

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23570188

研究課題名(和文)天然変性蛋白質による分子認識の物理的基盤

研究課題名(英文)Physical basis for the molecular recognition by intrinsically disordered proteins

研究代表者

新井 宗仁 (ARAI, MUNEHITO)

東京大学・総合文化研究科・准教授

研究者番号：90302801

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円、(間接経費) 1,290,000円

研究成果の概要(和文)：「天然変性蛋白質」は、近年発見された新しいカテゴリーの蛋白質であり、単独では特定の構造を持たないが、標的分子を認識・結合するという機能発現と同時にフォールディング(構造形成)する。天然変性蛋白質は、高等生物が持つ蛋白質の約4割を占めることから、その分子認識機構の解明が重要課題となっている。本研究では、複数の天然変性蛋白質の標的分子認識機構を、核磁気共鳴(NMR)法などを用いて調べた。その結果、天然変性蛋白質は極めて高速で分子認識可能なことや、天然変性蛋白質に応じて誘導適合機構と構造選択機構といった機構で分子認識することなどが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Intrinsically disordered proteins (IDPs) have disordered structures in isolation but fold into specific structures upon binding to their partner molecules. Because 40% of eukaryotic proteins are considered to be IDPs, elucidation of the mechanism of molecular recognition by IDPs has been one of the crucial issues in biophysics. Here, we investigated the mechanisms of molecular recognition by IDPs using NMR and other techniques. We found that IDPs can recognize partner molecules very rapidly and that both the induced-fit and the conformational selection mechanisms are utilized in the recognition of partner molecules depending on IDPs.

研究分野：生物物理学

科研費の分科・細目：生物科学・生物物理学

キーワード：蛋白質 フォールディング 分子認識 天然変性蛋白質

1. 研究開始当初の背景

「天然変性蛋白質」は、近年発見された新しいカテゴリーの蛋白質であり、高等生物が持つ蛋白質の約4割を占めることから、その機能発現機構の解明が重要課題となっている。天然変性蛋白質は、生理的条件下では特定の構造を持たないが、標的分子を認識・結合するという機能発現と同時にフォールディング(構造形成)する。したがって、天然変性蛋白質による分子認識機構の全貌を解明するためには、フォールディングという物理的な観点からの研究が必要である。しかし、このような観点からの研究は不十分であり、天然変性蛋白質による分子認識機構は未解明であった。

2. 研究の目的

(1) 天然変性蛋白質が標的蛋白質に結合してフォールディングする反応の分子機構を解明する。特に、「結合してからフォールディングする」という誘導適合機構(induced-fit)と、「フォールディングしてから結合する」という構造選択機構(conformational selection)のどちらの機構で説明できるのかを明らかにする。

(2) 複数の天然変性蛋白質の分子認識機構を解明することにより、普遍的な分子認識機構が存在するかどうかを検討する。

(3) 蛋白質のフォールディングや結合などに関する物理的性質を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 天然変性蛋白質と標的蛋白質との結合の強さ(解離定数)の測定には、核磁気共鳴(NMR)滴定法と蛍光滴定法を用いた。

(2) 天然変性蛋白質による標的分子認識反応の速度の測定には、NMR滴定法、NMR R_2 緩和分散法、およびストップフロー蛍光法を用いた。

(3) これらの測定データは、特異値分解法、グローバル解析法、NMR線形解析などを取り入れたソフトウェアを自作することによって解析した。

4. 研究成果

(1) **天然変性蛋白質 p53 による標的蛋白質 CBP TAZ2 の認識**：まず、複雑な結合様式を持つ蛋白質の NMR 滴定データを解析する方法を開発した。この方法を用いた結果、がん抑制因子 p53 の N 末端転写活性化ドメインにある天然変性領域 AD1 および AD2 は、転写コアクチベータ CBP の TAZ2 ドメイン上にそれぞれ 2 か所の結合部位を持つことがわかっ

た(図1)。また、p53 AD2 による TAZ2 認識速度($1.7 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$)を明らかにした。この速度は、これまでに知られている蛋白質間結合速度の中で最速であり、拡散律速限界に近い。これは、AD2 の負電荷と TAZ2 の正電荷間の強い静電引力によって実現されると考えられる。天然変性蛋白質には電荷が多く、それゆえに変性構造をとる。本研究の結果は、一般に、天然変性蛋白質が関与する結合は極めて速いことを示唆する。

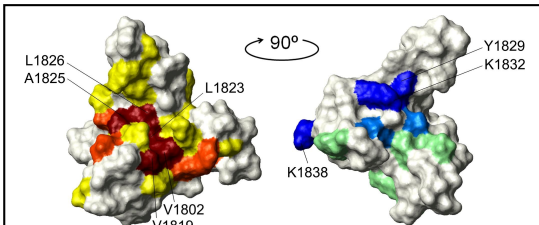


図1. 転写コアクチベータ CBP の TAZ2 ドメイン上にある天然変性蛋白質 p53 AD2 の結合部位。(左)高親和性結合部位。(右)低親和性結合部位。

(2) **天然変性蛋白質 Tat による標的分子 TAR の認識**：ヒト免疫不全ウイルス HIV-1 由来の天然変性蛋白質 Tat による TAR 核酸の認識反応をストップフロー蛍光法で測定した。その結果、数ミリ秒以内に結合反応が起き、そのあとに Tat の構造変化が起きることが示唆された。したがって、Tat-TAR 認識反応は、誘導適合機構によって起きると考えられる。

(3) **天然変性蛋白質 c-Myb による標的蛋白質 CBP KIX の認識**：転写因子 c-Myb の天然変性領域による転写コアクチベータ CBP の KIX ドメインの分子認識反応を、NMR を用いた R_2 緩和分散法によって詳細に調べた。その結果、安定な中間体を形成しない二状態的な反応で分子認識することが明らかになった。また、アミノ酸残基レベルでの解析結果から、結合反応の遷移状態において、核となる相互作用や構造が形成されていることが示唆された。このことから、c-Myb は、構造選択機構によって標的分子を認識することが示唆される。

(4) **天然変性蛋白質による分子認識には普遍的機構は存在するか?**：本研究により、天然変性蛋白質 Tat と c-Myb は、それぞれ、誘導適合機構と構造選択機構で分子認識することが示唆された。したがって、天然変性蛋白質による分子認識機構は、天然変性蛋白質に応じて異なっており、普遍的な認識機構は存在しないことが示唆される。今後は、天然変性蛋白質による分子認識機構を決定する因子の解明が重要な課題であろう。

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)

Ohori, Y., Okazaki, H., Watanabe, S., Tochio, N., Arai, M., Kigawa, T., & Nishimura, C. Flexible and rigid structures in HIV-1 p17 matrix protein monitored by relaxation and amide proton exchange with NMR. *Biochim. Biophys. Acta* 1844(3), 520-526 (2014). (査読有)

DOI: 10.1016/j.bbapap.2013

新井宗仁. NMR によるタンパク質-リガンド相互作用の定量解析法. *生物物理* 53(6), 305-308 (2013). (査読有)

<http://ci.nii.ac.jp/naid/130003382514>

Oikawa, H., Suzuki, Y., Saito, M., Kamagata, K., Arai, M., & Takahashi, S. Microsecond dynamics of an unfolded protein by a line confocal tracking of single molecule fluorescence. *Scientific Reports* 3, 2151 (2013). (査読有)

DOI: 10.1038/srep02151

Arai, M., Ferreon, J.C., & Wright, P.E. Quantitative analysis of multisite protein ligand interactions by NMR: binding of intrinsically disordered p53 transactivation subdomains with the TAZ2 domain of CBP. *J. Am. Chem. Soc.* 134(8), 3792-3803 (2012). (査読有)

DOI: 10.1021/ja209936u

Arai, M., Iwakura, M., Matthews, C.R., & Bilsel, O. Microsecond subdomain folding in dihydrofolate reductase. *J. Mol. Biol.* 410(2), 329-342 (2011). (査読有)

DOI: 10.1016/j.jmb.2011.04.057

[学会発表](計32件)

新井宗仁「タンパク質のコンホメーションとその異常」東京大学教養学部統合自然科学科 駒場サイエンス倶楽部、2013年12月17日、東京大学(東京都目黒区) Taihei Sawada, Takahiro Watanabe, Yuuki Hayashi, Munehito Arai, "Development of a novel affinity ligand for purification of antibodies at moderate pH", 第51回日本生物物理学会年会、2013年10月30日、国立京都国際会館(京都府京都市)

Takuhiro Otsu, Kunihiko Ishii, Hiroyuki Oikawa, Munehito Arai, Satoshi Takahashi, and Tahei Tahara, "Two-dimensional fluorescence lifetime correlation spectroscopy on the conformational dynamics of the unfolded state of BdpA", 第51回日本生物物理学会年会、2013年10月30日、国立京都国際会館(京都府京都市)

Hiroyuki Oikawa, Kiyoto Kamagata, Munehito Arai, Satoshi Takahashi,

"Improvements of the line confocal system for the single molecule tracking of fast folding dynamics of the B domain of protein A", 第51回日本生物物理学会年会、2013年10月29日、国立京都国際会館(京都府京都市)

Yasunori Ohba, Tetsuya Itabashi, Munehito Arai, Jun Abe, Satoshi Takahashi, Seigo Yamauchi, "Dynamics of spin-labeled denatured protein studied by multi-frequency electron paramagnetic resonance", 第51回日本生物物理学会年会、2013年10月28日、国立京都国際会館(京都府京都市) 新井宗仁「NMRによるタンパク質-リガンド相互作用の定量解析法」第14回若手NMR研究会、2013年6月29日、京都トラベラーズ・イン(京都府京都市)

小井川浩之、鈴木雄太、鎌形清人、新井宗仁、高橋聡「ライン共焦点顕微鏡による蛋白質折り畳み運動のマイクロ秒分解一分子蛍光追跡」第13回日本蛋白質科学会年会、2013年6月12日、とりぎん文化会館(鳥取県鳥取市)

Munehito Arai, "Molecular recognition by intrinsically disordered proteins", International Symposium on Protein Folding and its Biological Significance, 2013年3月4日、岡崎コンファレンスセンター(愛知県岡崎市)

Kouhei Sodeyama, Takashi Nakamura, Koki Makabe, Kunihiro Kuwajima, Munehito Arai, "Recognition mechanism of a TAR nucleic acid by HIV-1 Tat, an intrinsically disordered protein", 新学術領域研究「揺らぎが機能を決める生命分子の科学」第6回国際公開シンポジウム、2012年12月5日、京都テルサ(京都府京都市)

Munehito Arai, H. Jane Dyson, Peter E. Wright, "Mechanism of coupled folding and binding of intrinsically disordered proteins", 新学術領域研究「揺らぎが機能を決める生命分子の科学」第6回国際公開シンポジウム、2012年12月5日、京都テルサ(京都府京都市)

Hiroyuki Oikawa, Yuta Suzuki, Masataka Saito, Kiyoto Kamagata, Munehito Arai, Satoshi Takahashi, "Microsecond-resolved traces of protein folding by single-molecule FRET measurements", 新学術領域研究「揺らぎが機能を決める生命分子の科学」第6回国際公開シンポジウム、2012年12月5日、京都テルサ(京都府京都市)

阿部淳、新井宗仁、高橋聡、山内清語、大庭裕範「cw およびパルス EPR を用いた変性したプロテイン A の B ドメイン部位の構造解析」第51回電子スピンサイエンス学会、2012年11月1日、札幌コンベンションセンター(北海道札幌市)

Kouhei Sodeyama, Yuuki Hayashi, Takashi Nakamura, Koki Makabe, Kunihiro

- Kuwajima, Munehito Arai, "Recognition of a TAR nucleic acid by HIV-1 Tat, an intrinsically disordered protein", 第 50 回日本生物物理学会年会、2012 年 9 月 22 日、名古屋大学 (愛知県名古屋市)
- Munehito Arai, Josephine C. Ferreon, Peter E. Wright, "Extremely rapid binding of the intrinsically disordered p53 transactivation subdomain with the TAZ2 domain of CBP", 第 50 回日本生物物理学会年会、2012 年 9 月 22 日、名古屋大学 (愛知県名古屋市)
- Hiroyuki Oikawa, Yuta Suzuki, Kiyoto Kamagata, Munehito Arai, Satoshi Takahashi, "Microsecond-resolved traces of protein folding by single-molecule FRET measurements", 第 50 回日本生物物理学会年会、2012 年 9 月 22 日、名古屋大学 (愛知県名古屋市)
- Jun Abe, Munehito Arai, Satoshi Takahashi, Seigo Yamauchi, Yasunori Ohba, "Local and global structural analysis of denatured protein by CW and pulsed ESR", 第 50 回日本生物物理学会年、2012 年 9 月 22 日、名古屋大学 (愛知県名古屋市)
- 阿部淳、新井宗仁、高橋聡、大庭裕範、山内清語「変性したプロテイン A の構造解析：CW とパルス ESR 法」第 6 回分子科学討論会、2012 年 9 月 19 日、東京大学 (東京都文京区)
- 新井宗仁「天然変性タンパク質による標的分子認識機構」新学術領域「揺らぎと生体機能・水和と ATP」合同公開シンポジウム「ゆらぎと水 - 生命のエネルギーと機能の分子機構を探る」2012 年 9 月 15 日、大阪ガーデンパレス (大阪府大阪市)
- 新井宗仁, Josephine C. Ferreon, Peter E. Wright「天然変性タンパク質による標的分子認識機構」新学術領域「揺らぎと生体機能・水和と ATP」合同公開シンポジウム「ゆらぎと水 - 生命のエネルギーと機能の分子機構を探る」2012 年 9 月 14 日、大阪ガーデンパレス (大阪府大阪市)
- 小井川浩之、鈴木雄太、斉藤雅嵩、鎌形清人、新井宗仁、高橋聡「マイクロ秒分解一分子蛍光検出による変性タンパク質の高速揺らぎ」新学術領域「揺らぎと生体機能・水和と ATP」合同公開シンポジウム「ゆらぎと水 - 生命のエネルギーと機能の分子機構を探る」2012 年 9 月 14 日、大阪ガーデンパレス (大阪府大阪市)
- 21 袖山浩平、林勇樹、中村敬、真壁幸樹、桑島邦博、新井宗仁「天然変性タンパク質 HIV-1 Tat と核酸分子 TAR との相互作用解析」第 12 回日本蛋白質科学会年会、2012 年 6 月 21 日、名古屋国際会議場 (愛知県名古屋市)
- 22 小井川浩之、鎌形清人、新井宗仁、飯島一生、芳坂貴弘、高橋聡「マイクロ秒分解一分子 FRET 測定による蛋白質構造変化の追跡」第 12 回日本蛋白質科学会年会、2012 年 6 月 21 日、名古屋国際会議場 (愛知県名古屋市)
- 23 新井宗仁, Josephine C. Ferreon, Peter E. Wright「天然変性タンパク質 p53 による標的タンパク質 CBP の分子認識」生物物理関東地区研究会、2012 年 3 月 5 日、東京農工大学 (東京都小金井市)
- 24 Munehito Arai, "Molecular recognition by intrinsically disordered proteins", 4th Japan-Korea Seminar on Biomolecular Sciences Experiments and Simulations, 2012 年 1 月 9 日、東大寺総合文化センター (奈良県奈良市)
- 25 Kouhei Sodeyama, Munehito Arai, "Mechanism of TAR RNA recognition by HIV-1 Tat, an intrinsically disordered protein", 新学術領域研究「揺らぎが機能を定める生命分子の科学」第 5 回国際公開シンポジウム、2012 年 1 月 7 日、東大寺総合文化センター (奈良県奈良市)
- 26 Munehito Arai, Josephine C. Ferreon, Peter E. Wright, "Extremely rapid binding of the p53 transactivation subdomain with the TAZ2 domain of CBP", 新学術領域研究「揺らぎが機能を定める生命分子の科学」第 5 回国際公開シンポジウム、2012 年 1 月 7 日 (土) 東大寺総合文化センター (奈良県奈良市)
- 27 阿部淳、新井宗仁、大庭裕範、山内清語、高橋聡「二量子コヒーレンス EPR 法による変性したタンパク質の構造解析：プロテイン A」第 50 回電子スピサイエンス学会年会、2011 年 11 月 16 日、仙台国際センター (仙台市青葉区)
- 28 新井宗仁「蛋白質による標的分子認識のメカニズム」公開シンポジウム「蛋白質の機能を解き明かす多彩なアプローチ」2011 年 10 月 17 日、横浜市立大学 (神奈川県横浜市)
- 29 阿部淳、新井宗仁、大庭裕範、山内清語、高橋聡「変性状態におけるプロテイン A の二量子コヒーレンス ESR 法を用いた構造解析」第 5 回分子科学討論会、2011 年 9 月 21 日、札幌コンベンションセンター (北海道札幌市)
- 30 Munehito Arai, "Tackling the protein fluctuation problem by systematic amino acid substitutions", 日本生物物理学会第 49 回年会・シンポジウム「生命分子の揺らぎを探る新たなアプローチ」2011 年 9 月 17 日、兵庫県立大学 (兵庫県姫路市)
- 31 Munehito Arai, Masahiro Iwakura, C. Robert Matthews, Osman Bilisel, "Microsecond subdomain folding in dihydrofolate reductase", 日本生物物理学会第 49 回年会、2011 年 9 月 17 日、兵庫県立大学 (兵庫県姫路市)
- 32 Munehito Arai, H. Jane Dyson, Peter E. Wright, "Leu628 of the KIX domain of CBP is a key residue for the interaction with the

MLL transactivation domain", 第 11 回日本
蛋白質科学会年会、2011 年 6 月 8 日、ホ
テル阪急エキスポパーク(大阪府吹田市)

〔図書〕(計 1 件)

新井宗仁. タンパク質の揺らぎと機能
~ 結合と触媒 ~ 「揺らぎ・ダイナミクス
と生体機能 ~ 物理化学的視点から見た
生体分子 ~ 」(寺嶋正秀 編) pp.267-280,
化学同人(2013)

〔その他〕

ホームページ

<http://folding.c.u-tokyo.ac.jp/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

新井 宗仁 (ARAI, Munchito)

東京大学・大学院総合文化研究科・准教授

研究者番号 : 9 0 3 0 2 8 0 1