

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 8 月 13 日現在

機関番号：22701

研究種目：新学術領域研究(研究領域提案型)

研究期間：2009～2013

課題番号：21113002

研究課題名(和文)天然変性タンパク質の新規構造解析法の開発

研究課題名(英文)Development of a novel method for structure analysis of intrinsically disordered protein

研究代表者

佐藤 衛(Sato, Mamoru)

横浜市立大学・その他の研究科・教授

研究者番号：60170784

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 150,900,000円、(間接経費) 45,270,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、天然変性蛋白質(IDP)の動的構造解析を行うために、X線小角散乱法(SAXS)と分子動力学(MD)計算を組み合わせた新しい手法(MD-SAXS法)及び高速AFMの開発を行ってきた。MD-SAXS法では作成した動的構造モデルに補完的な実験データを加味したモデルから散乱強度を計算し、それが実験データと一致するように構造モデルを精密化する手法を開発し、古細菌由来の天然変性タンパク質Hefに適用した。また、高速AFMでは、新しい手法を導入してノイズの低減化を図り、様々なIDPの観察に適した基板や溶液条件を検討して、領域内の研究グループが対象とする様々なIDPの動態と機能の相関解析を行った。

研究成果の概要(英文)：In this study, we have developed novel methods to investigate flexible structure of intrinsically disordered proteins (IDPs) by small-angle X-ray scattering (SAXS) and molecular dynamics (MD) simulation (MD-SAXS) and by high-speed atomic force microscopy (AFM). In the MD-SAXS method, SAXS profile was calculated from the dynamic IDP model calculated considering complementary experimental data, and compared with experimental profile so that they are in agreement with the experimental data. In the high-speed AFM, a new method to reduce the noise level of the AFM device and a solution condition and supporting plate suitable for IDP observation have been developed. Reliability of the AFM has been assessed through the observation of PQBP-1 where NMR analysis went ahead for the identification of IDR. Based on these experiments, we have collaborated with a number of research group within this IDP research project in Japan and elucidated the structure-function relationship of various IDPs.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物化学

キーワード：X線小角散乱 高速AFM 分子動力学シミュレーション マルチドメインタンパク質 核内タンパク質

1. 研究開始当初の背景

研究開始当初、原子レベルでの動的な構造情報が得られるのはNMR法だけであった。しかしながら、NMR法では適用できるタンパク質の分子量に上限があり、非常に多くの天然変性領域 (intrinsically disordered region: IDR) を含むタンパク質の動的構造解析を行うにはNMR法だけでは不十分であった。そこで、X線小角散乱 (SAXS) 法を利用した新しい構造解析法の開発を目指した。SAXS法はタンパク質の低分解能溶液構造解析に最適な手法であるが、これに分子動力学的シミュレーションを併用することにより、NMR法で困難な高分子量のIDRを含むタンパク質の動的構造が原子レベルで解析できる可能性がある。さらにIDRが完全にディスオーダーしたランダムコイル状態なのか、それともある程度二次構造が形成された状態で揺らいでいるのかも容易に解析でき、IDRを有するタンパク質の構造・機能研究に非常に有効である。また、高速AFMは従来の構造生物学的手法や情報生物学的手法、分子生物学的手法で得られたデータと包括的に組み合わせることにより、天然変性領域の分子動態を解析する汎用性の高い強力な手法になり得るので、IDRの構造動態と機能との関連を明らかにする研究に大きく貢献するものと期待される。

2. 研究の目的

本計画研究では、次の2つの研究を柱に、本領域の他の計画研究グループと密接に連携し、天然変性タンパク質や天然変性領域を有するタンパク質の分子認識・機能発現機構の解明を目指す。

(1) X線小角散乱法 (SAXS法) による天然変性タンパク質の動的構造解析

SAXS法で得られる柔軟なタンパク質の溶液構造は時間的に平均され、機能に関与する揺らぎの情報が消失している。そこで、研究代表者らがこれまでタンパク質のダイナミクス研究に利用してきたSAXS法と分子動力学 (MD) シミュレーションとを組み合わせたMD-SAXS法をドメイン間に長大なIDRがあるために溶液状態で分子全体が大きく揺らいでいるマルチドメインタンパク質の系に適用できるように拡張し、IDRを含むマルチドメインタンパク質 (全長) の動的構造を原子分解能で解析するシステムの開発を目指す。

(2) 高速原子間力顕微鏡 (高速AFM) による天然変性領域の動態解析

研究分担者らは独自に開発した高速 AFM によって、ミオシン分子がアクチンフィラメント上を二足歩行する動態などを捉え、この新規顕微鏡の有効性、信頼性を実証してきた。この手法をクロマチンリモデリング因子

FACT の観察に適用した結果、高速 AFM が不規則構造を含むタンパク質にも応用できる汎用性の高い手法であることを見出した。そこで、本研究では、高速 AFM によるタンパク質の IDR の動態解析を目的に、本領域の研究グループが対象とする ID 領域を含むタンパク質を高速 AFM で観察し、機能に対応した動態変化を可視化し、分子間相互作用の本質の理解を深めることを目指す。さらに、MD-SAXS 法や既存の NMR、X線構造解析等による解析結果に高速 AFM によって視覚化されるダイナミクス情報を加えて ID 領域の構造と機能との関連を解析する。

3. 研究の方法と成果

(1) X線小角散乱法 (SAXS法) による天然変性タンパク質の動的構造解析

MD-SAXS 法による天然変性タンパク質の動的構造解析では、新規に購入した2次元複合型ピクセルアレー検出器を既存の SAXS 装置に組み込んで測定システムの最良化・効率化を図るとともに、X線結晶構造解析やNMRによって得られた原子モデルから水和構造を正しく考慮して理論的に SAXS 強度を計算する方法を開発した。この方法については世界的に幾つかの方法が提案されているが、実験的に得られた SAXS 強度との一致度はよくないので、本研究では、タンパク質溶液と緩衝溶液それぞれに対して、MD シミュレーションによって SAXS 強度を計算して両者を差し引く方法を開発した。この方法は、これまでに提案されている方法とはまったく異なる発想に基づいてタンパク質分子表面の水和水からの散乱を取り扱っており、モデルタンパク質を用いての動的構造解析で良好な結果が得られた。

次に、ヘリカーゼドメインとヌクレアーゼドメインの2つのドメインから構成され、その間に約100残基の天然変性領域 IDR が存在する古細菌由来タンパク質 Hef の SAXS データを新規に購入した2次元複合型ピクセルアレー検出器を搭載した SAXS 装置で収集した。このデータを使って初期的な解析を行ったところ、古細菌由来 Hef タンパク質は溶液中で単量体として単分散していることが明らかとなり、MD-SAXS 法による動的構造解析に適したタンパク質であることが示された。

そこで、このデータを使って2面角データベースから600,000のHef-IDR構造を抽出してHef全長構造を構築し、収集したSAXSデータを用いてMD-SAXS法による動的構造解析を行った。しかしながら、決定するパラメータの数に比べて観測値の数が不足するOver-fittingが問題となったので、SAXSデータと補完的なデータが得られるNMRの化学シフトや残余双極子相互作用を実験データ

に加えて分子動力学計算を行う手法を開発して Hef の全長および Hef の IDR の動的構造解析を行っている。

(2) 高速原子間力顕微鏡 (高速AFM) による天然変性領域の動態解析

高速 AFM による天然変性領域の動態解析の研究では、新しい振幅計測法を導入して装置のノイズ低減化を図るとともに、IDP を含む種々のタンパク質の観察に適した基板や溶液条件を検討した。ID タンパク質 FACT については、ID 領域のリン酸化に伴うフォールディングを見出し、ID 領域と DNA の結合がこのフォールディングを通して調節されていることが示唆された。ID を多く含むと予測される PQBP-1 の高速 AFM 撮影を試み、WW ドメインと推定される球状ドメインに ID 領域と思われる長い紐状の構造が続き、その先に小さい球状のドメインがあるように観察された。ID の存在が確認されていない種々のタンパク質のダイナミクスについても高速 AFM 撮影を行った。

また、多くの IDR を含むタンパク質及びそれらの部分断片試料のイメージングを行い、理論予測との比較、及び、天然変性領域に共通する性質や個々のタンパク質の天然変性領域に特有な性質を調べた。理論予測と一致する場合が一般的であるが、天然変性と予測されている領域が秩序構造をもつ場合や、それと逆の場合もあった。理論的に導かれる中間的な秩序-非秩序指数に対応する構造は実際には存在せず、完全秩序-完全非秩序状態の間をダイナミックに転移している可能性が示唆された。実際、メチル化 DNA 結合タンパク質 MeCP2 において転移現象が見出された。天然変性領域がほとんどを占めるタンパク質については、高速 AFM 観察を容易にするために GFP などを末端に導入した試料の調製を進めた。

次に、IDR と非 IDR の同定を NMR 解析が進んでいる PQBP-1 を標準試料として調べ、高速 AFM 解析の信頼性をまず確認した。何種類かの IDP の高速 AFM 観察を進めたが、特に、べん毛の Hook の長さに関係するとされている FliK と Rett 症候群に関与する Methyl CpG Binding Protein 2(MeCP2)について多くの観察を行った。FliK では N 端と C 端にある球状ドメインが ID 領域で連結されている構造が観察されるが、N 端側半分のコストラクトでは驚いたことになり ID 構造となっており、この結果は NMR のデータと一致する。MeCP2 については、1 次構造と ID 領域、非 ID 領域との関係を決定した。

以上、高速 AFM で数多くの ID 領域の観察結果を得たので、それらの力学特性をミクロスコピックな維持長で表した。その結果、種類に依らずほぼ一定の値をもつことが示

され、ID 領域の柔らかさはアミノ酸配列に依らずほぼ一定になっているという普遍的な結論を得た。FliK については、フック長を決めるに相応しい機構を示唆する結果を得た。すなわち、短い ID を挟む共に Order した N 末、C 末領域の間の相互作用が失われると、N 端領域は Order から Disorder し、長い ID 領域となるという可能性が示唆された。また、N_{TAIL}, PNT and Sic1 の 3 種について IDR を解析したところ、Compact-Extended 状態を遷移する領域を見出し、アミノ酸 1 残基当たりの compactness (大きさ) と compact 状態を取る割合に相関があり、また、疎水性アミノ酸含有率とも相関があることを見出した。

4. 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 20 件、その他 59 件)

1. K. Igarashi, T. Uchihashi, T. Uchiyama, H. Sugimoto, M. Wada, K. Suzuki, S. Sakuda, T. Ando, T. Watanabe, and M. Samejima, Two-way Traffic of Glycoside Hydrolase Family 18 Processive Chitinases on Crystalline Chitin, *Nature Communications* 査読有 (in press)
2. Inoue, M. Sato, H. Iwasaki, T. Shimizu, M. Ikeguchia and S. Akashi, Characterisation of an intrinsically disordered protein complex of Swi5-Sfr1 by ion mobility mass spectrometry and small-angle X-ray scattering, *Analyst*, 査読有, 138, 2013, 1441-1449, doi: 10.1039/c2an35878f
3. Y. Arimura, H. Kimura, T. Oda, K. Sato, A. Osakabe, H. Tachiwana, Y. Sato, Y. Kinugasa, T. Ikura, M. Sugiyama, M. Sato, and H. Kurumizaka, Structural basis of a nucleosome containing histone H2A.B/H2A.Bbd that transiently associates with reorganized chromatin, *Sci. Rep.* 査読有, 3, 2013, 3510, DOI:10.1038/srep03510
4. M. Hashimoto, N. Kodera, Y. Tsunaka, M. Oda, M. Tanimoto, T. Ando, K. Morikawa, and S. Tate, Phosphorylation-coupled Intramolecular Dynamics of Unstructured Regions in Chromatin Remodeler FACT, *Biophys. J.*, 査読有, 104, 2013, 2222-2234, doi: 10.1016/j.bpj.2013.04.007
5. N. Kuwabara, Y. Murayama, H. Hashimoto, Y. Kokabu, M. Ikeguchi, M. Sato, K. Mayanagi, Y. Tsutsui, H. Iwasaki, and T. Shimizu, Mechanistic insights into the activation of Rad51-mediated strand exchange from the structure of a recombination activator, the Swi5-Sfr1 complex, *Structure* 査読有, 20, 2013, 440-449, doi: 10.1016/j.str.2012.01.005
6. Y. Arimura, H. Tachiwana, T. Oda, M. Sato, H. Kurumizaka, Structural Analysis of the Hexasome, Lacking One Histone H2A/H2B

- Dimer from the Conventional Nucleosome. *Biochem. 査読有*, 51, 2012, 3302-3309, doi: 10.1021/bi300129b
7. K. Arita, S. Isogai, T. Oda, M. Unoki, K. Sugita, N. Sekiyama, K. Kuwata, R. Hamamoto, H. Tochio, M. Sato, M. Ariyoshi, and M. Shirakawa, Recognition of modification status on a histone H3 tail by linked histone reader modules of the epigenetic regulator UHRF1, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 査読有, 109, 2012, 12950-12955, doi: 10.1073/pnas.1203701109
 8. T. Uchihashi, N. Kodera, and T. Ando, Guide to Video Recording of Structure Dynamics and Dynamic Processes of Proteins by High-speed Atomic Force Microscopy, *Nat. Protocol*, 査読有, 7, 2012, 1193-1206, doi: 10.1038/nprot.2012.047
 9. H. Tachiwana, W. Kagawa, T. Shiga, A. Osakabe, Y. Miya, K. Saito, Y. Hayashi-Takanaka, T. Oda, M. Sato, S.-Y. Park, H. Kimura, and H. Kurumizaka, Crystal structure of the human centromeric nucleosome containing CENP-A, *Nature* 査読有, 476, 2011, 232-235, doi: 10.1038/nature10258
 10. Y. Kokabu, Y. Murayama, N. Kuwabara, T. Oroguchi, H. Hashimoto, Y. Tsutsui, N. Nozaki, S. Akashi, S. Unzai, T. Shimizu, H. Iwasaki, M. Sato, and M. Ikeguchi, Fission Yeast Swi5-Sfr1 Protein Complex, an Activator of Rad51 Recombinase, Forms an Extremely Elongated Dogleg-shaped Structure, *J. Biol. Chem.* 査読有, 286, 2011, 43569-43576, doi: 10.1074/jbc.M111.303339
 11. K. Igarashi, T. Uchihashi, A. Koivula, M. Wada, S. Kimura, T. Okamoto, M. Penttilä, T. Ando, and M. Samejima, Traffic Jams Reduce Hydrolytic Efficiency of Cellulase on Cellulose Surface, *Science*, 査読有, 333, 2011, 1279-1282, doi: 10.1126/science
 12. A. Miyagi, T. Ando and Y. L. Lyubchenko, Dynamics of Nucleosomes Assessed with Time-lapse High Speed Atomic Force Microscopy, *Biochemistry*, 査読有, 50, 2011, 7901-7908, doi: 10.1021/bi200946z
 14. M. Shibata, T. Uchihashi, H. Yamashita, H. Kandori, and T. Ando, Structural Changes in Bacteriorhodopsin in Response to Alternate Illumination Observed by High-speed Atomic Force Microscopy, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 査読有, 50, 2011, 4410-4413, doi: 10.1002/anie.201007544
 15. S. Shimoyama, A. Nagadoi, H. Tachiwana, M. Yamada, M. Sato, H. Kurumizaka, Y. Nishimura and S. Akashi, Deimination stabilizes histone H2A/H2B dimers as revealed by electrospray ionization mass spectrometry. *J. Mass. Spectrom.* 査読有, 45, 2010, 900-908, doi: 10.1002/jms
 16. N. Kodera, D. Yamamoto, R. Ishikawa, and T. Ando, Video Imaging of Walking Myosin V by High-speed Atomic Force Microscopy, *Nature*, 査読有, 468, 2010, 72-76, doi: 10.1038/nature09450
 17. P.-E. Milhiet, D. Yamamoto, O. Berthoumieu, P. Dosset, Ch. Le Grimellec, J.-M. Verdier, S. Marchal, and T. Ando, Deciphering the Structure, Growth and Assembly of Amyloid-like Fibrils Using High-speed Atomic Force Microscopy, *PLoS One*, 査読有, 5, 2010, e13240, doi: 10.1371/journal.pone
 18. D. Yamamoto, T. Uchihashi, N. Kodera, H. Yamashita, S. Nishikori, T. Ogura, M. Shibata, and T. Ando, High-speed Atomic Force Microscopy Techniques for Observing Dynamic Biomolecular Processes, *Methods Enzymol.*, 査読有, 475, 2010, 541-564, doi: 10.1016/S0076-6879(10)75020-5
 19. D. Yamamoto, A. Taoka, T. Uchihashi, H. Sasaki, H. Watanabe, T. Ando, and Y. Fukumori, Visualization and Structural Analysis of the Bacterial Magnetic Organelle Magnetosome Using Atomic Force Microscopy, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 査読有, 107, 2010, 9382-9387, doi: 10.1073/pnas.1001870107
 20. T. Oroguchi, H. Hashimoto, T. Shimizu, M. Sato and M. Ikeguchi, Intrinsic dynamics of restriction endonuclease EcoO109I studied by molecular dynamics simulations and X-ray scattering data analysis, *Biophys. J.* 査読有, 96, 2009, 2808-2822, doi: 10.1016/j.bpj.2008.12.3914
- [学会発表 (招待講演のみ記載)] (計 11 件、その他 130 件)
1. Toshio Ando, Filming Biomolecular and Cellular Processes by High-speed AFM, Euro AFM Forum 2014, March 17-19, 2014, Göttingen, Germany
 2. Mamoru Sato, Protein Dynamics Investigated by SAXS and MD Simulation, International Conference on Structural Genomics - Structural Life Science - (ICSG2013-SLS), July 29-August 1, 2013, Keio Plaza Hotel Sapporo in Sapporo
 3. Mamoru Sato, SAXS & MD Simulation to Investigate Protein Flexibility in Solution, International Symposium on Diffraction Structural Biology (ISDSB2013), May 26-29, 2013, Nagoya Trade & Industry Center
 4. Mamoru Sato, Mitsunori Ikeguchi, Tomotaka Oroguchi, SAXS & MD Simulation to Investigate Protein Flexibility in Solution, The 2st Annual Meeting for Whole-Organism Science Society. Joint Meeting with The 11th Annual Meeting of Structural-Biological Whole Cell Project, September 28-29, 2012, SPring-8 Public Relation Center

5. Noriyuki Kodera, Sujit Kumar Dora, and Toshio Ando, Imaging Study on Intrinsically Disordered Proteins by High-speed Atomic Force Microscopy, 3rd Kanazawa Bio-AFM Workshop, November 5-8, 2012, Kanazawa
6. Toshio Ando, Keynote Speech: High-speed Atomic Force Microscopy: Nanoscale Visualization of Dynamic Biomolecular Processes, NanoDay@Penn, October 24, 2012, Univ. of Pennsylvania, Philadelphia, USA
7. Mamoru Sato, SAXS to Investigate Protein Flexibility and Intrinsic Disorder in Solution, The 3th Asian Symposium on Advance Materials: Chemistry & Physics of Functional Materials (ASAM-3), September 19-22, 2011, Kyushu University (Chikushi-campus)
8. Mamoru Sato, Towards the dynamical structure analysis of intrinsically disordered proteins in solution by SAXS and MD simulation, The 6th Future Light Source Workshop 2010: Science and Technology, November 4-5, 2010, Pohang Accelerator Laboratory, Pohang, Korea
9. Mamoru Sato, Towards the structural characterization of intrinsically disordered proteins by small-angle X-ray scattering and molecular dynamics simulation, JST ERATO and CREST Joint Symposium "Future Trend in Soft material Research with Advanced Synchrotron Source—Interdisciplinary of Bio- & Synthetic- Materials and Industrial Transferring—", September 1-3, Spring-8
10. Toshio Ando, High-speed Atomic Force Microscopy and Nano-visualization of Dynamic Processes and Structural Changes of Proteins, 3rd International Symposium on Atomically Controlled Fabrication Technology, November 25-26, 2010, Osaka Univ. Nakanoshima Center
11. Mamoru Sato, Towards the structural characterization of intrinsically disordered proteins by the combined use of small-angle X-ray scattering and molecular dynamics simulation, 7th Pusan Workshop on Proteome Biophysics & 1st Asia-Pacific IUP Symposium, Dec. 5 - 6, 2009, Paradise Hotel, Hae Un Dae Beach, Pusan, Korea

[図書] (計 3 件) その他 10 件

1. Toshio Ando and Noriyuki Kodera, Springer, Methods in Molecular Biology, Vol. 897: Intrinsically Disordered Protein Analysis Vol.2: Methods and Experimental Tools(Chapter 4: Visualization of Mobility by Atomic Force Microscopy), 2012, 454
2. 安藤敏夫、丸善出版、タンパク質分析 (第 5 章: 機能解析法、5-2. 高速 AFM によるタンパク質 1 分子挙動解析)、2012, 291
3. 佐藤 衛、萩原央記、明石知子、翻訳後修飾のプロテオミクス (第 4 章: 翻訳後

修飾タンパク質の網羅的解析、4-13. 脱イミノ化) 平野 久、大野茂男編集、講談社、2011, 233

[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

- (1) <http://www-mls.tsurumi.yokohama-cu.ac.jp/lab/xtal-mls.html>
- (2) <http://www.tsurumi.yokohama-cu.ac.jp/IDP/index.html>
- (3) <http://www.s.kanazawa-u.ac.jp/phys/biophys/index.htm>

5. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 衛 (SATO, Mamoru)

横浜市立大学・大学院生命医科学研究科
教授

研究者番号: 60170784

(2) 研究分担者

安藤敏夫 (ANDO, Toshio)

金沢大学・数物科学系・教授

研究者番号: 50184320