

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 5 月 28 日現在

機関番号：34504

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21570173

研究課題名（和文）生理的条件下で天然構造と平衡にあるタンパク質の変性構造の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the denatured structure of protein in equilibrium with the native one under a physiological condition.

研究代表者

瀬川 新一 (SEGAWA SHIN-ICHI)

関西学院大学・理工学部・教授

研究者番号：70103132

研究成果の概要（和文）：S-S結合を欠損させて天然の立体構造を失わせたリゾチーム分子に残留する部分秩序構造をNMR分光法と重水素交換法を組み合わせることで研究した結果、リゾチームに存在するA、B、Cヘリックスが作る α ドメインの疎水性ポケットに β シートの底部にある残基 I55、L56が固定された構造が、このタンパク質の折りたたみ反応開始部位であることを解明することができた。一方、ピロリドンカルボキシルペプチダーゼ（PCP）の天然立体構造の揺らぎを調べる実験からは、208残基から成るこのタンパク質の残基70番近傍で起きる構造変化がこのタンパク質を2つの大きな構造ドメインに分割しようとするが、その揺らぎのモードが立体構造を完全な無秩序鎖状態にほどいてしまうことを突き止めた。

研究成果の概要（英文）：We have studied partially ordered structures remaining in unstructured disulfide-deficient variants of lysozyme by means of NMR and H/D exchange methods. In this residual structure, two residues of I55 and L56 involved in the bottom of the β -sheet were located in a hydrophobic pocket formed with A, B and C-helices in the α -domain. Lysozyme folding appears to be initiated around this site. On the other hand, H/D exchange reactions were studied in the native state of pyrrolidone carboxyl peptidase (PCP). The native structure was found to be divided into two domains by structural changes near at the residue 70.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学、生物物理学

キーワード：タンパク質のフォールディング、H/D交換反応とNMR測定、リゾチームS-S結合欠損変異体、超好熱菌由来のタンパク質、ピロリドンカルボキシルペプチダーゼ、タンパク質の変性状態、グリセロールによる選択的水和

1. 研究開始当初の背景

タンパク質の折りたたみ反応は、鎖が折りたたまれた天然構造と無秩序鎖となった変性状態間の構造変化である。無秩序鎖の状態を解明することが、その研究の鍵であるが、従来、高濃度の変性剤存在下のタンパク質を変性構造と捉えて研究が行われてきた。しかし、天然構造をとる分子が大部分を占めるような生理的溶媒条件下でも、秩序構造を失った変性構造をとる分子種が僅かながら存在し、その構造がタンパク質の folding 反応の開始状態に相当する変性状態である。この生理的溶媒条件下での変性構造を実験的に調べることが本研究の最重要課題であった。

そのような中で、我々はタンパク質の folding の初期過程の解明に特別に有利な2つの系を確立してきた。一つは、天然構造は失っているが様々な部分構造秩序度をもつ S-S 結合欠損リゾチーム変異体である。この試料は文字通り生理的条件下で変性状態にあるタンパク質である。もう一つは生理的溶媒条件下で変性状態に長くどまるという特性を持つピロリドンカルボキシルペプチダーゼ(PCP と略す)というタンパク質である。

2. 研究の目的

(1) 従来、生理的条件下で変性状態にあるタンパク質は、高濃度の変性剤を急激に希釈することによって refolding するまでの過渡状態において研究が行われてきたが、refolding 初期状態は短時間で通過するため詳細な構造情報を得ることが困難であった。上記2つの研究試料は、平衡状態やそれに準じるような安定な状態で、非天然構造に残留する部分秩序構造を調べることができるため、以下に述べるように高分解能の2次元 NMR スペクトルを用いて研究することが可能であった。

(2) リゾチームに存在する4本の S-S 結合を1本ずつ欠損させて、徐々に天然立体構造を失わせた種々の「folding 中間体」を作製し、その構造を NMR 分光法によって研究してきたが、2本以上の S-S 結合を欠損させた 2SS

変異体と 1SS 変異体を主な研究対象とした。これらは水溶液中ではランダムコイルに近い無秩序鎖構造をとるが、溶液に高濃度のグリセロールを加えることによって CD スペクトルに部分的な秩序構造が誘導されることを見出した。この構造を NMR 分光法によって詳細に研究することが目的であった。

(3) PCP 変異体 (2つの Cys 残基を Ser に置換した変異体、今後は単に PCP と呼ぶ) は温度と pH を調節することによって、事実上 refolding 反応を停止させることが可能なタンパク質である。GuHCl で完全変性(D₂状態)させた後、pH3.0、8°C で GuHCl を完全に除去すると 220nm 近傍の CD スペクトルは急速に一部回復するが、空間構造は非天然状態のままである(D₁状態)。この状態は長く続き、8°C では天然構造に戻るのに約 24hr かかる。この過渡状態の変化を NMR スペクトルで追跡することが目的であった。

3. 研究の方法

(1) リゾチーム変異体として C6-C127 と C64-C80 という2本の S-S 結合を持つ 2SS [6-127,64-80]変異体と1本の S-S 結合を C6-C127 間に保持する 1SS[6-127]と C30-C115 間に保持する 1SS[30-115]という3種のものが、とくに詳しく研究された。変異体を含む溶液に 30-70%濃度のグリセロールを加えると、220nm の CD スペクトルは全ての変異体で増大してヘリックスに富む構造に変化するが、280nm 近傍の CD スペクトルは一般には回復しなかった。例外が 2SS[6-127,64-80] と 1SS[6-127]である。これらにおいては部分的な3次構造が回復していると考えられる。この構造をアミノ酸残基レベルの分解能で調べるため、グリセロール溶液中で H/D 交換反応を実施し、その後グリセロールを除いて NMR 測定溶媒に DMSO を用いるという手法を用いてグリセロール中での H/D 交換反応の阻害因子を残基毎に決定することに成功した。

(2) PCP の D₁ 状態における構造形成の問題は、微妙な pH 変化に応じて敏感に refolding 速度が変わるため、まだ実験データの再現性に問題が残っているが、少なくとも、8°C、pH3.0 で長時間インキュベーションすると、初めはα6 ヘリックスだけだった構造形成領域が次にα4 ヘリックス領域に広がることは確かな実験事実であった。その後、徐々に他の領域の NH 基の H/D 交換反応の阻害因子が増大し、PCP 全体の構造形成が進行する様子が確認できた。ただし、PCP 全体の refolding も同時に進行しており、当初の予想ほどその時間域が大きく異ならなかったため、明瞭にどこまでが refolding 初期過程で、どこからが all-or-none の folding 過程なのか区別するのが困難な状況になった。一方、天然状態にある PCP の H/D 交換反応も生理的条件下で変性している D₁ 状態の影響を反映するので、pD2.9 にして種々の温度で H/D 交換反応を実施し、交換反応速度の温度依存性を調べ、H/D 交換の詳細な反応機構を調べる研究を行った。

4. 研究成果

(1) S-S結合欠損リゾチームの研究において C6-C127というS-S結合を残すISS[6-127] 変異体とC30-Cys115を持つ1SS[30-115]変異体の構造の違いが興味深い実験事実であった。溶媒にグリセロールを添加する方法によって違いを顕在化させ、NMR分光法とH/D交換法を組み合わせた方法で研究を行った結果、明瞭な違いが残基4-15領域のA-helixの安定性にあることが明らかになった。Aヘリックスを中心として、B、Cヘリックスの集まるαドメインにできた疎水性のポケットにβシート底部の2つの残基I55とL56が固定された構造がグリセロールによって誘導される。前述の2SS [6-127, 64-80]変異体ではもっと低い濃度のグリセロール溶液中でその3次構造が誘導され、それが天然構造に非常によく似ていることが明らかになった。研究成果は*Biopolymers*, **91** (2009), 665-675と同雑誌, **97** (2012), 539-549に論文発表されている。

(2) PCPに関する研究においては、pD2.9で

天然状態にあるPCPの主鎖アミドプロトンのH/D交換反応を温度35°C~50°Cの範囲で測定した。実験の結果、PCPは折りたたみ反応の開始状態であるD₁状態にまでunfoldingして、分子中心部にある48個のアミドプロトンが一斉に溶媒露出し、H/D交換反応が起きることが明らかとなった。さらに、D₁状態においてC末端の20残基ほどから成るα6-helix領域にH/D交換反応を阻害する13程度の遅延因子が存在することが分かった。すなわちD₁状態において、すでにこのα6-helixはヘリックスを形成していることを示唆している。この結果は現在論文を準備中である。その他、グルコアミラーゼのデンブリン結合ドメイン(SBD)というタンパク質の折りたたみ反応中間体を直接NMR分光法で構造解析する研究を成功させ、*J. Mol. Biol.*, **412**(2011), 304-315に論文発表した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計5件)

①Noda, Y., Narama, K., Kasai, K., Tachibana, H. & Segawa, S.: Glycerol-Enhanced Detection of a Preferential Structure Latent in Unstructured 1SS-Variants of Lysozyme, *Biopolymers*, **97** (2012), 539-549, 査読有.

②Silvers, R., Sziegat, F., Tachibana, H., Segawa, S., Whittaker, S., Günther, U. L., Gabel, F., Huang, J., Blackledge, M., Wirmer-Bartoschek, J., Schwalbe, H.: Modulation of Structure and Dynamics by Disulfide Bond Formation in Unfolded States, *J. Am. Chem. Soc.*, **134** (2012), 6846-6854, 査読有.

③Miyamoto, Y., Noda, Y., Iida, T., Yamaguchi, K., Nishimura, S., Tanaka, A., Segawa, S. & Inui, T.: NMR and CD analysis of an intermediate state in the thermal unfolding process of mouse lipocalin-type prostaglandin D synthase, *J. Biochem.*, **151** (2012), 335-342, 査読有.

④Sugimoto, H., Noda, Y. & Segawa, S.: NMR Analysis of a Kinetically Trapped Intermediate of a Disulfide-Deficient Mutant of the Starch-Binding Domain of Glucoamylase, *J. Mol. Biol.* **412** (2011), 304-315, 査読有.

⑤ Sakamoto, K., Hirai, K., Kitamura, Y., Yamazaki, K., Yusa, M., Tokunaga, N., Doi, G., Noda, Y., Tachibana, H. & Segawa, S.: Glycerol-Induced Folding of Unstructured Disulfide-Deficient Lysozyme into a Native-Like Conformation, *Biopolymers*, **91** (2009), 665-675, 査読有

〔学会発表〕(計 20 件)

①キンマン・クリストファー、飯村哲史、野田康夫、油谷克英、瀬川新一：ピロリドンカルボキシルペプチダーゼの折りたたみー天然類似の反応中間体の検出、日本物理学会第 67 回年次大会、2012 年 3 月 25 日（関西学院大学、西宮）。

②藪本和義、飯村哲史、野田康夫、油谷克英、瀬川新一、ピロリドンカルボキシルペプチダーゼの天然立体構造の大規模な揺らぎを H/D 交換反応で検出する、日本物理学会第 67 回年次大会、2012 年 3 月 25 日（関西学院大学、西宮）。

③瀬川新一、奈良間邦成、野田康夫、橋秀樹：S-S 結合欠損リゾチームを用いた折りたたみ反応研究の総括ー折りたたみ反応における各 S-S 結合の役割、第 11 回日本蛋白質科学会年会、2011 年 6 月 9 日（ホテル阪急エキスポパーク、大阪）。

④キンマン クリストファー、藪本和義、横田洋平、野田康夫、油谷克英、瀬川新一：H/D 交換 NMR 測定法によるピロリドンカルボキシルペプチダーゼ (PCP) の折りたたみ反応における逐次構造変化の研究、第 10 回日本蛋白質科学会年会、2010 年 6 月 16 日（札幌コンベンションセンター）。

⑤杉本華幸、野田康夫、瀬川新一：ジスルフィド結合を欠損させたデンブレン結合ドメインのリフォールディング中間体の NMR 解析、第 10 回日本蛋白質科学会年会、2010 年 6 月 17 日（札幌コンベンションセンター）。

⑥Sugimoto, H., Noda, Y. & Segawa, S.: NMR Analysis of a Kinetically Trapped Refolding Intermediate of a Disulfide-Deficient Mutant of the Starch-Binding Domain of Glucoamylase. 24th Annual Symposium of The Protein Society, August 4, 2010, San Diego, CA, USA.

⑦杉本華幸、野田康夫、瀬川新一：NMR analysis of a kinetically trapped refolding intermediate of a disulfide-deficient mutant of the

starch-binding domain of glucoamylase, 第 82 回日本生化学会、2009 年 10 月 22 日（神戸ポートアイランド）。

⑧Segawa, S., Yokota, Y., Dosei, M., Noda, Y. & Yutani, K.: The folding of PCP (Pyrrolidone Carboxyl Peptidase) proceeds in the denatured state similar to the stage of molten globule, The 23rd Symposium of The Protein Society, July 25, 2009, Boston, MA, U.S.A.

〔その他〕

ホームページ等

<http://sci-tech.ksc.kwansei.ac.jp/~segawa/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

瀬川 新一 (SEGAWA SHIN-ICHI)
関西学院大学・理工学部・教授
研究者番号：70103132

(2) 研究分担者

野田 康夫 (NODA YASUO)
関西学院大学・理工学部・教育技術主事
研究者番号：40268511

(3) 研究分担者

油谷 克英 (YUTANI KATSUhide)
独立行政法人理化学研究所・理化学研究所
播磨研究所・上級研究員
研究者番号：90089889

(4) 連携研究者

杉本 華幸 (SUGIMOTO HAYUKI)
関西学院大学・理工学研究科・博士研究員
研究者番号：60529527
(H21～H22 のみ)