

令和 3 年 6 月 11 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02391

研究課題名(和文) セグメント重水素化中性子散乱法による天然変性タンパク質の動的構造解析

研究課題名(英文) Dynamical structure analysis of intrinsically disordered proteins by neutron scattering using segment deuteration method

研究代表者

佐藤 衛 (SATO, Mamoru)

横浜市立大学・生命医科学研究科・教授

研究者番号：60170784

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：中性子散乱法(SANS法)によるタンパク質の動的構造解析では、コロナ禍により国外の中性子実験施設が全く利用できなかったため、SANS実験の前に収集したX線散乱(SAXS)データにアンサンブル最適化法を適用して初期的な構造解析を行った。その結果、全長のHefタンパク質の溶液中での構造は6つの異なるコンフォメーションをもつ構造のアンサンブルとして再現できた。一方、ポリペプチド鎖のライゲーションにおいてはスプリットインテインNpuDnaEを用いることで効率よく調製する方法を確立した。また、重水素化率をコントロールした試料調製プロトコルおよび重水素化率の評価プロトコルも合わせて確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

タンパク質の動的構造の情報は創薬の分野で創薬候補化合物のヒット率の向上に大きく寄与するものと期待され、わが国の国家プロジェクトとして、京/富嶽コンピューターを利用した分子動力学計算で予測されてきた。しかし、これはあくまでもin silicoのシミュレーションの世界の話で、実験データに基づいたタンパク質の動的構造解析法の開発が長く待たれていた。その意味で、当該研究は学術的な意義とともに社会的意義も非常に大きいと期待される。

研究成果の概要(英文)：In the dynamical structural analysis of proteins by neutron scattering (SANS), neutron facilities overseas were not available at all due to the COVID-19 pandemic. So, X-ray scattering (SAXS) data collected prior to SANS experiment were used for preliminary analysis. The analysis was performed by ensemble optimization method. As a result, the structure of the full-length Hef protein in solution could be well reproduced as an ensemble of six structures with different conformations.

Furthermore, we have established a method for efficient preparation of polypeptide chain ligation by using split intein, NpuDnaE. In addition, a sample preparation protocol in which the deuteration ratio was controlled and a protocol for evaluating the deuteration ratio were also established.

研究分野：構造生物学、蛋白質科学、中性子科学

キーワード：天然変性タンパク質 中性子小角散乱 セグメント重水素化

1. 研究開始当初の背景

X線・中性子散乱法 (SAXS・SANS) はタンパク質溶液にX線・中性子を照射し、散乱されるX線・中性子強度の角度依存性からタンパク質の溶液構造を解析する手法で、揺らぎの小さなタンパク質の溶液構造解析法として今日では広く利用されている。しかし、揺らぎの大きなタンパク質では様々な構造をもつ分子からの散乱が加算・平均されるため、揺らぎの小さなタンパク質と同様には取り扱えない。そこで、申請者らはX線散乱法 (SAXS) に関して、分子動力学 (MD) 計算で得られる揺らぎの情報から実測の SAXS データを検証する手法 (MD-SAXS 法) を開発し、この方法が揺らぎの大きなタンパク質の動的構造解析に有効であることを示してきた。さらに、申請者らは、天然変性タンパク質 (IDP) の研究プロジェクト (新学術領域研究) において、MD-SAXS 法を高度化し、その適用範囲を IDP にまで拡大しようと試みた。しかし、構造という三次元データを SAXS という一次元データから求めるとき、分子量が1万以下の小型タンパク質を除き、Over-fitting の問題からその動的構造を一義的に決定できないことが明らかとなった。そこで、本研究では、世界初の試みとして、X線の代わりに中性子を用いて、大型タンパク質を小型タンパク質として取り扱えることができる「セグメント重水素化中性子散乱法」を新たに開発し、この Over-fitting の問題の解決を目指した。

セグメント重水素化法はポリペプチド鎖の特定の領域 (セグメント) の軽水素を重水素で置換する方法で、元々はセグメントラベル法として NMR 構造生物学の分野で開発されたラベリング技術である。本研究ではこれを重水素化ラベリングに特化して SANS 測定に用いることにした。さらに、本研究では、重水素化率は100%ではなく75%とする。本研究の対象である Hef タンパク質は、2つのドメインの間に100残基の天然変性領域 (IDR) をもつので、この2つのドメインを75%重水素化し、この SANS を100%重水の溶媒の下で測定する。そうすると、75%重水素化された2つのドメインからの SANS は観測されず、非重水素化の IDR からの SANS のみが観測される。この方法は「逆転コントラスト同調法」と呼ばれ、研究代表者らが独自に考案した手法である。この方法を用いると、IDR のみを100%重水素化した Hef 全長の SANS を40%重水の下で測定する「コントラスト同調法」に比べて圧倒的に低バックグラウンド (=高精度) で SANS が測定でき、大きな利点がある。

2. 研究の目的

本研究では、セグメント重水素化 SANS 法により、2つのドメインの間に100残基の IDR をもつ Hef 全長の動的構造を原子レベルで解析することを目的とする。具体的には、セグメント重水素化法で Hef の2つのドメインを75%重水素化し、このタンパク質からの SANS を100%重水の下で測定する。そうすると、100残基の IDR からの散乱のみが観測されるので、この散乱データをアンサンブル最適化法で解析する。この手法のポイントは、2つのドメインの構造の揺らぎは無視できる程度に小さいので、最適化された IDR の構造アンサンブルが Hef 全長の動的構造となる点である。本研究では、こうして得られた Hef 全長の動的構造から天然変性タンパク質 (領域) が織りなす高度な分子認識・機能発現機構の解明を目指す。

3. 研究の方法

本研究では、タンパク質の動的構造解析のために、X線の代わりに中性子を利用する。さらに、大型タンパク質を小型タンパク質として取り扱えることができる「セグメント重水

素化中性子散乱法」を新たに開発する。セグメント重水素化法はポリペプチド鎖の特定の領域（セグメント）の軽水素を重水素で置換する方法で、元々はセグメントラベル法として NMR 構造生物学の分野で開発されたラベリング技術である。本研究ではこれを重水素化ラベリングに特化して SANS 測定に用いることにした。さらに、本研究では、重水素化率は 100%ではなく 75%とする。本研究の対象である Hef タンパク質は、2つのドメインの間に 100 残基の IDR 領域をもつので、この2つのドメインを 75%重水素化し、この SANS を 100%重水の溶媒の下で測定する。そうすると、75%重水素化された2つのドメインからの SANS は観測されず、非重水素化タンパク質 (= IDR 領域) からの SANS のみが観測される。この方法は「逆転コントラスト同調法」と呼ばれ、研究代表者らが独自に考案した手法である。この方法を用いると、IDR 領域のみを 100%重水素化し、この SANS を 40%重水の溶媒の下で測定する「コントラスト同調法」に比べて圧倒的に低バックグラウンド (= 高精度) で SANS が測定できる大きな利点ある。

ポリペプチド鎖の特定の領域(セグメント)の重水素で置換するためには、あらかじめ重水素で置換した領域とそうでない領域を別々に調製し、最終的に両者を再結合(ライゲーション)させる必要がある。ポリペプチド鎖のライゲーションには、ライゲーション酵素の一つであるスプリットインテインを利用する。

4. 研究成果

(1) スプリットインテインを用いたライゲーション法による試料調製法の確立

ポリペプチド鎖のライゲーションは様々なライゲーション酵素や化学反応を利用した系が開発されてきたが、本研究ではスプリットインテインの NpuDnaE を用いてライゲーションを効率よく行う試料調製法を確立した。当初の予定では、2つのドメイン(ヘリカーゼドメイン:分子量約5万とヌクレアーゼドメイン:分子量約3万)を75%重水素化し、その間に存在する分子量約1万のIDRを可視化する計画であった。しかし、研究の進展に伴い、Hef 全長はタンパク質濃度依存的に会合を起こすことがわかり、会合しない単分散な状態で測定するためには全長 Hef の濃度が 0.9 mg/ml 以下という希薄な条件にする必要があることが判明した。このような希薄な条件で IDR を可視化すると、IDR の濃度は 0.1 mg/ml となり、バックグラウンドの低い逆転コントラスト同調法を用いても十分な S/N 比で SANS データを収集することが難しいと予想された。そこで、計画を変更し、当初の目的を損なうことなく S/N 比を向上できる折衷案として、[1] 軽水素体ヘリカーゼドメイン-IDR に 75%重水素体ヌクレアーゼドメインをライゲーションしたものと、[2] 75%水素体ヘリカーゼドメインに軽水素体 IDR-ヌクレアーゼドメインをライゲーションしたものをそれぞれ調製し、それぞれ片方のドメインのみを可視化した試料の SANS データを収集することにした。結果、[1]および[2]の試料ともに数 mg ~ 数十 mg の量でセグメント重水素化 Hef タンパク質を調製することに成功した。また、スプリットインテインによる酵素反応ではライゲーション箇所の 1 アミノ酸をシステインへ置換する必要があるが、この 1 残基置換が Hef 全長の動的構造へは影響しないことを SAXS 解析により確認した。

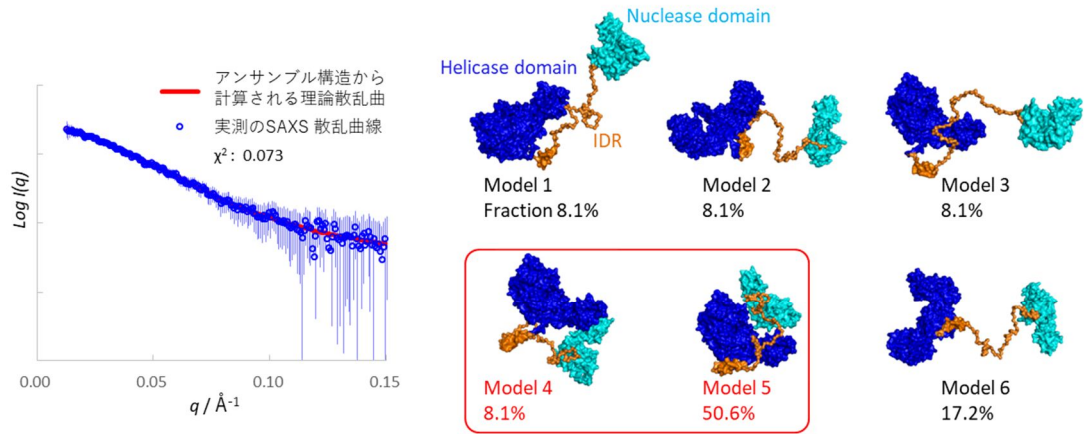
(2) 重水素化率を正確に調節した試料調製プロトコールおよび重水素化率評価プロトコールの確立

一般にタンパク質の重水素化は重水及び重水素化グルコースを含む最小培地で大腸菌を培

養することで行う。本研究では不可視化したいドメインを均一に正確に 75%重水素化する必要があるが、重水素化率をコントロールして試料を調製し、かつ得られたタンパク質の正確な重水素化率を評価する必要があるが、その方法はこれまで確立されていなかった。本研究では京都大学の杉山教授らとの共同研究により、質量分析で観測された 100%軽水素体と目的の重水素体の質量差から実際の重水素化率を評価するプロトコルを確立した。その結果、重水 / 軽水比および重水素体グルコース / 軽水素体グルコースをそれぞれ 75%、25% に調製した最小培地を用いても、タンパク質の種類によってあるいは培養ロットによって重水素化率が 75%から大幅に逸脱することが判明した。そこで、あらかじめスモールスケール培養でだまかな重水素化率を確認した後、置換率が 75%に近くなるように培地の重水、重水素体グルコース量を調整することにした。そして、ラージスケールで培養し、得られたタンパク質の重水素化率を質量分析で評価・確認した。こうして評価されたタンパク質の重水素化率（約 75%）に基づき、逆転コントラスト同調法で使用する溶媒の重水濃度を微調整した。加えて、ライゲーションしていない重水素化（重水素化率：約 75%）ドメイン単体を複数濃度の重水溶媒中（例えば 0, 40, 80, 100% 重水）で SANS 測定することで溶媒とタンパク質のコントラストを確認した。そして、不可視化したいドメインからの散乱の寄与を見積もり、必要に応じてさらに溶媒の重水濃度を微調整することにした。このようにして、重水素化率を正確に調節かつ確認することで、不可視化したいドメインからの散乱の寄与の大きさを見積もるという SANS 解析に必要な一連の実験プロトコルを確立した。これらのプロトコルは Hef タンパク質に限らず他の様々なタンパク質に適用可能な汎用性の高いものである。

(3) アンサンブル最適化法による動的構造の解析

2020 年度はセグメント重水素化 Hef 試料を用いて逆転コントラスト同調法による SANS 実験を予定していた。しかし、コロナ禍により、特に大強度中性子が利用可能な海外中性子実験施設を全く利用できなかったため、SANS データを得ることはできなかった。しかし、SANS に先行して行った SAXS 解析では SAXS データをもとに Hef 全長にアンサンブル最適化法を適用したところ、溶液中での動的構造は 6 つの代表構造のアンサンブルとして再現された。図ではヘリカーゼドメインに対してヌクレアーゼドメインが様々な相対配置をとっており、それらの構造アンサンブルとして実測の SAXS 散乱曲線が再現されており、Hef は柔軟な構造をとっていることがわかる。一方で、各構造の占める割合を見てみるとヘリカーゼドメインとヌクレアーゼドメインが接近した構造が高い割合を占めていることがわかった。天然変性領域は非常に柔軟であるにもかかわらずこのような構造の偏りを持つことが機能に必要なであると推測される。SAXS データに基づく解析ではドメイン部分からの散乱の寄与が大きいため、散乱の寄与の小さい天然変性領域のコンフォメーションの解釈には任意性が残っているが、今後 SANS データを取得することができれば解釈の任意性を解決し、天然変性領域の詳細なコンフォメーションを解析でき、構造の偏りを生み出す機構や機能との関連を明らかにできると期待される。



図：SAXSデータを用いたアンサンブル最適化法によるHef全長の動的構造の解析

(左) 実測のSAXS散乱曲線および、アンサンブル最適化により得られた代表構造(右)から計算される理論散乱曲線。実測の散乱曲線と理論散乱曲線はよく一致しており、代表構造のアンサンブルが溶液中での構造を再現できていることを示す。(右) アンサンブル最適化により得られた代表構造。各構造とその存在比率を図中に示す。ヌクレアーゼドメインとヘリカーゼドメインが接近した構造(Model4, 5)の存在比率が高い50%以上という結果が得られ、機能との関連が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 A. Hishiki, M. Sato, H. Hashimoto	4. 巻 167
2. 論文標題 Structure of HIRAN domain of human HLTF bound to duplex DNA provides structural basis for DNA unwinding to initiate replication fork regression	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J. Biochem.	6. 最初と最後の頁 597-602
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jb/mvaa008/5711295	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 I. Hayashi, T. Oda, M. Sato, S. Fuchigami	4. 巻 430
2. 論文標題 Cooperative DNA Binding of the Plasmid Partitioning Protein TubR from the Bacillus cereus pX01 Plasmid	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J. Mol. Biol.	6. 最初と最後の頁 5015-5028
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jmb.2018.11.001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 S. Kori, L. Ferry, S. Matano, T. Jimenji, N. Kodera, T. Tsusaka, R. Matsumura, T. Oda, M. Sato, N. Dohmae, T. Ando, Y. Shinkai, P. A. Defossez, K. Arita	4. 巻 27
2. 論文標題 Structure of the UHRF1 Tandem Tudor Domain Bound to a Methylated Non-histone Protein, LIG1, Reveals Rules for Binding and Regulation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Structure	6. 最初と最後の頁 485-496
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.str.2018.11.012	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 佐藤 衛	4. 巻 69
2. 論文標題 細胞外での分子修飾 (細胞外基質/その他) シトルリン化	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 生体の科学 (増大特集: タンパク質・核酸の分子修飾)	6. 最初と最後の頁 520-521
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 佐藤 衛	4. 巻 267
2. 論文標題 天然変性蛋白質 - 蛋白質の構造・機能研究の新しいターゲット	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 医学のあゆみ (第5土曜特集: 蛋白質代謝医学 - 構造・機能の研究から臨床応用まで)	6. 最初と最後の頁 954-958
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kori Satomi, Jimenji Tomohiro, Ekimoto Toru, Sato Miwa, Kusano Fumie, Oda Takashi, Unoki Motoko, Ikeguchi Mitsunori, Arita Kyohei	4. 巻 432
2. 論文標題 Serine 298 Phosphorylation in Linker 2 of UHRF1 Regulates Ligand-Binding Property of Its Tandem Tudor Domain	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 4061-4075
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jmb.2020.05.006	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kodera Noriyuki, Noshiro Daisuke, Dora Sujit K., Mori Tetsuya, Habchi Johnny, Blocquel David, Gruet Antoine, Dosnon Marion, Salladini Edoardo, Bignon Christophe, Fujioka Yuko, Oda Takashi, Noda Nobuo, Sato Mamoru, Lotti Marina, Mizuguchi Mineyuki, Longhi Sonia, Ando Toshio	4. 巻 16
2. 論文標題 Structural and dynamics analysis of intrinsically disordered proteins by high-speed atomic force microscopy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Nanotechnology	6. 最初と最後の頁 181-189
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41565-020-00798-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Inoue Rintaro, Oda Takashi, Nakagawa Hiroshi, Tominaga Taiki, Saio Tomohide, Kawakita Yukinobu, Shimizu Masahiro, Okuda Aya, Morishima Ken, Sato Nobuhiro, Urade Reiko, Sato Mamoru, Sugiyama Masaaki	4. 巻 10
2. 論文標題 Dynamics of proteins with different molecular structures under solution condition	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 21678
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-78311-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 5件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 佐藤 衛
2. 発表標題 Why we need deuteration in the field of life science now
3. 学会等名 第4回 重水素材料研究会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤 衛
2. 発表標題 天然変性タンパク質の構造研究とLLPSの構造基盤構築への展望
3. 学会等名 第4回LLPS研究会・ASUKA若手交流会2019（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 T. Oda, A. Sekino, A. Murakami ¹ , R. Oi, M. Yoneyama, N. Kodera, T. Ando, T. Konuma, K. Sugase, T. Oroguchi, R. Inoue, M. Sugiyama, S. Ishino, Y. Ishino, and M. Sato
2. 発表標題 The dynamic structure and function of intrinsically disordered region of Hef that is associated with a DNA repair
3. 学会等名 The 3rd Asia-Oceania Conference on Neutron Scattering 2019 (AOCNS 2019)（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小田 隆、関野絢子、村上綾香、大井里香、米山真紀、古寺哲幸、安藤敏夫、小沼 剛、菅瀬謙治、苮口友隆、井上倫太郎、杉山正明、石野園子、石野良純、佐藤 衛
2. 発表標題 DNA修復にかかわるHefの天然変性領域の揺らいだ構造と機能
3. 学会等名 第4回LLPS研究会・ASUKA若手交流会2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 T. Oda, A. Sekino, A. Murakami, R. Oi, M. Yoneyama, N. Kodera, T. Ando, T. Konuma, K. Sugase, T. Oroguchi, S. Ishino, Y. Ishino, M. Sato
2. 発表標題 The structure and function of intrinsically disordered region of Hef that is associated with a DNA repair (DNA修復にかかわるHefの天然変性領域の構造と機能)
3. 学会等名 第57回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 塩澤亜紀、飯田麻生、小田 隆、佐藤 衛、禾 晃和
2. 発表標題 SEX-SAXSによるLDLRファミリーのpH依存的な構造変化の検証
3. 学会等名 第19回日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 杉山正明、中川 洋、斉尾智英、矢木真穂、笠口友隆、小田 隆、井上倫太郎、佐藤信浩、守島 健、日野正裕、川北至信、高田慎一、富永大輝、佐藤 衛
2. 発表標題 中性子溶液散乱を基軸とした蛋白質の構造・ダイナミクス解析への挑戦
3. 学会等名 日本中性子科学会第18回年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小田 隆、関野絢子、米山真紀、浴本 亨、池口満徳、笠口友隆、杉山正明、石野良純、佐藤 衛
2. 発表標題 SANSと計算科学による天然変性タンパク質の動的構造と機能の解明
3. 学会等名 日本中性子科学会第18回年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小田 隆、関野絢子、米山真紀、村上綾香、苮口友隆、浴本 亨、池口満徳、杉山正明、石野良純、佐藤 衛
2. 発表標題 Protein deuteration for small angle neutron scattering
3. 学会等名 J-PARC Workshop2018 (Deuterium Labeling Study for Neutron Science) (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小田 隆、関野絢子、米山真紀、村上綾香、苮口友隆、浴本 亨、池口満徳、杉山正明、石野良純、佐藤 衛
2. 発表標題 溶液散乱と計算科学で明らかにする天然変性タンパク質の構造と機能
3. 学会等名 PF研究会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計0件

〔取得〕 計1件

産業財産権の名称 新規抗PAD4抗体	発明者 佐藤 衛、山田 道之、金澤 智	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特許第6675739号	取得年 2020年	国内・外国の別 国内

〔その他〕

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	小田 隆 (Oda Takashi) (00573164)	立教大学・理学部・助教 (32686)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------