

令和 4 年 6 月 6 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K19161

研究課題名(和文)食品成分に制御されるセンサータンパクの構造アンサンブル

研究課題名(英文)Structural ensembles of sensor proteins regulated by food components.

研究代表者

黒河 博文(Kurokawa, Hirofumi)

東北大学・多元物質科学研究所・講師

研究者番号：80359546

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は従来の鍵と鍵穴モデルでは説明できない「アンサンブル構造」による分子認識の解明を目指すものである。当初、酸化ストレスセンサーと有機化合物との複合体形成による準安定状態のトラップを試みたが、これとは別のモデル系として、cis型プレニル転移酵素が有用であることがわかり、そのX線結晶構造を明らかとした。X線回折実験に適したサイズのストレスセンサー結晶を得ることが困難であったため、微結晶でも解析が可能なクライオ電顕を用いた微結晶電子線回折法に着目し、まず低分子試料の分子置換法による構造解析を行った。年度末に所属部局にクライオ電顕が導入されたため、今後の解析を行うための基礎を確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

cis型プレニル転移酵素の結晶解析から低分子の結合によるタンパク質のダイナミックな構造変化を高分解能で明らかとした。このような成功例がある一方、柔軟なセンサータンパク質はX線解析が可能なサイズの大きな結晶を得ることが困難である。微結晶でも解析が可能なクライオ電子顕微鏡を用いた解析が必須と判断し、関連する共同研究を実施した。本研究はセンサータンパク質の分子認識を解明する上で鍵となる微小結晶解析に向けた基礎を築いたといえる。

研究成果の概要(英文)：This study aims to elucidate molecular recognition by "ensemble structure," which cannot be explained by the conventional lock and key model. We first attempted to trap metastable states by forming a complex between an oxidative stress sensor and the organic compound, but we found that cis-prenyltransferase was useful as another model system and determined its X-ray structure. Since it was difficult to obtain the stress sensor crystals of suitable size for X-ray diffraction experiments, we turned our attention to microcrystal electron diffraction using cryo-electron microscopy, which is capable of analyzing even microcrystals. The structural analysis of small molecule samples was first performed by using the molecular replacement method. Since the cryo-EM was installed in our department recently, we have established the basis for future analyses.

研究分野：構造生物学

キーワード：タンパク質 結晶構造

1. 研究開始当初の背景

アンフィンゼンはリボヌクレアーゼ A の実験から「タンパク質のネイティブな立体構造はそのアミノ酸の配列情報によって一意に規定される」(アンフィンゼンのドグマ)ことを示し、1972年のノーベル賞を受賞した。当時、タンパク質は自由エネルギーの高い一本鎖のほどけた状態から、自由エネルギー最小のコンパクトな状態へと一意的にフォールドすると考えられた。その後、狂牛病の原因となる異常型プリオンや、パートナー分子が存在しない状態では特定の構造をとらない天然変性タンパク質など、「アンフィンゼンのドグマ」では説明できない様々なケースが明らかとなった。つまり、細胞内でタンパク質は必ずしも自由エネルギー極小の状態にあるのではなく、準安定な状態で複数のコンフォメーション間を揺らいでいる状態(アンサンプル構造)にあり、これがコンフォメーション変化を伴う分子認識やシグナル伝達などの機能発現に重要な役割を果たすと考えられた。しかし、このようなアンサンプル構造を実験的にとらえることは困難であった。

2. 研究の目的

食品に含まれる天然有機物には、細胞に取り込まれて薬のように働くものがある。例えばブロッコリーの新芽に含まれるスルフォラファンはヒトの酸化ストレスセンサーに作用し、酸化ストレス消去に関わる酵素群の発現を誘導する。臨床研究からスルフォラファンには肝臓がん予防効果も示されており「食と健康」の観点からも注目を浴びている。さらに近年の研究から、酸化ストレスセンサーがスルフォラファン以外にも多様な炭素骨格をもつ種々の天然有機物を感知する生体防御ケミカルセンサーであることが明らかとなってきた。一つのセンサー分子が様々なストレス化合物を認識することは、「効率的な分子進化」という観点からも興味深い。またタンパク質科学の観点からも、従来の「鍵と鍵穴モデル」では説明できない新しい分子認識機構を強く示唆するものである。本研究では、センサータンパク質が「アンサンプル構造」をとっているが、ある種の天然有機物と複合体形成することで準安定状態にトラップされると考え、複合体結晶構造解析からタンパク質のダイナミックな構造の解明を試みた。

3. 研究の方法

ターゲット化合物の多様な炭素骨格を考慮するとセンサータンパク質はターゲットに適応して多様なコンフォメーションをとると考えられる(アンサンプル構造)。本研究では、タンパク質の「アンサンプル構造」という新しい概念に「センサータンパク質と標的化合物との複合体形成による準安定状態のトラップ」という手法で挑戦するものである。センサータンパク質は反応性システイン残基を有し、ターゲット化合物と共有結合する。天然有機物については、過去の予備的な研究から4種類の炭素骨格の大きく異なる候補化合物を選定済みである。さらに新たな候補化合物を加えて予備実験を実施した後、センサータンパク質と有機化合物との複合体を調整する。それぞれの複合体がアンサンプル構造の準安定状態に対応すると考えられるため、それぞれの構造(コンフォメーション)を出発点とした分子動力学シミュレーションを実施し、構造遷移のメカニズムを含むアンサンプル構造の全容を明らかにする。

4. 研究成果

既に実施済みであった大腸菌発現組換えタンパク質の結晶化条件を最適化し、最終的にはX線結晶構造解析を行う予定であった。低温でのタンパク質精製環境が用意できなかったこと等が原因で、良質な結晶を得ることが困難であった。一方、研究を進める過程で「アンサンプル構造」が低分子化合物との相互作用によってどのように変化するかを検証するモデル系として、*cis*型プレニル転移酵素が有用であることがわかった。基質のリン酸基と類似の硫酸イオンが結合した結晶構造と非結合型の結晶構造を比較すると保存されたRXGモチーフ(図1)の構造が大きく変化していた。*cis*型プレニル転移酵素結晶の非対称単位には3つのダイマーが含まれていたが、それぞれの三次元構造を詳細に比較することで、本酵素によって分子内部で繰り返される転移反応とリンクしたタンパク質構造変化の詳細を原子レベルで明らかとした。低分子化合物との相互作用によるアンサンプル構造制御の一端を解明できた⁽¹⁾。また、本酵素の計算機シミュレーションに向けた予備的な解析を実施した。

ストレスセンサーのX線結晶解析は上述の通り高分解能の回折データを取得するには至っておらず、新型コロナウイルス感染症の拡大により様々な実験を行う上での制限があり、実験計画を大幅に変更せざるを得ない状況となった。このような状況の中、X線構造解析が困難な100 nm程度の微結晶でも構造解析が可能なクライオ電顕を用いた微結晶電子線回折法（マイクロED）の適用を検討した。理化学研究所のグループと共同で有機半導体のマイクロEDデータを用いて構造解析法の開発を行い、分子置換法を適用することで難解析性の構造解析に成功した。所属部に年度末にクライオ電顕が導入されたことから、今後、マイクロEDによる難解析性微小結晶解析を行うための基礎を確立した。

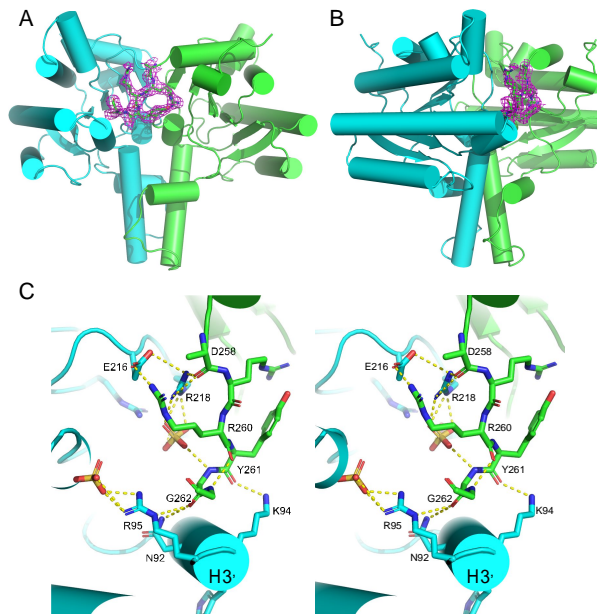


図1 (A) cis型プレニル転移酵素二量体のリボン図。RXGループの電子密度マップを紫で表示。(B)Aを別角度から見た図。(C)RXGループ付近のステレオ図。2量体間での相互作用がみられる。

<引用文献>

- (1) Kurokawa, H.; Ambo, T.; Takahashi, S.; Koyama, T. Crystal Structure of *Thermobifida Fusca* cis-Prenyltransferase Reveals the Dynamic Nature of Its RXG Motif-Mediated Inter-Subunit Interactions Critical for Its Catalytic Activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2020**, *532* (3), 459–465.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kurokawa Hirofumi, Ambo Takanori, Takahashi Seiji, Koyama Tanetoshi	4. 巻 532
2. 論文標題 Crystal structure of Thermobifida fusca cis-prenyltransferase reveals the dynamic nature of its RXG motif-mediated inter-subunit interactions critical for its catalytic activity	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 459 ~ 465
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2020.08.062	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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 黒河博文
2. 発表標題 cis型プレニル基転移酵素の構造ダイナミクス
3. 学会等名 第29回イソプレノイド研究会例会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 黒河博文、安保貴永、古山種俊
2. 発表標題 結晶構造解析によるcis型プレニル基転移酵素のダイナミクスと活性制御
3. 学会等名 第28回イソプレノイド研究会例会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------