

令和 5 年 6 月 23 日現在

機関番号：82626
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2020～2022
課題番号：20K05740
研究課題名（和文）ペルオキシレドキシンの新規な超分子複合体

研究課題名（英文）Supramolecular complex of peroxiredoxin

研究代表者

中村 努（Nakamura, Tsutomu）

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・研究グループ付

研究者番号：10357668

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）：ペルオキシレドキシンは広く生物界に存在するチオールペルオキシダーゼであり、抗酸化機能、酸化ストレスシグナル調節、シャペロン機能など、構造や酸化還元状態に依存した複数の機能を有する。立体構造（三次構造）は相同性があるが、分子会合（四次構造）レベルでは多様性がある。本研究ではペルオキシレドキシンの多様な四次構造の形成原理の解明、ならびに四次構造制御技術の開拓を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

相同性の高い三次構造から異なる四次構造を形成可能な事実は、アミノ酸残基の配置に基づく繊細な分子構造の制御により多様かつ機能的な集合体が得られることを示している。従って、集合の形成メカニズム解明と、その制御法を合わせることで、未知の集合様式の形成や集合・解離に対する応答性の付与に繋がり、制御可能な機能性バイオマテリアルの創製が可能となる。

研究成果の概要（英文）：Peroxiredoxin, belonging to a thiol peroxidase group, is widespread in all biological kingdoms. It has many functions such as anti-oxidation, regulation of oxidation stress, chaperoning, depending on higher-order structures and oxidation states. While peroxiredoxins are structurally homologous, their quaternary structures are variant. In this study, we explored the mechanism which determines various quaternary structures of peroxiredoxins.

研究分野：タンパク質科学

キーワード：Peroxiredoxin 四次構造 分子会合

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ペルオキシレドキシシン (Prx) は 広く生物界に存在するチオールペルオキシダーゼであり、抗酸化機能、酸化ストレスシグナル調節、シャペロン機能など複数の機能を有する。立体構造 (三次構造) は相同性があるが、分子会合 (四次構造) レベルでは多様性がある。つまり、Prx はホモ二量体を基本構造とし、溶液中で二量体として存在するもの、リング状に会合する十二量体、十量体、八量体などがある (図 1)。さらに単量体の Prx も知られている。四次構造変化が機能のスイッチングと関連すること、例えばヒト由来 HsPrx3 ではシャペロン機能を持つときにリングが集積することが示唆されている。このように、Prx の構造機能相関の解明は、タンパク質の新規機能発現や機能スイッチングに繋がると期待できる。

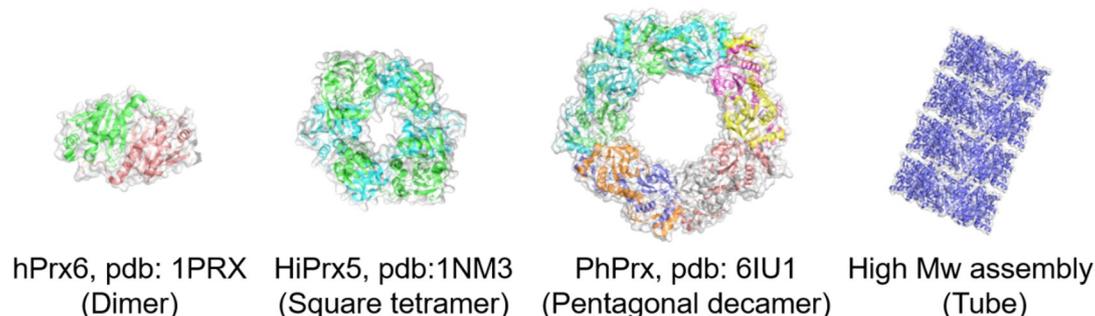


図 1 . Prx の多様な四次構造

2. 研究の目的

本研究は、Prx の超分子複合体について、その生成メカニズム・構造・機能を明らかにしようとするものである。そのために、新規 Prx の結晶構造解析、ならびに化学修飾法を用いた Prx 集合体の構造改変に取り組んだ。申請者は *Arabidopsis thaliana* 由来 Prx (AtPrx) が独自の集合形態をとり、脱塩処理等を通じて分子サイズが変換されることを発見し、新規な集合形態をとる Prx としてその高次構造の解明を目指した。また、*Thermococcus kodakaraensis* 由来 Prx (TkPrx) への化学修飾により、その集合形態を改変し、新規な集合構造の作成を目指した。

3. 研究の方法

AtPrx の結晶構造解析のために、AtPrx を大腸菌発現し、His-tag を利用して精製した。TEV プロテアーゼにより His-tag 配列を切断し、精製 AtPrx を得た。タンパク質結晶のスクリーニングキット (Crystal Screen 1 and 2, Hampton Research) を用いて結晶化条件のスクリーニングを行い、結晶化した。得られた結晶を SPring-8 (BL44XU ビームライン) にてエックス線照射し、回折データを測定した。回折データから電子密度データを作成し、分子置換法により位相付けした。

TkPrx は六角形環状十二量体を形成する。このタンパク質において、四次構造の構成単位である二量体の界面に存在する芳香族アミノ酸残基に変異導入すると、疎水性相互作用が破壊され、環状四次構造が解離して二量体となることを見出している。芳香環を除去する変異をかけることで集合体が解離したことから、逆に芳香環を付加することで解離した二量体を集合して四次構造の再構築が可能になると考えた。そこで、TkPrx にシステインを導入した二量体変異体 (TkPrxF42C、TkPrxF76C) をデザインし、化学修飾による芳香環の付加により四次構造の再構築を試みた。変異体に対して 2-(bromoacetyl)naphthalene (Naph-Br) を添加し化学修飾を行った。化学修飾した変異体の構造解析のために、エックス線結晶構造解析法とクライオ電子顕微鏡法 (Cryo-EM) を利用した。

4. 研究成果

AtPrx の結晶構造から、AtPrx がらせん状に集積し、筒状の集合形態をとる可能性が示唆された。ここで問題なのは、結晶構造解析でわかるタンパク質複合体が結晶化によるアーティファクトと区別がつかないという点であり、結晶構造解析は補完的なデータを与えるということを留意しなければならない。AtPrx の溶液を脱塩処理すると、塩存在下では二量体だった AtPrx が集積を開始し、大幅な分子サイズの増加が見られた。電顕では、レプリカ法によりチューブ状の集

積体を観察した。構造を明らかにするためにはクライオ電顕の利用が必須と考えられるが、そのために均一性の高い超分子複合体を得る必要がある。

TkPrxF42C、TkPrxF76C 変異体がすべて二量体として存在することをサイズ排除クロマトグラフィー (SEC) により確認した (図 2 a)。TkPrxF42C、TkPrxF76C 変異体に個別に Naph-Br を添加して調製した Naph@F42C と Naph@F76C は、野生型 TkPrx が形成する環状十二量体には変換されなかった。従って単独の TkPrxF42C、TkPrxF76C 変異体ではナフタレン環が二量体界面で立体障害を生じ、元の環状構造を形成できないと予想された。そこで TkPrxF42C、TkPrxF76C 変異体を 1 : 1 で混合し、Naph-Br を添加すると、各変異体が交互に並び、立体障害の影響を避けられると予想した。実際に、混合物にナフタレン環を付加した Naph@TkPrxMIX は SEC で環状十二量体に相当する分子サイズを示した (図 2 b)。Cryo-EM による構造解析により、Naph@TkPrxMIX がそれぞれの変異体を交互に配列した特殊な構造を有することが示された (図 2 c)。ナフタレン環の配向が異なる 2 種類の界面 (Type-X、Type-Y) を持ち、そのうち 1 種類 (Type-Y) は天然 Prx では見られない人工的な相互作用の様式を示した。天然 TkPrx の対称性の高い集合構造と異なり、Naph@TkPrxMIX は非対称の歪んだ六角形構造を有していた。B-factor マップから、特に Type-Y 界面において、構造の揺らぎが大きく、集合の最終過程で強引に形成されていることが示唆された。以上のように、化学修飾により導入した人工分子がアミノ酸残基に替わって相互作用を形成し、半人工のタンパク質集合体を形成することが示された。人工分子を集合体の構成要素とすることで、集合・解離に対する応答性の付与や未知の集合様式の形成に繋がると期待できる。

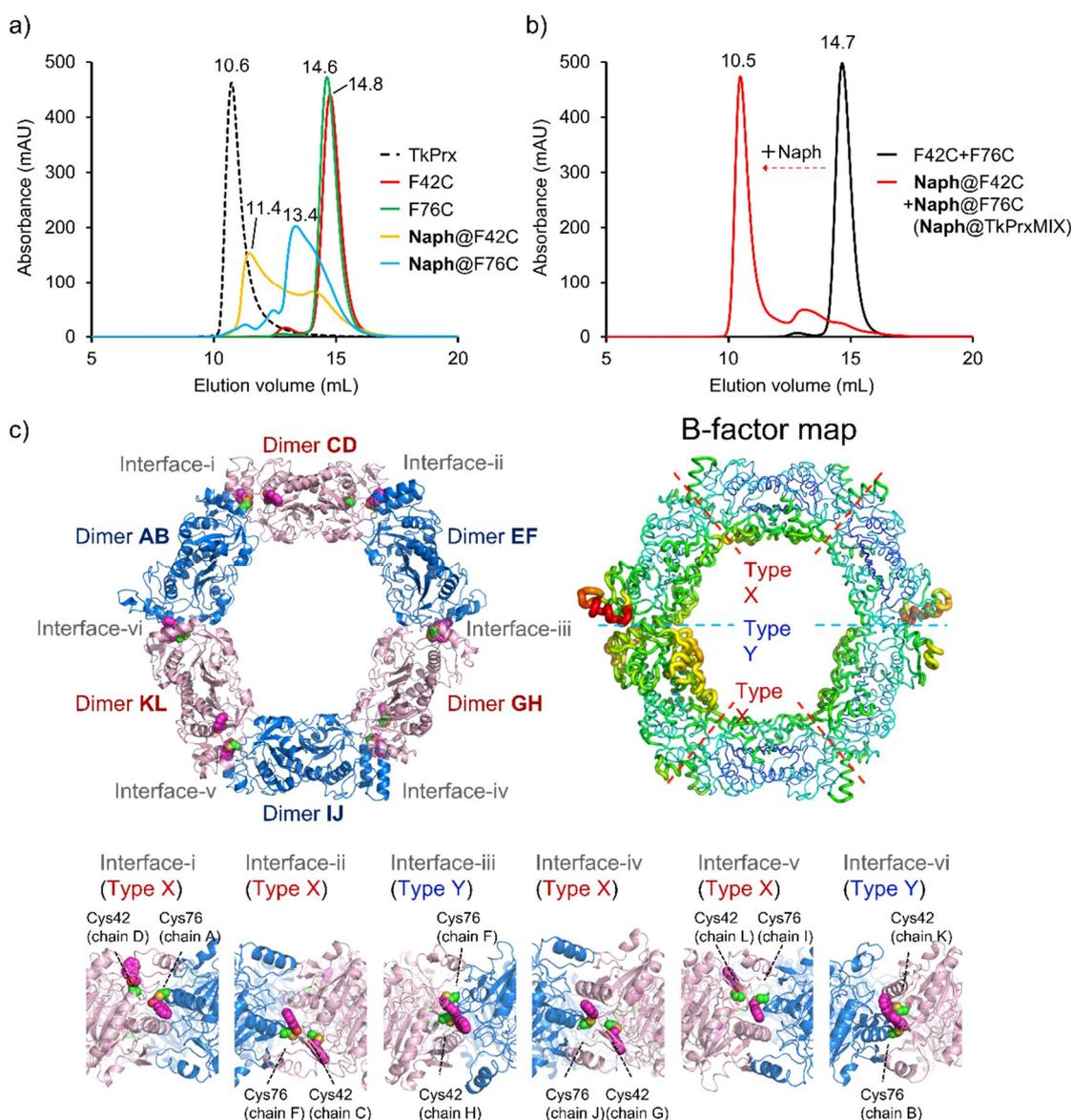


図 2 . a) TkPrx, TkPrxF42C, TkPrxF76C, Naph@F42C, Naph@F76C の SEC の結果。b) Naph@TkPrxMIX と、TkPrxF42C+TkPrxF76C の混合物の SEC の結果。c) Naph@TkPrxMIX の Cryo-EM 構造。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6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 Himiyama Tomoki, Tsuchiya Yuko, Yonezawa Yasushige, Nakamura Tsutomu	4. 巻 32
2. 論文標題 Rebuilding Ring-Type Assembly of Peroxiredoxin by Chemical Modification	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Bioconjugate Chemistry	6. 最初と最後の頁 153 ~ 160
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.bioconjchem.0c00587	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 Himiyama Tomoki, Nakamura Tsutomu	4. 巻 29
2. 論文標題 Disassembly of the ring type decameric structure of peroxiredoxin from Aeropyrum pernix K1 by amino acid mutation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Protein Science	6. 最初と最後の頁 1138 ~ 1147
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/pro.3837	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7件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 水見山 幹基、中村 努
2. 発表標題 環状タンパク質多量体の構造制御
3. 学会等名 第19回 産総研・産技連LS-BT合同研究発表会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 水見山 幹基、中村 努
2. 発表標題 Rebuilding and altering ring-type assembly of peroxiredoxin by chemical modification
3. 学会等名 第21回日本蛋白質科学年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 水見山 幹基、中村 努
2. 発表標題 Disassembly and Reassembly of Ring-type Structure of Peroxiredoxin by Manipulating Hydrophobic Interaction
3. 学会等名 第20回日本蛋白質科学会年会
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	水見山 幹基 (Himiyama Tomoki) (90828310)	国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・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
---------	---------