

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007～2009

課題番号：19540431

研究課題名 (和文) NMR分光法を用いてランダムコイル状態のタンパク質を残基レベルの分解能での解析

研究課題名 (英文) A NMR Study of Individual Residues of Proteins in a Random Coil State

研究代表者

野田 康夫 (NODA YASUO)

関西学院大学・理工学部・教育技術主事

研究者番号：40268511

研究成果の概要 (和文)：リゾチームには結合が4本存在し、その特定の2本を欠損させた変異体を2SS[6-127, 64-80]変異体と呼ぶ。この変異体は水溶液中では分子全体の秩序構造が失われており、ランダムコイルに近い構造であるが、グリセロールを添加すると立体構造が回復する。そこで、NMR分光法を用いて各残基アミドプロトンの重水素交換反応速度から Protection factor (溶媒プロトンと交換の度合を示す保護因子) を決定し、立体構造の構築原理について研究した。グリセロールを添加していくと、Ile55 と Leu56 を中心とした A-, B-, C-ヘリックスと β 3-ストランドの領域で特に保護が高くなった。これは α -ドメインの疎水コア領域で選択的水和効果によって長距離相互作用が回復したためである。

研究成果の概要 (英文)：2SS[6-127, 64-80] variant of lysozyme which has two disulfide bridges and lacks the other two disulfide bridges was quite unstructured in water, but a part of the polypeptide chain was gradually frozen into a native-like conformation with increasing glycerol concentration. It was monitored from the protection factors of amide hydrogens against H/D exchange by means of NMR spectroscopy. With increasing glycerol concentration, some selected regions were further protected. The highly protected residues were included in A-, B- and C-helices and β 3-strand, and especially centered on Ile 55 and Leu 56. In 2SS[6-127, 64-80], long-range interactions were recovered due to the preferential hydration by glycerol in the hydrophobic box of the α -domain.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：数物系科学

科研費の分科・細目：物理学・生物物理・化学物理

キーワード：生物物理、タンパク質、リゾチーム、核磁気共鳴、ジスルフィド結合、ランダムコイル、重水素交換、ジメチルスルホキシド

1. 研究開始当初の背景

タンパク質は一本のポリペプチド鎖である。しかし自発的に折りたたみ、立体構造を形成する。タンパク質は立体構造を形成してはじめて機能を持つ分子として働く。アミノ酸の配列情報からタンパク質の立体構造を解読することは、構造生物学上、非常に重要である。特に最近では、原子レベルの分解能で構造を研究することが行われている。立体構造形成時にタンパク質が折りたたむ過程を考える場合、その初期構造がどのような構造になっているのかということが問題となる。例えばその構造は一本のポリペプチド鎖が伸びきった構造であるとも考えられるが、必ずしもそのような構造を取っているとは限らない。そこで実際にタンパク質分子のある特定のアミノ酸残基を別のものに置換して系統的に構造安定性を変化させ、その影響を原子レベルの分解能で詳細に測定することが重要である。20種あるアミノ酸の中でも分子内S-S結合を持つシスチンは構造安定性に大きく依存している。リゾチーム分子内には4つのS-S結合が存在しているが、蛋白質工学的手法を用いることによって、その中の特定のS-S結合を欠損させたリゾチーム変異体を作製することができる。このようなタンパク質のSS結合再生中間体は折りたたみ過程の中間体をトラップしたものとして研究されている。

天然リゾチームの4本あるS-S結合のうち、1本のS-S結合が欠損した3SS中間体の立体構造はすでにかかなり天然構造に近いと考えられている。CDスペクトル、熱変性のDSC測定などの実験データが数多く存在するが、立体構造の詳細を知るためにはNMRによる構造情報が不可欠であった。そのために同位元素置換したSS結合欠損変異体を作製し、3次元NMRスペクトルを測定し、主鎖プロトンのみならず側鎖のプロトンも出来る限りピークの帰属を行った。さらに天然4SS型リゾチームも同様の方法によってピークの帰属を行い、3SS体と4SS体のNOESY交差ピークの分布の違いから立体構造変化の詳細を調べた。さらに2本のS-S結合が存在する2SS変異体(2SS[6-127, 30-115])についても同様の解析を行った。その結果、2SS[6-127, 30-115]変異体は β ドメインの構造が大きく壊れているものの、残基55、56の部分でB-ヘリックス上の残基28、31、32、38の側鎖とNOE接触していた。また、C-ヘリックスはN末端 α ドメインと特異的な側鎖間相互作用を通して疎水性コアを形成しているが、このことによって β -ドメインの両端は閉じた構造をとって α -ドメインに連結し、さらに β 1から β 2側鎖間の逆平行 β シートはその端にある残基55、56の部分で α -ドメインに固定されていた。

2. 研究の目的

リゾチーム分子内の4つのS-S結合の影響を1つ1つ系統的に着実に解明することが重要である。化学的手法では分子の内部にある特定のS-S結合の一本だけを切断することは不可能である。そのために蛋白質工学的手法を用いて目的部分のアミノ酸だけを置換したリゾチーム変異体を精製する。残基毎のレベルで情報を得るためにNMR分光法を用いることによって、特定のS-S結合の欠如による原子レベルでの変化を知ることができる。リゾチーム変異体の分子科学的研究を本格的に展開するためには、NMRスペクトルの観測データに基づく、最も詳細な原子レベルの分解能の構造変化を研究することが有効な手段である。ランダムコイル状態のタンパク質としてS-S結合を欠損させた様々なリゾチーム変異体について、NMR分光法を使った重水素交換反応によって研究を行うことが目的である。

3. 研究の方法

天然リゾチームには分子内に4本のS-S結合が存在する。具体的にはCys6-Cys127結合(SS1)、Cys30-Cys115結合(SS2)、Cys64-Cys80結合(SS3)、Cys76-Cys94結合(SS4)である。これら4本のS-S結合が再形成されないようにCys残基を他のアミノ酸残基に置換したリゾチーム変異体を作製する。その菌体を培養し、タンパク質の再生・精製を行って、目的のリゾチーム変異体の研究を行う。

まず最初に、NMRスペクトルに現れるピークの同定を行わなければならないが、ランダムコイル状態のタンパク質のNMRスペクトルは測定ピークの分散が少なく、そのピークを同定することは非常に困難である。そこでM9培地で大腸菌の培養を行い、リゾチーム変異体を精製する。この培地を用いると ^{15}N の同位元素でラベルした試料を得ることができる。この試料を用いて3次元のNMRスペクトルであるHSQC-NOESY-HSQCスペクトルを測定し、ピークの同定を行った。

主鎖アミドプロトンは溶媒の重水素と交換可能である。一般にランダムコイル状態のタンパク質は天然状態のタンパク質とは違って主鎖アミドプロトンの水素結合がほとんどないため、主鎖アミドプロトンは一様に交換すると考えられる。ここでランダムコイル状態にあるタンパク質に従来の重水素交換反応実験の方法を適用すると、NMRスペクトル測定中に溶媒の易動性プロトンと重水素交換反応が起きて、交換反応速度の決定は出来なかった。そこで重水素交換反応後、試料を凍結乾燥して反応を停止させ、測定溶媒として易動性プロトンを持たないジメチルスルホキシドを使うことによって、ランダムコイル状態にあるタンパク質アミドプロトンの重水素交換反応速度を残基毎に求めることが可能になった。

重水素交換反応速度を求めるために、サンプルを重水素溶媒に溶解する。反応時間終了後凍結乾燥を行い、重水素交換を停止させる。その凍結乾燥させた試料を易動性プロトンを持たないジメチルスルホキシドで溶解させ、NMR 測定 (^{15}N - ^1H HSQC スペクトル) を行った。重水素交換の反応時間を長くしていくとアミドプロトンのピーク強度は徐々に減少する。その各アミドプロトンのピーク体積の時間変化を計算し、重水素交換反応速度を求めた。 ^{15}N - ^1H HSQC 測定はプロトン測定より非常に感度が良く、分解能も優れているので、 ^{15}N - ^1H HSQC スペクトルはこのような実験において非常に有効な手段である。

また、上記の速い重水素交換反応を求める実験を応用して、重水素交換時にいろいろな添加剤を加えることが出来る。これらの添加剤は凍結乾燥する直前でカラムにかけることにより、タンパク質試料と分離することが出来る。この実験から添加溶媒による重水素交換反応の違いも求めることが出来た。

4. 研究成果

主鎖アミドプロトンの重水素交換反応を NMR 分光法で観測するためには、測定中でアミドプロトンが交換しないことが必要である。一般に、測定時にはタンパク質は天然状態であるためほとんど溶媒の重水素とは交換しない。しかし、ランダムコイル状態のタンパク質はこれまでの通常の方法では素早く溶媒の重水素と交換してしまう。そこで NMR 測定溶媒として 95% DMSO & 5% D_2O (pH*5.5) を用いた。この NMR 測定溶媒は通常の水溶液溶媒と比較すると 100 倍ほど交換速度が遅くなる。またこの NMR 測定溶媒を用いると、線幅が狭くなり、良く分散されたスペクトルが得られる利点がある。ピークの同定は 3 次元 HSQC-NOESY-HSQC スペクトルを用いて行われた。それら同定されたピークの化学シフト値は BMRB データベースに登録している {accession number: 11051(OSS 変異体) と 11052(2SS[6-127, 64-80] 変異体)}。図 1 に OSS 変異体から 2SS[6-127, 64-80] 変異体の化学シフト値の差を示す。Cys6-127 と Cys64-80 の S-S 結合がある近傍で大きな差となっている。

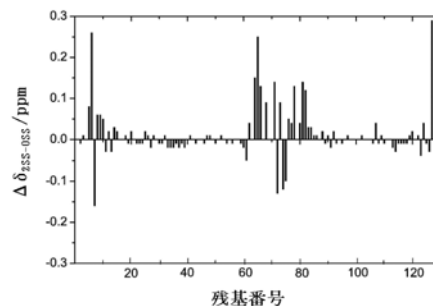


図1 2SS[6-127, 64-80]変異体と OSS変異体の主鎖アミドプロトンの化学シフト差。Cys64-Cys80 の領域が大きく変化している。Cys6-Cys127 の近傍を除いたその他の領域では大きな差になっていない。

OSS 変異体と 2SS[6-127, 64-80] 変異体における重水素交換反応を 4°C、pH*3.0 で行った。さまざまな反応時間後、凍結乾燥により反応を停止した。その後 NMR 測定溶媒に溶解し、2次元 HSQC スペクトルを観測した。図 2 には、いくつかのアミノ酸残基の 2 次元 HSQC スペクトルのピーク体積を重水素反応時間ごとに表示している。

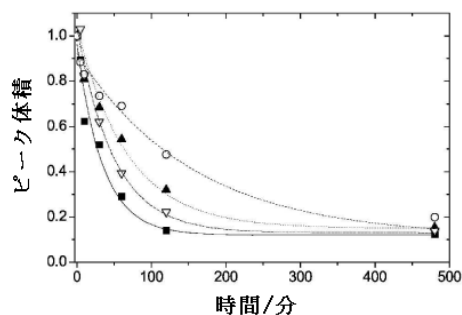


図2 いくつかの残基のアミドプロトンにおける重水素交換反応時間後のピーク体積変化。各アミドプロトンのピーク体積は軽水中のピーク体積を 1 として規格化している。○:W108、▲:I55、▽:V92、■:F34。

10%、20%、30%グリセロール濃度に対して 2SS[6-127, 64-80] 変異体の重水素交換反応を行った。図 3 には I55 における残基アミドプロトンのピーク体積の時間変化をそれぞれのグリセロール濃度で表示している。10%グリセロール濃度では重水素交換反応は水溶液中よりも遅いが、ほとんどのアミノ酸残基で 30 時間後には交換が終わっていた。グリセロール濃度を 10%から 20%に増加させると L8-R14、W28-F34、F38-N39、Q41、Y53-R61、L83-S85、T89、S91-S100、W108、W111、W123-R125 の領域で交換反応が明らかに遅くなっていた。30%グリセロール濃度では交換反応 168 時間後でもまだ 30 個のピークが観測された。

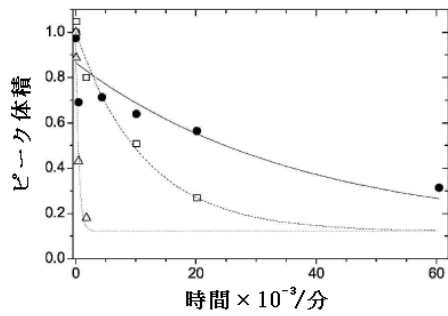


図3 各グリセロール濃度における I55 アミドプロトンの重水素交換反応時間後のピーク体積変化。グリセロール濃度は△:10%、□:20%、●:30%である。ピーク体積は軽水中のピーク体積を 1 として規格化している。

グリセロール各濃度での重水素交換反応に対する Protection factor を図 4 に示す。10%グリセロール濃度の Protection factor は約 5 から 10 に増加した。このことはポリペプチド鎖がグリセロール添加によって 2 次構造へ誘起されるのだが、Protection factor の値が 10 という小さい値であり二次構造領域にヘリックスが誘導されたというよりは、分子全体に弱いヘリックスの形成が促されたと考えられる。グリセロール濃度を増加させていくと Protection factor が増大する領域とそうでない領域に分かれる。大きく増加した領域では 2 次構造がグリセロールによって立体構造を誘起されたことを意味しているかもしれない。30%グリセロール濃度では V9-M12、V29-F34、I55-I58、L83-L84、T89、V92-V99 の領域で Protection factor は高く、1000 ほどであった。

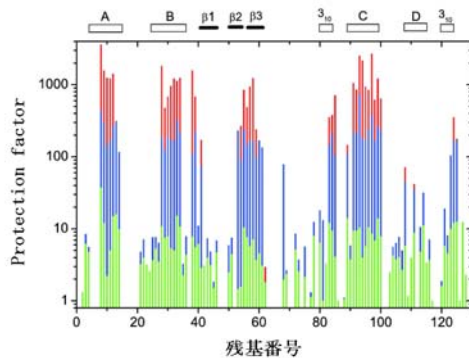


図4 各アミノ酸残基に対する Protection factor。緑:10%、青:20%、赤:30%のグリセロール濃度を示している。表の上部に天然リゾチームの 2 次構造に相当する部分を示している。

野生型リゾチームの天然構造は A9-M12 領域の A-ヘリックス、V29-F34 領域の B-ヘリックス、T89-V99 領域の C-ヘリックスを持っており、I55 と L56 の側鎖がそれらに入り込む形で安定化されている。また、Q57 と I58 は天然構造の 2 つのドメイン間に挟まっている。ここで、Protection factor が 1000 以上のアミノ酸残基はリゾチームの天然立体構造上の I55 と L56 を中心に位置していることがわかる。図 5 にはそれらの残基を野生型リゾチーム立体構造上に示している。この領域は 3 つの α ヘリックスと 3 本の β シートを互いに安定にさせ、リゾチームが折りたたむ際の要の部分であると思われる。また、その領域に近い F38、N39、L83-S85 の Protection factor は 1000 に近い値になっている。一方、D-ヘリックス (残基番号 108-115) や Ct3₁₀-ヘリックス (残基番号 120-124) 領域では Protection factor は 100 程度である。 β 1 と β 2 スtrand (残基番号 41-54) 領域などの 2 次構造部分では Protection factor が 10 程度である。グリセロールは溶液中でタンパク質分子の表面から排除される傾向があり、それに伴い水分子をタンパク質分子に押し付ける作用を持つ。このことを選択的水和と呼ぶ。残基間相互作用の協同性がなくなると、これらの領域の 2 次構造が不安定となり、選択的水和の効果が顕著には現れないと思われる。

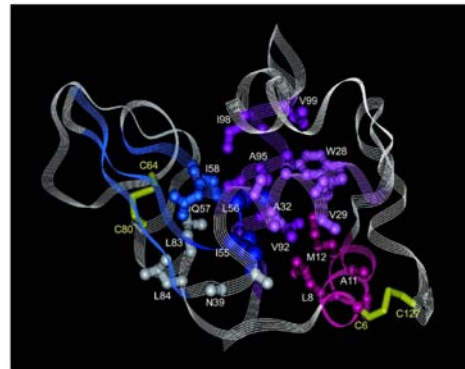


図5 天然リゾチームの立体構造上に、2SS[6-127, 64-80] 変異体においてグリセロールで構造が誘起された領域。大きく交換から保護された、いくつかの残基がリボン図上に示されている。I55 と L56 は青、Q57 と I58 は水色としている。A-ヘリックス (A9-M12) は赤、B-ヘリックス (V29-F34) はピンク、C-ヘリックス (T89-V99) は紫で示している。F38、N39、L83、L84 は白色としている。

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 Sakamoto, K., Hirai, K., Kitamura, Y., Yamazaki, K., Yusa, M., Tokunaga, N., Doi, G., Noda, Y., Tachibana, H., and Segawa, S., “Glycerol-Induced Folding of Unstructured Disulfide-Deficient Lysozyme into a Native-Like Conformation.”, *Biopolymers*, 査読有, 91, (2009), 665-675.
- ② Umezaki, T., Iimura, S., Noda, Y., Segawa, S., and Yutani, K., “The Confirmation of the Denatured Structure of Pyrrolidone Carboxyl Peptidase under Nondenaturing Conditions: Difference in Helix Propensity of Two Synthetic Peptides with Single Amino Acid Substitution”, *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 査読有, 71, (2008), 737-742
- ③ Iimura, S., Umezaki, T., Takeuchi, M., Mizuguchi, M., Yagi, H., Ogasahara, K., Akutsu, H., Noda, Y., Segawa, S., and Yutani, K., “Characterization of the Denatured Structure of Pyrrolidone Carboxyl Peptidase from a Hyperthermophile under Nondenaturing Conditions: Role of the C-Terminal α -Helix of the Protein in Folding and Stability”, *Biochemistry*, 査読有, 46, (2007), 3664-3672

[学会発表] (計14件)

- ① 杉本華幸、野田康夫、瀬川新一
NMR分光法を用いたジスルフィド結合を欠損させたデンブレン結合ドメインのリフォールディング中間体の構造解析
日本農芸化学会 2010年度大会、東京大学駒場キャンパス
2010年3月29日
- ② 横田洋平、キンマンクリストファー、藪本和義、野田康夫、油谷克英、瀬川新一
モルテングロビュール段階で見出されるPCP(ピロリドンカルボキシルペプチダーゼ)の逐次折れたたみ経路とそれに続く天然構造への転移
(Sequential folding pathway of

PCP(Pyrrolidone Carboxyl Peptidase) found in the molten-globule-like stage and the following folding transition)

第47回日本生物物理学会、アスティとくしま、2009年10月30日

- ③ 笠井健一、奈良間邦成、野田康夫、橘秀樹、瀬川新一
リゾチームのS-S結合欠損変異体における残留非ランダム構造
(Residual Nonrandom Structures in Disulfide-Deficient Variants of Lysozyme)
第47回日本生物物理学会、アスティとくしま、2009年10月30日
- ④ 宮本優也、野田康夫、西村重徳、猿渡馨、瀬川新一、乾隆
“NMR analysis of intermediate in thermal unfolding process of mouse lipocalin-type prostaglandin D synthase”
第82回日本生化学会大会、神戸ポートアイランド、2009年10月22日
- ⑤ 杉本華幸、野田康夫、瀬川新一
“NMR analysis of a kinetically trapped refolding intermediate of a disulfide-deficient mutant of the starch-binding domain of glucoamylase”
第82回日本生化学会大会、神戸ポートアイランド、2009年10月22日
- ⑥ Yasuo Noda
“Glycerol-Induced Folding of Unstructured Disulfide-Deficient Lysozyme into a Native-Like Conformation”
Molecular Science of Fluctuations toward Biological Functions and Chemistry of Biological Processes Created by Water and Biomolecules
Okazaki Conference Center, Japan
March 16, 2009
- ⑦ 宮本優也、野田康夫、西村重徳、猿渡馨、瀬川新一、乾隆
1H-NMRを用いたリポカリン型プロスタグランジンD合成酵素の熱変性中間体の解析
(1H-NMR analysis of intermediate in the thermal unfolding process of lipocalin-type prostaglandin D Synthase)
第81回日本生化学会大会、神戸
2008年12月9日

- ⑧ 横田洋平、吉田篤史、野田康夫、油谷克英、瀬川新一
 モルテングロビュール状の変性状態においてピロリドンカルボキシルペプチダーゼ (PCP) の折りたたみ反応は順次進行していく
 (The folding of PCP (Pyrrolidone Carboxyl Peptidase) sequentially proceeds in the denatured state similar to the stage of molten globule)
 第46回日本生物物理学会、福岡国際会議場、2008年12月5日
- ⑨ 吉田篤史、笠井健一、野田康夫、橘秀樹、瀬川新一
 N-アセチルグルコサミン3量体結合によって、リゾチーム変異体2SS(1+3)、2SS(3+4)、2SS(1+2)に誘導される秩序構造
 (Structures induced by tri-NAG binding to 2SS(1+3), 2SS(3+4) and 2SS(1+2) variants of lysozyme)
 第46回日本生物物理学会、福岡国際会議場、2008年12月4日
- ⑩ 村上周作、徳永直紀、野田康夫、橘秀樹、瀬川新一
 リゾチーム1SS変異体の部分秩序構造形成に対するグリセロールの影響
 (Effects of glycerol on the formation of partially ordered structures in 1SS-variants of lysozyme)
 第45回日本生物物理学会、パシフィコ横浜、2007年12月23日
- ⑪ 松尾和宏、野田康夫、橘秀樹、瀬川新一
 リゾチームの1SS-、2SS-変異体のS-S結合再生反応のキネティックス
 (Kinetic studies of disulfide regeneration of 1SS- or 2SS-variants of lysozyme)
 第45回日本生物物理学会、パシフィコ横浜、2007年12月23日
- ⑫ 徳永直紀、吉田篤史、野田康夫、橘秀樹、瀬川新一
 構造を失ったリゾチーム2SS変異体に誘起される秩序構造
 (Ordered conformation induced in unstructured 2SS-variants of lysozyme)
 第45回日本生物物理学会、パシフィコ横浜、2007年12月23日

- ⑬ 梅寄太郎、飯村哲史、野田康夫、油谷克英、瀬川新一
 超好熱菌由来タンパク質PCP-OSHの変性初期過程における構造のゆらぎの解明
 (Structural fluctuation in the folded structure of PCP-OSH at the initial stage of unfolding)
 第45回日本生物物理学会、パシフィコ横浜、2007年12月23日
- ⑭ 飯村哲史、梅寄太郎、坂本恵子、岡崎伸生、竹内誠、水口峰之、小笠原京子、野田康夫、瀬川新一、油谷克英
 超好熱菌由来Pyrrolidone carboxyl peptidaseの野生型と変異体A119Pの立体構造と変性機構の比較
 (Difference of native structure and unfolding mechanism between pyrrolidone carboxyl peptidase from a hyperthermophile and its mutant A119P)
 第7回日本蛋白質科学会、仙台国際センター、2007年5月26日

[図書] (計1件)

- ① 瀬川新一, 他、朝倉書店、タンパク質の事典、2008、828-832 (分担執筆)

[その他]

BMRB データベース (Biological Magnetic Resonance Data Bank: A Repository for Data from NMR Spectroscopy on Proteins, Peptides, Nucleic Acids, and other Biomolecules)

BMRB accession number

- ① 0SS変異体: 11051
 ② 2SS[6-127,64-80]変異体: 11052

6. 研究組織

(1) 研究代表者

野田 康夫 (NODA YASUO)

関西学院大学・理工学部・教育技術主事

研究者番号: 40268511

(2) 研究分担者

瀬川 新一 (SEGAWA SHIN-ICHI)

関西学院大学・理工学部・教授

研究者番号: 70103132