

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 6 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2023

課題番号：19K14677

研究課題名（和文）蛋白質天然変性領域がもたらす相転移ダイナミクスの構造基盤解析

研究課題名（英文）Structural analysis of protein intrinsically disordered regions that drive phase transition

研究代表者

吉村 優一（Yoshimura, Yuichi）

大阪大学・蛋白質研究所・招へい研究員

研究者番号：70632248

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、蛋白質溶液の相転移を駆動する天然変性領域の動的な構造変化に着目し、それを明らかにするためにカルボニル ^{13}C 核の直接検出による核磁気共鳴（NMR）測定手法を開発した。化学シフト分散のよい ^{15}N - ^{13}C 相関スペクトルを取得し、残基内および残基間の3次元 ^{13}C - ^{15}N - ^{13}C スペクトルを測定するパルス系列を作成することでNMR信号の連鎖帰属が可能となった。くわえて、パルス系列の改変により、アミド水素の化学シフトおよび溶媒との交換速度を取得できた。これらは、蛋白質の動的な構造変化の観測において役立つと期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生体内での機能上の役割が注目される蛋白質の天然変性領域は、動的に揺動するなかで機能制御を実現する。柔らかな構造を有する変性領域は蛋白質の結晶化を妨げるため、従来の結晶構造解析の適用は困難である。一方で、蛋白質分子を原子分解能で観測する核磁気共鳴（NMR）は、溶液中での構造動態解析が可能であり、相互作用解析や複雑環境での解析において威力を発揮する。本研究で開発した新規NMR測定法を適用することで、蛋白質の天然変性領域が駆動する液液相分離（LLPS）の分子機構の解明やLLPSを標的とした創薬研究への展開が期待される。

研究成果の概要（英文）：This study was focused on structural dynamics of protein intrinsically disordered regions that drive phase transition. To this end, nuclear magnetic resonance (NMR) experiments were presented that utilize carbonyl ^{13}C direct-detection. A ^{13}C -detect 2D (HACA)CON spectrum provided well-dispersed resonances, and these resonances circumvented solvent exchange broadening. Sequential resonance assignments were made through the ^{13}C -detect 3D (HA)CACON and (HA)CANCO experiments. A method relying on the detection of the anti-phase operator $2N_x\text{Hz}$ decorrelation was used to obtain the chemical shifts and solvent exchange rates of individual amide protons in the protein. The approach demonstrated in this study may be widely used to analyze structural dynamics of intrinsically disordered proteins.

研究分野：生物物理学

キーワード：天然変性蛋白質 核磁気共鳴 カルボニル ^{13}C

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年の研究から、蛋白質の構造において安定な立体構造を保持しない天然変性領域の構造物性および機能上の役割に注目が集まっている。蛋白質の天然変性領域は無秩序ではなく、揺動するなかで優先的にとる構造が存在し、動的な変化により蛋白質の機能制御を実現している。その一方で、天然変性領域はポリペプチド鎖やアミノ酸側鎖を溶媒に露出するため、分子間での相互作用の形成を促進し、神経変性疾患などの重篤な疾病発症の原因となる蛋白質凝集を引き起こす。

2. 研究の目的

天然変性領域がもたらす相転移ダイナミクスの構造基盤の解明を目指した。本研究の目的を達成するための準備段階として、核磁気共鳴 (NMR) 測定手法を改良した。

3. 研究の方法

15N -HSQCなどのアミド水素検出に基づくNMR測定法では、変性した蛋白質は測定核 (アミド水素) 周辺の環境の磁気的多様性に乏しいため、化学シフトの分散が狭く、化学シフト縮重が解析の妨げとなる。くわえて天然変性蛋白質ではアミド水素と溶媒との交換からの保護に乏しく、速い化学交換によりNMR信号が広幅化して信号検出が困難となる。これらの問題を解決するために、極低温プローブを装着した高感度測定が可能な溶液NMR装置を用いて、カルボニル 13C 核の直接検出による測定法を開発した。

4. 研究成果

2次元 (HACA) CON測定により、化学シフト分散のよい 15N 13C 相関スペクトルを取得できた。溶媒との速い化学交換により 15N -HSQCでは検出できなかったアミノ酸残基についても、(HACA) CON測定ではNMR信号が検出された。さらには、アミド水素原子がないため 15N -HSQCではNMR信号が得られないプロリン残基についても、(HACA) CON測定によりNMR信号を得ることが可能となった。NMR信号の帰属は、残基内および残基間の3次元 13C 15N 13C スペクトルを測定するパルス系列を作成することで連鎖帰属した。

蛋白質のダイナミクスについての情報を得るため、主鎖アミド 15N の横緩和速度を取得するためのパルス系列を作成した。(HACA) CON測定の 15N 化学シフト展開前にCPMGパルスを挿入することにより、溶媒との化学交換により 15N -HSQCでは信号検出できないアミノ酸残基やアミド水素を欠くプロリン残基を含めて 15N の横緩和速度を取得することができた。

(HACA) CON測定における 15N の横磁化展開中の 1H デカップルパルスの化学シフトオフセットがNMR信号強度に与える影響から、アミド水素の化学シフトおよび溶媒との交換速度を取得できた (Fig 1)。

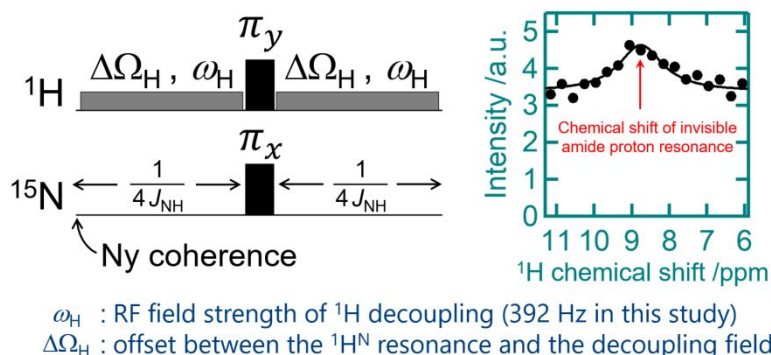


Fig 1. (Left) Pulse sequence building block. (Right) Intensity profile of a resonance from 18 spectra recorded as a function of the 1H decoupling field.

上述のNMR測定手法の開発には成功したが、試料調製の問題により蛋白質凝集を引き起こす相互作用の分子機序の解明には至らなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yuichi YOSHIMURA & Frans A. A. MULDER	4. 巻 74
2. 論文標題 Sensitive and simplified: a combinatorial acquisition of five distinct 2D constant-time 13C-1H NMR protein correlation spectra	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Biomolecular NMR	6. 最初と最後の頁 695 ~ 706
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10858-020-00341-x	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 Yuichi YOSHIMURA, Masatomo So, Yohei MIYANOIRI	4. 巻 1869
2. 論文標題 Carbonyl 13C-detect solution-state protein NMR experiments to circumvent amide-solvent exchange broadening: Application to 2-microglobulin	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics	6. 最初と最後の頁 140593 ~ 140593
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbapap.2020.140593	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3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 吉村優一
2. 発表標題 A combinatorial acquisition of distinct protein NMR spectra based on multiplicity-dependent resonance editing
3. 学会等名 第21回日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yuichi YOSHIMURA
2. 発表標題 Carbonyl 13C-detect solution-state protein NMR experiments to circumvent amide-solvent exchange broadening: Application to 2-microglobulin
3. 学会等名 ISMAR-APNMR 2021 (22nd International Society of Magnetic Resonance (ISMAR) Conference, held jointly with the 9th Asia-Pacific NMR (APNMR) Symposium) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 吉岡賢一, 長谷颯土, 政喜優, 青木大将, 吉村優一, 梅原崇史, 木村英昭, 楯真一
2. 発表標題 プロテイン・ドロップレットのNMR 解析
3. 学会等名 第58回NMR討論会
4. 発表年 2019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