

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23570193

研究課題名(和文)天然変性蛋白質の多分子認識機構の熱力学

研究課題名(英文)Thermodynamics of Multiple Molecular Recognition by Intrinsically Disordered Protein

研究代表者

浜田 大三(Daizo, Hamada)

神戸大学・医学(系)研究科(研究院)・非常勤講師

研究者番号：60372132

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円、(間接経費) 1,290,000円

研究成果の概要(和文)： 生合成される蛋白質は、そのアミノ酸配列に特有の立体構造を形成し機能を獲得する。一方、ゲノム上には、それ単独では、特異的な立体構造を形成しない「天然変性蛋白質」が多く存在する。天然変性蛋白質は、特定のリガンドと結合し、特異的な構造を形成することで機能を獲得する。

本研究では、腸管出血性大腸菌O157の天然変性型病原因子であるEspBによるリガンド結合の物理化学的メカニズムを調べた。その結果、EspBによるカテニンの分子認識反応が、EspBの41～70番目のアミノ酸領域で作られる不安定なヘリックス構造を介して進行する「構造選択的結合機構」により説明されることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)： Proteins produced in biological systems assume well-defined structures to obtain their unique functions. However, there are many intrinsically disordered proteins (IDPs) which are unable to form specific structures by themselves in genomic sequences. IDPs form well-ordered structures upon binding to their specific ligands.

Here, we analysed physicochemical mechanism of ligand binding by EspB, an IDP pathogen from enterohemorrhagic E. coli. We found that EspB binds to alpha-catenin through the unstable alpha-helical regions formed around G41-E70 in a manner of "Conformational Selection".

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・生物物理学

キーワード：天然変性蛋白質 分子認識 フォールディング 構造転移 腸管出血性大腸菌 円二色性 蛍光偏光解消 X線小角散乱

1. 研究開始当初の背景

通常「蛋白質は、そのアミノ酸配列に特有の立体構造を形成することで機能を獲得する」と考えられており、一般的な生物学の教科書には、そのように記載している。

しかしながら、ここ数十年における網羅的ゲノム解析の結果から、生体内には、特定の機能を持つにも関わらず、それ自身では特有の立体構造を形成することができない「天然変性蛋白質」が多く存在し、数々の生命現象において重要な役割を果たすことが示されてきた。このことは「既に形成されている立体構造の表面形状が合致するリガンドのみが特異的に認識される」という蛋白質の機能発現・分子認識のメカニズムに関して、大幅な修正が必要であることを示している。

いくつかの研究において、天然変性蛋白質のいくつかは、そのリガンドに結合することにより、特徴的な立体構造を構築し、リガンドの機能制御を行うことが、既に示されていた。このような分子認識に伴う構造形成は、一般的な球状蛋白質のフォールディング現象に類似しているが、比較的大きな並進エントロピーの減少を必要とする分子間相互作用を含む点で、通常のフォールディングとは、大きく異なり、その物理化学的詳細を知ることが、多くの生命現象を理解する上で重要であると考えられていた。また、以前の研究から、EspBは、 $\alpha$ カテニンのC末端ドメイン( $\alpha$ C)を介して相互作用することが示されていた。

一方、研究代表者らは、腸管出血性大腸菌(EHEC)の産する様々な病原因子の立体構造と機能に関する研究を進め、これら病原因子の多くが天然変性蛋白質であることを示してきた。この中でも特にEspBに関する研究から、同病原因子が、 $\alpha$ カテニン、ミオシン、ビンキュリン、ZO-1などの宿主細胞の細胞骨格形成に関与する、様々な立体構造の異なる制御因子と相互作用し、アクチン線維形態の変化を促進する機能を有することを明らかにしていた。

2. 研究の目的

本研究の目的は「天然変性蛋白質の作用機構を生物物理学的観点により明らかにし、その生体内における役割・機能に関する分子機構を原子レベルで解明する」ために、「EspBの多岐にわたるリガンドの認識反応をフォールディングとしてとらえ、その熱力学的機構を理解すること」である。

さらに、この研究を進めることで、EHECによる感染メカニズムにおけるEspBの役割について、より深く理解できると考えられた。

3. 研究の方法

(1) EspBのリガンド認識部位の同定

EspBのリガンドである、 $\alpha$ カテニンやビンキュリンとの相互作用に関与するEspBの配列領域を同定するために、同蛋白質の部分

配列を有するペプチド(図1)を調製し、これらとリガンド(主に $\alpha$ C)との相互作用について、蛍光偏光解消法による滴定実験により調べた。なお、EspBは $\alpha$ Cに対してN末端から100残基以内のいずれかの領域を介して、結合することが示されていたので、この領域をカバーする20~30残基からなる、ペプチドを主に作成した。また、蛍光偏光解消の変化を高感度で観測するために、これらのペプチドのN末端にFITC蛍光ラベルを導入した。

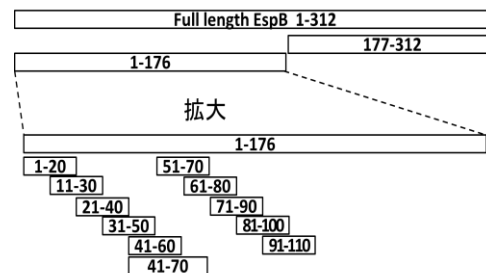


図1. 合成したペプチドの配列領域

(2) 遊離状態でのEspBの立体構造解析

X線小角散乱と円偏光二色性スペクトルを用いて、EspBの遊離状態における立体構造を解析した。また上記の部分ペプチドの立体構造についても円偏光二色性スペクトルにより二次構造の解析を行い、残余構造のある領域を同定した。これらのデータを合せ、EspB全長、及び $\alpha$ C結合に関与するアミノ酸配列とその周辺の構造を予測した。

4. 研究成果

(1)  $\alpha$ カテニンとの結合に関与するEspBの最小アミノ酸配列の同定

EspBの $\alpha$ Cへの結合に最小限必要なアミノ酸領域の同定を行うために、そのN末端にFITC蛍光ラベル化したEspB蛍光ラベル化フラグメント(図1)を合成し、 $\alpha$ カテニンのEspBとの結合に関わるC末端ドメイン( $\alpha$ C)との相互作用について調べた。

その結果、EspBの図1に示した41-60と51-70の二つのフラグメントで、解離定数( $K_d$ )23と12 $\mu$ Mの相互作用が確認された。

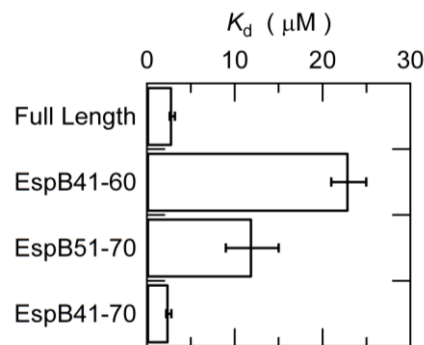


図2. EspBペプチドと $\alpha$ Cの解離定数( $K_d$ )

これらの値は、EspB全長と $\alpha$ Cとの相互

作用における  $K_d$  値 ( $2.9 \mu\text{M}$ ) よりも高い値であった。さらに、41-70 番目の配列に相当するペプチドに対する  $\alpha$  カテニンとの  $K_d$  を求めたところ、EspB 全長の示した値に近い  $2.5 \mu\text{M}$  であることが分かった。この結果より、EspB の G41~E70 に対応する 30 残基が EspB の  $\alpha$  カテニンに対する結合を再現する最小単位であることが示された。

## (2) EspB 全体構造と二次構造形成領域の解析

以前の研究で EspB は、部分的に  $\alpha$  ヘリックス構造を有する、部分変性型天然変性蛋白質であることが分かっていた。そこで、EspB のどの領域に、 $\alpha$  ヘリックス構造が存在するのかを明らかにするために、図 1 に示されたペプチドと EspB の全長の二次構造について、円偏光二色性スペクトルについて調べた。この結果、上記の  $\alpha$  C との相互作用に必須の 41~70 番目の配列周辺で  $\alpha$  ヘリックス構造が出来ていることが明らかになった。一方、C 末端の半分はランダムコイル状態に似た構造をしていることが明らかになった。

さらに、EspB 全長の形状について、X 線小角散乱法を用いて解析したところ、EspB が部分的に  $\alpha$  ヘリックス構造を保持しているにも関わらず、ランダムコイル状態に匹敵する広がった構造を形成していることが明らかになった (表 1)。

表 1. EspB 及び EspB と同様なアミノ酸数 (312 残基) を持つ蛋白質の形状パラメータ

	$R_g$ (Å)	$D_{\max}$
EspB	67.8	250
ランダムコイル	$62.0^1$	-
Phosphotriesterase <sup>2</sup>	$19.5^2$	$60^2$

<sup>1</sup> $R_g = 1.927 \times N^{0.598}$  ( $N=332$ ) より算出したランダムコイル状態の  $R_g$  の理論値

<sup>2</sup> Phosphotriesterase の PDB 構造座標 (1EYW) より Crysol にて計算した値。EspB と同程度の分子量を持つ球状蛋白質の天然構造における形状を示すために記載

## (3) 部分的に形成された $\alpha$ ヘリックス構造の熱力学的特性

EspB において部分形成されている  $\alpha$  ヘリックス構造の物理化学的特徴 (通常の球状蛋白質の天然構造に類似するか、部分変性構造に類似するか) について明らかにするために、EspB 全長及び G41~E70 に相当するフラグメントの  $\alpha$  ヘリックス構造の熱安定性について、円偏光二色性スペクトルを用いて調べた。EspB 全長、及び、フラグメントの両方で、塩酸グアニジン存在下において、同様な低温変性現象が確認された。この現象から、変性に伴う比熱の変化 ( $\Delta C_p$ ) を解析したところ、全長で、 $0.34 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ 、フラグメントで  $0.87 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$  であることが分かった。これらの結果より、G41~E70 で形成される  $\alpha$  ヘリックス構造は、EspB 全長の中で

主要な二次構造成分を占めており、その構造安定化に少ないながらも疎水性相互作用の寄与が関与することが示された。一方、前述の EspB の構造的特徴を考慮すると、41-70 の領域は、通常の球状蛋白質の天然構造とは異なり、側鎖間の相互作用がほとんど存在しない一本の伸びた  $\alpha$  ヘリックス構造を形成しており、さらに 41-70 以外の領域にも不安定な  $\alpha$  ヘリックス構造が出来ていることが示唆された。

## (4) EspB の分子認識と遊離状態での構造特性の相関

上記(1)~(3)の研究から、EspB は長く伸びた一本の不安定なヘリックス構造を N 末端に持ち、残りの部分はランダムコイル状態のように振る舞う、天然部分変性蛋白質の一種である、その機能発現において、41-70 番目のアミノ酸で形成される  $\alpha$  ヘリックス構造が重要な役割を果たすことが示された。これは、一般的な球状蛋白質に見られる、立体構造と機能の関係に似たメカニズムではあるが、分子認識前の状態における立体構造が揺らぎの大きな部分変性状態であるという点で大きく異なる。このような現象は、これまでの構造生物学の常識では、想定されていなかったものであり、新たな分子認識機構として、重要な発見であると考えられる。

さらに、研究代表者らは、腸管出血性大腸菌をはじめとする III 型分泌系を有する感染性細菌において、EspB に類似する天然変性型病原因子が多数見つかることを示しており、これらの研究成果は、感染症医学的観点からも重要な知見であると考えられる。

## 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 5 件)

- ① Hamaguchi M, Kamikubo H, Suzuki KN, Hagihara Y, Yanagihara I, Sakata I, Kataoka M, Hamada D. Structural basis of  $\alpha$ -catenin recognition by EspB from enterohaemorrhagic *E. coli* based on hybrid strategy using low-resolution structural and protein dissection. PLoS One. 査読有、2013 8(8):e71618. Doi: 10.1371/journal.pone.0071618
- ② Inoue N, Hamada D, Kamikubo H, Hirata K, Kataoka M, Yamamoto M, Ikawa M, Okabe M, Hagihara Y. Molecular dissection of IZUMO1, a sperm protein essential for sperm-egg fusion. Development, 査読有、Vol 140, 2013, 3221-3229. Doi: 10.1242/dev.094854
- ③ Iwaya N, Takasu H, Goda N, Shirakawa M, Tanaka T, Hamada D, Hiroaki H. MIT domain of Vps4 is a  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent

phosphoinositide-binding domain. *Journal of Biochemistry*, 査読有、Vol 153, 2013, 473-481

Doi: 10.1093/jb/mvt012

- ④ Sasahara K, Morigaki K, Okazaki T, Hamada D. Binding of islet amyloid polypeptide to supported lipid bilayers and amyloid aggregation at the membranes. *Biochemistry*, 査読有、Vol 51, 2012, 6908-6919  
Doi: 10.1021/bi300542g
- ⑤ Iwaya N, Akiyama K, Goda N, Tenno T, Fujiwara Y, Hamada D, Ikura T, Shirakawa M, Hiroaki H. Effect of  $Ca^{2+}$  on the microtubule-severing enzyme p60-katanin. Insight into the substrate-dependent activation mechanism. *FEBS Journal*, 査読有、Vol. 279, 2012, 1339-1352  
Doi: 10.1111/j.1742-4658.2012.08528.x.

[学会発表] (計18件)

- ① 浜田大三、免疫グロブリン軽鎖可変ドメインの構造揺らぎと分子病態、第三回岐阜構造生物学・医学・論理的創薬研究会シンポジウム、2014年3月18日、岐阜大学
- ② 浜田大三、免疫グロブリン関連アミロイドーシス発症の分子病態学 - 構造揺らぎの伝播と不安定化、立命館大学 R-GIRO 研究プログラム「蛋白質のフォールディングおよびフォールディング病発症機構の解明のための統合研究」セミナー、2014年3月14日、立命館大学草津キャンパス
- ③ 浜田大三、タンパク質構造決定 ~各手法の強み・留意点、文部科学省「地域イノベーション戦略支援プログラム」関西ライフイノベーション戦略プロジェクト「先進技術活用力養成講座(第一回) 構造ベース創薬セミナー」、2014年3月7日、計算科学振興財団
- ④ 浜田大三、免疫グロブリン関連アミロイドーシス発症における分子病態学、名古屋大学大学院 創薬化学研究科(共催 理学研究科附属構造生物学研究センター)創薬科学セミナー、2014年1月30日、名古屋大学
- ⑤ Hamada D、Toward understanding the mechanism of cytotoxicity of amyloidogenic variable domain of immunoglobulin light chains. 第51回日本生物物理学会年会、2013年10月30日、京都国際会議場
- ⑥ 浜田大三、腸管出血性大腸菌による中毒発生のメカニズム - 構造生物学的・生化学的アプローチ -、第35回日本中毒学会総会・学術集会(特別講演)、2013年7月19日、大阪国際交流センター
- ⑦ 縄田万里奈、上久保裕生、片岡幹雄、浜田大三、Trp 走査及びタンパク質切断による

腸管出血性大腸菌因子 EspB の標的結合部位の同定、第13回日本蛋白質科学会年会、2013年6月12日、とりぎん文化会館

- ⑧ 堤浩崇、小林祐大、浜田大三、免疫グロブリン軽鎖のアミロイド線維形成とフォールディング中間状態の関係、第13回日本蛋白質科学会年会、2013年6月12日、とりぎん文化会館
- ⑨ 中倉由香子、天野剛志、合田名都子、秋吉由佳里、鈴木守、浜田大三、古瀬幹夫、廣明秀一、タイトジャンクション抑制分解因子 LNX1 の構造に基いた創薬、第13回日本蛋白質科学会年会、2013年6月12日、とりぎん文化会館
- ⑩ Nawata M, Kamikubo H, Kataoka M, Hamada D, Identification of  $\alpha$ -catenin binding site in promolten globule type intrinsically disordered protein, EspB from enterohemorrhagic *E. coli*, 新学術領域研究 揺らぎと生体機能 第6回公開シンポジウム、2012年12月5日、京都テルサ
- ⑪ 奥村正樹、橋本翔子、縄田万里奈、油谷克英、引間孝明、浜田大三、日高雄二、伊藤廉、志波公平、今岡進、山口宏、内分泌攪乱物質によるプロテインジスルフィドイソメラーゼの構造変化、第12回日本蛋白質科学会年会、2012年6月20日、名古屋国際会議場
- ⑫ 岩谷奈央子、合田名都子、天野剛志、藤原芳江、浜田大三、伊倉貞吉、白川昌宏、廣明秀一、微小管切断酵素 p60-katanin に対する  $Ca^{2+}$  の効果、第12回日本蛋白質科学会年会、2012年6月20日、名古屋国際会議場
- ⑬ Hamada D, Hagihara Y, Kamikubo H, Kataoka M. Conformational properties of intrinsically less-ordered EspB effector from Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*, The 5th international symposium on "Molecular Science of Fluctuations toward Biological Functions", 2012年1月8日、東大寺文化センター
- ⑭ 浜田大三、高次蛋白質複合体における分子内構造揺らぎの役割、難治性疾患・統合創薬プロジェクト 第8回セミナー(招待講演) 2011年11月28日、立命館大学草津キャンパス
- ⑮ 浜田大三、分子内ダイナミクスがもたらす、高次分子間相互作用の制御、日本物理学会 2011年秋季大会、2011年9月22日、富山大学五福キャンパス
- ⑯ 秋吉由佳里、合田名都子、成田宏隆、鈴木守、天野剛志、浜田大三、藤原芳江、中川敦史、古瀬幹夫、廣明秀一、細胞間接着の制御に関わる LNX1 の構造・機能解析、第11回日本蛋白質科学会年会、2011年6月9日、ホテル阪急エキスポパーク

[図書] (計1件)

- ① Hamada D 他、Formatex, Current Microscopy Contributions to Advances in Science and Technology、2013、  
“Probing dynamic fibril-formation by an integrated microscopic approach”  
(P.668-677)

[その他]

ホームページ等

現在作成中

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

浜田大三 (HAMADA, Daizo)

神戸大学大学院医学研究科・非常勤講師

研究者番号：60372132