

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：11501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23770194

研究課題名(和文) 溶媒クエンチ法と蛋白質工学の融合による巨大蛋白質複合体の構造揺らぎ解析

研究課題名(英文) Structural fluctuations of protein complexes measured by combination of protein engineering and solvent quenching method

研究代表者

真壁 幸樹 (makabe, koki)

山形大学・理工学研究科・准教授

研究者番号：20508072

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では蛋白質の巻き戻り反応を介助する酵素、大腸菌シャペロニンGroEL/ESの構造揺らぎを明らかにすることを目指した。GroESを用いた溶媒クエンチ水素交換の結果からプロテクションファクターが10の6乗以上のアミドプロトンは10だけであり、フリーのGroESは構造揺らぎが大きいことが示された。また、インテインを融合したGroEL頂上ドメインの大腸菌発現に成功した。GroEL/ESの基質であるラクトアルブミンのN末端残基変異体の結晶構造解析からは、N末端残基が作る水素結合が安定性に大きく寄与していることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：In this project, we have been studying the structural fluctuations of E. coli chaperonin GroEL/ES system by using DMSO-quenched H/D exchange methods. For GroES H/D exchange experiments, we have successfully determined the exchange rates for 33 amide protons out of 94 amide protons in GroES. For the remaining 61 amide protons, we have determined the lower limit of the exchange rates. We found that only 10 amide protons have a protection factor larger than 10 to the power 6th. This result indicates that the free GroES is highly flexible in significant portions. From crystal structure analysis of N-terminal mutants of alpha-lactalbumin, a substrate protein of GroEL/ES system, we found the hydrogen bonding of the N-terminal residue is important for its stability.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物物理学

キーワード：タンパク質工学 シャペロン 水素交換

1. 研究開始当初の背景

蛋白質の構造揺らぎは蛋白質の機能発現において不可欠の要素である。NMR 法は蛋白質の構造揺らぎを検出する方法として強力であり、その中でもアミド水素の水素・重水素交換法は蛋白質の残基レベルの分解能で広い時間レンジにおける構造揺らぎを計測することが出来る方法である。方法は軽水中にある蛋白質試料を希釈や溶媒交換によって重水中へ置換し、アミド水素が重水へ置換されていくのを観察する。アミド水素の交換速度は中性領域では (EX2 条件と言う) 構造安定性に比例し残基あたりの局所的な安定性を評価できる。しかしながら、通常の NMR 法は方法論的な制約から 30kDa 以上の分子量を持つ蛋白質に適用することは困難だった。問題点は主に二つあり、残基数が増えることによってシグナルピーク数が増加し、観測されるシグナルピークの分離が悪くなる点と分子量の増加に伴う速い緩和速度のためにシグナルピークが広幅化することである。最近の NMR 技術の進歩により、ピーク分離の問題は 900MHz を超える超高磁場 NMR 装置の出現によって、また、ピークの広幅化は新しいパルス系列によるスピンの制御によって、大幅に改善してきたものの、巨大な生体分子を測定する上で十分とは言えないのが現状である。一方、生体内の蛋白質分子は 30kDa を超える蛋白質は多く存在し、生物機能に重要な役割を担っている。これらの分子の構造揺らぎを理解することは、生物を分子レベルから理解する上で重要である。

2. 研究の目的

蛋白質分子は本質的には動的であり、その機能を理解するには構造揺らぎを正しく評価する必要がある。しかしながら、これまでは測定方法の限界から、比較的小さな蛋白質のみが NMR 法を用いた構造揺らぎ測定の対象となっていた。本研究では溶媒クエンチ水

素・重水素交換 NMR 法と蛋白質工学的手法とを組み合わせることによって、**巨大蛋白質分子複合体 GroEL/ES の構造揺らぎの解明を目指す**。これにより従来の静的な蛋白質の構造・機能相関の見方を超えて、これまで未踏であった巨大蛋白質複合体がどのような構造揺らぎを持ち、機能を発現しているのか明らかにする。

また、GroEL/ES シャペロニンシステムの基質蛋白質である、ラクトアルブミンの N 末端残基が安定性に寄与していることが示されており、N 末端残基の変異体について構造-安定性相関の解明を目指す。

3. 研究の方法

GroEL/ES 複合体の構造揺らぎを水素・重水素交換反応によって明らかにするために、蛋白質ライゲーションと溶媒クエンチ NMR 法を融合したアプローチを用いる。GroES の構造揺らぎ解析では溶媒クエンチ法と大きい蛋白質分子の NMR 測定に用いられる TROSY 法を用いて GroES の構造揺らぎを水素交換反応で追跡する。GroES の DMSO 中での NMR 信号を帰属し、信号強度の変化の時間依存性から交換速度を決定し、プロテクションファクターを計算する。これにより、溶液中の構造揺らぎを決定する。さらに、蛋白質ライゲーションによって頂上ドメインのみを同位体ラベルした GroEL を作製する。NMR 測定条件である DMSO 溶媒中で、頂上ドメインのアサイメントを完了させる。引き続き、蛋白質全長を合成し、水素・重水素交換反応を行い、溶媒クエンチ法によって単量体に分離した条件で NMR 測定し、アミドプロトンシグナルが水素交換によって減衰する速度を決定する。水素・重水素交換実験は GroEL の T 状態、R 状態、R'' 状態それぞれについて行い、R'' 状態では GroES のみを同位体標識した系も合わせて用いて GroEL/ES 複合体の機能発現における構造揺

らぎの役割を明らかにする。

GroEL/ES の基質蛋白質である ラクトアルブミンの N 末端配列による安定性の違いについて X 線結晶構造解析から分子分解能の構造を決定し、解明を目指す。

4. 研究成果

(1) GroEL/ES の構造揺らぎ解析

GroES の水素交換反応を溶媒クエンチ法と TROSY 法を用いて測定を行った。結果、94 個の測定可能なアミドプロトンのうち、33 個のアミドプロトンについて交換速度とプロテクションファクターを決定することが出来た。残りの 61 個のアミドプロトンでは交換速度の下限値を決定した。プロテクションファクターが 10^6 以上をもつアミドプロトンは 10 だけであり、典型的な小型の球状蛋白質と比較してかなり少なかった。このことは 7 量体 GroES の多くの部位では溶液中で大きく構造が揺らいでいて、しっかりとした構造を保持していないことが示唆された。以前に報告されている、変性実験から計算されるプロテクションファクターより今回得られた値は大きい値であった。これは GroES の変性転移が、これまで報告されているより複雑な過程であることを示唆する。

GroEL の揺らぎについて、頂上ドメインを単独で発現させる系を構築し、水素交換反応の観察を行った。さらにインテインと融合させた発現ベクターを構築し、大腸菌発現系で発現することを確認した。

(2) GroEL/ES 基質蛋白質 ラクトアルブミンの N 末端残基による構造と安定性

α ラクトアルブミンを大腸菌で組み替え体発現させると、安定性が大きく減少することが報告されてきた。組み替え体ではその N 末端に余分なメチオニン残基が付加しているのが真性体との唯一の違いである (図 1)。この不安定化のために、値解析など不安定

化を誘導する変異導入を行うと、精密な安定性を決定するのが難しくなる。このため変異体を用いた研究を行うことが困難であった。Berliner らはこの問題を克服するために、ウシ α ラクトアルブミン組み替え体の 1 番目の残基を欠失した変異体を構築した。これは真性体で 1 番目の残基をメチオニンに置換した変異体であり、これによってアミノ酸残基数が真性体と同じになる。この N 末端欠損変異体は真性体と同程度の安定性を持つことが明らかとなった。最近、我々もヤギ α ラクトアルブミンで同様の N 末端欠損変異体を作製し (図 1 GLA-E1M)、安定性の回復を報告した。しかしながら、どのような構造メカニズムによって安定性の回復が起こるのかについて不明瞭であった。

今回、我々はヒトおよびヤギ α ラクトアルブミン N 末端欠損変異体 (HLA-K1M および GLA-E1M) の結晶構造を決定し、以前に決定された結晶構造と比較を行った。

結晶構造から、真性体において N 末端の N 原子が T38 と形成していた水素結合が、組み替え体では壊れていることが分かった。これはメチオニンの付加によって 1 残基目の N 原子が T38 付近のポケットに位置できなくなったためである。しかし、N 末端の欠損によって HLA-K1M と GLA-E1M は真性体と同様な T38 への水素結合が形成していた。加えて autHLA と recHLA の平衡下における分子動力学計算をそれぞれ 5 ns 行った。結果、recHLA では N 末端部位が大きく揺らいでおり、水素結合が過渡的にしか形成していないことが明らかになった。以上から真性体と同じ水素結合ネットワークを形成していることが、HLA-K1N や GLA-E1M の安定性に大きく寄与していることが示唆された。

human α-lactalbumin	residue number			
	0	1	2	3
autHLA		K	Q	F
recHLA	M	K	Q	F
HLA-K1M		M	Q	F

goat α-lactalbumin	residue number			
	0	1	2	3
autGLA		E	Q	L
recGLA	M	E	Q	L
GLA-E1M		M	Q	L

図1 今回作製した変異体のN末端配列。
autHLAとautGLAが真性体のヒトとヤギαラクトアルブミン。recHLAとrecGLAが組み替え体。HLA-K1MとGLA-E1MがN末端欠損変異体。PEDS, 2013

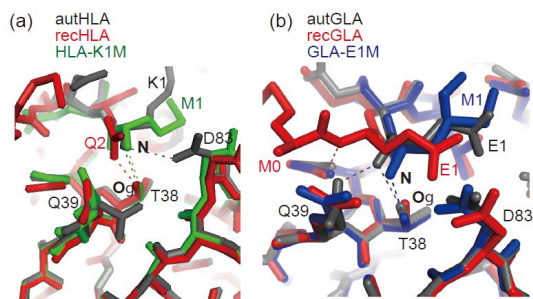


図2 N末端変異体の結晶構造(a)ヒトαラクトアルブミン、(b)ヤギαラクトアルブミン
PEDS, 2013

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 11件)

1. Ochi A, Makabe K, Yamagami R, Hirata A, Sakaguchi R, Hou YM, Watanabe K, Nureki O, Kuwajima K, Horii H.

The catalytic domain of topological knot tRNA methyltransferase (TrmH) discriminates between substrate tRNA and non-substrate tRNA via an induced-fit process.

J Biol Chem. 査読有, 2013 Aug 30;288(35):25562-74.

2. Sekiguchi H, Nakagawa A, Moriya K,

Makabe K, Ichianagi K, Nozawa S, Sato T, Adachi S, Kuwajima K, Yohda M, Sasaki YC. ATP dependent rotational motion of group II chaperonin observed by X-ray single molecule tracking.

PLoS One, 査読有, 2013 May 29;8(5):e64176.

3. Yagi-Utsumi M, Kuniyama T, Nakamura T, Uekusa Y, Makabe K, Kuwajima K, Kato K.

NMR characterization of the interaction of GroEL with amyloid as a model ligand. FEBS Lett., 査読有, 587, 1605-9, 2013.

4. Chandak MS, Nakamura T, Makabe K, Takenaka T, Mukaiyama A, Chaudhuri TK, Kato K, Kuwajima K.

The H/D-exchange kinetics of the Escherichia coli Co-chaperonin GroES Studied by 2D-NMR and DMSO-Quenched Exchange Methods.

J Mol Biol., 査読有, 425, 2541-60, 2013.

5. Nakamura T, Aizawa T, Kariya R, Okada S, Demura M, Kawano K, Makabe K, Kuwajima K.

Molecular mechanisms of the cytotoxicity of human α-lactalbumin made lethal to tumor cells (HAMLET) and other protein-oleic acid complexes.

J Biol Chem., 査読有, 288, 14408-14416, 2013.

6. Makabe K (Corresponding author), Nakamura T, Kuwajima K.

Structural insights into the stability perturbations induced by N-terminal variation in human and goat α-lactalbumin.

Protein Eng Des Sel., 査読有, 26, 165-170, 2013

7. Mukaiyama A, Nakamura T, Makabe K, Maki K, Goto Y, Kuwajima K.

The Molten Globule of 2-Microglobulin Accumulated at pH 4 and Its Role in Protein Folding.

J Mol Biol. , 査読有, 425, 273-291, 2013

8. Mukaiyama A, Nakamura T, Makabe K, Maki K, Goto Y, Kuwajima K.

Native-state Heterogeneity of 2-Microglobulin as Revealed by Kinetic Folding and Real-time NMR Experiments.

J Mol Biol. , 査読有, 425, 257-272, 2013

9. Tomoyori K, Nakamura T, Makabe K (Equal contribution with the 1st author), Maki K, Saeki K, Kuwajima K.

Sequential Four-state Folding/unfolding of Goat -Lactalbumin and Its N-Terminal Variants

Proteins, 査読有, 80, 2191-206, 2012.

10. Chen J, Yagi H, Sormanni P, Vendruscolo M, Makabe K, Nakamura T, Goto Y, Kuwajima K.

Fibrillogenic propensity of the GroEL apical domain: A Janus-faced minichaperone

FEBS Letters, 査読有, 586, 1120-1127, 2012.

11. Chen J, Makabe K, Nakamura T, Inobe T, Kuwajima K.

Dissecting a Bimolecular Process of MgATP2- Binding to the Chaperonin GroEL.

J Mol Biol. , 査読有, 410, 343-356, 2011.

[学会発表](計 3 件)

1. Koki Makabe

Folding and redesign of a beta-sheet rich model protein

International symposium on protein folding and its biological significance (招待講演)

2013年03月05日, 岡崎

2. 真壁幸樹

モデル蛋白質による シート構造の再設計, 平成 24 年生物物理学会東北支部会, 2012 年 12 月 21 日, 仙台

3. Koki Makabe, Takashi Nakamura and Kunihiro

Kuwajima

STRUCTURAL INSIGHTS INTO THE STABILITY PERTURBATIONS BY N-TERMINAL VARIATIONS IN HUMAN AND GOAT ALPHA-LACTALBUMIN

Korea-Japan Seminars on Biomolecular Sciences Experiments and Simulations (招待講演)

2012 年 1 月 9 日、奈良

[産業財産権]

出願状況(計 2 件)

1. 名称:蛋白質 化学療法剤複合体及びその製造方法,並びに医薬への応用

発明者:桑島邦博,中村敬,真壁幸樹,岡田誠治

権利者:分子科学研究所、熊本大学

種類:特許

番号:特願 2012-147492

出願年月日:2012 年

国内外の別:国内

2. 名称:球状蛋白質の準安定状態を用いた抗癌細胞作用のある分子の作成

発明者:桑島邦博,中村敬,真壁幸樹

権利者:分子科学研究所

種類:特許

番号:特願 2011-238611

出願年月日:2011 年

国内外の別:国内

[その他]

ホームページ等

<https://makabe.yz.yamagata-u.ac.jp>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

真壁 幸樹 (makabe, Koki)

山形大学・理工学研究科・准教授

研究者番号 : 20508072