

(1) 制御カチオン重合による精密な構造を有するポリマーの合成

(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開始剤系を開拓し、それを用いて様々な機能性を有するポリマーを合成してきた。29年度は、従来のカチオン重合では困難であった、高い立体特異性のリビング重合、シークエンス制御、金属・無機ナノ微粒子の新規配列などを検討した。たとえば、(1) *N*-ビニルカルバゾールの重合において、新しい開始剤を開拓し、分子量分布が狭くかつ高い立体規則性を有するポリマーの合成を行った。また、(2) セグメント長や枝間隔の明確なポリ乳酸グラフトポリマーの合成、および (3) 精密合成された高分子テンプレートによる無機・金属ナノ微粒子の配列制御等を検討した。

「結果と考察」

- (1) *N*-ビニルカルバゾールをモノマーとし、対アニオンが活性末端ユニットと相互作用しやすいカチオン重合開始剤系を設計した。その結果、 $\text{CF}_3\text{SO}_3\text{H}/\text{R}_4\text{NCl}$ 開始剤と ZnCl_2 を組み合わせ、さらに添加塩でルイス酸の状態を制御することにより、従来にはない高立体特異的なリビング重合系を見いだした。カチオン重合で過去最高の $mm \sim 94\%$ のポリマーが得られた。(文献1)
- (2) 環状アセタールの選択的開環反応を開始反応に用いたビニルエーテルのリビングカチオン重合を発展させることにより、水酸基を設計通りの位置に緻密に導入することが可能になった。さらにそれを用いて、セグメント間隔や側鎖長が制御されたグラフトポリ乳酸の合成を行った。(文献2)
- (3) これまで我々は、温度応答性ジブロックコポリマーをテンプレートに用いることでシリカナノ粒子をリング状に配列できることを見いだしてきた。29年度は、そのシークエンスや鎖長の影響を詳細に検討するとともに、カルボキシ基末端 PEG 鎖で化学修飾された金ナノ粒子の配列制御を試みた。金ナノ粒子がリング状に配列可能なことを初めて見いだした。

「文献」

1. Watanabe, H.; Kanazawa, A.; Aoshima, S. *ACS Macro Lett.* **2017**, *6*, 463–467.
2. Yokoyama, N.; Kanazawa, A.; Kanaoka, S.; Aoshima, S. *Macromolecules* **2018**, *51*, 884–894.

(2) 金属蛋白質活性部位の特異な疎水的環境に関する研究

(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。疎水環境のモデル化には嵩高い配位子が有効であり、合成戦略的にアリール基やアルキル基が用いられるが、これらは電子供与基として作用し金属中心の電子密度を高くし過ぎてしまうという欠点を持つ。私たちは、水素結合を組み合わせる事で、電子密度を高める事無く嵩高さの導入を可能にした。一方、モリブデン酵素は低濃度でも基質を効率良く捉える事が知られており、酵素-基質複合体(ES)の安定化により酵素活性の高さを達成していると言える。本研究では、基質や配位子の解離が抑制される疎水的環境を再現したモデルを用い、水素結合が反応性へ与える影響を明らかにする事を目的とする。

「結果と考察」

非常に嵩高い疎水性置換基 $\text{Ar}_3\text{C}-$ ($\text{Ar} = 4\text{-}t\text{-BuC}_6\text{H}_4\text{-}$)と2つの $\text{NH}\cdots\text{S}$ 水素結合を有するチオラート Ar^1S^- を合成し、ヨウ素で酸化したところ、通常生じるはずのジスルフィド($\text{Ar}^1\text{S-SAr}^1$)は生じず、 $[\text{Ar}^1\text{S-I}\cdots\text{I}]^-$ が得られた。これは、チオラートをヨウ素が求電子攻撃する時の反応中間体であり、 Γ の解離が水素結合により安定化されている事が、結晶構造解析、理論計算などから明らかになった¹。

これまでモリブドプテリン(MPT)を2つ持つモリブデン・タングステン酵素モデルを系統的に研究してきたが²、新たにMPTを1つもつ亜硫酸オキシダーゼ(SO)モデルを合成した。SOはMo(VI/IV)の酸化状態を用い、亜硫酸を硫酸へと触媒的に酸化する。 $\text{Ar}_3\text{C}-$ と $\text{NH}\cdots\text{S}$ 水素結合を併せ持つトルエンに可溶なSOモデルを合成し、非極性溶媒中、 PEt_3 を基質として用いたところ、生成物として OPEt_3 が生じ、モリブデン中心は6価から4価へと還元された。1当量の PEt_3 を加えた場合でも OPEt_3 は速やかに系中の PEt_3 と速やかに置換されてしまい、中間体の単離には至らなかったが、モデル錯体の構造解析により、水素結合がESの安定に寄与している事が示唆された。

「文献」

- 1) Okamura, T.; Kaga, T.; Yamashita, S.; Furuya, R.; Onitsuka, K. *J. Org. Chem.* **2017**, *82*, 2187-2192.
- 2) Okamura, T.; Omi, Y.; Onitsuka, K. *Inorg. Chim. Acta* **2017**, *467*, 379-384.

(3) 分子認識に基づく機能性超分子材料・システムの創製

(超分子機能化学研究室) 山口浩靖・高島義徳

【目的】

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たり、材料構成ユニットをホスト-ゲスト相互作用等の可逆的な結合を介して自己組織化させたりすることで、基質選択的な応答をする、あるいは外部刺激に応じて変形・修復したり、化学結合の可視化ができるような超分子材料を創製する。

【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) と疎水性のゲスト分子からなる包接錯体をゲルの架橋点とすることで、自己修復性や高靱性を有する超分子材料を作製した。本研究では、高分子側鎖に様々なゲスト分子を導入し、CD とゲスト分子の会合定数の違いが材料の力学物性へ及ぼす影響について検討した (添付論文)。その結果、ゲスト分子の分子構造と超分子ゲルの力学特性に相関が見られた。ゲストの分子鎖が長い程、あるいはポリマー主鎖から CD までの距離が長い程、高い破断応力と歪を示した。これは CD 部位の可動性が増大したためであると考えられる。

外部刺激により色調変化する超分子材料の創製

β CD のゲスト分子としてフェノールフタレイン (PP) を選択した。塩基性水溶液中において PP は赤色だが、 β CD に包接されることで無色透明になる。この性質を利用して外部刺激によって色調変化を示す材料の作製を行った。本材料に競争分子 (PP 以外の別のゲスト分子) や熱を与えたところ、この材料は無色透明から赤色に変化した。この色の変化は β CD と PP の包接錯体が解離したことによるものだと考えられる。力学刺激を可視化できるため、今後、幅広い分野への応用が期待される。

モノクローナル抗体のキラル認識を可視化するシステム構築

先に我々はビナフチル誘導体 (BN) の光学異性体に結合するモノクローナル抗体を単離することに成功している。一方の光学異性体 BN(S) をポリ N-イソプロピルアクリルアミドの中央部にリンカーを介して導入した pNIPAM-BN(S) と抗 BN(S) 抗体を混合すると、その溶液の下限臨界溶液温度 (LCST) は pNIPAM-BN(S) のみの系よりも高くなった。一方、BN(R) を導入したポリマー pNIPAM-BN(R) に抗 BN(S) 抗体を添加してもその LCST は変わらなかった。pNIPAM 中の BN にモノクローナル抗体が結合することにより pNIPAM の凝集挙動が変化することがわかった。抗 BN(S) 抗体存在下、pNIPAM-BN(S) の水溶液に BN(R) そのものを添加しても水溶液の状態に変化は見られないが、BN(S) を混合すると再び溶液が白濁した。抗体に結合する相手が pNIPAM 中の BN(S) から遊離の BN(S) に組み変わることで再び元の pNIPAM-BN(S) の凝集が起こったと考えられる。

(4) 高分子化イオン液体を利用した新規規則材料の開発

(阪大院理) 井上正志、浦川 理、片島拓弥

「目的」

高分子化イオン液体は、イオン液体構造を持つモノマーを重合したもので、イオン液体の持つ高い電気伝導性と、高分子が持つ熱可塑性、成形性を合わせ持つ材料である¹⁾⁻³⁾。最近の研究から、ポリカチオン型の高分子化イオン液体に大きなアニオンを組み合わせると、ガラス転移温度以上の温度域においても弾性率が 10^8 Pa 程度の安定な秩序構造を示すことが示唆された。本研究では、規則構造を解明するために、アニオンサイズと力学物性および誘電特性、さらに構造パラメーターとの相関について明らかにする。

「結果と考察」

Poly(1-butyl-3-vinylimidazolium) (PC4) を主鎖とする高分子化イオン液体を合成し、TFSI をはじめとする種々のサイズを持つ対アニオンを導入し、対アニオンサイズが高分子ダイナミクス、イオン電動⁴⁾におよぼす効果を明らかにした。対アニオンのイオン容積が側鎖カチオンのイオン容積を超えると、複素弾性率は、ガラス転移領域においてわずかに 1 桁しか緩和せず、高分子鎖のセグメント運動が高度に制限されることがわかった。誘電緩和分光法、IR 分光法、および小・広角 X 線散乱の結果から、粘弾性応答の劇的な変化は、対アニオンのイオン体積の増加により鎖の剛性が増加するためであることがわかった。さらに、鎖の剛性の増加によって、秩序的なメソ相が出現することが明らかになった。この相の出現は加工履歴の影響を強く受け、メソ相への転移は熱プレス成形による外力により誘起されること、さらに転移温度は熱分解温度よりも高いことがわかった⁵⁾。

「文献」

- 1) Nakamura K, Saiwaki T, Fukao K, Inoue T *Macromolecules* **44**, 7719 (2011)
- 2) Nakamura K, Fukao K, Inoue T *Macromolecules* **45**, 3850 (2012)
- 3) Inoue T, Matsumoto A, Nakamura K *Macromolecules* **46**, 6104 (2013)
- 4) Iacob C, Matsumoto A, Brennan M, Liu H, Paddison S., Urakawa O, Inoue T, and Runt J. *Acs Macro Lett*, 2017, **6**, 941-946
- 5) Matsumoto A, Iacob C, Urakawa O, Runt J. and Inoue T, *Macromolecules*, 2018, in press

(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。平成29年度は、3-アジド-1-プロピン (AP) 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 (EG_m-b-AP_n) の合成を継続して行い、その水溶液中での温度応答性会合挙動について調査した。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ポリマーの効果についてもさらに調査した。具体的には、ポリマー骨格に結合したボロン酸残基の正味の効果を知るため、ホルモース反応に対する影響のない非イオン性ポリマー骨格を有するボロン酸ポリマーによるホルモース反応を制御について調査した。

「結果と考察」

プロパルギル基を有する PEG の存在下、AP の CuAAC 重合により、AP ブロック鎖長の長いブロック共重合体 EG_m-b-AP_n を合成した。 EG_m-b-AP_n の水溶液中での会合挙動を透過率測定、光散乱測定により調査した。 EG_m-b-AP_n は水溶液中低温ではミセルを形成し、高温になるとミセルがさらに会合し、下限臨界溶液温度型相分離を起こすことがわかった。

非イオン性の *N,N*-ジメチルアクリルアミド (DMA) と 4-ビニルフェニルボロン酸 (VPA) との共重合体を調製し、DMA/VPA 共重合体の存在下、ホルモース反応を行なった。ボロン酸化合物存在下でのホルモース反応混合物中でボロン酸エステルが形成していることを赤外吸収スペクトルによって実証した。DMA/VPA 共重合体の存在下、主生成物は炭素数 6 および 7 の分岐型の糖あるいは糖アルコールであることが明らかとなった

「文献」

1) Michitaka, T.; Imai, T.; Hashidzume, A. *Polymers* **2017**, *9*, 549.

(6) べん毛モーターの回転子および固定子の構造解析

(阪大院理) 今田勝巳、金子文俊、川口辰也

【目的】

細菌べん毛モーターは、細胞内外のプロトンまたはナトリウムイオンの濃度差を利用して回転する。モーターは回転子と固定子で構成され、固定子中をイオンが流れると固定子と回転子が相互作用し、回転力が生じると考えられている。このとき、固定子は回転力に負けないようにペプチドグリカン層にしっかりと固定される必要がある。個々の固定子ユニットは回転中のモーターに組み込まれたり外れたりして交換され、組み込み・固定・イオン透過は連動している。しかし、そのしくみは大きな謎である。そこで、固定子固定に働く蛋白質と、回転子の主要部を構成する蛋白質の構造解析を行い、この問題の解明に取り組んだ。

【結果と考察】

サルモネラ属菌の固定子蛋白質 MotB の変異体の一つが、モーターへ組み込まれ易く、モーターから外れてもイオン透過活性を保ち、ペプチドグリカン結合能を持つことを見出した。この変異体のペリプラズムフラグメントの構造解析を行い、N 末側のヘリックスが構造変化していることを見出した。そこで、ジスルフィド架橋を導入して機能解析を行ったところ、架橋でモーター機能が失われ、還元剤添加で機能が回復し、還元剤を除くと再び機能を喪失した。このことから、N 末側のヘリックスの構造転移によりペプチドグリカン結合部の露出遮蔽とイオン透過経路の開閉が起こることが明らかになり、固定子の組み込み・イオン透過の活性化・ペプチドグリカン層への固定がこのヘリックスの構造変化で連携して起こることがわかった¹。また、グラム陽性菌の固定子蛋白質 MotS のペリプラズムフラグメントの構造解析にも成功し、MotB とよく似た構造を持つことが明らかになった。さらに、回転子蛋白質 FliF の中心に近いコア領域フラグメントの構造解析にも成功した。

¹ The helix rearrangement in the periplasmic domain of the flagellar stator B subunit activates peptidoglycan binding and ion influx. Kojima S, Takao M, Almira G, Kawahara I, Sakuma M, Homma M, Kojima C, Imda K. *Structure*. **2018**, 26: 590-598.

(7) タンパク質と界面活性剤との間の複合体形成

(阪大院理) 佐藤尚弘、寺尾 憲

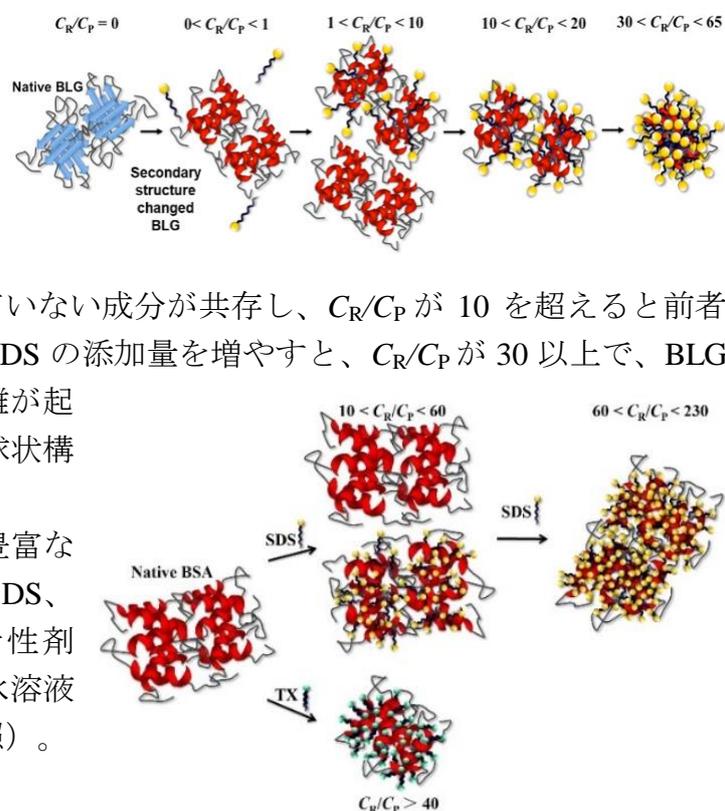
「目的」

球状タンパク質と界面活性剤との相互作用は、細胞膜中の膜たんぱく質の研究や、タンパク質の分子量測定に用いられるドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法 (SDS-PAGE) の基礎として、タンパク質化学において重要であるが、その水溶液中での相互作用の仕方の詳細および相互作用に伴う球状タンパク質の構造変化については、まだ十分には理解されていない。これは、水溶液中に複数成分が解離-会合平衡をしながら共存し、その組成が溶液濃度に強く依存するため、構造研究を行っていくためである。本研究では、高分子溶液学の手法を駆使して、水溶液中でのタンパク質-界面活性剤複合体の構造特性化を試みた。

「結果と考察」

牛乳の主成分で β シート構造が豊富な球状タンパク質 β -ラクトグロブリン (BLG) とアニオン性界面活性剤ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) を水溶液中で混合し、静的・動的・電気泳動光散乱、小角X線散乱、キャピラリー電気泳動、円二色性の各測定を同じ濃度範囲で行った。SDS の添加量の増やしていくと、まず BLG の二次構造が β シートから α らせんに転移するが (SDS と BLG のモル濃度比 C_R/C_P が 1 未満)、SDS の吸着量は非常に少ない。その後、BLG に SDS が吸着した成分とほとんど吸着していない成分が共存し、 C_R/C_P が 10 を超えると前者の成分のみとなる。さらに SDS の添加量を増やすと、 C_R/C_P が 30 以上で、BLG の二量体から単量体での解離が起こるが、BLG の三次構造は球状構造を保持している。

同様の実験を、 α らせんが豊富な牛血清アルブミン (BSA) と SDS、および BSA と中性界面活性剤 tritonX-100 (TX) の混合物水溶液についても行った (右図参照)。



(8) ナノセルロースを基盤とする機能材料の開発

(阪大院工) 宇山 浩、麻生隆彬、辻本 敬

「目的」

バクテリアセルロース (BC) は酢酸菌が産生するセルロースであり、一般的にはデザートに使われるナタデココとして知られている。BC は直径数十 nm のナノファイバーで構成されるハイドロゲルであり、高純度、高結晶性である。また、BC は緻密なネットワーク構造を有し、水含有量が 99 w% までに至るハイドロゲルであるが、セルロースの強い水素結合のため、いったん乾燥させると水中で再膨潤しない。本研究では BC の階層構造に着目し、その層間に高吸水性材料である架橋ポリアクリル酸ナトリウム塩 (PAA Na) を複合化することで、一次元的に膨潤-収縮する複合シートの開発を目指した。

「結果と考察」

BC ハイドロゲルを少量の N,N'-メチレンビスアクリルアミドを含むアクリル酸ナトリウム/アクリル酸 (1:3 mol/mol) 水溶液に 15 時間浸漬し、その後、70°C、6 時間で加熱することで BC/PAA Na 複合ゲルを作製した。複合シートの走査型電子顕微鏡 (SEM) 観察により、得られた複合シートは BC 由来の階層構造を保持していることがわかった。ゲルの圧縮試験から、PAA Na を複合化することでゲルの強度が飛躍的に向上することが示された。これは BC と PAA Na のネットワークが三次元的に相互に侵入した構造をとるためと考えられる。

膨潤-収縮のサイクルにおいて形状を保つモノマー濃度と架橋剤濃度を検討したところ、モノマー濃度 10wt%、架橋剤をモノマーに約 3% 添加した場合に、BC 中で適度な強度を有する複合ゲルが得られた。このゲルをアセトンへの浸漬により洗浄し、乾燥したところ、BC 層に垂直な方向に大きく収縮し、シートが得られた。このシートを水に浸漬したところ、垂直方向に大きく膨潤し、水平方向の膨潤はわずかであった。このゲルを再度乾燥したところ、シートに戻り、再度の水浸漬により垂直方向に大きく膨潤した。乾燥複合シートを水に浸漬すると膨潤度が 700% を超え、垂直方向と水平方向の変形比は約 5 であり、この複合ゲルの異方な膨潤挙動がわかった。さらに膨潤-収縮の繰り返しテストでは、ほぼ同じ膨潤度と形状変化を示した。一方、PAA Na を含まない BC のみを乾燥させたシートを水に浸漬しても膨潤しなかったことから、階層構造を有する BC に PAA Na を複合化することで、このような特徴ある一次元的な膨潤-収縮挙動を示したものと考えられる。本研究は、ゲル材料が同じ溶媒中での一次元的な膨潤-収縮に近い挙動を示す初めての例であり、挿入するポリマー種を選択することによりセンサー材料、アクチュエーター等への応用が期待される。

(9) 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。また、クライオ電子顕微鏡を利用した構造解析を進める。

「結果と考察」

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。H29年度には、日本医療研究開発機構の創薬等先端技術支援の支援を受け、大面積光子検出型二次元検出器を導入した。これにより、微弱な回折データの精度改善とデータ収集の高効率化が期待される。また、異常分散データの高精度なデータ収集などを可能とする多軸ゴニオメータを導入した。いずれも、H30年度からビームラインに導入し、運用を開始する予定である。

細胞はアミノ酸やエネルギーの状態によって自身の代謝を調節している。この時リソソーム膜上では、細胞内部の栄養シグナルを集約してタンパク質や脂質の合成、あるいは分解を誘導するmTORC1 (Mechanistic Target Of Rapamycin Complex 1)が働いており、そのキナーゼ活性がRagulatorタンパク質複合体によって制御されていることが知られている。この複合体による制御機構を理解するために、5つのサブユニットから構成されるRagulator複合体、およびRagulatorとmTORC1の相互作用を橋渡しするRag GTPaseの2つのRoadblockドメインを含む蛋白質7者複合体の立体構造をX線結晶構造解析により決定した。この構造から、Ragulatorの構成タンパク質のうち、Roadblockタンパク質であるp10とHBXIP、およびp14とMP1がそれぞれヘテロダイマーを形成し、さらにRag GTPaseであるRagAとRagCのそれぞれC末のRoadblockドメインもヘテロダイマーを形成していることが明らかになった。3つのRoadblockヘテロダイマーがHead-to-Tail様式で並んで配置し、それらの外側をp18がひも状に伸びた状態で絡みつくことで全体の構造を安定化させるという特異な構造が見出された。この構造を足場とすることで、アミノ酸シグナルがRag GTPaseの

構造を変動させ、それが mTORC1 の活性調節につながると考えられる。

イネ萎縮ウイルスの内殻に存在する主構成蛋白質である P7 は核酸結合に関与することが知られている。本蛋白質単体および核酸との複合体の構造解析に成功した。

コヒーレント X 線回折イメージング法の開発については、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) に参加して得られた膨大な量の RDV のスペックルデータから構造解析に利用できるデータの選別を進めた。

「文献」

Nakagawa, A.; Miyazaki, N.; Higashiura, A., Hierarchical structure assembly model of rice dwarf virus particle formation. *Biophys. Rev.* 2017, 10, 659-665.

Yonehara, R.; Nada, S.; Nakai, T.; Nakai, M.; Kitamura, A.; Ogawa, A.; Nakatsumi, H.; Nakayama, K.I.; Li, S.; Standley, D.M.; Yamashita, E.; Nakagawa, A.; Okada, M, Structural basis for the assembly of the Ragulator-Rag GTPase complex. *Nat. Commun.* 2017, 8, 1625.

Kanada, K.; Takeshita, K.; Suetake, I.; Tajima, S.; Nakagawa, A. Conserved threonine 1505 in the catalytic domain stabilizes mouse DNA methyltransferase 1. *J. Biochem.* 2017, 162, 271-278.

(10) 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) アミロイド線維とアモルファス凝集の競争的形成： β 2ミクログロブリンやニワトリ卵白リゾチームを材料として、フォールディングとアミロイド凝集、アモルファス凝集を全て含めた蛋白質の構造安定性の熱力学および速度論的機構の一般性を確立することを目指した。特に β 2ミクログロブリンについては、塩濃度と温度効果を詳細に調べ、塩濃度と温度に依存した構造状態の相図を作成した。これにより、蛋白質凝集の包括的な機構を示した。

(2) ポリリン酸による蛋白質凝集とアミロイド線維形成の促進：ポリリン酸の凝集促進効果を研究した。 β 2ミクログロブリンや α シヌクレインのアミロイド形成を強く促進することを示すと共に、静電的な機構と、塩析効果の2種類の機構によって起きることを示した。

(3) オバルブミンの凝集機構：ニワトリ・オバルブミンをトリプシン分解することにより23アミノ酸残基からなるアミロイド性ペプチドpOVAを得た。pOVAを化学合成したところ極めて強いアミロイド性を示した。オバルブミンはセルピンファミリーの属するが、pOVA領域の高いアミロイド性は、セルピンファミリーに一般的なことを示した。

以上をもとに蛋白質凝集が、「溶解度」、「過飽和」、「結晶性およびアモルファス状態の区別」によって、原理的かつ包括的に理解できることを示した。

[文献]

1. So, M., Hata, Y., Naiki, H. and Yuji Goto. Heparin-induced amyloid fibrillation of β 2-microglobulin explained by solubility and a supersaturation-dependent conformational phase diagram. **Protein Sci.** 26, 1024-1036 (2017).
2. Matsushita, Y., Sekiguchi, H., Chang, J. W., Nishijima, M., Ikezaki, K., Hamada, D., Goto, Y. and Sasaki, Y.C. Nanoscale dynamics of protein assembly networks in supersaturated solutions. **Sci. Rep.** 7, 13883 (2017).
3. Nitani, A.; Muta, H.; Adachi, M.; So, M.; Sasahara, K.; Sakurai, K.; Chatani, E.; Naoe, K.; Ogi, H.; Hall, D.; Goto, Y. Heparin-dependent aggregation of hen egg white lysozyme reveals two distinct mechanisms of amyloid fibrillation. **J. Biol. Chem.** 292, 21219-21230 (2017).

(1 1) 金属置換型電子伝達蛋白質を用いた構造・機能解析

(阪大蛋白研) 栗栖源嗣、田中秀明

[目的]

葉緑体中のレドックス代謝反応の多くは、電子伝達タンパク質フェレドキシン (Fd) に依存して駆動される。これまで、Fd と依存酵素の電子伝達複合体の構造研究では、実験上の制約から全て酸化型 Fd と酸化型酵素の非生理ペアを用いて研究が進められてきた。植物型 Fd の [2Fe-2S] クラスタを [2Ga-2S] に置換したガリウム置換 Fd (GaFd) を調製すれば酸化還元活性を持たない。つまり GaFd を用いれば、常に Fd を酸化状態の構造に保つことができ、光化学系 I 複合体 (red) + GaFd(oxi) の組み合わせなどで、より生理条件に近い複合体調製が可能となる。そこで本研究では、酸化型に固定された GaFd を用いてレドックス状態を制御した複合体の構造解析と機能解析を行うことを研究目的とした。

[結果と考察]

好熱性ラン藻 *Thermosynechococcus elongatus* から精製した光化学系 I 複合体と Fd-NADP⁺酸化還元酵素 (FNR) を調製し、野生型 Fd (wtFd) と Ga 置換型 Fd (GaFd) とを用いて機能解析を行った。高速吸収分光法により GaFd と wtFd の光化学系 I との反応を解析したところ、wtFd の K_d が $0.74 \mu\text{M}$ で GaFd が $0.44 \mu\text{M}$ と GaFd の方が小さい K_d 値を示すことが判った¹⁾。一方で、両 Fd とともに光化学系 I 複合体が持つ FeS クラスタの E_m 値を同様に 30mV 低下させる事が判明した。競合実験により GaFd が wtFd の競合阻害剤としてはたらくことも明らかとなり、GaFd が新しい解析ツールとして有用である事を示すことが出来た²⁾。

[文献]

1. C. Mignée, R. Mutoh, A. Krieger-Liszka, G. Kurisu, P. Sétif, Gallium ferredoxin as a tool to study the effects of ferredoxin binding to photosystem I without ferredoxin reduction. *Photosynth. Res.*, **134**, 251-263 (2017)
2. P. Sétif, R. Mutoh, G. Kurisu, Dynamics and energetics of cyanobacterial photosystem I:ferredoxin complexes in different redox states. *Biochim. Biophys. Acta*, **1858**, 483-496 (2017)