

日本核磁気共鳴学会 若手研究者渡航助成金（2019 年度第 2 回）

64th Annual Meeting of Biophysical Society 参加報告書

徳永 裕二

（国立研究開発法人 産業技術総合研究所 創薬分子プロファイリング研究センター）

渡航者は、2019 年度第 2 回募集の日本核磁気共鳴学会・若手研究者渡航助成金（以下、若手渡航助成）を拝受し、2020 年 2 月 15 日～19 日の期間に米国はサンディエゴにて開催された 64th Annual Meeting of the Biophysical Society（以下、BPS2020）にて研究発表および情報収集を行った。以下にこれらの内容を報告する。

序文

1984 年 2 月 2 日に生を受けた渡航者は、応募資格 35 歳以下である日本核磁気共鳴学会・若手研究者渡航助成金への応募時に 35 歳であり、渡航の二週間前には 36 歳を迎えた。ボクサーは前日計量後にエネルギーを蓄え、一回り大きくなって試合に臨むが、対照的に approx. 40 には体力の衰えは隠せない。精神ばかりは若々しく臨もうと Stay hungry, stay foolish を心に唱えてかの国に上陸した渡航者を迎えたのは、果たして Staypineapple hotel であった（図 1 A）。食べ放題のパイナップルクッキーにて hungry 精神は早々に打ち砕かれ（図 1 B）、生来の foolish のみを引き連れての参加となったことは、本レポートを読むことでご確認いただけることと想像する。

A



B



図 1. A. Staypineapple hotel 外観。B. 食べ放題パイナップルクッキー。砂糖が眩い。

参加学会および渡航先について

西海岸は留学先には適さない、何となれば気候温暖の故に若者をして遊興に耽らしめるからである（図 2）、とは、かつてある先達がものした論考である。こうした揶揄をよそに、今日のサンディエゴは生物学研究の一大拠点を形成し、その中心たるスクリプス研究所は

Prof. Peter Wright および Prof. Kurt Wüthrich を擁する。このことを反映し、当地では世界最大の生物物理学の会合である BPS がボストンと交互に開催されている（図 3）。



図 2. LAX-SA 間は Amtrak で移動。往路では 2 時間の到着遅延と度重なるホーム変更のアナウンスがあり、本邦の新幹線のクオリティの高さを再認識させた。それでも、ヤシの木がプラットフォームを縁取る風景は「まあ西海岸だし」と思わせる寛容の精神を涵養する。



図 3. BPS2020 の会場であるサンディエゴ・コンベンションセンター。背中側はすぐ市街であり、最初の建物は酒場である。ホテルから会場へのアクセスも頗る良好。

若手渡航助成による BPS への参加は渡航者が初と思われるため、BPS について簡単にご紹介したい。公式サイトによれば、BPS は 1958 年に発足した（初回会合は先立つ 1957 年。本邦でも後を追うように日本生物物理学会が 1960 年に発足している）。当時、第二次世界大戦における同分野および関連技術の発達を背景として、生物学への物理学的アプローチの必要性を痛感していた米国生理学会所属の有志 4 名が、約 2 年をかけて立ち上げたという。初代 president は望遠鏡を顕微鏡に持ち替えた元天文学者であったということも影響してか、本学会においては各種顕微鏡技術の活躍が特に目立った。

BPS2020 の参加人数は約 7,000 名と公表されている。これは日本分子生物学会年会と同等の数である。ただし、この数は米国にて開催される他の生物学関連の学会と比較すると数分の 1 ほどの小規模であり、それ故に参加者同士が intimate である点がアピールされている。つまりは生物学関連の学会の規模が、日本と比較して数倍、大きいということである（図 4）。人数に関して、ひとつ不思議に感じたこと。パラレルセッションは最大 8 テーマの同時進行であるため、単純な割り算では 1 テーマあたり 800 人超が詰めかけることが想定される。ところが、実際の聴衆の数はその 4 分の 1 ほどではないかと、渡航者の目には映った。西

海岸のバミューダ・トライアングルともいふべき現象であるが、次回ボストン大会を待ち、再現性を確認したい。座席を贅沢に使用できるという意味ではメリットともいえる。

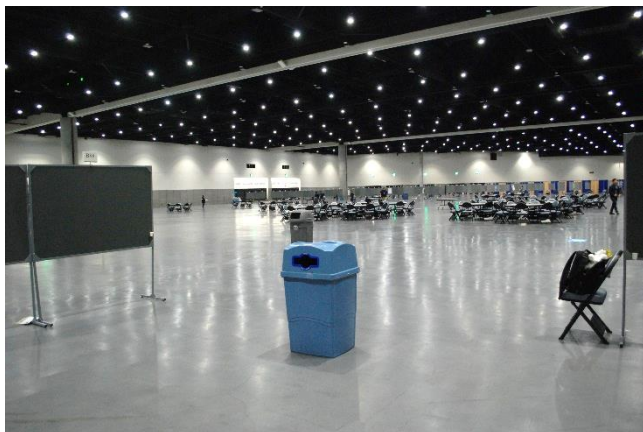


図 4. 最終日に片付けの進むポスター会場（研究内容の保護の観点からポスター掲示中の撮影は遠慮した）。国内の学会に比してボードの垂線方向の距離が広く取られており、快適であった。学会員の推薦を発表要件とすることで発表件数が適度に絞られているためか。

若手渡航助成の礎を築かれた故京極好正先生は、日本生物物理学会において 1986-87 年度期に会長を務められた。また、2018-2019 年期には、Prof. Angela Gronenborn が BPS の President を務めておられる。いずれの先生も NMR を中心に据えながらも、NMR 以外の物理化学的アプローチに造詣が深い点で共通している。故京極先生におかれては初期に赤外分光を専攻され Watson-Crick 塩基対が安定に形成される熱力学的根拠を示すなど記念碑的な業績を残された (Kyogoku et al, *BBA* (1969))。Prof. Gronenborn におかれては X 線結晶構造解析や電子顕微鏡解析を併用した学際的な研究から HIV ウイルスの構造生物学的研究に多大な貢献をされている (Perilla and Gronenborn, *Trends Biochem Sci* (2016) など)。これらのことにも象徴されるように、NMR の学際的活用を強く認識できるという観点からも、若手研究者の BPS 年会への参加は核磁気共鳴学会にとって有意義であると、渡航者は考えている。

学会内容報告

シンポジウム、プラットフォーム、およびワークショップは最大 8 テーマの平行セッションにて進行され、計 105 テーマを数えた。渡航者において便宜上、これらを図 5 のように分類した。

①膜および膜タンパク質

26 件と最大であった。これは物質輸送および情報伝達の始点として果たす生理的な重要性、および創薬標的としての膜タンパク質の重要性に加えて、技術的な進歩、一例を挙げれば極低温電子顕微鏡 (cryo-EM) の分解能向上などにより、取扱いの難しい膜タンパク質を対象とした研究において機能制御メカニズムを説明しうるだけの質・量を備えたデータの取得が可能となってきたことを反映したものと考えられる。

②分子および分子マシナリ

24 件設定された。内訳を見たとき、天然変性タンパク質 (Intrinsically disordered proteins; IDPs) のセッションが 4 件含まれることは注目に値する。特定の立体構造を持たない IDP の構造的 연구には NMR が活用されるため、NMR の専門学会では複数の IDP のセッションが設けられることは珍しくない。一方、生物物理の学会にて IDP に少なからぬセッションが割り当てられていることの背景には、液-液相分離 (Liquid-liquid phase separation; LLPS) の研究が国

際的に活発化していることがある。LLPS は文字通り液相と液相の間の分離であり、水と油であれば自然なことであるが、興味深いことに細胞の中で水と水が互いに組成を異にして分離し独特の機能場を形成する現象を指す。多くの場合、天然変性タンパク質／領域および RNA などが高密度に集合し、液滴相を形成する。脂質膜のように熱力学的な解釈が単純な境界で隔てられた古典的なオルガネラの対立概念として捉えられ、その形成原理および構成要素の種類は未知のところが多い。生物学的な意義については総説 (e.g., de Oliveira et al, *Adv Protein Chem Struct Biol* (2020)) に譲るが、単に現象論としてではなく生命現象および疾病を理解および制御するために不可欠な研究対象として位置づけられていることが重要といえる。また、上記の総説は冒頭で Schrödinger 博士の『生命とは何か』を引用し、「新しい構成要素ではなく、ありふれた構成要素の新しい振舞いこそが生命を理解する鍵である」との理念が具現化された対象として LLPS を位置付けており、生物物理学会にて特に LLPS が注目されることにはこうした背景もあろう。LLPS の研究においては NMR が活用されている (総説 Murthy and Fawzi, *J Biol Chem* (2020) など)。この領域では、NMR は関連分子の *in vitro* での挙動を高い構造分解能にて解析する目的に使われる傾向がある。具体的には、LLPS を形成する条件および形成しない条件における立体構造の違いを化学シフト変化として捉える、LLPS を形成するタンパク質および核酸の分子間相互作用部位を決定する、などである。このように NMR が使われた研究のうち、BSP2020 では Prof. Yuh Min Chook (関連文献 *Cell* (2018)) および Prof. Markus Zweckstetter (関連文献 *Nat Commun* (2019) など複数) の講演を拝聴した。いずれの研究も、液滴の形成を見る、大きさを測る、構成要素の出入りを定量するなどの目的にて顕微鏡観察像をメインツールとして用いると同時に、NMR を用いて構成タンパク質の残基分解能の情報を取得することで、分子機構の理解を深めていることに特徴がある。LLPS は構成要素となるタンパク質および核酸が探索されている段階であり、各論的な研究が多い中で、Prof. Zweckstetter らによる *Nat Commun* (2019) は、LLPS を構成するタンパク質／領域に共通する正の帯電傾向に着目し、塩基性アミノ酸として特に Lys が好まれる傾向があること、塩基性アミノ酸の種類が LLPS の物性に与える影響、および Lys 残基に固有のアセチル化修飾を介して LLPS 形成能が細胞コン

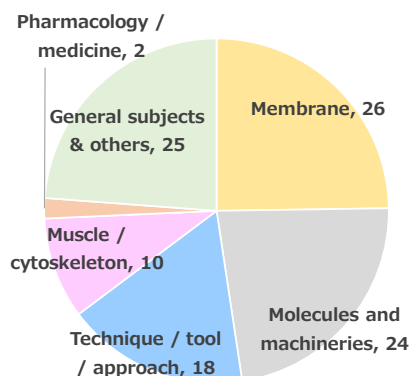


図 5. セッションの分類・内訳

テキスト依存的に制御されうることなど、LLPSに通底する原理を明らかとした点で重要な研究といえる。また、ゲル状に濃縮された液滴相においては、そこに含まれるタンパク質に由来するシグナルを溶液 NMR にて観測することが難しい場合もある。これに対し、Prof. Galia T Debelouchina ら（関連文献 *Angew Chem Int Ed* (2019)）は MAS 固体 NMR を適用し、INEPT と CP を併用することでゲル中において運動性を保持するアミノ酸と固定度の高いアミノ酸を観測し分け、LLPS 形成に寄与するアミノ酸残基を同定する方法論を提示することで、LLPS 研究にて NMR を活用する幅を広げた。

他の分子論的セッションは dynamics and allostery, fuzzy interactions, shape shifting など、立体構造および相互作用の可塑性を対象としたテーマ設定にて 5 件含まれており、NMR を活用した研究も頻見された。ただし、ポスター発表も含めると、生体分子の構造可塑性研究については分子動力学計算を用いた研究が非常に多かった。この観点で、Prof. Lindorff-Larsen は、NMR を含む実験データと分子動力学計算を相補的に利用することの意義を説いており、関連文献 *Science* (2018) は概念から具体例まで参考になる。

③技術、ツールおよびアプローチ

18 件設定された。ここには上述の cryo-EM も含まれる。最も存在感を示したのは 3 件のセッションを設けた超解像顕微鏡 (Super resolution microscopy; SRM) といえる。SRM は 2014 年のノーベル化学賞を皮切りに、原理・特徴を異にする複数の手法が派生するとともに市販の顕微鏡が出回るにおよび、今日の隆盛に至っている。SRM の理論的な分解能は最高で約 10 nm であり、細胞内におけるタンパク質の 1 分子分解能での観測にも適用されている。NMR と比較すると、in-cell NMR はタンパク質の立体構造の特徴を原子分解能で捉えることができ、空間分解能の観点で SRM と相補性を持つ。このことから、今後これらの技術を併用した研究が増加することを期待する。ただし、NMR においては通常、不均一な細胞内の集団平均を観測しているため、1 分子系のデータとの統合的解釈には慎重を要する。一方、SRM は観察対象となる分子等への蛍光標識を必要とすることから、拡散速度や相互作用など蛍光標識の影響が懸念される解析においては、より侵襲性の低い NMR のデータは重宝されるであろう（ただし、渡航者が把握できた限りでは、BPS2020 において in-cell NMR を積極的に利用した研究は 1 件に留まった）。

④筋肉および細胞骨格

10 件。若手が誇れる数少ない要素でもあることから、独立に分類した。筋肉の収縮機構の研究は日本人研究者の貢献が大きい分野のひとつである。また、「名取の階段」に象徴されるように生物学においてミクロとマクロが合流する端緒となった領域とも捉えられる。

⑤薬学・医学的観点における生物物理学のアプローチ

マイノリティではあったが、渡航者の所属と研究内容を考慮し独立に分類した。BPS2020 においては、この分野は情報学・計算科学が大半を占めていた。NMR は、これらの提示する結論を個別の対象にて実験的にサポートするばかりでなく、NMR 主導の研究事例から計算科学等の解析で見落とされている概念およびパラメータを提示することにより同分野の

質的向上に貢献できるものとする。

当該セッションにおいて、渡航者は Prof. Dorothee Kern の講演を聴く機会を初めて得た。噂に聞く、聴衆をダンスホールに誘う類まれな講演スタイルは健在であった。セッションのテーマ設定に沿った内容として、相同性が高く立体構造も非常によく重なる 2 種類の創薬標的キナーゼにおいて、抗癌剤に対する感受性が 1000 倍も異なることの動的構造基盤を解明した研究 (Agafonov et al, *Nat Struct Mol Biol* (2014) ; 少し古い) の紹介に一部の時間が割かれていた。一方、Prof. Kern の発表の主要部は、セッションの課題からはやや逸れたものであったが、渡航者は興味深く拝聴したため、以下に紙幅を割いて紹介したい。

Prof. Kern の代表的な研究の一つは、アデニル酸キナーゼにおいて酵素活性と相関する構造運動性を報告した研究 (*Nature* (2007)) であろう。当時から、進化的視点、その生物がその生物たりえるタンパク質構造的な根拠を追究されてきたように思う。近年はタンパク質キナーゼの研究にも力を入れていることから (*Nat Struct Mol Biol* (2014), *Science* (2015) など)、同分野の一人として渡航者も注目してきた。今回の講演は最新の *Science* (2020) の内容を主体に構成された。ここでは、癌関連キナーゼを題材として、分子間相互作用とアロステリの進化的視点からの切り分けが試みられた。

当該研究は、タンパク質のアロステリック制御の進化的起源を明らかにすることを目的とし、ヒト由来タンパク質キナーゼ Aurora A (以下 kinase; K) とそのアロステリック活性化因子 TPX2 (以下 regulator; R) を解析対象としてタンパク質科学研究を行ったものである。実は、本論文では一度も NMR が使われない。にもかかわらず、変異体設計の観点などから、NMR 研究にも活用を期待できる内容を含んでおり、一読の価値ありと考える。本研究において得られた結論は、(1) R の K に対する結合は、R が進化的に出現した時には既に最適なものであった。これに対し、(2) R による K のアロステリック活性化は、R が出現して以降、進化とともに長い時間をかけて、主に K 側のアミノ酸組成の変化に伴い徐々に増強された、というものである。

まず、筆者らは K および R の進化系統樹を作成することにより、進化的に K は R に先行して出現したことを示した。さらに、祖先配列再構成法を用いることにより、K および R それぞれについてヒト型のアミノ酸配列に進化する途中の複数の“分岐点”における配列を推定した。これらのリコンビナントタンパク質を調製することで、アロステリック制御の進化的起源を明らかにするための実験材料とした。本研究では、K の祖先配列として R の出現前後のものを 2 配列ずつ (R 出現前: K1, K2 および後: K3, K4) 準備し、これらの間の対比を示すことにより結論を説得力のあるものとしている (R については R1 および R2 の 2 種類の祖先配列を用いている)。この材料を用い、まず、K がいずれも自己リン酸化活性、自己リン酸化に依存した基質リン酸化活性を保持し、後者については異なる世代間で定性的に同等であることを示した。このことは、K は最初期から自己リン酸化活性に基づく機能制御を有してきたことを意味する。次に、K に対する R の親和性を総当り的に測定した。この結果、すべての R は、K3, K4, および K に対して解離定数 10 nM 前後の高親和性結合

を形成するのに対し、R 出現前の祖先である K1 および K2 に対しては 10 分の 1 以下の親和性しか示さなかった。このことが結論（1）の主たる論拠となる。さらに、R の結合に伴う K のアロステリックなキナーゼ活性上昇を総当りの測定した。この結果、すべての R は R 出現前の K1 および K2 の活性を強めず、R 出現後の K3, K4, および K の活性を増強した。注目すべきことに、K の進化が進むほど、すなわち $K3 < K4 < K$ の関係にてアロステリック増強は度を増した。一方、ある K に対する R の寄与は、 $R1 \sim R2 \sim R$ であった。これらのことが結論（2）の論拠となる。私見となるが、以上の事実は、分子間結合という機構は 10 ~ 20 kcal/mol のエネルギーを要するため、いちどきに半ば偶発的に獲得されたのに対し、アロステリック制御機構は、平衡の制御と考えればその 10 分の 1 ほどのエネルギーで行われることから、点変異によって生じるわずかな分子内／分子間結合の変化が蓄積しやすく、長い時間をかけて最適化されえた（恐らくは現在も途中である）ものと解釈できるであろうか。このことは、点変異により生じる疾病が、しばしば構造平衡の変化を分子機構とする可能性を暗示しており、NMR を用いた動的構造解析の有効性を指摘すると考えられる。

（＊アミノ酸点変異が疾病を惹起する分子機構については様々な仮説が取り沙汰されており（Stefl et al, *J Mol Biol* (2013) など）、上記考察は分子間結合とアロステリの特徴を見比べた場合の試論に留まることを申し添えておく）

最後に、アロステリック制御に寄与する K の構造部位を同定する目的にて、R 結合およびアロステリック制御を獲得する K2 から K3 への進化に伴い置換された 25 個のアミノ酸残基に着目した。これらのアミノ酸を、K4 以降およびアイソフォーム Aurora B（同様にアロステリック制御を受ける）にて保存される 15 個と残り 10 個に分類し、K2 にこれら 2 セットのアミノ酸変異をそれぞれ導入した結果、前者のみが K3 と同等の R 親和性および R によるアロステリック活性増強を獲得した。このことより、アロステリック制御を担うアミノ酸構成は、ひとたび獲得された後は失われずに維持され、かつさらなる変異により増強されてきたことが分かり、アロステリック制御が生存に不可欠な役割を果たしていることが強く示唆された。以上の結果は、R の出現に伴う分子間結合を介して獲得された共局在化という強力な優位性を“足場”として、アロステリック制御が K の変異を介して時間をかけて伸長してきたことを示しており、広く受け入れられている 2 遺伝子の共進化とは一線を画するモデルを提示した。なお、渡航者は *Nat Struct Mol Biol* (2014) および昨年の NMR 討論会において報告したように、キナーゼのアロステリック制御についての研究を行っており、「アロステリック制御は本当に必要なのか？単に強く結合すれば十分ではないのか？」という問いに実験データを以て答えることに難儀してきた。上記で示された結果は、進化がアロステリック制御を残し、強めてきたことを示すことでその不可欠性を示唆するとともに、責任残基を絞り込むことによって結合とアロステリック制御を切り分けて実験的検証を行うための材料を与えてもいる。

今後、K を K1~K4 にて置換することによる表現型の変化を調べる研究が行われ、Aurora A

におけるアロステリック制御の生理的意義が問われることとなろう。また、当然ながら、獲得されたアミノ酸点変異群とアロステリック制御の間のミッシングリンクについて、溶液 NMR を駆使して微視的かつ動的な機構が明らかとされることを期待する。

渡航者の発表

渡航者はポスター発表を行った（口頭発表を申請したが採択されず）。本研究では、ストレス下で機能する MAPK p38 α が、ストレス下の細胞内で生じる生理的環境の変化に応じて酵素活性を調節することを見出すとともに、その構造機構として環境変化が直接誘起する p38 α の構造平衡の変化を明らかとした。本結果は、原子分解能の動的構造情報、弱い相互作用の定量的な解析、および幅広い溶液条件でのデータ取得など、溶液 NMR の長所の上に成り立っており、結論の生物学的意義のみならず、NMR の利点を他分野の生物物理学者に理解してもらう意味でも有意義なものと考えていた。しかしながら、実際には NMR とは無関係という研究者に聞いてもらう機会を得られなかったことは、無念であった。やはり、聴衆が NMR 関係者に限定されない口頭セッションにて発表すべきと考えられる。ポスターからのピックアップ演題を見る限り、下世話ではあるが IF の高いジャーナルへの近著がある研究が採択されやすいように見受けられた。今後、参加を検討される若手の方の参考になれば幸いである。一方、渡航者と同じく p38 α の NMR 研究に取り組む研究者 2 名が訪ねてきてくれたことは僥倖であった。氏らと結んだ友好関係はもちろんのこと、競合するグループの人的動向や activity をそれとなく把握できたことも収穫であった。

蛇足

学術調査を目的とした渡航中の身ではあるとはいえ、渡航先の文化的側面に触れることで現地の人々の考え方について知るところも大きいと考えれば、現地にて些かのアルコール飲料（周波数ロック用に添加する重水と同程度の濃度）を嗜んだことは目的に適うと、渡航者は考える。この際、あるバーの壁に掲げられた以下の但し書を目にした。

—Bar rules—

1. Bartender is always right.
2. If bartender is wrong, see rule-1.

Bartender を Data に置き換えれば実験科学における基本的態度が導かれる。こうした判断の枠組みが酒場にまで裾野を広げていることに、畏敬の念を抱いた。

謝辞

渡航者が発表した研究は、渡航者の所属チームを主宰する竹内恒博士、横浜市立大学生命医科学研究科の高橋栄夫教授、および東京大学大学院薬学系研究科の嶋田一夫教授の多大なるご支援およびご指導の下に遂行された。この場をお借りして先生方に感謝を申し上げる。なお、同研究は科研費『研究活動スタート支援:16H07473』および『若手研究(B):17K15083』

の補助を受けて遂行された。

渡航者が BPS2020 への参加を検討した際、同学会の素晴らしさを説き、参加を後押ししてくださった3名の先輩方にも御礼を申し上げたい(2名は日本核磁気共鳴学会会員ではないという事情などから、御名前の記載は控えさせていただく)。ご高説に違わずエキサイティングな学会であった。

末筆となり恐縮であるが、若手渡航助成を創設し、その原資を与えてくださった、故京極好正先生および故阿久津政明氏、またご家族およびご関係者の皆様に厚く御礼申し上げます。助成を採択してくださった加藤晃一・日本核磁気共鳴学会会長、池上貴久・若手研究者渡航費助成金選考委員長、および選考委員の先生方にも深謝申し上げます。

結語

もし自分や親類が今日、鬼籍に入るとして、その遺産を各々の道の後進のために使うことを選択できるであろうか(寄付に価する財産があれば、という仮定のもとでの話である)。私のような俗物には、yes と即答することはできそうにない。

東京市市長(関東大震災後の復興)、満州鉄道総裁など多くの功績で知られる後藤新平は、死の床においてこのように語ったと伝えられる。

金を残して死ぬ者は下だ、仕事を残して死ぬ者は中だ、人を残して死ぬ者は上だ

本助成金を創設された方々は、人を残すこと、若手を育成することに投資をしてくださった。IT と AI の華やかなる今日、人が人に伝えられること、遺せるものは何か、そのことまで教えていただいたように思う。

帰路の Amtrak にて、シニアになりつつある我が身をカリフォルニア沖に沈む夕日に重ねて、まずは年相応の蓄財を誓いつつも、日本国側から見ればこれは朝日であると、若手に対して責任を持つべきシニアの夜明けを新しい気持ちで迎えた次第である(図6)。

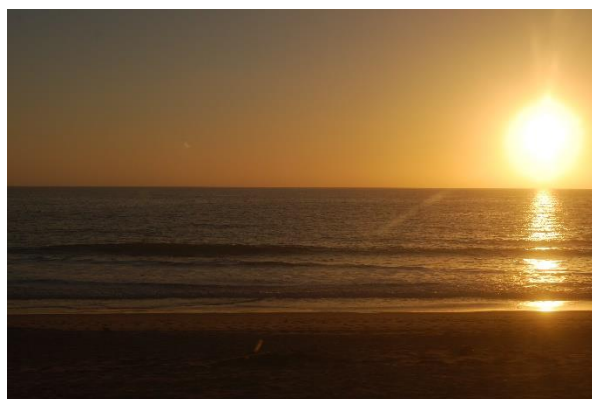


図 6. 沈む夕日は昇る朝日でもある。
若手期の終焉は folding ではなく aliasing である。

核磁気共鳴学会の諸兄におかれては、若輩者への引き続きのご指導・ご鞭撻をお願い申し上げます。