

令和 6 年 6 月 9 日現在

機関番号：82110

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K06527

研究課題名(和文) 配列が著しく異なる2つの天然変性タンパク質に共通する構造と機能の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the structure and function common to two intrinsically disordered proteins with significantly different sequences.

研究代表者

小田 隆(Oda, Takashi)

国立研究開発法人日本原子力研究開発機構・原子力科学研究部門 J-PARCセンター・研究職

研究者番号：00573164

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)：本研究では、相同だがアミノ酸配列が著しく異なる2つの天然変性タンパク質(IDP)について、共通の機能を持つと予測し、予測の証明と、機能を発揮するための構造的特徴の解明を目指した。我々は2つの天然変性タンパク質を対象に研究を行い、どちらもDNAとDNAクランプの両者に結合し、DNAクランプのスライドを抑制するという共通の機能を持つことが示すことができた。当初、この機能を発揮するために、2つの天然変性タンパク質に共通の二次構造モチーフ(ヘリックス)が保存されていると予測したが、本研究から、二次構造モチーフよりもむしろ構造の柔軟性によるDNAとの柔軟な相互作用が重要であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

一般に、タンパク質の機能に重要な領域はアミノ酸配列や立体構造が保存されていると考えられる。しかし、天然変性タンパク質(または天然変性領域)は生物種間でアミノ酸配列保存性が低く、特定の立体構造も取らないため、上記の概念に反する。本研究では、そのような天然変性タンパク質であっても共通の機能を持ちうることを発見した。本研究の成果は他のタンパク質においても従来「重要でない」として見過ごされてきた領域に新たな機能を発見するきっかけとなり、天然変性領域の構造・機能の理解に貢献すると期待する。

研究成果の概要(英文)：We predicted that two naturally denatured proteins (IDPs) that are homologous but have significantly different amino acid sequences share a common function. In this study, we aimed to prove this prediction and elucidate the structural features that enable it to perform its functions. We conducted research on such two IDPs. As a result, we showed that both IDPs bind to both DNA and DNA clamp and have a common function of suppressing the sliding of DNA clamp. Initially, we predicted that a common secondary structural motif (α -helix) would be conserved in the two IDPs to exert this function. However, our results suggest that flexible interactions with DNA due to structural flexibility are more important than secondary structural motifs.

研究分野：構造生物学

キーワード：天然変性タンパク質 X線小角散乱 古細菌

1. 研究開始当初の背景

折り畳まれた一定の立体構造を取らない天然変性タンパク質(または天然変性領域)は、細胞内シグナル伝達や遺伝情報の維持・発現など様々な生命現象で機能し、生命現象の理解に欠かせない存在である。そのため柔軟な構造と機能の関係について近年盛んに研究されるようになった(Oldfield, JC and Dunker, KA. Annu Rev Biochem. 2014, Wright, PE et al. Nat Rev Mol Cell Biol. 2015 他)。天然変性タンパク質のもう一つの大きな特徴は種間のアミノ酸配列保存性が低いことである。しかし、保存された配列や立体構造を持たない天然変性タンパク質がなぜ生物学的に重要な機能を担っているかについては注意が払われておらず、我々はこのことが大きな問題であると考へた。それは、構造生物学では多くの場合、タンパク質の配列アライメントや、保存された立体構造からそのタンパク質の機能や機能部位を推測するが、天然変性タンパク質ではこの従来

の常識に従った予測ができないからである。我々は好熱性古細菌 *Thermococcus kodakaraensis* 由来(以下 Tko と略記) Hef タンパク質の天然変性領域(IDR)を研究する過程で、IDR が近縁の古細菌(例えば *Pyrococcus furiosus*, 以下 Pfu と略記)でほとんど保存されていないにも関わらず(図 1)共通の機能を持つことを示唆するデータを得た。Hef は DNA の二本鎖間が共有結合で架橋された損傷の修復に必須のタンパク質で、2つの折り畳まれた構造ドメインの間を IDR がつないでいる。Hef は IDR で DNA クランプである PCNA と結合し(図 1)、損傷部位で複製が停止した際に機能する。DNA 修復・複製に関わるタンパク質は天然変性領域を持つものが多いが、それらの

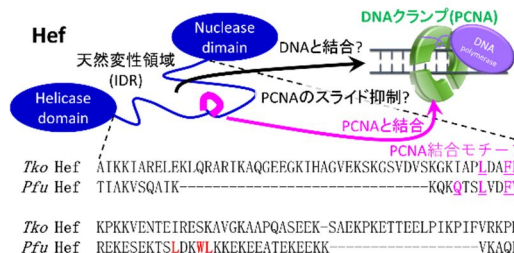


図1. Hef天然変性領域(IDR)によるPCNAのスライド抑制と生物種によるアミノ酸配列の違い。Hefの2つの折り畳まれたドメインを楕円で、天然変性領域を線で模式的に表す。DNAクランプ(PCNA)は3つの分子がリング型に会合したタンパク質で、DNAポリメラーゼを鑄型DNAにつなぎ留めてDNA上を滑る。Hef IDRはPCNA結合モチーフ(PIP-box: ピンク下線)を除き配列保存性は低い。本研究で発見したPfuHef IDRの2つ目のPIP-boxは赤字で示す。

天然変性領域は種間で配列保存性が著しく低いため、積極的な機能は議論されず、機能ドメインをつなぐリンカーと考えられてきた。そのため、Hef の IDR も当初、そのようなリンカーであると想像された。しかし、我々の先行研究から、TkoHef IDR は PCNA のスライドを抑制し損傷部位へとどめる機能が示唆された。興味深いことに TkoHef の IDR は 100 残基あるのに対し、PfuHef では 50 残基ほどしかなく、配列も大きく異なる(図 1)。しかし、我々は Pfu Hef の IDR も PCNA のスライド抑制能を持つことを示唆するデータを得ている。そこで、我々は、配列も長さも大きく異なる 2 つの天然変性領域が共通の機能を発揮できるのかを解明するために、本研究を行った。Hef に限らず一般に天然変性タンパク質は配列の進化速度が非常に速いことを考えると、このことは天然変性タンパク質全般に当てはまる大きな問題と考へられる。

2. 研究の目的

本研究では配列も長さも大きく異なる Tko、Pfu の Hef 天然変性領域が、共通の機能を発揮する分子機構を解明することを目的とした。我々は先行研究から TkoHef IDR が PCNA に結合するとともに DNA にも結合し、PCNA のスライドを抑制するモデルを提唱している(図 1)。Pfu では Tko と比較して天然変性領域が著しく短いため、果たして同じ構造や機能を持ち得るのかは全く未知である。しかし、一見、配列保存性が低く、ただのランダムコイルと思われる Tko と Pfu の Hef 天然変性領域には、共通の構造的特徴があることで同様の機能を発揮できると推測し、これを検証した。本研究でそのような領域にも保存された機能・構造があることが示されれば、他のタンパク質においても今まで見過ごされていた領域に新たな機能を発見するきっかけになり、タンパク質研究に新しい視点をもたらすと期待される。

3. 研究の方法

本研究では以下の手法で Hef 天然変性領域の機能評価、構造解析を行い、Tko、Pfu 両者で比較することで DNA の認識と PCNA のスライド抑制に必要な構造的特徴の解明を試みた。

- (1) Hef IDR、PCNA、DNA の相互作用解析
 - : 生化学実験(Electrophoretic mobility shift assay : EMSA)及び、表面プラズモン共鳴解析、等温滴定型カロリメトリー(ITC)により、Hef IDR、PCNA、DNA 三者間の相互作用を解析し、変異導入により IDR と DNA の相互作用部位の特定を行った。
- (2) X 線小角散乱(SAXS)、NMR、分子動力学計算(MD)による Hef IDR の構造解析
 - : Hef IDR、PCNA、DNA 三者複合体の SAXS データを取得し、SAXS データに基づき全体構造をアンサンブルとしてモデリングした。SAXS は低分解能であるため、IDR のより詳細な構造を解析するために、別途 NMR と分子動力学計算(MD)を行った。これらにより天然変性領域の全体構造と、局所構造を解析し、DNA 認識に重要な構造的特徴を解明の解明を

目指した。

- (3) 高速 AFM による PCNA のスライド抑制効果の確認
：基板上に弱く固定した長鎖 DNA に PCNA を結合させ、DNA 鎖上での PCNA のスライドの様子を観察した。PCNA は DNA 鎖上を一次元のブラウン運動によりスライドするため、連続した高速 AFM 画像から拡散係数を算出し、スライド速度を評価した。

4. 研究成果

(1) Hef IDR、PCNA、DNA の相互作用解析

Hef IDR には PCNA 結合モチーフとしてよく知られる PIP-box が予測されている(図 1)。ITC 解析の結果から、PIP-box が PCNA と結合することを確認した。PfuHef IDR では当初予測していなかった 2 つ目の PIP-box が同定されたが(図 1)、変異体を用いた EMSA 解析の結果、PCNA との相互作用は一つ目の PIP-box がメインであることが分かった。

図 2 は Tko 及び Pfu の Hef IDR、PCNA、DNA の相互作用を生化学実験(EMSA)で解析した結果である。Tko、Pfu どちらにおいても、Hef IDR は PCNA、DNA と安定な三者複合体を形成することが示された。表面プラズモン共鳴解析においても同様の結果が得られた。IDR の変異体解析の結果、Tko では N 末端 20 アミノ酸の欠失変異体、Pfu では N 末端 10 アミノ酸の欠失変異体で複合体形成能が低下することが示された。これらの結果から、Tko、Pfu どちらにおいても Hef IDR は PIP-box で PCNA と結合すると同時に、N 末端側で DNA と結合することで、PCNA のスライドを抑制するモデルが考えられた。

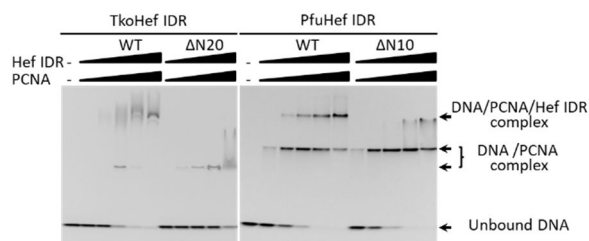


図2. Tko及びPfuHef IDR、PCNA、DNAの相互作用解析(EMSA)

(2) X線小角散乱(SAXS)、NMR、分子動力学計算(MD)による Hef IDR の構造解析

図 3 は TkoHef IDR と PCNA、DNA の 3 者複合体を SAXS 解析し、アンサンブルとして決定した構造である。IDR は大きな構造揺らぎを持つが、SAXS ではアンサンブル構造とすることで、全体の大まかな構造を解析できた。存在比率の最も高い構造(Model 3)では IDR の N 末端が DNA に接近しており、N 末端が DNA 結合に重要であるという生化学実験結果とも一致する結果が得られた。PfuHef IDR についても Tko と同様に PCNA、DNA との 3 者複合体の SAXS 解析を行い、同様に IDR の N 末端側が DNA に結合することを示す構造が得られた。NMR 解析と MD 計算は分子サイズの観点から複合体ではなく、TkoHef IDR 単独で行った。NMR 測定で得られたケミカルシフト値を

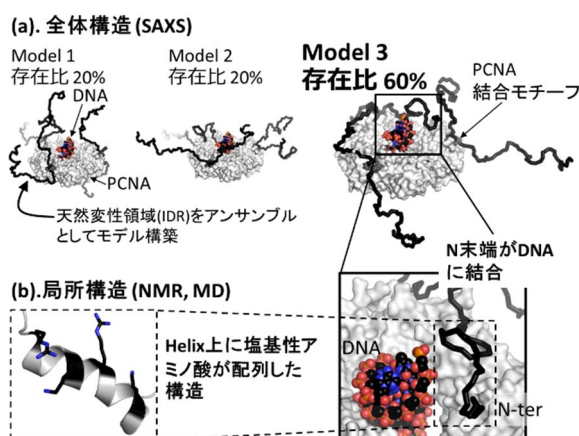


図3. SAXS, NMR, MD統合解析によるTkoHef IDRの構造解析

再現するよう MD 計算を行い、IDR のより詳細な構造を解析した。結果、得られたモデルでは TkoHef IDR の N 末端側に α -helix が形成されており、 α -helix 上に複数の塩基性残基が配置した特徴的な構造であった(図 3b)。この構造が DNA との結合(つまり PCNA のスライド抑制)に重要な構造的特徴であり、Tko と Pfu の両者に保存されていると予測した。そこで、両者について(1)塩基性アミノ酸を置換した変異体と、(2)塩基性アミノ酸を残し、 α -helix を破壊した変異体(プロリン、グリシン置換)について生化学的解析を行った。結果、(1)については、予想通り Tko、Pfu どちらにおいても DNA との結合能が失われ、塩基性アミノ酸の重要性が示された。一方、(2)については予想に反し、 α -helix を破壊しても DNA との結合能は失われないことが分かった。また、(1)の塩基性アミノ酸については 1 アミノ酸の置換では、効果が見られず、複数のアミノ酸の置換により DNA 結合能が失われた。これらの結果を総合すると、 α -helix という固い構造で DNA と結合するのではなく、IDR 上の塩基性アミノ酸が、DNA と柔軟に相互作用することが重要であると考えられた。

(3) 高速 AFM による PCNA のスライド抑制効果の確認

Hef IDR が PCNA の DNA 鎖上でのスライドを抑制することをより、定量的に示すために、高速 AFM を用いて PCNA のスライドの様子を観察した。雲母基板上に脂質膜を作製し、その脂質膜上に弱く固定化した長鎖 DNA 上に PCNA を結合させ、スライドの様子を経時観察した(図 4)。多数の PCNA 分子のスライドを長時間観察できる条件を確立することが困難であった。従って、十分な数の観察はできなかったが、複数の PCNA 分子の軌跡から PCNA の DNA 鎖上での一次元の拡散係数(D)を算出した。その結果、TkoHef IDR 存在下では PCNA 単独より拡散係数が小さ

く、スライド抑制効果が認められた。さらに、N 末端 20 残基欠失変異体では、観察数が十分ではないものの、野生型と比較して、拡散係数が大きく、スライド抑制効果が失われたことが示唆された。これらの結果は、生化学的解析及び構造解析の結果と一致する。PfuHef IDR の高速 AFM 観察ではやはり十分な数の観察が困難であったため、拡散係数の算出・比較には至らなかったが、Tko と同様の生化学的プロパティを示したことから、同様のスライド抑制効果があると考えられる。

以上の結果から、本研究では、Tko、Pfu の 2 つの Hef IDR について、IDR が PIP-box で PCNA と結合すると同時に N 末端側で DNA とも結合し、PCNA のスライドを抑制するという共通の機能とメカニズムを発見した。IDR と DNA の結合については、N 末端側の

-helix 上に配列した塩基性アミノ酸という二次構造モチーフの重要性を予測した。しかし、本研究の進展に伴い、そのような二次構造モチーフよりもむしろ、構造の柔軟性による DNA との柔軟な相互作用が重要であることが示唆された。

また、天然変性タンパク質の構造研究は大きな構造揺らぎや、複合体での分子サイズの大きさなどのため、未だに一般化された手法がないのが現状である。本研究では、低分解能であるが全体構造をアンサンブルとして解析できる SAXS、局所構造を解析できるが、揺らぎが大きくかつ分子サイズの大きい複合体の解析が難しい NMR、局所構造から全体構造までを解析できるが、実験データとの併用が必要な MD、の 3 つを統合的に利用した。これにより、天然変性タンパク質の局所構造から複合体の全体構造までを解析・議論することができた。本研究で用いた統合的手法は、他の天然変性タンパク質の構造研究にも応用できると期待する。

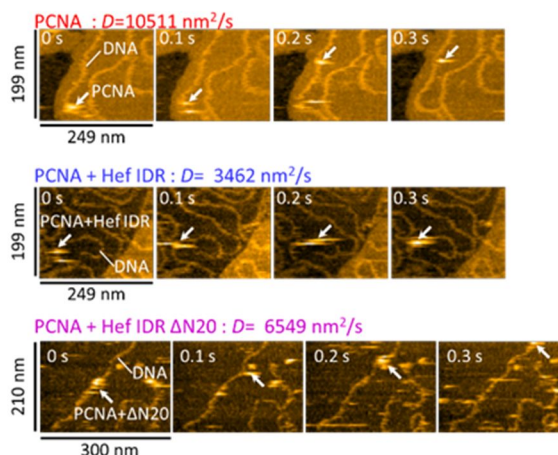


図4. PCNAのスライドの観察. TkoHefとPCNAを用いた観察で得られた連続画像の一例と複数のPCNAの観察結果から算出された拡散係数(D)を示す。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Ohtomo Hideaki, Yamane Tsutomu, Oda Takashi, Kodera Noriyuki, Kurita Jun-ichi, Tsunaka Yasuo, Amyot Romain, Ikeguchi Mitsunori, Nishimura Yoshifumi	4. 巻 435
2. 論文標題 Dynamic Solution Structures of Whole Human NAP1 Dimer Bound to One and Two Histone H2A-H2B Heterodimers Obtained by Integrative Methods	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 168189 ~ 168189
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jmb.2023.168189	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 Nakasone Yusuke, Murakami Hiroto, Tokonami Shunrou, Oda Takashi, Terazima Masahide	4. 巻 299
2. 論文標題 Time-resolved study on signaling pathway of photoactivated adenylyate cyclase and its nonlinear optical response	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 105285 ~ 105285
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbc.2023.105285	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 Inoue Rintaro, Oroguchi Tomotaka, Oda Takashi, Farago Bela, Martel Anne, Porcar Lionel, Sato Mamoru, Sugiyama Masaaki	4. 巻 5
2. 論文標題 Internal dynamics of multidomain protein as revealed by an optimized neutron spin echo measurement and all-atom molecular dynamics simulation	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Physical Review Research	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1103/PhysRevResearch.5.043154	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 該当する
1. 著者名 Taiki Tominaga, Hiroshi Nakagawa, Masae Sahara, Takashi Oda, Rintaro Inoue and Masaaki Sugiyama	4. 巻 12
2. 論文標題 Data Collection for Dilute Protein Solutions via a Neutron Backscattering Spectrometer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Life	6. 最初と最後の頁 675
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/life12050675	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 Nanaura Hitoki, Kawamukai Honoka, Fujiwara Ayano, Uehara Takeru, ...Oda Takashi, Kodera Noriyuki, Toma-Fukai Sachiko, Sato Mamoru, Taguchi Hideki, ...Mori Eiichiro	4. 巻 12
2. 論文標題 C9orf72-derived arginine-rich poly-dipeptides impede phase modifiers	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-021-25560-0	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 Kori Satomi, Jimenji Tomohiro, Ekimoto Toru, Sato Miwa, Kusano Fumie, Oda Takashi, Unoki Motoko, Ikeguchi Mitsunori, Arita Kyohei	4. 巻 432
2. 論文標題 Serine 298 Phosphorylation in Linker 2 of UHRF1 Regulates Ligand-Binding Property of Its Tandem Tudor Domain	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 4061 ~ 4075
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jmb.2020.05.006	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 Kodera Noriyuki, Noshiro Daisuke, Dora Sujit K., Mori Tetsuya, Habchi Johnny, Blocquel David, Gruet Antoine, Dosnon Marion, Salladini Edoardo, Bignon Christophe, Fujioka Yuko, Oda Takashi, Noda Nobuo N., Sato Mamoru, Lotti Marina, Mizuguchi Mineyuki, Longhi Sonia, Ando Toshio	4. 巻 16
2. 論文標題 Structural and dynamics analysis of intrinsically disordered proteins by high-speed atomic force microscopy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Nanotechnology	6. 最初と最後の頁 181 ~ 189
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41565-020-00798-9	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 Inoue Rintaro, Oda Takashi, Nakagawa Hiroshi, Tominaga Taiki, Saio Tomohide, Kawakita Yukinobu, Shimizu Masahiro, Okuda Aya, Morishima Ken, Sato Nobuhiro, Urade Reiko, Sato Mamoru, Sugiyama Masaaki	4. 巻 10
2. 論文標題 Dynamics of proteins with different molecular structures under solution condition	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 21678
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-78311-4	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8件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Takashi Oda, Rintaro Inoue, Ken Morishima, Rika Oi, Yoshizumi Ishino, Mamoru Sato, Masaaki Sugiyama.
2. 発表標題 Analysis of flexible structure of multi-domain protein by SANS using segment deuteration technique.
3. 学会等名 Twenty-Sixth Congress and General Assembly of the International Union of Crystallography. (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 小田 隆, 井上 倫太郎, 守島 健, 會澤 直樹, 大井 里香, 石野 良純, 奥 隆之, 佐藤 衛, 杉山 正明.
2. 発表標題 区分重水素化タンパク質を用いた中性子小角散乱解析
3. 学会等名 日本中性子科学会第23回年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 小田 隆, 井上 倫太郎, 守島 健, 會澤 直樹, 富永 大輝, 中川 洋 ¹ , 大井 里香, 石野 園子, 石野 良純, 奥 隆之, 佐藤 衛, 杉山 正明
2. 発表標題 X線/中性子散乱によるマルチドメインタンパク質Hefの構造/ダイナミクス研究
3. 学会等名 2023年度量子ビームサイエンスフェスタ, 第15回 MLFシンポジウム, 第41回PFシンポジウム
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 小田 隆, 井上 倫太郎, 富永 大輝, 中川 洋, 守島 健, 岩瀬 裕希, 石野 良純, 佐藤 衛, 杉山 正明
2. 発表標題 好熱性古細菌由来天然変性タンパク質の生理的温度における動的構造とダイナミクス
3. 学会等名 日本中性子科学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 井上 倫太郎、小田 隆、中川 洋、富永 大輝、川北 至信、佐藤 衛、杉山 正明
2. 発表標題 Internal Dynamics of Intrinsically Disordered Protein as Studied by Neutron Scattering
3. 学会等名 日本生物物理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小田隆
2. 発表標題 Integrated approach using X-ray/Neutron scattering and MD simulation for understanding dynamic structure and function of IDP
3. 学会等名 第59回 日本生物物理学会年会(BSJ2021) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小田隆, 井上倫太郎, 中川洋, 富永大輝, 大井里香, 石野良純, 杉山正明, 佐藤衛
2. 発表標題 中性子散乱実験に向けた区分重水素化タンパク質の調製
3. 学会等名 第21回日本中性子科学会年会(JSNS2021)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小田隆, 大井里香, 古寺哲幸, 安藤敏夫, 小沼剛, 菅瀬謙治, 荳口友隆, 井上倫太郎, 杉山正明, 石野園子, 石野良純, 佐藤衛
2. 発表標題 X線小角散乱と計算科学を用いた統合的解析による天然変性タンパク質の動的構造と機能の理解
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度京都大会(JSBBA2022) (招待講演)
4. 発表年 2022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
研究協力者	小沼 剛 (Konuma Tsuyoshi)		
研究協力者	古寺 哲幸 (Kodera Noriyuki)		
研究協力者	荳口 友隆 (Oroguchi Tomotaka)		

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