

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 31 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25870372

研究課題名(和文) NMR法によるArfファミリー低分子量G蛋白質構造変換機構の解析

研究課題名(英文) NMR analysis of the conformational change of an Arf-family Small G Protein

研究代表者

岡村 英保 (Okamura, Hideyasu)

国立研究開発法人理化学研究所・生命システム研究センター・研究員

研究者番号：50620928

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：Arfファミリー低分子量G蛋白質の構造変換分子機構を、特に溶液NMR法から明らかにすることが目的である。そこで、より自由度の高い安定同位体ラベル技術が利用できる無細胞蛋白質合成システムにより、タバコおよびヒト由来のArf18蛋白質を調整し、NMR緩和パラメーターを取得し、解析を行った。さらに、実際の細胞内のような高濃度環境下に適用できる緩和解析法として、従来法の問題を修正した新規拡張Model-free解析法の開発を行った。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to elucidate the molecular mechanism of the conformational change of an Arf-family Small G protein by using NMR relaxation analysis. *Nicotiana tabacum* and Human Arf18s were produced by a cell-free system that is capable of Advanced isotope-labeling techniques. The relaxation data of Arf18s were obtained and analyzed. In addition, I developed an extended model-free analysis that is applicable to macromolecular high concentrated systems like biological cells.

研究分野：構造生物学

キーワード：ダイナミクス 新規拡張model-free解析法 無細胞蛋白質合成システム

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 天然状態の蛋白質の立体構造とは、その溶液条件下において、系の自由エネルギーが最小になるように折りたたまれた状態である。しかしながら、溶液中での立体構造は静的なものではなく、熱揺らぎによる恒常的な動的平衡状態にある。研究開始当時、このような熱揺らぎの中で、わずかな確率で存在する励起状態の立体構造が、その蛋白質機能にとって本質的な役割をしている例がトップジャーナルに次々と報告されていた。本研究代表者は、細胞内で大きな立体構造変化を起こすことで機能する低分子量 G 蛋白質 Arf ファミリーのひとつ Arl8 で、その構造変化の基盤となる構造転移機構が、蛋白質コア領域に自発的な揺らぎとして内在していることを明らかにしていた。

(2) 蛋白質の実際に働く細胞内は数百 mg/ml 濃度程度の分子混雑環境にある。それゆえ、このような高濃度環境下での蛋白質動態(物性)を明らかにすることが不可欠である。しかしながら、既存の報告のほとんどは希薄溶液環境を対象としたものであり、このような高濃度環境が蛋白質動態に及ぼす影響はよく分かっていなかった。原因としては、このような環境を対象とする計測法がほとんど存在しないことがあった。

## 2. 研究の目的

本研究代表者が明らかにした、Arl8 蛋白質のコア領域の揺らぎを基礎とした構造変換機構は N 末ヘリックス領域との相互作用による制御を受けると考えられる。また、この N 末ヘリックス領域は膜とも相互作用すると考えられている。これらの状態遷移機構を特に NMR から得られる広範な時間スケールのダイナミクス情報から、定量性をもって明らかにする。

## 3. 研究の方法

(1) タバコおよびヒト由来 Arf ファミリー蛋白質 Arl8 の無細胞蛋白質システムにより調整を行った。そして、これらに対して、NMR 緩和パラメーターを取得し、緩和解析を行った。NMR 緩和パラメーターにはピコ秒~ミリ秒オーダーの非常に広範な蛋白質運動情報が取得できる。

(2) NMR 緩和パラメーターの解析法として最も成功を収めてきたものの一つとして、Model-free 解析法がある。しかしながら、これは細胞環境を志向した分子混雑環境には対応しないことが明らかになった。そこで、これに対応する新規拡張 model-free 解析法の開発を行った。

## 4. 研究成果

(1) 以前には大腸菌大量発現系にて調整を行っていたタバコ由来 Arl8 蛋白質であるが、より自由度が高く柔軟な安定同位体ラベル技術を利用できる細胞蛋白質合成系にて調整を試み成功した。これにより、より高難度な NMR 測定の適用が期待できる。そして、GTP 結合型、GDP 結合 GTP 様型、GDP 結合型の立体構造をそれぞれ NMR シグナルにて確認した。そして、これを利用して、ミリ秒からマイクロ秒の比較的に大きな構造変化が検出できる R2 緩和分散法を適用し、運動情報を取得した。結果、以前のデータの再現性が取れた。

(2) タバコ由来 Arl8 に比べて、よりインパクトの高い結果につながることを期待できるヒト由来 Arl8 について無細胞蛋白質合成系にて調整を行い成功した。そして同様に GTP 結合型、GDP 結合 GTP 様型、GDP 結合型の立体構造をそれぞれ NMR シグナルにて確認した。そして、緩和パラメーターの取得を行った。これらをタバコ由来のものと比較することで、新たな知見が得られると期待できる。

(3) 本研究課題では NMR 緩和解析法として、蛋白質の溶液中での全体運動から局所運動までの情報を包括的に評価することが可能な Model-free 解析法の利用を予定していた。しかしながら、本研究代表者は蛋白質が細胞環境のような高濃度環境下では従来法が想定しているモデルでは通用しないことを突き止めた。図 1 は、ある蛋白質を 0.1 - 32 mM まで濃度を変化させた時の、緩和パラメーター、 $T_1$ 、 $T_2$  のプロットである。濃度が上昇するに従って、プロットが図中の曲線外へ出ていく様子が見られる。これは従来モデルでは対応できない領域へ移動していることを表している。

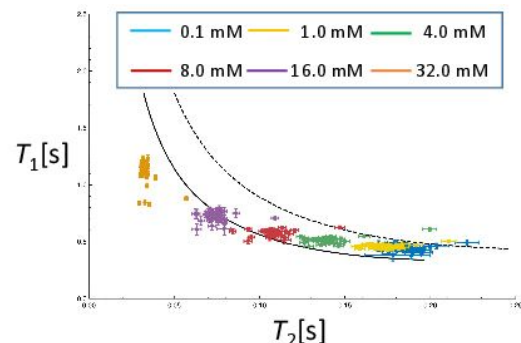


図 1 .  $T_1, T_2$  プロットの蛋白質濃度変化.

そこで、本研究代表者はこの問題の原因を特定し、それを克服した新規拡張 Model-free 解析法を考案して、開発した(論文準備中、参考:雑誌論文発表, 学会発表)

)。これは、高濃度環境下で生じるであろう、それぞれの自由な運動(ブラウン運動)の干渉を考慮したものとなっており、これによって、細胞環境を志向した、より実際に近い系での解析が可能となる。今後、これをArl8蛋白質に適用することで、その構造変換機構の詳細が明らかになることが期待できる。

#### 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 3 件)

Hideyasu Okamura, Hiroshi Nishimura, Takashi Nagata, Takanori Kigawa, Takashi Watanabe, Masato Katahira. Accurate and molecular-size-tolerant NMR quantitation of diverse components in solution. 査読有, *Sci Rep.* 6, 2016, 21742.  
DOI: 10.1038/srep21742.

岡村英保, 木川隆則, NMR で分子混雑環境におけるタンパク質の挙動を調べる. 査読有, *細胞工学*, 33, 2014, 830-834.

Kenji Ogura, Hideyasu Okamura. Conformational change of Sos-derived proline-rich peptide upon binding Grb2 N-terminal SH3 domain probed by NMR. 査読有, 2013, *Sci Rep.* 3, 2913.  
DOI: 10.1038/srep02913.

〔学会発表〕(計 9 件)

岡村英保, 柝尾尚哉, 杉山修世, 伊東優弘, 渡部暁, 優乙石, フェイグマイケル, 杉田有治, 木川隆則, 新規拡張 model-free 解析法により明らかになった分子混雑環境下での蛋白質運動, 第 54 回 NMR 討論会, 2015 年 11 月 6 日~8 日, 千葉工大(千葉・津田沼)

Hideyasu Okamura, Takanori Kigawa, Analysis of Protein Dynamics in Macromolecular Crowding Environment, 56th Experimental Nuclear Magnetic Resonance Conference, 19-24 April, 2015, Pacific Grove, USA

岡村英保, 西村裕志, 永田崇, 木川隆則, 渡辺隆司, 片平正人, 分子量(横緩和時間)の差に由来する物質定量のゆがみを克服する新しい測定法の開発とその応用, 第 53 回 NMR 討論会, 2014 年 11 月 4 日~6 日, 大阪大(大阪・吹田)

岡村英保, 柝尾尚哉, 杉山修世, 渡部暁, 優乙石, フェイグマイケル, 杉田有治, 木川隆則, 分子混雑環境に適用可能な新規拡張 model-free 解析法の開発, 第 53 回 NMR 討論会, 2014 年 11 月 4 日~6 日, 大阪大(大阪・吹田)

岡村英保, 木川隆則, 分子混雑環境における蛋白質の NMR 緩和解析, 日本生物物理学会第 52 回年会, 2014 年 9 月 25 日~27 日, 札幌コンベンションセンター(北海道・札幌)

岡村英保, 柝尾尚哉, 杉山修世, 渡部暁, フェイグマイケル, 杉田有治, 木川隆則, 分子混雑環境における蛋白質の NMR 緩和解析, 第 14 回日本蛋白質科学会, 2014 年 6 月 25 日~27 日, ワークピア横浜/横浜産貿ホール(神奈川・横浜)

西村裕志, 田頭英朗, 岡村英保, 片平正人, 渡辺隆司, NMR を用いたバイオマス生分解過程の追跡および解析法の開発, 第 9 回バイオマス科学会議, 2014 年 1 月 15 日~16 日, 高知県立県民文化ホール(高知・高知)

岡村英保, 柝尾尚哉, 杉山修世, 渡部暁, フェイグマイケル, 杉田有治, 木川隆則, 分子混雑環境における蛋白質の NMR 緩和解析, 第 52 回 NMR 討論会, 2013 年 11 月 12 日~14 日, 石川県立音楽堂(石川・金沢)

岡村英保, 西村裕志, 今村良教, 小澤佑, 寺島典二, 松下泰幸, 福島和彦, 渡辺隆司, 片平正人, 木質バイオマスを溶液 NMR 法で解析する為の方法論の開発とその応用, 第 52 回 NMR 討論会, 2013 年 11 月 12 日~14 日, 石川県立音楽堂(石川・金沢)

〔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：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

岡村 英保 (OKAMURA, Hideyasu)  
国立研究開発法人・理化学研究所  
生命システム研究センター  
研究員  
研究者番号：50620928

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：