

## 自己評価報告書

平成23年4月22日現在

機関番号：14603

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究期間：2008～2012

課題番号：20107006

研究課題名（和文） 天然変性蛋白質のモデル系開発と揺らぎと構造形成相関の解析

研究課題名（英文） Development of model systems for intrinsically disordered protein and understanding of the role of fluctuation on molecular recognition and folding

研究代表者

片岡 幹雄 (MIKIO KATAOKA)

奈良先端科学技術大学院大学・物質創成科学研究科・教授

研究者番号：30150254

研究分野：生物物理学

科研費の分科・細目：生物科学・生物物理学

キーワード：天然変性蛋白質、誘導折り畳み、分子認識、変性構造、中性子散乱、ストップフローCD、黄色ブドウ球菌核酸分解酵素

## 1. 研究計画の概要

分子機械である蛋白質が機能を発揮するためには、固有の立体構造が必要であるとされてきた。しかし、近年になってこの概念を全く覆す、天然変性蛋白質と呼ばれる一群の機能性蛋白質が数多く見出されてきた。天然変性蛋白質は、折り畳まれていないがために多様な標的の認識を可能にし、標的結合の効率を上げていると考えられている。天然変性蛋白質は揺らぎこそが分子認識の本質であることを示唆しており、蛋白質による分子認識の古典的描像である“鍵と鍵穴”モデルを否定し、誘導適合の概念の大幅な変更を促すものである。天然変性蛋白質は、生理的条件下では変性構造を取るが、標的分子を認識・結合することにより天然構造に折り畳まれる (Coupled folding and binding)。Coupled folding and binding は、結合が先行する機構と、折り畳みが先行する機構の2通りが原理的には可能であるが、一般には前者は起きないとされていた。我々は、黄色ブドウ球菌核酸分解酵素 (SNase) について、生理的条件下では変性構造を取るが機能を持つ変異体を数種作製し、天然変性蛋白質のモデル系を構築することに成功した。この成果を基に、SNase やジヒドロ葉酸還元酵素 (DHFR)、イエロープロテイン (PYP) 等の機能性蛋白質を用い、天然変性蛋白質のモデル系を作製し、構造、物性及び機能の詳細な評価を行う。この結果は、揺らぎと機能のかかわりに関する有用な情報を与えると期待される。これらの変異体のダイナミクスを野生型と比較することにより、同じ溶媒条件下で天然構造と非天然構造の構造揺らぎを詳細に解析する。

中性子非弾性散乱によるダイナミクス測定の結果は、分子動力学シミュレーションを援用して解析する。これにより、情報揺らぎが構造揺らぎにどのように反映され、構造安定性や反応性の違いとして現れるのかを詳細に解明する。

## 2. 研究の進捗状況

Coupled folding and binding には、折り畳みと標的結合の二つの要素過程があり、その順番により (a) 折り畳み→結合、(b) 結合→折り畳みの2種類の機構が考えられる。熱力学的考察から誘導折り畳みは (a) の機構に従い、(b) はありえないとされていた。誘導折り畳みの速度論的測定の標的濃度依存性から、両者の機構は識別できることを明らかにし、得られた SNase の変異体の阻害剤誘導折り畳み機構のストップフローCDによる解析に適用した。その結果、C末欠損変異体 ( $\Delta$ 140-149) や W140A は (a) の機構、33A34 や 63A64 のような挿入変異体は (b) の機構に従うことを示している。1種類のタンパク質で異なる誘導折り畳み機構を示す変異体を創出できたことは、世界で初めてであり、前者の機構が可能であることを示したのも、2例目となっている。 $\Delta$ 140-149 の溶液構造解析より、基質結合部位を構成する K84、Y85、Y113 や活性部位から離れた V51、K127、Q131 は構造をとっていないことが示され、非天然構造—基質複合体の存在が証明された。また、この機構が実現する要因が、疎水核の形成能を失うことであることを示すとともに、人工的に導入した SS 架橋により、

その相互作用を代替できることも示した。さらに、天然構造を形成し、活性部位を保持しているにもかかわらず、酵素活性を失う変異体を数種作製することに成功した。一方、蛋白質の動的性質を明らかにするために中性子非弾性散乱を SNase 野生型と天然変性蛋白質のモデル系について適用した。その結果、水和水が低温では蛋白質を硬くし、室温ではやわらかくすることを明らかにした。また、折り畳まれて獲得される動的性質があるが、水和水の動的性質がこれを隠してしまうこと、水和水のパーコレーション転移が蛋白質の動的性質を決めていることを明らかにした。

### 3. 現在までの達成度

① 当初の計画以上に進展している。研究期間を通して実現しようとしていた天然変性蛋白質のモデル系を作製し、**Coupled folding and binding** の分子機構の解明に研究期間の半ばで既に成功している。さらに、結合が先行する機構のあることを証明し、その機構に従う変異体作製の指針を明らかにしている。さらに、揺らぎと構造形成の関連に関しても、水和水の役割を明らかにすることに成功している。これらは、当初の計画以上に進展していると評価することができる。また、当初計画では予期していなかった天然構造を形成し、活性部位を保持しているにもかかわらず、酵素活性を失うという新規の変異体を得ることに成功している。この変異体の研究は本新学術領域研究のテーマにも合致し、揺らぎと機能の関係を当初構想とは異なった観点からも進めることが可能になったと考えている。研究成果の論文としての発表が遅れていることが反省点である。

### 4. 今後の研究の推進方策

研究目的に沿って、以下の各項目について研究を進める。(1) 天然変性蛋白質モデル系の作製と構造や物性の評価、(2) **Coupled folding and binding** の機構の解明、(3) 蛍光性非天然アミノ酸を導入したモデル系変異体の設計と作製、蛍光による揺らぎ測定、(4) 天然変性蛋白質モデル系のダイナミクス測定と野生型との比較、(5) US 複合体の構造とダイナミクスの測定、(6) 天然変性蛋白質のダイナミクスの測定とモデル系との比較、(7) 天然構造を取るにもかかわらず酵素活性を失う変異体の失活機構の解明。(1) および (2) では、SNase 以外の機能性蛋白質について、天然変性蛋白質のモデル系を作製し、SNase に対して成功した解析法の汎用性を明らかにするとともに、分子認識

と揺らぎの関係をより定量的に解明したいと考えている。既に、DHFR や PYP について、候補変異体を得ている。前者は基質アナログ、後者は発色団により誘導折り畳みを実現できると考えているが、速度論的測定が可能な系を構築する。(3) では、天然変性蛋白質のモデル系の溶液構造を明らかにし、揺らぎと構造形成や分子認識の關係の解析を行う。既に、SNase に対し、4 塩基コドンを用いる方法で導入できることを確認している。(4)、(5)、(6) では、(3) の試料作製に基づき、蛍光エネルギー移動を適用することで実現する。また、中性子非弾性散乱も適用する。(7) では、新たに作ることに成功した酵素活性を失う変異体の結晶構造解析を通して、揺らぎと機能発現の關係の解明を行いたい。これらの研究を通して、当初計画の実現を図る予定である。また、得られた研究成果を論文として順次公表していきたいと考えている。

### 5. 代表的な研究成果

(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 24 件)

- ① H. Nakagawa and M. Kataoka. Percolation of hydration water as a control of protein dynamics. *J. Phys. Soc. Jpn* 79, 083801, 2010, 査読有
- ② S. Kato, H. Kamikubo, S. Hirano, Y. Yamazaki and M. Kataoka. Non-local interaction responsible for the tertiary structural formation of Staphylococcal nuclease. *Biophys. J.* 98, 678-786, 2010, 査読有
- ③ S. Yamaguchi, H. Kamikubo, K. Kurihara, R. Kuroki, N. Niimura, N. Shimizu, Y. Yamazaki and M. Kataoka. Low barrier hydrogen bond in photoactive yellow protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 106, 440-444, 2009, 査読有

[学会発表] (計 88 件)

- ① M. Kataoka. Effect of hydration on protein dynamics. Leopoldina-Symposium on the Complexity Connecting Biomolecular Structure and Solvation Dynamics. 2010.5. 25-27, Bochum, Germany

[図書] (計 6 件)

- ① M. Kataoka and H. Nakagawa. Pan Stanford Publishing (Singapore), "Water, The Forgotten Biological Molecule" (eds. by Denis Le Bihan and Hidenao Fukuyama), 2011 年, pp. 49-62