

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 25 年 5 月 23 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22550038

研究課題名（和文）

新世代の蛍光検出円二色性によるタンパク質立体構造の動的ピンポイント解析法の開発

研究課題名（英文）

Method for Pin-Point Structure Analysis of Proteins by Fluorescence-Detected CD

研究代表者

根平 達夫（NEHIRA TATSUO）

広島大学・大学院総合科学研究科・助教

研究者番号：60321692

研究成果の概要（和文）：

新世代の蛍光検出円二色性（FDCD）測定装置を、初めてタンパク質に適用した。pH制御により二次構造と三次構造の変性を別々に観測できるメトミオグロビンの実験により、タンパク質のFDCDスペクトルは主に三次構造の変化を敏感に反映することを示した。蛍光ラベルを導入したカルモジュリンの実験からは、タンパク質溶液中にペプチド等の夾雑物があっても、目的のタンパク質だけを選択的に観測できることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

Fluorescence-detected circular dichroism (FDCD) was applied to model proteins for the first time with the device that we have recently developed. Using metmyoglobin, a tryptophan-containing protein that gets denatured separately at secondary and tertiary structure levels depending on the pH changes, it was unveiled that FDCD mainly observes the change of tertiary structure. Using a fluorescently-labeled calmodulin, which alters its structure by the existence of calcium ions and/or binding peptides, it was demonstrated that FDCD can selectively observe the structure changes of the target protein.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：基礎化学・有機化学

キーワード：構造有機化学

1. 研究開始当初の背景

タンパク質の立体構造解析は、ライフサイエンスの発展において不可欠である。長く信頼されてきたX線法では試料の結晶化が不可欠である。NMR法では分子量の大きなタンパク質には適用が困難なほか、同位体ラベル化

試料の調製が煩雑な上に測定装置が効果で大型である。これまでも他に相補的な手法が広く探求されてきたが、溶液中で実際に反応途中のタンパク質の構造変化を測定することは、原理的に相当困難である。

円二色性 (CD) は、タンパク質の構造解析手法の中でも、試料を選ばず迅速な測定が可能な方法の一つであり、特に二次構造の分析に有用である。ただし、三次および四次構造の解析としては確実性が乏しく、得られる二次構造情報もタンパク質溶液全体の平均値となることなど、広く構造解析に利用するためには、まだ改良の余地がある。

そこで申請者らが注目するのは、CD 測定において透過光を検出する代わりに蛍光を検出する蛍光検出円二色性 (FDCD) である。FDCD では、タンパク質全体の二次構造ではなく、観測しようとする蛍光物質が結合した部位周辺の高次構造をピンポイントで切り出すことが原理的に可能である。つまりタンパク質の混合溶液中であっても、迅速かつ選択的にシグナルを検出できる可能性が高い。

FDCD は新しい方法ではないが、測定装置が実用的レベルになったのは最近である。従来の FDCD 装置では「にせ FDCD 信号」の発生が見られ、信頼できる信号を得ることが困難であった。この「にせ FDCD 信号」は左右円偏光に残留する直線偏光成分が FDCD を観測する際に表出した結果で、蛍光の偏光度が大きいと特に顕著になる。分子構造とは無関係のシグナルとなって本来の FDCD 曲線を歪めてしまうため、分子量の大きいタンパク質への適用を特に困難にしてきた。

この状況の中、研究代表者らは 2005 年、新世代の FDCD 装置を開発した。楕円形の焦点の性質を利用して蛍光の異方性をキャンセルする楕円鏡型構造を採用して、「にせ FDCD 信号」の問題を原理的に解消し、さらに同構造による効果として測定感度の向上も同時に達成した。現在、この新世代 FDCD 装置が、反応途中のタンパク質の立体構造解析などに応用できる可能性があり、タンパク質の特定部位周辺の高次構造をピンポイントで検出する、唯一の方法である。

2. 研究の目的

新世代の FDCD 装置は、2005 年に研究代表者らが開発したものの、有用性を示す報告例が少ないこともあり、まだ多く市場に普及していない。本研究ではこの装置の利用法として、たとえ夾雑物が存在していても、溶液中の狙ったタンパク質から必要な立体情報を選択して切り出す「ピンポイント解析法」として確立することを、長期的な目的とした。

目的へのアプローチとして、(1) 一般に蛍光偏光の見られるタンパク質でも「にせ FDCD 信号」を解消できるのか、(2) タンパク質のどのような立体構造情報を観測することが

できるのか、(3) 夾雑物との混合溶液でも目的のタンパク質だけを観測することができるのか、の三点を明らかにすることを中期的な目標とした。

本研究では、ベンチマークとなるタンパク質として生体反応の多くで調節に関わるカルモジュリン (CaM) を選んだ。CaM は、細胞内のカルシウムイオンや結合ペプチドの有無に応答して、その構造を特徴的に変化させるため、FDCD の変化を構造変化と関係づけるのに都合が良いと予想された。また、多くの生物種間で配列がよく保存されており、研究成果を発展させる選択肢が広い。さらにタンパク質の構造研究で長く注目されているため、構造に関する報告が多い上に、大量発現の方法も多く知られている。ラベル化の方法や変異体の報告も数多く、研究方法の選択肢も多く都合が良いと考えた。

立体構造の変化と FDCD スペクトルの関係の見極めには、市販の既知タンパク質であるメトミオグロビン (MMG) を用いた。MMG は pH 変化に対して、二次構造と三次構造とが異なる変性特性を示すため、CD や FDCD によってそれらを区別して観測できると考えた。

3. 研究の方法

馬の心筋 MMG は市販のものを使用し、溶液の pH を塩酸によって制御しながら、CD および FDCD を測定した。

ラットの CaM は大腸菌に大量発現させ、これをクロマトグラフィーにより精製した。得られた CaM に、常法によってダンシル基を導入し、蛍光性のモデルタンパク質 DNS-CaM へと誘導した。DNS-CaM のラベル化部位は、ペプチドマスフィンガープリンティング法により Lys77 と特定した。これは CaM をダンベル型と見立てたときの持ち手部分に相当し、ペプチドとの結合に際して相互作用を邪魔しない位置であり、結合ペプチドとの相互作用は非ラベル化 CaM と同等である。ラベル化により得られた DNS-CaM は蛍光性で、9, 10-DPA の蛍光を基準としたとき、DNS-CaM の蛍光量子収率は 0.1 をやや下回る程度であった。

CD および FDCD の測定では、DNS-CaM の溶液に、Ca²⁺のキレートである EGTA を加えて Ca²⁺とした。ここに過剰な Ca²⁺イオン、さらに結合ペプチドを加えて、CD および FDCD を測定した。結合ペプチドとしては、ミツバチの毒メリチン、CaM 結合タンパク質作用部位のペプチドモデル (CKII²⁸¹⁻³⁰⁹) の他、いくつかのペプチドを用いた。

本研究では新世代の FDCD 測定装置として、研究代表者らの開発したプロトタイプ楕円鏡型 FDCD 装置を使用した。

4. 研究成果

新世代の FDCD 測定装置が「にせ FDCD 信号」の発生を解消できるかどうかを確認するため、DNS-CaM の FDCD スペクトルを、従来の FDCD 測定装置と比較した。CD と FDCD を測定した同じ溶液と装置で、蛍光検出直線偏光二色性 (FDLD) も併せて測定し、得られた FDLD から「にせ FDCD 信号」を見積もって FDCD 生データと比較した。図 1 (点線が「にせ FDCD 信号」、実線が FDCD 生データ) に示すように、従来の FDCD 測定装置 (A) では「にせ FDCD 信号」と FDCD 生データがほぼ一致するため真の FDCD 曲線がほとんど読み取れないのに対して、新世代の FDCD 測定装置 (B) では「にせ FDCD 信号」がほぼゼロとなり、FDCD 生データがそのまま真の FDCD 曲線となる。

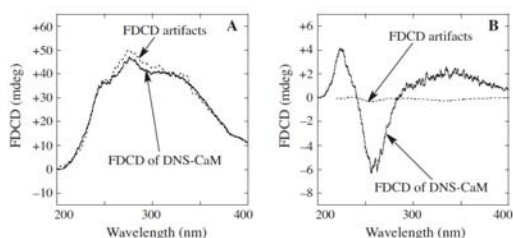


図 1 にせ FDCD 信号の解消

MMG は弱酸性 (pH 4.0) 溶液中で、二次構造は保持されたまま三次構造のみが変性し、強酸性 (pH 2.0) となると三次構造も変性することが知られている。図 2 (A および B はそれぞれ、CD および FDCD スペクトル) に示すように、MMG の溶液を中性 (実線) から pH 4.0 (小点線)、pH 2.0 (中点線) と段階的に変性させたとき、CD スペクトルは二次構造の変化に呼応した変化を示した。これに対して FDCD スペクトルは、三次構造の変化に伴い順次、変化することが明らかとなった。すなわち、タンパク質の立体構造解析において、CD スペクトルは主に二次構造の、FDCD スペクトルは主に三次構造の変化を敏感に反映することが明らかとなった。

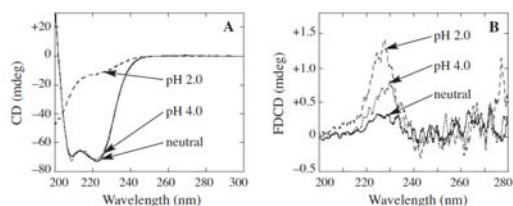


図 2 MMG 変性状態の観測

DNS-CaM はカルシウムイオンの有無により立体構造が大きく変化することが知られている。図 3 (A および B はそれぞれ、CD および FDCD スペクトル) に示すように、 Ca^{2+} の添加前後 ($-\text{Ca}^{2+}$ が黒実線、 $+\text{Ca}^{2+}$ が灰色線) で、CD スペクトルでは波形は変わらず強度だけが変化したのに対して、FDCD スペクトルでは広い波長領域で符号を含めて波形が大きく変化した。

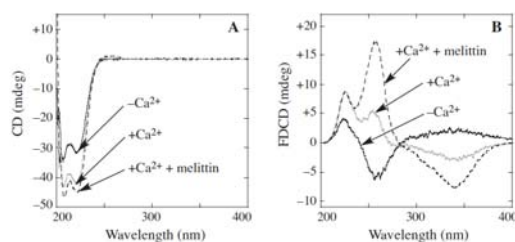


図 3 DNS-CaM の構造変化の観測

試料溶液を段階的に希釈しながらこの変化を CD と FDCD で追跡すると、 Ca^{2+} の有無を CD では判定できない濃度まで希釈してもなお、FDCD では差異が明瞭に観測された。この結果から、ダンシル基を用いたときの測定感度は、FDCD の方が CD よりも少なくとも数倍程度、高いことが分かった。ダンシル基の量子収率は 0.1 以下であることから、感度については適切なラベル基を選ぶことで、さらに向上する可能性がある。

図 3 はさらに、メリチン添加の様子も示している。メリチンは $+\text{Ca}^{2+}$ の条件で CaM と結合するとの報告がある。これを DNS-CaM 溶液で再現し、FDCD を測定すると $-\text{Ca}^{2+}$ 、 $+\text{Ca}^{2+}$ および $+\text{Ca}^{2+}$ + メリチン (点線) の 3 つの状態を、230, 260, 330 nm における符号と強度から、明確に区別できることが分かった。このとき CD では、強度のみがわずかに変化するだけであった。

ペプチドモデル CKII²⁸¹⁻³⁰⁹ を用いた測定結果からは、FDCD シグナルが DNS-CaM の構造のみに依存しており、溶液中のペプチドの総和として観測しているのではないことを示す結果が得られた。CD ではペプチドの総和を観測しているため、 $-\text{Ca}^{2+}$ の条件、すなわち、ペプチドが DNS-CaM に結合しない条件でもスペクトルに変化があるかのように見える。一方 FDCD では、ペプチドが結合しない条件では DNS-CaM のスペクトルに変化はまったく見られない。これは蛍光性の部位だけを観測するという FDCD の原理によって、矛盾なく説明できる。

ペプチドが DNS-CaM に結合する $+\text{Ca}^{2+}$ の条件

では、FDCD スペクトルは確かに明瞭な変化を示し、やはり広い波長範囲で符号と強度の変化を見るだけで間違いなく溶液状態を区別することが可能であった。CD スペクトルでは強度のみが大きく変化したが、波形と符号に変化はなかった。

FDCD では結合ペプチドと DNS-CaM の当量関係も的確に反映しており、例えば DNS-CaM の半量に相当する結合ペプチドでは FDCD 変化も半分だけになる一方、過剰量の結合ペプチドを加えても DNS-CaM の FDCD 変化は頭打ちになり、それ以上は変化しない。

FDCD により DNS-CaM の明瞭な構造変化を観測できたのは、DNS-CaM に強く結合するペプチドの場合のみであった。例えば、ポリリシンで DNS-CaM との結合を示す報告はなく、これに加えても FDCD の変化は観測されなかった。その他にも入手可能なペプチドに対して同様の実験を続けているが、現在のところ矛盾する結果は観測されていない。

以上のように、新世代の FDCD 測定装置はタンパク質の立体構造研究に適用可能であることが示された。従来の FDCD 測定装置で長く問題であった「にせ FDCD 信号」は、新世代の FDCD 測定装置ならば、分子量の大きいタンパク質の場合でも発生しないため、FDCD 生データはそのままタンパク質の立体構造の情報を示す。タンパク質の FDCD スペクトルは主に三次構造の変化を鋭敏に反映する。ペプチドなどの夾雑物を含むタンパク質溶液に適用したときでも、目的のタンパク質の FDCD スペクトルだけを選択的に観測することができる。この結果は、FDCD がタンパク質の立体構造をピンポイントで観測する手段として非常に有望であることを示している。

CD がタンパク質の二次構造を反映するのに対し、FDCD は蛍光ラベルと芳香族アミノ酸残基との位置関係を観測しているものと考えられる。すなわち FDCD では、適切な蛍光ラベル基を狙った部位に導入することにより、その部位を中心としたタンパク質の三次構造をピンポイントで解析できる可能性がある。

現在までのところ、タンパク質の立体構造と FDCD スペクトルの波形とは、完全に関連づけされていない。現在は、X 線などで構造決定されている CaM の構造を精査し、有機合成による適切なモデルの解析や CD の理論計算などを組み合わせた詳細な解析や、系統的なモデルペプチド合成によるライブラリー解析などを試みながら、FDCD 曲線の解釈を示

すべく実験と理論の両面から検討を継続している。

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 1 件)

T. Nehira, K. Ishihara, K. Matsuo, S. Izumi, T. Yamazaki, and A. Ishida, A sensitive method based on fluorescence-detected circular dichroism for protein local structure analysis, *Analytical Biochemistry*, 査読有, 430, 2012, 179-184, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ab.2012.08.020>

[学会発表] (計 2 件)

① 根平達夫, 石原郁, 松尾光一, 泉俊輔, 山崎岳, 石田敦彦, 蛍光検出円二色性 (FDCD) 測定装置によるタンパク質立体構造のピンポイント解析の可能性, 第 85 回日本生化学会大会, 2012 年 12 月 14-16 日, 福岡

② 石原郁, 泉俊輔, 石田敦彦, 山崎岳, 根平達夫, 蛍光検出円二色性 (FDCD) を用いたタンパク質立体構造のピンポイント解析の試み, 第 33 回日本分子生物学会年会/第 83 回日本生化学会大会 合同大会, 2010 年 12 月 7-10 日, 神戸

6. 研究組織

(1) 研究代表者

根平 達夫 (NEHIRA TATSUO)

広島大学・大学院総合科学研究科・助教

研究者番号: 60321692

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

山崎 岳 (YAMAZAKI TAKESHI)

広島大学・大学院総合科学研究科・教授

研究者番号: 30192397

石田 敦彦 (ISHIDA ATSUHIKO)

広島大学・大学院総合科学研究科・准教授

研究者番号: 90212886

平野 哲男 (HIRANO TETSUO)

広島大学・大学院総合科学研究科・助教

研究者番号: 50228805