

(1) カチオン重合による多様な切断・分解性を有する高分子の合成

(阪大院理) 青島 貞人、金澤 有紘

「目的」

当研究室ではこれまで、様々なリビングカチオン重合系やビニル付加・開環同時カチオン共重合系を開拓し、さらにそれらを用いて新規機能性ポリマーを合成してきた。令和元年度は、カチオン重合による多様な切断・分解性を有する高分子の合成などを検討した。たとえば、(1) 温和な条件・多様な条件で分解・切断が可能な分解性共重合体の合成や (2) 異種機構同時共重合による新しい配列制御法の開拓などを検討した。

「結果と考察」

(1) まず、トリメチルシリルビニルエーテルの制御カチオン重合の最適条件を検討した。さらに、環状アセタールとの共重合体を行い、新しい分解性高分子の設計・合成を試みた。その結果、得られたポリマーは比較的容易な脱トリメチルシリル化反応をトリガーとし、ヘミアセタールを経由して選択的に分解した。この分解は、従来（塩酸）に比べ、温和な条件（酢酸）または他の条件（塩基やフッ素アニオン）での分解を可能にした。さらにこの方法を用いた、ポリマーの切断も検討した（文献1）。

(2) 異なる複数の重合機構あるいは有機反応を系中で同時進行させるタンデム反応に基づいた新たな共重合により、従来は困難であった配列を制御する手法を開発した。モノマーとして 2-メチルジオキセパン (MDOP) と ϵ -カプロラク톤 (CL)、触媒に EtSO_3H を用いて重合を行い、種々の配列をもつ共重合体を得た。ポリマー構造を詳細に調べると、重合中にアセタールユニットの解重合反応と主鎖組替え反応が進行していることがわかった。そこでこれらの反応の特徴を利用した配列制御に挑戦した。まず CL 単独連鎖の無いポリマーを合成し、続いて真空ポンプで MDOP モノマーを系外に追い出し解重合を促進することにより、交互配列ポリマーへ変換することが可能となった（文献2）。さらに、重合温度変化による新しい配列制御法として、系を昇温することで交互性配列のポリマーへの変換を可能にした。

「文献」

1. Kato, R.; Kanazawa, A.; Aoshima, S. *ACS Macro Lett.* **2019**, *8*, 1498–1503.
2. Higuchi, M.; Kanazawa, A.; Aoshima, S. *ACS Macro Lett.* **2020**, *9*, 77-83.

(2) 金属錯体を骨格に持つ拡張型ポリペプチドに関する研究

(阪大院理) 鬼塚 清孝、岡村 高明、神林 直哉

「目的」

酵素の高選択性、高機能性は、精緻に組み立てられた立体構造により、もたらされると考えられる。蛋白質は、Ramachandran プロットで知られるように光学活性なアミノ酸の α 炭素周りの2つの二面角により構造が決定される。これに剛直なスペーサーを組み合わせて、概念を発展させたのが拡張型ポリペプチドである。高分子化することで、制限された立体配座による秩序立った立体構造の形成が期待できる。これまで、使用するアミノ酸側鎖の僅かな違いにより2次構造が変化することを明らかにしてきた。本研究では、溶液中で2次構造を形成する拡張型ポリペプチドの合理的な合成法の確立と機能への発展を目指す。

「結果と考察」

アミノ酸とビス(ピリジン)銀(I)錯体を組み合わせた拡張型ポリペプチドは、ピリジンを両末端に持つアミノ酸と銀(I)イオンの錯形成により結晶として得られる。アミノ酸としてL-ロイシンを用いた場合は左巻きの 6_1 らせん、L-イソロイシンを用いた場合はジグザグ構造を形成することを既に報告している¹。イソロイシンより CH_2 が1つ少ないL-バリンを用いると同様にジグザグ構造を形成し、D-バリンを用いると、その鏡像体を与えた。しかし、これらを1:1で混合したラセミ体では、結晶中で、それぞれが左巻き、右巻きの 4_1 らせんを形成した²。これらは難溶であり、極性溶媒に解離を伴って溶解する程度であるが、嵩高い疎水基 Ar_3C ($\text{Ar} = 4\text{-}t\text{-BuC}_6\text{H}_4$)をリシン側鎖末端に導入することでクロロホルムにポリマー構造を保ったまま溶解させることに成功した。リシンより CH_2 が1つ少ないオルニチンを用いた場合、CDスペクトルから異なった2次構造を形成することが明らかになった。しかし、ピリジンの配位力の違いからC末端のピリジンが優先的に銀イオンに配位し、尾一尾、頭一頭の連結であり、厳密にはポリペプチドとは言えない。そこで平面4配位の白金(II)錯体と、3座と単座の配位子を非対称に導入したアミノ酸を用い、さらに強固な白金-炭素結合を導入して解離を抑えることで、溶液中でも安定な拡張型ポリペプチドの合成に成功した。

「文献」

- 1) Okamura, T. *Chem. Eur. J.*, **2018**, *24*, 13437-13440.
- 2) Okamura, T.; Tsubouchi, K.; Onitsuka, K., *Chem. Asian J.* **2019**, *14*, 2950-2952.

(3) 生体高分子と遷移金属錯体または合成高分子とのハイブリッド化による機能性超分子触媒の合成

(超分子機能化学研究室) 山口浩靖・小林裕一郎

【目的】

抗体には多様性があり、種々の遷移金属錯体（触媒）に対してテーラーメイドの「分子フラスコ」を用意することができる。ターゲットとなる触媒ユニットに対して抗体を作製することにより極めて精密な不斉反応場を創製できると考えた。本研究では、生体系において優れた分子認識能を有するモノクローナル抗体と人工系において優れた触媒機能を有する遷移金属触媒をハイブリッド化させることにより人工金属酵素を開発した。従来の有機金属錯体のみでは実現できなかった精密制御反応場を構築することができた。

【結果と考察】

昨年度に引き続き、ビナフチル化合物（BN）の光学異性体（*R*体と*S*体のそれぞれ）に特異的に結合するモノクローナル抗体を活用した。これらの抗BN抗体は1,1-ビ-イソキノリン(BIQ)を配位子とする種々の金属錯体にも結合した。BNの軸不斉を認識するモノクローナル抗体と、BIQを配位子とする銅錯体(BIQ-Cu)を複合化することにより人工金属酵素を創製した。BIQ-Cuのみを用いてFriedel-Craftsアルキル化反応を行うと、生成物は立体異性体の混合物が得られた。一方、今回開発した抗体とBIQ-Cuからなる人工金属酵素を用いると、極めて高いエナンチオ選択性で反応が進行した。抗体とBIQ-Cuとの解離定数に基づいて系中に存在する遊離のBIQ-Cuの寄与を除外すると、本金属酵素は99%以上の極めて高いエナンチオ選択性を有することがわかった(参考文献1)。抗体を用いた金属酵素では初めてのC-C結合形成反応であり、抗BN抗体との超分子形成によりBIQ-Cuを不斉触媒として利用した初めての例でもある。軸不斉認識抗体を第二配位圏として利用することにより、金属錯体だけの系よりも収率が向上するとともに不斉が誘起される触媒システムを実現することに成功した。さらに、上記の系とは別にパラジウム錯体を安定に取り込むことができるモノクローナル抗体を利用すると、アリル位アミノ化反応が立体選択的に進行することがわかった(参考文献2)。

【参考文献】

- (1) Adachi, T.; Harada, A.; Yamaguchi, H. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 13551.
- (2) Kobayashi, Y.; Murata, K.; Harada, A.; Yamaguchi, H. *Chem. Commun.* **2020**, *56*, 1605.

(4) 半屈曲性高分子の粘弾性と複屈折

(阪大院理)井上正志、浦川 理

「目的」

鎖長 L が持続長と同程度の半屈曲性高分子は、セグメントの配向緩和モードに加えて、曲げと伸長モードが粘弾性に寄与する。昨年度の研究では、セルローストリスカルバメート CTC をモデル高分子とし、粘弾性測定に適したリン酸トリクレジル TCP を溶媒として、粘弾性測定と複屈折測定を実施した。両者の結果を比較することにより、三つの緩和モードを定量的に分離できることが実証した¹⁾。今年度の研究では、その技術をナノセルロースに応用し、ナノセルロースの精密解析を目的とした。

「結果と考察」

ナノセルロースは、木材を解繊して得られる材料であり、製造法の違いによりセルロースナノクリスタルCNCとセルロースナノファイバーCNFに大別できる。CNCは剛直な比較的短い材料であるのに対し、CNFはより細く長い繊維である。本研究では、CNCを対象とした²⁾。

CNCの希薄水溶液に対する動的粘弾性の測定から、長時間領域に剛直棒としての回転緩和モードが観測されるのに加え、短時間域でも緩和が曲げ・伸長モードに由来する観測された。太く短いCNCでは、この高周波数域の緩和は弱く、CNCが細く長くなるにつれ、緩和が回転緩和モードに近づき融合するようになった。一方、動的複屈折測定では、配向緩和に由来する長時間緩和のみが観測された。この緩和を棒の理論により解析することで、CNCの長さとその分布を決定することに成功した。CNCの長さとその分布の評価には、これまで電子顕微鏡観察が利用されており、定量的な評価のためには、多数の繊維長を直接計測する必要があり作業が煩雑であったが、動的複屈折測定により簡便に行うことが可能になった。さらに、高周波数領域で観測された曲げ・伸長モードを、半屈曲性高分子の粘弾性に対するMorseの理論を適用することにより、CNCのヤング率の評価が可能になった。

「文献」

- 1) Okada Y, Goto Y, Tanaka R, Katashima T, Jiang X, Terao K, Sato T, Inoue T, *Macromolecules* **51**, 9626 (2018)
- 2) Tanaka R, Kashiwagi Y, Okada Y, Inoue T, *Biomacromolecules*, **2020**, *21*, 408-417

(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・香門 悠里

「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。特に、われわれは、クリックケミストリーの中心的な反応である銅 (I) 触媒アジドアルキン環化付加 (CuAAC) に着目し、アジドとアルキンを有するポリマーから高密度トリアゾールポリマーの合成を行っている。2019年度は、CuAAC 重合によって、ポリ(エチレングリコール) (PEG) と高密度 1,2,3-トリアゾールポリマーとのブロック共重合体を合成し、得られたポリマーの溶液中での特性を調査した。

「結果と考察」

プロパルギル基を有する PEG の存在下で、3-アジド-1-プロピン (AP) または 3-アジド-1-ブチン (AB) の CuAAC 重合によって PEG と高密度 1,2,3-トリアゾールブロックの新しいジブロックコポリマー (EG m - b -AP n および EG m - b -AB n) を合成した。(ここで、 m と n は重合度を表す。) EG m - b -AP n は、 N,N -ジメチルホルムアミド中で分子分散状態を取り、蛍光性を示した。一方、EG m - b -AP n および EG m - b -AB n は水溶液中で会合体を形成した。水溶液中における会合挙動と温度応答性をいくつかの測定手法により詳細に調査した。光散乱データや NMR スペクトルは、EG45- b -AP6 と EG45- b -AP14 が優先的に球状ミセルを、EG18- b -AP4 と EG18- b -AP10 がベシクルを形成することを示した。また、EG18- b -AB7 が棒状ミセルを形成した。EG18- b -AP10、EG45- b -AP14、および EG18- b -AB7 の水溶液は、下限臨界溶液温度 (LCST) 型相分離を示した。これは、高温で PEG ブロックが脱水和し、高次の凝集体を形成するためである。以上の結果から、水溶液中における EG m - b -AP n および EG m - b -AB の温度応答性会合挙動は、ブロック鎖長の比を調整したり、メチル置換基を付加したりすることによって制御できることを明らかとした。

「文献」

1) Yang, Y.; Hashidzume, A. *Macromol. Chem. Phys.* **2019**, *220*, 1900317.

(6) べん毛モーターMS リングと回転制御蛋白質 ZomB 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の回転子は、土台となる MS リングとトルク発生および回転方向制御に関わる C リングで構成される。これまでに C リング構成蛋白質個々の部分構造と、電子顕微鏡による低分解能の回転子構造が明らかになっている。しかし、MS リングの構造は依然不明であり、回転子の構造に基づく理解は進んでいない。MS リングは1種類のタンパク質 FliF から形成されたリング状の複合体である。FliF は2回膜貫通型のタンパク質で、大きなペリプラズム側領域を持ち、べん毛ロッド、C リング、べん毛輸送装置と相互作用する。一方、モーターの反転に必須の蛋白質が最近新たに同定され ZomB と名付けられた。そこで今年度は、MS リング、ロッド、ZomB の構造解明に取り組んだ。

【結果と考察】

超好熱菌 *Aquifex aeolicus* 由来 FliF (残基数 : 489、分子量 : 54,000) について全長およびフラグメントを発現・精製し、結晶化した。その結果、58 から 213 までの残基からなる FliF₅₈₋₂₁₃ について X 線結晶構造解析により 2.3 Å 分解能で構造を決定した。FliF₅₈₋₂₁₃ は2つのドメイン (I : 58-122、II : 123-213) で構成され、各ドメインは病原性細菌が持つ III 型ニードル複合体構成タンパク質 PrgH や PrgK/EscJ、バチルス属細菌の孢子形成複合体構成タンパク質 SpoIIIAH と構造が類似していた。そこで、これらとの構造類似性とべん毛基部の低分解能電子顕微鏡マップを用い、FliF₅₈₋₂₁₃ の MS リング中での配置を特定し、変異体解析で確認した。その結果、ドメイン II は MS リング内側のリングを形成し、ドメイン II 内のループ (156-171) が III 型輸送装置構成蛋白質 FlhA と相互作用することが明らかになった。また、ロッド蛋白質 FlgG の結晶構造を 2.0 Å 分解能で決定し、電子顕微鏡マップにあてはめることでロッドの構造を解明した¹。一方、ZomB については、2.6 分解能の回折を与える結晶の作成に成功し、現在、構造解析を進めている。

1. Architecture of the Bacterial Flagellar Distal Rod and Hook of *Salmonella*. Saijo-Hamano Y, Matsunami H, Namba K, Imada K. *Biomolecules*. **2019**, 9: pii E260

(7) 両親媒性ブロック共重合体の溶液中におけるミセル化と相分離の競合

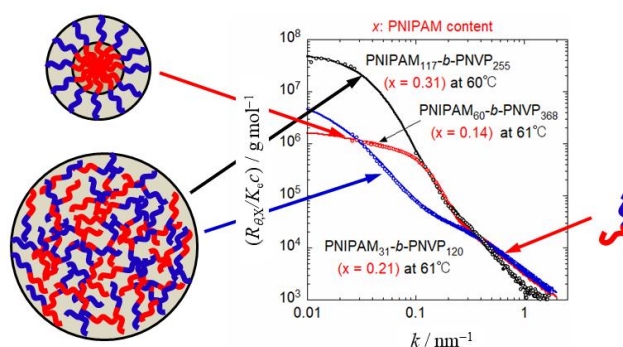
(阪大院理) 佐藤尚弘、寺尾 憲

「目的」

溶液中でのブロック共重合体のミセル化は、ナノサイズの製品を製造するためのナノテクノロジーにおける基本技術である。ホモポリマーは貧溶媒中で、希薄相と濃厚相に相分離するが、疎水性モノマーと親水性モノマーとからなる両親媒性共重合体は選択溶媒中で、さまざまな高分子ミセル（ナノ粒子）を形成する可能性がある。しかしながら、共重合体の両親媒性が弱い場合には、必ずしもミセルが形成されるとは限らず、ホモポリマーの貧溶媒系と同様に液-液相分離することもあり、ミセル化と液-液相分離が起こる条件を明確にしておくことは、自己組織化高分子をナノ材料として利用するうえで、重要な基礎知識である。

「結果と考察」

最近、我々は格子モデルを用いて、ブロック共重合体の溶液中でのミセル化と相分離の競合について理論的に取り扱った¹。同理論を用いて、ブロック共重合体の疎溶媒性ブロック鎖のモル分率 x を変化させたときのミセル化と相分離の競合について調べると、モル分率 x の減少に伴って、よりミセル化が起こりやすいことを見出した²。このことを実験的に確かめるために、 x の異なる poly(*N*-isopropylacrylamide)-*b*-poly(*N*-vinyl-2-pyrrolidone) (PNIPAM-*b*-PNVP) の 3 試料について水中で形成される自己集合体を小角 X 線散乱により調べた。その結果、理論の予言通り、 x が小さい試料ほどミセルを形成しやすいことを実証した²。



「文献」

- (1) T. Sato and R. Takahashi, *Polym. J.*, **49**, 273–277 (2017).
- (2) C. Kunag et al., *Macromolecules*, **52**, 4812–4819 (2019).

(8) 可逆性・可動性架橋に基づいた高分子材料の創製

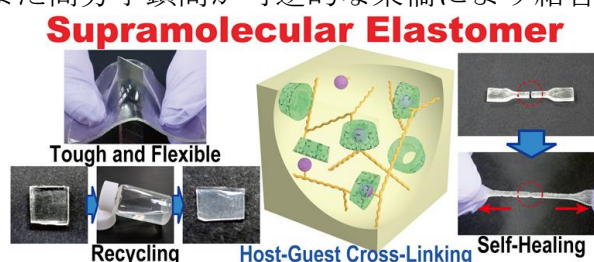
(阪大院理) 高島 義徳

「目的」

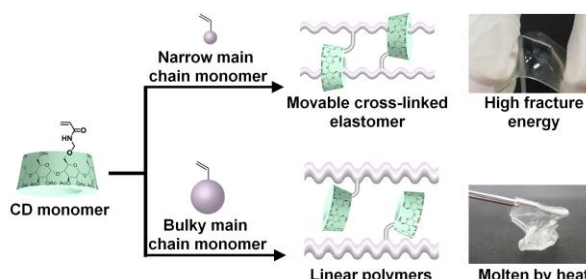
高分子材料の力学特性や刺激応答性などの機能性発現には、高分子材料内部の架橋形式が大きく影響している。本研究室では、高分子材料内部に可逆性架橋、もしくは可動性架橋を導入することで、高分子材料の力学特性の評価、さらにはそこから生まれる機能について研究を行っている。2019年度は、(1) 自己修復性機能と(2) 高靱性機能の発現に成功した。これらの研究には環状ホスト分子として、シクロデキストリン(CD)を用いた。

「結果と考察」

(1) 本研究では、アクリレート系のエラストマーを作製することを目的に、CDの水酸基をメチル化またはアセチル化したCDモノマーを用いた。適切なゲスト分子とCDモノマーを混合して、重合することにより得られた超分子エラストマーは高い延伸性を示した。また高分子鎖間が可逆的な架橋により結合されているため、有機溶媒にも可溶で、溶媒を除去することで再利用も可能であった。特にエラストマー系材料においても自己修復機能を示すことが明らかとなった¹。



(2) 作製時にゲスト分子を用いずに重合を行うと、高分子主鎖がCDモノマーの空孔に貫通した可動性架橋材料が形成されることが明らかとなった。この可動性架橋材料の形成には、高分子主鎖やCDモノマーの空孔サイズが力学特性に大きく関係していることが明らかとなった。CDモノマーの添加量には最適値があり、最適値を超えると、可動域が制限され、破壊エネルギーが低下することが明らかとなった²。



「文献」

- (1) S. Nomimura, M. Osaki, Y. Takashima, H. Yamaguchi, Harada, A. et al. *Macromolecules*, **52**, 2659-2668 (2019).
- (2) R. Ikura, J. Park, M. Osaki, H. Yamaguchi, A. Harada, Y. Takashima, *Macromolecules*, **52**, 6953-6962 (2019).

(9) 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、徐 于懿

「目的」

酢酸菌が産出するバクテリアセルロース (BC) はハイドロゲルとして得られる。BC ゲルは面方向においてはナノファイバーのネットワーク構造を有するが、厚み方向にはミクロンサイズの層状構造をもつという異方性を有している。本研究ではこの特異な構造を活かした機能材料として、ポリビニルアルコール (PVA) や多糖類との複合化による異方な膨潤-収縮挙動を有する生分解性材料の開発を目的とする。

「結果と考察」

BC/水溶性ポリマー複合シートは Bulk Method により作製した。BC ゲルを種々の濃度の PVA 水溶液に 4 日間浸漬した後、105°C で乾燥することで複合シートを得た。SEM 観察により、複合シートは BC 由来の積層構造に加えて、層間を結ぶ繊維が見られた。BC 単独では観察されないことから、PVA が BC 内部で乾燥時に繊維化したものと考えられる。得られた BC-PVA 複合シートを脱イオン水または異なる濃度の塩化ナトリウム水溶液に一晚浸漬させ、それぞれのイオン強度における膨潤能を評価した。水に浸漬した複合シートは垂直方向に一次的に大きく膨潤したが、塩水に浸漬した複合シートはわずかしこ膨潤しなかった。異なる濃度の塩化ナトリウム水溶液中における複合シートの膨潤率を調べたところ、塩化ナトリウム濃度の増加につれ複合シートの膨潤率が低下し、膨潤におけるイオン濃度応答性を示した。また、膨潤度は温度に依存し、高温のほうが膨潤度が高かった。温度が高くなると PVA と BC 間の水素結合が切れやすくなり、水が複合シートに侵入しやすくなったためと考えられる。

PVA フィルムは 10wt% 以下の塩化ナトリウム水溶液に浸漬すると崩壊・溶解するが、BC-PVA 複合化シートは塩水中で安定であった。さらに塩化ナトリウム水溶液に浸漬した複合シートは低い膨潤性を示すとともに、優れた弾力性と引張強度を有した。BC-PVA 複合シート (BC: PVA=1:30) の引張試験では、PVA フィルムに比べて BC-PVA 複合シートの破断強度が顕著に上昇し、セルロースファイバーによる補強効果が明らかになった。

これら以外に BC ゲルにポリ (スチレンスルホン酸ナトリウム) をグラフト化し、ゲルと外界のイオン強度差による浸透圧を制御することで、外部刺激に応答して剛性の変化するナマコ様ゲルを作製した。また、BC をカルボキシメチルセルロースと複合化し、炭素化することで高性能電極材料を開発した。

(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]

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。また、クライオ電子顕微鏡を利用して生体超分子複合体の単粒子構造解析を進める。

「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 (Yamashita and Nakagawa, *Biophys. Rev.*, 2019)。2018年度より稼働している大面積光子検出型二次元検出器と2019年度に設置した多軸ゴニオメータを利用して、微弱な回折データの精度改善と10倍程度のデータ収集の高効率化、異常分散データの高精度なデータ収集などが可能となった。さらに、多軸ゴニオメータを利用して、目的の実験にあった結晶の方位を設定できるようなシステムの開発を進めている。

耐性菌が発現する一つの原因として、菌体にとって毒物である抗菌剤を薬剤排出タンパク質複合体が菌体外に排出してしまい抗菌剤を効かなくしていることが挙げられる。緑膿菌は、プロトン濃度勾配を利用して様々な異物・薬剤を排出する Resistance Nodulation cell Division (RND) 型の多剤排出タンパク質複合体を持ち、これが過剰発現すると多剤耐性を獲得し、院内感染の原因となる。RND型多剤排出ポンプは、内膜に局在し薬剤排出の根幹を担う RND、ペリプラズムに局在するアダプタータンパク質 Membrane Fusion Protein (MFP)、外膜から細胞外への薬剤排出経路を確保する Outer Membrane Factor (OMF) から構成されている。緑膿菌においては複数の RND 型多剤排出ポンプが発現しているが、その中で MexAB-OprM は唯一恒常的に発現するメインのポンプ複合体である。MexAB-OprM を構成する MexA (MFP)、MexB (RND)、OprM (OMF) のそれぞれの結晶構造は、我々のグループを含めて過去の研究で明らかとなっているが、OprM は結晶構造では薬剤を排出する経路が閉じられている、MexA は結晶構造ではアーティファクトな 13 量体を形成するなど、個々の構造のみでは多剤排出ポンプの排出機構を解明することは困難であった。また、大腸菌のオルソログである

AcrAB-TolC の構造がクライオ電子顕微鏡により近原子分解能で明らかになっているが、この複合体解析にはペプチドリンカーやクロスリンクなどを遺伝子操作で導入したタンパク質を用いており、タンパク質同士の詳細な相互作用の議論は困難である。さらに、MexABOprM についてもナノディスクを用いた *in vitro* 再構成とネガティブ染色法による構造解析が行われているが、分解能が 20 Å 前後と詳細な分子間相互作用を理解するには十分でなかった。

本研究では、クライオ電子顕微鏡を用いた単粒子により、野生型の MexAB-OprM の近原子分解能 (3.64~3.76 Å) の構造決定に成功した。本研究の結果、MexAB-OprM は OprM の結合状態のみが異なる 2 状態を取れることが明らかとなった。両者は OprM のみを 60 度回転させることによって関係づけることができ、この 2 つの結合様式はほぼ同一であることが分かった。今回得られた構造と、*in vivo*, *in vitro* の両方での機能解析実験の結果と照らし合わせることで、各タンパク質間の詳細な分子間相互作用を明らかにすることができた。さらに、OprM の結晶構造との比較から、OprM が排出経路を開きながら複合体を形成するモデルを提唱した (Tsutsumi *et al.*, *Nat. Commun.*, 2019)。

「文献」

Yamashita, E.; Nakagawa, A. SPring-8 BL44XU, a synchrotron radiation beamline for biological macromolecular assemblies, operated by the Institute for Protein Research, Osaka University. *Biophys. Rev.* 2019, 11, 521-523.

Tsutsumi, K.; Yonehara, R.; Ishizaka-Ikeda, E.; Miyazaki, N.; Maeda S.; Iwasaki, K.; Nakagawa, A.; Yamashita, E. Structures of the wild-type MexAB-OprM tripartite pump reveal its complex formation and drug efflux mechanism. *Nat. Commun.* 2019, 10, 1520.

(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、宗 正智

[目的]

蛋白質はアミノ酸が連なった鎖状の高分子であり、基本的には水に難溶性である。進化の過程で、コンパクトにフォールディングして溶解性を高めると共に特異的な機能を獲得することによって、蛋白質は生体の機能物質となった。他方、蛋白質は変性するとしばしば難溶性となり、凝集する。中でもアミロイド線維は結晶性の凝集であり、アルツハイマー病をはじめとする様々な病気に関わる。本研究では、物理化学的な視点から、アミロイド線維の形成機構、さらには蛋白質凝集の生理的な意義を明らかにする。

[結果と考察]

後藤は令和2年3月で定年退職した。蛋白質のフォールディングとミスフォールディング反応に関する研究を総括すべく、研究を推進した。

(1) 蛋白質のフォールディングとミスフォールディング：蛋白質の立体構造はアミノ酸一次配列によって決まると考えられており、「アンフィンゼンのドグマ」と呼ばれる。他方、アミロイド線維形成はドグマの例外と考えられてきた。 β_2 ミクログロブリンをはじめとする様々な蛋白質について、温度やアジテーションの効果を調べた。その結果、溶解度と過飽和によって、蛋白質フォールディングとミスフォールディングを結びつけることに成功した[1]。

(2) 蛋白質凝集を誘導する様々な因子の作用機構：さまざまな溶媒条件や添加物によって蛋白質の溶解度は減少し、蛋白質はアミロイド線維、あるいはアモルファス凝集を形成する。このような因子として、「ポリリン酸[2]」と「等電点[3]」を見出し、ポリリン酸による β_2 ミクログロブリンのアミロイド線維形成、 α シヌクレインの等電点アミロイド線維形成を明らかにした。

以上より、「溶解度」や「過飽和」が蛋白質のアミロイド線維形成を支配する重要な因子であり、これを理解することによって蛋白質フォールディングとミスフォールディングの包括的理解が可能であることを提案した[1-4]。

[文献]

1. Noji, M., Sasahara, K., Yamaguchi, K., So, M., Sakurai, K., Kardos, J., Naiki, H. and Goto, Y. Heating during agitation of β_2 -microglobulin reveals that supersaturation breakdown is required for amyloid fibril formation at neutral pH. *J. Biol. Chem.* 294(43) 15826-15835 (2019).
2. Zhang, C., Yamaguchi, K., So, M., Sasahara, K., Ito, T., Yamamoto, S., Narita, I., Kardos, J., Naiki, H., and Goto, Y. Possible mechanisms of polyphosphate-induced amyloid fibril formation of β_2 -microglobulin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 116 (26), 12833-12838 (2019).
3. Isoelectric point-amyloid formation of α -synuclein extends the solubility and supersaturation-limited mechanism. Furukawa, K. Aguirre, C., So, M., Sasahara, K., Miyanoiri, Y., Sakurai, K., Yamaguchi, Y., Ikenaka, K., Mochizuki, H., Kardos, J., Kawata, Y., and Goto, Y. *Curr. Res. Struct. Biol.* in press.
4. Amyloid formation of α -synuclein based on the solubility- and supersaturation-dependent mechanism. Sawada, M., Yamaguchi, Y., Hirano, M., Noji, N., So, M., Otzen, D., Kawata, Y., and Goto, Y., *Langmuir* in press

(12) ダイニン分子モーターと制御因子との複合体構造解析

(阪大蛋白研) 栗栖源嗣、田中秀明、川本晃大

[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1,000kDa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蛋白質で、その生物学的重要性は極めて高い。最近になって、緑藻クラミドモナス由来の軸糸ダイニン軽鎖1(LC1)が、軸糸ダイニン外腕 γ 重鎖(OAD γ)の微小管結合領域(MTBD)に結合することが明らかにされた。そこで本研究では、ダイニンの運動活性を制御するLC1に着目し、その構造—機能の相関を解明することを研究目的とした。

[結果と考察]

LC1とOAD γ の直接の相互作用を見るために、LC1とOAD γ -MTBDとの複合体(LC1:OAD γ -MTBD)の結晶構造を1.7Å分解能で決定した¹⁾。その構造では、MTBDはH6ヘリックスと軸糸ダイニンに特有の挿入配列であるFlap領域とでLC1と結合していることが明らかになった。そこで、結晶構造を基に設計したLC1変異体を作成し、プルダウン実験によりLC1-MTBD間の相互作用にArg79が重要であること、H6ヘリックスが主に結合に寄与していることを明らかにした。今回得られたLC1:OAD γ -MTBD複合体構造を、既知の微小管-MTBD構造に重ね合わせることで微小管に結合したLC1-MTBD複合体の予想複合体構造も得た¹⁾。その構造ではLC1が直接微小管上の軌道と結合しておらず、LC1が微小管のC末端テイル領域に結合する可能性が示唆された。また予想複合体構造では、軸糸ダイニン特有のFlapがLC1の結合から解放されると、MTBDが結合している微小管上の隣のプロトフィラメントに結合する可能性が示唆された¹⁾。

[文献]

1. A. Toda, Y. Nishikawa, H. Tanaka, T. Yagi, G. Kurisu*, The complex of outer-arm dynein light chain-1 and the microtubule-binding domain of the γ heavy chain shows how axonemal dynein tunes ciliary beating. *J. Biol. Chem.*, **295**, 3982-3989 (2020)