

## 研究テーマ: 蛋白質の構造と機能の分子論的解明とその設計

— 生命活動の基本的原理の探求とその応用 —

- ・ 金属蛋白質における機能発現の分子機構の解明とその制御・設計
- ・ 進化的計算の開発とそれによるクラスターと蛋白質の最安定構造のシミュレーション

### 教員・職員構成・居室・連絡先

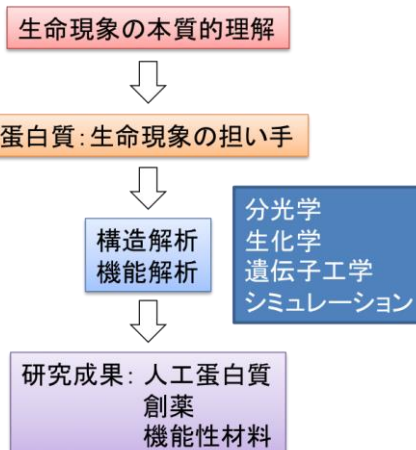
教授	石森 浩一郎	7-1-05 室	内線 2707	koichiro@sci.hokudai.ac.jp
准教授	内田 毅	7-1-04 室	内線 3501	uchida@sci.hokudai.ac.jp
助教	竹内 浩	7-1-03 室	内線 3533	takehi@sci.hokudai.ac.jp
助教	齋尾 智英	7-1-18 室	内線 3506	saio@sci.hokudai.ac.jp
研究室秘書	田中 眞紀	7-1-03 室	内線 3533	maki-t@sci.hokudai.ac.jp

### 研究院・学生・院生構成

博士課程 3 年	今井 瑞依
博士課程 2 年	関根 由可里
博士課程 1 年	土井 健太郎, 渡部 祐太
修士課程 2 年	小倉 麻梨子, 佐々木 美穂, 佐藤 航, 鈴木 研士郎
修士課程 1 年	今野 翔平, 柴田 明宏, 西谷 雄大, 道順 暢彦, Fatima Joy Consul Cruz
学部 4 年	加賀屋 潤, 小林 則之, 佐藤 淳哉, 丸岡 直矢 (全員総合化学院進学)
研究生	南 多娟 (総合化学院進学)

### 研究の概要

生体中で重要な働きを担う蛋白質のしくみを解き明かすため、蛋白質の構造に基づく機能解析に取り組み、さらにそこで得られた情報をもとに蛋白質の機能設計の試みまでを強力に推し進めています。そのため、分子生物学的、生化学的手法を駆使したアミノ酸置換蛋白質の効率的な発現、精製手法から、理学部では最高性能の 600 MHz 超高感度高分解能 NMR 装置、蛋白質のマイクロ構造を鋭敏にとらえるレーザーラマン分光装置、物理化学の基本原則に基づくシミュレーション計算といった物理化学的な手法まで、学際領域の多くの最新



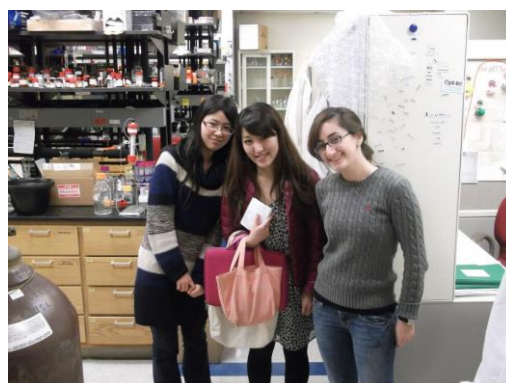
鋭の手法を取り入れて研究を進めています。物理化学が苦手でも**生命現象に興味ある人**、逆に生物があまり得意でなくても**物理化学的な解析に興味のある人**であれば、生命や生物の不思議を分子、原子のレベルで解き明かすことで楽しんで研究できるでしょう。さらに、このような研究で得られた成果や開発した手法は、ポストゲノムの時代に注目されている**蛋白質の分子構造に基づく創薬や治療法の開発、クリーンな機能性材料としての人工蛋白質の設計**など、これからの実際に社会に役立つ**新技術、新材料の基礎研究**としても重要な意義があります。

また、新たな研究の展開を求めて、国内外の研究室とも共同研究体制を整え、多くの研究機関と活発な交流を進め、特に**大学院生の海外研究機関への短期留学**を推奨しています。物理、生物、化学の学際領域の研究であるため、共同研究先は理工学系の化学関連部局だけではなく、**医学基礎研究系部局、農学系生物化学関連部局**など国内外の多様な研究機関と行っています。自分の専門分野をしっかりと持つだけでなく、広い視野を持って自ら研究を進めていくことのできる人材の育成を目指し、以下のような機関と院生の交流を含む共同研究の実績があり、現在も多くの国内外の期間と興味深い研究を継続しています。

国内：北海道大学、東北大学、大阪大学、慶応大学、鳥取大学、北陸先端大学院大学、兵庫県立大学、・・・

国外：ニューヨーク州立大学、オックスフォード大学、カリフォルニア工科大学、カリフォルニア大学バークレー校、・・・

平成 21 年より**大阪大学蛋白質研究所**との間で**共同研究プログラム**を開始して、**大学院生の長期派遣**を行っているほか、研究室として**大学連携設備ネットワーク**や**物質創製開発研究領域共同研究拠点**などに参加し、国内の各研究機関との共同研究を積極的に推し進めるとともに、平成 24 年度までに「**ショートステイ・ショートビジットプログラム**」により、修士課程院生 5 名、博士課程院生 1 名が 45～60 日の間、アメリカ合衆国の研究室に**短期留学**することで、海外の大学の多くの研究室とも共同研究や人的交流で緊密な関係を保っています。今年の 4 月からはパナソニック財団の支援を受けたフィリピン国立大学からの留学生、10 月からは韓国からの留学生が研究室に加わっています。



短期留学先の米国・イリノイ大の研究室

さらに、北海道大学の化学系大学院が中心となって推進している**博士課程教育リーディングプログラム「物質科学フロンティアを開拓する Ambitious リーダー育成プログラム」**の第 1 期生として 3 名の研究室所属の修士課程 1 年院生が選抜され、グローバルリーダー目指して、日々研鑽を積んでいます。

## **研究室保有機器**

**He冷却超高感度 600 MHz NMR**:理学研究院では最高性能。蛋白質の構造解析に駆使されています。

**分光システム付グローブボックス**:嫌気下 ( $O_2$  濃度 5 ppm 以下) での実験、測定用です。

**円二色性分光光度計(CD)**:蛋白質の二次構造に関する情報をもたらします。

**磁気円二色性分光用マグネット(MCD)**:日本で唯一の蛋白質専用の MCD 装置です。

**レーザーラマンシステム:**蛋白質のマイクロ構造解明に必須の装置です。50 cm の大型分光器のお陰で、蛋白質内のわずか 0.01 Å の変化も検出可能です。

**時間分解吸収・蛍光測定装置:**蛋白質のミリ ( $10^{-3}$ ) 秒からナノ ( $10^{-9}$ ) 秒の非常に速い構造変化を観測する装置です。

**表面プラズモン共鳴バイオセンサー:**蛋白質や DNA の相互作用を定量的に観測する装置です。

**高圧下分光測定装置:**数千気圧の圧力を加えることで、常圧下では観測できないような蛋白質の物性を鋭敏に観測することが可能な本研究室独自の装置です。

**全自動チップ電気泳動システム:**チップ上のマイクロ流路内でタンパク質や DNA の電気泳動を行う装置で、一サンプルわずか数分で結果が得られます。

**大型振盪培養機:**5L の巨大な三角フラスコを毎分 200 回転以上の高速で振盪し、大腸菌を培養します。帰宅し、寝ている間にも大腸菌がせっせと蛋白質を合成してくれます。

**クロマトグラフィーシステム:**スタートボタンを押すだけで、自動で蛋白質を精製してくれるすぐれものです。

## 研究場所

### 理学部 7 号館 1 階

#### 7-1-02 合成実験室

蛋白質の発現、精製や遺伝子操作などの実験場所です。大腸菌の培地を処分する「かぐわしい」香りが漂うときが多いようです。

#### 7-1-03 教員・院生室(竹内)

竹内助教のほか、田中秘書、院生・学生（今井、関根、小倉、佐々木、佐藤航、西谷、道順、Fatima）の居室です。女性が過半数を占める女子部屋です。

#### 7-1-04 教員・院生室(内田)

内田准教授のほか、院生・学生（柴田、加賀屋、佐藤淳、丸岡）の居室です。

#### 7-1-05 教員室(石森)

レーザープリンタが設置された前室の奥が居室ですので、遠慮せず奥までお入りください。

#### 7-1-08 レーザー分光室

レーザーラマン測定のためのレーザーや分光器、円二色性分光光度計、紫外可視近赤外分光光度計が整然と並んでいます。金属蛋白質測定用ラマン分光装置では日本で 1, 2 を争う性能で、全国から多くの研究者が測定に訪れます。ラマン測定中は部屋の照明を落とした中、レーザービームが怪しく飛び交います。

#### 7-1-12 共通機器室

共通機器室をお借りして DNA シーケンサ、グローブボックス、超低温冷凍庫などを置かせていただいています。

#### 7-1-18 教員・院生・機器室(齋尾)

齋尾助教のほか、院生・学生（土井、渡部、鈴木、今野）の居室で、住人すべてが男性の男子部屋ですが、入り口付近には蛋白質を精製するための低温室やクロマトチャンバーが



He冷却超高感度 600 MHz NMR

設置されています。また、学生実験でも使用した赤外分光光度計や紫外可視分光光度計、蛍光光度計、奥の方にはレーザー励起の時間分解吸収・蛍光測定装置などの分光分析装置が所狭しと並んでいます。

## 高分解能NMR室 4階

### 実験室1

共通実験室ですが、理学部では最高性能の He 冷却超高感度 600 MHz NMR を置かせていただいています。重厚な扉と高い天井が、いかにも高価な機器の置き場所である雰囲気醸し出しています。北大にも 2, 3 台しかない機器ですが、テーマによっては 4 年生でも操作します。

## 研究室の一年

- 4月 各自の研究テーマが決まり、実験を開始。
- 5月 実験、雑誌会、輪読、グループミーティング、セミナーの日常に慣れ。
- 6月 野球大会で勝利に酔う（ことを夢見る）。
- 7月 4年生による初陣のセミナー&院試壮行会。
- 8月 院試。院試お疲れさま会で一息。
- 9月 研究室旅行で refresh したあとは実験も本格化。
- 10月 学会シーズン始まる。教員や院生は全国遠征へ。来年は自分も…。
- 11月 雪がちらつくとそろそろ業績発表会のことが…。研究・実験も加速。
- 12月 年忘れ忘年会。初めての研究生生活で充実した1年（のはず）。
- 1月 正月気分もほどほどに。業績発表会は目前。焦る気持ちを抑えて着実に研究を。
- 2月 いよいよ業績報告会。自信をもって研究の集大成発表の晴れ舞台へ。
- 3月 卒論提出。学部生活の締めくくり。3年生研究室配属、研究室新歓そして追いコン。



今年の研究室旅行より(美瑛)

## 研究室の日常

**実験（毎日）：**各自のテーマに基づき、初めは教員や先輩に手取り足取り教えてもらいながら実験を開始します。

**雑誌会（毎週）：**主に修士課程院生と学部学生が自分の興味がある論文を研究室のメンバーの前で紹介。教員や先輩の質問に答えるうちに、プレゼンテーション能力が向上し、種々の面接での臨機応変な対応に絶大な効果あり。

**輪読（毎週 2 回）：**洋書を通読し、英語力を磨きます。専門英語の読解力はこれから社会で活躍する人には必須（院試の際にも意外に効果あり・英語に救われた人も多し）。

**グループミーティング（隔週）：**研究の進捗状況の報告し、教員や先輩方からアイデアをもらい、研究に役立てます。

**セミナー（各自年数回）：**各自の研究内容を紹介します。担当者にとっては業績発表会や学会発表の良い練習の場です。十分な準備が必要ですが、プレゼンテーション能力を磨くには絶好の機会です。

## 研究発表

大学院生、学部生には積極的に国内外の学会で自らの研究成果を発表すること奨励しています。平成 20 年度には学部 4 年生が日本生物物理学会北海道支部例会で「発表賞」、平成 21 年度は日本化学会冬季研究発表会で修士課程院生が「ポスター賞」、平成 22 年度は日本生物物理学会北海道支部例会で修士課程院生が「発表賞」、平成 23 年度は日本化学会北海道支部夏季研究発表会と化学系学協会北海道支部冬季研究発表会、日本生物物理学会北海道支部例会で修士課程院生が「優秀講演賞」と「ポスター賞」、平成 24 年度は金属の関与する生体関連反応シンポジウムと日本生化学会北海道支部例会で修士課程院生が「ポスター賞」、平成 24 年度は日本化学会北海道支部夏季研究発表会で修士課程院生が「優秀講演賞」、CSJ 化学フェスタと酸化反応討論会で博士課程院生が「ポスター賞」を受賞しました。今年度も金属の関与する生体関連反応シンポジウムで三名の院生が「ポスター賞」、日本化学会北海道支部夏季研究発表会で二名の修士課程院生が「優秀講演賞」を受賞しました。



夏季研受賞式より

研究成果は国内外の学会で発表し、論文を欧米の英文一流専門雑誌に投稿することで、世界に通用する研究者の育成を目指しています。研究室として発表を行った国内外の学会等は、以下の通りです。発表雑誌はあとの研究項目を参照ください。

国内：日本化学会、日本生物物理学会、日本生化学会、日本分子生物学会、日本蛋白質科学会、・・・

国外：Gordon Research Conference: Graduate School Seminar -Bioinorganic Chemistry, International Conference on Biological Inorganic Chemistry,・・・

## 主な就職先

最近の卒業生は、テルモ（修士）、カネカ（修士）、三菱化学（修士）、キューピー（修士）、大塚製薬工場（修士）、山本貴金属地金（修士）、JR 西日本（修士）、応用医学研究所（修士）、科学捜査研究所（修士）、経済産業省（修士）、旭化成ファーマ（学部）、日本アイビーエム・ソリューション・サービス（学部）などに就職しました。また、ここ数年に在籍した博士課程院生 3 名が日本学術振興会特別研究員で、うち 1 名は、その研究能力が極めて高いと認められ、化学分野で年間数人しか採択されない日本学術振興会特別研究員（SPD）でした。

## Open Lab 実施予定

10 月 20 日(月)以降の午後を予定していますが、出張・会議等で不在な場合もあるので、面倒ですが事前連絡をお願いします。

## 連絡先

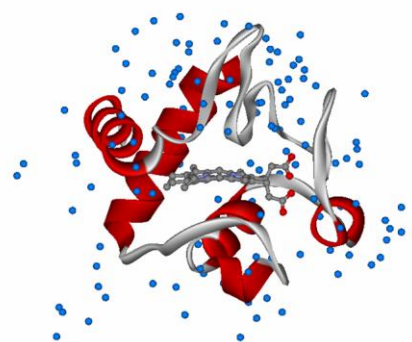
011-706-2707, あるいは [koichiro@sci.hokudai.ac.jp](mailto:koichiro@sci.hokudai.ac.jp). 研究室ホームページ <http://www.chem.sci.hokudai.ac.jp/~stchem/> もご覧ください。(Google で「構造化学研究室」).

twitter <http://twitter.com/kozokagaku> でも学科行事、研究室行事等の写真、日常や学会会場でのつぶやきを紹介しています。

# 金属蛋白質における機能発現の分子機構の解明とその制御・設計

石森浩一郎  
内田 毅  
齋尾 智英

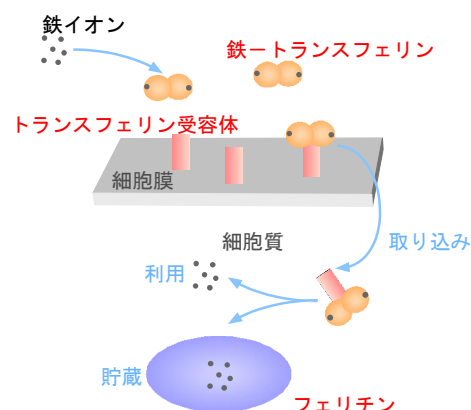
近年、ヒトゲノムの解読完了という成果に代表されるように、生命の科学的理解は着実に進んできている。しかし、遺伝子に組み込まれている生物情報が既知となっても、その情報が示す蛋白質の構造と機能の分子レベルでの理解なしには、真の意味で生体機能や生命現象を理解したとはいえず、蛋白質の高度な機能を活用した創薬、遺伝子治療、生体触媒等への応用も困難である。そこで我々は分子構造に基づく生命活動の分子レベルでの解明とその人工的制御を目指して、蛋白質、特に生体内で重要な金属イオンを含む蛋白質に注目し、種々の最先端の分光機器類による物理化学的手法を中心にして、最新の生化学的・分子生物学的手法を組み合わせることで、蛋白質における構造形成と機能発現の分子機構の解明、およびその分子設計の実現に取り組んでいる。



## 研究テーマの例

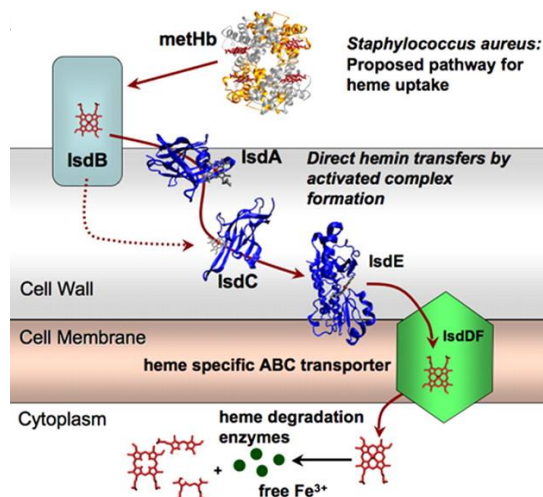
### 1) センサー蛋白質の構造および機能の解析

生物はその恒常性の維持のため、多くの機能を厳密に調整・制御する必要があり、その分子機構は、金属イオン、金属錯体、気体分子などのシグナル伝達物質によって仲介されている。我々は、これらのシグナル伝達機構について、種々の分光学的、分子生物学的手法を応用することでその分子構造を明らかにし、機能発現の分子レベルでの解明を試み、その人工的な制御の可能性を追求している。特に、金属イオンの代謝機構に注目し、その異常との関連性が示唆されている神経性疾患や肝炎といった疾患とセンサー蛋白質の機能を関連付けることで、その発症の分子論的描像の解明を試みている。



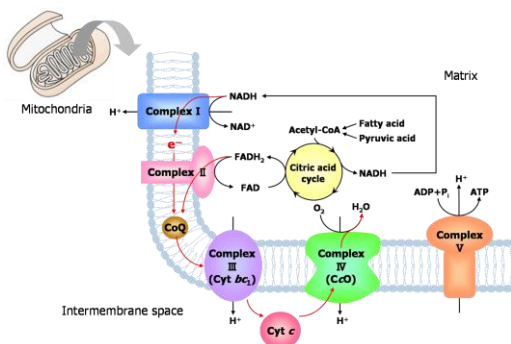
### 2) 病原性細菌の金属イオン獲得機構に関する研究

病原性細菌は自身が生存するために様々な金属イオンを必要とするが、その多くを宿主から獲得する。例えば、もっとも重要な鉄イオンは血液中の主要成分であるヘモグロビンから補酵素であるヘムを抜き取り、それを分解することで、鉄イオンだけを取り出し、自身の鉄含有蛋白質に取り込むことで利用している。このような細菌による金属イオンの獲得には多くの蛋白質が関与する複雑な機構を存在すると考えられているが、その詳細は不明である。いわば細菌にとっての補給路である金属イオンの獲得機構



を理解することは、細菌からの防御・医薬に関連すると考えられ、自作の顕微ラマン分光装置とマイクロリアクターを利用した反応系を構築し、ヘムの獲得機構を明らかにする研究を行っている。

### 3) 呼吸鎖における電子伝達機構の解明

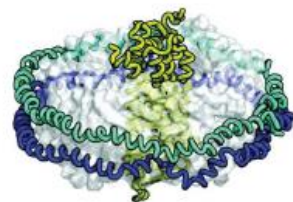


酸素呼吸生物は解糖系で得られた電子を用いて効率的に ATP を生産している。この ATP 生産過程には効率的な蛋白質間の電子伝達過程が必須であり、その解明は酸素呼吸生物のエネルギー生産の分子論的解明に必須であるばかりではなく、今後注目されるクリーンな生物エネルギー生産実現のためにも注目されている。我々はこの蛋白質間電子移動について、超高分解能多核多次元 NMR を用いることで、その分子機構の解明と人工的な制御を試みている。

### 4) 「ナノディスク」を用いた膜蛋白質の構造・機能に関する研究

3)の呼吸鎖の蛋白質をはじめ、生理的に重要な蛋白質の多くは生体膜に結合した状態で機能している。しかし、生体膜に結合したままでは蛋白質の精製が困難であるため、これまでの膜蛋白質の研究は、膜の代わりに両親媒性の界面活性剤を用いて可溶化した状態で行われており、生体内とは異なった環境下での構造や機能が議論されてきた。

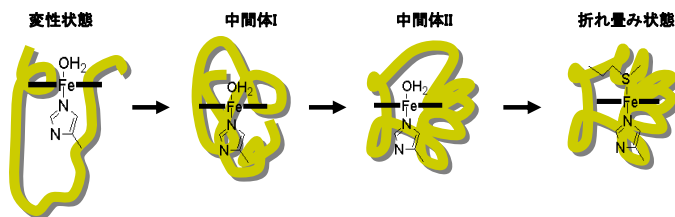
そこで最近、脂質と脂質のまわりを取り囲む蛋白質を用いることで、半径が 10 nm 程度の円盤状の膜、「ナノディスク」を作成し、その中に蛋白質を入れ込む手法が開発されてきた。この手法を用いて、呼吸鎖を構成する蛋白質をより生体内に近い条件でその機能や構造を検討するとともに、蛋白質を一定方向に配列させたナノデバイスへの応用の可能性を検討している。



### 5) 蛋白質の立体構造構築原理に関する研究

蛋白質は、ペプチド鎖が水素結合などの弱い力で一定の立体構造を維持し、その機能が発現すると想定されている。しかし、このような蛋白質の立体構造形成については、ペプチド鎖のアミノ酸配列に依存すると考えられているもの

の、その立体構造構築の原理については不明な点が多く、Post-Genome の時代に注目されている遺伝情報からの蛋白質の機能異常や、その応用としての遺伝性疾患の検出などにおいては、アミノ酸配列とそこから推定される蛋白質の立体構造に基づく蛋白質機能の推定が実用的にも重要なテーマでとなっている。そこで、このような蛋白質の立体構造構築原理の解明を目指して、種々の独自に開発した分光学的手法を駆使することで蛋白質立体構造形成過程を追跡し、その分子メカニズムを明らかにすることで、蛋白質の立体構造構築の基本原理や機能発現の分子機構を解明することを目指すとともに、人工的に設計された高機能性新規蛋白質の実現をも試みる。



## 最近の研究成果

- 1 最近注目を集めている新たな金属蛋白質である「ヘム制御蛋白質」に関する総説: Unique Heme Environmental Structures in Heme-regulated Proteins Using Heme as the Signaling Molecule, Ishimori, K., and Watanabe, Y. (2014) *Chem. Lett.* 印刷中
- 2 DNA鎖の動きを蛍光で追跡することに成功: Sequence and Temperature Dependence of the End-to-End Collision Dynamics of Single-Stranded DNA, Uzawa, T., et al., (2013) *Biophys. J.* **104**, 2485-2492.
- 3 ヘムを分解し、鉄を取り出す酵素をコレラ菌から発見: A heme degradation enzyme, HutZ, from *Vibrio cholerae*, Uchida, T., Sekine, Y., et al., (2012) *Chem. Commun.*, **48**, 6741-6743.
- 4 時計遺伝子の一つであるNPAS2のヘムに依存的な転写機構を解明: Effects of the bHLH Domain on Axial Coordination of Heme in the PAS-A Domain of Neuronal PAS Domain Protein 2 (NPAS2): Conversion from His119/Cys170 Coordination to His119/His171 Coordination, Uchida, T., et al., (2012) *J. Inorg. Biochem.*, **108**, 188-195.
- 5 気体分子の結合またはヘムの酸化状態により活性が制御される新規なキナーゼの機能構造解析: Identification and Functional and Spectral Characterization of a Globin-coupled Histidine Kinase from *Anaeromyxobacter* sp. Fw109-5, Kitanishi, K., et al., (2011) *J. Biol. Chem.*, **286**, 35522-35534.
- 6 ミトコンドリアにおけるATP合成に必須な電子移動過程の構造解析: NMR Basis for Interprotein Electron Transfer Gating between Cytochrome *c* and Cytochrome *c* Oxidase, Sakamoto, K., et al., (2011) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 12271-12276.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*はアメリカ科学アカデミーの機関誌で総合科学誌として高い評価を受けています。この論文の内容は北大ホームページやマイナビニュース等でも紹介されました。
- 5 ヘム結合によってその機能が制御される転写因子の構造解析: “Unusual Heme Binding in the Bacterial Iron Response Regulator Protein (Irr): Spectral Characterization of Heme Binding to Heme Regulatory Motif”, Ishikawa, H., et al., (2011) *Biochemistry*, **50**, 1016-1022.
- 6 多核多次元NMR法を用いた呼吸鎖電子伝達蛋白質シトクロム*c*における電子伝達ダイナミクスの検討: Redox-controlled backbone dynamics of human cytochrome *c* revealed by <sup>15</sup>N NMR relaxation measurements, Sakamoto, K., et al., (2010) *Biophys. Biochem. Res. Commun.* **398**, 231-236.
- 8 赤外分光法を用いた蛋白質立体構造形成過程の時間分解解析: Dehydration of Main-chain Amides in the Final Folding Step of Single-chain Monellin Revealed by Time-resolved Infrared Spectroscopy, Kimura, T., et al., (2008) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 13391-13396.
- 9 多核多次元NMR法を用いた蛋白質立体構造形成過程の解析: Hierarchical Folding Mechanism of Apomyoglobin Revealed by Ultra-fast H/D Exchange Coupled with 2D NMR, Uzawa, T., et al., (2008) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 13859-13864.



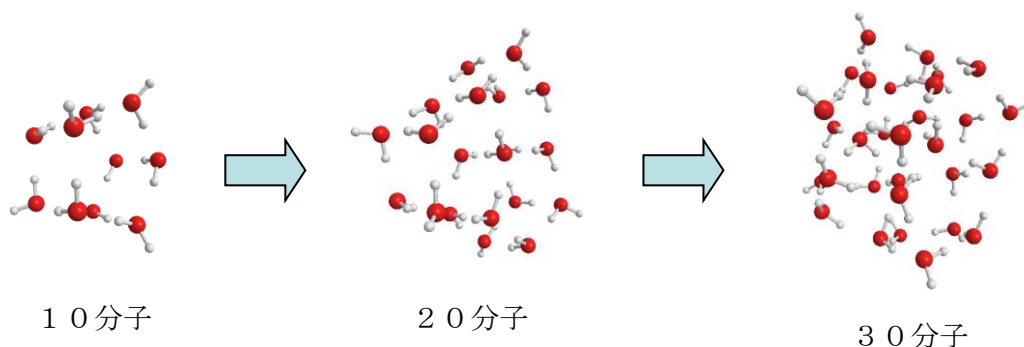
# 構造最適化手法の開発とそれによるクラスターとたんぱく質の 最安定構造のシミュレーション

竹内 浩

原子・分子の集合体の最安定構造を求める一構造最適化手法の開発を行っている。また、その応用として、クラスターとたんぱく質モデルの最安定構造のシミュレーションを実行している。

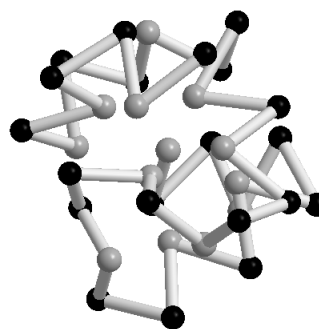
クラスターは気液中間相であり、クラスターサイズによる構造の変化の解明を目指して研究を進めている。たんぱく質については、一次構造から立体構造を予測するための手法を開発するために、単純なモデルを用いて計算を行っている。

## 水クラスターの構造変化



## 34残基の3次元たんぱく質モデル

ABBABBABABBABBABA  
BBABABBABBABABBAB



A と B が疎水性基（灰色）と親水性基（黒色）  
をそれぞれ示す

## 最近の研究成果

1. ベンゼンクラスターの構造 : "Structural features of small benzene clusters  $(C_6H_6)_n$  ( $n \leq 30$ ) as investigated with the all-atom OPLS potential", H. Takeuchi, *J. Phys. Chem. A*, 116, 10172 - 10181 (2012).
2. メタンクラスターの構造 : "The structural investigation on small methane clusters described by two different potentials", H. Takeuchi, *Comput. Theoret. Chem.*, 986, 48 - 56 (2012).
3. アセチレンクラスターの構造 : "Global minimum geometries of acetylene clusters  $(HCCH)_n$  with  $n \leq 55$  obtained by a heuristic method combined with geometrical perturbations", H. Takeuchi, *J. Comput. Chem.*, 31, 1699 - 1706 (2010).