

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月 21日現在

機関番号：34315

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22770114

研究課題名（和文） 高圧力 NMR 法によるポリユビキチンの高次構造変化の解明

研究課題名（英文）

High pressure NMR study for conformational fluctuation of polyubiquitin

研究代表者

北原 亮（KITAHARA RYO）

立命館大学・薬学部・准教授

研究者番号：70512284

研究成果の概要（和文）：

蛋白質ユビキチンは、標的蛋白質に1つ結合した状態やポリマー構造（ポリユビキチン）を形成した状態で機能する。またユビキチンは、多様なポリマー構造を形成することにより、多様な分子認識や多様な機能を有する。ポリユビキチンの分子認識の多様性が生じるメカニズムを解明するために、高圧力 NMR 法を用いてユビキチン単体と2つが共有結合したジユビキチンを用いての構造揺らぎの比較研究を行った。

研究成果の概要（英文）：

We investigated conformational fluctuation of Lys48-linked linear diubiquitin, as a minimum model of polyubiquitin chains, by using high-pressure NMR spectroscopy. Comparing pressure induced changes in chemical shifts between mono-ubiquitin and diubiquitin, we found that pressure stabilizes the “open” orientation of the two subunits for diubiquitin and the subunits have similar intrinsic motion to those of mono-ubiquitin. It is suggested that the intrinsic fluctuation of the subunits plays an essential role in the adaptation of global conformation of diubiquitin to the environment.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：構造生物学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物化学

キーワード：蛋白質、圧力、NMR

## 1. 研究開始当初の背景

ポリユビキチン鎖の研究については、既に Lys48 結合型の2量体、4量体ユビキチンの結晶構造解析、また様々な標的分子との複合体構造が解明されている。溶液条件では、Lys48, 63 結合型について NMR による解析がされている。特に、白川ら（京都大学）と Fushman ら（メリーランド大, USA）は、NMR による化学シフト解析や残余双極子カップリング(RDC)解析などから、2-4量体につい

て、4次構造やその構造変化について先駆的な研究を展開した。Fushman は、RDC 解析に基づき、Lys48 結合型2量体、4量体ユビキチンについて、サブユニットの配向が異なる2つの状態（open 状態と close 状態）の化学平衡モデル（4次構造の多型性）を提案した。4次構造変化は、ポリユビキチンの分子認識の選択性を生み出す観点から注目される結果である。しかしながら、各サブユニットの3次構造揺らぎと、ポリユビキチンの構

造揺らぎの関連性は未解決の問題である。

## 2. 研究の目的

細胞内の多くの蛋白質は重合体を形成し機能する。蛋白質複合体や重合体の4次構造変化は、分子認識や反応制御機構の観点から研究意義があり、各サブユニットの3次構造変化の詳細な理解が必要となる。本課題では、高圧力 NMR 法という3次構造変化の研究に優れた方法と分子選択標識技術を用いて、重合体内に存在するサブユニットの立体構造変化(コンフォメーション平衡)の全容解明と、4次構造変化の制御機構の解明を目指した。対象は Lys48, Lys63 結合型ポリユビキチン(2-4 量体)である。

## 3. 研究の方法

高圧力 NMR 法は、代表者が行っている独創的手法で、変性中間体など、通常その分布率が低く観測困難な状態を圧力で安定に捕捉する有効な方法である。500MHz, 600MHz に設置された高圧力 NMR 装置を用いて測定を行った。代表者の研究により、単量体ユビキチンの3次構造変化は詳細に解明されており、比較解析によりジユビキチン内の各サブユニット特有の3次構造変化や4次構造変化(サブユニット間の配向変化)の発見が期待できる。ジユビキチンは2つのサブユニットが開いた OPEN 型配向と閉じた CLOSED 型配向が知られている(下図)。ジユビキチンの特定サブユニットを同位体標識する技術によりジユビキチンの2つのサブユニットについて個々に評価することができる。

## 4. 研究成果

Lys48 結合の直鎖型 (proximal と distal

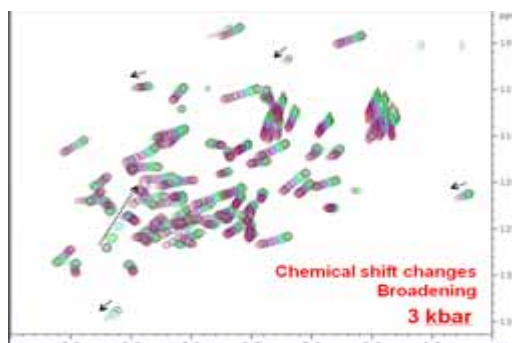


サブユニット)と環状型ジユビキチンを作成しの高圧力 NMR 測定と解析(1H/15N 化学シフト、15N スピン-スピン緩和速度定数 R2、Cleanex-PM における見かけの交換速度定数)を行った。

(1) 1H/15N の二重共鳴実験に基づいてジユビキチン(直鎖型、環状型)の信号帰属を行い、化学シフト値について比較解析を行った。加圧によりジユビキチンの 1H, 15N の化学シフト値は単体のそれと近接する結果となった(下図)。これは他方のサブユニットの効果が加圧により減弱されることを意味する。つまりジユビキチンの各サブユニット間に存在する OPEN-CLOSED 平衡はより水和

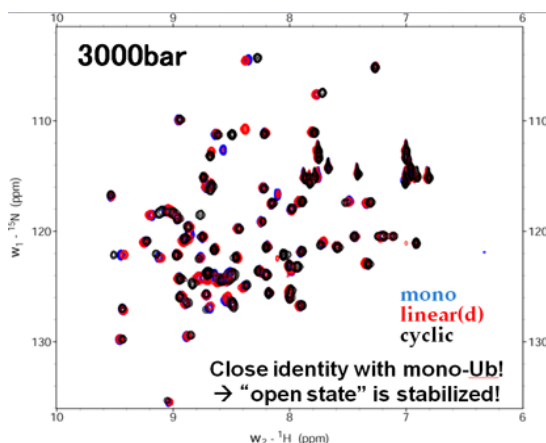
し単体の環境に類似した OPEN 方向に平衡が移動することを示唆する。

(2) R2 値の比較解析を行った。加圧により単体と同じ領域に R2 値の増加がみられた。



R2 値の増加はマイクロ秒~ミリ秒領域で生じる構造揺らぎを意味する。単体ユビキチンでは、N1-N2 構造間の構造揺らぎが1-10マイクロ秒で生じており、R2 値に反映されることがこれまでの解析からわかっている。ジユビキチンの proximal, distal の両サブユニットの同じ領域で同様の R2 値の増加が生じたことは、両サブユニット内にも N1 - N2 構造揺らぎが生じていることを示唆する。さらに、2つのサブユニットの界面部位でも R2 値の増加が生じていることが分かった。また 3000 気圧において 1H/15N の化学シフト値の多くは単体のそれと一致することが分かった(下図)。これらの結果から、加圧により両サブユニットの界面が水和し OPEN 型配向が安定化されたことを意味する。

同様な結果は、CLOSED 型のモデルである環状型においても見られた。環状型においても



各サブユニットは N1 N2 に転移し、さらに2つのサブユニット界面も十分に水和した OPEN 型様になっていることが示唆された(SEMI-OPEN 状態と名付けた)。つまり環状型ジユビキチンは CLOSED 型配向モデルであるが、高エネルギー状態として水和した OPEN 様配向との化学平衡にあり(自由エネルギー

は解析中)、OPEN 様配向は部分モル体積が小さい。各サブユニットが N2 構造をとることにより、OPEN 様配向が安定化されると推測した(下図)。

さらに常圧における直鎖型、環状型ジユビキチンに対し、Cleanex-PM-NMR 測定を行った。この測定から、溶媒水と相互作用しているア



ミド NH グループの同定ができた。

(3) N2 構造が安定化された変異体(Q41N など)を作成することに成功したため、R2 緩和分散 NMR 測定や高圧力 NMR 測定を行い N2 構造のダイナミクス解析を先行した。その他、<sup>15</sup>N スピン緩和測定や Cleanex-PM-NMR 測定、立体構造解析など N2 状態の構造とダイナミクス、安定性の解析を遂行した。今後、引き続き Q41N 変異体を用いたジユビキチンを解析し、N1-N2 構造の化学平衡と OPEN-CLOSED のサブドメイン配向の平衡の関係を明確にしていきたい。

(まとめ) 複合体やポリマーの運動性は分子認識メカニズムを解明する 1 つの手掛かりとなる。既に解明したユビキチン単体の構造揺らぎとの比較解析から、ジユビキチン分子の OPEN-CLOSED 平衡とサブユニット内の構造揺らぎを分離して考察することができた。またサブユニット内と分子全体のグローバルな変化が同期している場合も見られた点は興味深い。圧力という極限環境に対して、分子は部分モル体積を小さくするために構造やサブユニット間の化学平衡が変化しなければならない。分子はサブユニットが固有に持つ構造揺らぎを利用してグローバルな揺らぎを調節するという新しいメカニズムが明らかになったと考えている。

本課題の目的にも述べたように、蛋白質複合体や重合体(ポリマー)は細胞内の様々な機能発現に関わっているものの、その機能調節機構についての分子基盤は十分に理解されているとはいえない。本課題では、特に NMR を用いて得られる原子分解能の情報収集に重きを置いたが、高圧力下での小角散乱法を用いることにより、より大きな系を対象とし、その分子形状の変化が研究できる。世界的にも高圧力下での小角散乱測定が可能な研究施設はドイツや日本の SPring8 など限られているが、共同研究などを通じて本課題をより発展させていく予定である。

## 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2件)

Kitahara R., Simorellis A. K., Hata K., Maeno A., Yokoyama, S., Koide S. and Akasaka K., A delicate interplay of structure, dynamics and thermodynamics for function. A high pressure NMR and fluorescence study of Outer surface protein A., *Biophysical Journal*, 有, 102, 2012, 916-926

Ryo Kitahara, Kazumi Hata, Akihiro Maeno and Kazuyuki Akasaka, Michael Chimenti, Bertrand Garcia-Moreno, E. Martin A. Schroer, Christoph Jeworrek, Metin Tolan, Roland Winter, Julien Roche, Christian Roumestand, Karine Montet de Guillen and Catherine A. Royer, Structural plasticity of staphylococcal nuclease probed by perturbation with pressure and pH, *Proteins*, 有, 79, 2011, 1293-1305

[学会発表](計43件)

北原亮、準安定構造に着目した構造 - 機能相関: ユビキチン、ジユビキチン、第3回バイオ単分子研究会(招待講演) 2012年3月9日、新世代研究所 会議室(東京都)

Kitahara R., Kitazawa S., Yagi-Utsumi M., Ido A., Urushitani M., Sugase K., Kato K., ESIGN STRATEGY FOR HIGH FREE-ENERGY STATES OF PROTEINS BASED ON HIGH-PRESSURE NMR STUDY: ALTERNATIVELY FOLDED CONFORMATION OF UBIQUITIN, *Biophysical Society 56th Annual Meeting*, 2012年2月26日, サンディエゴ USA

北原亮、高圧力 NMR による構造生物学の新展開、NEDO 特別講演会(招待講演) 2011年10月13日、東京大学 薬学部講堂(東京都)

北原亮、蛋白質の準安定状態に着目した新しい構造生物学の展開、蛋白質研究所セミナー(招待講演) 2011年7月29日、大阪大学 蛋白質研究所(大阪府)

北原亮、タンパク質の高エネルギー構造に注目した新しい構造生物学の展開、第2回若手育成講習会(招待講演) 2011年4月26日、大阪大学蛋白質研究所(大阪府)

[図書](計1件)

朝倉哲郎編著、コロナ社、広がる NMR の世界、2011、70-73(研究代表者担当分)

〔その他〕  
ホームページ等  
[http://www.ritsumeai.ac.jp/pharmacy/kita-hara/kitahara\\_lab.html](http://www.ritsumeai.ac.jp/pharmacy/kita-hara/kitahara_lab.html)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

北原亮 (KITAHARA RYO)

立命館大学・薬学部・准教授

研究者番号：70512284