

日本生物物理学会 第5回中国四国支部大会

2013年5月25日（土）～5月26日（日）

ベネッセハウス・パークホール

講演要旨集

目次

はじめに 4

発表案内 4

会場案内図 6

直島へのアクセス方法 8

フェリー・高速船と連絡電車・バスの時刻表 9

直島観光案内 13

プログラム 14

要旨集 21

日本生物物理学会中国四国支部会員の皆様

日本生物物理学会第5回中国四国支部大会を、ベネッセハウス・パークホール（〒761-3110 香川県香川郡直島町琴弾地）で行ないます。支部大会も5回目を迎え、開催地が変わるごとに特にその地区の会員への知名度が上がり、新たな参加者が加わっているようです。今回も、中国四国地区の会員の交流の場として、また大学院生や若手研究者の研究成果発表の場としておおいに盛り上がることを期待します。

初夏の直島で、活発な議論が交わされ実り多い大会となることを、実行委員一同楽しみにしております。多くの皆様の参加をお待ちしております。

参加費

参加費は無料です。名札等は会場受付でお渡しいたしますので、お受取りください。事前に個人あてには送付いたしません。当日でも受け付けは可能ですので、必ず、参加登録を行なってください。

発表方式

- ・ご発表は口頭発表に限ります。
- ・液晶プロジェクタによるご発表をお願いします。
- ・講演時間:質疑応答および演者交代時間を含めて13分とさせていただきます。
例年よりも2分短くなっておりますので、ご注意ください。
- ・発表10分、質疑2分、交代1分を目安とします。
- ・PC接続時間を設けますので、ご発表直前のPC接続時間に接続と動作確認をお願いします。
- ・Power Point 2007をインストールしたWindows 7のパソコンを準備いたしますが、お手持ちのPCをお持ちいただいても結構です。
- ・Mac OSで発表される方は、接続コネクタをご持参ください。
- ・その他、ご不明な点はお問い合わせ下さい。

総会

大会2日目（5月26日）の12:00～13:00まで講演会場（パークホール）にて開催いたします。日本生物物理学会中国四国支部会員の方はご出席ください。

懇親会

懇親会は大会1日目（5月25日）19:30～21:30にベネッセハウス・パークホールで行ないます。懇親会費（正会員及び会員外参加者：8,000円、学生会員：3,000円）は当日受付にて徴収いたします。

支部大会会場へのアクセス

ベネッセハウスへのアクセスはHPホームページ
(<http://www.benesse-artsite.jp/access/index.html>) をご参照ください。

受付

大会参加者の方は講演会場（パークホール）内の受付にお越しくください。

休憩

1日目の2日目の休憩時にコーヒーまたはジュースをベネッセハウスからお持ちします。前回のようにこちらで飲み物とお茶菓子は準備しておりません。詳細は受付時にお渡しする注意事項に記載しております。

喫煙

ベネッセハウス構内は全面禁煙です。講演会場周辺に指定喫煙場所がありません。詳しくは次ページの地図を参照してください。


その他

その他お気づきの点がございましたら、受付のスタッフまでお問い合わせください。

日本生物物理学会第5回中国四国支部大会実行委員会
委員長 成瀬 恵治（岡山大学）
委員 井上 剛、松浦 宏治（岡山大学）

ベネッセハウス館内地図

ベネッセハウスパーク 館内のご案内
Benesse House Park Building Information

 館内は全て禁煙でございます。
No Smoking on the premises
ご喫煙は所定の場所をお願いいたします。
Please smoke at designated smoking area

 喫煙場所

テラスレストランのご案内
About Terrace Restaurant

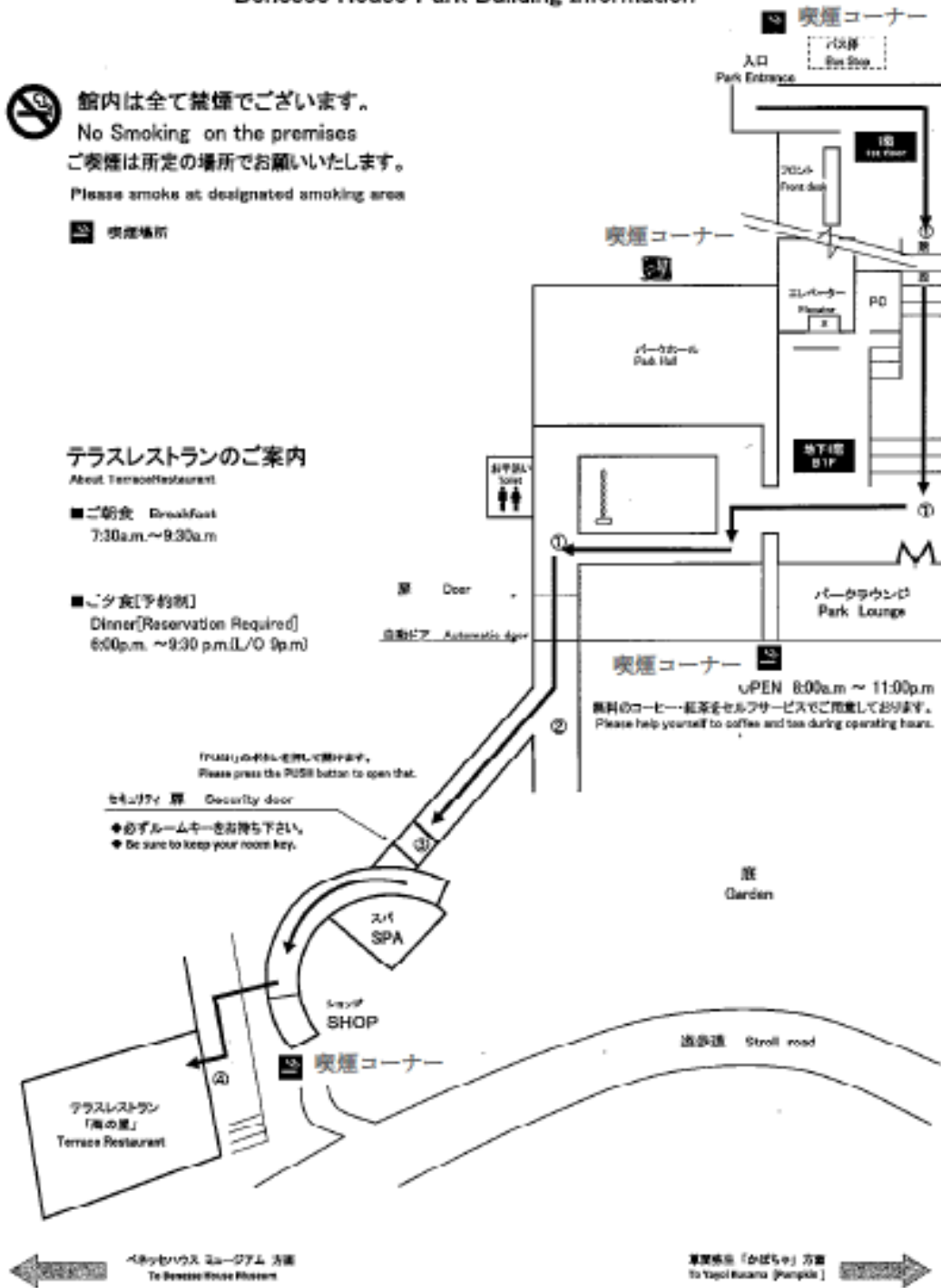
■ご朝食 Breakfast
7:30a.m. ~ 9:30a.m.

■ご夕食[予約制]
Dinner[Reservation Required]
6:00p.m. ~ 9:30 p.m.(L/O 9p.m.)

「PUSH」のボタンを押して開けます。
Please press the PUSH button to open that.

セキュリティ 扉 Security door

◆必ずルームキーをお持ち下さい。
◆ Be sure to keep your room key.



支部大会会場案内図



宮浦港

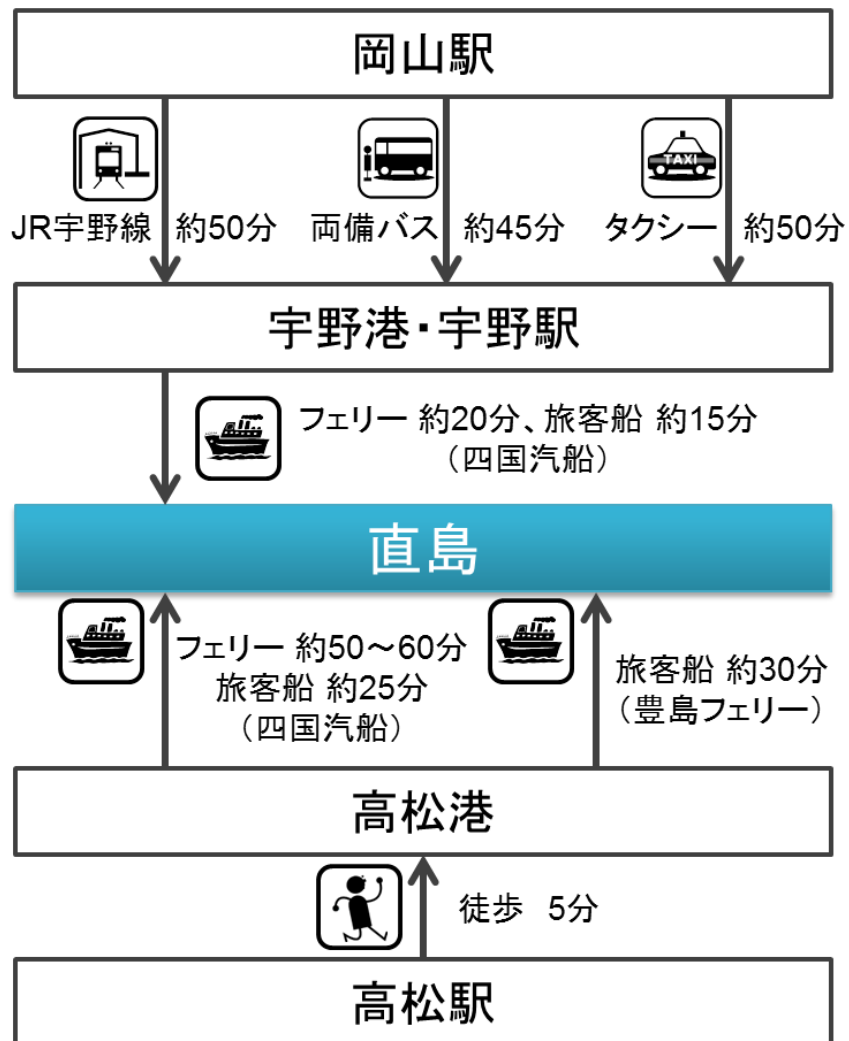


ベネッセハウス



つつじ荘

直島へのアクセス方法



【 行き 本州側 】

両備バス		待ち 時間	四国 汽船
岡山駅 発	宇野港 着		
7:00	7:52	0:30	④
7:30	8:22	1:00	⑤
8:00	8:52	0:30	
8:30	9:22	0:38	⑥
8:40	9:32	0:28	
9:30	10:22	0:38	⑦
10:30	11:22	0:53	⑧
11:00	11:52	0:23	
11:30	12:22	1:08	⑨
12:00	12:52	0:38	
13:00	13:52	0:33	⑩
13:30	14:22	1:08	⑪
14:00	14:52	0:38	
15:00	15:52	0:38	⑫
16:00	16:52	0:18	⑬
16:30	17:22	1:31	⑭
17:00	17:52	1:01	
17:30	18:22	0:31	⑮
18:00	18:52	1:33	
18:30	19:22	1:03	⑯
19:00	19:52	0:33	
19:30	20:22	2:08	⑰
20:00	20:48	1:42	
20:30	21:18	1:12	
21:00	21:48	0:42	

JR(普通)				待ち 時間	四国 汽船
岡山発	茶屋町(乗換)		宇野着		
	着	発			
5:49	→	→	6:38	0:42	③
7:11	7:26	7:28	7:52	0:30	④
8:24	8:38	8:40	9:10	0:50	⑥
9:54	10:09	10:13	10:37	0:23	⑦
10:53	11:09	11:21	11:46	0:29	⑧
11:45	12:06	12:11	12:34	0:56	⑨
12:45	13:06	13:11	13:34	0:51	⑩
13:45	14:06	14:11	14:34	0:56	⑪
15:15	→	→	16:12	0:18	⑫
15:45	16:07	16:11	16:34	0:36	⑬
17:45	18:07	18:11	18:34	0:19	⑭
19:16	→	→	20:03	0:22	⑮

	四国汽船	
	宇野発	宮浦着
①	6:10	6:30
②	6:30	6:50
③	7:20	7:40
④	8:22	8:42
⑤	9:22	9:42
⑥	10:00※	10:15
⑦	11:00	11:20
⑧	12:15	12:35
⑨	13:30 高	13:45
⑩	14:25	14:45
⑪	15:30	15:50
⑫	16:30	16:50
⑬	17:10	17:30
⑭	18:53	19:13
⑮	20:25	20:45
⑯	22:30 高	22:45

※…高速旅客船(瀬戸内国際芸術祭 2013 の開催期間中は運休) 高…高速旅客船

【 帰り 本州側 】

四国 汽船	待ち 時間	両備バス		
		宇野駅 発	宇野港 発	岡山駅 着
①	0:34	6:54	→	7:45
	0:49	7:09	→	8:00
②	0:24	7:24	→	8:15
	0:44	7:44	→	8:35
	1:04	8:04	→	8:55
③	0:39	8:49	→	9:40
	1:09	9:19	→	10:10
④	0:37	9:49	→	10:40
⑤	1:08	10:19	10:20	11:15
⑥	0:38	10:49	10:50	11:45
	0:40	11:19	11:20	12:15
⑦	0:20	11:49	11:50	12:45
	0:50	12:19	12:20	13:15
	1:20	12:49	12:50	13:45
⑧	0:45	13:49	13:50	14:45
⑨	1:15	14:19	14:20	15:15
	0:40	14:49	14:50	15:45
⑩	1:10	15:19	15:20	16:15
	0:35	15:49	15:50	16:45
	1:05	16:19	16:20	17:15
⑪	0:28	16:49	16:50	17:45
⑫	0:20	17:19	17:20	18:15
	0:50	17:49	17:50	18:45
⑬	0:20	18:19	18:20	19:15
	0:49	18:49	→	19:40
	1:19	19:19	→	20:10
⑭	0:27	19:49	→	20:40
	1:24	20:46	→	21:30
⑯	0:16	21:46	→	22:30

四国 汽船	待ち 時間	JR			
		宇野発	茶屋町(乗換)		岡山着
着	発				
③	0:19	8:29	→	→	9:13
④	0:23	9:35	9:58	10:03	10:17
⑤	0:14	10:26	10:54	11:01	11:20
⑥	0:36	11:16	11:42	11:49	12:02
⑦	1:11	12:41	13:04	13:08	13:29
⑧	0:36	13:41	14:04	14:08	14:30
⑨	0:31	14:41	15:04	15:09	15:29
⑩	0:26	15:41	16:04	16:08	16:29
⑪	0:19	16:41	17:04	17:08	17:29
⑫	0:41	17:41	18:04	18:08	18:29
⑬	0:41	18:41	19:04	19:09	19:29
⑭	1:05	20:27	→	→	21:24
⑮	0:40	21:25	→	→	22:18

	四国汽船	
	宮浦発	宇野着
①	6:00	6:20
②	6:40	7:00
③	7:50	8:10
④	8:52	9:12
⑤	9:52	10:12
⑥	10:25※	10:40
⑦	11:10	11:30
⑧	12:45	13:05
⑨	13:55 高	14:10
⑩	14:55	15:15
⑪	16:02	16:22
⑫	16:40	17:00
⑬	17:40	18:00
⑭	19:02	19:22
⑮	20:25	20:45
⑯	21:15 高	21:30

※…高速旅客船(瀬戸内国際芸術祭 2013 の開催期間中は運休) 高…高速旅客船

【 行き 四国側 】

■高知 → 高松

JR(南風)		JR(いしづち)		待ち 時間	四国 汽船
高知発	多度津		高松着		
	着	発			
6:00	7:42	7:46	8:11	1:04	②
8:01	9:43	10:08	10:36	0:19	④
9:13	10:56	11:21	11:54	0:46	⑤
10:13	11:54	12:22	12:55	2:45	⑥
11:13	12:58	13:23	13:54	1:46	
12:13	13:56	14:23	14:55	0:45	
13:13	14:58	15:23	15:55	2:10	⑦
14:13	15:57	16:24	16:55	1:10	
16:13	17:54	18:26	18:55	1:10	⑧

JR(しまんと)		待ち 時間	四国 汽船
高知発	高松着		
5:00	7:04	1:08	①
7:00	9:20	0:54	③
17:13	19:25	0:40	⑧

■松山 → 高松

JR(しおかぜ)		JR(いしづち, 普通)		待ち 時間	四国 汽船
松山発	多度津		高松着		
	着	発			
6:13	8:14	8:17	8:45	0:30	②
7:18	9:18	9:19※	9:55	0:19	③
8:13	10:15	10:23※	11:05	1:35	⑤
9:22	11:17	11:21	11:54	0:46	
10:22	12:18	12:22	12:55	2:45	⑥
11:26	13:20	13:23	13:54	1:46	
12:27	14:20	14:23	14:55	0:45	
13:21	15:18	15:23	15:55	2:10	⑦
14:23	16:20	16:24	16:55	1:10	
16:22	18:20	18:26	18:55	1:10	⑧

JR(いしづち)		待ち 時間	四国 汽船
松山発	高松着		
5:07	7:37	0:35	①
6:12	8:45	0:30	②
7:20	9:44	0:30	③
8:11	10:36	0:19	④
9:15	11:54	0:46	⑤
10:20	12:55	2:45	⑥
11:24	13:54	1:46	
12:19	14:55	0:45	
13:25	15:55	2:10	⑦
14:23	16:55	1:10	
16:28	18:55	1:10	⑧

※は普通列車

■徳島 → 高松

JR(うずしお)		待ち 時間	四国 汽船
徳島発	高松着		
5:43	6:53	1:19	①
7:00	8:13	1:02	②
8:24	9:31	0:43	③
9:22	10:32	0:23	④
10:28	11:37	1:03	⑤
11:31	12:34	3:06	⑥
12:24	13:31	2:09	
13:28	14:31	1:09	
15:26	16:31	1:34	⑦
16:46	17:44	0:21	
17:29	18:33	1:32	⑧
18:30	19:36	0:29	

	四国汽船	
	高松港発	宮浦港着
①	8:12	9:02
②	9:15	9:40
③	10:14	11:04
④	10:55	11:20
⑤	12:40	13:30
⑥	15:40	16:30
⑦	18:05	18:55
⑧	20:05	20:30

【 帰り 四国側 】

■高松 → 高知

四国 汽船	待ち 時間	JR(いしづち)		JR(南風)	
		高松発	多度津		高知着
			着	発	
①	0:45	8:45	9:05	9:32	11:29
②	0:35	9:40	10:12	10:48	12:28
③	0:40	10:47	11:05	11:44	13:40
④	1:00	11:50	12:10	12:41	14:42
⑤	0:20	12:50	13:21	13:48	15:39
	1:20	13:50	14:08	14:40	16:38
	2:20	14:50	15:22	15:50	17:42
⑥	0:30	15:50	16:09	16:48	18:48
⑦	0:45	16:50	17:23	17:55	19:45
	1:45	17:50	18:22	18:58	20:49
⑧	0:48	18:48	19:06	19:42	21:44
	1:51	19:51	20:09	20:46	22:48
⑨	1:01	20:51	21:09	22:13	0:03

四国 汽船	待ち 時間	JR(しまんと)	
		高松発	高知着
①	0:25	8:25	10:37
⑦	0:19	16:24	18:48
⑨	0:35	20:25	22:48

■高松 → 松山

四国 汽船	待ち 時間	JR(いしづち, しまんと, 普通)		JR(しおかぜ)	
		高松発	多度津		松山着
			着	発	
①	0:25	8:25し	8:49	9:16	11:16
②	0:35	9:40い	10:12	10:25	12:19
	1:05	10:10	10:51	11:06	13:09
④	0:37	11:27	12:15	12:17	14:25
	1:23	12:13	12:43	13:09	15:18
⑤	0:43	13:13	13:44	14:08	16:13
	1:43	14:13	14:43	15:08	17:11
	2:43	15:13	15:44	16:15	18:13
⑦	0:19	16:24し	16:55	17:07	19:12
⑦	1:18	17:23	18:07	18:09	20:25
⑧	0:29	18:29	19:02	19:06	21:04
	1:16	19:16	19:58	20:13	22:15
⑨	0:37	20:27	20:55	21:07	23:03
	2:25	22:15い	22:40	22:41	0:31

四国 汽船	待ち 時間	JR(いしづち)	
		高松発	松山着
①	0:45	8:45	11:14
②	0:35	9:40	12:10
③	0:40	10:47	13:13
④	1:00	11:50	14:12
⑤	0:20	12:50	15:17
	1:20	13:50	16:16
	2:20	14:50	17:24
⑥	0:30	15:50	18:25
⑦	0:45	16:50	19:23
	1:45	17:50	20:25
⑧	0:48	18:48	21:29
	1:51	19:51	22:34
⑨	1:01	20:51	23:28
	2:25	22:15	0:52

■高松 → 徳島

四国 汽船	待ち 時間	JR(うずしお)	
		高松発	徳島着
①	0:23	8:23	9:35
	1:10	9:10	10:17
②	1:05	10:10	11:24
④	0:17	11:07	12:13
	1:16	12:06	13:04
⑤	0:41	13:11	14:16
	1:42	14:12	15:19
	2:42	15:12	16:18
⑥	0:52	16:12	17:15
⑦	1:07	17:12	18:22
⑧	1:12	19:12	20:26
⑨	1:28	21:18	22:32
	2:31	22:21	23:32
	3:39	23:29	0:38

	四国汽船	
	宮浦港発	高松港着
①	7:00	8:00
②	8:40	9:05
③	9:07	10:07
④	10:25	10:50
⑤	11:30	12:30
⑥	14:20	15:20
⑦	15:40	16:05
⑧	17:00	18:00

直島観光案内

★「素顔の直島」ガイドマップダウンロードサイト

http://www.naoshima.net/guide_map/index.html

★地中美術館

<http://www.benesse-artsite.jp/chichu/index.html>

開館時間 10:00～18:00 (最終入館 17:00)

日本生物物理学会第5回中国四国支部大会プログラム

第1日目：5月25日（土）

13:00～17:37 一般講演 講演 10分、質疑応答 2分、交代 1分

18:00～18:50 基調講演 講演 40分、質疑応答 10分

18:50～19:30 全体写真撮影、自由時間

19:30～21:30 懇親会 1

22:00～ 懇親会 2

1-1 13:00～13:13

イオン感応型電界効果トランジスタを用いたマイクロ流路内のバイオフィルム検出

○松浦 宏治^{1,2}, 浅野 友香^{1,2}, 山田 章³, 成瀬 恵治²

(¹岡山大異分野融合先端研究コア, ²岡山大学大学院医歯薬学総合研究科, ³愛知工業大学工学部)

1-2 13:13～13:26

小型・安価な平面パッチクランプ装置の開発

○國安 築, 高橋 賢, 成瀬 恵治

(岡山大学 大学院医歯薬学総合研究科 システム生理学)

1-3 13:26～13:39

リン脂質二重膜のイメージング：蛍光分子の膜内配向で見る膜状態

○後藤 優樹, 玉井 伸岳, 松木 均 (徳島大院ソシオテクノサイエンス研)

1-4 13:39～13:52

タンパク質の超高感度測定法の開発

○伊藤 悦朗 (徳島文理大学・香川薬学部)

1-5 13:52～14:05

多成分蛍光標識法によるがん細胞結合ペプチドの高効率スクリーニング

○宍戸 昌彦, 福田 隆之, 笹本 博美 (岡山大学自然科学研究科)

1-6 14:05~14:18

リポフェクション試薬に代わる遺伝子導入試薬の探索

○小田 真由美, 佐藤 あやの

(岡山大学 大学院自然科学研究科 化学生命専攻 オルガネラシステム制御工学研究室)

14:18~14:33 休憩

1-7 14:33~14:46

固体基板表面にモデル生体膜を集積化する技術の開発

○森垣 憲一 (神戸大学 自然科学系先端融合研究環遺伝子実験センター)

1-8 14:46~14:59

脂質ラフト形成は熱力学的に説明できるのか? - 側方相分離とクラスター形成 -

○玉井 伸岳, 後藤 優樹, 松木 均 (徳島大院ソシオテクノサイエンス研)

1-9 14:59~15:12

麻酔作用のタンパク質受容体仮説の源泉: ホタル発光酵素ルシフェラーゼ

○松木 均¹, 西本 真琴², 後藤 優樹¹, 玉井 伸岳¹

(¹徳島大院ソシオテクノサイエンス研究部, ²和歌山高専物質工学科)

1-10 15:12~15:25

柿渋の病原性因子抑圧効果

○森田 愛, 相沢 慎一 (県立広島大学)

1-11 15:25~15:38

海洋性バクテリア *Vibrio fischeri* のべん毛タンパク質構成について

○田崎 梨佳, 相沢 慎一 (県立広島大学)

1-12 15:38~15:51

サルモネラ菌温度感受性 *flgE* 変異株のフックの長さ制御

○内田 薫, 道野 宏平, 相沢 慎一 (県立広島大学)

1-13 15:51~16:04

C リング変異株のフックの長さ制御について

○山崎 達哉, 内田 薫, 相沢 慎一 (県立広島大学)

16:04~16:19 休憩

1-14 16:19~16:32

Mechanochemical regulation of actin dynamics by a Dynamin 1 / Cortactin ring complex

○Hiroshi Yamada, Tadashi Abe, Kohji Takei (岡山大院・医歯薬・生化学)

1-15 16:32~16:45

遺伝子の過剰発現に対する細胞システムのロバストネスを測る

○守屋 央朗 (岡山大学異分野融合先端研究コア)

1-16 16:45~16:58

膜タンパクはいかにして力に応じるか?—粗視化分子動力学シミュレーション研究

○高橋 賢¹, 猿渡 和也², 戸田 憲作², 成瀬 恵治¹

(¹岡山大学医歯薬学総合研究科, ²岡山大学医学部)

1-17 16:58~17:11

基質伸展刺激下で細胞性粘菌アメーバはミオシン2を介して運動方向を決定する

○岩楯 好昭¹, 沖村 千夏¹, 佐藤 克也², 中島 雄太³, 辻岡 政経⁴, 南 和幸³

(¹山口大・理, ²徳島大・工, ³山口大・工, ⁴東京医科歯科・難治研)

1-18 17:11~17:24

ホヤ幼生の光受容から筋肉の駆動までの特異的神経経路の特定

○津田 基之¹, 堀江 健生², 川上 功¹, 岩崎 孝則¹, 吉原 良浩³, 日下部 岳広⁴

(¹兵庫県立大生命, ²筑波大臨海, ³理化学研究所, ⁴甲南大理工)

1-19 17:24~17:37

ヒスタミン H1 受容体発現ニューロンの摂食調節における機能の解明をめざした Cre recombinase 発現遺伝子改変マウスの作製

○堀尾 修平 (徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部分子情報薬理学)

17:37～18:00 休憩

基調講演 18:00～18:50

細胞力覚の多様性とアクチン細胞骨格の関係

曾我部 正博 (名古屋大学・大学院医学系研究科)

18:50～19:30 全体写真撮影、自由時間

19:30～21:30 懇親会 1

22:00～ 懇親会 2

ダウラギリ眺望とネパールの学校との交流

香川 弘昭 (岡山大学)

第2日目：5月26日（日）

9:00～11:49 一般講演 講演10分、質疑応答2分、交代1分

11:50～13:00 総会

2-1 9:00～9:13

高度好塩菌由来ジヒドロ葉酸還元酵素の構造と機能に対する塩の効果

○宮下 由里奈¹, 大前 英司¹, 仲宗 根薫², 楯 真一¹ (¹広大院理, ²近大工)

2-2 9:13～9:26

ジヒドロ葉酸還元酵素の構造及び安定性に対する水和とキャビティーの寄与

○西田 直哉, 大前 英司, 楯 真一 (広島大学大学院理学研究科)

2-3 9:26～9:39

ヒストンシャペロン ANP32B の核磁気共鳴法を用いた構造および機能解析

○栃尾 尚哉^{1,3}, 梅原 崇史², 木川 隆則², 横山 茂之², 楯 真一^{1,3}

(¹広島大学院・数理分子生命理学, ²理化学研究所・横浜, ³広島大学・クロマチン動態数理研究拠点)

2-4 9:39～9:52

クロマチンリモデリング因子 FACT の天然変性領域に対するリン酸化による DNA 結合制御機構

○楯 真一^{1,3}, 橋本 愛美¹, 津中 康央², 森川 耿右², 藤井 雅史¹, 栗津 暁紀^{1,3}

(¹広島大学・院理・数理分子, ²京都大学・iCeMS, ³広島大学・クロマチン動態数理研究拠点)

2-5 9:52～10:05

仮性結核菌由来ヘム獲得蛋白質 HasA の結晶構造解析による新規ヘム結合様式の解明

○金谷 雅弘¹, 室木 俊毅², 石丸 幸絵², 和田 百希¹, 佐藤 豪洋³, 小崎 紳一³, 日野 智也¹, 永野 真吾¹

(¹鳥取大院・工, ²鳥取大・工, ³山口大・農)

2-6 10:05～10:18

異なる生物種由来のヘムオキシゲナーゼ活性の微調節機構

○右田 たい子, 高田 さゆり (山口大・農・生物機能)

10:18～10:33 休憩

2-7 10:33～10:46

プロテオロドプシンの低 pH 条件下で起こるプロトン放出

○田母神 淳¹, 菊川 峰志², 奈良 敏文¹, 下野 和実³, 出村 誠², 加茂 直樹²
(¹松山大薬学部, ²北大生命科学院, ³東邦大薬学部)

2-8 10:46～10:59

大腸菌多剤排出系 **EmrE** の結晶構造に関する考察：細胞内外の向きを決める

○奈良 敏文¹, 根来 信敬¹, 田母神 淳¹, 加茂 直樹²
(¹松山大・薬学部, ²北大・生命科学院)

2-9 10:59～11:12

インフルエンザウイルス RNA 合成酵素におけるアセチル化能の構造機能学的解析

○畠山 大¹, 庄司 正樹¹, 廣田 丈典¹, 柳澤 伸¹, 長江 萌菜美¹, 山吉 誠也²,
河岡 義裕², 葛原 隆¹
(¹徳島文理大・薬・生化学, ²東大・医科研・ウイルス感染分野)

2-10 11:12～11:25

哺乳類ミトコンドリアのリン酸輸送担体の酵母における機能的発現

○山越 亮平^{1,2}, 山本 武範¹, 篠原 康雄^{1,2} (¹徳島大疾患プロテオゲノム研, ²徳島大院薬)

2-11 11:25～11:38

持続伸展刺激による単離心筋細胞のカルシウム流入機構への機械感受性AT1受容体の関与

○山口 陽平, 金子 智之, 成瀬 恵治, 入部 玄太郎
(岡山大学大学院医歯薬学総合研究科システム生理学)

2-12 11:38～11:49

伸展刺激誘発性カルシウムスパーク増加におけるミトコンドリアの役割

○入部 玄太郎, 貝原 恵子, 成瀬 恵治
(岡山大学大学院医歯薬学総合研究科システム生理学)

12:00～13:00 総会

講演要旨集

イオン感応型電界効果トランジスタを用いた
マイクロ流路内のバイオフィーム検出○松浦 宏治^{1,2*}, 浅野 友香^{1,2}, 山田 章³, 成瀬 恵治²¹岡山大学異分野融合先端研究コア, ²岡山大学大学院医歯薬学総合研究科,
³愛知工業大学工学部)

* kojimatu@md.okayama-u.ac.jp

細胞培養時には細胞代謝に伴い細胞外へ物質が分泌されるために培養液の pH が変化する。この pH を測定することによって細胞の状態を評価できる。微小流体の pH 計測に適しているイオン感応型電界効果トランジスタ (ISFET) では、五酸化タンタル等で被覆されたゲート電極に溶液中の水素イオンが相互作用することによって、ソース・ドレイン電極間の電圧 (V_{DS}) が変化する。 V_{DS} 変化と pH には直線関係があるために、 V_{DS} の計測によって検体内の pH が分かる (図 A)。培養液の pH 計測で細胞の代謝活性を評価し、細胞の状態を判別することができる。現在、ISFET センサを用いて哺乳細胞の解糖および呼吸活性測定系が完成している^[1]。

従来、培養液内の細菌数を推測するためには濁度を計測するが、直径 1 mm 以下の微細配管内では濁度測定は難しい。そのため、マイクロ流路内のバイオフィーム形成を濁度で評価することは困難である。そこで、マイクロ流路内で培養した細菌懸濁液の 20 μ l を採取し、ISFET センサ (図 B) で pH 変化を測定した (図 C)。その際、流路底面に形成した *Micrococcus luteus* のバイオフィームをクリスタルバイオレッド染色し、顕微観察 (図 D) することで、懸濁液内の pH とバイオフィーム形成との関係を調べた。2 日間培養後に懸濁液内の pH が上昇した際に、マイクロ流路内のバイオフィームの形成が確認された^[2]。培養液のアルカリ化後に細菌の代謝物質濃度上昇に伴ってバイオフィームが増加したと考えられる。ISFET センサで培養液のアルカリ化を検出することにより、食品工業プラント配管内のバイオフィーム形成を検出できる。半日以上の長時間計測では電圧値が経時変化するために、pH 校正を数時間おきに行う必要がある。現在、pH 校正も含めた自動流体制御・計測システム開発を進めている。

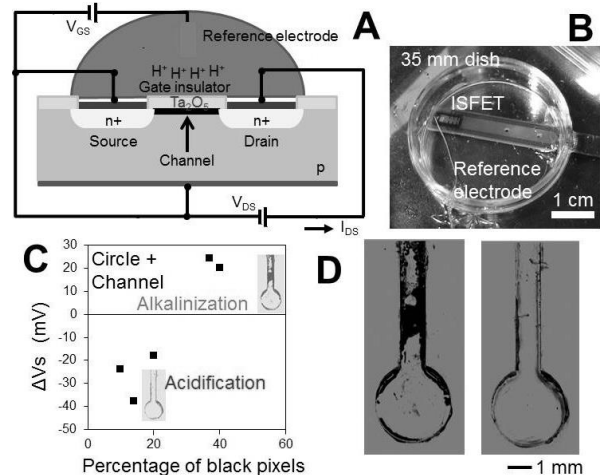


図 (A) pH 応答型 ISFET のデバイス機構 (B) 本研究で用いた ISFET センサ (C) 染色されたバイオフィームの面積 (流路内の黒い部分の割合) と電位差との関係 (D) 左: 培養液がアルカリ化した場合の染色後の流路底面、右: 培養液が酸性化した場合の流路底面

参考文献

[1] Mohri, S.; Yamada, A.; Goda, N.; Nakamura, M.; Naruse, K.; Kajiya, F. *Sens. Actuators B Chem.* **2008**, *134*, 447–450.

[2] Matsuura, K.; Asano, Y.; Yamada, A.; Naruse, K. *Sensors* **2013**, *13*, 2484–2493.

小型・安価な平面パッチクランプ装置の開発

○國安 築*, 高橋 賢, 成瀬 恵治

(岡山大学 大学院医歯薬学総合研究科 システム生理学)

* pn134lix@s.okayama-u.ac.jp

パッチクランプ法は筋や神経などの様々な細胞のイオンチャネル電流を記録する方法として幅広い分野で標準的な実験方法である。しかし、従来のガラス電極を用いた方法は顕微鏡や制振台などの大掛かりな設備や実験者の高度な技術が必要であり、実施に大きな障壁がある。本研究の目的は、小型で安価、かつ実験者の高度な技術を必要としない平面パッチクランプ装置の開発である。小型のケース中にシリコン樹脂製の平面電極（特許番号：4899051）及びヘッドステージを配置して記録システムを作成した。機械感受性イオンチャネル SAKCA を発現させたヒト胎児腎臓由来細胞 HEK293 を用いた実験では、slope conductance 273.7 pS の SAKCA 電流記録が正確に再現され、さらに陰圧による圧感受性応答の記録に成功した。cell attached 記録時のシール抵抗は最大 13.5 GΩ の高値を示し、低ノイズ記録が可能であることが確認された。またラット心筋由来細胞 H9c2 を用いたイオンチャネル電流の記録にも成功した。今後 whole cell 記録の方法を確立することにより、パッチクランプ実験が飛躍的に簡単に行えることが期待される。

リン脂質二重膜のイメージング：蛍光分子の膜内配向で見る膜状態

○後藤優樹*, 玉井伸岳, 松木 均
(徳島大院ソシオテクノサイエンス研)
* goto@bio.tokushima-u.ac.jp

【緒言】リン脂質を水中に分散させるとベシクルあるいはリポソームと呼ばれる閉鎖型の二重膜小胞体を形成する。このリン脂質二重膜の微視的な情報を得るには NMR や X 線・中性子回折などの手法の他、膜内に取り込ませた蛍光プローブの挙動を追跡する蛍光法もよく行われている。しかしながら、蛍光法では、その目的に応じて疎水性と親水性、双方のプローブを使い分ける必要があり、単一の蛍光プローブにより両方の環境の情報を得ることは困難である。我々は、リン脂質二重膜内の様々な微視的環境変化に応答可能なプローブである Prodan を見出し、この単一の蛍光プローブによるリン脂質二重膜の特徴づけを行っている。その成果の一部は以前の本学会において紹介した。今回は、Prodan の蛍光スペクトルに基づいたホスファチジルコリン (PC) 二重膜のイメージングの原理とその解析手法、およびイメージマップ (PC 二重膜内における Prodan 分子の配向図) の変化から見えてくる PC 二重膜の多様な膜状態について、最近の結果も含めて説明する。

【実験】Prodan を含有した PC 脂質 (濃度 1 mmol kg^{-1} 、PC と Prodan の濃度比 500 : 1) のベシクル懸濁液をバンガム法および超音波法で調製した。蛍光スペクトルは、試料室にシン・コーポレーション社製石英窓付き高圧セル (PCI-400) を備え付けた日立社製蛍光分光光度計 (F-2500) を用い、励起波長 361 nm、蛍光波長 400 から 600 nm の範囲で、温度および圧力の関数として測定した。蛍光スペクトルの解析は装置付属のソフトウェア FL-solutions および Origin 7 (ライトストーン社) で行った。また 3 次元イメージマップの作成には SigmaPlot 12 (HULINKS 社) を使用した。

【結果と考察】我々がこれまでに構築した種々の PC 二重膜の温度-圧力相図に基づいて蛍光測定を行った。得られた Prodan の蛍光スペクトルに対してその二次微分スペクトルを求め、各測定温度間あるいは圧力間を補間しながらスペクトルの強度変化を色彩化し、波長、強度、温度に対して 3 次元プロットすることで、PC 二重膜の膜状態に対するイメージマップを作成した。Prodan 分子の分配や配向は、イメージマップ上における青色の谷の部分で見積もることができ、この谷部の変化は、PC 二重膜の膜状態変化に関連づけられる。PC 分子の疎水基構造の変化 (アシル鎖長、鎖非対称性) およびベシクルサイズの差違が PC 二重膜の膜状態 (膜内 PC 分子の充填構造) におよぼす影響についてイメージマップを用いて述べる。また、近年、このイメージング手法を低温下における PC 二重膜の最安定相として知られているサブゲル (L_c) 相に適用することにより見えてきた L_c 相の興味ある膜内充填構造についても説明する。

References:

- [1] M. Goto, et al. *Langmuir* **26** (2010) 13377-13384.
- [2] M. Goto, et al. *Langmuir* **28** (2012) 12191-12198.
- [3] 後藤優樹, 高圧力の科学と技術 **23** (2013) 印刷中.

タンパク質の超高感度測定法の開発

伊藤悦朗

(徳島文理大学・香川薬学部)

eito@kph.bunri-u.ac.jp

疾病の診断ならびに進行度の決定において、ターゲットと目される遺伝子が発現した状態であるmRNAの量的変化を調べることが、一つの重要な方法であることは間違いない。しかし多くの疾病の場合、その原因となる分子はタンパク質またはペプチドであるが、さすがにタンパク質を増幅する術はない。すなわち、微量のタンパク質を増幅することによって定量測定することができないのが現状である。タンパク質の検出検査を行う一つの方法は、ELISA法 (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) である。ELISA法は特異性の高い抗原抗体反応を利用し、酵素反応に基づく発色 (または発光) をシグナルとして検出する。そこで一般的には、ELISA法で得られる微弱なシグナルの検出に努めることになる。

「タンパク質は増幅できない、かつシグナルは微弱である」という二つを考慮した場合、それならばいっそのこと「シグナルを増幅すれば良い」という考えが出てくる。このアイデアがわれわれの研究開発の原点にある。ELISA法から出てくるシグナルを、いかに増幅するのか?これを解決するのが酵素サイクリング法である。酵素サイクリング法は、複数種または単数種の酵素を用いることによって、正反応と逆反応を起こさせて (すなわちサイクリングさせて)、基質を消費することなくシグナル物質を増幅する方法である。

ここでひとつ面白いことに着目していただきたい。ELISA法から出てくるシグナルは、測定時間に対して線形である。つまり1次関数となる。一方で、酵素サイクリング法も得られるシグナルは、実は測定時間に対して線形である。ところがこのELISA法と酵素サイクリング法とを組み合わせると、シグナルは反応時間に対して2次関数的に (または幾何級数的に) 変化する。これが、われわれが開発している超高感度測定法の本質である。もう少し平易に表現すると、時間が経つにつれて、吸光度を測定するシグナル分子は、1個、1+2個、(1+2)+3個、(1+2+3)+4個・・・と増幅する。すなわち、短時間で急激なシグナル物質の増幅が望める。

現在のところ、アルカリホスファターゼなどの標識酵素単体では 10^{-20} mol、またペプチドのモデル分子としてインスリンを測定した場合は**検出限界が 10^{-19} mol**まで行くことがわかっている。通常の高感度と称するELISA法が 10^{-15} とか 10^{-16} mol程度に留まっていることを考えると、われわれの方法が「**超高感度**」に近づいていることがわかる。

本方法によって超高感度測定が可能となると、最初に述べた疾患の診断ならびに進行度の決定で威力を発揮するほか、すでに検査方法が確立されている検査項目も、そのサンプル量が微量で済むため、患者に優しい診断方法を提供できる。また血液ではなく、タンパク質の含有量が少ない唾液や尿での検査も可能となる。さらには医用分野において、mRNAは存在するものの、その翻訳がRNA結合タンパク質などによって抑制されており、結局、ターゲットであるタンパク質そのものを測定するしかない場合にも、われわれの方法は重要な研究ツールとなるであろう。

参考文献：伊藤悦朗、渡部聡、タンパク質超高感度測定法の開発 —ELISA 法と酵素サイクリング法との組み合わせの試み—、臨床病理、60: 1088-1093 (2012)

多成分蛍光標識法によるがん細胞結合ペプチドの高効率スクリーニング

○宍戸昌彦^{1*}, 福田隆之¹, 笹本博美¹

(1岡山大学自然科学研究科)

* sisido@cc.okayama-u.ac.jp

はじめに： がんの分子標的薬は、がん細胞中や細胞表面上に存在する特定の蛋白質などとだけ結合し、その機能を抑えるものである。これらの登場はがんの作用機構の解明と、その中で重要な役割をする蛋白質の構造解析などに代表される、生化学、分子生物学、構造生物学の成果である。しかし、これらの薬剤をどのようにして体内のがん組織周辺にのみ輸送するかについては、まだ大きな課題として残されている。近年話題になっているEPR効果によるがん組織への薬剤集積は、転移初期のがんには有効ではないと予想されるし、またすべてのがんに有効というわけでもない。がん組織へ特異的に結合するペプチドが見出せれば薬物輸送に有効であるばかりでなく、PET法等による診断にも利用できる。

がん細胞結合ペプチドのスクリーニング： アミノ酸8-12程度のペプチドは、化学合成で容易にライブラリーが構築できる。また20種類の天然アミノ酸だけでなく種々の非天然アミノ酸も導入できるので、ライブラリーの化学的多様性が広くできる利点がある。本研究ではペプチドが細胞内で分解することを避けるため、8個のDアミノ酸からなる合成ペプチドライブラリーを用いた。A431およびMCF7がん細胞をそれぞれ異なる部位に移植したマウスを作製し、ペプチドライブラリーを混合物のままマウスに静脈注射し、それぞれのがん組織を取り出し、それらに最も多く結合しているペプチドを同定した。

多成分蛍光標識法： このスクリーニングで最も大きな問題は、いかにしてがん細胞に結合しているペプチドを同定するかである。マウスを解体してがん組織を取り出し、細胞を洗浄し、破碎し、メタノールでペプチドを溶出させる。この溶出液中のペプチドは混合物であり、また極微量なので通常の方法での同定は困難である。そこで本研究ではペプチドライブラリーをサブライブラリーに分割し、それぞれのサブライブラリーごとに異なる蛍光基を標識することで、サブライブラリーを識別できるようにした。種々の検討の結果、用いた蛍光基は7種類となった。種々の蛍光基を側鎖に持つアミノ酸誘導体（渡辺化学工業）をペプチド合成に組み込むことで、各ペプチドを標識した。7種類の蛍光基を一度の蛍光測定で同定・定量するため、励起波長320-680nm、蛍光波長340-700 nmの範囲の2次元蛍光スペクトル測定装置を設計、製作し（PhotonDesign社）、得られた2次元スペクトルの最小二乗解析によって各蛍光基、すなわち各サブライブラリーのがん細胞結合量を求めた。

この方法の特徴、利点と欠点： 本スクリーニングでは2種類のがん組織を同時移植し、それらにペプチド混合物を接触させている。そのため、各ペプチドにとってどちらの種類のがんに強く結合するかの競争になっている。さらにペプチドを7種類同時導入することにより、各がん細胞に対してどのペプチドが良く結合するかの競争になっている。このように2重競争になっていることで、インビボスクリーニングでありながら極めて再現性や効率が良いスクリーニングになっている。もうひとつの特徴は、本スクリーニングでは「がん細胞」そのものが標的であり、特定の蛋白質を標的としているのではない。これは「化学生物学」方法であり、標的はペプチドが見出されてから同定するという立場である。

結果： 当日報告する。

リポフェクション試薬に代わる遺伝子導入試薬の探索

○小田 真由美^{1*}, 佐藤 あやの¹¹岡山大学 大学院自然科学研究科 化学生命専攻 オルガネラシステム制御工学研究室)

* en421714@s.okayama-u.ac.jp

遺伝子導入は、細胞に特定の遺伝子 DNA を人為的に導入し、新しい遺伝的な特徴を持つ細胞や個体を作製する、バイオテクノロジーにおいて重要な技術である。遺伝子導入法には、リン酸カルシウム法、エレクトロポレーション法、マイクロインジェクション法、リポフェクション法、DEAE-デキストラン法、プロトプラスト融合法、ウイルス法などがある。これらのうちリポフェクション法は、遺伝子の導入効率が高く、操作が比較的容易なため、広く用いられる。しかし、リポフェクション法で用いられる遺伝子導入試薬は、一般に高価であり、遺伝子組み換えタンパク質の大量発現などを目的とした遺伝子導入には適さない。本研究は、高価な試薬を用いるリポフェクション法に代わる、安価なカチオン性ポリマーとポリマーA(未発表)を用いた遺伝子導入法を開発し、さらに最適な条件を確立することを目的とした。

ヒト不死化網膜色素上皮細胞 (hTert-RPE1)とアフリカミドリザル腎臓由来の COS7 細胞に、以下の五つの試薬を用いて蛍光タンパク質遺伝子を導入した：X-treme GENE HP DNA transfection reagent (Roche), Polybrene (MERCK), Polyethylenimine branched transfection reagent (PEI, Sigma-ALDRICH), Polyethylenimine “Max”-High Potency Linear PEI (PEI-Max, Polysciences), ポリマーA。試薬と遺伝子 DNA の量比を変化させることにより、様々な条件で、遺伝子の導入効率を調べた。また、それぞれの条件における細胞毒性を評価した。リポフェクション法である X-treme GENE HP を用いた遺伝子導入効率と比較すると、その効率の序列は、X-treme GENE HP ≒ PEI-Max > Polybrene > PEI > ポリマーA であり、費用対効果が最も高かったのは、PEI-Max であった。

これに対して、細胞毒性を、試薬と遺伝子 DNA 複合体の添加後の細胞生存率として評価した場合、ポリマーA < PEI-Max ≒ PEI < X-treme GENE HP の順に高くなった。今後は、他の細胞株を用いて、決定した最適な条件に一般性があるかを明らかにしていきたい。さらに、ポリマーA 誘導体(カチオン性)を合成して、誘導体による遺伝子の導入効率と細胞毒性を評価していきたい。

固体基板表面にモデル生体膜を集積化する技術の開発

○森垣憲一^{1*}¹神戸大学 自然科学系先端融合研究環境遺伝子実験センター)

* morigaki@port.kobe-u.ac.jp

生体膜は、細胞において外部環境との境界をなし、情報伝達、エネルギーの変換、防御などの重要な機能を担うインターフェースである。そのため、現在使用されている薬の約半分は、膜結合型タンパク質をターゲットにしていると言われている。我々は、生体膜の構造と機能を模したモデル生体膜をシリコンやガラスなどの固体基板表面に作製し、生体膜と環境中の物質、食品中化合物、薬物などとの相互作用を精密に再現できるシステムの創製を試みている。そのため、光リソグラフィ技術でパターン化重合したポリマー脂質膜と、生体膜と同等の構造・物性を持つ流動性脂質膜をハイブリッド化したモデル生体膜をこれまで開発してきた^{1,2}。この手法では、流動性脂質膜が生体膜モデルとしての役割を果たし、ポリマー脂質膜は流動性脂質膜を一定の区画に取り込み安定化する枠組みとして機能する。本研究では、モデル生体膜を3次元構造に拡張する手法を開発した。親水部位に化学反応性基（エタノールアミン）を持った脂質を用いて、ポリマー脂質二分子膜を形成し、脂質膜表面に生体分子を化学修飾することを試みた。ポリマー脂質膜の表面に生体機能性分子を付加することで、パターン化モデル生体膜を基盤材料とした、新しい生体膜機能性界面を構築することが可能になった³。

また、モデル生体膜を基板面上に集積化することを目的とし、インクジェット塗布技術を用いた脂質膜作製技術を開発した。インクジェット塗布技術は微小領域に液体を塗布することが可能である。トレハロース、アガロースを含んだ水溶液をあらかじめパターン化ポリマー脂質膜の区画に塗布し、同じ位置に脂質溶液を塗布する二段階塗布方法を採用することにより、流動性を持った脂質二分子膜を区画内に形成することができた。そして、パターン化モデル生体膜に複数種の脂質二分子膜を集積化することに成功した⁴。

多種類の生体膜成分を固体基板面上にパターン化・集積化し、エラストマーなどの高分子材料からなる微細構造体と融合することで、複雑な生体膜機能を再現できるバイオ素子の実現につながるものと期待される。

【参考文献】

- (1) Morigaki, K.; Baumgart, T.; Offenhäusser, A.; Knoll, W. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2001**, *40*, 172-174.
- (2) Okazaki, T.; Inaba, T.; Tatsu, Y.; Tero, R.; Urisu, T.; Morigaki, K. *Langmuir* **2009**, *25*, 345-351.
- (3) Morigaki, K.; Mizutani, K.; Saito, M.; Okazaki, T.; Nakajima, Y.; Tatsu, Y.; Imaishi, H. *Langmuir* **2013**, *29*, 2722-2730.
- (4) Yamada, M.; Imaishi, H.; Morigaki, K. *Langmuir* **2013**, In press.

脂質ラフト形成は熱力学的に説明できるのか？

— 側方相分離とクラスター形成 —

○玉井伸岳*, 後藤優樹, 松木 均
(徳島大院ソシオテクノサイエンス研)

* tamai@bio.tokushima-u.ac.jp

細胞膜は、脂質や膜タンパク質など多種多様な生体分子から構成される多成分系分子集合体であり、その基本構造は両親媒性分子であるリン脂質が水性環境下で自発的に形成する二分子膜である。SimonsとIkonen [1]が新たな細胞膜モデルを提唱して以来、現在、細胞膜は本質的に不均一な構造を有していると一般的に考えられている。彼らのモデルによれば、細胞膜中には、ある種のリン脂質とコレステロールから形成されるラフトと呼ばれるマイクロドメインが含まれており、シグナル伝達など重要な細胞機能の発現のためのプラットフォームとして機能すると考えられている。

コレステロールがリン脂質二分子膜の構造や物性におよぼす影響は、モデル膜を利用して古くから研究されてきた。コレステロールを含まない一成分系のリン脂質二分子膜では、温度変化に伴って、リン脂質分子の炭化水素鎖の融解 (*trans-gauche* コンホメーション変化) に起因した構造変化、すなわち相転移を明確に示す[2]。これとは対照的に、コレステロールを含む二成分リン脂質混合二分子膜では、コレステロール含有量の増加に伴い、相転移が徐々に不明瞭になり、最終的に相転移が観測されなくなる。これは、炭化水素鎖が全て *trans* コンホメーションの状態 (秩序固体相: S_0 相) にコレステロールが取り込まれると、膜中での脂質分子の充填が乱され、膜の流動性が上昇する一方で、炭化水素鎖が *gauche* コンホメーションを含むいわゆる融解した状態 (無秩序液体相: L_d 相) に対しては、コレステロールは周辺のリン脂質分子の炭化水素鎖の揺らぎを抑制し、脂質分子の側方拡散を低下させ、結果として膜中での脂質分子の充填状態を向上させることに起因する。最終的に、コレステロール含有量がある一定以上になると、 S_0 相と L_d 相の中間的な性質を持つ第三の膜状態 (秩序液体相: L_o 相) が誘起される[3]。これまで、コレステロール組成依存的なリン脂質混合二分子膜の相挙動を相図上で明確に規定しようとする試みが数多くなされてきたが、この二相的なコレステロール効果のため、現在においても未だに統一的な見解を得るには至っていない[4]。

このような背景を踏まえ、我々は、種々のステロールがリン脂質二分子膜の相挙動におよぼす影響を、相図の観点から明確にすることを目指し、これまでリン脂質-ステロール混合二分子膜系の研究を系統的に進めてきた。本発表では、リン脂質二分子膜におよぼすコレステロール効果について、この数年間に得られた成果に基づく我々の考え方を、熱力学的観点から包括的に説明する。

References:

- [1] K. Simons, E. Ikonen, *Nature* **387** (1997) 569.
- [2] H. Ichimori et al., *Biochim. Biophys. Acta* **1414** (1998) 165.
- [3] J. H. Ipsen et al., *Biochim. Biophys. Acta* **905**(1987) 162.
- [4] D. Marsh, *Biochim. Biophys. Acta* **1978** (2010) 95.

麻酔作用のタンパク質受容体仮説の源泉：ホタル発光酵素ルシフェラーゼ

○松木 均^{1*}, 西本真琴², 後藤優樹¹, 玉井伸岳¹¹徳島大院ソシオテクノサイエンス研究部, ²和歌山高専物質工学科)

* matsuki@bio.tokushima-u.ac.jp

麻酔薬の作用メカニズムは、その発見から約150年以上経過した現在においても未だに解明されていない。20世紀初頭に見出された麻酔薬のオリーブ油への溶解度とその麻酔ポテンシー（強度）との間には良い相関があると言うMeyer-Overtonの法則以来、麻酔薬の発現場は生体膜に特定され、これまでに様々な麻酔理論が提唱されている。これら理論の中でも、麻酔薬が膜タンパク質に特異的に結合しその作用を発現とするタンパク質受容体説と呼ばれる仮説と、膜脂質に非特異的に結合することで膜内マトリックスに摂動を引き起こし、膜タンパク質に二次的に影響をおよぼし発現とする脂質膜説と呼ばれる仮説は、過去より論争を続けてきた。最近の麻酔理論は、生命科学（タンパク質・遺伝子工学）技術の進歩を背景にタンパク受容体説が麻酔メカニズム研究の中で隆盛となり、麻酔作用はある特定の膜内受容体（ニコチン性アセチルコリン受容体やGABA_A受容体など）に結合する受容体薬物であるという見解が一般に受け入れられている。しかしながら、麻酔薬が一般の薬物に比べ1000倍以上大きな作用濃度を持ち、且つその分子形状に構造特異性が見られないことなどを考える時、麻酔作用は本当に特異的な相互作用から起こるのだろうか。そもそも、このタンパク質受容体仮説の起源は、ホタル発光酵素ルシフェラーゼ（FFL）と言う水溶性のタンパク質が示した高い麻酔薬感受性にある。

1965年、米国ユタ大学の上田は、臨床濃度の麻酔薬により阻害を受ける初めてのタンパク質としてFFLを見出した。上田らはFFLに対する吸入麻酔薬の阻害様式を発光阻害から分光学的に追跡し、麻酔薬はFFLに非拮抗的に結合し発光を阻害することを主張したが、1984年に英国インペリアルカレッジのFranksとLiebが麻酔薬はFFLの基質であるルシフェリンの結合部位に特異的に結合し発光を阻害することを主張し、論争となった。その後、上田らはFFLの基質であるルシフェリンの競合阻害剤を用いた研究で麻酔薬結合の非拮抗性を主張し、対するFranksとLiebはFFL上においては麻酔作用の圧力拮抗現象は観測されないことや、FFL-麻酔薬複合体のX線結晶構造解析によりFFL上の麻酔薬結合部位が特定できたことなどにより麻酔薬結合の拮抗性を主張し、両者の間でFFLに対する麻酔作用の論争が続けられた。結局のところ、FFLに対する麻酔薬の作用様式についての最終的な決着はつかなかったが、当時使用されていたFFLの精製純度の問題に加え、上述した生命科学技術の発展の流れの中で、FFLは麻酔薬と特異的に結合するタンパク質の例証として徐々に認知されるようになった。現在の麻酔メカニズム研究においては、FFLは麻酔薬結合部位を有する最も代表的なタンパク質として見なされている。

今回は、麻酔作用のモデルタンパク質としてのFFLの歴史的な変遷と現在の位置づけ、および最近、我々が取り組みだしたFFLを用いた麻酔メカニズム研究について紹介する。

渋柿の病原性因子抑制効果

○森田 愛¹, 相沢 慎一^{1*}(¹ 県立広島大学)

* aizawa@pu-hiroshima.ac.jp

(目的) 抗菌とは一般に細菌を増殖させないことを指す。渋柿には抗菌作用があるといわれており、古くから石鹸や防カビ剤等に使用されている。しかし、渋柿の抗菌作用の詳しいメカニズムについてはわかっていない。サルモネラ菌は病原性因子を分泌することが知られている。そこで、広島県の代表的な渋柿である西条柿のエキスを、サルモネラ菌の培養液に添加し、サルモネラ菌の外分泌タンパク質と渋柿エキスとの関係を調べた。また、抗菌作用として働いている物質の実体を調べるために本研究を行った。

(方法) 県立広島大学果樹園内において採取した西条柿をコンプレッサーで圧搾し、エキスを採取した。採取したエキスから種子や果実を除くために遠心分離した上清を、サルモネラ菌の培養液に添加して培養した。培養液上清中の外分泌タンパク質をトリクロロ酢酸 (以下 TCA と略記する) 沈殿法によって回収し、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動法 (以下 SDS-PAGE と略記する) による解析を行った。渋柿エキスを添加して培養したサルモネラ菌に透過圧ショックをかけ、透過型電子顕微鏡でサルモネラ菌の病原性因子分泌装置であるニードル複合体の探索を行った。また、渋柿エキスの抗菌作用物質の性質を調べるために、カラムクロマトグラフィーを用いて溶媒分離を行った。分離した各化合物をサルモネラ菌の培養液に添加して TCA 沈殿法および SDS-PAGE によって外分泌タンパク質量の変化を解析した。

(結果・考察) 渋柿エキスの添加によるサルモネラ菌の増殖阻害はみられなかった。しかし、TCA 沈殿法および SDS-PAGE による解析から、渋柿エキスにはサルモネラ菌の病原性因子の分泌を抑制することがわかった。透過型電子顕微鏡観察の結果、渋柿エキスを添加したものではニードル複合体の構築が阻害されていた。カラムクロマトグラフィーで分離したところ、渋柿エキスに含まれる、二重結合を多く持つ物質に病原性因子の分泌を抑制する作用があることがわかった。このことから渋柿エキスには、サルモネラ菌のニードル複合体の構築を阻害し、病原性因子の分泌を抑制する作用があり、その有効成分は二重結合を多く持つ物質であるということがわかった。以上の結果から、渋柿エキスの抗菌性は、細菌の増殖抑制はしないが、細菌の病原性因子の分泌を抑制するという新しいメカニズムがあることが示唆された。

海洋性バクテリア *Vibrio fischeri* のべん毛タンパク質構成について

○田崎 梨佳¹, 相沢 慎一¹
(¹県立広島大学)

* q005062me@pu-hiroshima.ac.jp

運動性細菌の多くは、らせん状のべん毛を回転させることで推進力を得ている。べん毛はモーターにあたる基部体、モーターに回転力を伝えるユニバーサルジョイントのフック、尻尾のスクリューにあたるフィラメントに区別できる。フィラメントは通常1種類のフラジェリンと呼ばれるタンパク質で構築されている。

本研究で用いた海洋性のグラム陰性細菌 *Vibrio fischeri* は、イカなどに共生する発光細菌であり、極べん毛を4~7本有して海水中を泳ぐことができる。そのべん毛フィラメントの構築には *flaA, B, C, D, E, F* の6種類のフラジェリン遺伝子が関与している。なぜ複数のフラジェリンが必要なのか? 形態や物理化学的性質はほかのべん毛フィラメントとどう違うのか? これらの謎を解明するために、*Vibrio fischeri* の野生株と、*flaA, C, D* の3種類のフラジェリン遺伝子を欠損させた変異株(米国ハワイ大学の Ruby 教授から提供された)のべん毛構造を解析し比較した。

Vibrio fischeri の培養は海水に近い組成の TB-SW 培地で行った。野生株および変異株の増殖を観察して細菌の増殖率を調べ、さらに暗視野顕微鏡でべん毛運動を観察するとともに、電子顕微鏡でべん毛形態を観察した。その結果、培養後3~5時間でもっとも増殖が早く、かつべん毛を有して活発に動いていることがわかった。また *flaA, C* 欠損変異株は時間の経過とともにべん毛が抜け落ちたが、野生株と *flaD* 欠損変異株のべん毛は時間が経過しても抜けなかった。次に、べん毛フィラメントを単離、精製し、SDS-ポリアクリルアミド電気泳動法でフラジェリンの分子量を決定した。これらの結果を元に、環境変化によるフィラメントの形態変化などを議論する。

サルモネラ菌温度感受性 *flgE* 変異株のフックの長さ制御

○内田 薫^{1*}, 道野 宏平¹, 相沢 慎一¹
(¹ 県立広島大学)

* q131001bw@pu-hiroshima.ac.jp

多くの細菌はべん毛を使って運動している。べん毛構造は基部体、フック、フィラメントから成っており、構築もこの順序で行われる。サルモネラ菌のフックはFlgEというタンパク質1種類から構成されており、その長さはFliKによって平均の長さが55 nmに制御されている。また、FliKは分泌時に基部体構成タンパク質からフィラメント構成タンパク質への輸送基質の切り替えを行う役割も担っている。本研究では、温度感受性*flgE* 変異株SJW2219に着目しフックの長さ制御について調べた。30C培養では、野生株様のべん毛構造(71%)とフィラメントが付いていないフック基部体構造(26%)が観察された。37C培養では、フックなしの基部体構造が多く見られ(70%)、次いで多く観察されたのは、フィラメントが付いていない短いフックの基部体構造で(24%)、完全なべん毛構造は6%しか見られなかった。*flgE* 変異株のフックの長さをフィラメント付きの状態に計測すると、平均長は55 nmだったが、酸処理によるフィラメントの脱重合後のフックの平均長は45 nmと短くなった。HBBのSDS-PAGEによる解析の結果、変異株ではHAP1部分がなくなっていることが分かった。酸処理によるフィラメント脱重合の際にHAP1が欠落したためにフックの長さが短くなったことが示唆された。この結果より、*flgE* 変異株のフックの長さは野生株と同様に制御されており、今まで信じられてきたフックの平均の長さ55 nmは、HAP1部分を含めた長さであり、真のフックの長さは約45 nmであることが明らかとなった。

さらに、*flgE* 変異株の分泌タンパク質を調べた結果、*flgE* 変異株はFlgEの分泌量が野生株よりも多かった。このことから、*flgE* 変異株のフックタンパク質の重合効率が悪いと、フックの伸長速度が遅いことが示唆された。さらに、37C培養時、べん毛タンパク質は分泌しないがFliKは野生株よりも多く分泌したことから、フックの長さが短いとき、FliKは輸送基質の切り替えをすることなく分泌されることが示された。FliKはフィラメント構築が可能な最小のフックの長さを計測していることが示唆された。

Cリング変異株のフックの長さ制御について

○山崎 達哉¹, 内田 薫¹, 相沢 慎一¹
(¹ 県立広島大学)

* q223018iu@pu-hiroshima.ac.jp

多くの運動性細菌は運動器官としてべん毛を持ち、べん毛フィラメントを根元にあるべん毛モーターで回転させ運動している。べん毛は、菌体側から基部体・フック・フィラメントの3つの構造体から構成されている。基部体はフィラメントを回転させるモーターであり、主にCリング (FliG・FliM・FliN) がその働きをしている。フックの長さはほぼ一定に制御されており、サルモネラ菌の野生株は 55 ± 6 nm に制御されている。そのフックの長さを制御していると考えられている因子として、*fliK* とCリングがあげられる。FliK分子長を長くすると、フックの長さは長くなり、FliK 酸分子長を短くすると、フックの長さが短くなることが知られている。FliK の分泌がフックの長さ制御とべん毛繊維構築するために重要であると考えられている。またこれまでの研究でCリング変異株において、フックの長さが短くなる事が分かっている。本研究ではサルモネラ菌のフック制御におけるCリングの働きを検討することを目的として実験を行った。

はじめに、HAP1 という構造が酸処理によって脱離し、フックの長さが短くなる菌株があるため、Cリング変異株の HAP1 の有無を調べた。べん毛単離後、pH 2.5 グリシンバッファーで酸処理してフィラメントを脱重合し、SDS-PAGE でタンパク質解析を行った結果、フックの他に HAP 1 のバンドが観察できた。次に、酸処理をしていないCリング変異株のべん毛を電子顕微鏡で観察した結果、野生株より短いべん毛、フック付き基部体 (HBB) が多く、短いフックを持ったべん毛も多く観察された。Cリング変異株を培養する培地を変えて HBB 精製を行い、酸処理後のフックの長さを計測した。LB 培地で培養したCリング変異株のフックの長さは野生株とほぼ同じ長さであった。TY 培地で培養したとき、フックのピークが野生株と同じ長さで、20 nm にも表れた。

以上のことより、Cリング変異株のフックが短くなるのは HAP 1 の脱離が原因ではなく、フック自体の長さが短くなっていると考えられる。また、Cリング変異株はべん毛の構築がうまく行われていないことが示唆された。また、培地の NaCl がフックの長さ制御に関わっていることが示唆された。

**Mechanochemical regulation of actin dynamics
by a Dynamin 1 / Cortactin ring complex**

○Hiroshi Yamada*, Tadashi Abe, Kohji Takei

(岡山大院・医歯薬・生化学)

* hiroyama@md.okayama-u.ac.jp

Dynamin GTPase, a key molecule in endocytosis, mechanically severs the invaginated membrane upon GTP hydrolysis. Dynamin functions also in regulating actin cytoskeleton, but the mechanisms are yet to be defined. Here we show that dynamin 1, a neuronal isoform of dynamin, and cortactin form ring complexes, which twine around F-actin bundles and stabilize them. By negative staining EM, dynamin 1-cortactin complexes appeared as “open” or “closed” rings depending on guanine nucleotide conditions. By pyrene actin assembly assay, dynamin 1 stimulated actin assembly in mouse brain cytosol. In vitro incubation of F-actin with both dynamin 1 and cortactin led to the formation of long and thick actin bundles, on which dynamin 1 and cortactin were periodically colocalized in puncta. A depolymerization assay revealed that dynamin 1 and cortactin increased the stability of actin bundles, most prominently in the presence of GTP. In rat cortical neurons and human neuroblastoma cell line, SH-SY5Y, both dynamin 1 and cortactin localized on actin filaments and the bundles at growth cone filopodia as revealed by immunoelectron microscopy. In SH-SY5Y cell, acute inhibition of dynamin 1 by application of dynamin inhibitor led to growth cone collapse. Cortactin knockdown also reduced growth cone filopodia. Taken together, our results strongly suggest that dynamin 1 and cortactin ring complex mechanically stabilizes F-actin bundles in growth cone filopodia. Thus, the GTPase-dependent mechanochemical enzyme property of dynamin is commonly utilized both in endocytosis and regulation of F-actin bundles by a dynamin 1-cortactin complex.

Ref) Yamada et al., J. Neurosci., 33, 4514-4526, 2013

遺伝子の過剰発現に対する細胞システムのロバストネスを測る

守屋央朗

(岡山大学異分野融合先端研究コア)

hisaom@cc.okayama-u.ac.jp

細胞の機能は数千~数万のタンパク質が協調的に働くことで成し遂げられる。これらのタンパク質の発現量はそれぞれ一万倍以上も異なっている。それではこれらのタンパク質の発現量はどれくらい厳密に決められているのだろうか？この発現量をどれくらい揺らがせても細胞の機能は維持されるのだろうか？このような疑問から、私たちは真核細胞の単純なモデルである酵母を対象として、それぞれのタンパク質の過剰な発現に対して酵母の細胞システムがどのくらい耐えられるのか（ロバストなのか）を調べている。この解析は私たちが独自に開発した「遺伝子つなひき法」という実験法によってなされる。遺伝子つなひき法では、発現量の限界を知りたいタンパク質の遺伝子をネイティブなプロモーターごとプラスミドに組み込み、そのプラスミドのコピー数を栄養源を用いた遺伝的な選択圧により引き上げ、そのコピー数がどこまであげられるかを測ることで、発現量の限界を評価する (Moriya *et al.*, *Molecular Biosystems*, 2012)。

これまでに私たちは出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) や分裂酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*) の細胞周期制御因子について、遺伝子つなひき法により発現量の限界を測定し、その限界を生み出す分子メカニズムを数理モデルを用いた解析などから検討してきた (Moriya *et al.*, *PLoS genetics*, 2006, Kaizu *et al.*, *PLoS genetics*, 2010, Moriya *et al.*, *Molecular Systems Biology*, 2011)。最近、出芽酵母の持つすべての遺伝子6000について遺伝子つなひき法によりその発現量の限界を評価した (Makanae *et al.*, *Genome Research*, 2013)。その結果、酵母の遺伝子のうち80%以上のそれぞれを100倍程度過剰にしても細胞のシステムは維持され、細胞システムがタンパク質の過剰発現に対して非常にロバストであることが明らかになった。一方、わずか10倍程度にコピー数を上げただけで細胞システムが破綻する遺伝子も100程度同定した。これらは細胞システムに脆弱さをもたらす遺伝子群である。

本会では細胞システムのロバストネスを測ろうとする私たちのアプローチを紹介しつつ、細胞システムに脆弱さをもたらす分子機構についての最近の研究成果を紹介したい。

膜タンパクはいかにして力に応じるか？—粗視化分子動力学シミュレーション研究

○高橋 賢^{1*}, 猿渡 和也², 戸田 憲作², 成瀬 恵治¹(¹岡山大学医歯薬学総合研究科, ²岡山大学医学部)

* takah-k2@cc.okayama-u.ac.jp

細胞の機械感受性は、血圧調節、組織の分化や胚形成など、我々の生命において重要な役割を果たしている。しかし機械感受性の分子メカニズムにはいまだ不明な点が多い。この仕組みを明らかにするため、我々は脂質二重膜中にイオンチャネルを埋め込んだ系を作成し、粗視化分子動力学シミュレーションを用いて脂質膜の伸展に対するイオンチャネルの構造変化を解析した。細菌が持つ機械感受性イオンチャネル MscL および MscS の系において脂質膜に伸展を加えたところ、イオンチャネルの開口に伴う構造変化が期待通り観察された。次に我々は機械感受性を持たないニコチン性アセチルコリン受容体(AChR)チャネルの系を作成し、脂質膜に同様に伸展を加えた。その結果、膜の伸展操作によるチャネルの開口は認められなかった。次に、伸展刺激に対するチャネルの開口を抑制している部位を特定するため、膜貫通ドメイン以外を除去したモデルを作成して同様に脂質膜を伸展した。驚くべきことに、膜伸展が加えられたにもかかわらず AChR の膜貫通ドメインは傾きや変位などのいかなる構造変化も示さなかった。このことから、AChR が膜伸展に応じた構造変化を示さない性質は膜貫通ヘリックスそのものに備わっていることが示唆された。また別の非機械感受性イオンチャネル NaK の脂質膜に伸展を行ったところ、ポア形成膜貫通ヘリックスの傾きやポア径の増大は認められなかった。以上の結果から、機械感受性イオンチャネルが膜伸展に対しポア形成ヘリックスの傾きや変位などの構造変化を示す一方で、非機械感受性イオンチャネルにはこれらの構造変化を起こさせないような特定の構造があることが示唆された。

基質伸展刺激下で細胞性粘菌アメーバはミオシン2を介して運動方向を決定する

○岩楯好昭^{1*}, 沖村千夏¹, 佐藤克也², 中島雄太³, 辻岡政経⁴, 南和幸³¹山口大・理, ²徳島大・工, ³山口大・工, ⁴東京医科歯科・難治研

*iwadate@yamaguchi-u.ac.jp

生細胞は剪断流れや浸透圧、基質の硬さなど様々な機械的な刺激に常時さらされている。彼らは環境の機械的側面を感知し適切に応答する必要がある。細胞が接着している基質を一方へ繰返し伸縮させると、基質から機械的な刺激を細胞に与えることができる。繊維芽細胞、内皮細胞、平滑筋細胞等のストレスファイバーは、伸縮と垂直の方向に配列し、細胞の形もやがて同方向に伸びるようになることが知られている。

基質から機械的な刺激を受け取ることは速く遊走する細胞でも同様で、この場合、基質の繰返し伸縮は細胞の形ではなく移動方向を制御する。細胞性粘菌アメーバは、基質の伸縮とは垂直な方向に遊走した(図1)¹。この分子メカニズムを理解するために、佐藤らが開発したマイクロ伸縮装置(図2A)²を用いて粘菌アメーバを伸縮させ、細胞内のGFP-myosin II 動態を観察した。すると、myosin II は細胞の伸縮側のへりに均等に集積することが分かった(図2B)。さらに myosin II 欠損細胞は基質の繰返し伸縮下でもランダムな方向に運動した。ところが、myosin II 欠損細胞に、ATPase 活性の無い変位 myosin II を発現させた細胞は、野生型細胞同様、基質伸縮とは垂直な方向に遊走した。こうした結果から、粘菌細胞は細胞の歪勾配が大きい箇所に myosin II を集積させ、それとは異なる方向に向かって遊走することがわかった。さらにこの運動方向の決定には myosin II の ATPase 活性は必要ないこともわかった。

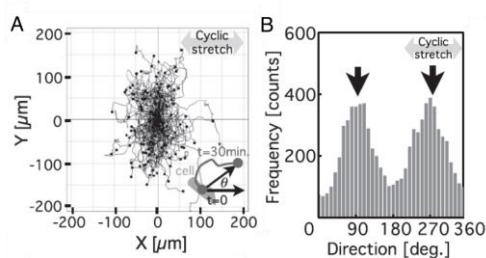


図1 粘菌アメーバは基質伸縮方向に垂直に運動する。A 横方向に伸縮を行った時の30分間の運動の軌跡。B 運動方向のヒストグラム。

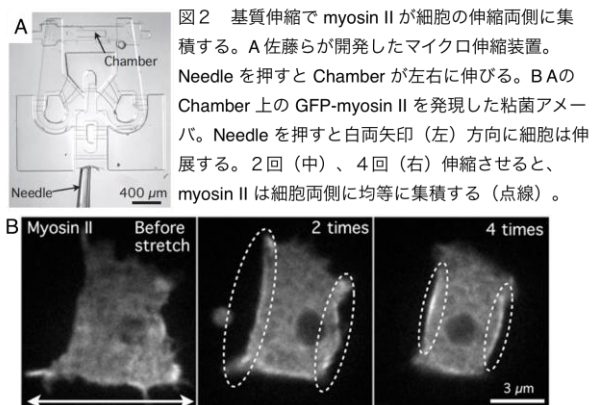


図2 基質伸縮で myosin II が細胞の伸縮両側に集積する。A 佐藤らが開発したマイクロ伸縮装置。Needle を押すと Chamber が左右に伸びる。B A の Chamber 上の GFP-myosin II を発現した粘菌アメーバ。Needle を押すと白両矢印(左)方向に細胞は伸展する。2回(中)、4回(右)伸縮させると、myosin II は細胞両側に均等に集積する(点線)。

1 Iwadate Y, Okimura C, Sato K, Nakashima Y, Tsujioka M, Minami K (2013) *Biophys J.* 104: 748-758.

2 Sato K, Kamada S, Minami K (2010) *Int. J. Mech. Sci.* 52:251-256.

ホヤ幼生の光受容から筋肉の駆動までの特異的神経経路の特定

○津田基之（兵庫県立大生命）、堀江健生（筑波大臨海）、川上 功（兵庫県立大生命）、岩崎孝則（兵庫県立大生命）、吉原良浩（理化学研究所）日下部 岳広（甲南大理工）

* qskh45539@zeus.eonet.ne.jp

要旨

生物の種類が爆発的に誕生したカンブリア紀に出現した脊椎動物の系譜の筆頭にあたる生物がホヤの幼生に類似したものと考えられている。ホヤの幼生は全身の細胞数は2600程度、神経細胞に限れば100個程度と簡単であり、神経回路を研究するには最適のシステムである。ホヤの幼生の脳胞には2個の黒色素細胞があり前方の色素細胞が平衡器（重力感知器）、右後は眼点（光受容器）である。我々は神経特異的な抗体を作り、ほとんどの神経細胞の同定に成功した。今回は光受容から筋肉の駆動までの特異的神経経路の特定について報告する。

{実験} 視細胞特異的に発現するアレクチンの遺伝子のプロモーターにクラゲ由来の蛍光タンパク質 GFP の遺伝子と WGA（小麦胚芽レクチン）をつないだものをホヤの受精卵に顕微注入する。GFP は視細胞の緑色の蛍光が発する。一方、WGA は経シナプスの的に発現するので、色素で染めることにより視細胞とそれから投射される神経回路を可視化することができる。

{結果}

ふ化した幼生を共焦点顕微鏡で観察し、GFP だけを可視化した像と WGA を可視化した像を重ねると視細胞を起点として脳胞に投射された2次神経細胞、さらに運動神経節の3次神経細胞に投射していることが分かる。この3次神経細胞を種々の神経物質作動性神経細胞の可視化調べた細胞と照らし合わせると、運動神経節に発現しているコリン作動性運動神経細胞の後方の1対の細胞であることが分かった。次にこのコリン作動性運動神経細胞から先の神経回路の投射を追跡するため、コリン作動性運動神経細胞に特異的に発現する小胞型アセチルコリントランスポーターの上流領域プロモーターに WGA と GFP をつないだ遺伝子を受精卵に顕微注入し、発生した幼生を解析した結果、このコリン作動性運動神経細胞からは軸索を経て、筋肉細胞まで達していることを観察した。

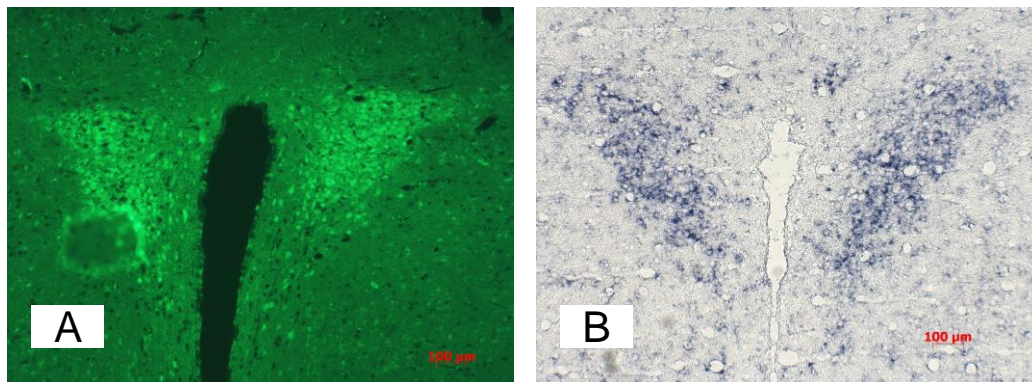
ヒスタミン H1 受容体発現ニューロンの摂食調節における機能の解明をめざした
Cre recombinase 発現遺伝子改変マウスの作製

○堀尾修平

(徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部分子情報薬理学)

horio-s@tokushima-u.ac.jp

視床下部は摂食中枢、満腹中枢があり、摂食調節の中心を担っている脳部位である。本研究では摂食調節を担う新規なニューロンとして、ヒスタミンH1受容体発現ニューロンに注目している。H1受容体発現ニューロンはマウス視床下部の室傍核 (PVH) に非常に高密度で存在していることをすでに確認している (下図B)。遺伝子改変マウスを利用して、このH1受容体発現ニューロンを選択的に死滅させると、マウスの摂食量が増加し、体重もそれに伴って増加したことから、PVHのH1受容体発現ニューロンは摂食抑制に深く関わっていると考えられる。しかし、このニューロンの性質は、H1受容体を発現するという以外には未だ全く判っていない。そこで、このニューロンの性質を様々な手法を用いて調べるため、H1受容体発現細胞特異的にCre recombinase (Cre) を発現する遺伝子改変マウスを作製した。作製にはノックインの手法を用いた。完成したマウスに目的の遺伝子組換えが生じていることを、サザンブロット法、ならびにPCR法で確認した。また、作製時に用いた選別用マーカであるneomycin耐性遺伝子は、FLPe発現遺伝子改変マウスと交配することにより取り除いた。Creの特異的な発現を、Creに対する抗体を用いた免疫抗体法により検出を試みたが、検出できなかった。その理由として、Creの発現量が少なく検出できなかったと考えられた。そこで、次にYFP (yellow fluorescent protein) 発現マウスと交配し、Cre特異的にYFPを発現させたマウスを作製し、YFPの発現を検出することでCreの発現を確かめようと考えた。その結果、PVHに、YFPに由来する特異的な蛍光が観察された (図A)。また、YFPの免疫抗体染色でも、同様の結果が得られた。これらの結果から、CreがH1受容体発現ニューロン特異的に発現するマウスが得られたと考えられる。この系によって、任意のタンパク質をH1受容体発現ニューロン特異的に発現させることが可能となり、パッチクランプ法、投射ニューロンおよび投射先ニューロンの同定、当該ニューロン活動の特異的な活性化あるいは不活性化など、種々の実験手法が適用可能となった。



マウス視床下部室傍核 (PVH) の H1 受容体発現ニューロンの蛍光による観察 (A)、および In situ hybridization による観察 (B)

細胞力覚の多様性とアクチン細胞骨格の関係

曾我部 正博<msokabe@med.nagoya-u.ac.jp>

(名古屋大学・大学院医学系研究科)

最近、細胞の形態や機能における力(ちから)の役割が注目を集め、メカノバイオロジーという新しい学問分野が誕生した。生体を構成する細胞は、骨格筋や臓器の動き、血流や重力、あるいは自身に起因する”力”を感知して(細胞力覚)、自らの形態、分化、増殖、運動を調節することが分かってきたからである。ここでは、細胞力覚の主役であり、かつ急速に分子同定が進みつつあるメカノセンサーの最新研究動向を紹介する。

機械受容チャネル(MSC)は、発見(1984)以来長い間、唯一の確立したメカノセンサーであったが^[1]、最近になって、接着関連分子(ADP:タリン)^[2]やアクチン細胞骨格(アクチン線維, AF; ストレス線維, SF)^[3,4]もメカノセンサーであることが確実になった。興味深いことに、この3者はメカノセンサーシステム(SF-ADP-MSC)を構成し、SFに生じる僅か1pNの張力が一個のMSCを活性化することも分かってきた^[5]。さらに注目すべきは、細胞がADPを介したSFの収縮力を利用して能動的に基質や隣接細胞を引っ張り、その反力から対象の機械的性質をモニターしているという発見である。その詳細は不明だが、対象の硬さに応じてSFの張力が増大してMSCを活性化し、硬さを細胞内Ca²⁺濃度に変換する可能性が指摘されている^[6]。このような“アクティブタッチ”(能動力覚)は、細胞の生存、増殖、分化、運動、組織形成、創傷治癒のみならずガンの発症や転移においても本質的役割を担うことが示唆されており、発生学や再生医学にパラダイムシフトを起こしつつある。

これまでの細胞力覚研究は、細胞内外の機械刺激によって生じるストレス(静止ストレス(pre-stress))を基準としたときの正のストレス)に対する感知/応答を考えてきた。しかし、圧縮された組織、集蜜状態の細胞集団、あるいは軟基質(培地)上の細胞では、アクチン細胞骨格は弛緩して負のストレス(静止ストレス以下)が生じる。このような条件下では、SFと接着斑(FA)のサイズは縮小するが、正のストレスだと逆の応答が見られる^[7]。こうしたストレス依存的なアクチン細胞骨格や接着斑の形成・崩壊のダイナミクスは、細胞の形態変化や運動において本質的に重要である。形成については、Rhoの活性化やその下流で生じる骨格張力の増大が重要なことは周知であるが、骨格の崩壊機構とストレスの関係については全く謎であった。我々はこの謎に初めて解答を与えた^[3]。アクチン線維が弛緩すると、軸周りの回転揺らぎが増大し、アクチン線維切断因子コフィリンの結合確率が上昇して切断することが分かった。アクチン線維は自分の張力の減少(つまり不要のサイン)を揺らぎの増大に表現して、自己破壊することで生理的役割を果たしている。

以上のようにアクチン細胞骨格はそれ自身、あるいはMSCやADPと連携して多彩な細胞力覚機構の実現に寄与している。今後、それぞれの力覚機構が活動する時空間スケールを見極め、それらが実際に機能している現場(*in situ*)での役割解明が重要な課題である。

(1)Yoshimura K, Sokabe M. *J Royal Soc Interface*, 7: 307-20 (2010). (2) del Rio A, et al. *Science*, 323: 638-41(2009), (3)Hayakawa K, et al. *J Cell Biol*, 195(5):721-7 (2011). (4) Hayakawa K, et al. *Commun Integr Biol*. 5(6):572-7 (2012). (5) Hayakawa K, et al. *J Cell Sci*, 121(4):496-503 (2008). (6) Kobayashi T, Sokabe M. *Curr Opin Cell Biol*, 22:669-76 (2010). (7) Hirata H, et al. *J Cell Sci*. 121(17):2795-804 (2008).

高度好塩菌由来ジヒドロ葉酸還元酵素の構造と機能に対する塩の効果

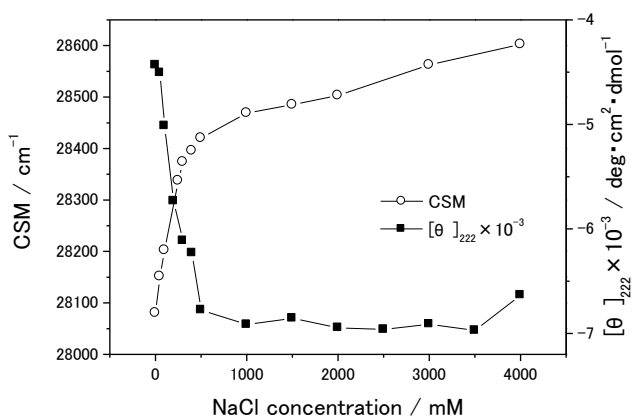
○宮下由里奈^{1*}, 大前英司¹, 仲宗根薫², 楯真一¹(¹ 広大院理, ² 近大工)

* m121033@hiroshima-u.ac.jp

Haloarcula japonica は、石川県能登の塩田土壌で発見された三角形の形状をした高度好塩性古細菌であり、海水の約8倍の塩濃度(約 20% = 3.5 M) で良好に生育する。このような細菌由来の酵素は、溶液中への塩の添加により安定な構造を形成し、活性も上昇することが、過去にいくつか報告されてきた^[1]。しかしながら、非好塩性細菌である大腸菌由来の相同酵素と比較すると、類似した立体構造を持っていることが知られており、好塩性細菌由来タンパク質の持つ好塩性がどのように獲得されているのかは未だ解明されていない。このような好塩性酵素の構造や機能に対して溶液条件の変化が及ぼす効果を研究することは、溶液中でのタンパク質の熱力学的安定性や構造形成原理への理解を深めるための手掛かりとなる。そこで本研究では、*H. japonica* 由来ジヒドロ葉酸還元酵素(DHFR)の構造と機能に塩が及ぼす影響と、その機構を調べることを目的として実験を行った。

H. japonica は染色体上に1つ(C1)と、プラスミド上に2つ(P1, P2)の、合計3つの DHFR 遺伝子を持っている。これらの大腸菌での高発現系の構築を試みたところ、P2 DHFR の過剰発現と、培養・精製系の確立に成功した。精製した酵素は pH 6 付近に活性の最適 pH を持っており、NaCl 濃度 200-500 mM 付近の低濃度領域で活性が最も高くなり、500 mM からは塩濃度を上昇させるにつれて活性が低下した。一方 CD を用いて二次構造の NaCl 濃度依存性を調べたところ、0-500 mM 間で二次構造の変化が起こり、500-4000 mM 間では二次構造の変化は見られなかった。また、蛍光測定の結果から、三次構造の変化も同じような NaCl 濃度依存性を示した(図1)。しかしながら、基質類似体である葉酸や補酵素 NADPH との解離定数やミカエリス定数は塩濃度に依存せず、0 mM と 500 mM のどちらの NaCl 濃度条件でも、CD スペクトルは葉酸の添加により変化しなかった。

これらの結果より、*H. japonica* P2 DHFR は、NaCl がなくても基質や補酵素と結合できる構造を持っているが、この構造には活性があまりないこと、NaCl の添加に伴い、より安定で活性のある構造を形成するが、より高い塩濃度条件下で活性は低下することがわかった。

図1. CSM と [θ]₂₂₂ の塩濃度依存性

参考文献

[1] D. B. Wright, D. D. Banks, J. R. Lohman, J. L. Hilsenbeck, and L. M. Gloss, *J. Mol. Biol.*, (2002) 323, 327-344.

ジヒドロ葉酸還元酵素の構造及び安定性に対する水和とキャビティの寄与

○西田直哉*,大前英司,楯真一

(広島大学大学院理学研究科)

*m130624@hiroshima-u.ac.jp

タンパク質は溶液中で機能するため、周りの水分子と相互作用している。タンパク質と相互作用した水分子は運動が制限され、それ故に水分子一つ当たりが占める体積が小さくなり、また、硬くなる。この水和に伴う分子間相互作用はタンパク質の機能及び構造安定性に大きく影響していると考えられており、水和の寄与を理解することはタンパク質の性質を理解するうえで重要となってくる。

水和をよく反映するパラメータの例として部分比容や圧縮率が挙げられる。これらの物性に寄与するもう一つの要因として、タンパク質内部に存在する原子パッキングが不十分なためにできた空隙であるキャビティが挙げられる。更にタンパク質は、加圧による溶液の体積減少に対応するために、水和水を増やしキャビティを解消するように平衡が移動して圧力変性を起こす。そのため、部分比容や圧縮率、圧力変性に伴う自由エネルギー変化と体積変化を調べることは、水和と構造安定性を結びつける有効な手段といえる。

大腸菌ジヒドロ葉酸還元酵素(EcDHFR)はジヒドロ葉酸をテトラヒドロ葉酸へと還元する反応を触媒する機能を持っているタンパク質であり、分子量が約 18kDa と比較的小さく単量体で存在することから、モデルタンパク質として広く研究に用いられている。

EcDHFRの42位のMetは活性部位である27位のAspから14Å離れているにもかかわらず、この部位の変異は酵素活性や構造安定性に大きな影響を及ぼすことが分かっている。(1)しかしこの原因についてはいまだ詳しく解明されていない。そこで今回はEcDHFRの野生型及び42位のMetを疎水性アミノ酸(Val,Leu,Trp)に置換した三種類の変異体を用いて、42位の置換が構造安定性に及ぼす効果を水和と関連付けて考察することを目的とし、実験を行った。

圧力変性測定の結果、全ての変異体で不安定化が見られた。圧縮率と部分比容の測定結果から、一残基の置換によって水和とキャビティが変化していることが確認できた。安定性と水和、キャビティの両方が置換によって影響を受けたことからこれらが安定性に影響していることは十分に考えられる。しかし部分比容や圧縮率、圧力変性に伴う体積変化

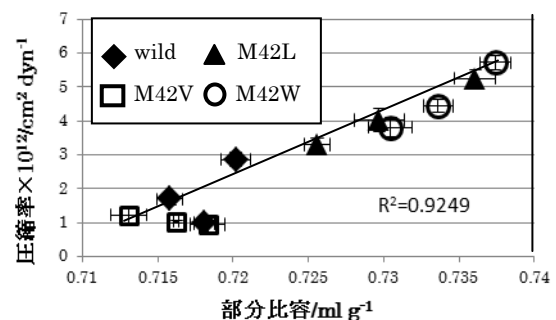


図1 各 DHFR の圧縮率の部分比容依存性

と安定性の間に相関は得られず、水和とキャビティの増減のみで安定性を考察することは難しい。また得られたパラメータと導入した残基の比容や疎水性度との間に相関がみられなかったため、42位の置換の影響は置換部位周辺だけでなく分子全体にわたっていることがわかった。更に、部分比容の小さなM42V変異体で圧力変性に伴う体積変化が大きいという結果から、42位の置換は変性状態にも影響している可能性が示唆された。

(1)E.Ohmae,Y.Fukumizu,M.Iwakura,and K.Gekko,J.Biochem.137,643 (2005)

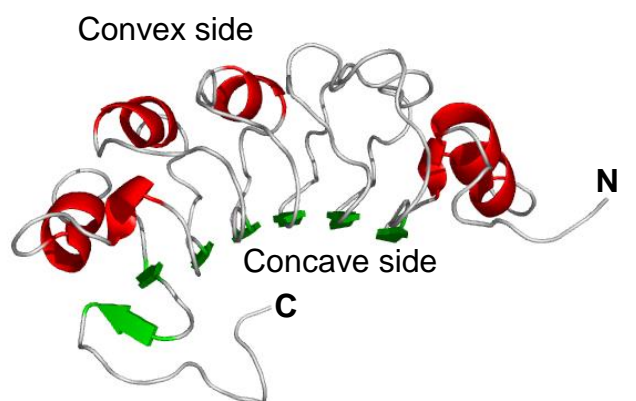
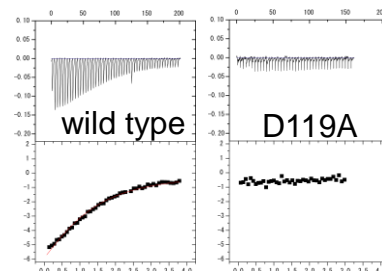
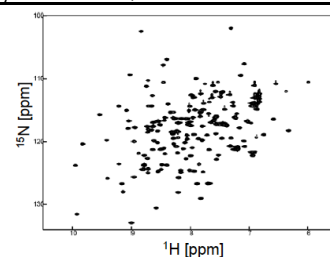
ヒストンシャペロン ANP32B の核磁気共鳴法を用いた構造および機能解析

○ 梶尾尚哉^{1,3*}, 梅原崇史², 木川隆則², 横山茂之², 楯真一^{1,3}¹広島大学院・数理分子生命理学, ²理化学研究所・横浜³広島大学・クロマチン動態数理研究拠点)

* naoya-tochio@hiroshima-u.ac.jp

真核生物において、そのゲノムDNAはコアヒストンタンパク質と結合し、ヌクレオソームと呼ばれるクロマチンの構造単位を形成する。ひとつのヌクレオソームは約147 bpのDNAと2つのH2A-H2B二量体、2つのH3-H4二量体コアヒストンタンパク質から構成されている。このヌクレオソーム形成の結果として、ヌクレオソームにおけるヒストンの再配置や放出が、真核生物におけるRNA転写、DNA複製、DNA修復などのDNAの調節に密接に関係していることが知られている。このようなヒストンの再配置や放出過程は様々なクロマチン結合タンパク質によって協調的に調整されており、これらのタンパク質のうちでも、ヒストンシャペロンはヌクレオソームの集合/解離において重要な役割を担っているものと考えられる。

Acidic nuclear phosphorprotein 32B (ANP32B)はANP32タンパク質ファミリーに属しており、N末端の複数のleucine rich repeat (LRR)からなる領域とC末端のvariable acidic regionから構成されている。このC末端領域はヒストンのアセチル化を阻害することが既に知られているが、N末端のLRR領域のクロマチン制御における役割は不明であった。我々は、ANP32BのLRR領域単体で、ヒストンシャペロン活性を有すること、またその溶液構造が、平行βシートからなるconcave (凹)面と主にαヘリックスからなるconvex (凸)面をもつようにLRRを配置した曲がった構造であることを示した。さらに、化学シフト摂動法(perturbation)や等温滴定量熱計(isothermal titration calorimetry, ITC)を用いた解析の結果、ANP32BのLRR領域はコアヒストンH3-H4 tetramerとconcave面を介して結合していることを示し、そのconcave面に存在する酸性残基および疎水性残基がヒストンとの結合に必須であることを示した。本研究結果はヒストンシャペロンの作用機構の理解をさらに深めるものと期待される。

Solution structure of ANP32B LRR region¹H, ¹⁵N HSQC of ANP32B LRR regionITC analysis with histone H3-H4

クロマチンリモデリング因子 FACT の天然変性領域に対するリン酸化による DNA 結合制御機構

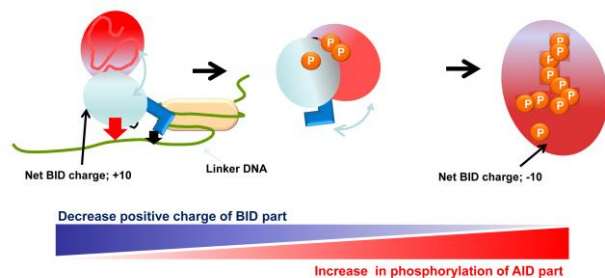
○楯 真一^{1,3*}, 橋本愛美¹, 津中康央², 森川耿右², 藤井雅史¹, 栗津暁紀^{1,3}

(¹広島大学・院理・数理分子, ²京都大学・iCeMS, ³広島大学・クロマチン動態数理研究拠点)

* tate@hirosima-u.ac.jp

ゲノム解析の結果から、真核細胞中のタンパク質は、安定な立体構造を持たない部分を多く含むことが明らかにされた。このような安定な立体構造を保持しない領域は、天然変性 (Intrinsically Disordered: ID) 領域と呼ばれる。近年の様々な研究から、ID 領域は安定な立体構造をもたないことを利用した独自の機能制御機構を担っていることが分かってきている。私達は、クロマチンリモデリング因子 FACT 中に含まれる ID 領域が細胞内でリン酸化され、ID 領域のリン酸化の程度に応じた FACT のヌクレオソーム DNA に対する結合能の変化を見いだしている(1)。

FACT のヌクレオソーム DNA 結合能は、リン酸化の程度が進むにつれて sigmoidal に低下した。これは、ID 領域の対するリン酸化が進むにつれて、ID 領域と DNA 結合部が分子内で強固に相互作用することにより阻害複合体を形成することが原因であると予測された。NMR を用いた解析からは、ID 領域に対するリン酸化により DNA 結合部との相互作用をする領域が2倍に広がることを確認された(2)。さらに、この解析から、FACT 分子内における ID 領域と DNA 結合部との相互作用は動的な結合-解離平行状態にあることもわかった (ダイナミック複合体)。このため、リン酸化により ID 領域上での DNA 結合部との相互作用部位が増えることは、そのまま阻害複合体の存在率の上昇につながるため、リン酸化の程度に応じて FACT の DNA 結合能が低下すると説明できる。



私達は、さらに上記のような分子内相互作用がどのようにして sigmoidal な DNA 結合能変化につながるかを解析するために 'polyelectrostatic' モデルを用いた解析を行った。その結果、DNA 結合能変化の観測データをうまく再現することに成功した(上図は、分子内相互作用の模式図)。さらに、粗視化モデルを用いたリン酸化依存的な阻害複合体形成過程をシミュレーションすることも試みている。

発表では、上記の実験結果、理論モデルによる解析結果について報告する。

References

1. Tsunaka Y, Toga J, Yamaguchi H, Tate S, Hirose S, Morikawa K. 2009. *J Biol Chem* 284: 24610-21
2. Hashimoto MK, N.; Tsunaka, Y.; Oda, M.; Tanimoto, M.; Ando, T.; Morikawa, K.; Tate, S. 2013. *Biophys J*, in press.

仮性結核菌由来へム獲得蛋白質 HasA の結晶構造解析による
新規へム結合様式の解明

○金谷雅弘^{1*}, 室木俊毅², 石丸幸絵², 和田百希¹, 佐藤豪洋³, 小崎紳一³, 日野智也¹,
永野真吾¹

(¹鳥取大院・工, ²鳥取大・工, ³山口大・農)

* kanadani@bio.tottori-u.ac.jp

鉄はあらゆる生物の生存、増殖に必要な不可欠な元素である。いくつかのグラム陰性菌はこの鉄を寄生した宿主から奪う特殊な機構を持つことが知られており、Has (Heme Acquisition System)はこの機構の一つである。この機構に含まれる蛋白質 HasA は菌体から分泌され、宿主のへムを獲得したのち、菌体外膜に存在する受容体 HasR へへムを受け渡す重要な機能を持つ。これまでに結晶構造が解析されている緑膿菌やセラチア菌由来 HasA (*Pa* HasA, *Sm* HasA)では His と Tyr が軸配位子としてへムを保持していることが明らかとなっている。しかし仮性結核菌由来 HasA (*Yps* HasA)は軸配位子 His が Gln に置換されており、分光学的解析から Tyr のみがへムに配位した新しいへム結合様式の存在が予想された。本研究では、*Yps* HasA WT (WT)と軸配位子 Tyr75 を Ala に置換した Y75A 変異体 (Y75A)の結晶構造を 1.70 Å、3.10 Å 分解能で決定し、この構造に基づいて新しいへム結合様式を明らかにした。

WT の全体構造は既報の HasA と類似していたが、へムポケット周辺に大きな構造の違いが見られた。WT のへムには分光学的解析などから予想された通り Tyr75 のみが軸配位子アミノ酸として配位していた。一方 *Pa* HasA や *Sm* HasA においても一つの軸配位子アミノ酸 His32 を含むループは、WT では大きく外側へ押し出され、第 6 配位子として水分子が配位していた。これは WT では His32 が Gln に置換され、へムとこのループとの配位結合が失われたためと考えられる。軸配位子 Tyr75 周辺には疎水性残基が多く存在し、へムと疎水性相互作用を形成していた。へム鉄に配位した水分子付近には Arg40 と Arg144 の側鎖がへムを押しえつけるようにスタッキングし、へムのプロピオン酸と水素結合を形成していた。これまでに結晶構造が報告された HasA において Arg がへムの保持に関わっている例はなく、新しいへム結合様式であると考えられる。また Tyr75 は *Yps* HasA の唯一の軸配位子としてへム保持に必要な不可欠なアミノ酸であることが考えられる。そこで Tyr75 を軸配位子として機能できない Ala に置換した Y75A を作成し、結晶構造解析を行った。Y75A は軸配位子を失ったにもかかわらず、へムを保持することが可能であり、全体構造、へム周辺の構造は WT と比較していずれもほとんど変化していなかった。このことから *Yps* HasA のへム保持には Arg との水素結合や疎水性残基との疎水性相互作用など、軸配位子を除くその他のアミノ酸との相互作用が重要であることが考えられる。HasA のアミノ酸配列の比較から、へムと水素結合している 2 つの Arg はセラチア菌や緑膿菌などの 6 配位型へムを持つ HasA には保存されておらず、仮性結核菌など 5 配位型へムを持つ HasA に多くみられる相互作用であると考えられる。一方で、Tyr75 付近に存在する疎水性残基は 5 配位型 HasA のみならず、6 配位型 HasA にも広く保存されていた。このことから疎水性残基とへムとの疎水性相互作用は HasA がへムを保持するうえで普遍的に重要な役割を担っていることが考えられる。

異なる生物種由来のヘムオキシゲナーゼ活性の微調節機構

○右田たい子*, 高田さゆり

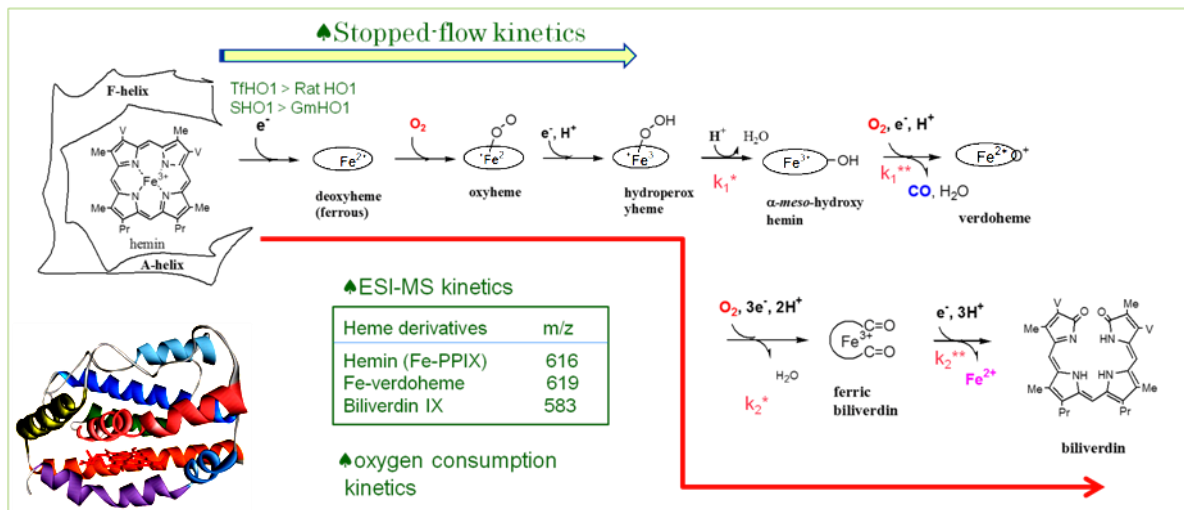
(山口大・農・生物機能)

*ctmigita@yamaguchi-u.ac.jp

ヘムオキシゲナーゼ(HO) は、酸素分子とNADPHの還元当量を用いて鉄(III)-ヘムを部位特異的に開環し、ビリベルディン、CO、と鉄イオンに分解する。反応過程は、下図のようにヘム鉄上での酸素分子の活性化を繰り返して進行し、 α -hydroxyhemeおよびverdoheme中間体を経由して進行する。HOの遺伝子は古細菌を除くほとんどすべての生物種で保存されているが、3つの生成物をめぐるヘム分解の目的やその機能環境も、生物種によって異なっている。HO反応には基質であるヘムのほかに、酸素分子と電子の供給が必須であり、しかも酸素分子と電子は逐次反応の各段階で必要とされる。

私たちは、異なる生物種由来のHOがその機能環境と必要とするヘム分解の主要産物の違いによってその反応機構をどのように微調整しているかを明らかにすべく研究を行っている。今回は、同じ生理的還元系を利用できるラットとフグ由来のHO1 (還元系、NADPH-CPR; 全体のhomology、52%)、およびダイズとシアノバクテリア由来のHO-1 (還元系、NADPH-FNR-Fd; 全体のhomology、20%) について、逐次反応の各過程で速度論解析を行い比較した。また、溶存酸素濃度をモニターすることで、HO反応の進行を観測した。

Stopped-flow kineticsでは、ferric hemeの減少速度と deoxyおよびoxyhemeの生成速度を求めることができた。Ferric hemeの還元速度=deoxyhemeの生成速度は、フグHO1がラットHO1よりも3倍速く、シアノバクテリアHO1はダイズHO1より1.2倍速いという結果が得られた。また、oxyhemeの生成速度は、フグHO1がラットHO1より1.5倍速く、シアノバクテリアHO1はダイズHO1より1.4倍速く、oxyhemeの生成は、ヘム還元速度と別個に調節されていることがわかった。また、ESI-MSによって、ヘムの分解およびベルドヘム中間体と生成物ビリベルディンの生成速度を求めることができたが、ベルドヘム中間体までの反応速度定数とベルドヘムからビリベルディンまでの速度定数の比を逐次反応モデルを仮定して求めた結果、フグHO1では前半が4倍ほど速く、ラットでは逆に後半が2倍ほど速い、という結果を得た。シアノバクテリアでは前半が後半と比較して2倍ほど速く、ダイズではベルドヘム以降が著しく遅く定量的な見積りは不可能であった。この相違の原因について、考察する。



プロテオロドプシンの低pH条件下で起こるプロトン放出

○田母神淳^{1*}, 菊川峰志², 奈良敏文¹, 下野和実³, 出村誠², 加茂直樹²¹松山大薬学部, ²北大生命科学院, ³東邦大薬学部

* jtamoga@cc.matsuyama-u.ac.jp

プロテオロドプシン (PR) は、海洋真正細菌から発見されたロドプシン様タンパク質である。他の微生物型ロドプシンと同様に7回膜貫通型の構造をとり、全トランス・レチナールを発色団に持つ。PRは光を吸収すると、全トランス・レチナールが13-シス・レチナールへと光異性化し、それに伴い構造の異なる種々の光中間体が形成され、再びもとの状態へと戻る。このサイクリックな反応過程のことをフォトサイクルという。PRは、そのフォトサイクルの過程でプロトン移動が起こることが知られており、1回のフォトサイクルの過程で1個のプロトンを細胞内から細胞外へと輸送する光駆動プロトンポンプである。我々は、以前、このタンパク質のフォトサイクルの過程で起こるプロトン移動のpH依存性を高感度pH電極として機能するITO (Indium tin-oxide) 電極を用いた電気化学的実験により調べた。その結果、中性から酸性のpH条件下 ($\sim 4 < \text{pH} < \sim 9.5$) においては、光励起により最初にプロトンのタンパク質内への取り込み、続いてタンパク質外へのプロトン放出が起こることが明らかとなった。一方、さらにpHを酸性にすると ($\text{pH} < \sim 4$)、プロトン取り込み・放出の順番が逆転し、先にプロトンの放出が起こることも明らかになった。そこで、本研究ではこの低pH条件下でプロトン取り込みに先行して起こるプロトン放出がどのアミノ酸残基に由来するのかを明らかにすることを目的に実験を行った。

低pH ($< \sim 4$) 条件下におけるITO電極を用いた実験から、プロトン放出に関与するアミノ酸残基の基底状態および光中間体時の pK_a は、それぞれ ~ 3.0 と ~ 2.3 と見積もられた。そこで、このpH条件下でのプロトン放出に関与するアミノ酸残基の候補は酸性アミノ酸であるAspまたはGlu残基であると考え、予想される様々な位置のAspまたはGlu残基を中性残基に置換した変異体を作製し、ITO実験を行った。その結果、レチナールシッフ塩基近傍に位置するAsp227残基の変異体で、プロトンの放出が先行して起こらなくなった。Asp227は、レチナールシッフ塩基の第二の対イオン (第一の対イオンはAsp97) としての役割をもつ残基で、レチナールの光異性化や吸収波長などに影響を及ぼす重要な残基である。そこで、吸収スペクトルのpH滴定実験も同時に行い、Asp227の基底状態での pK_a を見積もったところ、ITO実験から予測された pK_a 値 (~ 3.0) とよく一致した。このことから、このpH条件下で起こるプロトン放出はAsp227からのプロトン放出に由来すると結論付けた。さらに面白いことに、Asp227を中性残基に置換したD227N変異体でも、測定溶液中のCl⁻を除くと、野生型同様に低pH条件下でのプロトン放出が起こった。一方、さらにAsp97も中性残基に置換したD97N/D227N二重変異体では、Cl⁻の有無に関わらず低pH条件下でのプロトン放出は起こらなかったことから、この変異体で起こるプロトン放出は、Asp97からのプロトン放出だと考えられる。これらの結果より、PRの光励起によって形成される光中間体の安定化には、レチナールシッフ塩基近傍の負電荷の存在が必要であり、pHの酸性化により、2つの対イオン (Asp97, Asp227) がプロトン化した条件下においては、1) プロトネートしたAsp227の脱プロトン化、2) プロトネートしたAsp227近傍へのCl⁻の結合、3) プロトネートしたAsp97の脱プロトン化の順で、シッフ塩基近傍での負電荷の形成が起こることが明らかとなった。

大腸菌多剤排出系 **EmrE** の結晶構造に関する考察：細胞内外の向きを決める○奈良 敏文^{1*}, 根来 信敬¹, 田母神 淳¹, 加茂 直樹²¹松山大・薬学部, ²北大・生命科学院

* tnara@cc.matsuyama-u.ac.jp

[背景]大腸菌の多剤排出系EmrEは、Small multi-drug resistance (SMR)ファミリーに属する、分子量約12kDaの小さな膜タンパク質(110 a.a., 4 TM)である。プロトンの流入を利用し、methyl viologenやethidium bromide、acriflavin、tetraphenyl phosphonium、benzalkonium chlorideなど構造の異なる様々な脂溶性薬物を細胞外に排出し、多剤耐性を示す。ホモ2量体として機能すると考えられるが、多剤排出の詳細な分子機構は不明である。2005年頃から、ホモ2量体の構造に関してパラレル型かアンチパラレル型かが論じられたが、2007年にChenらがアンチパラレル型の結晶構造(図1)を示すなどを経て、現在はアンチパラレルホモ2量体(EmrE)₂と考えられている。

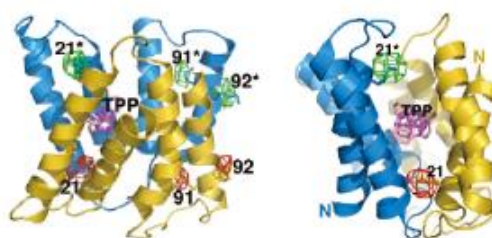


図1 EmrEの結晶構造。Chen, et al. (PNAS 2007)

ところでこの(EmrE)₂の結晶構造(PDB: 3B5D)、主鎖レベルでも厳密には非対称である。プロトン流入や基質排出の分子機構解明のためには、どちらが細胞外であるかを知りたい。そこで我々は、枯草菌の類似の多剤排出系EbrABで確認することを考えた。EbrABは、サブユニット間の相同性が高いが、EbrAとEbrBという別個のサブユニットから成るため、遺伝学的にも、タンパク質レベルでも区別が出来る。またEbrABは、(EmrE)₂と同様にアンチパラレル2量体であり、EbrAはN末とC末を共に細胞外に、EbrBはN末とC末を共に細胞内に突出する構造をとる。今回、(EmrE)₂の結晶構造でユニット同士(EmrE¹)(EmrE²)が接触するループ箇所Gly26とAla52、及びPro86とSer105(図2)に着目し、EbrAとEbrBの対応する部位が接近しているのかを化学修飾で調べた。

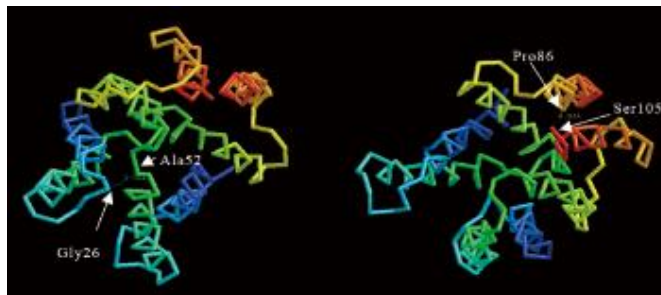


図2 サブユニット間で接近する部位

[結果と考察]

(EmrE¹)(EmrE²)のGly26とAla52に対応する箇所にCysを導入したEbrABは、何の機能的変化も見られなかった。一方、(EmrE¹)(EmrE²)のPro86とSer105に対応する箇所にCysを導入したEbrA-K87C/EbrB-K105Cにも機能的変化は無かったが、もう一つの可能性であるEbrA-P105C/EbrB-K86C変異体では、ethidium排出活性が大きく低下した。導入した2カ所のCys残基が細胞外に位置し、SS結合を形成したと考えられる。この変異EbrABをクロロフォルム/メタノールで抽出後、トリシンSDS-PAGEで両サブユニット間の架橋形成を調べた。その結果、還元剤存在下でモノマーのバンドが検出出来、EbrA-P105C/EbrB-K86C間にSS結合の形成が分かった。以上の結果は、(EmrE)₂の結晶構造(PDB: 3B5D)において、両サブユニット間でPro86とSer105が接近する側が、細胞外に向くことを示している。

インフルエンザウイルス RNA 合成酵素におけるアセチル化能の構造機能的解析

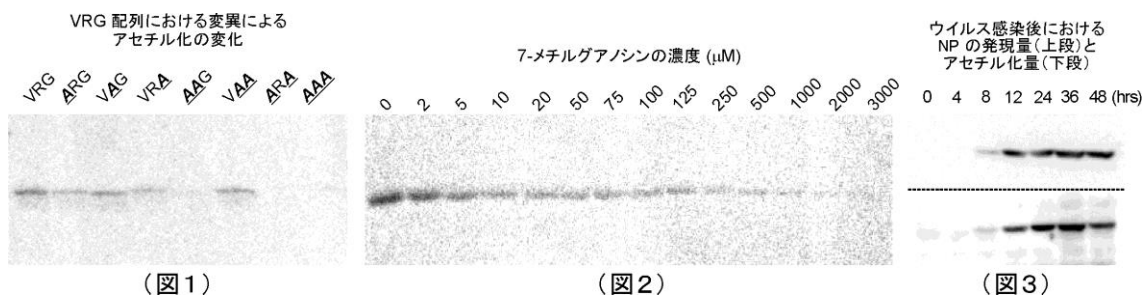
○畠山 大^{1*}, 庄司正樹¹, 廣田丈典¹, 柳澤 伸¹, 長江萌菜美¹, 山吉誠也², 河岡義裕²,
葛原 隆¹ (¹徳島文理大・薬・生化学, ²東大・医科研・ウイルス感染分野)

* daihatake926@ph.bunri-u.ac.jp

インフルエンザウイルスの RNA 依存性 RNA 合成酵素は 3 種類のサブユニットタンパク質 (PA, PB1, PB2) から構成されており, ウイルスゲノムの複製や転写を行っている. ノイラミニダーゼを標的分子とするオセルタミビルに対する耐性ウイルスが出現していることから, 新規薬剤の標的分子として期待されるが, その構造や機能に関しては未知の点が多い. 昨年の本学会では, 上記のサブユニットタンパク質のうち, PB2 がアセチル化能を有することを報告した. 本研究では, PB2 アセチル化能の生化学的特性をより詳細に解明したので報告する.

PB2 の一次構造および立体構造解析により, PB2 中央部分にはアセチル化酵素が保有するモチーフであるバリニン-アルギニン-グリシン (VRG) 配列が存在し, 結合シミュレーションにより PB2 中央部分にアセチル CoA が結合することが示唆された. そこで, PB2 アセチル化能に対する VRG 配列の重要性を解明するため, VRG 配列の一つ, もしくは複数のアミノ酸をアラニンに置換した組換えタンパク質を作製し, アセチル化能の有無を解析した. その結果, VRG 配列のバリニン残基とその他のアミノ酸を組み合わせアラニンに置換すると, アセチル化能が喪失した (図 1). さらに, VRG 配列のアミノ酸置換により, ウイルスポリメラーゼの転写および複製活性も有意に消失し, VRG 配列依存的な PB2 のアセチル化活性がウイルスの増殖過程において重要な働きを担うことが示唆された. また, PB2 中央部位は宿主 mRNA のキャップとなる 7-メチルグアノシン (m7G) と相互作用する機能を持つことが既に報告されている. そこで, PB2 に m7G を反応させると, PB2 のアセチル化活性が有意に抑制された. 結合シミュレーションからも m7G とアセチル CoA は結合ポケットを共有することが予想された. 以上より, PB2 は m7G 結合能とアセチル化能の両方を併せ持ち, ウイルス増殖の過程において互いの機能を調節し合うことが示唆された (図 2).

次に, ウイルス感染に伴ってアセチル化を受けるタンパク質の探索に着手した. その結果, 培養細胞へのウイルス感染後 8 時間で, ウイルスのヌクレオタンパク質 NP と思われるタンパク質がアセチル化された (図 3). NP は真核細胞のヒストンと同様, ウイルスの RNA ゲノムを巻き取るタンパク質であることから, NP への能動的なアセチル化によりウイルスゲノムの転写や複製を調節していることが予想された. 今後は組換えタンパク質や組換えウイルスを用いた実験を行い, PB2 による NP のアセチル化能を詳細に検討する予定である.



哺乳類ミトコンドリアのリン酸輸送担体の酵母における機能的発現

○山越亮平^{1,2}, 山本武範¹, 篠原康雄^{1,2,*}(¹徳島大疾患プロテオゲノム研, ²徳島大院薬)

* yshinoha@genome.tokushima-u.ac.jp

ミトコンドリアは2重の膜構造を有しているが、外膜には電位依存性アニオンチャネルというタンパク質が存在し、ほとんどの溶質やイオンはこのタンパク質を介して外膜を自由に透過できる。一方、内膜を隔てた H^+ 勾配がATP合成の駆動力になることもあり、内膜の透過性は極めて低く保たれている。ミトコンドリアのマトリックスで必要な分子を輸送するために、ミトコンドリア内膜にはそれぞれの分子に特異的な輸送担体が存在する。これらの輸送担体はアミノ酸配列に弱い相同性が見られ、推定されるトポロジーも類似するなど互いに似た構造特性を示すことから、共通の祖先から生じたファミリータンパク質であると考えられており、ミトコンドリア溶質輸送担体ファミリー (SLC25a) と総称されている。我々は哺乳類のミトコンドリアの溶質輸送担体の構造機能協関研究に向け、酵母を用いた発現系の構築を進めてきた。アデニンヌクレオチド輸送担体 (ADP/ATP carrier) の場合には、哺乳類のタンパク質をそのまま酵母に発現させることはできず、酵母のタンパク質のN末配列を有したキメラ体とすれば発現させることができた¹⁾。核ゲノムでコードされたミトコンドリアの多くはそのN末にミトコンドリア移行シグナルという配列を有するが、ほとんどの溶質輸送担体はN末にはミトコンドリア移行シグナルが存在しない。しかし、少なくとも哺乳類のヌクレオチド輸送担体を酵母で発現させるためには、そのN末がミトコンドリアへの移行に重要であることを明らかにした。

本研究ではリン酸輸送体 (PiC) の発現系の構築を進めた。リン酸輸送体はATP合成に必須であるので、酵母のリン酸輸送体をコードする遺伝子を破壊するとグリセリンを単一炭素源とした培地で生育できなくなる。この遺伝子破壊株 (Δ PiC) に酵母のリン酸輸送体をコードする発現ベクターを導入すると、リン酸輸送体が発現して酵母の生育が回復する²⁾。一方、ヒトのリン酸輸送体をコードする発現ベクターを導入したところ、酵母の生育は回復せず、タンパク質が機能的な形で発現しなかったことが示唆された。ヒトのリン酸輸送体はN末にプレシーケンスを有した形で合成され、プレシーケンスはミトコンドリアで除去されることが知られているが、酵母のリン酸輸送体には相当するシーケンスが存在しない。そこでプレシーケンスを除去したヒトのリン酸輸送体をコードする発現ベクターを構築し、これをリン酸輸送体遺伝子破壊株に導入したところ、酵母の生育が回復することが判明した。従って、哺乳類のリン酸輸送体の酵母での機能的発現にはプレシーケンスの除去が肝要であり、哺乳類の溶質輸送担体を酵母で発現させるためには、生物種に特異的なN末構造を考慮することが重要であることが明らかになった。

1) Hashimoto M, Shinohara Y, Majima E, Hatanaka T, Yamazaki N, Terada H. *Biochim Biophys Acta* 1409(1999)113.2) Phelps A, Wohlrab H. *J Biol Chem* 266(1991)19882.

持続伸展刺激による単離心筋細胞のカルシウム流入機構への機械感受性 AT1 受容体の関与

○山口陽平*, 金子智之, 成瀬恵治, 入部玄太郎
(岡山大学大学院医歯薬学総合研究科システム生理学)

* yyamaguchi@s.okayama-u.ac.jp

心筋に数分間の持続的な伸展刺激を加えると収縮力が徐々に増加する。この現象は、Slow force response(SFR)として知られている。SFRは、伸展刺激誘発性の細胞内 Ca^{2+} 流入により起こることが知られている。この流入経路の一つとして、伸展刺激により間質組織や心筋細胞自体から分泌されるアンギオテンシン II (Ang- II) がアンギオテンシン II 1 型(AT1)受容体を活性化させ、 Ca^{2+} 流入が起こると考えられている。しかし、近年の研究では、AT1 受容体には機械感受性があることが報告されている。そのため、この経路では Ang- II を介さず、伸展刺激により直接 AT1 受容体が活性化されている可能性がある。過去の SFR の研究では、乳頭筋など多細胞標本を用いているため、周辺の細胞からの Ang- II の影響を完全に取り除くことができず、この経路の最終的な活性化機構は未だに不明な点が多い。

そこで、我々は、カーボンファイバーを用いた単離心筋細胞伸展装置により単一心筋細胞に対して持続的伸展刺激を加えて、AT1 受容体がどのようなメカニズムにより活性化され、SFR を引き起こすのかを検討した。方法としては、生後 8~12 週のマウス心室筋をランゲンドルフ灌流下に酵素灌流して単離心筋細胞を得た。その細胞の両端をカーボンファイバーで保持し、1kHz 刺激下に 3~10%の伸展刺激を加え、その状態を 200~300 秒間維持し、元の状態に戻した。その際、各段階の張力は各刺激が入った点を最小値・収縮力が最大となった点を最大値として、最大値から最小値を減算することで得た。その結果、伸展してから 10 秒後の発生張力に対して、200~300 秒後には張力は有意に増加($9.7 \pm 1.7\%$, $n=8$)し、単離心筋細胞にて SFR を確認することができた。一方で、この反応は AT1 受容体阻害薬 (ARB) である Olmesartan ($10 \mu\text{M}$) により抑制された ($4.3 \pm 0.95\%$, $n=5$)。以上の結果から、SFR において、AT1 受容体は周辺の細胞から分泌された Ang- II を介さず、伸展刺激により直接活性化されることが示唆された。

伸展刺激誘発性カルシウムスパーク増加におけるミトコンドリアの役割

○入部玄太郎*, 貝原恵子, 成瀬恵治

(岡山大学大学院医歯薬学総合研究科システム生理学)

iribe@okayama-u.ac.jp

心筋細胞において観察されるカルシウムスパークは筋小胞体のカルシウム放出チャンネルであるリアノジン受容体からの自発的なカルシウム放出イベントであり、リアノジン受容体の放出能の指標となる。我々はこれまで単離心筋細胞に伸展刺激を負荷することによってカルシウムスパークが増加することを報告してきた。通常リアノジン受容体はカルシウムにより活性化 (calcium induced calcium release: CICR) されるが、この現象は伸展刺激により NADPHオキシダーゼ (NOX) が活性化されることによって発生する活性酸素 (reactive oxygen species: ROS) がリアノジン受容体を直接刺激することにより引き起こされるという報告がある。一方でミトコンドリアは筋小胞体に次ぐ大きなカルシウム貯蔵サイトであり、ROS の発生源でもあるため、ミトコンドリア由来のカルシウムやROSがこの現象に関与している可能性も否定できない。今回我々は伸展刺激誘発性のカルシウムスパーク増加におけるミトコンドリアの役割を検討した。

生後10~12週のマウス心室筋をランゲンドルフ灌流下に酵素灌流して得られた単離心筋細胞にカルシウム指示薬のFluo-4を負荷、顕微鏡下に細胞の両端をカーボンファイバーにて保持し、5~8%の伸展刺激を加えた。カルシウムスパークは共焦点レーザースキャナ (Yokogawa CSU X-1) を用いて測定した。

伸展刺激を加えることにより、カルシウムスパークは $142.1 \pm 13.1\%$ ($n = 10$) へと増加した。この反応はミトコンドリアの脱共役剤である FCCP ($5 \mu\text{M}$) でミトコンドリア機能を阻害することによって抑制された ($98.8 \pm 4.5\%$, $n = 11$)。この結果から、伸展刺激誘発性のカルシウムスパーク増加にはミトコンドリアを介したメカニズムが関与していることが示唆された。

日本生物物理学会第5回中国四国支部大会実行委員会
委員長 成瀬恵治 (岡山大学)
委員 井上 剛、松浦 宏治 (岡山大学)