

## (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) 疎水的環境により創り出される金属酵素活性部位の特異な反応場に関する研究

(阪大院理) 鬼塚 清孝、岡村 高明、神林 直哉

### 「目的」

高機能高分子錯体である金属酵素は、水中であっても、その活性中心を疎水的環境にすることで水素結合など弱い相互作用を効果的に保ち、活性な準安定構造を維持している。モリブデン(Mo)酵素の一種であるジメチルスルホキシド(DMSO)還元酵素(DMSOR)の活性部位は疎水的環境にあり、還元状態の  $\text{Mo}^{\text{IV}}$  中心は DMSO や  $\text{Me}_3\text{NO}$  などの基質を酸素原子移動反応(OAT)によりジメチルスルフィド(DMS)や  $\text{Me}_3\text{N}$  へと還元し  $\text{Mo}^{\text{VI}}\text{O}$  となる。一方、6 価から 4 価へは 2 電子還元過程ではなく、 $\text{Mo}^{\text{V}}\text{OH}$  を経由する 2 段階の 1 電子還元過程と考えられている。また、活性中心ではトリプトファン残基側鎖からの  $\text{NH}\cdots\text{O}=\text{Mo}$  水素結合の存在が示唆されている。本研究では、酵素活性部と周辺の疎水的環境をモデル設計・合成により再現し、反応機構の解明と高機能触媒への展開を目的とする。

### 「結果と考察」

非常に嵩高い疎水性置換基( $4\text{-}t\text{-BuC}_6\text{H}_4$ )<sub>3</sub>C を用い、トルエンに可溶性な DMSOR モデル錯体を合成した。この錯体が形成する疎水的環境は、DMSO を効率的に活性部位に取り込み、溶媒の極性に依存せず還元できることが明らかになった<sup>1</sup>。一方、トルエンに可溶性なモデル錯体は水溶性ミセル中の疎水的コア部分に溶解させることで、水溶液中で酵素が使用している NADH の類似体を用いたアミン *N*-オキシドの触媒的還元成功した。この触媒反応は水を必要とし、トルエン中での反応速度解析から水による  $\text{Mo}=\text{O}$  へのプロトン付加が律速段階である事が示された<sup>2</sup>。酸性プロトンによる  $\text{NH}^+\cdots\text{O}=\text{Mo}$  水素結合の役割を明らかにするため  $\text{Et}_3\text{NH}^+$  またはルチジニウム( $\text{LuH}^+$ )を対イオンとする錯体を合成した。トルエン中で  $\text{Mo}^{\text{IV}}$  は  $\text{Me}_3\text{NO}$  により  $\text{Mo}^{\text{V}}$  を収率良く与え、 $\text{LuH}^+$  塩はトルエンに溶解するだけで  $\text{Mo}^{\text{V}}$  を生じ、 $\text{LuH}^+$  の還元が示唆された。この予想外の結果は、酵素触媒サイクルにおいて水素結合が反応性を制御できる事を示唆している<sup>3</sup>。

### 「文献」

- 1) Hasenaka, Y.; Okamura, T.; Onitsuka, K., *Dalton Trans.* **2015**, 44, 6260-6267.
- 2) Hasenaka, Y.; Okamura, T.; Onitsuka, K., *Dalton Trans.* **2015**, 44, 12618-12622.
- 3) Okamura, T.; Yamada, T.; Hasenaka, Y.; Yamashita, S.; Onitsuka, K. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2016**. DOI: 10.1002/ejic.201600081.

### (3) 生体関連分子と合成高分子とのハイブリッド化による機能性材料創製

(高分子機能化学研究室) 山口浩靖

【目的】生体分子と合成高分子をハイブリッド化することにより新規機能性高分子触媒を開発した。本研究では、補因子がタンパク質の活性部位に取り込まれることにより、初めて酸素運搬、酵素、電子伝達などの機能を発現するヘムタンパク質、西洋わさびのペルオキシダーゼ(HRP)に注目した。酵素を構成するタンパク質(アポタンパク質)と補因子をそれぞれ合成高分子に導入し、これらの高分子材料を接触させたり、剥離させたりすることで触媒機能をオン・オフできるシステムを構築した。生体関連分子まわりの環境を制御することで、天然系では見られないような反応制御が可能な触媒を創製することができた。

【結果】HRP から補因子を抜き出したアポタンパク質(apoHRP)と補因子である鉄ポルフィリン(FePor)をそれぞれ導入したポリアクリルアミドゲルを合成した。apoHRP ゲルと FePor ゲルを 4 °C で接触させたところ、ゲルが接着した。apoHRP ゲルと FePor ゲル存在下、HRP の基質(ここでは ABTS)の酸化反応を観察した。接着した 2 種ゲルの界面から反応生成物に由来する色が広がってくることが確認できた。その反応速度は、apoHRP 及び FePor のゲルへの導入量および 2 種ゲル間の接触面積に比例することがわかった。apoHRP ゲルと FePor ゲルを接着させると ABTS の酸化反応が加速され、2 種ゲルを離すと反応が進行しなくなった。2 種類のゲルの接着－解離によって触媒反応を制御できることがわかった。

(本研究は原田明先生、高島義徳先生、橋爪章仁先生との共同研究である。)

【論文】Kobayashi, Y.; Takashima, Y.; Hashidzume, A.; Yamaguchi, H.; Harada, A. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 16254.

## (4) 完全ゼロ複屈折高分子の精密解析

(阪大院理)井上正志、浦川 理、片島拓弥

### 「目的」

単純な加成則から、三元系共重合体を利用すると、配向複屈折（固有複屈折）と固体状態での光弾性係数が、ともにゼロとなる完全ゼロ複屈折高分子 PZP を合成することができる。これは、系が理想的振る舞う場合であり、固体状態での副緩和など、実在系では非理想的な挙動が現れることが予測される。本研究では、PZP を合成し、複屈折に関する非理想的な挙動を精査した。

### 「結果と考察」

小池らの研究<sup>1)</sup>に従い、Methyl methacrylate (MMA)、Trifluoroethyl methacrylate (TFEMA)、Benzyl methacrylate (BzMA)の三成分系を用いて、MMA / TFEMA / BzMA = 55.5 / 38.0 / 6.5 (w/w/w)で共重合した。得られた試料の組成は、54.7 / 38.7 / 6.6 (w/w/w)となり、目的の組成に近い共重合体を得られた。

ひずみ複屈折（動的複屈折）と動的粘弾性  $G^*$ を測定した。時間温度換算則を利用して  $G^*$ の広い周波数域での合成曲線を得た。ガラス状領域では、 $G''$ には時間温度換算則がうまく適用できず、副分散が観測されることがわかった。一方、ひずみ光学係数の値は、通常の高分子の 1/10~1/100 程度のあるものの、測定可能であった。

以上の結果から、 $\Delta n_0$ と  $C_d$ を求めた。得られた  $\Delta n_0$ 、 $C_d$ 値は、ホモポリマーの文献値から加成性を仮定して計算される値とほぼ一致し、ランダム共重合法による複屈折の制御が可能であることが確認できた。しかしながら、ひずみ光学係数には、緩和課程が4つ存在することがわかった。それぞれ、鎖の配向緩和<sup>2)</sup>、ガラス緩和、二つの副分散に帰属できた。この結果は、長時間極限と短時間極限においては、複屈折を0にすることができるが、中間の時間領域では、各緩和モードの緩和速度が異なるため、複屈折の緩和が観測されることを意味している。さらに、今回の系では、固有複屈折が温度に依存するため、 $\Delta n_0$ 、 $C_d$ がともにゼロとなる完全ゼロ複屈折ポリマーは、ある特定の温度でしか達成できないことがわかった。

### 「文献」

- 1) Tagaya A, Koike Y *Polym J* **44**, 306 (2012)
- 2) Watanabe H, Matsumiya Y, Masubuchi Y, Urakawa O, Inoue T *Macromolecules*, (2015)

## (5) 特異的な分子間相互作用による超分子材料の作成

(超分子科学研究室) 高島義徳

### 1. $\beta$ シクロデキストリン( $\beta$ CD)ゲルとフェロセングルおよびアダマンタンを修飾した超分子材用の機能制御

酸化還元応答性と自己修復性を持つ超分子材料の作成を試みた。ゲスト分子にはフェロセンおよびアダマンタンを選択し、ホスト分子には $\beta$ CDを選択した。合成した超分子ゲルは化学架橋が入っていないにも関わらず、自立性を示した。フェロセンを酸化することにより、膨潤し、還元することで収縮した。さらに酸化還元制御を行うことで、形状の消去と書き込みができた。またアダマンタンを導入していることにより、破断面で接着する自己修復性を示した<sup>1</sup>。このように、機能性部位を二つ導入することで、膨潤収縮機能と自己修復機能、さらには形状記憶機能を有する機能性超分子材料が作成できた。

### 2. アジド基とアルキン基を用いたクリック反応による材料間の直接接着

アジド基を含むゲルとアルキン基を含むゲルを作成し、銅触媒を用いて、材料間の直接接着を試みた。ヒドロゲル間の接着強度は機能性官能基の導入量に応じて、上昇した。また、機能性官能基をガラス基板に修飾することにより、基材が異種であっても、接着できた。このような異種材料間の接着は接着剤を用いても可能であるが、大きな違いは材料間が分子結合によって接合されている点である。その結果、接着剤が溶解する有機溶媒に浸漬させても、分子接合による今回の方法では、解離することなく、強固な接着性を示した<sup>2</sup>。

### 3. 核酸塩基やオリゴヌクレオチドを用いた分子認識による材料間の接着

分子認識による接着として、核酸塩基を修飾したオルガノゲルやオリゴヌクレオチドを修飾したヒドロゲルを作成し、分子認識を通じた選択的な接着を試みた。その結果、アデニン修飾したゲルはチミン修飾したゲルの間で選択的な接着した。オリゴヌクレオチドを修飾したゲルでは、選択性が向上し、一致しない配列を持ったオリゴヌクレオチド修飾ゲル同士は接着しないが、配列が一致するゲル同士は接着した<sup>3</sup>。このように分子認識を通じた接着であるため、高い選択性を持った接着であることを確認した。

#### <参考文献>

1. Miyamae, K.; Nakahata, M.; Takashima, Y.; Harada, A. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 8984-8987.
2. Sekine, T.; Takashima, Y.; Harada, A. *RSC Advances* **2015**, *5*, 56130-56135.
3. Nakahata, M.; Takashima, Y.; Hashidzume, A.; Harada, A. *Chem. Eur. J.* **2015**, *21*, 2770-2774.

## (6) III型輸送装置による蛋白質輸送の計測

(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超分子複合体である。基質蛋白質をほどいて引き延ばし、細胞膜中の細いゲートを通させて細胞外へ輸送する、いわば高分子鎖の糸通し機能を持つ。本研究では、エネルギーを使って蛋白質を *unfold* する機構、ポリペプチド鎖を細胞膜中の細穴に通して輸送する機構の解明を目指し、外部から操作が可能なIII型輸送装置の *in vitro* 輸送測定系を確立して蛋白質輸送の計測を行うことを目的とした。

### 結果と考察

細菌の外膜とペプチドグリカン層を溶解後に圧力変化により内と外を逆転させ、III型輸送装置を保持した反転膜ベシクルを作成し、ベシクル外の物質をベシクル内へ輸送する系を作成した。そして、この系に外部から輸送基質・輸送装置細胞質コンポーネント・ATP等を変化させた時に小胞内に取り込まれる蛋白質量を測定した。基質タンパク質の反転膜内への取り込み活性を測定した。精製した輸送基質タンパク質 FlgD は、ATP 存在下で反転膜内に輸送されたが、プロトンイオノフォアによってプロトン駆動力を壊すと輸送が停止した。一方、ATPase 複合体を形成する FliH<sub>2</sub>/FliI 複合体と FliJ の添加すると輸送活性を劇的に促進した。さらに、ATP と FliHIJ の存在下では、プロトンイオノフォアで完全にプロトン駆動力を消失させてもタンパク質輸送が起きた。このことから、III型分泌装置はATPの加水分解エネルギーだけで基質輸送できるという、従来の説を覆す結果が明らかになった。

尚、2014年度の課題であったIII型輸送ATPase複合体を形成するFliH-FliI複合体の構造について、2015年度に論文を発表した。

1. Insight into the flagella type III export revealed by the complex structure of the type III ATPase and its regulator..

Imada K, Minamino T, Uchida Y, Kinoshita M, Namba K.

*Proc Natl Acad Sci U S A.* **2016**, Mar 29;113(13): 3633-3638.

## (7) 疎水性物質を内包する高分子ミセルの構造特性化

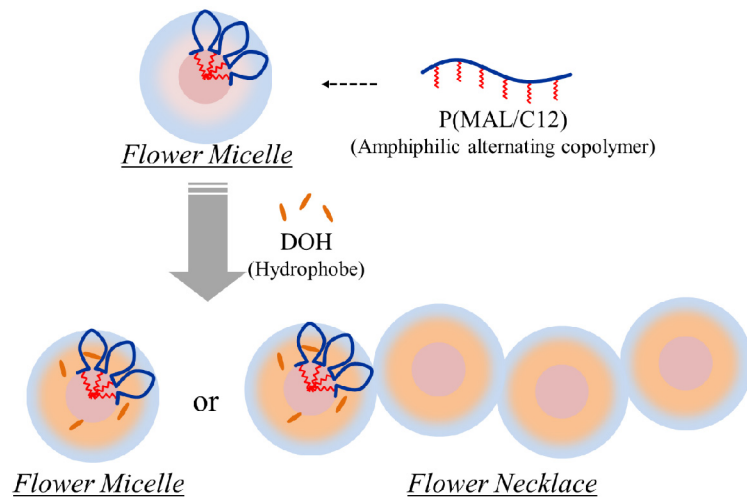
(阪大院理) 佐藤尚弘、寺尾 憲

### 「目的」

近年、水溶液中で形成する高分子ミセルをナノキャリアやナノリアクタなどに利用しようという試みが盛んに行われているが、運搬物あるいは反応原料である疎水性物質が高分子ミセル内にどのように取り込まれているかについては、いまだに十分理解されていない。最近我々は、低分子界面活性剤が水溶液中で形成する球状ミセルに疎水性物質（ドデカノール）を内包させたときのミセルの構造と解離-会合平衡を、静的光散乱と動的光散乱を組み合わせて詳細に研究した（別添資料参照）。これを拡張して、本研究では、両親媒性交互共重合体が水溶液中で形成する花型ミセルに疎水性物質であるドデカノールを内包させたときのミセル構造の特性化を行った。

### 「結果と考察」

親水性のマレイン酸と疎水性のドデシルビニルエーテルの交互共重合体は、希薄水溶液中で右図の左上に描いた花型ミセルを形成する。このミセル水溶液に疎水性物質であるドデカノールを添加すると、ドデカノールの内包両



の増加に伴って、同図中の下に示すように、単核の花型ミセルから多核のフラワーネックレスにモルフォロジー転移を起こすことを見出した。さらに、内包されたドデカノール（上図中の茶色の線分）は、交互共重合体のドデシル基（赤色のジグザグ線分）で形成される疎水性コア内（藤色の領域）にではなく、疎水性モノマーと親水性モノマーが共存しているミセルの中間領域内（上図中のオレンジ色の領域）に存在していることが判明した。これは、低分子界面活性剤の球状ミセルがドデカノールを疎水性コア内に内包させるのとは対照的な結果である。両親媒性交互共重合体が形成するミセルをナノキャリアやナノリアクタとして利用する場合、この疎水性物質の内包様式の特徴が生かせる可能性がある。

## (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  $\alpha$ -置換アクリル酸エステル類の重合研究を進める中で、 $\alpha$ -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。本年度は、以下の成果を得た。

(1) 官能性停止剤を用いる二元クリックケミストリーが可能な末端構造を持つ立体規則性ポリメタクリル酸メチルの合成および反応<sup>1)</sup>  $\alpha$ -ハロメチルアクリル酸プロパルギルを立体規則性 PMMA リビングアニオンと反応させ、停止末端に thiol-ene クリック反応が可能な C=C 二重結合と、azide-alkyne クリック反応が可能な末端アルキニル基を有する立体規則性ポリマーを合成した。その二元クリック反応 (orthogonal click reaction) を行い、片末端に二種類の官能基を one-pot 導入できることを明らかにした。

(2) アクリル酸エステルのリビングアニオンの停止反応<sup>2)</sup> MMA よりアニオン重合性の高いアクリル酸ブチル (BA) を用いて、 $\alpha$ -ハロメチルアクリル酸エステルによる停止反応を試みた。また、モノマー共存下での停止反応の検討から、停止剤との反応を基準とするモノマー相対反応性を評価したところ、嵩高いアルミニウムルイス酸存在下では、BA は MMA より約 1000 倍高い反応性を示すことが明らかになり、BA と MMA のモノマー選択的リビング共重合の定量的評価が可能になった。

(1) Y. Kohsaka, T. Kurata, K. Yamamoto, S. Ishihara, T. Kitayama, *Polym. Chem.* 2015, **6**, 1078-1087.

(2) Y. Kohsaka, S. Ishihara, T. Kitayama, *Macromol. Chem. Phys.* 2015, **216**, 1534-1539.



## (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、新規機能材料として期待される。本研究では安価な PP から油水を簡便に分離できる PP モノリス（スポンジ）の開発を検討した。

### 「結果と考察」

タンカーの大規模油流出事故は、周りの自然環境への被害や漁業等への二次被害が甚大となることから、その対策と備えが求められている。油吸着材として PP 不織布（マット）が製品化されており、海水に浮かぶ油を吸着により除去する。簡便な方法であるが、油を吸着した不織布の回収など、大規模事故には対応できない。本研究ではこのような課題への対応を目指した PP スポンジを創製した。このスポンジはデカリンと 1-ブタノールの混合溶媒中で PP を加熱して溶解し、これを室温に戻すことで合成した。PP は安価なプラスチックであり、温めて溶かし、冷ます、といった極めて簡単な操作でスポンジが得られることから実用性の高い技術である。SEM 観察よりスポンジ内部はハニカム様の構造であることがわかった。さらにスポンジの大きさ、形も自在に変えることができる。このスポンジは柔軟性が高く、折り曲げても割れない性質を示した。油のモデルとしてトルエンを用い、水とトルエンの混合物からトルエンのみを分離する実験を行った。この混合物に PP スポンジを入れるとトルエンのみが吸着し、それを取り出して絞ることでトルエンのみが回収できた。その際、PP スポンジはほとんど水を吸着しない。また、PP スポンジは強度が高いため、この操作は繰り返し行うことができる。今回、開発した PP スポンジは原料が安価、作製方法が簡便、形状を自在に変えられる、高強度、大型化可能といった特徴に加え、油水から油のみを吸着させて絞ることで油を分離できることから海洋での油流出への対応技術として期待できる。今後、この PP スポンジを組み込んだ油水分離装置が開発できれば、タンカー事故のみならず、油水分離を必要とする多くの産業分野での利用も想定される。

## (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]

X線結晶構造解析は、蛋白質などの生体高分子やウイルスなどの巨大な生体超分子複合体の構造解析のための強力な手法である。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を行い、その成果を利用して、蛋白質や生体超分子複合体の構造生物学研究を進める。さらに、X線自由電子レーザーを利用したウイルスなどの巨大な生体超分子複合体の構造解析を目指したコヒーレントX線回折イメージング法の開発を行う。

### 「結果と考察」

緑膿菌の多剤耐性に関係する薬剤排出複合体を構成する外膜結合蛋白質(OMF)については、これまでOprMのみの構造が報告されていた。H27年度に、ホモログ蛋白質であるOprNおよびOprJの構造解析に成功し、3つの蛋白質の構造比較を行うことで、複合体形成の特異性が表面形状および電荷分布の特徴によるものであることを明らかにした<sup>1</sup>。

イネ萎縮ウイルスの内部で転写複合体を形成するキャッピング酵素P5の結晶構造解析に成功し、同様に解析に成功した各種基質類似体と複合体の構造と合わせて、反応機構の解明を進めている。またRDV粒子の高分解能X線結晶構造解析を目指して、新たに導入した高圧凍結装置の整備と高圧凍結方法の検討を行った。バイロプラズマ主構成成分であるPns12の全長構造を位相差クライオ電子顕微鏡により観察し、N末端領域に柔軟な構造を有し、N末端部位を利用した会合が生じていることと一部が球状の構造をとっていることを明らかにした。N末端部の構造を有する部位の同定と結晶構造解析を目指した結晶化サンプル調製に取り組んだ。外殻蛋白質P8の内殻への結合による階層的な構造形成機構を、P8変異体と電子顕微鏡を用いて明らかにした。

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、SPI(Single Particle Imaging Initiative)に参加し、コヒーレントX線回折イメージング(CDI)実験を行った。RDVの良質なスペックルデータを得ることに成功し、そのデータ処理プログラムの開発を進めた。特に、ウイルス固有の形状に基づく散乱パターン(スペック)を基に大量のデータから解析に適したデータを選別する新しい手法を開発した。現在、その成果を基にして選別されたデータを使って、3次元像の構築を進めている。

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。H27 年度は、新たに導入した縦集光ミラーにより、従来に比べて 10 倍以上の強度の X 線を利用できるようになった。また、結晶自動マウント装置 SPACE の改造を行い、1 回に 128 個の結晶を装置にセットし、連続して 24 時間以上実験が行えるようになった。

「文献」

Crystal structures of OprN and OprJ, outer membrane factors of multidrug tripartite efflux pumps of *Pseudomonas aeruginosa*

Yonehara, R.; Yamashita, E.; Nakagawa, A., *Proteins: Struct. Funct. Bioinform.* **2016**, *in press*.

## (11) 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、宗 正智

### [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線維状の凝集体である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。β2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]

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以下のように進め、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重要な因子であること、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。

(1) リポソームのサイズに依存したアミロイドβのアミロイド線維形成機構を調べた。小さなリポソームが効果的にアミロイド形成を促進することから、生体膜の曲性がもたらす疎水性領域の露出がアミロイド形成の重要な因子であることを示した。

(2) 超音波は過飽和を解消してアミロイド形成を促進すると共に、溶解度以下の条件では、アミロイド線維の溶解を促進することを明らかにした。

(3) アミロイド線維とアモルファス凝集は、結晶とガラスに相当すること、そして両者の形成は、自由エネルギーと速度によって決まることを示した。これより、アミロイド線維とアモルファス凝集の競争的形成機構を提案した。

### [文献]

1. Terakawa, M.S., Yagi, H., Adachi, M., Lee, Y.H. and Goto, Y. Small liposomes accelerate the fibrillation of amyloid β (1-40). **J. Biol. Chem.** 290, 815-826 (2015).
2. Yagi, H., Mizuno, A., So, M., Hirano, M., Adachi, M., Akazawa-Ogawa, Y., Hagihara, Y., Ikenoue, T., Lee, Y.-H., Kawata, Y. and Goto, Y. Ultrasonication-dependent formation and degradation of α-synuclein amyloid fibrils. **Biochim. Biophys. Acta** 1854, 209-217 (2015).
3. Sakurai, K., Nakahata, R., Lee, Y.-H., Kardos, J., Ikegami, T. and Goto, Y. Effects of a reduced disulfide bond on aggregation properties of the human IgG1 CH3 domain. **Biochim. Biophys. Acta** 1854, 1526-1535 (2015).
4. Adachi, M. So, M., Sakurai, K., Kardos, J. and Goto, Y. Supersaturation-limited and unlimited phase transitions compete to produce the pathway complexity in amyloid fibrillation. **J. Biol. Chem.** 290, 18134-18145 (2015).
5. So, M., Ishii, A., Hata, Y., Yagi, H., Naiki, H. and Goto, Y. Supersaturation-limited and unlimited phase spaces compete to produce maximal amyloid fibrillation near the critical micelle concentration of sodium dodecyl sulfate. **Langmuir** 31, 9973-9982 (2015).

## (12) カルシウム依存性レドックス蛋白質の構造解析

(阪大蛋白研) 栗栖源嗣、田中秀明

### [目的]

酸素発生型光合成を行う高等植物や藻類では、時々刻々と変化する光環境に適応するため光アンテナの組成を調整する仕組みが存在する。最近、この光環境適応に重要な役割を担う蛋白質として Calredoxin が同定された。Calredoxin は  $\text{Ca}^{2+}$  を結合するドメインと酸化還元反応を担うドメインとを持ち、 $\text{Ca}^{2+}$  濃度依存的に酸化還元活性を発現する。本研究では、Calredoxin の  $\text{Ca}^{2+}$  依存的な構造変化を捉えて、ユニークな酸化還元活性発現機構を考察することを目的とした。また、X線結晶解析と並行して NMR 分光法の相補的な利用が Calredoxin の構造・機能研究にも有用であると確認することも、併せて研究目的とした。

### [結果と考察]

Calredoxin を組換え体として発現・精製し、単結晶構造解析を行った。構造解析の結果、N末端側のカルモジュリン様ドメインに4つの  $\text{Ca}^{2+}$  が結合し、フレキシブルなループ領域を挟んだC末端側にチオレドキシンドメインがつながる棒状の構造をしていた。両ドメイン間には多数の相互作用が見られたが、そのうち  $\text{Ca}^{2+}$  結合部位とチオレドキシンの活性中心間を直接関係づけるのは2つの水素結合ネットワークであった。変異体 Lys263Ile を用いた活性測定から、この水素結合ネットワークのうち263番のリジンを経由するものが  $\text{Ca}^{2+}$  依存的な酸化還元活性の発現に必須であることを突き止めた(論文査読中)。X線結晶解析と並行して、光合成レドックス代謝ネットワークを構成する蛋白質の構造変化部位を検出するためには、安定同位体標識した試料による  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC スペクトル測定が有用であることを確認した<sup>1)</sup>。

### [文献]

1. R. Mutoh, N. Muraki, K. Shinmura, H. Kubota-Kawai, Y.H. Lee, M.M. Nowaczyk, M. Rögner, T. Hase, T. Ikegami, G. Kurisu, X-ray Structure and Nuclear Magnetic Resonance Analysis of the Interaction Sites of the Ga-Substituted Cyanobacterial Ferredoxin, *Biochemistry* **54**, 6052-6061 (2015)