

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：82626

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K15403

研究課題名(和文)環状タンパク質の四次構造制御による機能スイッチング

研究課題名(英文)Structural and functional regulation of a ring-type protein quaternary structure

研究代表者

氷見山 幹基(Himiyama, Tomoki)

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

研究者番号：90828310

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)：四次構造は、複数のタンパク質鎖がタンパク質間相互作用により組みあがって形成する。このような複雑さと巨大さから、人工的な集合状態制御は困難だった。本研究ではアミノ酸変異と人工分子の修飾を組み合わせることで、巨大な環状タンパク質四次構造を持つペルオキシレドキシンの解離、および再集合を制御可能であることを見出した。本研究結果により、タンパク質集合体の機能制御や新しい集合体の創製など、既存の技術では困難であった課題の解決につながると期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

複数のタンパク質がさらに組みあがることで、タンパク質の四次構造は形成する。分子量が数十万以上となり、構造も複雑であることから、人工的に集合状態を制御するのは困難だった。本研究ではタンパク質同士が相互作用する界面に着目し、アミノ酸変異や人工分子の修飾といった表面構造の変化を導入することで、巨大な環状タンパク質集合体の解離、および再集合を制御可能であることを見出した。タンパク質集合体のような巨大な生体超分子であっても、人工的に合成した超分子のように、局所的な構造を変えるだけで簡単に構造変化を引き起こすことが判明した。

研究成果の概要(英文)：Quaternary structures are formed through the interprotein interactions among the multiple proteins. The complexity and the huge molecular size of the quaternary structures render difficulties in their control. This study revealed that the disassembly and the reassembly of a large ring-type peroxiredoxin assembly could be controlled by combining the amino acid mutations and the conjugation of a synthetic molecule. The result obtained here will pave the new way for the functional regulation and construction of protein assemblies.

研究分野：生体関連化学

キーワード：タンパク質集合体 四次構造 化学修飾 ペルオキシレドキシンの エックス線結晶構造解析

1. 研究開始当初の背景

従来のタンパク質集合技術では、高分子テンプレートやアミノ酸変異による相互作用を介してタンパク質を集積する (*Chem. Rev.*, **2016**, 116, 13571)。その結果、比較的単純な形状に限られ、タンパク質四次構造の精密な制御は困難であった。一方、天然のタンパク質集合は複雑なタンパク質間相互作用によって組み上げられ、集合して初めてその構造に基づく機能を発現する (*Chem. Soc. Rev.*, **2016**, 45, 24)。このように、人工的なタンパク質集合と天然タンパク質集合には大きな乖離があり、タンパク質間相互作用の制御に基づいて人工的にタンパク質を集合して完成し、機能発現するのは困難な課題であった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、環状タンパク質の四次構造と機能の制御である。本研究提案は、*Aeropyrum pernix* K1 由来ペルオキシレドキシシン (ApPrx) の集合状態に関する独自の知見を基にしている。ApPrx はホモ二量体が 5 個環状に集合した直径約 13 nm のドーナツ型十量体を形成する (*Proteins*, **2006**, 62, 822.) (Figure 1a)。ApPrx の二量体間界面は複数の疎水性アミノ酸残基が集中した疎水性クラスターを有している。本申請者は ApPrx の F80A 変異体が、疎水性相互作用の破壊によって十量体構造を解離してホモ二量体化することを見出した (*Protein Sci.*, **2020**, 29, 1138)。疎水性相互作用を失ったタンパク質に、相互作用再生を担う人工分子を修飾することで、タンパク質集合構造の再生が可能ではないかと着想した。アミノ酸変異により環状構造を解離して機能を消失したタンパク質を、化学的手法により再集合する本提案は、従来法では実現困難であった構造と機能の同時スイッチングを可能とし、新しいタンパク質集合制御技術に繋がると期待した。

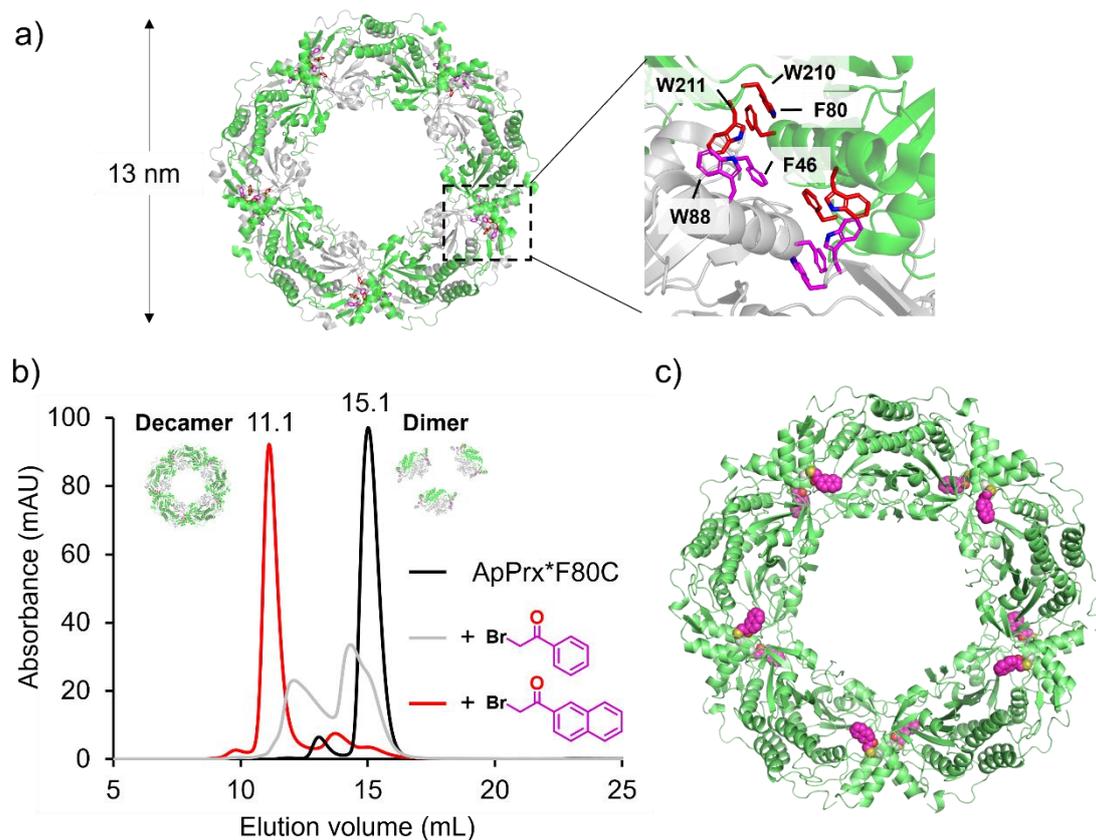


Figure 1. a) ApPrx の結晶構造 (PDB code: 2E2G)。b) ゲルろ過クロマトグラフィー。元の ApPrx*F80C を黒、Ph-Br を結合したものをグレー、Naph-Br を結合したものを赤で示した。ApPrx*F80C は二量体、Naph@ApPrx*F80C は十量体を形成していることが示された。c) Naph@ApPrx*F80C の結晶構造 (PDB code: 7C8A)。Naph 部位を紫色で示した。

3. 研究の方法

まず、ApPrx をベースにタンパク質ビルディングブロックを作成した。選択的にシステイン残基を修飾するために、天然 ApPrx が有するシステイン残基をすべてセリンに置換した変異体 ApPrx* を作成した。ApPrx* 十量体の二量体界面に位置する F80 をターゲットにシステイン変異を行い、二量体に解離した ApPrx*F80C 変異体を作成した。次に、結合する分子として芳香環の大きさが異なる 2-ブロモアセトフェノン (Ph-Br)、2-ブロモアセチルナフタレン (Naph-Br)、1-(ブロモアセチル)ピレン (Pyr-Br) を選定し、それぞれ ApPrx*F80C に結合した。人工分子を修飾した種々のタンパク質をゲルろ過クロマトグラフィー、動的光散乱法、エックス線結晶構造解析により集合状態を調査した。

他の酵素における研究においても、エックス線結晶構造解析による構造解明と機能解析を実施した。さらに、構造に基づき変異導入を行い、酵素機能の最適化を実施した。

4. 研究成果

Ph-Br の結合では、相互作用が弱く環構造が再生しなかった (Figure 1b)。Pyr-Br の結合では、水に不溶の沈殿が形成した。一方、Naph-Br を ApPrx*F80C に結合した Naph@ApPrx*F80C は、安定に環状十量体を形成することが、ゲルろ過クロマトグラフィーと動的光散乱法により示唆された。Naph@ApPrx*F80C について、結晶構造解析を実施し、人工分子であるナフタレン環が ApPrx* の二量体界面で疎水性相互作用を形成し、天然 ApPrx の環状構造を再構築していると示された (Figure 1c)。Naph@ApPrx*F80C は天然 ApPrx とほぼ同じ構造をとるものの、低温下で沈殿形成し、室温に戻すと可逆に溶解する特殊な性質を示した (Figure 2)。この内容で論文が 1 報受理され、表紙に採択された。

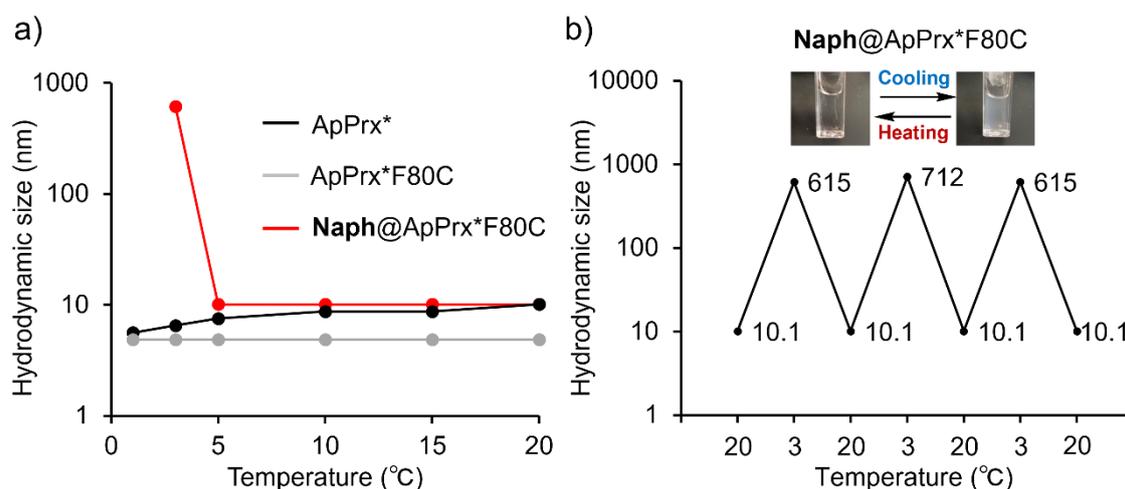


Figure 2. 動的光散乱法によるタンパク質サイズの温度変化評価。a) 各温度におけるタンパク質サイズ。ApPrx* (黒) は低温下で二量体に解離した。ApPrx*F80C (グレー) はどの温度でも二量体として存在した。Naph@ApPrx*F80C (赤) は低温下で沈殿形成し、分子サイズが大幅に増加した。b) 温度変化に伴う Naph@ApPrx*F80C の可逆な沈殿形成。Naph@ApPrx*F80C は低温下で沈殿形成し、室温で溶解する挙動を繰り返し示した。

さらに、構造レパトリー拡大に向けて、*Thermococcus kodakaraensis* 由来ペルオキシレドキシシン (TkPrx) をターゲットに、分子修飾による構造制御に取り組んだ。TkPrx は二量体を 6 つ集合し、十二量体を形成する。TkPrx の二量体界面にアミノ酸変異を導入し、十二量体から二量体に解離した変異体を複数種デザインした。さらにこれらに対して分子修飾を行い、再集合を確かめた。興味深いことに TkPrx の変異体が一種類では再集合しなかったが、二種類の変異体を混合すると再集合が確認できた。今後、この現象について調査を進め、TkPrx ベースのヘテロ集合体の構築をめざしていく。

また、*Geobacillus stearothermophilus* 由来リンゴ酸デヒドロゲナーゼ (gs-MDH) の結晶構造解析を行い、高い基質選択性のメカニズムを推定した。gs-MDH の 3 種の結晶から 4 つのドメイン構造を決定し、反応サイクルに当てはめることで基質選択性に重要なアミノ酸残基を特定した。gs-MDH の結晶構造をもとに、基質認識ループの構造柔軟性を向上した変異体をデザインし、低温最適化を行った。本内容で論文が 2 報受理され、1 件は表紙に採択された。さらに、プラスチック分解能が期待される *Caldanaerobacter subterraneus* subsp. *tengcongensis* 由来アセチルキシランエステラーゼの構造解析に成功した。この内容で論文が 1 報受理された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Sasamoto Kohei, Himiyama Tomoki, Moriyoshi Kunihiro, Ohmoto Takashi, Uegaki Koichi, Nishiya Yoshiaki, Nakamura Tsutomu	4. 巻 77
2. 論文標題 Crystal structure of acetylxlylan esterase from <i>Caldanaerobacter subterraneus</i> subsp. <i>tengcongensis</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Acta Crystallographica Section F Structural Biology Communications	6. 最初と最後の頁 399 ~ 406
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1107/S2053230X21009675	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 Shimozawa Yuya, Himiyama Tomoki, Nakamura Tsutomu, Nishiya Yoshiaki	4. 巻 34
2. 論文標題 Increasing loop flexibility affords low-temperature adaptation of a moderate thermophilic malate dehydrogenase from <i>Geobacillus stearothermophilus</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Protein Engineering, Design and Selection	6. 最初と最後の頁 gzab026
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/protein/gzab026	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, Okamoto Yasunori	4. 巻 25
2. 論文標題 Artificial Metalloenzymes: From Selective Chemical Transformations to Biochemical Applications	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecules	6. 最初と最後の頁 2989
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/molecules25132989	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 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 Shimozawa Yuya, Himiyama Tomoki, Nakamura Tsutomu, Nishiya Yoshiaki	4. 巻 -
2. 論文標題 Structural analysis and reaction mechanism of malate dehydrogenase from <i>Geobacillus stearothermophilus</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of 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) 10.1093/jb/mvab027	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5件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 氷見山幹基、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 氷見山幹基、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 氷見山幹基、中村努
2. 発表標題 複雑で巨大な環状タンパク質の構造制御
3. 学会等名 産業技術支援フェア in KANSAI 2021
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回蛋白質科学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 水見山幹基、中村努
2. 発表標題 Rebuilding ring-type decameric assembly of peroxiredoxin by chemical modification
3. 学会等名 日本化学会第101春季年会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 ペルオキシレドキシンに基づく人工ヘテロオリゴマータンパク質	発明者 水見山 幹基、中村努	権利者 国立研究開発法人産業技術総合研究所
産業財産権の種類、番号 特許、特願2021-137971	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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