

(1) カチオン重合による交互共重合体の精密合成および新しい分子設計

(阪大院理) 青島 貞人、金岡 鐘局、金澤 有紘

「目的」

我々はこれまで、リビングカチオン重合により様々な機能性ポリマーの合成を検討し、刺激応答性などの特異的な性質を見いだしてきた。今年度は、当研究室で見いだしたビニルエーテルとアルデヒドの交互型制御重合などを用い、(1) 選択的分解性と刺激応答性を併せ持つポリマーの精密合成、(2) ポリマー鎖の選択的な切断法の検討、(3) 新しい共重合による材料設計を行った。

「結果と考察」

(1) 温度・pH 応答性基やイオン性基を有するビニルエーテル類とアルデヒドとの交互共重合を検討した。その結果、得られたポリマーは比較的狭い分子量分布を持ち、側鎖構造に対応した様々な刺激応答性を有することがわかった。さらに比較的穏和な酸性条件下で減圧除去可能な低分子にまで分解できた。

(2) 上記系が副反応無くリビング的に進行しアセタール構造を形成することを利用して、ポリマーの特定位置に分解性ユニットを導入し、設計通りにポリマーを切断する方法を見いだした。例えば、ポリマーの中心部に交互ユニットを導入すると、酸加水分解後に正確に分子量が半分に切断された。また、ブロックコポリマーや星型ポリマーに導入すると、酸加水分解によりポリマーの一部が選択的に分解され、ゲルゾル変化、内包物放出が可能になった。

(3) ビニルエーテルとオキシラン化合物のビニル付加・開環同時カチオン共重合を検討した。適切なルイス酸触媒を用いた開始剤系により、交差生長反応を伴ってビニル付加・開環同時カチオン共重合が進行することを見いだした。さらに種々の置換基のオキシランを用い、生成し得る生長炭素カチオン種と交差生長の関係についても明らかにした。

側鎖にオキシエチレン基を有する両親媒性ブロックポリマーを使用することにより、シリカナノ微粒子の配列制御を検討した。その結果、15nm 程度のシリカナノ微粒子が、最適 pH 条件下、自然界では見られない微粒子のリング状配列(6~7 員環)をすることが見いだされた。

「文献」

Kawamura, M.; Kanazawa, A.; Kanaoka, S.; Aoshima, S. *Polym. Chem.* **2015**, in press.

Kanazawa, A; Kanaoka, S.; Aoshima, S. *Macromolecules* **2014**, *47*, 6635-6644.

(2) 分子内 NH...O 水素結合によるマグネシウム依存性ホスファターゼの加水分解反応性制御に関する研究

(阪大院理) 鬼塚 清孝、岡村 高明、神林 直哉

「目的」

Mg²⁺イオン依存性ホスファターゼは広く生物中に存在し、リン酸エステルやポリリン酸の加水分解を行い、遺伝情報、エネルギー、細胞周期やそれに関連した重大な疾病などに深く関わる重要な酵素であるにも拘わらず溶液構造を議論した研究例は極めて少ない。これは、マグネシウム-カルボキシレート結合の不安定性に因る。つまり、極性溶媒中では容易に解離し、溶媒和したイオン対になってしまう。以前、酵素内の NH...O 水素結合に着目し、モデル錯体 [Mg(L)₂(H₂O)₄] (L: カルボキシレート配位子)を用いて、L が単座で配位するとき、NH...O 水素結合を配位酸素原子に形成すれば Mg-O (L)が長くなり、もう一方の酸素原子に形成すれば Mg-O(L)が短くなる事、また Mg-OH₂ 結合長も変化する事を結晶構造や理論計算から明らかにしたが、錯体の溶解度が低く、溶液状態については言及できなかった。本研究では、トルエンのような非極性溶媒に可溶性錯体を合成し、水素結合が溶液構造や加水分解の反応性に与える影響を系統的に調べた。

「結果と考察」

高い疎水性置換基(4-*t*-BuC₆H₄)₃C (= Ar₃C)を用い、2つの NH...O 水素結合を持つ 2-Ar₃CCONH-6-*n*-BuCONHC₆H₃COO⁻ (L1)、1つの水素結合を持つ 2-Ar₃CCONHC₆H₄COO⁻ (L2)、水素結合を持たない 2-{(*n*-C₇H₁₅)(*n*-C₉H₁₉)CH}CO-

$\text{N}(\text{CH}_3)_6\text{H}_4\text{COO}^-$ (**L3**)を合成し、マグネシウム及び比較として亜鉛の中性錯体 $[\text{M}(\text{Ln})_2(\text{H}_2\text{O})_4]$ (**M-Ln**) ($\text{M} = \text{Mg}, \text{Zn}; \text{n} = 1-3$)を合成した。結晶構造から $\text{M}-\text{O}(\text{Ln})$ の結合長は **M-L1** > **M-L2** の順で、 $\text{M}-\text{OH}_2$ は逆の **M-L1** < **M-L2**、配位水の酸性度は $^1\text{H NMR}$ から **M-L1** > **M-L2** と見積もられた。加水分解反応は **M-L2** > **M-L3** > **M-L1** の順であり、配位水が脱プロトン化した OH^- の塩基性が重要である事が示された。反応速度の差は Mg 錯体の方が Zn 錯体より明らかに大きい事がわかった。今回の結果は、水素結合の様式を切り替えるだけで酵素の反応性を高低と真逆にでき、その変化量が大きい Mg^{2+} を酵素が利用している事を示している^{2,3)}。

「文献」

- 1) Okamura, T.; Nakagawa, J., *Inorg. Chem.* **2013**, *52*, 10812–10824.
- 2) Okamura, T.; Furuya, R.; Onitsuka, K. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 14639-14641.
- 3) Okamura, T.; Furuya, R.; Onitsuka, K. *Dalton Trans.* **2015**, *44*, 7512-7523.

(3) 抗体を用いた特異的反応場およびセンシング素子の開発

(高分子機能化学研究室) 山口浩靖

「目的」

生体系の免疫システムを利用した機能性高分子の創製を目的に、本年度は人体がストレスを感じたときに存在量が多くなる物質を高感度で特異的に捕捉し、その存在を可視化・定量化するためのセンシング素子開発を行なった。ストレスの度合

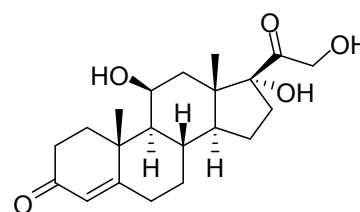


図1. コルチゾール

を測るための指標としてコルチゾール (図1) を選択した。コルチゾール (副腎皮質ホルモン的一种) は糖やタンパク質の代謝や免疫機構に関与する生命維持に不可欠なホルモンである。過度なストレスを受けると、コルチゾールの量が、血液のほか唾液や尿中でも増加し、その反応はとても敏感であるため、このコルチゾールを定量化できるシステムを構築することにより、簡便なストレス計測が可能になると考えた。このコルチゾールを特異的に結合する素子としてモノクローナル抗体を作製した。

「結果と考察」

コルチゾール誘導体 **1** および **2** (図 2(a)、(b)中の各化合物) をそれぞれキャリアタンパク質に導入して抗原を調製し、それぞれをマウスに免疫した。2週間間隔で4あるいは5回免疫した後のマウスの血中に、コルチゾールに結合する抗体があるか否かを酵素標識抗体測定法により観測した。その結果、**1** と **2** の両者において、マウス体内で目的の抗体が十分に産生されていることがわかった (図 2)。それぞれの免疫マウスから脾臓細胞 (抗体を作る細胞) を摘出し、これを骨髓腫細胞と融合することで、半永久的に増殖する抗体産生細胞を得た。これらの細胞の中から、コルチゾールに特異的に結合する抗体を作る細胞を選別し、それぞれの免疫系からモノクローナル抗体を複数種得ることに成功した。

血液希釈率

血液希釈率

図 2. コルチゾール誘導体 (**1** あるいは **2**) を免疫したマウスの血液を用いた酵素標識抗体測定の結果。横軸はマウス血液の希釈倍率で、縦軸はコルチゾールに結合する抗体の量あるいは結合力に比例する数値である。各グラフ上方にある●が免疫マウス、○が非免疫マウスの血液。●はコルチゾール以外にも非特異的に吸着する抗体の量を示す比較サンプルデータ。

(4) 高分子化イオン液体のダイナミクス

(阪大院理) 井上正志、浦川 理

「目的」

イオン液体を高分子化した高分子化イオン液体は、イオン液体の優れた物性を残しつつ、熱可塑性樹脂としての利用が可能になる。これまでの研究から、高分子化イオン液体は、ガラス転移領域で特異なダイナミクスを示すことが明らかになった。このダイナミクスの分子論的起源を、流動複屈折、粘弾性測定、誘電緩和法を用いて明らかにする。

「結果と考察」

bis(trifluoromethanesulphonyl)imide イオン (TFSI⁻)、nonafluorobutanesulfonic イオン(NfO⁻)、1,1,2,2,3,3-Hexafluoropropane-1,3-disulfonimide イオン (CPFSI⁻) を対アニオンとする Poly(1-butyl-3-vinylimidazolium)ベースの高分子化イオン液体について、流動光学測定を行い、粘弾性スペクトルを配向緩和モード、sub-Rouseモード、ガラスモードの3つのモードに分離し、粘弾性の精密解析を行った。ガラスーゴム転移領域に見られる緩和時間分布の広い緩和モードは、sub-Rouseモードに帰属できた。このsub-Rouseモードに対して、対アニオンの構造が与える影響についてアニオンの構造から詳細に検討を行った。sub-Rouseモードの応力光学係数が対アニオン種に依存したことから、この運動モードは対アニオンを伴った高分子主鎖の運動であると考えられた。また、PC₄VINfOに関する検討から、sub-Rouseモードの発現には、対アニオンの解離のしやすさが重要であることがわかった。さらに、PC₄VICPFSIの検討から、対アニオンの形状は、イオン伝導度へ影響するが、sub-Rouseモードへの影響は小さいことがわかった。さらに、高分子化イオン液体のダイナミクスに対する電荷の効果をより詳細に調べるため、イオン液体を溶媒とする高分子化イオン液体の溶液の粘弾性についても調べた。その結果、イオン液体中で高分子化イオン液体の配向緩和モードが加速されている可能性が示唆された。

「文献」

2) Nakamura K, Fukao K, Inoue T *Macromolecules* **45**, 3850 (2012)

3) Inoue T, Matsumoto A, Nakamura K *Macromolecules* **46**, 6104 (2013)

4) Nakamura K, Fukao K, Inoue T *J Soc Rheo Janan* **1**, 21 (2013)

5) Matsumoto A, Inoue T *Nihon Reoroji Gakkaishi* **42**, 227 (2014)

(5) 特異的な分子間相互作用による「もの」の選択的接着

(超分子科学研究室) 原田明、高島義徳

1. β シクロデキストリン(β CD)ゲルとフェロセンゲルによる酸化還元による接着制御

フェロセンを含むゲルは β CDゲルと選択的に接着するが、フェロセンを酸化することにより、 β CDとの接着が抑えられる。ところが、フェロセンが酸化されたカチオンはアニオン性のポリマーであるポリスチレンスルホン酸を含むゲルと接着することを見いだした¹。フェロセンの酸化還元反応により、 β CDゲルとの接着を制御することができた。

2. ボロン酸とカテコールとの相互作用を利用した pH や糖に応答するゲルシステムの開発

ボロン酸を含むゲルとカテコールを含むゲルとは塩基性条件下で結合し、集合体を形成するが、酸性側では解離する。また、ボロン酸を含むゲルとカテコールを含むゲルとの接着は単糖類により選択的に阻害されることが分かった²。すなわち、糖を認識して応答するシステムを構築することができた。

3. 金属イオンに応答するゲルの接着

β CD とビピリジルの両方を含むホストゲルは *t*-ブチル基を含むゲストゲルとは接着しないが、ホストゲルを銅イオンを含む溶液に浸漬させることにより、ゲストゲルと接着するようになった。これはホストゲルの中のビピリジルが銅イオンを配位することにより、 β CD 環から外に出るため、*t*-ブチル基をとりこむことができたためである³。

4. ものともとの反応による接着

ボロン酸を有するゲルとヨードベンゼンを有するゲルとを鈴木-宮浦カップリング反応で結合し、接着することができた⁴。

<参考文献>

1. Nakahata, M.; Takashima, Y.; Harada, A. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2014, 53, 3617-3621.
2. Nakahata, M.; Mori, S.; Takashima, Y.; Hashidzume, A.; Yamaguchi, H.; Harada, A. *ACS Macro Lett.*, 2014, 3, 337-340.
3. Nakamura, T.; Takashima, Y.; Hashidzume, A.; Yamaguchi, H.; Harada, A. *Nature Communications* 2014, 5, 4622.
4. Sekine, T.; Kakuta, T.; Nakamura, T.; Kobayashi, Y.; Takashima, Y.; Harada, A. *Scientific Reports* 2014, 4, 6438.

(6) 輸送 ATPase 複合体の構造と作動機構

(阪大院理) 今田勝巳、金子文俊、川口辰也

目的

Ⅲ型輸送装置はべん毛形成や細菌感染において、細菌細胞内で合成された蛋白質を細胞外へ分泌する際に働く分子機械である。我々はこれまでに細胞質コンポーネントである FliI ATPase と FliJ が回転モーター分子である F/V 型 ATPase と同様の構造を持つことを示した。そこで、FliH-FliI 複合体の構造と FliI リング複合体の ATPase 加水分解による構造変化を明らかにし、輸送装置の作動機構、F/V 型 ATPase の作動機構の相違点に迫ることを目的とした。

結果と考察

FliH-FliI 複合体の X 線結晶構造を 3.0 Å 分解能で決定した。FliH は 2 量体を形成して FliI と結合していたが、2 つの FliH 分子の構造は互いに著しく異なっていた。また 2 量体構造は、V 型 ATPase の G サブユニットと E サブユニットで形成される peripheral stalk

の構造と酷似していた。この結果から、Ⅲ型輸送装置の細胞質コンポーネントは全て F/V 型 ATPase と類似した構造を持つことが明らかになり、F/V 型と同様の回転触媒機構を持つことが示唆された。そこで、FliI リング複合体の ATPase 加水分解による構造変化を調べるため、高速 AFM による観察を行った。その結果、6 量体リングを形成する FliI 複合体は、添加したヌクレオチドにより、3 回回転対称になることがわかった。このことは、2 種類のサブユニットから成るヘテロ 6 量体構造を持ち、3 回回転対称の F/V 型 ATPase と同様であり、FliI 複合体の 6 つのサブユニットが機能的に分化していることを示している。これらの成果について、論文作成中である。尚、2013 年度の課題であったビブリオ菌の固定子構成蛋白質の構造解析とモーターへの組み込みに伴う構造変化について、2014 年度に論文を発表した。

1. Conformational change in the periplasmic region of the flagellar stator coupled with the assembly around the rotor.

Zhu S, Takao M, Li N, Sakuma M, Nishino Y, Homma M, Kojima S, Imada K.

Proc Natl Acad Sci U S A. **2014**, Sep 16;111(37): 13523-13528.

2. The bacterial flagellar motor and its structural diversity.

Minamino T, Imada K.

Trends Microbiol. 2015 Jan 20. pii: S0966-842X(14)00268-6. doi: 10.1016/j.tim.2014.12.011.

(7) 親水化ポリ (ジメチルシロキサン) の溶液物性

(阪大院理) 佐藤尚弘、橋爪章仁、寺尾 憲

「目的」

当研究室では、親水性高分子にドデシル基などの長鎖アルキル基を導入して疎水化させた両親媒性高分子が水溶液中で形成する高分子ミセルの構造について調べてきた。今年度は、逆に疎水性高分子に少量のイオン性置換基を導入したランダム共重合体が極性溶媒中で形成する高分子集合体について調べた。この

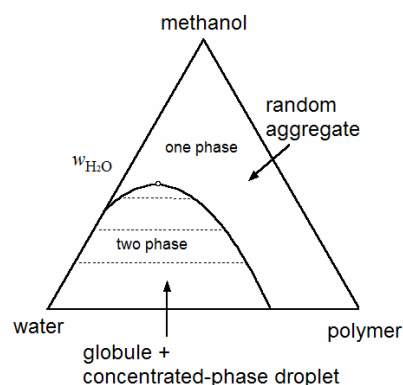
ようなランダム共重合体はアイオノマーと呼ばれ、古くから研究が行われてきたが、その強い両親媒性のために溶液中で形成される高分子集合体については、いまだ十分な理解が得られていなかった。近年燃料電池膜として注目されているフッ素ポリマーに電解質基を導入したナフィオンや、表面改質剤として利用されている親水化ポリ（ジメチルシロキサン）は、このアイオノマーの一種で、溶液から加工する過程で、その溶液中での高分子の集合状態を理解しておくことは重要である。本研究では、4級アンモニウム基を導入した親水化ポリ（ジメチルシロキサン）の水-メタノール混合物中での集合状態を、光散乱および小角X線散乱により調べ、高分子集合体の構造やその形成機構について考察した。

「結果と考察」

重合度が1050のポリ（ジメチルシロキサン）に4級アンモニウム基を16mol%導入したアイオノマーを合成し、0.1 M 酢酸ナトリウムを含む水-メタノール混合物と混ぜて1%未満の濃度の溶液を調製し、光散乱及び小角X線散乱測定を行った。

溶液はほぼ透明であったが、水-メタノール混合物中の水の重量分率が0.5以上では、相分離していた。この3成分系の相図は、右図に示すように、高分子+溶媒（メタノール）+非溶媒（水）の系に期待される相図であった。

2相領域にある溶液中で、濃厚相は回転半径が100~300 nm程度のコロイド粒子として存在するが、時間が経つと



ゆっくりと凝集が起り、溶液調製後数日が経過すると溶液は濁ってきた。2相領域にある高分子溶液系が、溶液調製直後にはコロイド分散状態にあるのは、この親水化ポリ（ジメチルシロキサン）の乾燥試料が、水-メタノール混合物と混ぜる前に、電解質基が凝集したマルチプレット構造をとり、溶解時にはそのマルチプレットが膨潤してコロイドが形成されたと考えられる。

(8) アニオン重合における停止反応の制御に関する研究

(基礎工学研究科) 北山辰樹・西浦崇文・北浦健大・高坂泰弘

【目的】アクリル系モノマーの立体特異性リビングアニオン重合における効率的な停止反応の開発による末端反応性立体規則性ポリマーの合成を目指す。また停止剤存在下のリビング重合にも挑戦する。

【成果】種々の α -置換アクリル酸エステル類の重合研究を進める中で、 α -ハロメチルアクリル酸エステルがメタクリル酸メチル（MMA）の立体特異性リビング重合で得られるポリマーアニオンとの反応で、末端に C=C 二重結合を有する立体規則性 PMMA を与えることを見出した。この停止反応は、ポリマーアニオンの α -ハロメチルアクリル酸エステルの C=C 結合への付加ののち、ハロゲンの脱離を伴う SN 2' 型の付加脱離反応であり、種々の添加材によって安定化された立体規則性ポリ MMA アニオンに対しても高効率で進行する。この二重結合はエステル基による活性化を受けており、塩基存在下でチオール類との Michael 付加型クリック反応が可能で、ラジカル種を必要としない温和な条件でのポリマー末端修飾反応に有効であった。この特性を生かし、メタクリル酸ビニルのアニオン重合の停止反応で得られた末端反応性ポリマーの末端特異的クリック反応およびビニルエステル基の加水分解によって、末端官能性、立体規則性ポリメタクリル酸の合成も可能であった。

（9）相分離を利用した機能性モノリスの開発

（阪大院工）宇山 浩、辻本 敬、長谷川 麗

「目的」

我々はこれまでに相分離を利用して、アクリル樹脂やポリアクリロニトリルなどの高分子溶液から骨格と空隙（貫通孔）がネットワーク状に連なった多孔体（モノリス）を簡便に作製する技術を開発してきた。この方法で作製した多孔体は空隙率が高く、高効率な吸着や反応が可能な機能材料として期待される。本研究ではエチレン-ビニルアルコール共重合体（EVOH）やセルロース誘導体を親水性担体原料に主に用いてモノリスを作製し、酵素、抗体等のタンパク質

を固定化し、バイオ用途に展開する。

「結果と考察」

グルタチオン (GSH) を EVOH モノリスに固定化し、GST 融合タンパク質 (GFP) の分離アフィニティーカラムとしての性能を検討した。EVOH モノリスを DSC のアセトニトリル溶液中で加熱し、活性化 EVOH モノリスを得た。続いてスパーサーとしてジアミン(1,2-ビス(2-アミノエトキシ)エタン)との反応をメタノール溶媒中で行った。再び DSC と反応させることで、スパーサーを含む活性化 EVOH モノリスを得た。GSH を活性化モノリスと反応させることでモノリス表面への固定化を行った。GSH 固定化量をブラッドフォード法を用いて求めたところ、GSH を直接固定化したほうが GSH の固定量が大きいということがわかった。GSH 固定モノリスカラムをフロー系で GFP の吸着及び脱着を行った。蛍光色素を含む GFP 溶液をモノリスカラムに通液し吸着させ、洗浄後に溶出バッファーを用いてタンパク質を溶出させた。溶液の蛍光強度からタンパク質の吸着量・溶出量を算出した。GSH の固定量の小さいスパーサーを含むモノリスの方がタンパク質の固定量・溶出量がともに多いことがわかった。スパーサーにより固定した GSH の可動域が広くなり、より広範囲でタンパク質と相互作用したためと考えられる。次に低分子薬剤を固定化したセルロースモノリスをアフィニティーカラムとして評価した。エピクロロヒドリンと反応させることによりセルロースにエポキシ基を導入した。鎖長の異なるジアミンを反応させることでアミノ基を導入し、続いてベンゼンスルホンアミド (モデル薬剤) を固定化した。ラット脳ライゼートを用いて結合テストを行ったところ、ターゲットタンパク質をよく吸着し、一方で非特異吸着の評価となる tubulin 等の吸着は少なかった。市販品と比して非特異吸着は大幅に抑制されており、低分子薬剤用のアフィニティーカラムとして優れた結果を示した。

(10) 巨大な生体超分子複合体の原子構造決定に関する研究

(阪大蛋白研) 中川敦史、鈴木守、山下栄樹

[目的]

分子量 10 億のクロレラウイルス、イネ萎縮ウイルス (RDV) を中心とした二重殻球状レオウイルスおよびその関連蛋白質、薬剤排出タンパク質複合体などを対象に、生体超分子複合体の構造解析を X 線結晶構造解析法や X 線自由電子レーザーを用いた単粒子解析法を用いて行う。また、その目的を達成するために SPring-8 の蛋白研ビームライン (BL44XU) の高度化とビームラインを利用した技術開発や X 線単粒子解析法の開発を進める。

「結果と考察」

イネ萎縮ウイルスの非構造蛋白質 Pns12 の結晶構造解析に成功し、Pns12 が会合して 18 量体を形成することを明らかにした。

アメリカ・スタンフォード SLAC 国立加速器研究所の X 線自由電子レーザー施設 LCLS において、ウプサラ大学のグループが開発したサンプルインジェクターを用い、コヒーレント X 線回折イメージング (CDI) 実験を行った。クロレラウイルスと RDV の良質なスペックルデータを得ることに成功した。現在このデータを用いて構造解析を進めている。すでに、いくつかのデータについて像回復に成功しており、それらの解釈を進めるとともに、3 次元構造解析に着手した。

SPring-8 の蛋白研ビームラインに関しては、巨大な生体超分子複合体や不安定な膜蛋白質結晶からの、より高精度な回折強度データ収集を目指して開発を進めている。特に、H26 年度は、より小さな結晶からの回折強度データ収集を可能とするように、縦集光ミラーを導入し、集光光学系の高度化を進めた。

「文献」

X-ray crystal structure of voltage-gated proton channel

Takeshita, K.; Sakata, S.; Yamashita, E.; Fujiwara, Y.; Kawanabe, A.; Kurokawa, T.; Okochi, Y.; Matsuda, M.; Narita, H.; Okamura, Y.; Nakagawa, A.; *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **21**(4), 352-357 (2014).

(1 1) 蛋白質のフォールディングとミスフォールディング

(阪大蛋白研) 後藤 祐児、Lee, Young-Ho

[目的]

蛋白質は正しくフォールディングすることにより機能を獲得する。他方、蛋白質はミスフォールディングしてアミロイド線維を形成し、さらには疾病を引き起こす。蛋白質のフォールディングとミスフォールディングの分子機構を、物理化学的手法で研究する。 β 2ミクログロブリンやアミロイド β ペプチド、ニワトリ卵白リゾチームをはじめとする蛋白質やペプチドを材料として、アミロイド線維の形成が、蛋白質の過飽和条件からの析出であることに焦点を当て、アミロイド線維の形成機構の解明を目指す。

[結果と考察]

- (1) 蛋白質のフォールディング・ミスフォールディングに関する研究を進め、溶質である蛋白質の「溶解度」と「過飽和」が、アミロイド線維形成を支配する特に重要な因子であることを示した。そして「超音波照射」は過飽和を解消してアミロイド線維を析出させる有効な方法であることを示した。
- (2) これまで困難であったアミロイド線維の自発的な形成反応を等温滴定型熱量計によって解析することに成功した。不定形凝集も含めて蛋白質凝集の熱測定を行いその熱力学的機構を提唱した。
- (3) パーキンソン病の原因となる α シヌクレインが低温変性することを見出し、その熱力学的機構を解析した。
- (4) マイクロプレートリーダーと超音波処理と組み合わせたアミロイドアッセイ法を開発して、さまざまな蛋白質やペプチドのアミロイド形成反応を解析した。これを発展させた自動アミロイド誘導アッセイ装置「HANABI (HANdai Amyloid Burst Inducer)」の研究開発を進めた。

[文献]

1. Umemoto, A., Yagi, H., So, M. and Goto, Y. High-throughput analysis of the ultrasonication-forced amyloid fibrillation reveals the mechanism underlying the large fluctuation in the lag time. **J. Biol. Chem.** 289, 27290-27299 (2014).
2. Ikenoue, T., Lee, Y.-H., Kardos, J., Yagi, H., Ikegami, T., Naiki, H. and Goto, Y. Heat of supersaturation-limited amyloid burst directly monitored by isothermal titration calorimetry. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 111, 6654-6659 (2014).
3. Muta, H., Lee, Y.-H., Kardos, J., Lin, Y., Yagi, H. and Goto, Y. Supersaturation-limited amyloid fibrillation of insulin revealed by ultrasonication. **J. Biol. Chem.** 289, 18228-18238 (2014).
4. Ikenoue, T., Lee, Y.-H., Kardos, J., Saiki, M., Yagi, H., Kawata, Y. and Goto, Y. Cold denaturation of α -synuclein amyloid fibrils. **Angew. Chem. Int. Ed.** 53, 7799-7804 (2014).
5. Lin Y., Lee Y.-H., Yoshimura, Y., Yagi H. and Goto, Y. Solubility and supersaturation-dependent protein misfolding revealed by ultrasonication. **Langmuir** 30, 1845-1854 (2014).

(12) 巨大モーター蛋白質ダイニンがもつストーク領域の精密構造解析

(阪大蛋白研) 栗栖源嗣、田中秀明

[目的]

ダイニンはATP依存的に微小管上を滑り運動するモーター蛋白質で、重鎖・中間鎖・軽鎖から構成される1000kDaを超える生体超分子複合体である。鞭毛運動や繊毛運動、さらに蛋白質輸送や染色体分離運動を担うモーター蛋白質でその生物学的重要性は極めて高い。我々は、微小管結合ドメインを含むダイニンのストーク領域に着目し、X線結晶解析法とCDスペクトル、分子動力学計算を併用して微小管への結合・解離を制御している構造基盤を原子レベルで明らかにすることを研究目的とした。

[結果と考察]

構造研究に用いる組換え体蛋白質を大量に調製するため、大腸菌と昆虫細胞を用いて発現系を構築し、複数種の高純度組換え体蛋白質を精製することに成功した。得られた組換え体のうち、マウス細胞質ダイニンがもつストーク領域について、その結晶構造を明らかにした。さらに、微小管への親和性が高い状態と低い状態との二状態を、還元剤の添加によって切り替え可能な改変体を作成し、二状態でCDスペクトルを測定した。二次構造解析の結果、ストーク領域全体に広がる特徴的な α ヘリックス構造が概ね（89%）保たれたまま二状態間を遷移している事が初めて示された。並行して、分子動力学計算による構造シミュレーションを実施し、ダイニンの脚に相当するストーク領域のダイナミクス解析を行った。以前に行われたダイニンモータードメイン全体の構造解析で分子モデルを構築できていなかったストーク領域に着目し、複数の構造解析手法を併用する事で、最終的に細胞骨格への結合とヌクレオチド加水分解の二つの要素反応を結びつける新しい情報伝達モデルを明らかにした¹⁾。

[文献]

1. Y. Nishikawa, T. Oyama, N. Kamiya, T. Kon, Y. Y. Toyoshima, H. Nakamura and G. Kurisu, Structure of the entire stalk region of the Dynein motor domain, *J. Mol. Biol.* **426**, 3232-3245 (2014)