

令和 4 年 6 月 16 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07040

研究課題名(和文) 膜タンパク質の膜貫通領域におけるシステイン残基を介したレドックス感知機構

研究課題名(英文) Redox sensing by membrane proteins via cysteine residues in the TM region as studied by using solution NMR

研究代表者

徳永 裕二 (Tokunaga, Yuji)

東京大学・大学院薬学系研究科(薬学部)・助教

研究者番号：80713354

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)：タンパク質のひとつひとつのアミノ酸残基からまんべんなく構造情報を取得する目的に汎用される二次元<sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N相関測定法について、<sup>15</sup>N直接検出CRINEPT法を開発することにより、脂質二重膜中に埋め込まれた膜タンパク質など高分子量タンパク質の観測における高感度化を達成し、医療用抗体アナログの製剤・保存温度条件におけるNMR観測に世界で初めて成功した。

また、大腸菌のtRNA硫黄修飾関連タンパク質であるTusEのNMR解析より、硫黄運搬に使われるCys108が積荷硫黄原子を付加し硫化状態となると、当該部位を保護するような構造変化を起こすことを見出し、このことによる効率的な硫黄運搬機構を提示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で開発した<sup>15</sup>N CRINEPT法は、溶液NMR法の最大の課題である高分子量限界を大幅に改善するとともに、従来は解析が困難であった重水素化できないタンパク質にも適用範囲を持つため、膜タンパク質のレドックス感知機構の解明のみならず、基礎研究および創薬分野に幅広く波及効果をもたらす極めて普遍性の高い技術的進歩として有意義である。

TusEを対象としたNMR解析から明らかとされた硫化に伴う合目的な構造変化は、化学的な安定性の低い硫黄修飾を介した情報伝達に対して頑強性をもたらす機構と捉えることができ、近年脚光を浴び始めた生体内の超硫黄分子群の制御を研究する上での先駆的な知見となる。

研究成果の概要(英文)：We developed an NMR technique, <sup>15</sup>N-direct detection CRINEPT, which enables observation of backbone amide signals of non-deuterated high molecular weight proteins with an unprecedentedly high sensitivity. By using <sup>15</sup>N CRINEPT, we successfully observed amide <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N resonances from more than 80% Ala residues of an analogue of a therapeutic monoclonal antibody in formulation at a storage temperature of 4 deg. This technique is also fundamental to the analyses of redox sensing mechanisms by membrane proteins reconstituted in a lipid bilayer.

We also investigated the structural change of an E. coli protein, TusE, which works as a member of sulfur transfer cascade from L-cysteine to tRNA. Persulfidation of TusE on Cys108 residue, where the cargo sulfur atom is attached to the sidechain of Cys108 to form the -SSH group, induced substantial structural change of TusE, leading to protection of the sulfur atom from passive oxidation for high-efficiency sulfur transfer.

研究分野：構造生物学

キーワード：タンパク質 システイン残基 過硫化 tRNA修飾 核磁気共鳴 高分子量観測

## 1. 研究開始当初の背景

細胞の脂質二重膜に埋め込まれた膜タンパク質は、リガンド結合等に伴い細胞内情報伝達を起こすことで、遺伝子発現、代謝制御、および物質輸送等を介して恒常性維持や環境応答に中心的に関与している。膜タンパク質の膜貫通領域 (TM 領域) は主に疎水性アミノ酸から構成されることで、極性に乏しい脂質膜環境において熱力学的に安定な構造を保持している。ところが、TM 領域には、構造安定性の観点からは説明しがたい、極性アミノ酸のシステイン (Cys) 残基が少なからず含まれる。その一部は、システイン同士のジスルフィド結合形成、またはアシル化修飾を受けることで、構造安定化に貢献するが、TM 領域システイン残基の多くは、膜タンパク質の機能に対する寄与は不明であった。一方、近年になり、チャネル分子アキュアポリン 8 (AQP8) が、細胞内外のレドックス環境に応じて TM 領域システインの修飾状態を変化させ、基質透過活性を制御することが報告されていた (Bestetti et al, Sci. Adv. 2018)。この知見などから、実施者は、膜タンパク質 TM 領域のシステイン残基が修飾を受けることで、レドックスセンサーとして働く仮説を立てた。生理的なシステイン修飾のドナー分子である過酸化水素 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (スルフェニル化; -SOH 化) 一酸化窒素 NO (ニトロシル化; -SNO 化) および硫化水素 H<sub>2</sub>S (スルフィドリル化; -SSH 化) は、いずれも拡散により膜透過することから、TM 領域システインへの接触を想定できる。しかしながら、質量分析などの既存の方法では、この仮説の実験的証明は困難である。これは、質量分析の試料調製は多数のステップを要するが、一般に、膜タンパク質は疎水性が高く凝集しやすいことや脂質分子と強く結合するため、これらの各ステップの効率を悪化させるためである。そのため、既存の方法論により膜タンパク質の TM 領域システイン修飾状態を解明できる蓋然性は低い。この状況を鑑み、TM 領域システイン残基の多様な修飾状態を、煩雑な試料の前処理を必要とせず、部位特異的に検出、同定および定量可能な新しいアプローチが求められていた。

## 2. 研究の目的

本研究では、これまで見過ごされてきた TM 領域システイン残基に着目し、細胞内外のレドックス環境を検知することでセンサーとして働くとの、独自の仮説に立ち、そのような膜タンパク質機能制御の概念を、実験的検証を通じて確立することを目的とした。この目的を既存の方法論により達成することでは困難であるため、システイン安定化を指向した試料調製および溶液 NMR 法による非侵襲的観測を融合したアプローチを考案し、その実現を目標とした。具体的には、システイン修飾状態の種類・物性情報を、脂質膜環境を伴い高分子量となる膜タンパク質測定条件においても、NMR 測定により十分な感度で解析可能とする技術基盤の確立、膜タンパク質の TM 領域システイン残基の構造 - レドックス修飾相関解析、および TM 領域システイン残基の修飾に依存した膜タンパク質の機能制御機構の解明を具体的な達成項目として設定した。

## 3. 研究の方法

まず、界面活性剤ミセルや再構成脂質二重膜中の膜タンパク質のように、100 kDa を超える高分子量の条件における溶液 NMR 計測技術の開発を行った。ここでは、高分子量条件において高効率となる磁化移動経路を利用するとともに、周辺プロトン核との相互作用が小さい <sup>15</sup>N 核直接観測法を組み合わせた測定技術を開発した。この測定法を用いることにより、従来の計測技術ではシグナルを検出することが不可能であった、重水素化されていない抗体分子の 4 における観測を試みた (研究成果 4 - 1)。本技術開発においては、世界有数の <sup>15</sup>N 最適化クライオプローブを活用した。

また、可溶性タンパク質を対象とした、溶液 NMR 法による硫化状態の分析を行った。ここでは、大腸菌における tRNA 硫黄修飾を担う *Tus* 遺伝子群の発現産物のひとつである *TusE* を対象とした。*TusE* を含む *Tus* タンパク質は、積荷硫黄原子を分子内の特定のシステイン残基に付加した硫化状態 (Cys-SSH) として、積荷硫黄原子を運搬する。したがって、*TusE* の硫化状態の NMR 解析を行うことにより、単に分析科学的にタンパク質の硫化が誘起するスペクトル変化を検出するのみならず、その構造変化についての情報を得ることで *TusE* による硫黄運搬について、新たな構造機構を明らかとすることも期待した。*TusE* は大腸菌発現系にて安定同位体標識試料を調製した。精製した *TusE* を硫化ナトリウム Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub> にて処理することにより、硫黄運搬を担う Cys108 を硫化した。硫化 *TusE* は化学的に不安定であり、溶存酸素により容易に酸化されることから、NMR 測定に必要となる数日間にわたり硫化状態が安定に維持される試料を調製するため、硫化 *TusE* 試料の調製および NMR 試料管への導入は、酸素を除去した嫌気チャンバ内にて行った。NMR 試料管は密閉度が高く酸素の浸入を抑制できるバルブ付きの試料管を使用した。*TusE* の主鎖アミド基に由来する <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N 相関シグナルから残基分解能の構造情報を取得することにより、硫化に伴う *TusE* の構造変化とその生理的意義について考察した (研究成果 4 - 2)。

## 4. 研究成果

### 4 - 1. 高分子量観測 NMR 計測技術の開発

残基分解能の構造情報を与える主鎖アミド基  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  相関シグナルを観測するための従来の溶液 NMR 技術は、適用可能な分子量上限が約 100 kDa に制限されており、また先鋭なシグナルを観測するためには周辺水素核の重水素化が必要であることも発現系や実験費用面における制約となっていた。本研究では、高分子量条件に適した磁化移動方式と観測核を組み合わせた計測技術を開発することで、これらの制約を大幅に解消した。磁化移動方式については、異核間の相関シグナルを得るために広く使われるスピン結合を介した磁化移動と、高分子量条件において特に高効率となる交差相関緩和を介した磁化移動を併用した CRINEPT 方式の磁化移動を利用した。直接観測核については、生体分子の高感度測定において一般的に使われる  $^1\text{H}$  核の代わりに、 $^{15}\text{N}$  核を利用した。 $^{15}\text{N}$  核は、核磁気回転比が  $^1\text{H}$  核の約 1/10 であるため絶対感度に劣るものの、周辺プロトンによる緩和の影響が小さく高分子量条件においても磁化の減衰が緩徐であるため、取り込み磁化の時間積分であるシグナル強度に基づく比較においては、高分子量条件においては  $^{15}\text{N}$  核直接観測の感度は  $^1\text{H}$  核直接観測を上回ることが予想された。これらの要素に、逆位相磁化としての磁化取り込み、および間接軸化学シフト展開と磁化移動を同期する工夫を加えることで、パルス系列の混合期における磁化の逸失を最小化した「 $^{15}\text{N}$  直接検出 CRINEPT 法」を開発した(図 1)。

本研究では、この技術を、立体構造に基づく品質評価技術を行うための技術が求められている医療用抗体に適用した。医療用抗体をはじめとするバイオ医薬は、ポリペプチドが非共有結合性の相互作用を介して折りたたまれた複雑かつ不安定な立体構造を有するため、古典的な低分子医薬と異なり、その品質評価において、開発段階から立体構造の均一性や安定性を考慮する必要がある。繊細な立体構造の状態を、製剤の溶液組成や保存温度の条件で、溶液中において高分解能に解析可能である計測手法として、溶液 NMR は優れた特性を有している。しかしながら、抗体医薬は哺乳細胞を使って産生されるため重水素化が困難であるとともに、2-8 の保存温度条件においては回転相関時間を考慮した実効的な分子量は 300 kDa と、従来の測定法の分子量上限を大幅に超過する。さらに、医薬品製剤は抗体分子が高濃度に溶解されることや、高濃度の安定化剤(ショ糖など)が添加されることにより、溶液は粘性が高くなるため、抗体分子の見かけの分子量はさらに大きいものとして振舞うこととなる。本研究では、ある医療用抗体と同一のアミノ酸配列を有するアナログ分子(以下、単に抗体と称する)を対象として、 $^{15}\text{N}$  直接検出 CRINEPT 法を適用した。既存の測定法として、 $^1\text{H}$  直接検出 CRINEPT 法など(以下、単に既存手法と称する)を用い比較対象とした。解析対象の抗体は、pH 制御用のバッファー成分のみからなる単純なテスト溶液に加え、皮下注射用(アミノ酸など抗体由来の  $^1\text{H}$  NMR シグナルと重なる周波数の信号を与える添加物を含む)および静脈内投与用(粘性の大きい高濃度のショ糖を含む)の溶液組成にて分析を行った。測定温度としては、分子の熱運動が激しく NMR シグナルを先鋭に観測しやすい、比較的高温の 32 を参照条件とし、抗体医薬の保存温度に相当する 4 における抗体由来シグナルの観測可否を調べた。この結果、32 の条件においては、溶液の組成によらず、 $^{15}\text{N}$  CRINEPT 法および既存手法のいずれも抗体由来シグナルの検出に成功し、両者の有効性に質的に大きな差異は認められなかった。これに対して、4 の条件においては、最も単純なテスト溶液中においても、既存手法では抗体由来シグナルを検出することはできなかった。

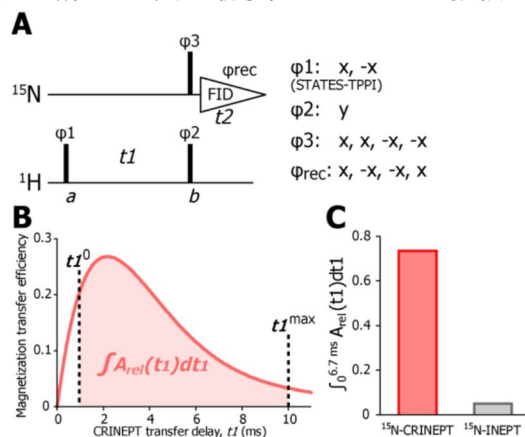


図 1.  $^{15}\text{N}$  直接検出 CRINEPT 法の概要

A. パルス系列、B. 感度推定概念図、C. 予測される感度の既存手法との比較(150 kDa, 4 条件)

本研究では、ある医療用抗体と同一のアミノ酸配列を有するアナログ分子(以下、単に抗体と称する)を対象として、 $^{15}\text{N}$  直接検出 CRINEPT 法を適用した。既存の測定法として、 $^1\text{H}$  直接検出 CRINEPT 法など(以下、単に既存手法と称する)を用い比較対象とした。解析対象の抗体は、pH 制御用のバッファー成分のみからなる単純なテスト溶液に加え、皮下注射用(アミノ酸など抗体由来の  $^1\text{H}$  NMR シグナルと重なる周波数の信号を与える添加物を含む)および静脈内投与用(粘性の大きい高濃度のショ糖を含む)の溶液組成にて分析を行った。測定温度としては、分子の熱運動が激しく NMR シグナルを先鋭に観測しやすい、比較的高温の 32 を参照条件とし、抗体医薬の保存温度に相当する 4 における抗体由来シグナルの観測可否を調べた。この結果、32 の条件においては、溶液の組成によらず、 $^{15}\text{N}$  CRINEPT 法および既存手法のいずれも抗体由来シグナルの検出に成功し、両者の有効性に質的に大きな差異は認められなかった。これに対して、4 の条件においては、最も単純なテスト溶液中においても、既存手法では抗体由来シグナルを検出することはできなかった。

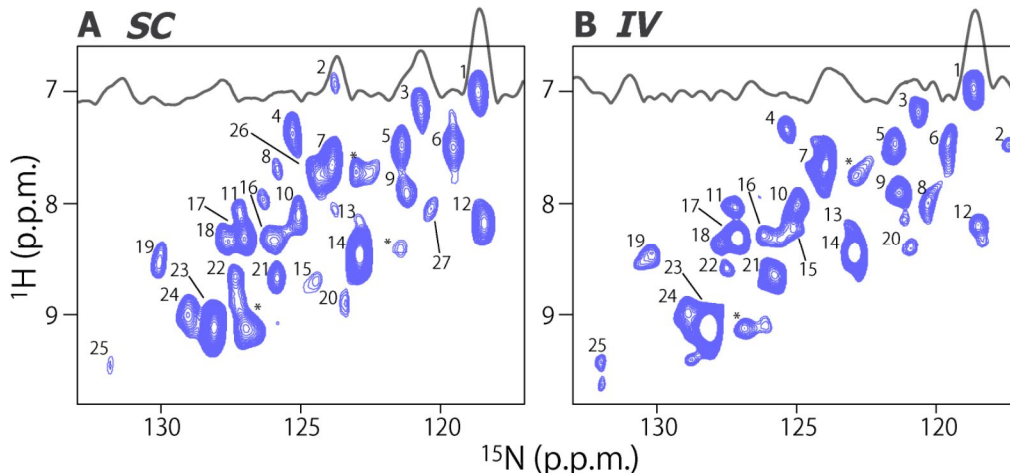


図 2.  $^{15}\text{N}$  CRINEPT 法による製剤・保存温度(4)条件における抗体分子の NMR スペクトル

一方、 $^{15}\text{N}$  直接検出 CRINEPT 法を適用した結果、テスト溶液のみならず最も粘性の大きい静脈内投与用の溶液中においても、80% 以上の主鎖アミドシグナルを検出することに成功した(図 2)。また、 $^1\text{H}$  直接観測実験では、皮下注射用の溶液組成においてはヒスチジンなどの添加物由来のアーティファクトシグナルが抗体のスペクトル領域に生じたが(図 2、網掛け領域)、 $^{15}\text{N}$  直接検出 CRINEPT 測定においては、 $^{15}\text{N}$  核を持たない添加物由来のアーティファクトは生じず、より高い分析精度を期待できることが示された。

さらに、 $^{15}\text{N}$  直接検出 CRINEPT 法を、抗体の糖鎖修飾の不均一性の解析に応用した。哺乳細胞などで産生される抗体医薬 (IgG) は Fc 領域に N 型糖鎖修飾を受けるが、末端部分のガラクトース修飾の有無は、抗体のエフェクター機能と関係することが知られている(図 3A)。 $[\text{Lys-}^{15}\text{N}]$  標識抗体に対して  $^{15}\text{N}$  直接検出 CRINEPT を適用した結果、糖鎖修飾部位から約 10 離れた Lys-248 のシグナルが、 $^{15}\text{N}$  方向に広幅かつ非対称な形状を示した(図 3B)。対照として、酵素的に末端 Gal を付加 (G2) および除去 (G0) した抗体のスペクトルには、 $^{15}\text{N}$  低磁場および高磁場側に相当するシグナルがそれぞれ見出された(図 3C)。このことから、インタクトの抗体においては、G2, G1/G1' および G0 成分に由来するシグナルが、それぞれの含有率を反映した強度比で観測されていることが判明した(図 3D)。実際に、シグナル強度から推定した Gal 修飾状態の含有比率は、質量分析と同様の傾向を示した。したがって、 $^{15}\text{N}$  直接検出 CRINEPT 法により抗体の糖鎖の不均一性を、インタクトの状態で定量的に解析することも可能であることが示された。以上の成果は *J Med Chem* 誌に報告した。

このように、 $^{15}\text{N}$  直接検出 CRINEPT 法は膜タンパク質のシグナル観測に有利であるばかりでなく、抗体医薬の立体構造評価を含めた創薬ニーズにも対応する。 $^{15}\text{N}$  直接検出 CRINEPT 法は、原理的に、従来の  $^1\text{H}$  検出型の測定法による高分子量観測において必須条件であった重水素化を必要としないことから、昆虫細胞や哺乳細胞でしか発現できないため重水素化試料の調製が難しい高難度タンパク質の観測にも適用可能であり、溶液 NMR 法を用いた構造生物学研究全般を底上げする波及効果の大きい技術と言える。

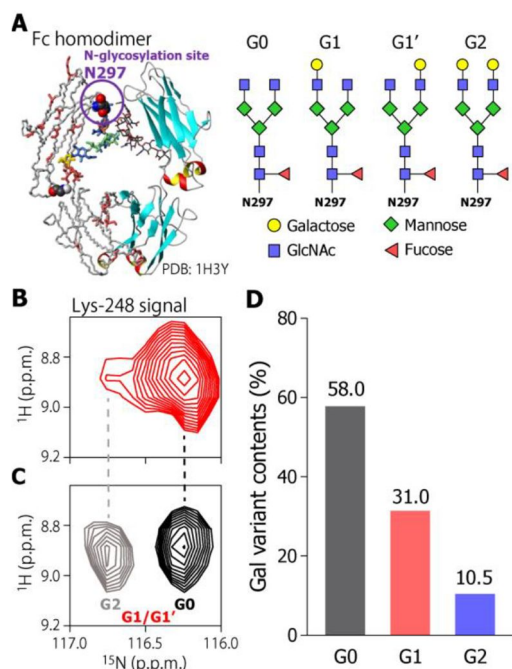


図 3 . 抗体の糖鎖修飾状態の解析

A. 末端 Gal 付加の種類、B. インタクトおよび C. 酵素処理した抗体の K248 由来シグナル、D. インタクト抗体の K248 由来シグナルの強度分布から推定した Gal 修飾状態の含有率。

#### 4 - 2 . 硫黄運搬タンパク質 TusE による効率的な硫黄運搬の構造機構の解明

tRNA の硫黄修飾は、あらゆる生物に保存された、正確な翻訳に不可欠な機構である。大腸菌の TusA-E 遺伝子群は、システイン脱硫酵素から tRNA 硫黄化修飾酵素へと硫黄原子を運搬する役割を担う(図 4)。

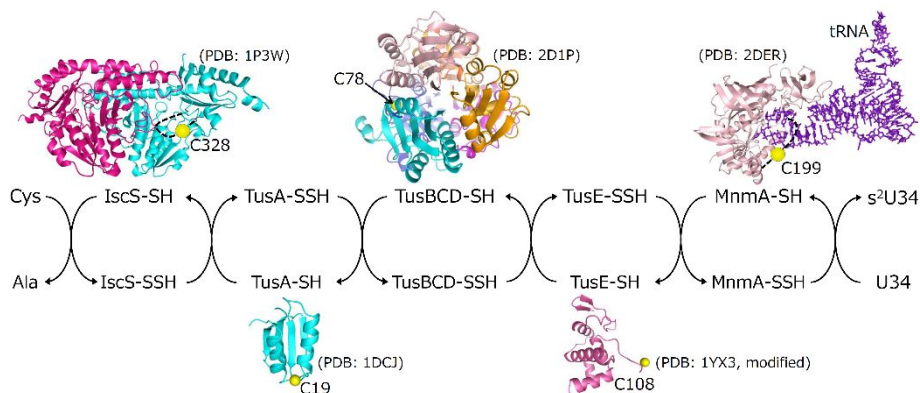


図 4 . Tus タンパク質群を介した Cys アミノ酸から tRNA への硫黄伝達

この際、各々のタンパク質の特定のシステイン残基の側鎖に、積荷硫黄を結合した“硫化状態” (-SSH 基) を形成する。TusE のホモログである好熱菌由来 DsrC の、硫化されていない状態の立体構造においては、硫黄部位のシステイン残基を含む C 末端 7 残基は特定の立体構造を形成していなかった。このような構造からは、化学的安定性の低い硫化状態が生体内において安定に維持され、効率の良い硫黄運搬を可能とする機構は不明である。そこで本研究においては、可溶性タンパク質において NMR による硫化状態の解析を行う題材として TusE を扱い、その硫化に伴う構造変化を溶液 NMR 法にて解析することにより、効率的な硫黄運搬の構造機構を明らかとすることを目的とした。[U-<sup>13</sup>C/<sup>15</sup>N] TusE は大腸菌にて発現後、精製し、硫化ナトリウム Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub> 処理にて硫化した。NMR 測定を行う数日間にわたり硫化状態を安定に維持するため、硫化 TusE 試料は嫌気チャンバ内にて調製し、密閉度の高いバルブ付き NMR 管に導入した。まず、硫化前後の TusE の 2 次元 <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N 相関スペクトルを比較した。この結果、主鎖アミドシグナル 100 個のうち 26 個に 0.15 ppm 以上の化学シフト変化が観測され、その分布は硫化部位である Cys108 を含む C 末端に加え、構造形成領域のヘリックス 4 および 5 に及んだ ( 図 5 )

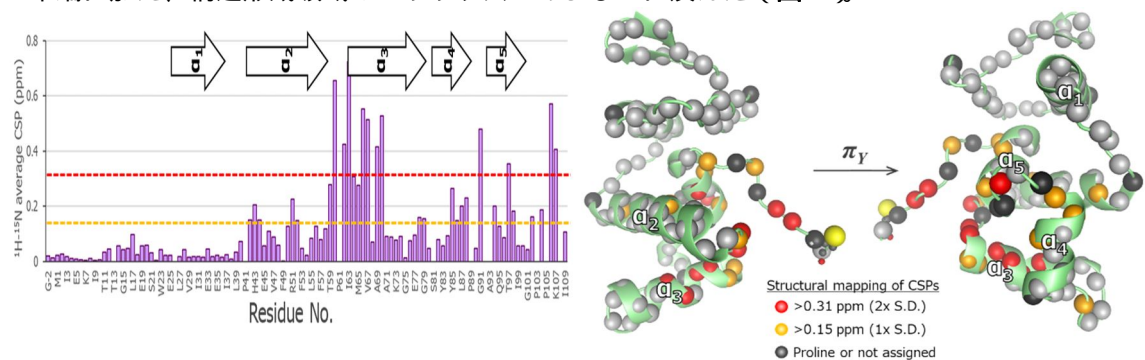


図 5 . 硫化に伴う TusE の化学シフト変化の残基プロット (左) および構造マッピング (右)

次に、<sup>15</sup>N-<sup>1</sup>H 異核 NOE 測定を行った結果、硫化に伴い C 末端領域のピコ秒～ナノ秒の速い運動は抑制されていた。以上より、硫化 TusE において C 末端領域は構造形成領域と相互作用を形成することが示唆された。このような構造変化の駆動力として、硫化に伴う Cys108 側鎖の酸解離定数の低下による脱プロトン化状態の安定化を想定し、この仮説を C108D/E/A/K 変異体を用いて検証した。この結果、これらの変異導入は、この順に、野生型 TusE における硫化に伴うスペクトル変化を再現した ( 図 6 )。以上の解析より、硫化 TusE は C 末端領域と構造形成領域の間に相互作用を形成し、硫化システイン残基を立体構造中に保護することで、ランダムな酸化による硫化状態の損失を防ぎ、効率的な硫黄運搬を行うと考察した。

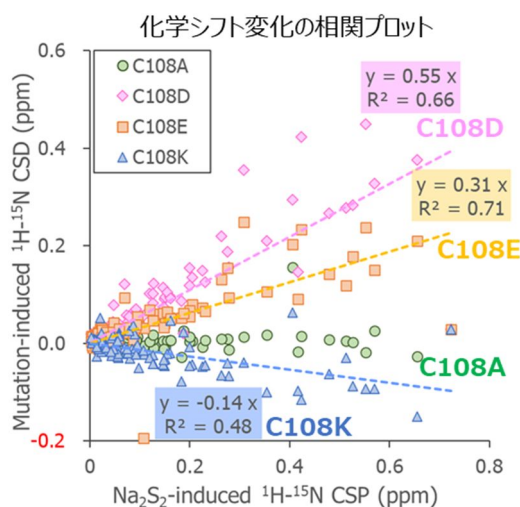


図 6 . TusE の硫化と C108X 変異導入に伴う化学シフト変化の相関

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 Yuji Tokunaga, Koh Takeuchi, Junya Okude, Kazutomo Ori, Takuya Torizawa, Ichio Shimada	4. 巻 63
2. 論文標題 Structural Fingerprints of an Intact Monoclonal Antibody Acquired Under Formulated Storage Conditions via 15N Direct Detection Nuclear Magnetic Resonance	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Medicinal Chemistry	6. 最初と最後の頁 5360-5366
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.jmedchem.0c00231	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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 徳永裕二、竹内恒、奥出順也、小里一友、鳥澤拓也、嶋田一夫
2. 発表標題 15N直接検出NMR法による製剤・保存条件におけるモノクローナル抗体の非破壊的観測
3. 学会等名 第59回NMR討論会
4. 発表年 2020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
研究分担者	坂倉 正義 (Sakakura Masayoshi) (20334336)	横浜市立大学・生命医科学研究科・助教  (22701)	
研究分担者	嶋 直樹 (Shigi Naoki) (20392623)	国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・主任 研究員  (82626)	

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