

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 23 日現在

機関番号：12601

研究種目：新学術領域研究(研究領域提案型)

研究期間：2009～2013

課題番号：21121001

研究課題名(和文) 過渡的複合体が関わる生命現象の統合的理解 - 生理的準安定状態を捉える新技術 -

研究課題名(英文) Integrative understanding of biological processes mediated by transient macromolecular complexes; New technology for visualizing physiologically metastable states

研究代表者

嶋田 一夫(Shimada, Ichio)

東京大学・薬学研究科(研究院)・教授

研究者番号：70196476

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 70,900,000円、(間接経費) 21,270,000円

研究成果の概要(和文)：本総括班は、新学術領域研究「過渡的複合体」を円滑に進めるために、方針を策定し、企画調整を行った。具体的には、定期的に総括班会議を開催し、1年に一度全体班会議を開催した。総括班が中心となって領域内の共同研究を推進し、また試薬の共同購入を行い効率的な研究費の執行に努めた。領域の成果を社会に発信するため、領域主催のシンポジウムの開催、規模の大きな学会におけるワークショップの開催を行った。若手育成の目的で、チュートリアルコース開催の支援を行った。定期的にニュースレターを発行し、年度末には成果報告書を作成した。

研究成果の概要(英文)：The role of the management team is to promote and coordinate each project of the Grant-in-Aid for Scientific Research on Innovative Area "Katoteki-Fukugoutai" (transient molecular complex). Specifically, we held the all-member meeting once a year, and the management team meeting on a regular basis. Efforts have been made to spend research funds efficiently by organizing the joint purchase of the reagents, and to promote collaboration between the members. We organized a symposium, and hosted workshops in various domestic conferences. We support the tutorial course for young investigators. We issued newsletters on a regular basis, and wrapped up an annual report at the end of the year.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物化学・構造生物化学

キーワード：構造生物学 核磁気共鳴法 X線結晶構造解析 一分子計測学 ケミカルバイオロジー

1. 研究開始当初の背景

タンパク質の立体構造の視点に基づく構造生物学研究は、生物学研究の基盤技術として生命現象の理解に大きく貢献している。しかしながら、従来の構造生物学研究の方法論および技術的制約から、決定された立体構造の多くは、インタクトのタンパク質から機能ドメインを切り出すなどの処置を施した対象に限られ、必ずしも *in situ* の状態を反映しているわけではない。さらに、同様の制約のため、複合体の構造解析も、多くは高親和性のリガンドとその標的タンパク質に限られている。一方、実際の生命現象発動の場においては、分子、細胞レベルなど様々な階層において、不安定で過渡的な複合体の存在およびその重要性が指摘されている。

細胞膜に存在する受容体は、リガンド結合に伴い受容体・細胞質因子を含むシグナル開始複合体をいわば“決定論的”に形成するかのように記述されるが、実際は個々の因子間の相互作用は細胞内においてしばしば過渡的で、不安定である (Nature, 443:651-7, 2006)。また、多くの細胞内タンパク質複合体では、最終的な安定複合体が形成される前に、両者が緩く接触した遭遇複合体とよばれる不均一な状態が過渡的に形成される (Nature, 447:1021-5, 2007)。例えば、化学反応や輸送を司る様々なタンパク質間相互作用では、遠距離でも作用できる静電相互作用により、タンパク質同士が引き寄せ合った遭遇複合体が素早く形成し、ついで最終的な複合体を形成することにより、 $10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ を越える高い結合速度を達成し、迅速で効率の高い化学反応や輸送が可能となっている (PNAS, 105:12855-60, 2008)。

さらに、細胞表層に目を向けるならば、シグナル伝達を効率に行うためにスフィンゴ脂質とコレステロールが過渡的に集合した膜ドメイン構造 (ラフト構造) が存在する。ここでは、膜タンパク質や細胞質因子がシグナル依存的に弱い相互作用で結合し、情報伝達のプラットフォームを形成している (Nat. Cell Biol., 9:7-14, 2007)。また、オルガネラ移行や分泌系のシグナル配列および細胞内のソーティング・輸送にかかわる種々のモチーフでは、コンセンサス配列が短く、しかもいくつかの位置で任意のアミノ酸残基が許されることから、多様なアミノ酸配列がモチーフとして許容されることが多く、これらのモチーフの受容体による認識には過渡的で動的な複合体が関与していると推定されている (Cell 100: 551-560, 2000, EMBO J 26: 4777-87, 2007)。

免疫細胞やがん細胞の生体内における動態においても過渡的な準安定状態の重要性が明らかとなりつつある。例えば、血液中を循環する免疫細胞は必要に応じて血管内皮細胞上へと接着する。このような血流下における細胞接着の初期段階においては、細胞上の受容体と血管内皮細胞上のリガンドが一過性

の結合と解離を繰り返しながら徐々に細胞の移動速度を落とすローリング反応が必須となる。ローリング反応において受容体がリガンドと親和性の低い過渡的な複合体を形成することが重要であると考えられている (Nat Immunol., 7:883-9, 2006)。

2. 研究の目的

上記で述べてきた現象は、生命現象を理解する上で重要であるものの、過渡的に形成される短寿命かつ不均一な状態が関与しているため、従来の構造生物学的手法を適用することは困難である。その理由は過渡的な複合体を *in vitro* で再現することが容易ではないこと、生細胞における過渡的な複合体を分子・原子レベルで解析する手法がないこと、などのため適切な解析戦略に欠けるからである。したがって、どのようにして *in situ* な状態における過渡的な複合体の性状解析を行うか？そして、どのようにして過渡的な複合体の機能を原子レベルで解析するか？について真剣に考察することが重要である。

本提案領域では、構造生物学、分子生物学、ケミカルバイオロジー、1分子計測学および免疫学の研究者の相互協力により、*in situ* における過渡的な準安定複合体を原子・分子レベルの精度で可視化する方法論を確立し、開発された手法を個別の系に適用することにより実証する。そして、従来の構造生物学的研究アプローチと合わせて過渡的な準安定複合体が関わる生命現象の解明を行うことを目的とする。

3. 研究の方法

研究期間内で開発する具体的な研究要素として、1. *in situ* における過渡的な準安定状態を原子レベルで記述可能にするサンプル調製法の開発を含めた NMR や X 線結晶法における新規測定・解析法の開発、2. 細胞表層におけるタンパク質の過渡的な準安定状態を観測可能とする、蛍光顕微鏡の回折限界 (約 250 nm) を破る超高解像度 1 分子蛍光顕微鏡の開発、3. 細胞表層および細胞内標的タンパク質分子に対する蛍光および低分子プローブを自在に導入できる新規化学反応の開発、4. 生細胞内におけるタンパク質の過渡的な相互作用を解析できる新規 NMR 法の確立、5. 免疫細胞およびがん細胞の生体内動態機構の解明、を設定する。(研究対象など研究内容の詳細は 2. 領域推進の計画・方法の項を参照)。そして、原子レベル、分子レベルおよび細胞レベルの研究を行うことを目指し、研究要素 1 を含む、A01: 準安定的に形成される生体分子複合体の構造とその機能発現機構、研究要素 2 と 3 を含む、A02: 準安定状態の動態を分子レベルで可視化する 1 分子観測技術の開発、研究要素 4 と 5 を含む、A03: 生理的準安定状態が引き金となって起こる高次生命現象の解析

の3種類の研究項目を設定する。本提案領域では原子、分子、細胞レベルのそれぞれを取り扱うマルチスケール(多階層)な研究項目を設定し、研究項目間の相互作用的な共同研究を展開することにより、生命科学の統合的な理解を目指す。そのため、本総括班は、この新学術領域研究を円滑に進めるために、方針を策定し、企画調整を行う。

4. 研究成果

(1) 総括班会議の開催

総括班の主たる役割は、(1) 各研究項目の成果を確実なものとするため、研究項目間の相互作用的共同研究を触媒すること、(2) 計画研究と公募研究の密接な連携を図ること、(3) 若手研究者の育成を行い当該領域の進展を図ることである。上記を行うため、定期的に総括班会議を開催し、総括班員が必要な方針を議論し、具体的な実行案を作成した。

(2) 全体班会議

年に1回、領域に参加する全ての研究者およびその共同研究者が一堂に会し、領域全体の班会議を開催した。領域には幅広い分野の研究者しているため、班会議での1人あたりの講演時間を30分程度と長めに設定し、バックグラウンドも含めて参加者が十分に研究内容を理解できるよう工夫した。また、共同研究促進のため、意見交換のための時間も十分にとった。

(3) 領域内共同研究の促進

共同研究に関しては、全体班会議での発表・討論および総括班会議での調整を通して研究者同士の連携を図った。班会議は研究項目ごとに行うのではなく、全員が集まる全体班会議を開催し、それぞれが研究発表を行った。また、研究項目間で研究者が議論できるようプログラム編成を工夫した。その結果、領域内で26件の共同研究が発足した。すでにその成果をまとめた論文は18件発表されており、今後もさらに増加すると見込まれる。本研究領域では、計画研究および公募研究の研究代表者として、方法論のための方法論を研究する研究者ではなく、ライフサイエンスにおいて重要な系に対しての問題意識を持ち、かつ方法論を研究する研究者に多く参画していただいている。その結果、計画・公募研究班内外の共同研究が進んでいると考える。また、特徴としては、異なる研究項目間、特に公募研究間での共同研究が多いことである。これは、研究者にとって、「知りたい情報ではあるがどのような手法を適応したら良いか不明」ということが、本領域により解消されつつあり、領域の方向性が妥当であったことを実証するものと考えている。

(4) シンポジウムの開催

また、領域のコンセプトと成果を国内外の研

究者にも広く伝えることを目的に、比較的参加者の多い学会においてワークショップを開催した。具体的には、日本蛋白質科学会年会(札幌)において「ワークショップ: 過渡的複合体の視点から生命現象を捉えなおす」、第49回 NMR 討論会(東京)「過渡的複合体が関わる生命現象の統合的理解」を開催した。また、日本化学会第91回春季年会においても「過渡的複合体を含む生命現象解明を目指した化学的アプローチ」を計画したが、震災の影響で中止(発表は成立)となった。平成23年7月21日には、領域単独で公開シンポジウムを開催した。シンポジウムでは計画研究代表者に加えて、若手の公募班員にも講演をお願いした。シンポジウムには86名が出席し、活発な討論が行われた。参加者にアンケートを行ったところ、80%以上が講演内容・講演の時間ともに良かったとの評価であった。平成25年には、第51回生物物理学学会年会(京都)において、公開シンポジウム「過渡的複合体が関わる生命現象の統合的理解」を開催した。同じく平成25年には、第36回分子生物学会年会(神戸)において、「原理まで遡って再確認する核磁気共鳴法の実力」というタイトルで公開ワークショップを開催した。また平成26年には領域の取りまとめとしての国際シンポジウムを開催予定である。

(5) 社会への発信

ニュースレターを年に1-2回の頻度で発行し、紙面を通じて領域内の交流の促進を図った。また年度末には成果報告書を作成し、領域内で得られた成果を共有することで、領域全体のこれまでの到達点を明確にした。また、領域のホームページを立ち上げ、領域の概要・方針、構成班員などの情報を公開した。また、領域内で得られた研究成果についても、公表した。国民との科学・技術対話に関しても、高校生への研究紹介、公開市民講座の開催などを通じて積極的に取り組んだ。日本生化学会の学会誌「生化学」2011年10月号に本領域で企画した特集記事を掲載し、日本生化学学会員に領域の成果を公開した。

(6) 若手育成

若手育成の取り組みとして、「先導的若手 NMR スペシャリスト育成プログラム」、「in-cell NMR workshop2021」、「in-cell NMR トレーニングコース2014」の開催を支援した。また領域シンポジウム出席のための旅費の援助を行った。

(7) 中間評価

平成23年度に受けた中間評価の結果はA+であり、研究領域の設定目的に照らして、期待以上の進展が認められるという評価を受けた。

5. 主な発表論文等
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 5 件)

西田紀貴, 嶋田一夫
CD44 の準安定なヒアルロン酸認識機構と細胞ローリング
生化学, 83(10), 893-901, 2011
<http://www.jbsoc.or.jp/seika/wp-content/uploads/2013/05/83-10-02.pdf>

神田大輔, 齊藤貴士
共有結合を用いた平衡シフトによる過渡的タンパク質複合体からの構造情報の取得
生化学, 83(10), 902-911, 2011
<http://www.jbsoc.or.jp/seika/wp-content/uploads/2013/05/83-10-03.pdf>

坂本明彦、加藤尚志、船津高志
細胞膜上におけるトロンボポエチン受容体の一分子ダイナミクス
生化学, 83(10), 912-919, 2011
<http://www.jbsoc.or.jp/seika/wp-content/uploads/2013/05/83-10-04.pdf>

松尾和哉, 浜地格
生細胞でのタンパク質選択的なケミカルラベリングの手法
生化学, 83(10), 920-929, 2011
<http://www.jbsoc.or.jp/seika/wp-content/uploads/2013/05/83-10-05.pdf>

早坂晴子, 岡田麻里, 白忠彬, 黒田康嵩, 吉田淳一, 宮坂昌之
ケモカインによる白血球, 癌細胞の生体内移動調節とケモカイン共働作用の関与
生化学, 83(10), 920-929, 2011
<http://www.jbsoc.or.jp/seika/wp-content/uploads/2013/05/83-10-06.pdf>

[学会発表](計 19 件)

1. 嶋田一夫
過渡的複合体が関わる生命現象の統合的理解
第 10 回日本蛋白質科学会年会ワークショップ「過渡的複合体の視点から生命現象を捉えなおす」
2010 年 6 月 16 日, 北海道札幌市

2. 神田大輔
準安定な分子複合体から構造情報を得るための新戦略.
第 10 回日本蛋白質科学会年会ワークショップ「過渡的複合体の視点から生命現象を捉えなおす」
2010 年 6 月 16 日, 北海道札幌市

3. 坂本明彦、加藤尚志、船津高志
トロンボポエチンシグナルの上流部は脂質ラフトによって制御されている
第 10 回日本蛋白質科学会年会ワークショップ「過渡的複合体の視点から生命現象を捉えなおす」
2010 年 6 月 16 日, 北海道札幌市

4. 浜地格
細胞での蛋白質選択的ケミカルラベリングの手法
第 10 回日本蛋白質科学会年会ワークショップ「過渡的複合体の視点から生命現象を捉えなおす」
2010 年 6 月 16 日, 北海道札幌市

5. 早坂晴子、吉村洋美、白忠彬、宮坂昌之
ケモカインレセプターの準安定状態と細胞動態
第 10 回日本蛋白質科学会年会ワークショップ「過渡的複合体の視点から生命現象を捉えなおす」
2010 年 6 月 16 日, 北海道札幌市

6. 白川昌宏
In-cell NMR 法による細胞内環境下の蛋白質の構造と機能の解析
第 10 回日本蛋白質科学会年会ワークショップ「過渡的複合体の視点から生命現象を捉えなおす」
2010 年 6 月 16 日, 北海道札幌市

7. 嶋田一夫
NMR による GPCR・リガンド相互作用解析
新学術領域研究「過渡的複合体」公開シンポジウム
2011 年 7 月 21 日, 東京大学薬学部 東京

8. 神田大輔
共有結合を用いた平衡シフトによる過渡的タンパク質複合体の安定化とその応用
新学術領域研究「過渡的複合体」公開シンポジウム
2011 年 7 月 21 日, 東京大学薬学部 東京

9. 船津高志
細胞膜上におけるトロンボポエチン受容体の一分子ダイナミクス
新学術領域研究「過渡的複合体」公開シンポジウム
2011 年 7 月 21 日, 東京大学薬学部 東京

10. 浜地格
生細胞での蛋白質の選択的ケミカルラベリ化と機能化
新学術領域研究「過渡的複合体」公開シンポジウム
2011 年 7 月 21 日, 東京大学薬学部 東京

11. 白川昌宏

磁気共鳴を使った生細胞における分子動態の計測手法の開発

新学術領域研究「過渡的複合体」公開シンポジウム

2011年7月21日, 東京大学薬学部 東京

12. 早坂晴子

白血球、癌細胞の生体内動態調節におけるケモカイン共働作用

新学術領域研究「過渡的複合体」公開シンポジウム

2011年7月21日, 東京大学薬学部 東京

13. 船津高志

「1分子イメージングによってわかるタンパク質の働き」日本バイオイメーキング学会第20回学術集会 公開講座

2011年8月31日 千歳市民文化センター、千歳市、北海道

14. 有吉 真理子, 大谷 淳二, 白川 昌宏

メチル化 CpG 結合蛋白質 MBD4 による緩い基質 DNA 認識

第51回日本生物物理学会年会ワークショップ「過渡的複合体が関わる生命現象の統合的理解」

2013年10月29日, 京都府京都市

15. 神田 大輔

タンパク質結晶中に意図的に創り出した空間を使って, タンパク質に結合した状態のリガンドの大振幅運動を解析する

第51回日本生物物理学会年会ワークショップ「過渡的複合体が関わる生命現象の統合的理解」

2013年10月29日, 京都府京都市

16. 西田 紀貴, 嶋田 一夫

ゲル包埋型バイオリアクターを用いた生細胞内蛋白質間相互作用のNMR観測

第51回日本生物物理学会年会ワークショップ「過渡的複合体が関わる生命現象の統合的理解」

2013年10月29日, 京都府京都市

17. 浜地格

タンパク質解析のための生細胞でのケミカルラベリング

第51回日本生物物理学会年会ワークショップ「過渡的複合体が関わる生命現象の統合的理解」

2013年10月29日, 京都府京都市

18. 早坂 晴子, 小林 大地, 宮坂 昌之

ケモカイン受容体多量体形成による細胞動態の調節

第51回日本生物物理学会年会ワークショップ「過渡的複合体が関わる生命現象の統合的理解」

2013年10月29日, 京都府京都市

19. 坂本 明彦, 加藤 尚志, 船津 高志

一回膜貫通型サイトカイン受容体 Mpl 二量体化の一分子蛍光解析

第51回日本生物物理学会年会ワークショップ「過渡的複合体が関わる生命現象の統合的理解」

2013年10月29日, 京都府京都市

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

過渡的複合体 HP

http://ishimada.f.u-tokyo.ac.jp/public_html/tmc/

6. 研究組織

(1) 研究代表者

嶋田一夫 (Shimada, Ichio)

東京大学大学院薬学系研究科・教授

研究者番号: 70196476

(2) 研究分担者

神田大輔 (Kohda, Daisuke)

九州大学生体防御医学研究所・教授

研究者番号: 80186618

(3) 連携研究者

船津高志 (Funatsu, Takashi)

東京大学大学院薬学系研究科・教授

研究者番号: 00190124

浜地格 (Hamachi, Itaru)

京都大学工学研究科・教授

研究者番号: 90202259

白川昌宏 (Shirakawa, Masahiro)

京都大学工学研究科・教授

研究者番号: 00202119

早坂晴子 (Hayasaka, Haruko)

大阪大学医学系研究科・助教

研究者番号: 70379246

阿久津秀雄 (Akutsu, Hideo)

大阪大学蛋白質研究所・客員教授

研究者番号: 60029965

稲垣冬彦 (Inagaki, Fuyuhiko)

北海道大学 先端生命科学研究所・教授

研究者番号: 70011757

宮坂昌之 (Miyasaka, Masayuki)

大阪大学医学系研究科・教授

研究者番号：50064613
西村善文 (Yoshifumi, Nishimura)
横浜市立大学国際総合科学部・教授
研究者番号：70107390
森川耿右 (Morikawa, Kosuke)
国際高等研究所・チーフリサーチフェロー
研究者番号：50135513