

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25513005

研究課題名(和文) 質量分析法とキャビティオミクス解析を用いた蛋白質の「揺らぎの震源地」の解析

研究課題名(英文) Analysis of the "epicenter of fluctuation" of proteins using mass spectrometry and the cavity omics analysis

研究代表者

泉 俊輔 (Izumi, Shunsuke)

広島大学・理学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：90203116

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：タンパク質が形成する空洞を網羅的に解析する方法のパーシステントホモロジー群は、タンパク質内の原子を0単体とし、各ファンデルワールス半径からなる球で近似した3次元対象のnerveをとり、ファンデルワールス半径を実数倍し、トポロジカル・キャビティがホモロジー群として生成・消滅する。この解析を施すと、リパーゼでは半径関数0.8付近のピークは小さな空洞を、半径関数1.5付近のピークは大きな空洞(ロバスト空洞)を表す。本研究では、様々な種類のタンパク質にHD交換実験を行い、各タンパク質のHD交換速度を算出し、その結果とパーシステントホモロジーの相関からタンパク質の空洞がHD交換に及ぼす影響を考察した。

研究成果の概要(英文)：Speed of the fluctuation of the protein is measured in such as hydrogen deuterium (HD) exchange rate. In the present study, the HD exchange rate that tied the cavity of the protein (cavity), heading the relationship between the common structure of the speed and protein fluctuations, discussed the features of the HD exchange method in protein.

研究分野：タンパク質の質量分析を用いた構造解析

キーワード：質量分析 タンパク質 パーシステントホモロジー群 HD交換速度 トポロジカル・キャビティ

1. 研究開始当初の背景

本研究は蛋白質の揺らぎを位相幾何学的な切り口で論じることが目的とする。蛋白質内部に存在するキャビティは、蛋白質の揺らぎの発生源となっており、機能を発現・制御する際に重要であることが明らかになりつつある。しかしながらキャビティの定義は、研究者によって異なっている。本研究において我々は、位相幾何学的にキャビティを定義し、そのあいまいさを廃するとともに、蛋白質内の網羅的なキャビティの数え上げとその位置を特定する方法論を確立する。従来のキャビティの定義があいまいなのは、グリッドベースでキャビティを定義することによる。すなわち「ここには が入るくらいの間隔が空いている」という定義であり、その研究者がキャビティに入る分子として何に注目するかによって、キャビティの数も位置も異なってしまう。一方、位相幾何学的に「ここにはファンデルワールス半径が 倍広がってもつぶれない間隔が空いている」という定義をすれば、一意的・網羅的にキャビティを特定することができる。

一方、我々は質量分析による H/D 交換速度を詳細に測定することによって、蛋白質に基質が結合することや変異を加えたときに、その揺らぎの速度がどのように変化するかを調べてきている。また最近では、リボソームのような巨大分子でも各サブユニットの H/D 交換速度を測定することによって、リボソーム構成の機序を明らかにした。しかしながら質量分析の結果に限らず、これまでの蛋白質の揺らぎの速度論的研究は、研究者の興味のある蛋白質で調べられているにすぎず、系統的な研究は極めて少ない。また H/D 交換速度から割り出される揺らぎを蛋白質の構造と結びつける場合も、2 次構造やドメイン・フォールドなどの 3 次構造に分けて評価することが一般的であり、もっと根源的な構造情報に基づいて考察している例は少ない。我々は、本研究課題において質量分析を用いて得られる蛋白質の揺らぎの速度を位相幾何学的な定義によるキャビティ (トポロジカル・キャビティ: 以下 T-キャビティ) と結びつけることで、そこから揺らぎの速度を支配する蛋白質内の共通の構造を見出し、さらに揺らぎがどのように伝播してゆくのかを明らかにする。

2. 研究の目的

質量分析を用いて得られる蛋白質の揺らぎの速度を位相幾何学的な定義によるキャビティと結びつけることで、そこから揺らぎの速度を支配する蛋白質内の共通の構造を見出し、さらに揺らぎがどのように伝播してゆくのかを明らかにする。

キャビティを位相幾何学的な手法で網羅的に数え上げる方法論はこれまでになく、キャビティオミクス解析と呼ぶべき新しい切り口である。これと蛋白質分子の揺らぎとを組

み合わせることによって、蛋白質の揺らぎの根源 (= 揺らぎの震源地) の構造の特定をめざす。この「揺らぎの震源地」が特定できると、構造生物学の他、酵素工学や生合成工学など蛋白質の機能変化にも波及する概念が確立する。

3. 研究の方法

-(a) ホモロジー群を用いる蛋白質のトポロジカル・キャビティ (T-キャビティ) の定量化

球状蛋白質を用いて、適切な幾何モデルの導出とそれに対するホモロジー群を用いた蛋白質内のキャビティの位相幾何学的定量化を行う。ここでは基本データとして蛋白質の X 線結晶解析像を用い、幾何モデルとしては以下を考える:

- Cech 複体: 蛋白質内の原子を 0 単体とし、それらを各ファンデルワールス半径からなる球で近似した 3 次元対象の nerve をとったもの。
- Rips 複体: 蛋白質内の原子を 0 単体とし、2 つの原子 a, b (それぞれのファンデルワールス半径を r_a, r_b とする) 間距離が $r_a + r_b$ 以下のときに 1 単体を張る。 $(k+1)$ 個の原子からなる k 単体はその中の任意の原子対に 1 単体が張られているものから構成される。

上記モデルのそれぞれに対応する Persistence Diagram を作成する。Cech 複体、Rips 複体それぞれは、ファンデルワールス半径などのパラメータを含んでいるので、そのパラメータを実数倍することによって、T-キャビティがホモロジー群として生成・消滅する。この T-キャビティ群の生成・消滅の振舞いを Persistence Diagram と呼ぶ。すなわち蛋白質は構成原子のファンデルワールス半径を実数倍変化させることによって、その蛋白質に固有の Persistence Diagram を記述する。

このキャビティ・スペクトルを研究分担者の平岡氏と共に、-(a) で H/D 交換を行うすべての蛋白質について作成する。

-(a) H/D 交換反応を用いる蛋白質の揺らぎの解析

水溶液中での蛋白質全体の H/D 交換反応速度を ESI イオン化法により測定する。この手法は、我々の研究室で 10 年来培ってきた技術で、H/D 交換量の経時的変化は蛋白質の X 線結晶解析が行われた条件を考慮しつつ、その pH や濃度においては生理的条件に近い条件で行う。ESI イオン化は温度制御が可能で、できるだけサンプル量を少なくできるように Nano スプレーイオン化を採用する。

-(b) ホモロジー群を用いた T-キャビティの生成元の解析

T-キャビティの生成元を求めることは、上記の幾何モデル上で 2 次ホモロジー群の最小生成元を求めることと同値である。 -(a)

によって2次ホモロジー群の各生成元に対する代表元がそれぞれ得られるので、課題は「代表元を種にして真のキャピティに対応する最小生成元を見いだす」とことと言い換えられる。しかしながら一般に Computational Topology の問題として代数的厳密解を求めることはNP困難であることが知られている。そこで我々は代数的に解を厳密に求めるのではなく、高精度な近似解を高速に求めることをめざす立場をとる。つまりここでの基本方針は、蛋白質の幾何モデル上で最小生成元を双曲安定定常解に持つような偏微分方程式モデルを導入し、ホモロジー群計算で定まる代表元を初期値にして解の時間発展を追うことで最小生成元を近似的に求めようというものである。そのメリットとしては、数学的には時間無限大の極限で到達可能な最小生成元ではあるが、双曲性を積極的に利用することで解の収束を早め、有限時間で良い近似解を得ることを可能とする。

ここで解決されるべき課題としては、1) 手呂・小林モデルの2次元版偏微分方程式モデルの確立、2) 幾何モデルの特異性を扱うことが可能な数値計算手法の提案、が挙げられる。特に2)については幾何モデルに現れる0単体と1単体上での微分方程式の定式化を考えることと同値であるが、これは有限要素法を参考に適切な弱形式化を導入することで対応する予定である。この計画を実行する為には、数理解析および変分法における業績を持つ平岡氏の研究分担者としての参加が不可欠である。

-(b) 揺らぎの空間的伝播と T-キャピティの生成元との相関

蛋白質の H/D 交換位置を決定するために、我々が開発したペプシンと MALDI イオン化を組み合わせた手法を用いて、ペプシンフラグメントの H/D 交換速度とその位置を観測する。H/D 交換変化率は色分けし、揺らぎの空間的伝播情報を可視化する。この際に、蛋白質によっては、夾雑する低分子化合物のためにスペクトルを複雑にする懸念がある。この問題に対しては1) 株式会社島津製作所の福山・田中らと共同開発したマトリックスを用いて、当該ペプチドを優先的にイオン化すること、2) MSⁿ測定により帰属の確度を向上させることで解消する。

このようにして得られた揺らぎの空間的伝播情報から「揺らぎの震源地」を明らかにする。この震源地が -(b) で求めた位相幾何学的な生成元とどのように相関するのかを調べる。特に、ある特徴的な大きさの T・キャピティがあることが、揺らぎを伝播させる要因になっているのかどうかを、-(a) で求めたキャピティ・スペクトルと関連させながら解析する。

4. 研究成果

タンパク質構造の解析手法の一つに質量分

析法と HD 交換法を組み合わせる手法がある。また、タンパク質が形成する空洞を網羅的に解析する方法として、パーシステントホモロジー群がある。パーシステントホモロジー群は、平成 23 年に濃野・平岡らが提唱した解析手法であり、たんぱく質内の原子を 0 単体とし、それらを各ファンデルワールス半径からなる球で近似した 3 次元対象の nerve をとったものから、ファンデルワールス半径などを実数倍することで、トポロジカル・キャピティ (T-キャピティ) がホモロジー群として生成・消滅する。半径関数 0.8 付近のピークは小さな空洞を、半径関数 1.5 付近のピークは大きな空洞 (ロバスト空洞) を表している。本研究では、様々な種類のタンパク質に HD 交換実験を行うことで、各タンパク質の HD 交換速度を算出し、それらの結果とパーシステントホモロジーの相関から、タンパク質の空洞が HD 交換に及ぼす影響を考察した。タンパク質の HD 交換速度とタンパク質を構成する疎水性アミノ酸の数に相関があることがわかった。また、HD 交換速度とパーシステントホモロジーとの相関から、タンパク質の疎水制度と空洞の数、大きさも HD 交換速度を決めることが明らかとなった。このことから、従来の HD 交換実験において、HD 交換速度はタンパク質の持つ水素結合で決定されていたが、タンパク質内部の疎水性アミノ酸がもたらす空洞に重水が入る速度がタンパク質の HD 交換速度を決めている要因の一つであることが示唆された。

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 11 件)

1. Dual selective nitration in Arabidopsis: almost exclusive nitration of PsbO and PsbP, and highly susceptible nitration of four non-PSII proteins, including peroxiredoxin II E

By Takahashi, Misa; Shigeto, Jun; Sakamoto, Atsushi; Izumi, Shunsuke; Asada, Kozi; Morikawa, Hiromichi. Electrophoresis (2015), 36(20), 2569-2578. 査読有

2. A unique mechanism of successful fertilization in a domestic bird

By Sasanami, Tomohiro; Izumi, Shunsuke; Sakurai, Naoki; Hirata, Toshifumi; Mizushima, Shusei; Matsuzaki, Mei; Hiyama, Gen; Yorinaga, Eriko; Yoshimura, Takashi; Ukena, Kazuyoshi; et al

Scientific Reports (2015), 5, 7700. 査読有

3. In vitro and in vivo evidence for oxalate oxidase activity of a germin-like protein from azalea

By Sakamoto, Atsushi; Nishimura,

Takashi; Miyaki, Yoh-ichi; Watanabe, Shunsuke; Takagi, Hiroshi; Izumi, Shunsuke; Shimada, Hiroshi
Biochemical and Biophysical Research Communications (2015), 458(3), 536-542. 査読有

4. Differential regulation of epidermal growth factor receptor by hydrogen peroxide and flagellin in cultured lung alveolar epithelial cells
By Nishi, Hiroyuki; Maeda, Noriko; Izumi, Shunsuke; Higa-Nakamine, Sayomi; Toku, Seikichi; Kakinohana, Manabu; Sugahara, Kazuhiro; Yamamoto, Hideyuki
European Journal of Pharmacology (2015), 748, 133-142. 査読有

5. Marangoni flow around a camphor disk regenerated by the interaction between camphor and sodium dodecyl sulfate molecules
By Nakata, Satoshi; Tenno, Ryoichi; Deguchi, Ayano; Yamamoto, Hiroya; Hiraga, Yoshikazu; Izumi, Shunsuke
Colloids and Surfaces, A: Physicochemical and Engineering Aspects (2015), 466, 40-44. 査読有

6. Localized bioconvection patterns and their initial state dependency in *Euglena gracilis* suspensions in an annular container
By Shoji, Erika; Nishimori, Hiraku; Awazu, Akinori; Izumi, Shunsuke; Iima, Makoto
Journal of the Physical Society of Japan, 83(4), 043001/1-043001/4(2014). 査読有

7. Self-propelled motor driven by a glucose engine
By Matsuda, Yui; Yoshii, Miyu; Suematsu, Nobuhiko J.; Izumi, Shunsuke; Nakata, Satoshi
Chemistry Letters, 43(4), 453-455 (2014). 査読有

8. Alkylated Dihydroxybenzoic Acid as a MALDI Matrix Additive for Hydrophobic Peptide Analysis ,
By Fukuyama, Yuko; Tanimura, Ritsuko; Maeda, Kazuki; Watanabe, Makoto; Kawabata, Shin-ichirou; Iwamoto, Shinichi; Izumi, Shunsuke; Tanaka, Koichi,
Analytical Chemistry, 86(10), 5187,2014. 査読有

9. Reciprocating motion of a self-propelled object on a molecular layer with a local minimum and a local maximum isotherm ,
By Nakata, Satoshi; Miyaji, Tatsuya; Ueda, Tomoaki; Sato, Taisuke; Ikura, Yumihiko S.; Izumi, Shunsuke;

Nagayama, Masaharu: ,
Journal of Physical Chemistry C, 117(12), 6346-6352,,2013. 査読有

10. Potential of radical scavenging reagents as a matrix additive in the direct detection of S-nitrosylated peptides with UV-MALDI MS ,
By Watanabe, Makoto; Yamamoto, Rie; Iwamoto, Shinichi; Fukuyama, Yuko; Tanimura, Ritsuko; Kawabata, Shin-ichirou; Sato, Taka-Aki; Izumi, Shunsuke; Tanaka, Koichi: ,
International Journal of Mass Spectrometry , 333, 67-71,2013. 査読有

11. Alkylated Trihydroxyacetophenone as a MALDI Matrix for Hydrophobic Peptides, ,
By Fukuyama Yuko; Nakajima Chihiro; Furuichi Keiko; Taniguchi Kenichi; Kawabata Shin-Ichirou; Izumi Shunsuke; Tanaka Koichi: ,
Analytical chemistry, 9444-9448,2013. 査読有

〔学会発表〕(計 1 件)

1. 泉 俊輔 リパーゼの構造安定性はどのようにして決まるのか? 質量分析からの一考察,
第 69 回 酵素工学研究会講演会, 名古屋, 2013.4.26

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究代表者

泉 俊輔 (Izumi Shunsuke)

広島大学・理学研究科・教授

研究者番号：90203116

(2)研究分担者

平岡 裕章 (Hiraoka Yasuaki)

東北大学・原子分子材料科学高等研究機

構・准教授

研究者番号：10432709

(3)連携研究者

()

研究者番号：