

令和元年6月28日現在

機関番号：34315

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2018

課題番号：26410187

研究課題名(和文) 高圧力振動分光法を利用した天然変性タンパク質の“機能構造”の予測

研究課題名(英文) Prediction of "Functional Structure" of Intrinsically Disordered Proteins using High Pressure Vibrational Spectroscopy

研究代表者

加藤 稔 (KATO, MINORU)

立命館大学・生命科学部・教授

研究者番号：00241258

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)：標的分子なしに遊離の天然変性タンパク質だけを用いて、“機能構造”(構造形成時のフォールド構造)を実験的に予測する方法を確立するための第一歩として、「標的分子との結合によりヘリックス構造を形成する天然変性タンパク質が、高圧力下において単独でヘリックス構造が誘起される」ことを検証することを試みた。モデル分子として、転写因子CREBのpKIDを対象とした。1058 MPaまでの高圧力下でのアミドI'モードのFTIR測定から、圧力増加にともない水和ヘリックス構造が誘起されることを観測した。以上の結果は、本研究の目的である「天然変性タンパク質におけるヘリックス形成予測に圧力を利用できる」ことを支持した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

真核生物においては、蛋白質の約40%が天然変性タンパク質であるにも関わらず、対応する標的分子の多くが同定されていない。これが天然変性タンパク質研究の進展の阻害要因の一つになっている。標的分子を用いなくても実験的に機能時の構造予測ができれば、その学術的意義は大きい。本研究は、標的分子を用いない実験的予測法の一つとして高圧力を利用できる可能性を示すことができた。さらに検証を深めることにより新たな予測法の確立が期待できる。

研究成果の概要(英文)：For the first step to establish a method to experimentally predict the secondary structure of intrinsically disordered proteins (IDPs) bound to the target molecules, in this study we examined whether pressure induces helix formation of IDPs without the target proteins. As a model molecule we performed pressure effect on the secondary structure of pKID (phosphorylated kinase-inducible domain) using high pressure FTIR equipped with diamond anvil cell up to 1058 MPa. Increasing pressure increased the peak intensity of the amide I' band due to solvated helix. This indicated that pressure induced the helix formation of pKID. The present test experiment supports the availability of the use of pressure experiments without target molecules for prediction of helix formation of IDPs as bound to target molecules.

研究分野：生体関連化学、生物物理化学

キーワード：天然変性蛋白質 圧力 FTIR法 ラマン分光 ダイヤモンドアンビルセル ヘリックス 2次構造予測

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

天然状態で構造を持たない天然変性タンパク質は、従来のタンパク質の概念から逸脱する特異なタンパク質であり、医学・生理学的重要性とともに、タンパク質折りたたみ問題、分子認識などの物理化学・タンパク質化学的視点からも大変注目されている。真核生物においては、タンパク質の約 40%が天然変性タンパク質であるにも関わらず、研究の歴史は浅く、本格的な基礎研究(生物物理・構造生物学的研究)が始まったばかりである。天然変性タンパク質は標的タンパク質との相互作用によりフォールドし機能を発現するが、対応する標的タンパク質の多くが同定されていない。

本研究では、標的分子を用いずに、そのフォールド構造(構造部位)を予測しようとするものである。最近、研究代表者らは設計および天然のヘリックスペプチド(一本鎖ヘリックス、コイルドコイル、ヘリックスバンドル)を対象とした系統的な圧力効果実験を行ってきた。いずれのペプチドも加圧に伴いアンフォールド構造からフォールドすること(Fig.1)を、高圧力(1万気圧程度)FTIR測定により明らかにした。これら一連の研究から、“ヘリックス形成能”を持つペプチド・タンパク質は、加圧によりフォールドすることが結論づけられた。逆に考えれば、高圧力下でヘリックスが誘起されるペプチドはヘリックス形成能を持っているといえる。このことを天然変性タンパク質にあてはめると、標的分子との結合によりヘリックス構造を形成する天然変性タンパク質は、高圧力下において単独でヘリックス構造が誘起されるといえる。すなわち、「高圧力を利用しての天然変性タンパク質の機能発現時構造予測」(機能発現時構造を以下“機能構造”と呼ぶ)が可能ではないかという考えから研究を着想した。

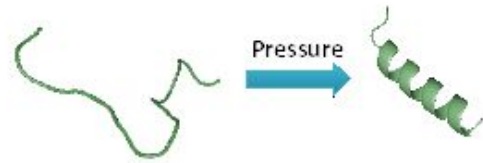


Fig.1. Pressure-induced helix formation.

2. 研究の目的

上記で述べた「高圧力を利用しての天然変性タンパク質の機能発現時構造予測」を確立するための第一歩として、「標的分子との結合によりヘリックス構造を形成する天然変性タンパク質が、実際に高圧力下において単独でヘリックス構造が誘起される」ことを検証する必要がある。本研究では、標的分子と結合したときにヘリックス構造を形成する転写因子 CREB(cyclic AMP response element-binding protein)の pKID(phosphorylated kinase-inducible domain)を主要対象分子とした。数ある天然変性タンパク質のうち、pKID のように標的分子が知られているものは数少なく、そのほとんどは結合後の立体構造が未知である。この pKID (TDSQKRREILSRPYSYRILNDLSSDAP)を用いて、圧力誘起ヘリックス形成を検証することが本研究の中心的な課題である。その他の課題として、「新規の2次構造解析法としての高圧力ラマン分光測定法の開発」、「構造に関する予測原理の確立のための予備研究」を設定した。以下、3、4では、上記主課題を中心に報告する。

3. 研究の方法

pKIDはPS3 Peptide Synthesizer (Protein Technologies, Inc.)を用いてF-moc固相合成法により合成した。合成したpKIDの粗精製試料は逆相クロマトグラフィーHPLCにより精製した。MALDI-TOF-MASSにより分子量検定を行い、HPLCにより純度は97.1%であることを確認した。試料の濃度はTyrのモル吸光係数より決定した。CDスペクトルの測定にはJ-805 CD spectropolarimeter (JASCO, Co.Ltd.)を用いた。溶媒のスペクトルはペプチド溶液と同様の条件で測定し、各測定CDスペクトルから減算した。IRスペクトル測定にはFTIR-6100 (JASCO, Co.)を用いた。スペクトルの分解能は4.0 cm⁻¹で512回積算した。セルにはルレバー式のDiamond Anvil Cell (DAC)を用いた。

4. 研究成果

(1) CD スペクトルによる常圧下でのヘリックス含量解析

CD スペクトルは、ヘリックス含量を定量化するのに最もよく使われる方法である。Fig.2 に、2,2,2-Trifluoroethanol (TFE)濃度 0 %(v/v) - 50 %(v/v)での pKID の CD スペクトルを示

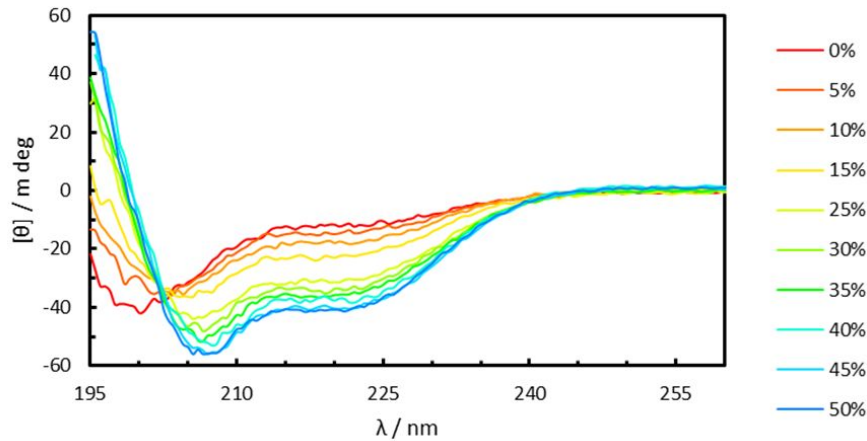


Fig. 2. CD spectra of pKID (4.0 mg/ml) in 50 mM phosphate buffer (pD 7.4) with addition of TFE (TFE concentration: 0~50%) at 24.5 °C.

した。ヘリックスは、一般に、208 nm と 222 nm に負の極大を、190 nm に正の極大を示す。TFE の濃度が高くなるに従い、ヘリックス含量が増加することがわかる。ヘリックス含量は 222 nm の平均残基モル楕円率から算出した。THE 0%、常温、常圧でのヘリックス含有率は、24.8%であった。ヘリックス誘導剤を添加することにより、その含有率は顕著に増加することから、ヘリックス形成能を有することがわかる。

(2)FTIR 法を用いたヘリックス含量に及ぼす温度効果および圧力効果

高圧力下におけるペプチド・タンパク質の2次構造解析は現在のところFTIR法が唯一の実験手段である。(遠紫外領域でのCD測定法では高圧力下で測定に適する光学窓材がない。NMR法ではいまのところ測定圧力限界は300 MPa程度である。本研究では、高圧力下での2次構造解析にDACを用いたFTIR法を採用した。圧力効果との比較のため温度可変測定も行った。Fig.3に7.4 °Cから79.4 °Cの範囲で測定したpKIDのアミドI'モード領域のFTIRスペクトルを示した。pKIDの2次構造は常温・常圧でヘリックス含有率は約25%であり、残りは不規則構造である。温度上昇に従い、より不規則構造の割合が増えることが予測される。Fig.3(c)は温度上昇にともない、1630 cm⁻¹付近のピークが減少していることを示している。溶媒和ヘリックスは1630 cm⁻¹付近に観測されることが知られており、このピークの減少は温度上昇に伴うヘリックスの減少と一致する。これに呼応して増加する1660 cm⁻¹から1670 cm⁻¹付近の強度増加は不規則構造の増加と考えられる。

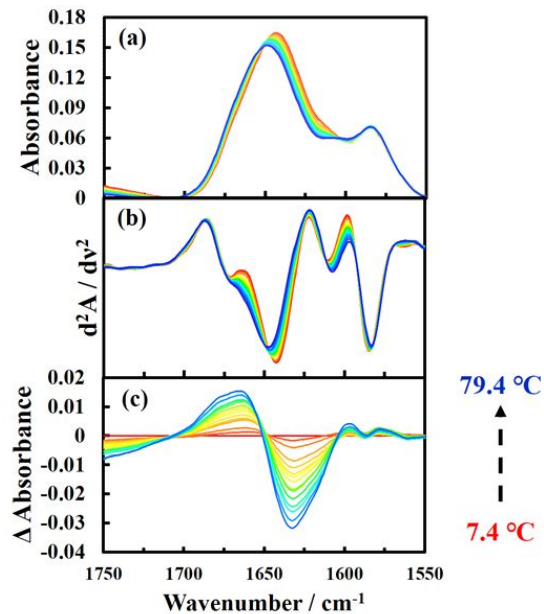


Fig. 3. (a)FTIR spectra, (b) the second derivative spectra, and (c) the difference spectra of the amide I' mode of pKID (7.0 mg/ mL) in 50 mM phosphate buffer at various temperatures (7.4~79.4 °C).

これに呼応して増加する1660 cm⁻¹から1670 cm⁻¹付近の強度増加は不規則構造の増加と考えられる。

次に、圧力可変測定の結果を Fig. 4 に示す。Fig.4 (a)および(c)のから加圧にともない、水和ヘリックスに帰属されるピーク強度が増加し、不規則構造に由来する領域の強度は減少していることが示された。差スペクトルの変化パターンは温度効果と圧力効果ではほぼ逆のパターンを示した。すなわち、加圧に伴い、pKID はヘリックス含有率が増加することが示された。

(3) まとめ

本研究では、標的分子なしに、遊離の天然変性タンパク質だけを用いて、“機能構造”(構造形成時のフォールド構造)を実験的に予測する方法を確立することを目指し、次の3つの課題を設定した： 代表的な天然変性タンパク質をモデルに用いての圧力誘起ヘリックス形成の実証、

新規の2次構造解析法としての高圧ラマン分光測定法の開発、構造に関する予測原理の確立のための予備研究。

課題 では、(1),(2)の通り、転写因子 CREB の pKID をモデル分子とした圧力可変 FTIR 実験により圧力誘起ヘリックス形成を検証することができた。ただし、ここで実証できたのは1例であり、今後他の例でも検証する必要がある。課題 に関しては、光学系にダイクロイックミラーを採用するとともに、DAC に用いる金属ガasketのデザイン変更により散乱強度を改善した。現在のところ高濃度のペプチドサンプルでは、主要ピークが観測されているが、定量的な評価は、今後本格的に進める予定である。課題 では、4つのトリプトファンを疎水性コアとして有するヘアピンペプチド(Trpzip4)およびその変異体(ヘアピン側Wの一残基置換体)をテスト分子とした。芳香族アミノ酸置換はいずれも圧力変性を示さず、Val置換体は圧力変性を示した。構造の圧力応答は配列に依存することが明らかとなった。このように構造をとるペプチドに関してはヘリックスペプチドとは圧力応答の結果が異なることから、天然変性タンパク質の機能構造予測に関しては、ヘリックス系とは別の戦略を立てる必要があることが明らかとなった。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計2件)

1. Takahiro Takekiyo, Minoru Kato and Yukihiro Yoshimura, “Pressure-induced structural changes of alanine oligopeptides in aqueous solutions”, *High Pressure Research*, 39, 202-209 (2019). doi: 10.1080/08957959.2019.1584195, 査読有
2. Takahiro Takekiyo, Erika Yamaguchi, Koji Yoshida, Minoru Kato, Toshio Yamaguchi, Yukihiro Yoshimura, “Interaction Site between the Protein Aggregates and Thiocyanate Ion in Aqueous Solution: A Case Study of 1-Butyl-3-methylimidazolium Thiocyanate”, *J. Phys. Chem. B*. 119 (22), 6536–6544 (2015), 査読有

[学会発表](計11件)

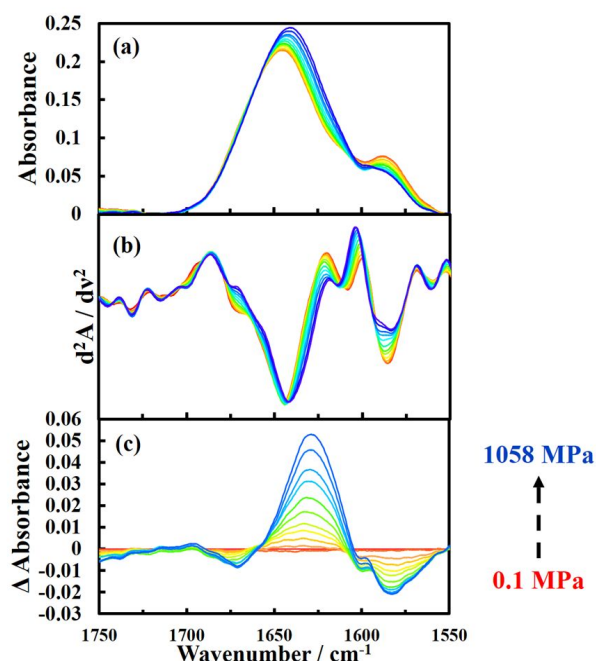


Fig. 4. (a)FTIR spectra, (b) the second derivative spectra, and (c) the difference spectra of the amide I' mode of pKID (13.5 mg/mL) in 50 mM HEPES buffer(pD7.4) at various pressures (0.1~1058 MPa, 24.5 °C).

1. Minoru Kato, Soichiro Kubota and Tsubara Yamamoto, Pressure effects on the secondary structure of an intrinsically disordered protein: pKID peptide, The 10th International Conference on High Pressure Bioscience and Biotechnology (HPBB2018) (2018).
2. 加藤 稔, 窪田 総一郎, 山本 翼, Do an intrinsically disordered peptide, pKID fold under high pressure?, 第 56 回日本生物物理学学会年会 (2018).
3. 窪田総一郎、加藤 稔, 天然変性タンパク質 pKID の 2 次構造に及ぼす圧力効果, 第 11 回バイオ関連化学シンポジウム (2017).
4. 加藤 稔, 今村比呂志, 土屋慶太, 窪田総一郎, ヘアピンは圧力によりリフォールドするか, 第 57 回高圧討論会 (2016).
5. 加藤 稔, 池内ゆず, 山本翼, 蛋白質の圧力誘起リフォールディング, FTIR 法による初めての直接観測, 第 43 回生体分子科学討論会 2016 (2016).
6. 加藤 稔, 山本翼, 池内ゆず, Cytochrome c の圧力誘起リフォールディング, 第 56 回高圧討論会 (2015).
7. 加藤 稔, 土屋慶太, GB1(41-56)ペプチドのヘアピン構造に及ぼす圧力効果に関する FTIR・ラマン分光研究, 第 53 回生物物理学学会年会 (2015).
8. 加藤 稔, モデルペプチドの高圧力研究から見えてくるタンパク質の圧力変性機構, 第 15 回日本蛋白質科学会年会 (2015). (招待講演)
9. 土屋慶太, 和田竜一, 加藤 稔, 振動分光法を用いた β -hairpin モデルペプチドの構造に対する圧力効果, 第 55 回高圧討論会 (2014).
10. Keita Tsuciya, Ryoichi Wada, and Minoru Kato, Vibrational spectroscopic study of the pressure effect on beta-hairpin structure using model peptides: mutants of GB1 (41-56), The European Molecular Liquids Group and the Japanese Molecular Liquids Group (EMLG/JMLG) Annual Meeting 2014 (2014).
11. Masanori Tsujii, Kazushi Fujimoto, and Minoru Kato, The structure stability of beta-hairpin model peptide by molecular dynamics calculations, The European Molecular Liquids Group and the Japanese Molecular Liquids Group (EMLG/JMLG) Annual Meeting 2014 (2014).

[その他]

ホームページ等

<http://www.ritsumeai.ac.jp/se/rc/staff/kato/LAB.html>

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。