

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2011～2014

課題番号：23687020

研究課題名(和文)放射光真空紫外円二色性による蛋白質精密構造解析の新展開

研究課題名(英文) New developments in structural analysis of proteins by synchrotron-radiation vacuum-ultraviolet circular dichroism

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・助教

研究者番号：40403620

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 16,300,000円

研究成果の概要(和文)：放射光真空紫外円二色性法により、蛋白質の精密な溶液構造情報の獲得を可能にすると共に、この手法を生体膜と結合した蛋白質の精密構造解析に応用した。またアルツハイマー病などの原因蛋白質であるアミロイド線維の円二色性スペクトルを、最先端の計算科学を用いて帰属し、アミロイド線維の形成や毒性に重要な分子間構造を明確にした。円二色性研究の国内外の専門家14名を招聘し円二色性国際ワークショップ(広島, 2014年3月4日)を開催し、円二色性法による蛋白質構造解析の有効性を広く発信した。

研究成果の概要(英文)： We newly developed the analytical method for estimating the contents, numbers of segments, sequences, and orientations of protein secondary structures in aqueous solution using a vacuum-ultraviolet circular dichroism (VUVCD) with a synchrotron-radiation light source. This spectroscopy was powerful technique for characterizing the structures of proteins at non-native states such as the membrane-bound state. The VUVCD spectrum of amyloid fibrils was assigned with the CD theory and molecular dynamics simulation to characterize the intermolecular structures of amyloid fibrils which are important for understanding the fibril formations and toxicity. A press release of this research was issued to the media. Further, we invited 14 domestic and international experts of CD fields and organized Hiroshima International Workshop on Circular Dichroism (4th May, 2014, Hiroshima) to promote the usage of protein structural analysis using the VUVCD spectroscopy.

研究分野：生物物理化学

キーワード：真空紫外円二色性 放射光 蛋白質 二次構造 バイオインフォマティクス 円二色性理論 生体膜  
アミロイド

## 1. 研究開始当初の背景

円二色性(CD)は、光学活性物質の立体構造を敏感に反映するため、蛋白質の重要な構造解析法となっている。これまで我々は、CD法による高エネルギー遷移に基づいた蛋白質の構造解析を可能にするため、広島大学放射光科学研究センターの放射光源を利用し、真空紫外(VUV)領域まで CD 測定可能な、真空紫外円二色性(VUVCD) 分散計を構築した。また我々は、VUVCD 法を天然状態及び非天然状態における蛋白質の 2 次構造含量・本数の高精度解析に応用すると共に、VUVCD から得られる 2 次構造情報とアミノ酸配列情報(Neural-Network: NN)を組み合わせることで、アミノ酸残基レベルで 2 次構造の位置が予測できる手法を開発した。これらの研究により、VUVCD が蛋白質の精密な溶液構造解析に極めて有効であることを示した。一方、海外での放射光を用いた CD 装置が、英国・米国等世界 8 か国 9 放射光施設に広まり、現在保有している VUVCD 測定・解析技術を生かした研究を更に発展させる必要があった。

## 2. 研究の目的

本研究では、VUVCDによる蛋白質の構造解析を、分子動力学法、分子軌道法、バイオインフォマティクス等の計算科学を利用することで、立体構造まで解析できる手法に発展させ、これまで未解明であった天然・非天然蛋白質の溶液中における精密構造解析に応用し、構造生物学における CD 分光の新たな展開を目指した。具体的には以下の 3 点の研究課題を実行した。

## (1) 蛋白質 2 次構造解析の高度化

我々はこれまで、構造既知蛋白質の VUVCD スペクトル、2 次構造含量、アミノ酸配列のデータベースを構築し、構造未知蛋白質の VUVCD スペクトルから 2 次構造( $\alpha$ -helix や $\beta$ -strand)の含量、本数、配列が予測可能な解析ソフトを開発した。本研究課題では、蛋白質 VUVCD スペクトルのデータベースを増加させ、2 次構造の解析精度を向上させると共に、Turn 構造の位置予測の実現を目指した。

## (2) 蛋白質 CD の理論解析

VUVCD を用いた蛋白質の立体構造解析を進める上で、3 次元座標(PDB データなど)から VUVCD スペクトルを算出できる理論体系を確立することは非常に重要である。本研究課題では、特に蛋白質 VUVCD への芳香族アミノ酸側鎖の Exciton Coupling 効果を調べ、新規 CD 理論の構築を目指した。

## (3) 非天然蛋白質の精密構造解析

本研究課題では、上述した VUVCD 解析法を用いて、非天然状態であるアルコールや生体膜により誘起された蛋白質やアミロイド線維の構造解析を行う。また、Flow 環境下で線二色性(LD)が測定できるシステムを VUVCD 装置に組み込むことで、生体膜に対する  $\alpha$ -helix 構造の配向解析技術の構築を目指した。

## 3. 研究の方法

## (1) 蛋白質 2 次構造解析の高度化

①現在の蛋白質 VUVCD スペクトルのデータベースに、新たに十種類程度の蛋白質を加える。特に $\beta$ -strand 構造の予測精度を向上させるため $\beta$ -rich 蛋白質の数を増加させる。また、アミノ酸配列から turn 構造の位置が予測できる既存の手法を VUVCD-NN 法に導入する。

②VUVCD 分光から得られる蛋白質 2 次構造情報(含量・本数・配列)を構造制約条件として、分子動力(MD)学や Homology modeling 法を用いて蛋白質の 3 次構造予測する。MD 法では従来の構造形成の制約条件に加え、温度パラメーター(レプリカ交換法)等を考慮した解析を実行し、Homology modeling 法では構造制約条件を利用し、数十種類の構造既知蛋白質の 3 次構造の予測精度を評価する。

## (2) 蛋白質 CD の理論解析

Dihydrofolate reductase(DHFR)の芳香族残基変異体の VUVCD スペクトル測定を行い、芳香族残基の立体配座(Exciton coupling)と VUVCD との関係を明確にする。また、VUVCD による蛋白質の 2 次構造解析への影響についても調査する。

## (3) 非天然蛋白質の精密構造解析

① VUVCD 法を用いて、アルコール(trifluoroethanol:TFE 及び methanol:MeOH)存在下の 6 種類の蛋白質(myoglobin; Mb, human serum albumin: HSA,  $\alpha$ -lactalbumin: LA,  $\beta$ -lactoglobulin: LG, thioredoxin: Trx,  $\alpha$ -chymotrypsinogen: CGN)の 2 次構造含量・本数・配列の解析を行い、蛋白質のアルコール変性構造の特性を調査する。

②光路長 100 $\mu$ m 以下の薄型 Flow セルを設計し作成する。Flow には、送液ポンプを利用する。現行の VUVCD 装置を改良し、LD スペクトルの測定を可能にする。これらのシステムを用いて、生体膜に対する $\alpha$ -helix の配向状態が解析できる Flow 型 LD 測定システムを構築する。

③生体膜(リポソーム)結合状態で 3 種の蛋白質(LA, LG, Trx)の VUVCD と LD 測定を実施する。脂質として phosphatidylglycerol を使用し、抽出法を用いて直径 100nm のリポソームを作成する。生体膜結合蛋白質の 2 次構造含量・本数・配列・配向を明らかにし、膜結合した蛋白質のコンフォメーションの特徴を明確にする。

④ $\beta_2$ -microglobulin ( $\beta_2m$ ) は、酸変性条件下でアミロイド線維を形成する蛋白質であるが、その断片ペプチド 21-29 ( $\beta_2m_{21-29}$ )は、中性条件下でもアミロイドを形成する。そのため、 $\beta_2m_{21-29}$  は $\beta_2m$  のアミロイド化に重要な役割を担っていると考えられる。そこで、 $\beta_2m_{21-29}$  から形成できるアミロイド線維の構造パターンを、平行・逆平行 $\beta$ -sheet 等の可能性を含めて網羅的に作成し、これらアミロイド線維の初期構造を MD 法によりシミュレーションする。シミュレーションされた構造から、CD 理論を用いてスペクトルを算出する。計算と実測スペクトルの差やシミュレーション構造の安定性などを調査することで、最適

な初期構造を探索し、そのシミュレーション構造から水溶液中でのアミロイド線維のコンフォメーションの変化や分子間相互作用の様子を詳細に解析する。

#### 4. 研究成果

##### (1) 蛋白質 2 次構造解析の高度化

①8種の構造既知β-rich蛋白質のVUVCDスペクトルを既存のデータベースに組み込み、アミノ酸配列レベルでの蛋白質2次構造含量の予測精度を改善させた。また、VUVCD-NN法にTurn構造の位置を予測するNetTurnPプログラム[1]の構造パラメータを導入することで、アミノ酸配列レベルでのTurn構造の有無を80%程度で予測することに成功した。

②VUVCD分光から得られる蛋白質2次構造情報(含量・本数・配列)を、Homology modeling法やMD法の制約条件として利用した結果、制約条件に適合した構造を得ることに成功した。しかし、適用できる蛋白質分子が非常に小さい等のいくつかの課題を残した。

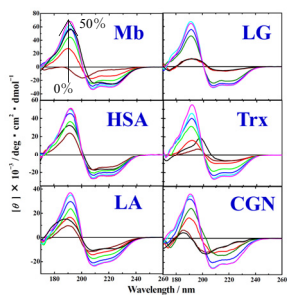
##### (2) 蛋白質CDの理論解析

芳香族残基間に励起子相互作用を持つDHFRの芳香族残基変異体のVUVCDスペクトル解析から、VUV領域で励起子相互作用に起因される新たな特性ピークの存在を明らかにした。DHFRのTrp変異体のVUVCDスペクトルから、VUV領域におけるCDへのTrp残基の寄与を解析した。その結果、DHFRではVUV領域のCDに、芳香環と主鎖との励起子相互作用が大きく影響していることが分かった。これらの成果は、蛋白質CDスペクトルの算出や2次構造解析法の高度化に向けた重要な情報となった。

##### (3) 非天然蛋白質の精密構造解析

① TFE 及び MeOH 存在下での6種の蛋白質VUVCDスペクトル(右図)をVUVCD-NN法で解析した。その結果、蛋白質のアルコール変性構造の特徴は、α-helix構造リッチであるが、ジスルフィド結合によりα-helix構造の形成(含量や長さの増加)が強く阻害されることが分かった。

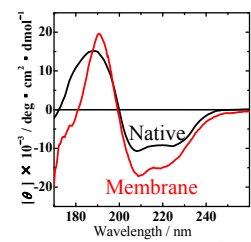
アルコール(TFE)変性蛋白質(pH2.0)のVUVCDスペクトル



②VUVCD分散計を改良することで、CDとLDの同時測定を可能にした。また、送液ポンプとFlowセルを組み合わせたFlow-LD観測システムを構築した。標準試料となるDNAのLD測定及び球状蛋白質のCD・LD測定等からLD観測システムが正常に稼働していることを確認した。

③VUVCDとFlow型LD観測システムを利用することで、3種の蛋白質の膜結合構造を解析した(下図)。その結果、膜結合によりhelix含量と本数の増加が確認され、またVUVCD-NN法から得られるhelix領域のアミノ酸組成から、各helixのnet chargeや疎水性

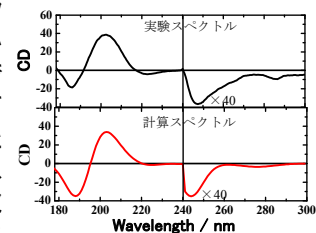
度が予測された。天然状態と膜結合状態のhelixの特性を示すこれらのパラメータから、生体膜との親和性を考慮することで、蛋白質の膜結合部位を予測することができた。また、結合部位におけるhelix



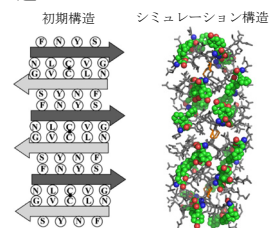
の配向をLD測定により明確にすることができた。これらの研究成果は、VUVCDとLDの組み合わせ法が、生体膜結合蛋白質のコンフォメーション解析に有効であることを示している。

④β<sub>2</sub>m<sub>21-29</sub>の溶液中でのアミロイド線維のCDスペクトルを、近紫外からVUV領域まで放射光を用いて高精度で測定した(右上図)。このスペクトルには、2次構造だけでなく3次構造(芳香族アミノ酸側鎖)の寄与が多く含まれることが分かった。様々なアミロイド線維の原子レベルの初期構造(右下図)のシミュレーション構造から、CD理論を用いてスペクトルを計算した結果、アミロイド線維のβ-sheetが逆平行で積み重なった初期構造で実測スペクトルを再現できた。また、アミロイド線維内の分子間芳香族アミノ酸側鎖が、3種の配向パターンで存在することを明らかにした。

β<sub>2</sub>m<sub>21-29</sub>のアミロイド線維の実験・計算VUVCDスペクトル



β<sub>2</sub>m<sub>21-29</sub>アミロイド線維の初期構造とシミュレーション構造



① B. Petersen, C. Lundegaard, T. N. Petersen (2010) NetTurnP—Neural network prediction of beta-turns by use of evolutionary information and predicted protein sequence features. *PLoS One* 5, e15079.

#### 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48件)

① K. Matsuo, H. Hiramatsu, K. Gekko, H. Namatame, M. Taniguchi, R. W. Woody (2014) Characterization of intermolecular structure of β<sub>2</sub>-microglobulin core fragments in amyloid fibrils by vacuum-ultraviolet circular dichroism spectroscopy and circular dichroism theory. *J. Phys. Chem. B*, **118**, 2785–2795. (査読有)

② Y. Matoba, M. Miyasako, K. Matsuo, Kosuke Oda, M. Noda, F. Higashikawa, T. Kumagai,

- M. Sugiyama (2014) An alternative allosteric regulation mechanism of an acidophilic L-lactate dehydrogenase from *Enterococcus mundtii* 15-1A. *FEBS Open Bio.*, **4**, 834–847. doi:10.1016/j.fob.2014.08.006 (査読有)
- ③ T. Itoh, I. Sugimoto, T. Hibi, F. Suzuki, K. Matsuo, Y. Fujii, A. Taketo, H. Kimoto (2014) Overexpression, purification, and characterization of Paenibacillus cell surface-expressed chitinase ChiW with two catalytic domains. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **78**, 624–634. (査読有)
- ④ K. Matsuo, K. Gekko (2013) Construction of a synchrotron-radiation vacuum-ultraviolet circular-dichroism spectrophotometer and its application to the structural analysis of biomolecules. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **6**, 675–689. (査読有)
- ⑤ K. Matsuo, K. Gekko (2013) Circular-dichroism and synchrotron-radiation circular-dichroism spectroscopy as tools to monitor protein structure in a lipid environment. *Methods Mol. Biol.*, **974**, 151–176. (査読有)
- ⑥ E. Ohmae, K. Matsuo, K. Gekko (2013) Vacuum-ultraviolet circular dichroism of Escherichia coli dihydrofolate reductase: Insight into the contribution of tryptophan residues. *Chem. Phys. Lett.*, **572**, 111–114.
- ⑦ Y. Maki, S. Watabe, T. Dobashi, K. Matsuo (2013) Effect of sugars on aging of gelatin gels by vacuum-ultraviolet circular dichroism and rheological measurements. *J. Biorheol.*, **28**, 38–44. (査読有)
- ⑧ K. Matsuo, H. Namatame, M. Taniguchi, K. Gekko (2012) Vacuum-ultraviolet electronic circular dichroism study of methyl  $\alpha$ -D-glucopyranoside in aqueous solution by time-dependent density functional theory. *J. Phys. Chem. A*, **40**, 9996–10003. (査読有)
- ⑨ K. Matsuo, Y. Sakurada, S. Tate, H. Namatame, M. Taniguchi, K. Gekko (2012) Secondary-structure analysis of alcohol-denatured proteins by vacuum-ultraviolet circular dichroism spectroscopy. *Proteins*, **80**, 281–293. (査読有)
- ⑩ 松尾光一 (2013) 放射光真空紫外円二色性を用いた蛋白質の構造解析法. 蛋白質科学会アーカイブ, **6**, e064. (査読有)
- ⑪ 松尾光一 (2012) 放射光による円二色性分光の最前線. 化学と工業, **65**, 227–228. (査読有)
- [学会発表] (計 30 件)
- ① 松尾光一: 放射光真空紫外円二色性を用いたタンパク質の構造解析. 日本分析化学会第 63 年会(2014 年 9 月 19 日, 広島)(招待講演)
- ② K. Matsuo, K. Gekko, H. Namatame, M. Taniguchi: Structural Dynamics and Hydrations of Monosaccharides Characterized by Vacuum-Ultraviolet Circular Dichroism Spectroscopy. 5th European Association For Chemical and Molecular Sciences (2<sup>nd</sup> August 2014, Istanbul, Turkey) (Top Poster Award)
- ③ K. Matsuo, K. Gekko, H. Namatame, M. Taniguchi: Vacuum-ultraviolet circular dichroism study of monosaccharides by synchrotron radiation spectroscopy. Hiroshima International Work Shop on Circular Dichroism Spectroscopy (4<sup>th</sup> March 2014, Hiroshima) (Invited lecture)
- ④ K. Matsuo, H. Namatame, M. Taniguchi, K. Gekko: Structural analysis of biomolecules using synchrotron-radiation vacuum-ultraviolet circular dichroism spectroscopy. Annual User's Meeting and 20th Anniversary of Operation (5<sup>th</sup> September 2013, NSRRC, Hinchu, Taiwan) (Invited lecture)
- ⑤ K. Matsuo, K. Gekko: Vacuum-ultraviolet circular dichroism study of saccharides by synchrotron radiation spectroscopy. The 14th International Conference on Chiroptical Spectroscopy (11<sup>th</sup> June 2013, Nashville, Tennessee, USA). (Invited lecture)
- ⑥ K. Matsuo: Recent progress of SR-VUVCD spectroscopy at HiSOR. 16th Hiroshima International Symposium on Synchrotron Radiation (1<sup>st</sup> March 2012, Hiroshima) (Invited lecture)
- ⑦ 松尾光一: 放射光真空紫外円二色性による生体分子の精密構造解析. 日本化学会第 92 春季年会(2012 年 3 月 27 日, 日吉)(進歩賞受賞講演)
- [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]
- ① プレスリリース:平成 25 年 3 月 17 日 HiSOR を用いて, アルツハイマー病などの疾患原因タンパク質の解析に世界で初めて成功~構造生物学にブレークスルーを与える新手法~
- ② 新聞報道:「原因タンパク質 構造解明 アルツハイマー治療に光 広島大の松尾助教ら」(中国新聞 平成 26 年 3 月 15 日)
- ③ 国際ワークショップの主催: Hiroshima International Workshop on Circular Dichroism Spectroscopy (2014 年 3 月 4 日, 広島)
- ④ 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・助教  
研究者番号:40403620