

(1) ビニル付加・開環同時カチオン共重合系の開発

(阪大院理) 青島 貞人、金澤 有紘

「目的」

当研究室ではこれまで、リビングカチオン重合の開始剤系の設計および様々な機能性を有するポリマーの精密合成を検討してきた。また近年、ビニルモノマーと環状モノマーを用いた新しい共重合系を開発してきた。今年度はおもに、(1) リビング重合とビニル付加・開環共重合の両立を可能とする開始剤設計に向けた検討、(2) 種々のビニルモノマーと環状アセタールの制御カチオン共重合系の設計、(3) ビニル付加カチオン重合と配位開環重合が同時に進行する新しいタイプの共重合系の開発に沿って研究を進めた。

「結果と考察」

- (1) トリフルオロメタンスルホン酸などの超強酸を用いた開始剤系により、アルキルビニルエーテルとイソブチレンオキシドのカチオン共重合において長寿命生長種が生成することを見出した。また、ビニルエーテル、オキセタン、メチルエチルケトンのカチオン三元共重合が、非配位性の対アニオンをもつトリチル塩を用いた開始剤系を設計することで、長寿命生長種の生成を伴って進行した。
- (2) 種々の置換基・環員数の環状アセタールを用いてビニルモノマーとのカチオン共重合を検討した。適切な反応性のモノマーを組み合わせ、ビニルモノマーのリビング重合に基づいて開始剤系を設計することで、制御カチオン共重合が進行する系を見出した (文献1)
- (3) ビニルエーテルのビニル付加カチオン重合と環状エステル (ϵ -カプロラクトン) の配位開環重合が同時に進行する新しいタイプの共重合系を設計した (文献2)。 HfCl_4 と $\text{Hf}(\text{O}i\text{Bu})_4$ を適切な量比で組み合わせて生成した触媒により、独立した生長反応が進行する一方、活性点で一時的に組み合わせることでアルコキシ基交換反応が起こり、グラフト共重合体が生成した。

「文献」

- 1) Shirouchi, T.; Kanazawa, A.; Kanaoka, S; Aoshima, S. *Macromolecules* **2016**, *49*, 7184–7195.
- 2) Highchi, M.; Kanazawa, A.; Aoshima, S. *ACS Macro Lett.* **2017**, *6*, 365–369.

(2) 有機金属錯体を用いた新規重合反応の開発とその機能化

(阪大院理) 鬼塚 清孝、岡村 高明、神林 直哉

「目的」

近年、新しい機能発現を期待した新規高分子材料の創成と、それを可能にする高分子合成法の開発が盛んに行われてきた。一方、高分子合成において有機金属錯体は独自の重合触媒活性を示すことから様々なモノマーを用いた重合を可能とし、配位子や反応条件を工夫することで高分子の主鎖構造を厳密に制御した精密重合へも展開されている。本研究では、有機金属錯体を用いた新規重合反応の開発及び、得られた高分子の機能化を行うことで新規機能性高分子合成方法の確立を目的としている。

「結果と考察」

面不斉シクロペンタジエニル錯体を用いた不斉アリル位アルキル化反応を不斉重合反応に応用することで、新しい不斉重合反応の開発を行った。この重合反応では、炭素求核剤自体がプロキラルとなり、新しく生じる不斉炭素に加えて求核剤上の不斉炭素の立体化学まで制御する必要が生じる。分子内に塩化アリル及び、 β -ジケトン部位を有する二官能性モノマーを設計し、重合反応を行い、高分子を得た。得られた高分子の解析を行ったところ、高ジアステレオ及び、高エナンチオ選択的に反応が進行していることが明らかとなった¹。我々の不斉重合反応で得られる高分子は構成単位に変換可能な末端二重結合を有している。そこで、チオールとオレフィンの結合形成反応であるチオール-エン反応に注目し、様々な側鎖置換基の修飾を行った。いずれの置換基においても副反応を伴わず、定量的に反応が進行し、効率的な側鎖への置換基導入を可能にした²。更に、不斉重合反応によって得られるポリ *N*-アルコキシアミドは、還元反応によりアミド結合へと変換可能であり、非天然型ポリペプチドへと変換できることを見出した。得られた高分子は、溶液中で安定ならせん構造を形成していることを明らかとした。

「文献」

- 1) Kanbayashi, N.; Hosoda, K.; Okamura, T.; Aoshima, S.; Onitsuka, K., *Polym. Chem.* **2016**, *7*, 3691-3699.
- 2) Knabyashi, N.; Miyamoto, S.; Ishido, Y.; Okamura, T.; Onitsuka, K., *Polym. Chem.* **2017**, *8*, 985-994.

(3) 分子認識を介した機能性触媒・ソフトマテリアルの創製

(超分子機能化学研究室) 山口浩靖・高島義徳

【目的】

生体系では、DNAにおける相補的な核酸塩基対形成や酵素による基質認識、抗原-抗体反応など、分子認識が重要な役割を果たしている。本研究では、分子認識を介して特定の分子間で複合体を形成させることにより、外部刺激に応じて変形・機能するような新しい材料や、簡便に機能性分子を単離・精製できるシステムを創製する。

【結果と考察】

可動性架橋を用いた機能性超分子材料の作製

環状多糖のシクロデキストリン(CD)と光刺激応答性分子であるアゾベンゼンを刺激応答素子としてヒドロゲルに組み込んだゲルを作製した。このゲルは高い靱性を示し、さらに光の照射波長に応じて屈曲したり収縮または伸長したりする特性を有するゲルアクチュエータとなることがわかった。ホスト-ゲスト相互作用を介して輪分子がひも状分子上を滑ることにより、迅速な変形が可能になった。

さらに CD とポリマーからなるポリロタキサン構造を可逆的な結合で連結した自己修復材料を開発した。この材料は、溶媒を含んだ状態では、切断・再接触させることで 10 分以内に強度が元の 80%以上まで回復した。また溶媒を含まないバルクの状態では、表面につけた傷が 30 分以内にほぼ 100%まで回復し、極めて速く効率の高い自己修復性を示すことが明らかになった。

モノクローナル抗体を用いた簡便な光学分割法の構築

医薬品の製造などにおいて不斉合成や光学分割は重要な技術である。一方の光学異性体の特異的に認識する結合素子として抗体を作製することにより、特異的な光学分割法や不斉触媒の開発への利用が期待される。本研究では、ビナフトール誘導体の 2 種の光学異性体 (R 体と S 体) に対してそれぞれ特異的に結合するモノクローナル抗体をそれぞれ作製した。R 体の特異的に結合するモノクローナル抗体とビナフトール誘導体のラセミ体 (R 体と S 体の混合物) を混合し、限外濾過膜を介した遠心分離操作を行うだけで、S 体が高い光学純度で得られた。同様に、S 体の特異的に結合するモノクローナル抗体を用いることで R 体が精製できた。簡便で瞬時に光学分割できるシステムを構築することに成功した。

【参考文献】

- (1) Iwaso, K.; Takashima, Y.; Harada, A. *Nat. Chem.* **2016**, *8*, 625-632.
- (2) Nakahata, M.; Mori, S.; Takashima, Y.; Yamaguchi, H.; Harada, A. *Chem* **2016**, *1*, 766-775.
- (3) Adachi, T.; Odaka, T.; Harada, A. Yamaguchi, H. *ChemistrySelect* **2017**, *2*, 2622-2625.

(4) マイクロゲルを利用した新規ゲル材料の開発

(阪大院理)井上正志、浦川 理、片島拓弥

「目的」

高分子ゲルは、高い生体親和性を有し、また網目中に物質を担持・徐放する性質を示すため、医用構造材料への応用が期待されている。ゾル状態で注射し、体内でゲル化させるインジェクタブルハイドロゲルは、低侵襲な治療法として期待されている。しかし、従来のインジェクタブルゲルでは、プレゲル溶液が低分子量の粘性液体であるため、プレゲル溶液の患部からの流出や成形不良などの課題があった。本研究では、プレゲル溶液にマイクロゲル分散系を導入したマイクロゲル架橋システム (MGCS) を提案する。MGCS の持つ塑性的性質を用いれば、プレゲル溶液の液だれや成形性の改善が期待できる。

「結果と考察」

本研究では、MGCS プレゲル溶液のレオロジー制御、MGCS のゲル化後の力学物性および膨潤挙動について、構造パラメーターとの相関について検討した。

プレゲル溶液の流動性を制御するために、マイクロゲル分散系と線状高分子の混合系のレオロジーについて検討した。その結果、線状高分子の分子量が増加するとマイクロゲルとの間からみ合いが生じ、マイクロゲル分散系が持つ塑性を制御できることが判明した¹。

次に、アガロースマイクロゲル分散溶液とポリビニルアルコールの混合系について、グルタルアルデヒドを用いてポリビニルアルコールを架橋させた。この試料を用いて、ゲル化過程のレオロジー特性の評価を行った。期待通りにゲル化以前から、有限の弾性率を示すこと、また4000秒程度でゲル化させることができた。また、得られたゲルの弾性率は、マイクロゲルが本来持つ弾性率より低くなった。この原因として、今回の実験では、ゲルを機械的に破砕した作成したマイクロゲルを使用したか、この破砕過程でダメージを受けている可能性が考えられた。

このほか、マイクロゲル中での、高分子鎖のダイナミクスを明らかにするために、マイクロゲル分散溶液と一時網目系との混合系についても検討した。

「文献」

- 1) 山崎香奈, 片島拓弥, 井上正志, 中村綾野, 那須昭夫, *高分子論文集*, 2016, 73(6), 532-538

(5) 精密高分子を利用した高分子性の理解と高性能高分子の創製

(阪大院理) 橋爪 章仁

「目的」

われわれは、高分子が重要な役割を担っている理由を詳細に解明することを目的とし、独自に設計、合成した精密高分子を用いて高分子性の理解を目指している。また、高分子性を利用した高性能高分子の開発も目指している。最近、われわれは 3-アジド-1-プロピン誘導体の銅(I)触媒アジド・アルキン環化付加 (CuAAC) 重合を用いて、高分子主鎖中に高密度のトリアゾール環を有する新規高分子を開発してきた。平成 28 年度は、3-アジド-1-プロピン誘導体の CuAAC 重合によるポリエチレングリコール (PEG) とのブロック共重合体の合成を行った。さらに、ホルムアルデヒドからの単糖合成反応であるホルモース反応におけるボロン酸化合物の効果についても調査した。

「結果と考察」

プロパルギル基を有する PEG の存在下、3-アジド-1-プロピンの CuAAC 重合により、異なる重合度を有するブロック共重合体を合成した。得られたブロック共重合体は極性有機溶媒に可溶であった。興味深いことに得られたブロック共重合体は、*N,N*-ジメチルホルムアミド中、蛍光を発した。貧溶媒を加えると蛍光強度の減衰が観測され、分子分散状態からの蛍光であると考えられる。

ホルモース反応における選択的な生成物形成を目指し、低分子ボロン酸のフェニルボロン酸ナトリウム (SPB)、あるいは高分子ボロン酸であるビニルフェニルボロン酸ナトリウムとスチレンスルホン酸ナトリウムの共重合体 (VPB/SS) の存在下、水酸化カルシウムを塩基触媒として用い、ホルモース反応を行なった。高速液体クロマトグラフィー、NMR、質量分析による調査により、SPB の存在下では炭素数の少ない糖が得られるのに対し、VPB/SS の存在下では炭素数の多い糖アルコールが得られることが明らかとなった。これは、ボロン酸エステル安定性が低分子と高分子で異なることが原因であると考えられる。

「文献」

- 1) Imai, T.; Michitaka, T.; Hashidzume, A. *Beilstein J. Org. Chem.* **2016**, *12*, 2668-2672.
- 2) Masaoka, M.; Michitaka, T.; Hashidzume, A. *Beilstein J. Org. Chem.* **2016**, *12*, 2663-2667.

(6) III型蛋白質分泌における輸送順序決定機構

(阪大院理) 今田勝巳、金子文俊、川口辰也

【目的】

III型蛋白質分泌装置は、細菌が自身の細胞内で合成した蛋白質を細胞外へ分泌する際に働く 200 以上のサブユニットから成る超分子複合体で、細菌のべん毛形成やヒトや動物に感染する際にはたらく。基質蛋白質を決まった順序で細胞外へ輸送する機能を持つが、基質分子の認識と秩序だった輸送の機構は不明である。そこで、外部条件を操作可能なIII型輸送測定系を用い、輸送順序を決めるしくみの解明を行う。また、輸送系を構成する蛋白質の構造解析を行い、選択的輸送の分子機構の解明を目指す。ことを目的とした。

【結果と考察】

2015 年度までに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確立した。今年度は、この系を用いてべん毛フックを構成する蛋白質 FlgE とフック形成に必須の蛋白質 FlgD の輸送を調べた。その結果、FlgD と FlgE をベシクル外に添加するとベシクル内に生細胞と同様のフックが形成された。また、FlgE の輸送量は FlgD がいないと少ないが FlgD が存在すると飛躍的に上昇した。このことから、FlgD と FlgE の間に輸送の階層性があることが示唆された。

また、輸送を制御すると考えられている輸送シャペロン蛋白質のひとつである FlgN の 2.3Å 分解能での構造解析に成功した。構造に基づき変異体を作製し、親和性解析、超遠心分析、円二色性スペクトル解析から、FlgN 中の alpha ヘリックス同士が互いに大きく位置を変えるダイナミックな構造変化を起こすことで、結合する蛋白質に対する親和性を変え、輸送基質を輸送装置に渡す機構を明らかにした¹。

1. Rearrangements of α -helical structures of FlgN chaperone control the binding affinity for its cognate substrates during flagellar type III export.

[#]Kinoshita M, [#]Nakanishi Y, Furukawa Y, Namba K, ^{*}Imada K, ^{*}Minamino T.

Mol. Microbiol. **2016**, 101: 656-670.

(7) ポリイオンコンプレックスミセルの構造特性化

(阪大院理) 佐藤尚弘、寺尾 憲

「目的」

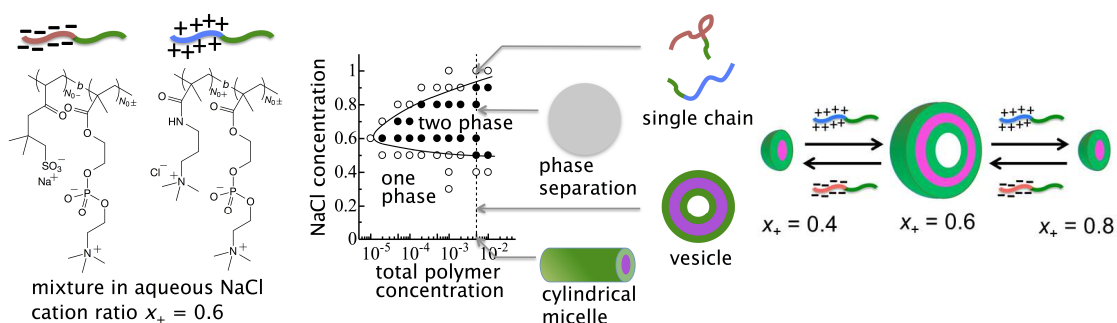
水溶液中で形成する高分子ミセルを、ナノキャリアやナノリアクタなどに利用しようという試みが盛んに行われている。その中で、水溶液中でポリイオンコンプレックスを形成するポリカチオンとポリアニオンを片方のブロック鎖とし、中性で水溶性の高分子鎖をもう片方のブロック鎖とする2種類のブロック共重合体混合物が形成するミセルは、現在 DDS に最も利用されている。本研究では、水溶液の添加塩濃度およびブロック共重合体の混合比を変化させて、ポリイオンコンプレックスミセルの構造を制御することを目的とした。

「結果と考察」

下に示すカチオン性-中性 (両性) ブロック共重合体とアニオン性-中性 (両性) ブロック共重合体の混合物が希薄水溶液中で形成するポリイオンコンプレックスミセルの構造を、主として小角 X 線散乱を用いて調べた。まず、カチオン基の全イオン性基に対するモル分率 x_+ (混合比) を 0.6 に固定し、添加塩である NaCl の濃度を 2M から 0M まで変化させると、下の相図に示すように分子分散状態から相分離状態を経て、ベシクル、円筒状ミセルとモルフォロジー変化を起こす。相分離-ミセル転移は、ブロック鎖の相互作用パラメータの違い (両親媒性) の変化により理論的に説明でき、ベシクルから円筒状ミセルへの転移は、ミセルの充填パラメータの概念を用いて説明できた。

また、添加塩濃度を 0.1M に固定して、混合比を変化させると、 $x_+ = 0.6$ でベシクルを形成していたのが、 $x_+ = 0.4$ あるいは 0.8 では小さい球状ミセルとなり、その変化は可逆的であった。この可逆的モルフォロジー転移は、ミセルの静電相互作用エネルギーにより説明できた。

以上のように、ミセルの形成条件を変えることにより、ポリイオンコンプレックスミセルのモルフォロジー制御が可能であることが明らかとなった。



(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・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 (T1) 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、停止剤共存下でのリビング重合 (アトロ-pos重合) を開発し、以下の成果を得た。

(1) メタクリル酸メチルのアトロ-pos重合 メタクリル酸メチル (MMA) の Li-*i*PrIB / EtAl(ODBP)₂ 開始剤によるシンジオタクチック特異性リビングアニオン重合を、 β 位に立体障害となるメチル基を導入した停止剤、 α -ハロメチルクロトン酸エステル (T2) を用いたアトロ-pos重合に成功した。

(2) アクリル酸エステルのアトロ-pos重合 Li-*i*PrIB / EtAl(ODBP)₂ 開始剤によるアクリル酸ブチル (BA) のリビング重合は、T1 により効率よく停止できる³が、BA は T1 より高い反応性を示すことから、アトロ-pos重合の適用を試みた。BA と T1 を同時に加えて、トルエン中、-60 °C で 2 時間反応させ、さらに 0 °C で 1 時間反応を行った (Run 5)。分子量分布はやや広い ($M_n = 4400, M_w/M_n = 1.49$) もの、100%のモノマー転化率と高い末端導入率 $F = 93\%$ が達成された。また、より穏和な求核種であるメタクリル酸テトラブチルアンモニウムを開始剤に用い、同様の条件下でアクリル酸エチル (EA) のアトロ-pos重合を試みたところ、狭い分子量分布 ($M_n = 9600, M_w/M_n = 1.06$) と高い末端導入率 ($F = 90\%$) でポリマーが得られた。

(3) モノマー選択的アトロ-pos重合による末端機能化ブロック共重合体の one-pot 合成 BA と MMA の共重合を T2 存在下で行うと、狭い分子量分布 ($M_n = 9500, M_w/M_n = 1.25$) と比較的高い末端導入率 ($F = 84\%$) でブロック共重合体を得られ、アトロ-pos重合によるモノマー配列、分子量、立体規則性、末端官能基の四元同時制御が達成された。

(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、麻生隆彬、辻本 敬

「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。本研究ではセルロースのモノリスの作製と応用を検討した。

「結果と考察」

セルロースは天然に最も多く存在する高分子であり、耐薬品性、物理的強度、生体適合性に優れるため、分離担体の基材としてよく用いられる。またセルロースは水酸基を豊富に有しており、タンパク質の非特異吸着抑制が期待されることからタンパク質分離担体として注目されている。我々は溶解性に優れる酢酸セルロース（CA）に着目して熱誘起相分離（TIPS）法を用いることによりCAモノリスを作製し、これを加水分解することでセルロースモノリスを得る方法を開発した。さらにピペットチップ型に成形したセルロースモノリスにカルボキシル基や第3級アミノ基を導入することでタンパク質の吸着および脱着挙動を評価し、イオン交換前処理カラムとしての応用を検討した。

CAをDMFに加熱して溶解させ、DMF/1-ヘキサノールの体積比が2:3となるように1-ヘキサノールを添加した。ピペットチップにCA溶液を吸い取り、20°Cで静置することにより相分離を進行させ、ピペットチップ型CAモノリスを得た。次にこれを加水分解することでセルロースモノリスに変換した。セルロースモノリスにクエン酸を加えて加熱することで、カルボキシル基を導入した（CA-COOH）。

CA-COOHモノリスを用いて、タンパク質の吸着および溶出を行った。CA-COOHモノリスにリゾチーム（LYS）溶液を通液して吸着させ、リン酸緩衝液による洗浄後、食塩水を用いてLYSを溶出させた。CA-COOHモノリスにおけるLYSの吸着容量はクエン酸の仕込み比に依存して増加しており、溶出においては99%の回収率を示した。CA-COOHモノリスにおいて吸着したLYSがほぼ全て溶出することを確認した。またCA-COOHモノリスにLYSの吸脱着操作を繰り返し行うことで再利用性を検討した。5回繰り返し使用した結果、LYSの吸着量および溶出量に大きな変化はなく、性能を維持した。

(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、東浦彰史

[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てウイルス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」

イネ萎縮ウイルスのキャプシドは二重殻構造を有しており、内殻が120個のP3蛋白質から、外殻が780個のP8蛋白質からできている。2種類900個の蛋白質から、きちんとしたキャプシド構造を形成するためには階層的な構造構築が必要であると考えられる。P8蛋白質のC末端にGFPを融合させたものを大腸菌で発現させたところ、キャプシド外殻に見られる三量体構造を形成した。さらに外殻を外して内殻のみにした粒子に対して、P8蛋白質およびP8-GFP融合蛋白質をそれぞれ混ぜ合わせ、クライオ電子顕微鏡および位相差電子顕微鏡で観察したところ、P8蛋白質を混ぜたものは二重殻構造を形成するのに対して、P8-GFP融合蛋白質を混ぜたものは、内殻の正二十面体対称の三回軸上に特異的に結合することがわかった。このことから、イネ萎縮ウイルスの外殻構造は、特異的な位置の結合を基にそれを足場として進んでいくという、階層的な構造構築が行われていると考えられる。

また、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) に参加して、コヒーレントX線回折イメージング(CDI)実験を行い、RDVおよびクロレラウイルスPBCV-1の良質なスペックルデータを得ることに成功した。得られた膨大な量のデータから構造解析に利用できる解析に適したデータの選別を行った。

SPRING-8の蛋白研ビームライン 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。H28年度は、従来からの4象限スリットを用いたビーム成形システムに変えて、新たにピンホールによるビーム成形システムを導入した。これにより結晶の形状に合わせた最適のビーム形状を作り出すことができようになり、寄生散乱やバックグラウンドを低減することでデータ精度の向上を行うことができた。

「文献」

Munke, A. ; Andreasson, J. ; Aquila, A. ; Awel, S. ; Ayyer, K. ; Barty, A. ; Bean, R. J. ; Berntsen, P. ; Bielecki, J. ; Boutet, S. ; Bucher, M. ; Chapman, H. N. ; Daurer, B. J. ; DeMirici, H. ; Elser, V. ; Fromme, P. ; Hajdu, J. ; Hantke, M. F. ; Akifumi Higashiura; Hogue, B. G. ; Hosseinizadeh, A. ; Kim, Y. ; Kirian, R. A. ; Reddy, H. K. N. ; Lan, T.-Y. ; Larsson, D. S. D. ; Liu, H. ; Loh, N. D. ; Maia, F. R. N. C. ; Mancuso, A. P. ; Mühlig, K. ; Nakagawa, A. ; Nam, D. ; Nelson, G. ; Nettelblad, C. ; Okamoto, K. ; Ourmazd, A. ; Rose, M. ; Schot, G. v. d. ; Schwander, P. ; Seibert, M. M. ; Sellberg, J. A. ; Sierra, R. G. ; Song, C. ; Svenda, M. ; Timneanu, N. ; Vartanyants, I. A. ; Westphal, D. ; Wiedorn, M. O. ; Williams, G. J. ; Xavier, P. L. ; Yoon, C. H. ; Zook, J., Coherent diffraction of single Rice Dwarf virus particles using hard X-rays at the Linac Coherent Light Source. *Sci Data* 2016, 3, 160064.

Higashiura, A. ; Yamashita, E. ; Yoshimura, M. ; Hasegawa, K. ; Furukawa, Y. ; Kumasaka, T. ; Ueno, G. ; Yamamoto, M. ; Tsukihara, T. ; Nakagawa, A., SPring-8 BL44XU, Beamline Designed for Structure Analysis of Large Biological Macromolecular Assemblies. *AIP Conf. Proc.* 2016, 1741, 0030028.

(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、熱量計、蛍光顕微鏡、NMR、超音波照射などの物理化学的手法で研究する。アミロイド線維や不定形凝集を区別して研究を進め、蛋白質凝集の原理的理解を深める。

[結果と考察]

(1) 超音波は過飽和を解消してアミロイド線維を形成する有効な方法である。一方で、アミロイド線維に強力な超音波を照射することにより、アミロイド線維に特異的に結合するチオフラビンTの蛍光強度が減少する。 $\beta 2$ ミクログロブリンとインスリンをモデル蛋白質として、強力な超音波照射によってできた分子種の構造や物性を、CD、FTIRによって詳細に調べた。その結果、強力な超音波照射によって、線維の二次構造は変化していないが、三次構造が変化していることが示された。

(2) ヘパリンは強く負に帯電したグリコサミノグリカンであり、アミロイド線維の形成を促進する添加物として知られている。 $\beta 2$ ミクログロブリンに対するヘパリンの効果をpH 2において調べた。ヘパリンは低濃度でアミロイド線維形成を促進したが、高濃度のヘパリンは、アモルファス凝集が形成された。ヘパリンの作用が塩によることを示唆すると共に、アミロイド線維とアモルファス凝集の競争的形成が、ヘパリンでも起きることが明らかとなった。

(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。さらに、アミロイド線維とアモルファス凝集の競争的形成機構、溶解度と過飽和の重要性を提案した。

[文献]

1. Masatomo So, Yasuko Hata, Hironobu Naiki, and Yuji Goto. Heparin-induced amyloid fibrillation of β_2 -microglobulin explained by solubility and a supersaturation-dependent conformational phase diagram. **Protein Sci.**, accepted for publication.
2. Damien Hall, R. Zhao, Masatomo So, Masayuki Adachi, G. Rivas, John A. Carver, and Yuji Goto. Recognizing and analyzing variability in amyloid formation kinetics: Simulation and statistical methods. **Anal. Biochem.** 510, 56-71 (2016).
3. Sayaka Noda, Masatomo So, Masayuki Adachi, Jozsef Kardos, Yoko Akazawa-Ogawa, Yoshihisa Hagihara, and Yuji Goto. "Thioflavin T-silent denaturation intermediates support the main-chain dominated architecture of amyloid fibrils". **Biochemistry**, 55, 3937-3948 (2016)
4. Masatomo So, Damien Hall, and Yuji Goto. Revisiting supersaturation as a factor determining amyloid fibrillation. **Curr. Opin. Struct. Biol.** 36, 32-39, (2016).

(12) ダイニンストーク領域の微小管結合に伴う構造変化

(阪大蛋白研) 栗栖源嗣、田中秀明

[目的]

ダイニンはATP加水分解による化学エネルギーを力学的運動へと変換する事で、細胞内の微小管上をマイナス端方向へと移動する分子モーターの1つである。重鎖・中間鎖・軽鎖から構成される1,000 kDaを超える生体超分子複合体をとっている。鞭毛運動や繊毛運動、さらに細胞内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、微小管と結合・解離するダイニンモーターの構造領域に着目し、特に微小管結合領域の結晶構造と分光法による構造解析で、微小管結合に伴う構造変化を考察することを研究目的とした。

[結果と考察]

マウスの細胞質ダイニンと緑藻クラミドモナスの軸糸ダイニンストーク領域を組換え体として調製し、構造解析を行った。人工的に2種類のS-S結合を導入することによって、それぞれの微小管親和性を高・低2種類に固定することに成功した。合計4種類のサンプルを用いて、非還元SDS-PAGE解析、CD測定による二次構造解析、X線小角散乱(SAXS)測定による溶液構造解析、さらに ^2H - ^{15}N あるいは ^{13}C にラベルした組換え体を用いたNMR測定を行った。微小管親和性が高い状態に固定した試料では、2種類のダイニン双方で二次構造含量の低下が観測され、SAXS測定とNMR測定ではストーク領域の2量体化が示唆された。これは細胞質ダイニンモータードメインのADP結合型結晶構造中に存在するストークの二量体構造と整合しており、微小管親和性が低下する際にストーク領域を介して単量体化することが示唆された。このことはストーク領域を介したダイニン分子活性化の可能性を示しており、これまでになく新しい活性化の機序を提案することが出来た¹⁾。

[文献]

1. Y. Nishikawa, M. Inatomi, H. Iwasaki, G. Kurisu, Structural Change in the Dynein Stalk Region Associated with Two Different Affinities for the Microtubule, *J. Mol. Biol.*, **428**, 1886-1896 (2016)