## 科学研究費助成事業 研究成果報告書



平成 28年 6月 3日現在

機関番号: 24302 研究種目: 挑戦的萌芽研究 研究期間: 2014~2015

課題番号: 26660091

研究課題名(和文)ヘリックスバンドル形成をモデルとした蛋白質の構造エントロピーの定量化

研究課題名(英文)Quantification of protein conformational entropy on helix-bundle formation

#### 研究代表者

織田 昌幸 (Masayuki, Oda)

京都府立大学・生命環境科学研究科(系)・准教授

研究者番号:20318231

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):ヘリックスバンドル構造をもつ蛋白質の疎水性コアにHisを導入し、さらに不安定化することで、金属イオン結合に伴いランダム構造からヘリックスバンドル構造に変化するモデル蛋白質を調製した。同構造変化の構造エントロピーの定量化、さらにアンサンブル量と1分子解析結果の相関解明を目指し、MMR、等温滴定型熱量計(ITC)、高速X線1分子追跡(DXT)実験などを行った。これまでの成果として、目的蛋白質の調製に成功し、ITCを用いて結合熱力学量を決定した。さらにDXTを用いて、動的構造変化の1分子解析を行い、金属イオン結合前後での動きの経時変化を観測した。

研究成果の概要(英文): I designed a model protein whose structure is changed from random to helix-bundle upon its metal binding to His residues introduced into the hydrophobic core, using another designed protein reported previously as the template. I could successfully generate the protein by additional destabilized mutation into the template protein. The main purpose of this study is to quantify the conformational entropy, and to correlate the structural ensemble with the structural information obtained from single-molecule analysis. To achieve the purpose, I carried out NMR, isothermal titration calorimetry (ITC), and diffracted X-ray tracking (DXT) experiments. The NMR experiments showed that one of the designed proteins was changed from random to helix-bundle structure upon its metal binding. The ITC experiments could determine the binding thermodynamics, and the DXT experiments could detect the structural dynamics and their changes upon the metal-binding at single-molecule level.

研究分野: 蛋白質科学

キーワード: 動的構造 蛋白質 構造エントロピー

#### 1.研究開始当初の背景

蛋白質の分子間相互作用解析を熱力学的 に行い、例えばドラッグデザインにおいて、 如何に結合力を高めるかは、長年の重要課題 であり、基本的に現在もその課題解決の要求 は変わっていない。その要因として、蛋白質 の動的挙動の見積もりが難しいことや、エン タルピーを重視するあまりエントロピーの 損失が大きくなる、といったことなどが挙げ られる。蛋白質の動的挙動については、既存 の NMR による解析手法に加えて、最近開発 が進められる1分子レベルでの解析手法も有 効で、より正確かつ詳細に検出できるように なりつつある。一方、熱力学解析についても、 高感度の熱量計が開発され、こちらもより正 確かつ詳細に解析できる時代になった。特に 等温滴定型熱量計 (ITC)は、多くの研究機 関で活用されている。ただしエンタルピー・ エントロピー補償則の問題もあり、ラショナ ルな結合分子の創製には多くの課題が残さ れていた。

#### 2. 研究の目的

金属イオン結合に伴い ヘリックスバンドルを形成するモデル蛋白質を対象として、そのフォールディング過程での動的構造変化を1)NMRで解析し、2)その構造情報をITCで得られる熱力学情報と相関づける。特に構造情報とエントロピー量との相関付は、本研究の主目的となる蛋白質の構造エントロピーの定量化に直結する。さらに3)高速X線1分子追跡法(DXT)により、1分子レベルでの動的構造情報を取得し、NMRやITCで得られるアンサンブル量と相関づける。以上を本研究の目的として、研究を行った。

### 3. 研究の方法

DeGrado らにより NMR で構造決定された ヘリックスバンドルを鋳型とし、疎水性コア 形成残基となる3残基分をHisに置換し、元 はランダム構造をとるものの、金属イオン結 合に伴いヘリックスバンドルに構造変化す るモデル蛋白質の構築を試みた。詳細は、研 究成果欄に記載するが、実際には図1に示す ように3残基分をHisに置換しただけでは金 属イオン非存在下でランダム化することが できず、さらに図1でXと示す部位に変異を 加えることで、当初の目的モデル蛋白質、金 属イオン添加で、ランダムからヘリックスバ ンドルへと構造変化する試料を得ることが できた。これら各モデル蛋白質の発現は、大 腸菌を用いて行い、精製は主に逆相 HPLC を 用いて行った。各精製モデル蛋白質の二次構 造、および金属イオン添加に伴う構造変化は、 円二色性分散計 (CD) を用い、遠紫外領域の CD を測定することで評価した。さらに詳細な 立体構造解析は、600 MHz NMR を用いて行っ た。金属イオンとの結合熱力学解析は、 Malvern の iTC200 を用いて行った。測定にあ たっては、セル側の各モデル蛋白質に対して、 シリンジ側の金属イオンを滴下する系で行った。DXT 測定では、N 末端に His-tag を付加して各モデル蛋白質を発現、精製し、DXT 測定用の Ni を付与したカプトン基板上に、その His-tag を介して結合させた。さらに図1に示すように、各モデル蛋白質に1つだけある Met に金ナノ結晶を結合させ、金属イオン有、無の条件下で、SPring-8にて白色光レーザーを照射することで、金ナノ結晶からの回折点を経時的に高速カメラで検出し、各種解析を行った。

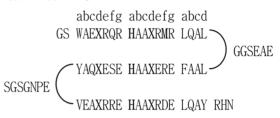
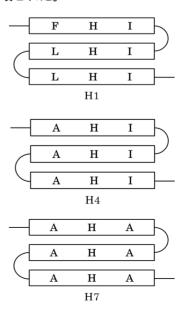


図1.モデル蛋白質のアミノ酸配列

#### 4. 研究成果

### (1)各モデル蛋白質の構築とその二次構造 解析

DeGrado らのモデル蛋白質を鋳型として、 最初は図1に示す2番目のaの位置にHisを 導入することで(図2の H1) 元の疎水性コ アが不安定化され、ランダム構造になり、金 属イオン添加により、これら His 残基が金属 イオンと結合、パッキングすることで、ヘリ ックスバンドル構造が回復することを予想 した。しかし図3に示すように、CD解析の結 果、金属イオン添加前でも安定なヘリックス バンドル構造を形成していることが明らか になり、さらなる不安定化のためのアミノ酸 導入の必要性が示唆された。そこで図2に示 すような各種モデル蛋白質を発現、精製し、 その二次構造、および金属イオン添加に伴う 構造変化を、主に CD を用いて解析した。そ の結果、HA や HG と命名した各モデル蛋白質 で、目的とした金属イオン結合に伴う構造変 化が示唆された。



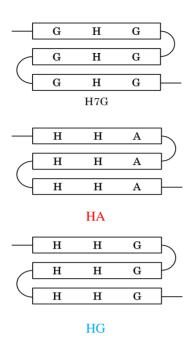
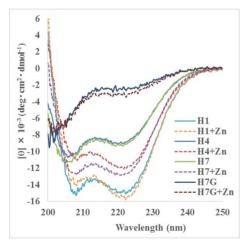
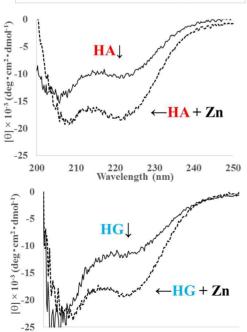


図2.各モデル蛋白質の疎水性コア形成残基 のアミノ酸





220

Wavelength (nm)

250

240

200

210

図3.各モデル蛋白質の金属イオン添加前後 での遠紫外CDスペクトル

### (2) NMR による立体構造解析

金属イオン添加に伴う構造変化が示唆さ れた HA と HG について、1H NMR 測定を行った。 図4に示すように、金属イオン添加に伴い、 シグナルのブロードニングが認められたこ とから、何らかの高次構造形成が示唆された。 さらに HA の高磁場領域において、金属イオ ン添加後にシグナルが観測されたことから、 HA ではヘリックスバンドル構造の形成が示 唆された。一方、高磁場シグナルの観測されない HG は、バンドル構造をとらないヘリッ クス誘起の可能性が示唆された。これらの結 果は、CD スペクトルにおける 222 nm と 208 nm の CD 値の比の違いからも支持される。すな わち、金属イオン添加に伴い、HA では安定な バンドル構造が形成されたのに対し、HG では バンドル形成がない、あるいはヘリックス間 の相互作用の弱い立体構造が形成されたも のと考えられる。

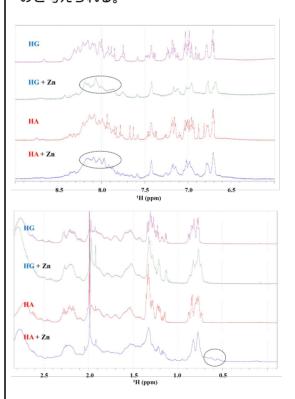
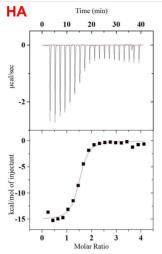


図4. モデル蛋白質 HA、HG の金属イオン添加前後での<sup>1</sup>H NMR スペクトル

## (3)金属イオン結合の熱力学解析

HA と HG について、金属イオン結合の熱力学解析を、ITC を用いて行った。図5に示すように、良好な ITC プロファイルが得られ、解析した結果、HG に比べて HA では、3 倍程度、結合力が強く、より負に大きな結合エンタルピー変化が観測された。結合エントロピー変化も、HA でより負に大きな値が得られた。これらの結果は、HA でより安定に金属イオンと結合し、その効果がエントロピー変化とし

て部分的に補償されたものと解釈できる。



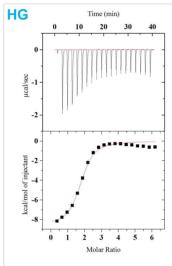


図4. モデル蛋白質 HA、HG の金属イオン結合 ITC プロファイル

# (4)金属イオン添加前後での動的1分子構 造解析

HAとHGについて、金属イオン添加前後で の DXT 測定を行った。HG に比して、HA では その動きが大きいことが明らかになった。一 方、金属イオン添加前後での動きの変化につ いて、結果の再現性に欠けるところがあり、 さらなる検討を行う予定である。またケージ ド化合物を添加し、DXT 測定溶液にレーザー を照射することで溶液の pH を瞬時に変え、 金属イオン結合状態から非結合状態への経 時変化の解析を試みた。これは His 残基に対 する金属イオン結合が、酸性 pH で弱くなる ことを利用した測定アイデアである。これま での結果として、適当なレーザー照射条件を 決定できずに、試行錯誤を繰り返しているが、 成功すれば、蛋白質フォールディングに関す るストップトフロー的な観測が可能となる。

## 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 0件)

〔学会発表〕(計 1件) 第15回 日本蛋白質科学会年会 2015年6月24日 疎水性コア形成残基置換に伴う3本鎖へリックスバンドル形成の構造解析 臼井 大樹、小道信孝、金折賢二、田中俊樹、織田昌幸

[図書](計 0件)

〔産業財産権〕 出願状況(計 0件)

〔その他〕 ホームページ等

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

織田 昌幸(ODA Masayuki) 京都府立大学・大学院生命環境科学研究 科・准教授 研究者番号: 20318231

(2)研究分担者

( )

研究者番号:

#### (3)連携研究者

関口 博史(SEKIGUCHI Hiroshi) 公益財団法人高輝度光科学研究センター・利用研究促進部門・研究員 研究者番号:00401563

研究者番号:00401563