

令和元年6月17日現在

機関番号：17102

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究期間：2014～2018

課題番号：26119002

研究課題名（和文）タンパク質分子の動きを観るために結晶中に創り出した隙間を利用する新発想結晶解析

研究課題名（英文）Rational design of crystal contact-free space in protein crystals for analyzing spatial distribution of motions within protein molecules

研究代表者

神田 大輔（Kohda, Daisuke）

九州大学・生体防御医学研究所・教授

研究者番号：80186618

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 179,700,000円

研究成果の概要（和文）：蛋白質結晶中に結晶コンタクトが無い空間を意図的に創り出し、柔らかい構造（ループやリガンド）を配置して、その動きの空間分布を差マップ中の電子密度として解析する方法を開発した。鍵となるのはタグ蛋白質と対象蛋白質を一本の長いヘリックスを用いて硬く接続することにある。Tom20蛋白質に結合した状態のプレ配列ペプチドの運動の可視化と、Tim21蛋白質の結晶コンタクトにより変形したループ2の溶液構造の推定に適用した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

蛋白質の結晶中では分子同士が接触して3次元の結晶格子を作っている。蛋白質の中には一部の構造が柔らかく創られているために、結晶中では結晶コンタクトにより容易に変形し、正しい形（溶液中の平衡状態）をとっていない可能性がある。柔らかく動的な部分の構造変化は蛋白質の機能と密接に関連していることが少なくないことを考えると、「柔動構造の変形・固定問題」を真剣にとらえ、実験的に解決する手段を考案することは重要である。

研究成果の概要（英文）：We developed a fusion protein method to create crystal contact-free space (CCFS) in protein crystals and to place the mobile parts or ligands in the CCFS. The mobile parts/ligands appear as smeared electron densities in the CCFS in the difference electron density map. We applied the CCFS method to visualize the movement of a highly mobile presequence peptide as bound to the mitochondrial import receptor, Tom20, and to estimate the solution conformation of a flexible loop segment in another mitochondrial import protein, Tim21, which was distorted in the conventional crystals by the crystal contacts.

研究分野：構造生物学

キーワード：タンパク質結晶 動的構造 結晶コンタクト 融合タンパク質 MBP Tom20 Tim21

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

### 1. 研究開始当初の背景

タンパク質の結晶中では分子同士が接触して3次元の結晶格子を作っている。結晶構造が溶液中の構造と同一と見なして良いことは、結晶構造とNMR構造が一致するという多くの事例から証明されている。しかし、タンパク質の中には、その一部の構造がとりわけ柔らかく創られていて、その形の変化が機能発現に重要である場合が少なくない。そうした柔軟な部分は結晶中では分子同士の接触(結晶コンタクト)により容易に変形し、正しい形(溶液中の平衡状態)ではなくなってしまう可能性がある。変形までしなくても運動が制限されて偏った形に固定されてしまう。この状況を指して結晶構造はスナップショットであると言う。では、今までなぜ「柔構造の変形・固定問題」は看過されてきたのだろうか? 多くの場合、柔らかく動的な部分の電子密度が薄くなったり見えなくなったりしてしまうので、価値がない情報として無視されてきたと想像される。しかし、結晶コンタクト効果によって変形した構造が得られて、意図せずに誤った解釈をしてしまう可能性が常に存在する。柔らかく動的な部分の構造変化はタンパク質の機能と密接に関連していることが少なくないことを考えると、「柔動構造の変形・固定問題」を真剣にとらえ、実験的に解決する手段を考案することは重要である。

結晶解析を使わなくても、NMR法を使えばよいと考えることもできる。NMR法は溶液中におけるタンパク質の動的な構造を調べる方法として一般に受け入れられている。しかし、大きな振幅で運動している構造の場合、NMR情報が距離に対して高度に非線形性( $\propto r^{-3} \sim r^{-6}$ )を持つために、集団平均として計算されるNMR構造は結果的に歪んでしまう。一方、分子動力学計算(MD simulation)を使っても、ループのような大きな振幅で動く構造の運動の様子を正しく再現することは計算パワーの点で未だ困難である。まとめると、現状では振幅の大きな運動の空間分布を正しく推定するための良い実験的方法が存在しない。

### 2. 研究の目的

結晶の回折現象に基づいて得られる電子密度マップは大きな振幅の運動があっても、占有率(occupancy)が1より小さくなって電子密度が小さくなるが、空間分布が歪むことはない。その意味で、結晶解析を大振幅運動の解析に使うことは理にかなっている。しかし、すでに述べたように、通常の結晶内では結晶コンタクトにより運動が抑制され、スナップショット構造となっている。そこで、結晶コンタクト効果無い“隙間”を結晶格子中に意図的に創りだし、結晶コンタクトによる「柔動構造の変形・固定問題」の解決を目指す(図1)。3つの技術要素は、タグタンパク質との融合タンパク質の作製、タグタンパク質と対象タンパク質を一本の長いヘリックスを用いて硬く接続、さらに親和力の弱いリガンドの場合は、占有率を保障するために共有結合を用いて、リガンドを対象タンパク質にテザリングする、である。タンパク質の結晶中に創りだした空間のことを結晶コンタクトフリー空間(crystal contact-free space)、略してCCFSと呼ぶことにする。

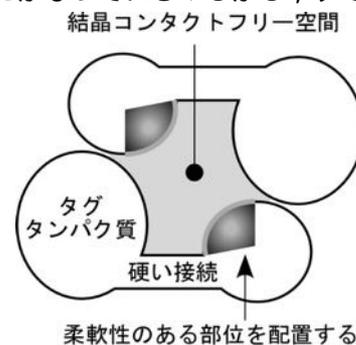


図1 対象タンパク質をタグタンパク質に硬い接続を用いて融合させることで、2つのタンパク質の間に隙間空間を創り、そこに対象タンパク質の一部分を意図的に配置する。

### 3. 研究の方法

具体的な課題として、ミトコンドリアプレ配列受容体Tom20タンパク質に結合した状態のプレ配列ペプチドの大きな運動性を定量的に解析する。タグタンパク質としてマルトース結合タンパク質(MBP)を用いる。MBPのC末端部分はヘリックス構造をとっていて、Tom20に存在するN末端ヘリックスと直接つなげることで一続きのヘリックスとなるようにデザインする。2つのヘリックスの間に挿入するアミノ酸の残基数を変えることで、Tom20とMBPの相対配置を変化させ、プレ配列が結晶コンタクトの影響を受けない隙間に位置するように調節する。プレ配列は分子間ジスルフィド結合を用いてTom20にテザリングする。

CCFSのもう一つの利用法として、結晶コンタクトによるタンパク質構造の変形を除くことができる。結晶構造と溶液NMR構造の両方が決定されていて、ループ部分のコンホメーションが異なる例として酵母のTim21タンパク質を選択した。結晶構造のループ構造を見ると結晶コンタクトによって変形していることが推察される、一方、NMRのループ構造は収束が悪い多数のコンホメーションの集団となっている(図2)。接続に使う $\alpha$ ヘリックスの長さを複数用意してMBPとTim21の融合タンパク質を作成する。

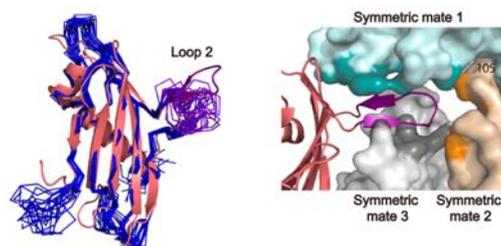


図2 Tim21タンパク質のX線構造(ピンク)とNMR構造(青)の重ね合わせ(左)。X線構造のループ2部分はヘアピン構造をとっているが、結晶中では他の3つの分子と接触している(右)。

### 4. 研究成果

(Tom20-プレ配列 pALDH) 事前にモデルビルディングを行い、挿入する残基数を4とした。ラット ALDH 由来のプレ配列を用いて、MBP-Tom20-SS-pALDH 複合体を発現・精製し、結晶を得て構造解析を行った。回折分解能は 1.8 Å であった。モデルバイアスを避けるために、分子置換の際にはプレ配列に対応する原子は置かなかった。

差フーリエ電子密度マップをつくると、結合サイト付近にプレ配列ペプチド由来と思われる棒状の電子密度を得ることができた。さらに電子密度マップのノイズ低減のために、フーリエ変換の際にローパスフィルターを用いることが有効であった(図3)。また、計算の overfitting を防止するための FreeR 手法を改良する必要があった。通常の FreeR 計算では、あらかじめ少数の回折データ(正確には構造因子)を構造精密化計算に使わない。その理由は予め取り置いた FreeR セットの回折データを計算の検証に用いるためである。使用するデータの数が減るために、電子密度の質は必然的に低下するが、動きが小さい原子ではその影響は無視できる。しかし、運動性の大きな原子では影響が無視できない。5%の FreeR セットを使うと 20 通りの FreeR セットを作ることができるので、20 個の独立した構造計算を行うことができる。その結果できる 20 個の電子密度マップの平均を計算することで FreeR 計算の影響を取り除けることが分かった。次に、bulk solvent correction の影響を検討した。バルクソルベントとはタンパク質結晶において、タンパク質分子間の空間を埋めているディスオーダーした水分子やイオンを指し、低分解能側の X 線回折の強度を減少させる。このバルクソルベントによる減衰効果を補正する計算手法が bulk solvent correction であり、通常の X 線解析計算でも考慮されているが、本法ではローパスフィルターを使って低分解能側の回折データを抜き出して使うために、その影響を詳細に評価することが重要であった。3つの X 線解析計算プログラム、REFMAC5、PHENIX、CNS を比較したところ、ほぼ同等の品質の電子密度が得られた。このことから bulk solvent correction アルゴリズムが結果に影響している可能性は少ないことを確認した。テザリングした Tom20-SS-pALDH の分子動力学計算を理化学研究所・杉田主任研究員と行い(J. Phys Chem B, 2013)、計算結果からシミュレーションした電子密度が実験から得られた電子密度と良く一致することを示した(図4)。以上の成果をまとめて発表した(原著論文 11)。さらに、テザリングしていない状態の Tom20-pALDH の分子動力学計算を理化学研究所・宮下研究員と行い、テザリングはプレ配列の空間分布に影響を与えないことを確かめた(原著論文 4)。

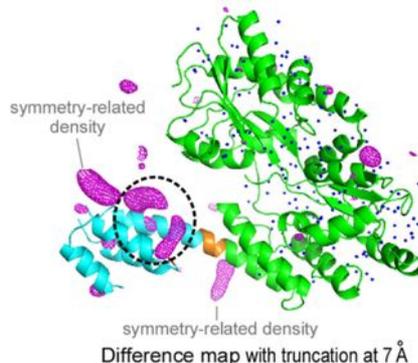


図3 MBP-Tom20-SS-pALDH の Fo-Fc マップ (マゼンタ)。点線内がプレ配列の電子密度。MBP (緑)-Tom20 (シアン) のモデルを重ねて表示した。青い点は水分子。

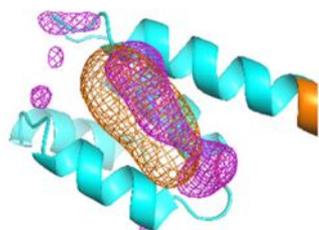


図4 実験により決定したプレ配列ペプチドの電子密度(マゼンタ)は計算の電子密度(オレンジ)と重なるもの少しずれている。

(Tim21 のループ構造) Tim21 結晶中と NMR 構造でコンホメーションが異なるループをループ 2 と呼ぶことにする(図2) 酵母の Tim21 タンパク質と MBP との融合タンパク質を作成し、結晶化と構造決定を行った。硬い接続に使った α ヘリックスの長さを複数用意してタンパク質を調製し、結晶化を行って最終的に 3 つの結晶構造を得ることができた。結晶構造解析を行い、スマアしている電子密度にループ 2 のモデルを置くことが可能であった。回折分解能は 1.8 Å であった。CCFS がデザイン通り出来ているかどうかを評価するために、ループ 2 の温度因子を比較した。その結果、3 つの結晶構造のうち一つでほぼ完全な CCFS が出来ていることがわかった(図5)。この CCFS 中のループの構造を、すでに報告されている NMR 溶液構造と比較した。その結果、異なることが判明した。したがって、CCFS 中のループのモデル構造が真の溶液構造(のアンサンブル平均)と見なして良いかどうかの判断ができない事態となった。そこで、950MHz NMR と自動帰属プログラムを使用して NMR 構造を新規に決定し直すこと(横浜国立大学・児嶋教授と共同研究)と、分子動力学計算による溶液構造分布の推定(理研・宮下研究員と共同研究)を行った。その結果、今回の CCFS 中に得られたループ 2 のモデル構造は、新しい NMR 構造のアンサンブル分布および計算構造のアンサンブル分布の中央に位置していることが判明した。すなわち、CCFS 中のループ 2 のコンホメーションは、溶液中のループ 2 の代表的な構造と見なして良いと結論でき、CCFS が溶液中のコンホメーションの推定に使えることを示せた(投稿中)。

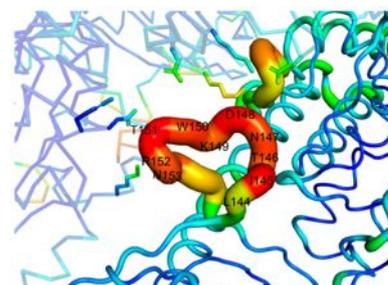


図5 CCFS中の配置されたループ2のモデルは大きな温度因子(B因子)をもつ。このことから、CCFSの中で動いている。厳密に言うと、結晶は凍結低温状態にあるので、static disorder状態にある。

## 5 . 主な発表論文等

### [ 雑誌論文 ] ( 計 13 件 )

1. Yamasaki T, \*[Kohda D](#). A Radioisotope-free Oligosaccharyltransferase Assay Method. *Bio-protocol* 9: e3186 (2019)
2. \*[Kohda D](#). "Multiple partial recognitions in dynamic equilibrium" in the binding sites of proteins form the molecular basis of promiscuous recognition of structurally diverse ligands. *Biophys Rev*. 10:421-433 (2018)
3. \*[Kohda D](#). Structural basis of protein Asn-glycosylation by oligosaccharyltransferase. *Adv Exp Med Biol*. 1104:171-199 (2018)
4. Srivastava A, Tama F, [Kohda D](#), \*Miyashita O. Computational investigation of the conformational dynamics in Tom20-mitochondrial presequence tethered complexes. *Proteins*, 87:81-90 (2018)
5. Fujinami D, -Mahin AA, Elsayed KM, Islam MR, Nagao JI, Roy U, Momin S, Zendo T, \*[Kohda D](#), \*Sonmoto K. The lantibiotic nukacin ISK-1 exists in an equilibrium between active and inactive lipid-II binding states. *Commun Biol*. 1:150 (2018).
6. Fujinami D, Taguchi Y, \*[Kohda D](#). Asn-linked oligosaccharide chain of a crenarchaeon, *Pyrobaculum calidifontis*, is reminiscent of the eukaryotic high-mannose-type glycan. *Glycobiology* 27: 701-712 (2017)
7. Matsumoto S, Taguchi Y, Shimada A, Igura M, \*[Kohda D](#). Tethering an N-glycosylation sequon-containing peptide creates a catalytically competent oligosaccharyltransferase complex. *Biochemistry*, 56:602-611 (2017)
8. Kubota M, \*Takeuchi K, Watanabe S, Ohno S, Matsuoka R, [Kohda D](#), Nakakita SI, Hiramatsu H, Suzuki Y, Nakayama T, Terada T, Shimizu K, Shimizu N, Shiroishi M, Yanagi Y, \*Hashiguchi T. Trisaccharide containing  $\alpha$ 2,3-linked sialic acid is a receptor for mumps virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 113:11579-11584 (2016)
9. Taguchi Y, Fujinami D, \*[Kohda D](#). Comparative analysis of archaeal lipid-linked oligosaccharides that serve as oligosaccharide donors for Asn-glycosylation. *J Biol Chem*, 291:11042-11054 (2016)
10. \*Shimada A, Yamaguchi A, [Kohda D](#). Structural basis for the recognition of two consecutive mutually interacting DPF motifs by the SGIP1 $\mu$  homology domain. *Sci Rep* 6: 19565 (2016)
11. Matsuoka R, Shimada A, Komuro Y, Sugita Y, \*[Kohda D](#). Rational design of crystal contact-free space in protein crystals for analyzing spatial distribution of motions within protein molecules. *Protein Sci* 25: 754-768 (2016)
12. Fujinami D, Nyirenda J, Matsumoto S, \*[Kohda D](#). Structural elucidation of an asparagine-linked oligosaccharide from the hyperthermophilic archaeon, *Archaeoglobus fulgidus*. *Carbohydr Res* 413: 55-62 (2015)
13. Ishiwata A, Taguchi Y, Lee YJ, Watanabe T, [Kohda D](#), \*Ito Y. N-Glycosylation with synthetic undecaprenyl pyrophosphate-Linked oligosaccharide to oligopeptides by PglB oligosaccharyltransferase from *Campylobacter jejuni*. *Chembiochem* 16: 731-737 (2015)

### [ 学会発表 ] ( 計 23 件 )

1. 韓喜玲, 嶋田睦, 神田大輔 ( 2018, 9/24 )  
Creating crystal contact-free space in protein crystals makes the spatial distribution of a presequence peptide in the binding site of the mitochondrial presequence receptor, Tom20, visible  
第 91 回日本生化学会, 京都 .
2. 韓喜玲, 嶋田睦, 神田大輔 ( 2018, 6/30 )  
Visualization of the spatial distribution of a presequence peptide in the binding site of the mitochondrial presequence receptor, Tom20, using crystal contact-free space created in protein crystals  
平成 30 年度日本生化学会九州支部例会, 福岡 .
3. Daisuke Kohda (2018, 3/22)  
Integrative Structural Biology Approach to Understand the Structural and Dynamic Basis of Asn-Glycosylation  
The Japanese Biochemical Society Bio-Frontier Symposium, International symposium on ER stress, glycosylation, homeostasis and diseases, Wako, Saitama.
4. Daisuke Kohda (2017, 12/6)  
Integrative Structural Biology Approach to Understand the Structural and Dynamic Basis of Asn-Glycosylation  
2nd Joint International Symposium of NSRRC and IPR, National Synchrotron Radiation Research

- Center, Hsinchu, Taiwan.
5. Xiling Han (2017, 12/6)  
Visualization of the spatial distribution of a presequence peptide in the binding site of the mitochondrial presequence receptor, Tom20, using crystal contact-free space created in protein crystals  
生命科学系学会合同年次大会 (第40回日本分子生物学会, 第90回日本生化学会), 神戸.
  6. Siqinbala, Atsushi Shimada, Daisuke Kohda (2017, 12/6)  
Application of the crystal contact-free space to analyze the intrinsic conformation of proteins by crystallography  
生命科学系学会合同年次大会 (第40回日本分子生物学会, 第90回日本生化学会), 神戸.
  7. Daisuke Kohda (2017, 3/22)  
Integrative Structural Biology Approach to Understand the Structural and Dynamic Basis of Asn-Glycosylation  
The 10th Anniversary of Protein & Peptide Conference (PepCon-2017), Fukuoka (Hilton Fukuoka Sea Hawk).
  8. Daisuke Kohda (2016, 10/7)  
Integrative structural biology approach to decipher the molecular mechanism of Asn-glycosylation  
The 42nd Naito Conference, "In the Vanguard of Structural Biology: Revolutionizing Life Sciences", Sapporo.
  9. Daisuke Kohda (Nov 13-14, 2015)  
Application of "crystal contact-free space" to the study of protein dynamics  
The 25th Hot Spring Harbor International Symposium, "Cutting Edge of Technical Innovations in Structural and Systems Biology", Fukuoka
  10. Daisuke Kohda (Sep 13-15, 2015)  
Crystal contact-free space for analyzing spatial distribution of protein internal motions  
第53回日本生物物理学会年会シンポジウム 2SAA 「動的構造生命科学を拓く新発想測定技術」, 金沢
  11. Daisuke Kohda (Aug 13-16, 2015)  
Integrative structural biology approach to understand the structural and dynamical basis of Asn-glycosylation  
The 6th Asia-Pacific NMR Symposium (APNMR6), Hong Kong
  12. 神田大輔 (2015, 6/26)  
"結晶コンタクトフリー空間"を利用する新しい結晶解析技術を用いて蛋白質分子の内部運動の空間分布を視覚化する  
第15回日本蛋白質科学会 3WB 「動的構造生命科学を拓く新発想測定技術」, 徳島
  13. 松岡礼, 神田大輔 (2015, 6/26)  
X線結晶構造解析から蛋白質分子の動的情報を得るための新奇手法  
第15回日本蛋白質科学会, 徳島
  14. 松岡礼, 神田大輔 (2015, 5/17)  
X線結晶解析からタンパク質分子の動的情報を得るための新手法  
平成27年度日本生化学会九州支部例会, 福岡
  15. 神田大輔 (2015, 5/7)  
蛋白質結晶中に隙間を創り出す新しいX線結晶解析を用いて蛋白質分子内部の動きを観る  
日本生物物理学会九州支部・熊本大学イメージングセミナー NMRとMRIの邂逅, 熊本
  16. 神田大輔 (2015, 1/13)  
新学術領域「動的構造生命」の概要  
生命分子ダイナミクスの探求を目指す次世代 NMR 研究会, 岡崎
  17. 松岡礼, 小室靖明, 杉田有治, 神田大輔 (2014, 12/5-6)  
X線結晶解析から分子の動的情報を得るための方法  
立体視プロジェクションシステムを使った分子科学研究講演会, 飯塚
  18. Rei Matsuoka, Daisuke Kohda (Sep 29-30, 2014)  
Structural and dynamic basis for mitochondrial presequence recognition by Tom20  
The 5th Japan-Taiwan bilateral NMR symposium, 札幌
  19. Daisuke Kohda (Sep 20-22, 2014)

Structural and dynamic basis for mitochondrial presequence recognition by Tom20  
ISN 2014 Special Neurochemistry Conference, 東京

20. Rei Matsuoka, Yasuaki Komuro, Yuji Sugita, Daisuke Kohda (Aug 5-12, 2014)  
Intentional crystal-contact-free space in protein crystal  
The 23rd congress and general assembly of the international union of crystallography (IUCr2014),  
Montreal
21. 松岡礼, 小室靖明, 杉田有治, 神田大輔 (2014, 6/25-27)  
X線結晶解析から分子の動的情報を得るための新手法  
第14回日本蛋白質科学会, 横浜
22. 神田大輔 (2014, 6/25)  
タンパク質結晶中に意図的に創り出した空間を使って, タンパク質結晶中の大振幅運動を解析する  
第14回日本蛋白質科学会年会 ワークショップWS01 躍動するタンパク質とプロミスキャ  
スネットワーク, 横浜
23. 松岡礼, 小室靖明, 杉田有治, 神田大輔 (2014, 5/17-18)  
X線結晶解析からタンパク質分子の動的情報を得るための新手法  
平成26年度日本生化学会九州支部大会, 福岡

〔図書〕(計2件)

1. Hidekazu Hiroaki, Daisuke Kohda . 2018.  
Protein-Ligand Interactions Studied by NMR .  
Experimental approaches of NMR spectroscopy -Methodology and application to life science and  
materials science-, Chapter 21, pp.579-600  
The Nuclear Magnetic Resonance Society of Japan (Ed.), Springer Nature, Singapore.
- 2 神田大輔, 2014.  
監修と Overview  
細胞工学 33, No.8, 810-814 特集「バイオNMR 細胞内分子の真の動的構造と相互作用  
を明らかにする」

〔産業財産権〕

出願状況 (計0件)

取得状況 (計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://ugoku-tanpaku.jp>

<http://vsb.bmr.kyushu-u.ac.jp/Shingakujuutsu/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

該当なし

### (2) 研究協力者

該当なし

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。