

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年6月9日現在

機関番号：14401
 研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2009～2011
 課題番号：21570170
 研究課題名（和文）核磁気共鳴の緩和分散法を利用した酵素活性部位の遷移状態の構造解析
 研究課題名（英文）Structural analysis of the transient state of an enzyme active site using NMR relaxation dispersion
 研究代表者
 池上 貴久（IKEGAMI TAKAHISA）
 大阪大学・蛋白質研究所・准教授
 研究者番号：20283939

研究成果の概要（和文）：

キチナーゼを、*Pfl*-ファージとアクリルアミドゲルを配向剤として用い、静磁場中で配向させ、残余双極子相互作用値（RDC）を測定し、これらを使った系が有効であることを実証した。さらに、この配向状態での緩和分散法の適用法を開発するため、構造交換していることが確実な複合体の系を用いた。これらの stoichiometry を変えると、RDC の値も複合体の比率に依存して変わることを確認した。

研究成果の概要（英文）：

An enzyme chitinase was aligned along the static magnetic field using *Pfl*-phage or acrylamide gel as an alignment medium. In this state residual dipolar coupling was observed, confirming that the system was effective for the analysis. To further apply the relaxation dispersion method to the alignment system, a complex system which was well known to be in a conformational exchange was used. Upon changing the stoichiometry in the complex, it was observed that the residual dipolar coupling also changed accordingly.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
2011 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：構造生物学

科研費の分科・細目：生物科学・生物物理学

キーワード：核磁気共鳴、NMR、遷移状態、induced-fit、構造解析

1. 研究開始当初の背景

酵素などの蛋白質には通常基底状態での構造以外に、励起された遷移状態での構造が

しばしば存在する。例えば、酵素に基質が相互作用して活性を発揮する瞬間には、酵素は遷移状態の構造に変化している。これまで、この構造の変化は、「基質が酵素蛋白質に結

合することによって初めて遷移状態の構造が誘起される」とする「誘導適合 (induced-fit)」で説明されてきた。しかし近年、「基質が結合していない状態でも、酵素が基底状態周辺で揺らぐことで、一時的に遷移状態の構造を採り、それに基質が選択的に相互作用することによって、基底・遷移状態間の平衡が遷移状態の方へシフトする」とする「アロステリック効果」が提唱され始めた。

この酵素の構造を「はさみ」に例えるなら、基底状態での構造は「閉じたはさみ」に対応する。このままでは、触媒される物質である基質は立体障害のため、活性部位に組み込めない。しかし、このはさみの構造は水溶液中で揺らぐことで一瞬「開いたはさみ」に転じることがあり、その瞬間に基質が鍵と鍵穴の組み合わせのように活性部位にはまり込む。

この「開いたはさみ」に対応する遷移状態は、ミリ秒程度と非常に短命であり、また、分子数比率として全体の数 % あるかないかの微量であるので、実験でその構造を観測することは非常に困難であった。しかし、新たな手法である核磁気共鳴 (NMR) の緩和分散法を用いると、「開いたはさみ」に対応する遷移状態の情報についても得ることができる可能性が最近示された。

この方法論は世界のいくつかのグループから提案され、非常に有用であると認められつつある。しかし、この緩和分散法から得られた遷移状態での化学シフト値や残余双極子相互作用値から、その状態での立体構造を高精度に決定した例は数例しかない。

2. 研究の目的

酵素が基質と相互作用する際、あるいは、蛋白質が別の蛋白質などと相互作用する際、その立体構造が変化する場合が多いが、相手方の基質や蛋白質が無い状態でも、非常に低い存在確率ではあるが、相互作用した状態での

構造を一瞬だけ取ることがある。そのような遷移状態の構造を、NMR の緩和分散法を用いて解析する。

3. 研究の方法

試料調製

キチナーゼのキチン分解活性ドメイン (放線菌 *Streptomyces griseus* 由来 ChiC) を遺伝子組み換え大腸菌を用いて安定同位体 $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}/(^2\text{H})$ で標識した状態で発現させる。さらに、 ^{13}Co 核と ^{13}C 核の特異的標識のために $1\text{-}^{13}\text{C}$ -ピルビン酸と $[2\text{-}^{13}\text{C}]$ -グルコースを用い、また、メチル基の特異的標識のために 2-ケト酪酸を用いて、原則的に観測の対象となる核のみが安定同位体で標識された試料を得る。前者の ^{13}Co 核と ^{13}C 核の選択的標識は世界でもまだほとんどなされていない。

DHPC-DMPC 類のリン脂質、PEG などの高分子、および、Pfl-ファージ蛋白質などの配向剤を用いて、ChiC の活性ドメインを静磁場中で配向させるための試料を調製する。

NMR 測定

これらの試料を用いて、CPMG パルス系列、および、 $T_{1\rho}$ スピンロック法によりアミド ^{15}N , ^1HN , ^{13}Co , ^{13}C 、 ^1H 、 ^{13}C 核、および、メチル基 ^{13}C - H_3 核を対象に NMR の緩和分散法を測定する。このデータに理論曲線を最適化することにより、各スピン系における基底状態と遷移状態での化学シフト値の差を取得する。緩和分散は一量子コヒーレンスだけではなく、 ^{15}N - ^1HN , ^{13}C - ^1H の多量子コヒーレンスにも適用することにより、データの信頼性を向上させる。また、構造交換の情報 (R_{ex}) をより精密に取得するために、 ^{15}N - ^1HN の交差相関緩和 (cross-correlated relaxation) も測定する。このような多種類のスピン系を総合的に網羅した酵素の解析は、まだなされていない。

静磁場中で配向させた状態で ^{15}N - ^1HN , ^{13}C - ^1H , ^{13}Co - ^1HN , ^{13}Co - ^{13}C , ^{13}C - ^{13}C , ^{13}C

・¹H・メチル基 ¹³C-¹H₃ 核の二重分裂ピークそれぞれの緩和分散を TROSY 法により測定する。この結果より、遷移状態でのそれぞれの化学シフト値が得られ、両者の差から遷移状態での残余双極子相互作用値が得られる。この残余双極子相互作用値は、対応する核間ベクトルの分子配向座標に対する方向性に依存するので、立体構造を計算する際の貴重な情報源となる。この応用例は、世界でもモデル試料を使つての 1-2 例しかない。

4. 研究成果

キチナーゼのキチン分解活性ドメイン (放線菌 *Streptomyces griseus* 由来 ChiC) を、PFI-フェージとアクリルアミドゲルを配向剤として用い、静磁場中で配向させ、残余双極子相互作用値を測定し、PFI-フェージとアクリルアミドゲルを使った系が有効であることを実証した。配向にはさまざまなパターンがある方が最終的な精度が高まるので、複数の種類の配向剤を試した。さらに、この配向状態での緩和分散法の適用法を開発するため、構造交換していることが確実な複合体の系 (SH3 ドメインとその基質) を用いた。そして、両者がアクリルアミドの配向剤の中で、有意に配向することを確認した。これらの stoichiometry を変えると、RDC の値も複合体の比率に依存して変わることを確認した。

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 3 件)

1. Lee, Y. H., Ikegami, T., Standley, D. M., Sakurai, K., Hase, T., and Goto, Y. Binding Energetics of Ferredoxin-NADP⁺ Reductase with Ferredoxin and Its Relation to Function. (2011) *Chembiochem* **12**, 2062-2070. 査読有り

2. Kaieda, S., Matsui, C., Mimori-Kiyosue, Y., and Ikegami, T. (2010) Structural basis of the recognition of the SAMP motif of adenomatous polyposis coli by the

Src-homology 3 domain. *Biochemistry* **49**, 5143-5153. 査読有り

3. Yokogawa, D. and Ikegami, T. (2009) A robust approach to calculate entropy change based on density functional theory in the energy representation. *The Journal of Chemical Physics* **131**, 221101. 査読有り

[学会発表] (計 12 件)

1. 講演題目: Is the interaction site with SH2 domains really well-known several residues including phosphotyrosine alone?
講演会名: 9th Japan-Korea Bilateral Symposium on Biological NMR
日時: 2012 年 3 月 16 日 (金)
場所: 北海道大学 Conference Hall
発表者: 池上貴久

2. 講演題目: NMR による蛋白質と低分子リガンドとの相互作用の解析法
講演会名: NMR による蛋白-薬剂相互作用検出実験法
日時: 2012 年 3 月 8-9 日 (木金)
場所: 蛋白質研究所
発表者: 池上貴久

3. 講演題目: ダイナミクスを利用したさまざまな NMR 相互作用解析法の紹介
講演会名: 第 43 回ワークショップ「計算科学と NMR の融合に向けて」
日時: 2012 年 2 月 6 日 (月)
場所: 理化学研究所横浜研究所交流棟ホール
発表者: 池上貴久

4. 講演題目: Advantages and disadvantages of a high magnetic field NMR and ¹³C detection (高磁場 NMR の利用・¹³C 検出への期待)
講演会名: 第 13 回 RRR-workshop 2011/12
日時: 2012 年 1 月 25-26 日 (水木)
場所: 首都大学東京秋葉原サテライトキャンパス
発表者: 池上貴久

5. 講演題目: 核磁気共鳴の測定や解析の実際
講演会名: 熊本大学特別講演会
日時: 2012 年 1 月 17 日 (火) 15:00-17:30
場所: 熊本大学薬学教育部
発表者: 池上貴久

6. 講演題目：図で見る新しい NMR 手法の原理

講演会名：ISNMR2011 チュートリアル講演
日時：2011 年 11 月 15 日（火）9:30-10:20
場所：横浜大榎橋ホール
発表者：池上貴久

7. 講演題目：950MHz-NMR マシンの性能を最大限に引き出すことを目指して

講演会名：蛋白研セミナー（先端的 NMR 拠点から生まれる新たな潮流：最新成果、役割、利用）
日時：2011 年 7 月 28-29 日（木-金）
場所：蛋白質研究所
発表者：池上貴久

8. 講演題目：タンパク質の NMR - 13C 検出への期待-

講演会名：平成 23 年度日本分光学会 NMR 講習会
日時：2011 年 7 月 20 日（水）10:00-18:00
場所：東京大学薬学部西講義室（西館一階）
発表者：池上貴久

9. 講演題目：蛋白質解析における NMR のより面白い活用法とは

講演会名：日本生物物理学会北海道支部講演会
日時：2011 年 2 月 24 日（木）
場所：北海道大学理学部
発表者：池上貴久

10. 講演題目：プロダクトオペレータの基礎（10hr）、プロダクトオペレータの発展（6hr）

講演会名：先導的若手 NMR スペシャリスト育成プログラム（第一回研修会）
日時：2010 年 12 月 2-4 日（木-土）
場所：琵琶湖リゾートクラブ
発表者：池上貴久

11. 講演題目：Structural analysis of an SH3 domain that also interacts in the same recognition region with a sequence containing no proline-rich motif

講演会名：Korea-Japan Bilateral Symposium on Protein Structure and Folding
日時：2010 年 11 月 26-27 日（金、土）
場所：ソウル大学薬学部
発表者：池上貴久

12. 講演題目：950MHz-NMR の設置の経緯、現状、これからの方針

講演会名：蛋白研セミナー「超高磁場が拓く生体系 NMR：最新技術と応用」

日時：2010 年 7 月 29（木）- 30 日（金）
場所：大阪大学蛋白質研究所講堂
発表者：池上貴久

6. 研究組織

(1) 研究代表者

池上 貴久 (IKEGAMI TAKAHISA)
大阪大学・蛋白質研究所・准教授
研究者番号：20283939