

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 15 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25440069

研究課題名(和文)蛋白質の凝集メカニズムの原子レベルでの解明と化学修飾法による安定化

研究課題名(英文) Analysis of the mechanism of protein aggregation at an atomic level and development of a method of stabilizing it by chemical modification

研究代表者

池上 貴久 (Ikegami, Takahisa)

横浜市立大学・生命医科学研究科・教授

研究者番号：20283939

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：蛋白質には特定の立体構造を保ったまま相互作用して凝集する例が見られる。このような凝集は多くの病気にも関連している。また同時に NMR などの分光学的解析を妨げる原因にもなっている。そのような凝集が自発的に起こる物理的メカニズムを解明し、それを阻害するような化学修飾法を開発することを当研究の目的とした。腸球菌のバンコマイシン耐性に関与する酵素 VanX を対象とした。おもに NMR を利用して二量体としての立体構造を解析した。その結果、VanX は濃度を上げるにつれて四量体へと凝集していくことが示された。さらに pH に応じて、その凝集の程度が変わることも分かった。

研究成果の概要(英文)：There are many examples of proteins interacting with each other while maintaining their specific three-dimensional structures, and leading to aggregation. Such aggregation is also associated with many kinds of diseases. It is also one of the causes that hinder detailed spectroscopic analyses such as NMR. The purpose of this study is to study the physical mechanism by which such aggregation occurs spontaneously and to develop chemical modification methods that inhibit it. I have targeted VanX, an enzyme involved in vancomycin resistance in Enterococci. The tertiary structure as a dimer was analyzed mainly by NMR. As a result, it was shown that VanX aggregates to tetramers as the concentration increases. It was also found that the degree of aggregation changes depending on the solvent pH.

研究分野：構造生物学

キーワード：核磁気共鳴 蛋白質 立体構造解析 非特異的相互作用 NMR

1. 研究開始当初の背景

タンパク質の凝集が最近の大きな話題となっているが、原子レベルでこれを見ると、凝集といえどもその様子は大きく二つに分けられる。1つ目は個々の分子が特定の立体構造をとらず、さまざまな、あるいはフレキシブルに動いた柔軟な構造をとったタンパク質分子がお互いに非特異的に相互作用して大きな凝集体となっているケースである。もう1つは、ある程度決まった構造をすでに持っているが、その構造を保ったまま集まって凝集しているケースである。その決まった構造がもともとの構造とは異なるようなケースであっても、その凝集体における構造がある特定の構造であればこの範疇に入り、たとえば脳内に沈着するアミロイドなどが例として挙げられる。

上記の2ケースとも凝集体の体積が大きくなるほど溶解度が下がる傾向がある。凝集という現象が上記のように病気に深く関連している一方で、蛋白質の多くの研究において一種の妨げにもなっている。例えば、対象とする蛋白質の機能や構造を調べたい場合、何らかの物理的パラメータの検出感度を上げるために、その蛋白質を濃縮する。すると、特に真核生物由来の蛋白質において凝集が発生するケースが多い。蛋白質が凝集してしまうと、実際よりも低い活性しか検出されなかったり、また結晶の作成や NMR による立体構造やダイナミクスの解析にも失敗してしまう。筆者はおもに NMR を使って蛋白質の構造を解析しているが、この凝集が起これると、スペクトルのピークがブロード化し、そもそも解析が不可能になってしまうようなケースにしばしばぶつかった。このような現象は交換によるピークのブロード化と呼ばれているが、これを NMR 分光学的に全てのケースに渡ってうまく解決する方法はまだ見つかっていない。

2. 研究の目的

上記の2つ目の「凝集」の概念で注意したい点は、この対象は **intrinsically disordered protein (IDP)** ではないということである。IDP はそのままでは構造を持っていない。それに対して、上記の凝集のケースでは個々の蛋白質分子は決まった特定の **specific** な構造をもっているながら凝集するのである。例えば、蛋白質によっては結晶構造がすでにきっちりと解析されているながら、NMR で観察するとスペクトルが酷くブロードしているようなケースがある。これは特定の構造をもった蛋白質が凝集を起こす典型的な例である。筆者は、このような凝集は完全に非特異的に相互作用

しているのではなく、ある特定の領域を界面として凝集していると見ている。そのため、ある条件下では結晶として成長するが、NMR ではスペクトルが見えなくなってしまう。

そこで、このような蛋白質を対象として、その凝集の物理的なメカニズムを解明すること、そして、その凝集を防ぐための化学修飾の手段を開発することを研究の目的とした。

3. 研究の方法

バンコマイシン耐性に関与する腸球菌由来の VanX を安定同位体である ^{15}N あるいは、測定手段によっては、 ^{13}C , ^2H で標識する。VanX をコードした DNA は pET-15b ベクターに収めることにより、His-tag を N-末端に付加することにより、His-tag は thrombin によってうまく切断できるように認識部位との間に Gly-Gly-Ser-Gly からなるリンカーを入れて設計する。また、分子間の非特異的なジスルフィド結合の形成を防ぐために Cys78, Cys157 は両方とも Ser に置換する。今後の研究のために活性残基の一つである Glu181 を Ala に置換した変異体も作成する。

構造解析には 500, 800MHz NMR 装置を利用した。測定温度は 298K に設定した。なお、主鎖の帰属では感度が足りなかったため、303K でも測定した。

4. 研究成果

対象として、バンコマイシン耐性に関与する腸球菌 *Enterococcus faecium* 由来の VanX を選んだ(図1)。遺伝子組み換え大腸菌で発現させた蛋白質の多くが inclusion-body として沈殿フラクションに検出された。容易に凝集する蛋白質は、少しの条件の変化ですぐに凝集、沈殿してしまう傾向が強い。上清部分からも数割程度の VanX は回収できたが、高価な安定同位体を導入していることから沈殿を塩酸グアニジンで溶かし、透析を通して refolding させた。その透析の条件検討にかなりの時間を費やした。

NMR で二次元スペクトルを測定した結果、pH4, 8 などでは比較的きれいなピークが検出されたのに対して、pH6 では濃度を少しでも上げるとピークが消えてしまった。これは等電点沈殿によるものと考えている。ただし、pH4, 8 でも濃度を 0.05mM 以上に上げると、ピークのブロード化が顕著になり、三次元測定を適用することができなかった。そこで、50 μM という NMR にとってはかなり低い濃度で三次元測定を行った。

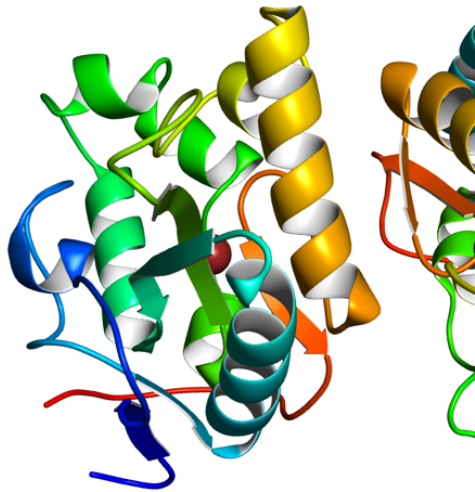


図1) VanXの結晶構造 (pdb: 1R44) 6個の構造のうちChain Lに相当する。右に一部だけ見えているのはChain Kである。赤い丸はZn²⁺イオンを表す。同じ亜鉛プロテアーゼに属するサーモリシンと活性部位での残基の配置は似ている。

研究を進めるにつれて、これが二量体である証拠が出始め、さらにこの VanX は濃度に依存して二量体と四量体との平衡が移動しているようであった。図2に示すように、濃度を 0.05mM 以上に上げると NMR スペクトルが急速に劣化する原因は、この四量体成分の増加によるものと考えている。凝集を防ぐための具体的な化学修飾の開発にまでは至らなかったが、最終年度は NMR による主鎖の帰属をほぼ完成させ、二量体としての立体構造が分かりつつある。当研究は今後も継続していき、多量体を形成するメカニズムを立体構造の観点から解明する。

解析用に調製した VanX は一度 refolding の過程を経ているため、実際に野生体と同じ構造をとっているかどうかを確認する必要がある。まずは、大腸菌をソニケーションした際に上清フラクションに存在する微量の VanX を精製した。その結果、その *in vivo* での folding を経た VanX の ¹H-¹⁵N HSQC スペクトルは、*in vitro* で refold させた VanX のスペクトルと全く同じであった。さらに、活性があるかどうかを NMR を使ってチェックした。10mM の D-Ala-D-Ala に対して 1/10,000 等量の VanX を加えて D-Ala-D-Ala の ¹H ピークの変化を観測した。その結果、図3のように36分でおおよそ 1/4 程度が分解されたことを確認した。

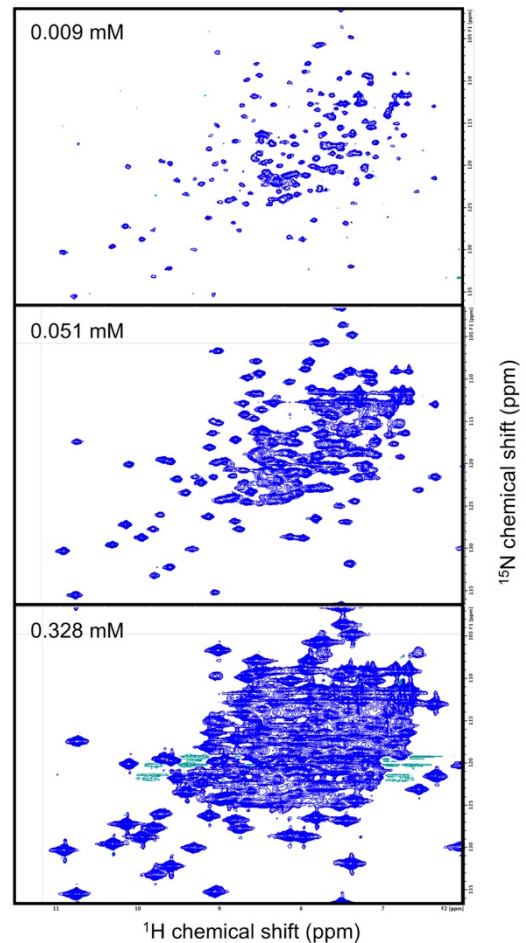


図2) 左上に示す値に VanX の濃度を変えた時のスペクトルの変化の様子。いずれも 298K, pH8.0 にて測定した。濃度を上げると極端に ¹H/¹⁵N アミドピークが広幅化している。

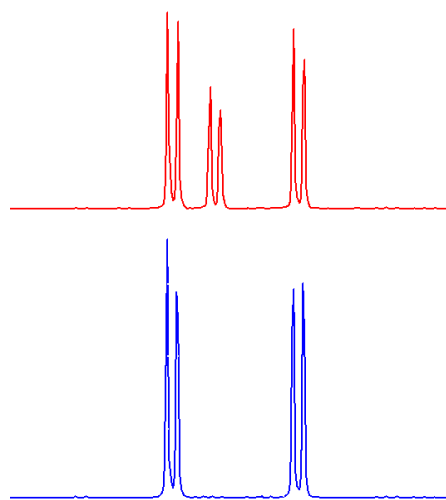


図3) D-Ala-D-Ala の一次元 ¹H-NMR ピーク (下側)。(上側) 1/10,000 等量の VanX を加えて36分後のピーク。これらのピークは D-Ala-D-Ala のメチル基の ¹H に帰属される。VanX によ

ってペプチド結合が加水分解されると、1 アミノ酸の D-Ala となるので、縮重したピークが2本のピークの間に出現する。ピークが2本に分裂しているのは同残基内の $^1\text{H}^\alpha$ との ^3J -coupling による。

どの界面でサブユニットどうしが二量体として相互作用しているかを解明するために、まずは主鎖の共鳴値の帰属を行った。そのために3次元の HNCA, HNCOCa, HNCOC, HNCACOC, HNCACB 実験 (TROSY 形式) を、いずれも ^2H , ^{15}N , ^{13}C 標識の試料で測定した。濃度が $50\ \mu\text{M}$ と非常に薄いため全てのピークを観測することができず、85% 程度の完成度である。しかし、スペクトルを何枚も積算し、かつ nonuniform-sampling (NUS) を導入することにより、帰属できていない箇所の完成を目指している。また、メチル基については、変異体および結晶構造から帰属する予定である。メチル基どうし、あるいは、メチル基とアミド基との間の NOE を観測することによって、二量体の構造を決定できるであろう。なお、結晶構造 (pdb:1R44) には 202 残基からなるペプチド鎖6個が一行に並んだ形で登録されている (図1)。したがって、そのうちのどの相互作用が溶液内の二量体としての相互作用を反映しているのか、あるいは、いずれも溶液内の姿を反映していないのかなどについては全く分からない。上記の NOE を観測することによって、それが明らかになるだろう。

立体構造を保ったままタンパク質が凝集する現象は、アミロイドなど多くの病気と関連している。そのため、そのメカニズムの解明はそれらの病気の解明につながる。また、大腸菌発現系における封入体 (inclusion body) の実体についてもあまり良く分かっておらず諸説が出されているが、この解明にも役立つであろう。また、多くのタンパク質が自発的に複雑な複合体を形成する系において、その組織化の物理的メカニズムには今回の凝集のメカニズムと共通している要素も多い。このことから、当研究は生体内における純粋な生命科学の解明にもつながると考えている。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計3件)

- 1) Veit, S., Nagadoi, A., Roegner, M., Rexroth, S., Stoll, R., and Ikegami, T. (2016) The cyanobacterial cytochrome b6f subunit PetP adopts an SH3 fold in solution. *Biochim. Biophys. Acta* **1857**, 705-714. doi: 10.1016/j.bbabi.2016.03.023. 査読有

り

- 2) Oktaviani, N.A., Risor, M.W., Lee, Y.H., Megens, R.P., de Jong, D.H., Otten, R., Scheek, R.M., Enghild, J.J., Nielsen, N.C., Ikegami, T., and Mulder, F.A. (2015) Optimized co-solute paramagnetic relaxation enhancement for the rapid NMR analysis of a highly fibrillogenic peptide. *Journal of Biomolecular NMR* **62**, 129-42. doi: 10.1007/s10858-015-9925-8. 査読有り
- 3) Furukawa, Y., Teraguchi, S., Ikegami, T., Dagliyan, O., Jin, L., Hall, D., Dokholyan, N.V., Namba, K., Akira, S., Kurosaki, T., Baba, Y., and Standley, D.M. (2014) Intrinsic disorder mediates cooperative signal transduction in STIM1. *Journal of Molecular Biology* **426**, 2082-2097. doi: 10.1016/j.jmb.2014.03.006. 査読有り

[学会発表] (計3件)

- 1) 池上貴久「NMR spin-relaxation analyses of larger molecules」 in RRR workshop 2017 Kyoto, Frontiers of NMR methods and their cutting edge applications, 2017年2月22-23日、Funai Tetsuro Auditorium in Kyoto University Katsura Campus (京都府京都市)
- 2) 池上貴久「Cooperativity observed in a signal transduction-related protein」 in The 5th International Symposium on Drug Discovery and Design by NMR 第5回国際シンポジウム「NMR創薬」2016年8月29-30日 (主催: 西村善文) 理研横浜キャンパス交流棟ホール (神奈川県横浜市)
- 3) 池上貴久「Analysis of Artifacts Derived from Pulse Imperfections in CPMG Pulse Trains」 in The XXVIIth International Conference on Magnetic Resonance in Biological Systems, 2016年8月21-26日, Kyoto International Conference Center (京都府京都市)

[図書] (計3件)

- 1) 「直積演算子 (プロダクトオペレータ) の覚え方」長土居有隆, 池上貴久, NMR 学会誌 NMR 7, 基礎講座 pp. 72-76 (130 総

ページ) (2016).

- 2) 「フーリエ変換に代わる共分散変換の特徴」長土居有隆, 池上貴久, NMR 学会誌 NMR 6, 基礎講座 pp. 56-64 (110 総ページ) (2015).
- 3) 「残余双極子相互作用を利用した NMR 解析」長土居有隆, 池上貴久, 分光学会学会誌 分光研究 64-4, 講座 pp. 490-501 (610 総ページ) (2015).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

池上 貴久 (IKEGAMI, Takahisa)

横浜市立大学・生命医科学研究科・教授

研究者番号：20283939