

平成30年6月6日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07023

研究課題名(和文)天然変性蛋白質による分子認識機構の統一的解明

研究課題名(英文) Unified understanding of the coupled folding and binding mechanisms of intrinsically disordered proteins

研究代表者

新井 宗仁 (Arai, Munehito)

東京大学・大学院総合文化研究科・教授

研究者番号：90302801

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：天然変性蛋白質は、生理的条件下では特定の構造を持たず、標的蛋白質の認識・結合と同時にフォールディングする。高等生物が持つ蛋白質の多くが天然変性蛋白質であることから、それらの分子認識機構の決定因子を解明し、あらゆる天然変性蛋白質の分子認識機構を統一的に理解することが重要である。本研究により、1つの天然変性蛋白質内に誘導適合機構と構造選択機構という2つの仕組みが共存して標的分子を認識可能であるという画期的な成果が得られた。また、天然変性蛋白質の折りたたみやすさが標的分子認識機構の決定因子であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Intrinsically disordered proteins (IDPs) have disordered structures under physiological conditions but fold into specific structures upon binding to their target proteins. Because many eukaryotic proteins are IDPs, it is important to elucidate the determinants of the mechanisms of coupled folding and binding of IDPs and to unify the understanding of how IDPs recognize their target molecules. Here, we showed that even a single IDP can contain two regions that bind their targets via different binding mechanisms, including the induced-fit and conformational selection mechanisms. Moreover, our results suggest that the folding ability of IDPs determines their binding mechanisms.

研究分野：生物物理学

キーワード：蛋白質 フォールディング 天然変性蛋白質 分子認識 NMR

1. 研究開始当初の背景

天然変性蛋白質は、生理的条件下では特定の構造を持たず、標的蛋白質の認識・結合と同時にフォールディング(構造形成)する。高等生物が持つ蛋白質の約3割が天然変性蛋白質であることから、それらの分子認識機構の決定因子を解明し、あらゆる天然変性蛋白質の分子認識機構を統一的に理解することが重要である。その仕組みとして、2つのモデルが提唱されている。一つは「誘導適合機構」であり、天然変性蛋白質が標的分子と結合した後に折りたたまれるというモデルである。もう一つは「構造選択機構」であり、天然変性蛋白質は単独ではひも状のまま揺らいでいるが、ある特定の構造に一時的に折りたたまれたときにのみ、標的分子と結合するというモデルである。これまでの研究から、天然変性蛋白質に応じて分子認識機構が異なることが示唆されている。そこで本研究では、次の事項の解明を目標として研究を行った。

2. 研究の目的

(1) さまざまな天然変性蛋白質の立体構造、標的分子との結合様式、および、標的分子認識機構を解明する。

(2) 天然変性蛋白質による分子認識機構の決定因子を解明する。これにより、あらゆる天然変性蛋白質の分子認識機構を統一的に理解することを目指す。

(3) 天然変性蛋白質と球状蛋白質における折りたたみ反応と結合反応を統一的に説明できるメカニズムを検討する。

(4) 蛋白質のフォールディングや結合などに関する物理的性質を明らかにする。

(5) 天然変性蛋白質の分子認識機構についての知見を利用して、天然変性蛋白質を利用した機能性蛋白質分子のデザインを試みる。

3. 研究の方法

天然変性蛋白質は大腸菌を用いて大量発現させ、高純度精製した。必要に応じてアミノ酸置換変異体を作製した。

天然変性蛋白質の立体構造解析には、円二色性(CD)スペクトルや、核磁気共鳴(NMR)分光法、X線溶液散乱法などを用いた。また、天然変性蛋白質と標的蛋白質との結合の強さは、NMR滴定法や等温滴定型熱量計(ITC)などを用いて定量した。

これらのデータは、自作のソフトウェアを用いた特異値分解やグローバル解析などによって解析した。

4. 研究成果

(1) **天然変性蛋白質 c-Myb による標的蛋白質 CBP KIX の認識**: 天然変性蛋白質 c-Myb が標的蛋白質である転写コアクチベーター CBP の KIX ドメインを認識する反応を詳細に解析した。その結果、c-Myb の N 末端側は構造選択機構によって KIX と結合するのに対し、c-Myb の残り半分は誘導適合機構で結合することが明らかになった(図1)。つまり、1つの蛋白質内に2種類の仕組みが共存していた。また、2つの領域ではヘリックス構造への折りたたみやすさが異なっており、折りたたみやすさが分子認識機構を決定することが示唆された。

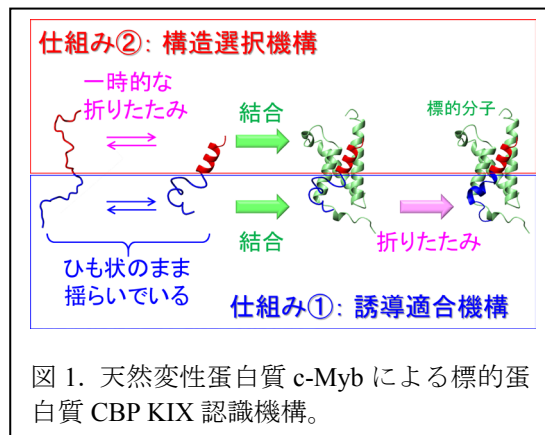


図1. 天然変性蛋白質 c-Myb による標的蛋白質 CBP KIX 認識機構。

(2) **天然変性蛋白質 Tat による標的蛋白質 CBP KIX の認識**: 標的蛋白質 KIX は、c-Myb の他にも様々な天然変性蛋白質と結合できる。そこで、KIX に結合する天然変性蛋白質である HIV-1 由来 Tat について、単独での立体構造物性と、KIX との結合に伴う立体構造変化を詳細に調べた。まず、生理的条件下(亜鉛結合状態、中性 pH)における Tat の精製方法を確立させた。次に、Tat 単独での立体構造を CD や X 線散乱法などで解析した。その結果、pH 変化や亜鉛結合に応じて立体構造が変化することが示された。また、Tat と KIX の結合に伴って二次構造が形成されることが示唆された。

(3) **転写因子 c-Jun による標的蛋白質 CBP KIX の認識**: 転写因子 c-Jun と標的蛋白質 KIX との結合を詳細に調べた。まず c-Jun の転写活性化ドメインの発現系を構築後、CD や NMR などで c-Jun 単独での構造解析を行い、c-Jun が天然変性蛋白質であることを明らかにした。次に、標的蛋白質 KIX と結合したときの二次元および三次元 NMR スペクトルを測定した。ピーク帰属を行い、c-Jun 上の KIX 結合部位を解明した。

(4) **天然変性蛋白質 E1A による標的蛋白質 CBP NCBD の認識**: アデノウイルス由来の転写制御因子である E1A は天然変性蛋白質であり、標的蛋白質である CBP の NCBD ドメインと結合する。異なるアデノウイルスに

由来する様々な E1A のコンストラクトと NCBD との結合を測定した NMR 滴定実験のデータを、我々が開発した解析法を用いて詳細に解析した。その結果、E1A と NCBD が複雑な様式で結合することを明らかにした。また、強毒性と弱毒性のアデノウイルス由来 E1A では標的蛋白質との結合強度が異なることが示唆された。

(5) ハースタチンの立体構造解析： 抗がん剤候補分子であるハースタチンは、細胞表面にある HER2 蛋白質の二量体形成を阻害することによって細胞の異常増殖を阻害できる。ハースタチンの C 末端側にある HER2 結合領域の立体構造を NMR 分光法などで解析した。その結果、ハースタチンの HER2 結合領域は天然変性状態にあることが明らかになった。

(6) 天然変性蛋白質による標的分子認識機構の決定因子の解明： これまでに得られた結果を総合すると、次のように考えられる。生体内で合成されたらすぐに標的と結合して機能を発揮すべき天然変性蛋白質 (c-Myb など) では、ヘリックス構造に折りたたみやすい領域を持ち、構造選択機構で標的と結合する。これに対し、リン酸化という修飾を受けた場合にのみ標的と結合すべき天然変性蛋白質 (pKID など) では、ヘリックス構造を形成しにくく、誘導適合機構によって KIX と結合する。したがって天然変性蛋白質は、それぞれの機能に応じて折りたたみやすさが異なり、結合の仕組みも異なることが示唆された。すなわち、天然変性蛋白質の折りたたみやすさが標的分子認識機構を決定するという仮説が得られた。

そこで、この作業仮説を検証するために、天然変性蛋白質 c-Myb の二次構造形成能を変化させた複数の変異体を理論的に設計後、実際に作製して標的蛋白質 KIX との結合能の変化を解析した。その結果、二次構造の安定化が標的蛋白質との結合を強化することが示唆された。この結果は、天然変性蛋白質の分子認識には、蛋白質の折りたたみやすさが重要であるという仮説を支持している。

(7) これまでに得られた知見に基づき、天然変性蛋白質による標的分子認識反応と、球状蛋白質におけるフォールディング反応を統一的に説明できるメカニズムを提唱し、総説を執筆した。また、天然変性蛋白質による標的結合を制御する手法の開発や、天然蛋白質の立体構造物性に関する理論的解析なども行った。さらに、変性蛋白質の構造ダイナミクスの解析や、蛋白質間相互作用の精密解析も行った。

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 6 件)

- ① Arai, M. Unified understanding of folding and binding mechanisms of globular and intrinsically disordered proteins. *Biophysical Reviews* 10(2), 163-181 (2018). 査読有
DOI: 10.1007/s12551-017-0346-7
- ② Takenaka, T., Nakamura, T., Yanaka, S., Yagi-Utsumi, M., Chandak, M.S., Takahashi, K., Paul, S., Makabe, K., Arai, M., Kato, K., & Kuwajima, K. Formation of the chaperonin complex studied by 2D NMR spectroscopy. *PLoS ONE* 12(10), e0187022 (2017). 査読有
DOI: 10.1371/journal.pone.0187022
- ③ Otosu, T., Ishii, K., Oikawa, H., Arai, M., Takahashi, S., & Tahara, T. Highly heterogeneous nature of the native and unfolded states of B domain of protein A revealed by two-dimensional fluorescence lifetime correlation spectroscopy. *J. Phys. Chem. B* 121(22), 5463-5473 (2017). 査読有
DOI: 10.1021/acs.jpcc.7b00546
- ④ Haberz, P., Arai, M., Martinez-Yamout, M.A., Dyson, H.J., & Wright, P.E. Mapping the interactions of adenoviral E1A proteins with the p160 nuclear receptor coactivator binding domain of CBP. *Protein Sci.* 25(12), 2256-2267 (2016). 査読有
DOI: 10.1002/pro.3059
- ⑤ Arai, M., Sugase, K., Dyson, H.J., & Wright, P.E. Conformational propensities of intrinsically disordered proteins influence the mechanism of binding and folding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 112(31), 9614-9619 (2015). 査読有
DOI: 10.1073/pnas.1512799112
- ⑥ Oikawa, H., Kamagata, K., Arai, M., & Takahashi, S. Complexity of the folding transition of the B domain of protein A revealed by the high-speed tracking of single-molecule fluorescence time series. *J. Phys. Chem. B* 119(20), 6081-6091 (2015). 査読有
DOI: 10.1021/acs.jpcc.5b00414

[学会発表] (計 35 件)

- ① 榎原朋子、林勇樹、工藤恒、河合秀信、岡芳樹、新井宗仁「天然変性タンパク質 HIV-1 Tat の構造特性と分子認識」第 7 回日本生物物理学会関東支部会、2018 年
- ② 岡芳樹、竹内恒、林勇樹、新井宗仁「細胞内 GTP 定量センサーの開発」第 7 回日本生物物理学会関東支部会、2018 年
- ③ 新井宗仁「天然変性タンパク質による標的分子認識機構」第 18 回若手 NMR 研究会、2017 年
- ④ 岡芳樹、澤田泰平、渡辺尚大、工藤恒、

- 和田愛未、河合秀信、張マリ、林勇樹、新井宗仁「中性に近い pH で抗体を精製可能な新規アフィニティーカラムの開発」2017年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017)、2017年
- ⑤ 季高駿士、岡芳樹、林勇樹、新井宗仁「c-Myb-KIX 間相互作用を阻害するペプチドの合理的設計」第 17 回日本蛋白質科学会年会ワークショップ「タンパク質科学における理論と実験の協奏」、2017年
- ⑥ 吉崎慧、末松佑磨、季高駿士、榎原朋子、林勇樹、新井宗仁「天然変性タンパク質 c-Jun と転写コアクチベータ CBP の KIX ドメインの相互作用」第 17 回日本蛋白質科学会年会ワークショップ「天然変性領域及びマルチサブユニット複合体の機能解析」、2017年
- ⑦ 榎原朋子、林勇樹、工藤恒、河合秀信、岡芳樹、新井宗仁「天然変性タンパク質 HIV-1 Tat の亜鉛と pH に依存した構造多様性」第 17 回日本蛋白質科学会年会、2017年
- ⑧ 岡芳樹、澤田泰平、渡辺尚大、工藤恒、和田愛未、河合秀信、張マリ、林勇樹、新井宗仁「合理的設計による新規抗体精製用アフィニティーリガンドの開発」第 17 回日本蛋白質科学会年会、2017年
- ⑨ 岡芳樹、澤田泰平、渡辺尚大、工藤恒、和田愛未、河合秀信、張マリ、林勇樹、新井宗仁「合理的設計による抗体精製用アフィニティーリガンド FPA の改良」第 6 回日本生物物理学会関東支部会、2017年
- ⑩ 新井宗仁「天然変性タンパク質を利用した創薬基盤技術の開発」第 6 回岐阜構造生物学・医学・論理的創薬研究会シンポジウム、2017年
- ⑪ 河合秀信、高橋大輔、新井宗仁「Statistical analysis on the molecular size of native proteins」第 54 回日本生物物理学会年会・シンポジウム「Frontiers in protein organization and disorganization」2016年
- ⑫ Shunji Suetaka, Yoshiki Oka, Yuuki Hayashi, Munehito Arai, “Rational design of a peptide inhibitor of the c-Myb-KIX interaction”, 第 54 回日本生物物理学会年会、2016年
- ⑬ Hidenobu Kawai, Daisuke Takahashi, Munehito Arai, “Statistical analysis on the structural properties of native proteins”, 第 54 回日本生物物理学会年会、2016年
- ⑭ Yoshiki Oka, Taihei Sawada, Takahiro Watanabe, Hisashi Kudo, Manami Wada, Hidenobu Kawai, Mari Chang, Yuuki Hayashi, Munehito Arai, “Rational design of FPA, a ligand for antibody purification”, 第 54 回日本生物物理学会年会、2016年
- ⑮ Tomoko Kunihara, Yuuki Hayashi, Hisashi Kudo, Hidenobu Kawai, Yoshiki Oka, Munehito Arai, “Conformational diversity in the intrinsically disordered HIV-1 Tat protein induced by zinc and pH”, 第 54 回日本生物物理学会年会、2016年
- ⑯ Satoru Yoshizaki, Tomoko Kunihara, Yuuki Hayashi, Munehito Arai, “Interaction of the intrinsically disordered c-Jun with the KIX domain of the transcriptional coactivator CBP”, 第 54 回日本生物物理学会年会、2016年
- ⑰ Munehito Arai, Kenji Sugase, H. Jane Dyson, Peter E. Wright, “Conformational propensities of intrinsically disordered proteins influence the mechanism of binding and folding”, ICMRBS2016 (27th International Conference on Magnetic Resonance in Biological Systems), 2016年
- ⑱ Tomoko Kunihara, Yuuki Hayashi, Hisashi Kudo, Hidenobu Kawai, Yoshiki Oka, Munehito Arai, “Structural analysis of the intrinsically disordered HIV-1 Tat protein”, ICMRBS2016 (27th International Conference on Magnetic Resonance in Biological Systems), 2016年
- ⑲ 岡芳樹、澤田泰平、渡辺尚大、林勇樹、新井宗仁「合理的設計による抗体精製用リガンド FPA の開発」第 16 回日本蛋白質科学会年会、2016年
- ⑳ 榎原朋子、林勇樹、工藤恒、河合秀信、岡芳樹、新井宗仁「天然変性タンパク質 HIV-1 Tat の立体構造解析」第 16 回日本蛋白質科学会年会、2016年
- 21 河合秀信、高橋大輔、新井宗仁「天然タンパク質の立体構造物性に関する統計解析」第 16 回日本蛋白質科学会年会、2016年
- 22 榎原朋子、林勇樹、工藤恒、河合秀信、岡芳樹、新井宗仁「天然変性タンパク質 HIV-1 Tat の立体構造解析」第 16 回 東京大学生命科学シンポジウム、2016年
- 23 新井宗仁「タンパク質のフォールディングとデザイン」東京大学 大学院理学系研究科 物理学専攻 A7 サブコース 第 3 回シンポジウム「生物物理の新展開」2016年
- 24 榎原朋子、林勇樹、工藤恒、河合秀信、岡芳樹、新井宗仁「天然変性タンパク質 HIV-1 Tat の立体構造解析」第 5 回日本生物物理学会関東支部会、2016年
- 25 岡芳樹、澤田泰平、渡辺尚大、林勇樹、新井宗仁「合理的設計による抗体精製用リガンド FPA の開発」第 5 回日本生物物理学会関東支部会、2016年
- 26 河合秀信、高橋大輔、新井宗仁「天然タンパク質の立体構造物性に関する統計解析」第 5 回日本生物物理学会関東支部会、2016年
- 27 Hiroyuki Oikawa, Kiyoto Kamagata, Munehito Arai, Satoshi Takahashi, “Complex folding transition of the B

domain of protein A investigated by the high-speed measurement of single-molecule FRET time series”, Pacificchem 2015, 2015 年

- 28 Tomoko Kunihara, Yuuki Hayashi, Munehito Arai, ”pH-dependent conformational changes in the intrinsically disordered HIV-1 Tat protein”, 第 53 回日本生物物理学会年会、2015 年
- 29 Hiroyuki Oikawa, Munehito Arai, Atsuhito Fukasawa, Hiroaki Yokota, Toru Ide, Satoshi Takahashi, “Tracking microsecond single-molecule FRET dynamics on the fast protein folding by the line-confocal microscopy”, 第 53 回日本生物物理学会年会、2015 年
- 30 Yasunori Ohba, Munehito Arai, Jun Abe, Tetsuya Itabashi, Toshikazu Nakamura, Satoshi Takahashi, Seigo Yamauchi, “Relaxation and lineshape analysis for electron paramagnetic resonance of doubly spin-labeled protein with structural distribution”, 第 53 回日本生物物理学会年会、2015 年
- 31 Hidenobu Kawai, Munehito Arai, “Statistical analysis on the molecular density of native proteins”, 第 53 回日本生物物理学会年会、2015 年
- 32 Daisuke Tashiro, Yuuki Hayashi, Munehito Arai, “Herstatin, an antitumor drug candidate, is an intrinsically disordered protein”, 第 53 回日本生物物理学会年会、2015 年
- 33 Taihei Sawada, Yoshiki Oka, Takahiro Watanabe, Yuuki Hayashi, Munehito Arai, “Rational design to improve the pH-sensitive antibody dissociation of FPA, a ligand for antibody purification”, 第 53 回日本生物物理学会年会、2015 年
- 34 榎原朋子、林勇樹、新井宗仁「天然変性タンパク質 HIV-1 Tat と転写コアクチベーターCBP の KIX ドメインとの相互作用」第 16 回日本蛋白質科学会年会、2015 年
- 35 河合秀信、高橋大輔、新井宗仁「天然タンパク質の分子サイズ特性に関する統計解析」第 16 回日本蛋白質科学会年会、2015 年

[その他]

ホームページ

<http://folding.c.u-tokyo.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

新井 宗仁 (ARAI, Munehito)

東京大学・大学院総合文化研究科・教授
研究者番号：90302801

(2) 連携研究者

林 勇樹 (HAYASHI, Yuuki)

東京大学・大学院総合文化研究科・助教
研究者番号：90444059