

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）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：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659024

 研究課題名（和文）13C直接検出法を用いた高分子量天然変性タンパク質の
構造解析技術開発

 研究課題名（英文）Structure analysis of high-molecular weight intrinsically disordered
proteins using 13C detection NMR approach

研究代表者

楯 真一 (SHINICHI TATE)

広島大学・大学院理学研究科・教授

研究者番号：20216998

研究成果の概要（和文）：

酵母基本転写因子 Tfa2 を対象として、Mediator サブユニット Gal11 結合を担う intrinsically disordered (ID)領域 (Tfa2-mbd: Tfa2 mediator binding domain) の立体構造解析を、¹³C 検知および ¹H 検知多次元 NMR スペクトルにより行った。ID 領域特有の NMR シグナルの重なりを、シグナルの分散の良い ¹³C および ¹⁵N の化学シフト軸で展開する 3D スペクトルを用いることで効率的にシグナル帰属をすすめた。

その結果、Tfa2-mbd は、①過渡的に低存在率の 3 本の helix からなる構造を取ることで、②この過渡的立体構造形成は、ホモ二量体構造形成と連動すること、③さらに、過渡的に形成される Tfa2-mbd は、Gal11 との結合に不可欠であることを明らかにした。

今回の研究を通して、Tfa2 の ID 領域が過渡的に形成する低存在率構造が、Gal11 を介した基本転写因子のリクルートメントに関わることを示した。ID 領域の過渡的構造形成を利用する機能制御機構という新しい機能的側面を明らかできた。

研究成果の概要（英文）：

We analyzed one of the general transcription factors in yeast cell, Tfa2, with the ¹³C and ¹H detection NMR methods. In this work, we particularly focused on the intrinsically disordered part in Tfa2, which binds to Gal11 subunit in the Mediator complex. The severe signal overlaps typically found for the ID segment were solved using the ¹³C' and ¹⁵N evolution axes, whose chemical shifts have significant dispersions over the other nuclear spins in protein.

We found the Mediator binding domain of Tfa2, Tfa2-mbd, transiently forms three-helix structure. The transient structure formation was mediated by its homo-dimer formation. We also found that the transiently folded structure has binding ability to Gal11; the mutant that lacks the transient folding ability does not bind to Gal11.

Over all, the present research has demonstrated the unique structural and functional properties associated with the ID part in Tfa2.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・物理系薬学

キーワード：構造生物学

1. 研究開始当初の背景

ゲノム配列解析が進む中で、タンパク質中に存在する天然変性領域 (**intrinsically disordered: ID**) の持つ機能上の役割が注目されている。安定な立体構造を保持しないために、従来の構造生物学的手法の利用は限られる。そのため、**ID** 領域の存在の発見以来 10 年以上立つ今日でも十分な研究が進んでいない。本研究では **NMR** を駆使して **ID** 領域の構造研究を行うことで、新たな **ID** の持つ機能上の役割を明らかにすることを目指した。

研究対象としては酵母の基本転写 **Tfa2** を対象とした。**Tfa2** は **Tfa1** とヘテロ四量体を形成して転写 **Mediator** 複合体と相互作用することにより転写制御する。金沢大学・櫻井らの系統的な欠損変異体を用いた実験から、**Tfa1-Tfa2** の相互作用部位および **Mediator** 結合部位の同定がすすめられている。本研究で対象とした **Tfa2** は **Mediator** 複合体のサブユニットである **Gal11** と相互作用することで **Tfa** 基本転写因子のリクルートを担う。櫻井らは、上記の研究を通して **Tfa2** 中の **Gal11** 結合部位を同定している。同定された **Tfa2** の **Gal11** 結合部位 (**Tfa2 Mediator binding domain: Tfa2-mbd**) は、アミノ酸配列の特性から **ID** としての性質を持つことが分かった。一方、**Gal11** 側の **Tfa2** と相互作用するセグメントも **ID** 領域であり、基本転写因子 **Tfa** と **Mediator** 複合体の相互作用は **ID** 領域間の相互作用を介して行われていることが示された。

そこで本研究では、基本転写因子のリクルートを制御する機能をもつ **ID** 領域どうしの相互作用の詳細を明らかにするために **NMR** を駆使した構造解析を進めた。

2. 研究の目的

ID 領域の **NMR** スペクトルは一般的にシグナルの重なりが大きくシグナル帰属が困難である。また、シグナル帰属ができた後も、どのようにしてその構造特性を明らかにするか等、研究手法としての一般論が確立していない。

本研究では、**Tfa2-mbd** の **ID** 領域を対象としてその過渡的構造形成を明らかにすることを目的とした研究を進めた。本研究は、**ID** 研究における過渡的に形成される低存在率構造解析の 1 つの研究例を提示する。

3. 研究の方法

3-1. 主鎖シグナル帰属・立体構造解析
 ^{13}C 検知および ^1H 検知型の三重共鳴法を用いて主鎖側鎖の帰属を進め構造解析を行う。

3-2. 構造形成原理の解析
構造形成を誘導する原理を解析するために、温度依存性、濃度依存性などを検討する。**NMR** のみならず、**CD** スペクトル、生化学的方法など複数の構造解析手法を用いる。また、変異体を用いて構造形成にキーとなるアミノ酸残基を特定する。

3-3. 過渡的構造形成の解析
化学シフト情報、残余双極子 (RDC) など、過渡的構造形成状態を解析するための複数の解析を進める。

4. 研究成果

4-1. NMR 立体構造解析

Tfa2-mbd は典型的な **ID** 領域としての **NMR** シグナルを与える。図 1 にその結果を示す。 ^{13}C 検知および ^{15}N 検知の三重共鳴スペクトルを用いることで主鎖および側鎖の完全帰属を終えた。

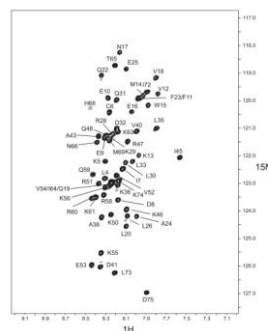


図 1 : **Tfa2-mbd** の ^1H - ^{15}N HSQC スペクトルと主鎖のシグナル帰属。

NOE スペクトルの解析から、図 2 に示すような 3 本のヘリックス構造を持つことが明らかになった。ただし、この立体構造解析では **NOE** の混合時間を 250 msec という通常の混合時間の二倍となる長さを設定して測定した。

NOE 混合時間の設定に当たっては、**NOE** シグナル強度の時間発展 (**buildup**) を解析し、300 msec で **NOE** が最大強度になることを確認している。このことは、観測された 3 本のヘリックスからなる構造が安定な構造ではなく、過渡的に形成されていることを示している。通常 100 msec の混合時間で最大強度になる **NOE** が 300 msec で最大値に到達することは定性的には最大でも 30% 程度の存在率でこの構造を取ると予測される。

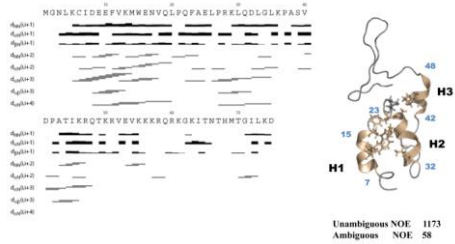


図 2: Tfa2-mbd で観測される「過渡的」立体構造。

4-2. ホモ二量体を介した構造形成

Tfa2-mbd スペクトルは濃度依存的に直線的なスペクトル変化を示す。このことから、Tfa2-mbd の構造形成には相互の結合が必要であることが予測される。化学架橋を用いる実験から、Tfa2-mbd はホモ二量体を形成することが分かった。実際に $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -filtered NOE の実験からホモ二量体形成が確認できた。

図 2 の立体構造に基づいて、構造形成の中心にある W15 を Ala にアミノ酸変異をいれた変異体では濃度依存的なスペクトル変化が観測されなくなり従ってホモ二量体形成能が失われたことが分かる。

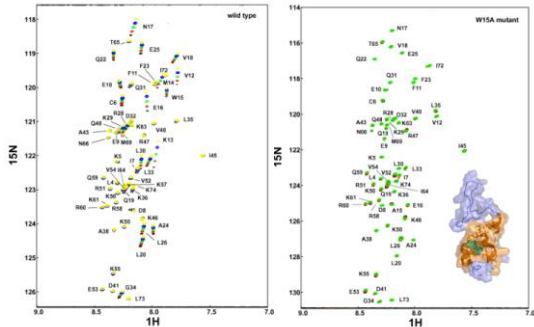


図 3: Tfa2-mbd の濃度依存的なシグナル変化。W15A 変異体では濃度依存的なシグナル変化が観測されずホモ二量体形成能が失われていることがわかる。

TFIIEb - Gal11 titration - determination of the dissociation constant, Kd

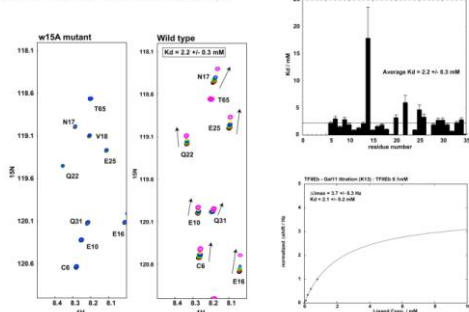


図 4: Tfa2-mbd の Gal11 フラグメントとの相互作用。W15A 変異体は Gal11 に対する結合能を失っている。

二量体形成能をもつ野生型と W15A 変異体に対して Gal11 フラグメントの滴定実験を行った。その結果 Tfa2-mbd は二量体形成能を失うと同時に、構造形成能も失うのみならず、Gal11 に対する結合活性も失うことが分かった。

4-3. 低存在率構造の解析

化学シフトデータベースを用いることでタンパク質の二次構造存在率を評価する方法が Cambridge 大学のグループから発表されている。この方法を用いて Tfa2-mbd の 3 つのヘリックス構造の存在率について解析した。

その結果、長い混合時間を使った NOE から決定された 3 本のヘリックス構造は化学シフトからも確かに存在が確認された。Tfa2-mbd には低存在率のヘリックス構造が存在することが明らかになった。

NOE を使った解析では、個々のヘリックス構造の存在率を推定することはできない。化学シフトによるヘリックス構造存在率解析は、3 本のヘリックスの存在率がそれぞれ異なることをしめす。第一ヘリックスは 15% であるのに対して、第二ヘリックスは 5% 未満、第三ヘリックスは約 30% の存在率である。

NOE の構造解析結果と、濃度依存的な化学シフト変化からは 3 本のヘリックスが協同的に構造形成する可能性を考えていたが、3 つの異なる存在率から、個々のヘリックスは独立に構造形成をすることが分かった。

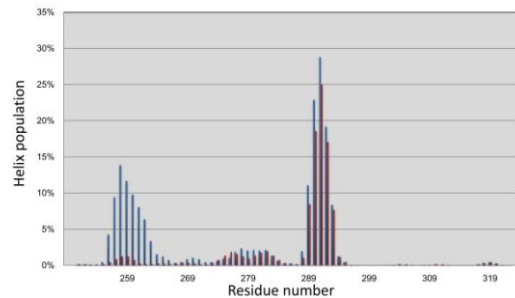


図 5: 主鎖原子の化学シフトから予測したヘリックスの存在率 (残基番号は Tfa タンパク質中での残基番号表示)。青: 野生型。赤: W15A 変異体の結果を示す。

同様の二次構造存在率解析から、W15A 変異体は第一ヘリックス形成能が全く失われてしまうことが分かった。一方で、第二、第三ヘリックスの存在率は全く変化しない。このことから、W15A によりホモ二量体形成能が失われた理由は、第一ヘリックスが失われたことによると考えることができる。このことは、Tfa2-mbd が第一ヘリックスを介してホモ二量体形成をし

ていることを意味する。アミノ酸配列の特
 5. 主な発表論文等徴から見ても、第一ヘリックス部には、coiled-coil 構造を形成する特性があるため、Tfa2a-mbd は第一ヘリックスでcoiled-coilを形成することでホモ二量体を形成することが分かった。RDC および真空紫外 CD の解析結果も NMR の観測結果と整合性がある。

さらに、W15A はホモ二量体形成能を失うと同時に Gal11 に対する結合能も失っているため、Gal11 結合は、Tfa2-mbd の第一ヘリックスが coiled-coil 構造を形成することにより初めて可能になると考えることができる。

過渡的に形成される Tfa2-mbd のホモ二量体が基本転写因子 Tfa の Mediator 複合体へのリクルートを制御するという機構が考えられる。

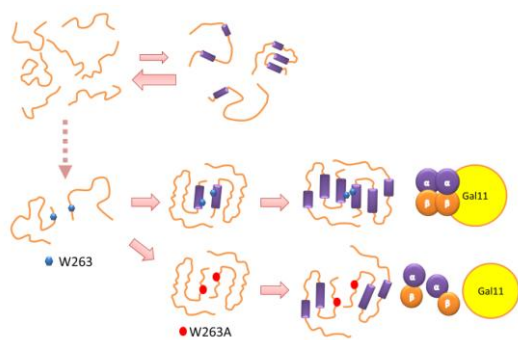


図 6: 過渡的構造形成を介した基本転写因子 Tfa の Mediator 結合過程。図中 W263 は Tfa 全長の残基番号である。NMR 構造解析したフラグメント中の W15 に対応する。

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 11 件)

1. **Hashimoto,M.**, Kodera,N., Tsunaka,Y., Oda,M., Tanimoto,M., Ando,T., Morikawa,K., and **Tate,S.** “Phosphorylation-coupled intramolecular dynamics of unstructured regions in chromatin remodeler FACT”, *Biophys. J.*, 104, 2222-2234 (2013). [査読有]
2. Uewaki,J., Kamikubo,H., Kurita,J., Hiroguchi,N., Moriuchi,H., Yoshida,M., Kataoka,M., Utsunomiya-Tate,N., and **Tate,S.** “Preferential domain orientation of HMGB2 determined by the weak

intramolecular interactions mediated by the interdomain linker”, *Chem.Phys.*, 419, 212-223 (2013). [査読有]

3. Ohmae, E., Murakami, C., **Tate,S.**, Gekko, K., Hata, K., Akasaka, K. and Kato,C., “Pressure dependence of activity and stability of dihydrofolate reductases of the deep-sea bacterium *Moritella profunda* and *Escherichia coli*.” *Biochim. Biophys. Acta*, 1824, 511-519 (2012). [査読有]
4. Nakano,S., Sugihara,M., Yamada,R., Katayanagi,K., **Tate,S.** “Structural implication for the impaired binding of W150A mutant LOX-1 to oxidized low density lipoprotein, OxLDL” *Biochim. Biophys. Acta.* 1824, 739-749 (2012). [査読有]
5. Ohmae,E., Murakami,C., **Tate,S.**, Gekko,K., Hata,K., Akasaka,K., and Kato,C. “Pressure dependence of activity and stability of dihydrofoalte reductase of the deep-sea bacterium *Moritella profunda* and *Escherichia coli*.” *Biochim. Biophys. Acta* 1824, 511-519 (2012). [査読有]
6. Koichi,M., Sakurada,Y., **Tate,S.**, Namatame,H., Taniguchi,M., Gekko,K. “Secondary-structure of alcohol-denatured proteins by vaccum-ultraviolet circular dichroism spectroscopy” *PROTEINS*, 80, 281-193 (2012). [査読有]
7. Mizuno,S., Amida,H., Kobayashi,N.,Aizawa,S., and **Tate,S.** “The NMR structure of FliK, the trigger for the switch of substrate specificity in the flagellar type III secretion apparatus” *J.Mol.Biol.* 409, 558-573 (2011). [査読有]
8. **Tate,S.** Imada,A., and Hiroguchi,N. “Complementary use of NMR to X-ray crystallography for the analysis of protein morphological change in solution” in ‘Current trends in X-ray crystallography’ (ed. Chandrasekaran, A.) Chap. 18, pp409-436, InTech, Cloatia. (2011). [査読有]
9. Ohki, I., Amida, H., Yamada, R., Sugihara, M., Ishigaki, T. and **Tate,S.** “Surface plasmon resonance study on functional significance of clustered organization of lectin-like oxidized LDL (LOX-1).” *Biophysica Acta*, 1814, 345-354 (2011). [査読有]

10. Murakami, C., Ohame, E., **Tate, S.**, Gekko, K., Nakasone, K. and Kato, C. "Comparative study on dihydrofolate reductases from *Shewanella* species living in deep-sea and ambient atmospheric-pressure environments. *Extremophiles*, 15, 165-175 (2011). [査読有]
11. 榎 真一 「NMRで観測する超高分子量タンパク質の分子形態」生物物理 51, 84-87 (2011). [査読有]

[学会発表] (計 27 件)

1. **Tate, S.** "Gene regulation in the chromatin context seen from the protein structural dynamics point of view" 1st Int. symposium of the Mathematics on chromatin live dynamics (招待講演) 2013.03.15 広島
2. 榎 真一「核内受容体タンパク質 PPAR γ の基質依存的構造変化とコアクティベーター認識機構」第36回日本分子生物学会年会 (招待講演) 2012.12.12 福岡.
3. 榎 真一「NMRによるタンパク質構造揺動の検出—タンパク質分子の動的構造と機能の相関解明に向けて」日本生化学会西日本大会 (招待講演) 2012.11.11 佐賀.
4. 榎 真一「タンパク質構造の揺らぎと機能の相関」広島大学・数理分子生命理学専攻 第4回公開シンポジウム (招待講演) 2012.09.06 広島
5. **Tate, S.** "Functionally detuning motion for the hydride transfer step, which is intrinsically active loop dynamics of dihydrofolate reductase, DHFR" Euromer2012 (招待講演) 2012.07.01 Dublin, Ireland.
6. 榎 真一 「タンパク質構造の揺らぎによる機能制御—NMRにより明らかになった msec 時間域の構造揺らぎの役割」スーパーコンピューター京と生命科学 (招待講演) 2012.06.01 岡山.
7. 榎 真一「TAL effector の結晶構造から明らかになった DNA 認識機構」第1回ゲノム編集研究会 (招待講演) 2012.02.28 広島
8. 榎 真一「NMR 用いた新しい膜タンパク質構造研究のアプローチ」高次系分子化学ミニシンポジウム 2012.01.24 大阪
9. **Tate, S.** "Protein structural dynamics modulation induced by a mutation to flexible loop" 日本生物物理学会第49回年会 (招待講演) 2011.11.16 兵庫
10. 榎 真一「タンパク質の内部運動性と機能制御」理論と実験研究会 2011 (招待講

演) 2011.10.07 広島

11. **Tate, S.** "Functional regulation through phosphorylation to acidic intrinsically disordered region in FACT as a chromatin remodeling factor" Ann. Meeting of Protein Science Japan, cosponsored Asia Pacific Protein Association (招待講演) 2011.06.07 大阪

その他 16 件

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: 酸化 LDL 受容体に作用するリポソーム
 発明者: 町田幸子, 倉持みゆき, 榎 真一, 山田梨紗都
 権利者: 同上
 種類: 特願
 番号: 2012-72404
 出願年月日: 2012.03.27
 国内外の別: 国内

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.mls.sci.hiroshima-u.ac.jp/biophysics/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

榎 真一 (SHINICHI TATE)
 広島大学・大学院理学研究科・教授
 研究者番号: 20216998

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: