

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：15401

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化）

研究期間：2016～2017

課題番号：15KK0260

研究課題名（和文）放射光真空紫外円二色性によるタンパク質の高次構造解析と生体分子間相互作用の研究
（国際共同研究強化）

研究課題名（英文）Structural analysis of protein using synchrotron-radiation vacuum-ultraviolet circular dichroism and study of biomolecular interactions(Fostering Joint International Research)

研究代表者

松尾 光一（Matsuo, Koichi）

広島大学・放射光科学研究センター・准教授

研究者番号：40403620

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 6,400,000円

渡航期間： 6ヶ月

研究成果の概要（和文）：原子レベルの蛋白質立体構造から円二色性（CD）スペクトルを算出できるCD理論を真空紫外（VUV）領域まで拡張することで高度化し、蛋白質の二次構造だけでなくアミノ酸側鎖構造（三次構造）に関する情報を取得する手法を構築した。この手法を、2-microglobulinフラグメント（ $2m21-31$ ）のpHに依存したアミロイド線維の構造解析に応用した結果、pHによる線維の構造変化は二次構造レベルではなく、アミノ酸側鎖が関与する分子間構造の違いによるものであることが示唆された。VUV領域まで考慮したCD理論は、アミロイド線維のような蛋白質-蛋白質相互作用系の構造解析に有効であることが分かった。

研究成果の概要（英文）：Circular dichroism (CD) theory can calculate the CD spectrum of protein from its three-dimensional structure at atomic level. In this study, we improved this theory as the structural information of amino-acid side chain (tertiary structure) and backbone (secondary structure) can be more accurately characterized. New theory was evaluated by the crystal structures of seventeen proteins by comparing their experimental and theoretical spectra. This method was applied to the structural analysis of amyloid fibrils of beta2-microglobulin fragment at two pH values (acid and base conditions). The results showed that the structural differences depending on pH were ascribed not to the secondary structures but to the intermolecular structures related to side chain of amino acids, indicating that the CD theory including the VUV region was powerful tool for the structural research of protein-protein interactions such as amyloid fibrils.

研究分野：生物物理化学

キーワード：放射光円二色性 アミロイド線維 分子動力学法 CD理論 蛋白質 蛋白質相互作用 分子間構造

1. 研究開始当初の背景

円二色性(CD)は、蛋白質の構造解析に広く利用されている。この手法は、様々な実験条件下で測定できる利点を持つため、特に蛋白質、生体膜、DNAなどと相互作用した環境下にある構造解析に有効である。しかし、相互作用のメカニズムの解明に重要な結合部位(分子間)などの局所構造の解析は困難である。これまで我々は、CD分光法から得られる構造情報やその精度を向上させるため、放射光を用いた真空紫外円二色性(VUVCD)分散計を用いて、160nmまでの蛋白質CDスペクトル測定を実現し、二次構造の含量・本数のみならず、バイオフィォマティクス技術などの機械学習法と組み合わせることで、二次構造の位置や配向の解析を可能にした。例えば、生体膜相互作用系では、蛋白質の膜結合部位の構造を明確化できる手法を開発している。一方最近では、原子レベルの蛋白質立体構造モデルを用いるCD理論解析(図1)から、活性部位付近の局所構造やリン酸化による局所的な構造変化などを解析することができるようになった。そのため、放射光を用いて初めて観測できる高エネルギー領域(VUV領域)の電子遷移の種類やモーメントを考慮した蛋白質CD理論(VUVCD理論)の構築は、従来よりも精密な蛋白質の高次構造(膜-蛋白質、蛋白質-蛋白質間構造)など情報の獲得を可能にし、CD分光法にブレークスルーをもたらすと期待できる。

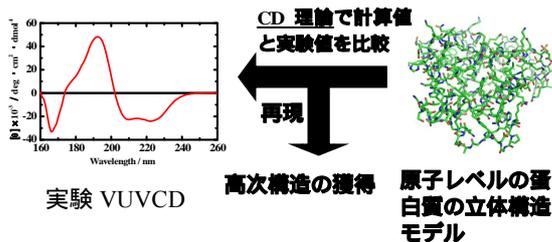


図1 CD理論を用いた蛋白質構造解析の模式図

2. 研究の目的

そこで本研究ではCDによる蛋白質-蛋白質相互作用系の構造解析法を重点的に高度化させるため、以下の2点について研究を展開した。現在のCD理論は、二次構造に帰属されるアミド基と三次構造に帰属される芳香族アミノ酸側鎖のCDを計算することができる。計算精度を向上させるため、マトリックス法を用いた新しいCD理論を構築すると共に、他のアミノ酸側鎖も考慮できるプログラムを作成する。構築した理論を用いて、蛋白質-蛋白質相互作用系の応用研究として、溶液中のアミロイド線維のCDスペクトルの帰属を行う。特に、溶媒効果の一つであるpHに依存する線維構造の違いを明確化する。

3. 研究の方法

蛋白質のCD理論の高度化
現在までに開発されたCD理論には、マト

リックス法を用いたPROTEINプログラムとマトリックス法に分極率の寄与を考慮したPROTPOLプログラムがある。前者は、標準的な計算方法であり、後者はプロリン残基が多い蛋白質の計算に有効である。計算精度の向上のため、遷移エネルギーの局所電場を考慮できるプログラムを新たに構築し、既存のPROTEINプログラムに実装する(PROTEIND)。CD理論に高度化するため、ヒスチジン側鎖のイミダゾール基(pKa 6.0)のプロトン化を、 ϵ 位、 δ 位、また両方の場合を考慮したプログラムを作成する。

β_2 -microglobulin(β_2m)フラグメントアミロイド線維の構造解析

透析アミロイド病に關与する β_2m の断片ペプチド β_2m_{21-31} ($^{21}NFLNCYVSGFH^{31}$)は、アミロイド線維のコアフラグメントとして知られており、酸性と塩基性で異なる形態を取ることが知られている。 β_2m_{21-31} フラグメント(純度99%以上)のアミロイド線維(濃度0.1~0.05%)を100mM NaClを含む50mM酢酸緩衝液(pH5.0)と50mMリン酸緩衝液(pH8.5)中で作成した。アミロイド線維の300~178 nmまでのCDスペクトルを、HiSORの放射光VUVCD装置により測定した。 β_2m_{21-31} アミロイド線維の立体構造モデルは、 β_2m_{20-40} アミロイド線維の固体NMR構造を基に構築した。線維内の平行・逆平行 β -sheetのスタッキングパターンなどを考慮しながらモデル構造を構築し、水溶液中で分子動力学法(GROMACS)により20ns間シミュレートした。400ps毎のシミュレート構造を抽出し、それぞれの理論CDスペクトルをPROTEINとPROTEINDプログラムにより計算した後、平均化した。

4. 研究成果

蛋白質のCD理論の高度化

遷移エネルギーの局所電場を考慮したプログラムであるPROTEINDを構築し、二次構造含量が異なる17種類の蛋白質の結晶構造(分解能0.9~2.3Å)を対象に、3種類のCD理論(PROTEIN, PROTPOL, PROTEIND)を用いて計算を行なった結果、 α -helix richな蛋白質、 α/β or $\alpha+\beta$ 蛋白質、 β -strand richな蛋白質のいずれにおいても、PROTEIND > PROTEIN > PROTPOLの順番で、計算スペクトルの精度が向上することが分かった。また、これら17種の結晶構造を分子動力学(MD)法でシミュレートし、計算CDと実測CDとの比較を行った。その結果、3種類のCD理論いずれの計算方法においても、MD法を用いた場合の方が、実測VUVCDに近い理論値を示した。これにより、構造ダイナミクスを考慮できるMD法は、蛋白質CD理論に有効であることが分かった。

ヒスチジン側鎖についてのCD理論を3種類作成した。 ϵ 位あるいは δ 位のプロトン化は、正味電荷はゼロであるため、イミダゾール基の電荷は無視し、 π 電子密度のみを考慮

した。位と δ 位の両方がプロトン化されている場合は、イミダゾール基の正味電荷(+1)を2つのN原子に均等に分けた。これにより、ヒスチジン側鎖の寄与も考慮できる新たなCD理論を構築した。これら側鎖の種類に依存した蛋白質CDへの影響を見るために、RNase Aの結晶構造からCDを計算した結果、主に近紫外域の280nm付近のCDに影響を及ぼし、紫外・真空紫外域には、影響が無いことが分かった。近紫外域のCDは、芳香族アミノ酸側鎖の影響を受けるため、主に三次構造の帰属に有効であると考えられる。

β_2 mフラグメントアミロイド線維の構造解析

アミロイド線維コアフラグメントの β_2 m₂₁₋₃₁のアミロイド線維を酸性(pH5.0)と塩基性(pH8.5)条件下でVUVCD測定を行った。その結果、pH5.0では280nm付近で正、220nm付近で負、200と180nmで連続した正のピークを示し、pH8.5では280nm付近で負、220nm付近で正、180nmで正のピークを示し、このフラグメントは、pHに依存して特徴的なCDを示し、構造に違いがあることが分かった。各pH条件下で、 β_2 m₂₁₋₃₁のアミロイド線維のモデル構造のMD計算を、 β -sheetのスタッキングパターンやシステイン残基の二面角(N-C α -C β -S)を考慮しながら行った結果、いずれの初期構造でも、初期の β -sheetリッチ構造を保ちつつ、20ns間シミュレートできることが分かった。PROTEINのCD理論を用いて、VUVCDスペクトルを計算した結果、平行 β -sheetの場合は比較的CD強度が大きく、実測値とは異なり、逆平行 β -sheet構造の方が、実測に近かった。また、フラグメント間にジスルフィド結合があることや、システイン基のC β やSを含めた二面角の違いによりCDスペクトルが変化することがわかった。この二面角180°の時に、PROTEINの計算精度内で、酸性・塩基性条件下での β_2 m₂₁₋₃₁のアミロイド線維の特徴的なCDスペクトルが再現することができた。(図2)

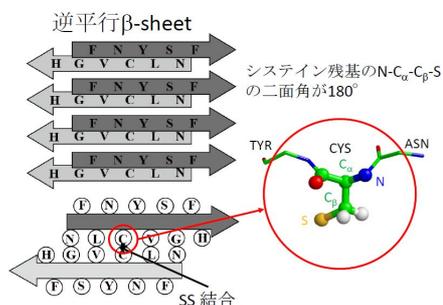


図2 予想された β_2 m₂₁₋₃₁のアミロイド線維の分子間(スタッキング)構造

以上の結果は、pHによるコンフォメーション変化は、二次構造レベルではなく、芳香族アミノ酸側鎖が関与する分子間構造(スタッキング)の違いによるものであることが示唆された。VUV領域まで考慮したCD理論は、

アミロイド線維のような蛋白質-蛋白質相互作用系の構造解析に有効であることが分かった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者は下線)

[雑誌論文](計6件)

K. Matsuo (2017) Vacuum-ultraviolet circular-dichroism study of oligosaccharides using a synchrotron-radiation spectroscopy. *Biomed. Spectrosc. Imaging*, **6** 111-121. (査読有)

M. Pukáncsik, Á. Orbán, K. Nagy, K. Matsuo, K. Gekko, D. Maurin, D. Hart, I. Kézsmárki, B. G. Vértess (2016) Secondary structure prediction of protein constructs using random incremental truncation and vacuum-ultraviolet CD spectroscopy. *PLoS ONE* 11(6), e0156238. (査読有)

K. Matsuo, H. Namatame, M. Taniguchi, K. Gekko (2016) Conformation of membrane-bound proteins revealed by vacuum-ultraviolet circular-dichroism and linear-dichroism spectroscopy. *Proteins*, **84**, 349-359. (査読有)

月向邦彦, 松尾光一 (2016) 放射光真空紫外円二色性による生体分子の構造解析. *分光研究*, **65**, 172-182. (査読有)

M. Kumashiro, K. Matsuo, Y. Izumi, H. Namatame, M. Taniguchi (2017) Conformation of Membrane-Bound Myelin Basic Protein Characterized by Vacuum-Ultraviolet Circular-Dichroism Spectroscopy. *HiSOR Activity Report* 2016, 108. (査読無)

K. Matsuo, H. Yamamoto, S. Lee, T. Mizobata, K. Gekko, Y. Kawata (2017) Studies on structure and amyloid fibril formation of α -Synuclein. *HiSOR Activity Report* 2016, 115-116. (査読無)

[学会発表](計22件)

招待講演(国際学会)

K. Matsuo, Characterization of Biomolecule Structures by Synchrotron-Radiation Vacuum-Ultraviolet Circular-Dichroism Spectroscopy, 4th International Symposium on Hybrid Materials and Processing, (November 2017, Pusan, Korea)

K. Matsuo, Protein structural analysis by synchrotron-radiation circular-dichroism spectroscopy, Japan-Korea Student Workshop (Hiroshima University - Pusan National University), (November 2016, Higashi-Hiroshima, Japan)

K. Matsuo, New developments in the structure analysis of biomolecules using synchrotron-radiation vacuum-ultraviolet circular dichroism, The 13th International School and Symposium on Synchrotron Radiation in Natural Science (ISSRNS'2016), (June 2016, Ustroń, Poland)

招待講演(国内学会)

松尾光一:放射光円二色性によるタンパク質構造解析法の現状 第4回キラル研究会, 2016年12月10日 京都

松尾 光一:放射光円二色性法による生体分子の構造解析,平成 29 年度結晶学若手の会,2017 年 11 月 23 日 広島
松尾光一:真空紫外円二色性による蛋白質の構造解析と生体分子相互作用研究への応用.第 31 回日本放射光学会年会・放射光科学合同シンポジウム,2017 年 1 月 7 日 神戸

国際学会

K. Matsuo, Present status and future prospect of HiSOR-VUVCD spectrophotometer for characterizing biomolecule structures in solution, The 22nd Hiroshima International Symposium on Synchrotron Radiation (March 2018, Hiroshima)

M. Kumashiro, Y. Izumi, K. Matsuo: Conformations of Myelin Basic Protein Interacted with Membrane Revealed by Vacuum-Ultraviolet Circular-Dichroism. The 22nd Hiroshima International Symposium on Synchrotron Radiation (March 2018, Hiroshima)

S. Suenaga, M. Kumashiro, Y. Izumi, K. Matsuo: Secondary Structural Analysis of Hyaluronan Synthase Interacted with Membrane by Vacuum-Ultraviolet Circular Dichroism Spectroscopy. The 22nd Hiroshima International Symposium on Synchrotron Radiation (March 2018, Hiroshima)

K. Nishikubo, Y. Izumi, K. Fujii, K. Matsuo, Y. Matsumoto, A. Yokoya: Secondary structural analysis of XRCC4 protein using HiSOR-VUVCD. The 22nd Hiroshima International Symposium on Synchrotron Radiation (March 2018, Hiroshima)

Y. Izumi, K. Matsuo: Beam focusing and Sample-Volume Reduction Using Schwarzschild Objective at VUV-CD Spectrophotometer. The 22nd Hiroshima International Symposium on Synchrotron Radiation (March 2018, Hiroshima)

Y. Izumi, K. Matsuo: Structural Analysis of Lysine-4 Methylated Histone H3 Using VUV-CD Spectroscopy. The 22nd Hiroshima International Symposium on Synchrotron Radiation (March 2018, Hiroshima)

K. Matsuo, R. W. Woody, Structural Characterization of Amyloid Fibrils using Synchrotron-Radiation Circular Dichroism and Circular Dichroism Theory, Biochemistry and molecular biology department symposium (August 2017, CSU Mountain Campus, USA)

Y. Izumi, K. Matsuo: Probing histone H3 structural alterations induced by lysine-4 methylation. Chirality 2017 (July 2017, Tokyo)

K. Matsuo, Present Status and Future Plan of VUVCD Spectrophotometer, The 21st Hiroshima International Symposium on Synchrotron Radiation (March 2017, Hiroshima)

M. Kumashiro, K. Matsuo, Y. Izumi, H. Namatame, M. Taniguchi: Conformation of Membrane-Bound Myelin Basic Protein Characterized by Vacuum-Ultraviolet

Circular-Dichroism Spectroscopy. The 21st Hiroshima International Symposium on Synchrotron Radiation (March 2017, Hiroshima)

K. Matsuo, R. W. Woody, Characterization of Intermolecular Structure of β_2 -Microglobulin Core Fragments in Amyloid Fibrils by Vacuum-Ultraviolet Circular Dichroism Spectroscopy and Circular Dichroism Theory, CSU Biochemistry and Molecular Biology Department Symposium (August 2016, CSU Mountain Campus, USA)

K. Matsuo, H. Namatame, M. Taniguchi, K. Gekko: Solution Structures and Hydration of Monosaccharides Characterized by Vacuum-Ultraviolet Electronic Circular-Dichroism Spectroscopy. Molecular Chirality Asia 2016 (April 2016, Osaka Japan)

国内学会

中鍵辰哉,鈴木学,松尾光一,佐野健一:ペプチド提示によるアミロイド繊維形成阻害.2017 年度生命科学系学会合同年次大会 (2017 年 12 月,神戸)

熊代宗弘,泉雄大,松尾光一:放射光真空紫外円二色性による生体膜と相互作用したミエリン塩基性タンパク質の構造解析.第 17 回日本蛋白質科学会年会 (2017 年 6 月,仙台)

松尾光一,横靖幸,生天目博文,谷口雅樹,月向邦彦:放射光円二色性・線二色性による生体膜と相互作用した蛋白質のコンフォメーション解析.第 29 回日本放射光学会年会・放射光科学合同シンポジウム (2016 年 1 月,柏市千葉)

K. Matsuo, Y. Maki, H. Namatame, M. Taniguchi, K. Gekko: Conformations of Membrane-Bound Proteins Characterized by Vacuum-Ultraviolet Circular-Dichroism and Linear-Dichroism Spectroscopy. 日本蛋白質学会 (2016 年 6 月,福岡)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

国際ワークショップの主催: Hiroshima International Workshop on Circular Dichroism Spectroscopy 2017 (2017 年 2 月 28 日,広島)

ホームページ:

<http://home.hiroshima-u.ac.jp/koichi/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松尾 光一 (MATSUO, Koichi)
広島大学・放射光科学研究センター・准教授

研究者番号: 40403620

(2) 研究協力者

〔主たる渡航先の主たる海外共同研究者〕

Robert W. Woody
米国コロラド州立大学・生化学・分子生物専攻・名誉教授

〔その他の研究協力者〕

()