

令和 4 年 4 月 28 日現在

機関番号：74408

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06604

研究課題名(和文) 目的生物由来微量タンパク質に対する新規協同的構造変化解析法の確立と展開

研究課題名(英文) Development and application of analytical method of a new cooperative structural change for a small amount of extracted proteins from target organisms

研究代表者

山本 竜也 (Yamamoto, Tatsuya)

公益財団法人サントリー生命科学財団・生物有機科学研究所・統合生体分子機能研究部・研究員

研究者番号：70437573

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：生体から直接抽出してきたタンパク質の動的構造を調べるために、我々はMALDI MSによるH/D交換実験に着目し、専門外の研究者が容易に使えるソフトウェアを開発した(フリーで配布を始めた)。このソフトウェアは様々な解析を自動的に行うだけでなく、同位体取り込みの異なる分子の存在比まで示すことができた。また、自らソフトウェア開発できる利点を生かし生体から抽出できるタンパク質量で静的な構造からは予想できなかった動的構造の変化を敏感に捉えることに成功した。更にタンパク質内で同じ構造クラスター内にある水素の数や溶媒露出度を算出すること成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

学術的には現在の構造解析は本来とは異なる生物を使った大量発現系を用いており、翻訳後修飾情報の喪失、溶液構造解析可能な対象が少ないこと、複数タンパク質の一斉解析が困難であることが原因となって生理的な活性を含む定量的なデータを十分に説明できていない。本研究の成果はこれらの問題を解決するための基盤技術確立したことにある。社会的には今後発展するであろう家畜、植物、人間自身の遺伝子操作に対し、その結果発現したタンパク質がどのように振る舞い影響するのかを知るための情報を与える技術を開発したことに意義がある。

研究成果の概要(英文)：In order to detect the dynamic structure of proteins extracted directly from organisms, we focused on H/D exchange experiments using MALDI MS and developed software that can be easily used by non-specialized researchers (started distribution for free). The software not only automatically performs various analyses, but can even show the abundance ratio of molecules with different isotopic uptakes. In addition, we succeeded in sensitively capturing changes in the dynamic structure that could not be predicted from the static structure with the amount of extracted protein. This result could be obtained by making the software by ourselves. Furthermore, we succeeded in calculating the degree of solvent exposure and the number of hydrogens in the same structural cluster in the protein.

研究分野：生物物理学

キーワード：質量分析 H/D交換 タンパク質の動的構造 ソフトウェア開発

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

タンパク質構造やその変化は機能と密接な関係にあるが、活性を含む定量的なデータを十分に説明できていない。主な理由は、現在の構造解析が本来とは異なる生物を使った大量発現系を用いていること、それに付随した翻訳後修飾情報の喪失、溶液構造解析可能な対象が少ないこと、複数タンパク質の一斉解析が困難であることなどである。それらを克服するため、申請者は質量分析法と H/D 交換 (HDX) を使った新しい切り口による手法開発を続けてきたが、機能に関連する構造変化を捉えるにはその変化を三次元的に解釈するためのより高精細な解析が課題であった。

2. 研究の目的

生物から直接抽出したタンパク質の動的構造を微量な生体内濃度レベルで立体的に検出する HDX クラスタ解析手法を確立し、実際の生体内におけるタンパク質の振る舞いを捕捉する道を拓く。

3. 研究の方法

MALDI-MS と重水素交換を使ってタンパク質内の構造変化領域を特定するだけでなく、重水素交換中に協同的に重水素に置き換わる水素クラスターを検出し、その溶媒露出度と交換速度を算出する新手法「HDX クラスタ解析」を用いて構造変化を立体的に捉え、抽出サンプルに対して機能に直結する構造因子解明のための基盤を構築する。

(1) HDX クラスタ解析は HDX-MALDI MS のデータを高精細に解析することでオリジナルな定量結果が得られることが分かったが、だれもが使えるような整備はなされておらず、また得られた結果の解釈にも発展の余地がある。そこで最初にプログラミング言語 Java を使い解析手法の一般化と高度化(高速化、自動化、新アルゴリズム実装)を進める。

(2) 酵素機能に関連する構造変化を調べるため、大きな構造変化が活性に大きく寄与することが分かっている Adenylate kinase1(AK1)の精製試料を使った実験を行う。酵素反応は温度上昇によって活性も上昇するため、触媒の活性化エネルギーを下げるような構造の動きがある。そこで、様々な温度で HDX-MS の実験を行うことでその動きを水素クラスターの変化から観察し、酵素機能に必要な構造変化を解明する。

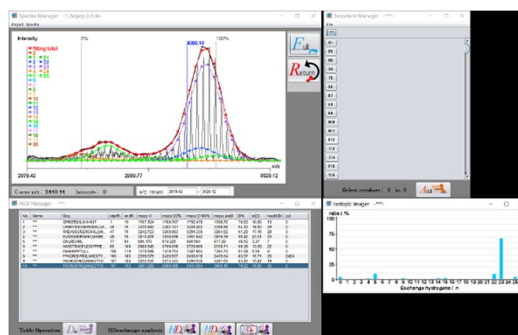
(3) 生物組織(培養細胞)から抽出できるサンプル濃度で HDX の実験を行うことで、実験系を確立し、AK1 をベースとして結晶構造などでは見えない新たな構造情報を取得する。

4. 研究成果

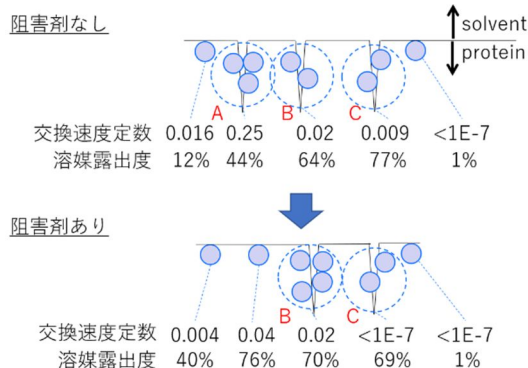
(1) HDX-MALDI MS のデータを高精細に解析するためのソフトウェア開発を行い、だれもが使えるような整備を進めた。具体的には HDX-MALDI MS のデータを高精細に自動解析するソフトウェア「Scipas DX」を開発し、論文発表[引用文献1]と web 上でのフリー配布[引用文献2]を行った。本ソフトウェアはウェットな研究を行っている申請者自身が作成し、「単一フォルダに格納することで一斉解析する機能など」を備えた実用性を重視した設計となっている。

また、HDX 解析の経時変化結果を使うことで、HDX 過程での交換水素クラスターを検出し、そのクラスターがもつ交換速度定数や表面露出度を算出する一段階高度なソフトウェアの開発も進めた。具体的には各交換時間で、フラグメント内の水素について、何個交換した水素が何割あるかを Scipas DX で同位体分布から計算し、その経時変化を基にクラスターの個数と各クラスター内の水素数を総当たりにシミュレートすることで最もフィットする状態を見つけ出し、右図に示すようなクラスターを検出するアルゴリズムの開発を行った。この様な計算は過去に行われた例がなく、質量分析を使った HDX 実験の限界を突破した成果である(論文執筆中)。

計算の実例として AK1 の阻害剤である ADP 類似物質を用いた HDX 実験を行い、その経時変化データを使ってクラスター解析を行った。図に示す通り、阻害剤の有無などの動的構造の変化に



開発したソフトウェア Scipas DX



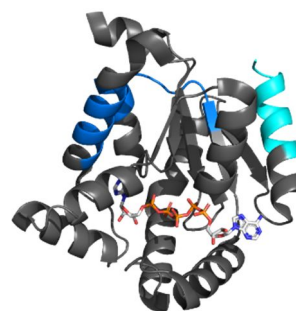
AK1 クラスタ解析の例。実線の円が水素、点線が水素クラスター。

図に示す通り、阻害剤の有無などの動的構造の変化に

対し高感度でその変化を検出することに成功した。検出できた変化としてはクラスターの数が一つ減っただけでなく、クラスター内の水素の個数の変化や交換速度定数の変化までも捉えることに成功した。

クラスター解析の計算速度について、本研究前のテスト解析時は 9 残基の長さのもので一般的な Core-i5 搭載のノート PC で数日を要し、また残基が長くなるにつれ計算時間が指数関数的に長くなるため、実用的に使うには制限があった。しかし、アルゴリズムを改良することで解析時間を数十秒まで早めることに成功した。元々クラスター数やクラスター内の水素数を毎回仮想空間に作りだして総当たりし、交換速度定数や表面露出度を変数として変動させながら最もフィットする状態を探索していたが、全クラスターパターンを仮想空間に作り出す部分が律速となっていることを突き止めることができた。そこで、クラスター数やその中の水素数のリストをあらかじめデータとして内在させることにより、コードは長くなってしまいが、その部分の計算を省くことに成功し大幅な計算時間のたしゅくに成功している。現在は 12 残基長のフラグメントまでクラスターパターンのリスト化に成功し、HDX の解析で使用する多くのペプシンフラグメントの長さが 12 残基以下であるため、実的に使える状態になった。現在 12 残基長のクラスター解析に要する時間は数分となっている。

(2) ヒト由来 AK1 を使って温度を振った HDX 実験を行うことで、酵素反応は温度上昇によって触媒の活性化エネルギーを下げるような構造の動きを探る試みを行った。この結果、温度に対して依存的な HDX の取り込み量上昇を示し、活性化エネルギーを下けている可能性を示す領域として右図の青色の 2 領域や水色の 1 領域が見つかった。この領域は X 線結晶構造などでは予想できなかった領域であり、本研究の重要性が示された。



AK1 の温度を振った HDX 実験の結果活性化エネルギーを下げるような動きを示唆した領域(青色・水色)

(3) 海洋生物の組織や培養細胞などの生体由来タンパク質やペプチドについて、その同定を他の研究で同時に進めており[引用文献 3]いる。その経験から翻訳後修飾が入った状態で検出する場合においてもサブマイクログラムオーダーの量があれば、様々な生物種の様々なタンパク質において取得可能であることが分かったため、その量を基準として HDX 実験を設計し、新規情報が採れるか検証を行った。

具体的には進化的にばらつきのある 5 つの生物種由来の AK1 (ヒト、ニワトリ、アフリカツメガエル、ホヤ、大腸菌) について、生物組織 (培養細胞) から抽出できるサンプル濃度で HDX 実験を行うことで、様々な生物種由来の酵素について構造学的な共通性と相違性について検出可能かどうかを調べた。結果は結晶構造や予測構造からは推定できない活性中心から離れたループ領域に交換されない領域が存在し (右上図内の青色のループ領域を含むフラグメント)、それはすべての生物種由来の AK1 で共通していることが新たに分かった。興味深いことにこの領域は(2)の実験で行った活性化エネルギーを下げる可能性を示す領域でもあり、由来生物の生育温度などによってことなる酵素活性の影響を示唆するものである。

逆に強い構造を持つと相応される N 末端 シート領域では種によって交換の程度が異なることもわかり、大腸菌の様な単細胞生物は構造から想像される通り交換速度が遅く、温度の上昇とともに交換速度が上がっている傾向が見えた。一方で脊索動物になるとこの領域の交換速度は低い温度で実験した場合でも速く、温度の上昇に関係なく低い温度領域ですでに交換速度が飽和していることが分かった。結晶構造や予測構造からは大腸菌も脊索動物も違いが判らず主鎖構造がほぼ重なり、側鎖構造であってもその違いが判らず HDX による重水素の取り込みは遅いであろうと予測されたが、それとは大きく異なる結果となった。

本実験で我々の構築した「目的生物由来微量タンパク質に対する新規協同的構造変化解析法」は結晶構造の様な静的情報では見えてこないものが生体抽出したタンパク質を使って見えることを証明し、それらの発見を助けるツールの開発にも成功した。

<引用文献>

1. Yamamoto T., Yamagaki T., Satake H. †, "Development of Software for the In-Depth Analysis of Protein Dynamics as Determined by MALDI Mass Spectrometry-Based Hydrogen/Deuterium Exchange.", Mass Spectrom (Tokyo) 2020, 8, S0082.
2. <https://protein.p-desi.net/scipasDX/scipasDX.html>
3. Fodor I., Svigruha R., Bozsó Z., Tóth G.K., Osugi T., Yamamoto T., Satake H., Pirger Z. "Functional characterization and related evolutionary implications of invertebrate gonadotropin-releasing hormone/corazonin in a well-established model species" 2021, Scientific reports 11 (1), 1-10

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 5件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Kikuchi Akihiro, Takayama Hiroaki, Tsugane Hirohiko, Shiba Kazuhiro, Chikamoto Keita, Yamamoto Tatsuya, Matsugo Seiichi, Ishii Kiyo-aki, Misu Hirofumi, Takamura Toshinari	4. 巻 10
2. 論文標題 Plasma half-life and tissue distribution of leukocyte cell-derived chemotaxin 2 in mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 13260
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-70192-x	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 Sakai Tsubasa, Yamamoto Tatsuya, Matsubara Shin, Kawada Tsuyoshi, Satake Honoo	4. 巻 21
2. 論文標題 Invertebrate Gonadotropin-Releasing Hormone Receptor Signaling and Its Relevant Biological Actions	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 8544 ~ 8544
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms21228544	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 Yamamoto Tatsuya, Yamagaki Tohru, Satake Honoo	4. 巻 8
2. 論文標題 Development of Software for the In-Depth Analysis of Protein Dynamics as Determined by MALDI Mass Spectrometry-Based Hydrogen/Deuterium Exchange	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Mass Spectrometry	6. 最初と最後の頁 S0082 ~ S0082
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.5702/massspectrometry.S0082	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 Satake Honoo, Matsubara Shin, Shiraishi Akira, Yamamoto Tatsuya, Osugi Tomohiro, Sakai Tsubasa, Kawada Tsuyoshi	4. 巻 68
2. 論文標題 Neuropeptides, Peptide Hormones, and Their Receptors of a Tunicate, <i>Ciona intestinalis</i>	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Results Probl Cell Differ	6. 最初と最後の頁 107 ~ 125
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/978-3-030-23459-1_5	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 Satake H, Matsubara S, Shiraiishi A, Yamamoto T, Osugi T, Sakai T, Kawada T	4. 巻 377
2. 論文標題 Peptide receptors and immune-related proteins expressed in the digestive system of a urochordate, <i>Ciona intestinalis</i> .	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cell Tissue Res.	6. 最初と最後の頁 293-308
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00441-019-03024-8	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 Kabe Yasuaki, Koike Ikko, Yamamoto Tatsuya, Hirai Miwa, Kanai Ayaka, Furuhashi Ryogo, Tsugawa Hitoshi, Harada Erisa, Sugase Kenji, Hanadate Kazue, Yoshikawa Nobuji, Hayashi Hiroaki, Noda Masanori, Uchiyama Susumu, Yamazaki Hiroki, Tanaka Hiroto, Kobayashi Takuya, Handa Hiroshi, Suematsu Makoto	4. 巻 13
2. 論文標題 Glycyrrhizin Derivatives Suppress Cancer Chemoresistance by Inhibiting Progesterone Receptor Membrane Component 1	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 3265 ~ 3265
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers13133265	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 Fodor István, Svigruha Róka, Bozsó Zsolt, Tóth Gábor K., Osugi Tomohiro, Yamamoto Tatsuya, Satake Honoo, Pirger Zsolt	4. 巻 11
2. 論文標題 Functional characterization and related evolutionary implications of invertebrate gonadotropin-releasing hormone/corazonin in a well-established model species	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1-10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-89614-5	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 -

〔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 山本竜也・佐竹炎
2. 発表標題 H/D交換質量分析とScipas DXを用いたAdenylate kinase 1構造ダイナミクスの種間類似性解析
3. 学会等名 第68回質量分析総合討論会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山本竜也, 佐竹炎
2. 発表標題 H/D交換質量分析を用いたAdenylate kinase 1構造ダイナミクスの種間類似性解析
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

Scipas DX https://protein.p-desi.net/scipasDX/scipasDX.html Protein dynamics project for multicomponents https://protein.p-desi.net/

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