

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 6 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21360398

研究課題名（和文） 工学的展開を目指す天然変性蛋白質の構造・機能解析

研究課題名（英文） Structural and Functional Analyses of Intrinsically Unfolded Proteins for Engineering

研究代表者

津本 浩平（TSUMOTO KOUHEI）

東京大学・医科学研究所・教授

研究者番号：90271866

研究成果の概要（和文）：天然変性蛋白質が示す新規な特異的相互作用と会合形成能に着目し、その機構を種々の物性・構造解析に加え、熱力学的解析および速度論的解析に基づいて記述した。具体的には、2つの天然変性蛋白質をモデルに、構造解析に加え、熱力学的および速度論的解析、変異導入解析により、標的分子・リガンドとの相互作用の相互作用機構、触媒機構を明らかにした。新規な添加剤系による蛋白質ハンドリング系を構築した。また、機能未知であった分子種については、*in vivo* 解析からその機能を明らかにした。さらに、新規標的分子を用いた物質集積の制御、材料設計などボトムアッププロセスの工学的応用への展開の可能性を示した。

研究成果の概要（英文）：Functional and physicochemical properties of intrinsically unfolded proteins have been focused. The novel interaction and self-assembly mechanisms have successfully described, based on several physicochemical, structural, and functional analyses. A novel system for handling proteins has been constructed, based on the chemical chaperone-like mechanism of an amino acid and derivatives. For a functionally unknown protein, we elucidated the function from cell-based analyses. A novel target has been used for construction of artificial regulation system of self-assembly process *in vitro*, showing the potential of proteins used as a tool of a bottom-up process in nano-biotechnology.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	9,100,000	2,730,000	11,830,000
2010年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2011年度	2,100,000	630,000	2,730,000
年度			
年度			
総計	13,400,000	4,020,000	17,420,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：プロセス工学、生物機能・バイオプロセス

キーワード：蛋白質、分子認識、生物・生体工学、ナノバイオ、天然変性

## 1. 研究開始当初の背景

生物は、構造蛋白質や酵素などその三次元構造が球状や棒状に近似できる **tight** にフォールドした蛋白質だけでなく、複数のドメインが特定の構造をとらないリンカーにより

連結したマルチドメイン構造やリガンドが結合して初めて構造を形成する領域を有する天然変性蛋白質を持つものが多い。特に、近年のゲノム解析結果と高次構造予測から、全読み枠蛋白質のおよそ 25% が一定の構造

をとらない天然変性蛋白質であることが指摘されており、生物種が天然変性蛋白質をあえて積極的に利用している可能性が考えられる。以上は、蛋白質の構造・機能の本質的理解において、ドメイン間リンカーや構造を取らないループ領域の果たす役割を記述することの重要性を示している。しかしながら、天然変性蛋白質そのものの構造情報についての理解にはいまだ乏しいことに加え、転写因子や受容体など部分変性蛋白質とリガンドの複合体の結晶構造は報告されているものの、複合体形成に至るプロセスは明らかになっていないものも多い。天然変性蛋白質が示す相互作用の機構を多角的解析から記述することは、蛋白質の本質的理解に意義深い知見を得ることにつながる。

## 2. 研究の目的

本研究では、①天然変性蛋白質が示す新規な特異的相互作用と会合形成能に着目し、その機構を種々の物性・構造解析に加え、熱力学的解析および速度論的解析に基づいて記述する。具体的には、Tob1 および EbpS の二つを天然変性蛋白質のモデルに、構造解析に加え、熱力学的および速度論的解析を基に変異導入解析も駆使することで、標的分子・リガンドとの相互作用の相互作用機構を明らかにする。②研究代表者らがこれまで行ってきた蛋白質の溶媒環境制御の知見を積極的に取り入れ、アミノ酸とその誘導体を用いた新しい蛋白質ハンドリング系を構築、天然変性蛋白質ハンドリング系への展開を図る。③新規な相互作用機構に基づき形成される超分子構造とその形成機構の解明を目指す。さらに、明らかになった新規な機構に基づいて、物質集積の制御、材料設計などボトムアッププロセスのツールとしての工学的応用への展開を目指す。

## 3. 研究の方法

本課題では以下の3つの観点から研究を進めた。①TOB1 および EbpS の二つを天然変性蛋白質のモデルに、構造解析に加え、熱力学的および速度論的解析を基に変異導入解析も駆使することで、天然変性蛋白質の標的分子・リガンドとの特異的相互作用に関するデータを広く蓄積し、その相互作用機構を明らかにする。②研究代表者がこれまで行ってきた蛋白質の溶媒環境制御の知見も積極的に取り入れ、天然変性蛋白質における相互作用機構を蛋白質の水の状態からも精査し、相互作用における構造変化および中間状態における水とのダイナミクスに関して考察を深め、天然変性蛋白質における相互作用の一般則まで拡張することを目指す。アミノ酸とその誘導体③新規な分子認識能に基づき形成される自己集積構造とその形成機構の解

明を目指す。

以上の解析から明らかになった新規な認識機構に基づいて、物質集積の制御、材料設計などボトムアッププロセスのツールとしての工学的応用へ展開できる可能性を探る。

## 4. 研究成果

### (1) 変異体・欠損体の構築と物性解析：

Tob1、EbpS 双方について、全長蛋白質ならびに欠損体、部位特異的変異体の発現系を構築、その溶液構造を円二色性や蛍光スペクトルを用いて評価した。Tob1 については、天然変性領域がコア構造に及ぼす影響は観察されなかった。EbpS は特定の領域に重金属結合能があり、その結合によりらせん構造が誘起されることが明らかとなった。また、Tob1 についてはN末端ドメインを有する分子種を中心に、熱安定性や化学安定性を、示差走査型熱量測定(DSC)ならびに変性剤滴定による構造変化から熱力学的に評価したところ、天然変性領域が及ぼす影響は限定的であることが分かった。次に、Tob1 と種々の標的蛋白質との複合体形成における結合速度と解離速度について、表面プラズモン共鳴法により解析したところ、天然変性領域に存在する Poly-PQ 配列が相互作用における熱力学的特性を変化させる可能性が強く示唆された。

### (2) 環境制御に基づいた天然変性蛋白質の自己集積構造と in vivo の機能：EbpS

(1) で述べた EbpS の全長、及び欠損体を用いた解析から、重金属結合能が明らかとなり、特に、Zn に関しては、発熱を伴う特異的な相互作用を示すことが示された。そこで、in vivo での機能と Zn 結合による自己集積構造との関連について、さらに解析を進めるべく、EbpS の欠損株、ならびに発現誘導株を樹立し、その宿主細胞感染能と金属イオン添加との関連を考察した。EbpS が増殖能、Zn 結合、及び莢膜合成に強く関与していることが明らかとなった。

### (3) 表面プラズモン測定 (SPR) ならびに滴定型熱量計 (ITC) を用いた低分子化合物の探索：Tob1

Tob1 の天然変性領域が機能に及ぼす影響に関して考察を深めるため、結合蛋白質 CNOT7 に特異的に結合する低分子化合物を探索し、Tob1 との相互作用の阻害に関して考察した。まず、東京大学創薬オープンイノベーションセンターで準備されたフラグメントライブラリー (2000 化合物) から、SPR を用いて結合能の有無に関するスクリーニングを試みたところ、複数種の化合物が候補になりうることが分かった。これらについて、探索した CNOT7 に特異的相互作用する低分子化合物を用いた相互作用を精密に解析したと

ころ、その相互作用を顕著に阻害できる分子種が3種存在していたことが明らかとなった。この相互作用阻害に、天然変性領域の有無が大きく関連する可能性が考えられ、相互作用解析における溶媒制御の重要性が強く示唆された。以上の結果に基づき、蛋白質間相互作用阻害剤開発の礎を築いた。

(4) 新規な蛋白質ハンドリング技術の開発：グルタミン酸誘導体とアルギニン

グルタミン酸誘導体の一つである、C12-Gluがアルギニンとの共奏的作用により、特定の膜蛋白質の抽出ならびに封入体として発現抽出された蛋白質のリフォールディングに有効に働くことを示した。これらは、天然変性蛋白質のハンドリングに効果的に作用することを世界にさきがけて明らかにした。

5. 主な発表論文等

(研究代表者には下線, 代表例を示した)

[雑誌論文] (計 44 件)

- 1) Abe R, Caaveiro JM, Kozuka-Hata H, Oyama M, Tsumoto K. Mapping the ultra-weak protein-protein interactions between heme transporters of *Staphylococcus aureus*. *J. Biol. Chem.* 287, 16477–16487 (2012) 10.1074/jbc.M112.346700
- 2) Nishina T, Komazawa-Sakon S, Yanaka S, Piao X, Zheng DM, Piao JH, Kojima Y, Yamashina S, Sano E, Putoczki T, Doi T, Ueno T, Ezaki J, Ushio H, Ernst M, Tsumoto K, Okumura K, Nakano H. Interleukin-11 links oxidative stress and compensatory proliferation. *Sci Signal.* 5, ra5 (2012) 10.1126/scisignal.2002056
- 3) Miyafusa T, Caaveiro JM, Tanaka Y, Tsumoto K. Crystal Structure of Enzyme CapF of *Staphylococcus aureus* Reveals a Unique Architecture Composed of Two Functional Domains. *Biochem J.* 443, 671–680 (2012) 10.1042/BJ20112049
- 4) Kawai T, Caaveiro JM, Abe R, Katagiri T, Tsumoto K. Catalytic activity of MsbA reconstituted in nanodisc particles is modulated by remote interactions with the bilayer. *FEBS Lett.* 585, 3533–3537 (2011) 10.1016/j.febslet.2011.10.015
- 5) Moriwaki Y, Caaveiro JM, Tanaka Y, Tsutsumi H, Hamachi I, Tsumoto K. Molecular Basis of Recognition of Antibacterial Porphyrins by Heme-Transporter IsdH-NEAT3 of *Staphylococcus aureus*. *Biochemistry.* 50, 7311–7320 (2011) 10.1021/bi200493h
- 6) Ishii D, Abe R, Watanabe SI, Tsuchiya M, Nocker B, Tsumoto K. Stepwise Characterization of the Thermodynamics of Trichocyte Intermediate Filament Protein Supramolecular Assembly. *J. Mol. Biol.* 408, 832–838 (2011) 10.1016/j.jmb.2011.03.034
- 7) Motonori Kudou; Daisuke Ejima; Haruna Sato; Ryosuke Yumioka; Tsutomu Arakawa; and Kouhei Tsumoto. Refolding single-chain antibody (scFv) using lauroyl-L-glutamate as a solubilization detergent and arginine as a refolding additive. *Protein Exp. Purif.* 77, 68–74 (2011) 10.1016/j.jpep.2010.12.007
- 8) Yanaka S, Sano E, Naruse N, Miura KI, Futatsumori-Sugai M, Caaveiro JM, Tsumoto K. Non-core region modulates interleukin-11 signaling activity: Generation of agonist and antagonist variants. *J. Biol. Chem.* 286, 8085–8093 (2011) 10.1074/jbc.M110.152561
- 9) Suzuki T, Kim M, Kozuka-Hata H, Watanabe M, Oyama M, Tsumoto K, Yamamoto T. Monoubiquitination of Tob/BTG family proteins competes with degradation-targeting polyubiquitination. *Biochem Biophys Res Commun.* 409, 70–74 (2011) org/10.1016/j.bbrc.2011.04.107
- 10) Mihoko Ui, Yoshikazu Tanaka, Takeshi Tsumuraya, Ikuo Fujii, Masayuki Inoue, Masahiro Hirama, and Kouhei Tsumoto Structural and Energetic Hot-Spots for the Interaction between a Ladder-like Polycyclic Ether and the Anti-Ciguatoxin Antibody 10C9Fab. *Molecular BioSystems* 7, 793–798 (2011) 10.1039/COMB00162G
- 11) Kudou M, Yumioka R, Ejima D, Arakawa T, Tsumoto K. A novel protein refolding system using lauroyl-L-glutamate as a solubilizing detergent and arginine as a folding assisting agent. *Protein Expr Purif.* 75, 46–54 (2011) 10.1016/j.jpep.2010.08.011
- 12) Rahul S. Rajan, Kouhei Tsumoto, Masao Tokunaga, Hiroko Tokunaga, Yoshiko Kita

- and Tsutomu Arakawa Chemical and Pharmacological Chaperones: Application for Recombinant Protein Production and Protein Folding Diseases. [Current Medicinal Chemistry](#) **18**, 1-15 (2011)  
10.2174/092986711793979698
- 13)Ui M, [Tsumoto K.](#) An approach to rational ligand-design based on a thermodynamic analysis. [Recent Pat Biotechnol.](#) **4**, 183-188 (2010)  
10.2174/187220810793611482
- 14)Ryota Abe, Jose M. M. Caaveiro, Motonori Kudou and [Kouhei Tsumoto](#) Solubilization of Membrane Proteins with Novel N-Acylamino Acid Detergents. [Mol. BioSyst.](#) **6**, 677-679 (2010)  
10.1039/B925791H
- 15)Saeko Yanaka, Motonori Kudou, Yoshikazu Tanaka, Takumi Sasaki, Sumiyo Takemoto, Atsuko Sakata Yukio Hattori, Tomoyuki Koshi, Shiro Futaki, [Kouhei Tsumoto](#), and Toshihiro Nakashima Contribution of the flexible loop region to the function of Staphylococcal enterotoxin B (SEB) [Protein Eng. Des. Select.](#) **23**, 415-421 (2010)  
10.1093/protein/gzq006
- 16)Yokota A., [Tsumoto K.](#), Shiroishi M., Nakanishi T., Kondo H., Kumagai I. Contribution of asparagine residues to the stabilization of a proteinaceous antigen-antibody complex: HyHEL-10-HEL [J. Biol. Chem.](#) **285**, 7686-7696 (2010)  
10.1074/jbc.M109.089623
- 17)Aikawa C, Nozawa T, Maruyama F, [Tsumoto K.](#), Hamada S, Nakagawa I. Reactive oxygen species induced by Streptococcus pyogenes invasion trigger apoptotic cell death in infected epithelial cells. [Cell Microbiol.](#) **12**, 814-830 (2010)  
10.1111/j.1462-5822.2010.01435.x
- 18)Nagatoishi S, Tanaka Y, Kudou M and [Tsumoto K.](#) Temperature and salt concentration alter base-sequence selectivity of a duplex DNA-binding protein. [Mol. Biosyst.](#) **6**, 98-101 (2010)  
10.1039/B914828K
- 19)Futatsumori-Sugai M and [Tsumoto K.](#) Signal peptide design for improving recombinant protein secretion in the baculovirus expression vector system [Biochem. Biophys. Res. Commun.](#) **391**, 931-935 (2010)  
10.1016/j.bbrc.2009.11.167
- 20)Sakamoto S, Jose M. M. Caaveiro, Sano E, Tanaka Y, Kudou M and [Tsumoto K.](#) Contributions of interfacial residues of human Interleukin15 to the specificity and affinity for its private alpha-receptor. [J. Mol. Biol.](#) **389**, 880-894 (2009)  
10.1016/j.jmb.2009.04.050
- 21)Nakakido M, Kudou M, Arakawa T, and [Tsumoto K.](#) To be excluded or to bind, that is the question: Arginine effects on proteins [Curr. Pharm. Biotechnol.](#) **10**, 415-420 (2009)  
<http://www.benthamdirect.org/pages/content.php?CPB/2009/00000010/00000004/0010G.SGM>
- 22)Abe R, Kudou M, Tanaka Y, Arakawa T and [Tsumoto K.](#) Immobilized metal affinity chromatography in the presence of arginine. [Biochem. Biophys. Res. Commun.](#) **381**, 306-310 (2009)  
10.1016/j.bbrc.2009.01.054
- 23)Futatsumori-Sugai M, Abe R, Watanabe M, Kudou M, Yamamoto T, Ejima D, Arakawa T, and [Tsumoto K.](#) Utilization of an arginine-elution method for FLAG-tag chromatography [Protein Expr Purif.](#) **67**, 148-155 (2009)  
10.1016/j.pep.2009.03.012
- 〔学会発表〕（計 61 件、国際学会のみを下記に記した）
- 1)14<sup>th</sup> Asian Chemical Congress  
2011年9月6日～8日  
Thermodynamic Analyses of Binding and Transfer of Heme: Isd System.  
[Tsumoto K.](#), Caaveiro J.M.M., Abe R, Moriwaki Y, Vu N, Watanabe M, Tanaka Y
- 2)The IXth European Symposium of The Protein Society  
2011年5月22日～26日  
Stockholm - Stockholm University, Aula Magna  
Structural and functional analysis of Capsular polysaccharide synthesizing enzyme CapF from Staphylococcus aureus  
Miyafusa T, Tanaka Y, Caaveiro J.M.M., Kuroda M, Yao M, Ohta T, Tanaka I, [Tsumoto K.](#)
- 3)Immunology 2011  
2011年5月13日～17日

Moscone Center (San Francisco • USA)  
Targeted glycosylation of “non-core region” of  
Interleukin 11 modulates its biological  
function.

Yanaka S, Sano E, Naruse N, Caaveiro J.M.M.,  
Tsumoto K.

4)2010 環太平洋国際化学会

2010年12月15~20日

ハワイコンベンションセンター

Structural and functional analysis of capsular  
polysaccharide synthesizing enzyme CapF.

T. Miyafusa; Y. Tanaka; J. Martinez Caaveiro;  
M. Kuroda; M. Yao; T. Ohta; I. Tanaka; K.  
Tsumoto

5)Pacific Chem 2010

2010年12月15~20日

米国ハワイ州 Hawaii Convention Center

Solubilization of Membrane Proteins with  
Novel N-Acylamino Acid Detergents

安部良太・ホセマルチネスカアペイロ・津  
本浩平

6)DiPiA2010

2010年10月17~20日

Skipper Hotel. Barcelona, スペイン

Aromatic Interactions are Essential for  
Carbohydrate Recognition by an Enzyme

Caaveiro, J.M.M., Kobe, A., Clifton, J.G.,  
Ringe, D., Petsko, G.A. and Tsumoto, K.

7)The 23rd Symposium of the Protein Society

Boston, Massachusetts, USA.

Date: July 24-29, 2009.

Three Hot-Spot Regions Define the High  
Affinity of Human Interleukin 15 for its  
Private alpha-Receptor

Caaveiro, J.M.M., Sakamoto, S., Sano,  
E., Kudou, M. and Tsumoto, K.

〔図書〕(計13件、代表例を示した)

1)津本浩平

抗体の安定性向上技術

BIOINDUSTRY, 28, 28-34 (2011)

2)津本浩平

タンパク質相互作用解析：等温滴定型熱量

測定と表面プラズモン共鳴

生物学, 89, 391-394 (2011)

3)津本浩平 (分担執筆)

タンパク質工学

遺伝子工学 (化学同人) (2011)

4)Satoshi Ohtake, Yoshiko Kita, Kouhei

Tsumoto, Tsutomu Arakawa.

Solvent Interactions with Proteins and Other  
Macromolecules

Amino Acids, Peptides and Proteins in  
Organic Chemistry Volume 5 - Analysis and

Function of Amino Acids and Peptides (Wiley),  
273-356 (2011)

5)中木戸誠、津本浩平 (分担執筆)

「クロマトグラフィー」「界面活性剤」

生化学事典 (朝倉書店) (2011)

6)Kumagai I. and Tsumoto K.

Antigen-antibody Binding Encyclopedia of  
Life Sciences (2010)

7)津本浩平、江島大輔、荒川力

抗体会合体の定量的評価の課題

抗体医薬のための細胞構築と培養技術  
(2010)

8)津本浩平 (編者)

酵素利用技術大系(2010)

9)津本浩平、宇井美穂子

相互作用の熱力学情報に基づく低分子リ

ガンド設計

薬学雑誌, 129, 1311-1317 (2009)

10)津本浩平、宇井美穂子

抗原抗体相互作用の熱力学的解析：特異  
性と親和性

熱測定, 36, 205-215 (2009)

〔その他〕

ホームページ等

<http://park.itc.u-tokyo.ac.jp/phys-biochem>

6. 研究組織

(1)研究代表者

津本 浩平 (TSUMOTO KOUHEI)

東京大学・医科学研究所・教授

研究者番号：90271866