に不溶性であった。それに対して、酸性アミノ酸であるGluもしくはAspを3つ導入した変異体では溶解度が回復していた。また、さらに3つの酸性アミノ酸を (酸性アミノ酸を計6つ) 導入した変異体は凝集することなく、野生型と同じダイマー構造を形成した。これらのことから、疎水性表面を持ったタンパク質であっても、疎水性表面近傍に酸性アミノ酸を導入することで凝集を抑制し、溶解度を回復できることが分かった。

9. フェムトリットロドロップレットアレイを用いた アルカリフォスファターゼ 1 分子観測

○大林祐介¹、飯野亮太²、野地博行²

¹東大・工・応用化学、²東大院・工・応用化学

現在、疾病・感染マーカーの検出には一般的に酵素免疫吸着法 (ELISA) が用いられているが、より高感度な分析法の実用化により疾病等の早期発見が可能となる。フェムトリットロオーダーのドロップレットアレイを用いた β -galactosidase 1 分子観測を応用したデジタル ELISA が開発され、検出感度は通常の ELISA と比べ 10^6 改善された。より高活性の酵素を用いて行うことでデジタル ELISA をより短時間・ハイスループットに改善できる。本実験では高活性な Alkaline phosphatase (ALP) 変異体 (D101S mutant) の 1 分子観測と検出下限値の測定を行い、デジタル ELISA の抗体標識酵素として使用可能であると確認した。個々のドロップレットの蛍光強度変化から計測した 1 分子酵素活性は 877 s^{-1} と多分子での計測結果 (1090 s^{-1}) と近い値が得られ、ALP 1 分子のシグナル検出が可能であることを結論付けた。また ALP 濃度と蛍光を発するドロップレットの割合の対応をプロットすると直線性の良い検量線が得られ、検出下限値は 9.4 fM となった。

10. 超音波が誘導するがん細胞死

○藤里砂、高羅晴子、平岡和佳子

明大院・理工

本研究では、ヒト組織球性白血病細胞株を用い、低強度超音波 ($1\sim 10 \text{ MHz}$, $0\sim 2 \text{ W/cm}^2$) が引き起こす細胞死を解析することで、超音波が引き起こす生物作用のメカニズム解明に取り組んだ。最初に、超音波キャビテーション由来のヒドロキシルラジカルによる化学的作用を定量し、細胞増殖・細胞死との相関関係を検討した。次に、総合的な生物影響が反映される細胞の増殖能と、照射直後の破裂細胞、照射 24 時間後のアポトーシスを分析した。実験結果より、ヒドロキシルラジカルによる化学的作用と、気泡の振動等による機械的作用の両者が、超音波による生物効果を引き起こしていることが明らかとなった。また、周波数や強度の違いは、化学的作用と機械的作用の割合を変化させることが実証され、 $1\sim 2 \text{ MHz}$ の周波数で 1 W/cm^2 未満の強度で引き起こされるがん細胞の破裂には、機械的作用のみが関わっていることが明らかとなった。この結果は、超音波とマイクロバブル製剤等の併用によって機械的作用を増幅させることにより低強度超音波が、がん治療等にも応用可能であることを示唆している。今後は、ターゲットへの照射環境を検討することが必要である。

11. 表面増強ラマン分光 (SERS) イメージングによるヌクレオチド検出法の開発

○中川佳史

東大・工

表面増強ラマン散乱 (SERS) は銀等のナノ粒子近傍にある分子のラマン散乱を著しく増大する現象である。その強い増強を利用することで一分子由来のラマン散乱でも 1 秒以下で検出可能な一方でコンタミネーションも検出される、スペクトルが銀ナノ粒子への吸着状態に依存する等の問題点がある。ゆえに SERS スペクトルの同定は通常のラマン散乱に比べてより注意深く解析を行う必要がある。ゆえに本実験は SERS イメージングを用いたアデニンヌクレオチド類の SERS スペクトルを検出・同定する方法の開発を目的とした。

本実験ではアデニン、アデノシン、AMP、ADP、ATP の 1mM 水溶液の測定を行った。この結果得られたスペクトルは全て 730cm^{-1} , 1320cm^{-1} 付近に強いピークが見られた。またこれらが通常のラマン散乱でのピークと一致したことからこのピークはアデニン環由来のピークであると考えられる。一方 ATP1 分子以下となる低濃度での ATP の測定結果はこれらのピークが見えなかった。この原因としては解析方法等が不適切、吸着状態の違いゆえスペクトルも異なっている等の要因が考えられる。

今後は手法の改善をすすめ一分子測定を可能にし、タンパク質の加水分解に伴う ATP から ADP への変化を検出することを目標としている。

【7 PM1】 (13:30~14:35)

12. 円偏光二色性法と示差走査蛍光定量法を用いた BPTI 変異体の熱安定性の評価

○小須田慧司¹、Aude Echalié²、黒田裕¹

¹東京農工大・工・生命工、²モンペリエ大学・構造科学研究センター

蛋白質の熱安定性を決定する手法の多くは高濃度・高純度の試料を大量に必要とし、複数の試料の同時測定が難しい。最近開発された示差走査蛍光定量法 (Differential Scanning Fluorimetry, DSF) は、低コストかつ一回の測定で多数の蛋白質の熱安定性を評価することができるため、プロテオミクス研究に適していると考えられている。当研究では、従来から用いられている円偏光二色性 (CD) 測定と DSF を用いて、単一アミノ酸を 5 残基付加したウシ膵臓トリプシン阻害蛋白質 (BPTI) 変異体の熱安定性を評価した。CD 測定では、通常の光路長 1 cm の試験管を用いて 5~20 μM の比較的 low 濃度のみで測定が可能であった。一方で DSF では、より高濃度の試料を測定できたが、低濃度の測定は難しかった。両手法によって算出された変性中点温度 (T_m) は、本研究で対象とした変異体で値が一致した。また、DSF を用いることで、異なるバッファー条件での熱安定性を迅速に調べることができた。さらに、疎水性の強いイソロイシンを付加した BPTI 変異体の熱安定性が高濃度で低下することが示された。

13. 大腸菌の細胞壁合成阻害による自己溶菌を利用した組換えタンパク質抽出法の開発

○二宮拓也¹、上岡哲矢²、惣谷志保里²、黒田裕²

東京農工大学大学院工学府¹産業技術専攻、²生命工学専攻

大腸菌内から目的の組換えタンパク質を回収する際、集菌後超音波破砕などの物理的な手法がよく用いられるが、熱や振動が目的タンパク質に損傷を与える場合がある。当研究室では、細胞壁合成阻害作用を持つ VanX 酵素を用いて大腸菌の自己溶菌による穏和な条件でのタンパク質抽出法が開発されている[1]。本発表ではこの溶菌機構に着目し、抗生物質であるペニシリン系抗生物質を用いて大腸菌を溶菌させる、新規のタンパク質抽出法について述べる。4種類のモデルタンパク質を発現させたのち抗生物質を用いて溶菌を誘導させ、培養液を SDS-PAGE 解析により評価した結果、培地中に漏出されたタンパク質が検出できた。また、培地中に漏出したタンパク質の活性は、超音波破砕によって得られたものと同程度の活性を持っていた。さらに、細胞壁の骨格であるペプチドグリカン鎖を加水分解する酵素であるリゾチームと細胞膜を溶解させる界面活性剤を併用する事で、溶菌効率が大幅に向上した。

[1] T Kamioka, S Sohya, N Wu, T Maki, T Matsuda, T Ikegami, H Nakamura, and Y Kuroda. Extraction of Recombinant Protein from E.coli by Using a Novel Cell Autolysis Activity of VanX, *Analytical Biochemistry*, 439(2):212-7 (2013)

14. サルモネラ菌べん毛繊維の多型変換のメカニズムに関わるアミノ酸残基の推測

○氏家篤、阿部里穂、石川幸、北川莉子、杉山友香、松永彩花、林史夫、大澤研二

群馬大学・工学部

サルモネラ菌べん毛繊維は、494 アミノ酸残基のフラジェリンからなるタンパク質集合体であり、様々ならせん構造をとることが知られている。このらせん構造の変化は多型変換と呼ばれ、そのメカニズムは未だ不明な点が多い。本研究室では、1 アミノ酸置換により生じた直線形べん毛繊維をもつ突然変異体 4 種から遊泳能力を回復した復帰突然変異体を多数単離し、多型変換に重要なアミノ酸残基として Ser106、Ala416、Ala427、Arg431、Asp107、Gly426、Ser448 を同定した。本研究では、多型変換のメカニズムを知るために、これらのアミノ酸残基やその周囲でそれらと相互作用していると推測されたアミノ酸残基に変異を導入し、それらの変異体のべん毛繊維のらせん構造と遊泳を観察した。Arg431 を Cys、His、Ser に置換した変異体のべん毛繊維は Curly 型をとっていた。本発表ではこれらの結果も含め、他の変異種の結果について報告し、考察する。

15. 部分フッ素化・非フッ素化二成分系脂質膜中におけるバクテリオロドプシンの分配

○吉野 賢¹、高木 俊之²、高橋 浩¹、菊川 峰志³、横山 泰範⁴、網井 秀樹¹、金森 敏幸²、園山 正史¹

¹ 群馬大・院理工, ² 産総研, ³ 北大・院先端生命, ⁴ 名大・院工

膜タンパク質は生命現象の解明や創薬開発において重要な標的タンパク質である。しかし膜タンパク質を生体から取り出し、その機能を詳細に調べられる系に再構成することは極めて困難であり、新たな界面活性剤や人工脂質の開発が強く望まれている。我々は天然脂質の安定性の低さを克服するために、リン脂質 DMPC のアシル鎖の一部にフッ素を導入した新規部分フッ素化リン脂質 (diF4H10-PC) を設計・開発し、バクテリオロドプシン (bR) の再構成を検討した。その結果、従来の DMPC に再構成した場合に見られた脂質膜のゲル-液晶相転移に伴う bR の二次元結晶の解離が起きず、機能時の安定性が向上した。

本研究では diF4H10-PC 再構成 bR が液晶相で三量体を形成する要因を探るため、フッ素化による親和性の変化に着目し、diF4H10-PC と DMPC の混合膜に bR を再構成した。様々な混合比の混合膜において、いずれの混合比でも bR は DMPC 膜に選択的に取り込まれた。このことから bR と diF4H10-PC の親和性の低さが示され、diF4H10-PC 膜の液晶相において bR の三量体の維持を助ける働きをすることが示唆された。

16. バクテリオファージ Mu ネックサブユニットの構造解析

岩崎拓真¹、○武田茂樹¹、山下栄樹²

¹ 群大・理工, ² 阪大・蛋白研

バクテリオファージ Mu は大腸菌に感染する溶原性のウイルスであり、正二十面体でゲノム遺伝子を格納している頭部、収縮性の尾部、宿主を認識して結合するテイルファイバーなどからなる。今回、頭部と尾部を繋いでいるネックの部分形成している gp36 の X線結晶解析を行い、他のファージのネックと比較したので、その結果を報告する。

精製した gp36 は超遠心分析により溶液中の分子量は 16.4KDa と測定され、単量体であることが確認できた。X線結晶解析により決定された構造は、5本の α ヘリックスからなり HK97 ファージのネックの構造とよく類似していたが、HK97 のネックは水溶液中で 13 量体である。決定された構造から、HK97 のネックでサブユニット同士の結合を起こしているループが Mu ファージの gp36 では非常に短いために分子集合できないで単量体であることがわかる。また、gp36 は phi29 ファージのネックや P22 ファージのネックの一部とも類似した構造をもっており、おそらく gp35 や gp37 といった他のサブユニットと結合した状態で他のファージのネックと同様な状態に分子集合すると考えられる。つまり、Mu ファージのネックは phi29 ファージや P22 ファージのネックがいくつかのサブユニットにわかれている状態になっていると予想される。

17. 金ナノ粒子を用いた投影型 X 線顕微鏡の分解能の向上

○茂木貴大、吉村英恭

明大・理工

近年、シンクロトロン放射光を用いた方法や X 線自由電子レーザーを用いた方法により X 線顕微鏡の技術は急速に進歩しており、数十ナノメートルの分解能を達成するに至っている。しかし、これらの方法はシンクロトロンのような大きな施設でしか行うことができないため、まだ一般的な方法とは考えられない。したがって、実験室にも設置可能で容易に使用可能な投影型 X 線顕微鏡が、シンクロトロンを用いた方法と補完しあって、生物試料の観察に有効な手段となることが期待されている。本研究で用いた投影型 X 線顕微鏡は光学顕微鏡よりも分解能が良く、生物試料を壊さずに観察できるという利点がある。また、X 線は透過性が高いため生物試料の内部構造を観察でき、焦点深度も深く試料が多少厚くても観察可能で、複雑な光学系がないため X 線の焦点を合わせる必要もない。

本研究では、X 線を発生させるターゲット金属に金ナノ粒子を用いることで X 線発生源を小さくし、分解能の向上を試みた。

18. アポフェリチンのアセンブリにおける静電相互作用の役割

○佐藤大輔¹、大友秀明¹、黒部淳史¹、竹部皐月¹、砂戸歩美¹、井上正義¹、山田好輝²、
中川香奈子¹、藤原和夫¹、池口雅道¹

¹創価大学・院・生命情報工、²JASRI/SPring-8

生体内には多数のサブユニットから形成される、対称性を持った超分子構造体が数多く存在する。例えば、フェリチン、ウイルス・キャプシド、Vault、プロテアソームなどである。これら超分子構造体のアセンブリメカニズムを明らかにすることは生物学的、物理化学的に重要である。Non-heme ferritin (Ftn) は 4/3/2 回転対称軸を持つ、24 量体の球殻状蛋白質である。Ftn は酸性 pH で 2 量体に解離し、中性 pH に戻す事で 24 量体へリアセンブリ可能である。本研究の目的は Ftn のアセンブリメカニズムを明らかにすることである。酸解離した Ftn 溶液と高 pH の緩衝液を混合することで反応を開始し、時間分解 X 線小角散乱実験により反応を追跡した。アセンブリの初速度は、蛋白質濃度の 2 乗に比例することが分かった。Ftn のアセンブリ速度は pH に依存し、pH 6.4 では速すぎて反応を追跡できなかった。pH を上げることで反応は遅くなり、pH 8.0 で全反応を追跡する事に成功した。pH 依存性の原因を調査するために Ftn のネットチャージを変化させた変異体、特異的な塩橋を破壊した変異体を作成した。これらの変異体は全て WT と同様の構造を持っていた。

19. 金属ナノ粒子の二次元配列法の開発

○荻村 史佳¹、引地 祐介¹、吉村 英恭¹

¹明大・理工,

粒径が約7 nmのナノ粒子を、フェリチンタンパク質を用いて作製し、シリコン(Si)基板上に六方最密の二次元粒子配列を作製した。フェリチンは外径13 nmの球状タンパク質であり、鉄などの無機物の粒子を内径7 nmの空洞内に形成することが知られている。配列化の方法としては、タンパク質変成膜上にカドミウムイオンを架橋にして作製する方法(Nano Letters 5, 991, 2005)や、カーボンナノホーン親和性のペプチドを表面修飾したフェリチンを用いる方法(Langmuir 24, 12836, 2008)が知られているが、これらの方法はカドミウムの利用や特殊なフェリチンを使う必要があり、産業利用には適さないと考えられる。そこで、本研究では横毛管力を利用し配列化を行った。配列形成は、固定したSi基板を水槽に浮かせたフェリチン溶液中に浸し、水槽の水をペリスタポンプで排出することでフェリチン溶液の界面をゆっくり移動させ、横毛管力を利用して六方最密化を行った。この方法により、単層で大きな配列を作製することができたが、配列中に多くの欠陥が観察された。今後は湿度、温度、移動速度、溶液pHなどを精密に調整することにより欠陥のない大きな配列体を形成させる条件を探索していく。

20. ウマ H 鎖フェリチンを用いた鉄ナノ粒子の形成

○根本舞、吉村英恭

明大・理工

フェリチンには核形成部位を持つ L 鎖と酸化活性部位を持つ H 鎖が存在する。ウマ L 鎖フェリチン蛋白質のみから成る fer0 は溶液中で非常に安定であるため、内部で金属ナノ粒子を形成させる研究が進んでいる。しかしながら、fer0 内で形成される粒子は鉄以外では形成率が低く、形成されたとしても多結晶のことが多い。一方、H 鎖フェリチンは活性部位の存在により形成率の上昇が期待されるが、溶液中での安定性が低いために粒子形成の研究は進んでいない。そこで、我々はウマ H 鎖フェリチン蛋白質を用いることによって単結晶の粒子の形成率を上げることを試みている。まず、ウマ H 鎖フェリチン (HoHF) の発現・精製法を構築したところ、2 種の HoHF を得ることができた。これらの HoHF では鉄イオンの酸化速度に大きな違いは見られなかったが、イオンの濃度によるフェリチンの凝集体形成に違いが見られた。低濃度の鉄イオンを用いて粒子を形成させたところ、fer0 では鉄を含まないアポフェリチンが多数存在するのに対し、HoHF では均一に小さな粒子が形成されていた。