

機関番号：34417

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20540400

研究課題名(和文) 主にベータ構造からなる3種のSH3蛋白質の動的構造と構造変換

研究課題名(英文)

Dynamic study on three SH3 domain proteins, mainly consisted by beta structures

研究代表者

木原 裕 (KIHARA HIROSHI)

関西医科大学・医学部・教授

研究者番号：20049076

研究成果の概要(和文)：

立体構造上は、相同な src, Fyn および PI3K 由来の3種のSH3のフォールディング過程をクライオストップフロー法で追跡した。結果は3種がそれぞれ異なった過程を通ることが明らかとなった。src SH3は、我々の方法では追跡できないほど速く(室温なら 10 μ s以内と思われる)できる初期中間体(バースト過程)とその後秒のオーダーでフォールドする過程からなった。一方、Fyn SH3 の場合には、バースト過程とそれに続く速い過程および src SH3に匹敵する遅い過程からなっていた。PI3K では、バーストの大きさが小さく、遅い過程が観測された。これは、初期中間体から次の中間体への遷移が共にバーストの時間内で起こっているとすると3種が整合的に説明できる。

研究成果の概要(英文)：

Folding process of three homologous SH3 proteins (src, Fyn and PI3K domain proteins) were monitored by cryo-stopped-flow method combined with circular dichroism (CD), fluorescence and X-ray scattering. Results show that the folding pathways are different from each other, though the native tertiary structures are similar with each other. Transiently appeared intermediate of src SH3 are rich in alpha-helix. Its structure was calculated by two programs, GASBOR and SAXS-MD. Both structures are similar at least in terms of gross conformation. The intermediate calculated by SAXS-MD shows atomic coordinates which gives us main chain conformation in the transiently appearing structure.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	100,000	30,000	130,000
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・生物物理学・化学物理学

キーワード：フォールディング, フォールディング初期中間体, クライオストップフロー法, SH3 ドメイン蛋白質

1. 研究開始当初の背景

我々は、既に文献[1, 2]で発表したように、

src SH3 のフォールディング中間体が α ヘリックスの多い構造であることを明らかにしてきた。残る問題は、(i)この中間体が存在

することが一般的に言えることであるか、(ii) 中間体の構造を明らかにできないか、(iii) なぜこのような中間体が存在するのか、などの問いに答えることであった。我々は、そのためにX線溶液散乱法で中間体の構造を求める戦略の開発、進化的に相同な他のSH3ドメイン蛋白質についてさらに知見を深める、ことを目指して本研究を開始した。

研究開始時には、研究分担者として、新庄助教、大学院生として松村義隆、研究員として Xianju Jin, 研究協力者として小島正樹、田代桜子（東京薬科大学）が問題意識を共有していた。また M. Gruebele (UCIC)との共同研究も継続していた。

研究装置としては、円偏光二色性、蛍光ストップフロー装置（研究室に常置）。生化学的試料精製も基本的には研究室で行なった。X線溶液散乱の実験は、高エネルギー研究機構放射光研究施設と Advanced Photon Source (USA) で、それぞれ課題に採択されており、引き続き実験を行うことができる状態であった。

2. 研究の目的

蛋白質は、天然状態（以下N状態という）で取る立体構造、完全にほどけた状態（以下U状態という）の他に、フォールディングの初期にモルテングロビュール状態（以下MG状態）を取る場合があることが知られている。このMG状態は、酸変性時などにも現れることがある。多くの蛋白質はこれとは別に、ある条件下で、アミロイド線維を形成することも知られてきた。

我々はこの数年、src SH3 を用いたフォールディングを行ってきた。SH3 のN状態は、 β 構造だけからなっており、 α ヘリックスを含まない蛋白質の場合にどのようなフォールディング過程を取るのかを明らかにすることが主な興味であった。SH3 はそれまでの研究では、U \rightarrow N への2状態転移を行う蛋白質とされていた。ところが驚いたことに、我々は、SH3蛋白質は、フォールディング初期にアミノ酸全体の21%にもものぼる部分が α ヘリックスを形成することを見出した [1]。

SH3 は、またある条件下で、アミロイド線維を形成することが知られている。特にPI3K SH3 は、酸性のある条件下で、アミロイド線維を形成する。

SH3蛋白質は、その構造の単純さゆえに、分子動力学を用いた蛋白質の構造形成の理論研究にもよく用いられている蛋白質である。それがこのように多形を取り、しかも α ヘリックスから、 β 構造への転移も容易に起こすこと、アミロイド線維とN状態の分岐のメカニ

ズムも調べられる可能性がクローズアップされるに到って、我々はその多形間の構造変化を調べることができる最も有利な位置にいることに思い至った。

したがってこの研究の目的は、3種類のSH3を用いて、SH3構造がどのように多形を取るのか、またそれがどのように制御されているのかを明らかにすることであった。

3. 研究の方法

今まで行ってきたsrc SH3およびその変異体 (A45G)に加えて、Fyn SH3, PI3K SH3を選び、それぞれ精製した。PI3Kの精製にあたっては置塩博士の協力を得た。

測定は、今まで開発してきたクライオストップフロー法（プローブとして、円偏光二色性、ケイ光、X線溶液散乱を用いる）を主として用いた。X線溶液散乱の実験は、主に高エネルギー加速器研究機構で、さらにAPS (Chicago)での実験も行われた。

得られた中間体のX線溶液散乱の結果を基に、小島（および同研究室の森本氏）、新庄は、分子動力学法による構造予測を行った。

4. 研究成果

(1) Src SH3 フォールディング中間体の構造解析

① Src SH3は、フォールディングの初期に、 α ヘリックスを多く含む中間体を取る。図1に塩酸グアニジン濃度ジャンプ法によって得られた測定結果の一例を示す。

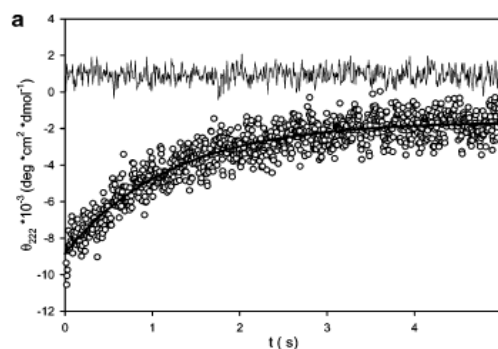


図1. Src SH3 の塩酸グアニジン希釈によるフォールディング。円偏光二色性をプローブとしている。上側の測定値は、変成した蛋白質を変性条件のbufferで希釈したもので、ほぼ変性時の楕円率を表す。4℃, pH3.

この中間体は、pH 2からpH 6、室温から

-28°C (0°C以下では不凍液としてエチレングリコールを含む)の範囲で、例外なく観測された。測定は、円偏光二色性、ケイ光、X線溶液散乱の3種のプローブで観測されたが、中間体の楕円率、慣性半径値は、温度には依存しなかった。pH 3では、pH6の場合より、大きな楕円率を示し、全アミノ酸の21%が α ヘリックスに含まれていると推測された。図2に得られたフォールディングに伴う慣性半径の時間変化を示す。

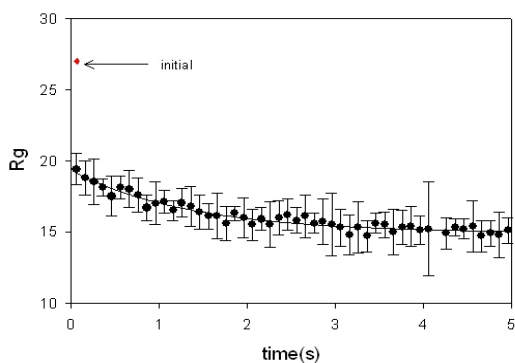


図2. フォールディングに伴う慣性半径の時間変化。4°C, pH3. 左上方の点は、アンフォールドした状態で測定された慣性半径。ストップフロー装置の混合時間内に既に大きな分子収縮が起きていることが分かる。

X線溶液散乱の結果から、中間体はKratky plot がピークを示すことから、既にコンパクトな形をとっていることが分かった。中間体の慣性半径は18.5 Åであった。これは変性してアンフォールドしているときの27Åよりずっと小さいが、ネイティブな構造のときの14.6Åよりはわずかに大きく、Kratky plot の形も併せて考えると、モルテングロビュール状態を形成していると思われる。X線溶液散乱法で求めた散乱プロファイルに基づいて、構造を推測してみた。まずSvergunによって開発されたGASBOR [3]を用いて計算した。結果は図3に示すように、中心から二つに折れたブーメラン型の構造をしていることが予測された。次に我々が小島教授らと開発してきたSAXS-MDのプログラム[4]で中間体の構造予測を行なった。このプログラムの最大の利点は、蛋白質がそのアミノ酸のつながりを保って表すことができることである。結果は図3に重ねて表示している。GASBORとSAXS-MDで計算された結果は全体として良く一致している。このことは、SAXS-MDで得られた結果が妥当であることを示している。ただこのモデルと実験で得られた α ヘリックスの含量とは一致しなく、これは今後の課題であ

る。

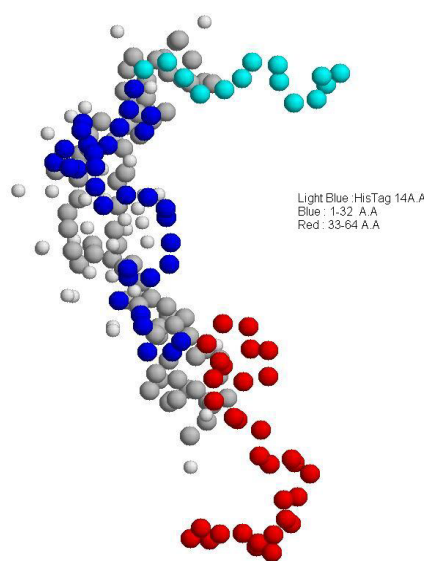


図3. Src SH3のフォールディング中間体の構造予測。灰色の球は、GASBOR [2]で計算した結果を、赤と青で示したのは、SAXS-MD[4]で計算した結果を表す。灰色の小さい球は、束縛水を示す。図でライトブルーの部分は、HisTag、青は1から32番目の残基、赤は33番から64番目までの残基を表す。

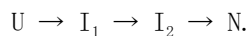
② Src SH3の45番目のアミノ酸をAlaからGlyに変換した変異体A45Gは、pH3以下で安定な平衡中間体を形成する[2]。この平衡中間体は、楕円率、慣性半径で見ると、フォールディング中間体と区別できず、 α ヘリックスを多く含むことが明らかになった。したがって、(i)で求めたように、ほとんど β 構造からなる蛋白質でも、フォールディング中間体として α の多い構造を取るだけでなく、 α - β の変換は比較的容易に起こる可能性を示唆していると思われる。

(2) 相同な3種のSH3ドメインのフォールディング経路の比較

立体構造上は、相同なsrc, FynおよびPI3K由来の3種のSH3のフォールディング過程をクライオストップフロー法で追跡した。結果は3種がそれぞれ異なった過程を通ることが明らかとなった。src SH3は、我々の方法では追跡できないほど速く(室温なら10 μ s以内と思われる)できる初期中間体(バースト過程)とその後秒のオーダーでフォールドする過程からなった。

一方、Fyn SH3の場合には、バースト過程とそれに続く速い課程およびsrc SH3に匹

敵する遅い過程からなっていた。PI3K では、バーストの大きさが小さく、遅い過程が観測された。これは、初期中間体から次の中間体への遷移が共にバーストの時間内で起こっているとすると3種が整合的に説明できる。



すなわち、Fyn SH3 は I_1 , I_2 を経てフォールドする、src SH3は、 I_1 から I_2 への変換が遅く、 I_2 は事実上観測されない。PI3K SH3は、 I_1 の形成が観測できないほど速く、 I_2 のみが観測されると考えられる。

以上の結果は、相同で立体構造上は違いがほとんど見られない系でも、フォールディングは多形で行われることを示す好例であった。これは蛋白質の成立過程を考えたときにきわめて興味深い結果を示唆している。同じ原始蛋白質から進化してきた3種の蛋白質が、1次構造の相同性を保ったままで、立体構造のトポロジーを不変に保ちながら、なおかつそのフォールディング過程は多様な選択をしているということになる。今後他の蛋白質でも似たような現象がないかどうか研究してみる必要がある。

(3) フォールディング中間体と α ヘリックス構造予測

SH3 ドメインに関する限り、2次構造予測のどのプログラムも中間体で、大きな α ヘリックスの割合を示唆するものはなかった。しかし、隣のアミノ酸との相関だけを考慮した Rohl らのプログラム(Helix2) [5]を用いて、各蛋白質の α ヘリックス含量を計算したところ、極めて興味深い結果が得られた(図4)。

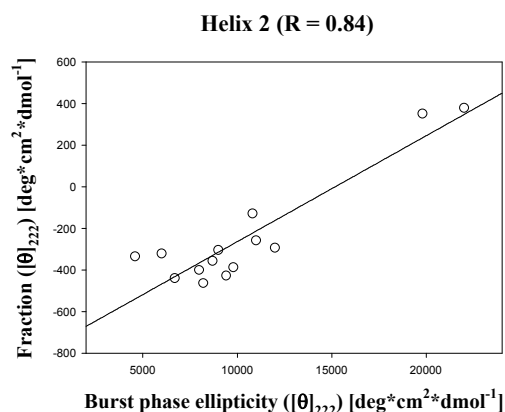


図4. フォールディング中間体のヘリックス含量とHelix2を用いた α ヘリックス含量の相関 [1].

すなわち、フォールディング初期に現れる中間体は、ヘリックス転移理論から予想されるヘリックスのできる割合と高い相関を示すということである。これは、サブマイクロ秒の時間領域でできては壊れるヘリックスがトラップされたときに、フォールディングの初期中間体として準安定化されるという仮説を表している。いわば、準安定なヘリックスの拡散衝突がフォールディングの原因であるという説である。この仮説のさらなる発展を期待したい。

Reference

- 1) Li *et al.* (2007) *Biochemistry* 46, 5027-5082
- 2) Li *et al.* (2007) *J. Mol. Biol.* 372, 747-755
- 3 Svergun *et al.* (2001) *Biophys. J.*, 80, 2946-2953
- 4 Kojima *et al.* (2004) *J. Appl. Cryst.* 37, 103-109
- 5) Rohl *et al.* (1996) *Protein Sci.* 5, 2623-2637

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 17 件)

①加納文昌, 新庄正路, Zhi-jie Qin, Jinsong Li, 松村義隆, 清水昭夫, 寺本明夫, 木原裕, Denaturant-induced helix-coil transition of oligopeptides: theoretical and equilibrium studies of short oligopeptides C17 and AK16, *Polymer J.*, 査読有, 43, 2011, 293-300.

②松村義隆, 新庄正路, Anjali Mahajan, Ming-Daw Tsai, 木原裕, alpha-helical burst on the folding pathway of FHA domains from Rad53 and Ki67. *Biochimie*, 査読有, 92(8), 2010, 1031-1039.

③ Tsukamoto S, Yamashita T, Yamada Y, Fujiwara K, Maki K, Kuwajima K, Matsumura Y, Kihara H, Tsuge H, Ikeguchi M, Non-native α -helix formation is not necessary for folding of lipocalin: comparison of burst-phase folding intermediates between tear lipocalin and β -lactoglobulin, *Proteins*, 査読有, 76(1) 2009, 226-236.

④ Kim SJ, Matsumura Y, Dumont C, Kihara H., Gruebele M., Slowing down downhill folding: a three-probe study, *Biophysical Journal*, 査読有, 97(1), 2009, 295-302.

⑤ 小島正樹, 野中孝昌, 森本康幹, 中川隆司, 柳茂, 木原裕, NMR と X 線溶液散乱データから得られる構造情報の加算性, 冗長性, 相補性 (MS51), *日本結晶学会紙*, 査読無し, 51(1), 2009, 92-93.

⑥ Kogo H, Takeuchi K, Inoue H, Kihara H, Kojima M, Takahashi K, Urea-dependent unfolding of HIV-1 protease studied by circular dichroism and small-angle X-ray scattering, *Biochimica et Biophysica Acta- Proteins and Proteomics*, 査読有, 1794, 2009, 70-74.

⑦ Kojima M, Kezuka Y, Nonaka T, Hiragi Y, Watanabe T, Kimura K, Takahashi K, Yanagi S, Kihara H, Saxes MD View: A three-dimensional graphics program for displaying force vectors. *Journal of synchrotron radiation*, 査読有, 15(5), 2008, 535-537.

⑧ Prokhorov DA, Timchenko AA, Uversky VN, Khristoforov VS, Kihara H, Kimura K, Kutysenko VP, Dynamics of oligomer formation by denatured carbonic anhydrase II, *Biochimica et Biophysica Acta*, 査読有, 1784(5), 2008, 834-842.

⑨ Tashiro M, Kojima M, Kihara H, Kasai K, Kamiyoshihara T, Ueda K, Shimotakahara S, Characterization of fibrillation process of alpha-synuclein at the initial stage, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 査読有, 369(3) 2008, 910-914.

⑩ Matsumura Y, Li J, Ikeguchi M, Kihara H, Helix-rich transient and equilibrium

intermediates of equine beta-lactoglobulin in alkaline buffer, *Biophysical chemistry*, 査読有, 134(1-2), 2008, 84-92.

[学会発表] (計 24 件)

① H. Kihara, M. Shinjo, F. Kano, ZJ. Qin, Denaturant-induced helix-coil transition. Statistical and kinetic study, *Pacificchem2010*, 2010年12月19日, ハワイコンベンションセンター (ハワイ) .

② H. Kihara, Alpha-helical-rich intermediates on the early stage of protein folding, *Pacificchem2010*, 2010年12月19日, Hotel Sheraton Waikiki (ハワイ) .

③ M. Shinjo, JS. Li, Y. Matsumura, XJ. Jin, H. Kihara, Structural analysis on folding intermediate of srcSH3, The 4th International Symposium on Molecular Science of Fluctuations toward Biological Functions, 2010年11月30日, ピアザ淡海 (大津市).

④ Y. Matsumura, M. Shinjo, A. Mahajan, MD. Tsai and H. Kihara, Alpha-helical burst on the folding pathway of FHA domains from Rad53 and Ki67, 第48回日本生物物理学会年会, 2010年9月20日, 東北大学(仙台市).

⑤ ZJ. Qin, Y. Matsumura, M. Shinjo, H. Kihara, Structure of α -helix-rich intermediates of BLG on its folding pathway, 第48回日本生物物理学会年会, 2010年9月21日, 東北大学(仙台市).

⑥ 松村義隆, 置塩信行, 新庄正路, 木原裕, PI3K SH3 domain における酸性平衡中間体と遷移中間体の比較, 第10回蛋白質科学学会年会, 2010年6月17日, 札幌コンベ

ンションセンター (札幌市) .

⑦ 砂戸歩美, 塚本精一, 松村義隆, 木原裕, 藤原和夫, 池口雅道, 12 量体および 24 量体フェリチンファミリータンパク質の溶液構造, 第 10 回蛋白質科学会年会, 2010 年 6 月 16 日, 札幌コンベンションセンター (札幌市) .

⑧ H. Kihara, Alpha-helix-rich intermediate on the protein folding pathway studied by cryo-stopped flow method, Leopoldina-Symposium, "The complexity connecting biomolecular structure and solvation dynamics", 2010 年 5 月 25 日, Rehr University Bochum, Germany.

⑨ Y. Matsumura, M. Shinjo, A. Mahajan, MD. Tsai, H. Kihara, An observed α -helical burst of FHA1 domain of Rad53 in the folding pathway, 第 47 回日本生物物理学会年会, 2009 年 10 月 30 日, アステイ徳島 (徳島市) .

⑩ Y. Matsumura, M. Shinjo, N. Okishio, H. Kihara, Structural change of PI3K SH3 domain at acidic pH, 第 47 回日本生物物理学会年会, 2009 年 10 月 30 日, アステイ徳島 (徳島市) .

⑪ M. Shinjo, Y. Matsumura, XJ. Jin, H. Kihara, α -helix-rich-states of β -lactoglobulin and src SH3, formed in high concentration of ethylene glycol and trifluoroethanol, are not either fully unfolded or compact, 第 47 回日本生物物理学会年会, 2009 年 10 月 30 日, アステイ徳島 (徳島市) .

⑫ H. Kihara, Y. Matsumura, M. Shinjo, JS. Li and XJ. Jin, Early Events of Protein Folding studied by cryo-stopped-flow method, International Symposium on

Reaction Dynamics of Many-Body Chemical Systems, 2009 年 6 月 23 日, 京都ガーデンパレス(京都市).

[その他]
ホームページ等
<http://www3.kmu.ac.jp/butsuri/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木原 裕 (KIHARA HIROSHI)
関西医科大学・医学部・教授
研究者番号 : 20049076

(2) 研究分担者

新庄 正路 (SHINJO MASAJI)
関西医科大学・医学部・助教
研究者番号 : 90388447