

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：32511

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23590049

研究課題名(和文) ウイルス天然変性蛋白質の多形構造形成とNMR解析

研究課題名(英文) NMR approach and prediction for the residual structures in the intrinsically disordered proteins

研究代表者

西村 千秋 (NISHIMURA, Chiaki)

帝京平成大学・薬学部・教授

研究者番号：70218197

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：ウイルス天然変性蛋白質に焦点を当て、NMRによる実験結果と一次配列から予測される天然変性部位を比較した。はしかウイルスNtail蛋白質とアルファシヌクレインでは、僅かな残存多形構造が実験から観測された。Ntailには一本のヘリックスと若干のベータ構造が存在し、シヌクレインにはN端とC端ドメインにかすかな2次構造が観測された。これらの残存構造が機能発現に関連すると思われる。HIV-1のp17マトリックスとp24カプシド蛋白質では、1次配列から予測されるほど天然変性は実験で観測されなかった。カプシド蛋白質では生理的条件下での不安定化を試み、新たに検出された揺らぎ構造が予測天然変性部位と一致した。

研究成果の概要(英文)：Residual and ensemble structures in intrinsically disordered proteins can be directly related to their functions. For alpha-synuclein, the N- and C-terminal domains were slightly more protected from the amide-proton exchange than the other regions monitored by CLEANEX-PM. Chemical shift studies and delta2d analyses were powerful tools to figure out the minor populations of the residual alpha- and beta-structures for the measles virus C-terminal domain Ntail of nucleoprotein. The amounts of residual structures in both proteins were very small. HIV-1 p17 matrix protein and p24 capsid N-terminal domain fold in the physiological condition as globular proteins, although two proteins were predicted to be 50% unfolded based on the sequence. The order-parameter studies on p17 revealed that the more flexibility was included in helix 5 than in the other helices. For p24, the long-range effects by the addition of the unnecessary tag on the dynamics structures were observed at helices 4 and 6.

研究分野：物理系薬学

キーワード：核磁気共鳴 天然変性蛋白質 残存構造 2次構造 緩和時間 化学シフト 揺らぎ構造 ウイルス

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 天然変性蛋白質は、生理的な条件下でも折りたたまれない蛋白質の総称であり、全蛋白質の 30% もの蛋白質がその分類に属することがわかってきた。核内の転写因子の中に多く存在することより、申請者は遺伝子に関連が深いウイルス中での天然変性蛋白質の存在の可能性に興味を持ち、ウイルス天然変性蛋白質の同定と構造解析を行う研究の発想に至った。

(2) 天然変性蛋白質にも、“残された”構造が存在することが多く報告され、その構造はその後の蛋白質の行く末に関わっている。一方その残存構造は、蛋白質の構造形成(折りたたみ)過程の途中で、何らかの原因で止まってしまった構造として考えることもできる。これまで折りたたみ中間体の研究を行ってきた申請者は、その中間体と天然変性蛋白質の残存構造の類似性と相違を比較したいという着想にいたり、研究を開始した。

(3) 溶液 NMR 法といえども、変性蛋白質の構造解析に際しては、困難な点が多く存在する。蛋白質の酸変性、変性剤変性と熱変性の NMR による研究にこれまで従事してきた申請者は、生理的な条件下でも変性構造をとる天然変性蛋白質に対して、新しい解析法の確立を目指したいという発想のもとに研究を計画した。

### 2. 研究の目的

(1) 種々の天然変性蛋白質の段階的な構造の解析法を目指す。天然変性度に応じた NMR ならではの揺らぎ運動解析と変性状態解析の測定系を用いて、それぞれ異なる天然変性度を持つ蛋白質に応用していき、個々の蛋白質の持つ天然変性度を格付けしていくことを目的とする。本研究ではアミノ酸 1 次配列から、天然変性度が高いと予測されるウイルスなどの蛋白質を選び、その天然変性を具体的に NMR で解析した。さらにすでに周知の天然変性蛋白質の天然変性度と比較して議論した。

(2) 天然変性度を正確に格付けできる新しい測定方法を開発することを目的とする。変性状態の多形平均構造として観測される中の残存構造を、具体的に個々の多形構造として解析できる方法を開発する。定量的に天然変性度が評価できる測定法を見出す。

### 3. 研究の方法

(1) HIV-1 より p17 マトリックス蛋白質と p24 カプシド蛋白質 N 端ドメインを作成した。この二つの蛋白質からは、アミノ酸配列から判断できる天然変性度構造予測の PONDR を用いると、高い天然変性度が予測されたが、実際には球状蛋白質として構造決定がすでになされている。しかしウイルスの核蛋白質 C

端ドメインの N<sub>tail</sub> 蛋白質とウシの視覚に関連する peripherin-2 の C 端ドメイン蛋白質は、かなり天然変性度の高い蛋白質として、本解析に用いられた。アルファ シヌクレインは、アミロイドを形成することが知られており、極めて高い天然変性度を示していた。

(2) 以上の 5 種の蛋白質を用いて、NMR の測定から得られる化学シフトと、化学シフト値を用いたデルタ 2d 解析による 2 次構造解析、緩和実験である T<sub>1</sub> と T<sub>2</sub>、さらに異核 NOE 実験から得られるピコ秒からナノ秒の時間オーダーの揺らぎ構造解析とオーダーパラメータの計算、またシグナル強度、そして CLEANEX-PM 法によるミリ秒時間領域のアミドプロトン交換などを指標として用いて、それぞれ蛋白質の持つ天然変性度を多角的観点より評価した。

### 4. 研究成果

(1) アルファ シヌクレインの残存構造解析は、短い時間におけるアミドプロトン交換観測が可能な CLEANEX-PM 法を用いることによって行われた。ほとんど変性している蛋白質のアミドプロトン交換は、非常に短い時間内でも起こりうる。特に 10-100 ミリ秒のような短い時間内のアミドプロトン交換によって、残存構造などの弱いアミドプロトンのプロテクションを観測することが可能である。さらに pH を変化させて異なる条件下で測定することにより、pH に依存した正確なアミドプロトン交換が観測された。従来の水素重水素交換法によって、球状蛋白質では、分から時間領域の反応のアミドプロトン交換が観測され、その交換の EX2 モードが示されたが、この CLEANEX-PM 法においても本研究において、交換速度の pH 依存性である EX2 モードが、ミリ秒の時間オーダーで天然変性蛋白質において示された。その結果より、化学シフト値からはほとんど構造がないと考えられたアルファ シヌクレインにおいても、N 端と C 端ドメインにおいて、残存構造形成によると思われる弱いプロテクションが観測された。このことからアルファ シヌクレインにおいては、単量体あるいは 2 量体形成により、N 端ドメインと C 端ドメインが相互作用する可能性が考えられた(Okazaki et al., (2013) FEBS Lett.)。

(2) p17 マトリックス蛋白質はヘリックス 1 と 3 と 5 の位置において、アミノ酸配列から天然変性度が高いと予測されている。すでに球状蛋白質としての構造が決定されており、この不一致はどうして起こるのかを明らかにするために、ナノ秒からピコ秒の速い時間領域での揺らぎ運動を観測できる緩和実験を行い、p17 マトリックス蛋白質の揺らぎ構造の存在を明らかにした。さらにミリ秒時間オーダーの揺らぎ運動を観測できる CLEANEX-PM 法を用いて解析した。ヘリックス

3 と 4 間のループは、ループの中で最も高い運動性を示していた。さらにヘリックス 5 においては、オーダーパラメータの計算結果より、運動性が他のヘリックス部分よりも上がっていることがわかった。長い C 端領域部分の柔軟な構造が、配列上隣り合っているヘリックス 5 の部分の構造の運動性も上昇させていると結論した(Ohori et al., (2014) BBA Proteins and Proteomics)。

(3) p24 カプシド蛋白質は、p17 マトリックス蛋白質の合成と同時に出来上がるが、遺伝子配列上考えられる Gag 蛋白質の一つであり、両蛋白質とも複雑に重合して HIV-1 遺伝子の本体の RNA を包み込む構造蛋白質としての機能がある。その p24 も多くの天然変性部位を含むとアミノ酸配列から予測されているが、実際にはその球状構造が解かれている。このような p24 を生理的条件下で不安定化させるために、p24 の N 端ドメインを研究対象に選び、余分なタグ配列を N 端あるいは C 端に残して作成し、そのタグの分子全体への構造的影響を調べた。非常に高い揺らぎの運動性を持つタグが、余分に N 端あるいは C 端に結合していると、生理的条件下でも分子構造的に、分子全体を不安定化できると考えた。

緩和実験と CLEANEX-PM のアミドプロトン交換実験の結果より、N 端 C 端のどちらにタグを付けた場合でも、34 ループとヘリックス 6 を含む同じ部位で、揺らぎの上昇した構造が観測された。さらに N タグを付けた場合には、それに加えてヘリックス 4 の部分での揺らぎ運動の増加が観測された。つまりこのように段階的な(一段階目: 34 ループとヘリックス 6、二段階目: ヘリックス 4)揺らぎ多形構造の増加が、タグの付加によって起こった。このことは、この蛋白質からは配列に基づく、高い天然変性度が予測されたが、実際にはぎりぎりのところで構造が安定化されており、球状構造を形成している可能性が示された(Okazaki et al., (2014) BBA Proteins and Proteomics)。

(4) はしかウイルス核蛋白質の C 端ドメインに相当する  $N_{tail}$  蛋白質と、ウシの視覚に関する peripherin-2 の C 端領域の断片の構造を解析した。一次配列からの予測に基づく、両蛋白質ともに高い天然変性度を持っていたが、化学シフト値からすると、両蛋白質ともに中央部に一本のヘリックスが存在していた。さらに化学シフト値を詳細にデルタ 2d 法によって解析したところ、少量のベータ構造も両蛋白質ともに点在して含んでいることがわかった。シグナル強度の値として、 $N_{tail}$  蛋白質では配列と全く関連なく、ばらばらの強度を与えたが、やや変性度が  $N_{tail}$  蛋白質よりも低い peripherin-2 では、全体的に見てヘリックスの位置でのシグナル強度が弱まっており、配列との相関が観測された。

CLEANEX-PM 法によって残存構造の部位を、アミドプロトン交換のプロテクションの観点から特定した。その結果は、それぞれヘリックスの位置ではあまりプロテクトされておらず、peripherin-2 断片では N 端の部分、 $N_{tail}$  ではヘリックス部分のやや後ろのベータ構造の部分が、交換から弱くであるがプロテクトされていた。このように残存構造の中には、顕著なヘリックス構造の他に、若干ベータ構造も含まれていることがわかった(Ono, et al., (2015) BBA Proteins and Proteomics)。

(5) 本研究では種々の異なる方法により、残存構造を評価してきた。配列上では多くの部分が天然変性していると予測された二つの HIV-1 蛋白質でも、分子全体で球状構造を形成していた。この場合では、分子内で鍵となるロンゲレンジな相互作用が留め金となり、分子全体を安定化している可能性が考えられた。留め金の解除によって簡単にほどける蛋白質の特性が、RNA を覆う蛋白質として機能する場合に、有利であるのかもしれない。

一方、天然変性度が高いアルファ シヌクレインと  $N_{tail}$  蛋白質に関しては、天然変性度の比較を実験結果より行った。アルファ シヌクレインでは CLEANEX-PM 実験において、交換からプロテクトされた構造が N 端ドメインと C 端ドメインで観測されたが、化学シフト値からは、ごく小さい 2 次構造のみが観測された。 $N_{tail}$  蛋白質は化学シフト値からすると、はっきりとしたヘリックス構造が中央部に存在していたが、CLEANEX-PM 法で観測されるプロテクションはかなり低かった。このように残存構造の形成は多様であり、いくつかの複数の方法で観測し、定量的に総合的に天然変性度を評価することが必要であると思われた(図 1)。

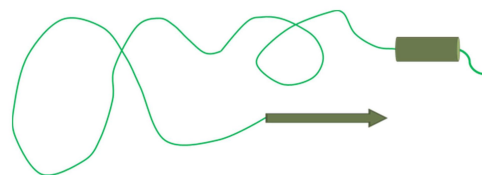


図 1 天然変性蛋白質中の残存 2 次構造

(6) 申請者は、アポミオグロビンの折りたたみ中間体の研究をこれまで行ってきた。アルファ シヌクレインと  $N_{tail}$  蛋白質の持つ残存構造中の 2 次構造は、アポミオグロビンの pH4 中間体状態でのヘリックス C と E のレベルであり、pH2 酸変性状態での残存構造中のヘリックス H の 2 次構造と同程度であると結論できた。すなわち、ヘリックス ABGH で主に構成されるアポミオグロビンのモルテングロビル状態での中間体構造中の 2 次構造よりは、ずっと少ないものであった。

部位特異変異体の作製により、折りたたみ中間体での一部のヘリックス構造を安定に形成させ、中間体構造を変化させることがで

きた(Nishimura, et al., (2011) JMB)。また NMR 以外にも FRET を用いて、中間体状態の蛋白質分子の形、動的な構造を明らかにし、天然状態とは異なる構造であるノンネイティブな構造を最近明らかにしてきた (Aoto, Nishimura et al., (2014) Biochemistry)。

今後の展望として、様々な観点から種々の測定法を用いて、中間体状態の構造のように、未熟な状態で止まってしまった天然変性蛋白質の多形残存構造を明らかにしていきたいと思っている。折りたたみ中間体の構造と天然変性蛋白質の残存構造を比較していきたい。さらに天然変性蛋白質の持つ機能との関連も明らかにしていきたい。NMR 法による新しい天然変性蛋白質の解析法の確立も現在進行中であり頑張っていきたい。

(7) 国内外の位置づけとインパクト：天然変性蛋白質であるアルファ シヌクレインと、はしかウイルス核蛋白質 C 端ドメイン N<sub>tail</sub> 蛋白質は、世界の多くの研究者が現在研究しており、その激しい競争の中、申請者も何とか論文公表を行っている。公表できた論文は、それなりに国内外にインパクトもあると思っている。申請者は、これまで折りたたみ中間体の解析に行ってきたアミドプロトン交換などを指標として、天然変性蛋白質の性格づけに努力しており、世の中の研究の小さな一端を担っていると思われる。

#### 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 6 件)

Ono, Y., Miyashita, M., Ono, Y., Okazaki, H., Watanabe, S., Tochio, N., Kigawa, T., and Nishimura, C. \*(Corresponding author): Comparison of residual alpha- and beta-structures between two intrinsically disordered proteins by using NMR *Biochim. Biophys. Acta, Proteins and Proteomics* (査読有) **1854(3)**, 229-238, 2015  
doi: 10.1016/j.bbapap.2014.12.007

Okazaki, H., Kaneko, C., Hirahara, M., Watanabe, S., Tochio, N., Kigawa, T., and Nishimura, C. \*(Corresponding author): Long-range effects of tag sequence on marginally stabilized structure in HIV-1 p24 capsid protein monitored using NMR *Biochim. Biophys. Acta, Proteins and Proteomics* (査読有) **1844(9)**, 1638-1647, 2014  
doi: 10.1016/j.bbapap.2014.06.009

Aoto, P.C.<sup>1</sup>, Nishimura, C.<sup>1</sup>, Dyson, H.J., and Wright, P.E.:

Probing the non-native H helix translocation in apomyoglobin folding intermediate *Biochemistry* (査読有) **53(23)**, 3767-3780, 2014

<sup>1</sup>Two authors contribute equally.  
doi: 10.1021/bi500478m

Oho, Y., Okazaki, H., Watanabe, S., Tochio, N., Arai, M., Kigawa, T., and Nishimura, C. \*(Corresponding author): Flexible and rigid structures in HIV-1 p17 matrix protein monitored by relaxation and amide proton exchange using NMR *Biochim. Biophys. Acta, Proteins and Proteomics* (査読有) **1844(3)**, 520-526, 2014  
doi: 10.1016/j.bbapap.2013.12.010

Okazaki, H., Oho, Y., Komoto, M., Lee, Y-H, Goto, Y., Tochio, N., and Nishimura, C. \*(Corresponding author): Remaining structures at the N- and C-terminal regions of alpha-synuclein accurately elucidated by amide-proton exchange NMR with fitting *FEBS Lett.* (査読有) **587(22)**, 3709-3714, 2013  
doi: 10.1016/j.febslet.2013.09.039

Nishimura, C., Dyson, H.J. and Wright, P.E.: Consequence of stabilizing the natively disordered F helix for the folding pathway of apomyoglobin *J. Mol. Biol.* (査読有) **411(1)**, 248-263, 2011  
doi: 10.1016/j.jmb.2011.05.028

[学会発表](計 14 件)

Nishimura, C.: Dynamic structures of the intrinsically disordered proteins and folding intermediates: 7th Korea-Japan Joint Seminars on Biomolecular Sciences: Experiments and Simulations (招待講演) November 26-28, 2014, Seoul (Korea)

Ono, Y., Miyashita, M., Ono, Y., Okazaki, H., Watanabe, S., Tochio, N., and Nishimura, C.: Features of intrinsically disordered proteins monitored by NMR The 53rd Annual Meeting of the Nuclear Magnetic Resonance Society of Japan November 4-6, 2014, Osaka Univ. Convention Center (Suita-shi, Osaka)

大野 悠一、宮下 真奈美、大野 優美、岡崎 萌花、渡部 暁、栃尾 尚哉、西村 千秋: 天然変性蛋白質の段階的な NMR 解析 第 58 回日本薬学会関東支部会

2014年10月4日、昭和薬科大学  
(町田市、東京)

Nishimura, C., Aoto, P.C., Dyson, H.J. and  
Wright, P.E.:

Non-native H helix translocation in folding  
intermediate of apomyoglobin  
第52回日本生物物理学会年会、  
2014年9月25日-27日、札幌コンベンシ  
ョンセンター(札幌市、北海道)

西村 千秋:

パルスラベル重水素交換法によるフォー  
ルディング中間体の解析  
第14回日本蛋白質科学会年会アーカイブ  
WS:(招待講演)  
蛋白質のフォールディング、ミスフォー  
ルディング研究のための測定解析プロト  
コール  
2014年6月25日-27日、ワークピア横浜  
/横浜産質ホールマリネリア  
(横浜市、神奈川)

Nishimura, C., Watanabe, S. and Wright, P.E.:

Protein unfolding and disassembly monitored  
by amide proton exchange  
The 2th International Symposium: Dynamical  
Ordering of Biomolecular Systems for  
Creation of Integrated Functions:  
January 11-12, 2014, Kyoto Univ.  
(Kyoto-shi, Kyoto)

Okazaki, H., Otori, Y., Komoto, M.,  
Watanabe, S., Tochio, N., and Nishimura, C.:  
Dynamic structure of the intrinsically  
disordered proteins monitored by NMR  
The 52nd Annual Meeting of the Nuclear  
Magnetic Resonance Society of Japan  
November 12-14, 2013, Ishikawa Ongakudo  
(Kanazawa-shi, Ishikawa)

Nishimura, C., Sugiyama, Y. and Komoto, M.:

Fluctuating and Remaining Structure in the  
Intrinsically Disordered Protein Monitored  
by NMR  
The 6th International Symposium: Molecular  
Science of Fluctuations toward Biological  
Functions:  
December 5-6, 2012, Kyoto Terrsa  
(Kyoto-shi, Kyoto)

Nishimura, C. and Wright, P.E.:

Transient Structure of the Kinetic  
Intermediate of Apomyoglobin Monitored by  
Quench-Flow HD Exchange NMR  
The 51st Annual Meeting of the Nuclear  
Magnetic Resonance Society of Japan  
November 8-10, 2012, WINC Aichi  
(Nagoya-shi, Aichi)

西村 千秋、幸元 雅也:

水との交換を指標とした $\alpha$ シヌクレイン  
など蛋白質の揺らぎ構造解析  
新学術領域「揺らぎと生体機能」「水と  
ATP」合同公開シンポジウム  
2012年9月14日-15日、大阪ガーデンパ  
レス(大阪市、大阪)

Nishimura, C. and Wright, P.E.:

Fluctuating structures during the folding  
events of apomyoglobin:  
Non-native structure in the intermediate  
4<sup>th</sup> Japan-Korea Seminar on Biomolecular  
Sciences:  
Experiments and Simulations, (招待講演)  
January 9-11, 2012, Todaiji Culture Center  
(Nara-shi, Nara)

Nishimura, C., Tochio, N., Akikawa, H.,

Kaneko, C., Ishii, A., Hayashi, N.,  
Hirahara, M., Sato, M., Abe, S., and  
Orikasa, T.:  
NMR studies on the protein containing the  
intrinsically disordered region.  
The 5<sup>th</sup> International Symposium of  
Molecular Science of Fluctuations toward  
Biological Functions:  
January 7-8, 2012, Todaiji Culture Center  
(Nara-shi, Nara)

西村 千秋:

NMR で見たアポミオグロビン過渡的折  
りたたみ中間体の構築原理  
2011年日本物理学会秋季大会シンポジ  
ウム、生物物理(領域12)  
(招待講演)  
2011年9月21日-24日、富山大学  
(富山市、富山)

西村 千秋:

天然揺らぎ構造のNMR解析  
生命分子の揺らぎを探る新たなアプ  
ローチ  
New approaches for probing biomolecular  
fluctuations  
第49回日本生物物理学会年会シンポジ  
ウム(招待講演)  
2011年9月16日-18日、兵庫県立大学  
(姫路市、兵庫)

[図書](計1件)

Ohtake, S., Kita, Y., Nishimura, C., and  
Arakawa, T.:  
Organic solvents: properties, toxicity, and  
industrial effects  
Nova Science Publishers,  
Editor Ryan E. Carter:  
1-29, 2011

6 . 研究組織

(1)研究代表者

西村 千秋 (NISHIMURA, Chiaki)

帝京平成大学・薬学部・教授

研究者番号：70218197

(3)連携研究者

後藤 祐児 (GOTO, Yuji)

大阪大学・蛋白質研究所・教授

研究者番号：40153770