

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25870407

研究課題名(和文) Study on effect of electrostatic interactions on stability of electron transfer complexes and amyloid fibrils

研究課題名(英文) Study on effect of electrostatic interactions on stability of electron transfer complexes and amyloid fibrils

研究代表者

李 映昊 (LEE, Young-Ho)

大阪大学・たんぱく質研究所・講師

研究者番号：70589431

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)：Ferredoxin(Fd)とsulfite reductase間、そして、FdとFd NADP(+)-reductase間の分子間相互作用と酵素活性との関連性を熱測定、核磁気共鳴分光法、X線結晶構造解析、酵素活性測定などの様々な手法を用いて調べた。蛋白質間の静電的相互作用とともに非静電相互作用も電子伝達複合体形成に重要であることを明らかにした。加えて、分子間の非共有結合の微調整によって酵素の活性が制御されることを提案した。様々な病気の原因となるアミロイド線維も球状蛋白質のように高温で高温変性し、低温で低温変性することを見出し、線維の低温変性には分子間の静電反発が重要であることを提案した。

研究成果の概要(英文)：We have conducted thermodynamic studies on binding reactions between ferredoxin (Fd) and sulfite reductase (SiR) as well as Fd and ferredoxin NADP(+)-reductase (FNR) using calorimetry, NMR spectroscopy, and X-ray crystallographic analysis with FNR and SiR activity assays. We have revealed that oppositely-charged Fd and SiR formed the electron transfer complex using attractive charge-charge interactions, and that non-electrostatic interactions was also important for fine tuning of binding modes between Fd and SiR to optimize SiR activity. The same results were also obtained in the binding system between Fd and FNR. We have also revealed that amyloid fibrils of alpha-synuclein cold-denatured below 293K due to the repulsive electrostatic interactions at low temperature. We have clearly demonstrated that interprotein electrostatic interactions play an important roles in normal protein functions and in clearance of disease-related amyloid fibrils.

研究分野：蛋白質科学

キーワード：Amyloid fibril Binding thermodynamics Calorimetry Electron transfer Electrostatics Enzyme activity Interprotein interaction Protein misfolding

1. 研究開始当初の背景

分子間の非共有結合は、蛋白質の複合体形成の調節など酵素活性に重要であるが、分子レベル・原子レベルにおけるその詳細な理解はまだ不十分である。蛋白質間に働く非共有結合は、蛋白質の溶解度も調節し、様々な蛋白質の異常凝集反応を統御する。非共有結合には、大きく静電的相互作用と非静電的相互作用があるが、最初に、電子伝達蛋白質の複合体形成に鍵となると提案されている静電的相互作用に着目した。

近年、電荷を多く持つため生理的条件下で立体構造をとらない天然変性蛋白質に関する研究が盛んでいる。天然変性蛋白質である alpha-synuclein は、凝集してアミロイド線維を形成し、パーキンソン病の発症に深く関与している。Alpha-synuclein が形成するアミロイド線維の構造安定性は全く未知であり、温度に対する線維の構造安定性と電荷同士の静電的相互作用の構造安定性への寄与に関する情報がない。

2. 研究の目的

分子間の静電的相互作用の役割を調べ、蛋白質の機能や凝集反応をより深く理解する。

3. 研究の方法

酵素活性
蛋白質工学
熱測定
円二色性分光法
核磁気共鳴分光法
X線結晶構造解析
原子間力顕微鏡法

4. 研究成果

(1) Ferredoxin(Fd)と sulfite reductase 間、そして、Fd と Fd NADP(+)-reductase 間の分子間相互作用と酵素活性との関連性を熱測定、核磁気共鳴分光法、X線結晶構造解析、酵素活性測定などの様々な手法を用いて調べた。蛋白質間の静電的相互作用とともに非静電相互作用も電子伝達複合体形成に重要であることを明らかにした。加えて、分子間の非共有結合(静電的相互作用と非静電相互作用)の微調整によって酵素の活性が制御されることを提案した。

上記の研究内容で下の出版に寄与した。

[図書](計1件)

Kim et al.

加えて、一つの論文がアプセフトされた(発表論文の実績にはのせていない)。

Kinoshita M., Kim J.Y., Kume S., Sakakibara Y., Sugiki T., Kojima C., Kurisu G., Ikegami T., Hase T., Kimata-Ariga Y., Lee Y.-H. Physicochemical Nature of Interfaces Controlling Ferredoxin NADP+ Reductase

Activity through Its Interprotein Interactions with Ferredoxin (2015) Biochimica et Biophysica Acta-Bioenergetics In press

他方、二つの原稿を準備している。

(2) 様々な病気の原因となるアミロイド線維も球状蛋白質のように高温で高温変性し、低温で低温変性することを見出し、線維の低温変性には分子間の静電反発が重要であることを提案した。

上記の研究内容で下の論文を発表した。

発表論文 Ikenoue and Lee et al.

(3) 蛋白質は溶解度を超えない可溶化された状態で機能するが、溶解度を超えると凝集し、失活とともに様々な病気の原因となるアミロイド線維や無定形凝集体を形成する。蛋白質の溶解度が凝集反応を支配する因子であることを明らかにした。

上記の研究内容で下の論文を発表した。

発表論文 Yagi et al.

発表論文 Terakawa et al.

発表論文 Muta et al.

発表論文 Lin and Lee et al.

発表論文 Mangione et al.

発表論文 Kimata-Ariga et al.

(4) L-PGDS という蛋白質と10種類以上の難溶性リガンドとの相互作用を熱測定を用いて調べた。分子間の疎水性相互作用がL-PGDS と難溶性リガンドとの相互作用を支配する主な駆動力だと提案されてきた。しかし、両分子間の相互作用は、疎水性相互作用とともに静電的相互作用も重要であり、これらの分子間相互作用の微調整によって複合体が形成されることを明らかにした。

上記の研究内容で下の論文を発表した。

発表論文 Kume and Lee et al.

(5) 球状蛋白質の構造形成反応の熱力学は既に確立されているが、蛋白質の凝集反応に関する熱力学的な研究は未だにない。熱測定を用い、蛋白質が凝集するときの熱を正確に測定し、様々な熱力学的パラメータを得ることに成功した。

上記の研究内容で下の論文を発表した。

発表論文 Ikenoue and Lee et al.

(6) 円二色性分光法を用い、アミロイド線維構造を予測できるアルゴリズムを作った。

上記の研究内容で下の論文を発表した。

発表論文 Micsonai et al

(7) 球状蛋白質と抗体の構造安定性を調べ、蛋白質の構造安定性を維持できる因子を議論した。

上記の研究内容で下の論文を発表した。

発表論文 Sakurai et al.

発表論文 Akazawa-Ogawa et al.

(8) 核磁気共鳴分光法と重水素交換法を用い、様々な pH における alpha-synuclein の構造状態を議論した。

上記の研究内容で下の論文を発表した。

発表論文 Okazaki et al.

(9) 核磁気共鳴分光法と熱測定を用い、蛋白質間や蛋白質とリガンド間の相互作用を原子レベルで特徴づけた。

上記の研究内容で下の論文を発表した。

発表論文 Tanaka et al.

発表論文 Konuma et al.

(10) 天然変性蛋白質や凝集反応に適した新たな核磁気共鳴分光法を開発した。

上記の研究内容で下の論文を発表した。

発表論文 Oktaviani et al.

(11) 遺伝子修復蛋白質のドメイン間の相互作用に基づき、遺伝子修復機構の一つのモデルを核磁気共鳴分光法を用いて提案した。

上記の研究内容で下の論文を発表した。

発表論文 Mizushima et al.

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17件)

Micsonai A., Wien F., Kernya L., Lee Y.-H., Goto Y., Réfrégiers M. and Kardos J. Accurate Secondary Structure Prediction and Fold Recognition for Circular Dichroism Spectroscopy (2015) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 査読有
DOI: 10.1073/pnas.1500851112

Oktaviani N.A., Risør 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.A. Optimized Co-Solute Paramagnetic Relaxation Enhancement for the Rapid NMR Analysis of a Highly Fibrillogenic Peptide (2015) J. Biomol. NMR 査読有
DOI: 10.1007/s10858-015-9925-8

Sakurai K., Nakahata R., Lee Y.-H.,

Kardos J., Ikegami T. and Goto Y. Effects of a Reduced Disulfide Bond on Aggregation Properties of the Human IgG1 CH3 Domain (2015) Biochim. Biophys. Acta. 査読有
DOI: 10.1016/j.bbapap.2015.02.020

Yagi H., Mizuno A., So M., Hirano M., Adachi M., Akazawa-Ogawa Y., Hagihara Y., Ikenoue T., Lee Y.-H., Kawata Y. and Goto Y. Ultrasonication-Dependent Formation and Degradation of α -Synuclein Amyloid Fibrils. (2015) Biochim. Biophys. Acta. 1854, 209-217, 査読有
DOI: 10.1016/j.bbapap.2014.12.014

Terakawa M.S., Yagi H., Adachi M., Lee Y.-H. and Goto Y. Small Liposomes Accelerate the Fibrillation of Amyloid β (1-40). (2015) J. Biol. Chem. 290, 815-826, 査読有
DOI: 10.1074/jbc.M114.592527

Muta H., Lee Y.-H., Kardos J., Lin Y., Yagi H. and Goto Y. Supersaturation-Limited Amyloid Fibrillation of Insulin Revealed by Ultrasonication. (2014) J. Biol. Chem. 289, 18228-18238, 査読有
DOI: 10.1074/jbc.M114.566950

Ikenoue T.*, Lee Y.-H.*, Kardos J., Saiki M., Yagi H., Kawata Y. and Goto Y. Cold Denaturation of Alpha-Synuclein Amyloid Fibrils. (2014) Angewandte Chemie 53, 7799-7804 (*equal contribution), 査読有
DOI: 10.1002/anie.201403815

Mizushima R., Kim J.Y., Suetake I., Tanaka H., Takai T., Kamiya N., Takano Y., Mishima Y., Tajima S., Goto Y., Fukui K. and Lee Y.-H. NMR Characterization of the Interaction of the Endonuclease Domain of MutL with Divalent Metal Ions and ATP. (2014) PLoS ONE 9, e98554, 査読有
DOI: 10.1371/journal.pone.0098554

Akazawa-Ogawa Y., Takashima M., Lee Y.-H., Ikegami T., Goto Y., Uegaki K. and Hagihara Y. Heat-induced Irreversible Denaturation of the Camelid Single Domain VHH Antibody is Governed by Chemical Modifications. (2014) J. Biol. Chem. 289, 15666-15679, 査読有
DOI: 10.1074/jbc.M113.534222

Ikenoue T.*, Lee Y.-H.*, Kardos J., Yagi H., Ikegami T., Naiki H. and Goto Y. Heat of Supersaturation-limited Amyloid Burst Directly Monitored by Isothermal

Titration Calorimetry. (2014) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 111, 6654-6659 (*equal contribution), 査読有
DOI: 10.1073/pnas.1322602111

Lin Y.*, Lee Y.-H.*, Yoshimura Y., Yagi H. and Goto Y. Solubility and Supersaturation-Dependent Protein Misfolding Revealed by Ultrasonication. (2014) Langmuir 30, 1845-1854 (cover story) (*equal contribution), 査読有
DOI: 10.1021/la403100h

Kume S.*, Lee Y.-H.*, Nakatsuji M., Teraoka Y., Yamaguchi K. Goto Y. and Inui T. Fine-Tuned Broad Binding Capability of Human Lipocalin-type Prostaglandin D Synthase for Various Small Lipophilic Ligands. (2014) FEBS Lett. 588, 962-969 (*equal contribution), 査読有
DOI: 10.1016/j.febslet.2014.02.001

Okazaki H, Ohori Y, Komoto M, Lee Y.-H., Goto Y, Tochio N. and Nishimura C. Remaining Structures at the N- and C-terminal Regions of Alpha-Synuclein Accurately Elucidated by Amide-Proton Exchange NMR with Fitting. (2013) FEBS Lett. 587, 3709-3714, 査読有
DOI: 10.1016/j.febslet.2014.02.001

Mangione P.P., Esposito G., Relini A., Raimondi S., Porcari R., Giorgetti S., Corazza A., Fogolari F., Penco A., Goto Y., Lee Y.-H., Yagi H., Cecconi C., Naqvi M.M., Gillmore J.D., Hawkins P.N., Chiti F., Rolandi R., Taylor G.W., Pepys M.B., Stoppini M. and Bellotti V. Structure, Folding Dynamics and Amyloidogenesis of Asp76Asn 2-Microglobulin: Roles of Shear Flow, Hydrophobic Surfaces and Crystallin. (2013) J. Biol. Chem. 288, 30917-30930, 査読有
DOI: 10.1074/jbc.M113.498857

Kimata-Arigo Y., Kubota-Kawai H., Lee Y.-H., Muraki N., Ikegami T., Kurisu G. and Hase T. Concentration-Dependent Oligomerization of Cross-Linked Complexes between Ferredoxin and Ferredoxin-NADP+ Reductase. (2013) Biochem. Biophys. Res. Commun. 434, 867-872, 査読有
DOI: 10.1074/jbc.M113.498857

Tanaka H., Akagi K.I., Oneyama C., Tanaka M., Sasaki Y., Kanou T., Lee Y.-H., Yokogawa D., Dobenecker M.W., Nakagawa A., Okada M. and Ikegami T. Identification of a New Interaction Mode between the Src Homology 2 (SH2) Domain of C-terminal Src

Kinase (Csk) and Csk-Binding Protein (Cbp)/Phosphoprotein Associated with Glycosphingolipid Microdomains (PAG). (2013) J. Biol. Chem. 288, 15240-15254, 査読有
DOI: 10.1074/jbc.M113.498857

Konuma T., Lee Y.-H., Goto Y. and Sakurai K. Principal Component Analysis of Chemical Shift Perturbation Data of a Multiple-ligand-binding System for Elucidation of Respective Binding Mechanism. (2013) Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics 81, 107-118, 査読有
DOI: 10.1002/prot.24166

[学会発表](計11件)

Toward establishing the thermodynamics of protein misfolding and aggregation. Lee Y.-H. 先端融合科学シンポジウム「生体分子のダイナミクスを眺める」, January 19-20, 2015, Kobe.

Finely-tuned intermolecular interactions for protein function. Lee Y.-H. Korea-Japan joint international seminar, January 11, 2015, Osaka.

Finely-tuned intermolecular interactions for protein function. Lee Y.-H. The 11th Japan-Korea Bilateral Symposium on Biological NMR symposium, December 17-20, 2014, Osaka.

Thermodynamic characterization of supersaturation-limited protein misfolding and aggregation by calorimetry. Lee Y.-H. International Seminar on "Mechanism and regulation of aberrant protein aggregation", November 17-20, 2014, Osaka.

Cold and Heat Denaturation of Amyloid Fibrils of Intrinsically Disordered -Synuclein. Lee Y.-H. The 4th Asia-Pacific Symposium on Intrinsically Disordered Proteins, November 10, 2014, Daejeon (Korea).

Fine-tuned intermolecular interactions for protein function and supersaturation-limited formation of disease-related protein aggregates. Lee Y.-H. Invited seminar at Pohang University of Science and Technology, October 21, 2014, Pohang (Korea).

Fine-tuned intermolecular interactions for protein function and

supersaturation-limited formation of disease-related protein aggregates. Lee Y.-H. Invited seminar at Yonsei University, October 1, 2014, Seoul (Korea).

Heat of supersaturation-limited amyloid burst directly monitored by isothermal titration calorimetry. Lee Y.-H. The 14th Annual Meeting of the Protein Science Society of Japan, Yokohama, Japan, Jun 25-27, 2014, Yokohama. (English session)

Cold-denaturation of Amyloid Fibrils of α -synuclein Based on a Main-Chain Dominated Architecture. Lee Y.-H. The 86th Annual Meeting of the Japanese Biochemical Society, September 10-12, 2013, Yokohama.

Cold-denaturation of Amyloid Fibrils of α -synuclein Based on a Main-Chain Dominated Architecture. Lee Y.-H. Institute for Protein Research seminar on "Exploring the New Horizons of Protein Folding and Misfolding Studies", June 19-20, 2013, Osaka.

Cold Denaturation of α -synuclein Amyloid Fibrils. Lee Y.-H. Invited seminar at Eötvös Loránd University, August 16, 2013, Budapest (Hungary).

〔図書〕(計1件)

Kim J.Y., Ikegami T., Goto Y., Hase T. and Lee Y.-H. Investigation of Protein-Protein Interactions of Ferredoxin and Sulfite Reductase under Different Sodium Chloride Concentrations by NMR spectroscopy and Isothermal Titration Calorimetry. (2015) Sulfur Metabolism in Plants (Springer) (査読有) In press

Hardcover: 320 pages

2015 edition (September 14, 2015)

Language: English

ISBN-10: 3319201360

ISBN-13: 978-3319201368

〔産業財産権〕

出願状況(計 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 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

6. 研究組織

(1) 研究代表者
李 映昊 (LEE, Young-Ho)
大阪大学 たんぱく質研究所 講師
研究者番号：70589431

(2) 研究分担者
()

研究者番号：

(3) 連携研究者
()

研究者番号：