

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：15401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26650023

研究課題名(和文)重水素同位体シフトを用いるタンパク質側鎖間水素結合ダイナミクス解析

研究課題名(英文) Dynamics of hydrogen bond network among the side chains in the active site of enzyme revealed by NMR deuterium isotope shift

研究代表者

楯 真一 (Shin-ichi, Tate)

広島大学・理学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：20216998

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：NMRシグナルに対する重水素同位体シフトを利用して、プロリン異性化酵素Pin1の酵素ドメインであるPPIaseドメインの活性部位に形成される水素結合ネットワークのダイナミクス解析を行った。重水素同位体シフトの変化から、ネットワーク中の水素結合強度の変化を簡便かつ明瞭に計測することに本研究の特徴がある。PPIaseドメインの活性残基C113に対して3つの異なるアミノ酸変異を導入し、それぞれの変異体の異性化速度変化と、活性部位の水素結合ネットワーク変化の相関を解析した。同様に、活性部位から離れた位置にあるS138残基についても変異を導入し、活性と水素結合ネットワーク安定性の相関を解析した。

研究成果の概要(英文)：NMR isotope shifts caused by the proton/deuteron change were exploited to reveal the relations between the proline isomerase activity of Pin1 and the hydrogen bond network formed in the active site. The isotope shift was used to quantitatively elucidate the changes in the strength of the hydrogen bonds in the network. We made three different mutants having amino acid changes to C113 in the active site of the isomerase domain of Pin1, PPIase. In addition, C138 mutation was applied to see the distal effect on the hydrogen bond network. Combined the results from the analyses on the different mutants made the role of the hydrogen bond network in the PPIase active site clearer.

研究分野：生物物理化学

キーワード：NMR プロリン異性化酵素 重水素同位体シフト 安定同位体 タンパク質 酵素

1. 研究開始当初の背景

タンパク質の動的構造と機能との相関は、ポスト構造ゲノム時代におけるタンパク質構造生物学主要な研究テーマである。NMR を含む様々な実験的手法がタンパク質の動的構造解析に応用され、動的構造と機能との相関が議論されてきている。しかし、多くの実験的動的構造解析はタンパク質の主鎖の動的構造を対象としており、酵素反応やタンパク質の分子認識過程に直接関わる側鎖の動的構造に焦点をあてた研究例は少ない。そこで、本研究では、NMR シグナルに対する重水素置換による化学シフト変化(同位体シフト)を利用した側鎖間水素結合強度変化の定量的解析を通して、タンパク質構造の動的構造と機能との相関を解析する研究を進めた。

プロリン異性化酵素 Pin1 を研究対象とした。Pin1 は、リン酸化された Ser/Thr を含む pSer/pThr-Pro の2残基モチーフを標的として Pro のペプチド結合を cis-trans 双方向の異性化を触媒する。Pin1 による pSer/pThr-Pro におけるペプチド結合異性化は、リン酸化カスケードを介したシグナル伝達過程においては、この2残基モチーフ部の脱リン酸化効率を低下させるなどの影響を与える。すなわち、Pin1 は、細胞内信号伝達を標的部位の構造変化を介して制御している。このため、Pin1 の機能の変調は、がん、アルツハイマーなど様々な疾病誘導に係わる。

Pin1 は2つのドメインが柔軟なリンカーにより結合した構造を持つ(図1)。N 末端部にある WWドメインはリン酸化 Ser/Thr を認識する基質結ドメインである。一方、C 末端部にあるドメインは Pro 異性化反応を担う、酵素ドメインである (PPIase ドメイン)。

Pin1 の結晶構造は解かれているが、pSer/pThr-Pro モチーフを含む基質と PPIase ドメインの複合体立体構造は解かれていない。また、Pro が cis/trans 異性化過程で pSer/pThr-Pro モチーフが PPIase の活性残基とどのような相互作用を通して異性化過程が促進されるかという機構についてはいろいろなモデルが提唱されているが未だに完全な理解には到っていない。

Pin1 と相関性が高い Pro 異性化酵素である Par14 の高分解能結晶構造から PPIase 活性部位には、C113-H59-H157-T152 の活性部位にある4残基を結ぶ水素結合ネットワークの存在が示唆された(図2)。この結晶構造は、基質が存在しない状態での構造(apo型)であるため、この水素結合ネットワークの存在が Pro 残基の cis/trans 構造異性化という大きな構造変化過程にどのように係わるかは分からない。その後、分子動力学計算

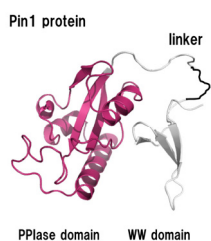


図1: Pin1 の全体構造。結晶構造

(MD)により cis/trans 構造異性化が PPIase の活性部位内で実現されるためには、この水素結合ネットワークが、cis/trans 異性化反応過程にしたがってダイナミックに切断・再結合されることが必要であると示唆された。

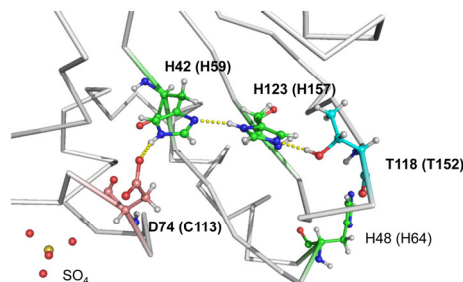


図2: Par14 の高分解能結晶構造で観測された Pro 異性化酵素活性部位における4残基側鎖間で形成される水素結合ネットワーク。括弧内の残基番号は、アミノ酸配列上相同性をもつ Pin1 の対応するアミノ酸残基を示す。

MD 計算から推測された水素結合ネットワークのダイナミックな切断・再結合変化の可能性と、その過程で変化する活性残基の側鎖間水素結合状態変化を実験的に観測することを目的として本研究を開始した。

その結果、PPIase 活性部位にある水素結合ネットワークを形成する4残基は、相互に緊な依存性をもっており、末端部にある C113 のアミノ酸変異が、もう一つの末端である T152 にまでアロステリックに影響をおよぼす構造にあることを明らかにした。また、この水素結合ネットワークは、基質が存在しない状態での活性部位の立体構造を最適に保持する役割も担っており、異性化反応過程に係わるのみならず、基質結合を促進するための立体構造保持にも寄与していることを明らかにした。また、水素結合ネットワークの安定性が、WW ドメインと PPIase ドメインとの分子内接触によっても影響を受けることを、重水素同位体シフトをもちいた、定量的な水素結合強度変化観測から明らかにした。

2. 研究の目的

上記で記した Pin1 タンパク質の活性部に形成される水素結合ネットワークのダイナミクスの機能上の役割を解明することを目的とする。

PPIase 活性部位にある4つの活性残基の側鎖間で形成される水素結合ネットワークは、Pro の cis/trans の異性化反応の過程でダイナミクスに切断・再結合を行うことが MD シミュレーションから示されている。しかし、実験的にこの過程を明らかにすることは既存の実験技術では困難である。そこで、本研究では、側鎖間の水素結合強度を高感度に計測する方法として、NMR 化学シフトに対する重水素同位体効果を用いた。水素結合ネットワーク形

成の中心部を担う2つのヒスチジンのイミダゾールリング中にある ^{15}N 化学シフトに対する重水素同位体効果をプローブとして(図3), 異性化反応過程で反応制御のキーとなるC113残基に対する変異により変化する水素結合ネットワークの状態を解析し, MD計算により示唆されたcis/trans異性化過程で生じる水素結合ネットワークダイナミクスについて実験的に考察した。

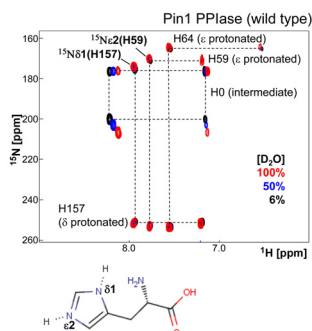


図3: 多重結合 ^1H - ^{15}N 相関スペクトルによるヒスチジン側鎖 ^{15}N 化学シフトの観測。

Pin1は, 異性化反応を行う酵素ドメインであるPPIaseドメインに加えて, 基質結合を担うWWドメインをもつ。アメリカのグループによる研究では, WWドメインとPPIaseとのドメイン間接触がPPIaseの活性を変化させる可能性を示唆している。本研究では, ドメイン間接触部にあるS138に対する変異の水素結合ネットワークに対する摂動についても上記で記したヒスチジン側鎖 ^{15}N シグナルを用いる方法を用いて解析した。この結果, 活性部位から遠く離れたS138の変異が, 活性部位の水素結合ネットワークに明らかな摂動を誘導することを明らかにした。このことから, WWドメインのPPIaseドメインへの接触がPro異性化活性に摂動を与える機構が確認された。

3. 研究の方法

(1) Pin1 cis/trans 異性化速度の直接観測。今回の研究では, 変異による水素結合ネットワークに対する摂動がcis/trans異性化速度をどのように変えるかを定量的に解析する必要がある。本研究ではシグナルペプチドのNMRスペクトル変化からcis→transおよびtrans→cisの双方の異性化反応速度をEXSY(exchange spectroscopy)スペクトルにより決定した(図4)。

(2) 重水素同位体効果を用いた水素結合強度評価。水素結合強度の評価には, ヒスチジン側鎖イミダゾール ^{15}N の化学シフトに対する重水素同位体シフト効果を使う。まず, 対象とする2つのヒスチジンH59とH157それぞれの側鎖の互変異性状態(tautomeric form)を決定する。これは, イミダゾールリング中の2

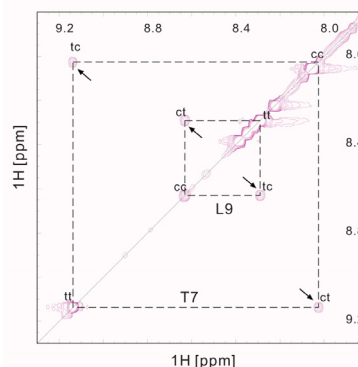


図4: 2D EXSYによるcis/trans異性化速度の計測。相関シグナルの混合時間依存性から異性化速度を決定する。

つの ^{15}N 核と同じくイミダゾールリング中の ^1H との間の多重結合相関スペクトルのパターンから決定できる(図3)。

上記のスペクトル解析から, イミダゾールリング中の水素結合ネットワーク中での配向を決定できる。4残基から成る活性部位の水素結合ネットワークの中央部は, ヒスチジン側鎖間で形成される。中央の2つのヒスチジン側鎖の配向が確定できるため, ネットワーク全体を構成する原子間相互作用を一義的に確定できる。

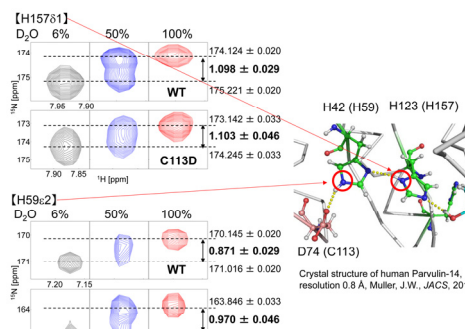


図5: ヒスチジン側鎖の多重結合 ^1H - ^{15}N 相関スペクトル 50%重水素含有溶媒で観測される相関シグナルの変化により水素結合強度を評価する。

イミダゾールリング中の ^{15}N に重水素が直接結合すると, ^{15}N 化学シフトは高磁場シフトする。これを重水素同位体効果とよぶ。同位体シフトの大きさは, 重水素(D)が ^{15}N 核上にどの程度安定に滞在するか, すなわち ^{15}N -D結合強度に依存する。 ^{15}N -D結合中のDは, 溶媒と活発に交換する。このため, 溶媒中に ^1H が存在する場合には, 容易に溶媒の ^1H と交換し ^{15}N - ^1H 結合に変化する。イミダゾールリング ^{15}N に結合する水素(重水素)が安定な水素結合を形成する場合には, ^{15}N -Dの重水素の溶媒との交換が抑制されるために, ^{15}N -D由来のシグナルと ^{15}N - ^1H 由来のシグナルが別々に観測される。

上記の溶媒との交換により変化する NMR シグナルの性質を用いることにより、ヒスチジン側鎖イミダゾールリングを介した水素結合強度を評価することができる。

今回の実験では図5に示すように、50% 重水を含む溶媒中の Pin1 PPIase ドメインを対象として水素結合強度を重水素同位体シフトによるイミダゾールリング ^{15}N シグナル変化をもとに評価した。同位体シフトデータに加えて、立体構造決定およびスピン緩和による骨格構造の動的変化の解析も併用して、活性部位における水素結合ネットワークと異性化活性の相関を解析した。

4. 研究成果

(1) Pin1 酸化不活性状態を摸した C113D 変異体の水素結合ネットワーク変化と活性の異性化反応の相関

Pin1 の活性部位にある C113 残基は、高い化学反応性を持ち、タンパク質保存中においてもしばしば空気酸化される。C113 が酸化された Pin1 の cis/trans 異性化活性が低下することが分かっている。本研究では、C113 の酸化を摸した C113D 変異体の水素結合ネットワーク解析と活性の相関を解析した (図5)。

図5では、野生型と C113D 変異体の H59 と H157 の ^{15}N シグナルを比較している。野生型では H157 の ^{15}N シグナルが 50% 重水溶媒中ではダブルットになっているのに対して、C113D では H59 の ^{15}N がダブルットになっている (図5)。このことから、野生型では H59-H157 にイミダゾールリング間での水素結合が強固であるのに対して、C113D 変異体では、D113 と H59 の間に形成される水素結合が強くなり、その代わりに野生型では強固な H59-H157 の水素結合強度が弱くなっていることが分かった。

C113-H59-H157-T152 の4残基から成る水素結合ネットワークを構成する水素結合の強度は様ではなく、野生型では、H59-H157 が強く C113-H59 が弱いというバランスをもって維持されている事が分かった。C113D 変異体は、このバランスを崩すので、D113-H59 の側鎖間水素結合を強固にするという性質がある。

2D-EXSY で測定した C113D 変異体の cis/trans 異性化速度は cis \rightarrow trans (CT) および trans \rightarrow cis (TC)のいずれにおいても約 1/100 に低下した (図6)。活性低下の原因を調べるために、野生型および C113D 変異体の PPIase ドメインの立体構造を決定した：野生型 (PDB 2RUC), C113D 変異体 (PDB 2RUD)。

立体構造の比較から、C113D 変異体は変異点から遠く離れた位置にあるリン酸基と相互作用する3つの塩基性残基を含むループ構造の変化を誘導することが分かった。

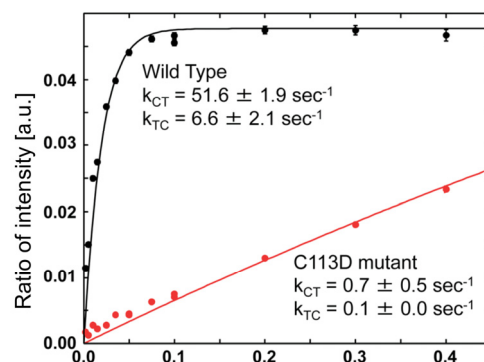


図6：野生型と C113D 変異体の間での Pro 異性化速度の比較。C113D の異性化速度は野生型の約 1/100 になった。

リン酸基をもつ基質ペプチドの認識に係わるループ構造の変化により、C113D PPIase は基質結合能が低下したことが活性低下の理由であると考えられた。実際に等温滴定型カロリメトリー (ITC) の測定から C113D PPIase はリン酸化基質に対する結合能をほとんど失っている事が確認できた。

上記の結果、Pin1 PPIase ドメインの活性部位にある水素結合ネットワークは、構成する4つの残基の間で水素結合強度のバランスを保っており、変異によりそのバランスが崩れることにより、広範に活性部位の立体構造が変化することが明らかになった (図7)。

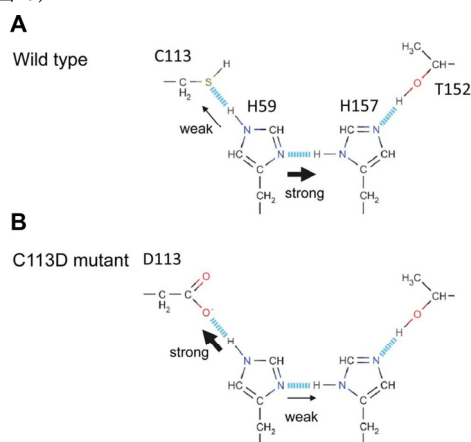


図7：Pin1 PPIase ドメイン活性部位にある水素結合ネットワーク。C113D 変異によるネットワーク内の水素結合バランスの乱れを、開発した重水素同位体シフトを使った計測法により明らかにした。

(2) 反応中間体を摸した C113S, C113A 変異体の構造機能解析

PPIase 活性部位で生じる異性化過程で、C113 側鎖 sulfonate が水素と結合して thiol となる過程が重要であることが MD シミュレーションから示唆されている。また、C113 の thiol が基質ペプチドに対して水素結合

する事により、4残基から水素結合ネットワークへのC113の寄与が無くなる過程も異性化反応を進める上で重要であることがMDシミュレーションをもとに議論されている。C113側鎖の水素付加およびC113の水素結合ネットワークからの離脱を模した変異体として、それぞれC113S, C113Aを作成し、上記と同様に水素結合強度と、異性化速度との相関解析を行った。

C113Aは、1/50の異性化速度となるが、C113Sについては2D-EXSYでは異性化が観測できないほど異性化速度が低下した。C113S, C113Aのいずれもヒスチジン側鎖の ^1H - ^{15}N 相関シグナルを観測することができなかった。 ^1H - ^{13}C 相関シグナルを併用して解析したところ、H59, H157いずれのイミダゾールリングも互変異性体間で化学交換をしていることが分かった。この化学交換中で生じる互変異性体は各変異体では異なるが、いずれもH59-H157間の水素結合を切断する。このために、C113A, C113S変異体のいずれも野生型に比べて熱安定性が低下した。水素結合ネットワークはPPIaseドメインの活性部位の構造維持にも係わる事が明らかになった。

C113S, C113A変異体の解析から、C113側鎖の状態変化が、水素結合ネットワークのダイナミクスに明らかかな変化を誘導する事を明らかにした(図8)。

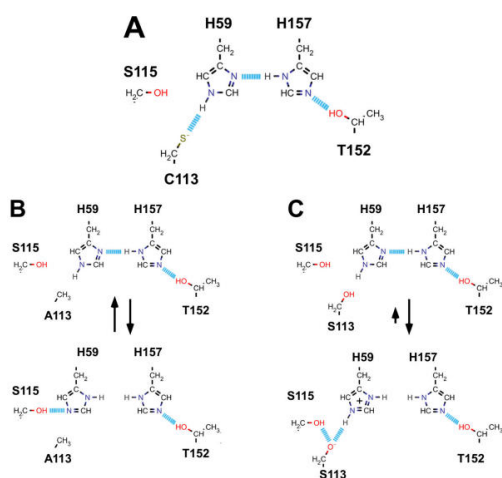


図8: C113A, C113S変異体で観測されたヒスチジン残基のダイナミクス。(A)野生型では安定な水素結合が形成されるが、C113A(B), C113S(C)では、ヒスチジン側鎖の互変異性によりH59-H157間の水素結合が切断される。

(3) ドメイン間相互作用界面部アミノ酸変異によるPPIaseドメイン構造安定化

Pin1の2つのドメインの接触がPPIaseの活性に変化を与える可能性が示唆されている。そこで、本研究では、2つのドメインの接触点に位置するS138残基の変異の、水素結合ネットワークへの影響を解析した。解析の結果、S138A変異体は、C113 -

H59 - H157の間を結ぶ2つの水素結合強度が共に強くなっていることが分かった(図9)。S138A変異体の異性化速度は低下しており、水素結合ネットワークが野生型よりも強固になっても活性は低下した。一方で、水素結合ネットワークが強固になったために、S138A変異体では10°C近く変性温度が上昇し野生型より安定になった。

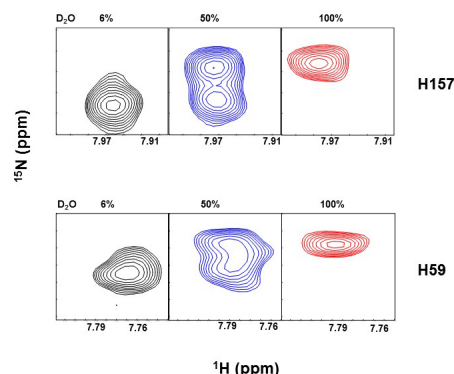


図9: S138A変異体のH157, H59イミダゾールリング ^{15}N シグナルに対する重水素同位体シフトにより観測された、水素結合強度。

(4) 結論

本研究では、重水素同位体シフトを利用することで、従来までは測定が困難であった側鎖間の水素結合強度を評価する方法を開発した。

この方法を用いてPin1タンパク質の酵素部位にある4つの活性残基の側鎖間で形成される水素結合ネットワークの状態を解析した。その結果、Pin1が最適な異性化酵素活性を発現するには、活性4残基間の水素結合ネットワークが最適なバランスを保つことが必要であり、それよりも強くても弱くても活性低下につながる事を明らかにした。また、このネットワーク中にあるC113残基の側鎖の状態により、水素結合ネットワーク中央部にあるH59-H157残基間の水素結合が動的に切断・再結合を繰り返す性質を持つことを明らかにした。この動的性質は、基質ペプチドのPro異性化反応上で重要な役割を持つとされるが、今回の研究で、その存在を実験的に示す事に成功した。

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4件)

1. Wang, J., Tochio, N., Kawasaki, R., Tamari, Y., Xu, N., Uewaki, J., Utsunomiya-Tate, N., *Tate, S. (2015): Allosteric breakage to the hydrogen bond within the dual-histidine motif in the active site of human Pin1 PPIase, *Biochemistry*, 54, 5242-5253. [査読有]
2. *Takami, T., Ojiro, Y., Ogawa, S., Takaku, Y., Ogawa, Y., Saito, M., Matsuoka, H., Tate, S.

- (2015): Coating the outer surface of glass nanopipette with chlorobenzene-terminated polysiloxane, *e-J. Surf. Sci. Nanotech*, 13, 79-84. [査読有]
- Narayanan, S.P., Maeno, A., Wada, Y., Tate, S., and Akasaka, K. (2015): Sequential backbone resonance assignments of the E.coli dihydrofolate reductase Gly67Val mutant: folate complex, *Biomol. NMR Assign.* 1-5. [査読有]
 - Xu, N., Tochio, N., Wang, J., Tamari, Y., Uewaki, J., Utsunomiya-Tate, N., Igarashi, K., Shiraki, T., Kobayashi, N., and *Tate, S. (2014): The C113D mutation in human Pin1 causes allosteric structural changes in the phosphate binding pocket of the PPIase domain through the tug of war in the dual-histidine motif, *Biochemistry*, 53, 5568-5578. [査読有]

[学会発表] (計 13 件)

■招待講演のみを記載

- Biological functions elicited by the structure and dynamics of intrinsically disordered regions (IDRs), Shin-ichi Tate, HiSFs2016 (2016.03.17, Higashi-Hiroshima).
- Structural dynamics and their functional implications of the intrinsically disordered regions (IDRs) in transcription regulatory proteins. Shin-ichi Tate, Pacifichem2015 (2015.12.17, Hawaii, USA).
- Structure dynamics and functions of folded and intrinsically disordered proteins (IDPs), Shin-ichi Tate, Inst. Sciences Analytiques Seminar in Lyon1 Univ. (2015.12.01, Lyon, France).
- Functional significance of the transient folding of intrinsically disordered proteins (IDPs), Shin-ichi Tate, 第 53 回 日本生物物理学会年会・シンポジウム (2015.09.14, 金沢).
- How life can be understood by physics and mathematics, Shin-ichi Tate, Inst. Mathematics in University of Science and Technology of China (USTC) (2015.09.04, Shanghai, China).
- Functional significance of the transient folding of intrinsically disordered proteins (IDPs), Shin-ichi Tate, 第 15 回 日本蛋白質科学会年会・ワークショップ (2015.06.25, 徳島).
- Functional significances of the transient folding of intrinsically disordered proteins (IDPs) revealed by combinatorial approaches including high-speed AFM, SAXS, molecular dynamics and NMR, Shin-ichi Tate, Gordon Research Seminar (2015.06.06, Italy).
- Functional significance of the transient folding of intrinsically disordered proteins (IDPs) revealed by the combinatorial approaches, Shin-ichi Tate. Invited Seminar at Academia Sinica (2015.04.09, Taiwan)
- 楯 真一「生命科学と数理の融合の今後の発展方向」生命ダイナミクスの数理とその応用: 異分野とのさらなる融合 (2014.12.03, 駒場).
- Shin-ichi Tate “Exploring functional significance of transient interactions of the intrinsically disordered proteins (IDPs) with the combinatorial use of AFM, SAXS, MD and NMR” The 5th Japan-Taiwan Bilateral NMR symposium (2014.09.29, Sapporo, Japan).
- Shin-ichi Tate, “Transient folding and functional roles of the intrinsically disordered parts in gene regulatory proteins” Gordon Research Conference (2014.07.10, Boston, USA).
- Shin-ichi Tate, “Functional significances of transient folding of the intrinsically disordered proteins (IDPs) revealed by the combinatorial approaches, including high-speed AFM, SAXS, molecular dynamics and NMR” *Euromar2014* (2014.07.01, Zurich, Switzerland).
- Shin-ichi Tate, “Structural dynamics intrinsically detuning enzyme action revealed by NMR” *AnalytiX-2014* (2014.04.26, Dalian, China).

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: ナノピペットおよびその作製方法
 発明者: 高見知秀, 楯 真一, 尾白佳大, 小川修一, 高桑雄二, 小川佳英, 斉藤美佳子, 松岡英明
 権利者: 広島大学
 種類: 特許
 番号: 特願 2014-220411
 出願年月日: 平成 26 年 10 月 29 日
 国内外の別: 国内

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.mls.sci.hiroshima-u.ac.jp/biophys/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

楯 真一 (SHIN-ICHI TATE)

広島大学・大学院理学研究科・教授

研究者番号: 20216998