第4回日本生物物理学会関東支部会

プログラム・要旨集



会期:2015年3月9日(月)・10日(火)

会場:日本大学文理学部 3 号館 3 階 3305 教室

参加者へのご案内

☞ 日 時:3月9日(月)10:30~·10日(火)10:00~

(両日とも第一発表の30分前から受付を開始します)

場 所:日本大学文理学部 3 号館 3 階 3305 教室

懇 親 会:3月9日(月)17:30~19:30 3号館1階カフェテリア秋桜

☞ 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 5分

以下の通りベルを鳴らします。

ベル1回:講演終了2分前

ベル2回:講演終了、質疑応答

ベル3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。

⑤ 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。付属のコネクタが必要な場合は、お忘れなくご持参ください。



パソコン側 (メス)



接続ケーブル側(オス)

※バッテリー切れに備え、電源アダプタ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。

事務局で予備のパソコンを用意します。

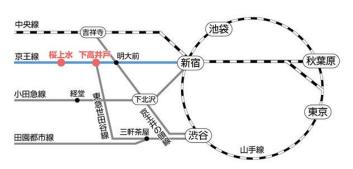
(仕様: OS: Windows8/パワーポイント 2010)

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。

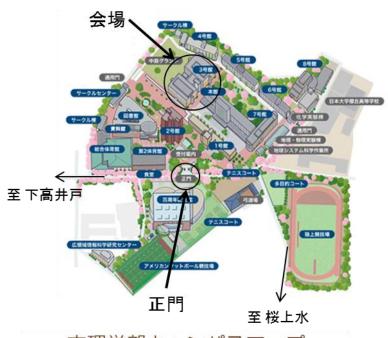
☞ 昼食は3号館1階カフェテリア秋桜がご利用できます。営業時間11:00~14:30

会場及び交通のご案内

会場:日本大学文理学部 3 号館 3 階 3305 教室 (京王線/下高井戸駅あるいは桜上水駅より徒歩8分)







文理学部キャンパスマップ

プログラム

1日目:2015年3月9日(月)

座 長 斎藤 稔 (日本大学・文理学部)

小松崎 良将(日本大学・理工学部)

[9AM1] $10:30\sim11:50$

- ① 眼電基準電極を使用しない P300 speller の実装と評価(10分) p.7 樋口 丈志(明治大学・理工学部)
- ② 運動想起を用いた 1 電極による BCI の信号解析法の比較(10分) p.7 福富 裕康(明治大学・理工学部)
- ③ 生物対流パターンの環境応答性(10分) p.8 末松 J. 信彦(明治大学大学院・先端数理科学研究科)
- ④ 末梢における T 細胞の選択に関する統計的解析 (10分) p.8 堅山 耀太郎 (東京大学大学院・工学系研究科)
- ⑤ ナメクジ嗅覚神経系に見られる時空間活動パターンの膜電位イメージング (10分) 石田 康平 (日本大学大学院・総合基礎科学研究科) p.9
- ⑥ 新しいカルシウム感受性色素を用いたマウス海馬スライスのレーザー共焦点イメージング (10分) p.9

浜崎 雄太 (日本大学大学院・総合基礎科学研究科)

① 中枢振動回路の一酸化窒素による動的修飾(20分) p.10 渡辺 恵(東北大学大学院・工学系研究科)

~ 昼 食 ~

座 長 伊倉 貞吉 (東京医科歯科大学・難治疾患研究所) 黒田 裕 (東京農工大学・工学部)

[9PM1] $13:00\sim14:20$

- ① 複数ペプチドの全原子分子動力学シミュレーションを用いたアミロイド形成機構の解析(10分) p.11
- 小須田 慧司(東京農工大学大学院・工学府)
 ② SAAP 力場の改良とシニョリンの分子シミュレーション(10分)

p.11

鈴木 智樹 (東海大学・理学部)
③ 単一アミノ酸ポテンシャルを用いた SAAP 力場の開発とペプチド分子設計への応用 (20分)

p.12

岩岡 道夫(東海大学・理学部)

④ 光電子収量分光によるクロロフィル a 溶液の電子構造観測 (20分) p.12 武田 祐希 (千葉大学大学院・融合科学研究科)

佐藤 大輔 (創価大学・工学研究科) ~ 休 憩 ~ 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) 太田 善浩 (東京農工大学・工学部) [9PM2] $14:30\sim16:00$ ① SH1 ヘリックス変異ミオシンは滑り速度と熱安定性を低下させる(10分) p.14柴田 琴実 (日本大学大学院・総合基礎科学研究科) ② デングウイルス由来 ED3 ドメインの熱安定性と会合状態についての解析(10分) 早乙女 友規 (東京農工大学・工学部) p.14 ③ Analysis of protein aggregation and oligomerization using short tag (SEP-tags) (10分) p.15Md. Golam Kabir (Tokyo University of Agriculture and Technology) ④ 尿素変性を用いたデングウイルス由来エンベロープ糖蛋白質第 3 ドメインの変異 体解析 (10分) p.15櫻井 博光 (東京農工大学大学院・工学府) ⑤ 電子線一分子内計測法の開発とタンパク質分子内運動計測への応用(10分) p.16 小川 直樹 (東京農工大学大学院・工学府) ⑥ 核質中のシャトルタンパク B23 を含む構造の動態観察(10分) p.16三松 沙織(産業技術総合研究所・バイオメディカル研究部門) ⑦ 成長円錐におけるアクチン関連タンパクの FRAP 解析(10分) p.17田中 みなみ (産業技術総合研究所・バイオメディカル研究部門) ⑧ 超解像光学顕微鏡によるアクチン系細胞骨格の観察(20分) p.17加藤 薫(産業技術総合研究所・バイオメディカル研究部門) ~ 休 憩 ~ 座長 渡辺 恵 (東北大学大学院・工学系研究科) [9PM3] $16:10\sim17:10$ ① ランビエ絞輪近傍のチャネルによる活動電位高頻度発火の制御(20分) p.18廣野 守俊(同志社大学・脳科学研究科) ② 数理的スパイン解析ソフト Spiso-3D を用いた海馬シナプス新生に対する性ホルモ ンの急性効果の解析(20分) p.18 北條 泰嗣 (東京大学大学院・総合文化研究科) ③ 川戸研における脳科学の進展:海馬の記憶と神経ステロイド(20分) p.19川戸 佳(東京大学大学院・総合文化研究科)

⑤ フェリチンアセンブリ速度における正味電荷の影響(20分)

p.13

~ 懇親会(カフェテリア秋桜) ~

2日目:2015年3月10日(火)

座 長 大澤 研二 (群馬大学大学院・理工学府)

[10AM1] $10:00\sim11:00$

- ① 好熱菌酵素の低温高活性化に関わるアミノ酸置換の探索(10分) p.20 筒井 聡志(東京薬科大学・生命科学部)
- ② アミノ酸組成の変化を許容して推定した祖先型タンパク質の耐熱性(10分) p.20 別所 瑞萌(東京薬科大学・生命科学部)
- ③ 白金結合能を持ったタンパク質ループ配列の創出と解析(10分) p.21 梶 亜純(東京薬科大学・生命科学部)
- ④ シアノバクテリア由来アルカン合成酵素の変異解析及びバイオエネルギー産生への 応用(10分) p.21 工藤 恒(東京大学大学院・総合文化研究科)
- ⑤ プロリン異性化酵素とアルツハイマー病 (20分) 伊倉 貞吉 (東京医科歯科大学・難治疾患研究所)

~ 休 憩 ~

座 長 赤沼 哲史(東京薬科大学・生命科学部) 工藤 恒(東京大学大学院・総合文化研究科)

[10AM2] $11:10\sim12:10$

- ① サルモネラ菌べん毛繊維の構造を制御する Ala₄₂₇ の部位特異的変異体の作製と表現型解析(10分) p.23 神保 悟子(群馬大学・工学部)
- ② 薬剤のターゲットタンパク質への変異導入による大腸菌薬剤耐性獲得機構の解明 鈴木 麻衣子(東京大学大学院・新領域創成科学研究科)(10分) p.23
- ③ 天然変性タンパク質 HIV-1 Tat による標的分子認識機構 p.24 椢原 朋子(東京大学大学院・総合文化研究科)(10分)
- ④ F-アクチンの水和状態に及ぼす 2 価金属イオンの影響 p.24 千島 亮太郎 (東北大学大学院・工学研究科) (10 分)
- ⑤ ミオシンサブフラグメント 1 の水和に及ぼす ATP アナログの影響(10 分) p.25 大椙 英恭(東北大学大学院・工学研究科)

座 長 林 史夫 (群馬大学大学院・理工学府)

八桁 清樹 (東京大学大学院・新領域創成科学研究科)

[10PM1] $13:10\sim14:10$

- ① ラマン分光による NaI 重水軽水混合溶液中のハイパーモバイル水和層解析(10分) 佐藤 正義 (東北大学大学院・工学研究科) p.26
- ② 誘電緩和分光法と分子動力学法に基づくハイパーモバイル水形成イオン周囲の水和特性評価(10分) p.26 最上 譲二(東北大学大学院・工学研究科)
- ③ アクトミオシンのハイパーモバイル水和層の役割について考える(10 分) p.27 鈴木 誠(東北大学大学院・工学研究科)
- ④ 光誘起交換スペクトルを利用した蛋白質構造変化前後の NMR 信号帰属法(10分) 植田 啓介(理化学研究所・ライフサイエンス技術基盤研究センター) p.27
- ⑤ 疎水性相互作用と静電相互作用を基本とした新規タンパク質間相互作用の創出 (20 分) p.28

八木 創太 (東京薬科大学大学院 生命科学研究科)

~ 休 憩 ~

座 長 鈴木 誠(東北大学大学院・工学研究科) 向井 秀夫(明治大学・理工学部)

[10PM2] $14:20\sim15:50$

- ① カーボンナノチューブと形質転換したタンパク質複合体のペプチドアプタマー分子 認識能を利用した複合体形成(10分) p.29 二井 大輔(東京理科大学大学院・理学研究科)
- ② 温度および塩濃度の調節による poly(N-isopropylacrylamide)で表面被覆した単層 カーボンナノチューブの分散・沈殿制御(20分)取泉 勝樹(東京理科大学・理学部)
- ③ 血圧調整酵素レニン触媒残基の pKa シフト機構の解明(20 分) p.30 山下 雄己(東京大学・工学部)
- ④ イソプレノイド前駆体合成酵素 IDI-2 の活性種フラビンのプロトン化状態 (20 分) 高岡 友裕 (東京大学・工学部) p.30
- ⑤ 抗体凝集に関与する IgG1 定常領域ドメインの特性解析(20分) p.31 八桁 清樹(東京大学大学院・新領域創成科学研究科)

~ 休 憩 ~

座 長 小松崎 良将(日本大学・理工学部) 斎藤 稔(日本大学・文理学部)

[10PM3] $16:00\sim17:00$

- ① 単離ミトコンドリア内の Mito-GO ATeam 計測(10分)ル下 紗季(東京農工大学・工学部)
- ② ダメージの少ないミトコンドリア単離法の検討(10分) p.32 柴田 貴弘(東京農工大学大学院・工学府)

- ③ 老化にともなうラット脳内の性ステロイド合成系と受容体の変化(20分) p.33 棟朝 亜理紗(東京大学大学院・総合文化研究科)
- ④ シクロフィリン D による酸化ストレス誘導機構 (20分) p.33 太田 善浩 (東京農工大学・工学部)

~ 閉 会 ~

① 眼電基準電極を使用しない P300 speller の実装と評価 (10分)

○樋口丈志 1, 向井秀夫 1

1明大・理工・情報

Brain Computer Interface (BCI) とは脳波等の脳活動を解析し、その情報で機器を操作するための仕組みである。BCI システムでは例えば思考するだけで意志の伝達を行うことが可能になるので、体を動かせない人のコミュニケーションの助けとなることが期待される。代表的な BCI システムに、脳波の一つである事象関連電位の P300 を用いて文字の入力を行う P300 speller がある。BCI の研究では瞬きなどの眼電位変化(眼電)は脳波の大きなノイズの原因であり、P300 speller の正確性を損なう要因となるため、従来は眼電を同時に測定してその影響を除く必要があった。しかし、ユーザーは眼の周りにも電極を貼付しなければならないので、眼電を測定せずに済めばシステムの使用感の向上につながる。本研究では、眼電の変化がどの程度 P300 speller に影響を与えているのかを検討し、眼電の影響の少ない電極で構成される speller を実装し性能を評価した。その結果、最も影響を受ける前頭部の電極 Fz を除いた時の性能が、試行回数が少ない時点でも良く、最終的には 80%の正答率が達成された。

② 運動想起を用いた1電極によるBCIの信号解析法の比較(10分) ○福富裕康¹、向井秀夫¹

1明大・理工・情報

手などによる実際の運動や操作を行わず、脳内活動を機器などの命令に活用するインターフェースを BCI(brain-computer interface)という。筋萎縮性側索硬化症(ALS)などの運動障害をもつ患者にとって運動を想起することで物の操作ができればメリットが大きいので、運動想起に伴う脳波の変化を用いた BCI の研究が盛んに行われている。BCI 研究は、多数の電極を用いるものと少ない電極数を用いるものとに分けられる。運動想起を用いる少数の電極による BCI の中で、すべての処理を1電極のみで行っている実装は少ない。本研究では、すべての処理を1電極から得られるデータを用いて行い、運動想起の検出をする BCI の実装を行った。信号の解析には、3種類の特徴抽出法と2種類の判別法を用い、それぞれを組み合わせた時の精度を比較した。検出する状態としては、運動想起中か運動想起をしていないかの2状態に限定した。実験の結果、平均的に良い精度を出したのは時間差の信号強度の増加を用いた time-varying 特徴と判別法としてサポートベクターマシン(SVM)の組み合わせであった。この解析法を採用することで、1電極での BCI の精度向上が期待される。

③ 生物対流パターンの環境応答性(10分)

○末松 J.信彦 1

1明治大院·先端数理

微生物の多くは化学濃度場や重力場、光場などの環境に応答して遊泳速度や方向を制御する機能(走性)を示す。この走性によって上に向かって遊泳するような環境下において、微生物の集団が巨視的な対流パターン(生物対流パターン)を形成することは知られている。本研究では、光に対する走性を示す微生物であるミドリムシの生物対流パターンに着目し、その環境応答性に関して調べた。ミドリムシの培養液の下からフラットライトで定常的に白色光を照射すると、負の走光性によって斑点が六方格子状に規則的に配列した生物対流パターンが形成された。その特性波長は照度が強いほど短くなった。光強度を周期的に変化させる条件下では、周期が短い時には定常光と同様のパターンが形成され、周期が十分に長い時にはパターンの生成と消滅が繰り返された。しかし、数十秒の周期(ミドリムシが対流セルを一周するのにかかる時間に相当)では不規則な斑点パターンが形成された後、規則的な斑点パターンが形成される領域と対流パターンが形成されない領域が現れ、多重安定であることを示唆するような結果が得られた。本講演では主に観察結果を報告し、考えうる機構についての提案を行う。

④ 末梢における T細胞の選択に関する統計的解析 (10分)

○堅山耀太郎 1 横田亮 2 小林徹也 2

1東京大学工学系研究科電気系工学専攻,2東京大学生産技術研究所

免疫システムにおいて中心的役割を果たす T 細胞は、それぞれ T 細胞受容体 (T cell receptors; TCR) を持っており、その受容体に反応する抗原を非自己とみなして免疫反応を開始する。 TCR 配列は T 細胞の分化の過程で確率的に生成されるため多様なパターンを持ち、免疫システムが非自己を幅広く認識することを可能にしている。 そのため、この TCR の多様性の分布のダイナミクスを理解することは、免疫システムの性質を理解する上で欠かすことのできない要素である。

T細胞は骨髄で生成された後胸腺に移動し、成熟の過程で自己の細胞・タンパク質に対する反応性の程度に基づいて選択される。成熟した T細胞はさらに末梢に移り、実際の病原体由来の抗原に反応し増殖する。したがって、TCR の多様性の分布は骨髄、胸腺、末梢で大きく変化すると考えられている。胸腺と末梢における TCR 分布の変化は、CD4+T細胞を対象として先行研究により確率モデルが提案されている。しかし、CD4+T細胞の中には多様なサブセットが存在しており、これらのモデルはこのサブセット間での違いを考慮していない。特に、免疫反応の抑制に関わる制御性 T細胞(CD4+foxp3+)はその他の CD4+T細胞と多くの点で異なる挙動を示し、選択においても独自の特徴を持つと考えられている。本研究では、マウスの胸腺と末梢においてそれぞれ採取した制御性 T細胞(CD4+foxp3+)とヘルパーT細胞(CD4+foxp3-)の TCR のアミノ酸配列データを統計処理し、胸腺と末梢の TCR 分布の関係を確率モデル化することで、サブセットごとに選択の特徴を解析した。

- ⑤ ナメクジ嗅覚神経系に見られる時空間活動パターンの膜電位 イメージング (10分)
 - 〇石田康平, 浜崎雄太, 斎藤稔
 - 日本大学大学院・総合基礎科学研究科

チャコウラナメクジの嗅覚中枢である前脳葉では、約 1 Hz の局所場電位(local field potential; LFP)の振動現象が見られる。しかしながら、電気生理的手法では測定電極が接触している部分の神経活動しか測定できない。本研究では、画像生理的手法(膜電位イメージング)を用いることで、前脳葉の空間的な神経活動を捉えることを試みた。膜電位感受性色素としては Di-4-ANEPPS を用い、その蛍光強度変化を sCMOS カメラで測定した。その結果、前脳葉の先端部から基部に向かって神経活動が伝搬し、先端部と基部で LFP 振動のピークに時間差があることを見出した。また、触覚に様々な匂い刺激を行い神経活動の変化を調べた。その際、取得した画像から膜電位変化に対応した擬似カラー化を行い、神経活動が伝播する様子の可視化を行った。その結果、忌避性の匂い刺激を与えると LFP 振動のピークの時間差が縮まり、神経活動の伝搬速度が増加する様子を可視化することができた。

- ⑥ 新しいカルシウム感受性色素を用いたマウス海馬スライスの レーザー共焦点イメージング (10分)
 - ○浜崎雄太,小山内裕美,宇野祥規,小原航,鈴木涼太,斎藤稔 日本大学大学院・総合基礎科学研究科

脳は多くのニューロンからなる複雑なネットワークを形成している。このような多数のニューロンの活動を同時測定するには、電気生理的手法は適していない。そこで我々は、単一ニューロンレベルの分解能で、多数のニューロンの活動を同時に測定することが可能な Functional multineuron calcium imaging(fMCI 法)を用いて、複雑な脳機能を調べている。fMCI 法は、細胞内にカルシウム感受性蛍光色素を導入し、ニューロンの活動に伴うカルシウム流入をレーザー共焦点顕微鏡によって画像として捉える手法である。カルシウム感受性蛍光色素としては Oregon green BAPTA-1 (OGB1) を使用するのが主流であるが、OGB1 では SN 比が低く、神経活動の検出が困難である。そこで本研究では、最近開発されたカルシウム感受性蛍光色素 Cal-520 を使用した fMCI 法を行い、SN 比の向上を試みた。その結果、同一の励起光強度で測定を行った場合 Cal-520 は OGB1 に比べ SN 比が高く、神経活動の検出数が増加した。

⑦ 中枢振動回路の一酸化窒素による動的修飾 (20分)

○渡辺恵

東北大・工

中枢神経系はさまざまな振動活動を生じることが知られている。振動活動は認知機能に重要な役割を果たしていると考えられている。ナメクジの嗅覚中枢である前脳葉では、約1Hzの局所場電位の自発振動活動が測定される。触角に匂い刺激を与えると、振動数の増加と、活動の空間的同期性の亢進が起きる。この応答のメカニズムを詳しく知るために、前脳葉に入力する神経線維に対して単発の電気刺激を行った。その結果、匂い刺激の場合と同様の活動変化が生じた。これらの変化は一酸化窒素(NO)の合成阻害剤で阻害されたことから、前脳葉での入力依存的な NO の放出が振動活動を修飾すると考えられた。さらに詳細な解析から、振動数や同期性の変化は、自発振動活動に対する刺激タイミングの位相に依存することが明らかになった。修飾効果の位相依存性は NO の光放出でもみられ、NO が振動活動を動的に修飾できることが示された。これらの結果は結合振動子モデルによって再現された。匂いの記憶や弁別などの脳機能に、振動回路の動的性質が関与している可能性が考えられる。

9PM1 13:00~14:20

- ① 複数ペプチドの全原子分子動力学シミュレーションを用いた アミロイド形成機構の解析 (10分)
 - ○小須田慧司1, 末永敦2, 泰地真弘人3, 黒田裕1
 - 1東京農工大・工,2産総研・AIST,3理研・QBC

アミロイドは様々な疾患の原因とされる蛋白質凝集体である。その詳細な形成機構は明らかではないが、「コア配列」と呼ばれるアミロイドを形成する蛋白質の部分配列がアミロイド形成に関与すると考えられている。本研究では、全原子分子動力学シミュレーションを用いてコア配列を有する 27 本のペプチドの凝集を観察し、コア配列ペプチドの凝集性、凝集時の二次構造形成について解析した。用いたペプチドは実験的にアミロイド線維を形成することが確認された NFGAILSS である。これを野生型とし、さらに各残基をアラニン・フェニルアラニンスキャニングした変異体も同様に解析した。全ての変異体は 50 ナノ秒で凝集したが、野生型に比べ、フェニルアラニンや疎水性残基をアラニンに置換した変異体では凝集体の 6 構造が減少した。野生型ペプチドの凝集において、計算初期にフェニルアラニン間の 6 ブリッジが観測された。しかし、マルコフモデルを用いて 6 構造形成経路を解析したところ、フェニルアラニン間の 6 ブリッジはその後の 6 構造形成を促進する効果はなかった。一方、マルコフモデルによる解析においても 6 構造の多くは疎水性残基によって形成されることが示唆された。

- ② SAAP 力場パラメーターの改良とシニョリンの分子シミュレー ション (10分)
 - ○鈴木智樹 1、馬部菜月 1、下里卓 1、峯崎俊也 1、岩岡道夫 1
 - 1東海大・理

我々の研究室ではペプチドの分子シミュレーション用の新しい力場として、単一アミノポテンシャル(SAAP)力場を開発している。この力場では各アミノ酸を主鎖と側鎖に分割してアミノ酸全体のポテンテャルを近似している。しかし、 α 炭素と β 炭素で連結する従来の手法では計算精度が悪かった。そこで本研究ではアミノ酸の主鎖と側鎖の分割方法を変更し、 β 炭素と γ 炭素との間で連結する手法を採用すると共に、アルゴリズムの改良も行った。新しい側鎖分離近似法を各アミノ酸に適応するために、SAAP プログラムを修正し、その後、改良された SAAP 力場を用いて、アミノ酸 10 個からなり β ターン構造をもつシニョリン(アミノ酸配列:GYDPETGTWG)の分子シミュレーションをモンテカルロ法によって行った。その結果、従来の SAAP では天然構造に類似した β 構造の RMSD 値が~2.0 Åであったのに対して、改良した SAAP では RMSD 値が~1.0 Å と約半分になっていた。また、天然構造に類似した構造の出現率も従来の SAAP では約 28%であったのに対して、改良した SAAP では約 42%と向上した。よって、側鎖分離の方法を改良したことでシミュレーション精度が格段に向上したことが分かった。

9PM1 13:00~14:20

- ③ 単一アミノ酸ポテンシャルを用いた SAAP 力場の開発とペプチド分子設計への応用 (20分)
 - ○岩岡道夫1、峯崎俊哉1
 - 1東海大・理

タンパク質立体構造の形成は様々な要因(相互作用)によって支配されている。当研究室では、タンパク質を構成する各アミノ酸の構造特性が、どのようにアンフォールド状態のポリペプチド鎖の構造空間を規定し、天然状態に至るフォールディング経路を支配しているのかに興味をもっている。そのための研究手段として、単一アミノ酸ポテンシャルカ場(SAAP 力場)の開発を独自に進めている。SAAP 力場では、ポリペプチド鎖のポテンシャルエネルギー(ETOTAL)を、単一アミノ酸ポテンシャル(ESAAP)とアミノ酸間の相互作用(ENTER EES + ELJ)の和として表す。ESAAP 項は ab initio 計算(水中)によって多次元二面角空間のグリッド上で決定した。ENTER 項のうち、静電相互作用(EES)は ab initio計算から得られた ESP 電荷を、レナード・ジョーンズポテンシャル(EES)は amber 力場で用いられているパラメーターを用いて、分子シミュレーションプログラム(モンテカルロ法)の中で計算する。SAAP 力場の応用例として、セレン含有酵素(グルタチオンペルオキシダーゼ;GPx)の活性中心の構造を、セレノシステインを含む短鎖ペプチドで再現することを試みた。

④ 光電子収量分光によるクロロフィル a 溶液の電子構造観測 (20分)

〇武田祐希¹、江澤拓²、宮内拓也¹、金城拓海¹、KaveengaRasikaKoswattage³、中山泰生¹、石井久夫^{1,3}

1千葉大院融合,2千葉大工,3千葉大先進

高効率な光エネルギー変換システムである光合成反応の解明は、人工光合成システムの開発につながる重要な課題である。特に光化学系では、光をクロロフィル a(Chl-a)の光励起反応により電気エネルギーへ変換しており、これが高効率なエネルギー変換の鍵を握る。さらに生体内の Chl-a は会合状態をとり、水を含んだ環境下に存在することが分かっている。したがって生体内での状態に近い Chl-a の電子構造を観察することが重要である。非生体物質に対して光電子分光(PES)は電子構造を観測する有力な手法であるが、真空環境が必要なため生体システムに対しての応用は限定される。一方、非真空下でも測定が行える光電子収量分光(PYS)を用いると非真空下での生体関連分子の電子構造を調べることができる。今回は、アセトン・水混和溶媒中で会合させた Chl-a の大気下 PYS 測定を、水の体積割合を変化させて行った。この混和溶媒中で会合した Chl-a は、生体内の Chl-a の人工的なモデルとして研究されており、会合度は水の体積割合に依存することが報告されている。結果として、会合度に応じてイオン化エネルギーが変化する現象が見られた。講演では理論計算によるデータも踏まえて、会合度と電子構造の関係性を示す。

9PM1 13:00~14:20

- ⑤ フェリチンアセンブリ速度における正味電荷の影響 (20分)
 - 〇佐藤大輔 1 、黒部淳史 1 、竹部皐月 1 、大友秀明 1 、砂戸歩美 1 、木原裕 2 、藤原和夫 1 、池口雅道 1
 - 1創価大・工・生命情報、2立命館大学 SR センター

大腸菌フェリチン (Ftn)は 24 量体の球殻状タンパク質である。Ftn は酸性 pH で可逆的に 2 量体に解離する。酸性解離した Ftn 溶液と適切な緩衝液を迅速混合することで、アセンブリ反応を開始し、時間分解 X 線小角散乱法により追跡した。Ftn のアセンブリ速度は、pH、イオン強度に依存することが分かった。pH は 6.0 から 8.0 まで測定され、pH が高くなるほどアセンブリ速度は減少した。アセンブリ速度のイオン強度依存は、NaCl の濃度を変更することで行われた。NaCl は 0 から 500 mM まで測定され、NaCl 濃度が上昇すると、アセンブリ速度は上昇した。我々は Ftn アセンブリ速度が pH、イオン強度に依存する原因は 2 量体の正味電荷間の反発と考え、この仮説を実証するために、1 つまたは複数の Gluを Gln に置換し、正味電荷を減少させた変異体を作製した。WT と変異体のアセンブリ速度を比較したところ、正味電荷を減少させた変異体ほどアセンブリ速度は減少した。

- ① SH1 ヘリックス変異ミオシンは滑り速度と熱安定性を 低下させる (10分)
 - ○柴田琴実1、岩井草介2、茶圓茂1

1日大·文理, 2弘前大·教育

筋肉を構成するタンパク質であるミオシン II は、アクチンフィラメントと相互作用して滑り運動をおこない筋肉を収縮させる。ミオシン II の SH1 ヘリックスという領域は、滑り運動の際に ATP 分解で生じた構造変化がレバーアームに伝わるのを調節するといわれている。ヒトの SH1 ヘリックスにアミノ酸の変異が入って発症する病気がある。 2006 年岩井らは、ヒト非筋性ミオシン IIA のアミノ酸残基 705 番目のアルギニン(R)がヒスチジン(H)に変異すると非症候性遺伝性難聴(DFNA17)を発症する変異を細胞性粘菌で発現させ、その変異型ミオシン II の滑り速度や熱安定性が著しく低下したことを報告した。

我々はヒト非筋性ミオシン IIA のアミノ酸配列 702 番目のアルギニン(R)がシステイン(C) に変異すると難聴や白血球小胞体を発症するものと、ヒト速筋ミオシンのアミノ酸配列 706 番目のグルタミン酸(E)がリシン(K)に変異すると筋障害を発症するものを扱っており、その 2 種類の変異を細胞性粘菌のミオシン II に導入した。細胞性粘菌ミオシン II ではそれぞれ 686 番目、683 番目にあたるので R686C、E683K と表す。これら R686C、E683K 変異型ミオシン II と野生型ミオシン II の滑り運動速度や熱安定性などを比較したところ、滑り速度は約 2/3 まで低下し、熱安定性も著しく低下した。

この結果からSH1へリックスは構造変化の伝達を調節していることが確かめられ、また、 ミオシンの熱安定性を決定する要因のひとつであると考えられた。

② デングウイルス由来 ED3 ドメインの熱安定性と会合状態の解析 (10分)

○早乙女友規, Mohamed M Islam,黒田裕

東京農工大学工学部生命工学科

本研究ではデングウイルス 3 型と 4 型由来のエンベロープ糖タンパク質第 3 ドメイン (DEN3 ED3 及び DEN4 ED3) の熱安定性と会合状態を解析した。まず、pH4.1-5.1、タンパク質濃度 $2.5-20~\mu M$ の条件でゲルろ過(SEC)を測定したところ、タンパク質濃度の上昇に伴いモノマー比率が減少し、ダイマー比率が増加した。その結果、常温で、ED3 のモノマー・ダイマーが平衡に共存することがわかった。

また、pH4.1-5.1、タンパク質濃度 5-50 μ M、温度 20-95 $^{\circ}$ Cの条件下で円偏光二色性を測定したところ、タンパク質濃度の増加に伴い変性中点温度は低下すること示された。つまり、ED3 の熱変性過程においてもタンパク質濃度依存性が観測されることから、高温での変性状態でダイマー以上の会合体が形成されることを示唆された。また、SEC の結果と合わせて考えると、モノマー比率が大きい条件ではタンパク質濃度増加に伴い変性中点温度が減少していることがわかった。

③ Analysis of protein aggregation and oligomerization using short tag (SEP-tags) (10 分)

OMd. Golam Kabir, Mohammad Monirul Islam and Yutaka Kuroda Department of Biotechnology and Life Science, Tokyo University of Agriculture and Technology

The mechanisms of amorphous protein aggregation remain to be fully elucidated. Here we report the effects of 12 short poly amino acid peptide tags attached to a simplified bovine pancreatic trypsin inhibitor (BPTI) variant on the formation of sub-visible soluble oligomers using dynamic light scattering (DLS) and size-exclusion chromatography (SEC). The DLS data indicated that the attachment of five residue Ile tags (C5I) resulted in the formation of 10- to 15-mer oligomers at pH4.7-pH8.7. On the other hand, the highly solubilizing charged C5E, C5D and C5K induced small oligomers (3-4 mer) and increased protein solubility. The other peptide tags, which affected moderately protein solubility (1-3 fold increase), did not change the oligomeric state of BPTI. These observations were fully corroborated with the SEC observations. The only exception was the C5I tagged variant, for which the large oligomeric states observed by DLS was not identified by SEC. Altogether, these observations indicated that the peptide tags can manipulate protein solubility and sub-visible oligomer formation.

④ 尿素変性を用いたデングウイルス由来エンベロープ糖蛋白質第 3 ドメインの変異体解析(10分)

○櫻井博光、黒田裕

東京農工大学工学府生命工学専攻

当研究室における先行研究で、デングウイルス由来のエンベロープ糖蛋白質第 3 ドメイン (以下 ED3) に 1 又は 2 残基置換を導入することで、変性中点温度 (以下 T_m 値) が大きく変化した。また、変異体の T_m 値と ELISA で観測した抗体との反応性がよく相関していた。しかし、ELISA を行った温度は $25\,^{\circ}$ C であり、その温度では変異体は全て天然状態にあったため、相関の物理化学的な説明は困難であった(Elahi et al., BBA 2013)。そこで本研究では ELISA 実験と同じ温度での安定性を調べるため、尿素変性の解析から ED3 変異体の $25\,^{\circ}$ C での安定性を求めた。対象とする蛋白質は先行研究と同じデング 3 型と 4型についてそれぞれ 5 種類の変異体と野生型の計 12 種類である。尿素に対する安定性を評価するため、 $0\sim 8$ M の尿素濃度で円偏光二色性 (CD) を $25\,^{\circ}$ C で測定し、その解析から各尿素濃度での変性ギブズエネルギー変化 (ΔG_D) を求め、尿素濃度が 0 M の ΔG_D H20を外挿した。 ΔG_D H20 と先行研究の ELISA の比較を行った結果、一部で相関が見られた。

- ⑤ 電子線 1 分子内計測法を用いたタンパク質の超微細運動計測 (10 分)
 - 〇小川直樹 1.2、溝川涼 2、土田佳那子 1、山本陽平 1、佐々木裕次 3、養王田正文 1、石川晃 2

1農工大・院工,2日大・文理,3東大・院新領域

生体における生命活動の究極的な計測はその生体を構成する個々の1分子の運動をリアルタイムで観察し、それぞれの相互作用を捉え、理解することと考えられる。我々は、前段階として、市販の走査電子顕微鏡を用いた電子線1分子内計測法 (DET) を開発している。DET は水中試料観察用セル (EC) を用いて計測対象物にラベルした金粒子由来の結晶方位の変化を電子後方散乱回折像 (EBSP) として連続で捉え、対象物の運動を3次元的に時分割として計測する方法である。今回の計測では、従来の無機高分子と異なり電子線照射によるダメージを受けやすいと考えられるタンパク質試料を用いることから、試料の支持方式を変更し、入射電子ビームと回折電子が試料を照射することなく計測できる支持方式を開発した。この方式により、電子線の到達範囲から考えて、タンパク質試料に対し損傷無しで1分子内運動計測が可能になった。

- [1] N. Ogawa et al., Scientific Reports, 3, 2201 (2013) 1-7
- [2] N. Ogawa et al., Ultramicroscopy, 140 (2014) 1-8
- ⑥ 核質中のシャトルタンパク B23 を含む構造の動態観察 (10 分)
 ○三松沙織 1,2、内堀そよみ 1,2、倉持麻衣子 1,2、廣島通夫 3、小島亜矢子 1、小林恵美子 1、 栗崎晃 3、佐甲靖志 4、加藤薫 1

1産総研・バイオメディカル,2筑波大・生命環境、3産総研・幹細胞工学研究センター、4理研・佐甲細胞情報研

細胞核は、遺伝情報 (DNA) を保持する器官である。核内では、遺伝子の発現・制御に関わるタンパク・RNA が集合し、構造体をつくるが、構造体自体やその中の分子の動きを直接観察・解析した報告は、限られている。

当研究室では、高精度のアポダイズド位相差(APC)により核内を動く白い粒子(核内粒子と呼ぶ)を可視化し、核内の物質運動を研究してきた。核内粒子の運動軌跡を大量(1万座標以上)取得し、統計的に解析し、核内粒子の運動を、『拡散(自由拡散と2成分の制限拡散)』と『方向性の運動(2成分)』で説明した。しかし、核内粒子が含むタンパクは不明だった。

本研究では、APC で可視化した核内粒子がシャトルタンパク B23 を含むことを示した。 B23 は核小体ー細胞質のシャトルに関わる。我々の解析は核小体から細胞質への運動を解析したとわかった。

さらに、APC と免疫染色を組みあわせ解析した。APC で粒子の運動を記録し、同一の粒子を固定染色し、B23 を含むと同定した粒子の運動軌跡を、粒子ごとに解析した。統計解析の運動パターンと粒子ごとの解析の結果は一致した。我々の統計的解析の結果を、粒子ごとの解析でも支持した。

9PM2 14:30~16:00

⑦ 成長円錐におけるアクチン関連タンパク Fascin の FRAP 解析 (10分)

○田中みなみ 1,2、東ヶ﨑健 3、海老原利枝 4、加藤薫 1,2

1産総研・バイオメディカル,²筑波大大学院・生命環境、³ファンケル・総合研、⁴産総研・幹細胞センター

成長円錐は神経細胞の軸索や樹状突起先端に存在する構造である。この構造は外部環境に 敏感に反応し、経路を探し、軸索や樹上突起を伸長させ、標的まで誘導する。成長円錐の 先端部の伸長はアクチンの重合速度と retrograde flow の速度のバランスで決まる。私たち はアクチンの動態に関わるアクチン関連タンパク質について、共焦点顕微鏡を用いた FRAP(Fluorescence Recovery after Photobleaching)による観察と解析を行ってきた。すで に蛍光アクチンや arp2/3 複合体の分子群について FRAP 解析を行い、ArpC1、ArpC5 と Arp2、Arp3 で結合乖離の速度が異なることを報告した。今回はアクチンの東化タンパク質 であるファシンなど、他のアクチン関連タンパク質についても FRAP を行ったので、進歩 状況を報告する。

⑧ 超解像光学顕微鏡によるアクチン系細胞骨格の観察 (20分)

○加藤薫 1,2、田中みなみ 1,2、上条桂樹 3、高橋正行 4、細谷浩史 5、

1産総研・バイオメディカル,2筑波大・生命環境、3東北大・医学系、4北大・理・化学、 5広島大・理、

光の回折限界で決まる分解能を越え、微細構造を可視化する技術である。超解像技術は光 学顕微鏡にも使用され、各種の超解像光学顕微鏡が実用化されはじめた。

神経成長円錐は、伸張している神経突起の先端部に見られる構造で、アクチン系の細胞骨格の動態が、運動を担うとされている。しかし、従来の顕微鏡では、アクチンの網目を直接捉えることが出来ず、観察には電子顕微鏡が必要とされてきた。このため、成長円錐の運動のメカニズムは、間接的に捉えたアクチンの動態をもとに考えらてきた。もし、超解像光学顕微鏡で、成長円錐のアクチンの網目構造を直接見ることが出来れば、成長円錐の運動機構のメカニズムを、直接、調べることが出来ると考えた。

超解像光学顕微鏡は、STED(ライカ製、ライカマイクロシステムズ社にて借用)と SIM (ニコン製、産総研共用機器)を用いた。これらを用いて、成長円錐や培養細胞のアクチン系骨格の観察条件を決定したので、総説的に技術を紹介する。そして、最後に、これらの biological application の例を挙げる。

9PM3 16:10~17:10

- ① ランビエ絞輪近傍のチャネルによる活動電位高頻度発火の制御 (20分)
 - ○廣野守俊¹、御園生裕明¹
 - 1同志社大学・脳科学研究科・チャネル病態生理部門

高頻度発火する活動電位の正確な伝播は神経情報処理において不可欠である。ニューロンの軸索起始部で生じた活動電位は、fidelity を保ちながら軸索を伝播する。有髄神経の活動電位はランビエ絞輪を中継点とする跳躍伝導によって神経終末へ到達する。近年、小脳プルキンエ細胞軸索のランビエ絞輪近傍の paranode と呼ばれる部位に BK チャネル (large-conductance voltage- and Ca^{2+} -activated K^{+} チャネル)が発現することが形態学的に示唆された。そこで paranode に局在する BK チャネルの活動電位高頻度発火への寄与を、逆行性活動電位を記録しながら調べた。 BK チャネルの阻害剤である penitrem A やpaxilline を軸索に局所投与すると、逆行性活動電位の高頻度発火が低下することが分かった。さらに Ni^{2+} の局所投与によっても同様な抑制効果が見られた。ゆえに Paranode 付近では、脱分極と Paranode 付近では、脱分極と Paranode で Paranode の Paranode

- ② 数理的スパイン解析ソフト Spiso-3D を用いた海馬シナプス新生に対する性ホルモンの急性効果の解析 (20分)
 - ○北條泰嗣1、川戸佳1

1東大・総合文化

記憶・学習中枢の海馬において、情報は神経細胞同士の間のシナプスという構造を通じて やり取りされる。性ホルモンは、このシナプス後部(スパイン)を短時間で増加させる作 用を持つが、それがどのような分子メカニズムで引き起こされるかはわからなかった。

我々はリン酸化酵素のカスケードがスパイン増加に関与していると予想して、各種リン酸化酵素の阻害剤を海馬スライスに投与して実験した。共焦点レーザー顕微鏡で取得したシナプスの画像ファイルから、数理的にスパインの位置と大きさを検出するソフトウェア Spiso-3D (Mukai et al., 2011 *Cerebral Cortex*i Hojo et al., 2011 *Front. Endocrinol.*) を用いて、スパインの密度と頭部直径の分布を解析したところ、女性ホルモン・男性ホルモンはシナプス内のステロイド受容体に結合した後、Erk MAPK, PKA, PKC, LIMK などのリン酸化酵素を駆動して、細胞骨格のアクチンを重合させてスパインを新生させていることが分かった (Hasegawa et al., 2015 *Brain Res.*; Hatanaka et al., 2014 *Brain Res.*)。また、女性ホルモンでは PI3K や CaMk II といったリン酸化酵素も駆動していることが分かった。

9PM3 16:10~17:10

- ③ 川戸研における脳科学の進展:海馬の記憶と神経ステロイド (20分)
 - ○川戸佳 1,2

1東大・院総合文化・広域,2東大・理学系・物理

川戸研では、この 20 年あまり、脳の記憶中枢の海馬神経で、シトクロム P450 系が働いていて神経ステロイドを合成しており(コレステロール→プレグネノロン→…・→男性ホルモン→女性ホルモン。ストレスホルモンも合成)、ステロイドが神経シナプスでの記憶能力を早く高める、ことを証明しよう、という、かなりバクチ的な研究を進めてきました。最後には成功しましたが予想確率は??でした。「環境ホルモンの脳記憶学習への攪乱」「新型多電極による環境ホルモンの海馬記憶の攪乱」「神経シナプスの数理解析」という、大型プロジェクトを遂行する幸運に恵まれたことも大きな要因であります。 本当は全く新しい女性ホルモン受容体を見つけて、その神経機能制御を解明する、という目標でしたが、これは世界的にうまくゆかず、古典的受容体 ERa が実はシナプス膜に局在していて、シナプス記憶を強化していることを見出しました。 最近は、海馬記憶シナプスの老化と男性・女性ホルモン補充による若返りの研究に進んでいます。世界で1000万人がこの治療を受けていて、痴呆症の改善に効いています。 ストレスホルモンが fight or flight の決断を行う際の海馬シナプス作用研究でも面白い発見ができました。

① 好熱菌酵素の低温高活性化に関わるアミノ酸置換の探索 (10分) ○筒井聡志、赤沼哲史、木村彦乃、山岸明彦 東薬大・生命・応用生命

好熱菌由来酵素は高い熱安定性を持つため高温で高い酵素活性を持つが、常温菌由来酵素と比較すると低温域での酵素活性が著しく低いことが知られている。本研究では、好熱菌
Thermus thermophilus 由来 3-イソプロピルリンゴ酸脱水素酵素(TthIPMDH)と
Escherichia coli 由来 IPMDH(EcoIPMDH)のアミノ酸配列を比較し、TthIPMDH に
EcoIPMDH 型のアミノ酸を挿入または置換した変異体を作製した。その際、活性部位から
8Å以内の残基をアミノ酸置換の対象として選択し、立体構造上近接している複数のアミノ
酸は 1 つの変異体にまとめて導入した。作製した 11 変異体の内 7 変異体で 25℃での比活性が向上し、TthIPMDH と比較して最大で約 8.7 倍の比活性をが得られた。次にアミノ酸
置換の組み合わせ効果を検討したところ、TthIPMDH と比較して 25℃での比活性が約
12.2 倍向上した変異体が得られた。したがって、本研究で行った方法は好熱菌酵素の低温高活性化に関わるアミノ酸の効率的な探索法であることが示唆された。

- ② アミノ酸組成の変化を許容して推定した祖先型タンパク質の耐熱性(10分)
 - ○別所瑞萌、赤沼哲史、横堀伸一、山岸明彦 東薬大・生命・応用生命

現存の生物が持つタンパク質の進化系統解析から祖先生物が持っていたタンパク質のアミノ酸配列を推定し、祖先タンパク質の復元と解析を行うことで、古代生物の生育温度を推定できる。我々は進化の過程でアミノ酸組成が均一であるという近似を含む推定プログラムを用いて祖先型ヌクレオシドニリン酸キナーゼ(NDK)を復元し、それらの変性温度を調べることによって、古細菌共通祖先、真正細菌共通祖先、コモノート共に 75℃を超える高温環境で生育していた(超)好熱菌であったと推定した(1)。一方 Gouy らはアミノ酸組成の変化を許容するプログラムを用いてアミノ酸配列を推定し、アミノ酸組成から我々の推定よりも低い生育温度を推定した(2)。本研究では Gouy らと同じプログラムを用いて祖先型 NDK 配列の推定を行い、実験により生育温度を推定した。その結果、アミノ酸組成の変化を許容しても祖先生物が(超)好熱菌であったという結論には影響しないことが明らかとなった。

- (1) Akanuma et al. PNAS 110, 11067 (2013)
- (2) Boussau et al. Nature 456, 942 (2008)

③ 白金結合能を持ったタンパク質ループ配列の創出と解析 (10分) 〇梶 亜純¹、新納寛也¹、赤沼哲史¹、内田達也¹、山岸明彦¹ ¹東薬大・生命

金属とタンパク質間の新規相互作用形成は、無機物と有機物のハイブリッド材料の創成に求められる技術である。例えば、現在よく用いられている血糖値測定用グルコースセンサーは、白金電極にグルコース酸化還元酵素をポリアクリルアミドゲルで固定している。しかし、タンパク質の分子表面の任意の部位に自在に金属結合部位を作る事が出来れば、より高感度のグルコースセンサーを開発できると期待される。本研究では、タンパク質の分子表面にあるループ上に、白金結合部位を創出することを試みた。本研究室で作製された人工4~リックスバンドルタンパク質 LARFH をモデルタンパク質とし、そのループの1つにランダムなアミノ酸配列をつくり、T7ファージディスプレイ法を用いて白金との結合親和性を獲得した変異体を選択した。選択された変異体の多くはループに6残基 YKRGYK配列を含んでいた。フロー型水晶振動子マイクロバランスによって解析した結果、YKRGYK配列が白金との親和性を強めることがわかった。さらにアラニンスキャニングにより、白金結合親和性に寄与するアミノ酸を同定した。

- ④ シアノバクテリア由来アルカン合成酵素の変異解析及びバイオエネルギー産生への応用(10分)
 - ○工藤 恒1、池内昌彦1、新井宗仁1,2、

1東大・総合文化・生命、2JST・さきがけ

シアノバクテリアは、炭化水素を合成することが知られている。この合成には、アシルACP 還元酵素(AAR)とアルデヒド脱カルボニル化酵素(AD)という 2 つの酵素によって触媒される。AAR は、脂質代謝の途中産物であるアシル ACP をアルデヒドへと還元し、生成したアルデヒドは AD によって、アルカンまたはアルケンへと変換される。しかしこれらの酵素は活性が低い。そこで生合成された炭化水素をバイオ燃料として利用するためには酵素の活性化が必要不可欠である。さらに、シアノバクテリア内で炭化水素を大量に合成させることによって、カーボンニュートラルの考えに基づく環境に配慮したバイオエネルギーの産生が可能となる。

実験手法としては、AD 及び AAR の 1 アミノ酸置換変異解析を行うことによって、活性に重要なアミノ酸部位を同定し、高い活性を持つ変異体を探索する。また、AAR の構造解析も進めている。そして、高活性化した AD 及び AAR をシアノバクテリアに形質転換することで大量のアルカンを合成する変異株を構築し、新たなエネルギーとしての実用化を目指す。

⑤ プロリン異性化酵素とアルツハイマー病(20分)

○伊倉貞吉1、伊藤暢聡1

1医科歯科大・難研

アルツハイマー病は、かつては β アミロイドの沈着が原因であると考えられていた。しかし、 β アミロイドを標的とする創薬や抗体医療は、ことごとくアルツハイマー病の進行を止めることに失敗しているのが現状である。このような状況下で、 β アミロイドに代わってタウタンパク質が注目されるようになってきた。タウタンパク質は、正常時には神経細胞内の微小管に結合し、微小管の重合の促進や安定化に寄与している。しかし、過剰リン酸化を受けると、微小管への結合能を失い凝集化する。その結果、微小管は不安定化し、神経細胞はアポトーシスに至ると考えられている。また、この凝集体は何らかの機構により細胞外へ排出され、まわりの神経細胞にプリオン様の機構によって感染し、アポトーシスが連鎖していくとも考えられている。一方、細胞内には、このタウタンパク質の凝集を抑制する仕組みがもともと備わっている。どうやら、その一端を担うのがプロリン異性化酵素らしい。プロリン異性化酵素がタウタンパク質の凝集を抑える機構は現在もなお仮説の段階ではあるが、本研究会では、私たちの実験から明らかになってきたことをいくつか紹介したい。

10AM2 11:10~12:10

- ① サルモネラ菌べん毛繊維の構造を制御する Ala₄₂₇ の部位特異的 変異体の作製と表現型解析 (10分)
 - ○神保悟子1、氏家篤2、林史夫2、大澤研二2
 - 1群馬大・工,2群馬大・院理工

サルモネラ菌べん毛繊維は、フラジェリンと呼ばれる1種類のタンパク質の集合体であり、様々ならせん構造をとることが知られている。らせん構造の変化は多型変換と呼ばれ、そのメカニズムには未だ不明な点が多い。本研究室では一つのアミノ酸置換によって生じた直線形べん毛繊維をもつ4種の突然変異体から、別のアミノ酸置換によって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。その中でも、Arg431、Ala427、Gly426は隣接する素繊維に面し、その周辺との相互作用によってべん毛繊維の構造を変化させると考えられている。

本研究では、多型変換における Ala427 の機能の解明を目指し、Ala427 への変異導入を試みた。復帰突然変異体で Ala427 に生じた第二変異は Thr、Glu、Ser、Gly の 4 種あり、Thr のみが複数の突然変異体から単離されている。これらの第二変異のみをもつ変異体を部位特異的に作製し、変異体の多型変換能を知るために、それらのべん毛繊維のらせん構造と遊泳能力を解析した。本発表ではこれらの結果を報告すると共に、Ala427 の機能について考察する。

- ② 薬剤のターゲットタンパク質への変異導入による大腸菌薬剤 耐性獲得機構の解明 (10分)
 - ○鈴木麻衣子 1、塚本雅之 2、本田真也 1,2
 - 1東大・新領域、2産総研・バイオメディカル

抗生物質は感染症を治療するための重要な薬剤である。しかし、抗生物質が効かない菌である薬剤耐性菌が長年問題となっている。菌が薬剤耐性を獲得する機構の一つとして、ターゲットとなるタンパク質に変異が入り、薬剤との結合能が低下することが挙げられる。本研究では大腸菌のペニシリン結合タンパク質(PBP)1bをモデルとし、この分子機構に焦点を当てて研究に取り組み、菌の薬剤耐性獲得機構について更なる知見を得ることを目指す。これまで自然界から単離された耐性菌由来のPBPの変異に関する機構として、PBPのペニシリン結合部位周辺に変異が入ることが知られている。本研究では大腸菌のPBP1bにランダムな変異を導入し、薬剤選択することで人工薬剤耐性菌を取得し、薬剤選択前と選択後の集団を次世代シークエンサーを用いて配列解析した。それぞれの変異をWTの残基に対する増加率(I_{NP})で薬剤耐性に関与するか評価すると活性部位から離れた部位にも I_{NP} の値が高い変異が入ることが分かった。この変異は医療単離株の肺炎レンサ球菌のPBP1aでも見られ、活性部位から離れた部位にある変異も薬剤耐性に関与していると思われる。

③ 天然変性タンパク質 HIV-1 Tat による標的分子認識機構(10分) ○椢原朋子¹、林勇樹¹、新井宗仁¹²¹東大・総合文化,²科学技術振興機構・さきがけ これまでの概念では、タンパク質は特定の立体構造を形成することによって機能を発現す ると考えられていた。しかし近年、長い不規則構造領域を持つ天然変性タンパク質 (intrinsically disordered protein, IDP)が発見され、真核生物の持つタンパク質の三割以 上を占めていることがわかった。IDP はシグナル伝達や転写、細胞周期調節などの重要な 機能に関与することが報告されており、タンパク質の機能発現の新たな概念として注目さ れている。IDP は標的分子への結合という機能発現と同時に特定の立体構造へとフォール ディングする(coupled folding and binding)特性を持つ。IDP の機能発現機構を理解する ためには、このような IDP 特有の反応機構の解明が不可欠である。

ヒト免疫不全ウイルス HIV-1 の増殖に関与するタンパク質 Tat(Transactivator of transcription)は IDP であり、転写コアクチベーターCBP の KIX ドメインと相互作用し、HIV-1 の mRNA の転写開始を促進する。このことから Tat は新たな抗 HIV 医薬品開発のターゲットとなっているが、Tat と KIX の複合体構造や結合反応機構は未解明である。そこで本研究では、天然変性タンパク質である HIV-1 Tat が、その標的タンパク質である CBP の KIX ドメインと結合したときの立体構造、および結合反応機構の解明を目指す。現在、高純度の Tat タンパク質を得るために、様々な Tat のコンストラクトを作成し、精製方法の詳細な検討を行った。その結果、全長 Tat と KIX ドメインを高純度で得ることに成功した。次に、CD スペクトルにより、両者の相互作用による二次構造変化を検出した。また、 1 H pulsed-field gradient NMR 法により、遊離状態の Tat がフォールディング中間体に似たコンパクトな構造を形成することが示唆された。今後はまず、NMR 法を用いて、KIX との結合部位の同定や、KIX 結合状態での Tat の主鎖二次構造の決定を行う。さらに、NMR 緩和法やストップトフロー蛍光法などを用いて結合反応の速度論解析を行い、結合反応機構の解明を目指す。

④ F-アクチンの水和状態に及ぼす 2 価金属イオンの影響 (10 分) 〇千島亮太郎、今尾麻人、渡辺貴裕、和沢鉄一、最上譲二、鈴木誠 東北大・エ

⑤ ミオシンサブフラグメント1の水和に及ぼすATPアナログの 影響(10分)

○大相英恭、渡辺貴裕、和沢鉄一、最上譲二、鈴木誠 東北大・エ

モータータンパク質ミオシンのサブフラグメント 1(S1)は ATP 加水分解による自由エネルギー変化を利用してアクチンとの相対的な滑り運動する。細胞内環境では S1 の ATP 加水分解サイクルは連続的に進行する。ATP 加水分解中間状態を調べるために、中間状態の構造を静的に再現するために、アナログを用いた研究が広く行われている。 $S1 \cdot ATP$ 状態のアナログとして $S1 \cdot AMP \cdot PNP$ 及び $S1 \cdot ADP \cdot BeF_x$ が、 $S1 \cdot ADP \cdot Pi(リン酸)$ 状態のアナログとして $S1 \cdot ADP \cdot AlF_4$ 及び $S1 \cdot ADP \cdot Vi(バナジン酸)$ が知られている。

本研究では、これら ATP 加水分解中間状態アナログを対象に、誘電緩和分光法(DRS)を用いて水和測定を行った。水和解析した結果、S1 および S1・ADP 状態に比べ、各中間状態アナログでは、拘束水の緩和強度が増加し、水和数が増大することが示された。これは、以前 Suzuki ら(BJ, 1997)が報告した水和減少と逆の結果となった。このことから ATP アナログと結合した S1 構造は、実際の ATP 分解サイクルの中間状態構造ではないことを強く示唆する。

⑥ Acto-S1-ADP 複合体の水和解析 (10 分)

○渡辺貴裕¹、芝野将太¹、最上譲二¹、鈴木誠¹

1東北大・工,

筋肉を構成するアクチンとミオシンは、ATP の加水分解のエネルギーを用いてすべり運動する。誘電緩和分光法により、このアクチンの周囲にバルク水よりも誘電緩和周波数の高い水和水ハイパーモバイル水(HMW)の存在が報告された(Kabir,2003)。また、ミオシン頭部 S1 の結合により、HMW が増加する現象が見出された(Suzuki,2004)。しかし、HMW の形成機構や筋収縮への関わりは明らかになっていない。筋肉構成タンパク質の水和状態の変化が筋収縮の機能発現に関与しているならば、結合 S1 数や結合ヌクレオチド種によって水和状態が変化するかを知る必要がある。そこで Acto-S1-ADP 複合体の水和状態について結合 S1 数の依存性を誘電緩和分光法により解析し、さらに水和水の熱力学的な解釈のため水和状態の温度依存性を解析した。また、示差走査熱量測定により試料溶液の熱容量を測定し、得られた水和パラメータとの相関を検証した。その結果、複合体の水和水、特に HMW 成分について結合 S1 数および温度に対する系統的な変化を観測した。また、HMW の誘電緩和効果の強さとその熱容量との間に明瞭な相関関係を見出した

10PM1 13:10~14:10

- ① ラマン分光による NaI 重水軽水混合溶液中のハイパーモバイル 水和層解析 (10分)
 - ○佐藤正義1、最上譲二1、谷内哲夫1、鈴木誠1
 - 1東北大・工,

筋肉タンパク質アクチンの周囲にはバルク水の他に、拘束水及びバルク水よりも高い誘電緩和周波数を持つハイパーモバイル水(HMW)が形成される。水分子のダイナミクスは分子間相互作用に大きな影響を与える要因の 1 つであり、タンパク質の機能発現や筋収縮の熱力学的理解に、HMW の分子レベルでの現象解明が重要となる。HMW はアルカリハライドイオン周囲でも発見されており、ラマン分光では水構造破壊領域として HMW が検出されている(Y.Okazaki, 2014)。また統計力学や分子動力学から HMW が水分子間の多体相互作用による現象であることが示されている(M.Kinoshita, 2009; Y.Kubota, 2012)。本研究では、多量の重水を加えた NaI 水溶液のラマン分光より、HMW は検出されないことを確認し、OH 伸縮振動バンドから水分子間 OH 共鳴伸縮振動に相当する波数成分が減少することを確認し、軽水分子間の共鳴現象が抑えられたことが示唆される。このことから水分子間の多体相互作用の共鳴伸縮振動が抑制されることから、HMW が多体相互作用による現象であることを実験的にサポートする結果を得た。

- ② 誘電緩和分光法と分子動力学法に基づくハイパーモバイル 水形成イオン周囲の水和層特性評価 (10分)
 - ○最上譲二1、石杜和希1、松林伸幸2、鈴木誠1
 - 1東北大・工,2大阪大・基礎工

筋肉タンパク質アクチンやリン酸イオンの周囲にはバルク水とは誘電的特性の異なる拘束水とハイパーモバイル水(HMW)が形成されている。HMW はバルク水よりも高い誘電緩和周波数を持ちアルカリハライドイオン周囲でも発見され、最近、統計力学や分子動力学、ラマン散乱などの手法でも観測可能になってきた(M.Kinoshita,2009; Y.Kubota,2012; Y.Okazaki,2014)。水分子のダイナミクスは分子間相互作用に影響を与えるので、分子レベルでの HMW の挙動の理解がタンパク質機能の解明には重要である。本研究では、オリゴリン酸及びアルカリハライドイオン水溶液を対象に誘電緩和分光法(DRS)と分子動力学法(MD)を用いて水和特性を評価した。DRS 測定の結果、全イオンで HMW を形成している事を明らかにした。また、高速・高精度な自由エネルギー計算が可能な ER 法により MDトラジェクトリから水和自由エネルギーの温度依存性を求め、エントロピーとエンタルピー項、及び溶質-水と水-水相互作用項に分離した。さらに各相互作用の溶質からの距離依存性を調べており、多体効果の謎を解く鍵になると考えられる。

10PM1 13:10~14:10

- ③ アクトミオシンのハイパーモバイル水和層の役割について 考える(10分)
 - ○鈴木 誠1
 - 1東北大院・工,

アクトミオシン周りにハイパーモバイル水(HMW)が誘電緩和分光(DRS)法により観測 (Kabir et al, BJ 2003)された。HMW は溶質の水和層において誘電緩和周波数がバルク水より高い領域の水である。より単純な alkali halide 水溶液でも DRS 以外に Raman OH 伸縮振動バンドの解析から同等量の HMW を観測(Okazaki et al, 2014)した。これまでに荷電した大きな球形粒子分子の周りに水分子の回転エントロピーの統計力学的理論計算 (Kinoshita, JCP 2009) と荷電粒子周りの水の MD 計算 (Kubota et al, JCP 2012) により HMW が水 2 層程度形成され、それは水分子間の多体効果であることが示された。実験的に多体効果を確かめる方法として水の Raman OH 伸縮振動バンドの観測を多量の重水中で行う方法がある。この実験から OH 伸縮振動バンドの最低波数成分が顕著に低下し多体効果であることが確認された。一方水和自由エネルギーを空間分割で示す方法が可能となり HMW がアクトミオシン駆動エネルギーへの関与を定量的に議論する基盤ができてきた。

- ④ 光誘起交換スペクトルを利用した蛋白質構造変化前後の NMR 信号帰属法 (10分)
 - ○植田啓介1、長島敏雄1、西村千秋2、山崎俊夫1
 - ¹理研・CLST, ²帝京平成大・薬

蛋白質の機能と構造は密接に関係し、機能の理解のために、構造変化前後を比較する必要がある。蛋白質の NMR 測定の場合、構造変化前と構造変化後の信号の帰属を同様に行えばよい。ところが、いくつものアミノ酸残基のピークが構造変化前と比べて大幅にシフトした場合、同じ蛋白質であるにもかかわらず、未知の蛋白質の帰属と同様の労力を費やす場合がある。そこで、信号の帰属を容易にするために、構造変化の前と後の同じアミノ酸残基由来の NOE ピークの獲得を試みた。構造変化前の信号がすでに帰属されていれば、NOE ピークをたどり、構造変化後の同じアミノ酸残基の信号を容易に帰属できることになる。単純な構造変化の再現モデルとして、紫外線と青色光の照射の切り替えで可逆的に伸縮するアゾベンゼン誘導体を結合させた、1 本の a helix から成る合成ペプチドを使用した。光照射をパルスシーケンスに同期させ、ミキシング時間に構造変化させたところ、目的の NOE ピークの獲得に成功し、構造変化前の帰属情報を鋳型に用いて構造変化後のスペクトルの帰属を達成した。現在は、さらに大きいミオグロビンへの適用を進めているところである。

10PM1 13:10~14:10

- ⑤ 疎水性相互作用と静電相互作用を基本とした新規タンパク質間 相互作用の創出 (20 分)
 - ○八木創太、赤沼哲史、山岸明彦東京薬科大学大学院・生命科学研究科

タンパク質間相互作用は生命現象の中心的な役割を果たしており、盛んに研究が進められている。しかし、未だにタンパク質間相互作用を人工的に設計することは困難な課題である。本研究では2種類のタンパク質間に簡単な原理に基づく新規タンパク質間相互作用を創出する。材料とする Sulerythrin 表面の α へリックスに、疎水性アミノ酸である Leu と負電荷アミノ酸である Glu もしくはAspを導入することで相互作用面を創出した。さらに、人工タンパク質である LARFHcys 表面の α へリックスに Leu と正電荷アミノ酸である Arg を導入することで相互作用面を創出した。これにより、2種のタンパク質間で疎水性相互作用と静電相互作用を駆動力とした α へリックス間相互作用を生じさせる。これらのタンパク質を別々に発現、精製し、オリゴマー構造と円二色性スペクトルを解析した。いずれも単体では凝集することなく天然構造で存在した。次に、正電荷型 LARFHcys に負電荷型 Sulerythrin を混合しプルダウンアッセイを行ったところ、2種のタンパク質間で相互作用が確認された。今後、この相互作用について詳細を解析していく。

10PM2 14:20~15:50

- ① カーボンナノチューブと形質転換したタンパク質複合体のペプチドアプタマー分子認識能を利用した複合体形成(10分)
 - ○二井 大輔 1, 野沢 陽佑 1, 嶋田 友一郎 2, 鞆 達也 1
 - 1東理大・理,2東理大・工

本研究では、カーボンナノチューブ(CNT)表面に特異的に結合するペプチド(CNT 結合配列)を用いることによりタンパク質-CNT 複合体作製を目的とした。この複合体を素子として利用する場合、タンパク質の活性を維持したまま CNT 表面に配向性をもって結合しなければならない。そこで、緑色蛍光タンパク質(GFP)に遺伝子組換えにより CNT 結合配列を導入し、CNT 表面との結合について検証を行った。

嶋田らによって同定された CNT 結合配列を GFP の N 末端近傍に導入し、CNT 結合配列 を有する GFP を調製した。この GFP と CNT を混合したところ、CNT 表面に GFP が有意 に結合する事が蛍光測定により示された。 CNT 結合配列は GFP の N 末端近傍に導入して いる事から、配向を維持し、CNT 表面結合していると考えられる。

また光エネルギーー電子変換素子を作製する事を目的とした、光合成光化学系 I-CNT 複合体作製を同様の方法により試みた。この複合体形成により、光励起によって光化学系 Iの還元側に位置する Fe-S クラスターから CNT への電子移動が期待できる。本会では、これらタンパク質-CNT 複合体について報告を行う。

- ② 温度および塩濃度の調節による、poly(N-isopropylacrylamide) で表面被覆した単層カーボンナノチューブの分散・沈殿制御 (20分)
 - ○和泉勝樹 1、大浦秀介 1、熊代善一 2、岡野光夫 2、梅村和夫 1
 - 1東理大、2東女医大

単層カーボンナノチューブ(SWNT)を DNA 等の有機分子で被覆した複合体はバイオセンサーやドラッグデリバリー等さまざまな分野への応用が期待されている。本研究では、温度応答性高分子である poly(N-isopropylacrylamide)(PNIPAAm)を有機分子として用いた、未だ研究例の少ない PNIPAAm-SWNT 複合体の温度および塩濃度に対する応答を調べた。実験操作は原則、室温(25℃)にて行い、試料を室温または冷蔵庫内(3℃)で一晩静置したのち、遠心処理を施して沈殿の生じる度合いを検証した。その結果、室温で静置した場合は塩濃度を 1 mM 程度まで上げると塩の種類を問わず沈殿が増加し、その度合いは塩濃度に正に相関した。また、沈殿した複合体は溶媒を水に置換すると再分散可能であることが分かった。一方、冷蔵庫内に静置した場合は 4 mM まで塩濃度を上げても沈殿が少なかった。以上の結果は、塩濃度の調節による PNIPAAm の下限臨界溶液温度の低下が原因である可能性がある。本研究から、温度および塩濃度の調節により PNIPAAm-SWNT 複合体の分散・沈殿制御ができることが見出された。

10PM2 14:20~15:50

③ 血圧調整酵素レニン触媒残基の pKaシフト機構の解明 (20分)

○山下雄己 1,2、斉藤圭亮 1,2,3、石北央 1,2

1東大・工,2東大・先端研,3JST さきがけ

アスパラギン酸プロテアーゼは、活性部位内の 2 つの Asp 残基のうち、プロトン化した Asp 残基がペプチドを切断する酵素で、一般に pH 4 近傍の酸性領域で最大活性を示す。その中でレニンは、pH 6付近と 8付近に 2本のピークを持つという特異な pH 依存性を示す。 私達は、アスパラギン酸プロテアーゼレニンおよび BACE1 について、結晶構造に基づき、 ポアソン・ボルツマン方程式を用いて静電相互作用を解析することにより、触媒残基 Asp32、Asp215 の pKa を計算し、pH 依存曲線のピーク位置とほぼ一致する pKa 値を得た。 レニン

Asp215 の pK_a を計算し、pH 依存曲線のピーク位置とほぼ一致する pK_a 値を得た。レニンは、他のアスパラギン酸プロテアーゼに共通の Thr218 による Asp215 への水素結合がないため、Asp215 の pK_a が高く Asp32 よりもプロトン化しやすいということもわかった。

さらに QM/MM(Quantum Mechanics/ Molecular Mechanics)計算を併用して、基質アンジオテンシノーゲンとの複合体構造も解析した結果、基質 His9 が酵素 Asp215 に水素結合することで Asp32 がプロトン化し、レニンが活性化することを発見した。すなわちレニンは、基質の結合により初めて活性化する酵素であることが示唆された。

④ イソプレノイド前駆体合成酵素 IDI-2 の活性種フラビンの プロトン化状態 (20分)

○高岡友裕 1、斉藤圭亮 1,2,3、石北央 1,2

1東大・工、2東大・先端研、3JST さきがけ

イソプレノイドの前駆体を合成する酵素タイプ2イソペンテニル二リン酸イソメラーゼ (IDI-2) はフラビンを補因子に持つ。この反応では、基質のプロトン化によるカルボカチオン中間体の形成に、還元型フラビン $FMNH_2$ の双性イオン異性体 $FMN(N5-H_2)$ が重要な 役割を果たすと言われているが、その存在は推測の域を出ない。私達は還元型フラビンのプロトン化状態安定性を評価するために pK_4 値の計算を行った。

まず、分子構造にのみ基づいた量子化学的エネルギー計算で、実験では求めることが難しい水溶液中での双性イオン異性体の pKa 値を求めた。その結果、双性イオン異性体は水溶液中では非常に不安定であることがわかった。

次に、結晶構造に基づきポアソン・ボルツマン方程式を用いて静電相互作用を解析することにより、タンパク質環境の下での FMN(N5-H₂)/ FMN(N5-H) の p K_a 値を求めた。その結果、FMNH₂ は IDI-2 タンパク質中でも、双性イオン異性体 FMN(N5-H₂)が通常のプロトン化種 FMN(N1-H,N5-H)よりも、エネルギー的に大きく不安定であることがわかった。

10PM2 14:20~15:50

- ⑤ 抗体凝集に関与する IgG1 定常領域ドメインの特性解析 (20分)
 - ○八桁清樹 1、本田真也 1,2

1東大・新領域,2産総研・バイオメディカル

蛋白質の凝集反応は、蛋白質の構造的特徴や脆弱な安定性などの本質的な性質に由来するため、ある意味では避けられない現象といえる。IgG1 は抗体医薬品として使用されている蛋白質であるが、その凝集反応も、医薬品として要求される高い品質に悪影響を与えることから、高度に抑制されることが望ましい。IgG1 は、物性の異なる複数種のドメインから構成されているが、その複雑な構成は抗体凝集反応をドメイン単位などのより細やかなレベルで解析することを困難にする。そこで本研究では、抗体の凝集反応をドメイン単位で理解することを目指し、IgG1 の定常領域ドメイン(CH2、CH3、CL、CH1-CL ダイマー)を、大腸菌を用いて個別に合成し、pH2-8、0-300 mM NaCl からなる広範な溶液条件におけるコンホメーション変化と凝集反応を解析した。解析の結果、酸変性状態では NaCl 濃度の増加に伴い CH2 と CH3 が凝集体を生じることがわかった。さらに凝集反応が始まる NaCl 濃度が 2 つのドメインで異なり、変性状態のコロイド的な安定性がドメイン間で異なることがわかった。これらの結果は、蛋白質の凝集のしやすさが、構造安定性だけではなく、変性時のコロイド安定性にも大きな影響を受けることを示している。

10PM3 16:00~17:00

単離ミトコンドリア内の Mito-GO ATeam 計測 (10分)

○山下 紗季、蛭崎 琴絵、太田 善浩

東京農工大・工・生命工

ATeam は、ATP 濃度に応じて FRET 効率が変化することで、リアルタイムに ATP 濃度を計測できる蛍光プローブである。その結果、細胞内のさまざまな箇所で ATP 濃度が計測され、その多様性が分かってきている。ATP の主要な産生箇所であるミトコンドリアマトリクスにおいても計測され、細胞質とマトリクスの ATP 濃度の比較などが行われている。しかし、ミトコンドリア内の ATP 濃度がどのように調節されているのか、不明である。そこで本研究では、マトリクス内 ATP 濃度の調節機構を理解することを目的として、ミトコンドリア周囲の環境を自在に操作できる単離ミトコンドリアを対象に、ミトコンドリア内GO-ATeam を計測する条件の確立を目的とした。

GO-ATeam は、ATP に特異的に結合する ε サブユニットを OFP 変異体と GFP 変異体ではさんでおり、ATP が結合すると GFP 変異体から OFP 変異体へ FRET 効率が変化する。 GO-ATeam はミトコンドリア移行シグナルをつけて、C6 細胞のミトコンドリアマトリクスに発現させた。C6 細胞から単離したミトコンドリアは量が少ないので、個々のミトコンドリアを蛍光顕微鏡で計測した。ATP を添加すると、GFP の蛍光強度の低下、OFP の蛍光強度の上昇が認められ、ミトコンドリア内での ATP 濃度が増加するのが観察された。

② ダメージの少ないミトコンドリア単離法の検討(10分)

○柴田 貴弘1、山根 理絵2、加藤 薫3、太田 善浩1

1農工大院・生命工,2農工大・生命工,3産総研

本研究は、細胞からダメージの少ないミトコンドリアを単離することを目的とした研究である。単離ミトコンドリアは、ミトコンドリア周囲の環境を自由に調節できることから、ミトコンドリアの機能を調べる研究によく用いられている。しかし、従来の単離法では、細胞をすりつぶすため、ミトコンドリアのダメージが大きいことが考えられる。

そこで、ストレプトリシン O を用いて、細胞膜に孔を開け、ピペッティングにより穏やかに単離する方法を検討した。この方法により単離されたミトコンドリアを次の 4 つの点から調べた。①単離ミトコンドリアの形状を、透過光観察および GFP 蛍光観察により確認した。②単離ミトコンドリアの膜構造を、超解像顕微鏡(N-SIM)を用いて観察した。③単離ミトコンドリアの膜の完全性を、生細胞を染色する蛍光色素 calcein の染色割合から確認した。④単離ミトコンドリアの膜電位形成能を、膜電位感受性蛍光色素 TMRE の染色割合から確認した。また、ダメージの少ないミトコンドリアは、外膜を介した輸送機構の解明に利用できることが考えられる。そこで、膜電位形成能を有するミトコンドリアの、基質に対する応答性を、TMRE 蛍光強度により比較・検討した。

10PM3 16:00~17:00

- ③ 老化にともなうラット脳内の性ステロイド合成系と受容体の 変化 (20分)
 - ○棟朝亜理紗、北條泰嗣、木本哲也、川戸佳

東大・総合文化・広域科学専攻

老化をすると性ステロイド濃度が減少し、記憶・学習能が低下する。記憶・学習能と血中の性ステロイド合成系の関係に着目した研究が多いが、海馬内には独自の性ステロイド合成系が存在し、海馬内の性ステロイド濃度は血中の濃度よりも高い。また、老齢の研究は、老齢ラットの飼育と入手が難しい為、アルツハイマー病などのモデル動物を使用した研究が多い。これらのことから、3、12、24ヶ月齢(ヒトでは約20、40、80歳)のオスラットを用いて、海馬内の性ステロイド合成酵素および受容体のmRNA発現量と、性ステロイド濃度の老化に伴う変化を調べた。

RT-PCR 法を用いた mRNA 発現量解析では、男性ホルモン合成酵素 (P450scc、38-HSD I、P450(17a)、178-HSD (1,3)、5a-reductase 2)、男性ホルモン受容体 AR の発現量が減少することが判明した。それに対し、女性ホルモンの合成酵素 P450arom と受容体 ERa は老化により変化しなかった。

質量分析法を用いた性ステロイド濃度解析では、男性ホルモン (T、DHT) は老化により 約 1/100 に減少することが明らかとなった。それに対し、女性ホルモンは老化をしても約 1/4 にしか減少しなかった。

一方、海馬では神経栄養因子の BDNF と神経細胞数は老化により減少しない。このことからも、海馬神経細胞の保護やシナプス密度維持には性ステロイドが重要であると言える。

④ シクロフィリン D による酸化ストレス誘導機構 (20分)

小林明日香、中里眸、四戸大介、大崎光、藤田智沙子、田中康太郎、中島華、〇太田善浩 東京農工大・エ

シクロフィリン D (CypD) はミトコンドリアに局在するプロリン異性化酵素であり、酸化ストレス誘導性の細胞死において、細胞死を促進することが報告されている。そのメカニズムは、ミトコンドリア内膜の透過性が急激に上昇するミトコンドリア膜透過性遷移(MPT) と呼ばれる現象によると考えられてきた。しかし、MPT が生じる前の初期の段階においても、CypD が細胞死の進行に影響を与えることが見出された。本研究は、CypD がMPT 以前の細胞死の進行に及ぼす影響を調べたものである。

野生型 CypD を過剰発現させた WT 細胞、酵素活性欠損型 CypD (R97A) を過剰発現させた R 細胞を用いた。ロテノンを低濃度で加えると、WT 細胞では細胞が収縮して細胞死が生じるのに対し、R 細胞では形態変化や細胞死が生じなかった。WT 細胞の収縮後の早い段階ではミトコンドリアの膜電位は保たれており、MPT は生じていなかった。そこで、これら 2 つの細胞におけるミトコンドリアの活動の違いを調べるため、呼吸活性、乳酸生成速度、ミトコンドリアタンパク質、活性酸素発生、脂質過酸化を比較した。その結果、WT 細胞では酸化ストレスが誘導されやすくなっていることが示唆された。