

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 27 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25440018

研究課題名(和文) 加圧下における蛋白質分子内部芳香環反転運動の解析

研究課題名(英文) Study of aromatic ring-flipping in protein interiors at high pressures

研究代表者

武田 光広 (TAKEDA, MITSUHIRO)

熊本大学・生命科学研究部・助教

研究者番号：90508558

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：蛋白質のフェニルアラニン、チロシン残基芳香環は原子が細密充填した分子内部においてもCベータ-Cガンマ軸周りに反転しており、同反転は蛋白質の大きな構造揺らぎ(large amplitude breathing motion)に伴う分子内の間隙(Cavity)生成に依存する。本課題では、加圧状態における蛋白質中の芳香環反転速度をSAIL(立体整列同位体標識)-NMR法を利用して精密に測定し、反転速度の圧力依存性から構造揺らぎにより生じる間隙の大きさ(活性化体積)を見積もった。本成果は、これまで知見が全くなかった蛋白質の大きな構造揺らぎの研究の礎となると期待される。

研究成果の概要(英文)：The side-chain aromatic rings of phenylalanine and tyrosine residues in the interior of protein frequently rotate about their C $\beta$ -C $\gamma$  axis, which is assumed to occur when the protein undergoes a large amplitude slow breathing motion. In this project, under varied hydrostatic pressures, the ring flipping rates were evaluated by using the SAIL-NMR methods. This study expectedly provides new insight into the large amplitude motion of proteins.

研究分野：構造生物化学

キーワード：NMR SAIL

## 1. 研究開始当初の背景

近年 NMR 法による蛋白質の構造解析技術の進歩には蛋白質の安定同位体標識技術の高度化が多大な貢献をしており、特に甲斐荘等(名大・首都大)が開発した立体整列同位体標識 (stereo-array isotope labeling; SAIL) 法は国際的に高い関心が寄せられている。同手法は蛋白質試料の高度安定同位体標識に基づく技術であり、現在も改良を進めながら構造決定の分子量限界を押し上げて続けている。しかし、本質的には動的過程である蛋白質の機能に迫る上では、蛋白質の立体構造決定に留まらずその動的過程に対する解析技術の開発も SAIL 法として取り組む必要があり、本申請課題はその一環と位置付けられる。

溶液中の蛋白質は、large amplitude breathing motion と呼ばれる大きな構造揺らぎを生じる。同現象は、蛋白質が持つフェニルアラニン(Phe)、チロシン(Tyr)残基の側鎖芳香環が分子内部でもフリップフロップ運動(以下、“反転運動”と記す)をするという観測事実からその存在が知られている。蛋白質の分子内部に位置する芳香環は結晶構造中ではその周りに他の原子が密にパッキングし動く余地が無いが、溶液 NMR 法により芳香環の $\delta 1$ ,  $\delta 2$ 、或いは $\epsilon 1$ ,  $\epsilon 2$  のシグナルを観測すると、むしろ両者が平均化して観測されることが一般的であり、芳香環がその  $C\beta$ - $C\gamma$  軸上に関して速く反転している事を示している。この反転運動速度は試料に圧力をかけると変化するため、図 1 に示すように蛋白質全体が過渡的に大きく揺らぎ、分子内に芳香環の反転を可能とする間隙が形成されている事が明らかとなった。このような蛋白質の活性化状態において生じる同間隙の大きさは環の反転速度の圧力依存性から見積もることが原理的には出来るはずなのだが、従来の NMR 手法では蛋白質の芳香環シグナルの観測自体が困難であり、活性化体積の報告は未だに 3 例しかない。また、その測定精度も十分でない

ため、同揺らぎの研究は立ち遅れている。

申請者は、これまで SAIL 法を利用した蛋白質動態解析手法の開発を進めており、その一つとして芳香環の反転運動に焦点を置いた研究を進めている。SAIL 法では位置選択的に安定同位体標識された芳香族アミノ酸を蛋白質に取り込ませることで、従来の均一 $^{13}C/^{15}N$  標識体において問題となるスピン間相互作用を完全になくし、芳香族スペクトルが非常に簡略化される。同手法を利用すると、従来不可能であった、精密な芳香環反転運動の解析も実現可能となる。申請者は、SAIL 法と高圧 NMR 実験を組み合わせた本申請課題の内容の着想を得た。

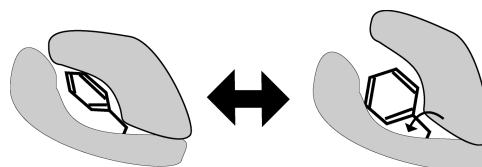


図 1 蛋白質の芳香環回転運動と分子揺らぎ

## 2. 研究の目的

以下の 3 つの目標を設定した。

目標 1 : BPTI 蛋白質内部の Tyr23, Tyr35, Phe45 芳香環を解析対象として反転運動の活性化体積を SAIL Phe/Tyr 標識体に対し加圧下にて NMR 交換実験により精密 (測定誤差 $\pm 2\text{\AA}$  以下) に各反転速度を測定し、3 者間で活性化体積値を比較する。

目標 2 : 測定温度を 10 度刻みで変化させて BPTI 蛋白質内部の芳香環の反転の活性化体積が、温度に依存して変化するか否かを調べる。

目標 3 : Tyr35 の芳香環反転速度が野生型に比べて 100 倍程度早い G37A 変異体中の Tyr35 を対象として芳香環の反転運動の活性化体積を見積もり野生型のデータと比較することで、活性化エンタルピー値と活性化体積との間に相関があるか否かを調べる。(目標 3)

本申請課題は、セリンプロテアーゼ阻害剤である BPTI 蛋白質を解析対象とする。同蛋

白質は、4 残基の Phe 残基と 4 残基の Tyr 残基を含む。このうち、分子内部に位置する Tyr23, Tyr35 と Phe45 は常圧でもその芳香環反転速度が比較的遅く、低温にすると  $\delta 1$  と  $\delta 2$  (あるいは  $\varepsilon 1$  と  $\varepsilon 2$ ) とのシグナルが分離観測される。このうち、Phe45 と Tyr23 については反転速度の圧力依存性から活性化体積が、 $50 \text{ \AA}^3$  と  $60 \text{ \AA}^3$  見積もられているが、同解析は  $^1\text{H}$  NMR による線形解析に基づいており測定誤差が  $\pm 20 \text{ \AA}^3$  と大きい。本申請課題では SAIL 標識試料を利用して加圧下で精密に芳香環反転速度を解析し、3 残基間での活性化体積を比較する(目標[1])。また、芳香環の活性化体積は、蛋白質が活性化状態に移行する際に増加する体積なので芳香環反転を伴う活性化状態の揺らぎが大きくなれば活性化体積は増えると予想される。この点を検証するため、活性化体積の温度依存性を調べる(目標[2])。また、同 3 残基の環の反転速度は常圧における温度依存性の比較から、活性化状態に移行する際に必要なエネルギーが大きくばらついており、Tyr35 の芳香環は Gly37 の主鎖アミドと Asn44 の側鎖に挟まれた形で存在し、高い活性化エンタルピー値を示している。G37A 変異体では同相互作用がくずれ、反転速度が大きく上昇する。G37A 変異体について活性化体積を調べ、蛋白質の活性化状態に移行する際のエネルギー(活性化エンタルピー)と活性化体積が独立したものか否かを調べる(目標[3])

### 3. 研究の方法

初年度は、BPTI 蛋白質中の Phe45, Tyr23, Tyr35 の芳香環を対象として活性化体積を調べる。本申請課題では、図 2 に示す  $\delta$ 型あるいは  $\varepsilon$ 型-SAIL Phe/Tyr により選択標識された BPTI 蛋白質を調製して解析に用いる。同蛋白質の発現は大腸菌発現システムを用い、蛋白質発現誘導前に同 SAIL アミノ酸を培養液に添加して標識試料を発現させる。申請者は、BL21(DE3)大腸菌株を用いて、発現誘導時直

前に 1L 培養液当たり、10-15 mg の Phe あるいは Tyr を添加することにより標識率が 90%を超える発現量が得られることを確認している。

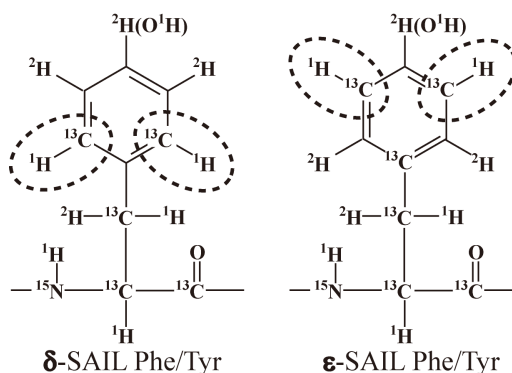


図2  $\delta$ 型、 $\varepsilon$ 型 SAIL Phe・Tyr

加圧実験は、DAEDLUS 社製 NMR 用高压実験装置を用いて行う。同装置は、試料管、圧力ポンプおよび両者をつなぐ高压ラインより構成され、最大 2,500 気圧まで試料に対する加圧が可能である。本高压 NMR 装置の試料管はセラミックス製で内径が 3 ミリと従来の装置に比べて比較的太いため、測定感度が高く SAIL 法と組み合わせることで精密な緩和解析等が実現可能となる。

測定は、クライオプローブを備えた 600 MHz、もしくは 900 MHz 高磁場 NMR 装置 (Bruker 社) を使い実施する。SAIL Phe/Tyr により標識された BPTI 試料を常圧から 500 気圧刻みで最大 2500 気圧の範囲で加圧して測定を行う。本解析では圧力による化学シフト変化の影響を考慮し、解析は軸反転に関して等価なシグナルが分離して観測される温度領域に限定し、 $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  Cz 磁化交換実験 (EXSY) を用いて行う。シグナルが分離観測される温度が互いに異なるため、Tyr23 の  $\delta$ 位、Phe45 の  $\varepsilon$  位  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$  シグナルは 10 度、Tyr35 の  $\varepsilon$  位は 40 度にて測定する。得られた圧力と反転速度をプロットし、 $\delta V = -k_B T (\delta \ln k / \delta P)$  ( $k_B$ : ボルツマン定数,  $T$ : 温度,  $k$ : 反応速度,  $P$ : 圧力) の関係式に基づき活性化体積を算出する。

活性化体積の温度依存性の解析: BPTI 蛋白質の Phe45, Tyr23, Tyr35 側鎖芳香環反転の活性化体積の温度依存性を調べる。測定試料、装置は初年度と変更しない。測定は 10~50 度の温度範囲で 10 度刻みに行い、圧力範囲は 1~2,500 気圧の範囲で 500 気圧刻みで反転速度の測定を行う。50 度・2500 気圧の過酷な条件でも BPTI 蛋白質は変性せずに立体構造を保持することは同条件における  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC スペクトルの測定より確認済みである。解析は、芳香族シグナルの  $\delta_1$  と  $\delta_2$  あるいは  $\varepsilon_1$  と  $\varepsilon_2$  のシグナルが分離観測されている場合は EXSY 実験を用い、シグナルが平均化されて観測されている温度領域ではシグナルに対する線形解析により反転速度を調べる。なお、準備実験より芳香環シグナルの化学シフト値は 1-2500 気圧の範囲における圧力変化に比べて、10-50 度の温度範囲における温度変化の方が誘起される化学シフト変化が小さい観測結果が得られているため、線形解析において同圧力で低温における化学シフト値を用いる。

G37A 変異体における活性化体積: 本項目では、反転運動の活性化エンタルピー ( $\Delta H^\ddagger$ ) と活性化体積との間に相関があるか否かを調べる。G37A 変異体は既に申請者は発現系を構築している。野生型 BPTI と G37A 変異体について、Tyr35 反転速度の温度・圧力依存性から活性化エンタルピーと活性化体積値を見積もる。G37A 変異体では野生型において存在する Tyr35 の芳香環と Gly37 のカチオン  $\pi$  相互作用がなく、両者の活性化エンタルピー値は大きく異なると予想される。この状況にて、活性化体積が野生型と G37A 変異体との間で近い値になるか否かを調べる。もし、野生型と G37A 変異体との間の比較ではデータ数が足りないと判断されたならば、野生型に比べて反転速度が 2 倍程度早い

G36S 変異体についても同様に Tyr35 反転運動の活性化エンタルピーと活性化体積値を調べ、相関の有無を調べる。

#### 4. 研究成果

当初目標として設定した 3 つの目標はおおむね達成する事が出来た。以下、各項目について述べる。

目標 1 加圧下における活性化体積の測定  
DEADALUS 社の高圧 NMR 装置を利用して、1 気圧、500 気圧、1000 気圧、1500 気圧、2000 気圧、2500 気圧の加圧下において、Tyr35, Phe45 の反転速度を、NMR 交換実験により見積もった。この場合、芳香環の 1 位と 2 位のシグナルが分離して観測されているため、また  $t_1$  展開と  $t_2$  展開時間との間に混合時間を設ける事で両ピークの間に変換ピークを検出できる。このとき、混合時間と交換ピークの強度を理論式に当てはめる事で、交換速度を高い精度で見積もる事が出来る。実際に、加圧下で実験を行い、活性化体積を見積もった結果、2 程度の誤差で同体積を見積もる事が出来た。これは、当初設定した誤差の基準を満たしており、本目標は達成できたと結論した。

目標 2 で設定した活性化体積の温度依存性については、反転速度が比較的遅い Tyr35 について、温度を 10 度変化させて活性化体積を見積もった。その結果、温度変化の前後で優位な変化を検出する事は出来なかった。この事から 10 度程度の温度変化では揺らぎの生成の過程に大きな差は出ないと考えられる。しかしながら、この結果が幅広い温度領域にわたり当てはまるかは、更なる検討が必要であろう。

目標 3 で掲げた、変異導入による影響についてであるが、Tyr35 の活性化体積について、野生型に比べて 9 程度の減少が見られた。野生型 BPTI では 37 番目のグリシンの主鎖アミド基が Tyr35 の芳香環とカチオン

相互作用をしている。一方、G37A ではこの 37 番目グリシンがアラニンに置換され、同残基の 2 面角が変化し、主鎖アミド基を介した芳香環との相互作用が変化している事が予想される。この事を踏まえると、G37A 変異体では Tyr35 周辺の原子間相互作用ネットワークが緩み、平衡状態において既に活性化に必要な体積がある程度確保されているというのが一つの解釈としてあり得る。

総括すると、今回、SAIL 法と高圧 NMR 法を組み合わせることで、活性化体積について精密なデータが取得可能となった。本成果は、これまで知見が全くなかった蛋白質の大きな構造揺らぎの研究の礎となると期待される。特に、このようなタンパク質の揺らぎは過渡的であり、かつその前後で構造に差がないため、NMR でしか捉える事が出来ない点を最後に指摘しておきたい。

#### 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 8 件)

Ihara M, Hamamoto S, Miyanoiri Y, Takeda M, Kainosho M, Yabe I, Uozumi N, Yamashita A. "Molecular bases of multimodal regulation of a fungal transient receptor potential (TRP) channel" *J. Biol. Chem.* 288, 15303-17 (2013) doi: 10.1074/jbc.M112.434795. (査読有り)

Miyanoiri Y, Takeda M, Okuma K, Ono AM, Terauchi T, Kainosho M. "Differential isotope-labeling for Leu and Val residues in a protein by *E. coli* cellular expression using stereo-specifically methyl labeled amino acids" *J. Biomol. NMR* 57, 237-249 (2013) doi: 10.1007/s10858-013-9784-0. (査読有り)

Takeda M, Miyanoiri Y, Terauchi T, Yang C-J, Kainosho M "Use of H/D isotope effects to gather information about hydrogen bonding and hydrogen exchange rates" *J. Magn. Reson.* 241, 148-154 (2014) doi: 10.1016/j.jmr.2013.10.001 (査読有り)

Sato T, Miyanoiri Y, Takeda M, Naoe Y, Mitani R, Hirano K, Takehara S, Kainosho M, Matsuoka M, Ueguchi-Tanaka M, Kato H. "Expression and purification of a GRAS domain of SLR1, the rice DELLA protein." *Protein Expr. Purif.* 95.

248-254 (2014) doi: 10.1016/j.jmr.2014.01.006. (査読有り)

Schmidt E, Ikeya T, Takeda M, Löhr F, Buchner L, Ito Y, Kainosho M, Güntert P "Automated resonance assignment of the 21 kDa stereo-array isotope labeled thioldisulfide oxidoreductase DsbA" *J. Magn. Reson.* 249, 88-93 (2014) doi:10.1016/j.jmr.2014.10.005 (査読有り)

Wang S, Parthasarathy S, Nishiyama Y, Endo Y, Nemoto T, Yamauchi K, Asakura T, Takeda M, Terauchi T, Kainosho M, and Ishii Y "Nano-mole scale side-chain assignment by <sup>1</sup>H-detected protein solid-state NMR by ultra-fast magic-angle spinning and stereo-array isotope labeling" *PLoS One* 10, e0122714 (2015) doi: 10.1371/journal.pone.0122714. (査読有り)

Wang S, Parthasarathy S, Xiao Y, Nishiyama Y, Long F, Matsuda I, Endo Y, Nemoto T, Yamauchi K, Asakura T, Takeda M, Terauchi T, Kainosho M, Ishii Y. "Nano-mole scale sequential signal assignment by <sup>1</sup>H-detected protein solid-state NMR" *Chem. Commun. (Camb)* 51, 15055-8 (2015). doi: 10.1039/c5cc04618a (査読有り)

Yang CJ, Takeda M, Terauchi T, Jee J, Kainosho M. "Differential large-amplitude breathing motions in the interface of FKBP12-drug complexes." *Biochemistry* 54, 6983-95 (2015) doi: 10.1021/acs.biochem.5b00820. (査読有り)

[学会発表](計 9 件)

Mitsuhiro Takeda, Yohei Miyanoiri, Chun-Jiun Yang, Sanae Kondo, Tsutomu Terauchi, Masatsune Kainosho "13C NMR analyses using site-specific isotope labeling for studying hydrogen exchange and protonation states of polar side-chain groups in proteins" Asia-Pacific NMR (2015) August 13-16 Hong Kong (China)

Mitsuhiro Takeda, Yohei Miyanoiri, Chun-Jiun Yang, Sanae Kondo, Tsutomu Terauchi, Masatsune Kainosho "NMR Hydrogen exchange study of polar side-chain groups in proteins" ISMAR (2015) August 17-21 Shanghai (China)

武田光広 集中講義「NMR による構造解析の基本」・高度安定同位体標識利用 NMR 法によるタンパク質の動態構造の研究、名古屋大学生命理学特別講義 (2015) 7 月 23 - 24 日 名古屋大学 (愛知県・名古屋市)

武田光広 高度な安定同位体標識を利用した NMR 解析技術の開発、生命分子ダイナミクスの探求を目指す次世代 NMR 研究会

(2015) 1月13日 岡崎統合バイオサイエンスセンター (愛知県・岡崎市)

Mitsuhiro Takeda, Tsutomu Terauchi and Masatsune Kainosho ” NMR method for investigating hydrogen exchange rate of lysine side-chain amino group” International Conference of Magnetic Resonance in Biological System (2014) August. 24-29 Dallas (USA)

武田光広、甲斐荘正恒、SAIL 法を利用したタンパク質構造揺らぎのNMR研究、第53回NMR討論会 (2014) 11月4 - 6日 大阪大学コンベンションセンター (大阪府・吹田市)

武田光広、寺内勉、甲斐荘正恒 蛋白質リジン残基側鎖アミノ基の水素交換速度の解析、第52回NMR討論会 (2013) 11月12-14日 石川県立音楽堂 (石川県・金沢市)

武田光広、SAIL NMR法による蛋白質過渡的揺らぎの研究、平成 25 年度 日本分光学会NMR分光部会 講習会 (2013) 10月16日 名古屋大学 ES 館会議室(愛知県・名古屋市)

武田光広、SAIL-NMR 法による蛋白質の Large amplitude breathing motion の解析 大学院セミナー (2013) 6月19日 立命館大学びわこ・くさつキャンパス (滋賀県・草津市)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕  
出願状況 (計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況 (計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

武田 光広 (TAKEDA, Mitsuhiro)  
熊本大学・生命科学研究部・助教  
研究者番号：90508558

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：