

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 24 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24570124

研究課題名(和文)創薬ターゲット蛋白質のスルホベタインによる安定化

研究課題名(英文)Stabilization of drug-target proteins by sulfobetaines

研究代表者

若松 馨(Wakamatsu, Kaori)

群馬大学・大学院理工学府・教授

研究者番号：40222426

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：創薬において蛋白質の安定化は重要である。蛋白質を安定化する化合物としてスルホベタイン類がある。スルホベタインがタンパク質を安定化するメカニズムを解析するために、タンパク質のダイナミクスに及ぼす効果を解析した。その結果、NDSB-195がユビキチンの 4-2 loopのダイナミクスを促進すること、NDSB-256がプロリンのcis-trans異性を促進する事を見いだした。

研究成果の概要(英文)：Stabilization of proteins (prevention of denaturation and aggregation) is important in drug development. Sulfobetaines are a class of protein stabilizer whose mechanisms remain elusive. To elucidate their stabilizing mechanisms, we analyzed their effects on protein dynamics. We found that NDSB-195 enhances the dynamics of 4-2 loop of ubiquitin molecules and that NDSB-256 enhances the cis-trans isomerization of an Ala-Pro peptide bond. These effects may contribute the stabilizing activities of sulfobetaines by helping the denatured protein molecules escape from kinetic traps. In addition, by expressing proteins and peptides as fusion proteins, we succeeded in obtaining soluble complex of G<sub>i1</sub> and its activator peptide designed from the junction between the intracellular third loop and sixth transmembrane helix in the m4 muscarinic acetylcholine receptor. We also identified 3 residues in the peptide that are critical for the binding with G<sub>i1</sub>.

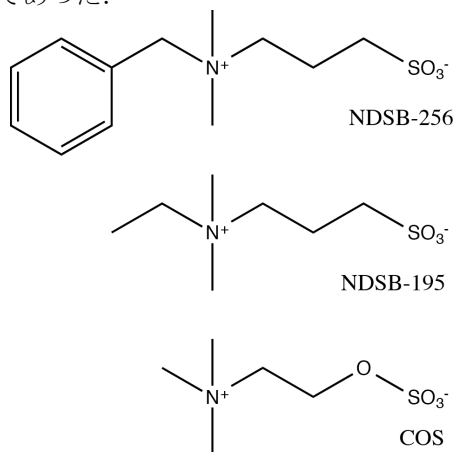
研究分野：構造生物学

キーワード：蛋白質 安定化 スルホベタイン メカニズム ダイナミクス GPCR G蛋白質

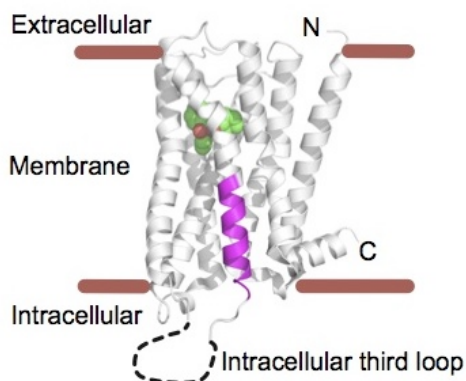
1. 研究開始当初の背景

(1) 創業において蛋白質の安定化は重要である。まず、蛋白質製剤が承認されるためには長期間の安定性が必要条件である。また、創業の最大のターゲットである膜蛋白質であるG蛋白質共役受容体 (GPCR) の立体構造を解析するためには、可溶化後の安定性が必須である。

(2) 蛋白質を安定化する化合物としてスルホベタイン類 (下図に主要な物の構造を示す) があり、申請者らはスルホベタインが各種蛋白質の変性や凝集を防止する事を見いだしてきた。しかし、その安定化メカニズムは不明であった。



(3) GPCR の一種である m4 ムスカリン性アセチルコリン受容体の細胞内第3ループと第6膜貫通ヘリックスの移行部に相当する14残基のペプチド (m4I3C(14), 下図の紫色部分) が  $G\alpha_{i1}$  を特異的に活性化することを申請者らは見いだしていた。そこで、m4I3C(14) は受容体の良い低分子モデルとなり、GPCR とG蛋白質との相互作用の解析に有用であると期待されていた。しかし、複合体の調製は、混合時の凝集により困難であった。また、m4 ムスカリン性アセチルコリン受容体の細胞内第3ループに含まれる VTIF (VTIL) モチーフが  $G\alpha_{i1}$  との相互作用に重要であると予測されていた。



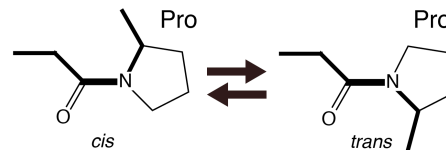
2. 研究の目的

(1) スルホベタインが蛋白質を安定化するメ

カニズムを調べるために、スルホベタインが蛋白質のダイナミクスに及ぼす効果を核磁気共鳴で解析することを目的とした。

① ユビキチンはダイナミクスが最も詳しく解析されている蛋白質の1つであるので、スルホベタインの1つである NDSB-195 がユビキチンのマイクロ秒~ミリ秒の範囲のダイナミクスに及ぼす効果を解析する事を目的とした。

② 蛋白質の最も遅いダイナミクスの1つはプロリン残基のペプチド結合のシス・トランス異性化 (下図) である。この異性化速度に及ぼす各種スルホベタインの効果解析する事を目的とした。



(2) m4I3C(14) と  $G\alpha_{i1}$  との複合体を可溶性の状態に調製すること、また  $G\alpha_{i1}$  との結合に必要な m4I3C(14) のアミノ酸残基を同定することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) スルホベタインが蛋白質のダイナミクスに及ぼす効果の解析

① マイクロ秒~ミリ秒の範囲のダイナミクスはアミドシグナルの緩和に影響を及ぼすので、アミド  $^1\text{H}$  シグナルの線幅とアミド  $^{15}\text{N}$  シグナルの横緩和速度 ( $R_2$ ) に NDSB-195 が及ぼす効果を解析した。

② ジペプチドであるグリシルプロリンのシス・トランス異性化速度を、各種スルホベタイン存在下で、化学交換分光法 (EXSY) で解析した。

(2) m4I3C(14) と  $G\alpha_{i1}$  との相互作用

① 可溶性複合体の調製

$G\alpha_{i1}$  の N 末端にグルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST) またはマルトース結合タンパク質 (MBP) のタグをつけ、m4I3C(14) の N 末端側にヒスチジンタグ付きのユビキチンを融合した。また、凝集防止剤であるまたコリン-O-サルフェート (COS) の添加効果も確認した。

②  $G\alpha_{i1}$  との結合に必要な m4I3C(14) のアミノ酸残基の同定

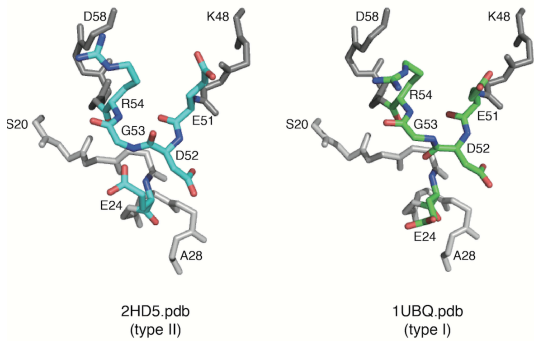
MBP タグを付けた  $G\alpha_{i1}$  とユビキチンを融合した m4I3C(14) (およびその点変異体) の複合体について、MBP 樹脂を用いたプルダウン・アッセイを行った。点変異が複合体形成に及ぼす効果を解析することによって、結合に必要なアミノ酸残基を同定した。

#### 4. 研究成果

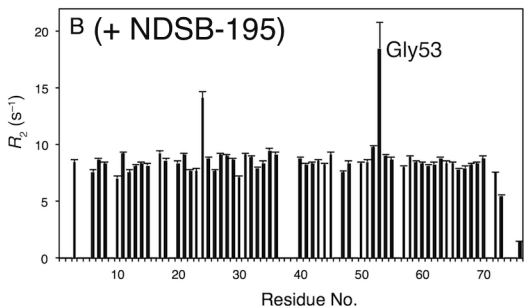
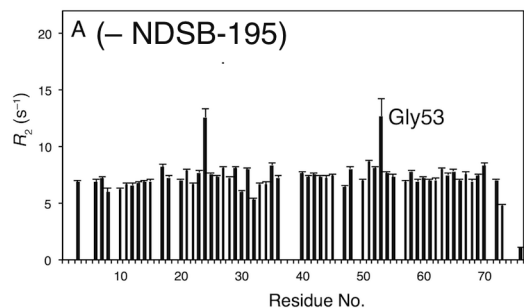
(1) スルホペプチンが蛋白質のダイナミクスに及ぼす効果の解析

##### ① ユビキチンの運動性に及ぼす効果

ユビキチンの  $\beta 4$ - $\alpha 2$  ループはミリ秒のオーダーでタイプ II とタイプ I の2つの  $\beta$  ターン構造の間を行き来しており (下図), それが Gly53 の  $^{15}\text{N}$  の  $R_2$  を大きくしている.



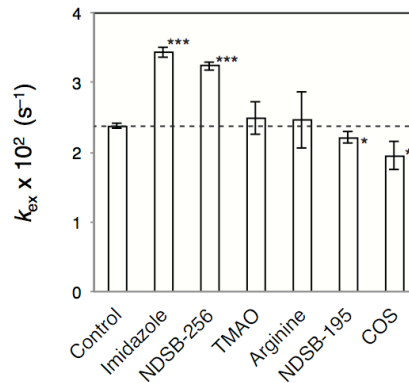
NDSB-195 の添加によりその  $R_2$  が特異的に更に大きくなるのがわかった (下図). また, Gly53 の  $^1\text{H}$  のシグナルの線幅は NDSB-195 の濃度依存的に小さくなった (シャープになった). この2つの観測から, NDSB-195 は  $\beta 4$ - $\alpha 2$  ループのダイナミクスを高めていることが分かった. なお, ダイナミクスを高める化合物は一般的に蛋白質の安定性を低下させるが, NDSB-195 はユビキチンについても安定性を高めることが確認された. NDSB-195 は蛋白質の安定性とダイナミクスの両方を高める興味深い化合物であると考えられる.



##### ② プロリンのシス・トランス異性化速度

蛋白質のリフォールディングを顕著に促進する NDSB-256 は異性化反応を強く促進した (下図). 一方, 構造が似ている NDSB-195 と COS は逆に抑制した. プロリンの異性化反応は蛋白質のフォールディングの律速段階の

1 つであるので, NDSB-256 の異性化促進効果は, この化合物のリフォールディング促進活性に寄与していると考えられる.



##### (2) m4I3C(14)と $\text{G}\alpha_{i1}$ との相互作用

###### ① 可溶性複合体の調製

m4I3C(14)のペプチドと  $\text{G}\alpha_{i1}$  とを結晶化に必要な高濃度で混合すると凝集し, COS などの凝集防止剤を添加しても凝集は防止できなかった. しかし, m4I3C(14)をユビキチンとの融合蛋白質とし,  $\text{G}\alpha_{i1}$  に MBP や GST のタグを付加すると, 明瞭な凝集体を形成する事なく, 複合体を形成した. その粒子サイズを動的散乱で分析したところ, MBP タグ付きの方が小さかったので, 構造解析に有用であると期待され, 現在結晶化を試みている.

	m4i3c(14)Gly	His-ubi-m4i3c(14)Gly
Gai1	Insoluble	Insoluble
GST-Gai1	Insoluble	Soluble
MBP-Gai1	NA	Soluble

###### ② $\text{G}\alpha_{i1}$ との結合に必要な m4I3C(14)のアミノ酸残基の同定

当該受容体の細胞内第3ループと  $\text{G}\alpha_{i1}$  との相互作用には, 第3ループに含まれる VTIF モチーフが重要であると予測されていた. 実際に, 後半の Ile402 と Phe403 を他のアミノ酸に置換すると結合能が予想通り失われた (下図). しかし, 前半の V398 と Thr399 を置換しても結合が弱まることはなく, 結合が強まる場合もあった. また, より前方の Arg396 も結合に必須であることがわかった. これらの情報は G 蛋白質と GPCR との相互作用について貴重な情報を提供する.



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 4 件)

- ① H. Wang, K. Hosoda, T. Ishii, R. Arai, T. Kohno, S. Terawaki, and K. Wakamatsu, Protein stabilizer, NDSB-195, enhances the dynamics of the beta4-alpha2 loop of ubiquitin, *J. Pept. Sci.*, 査読有, 22 巻, 2016, 174-180.  
DOI: 10.1002/psc.2855
- ② S. Terawaki, R. Matsubayashi, K. Hara, T. Onozuka, T. Kohno, and K. Wakamatsu, Biochemical characterization of a heterotrimeric Gi-protein activator peptide designed from the junction between the intracellular third loop and sixth transmembrane helix in the m4 muscarinic acetylcholine receptor, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 査読有, 463 巻, 2016, 17-24.  
DOI:10.1016/j.bbrc.2015.05.018
- ③ S. Terawaki, A. Yoshikane, Y. Higuchi, and K. Wakamatsu, Structural basis for cargo binding and autoinhibition of Bicaudal-D1 by a parallel coiled-coil with homotypic registry, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 査読有, 460 巻, 2015, 451-456.  
DOI: 10.1016/j.bbrc.2015.03.054
- ④ H. Wang, K. Hosoda, S. Terawaki, and K. Wakamatsu, Refolding additive, dimethylbenzylammonium propane sulfonate (NDSB-256), accelerates gly-pro cis-trans isomerization, *Protein Pept. Lett.*, 査読有, 22 巻, 2014, 234-238.  
DOI: 10.2174/0929866521666141124103904

[学会発表] (計 28 件)

- ① 神山亮司, 山井俊英, 王梅梅, 細田和男, 寺脇慎一, 武田茂樹, 若松馨, Non-Detergent SulfoBetaine が蛋白質に及ぼす効果, 第 42 回生体分子科学討論会, 2015 年 6 月 12-13 日, 高崎シティーギャラリー (群馬県高崎市).
- ② 原加奈子, 松林里奈, 寺脇慎一, 河野俊之, 若松馨, m4 ムスカリン性アセチルコリン受容体の細胞内第 3 ループ/第 6 膜貫通ヘリックスペプチドと G $\alpha$ i1 との相互作用解析, 第 87 回日本生化学会大会, 2015 年 10 月 15-18 日, 国立京都国際会館 (京都府京都市).
- ③ Kaori Wakamatsu, Tetsuro Demura, Ryutaro Ohtsuki, Ryo Arai, Akino Sayama, Mutsumi Wakayama, Takanori Sanai, Fukuei Tetsuka, Mitsuhiko Yoshizawa, Haimei Wang, Takeshi

Ishii, Kazuo Hosoda, Yasuko Iizuka, Nobukazu Nameki, Analysis of the mechanisms whereby sulfobetaines stabilize proteins, 第 86 回日本生化学会大会, 2013 年 9 月 11-13 日, パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市).

- ④ Kaori Wakamatsu, Toshihide Yamai, Layla Takahashi, Masato Nakajima, Naoki Yamashita, Takeshi Ishii, Kazuo Hosoda, Shigeki Takeda, Thermal stabilization of G protein-coupled receptor by non-detergent sulfobetaines (NDSBs), 第 85 回日本生化学会大会, 2012 年 12 月 15 日, マリンメッセ福岡 (福岡県福岡市)

[その他]

ホームページ等

<http://wakamatsu-lab.chem-bio.st.gunma-u.ac.jp/Wakamatsu-lab/Top.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

若松 馨 (Wakamatsu, Kaori)

群馬大学大学院理工学府・教授

研究者番号: 4 0 2 2 2 4 2 6

(3) 連携研究者

寺脇 慎一 (Terawaki Shin-ichi)

群馬大学大学院理工学府・助教

研究者番号: 1 0 4 5 2 5 3 3

飯塚 靖子 (Iizuka Yasuko)

群馬大学理工学部・技術長

研究者番号: 6 0 3 7 5 5 6 6

(4) 研究協力者

細田 和男 (Hosoda Kazuo)