

令和 6 年 6 月 5 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K06578

研究課題名（和文）リガンド結合を伴う蛋白質フォールディングの反応駆動力の解析

研究課題名（英文）Elucidation of driving forces underlying protein folding coupled with ligand binding.

研究代表者

横 互介（Kosuke, Maki）

名古屋大学・理学研究科・准教授

研究者番号：30361570

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：溶媒条件を制御することにより、リガンド添加によって蛋白質のフォールディングを引き起こすことができることを示した。この手法をモデル蛋白質スタフィロコッカル・ヌクレアーゼ(SNase)に適用した。核磁気共鳴法を含む各種分光法、分子動力学シミュレーションおよびモデル計算によって、フォールディングに関わる分子種の構造・安定性を特徴づけた。リガンド濃度依存的に、Conformational selectionからInduced fittingへと主要な経路が移り変わっていった。さらに、反応推進駆動力の一つであるリガンドのふたつのリン酸基のフォールディング反応における役割を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

蛋白質が構造変化を伴い複合体を形成する際に、リガンド結合と構造変化が起こる順序を調べた。広い範囲にわたる実験・計算機シミュレーションによる結果を踏まえて、モデル計算に基づいて、リガンド濃度に依存して反応経路が変化していくことが明らかになった。蛋白質複合体形成は神経変性疾患などと深い関連があることから、本研究の結果は蛋白質科学のみならず医学にも貢献し得るものである。

研究成果の概要（英文）：By regulating solution conditions, we have shown that addition of a specific ligand, protein folding can be induced. We applied the method to the folding of a model protein, staphylococcal nuclease (SNase). A series of spectroscopic prods including NMR were used to follow the folding reaction. In addition to those methods, replica-permutation molecular dynamics simulation and a statistical mechanical model were used to characterize the structural properties and energetics of the relevant species. Furthermore, we exploited a chemically modified ligand to investigate roles of each phosphorylation groups of the ligand.

研究分野：生物物理学

キーワード：蛋白質 フォールディング 複合体 スタフィロコッカル・ヌクレアーゼ

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

ほとんどの生物学的過程は蛋白質の複合体形成・解離を必要とする。蛋白質複合体形成は、程度の差はあるもののそれぞれの構成蛋白質分子の構造変化を伴う。最も極端な例として、天然変性蛋白質(IDP)があげられる。IDPは複合体を形成してはじめて特異的な立体構造を獲得するので、IDPの構造・機能解析に際して、個々の構成蛋白質だけに着目しても限られた知見しか得られない。IDPに限らず、蛋白質・生体高分子の複合体構造やその形成機構の解明が待ち望まれている。このような系のうち最も典型的なもののひとつとしてリガンド結合を伴う蛋白質のフォールディングがある。本研究を開始する時点で、そのリガンド結合によるフォールディング反応速度論は、反応における構造形成とリガンド結合の順序に着目して 1. 構造形成のあとにリガンドが結合する conformational selection (CS)と 2. リガンドが結合してから構造を獲得する induced-fit (IF)によって定められた(図 1a)、並行な経路からなると捉えられていた(図 1b)。しかし、このような速度論的ふるまいを引き起こす反応の駆動力については不明のままであった。

リガンドがフォールディングを誘導する機構を駆動力に基づいて理解するためには、反応に関わる各分子種の安定化機構を、物理的相互作用と構造的特徴に基づいて探索する必要がある。相互作用の度合いを勘案すると、速度論のモデル(図 1b)を再構築する必要が生じる。すなわち、ほどけた状態(U/U-L)や遷移状態(TS / TS-L)においては、リガンド結合は弱く、従って反応過程は、リガンドと結合していない状態と結合した状態との間で速い平衡を保ちながら天然状態に至ると予想される(図 1c)。

### 2. 研究の目的

このような背景を鑑み、リガンド結合を伴うフォールディングについて、反応に関わる分子種や遷移状態の安定性と構造に基づいて、反応を駆動する物理的相互作用を明らかにすることを本研究の目的とした。特に、反応にかかる安定性の評価に際して、従来のように反応過程をCSもしくはIFに沿った経路(図 1a,b)に押し込めるのではなく、CS/IF経路を言わば反応の両極端とするエネルギー地形を用いて(図 1c)、実際に起こる過程を表現することを目指した。

本研究の目的を達成するために、149 アミノ酸残基からなるモデル蛋白質スタフィロコッカル・ヌクレアーゼ(SNase)(図 2a)を用いた。SNaseは、特異的なリガンドとして基質アナログ adenosine-3',5'-diphosphate (prAp)を持ち、prApとの結合によって天然状態が安定化する。物理的相互作用として、基質アナログ-SNase分子間の特異的な結合と非特異的な静電相互作用を取り入れる。構造については各種分光的手法を駆使して特徴付ける。

さらにリガンド結合・未結合状態間の速い平衡を取り入れ(図 1c)、CS/IFを反応経路の両極端とする反応の自由エネルギー地形を描く(図 2b)。自由エネルギー面上でほどけた状態から天然状態に至る最も安定な経路を見出し、実際の反応過程を捉える。本解析が図 2bの底面全体を俯瞰するのに対し、CS/IF統合モデル(図 1b)による解析はその四辺のみの解析に対応する。この意味で本解析は、構造変化を伴う複合体形成反応の表し方を質的に変える。

### 3. 研究の方法

(1) 基質アナログ prAp 添加により開始する SNase のフォールディング反応条件の最適化  
多くの蛋白質と同様 SNase もリガンド結合により天然状態が安定化する。リガンド非存在下ではアンフォールディングする尿素濃度においても SNase は天然のリガンド複合体を蓄積する。従って、このような尿素濃度においてアンフォールド状態にある SNase 溶液にリガンドを添加すると、リガンド結合による SNase のフォールディングを誘導することができる。本研究課題で

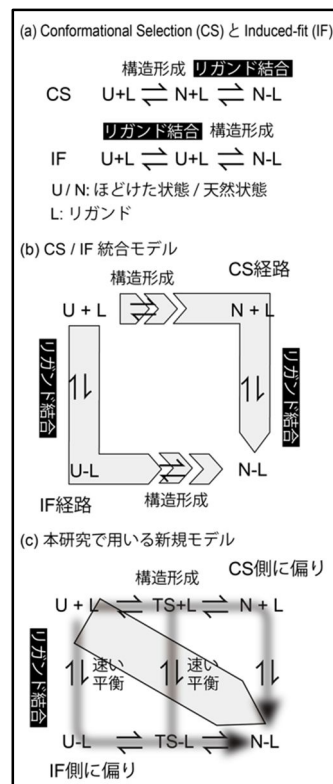


図 1. リガンドによるフォールディング反応のモデル。(a) CSとIF。(b) CSとIFとを速度論的に統合したモデル。(c)本研究で用いる(b)を拡張した新規モデル。

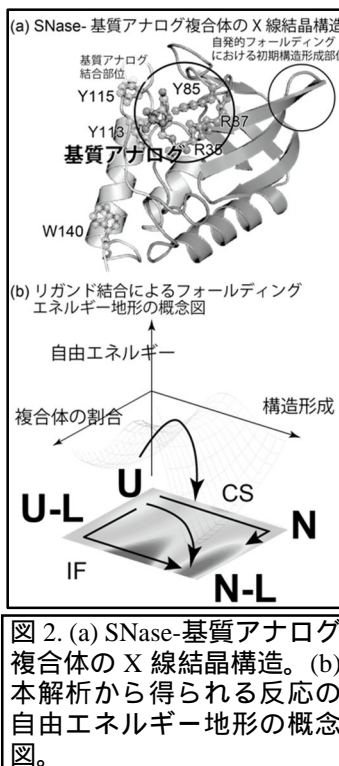


図 2. (a) SNase-基質アナログ複合体の X 線結晶構造。(b) 本解析から得られる反応の自由エネルギー地形の概念図。

行った一連の実験では、尿素濃度として 2.5 M - 3.0 M を用いた (図 3a)。この穏和な変性条件において、概ね 70% - 80% の SNase のフォールディングを観測できる。

(2) リガンドの「変異体解析」による prAp と SNase との間の相互作用解析

蛋白質のフォールディング反応の遷移状態は、反応機構を解明する上で重要であり、その安定性・構造の特徴づけが精力的になされてきた。遷移状態の特徴づけのために、部位特異的のアミノ酸置換を用いた手法が用いられる。本研究課題は、蛋白質ではなく prAp の二つのリン酸基の片方を取り去った 1 リン酸基 prAp 「変異体」を用いて、リガンド結合を伴う SNase のフォールディング反応におけるそれぞれのリン酸基の役割を原子団特異的に調べた。

(3) 各種分光法を用いた prAp 結合による SNase のフォールディング反応の観測

(1)に記した穏和な変性条件下において、prAp 結合によるフォールディング反応の prAp 濃度依存性を測定した。分子全体の様相について、三次構造形成に関しては本研究課題で導入した蛍光分光光度計を用いてトリプトファン蛍光を観測し、二次構造形成に関しては名古屋大学遺伝子実験施設の井原邦夫准教授との共同研究によって円二色性(CD)を用いて観測した。米国 Fox Chase Cancer Center の Heinrich Roder 教授との共同研究によって、アミノ酸残基特異的なリガンド結合・構造変化を核磁気共鳴(NMR)法を用いて特徴づけた。多くの蛋白質について、(室温における)フォールディング反応速度論の観測にはマイクロ秒からミリ秒の時間分解能が必要とされる。本研究課題においても、東京医科歯科大学の伊倉貞吉准教授(現在お茶の水女子大学)との共同研究によって、ストップト・フロー-CD 法を用いて反応開始ごミリ秒からの反応を追跡した。結果としてリガンド結合による SNase のフォールディングは 100 秒 - 1000 秒程度で起こる比較的遅い反応であることが分かり、比較的測定に時間がかかる NMR 法を用いて実時間で反応を追跡できた。

(4)分子動力学シミュレーションとモデル計算による反応関連分子種の安定性と構造解析

分子科学研究所の奥村久士准教授・伊藤暁助教との共同研究によって、prAp 存在下 / 非存在下における SNase のレプリカ-順列分子動力学シミュレーションを用いたリガンド結合を伴う SNase のフォールディングの原子レベルでの解析を行い、prAp と SNase との結合様式や相互作用を調べた。リガンド結合とクーロン相互作用とを取り込んだイジング様ハミルトニアンを用いた統計力学モデルによって実験結果を解析し、反応関連分子種の構造と安定性とを特徴づけた (図 3b)。

#### 4. 研究成果

(1) 分光学的測定・計算機シミュレーションおよびモデル計算による SNase のリガンド結合を伴うフォールディングの解析

SNase の基質アナログ prAp 結合を伴うフォールディング反応を穏和な変性条件下において実現した。反応の平衡論と速度論を prAp 濃度に関して系統的に測定し、反応に関わる分子種や遷移状態の安定性と構造を特徴づけた。また、共同研究を通じて、NMR 法を用いた残基レベルの観測および分子動力学シミュレーションを用いた原子レベルでの解析をも行った。得られた結果に基づき、反応機構を、イジング様モデルを用いて解析することによって、反応の物理的駆動力を調べた。

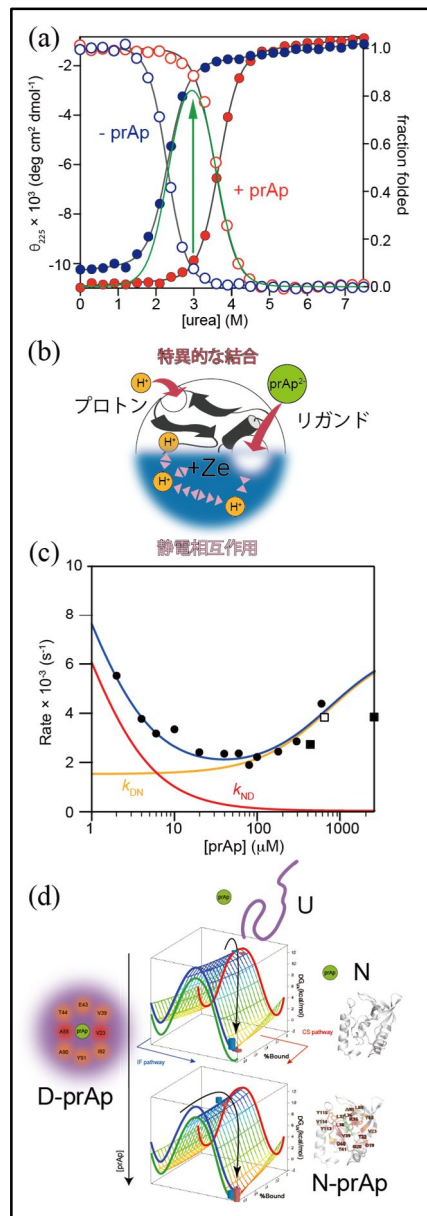


図 3. (a) 2.9 M 尿素存在下における prAp 存在下/非存在下における SNase のアンフォールディング平衡。高濃度 prAp の添加によって緑色の矢印分フォールディングする。(b) prAp 結合と静電相互作用とを取り入れたイジング様ハミルトニアン。上半分が特異的結合に由来する項であり、下半分がクーロン相互作用に由来する項。(c) prAp 結合を伴う SNase フォールディング速度定数の prAp 濃度依存性。低 prAp 濃度において CS 経路が主要であり、高 prAp 濃度において IF 経路が主要になる。■/● は NMR 法による実時間測定。○は蛍光・CD 法を用いた測定。(d) 低 prAp 濃度、高 prAp 濃度における巨視的なフォールディング経路の表現。反応初期に prAp と結合しているアミノ酸残基を明示している。SNase の結晶構造は天然状態における prAp との結合の様子を示す。

尿素 2.9 M 存在下の穏和な変性条件下において、SNase の prAp 誘導フォールディングを実現した。反応の prAp 濃度依存性を測定することにより、その主要な反応経路が prAp 濃度依存的に CS から IF へとシフトすることを見出した (図 3c)。特に、NMR および MD による結果から、IF 条件下の反応初期において、SNase と prAp とが天然/非天然様相互作用を通じて緩やかに結合していることがわかった。さらにリガンドとの結合・解離が充分にはやい平衡にあるとして、リガンドと結合していないアンフォールド状態からリガンドと結合した天然複合体状態への反応経路巨視的なふるまいを評価した。イジング様モデルを用いた解析により、リガンド濃度依存的に反応の自由エネルギー・ランドスケープが CS 側から I 側 F へと連続的に移行変わることを明らかにした (図 3d)。反応の遷移状態が、prAp のもつ二つのリン酸基に由来すると考えられる静電相互作用によって安定化されることが示唆された。

(2) prAp のリン酸基「変異体」を用いた SNase のリガンド結合を伴うフォールディングにおける prAp リン酸基の役割の解析

(1)の研究によって、特に IF 条件下において prAp のふたつのリン酸基がリガンド結合を伴う SNase のフォールディングを誘導する上で重要であることが明らかになった。prAp のふたつのリン酸基:5'-リン酸基と 3'-リン酸基のそれぞれのフォールディングにおける役割を明らかにした。prAp を「野生型」のリガンドとして、それぞれ 5'-および 3'-リン酸基を欠く「変異体」adenosine-3'-monophosphate (rAp) と adenosine-5'-monophosphate (prA) を用いて SNase のフォールディングを誘導

した。prAp, rAp および prA それぞれ SNase との親和性が異なるので、極めて広い範囲のリガンド濃度にわたり SNase のフォールディングを観測した。観測のためのプローブとして、分子全体の様相を知るためにトリプトファンの蛍光を用い、アミノ酸残基特異的な観測を行うために NMR 法を用いた。いずれのリガンドについても、prAp 同様リガンド濃度依存的に CS 経路から IF 経路へと主要な経路が移っていった。それぞれのリガンドを用いた際の遷移状態および天然状態の安定性を評価した。高リガンド濃度の IF 条件下において(i) 5'-リン酸基は変性状態においてゆるく SNase と相互作用し、SNase のふたつのドメインを橋渡ししており、(ii) 3'-リン酸基は天然状態に至る以前、遷移状態において幾分特異的な結合を示すことが明らかになった。

(3) 得られた結果のまとめとインパクト

これまで SNase のフォールディングはリガンドの有無に関わらず自発的な反応として捉えられてきた。本研究課題において、穏和な変性条件下で測定を行うことによって、自発的にフォールディングする SNase のリガンド結合を伴うフォールディングを調べた。(1)において反応を引き起こす駆動力を、アミノ酸残基/原子レベルでの測定や計算によって得られた結果をモデル計算に基づき解析することによって明らかにした。さらに(2)において、特に IF 条件下でフォールディングの駆動力となり得るふたつのリン酸基との相互作用について、それぞれのリン酸基のフォールディングにおける役割を明らかにした。溶媒条件を制御することにより、自発的にフォールディングする蛋白質についてもリガンド結合を伴うフォールディングを研究することができる。また、必ずしもパートナー蛋白質がリガンドではない場合でも、リガンド側に変化を導入し、複合体形成過程を原子団レベルで特徴づけることが可能である。

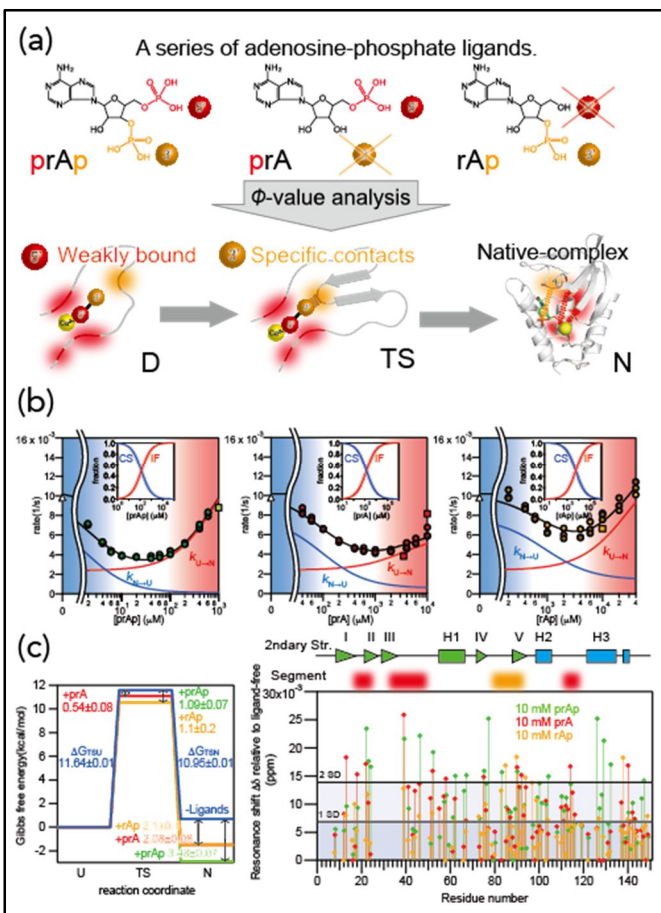


図 4. (a) prAp 結合を伴う SNase のフォールディング過程のスキーム。5'-リン酸基が SNase の変性状態においてゆるく結合し、ふたつのドメインの橋渡しとなる。遷移状態では、3'-リン酸基が特異的な相互作用を形成する。(b) prAp, prA, rAp による SNase フォールディングのリガンド濃度依存性。それぞれのリガンドに対して、CS から IF への主要な経路の切り替わりが起こる濃度が概ね一桁ずつ異なる。(c) rAp, prA をリガンドとした時の天然状態、遷移状態の安定性を、prAp をリガンドとした時の対応する安定性などに対して比較することにより、反応の遷移状態におけるリガンドの結合親和性を評価する ( $\phi$  値解析)。それぞれのリン酸基を欠いた時の NMR 化学シフトの変化。

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 2件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yujiro Mori, Takuya Mizukami, Saho Segawa, Heinrich Roder, and Kosuke Maki	4. 巻 -
2. 論文標題 Folding of staphylococcal nuclease induced by binding of chemically modified substrate analogs sheds light on mechanisms of coupled folding/binding reactions	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biochemistry	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） 10.1021/acs.biochem.3c00094	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 Mizukami Takuya, Furuzawa Shunta, Itoh Satoru G., Segawa Saho, Ikura Teikichi, Ihara Kunio, Okumura Hisashi, Roder Heinrich, Maki Kosuke	4. 巻 117
2. 論文標題 Energetics and kinetics of substrate analog-coupled staphylococcal nuclease folding revealed by a statistical mechanical approach	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America	6. 最初と最後の頁 19953 ~ 19962
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas.1914349117	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

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Yujiro Mori, Issei Suzuki, Shingo Fukazawa, Kosuke Maki
2. 発表標題 スタフィロコッカル・ヌクレアーゼにおける、自発的フォールディングからリガンド誘導フォールディングへの機構転移
3. 学会等名 第60回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yujiro Mori, Saho Segawa, Kosuke Maki
2. 発表標題 Similarity and difference between substrate analogue-induced and spontaneous folding of staphylococcal nuclease
3. 学会等名 第58回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 森祐二郎, 水上琢也, 瀬川紗帆, 横互介
2. 発表標題 反応順序の切り替えを利用したリガンドによる蛋白質フォールディング機構の原子団レベルでの解析
3. 学会等名 日本物理学会第76回年次大会 (2021年)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 森祐二郎, 水上琢也, 瀬川紗帆, 横互介 (森祐二郎が最優秀発表賞を受賞)
2. 発表標題 反応順序の切り替えを利用したリガンドによるフォールディング機構の原子団レベルでの解析
3. 学会等名 令和2年度生物物理学会中部支部講演会
4. 発表年 2021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		
米国	Fox Chase Cancer Center		