

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 25 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24570175

研究課題名(和文) やわらかなタンパク質 Bach のリガンド分子による制御機構の解明

研究課題名(英文) Regulation of Bach2 intrinsically disordered region by ligand

研究代表者

村山 和隆 (Murayama, Kazutaka)

東北大学・医工学研究科・准教授

研究者番号：40400452

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：Bach2は大部分が天然変性領域からなるタンパク質である。我々は331-520という領域で比較的良好に精製サンプルを調製することに成功した。この領域でのヘムの結合は、331-839という長い領域での結合実験の結果と非常によく似た結合パターンを示した。動的な光散乱ではBach2(331-520)はヘムが結合することにより不安定化が予想され、またX線小角散乱実験を行い、ヘムの結合が構造のコンパクト化に寄与していることが明らかとなった。このことは質量分析を用いた解析からも支持されており、Bach2がヘムにより構造変化を起こす一端を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Bach2 plays an important role in the transcriptional process. Bach2 includes long intrinsically disordered regions. We prepared the region of 331-520 to investigate its biophysical properties. Spectroscopic measurements revealed that Bach2(331-520) is intrinsically disordered region, in which heme binds. SAXS and dynamic light scattering measurements indicated that heme binding form of Bach2(331-520) is unstabler than the non heme binding form and the structure will be more compact. Our results showed the first example of the heme binding protein which is (1) intrinsically disordered protein/region, (2) indicates structural change by heme binding.

研究分野：生物物理化学

キーワード：タンパク質構造変化 天然変性タンパク質 ヘム結合

1. 研究開始当初の背景

Bach タンパク質はヘムをリガンドとするタンパク質であり(Hira et al., IUBMB Life 59, 542-551 (2007); Ogawa et al., EMBO J., 20, 2835-2843(2001)), Bach1 と Bach2 の 2 つのタイプが知られている。Bach1 は他のタンパク質とのヘテロ 2 量体形成により酸化ストレス防御遺伝子やグロビン遺伝子の制御を行う(Sun et al., PNAS, 101, 1461-1466 (2004))。一方、Bach2 は B 細胞特異的に発現し、B 細胞分化や液性免疫応答の制御に必須であることが見出されている(Muto et al., Nature, 429, 566-571(2004); Muto et al., EMBO J., 17, 5734-5743(1998))。Bach タンパク質は多細胞生物においてヘムをリガンドとする転写因子として最初に同定されたものであり、ヘムのリガンドとしての多様性にも関わる医学的に重要なタンパク質である。特に Bach2 タンパク質はヘムとの結合が B 細胞の分化に関わることが示されている(BMB2008 シンポジウム、Watanabe et al., Blood, 117, 5438-5448(2011))。このように Bach タンパク質の細胞生物学的レベルでの理解が深まっていく一方で、このタンパク質の分子機構としては、CP モチーフを中心としたヘムの結合、bZip ドメインを介した DNA 結合が挙げられる程度で、特にタンパク質の分子機構の解明はほとんど進んでいない。配列の解析では Bach タンパク質は大部分が“やわらかな”特定の二次構造を持たない領域である(図 1)。これまでのところでは、

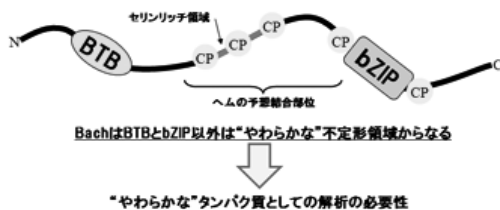


図1. Bachタンパク質の構成

Bach1 の BTB ドメインについて申請者らの研究においてその立体構造が解明され(図 2)、

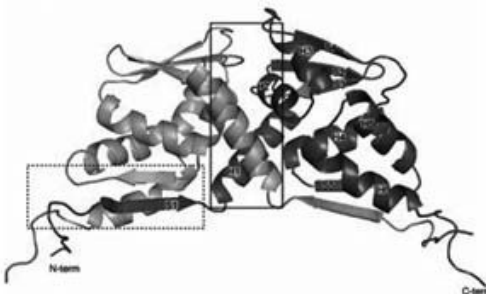


図2. Bach1-BTBドメインの構造

(四角で囲まれた部分は2量体化部位)

特徴的なホモ 2 量体化の機構を示したものである(Ito et al., Gene Cells, 14, 167-178(2009))。

bZip ドメインは Bach タンパク質そのものとしての立体構造はまだ決定されていないが、ロイシンジッパータンパク質としての解

析例は多数存在する。最近の成果として(日本生物物理学会、2010 年、村山ら)Bach2 タンパク質のプロテアーゼの限定分解などの実験からヘム結合モチーフである CP モチーフを 3 箇所含む領域(331-520)がドメイン様の構造をとり、ヘムの受容を示すことが見出された。また、このヘムの受容がタンパク質のコンホメーション変化に関わることも動的光散乱(DLS)から観察された。さらにこの領域について結晶化を試みたところ微結晶が得られている。これまでの結果は、Bach タンパク質の主要な分子機能の一つであるヘムの受容において、特定の部位への結合と立体構造の変化をともなうことを示している。よって、本研究課題で計画している物理化学的解析を進めることでヘムを介した制御のメカニズム(構造変化機構)を解明できると考えている。

2. 研究の目的

1 の背景を踏まえて本研究計画では、ヘムによる Bach タンパク質の制御に焦点をあて、(1)Bach タンパク質の安定な高純度サンプルの調製 (2)溶液中における構造様態の解析 (3)ヘムの結合による構造の変化の解明 (4)ヘムによる転写調節の分子機構の考察 の 4 点の項目に沿ってその物理化学的・構造学的基盤がどのようなものかを明らかにし、その多彩な機能の分子機構理解の基盤を構築することを目指し、2012-2014 年度にわたり研究を推進した。

3. 研究の方法

高純度サンプルの調製：

タンパク質の溶液状態の解析には安定で高純度なタンパク質試料が重要である。我々は Bach2 タンパク質についてさまざまな発現領域を検討し、その精製と安定性の確認を進めた。その結果、ヘム結合領域を含む 331-520 の領域で安定なタンパク質に調製が可能となり、以後の解析においてはこの試料を用いて実験を進めた。

Bach2 の構造様態と安定性の測定：

タンパク質の溶液中における状態を計測するものとして本研究では、さまざまな分光分析、例えば UV/Vis 分光法、分析超遠心、円二色分光法、動的光散乱などを用いて測定を行った。

これらの測定では上記の高純度試料を用いて進められたが、Bach2 タンパク質は長期的な安定性を維持しておらず、初期の評価においては 1 週間単位での保存は不可能であることがわかった。そこで、測定は精製直後に行うものとし、原則 1 日での測定とした。またヘムの共存下での測定は高濃度のヘムが存在すると溶液の不安程度が増加するため、ヘムはタンパク濃度程度(同等のモル濃度)以下で添加し測定を進めた。

まず溶液中における Bach2(331-520) 領域とヘムとの結合を調べるため UV/Vis の吸収スペクトルの測定を行った。ヘムとの結合は 5 配位、6 配位にそれぞれ特徴的な 366nm と 432nm におけるピークにより検討した。分析超遠心は測定時間も考慮し速度法により測定した。円二色性分光スペクトルは通常の二次構造の評価に使用される 190~300nm の領域での測定を行った。動的光散乱は T_m を評価するため温度プロファイルを計測した。

溶液中におけるヘムによる高次構造変化の解析：

高次構造解析としては当初 X 線結晶構造解析を検討していたが、Bach2 タンパク質の結晶を得ることは難しく、X 線小角散乱を用いた測定とリジン部位の化学修飾を質量分析で解析することにより、溶液中における高次構造（とその変化）を測定した。

X 線小角散乱はリガク社製 BioSAXS-1000 を用いて、ヘムの有無についてそれぞれ溶液散乱を測定した。散乱曲線は ATSAS プログラムパッケージによりクラツキープロットの解析を行った。また化学修飾は NHS アセテートによりリジンをターゲットとして、ヘムの有無でそれぞれ実験した。修飾タンパク質は MALDI-tof-MS によりリジンを含むペプチドのピーク強度を比較し非修飾部分の差として評価した。

レポーターアッセイによる遺伝子発現調節の解析：

上記の物理化学的な測定に加えて、*in vivo* の実験としてルシフェラーゼレポーターアッセイを用いた Bach2(331-520) のヘムによる転写調節について実験を行った。

4. 研究成果

溶液中における構造様態の解析：

Bach2 (331-520) の領域はヘム結合に重要な CP モチーフを 3 ヶ所含むことから、ヘムとの相互作用による機能に注目している。UV/Vis 吸収スペクトルの解析では 366nm と 432nm のピークが観測された。これらはタンパク質とヘムとの結合においてそれぞれ 5 配位と 6 配位の結合に相当すると考えられる。以前の研究において 331-739 という長い発現領域でそれぞれの結合様式が存在することがわかってきたが、本研究での発現領域である 331-520 においてもヘムの 2 つの結合様式が同様に確認された。分析超遠心ではこの領域はヘムの有り無しに関わらず単量体として存在していることがわかり、ヘムは多量体化には関与しない、すなわちヘムは分子間での配位結合や相互作用には影響を与えないことがわかった。円二色性スペクトルではランダムコイル構造に特徴的な 200nm 近辺に極小値を持つスペクトルが観測され、特徴的な二次構造は含まないものと予想された。また動的光散乱による温度プロファイルの観測では、ヘムの共存により、より低い T_m が観測され、ヘムの結合は Bach2 タンパク質を不安

定化することが示唆された(図 3)。

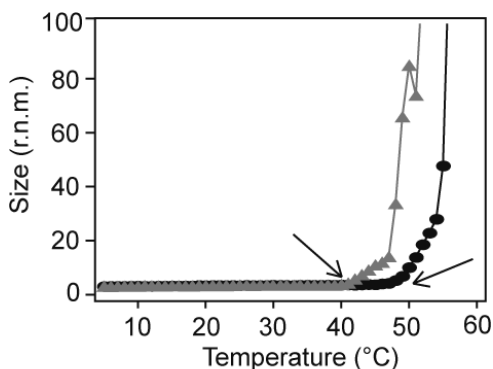


図3. 温度プロファイル

ヘムの結合による構造の変化の解明：

Bach2 タンパク質はいわゆる天然変性タンパク質に分類されるタンパク質であり、溶液中における構造変化を定量的に評価するために我々は X 線小角散乱をいう手法を検討した。小角散乱法ではまずは溶液内の試料について慣性半径が評価できる。Bach2 はヘムの共存によりわずかに大きな慣性半径を示した。またクラツキープロットの解析では、ヘムとの結合でわずかにピークを示しヘムのないときに比べてコンパクトさが増すものと予想された。これら 2 つの事実を考えると Bach2 はヘムの結合によりコンパクトさが増しつつも慣性半径を大きくするような変形（例えば細長くなるなど）を起こすものと考えられた。さらに化学修飾の解析ではヘムの共存下においてリジン残基への修飾が増加するという結果が得られた。これは先の結果と合わせて、ヘムの Bach2 への結合によりタンパク質はコンホメーションの変化を起こし、リジン残基が相対的に溶媒側に向くことにより修飾が増加したものと思われる、リジン残基の元の相互作用が減少することが T_m の低下 (= 不安定化) につながったものと考えられる(図 4)。

Bach2(331-520)

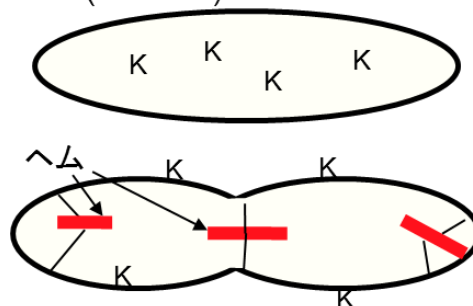


図4 Bach2コンホメーション変化

ヘムによる転写調節の分子機構の考察：

Bach2 は転写抑制因子であり、ヘムが結合すると DNA から外れ、分解が促進される。ヘムと Bach2 とが結合することは以前よりわかっていたが、ヘムの結合による DNA 結合阻害と

分解の促進に関する分子メカニズムは不明であった。ルシフェラーゼレポーターアッセイではヘムの存在下でルシフェラーゼ活性が増大し、Bach2 にヘムが結合することで遺伝子調節に影響を及ぼすことが見出されている。我々の結果からはBach2 にヘムが結合することでコンホメーションの変化が起こることが明らかとなっており、このコンホメーション変化により DNA への結合能が変化することが予想され、Bach2 では結合能が低下するものと思われる。また同時にヘムの結合はタンパク質安定性の低下を招き、より分解されやすい状況になるものと考えられる。ただBach2はコンホメーション変化により分子内、分子間の相互作用環境を変化させる可能性もあることから、Bach2 単独での変化の結果として転写抑制解除が起こるのではなく、介在しているタンパク質との相互作用を変化させることによって転写抑制機能を制御している可能性もある。また天然変性タンパク質としての性質は機能制御を単なるスイッチングではなく、連続的な構造変化により連続的に制御しているのではないかと考えている。

天然変性タンパク質はこれまでもさまざまなものが研究されてきたが、従来は遭遇複合体に見られるような[天然変性構造][通常の3次構造]という構造状態と変性状態の2つの状態間の転移についての議論が多かったように思われる。一方、本件研究におけるBach2では[天然変性1][天然変性2]というような天然変性うちの2つの状態間の変化として構造変化をみなすことができる(図5)。

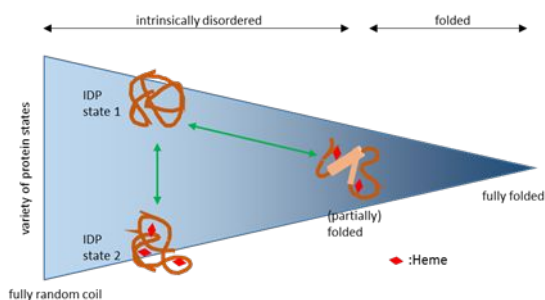


図5 天然変性状態の変移

このようなタンパク質の構造変移についてはこれまでのところ十分に議論されたものではなく、特にヘムを結合するタンパク質について議論したものは本研究が最初である。天然変性タンパク質としてのBach2の分子機構の理解にはまだまだ困難な部分があり、今後もメカニズムの理解に向けて引き続き研究を進めることが重要である。

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)

M. Watanabe-Matsui, T. Matsumoto, T. Matsui, M. Ikeda-Saito, A. Muto, K. Murayama, K. Igarashi. Heme binds an intrinsically disordered region of Bach2 and alters its conformation. Arch. Biochem. Biophys., 565, 25-31(2015).

doi: 10.1016/j.abb.2014.11.005

(査読有)

[学会発表](計 5 件)

松井-渡部美紀、ヘムによる天然変性タンパク質 Bach2 の制御、日本生化学大会、H26 年 10 月 15-18 日、京都国際会議場(京都)

渡部-松井美紀、ヘムに制御される天然変性タンパク質 Bach2 の制御機構の解明、日本蛋白質科学会、H25 年 6 月 12-14 日、とりぎん文化会館(鳥取)

村山和隆、天然変性タンパク質 Bach2 のタンパク質のヘム結合領域、日本生物物理学会、H25 年 10 月 28-30 日、京都国際会議場(京都)

村山和隆、X 線小角散乱による Bach2 タンパク質の構造変化の解析、日本蛋白質科学会、H24 年 6 月 20-24 日、名古屋国際会議場(愛知、名古屋)

渡部-松井美紀、ヘムによる天然変性タンパク質の制御、日本生化学大会、H24 年 12 月 14-16 日、福岡国際会議場(福岡)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

<http://www.structbiol.med.tohoku.ac.jp/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

村山 和隆 (Murayama, Kazutaka)
東北大学・大学院医工学研究科・准教授
研究者番号：40400452

(2) 連携研究者

武藤 哲彦 (Muto, Akihiko)
東北大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：80343292

松井-渡部 美紀 (Matsui-Watanabe, Miki)
東北大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：00455784