

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 31 日現在

機関番号：34315

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25840025

研究課題名(和文)変性中間体を標的とした構造生物学の新展開

研究課題名(英文)High-energy conformations of proteins as a new target of structural biology

研究代表者

北原 亮 (Ryo, Kitahara)

立命館大学・薬学部・准教授

研究者番号：70512284

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：タンパク質は最安定状態以外にも、高いエネルギーを持った状態(高エネルギー状態)が存在する。これまでの立体構造研究では、それらの立体構造や物性が不明であった。数千気圧の圧力により、高いエネルギーを持ったコンフォメーションを安定化させ、NMRによる立体構造解析を試みた。タンパク質ユビキチンの局所変性状態を、低温、酸性、高圧条件下で安定に捉え、NMR信号の帰属、原子間距離情報(NOEと常磁性緩和促進)や二面角情報を収集し、立体構造計算を行った。TDP-43のRNA結合ドメイン及びOspAについて、圧力、熱及び変性剤による変性実験を行い、各種熱力学量を得た。

研究成果の概要(英文)：The conventional NMR approach for structure determination so far reveals atomic coordinates of the most stable conformation of a protein, the so-called "native state". Despite significant progress in our knowledge about the basic folded conformation of proteins, high-Gibbs free energy states of proteins are poorly understood. Here, we investigate the structure and backbone dynamics of locally disordered state of ubiquitin using high pressure NMR spectroscopy. We carried out NMR signal assignments, the collection of structural information based on chemical shifts, NOE, and paramagnetic relaxation enhancements (PRE). We also performed ¹⁵N spin relaxation experiments (T1, T2, hNOE). More than 1000 NOE- and PRE-based distance constraints and 42 torsion angle constraints were used for structure calculation of the locally disordered state. High-pressure NMR spectroscopy provides snapshots of fluctuating ubiquitin structure at atomic resolution.

研究分野：構造生物学

キーワード：圧力 コンフォメーション NMR 熱力学

1. 研究開始当初の背景

酵素反応や蛋白質凝集・線維化については、高エネルギー構造（活性型 OPEN 構造や変性中間体）が反応中間体として関わっていることが示唆されているが (Boehr et al. Science 2006, Neudecker et al. Science 2012)、それら高エネルギー状態の生理条件下での分布率は数%と限られており通常の NMR や X 線結晶構造解析手法では構造解析することが困難である。これまでに R_2 緩和分散法を用いた研究により得られた NMR 化学シフト情報と、構造・化学シフトデータベースを用いた高エネルギー構造のモデリング手法 (CS-Rosetta など) が成功を収めているが (Bouvignies et al. Nature 2011 など数例)、側鎖を含めた精密な構造解析に至っていない。本研究では、セラミクスセルを用いた高感度高圧力 NMR 法により、これまで発見してきた蛋白質の高エネルギー状態の立体構造解析を行い、高エネルギー構造を標的としたリード化合物創出法など新しい創薬手法の開発につなげる。

2. 研究の目的

高エネルギー状態の立体構造解析を行い、分子認識、凝集メカニズムに注目した新しい構造生物学の展開を図ることを目的とする。特にセラミクス性高感度耐圧 NMR セル (3mm: 既存キャピラリーセルの約 10 倍感度) を導入し、これまでのキャピラリー型セルよりも多数の構造情報を収集し、より精度の高い構造解析を行う。

(1) 高圧力下で変性中間体が発見されたタンパク質について、本手法を適応する。

ユビキチンの準安定状態 N_2 の精密構造解析: N_2 については、基底状態 N_1 と準安定状態 N_2 が 15%:85% の状態で構造解析を行ったが、 N_2 状態の純度が低い点、構造情報の不足という問題があった (Kitahara et al. JMB 2005)。

ユビキチンの変性中間体 I の構造解析: I は、33-41 番領域が局所的に変性した局所変性状態であることがわかっているが (Kitahara & Akasaka PNAS 2003)、その構造や主鎖の運動性については未解明である。

ライム病のワクチンである OspA (28 kDa) についてはレセプター認識に関わる変性中間体の構造とダイナミクスを解明する。筋萎縮性側索硬化症 ALS 患者全体の 95% の原因蛋白質と示唆される TDP43 については、RRM ドメインがミスフォールディング状態を形成し、多量体形成の引き金となることを示唆した (Shodai et al. JBC 2013)。RRM ドメインのミスフォールディング状態の構造解析を行い、変性中間体を分子標的とした TDP43 の凝集阻害化合物の探索を目指す。併せて、RRM1 ドメイン、RRM1+RRM2 ドメイン、TDP-43 全長の熱安定性について調べる。

(2) 高圧力 NMR 研究を通して、様々なタンパク質の構造揺らぎが、分子内キャビティー近傍で生じていることがわかってきた。タンパク質の構造転移と分子内キャビティーの関係性を調査するために、酸素ガス圧 NMR 法を開発した。T4 リゾチームのキャビティー拡張型変異体 L99A と OspA に適応し、分子内キャビティーの疎水性度合いとその位置について調査した。

3. 研究の方法

NMR 測定のために、大腸菌培養により安定同位体標識試料を作成した。セラミクスセル (Daedalus Innovation) を用いた高圧力 NMR 法 (静水圧) により、温度 20~40 °C、圧力 1-2500 気圧の間で NMR 測定を行った。

耐ガス圧セル (Wilma-Lab Glass Co.) を用いて、7 気圧以下の範囲で酸素ガス、窒素ガス、アルゴンガスを用いた NMR 測定を行った。

4. 研究成果

(1) 静水圧を用いたタンパク質の高エネルギー状態の立体構造解析を行った。

ユビキチンの N_2 状態: N_1 - N_2 構造揺らぎの増幅を狙った変異体 Q41N を開発し、高圧力 NMR 法を用いて 1-2500 気圧の間で NMR 測定を行った。化学シフトの圧力依存性解析から、Q41N 変異体は 1 気圧下でも N_2 状態を 70% 有することがわかった。さらに、2500 気圧下で N_2 状態が 97% まで増加することがわかった (Kitazawa et al. Biochemistry 2013)。2500 気圧下で $^1H/^{15}N/^{13}C$ の信号帰属実験を行った。高感度セラミクスセルを用いた ^{15}N -edit, ^{13}C -edit の三次元 NOESY 測定を高感度で行うことにより、距離情報を多数収集することに成功した。距離情報 NOE (1245 個)、二面角情報 (72 個) を用いて、CYANA を用いた NOE 帰属と構造計算を行った。水を含めて構造精密化を行った (Kitazawa et al. Biochemistry 2014)。図 1 は、 N_1 構造と N_2 構造を示す。 N_2 構造では、5 ストランドの 68 番残基より C 末端が外側に反っている

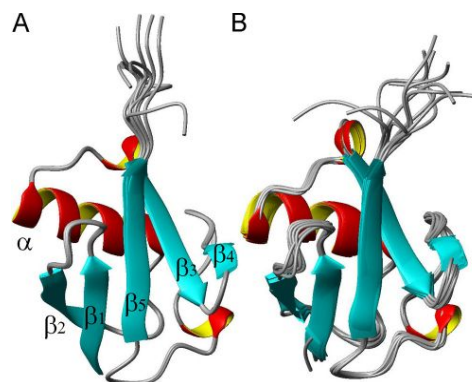


図 1. (A) ユビキチンの N_1 構造と (B) N_2 構造

ること、ヘリックス後半から続くループ(33-41番残基)にも配向の変化が見られた。

大変興味深いことに、5ストランドの外側への反り返りをもったN₂構造は、ユビキチンがユビキチン活性化酵素E1との複合体時に形成する構造と類似していた。この類似性から、ユビキチンのE1分子認識機構は、誘導適合型よりはコンフォメーション選択型であることが示唆された。

ユビキチンの局所変性状態I: Q41N変異体を用いることにより、低温、酸性条件下で、2500気圧まで加圧することにより、32-41番残基で、HSQC信号の著しい減弱が観測された。32-41番残基では、立体構造が崩れ、構造の多様性のために信号強度が顕著に減弱したと考察できる。HSQC信号強度の圧力依存性解析より、2500気圧下ではI状態が約70%、完全変性状態が30%程度存在していると考えられる。しかしながら、32-41番残基では、信号強度の減弱のため、原子間距離情報NOEの収集ができなかった。それら領域の構造情報を補完する目的で、常磁性緩和促進PRE測定を行うために複数のシステイン変異体を作成し、常磁性化合物MTSLを化学結合させた。常磁性状態MTSLとアスコルビン酸での還元状態でHSQC信号強度を比較することにより、PRE効果から距離情報の産出を行った。CYANAを用いた立体構造計算に、PRE情報を追加することにより、構造の収束度合いが高まった。現在、構造精密化中である。

OspAの変性中間体の立体構造解析を行うために、¹³C/¹⁵N/²H(70%)のトリプル標識試料を作成した。1気圧下での主鎖帰属のための三重共鳴NMR測定は良好であり、ほぼ全ての主鎖帰属を行った。2500気圧下で三重共鳴NMR測定を行ったが、NMR測定期間中に分子間凝集が生じ、主鎖信号帰属を完結できなかった。局所変性状態では、多くの疎水性残基が溶媒に露出するため疎水性相互作用が分子間凝集の引き金になったものと考えられる。

OspAは、5つの塩橋により構造安定化されている。中央からC末端ドメインにかかる塩橋を1つ潰し、局所変性状態への構造揺らぎを増幅させることを目的として、E160L変異体を作成した。高圧力NMR法を用いて、野生型と同様の局所変性を生じることを確認した。しかしながら、局所変性に伴う分子間凝集が野生型に比べ強く、実験の不可逆性から熱力学解析ができなかった。

高圧力NMR測定により、RRM1ドメインの一部の領域で、分子間相互作用によるミスフォールド状態への転移が予測された(Shodai et al. JBC 2013)。RRM1のNMRによる構造モデルを用いて、ミスフォールディング領域を標的として、計算機による相互作

用化合物の探索研究を行った(創薬等支援技術基盤プラットフォーム事業の協力)。データベースからの予測化合物10以上について、RRM1ドメイン及びTDP-43全長に対して、SDSページ法とウエスタンブロッティング法により凝集阻害効果の評価を行ったが、明確な阻害効果を示す化合物を見いだすことができなかった。

RRM1ドメインについて、グアニジン塩酸塩を用いた変性実験を、蛍光分光法を用いて273~338Kの温度範囲で行った。この温度範囲で、可逆的な変性実験に成功し、変性に伴うギブズエネルギー変化(*G*)、エンタルピー変化(*H*)と熱容量変化(*C_p*)を算出した。*G*を温度に対してプロットすると、放物線状のプロットが得られ、高温変性と低温変性状態を観測できた。

(2) 酸素ガス圧NMR法を用いた疎水性キャビティーの検出を行った。

T4リゾチームキャビティー拡張型変異体L99Aにおいて、構造転移に関わる部分に大きなキャビティーが存在している。圧力による構造転移では、キャビティーの水和が負の体積変化の源になると考えられる。X線結晶構造解析による基底状態の構造では、拡張されたキャビティーには水分子が確認されておらず、疎水的環境と予測されているが、水溶液中での状況は不明である。疎水性であり、常磁性をもった酸素ガス分子をプローブとすることにより、T4リゾチームL99A変異体と酸素分子の相互作用を評価した(Kitahara et al. Scientific Reports, 2016)。

T4リゾチームL99Aにおいては、¹H/¹⁵N HSQC測定、¹H/¹³C HSQC測定、NH ¹H-*T₁*緩和測定、CH ¹H-*T₁*緩和測定を行った。HSQC測定では、アミドグループとメチルグループについて、H, C, Nの化学シフト変化や線幅の広がりを観測した。図2は、メチル領域の¹H/¹³C HSQCスペクトルを示す。酸素濃度の増加とともに、特定のメチル基の信号が、化学シフト変化するとともに、信号強度の減弱を示した。また、¹H-*T₁*測定では、アミドグループやメチルグループで常磁性酸素からの常磁性緩和促進(PRE)を観測することに成功した。図3は、顕著なPREを示したアミドグループとメチルグループを構造上の分布を示す。PREは、酸素不対電子からの距離の6乗に反比例するため、酸素分子と観測水素間の距離情報となる。PRE情報から酸素分子の相互作用部位の同定に成功した。

L99Aは、2つの親水性キャビティーと2つの疎水性キャビティーを有するが、2つの疎水性キャビティーでのみ酸素の相互作用が確認された。本結果から、水溶液中のL99A変異体について、2つの疎水性キャビティーは、水分子の存在率が低く真空に近い環境と示唆された。X線結晶構造解析でも、これら疎水性キャビティーには、電子密度が僅かか

全く確認されていない事実と一致する。また、分子動力学計算を用いることにより、酸素分子が2つの疎水性キャビティーを移動する様子や、溶媒への出入りが確認できた。L99Aの疎水性キャビティーは、ベンゼンやベンゼン誘導体と相互作用することから、リガンドの出入り経路の1つの可能性を示すことができた。

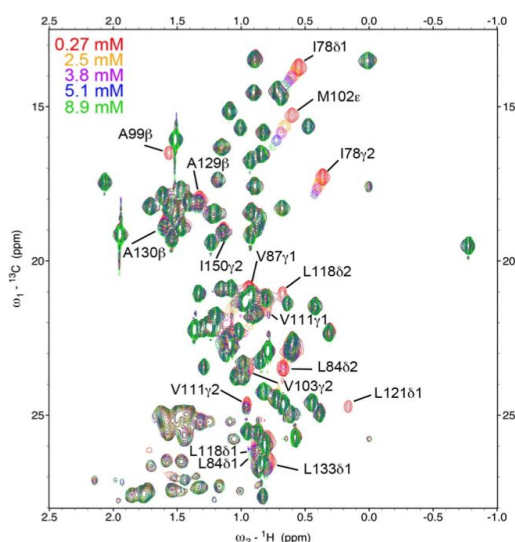


図 2. $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ HSQC スペクトル。酸素濃度(酸素圧)の増加により化学シフトが変化する様子。

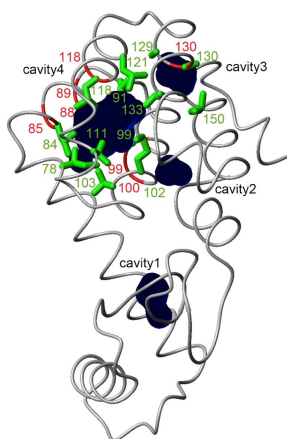


図 3.強いPREを示したL99A変異体のアミド基(赤)とメチル基(緑)。

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 9件)

1. Ryo Kitahara, Yuichi Yoshimura, Mengjun Xue, Tomoshi Kameda, Frans A. A. Mulder, Scientific Reports

6, 20534 (2016) (査読あり)

2. Ryo Kitahara and Frans Mulder, Is pressure-induced signal loss in NMR spectra for Leu99Ala cavity mutant of T4 lysozyme due to unfolding? PNAS 112, E923 (2015) (査読あり)
3. Akihiro Maeno, Daniel Sindhikara, Fumio Hirata, Renee Otten, Frederick W. Dahlquist, Shigeyuki Yokoyama, Kazuyuki Akasaka, Frans A. A. Mulder, and Ryo Kitahara, Cavity as a source of conformational fluctuation and high-energy state: High-pressure NMR study of a cavity mutant of T4 lysozyme, Biophysical J. 108, 135-145 (2015) (査読あり)
4. Soichiro Kitazawa, Tomoshi Kameda, Ayumi Kumo, Maho Yagi-Utsumi, Nicola J. Baxter, Koichi Kato, Michael P. Williamson, and Ryo Kitahara, Close identity between alternatively folded state N₂ of ubiquitin and the conformation of the protein bound to the ubiquitin-activating enzyme. Biochemistry 53, 447-449 (2014) (査読あり)
5. Ryo Kitahara, Kazumi Hata, Hua Li, Mike Williamson, Kazuyuki Akasaka, Pressure-induced chemical shifts as probes for conformational fluctuations in proteins, Progress in NMR Spectroscopy, 71, 35-58 (2013) (査読あり)

[学会発表](計 17件)

6. Ryo Kitahara, Yuichi Yoshimura, Mengjun Xue, Tomoshi Kameda, Frans A. A. Mulder, O₂ binding sites in protein cavities detected by gas-pressure NMR spectroscopy, HPBB 2016, 2016年7月予定、トロント(カナダ)
7. Soichiro Kitazawa, Takuro Wakamoto, Teppei Ikeya, Tomoshi Kameda, Maho Yagi-Utsumi, Koichi Kato, Christian Roumestand, Nicola J. Baxter, Mike P. Williamson, Ryo Kitahara, NMR snapshots of a fluctuating ubiquitin structure, EUROMAR2016, 2016年7月6日予定、オーフス(デンマーク)
8. Ryo Kitahara, Solution structure of transiently populated exited states of ubiquitin studied by high-pressure NMR spectroscopy, IPR Seminar, 2016年6月3日予定、大阪大学(大阪府)
9. 北原亮, 酸素ガス圧 NMR 法によるタンパク質の動的疎水性キャビティーの検出、第5回岐阜構造生物学・医学・論理的創薬研究会シンポジウム(招待講

- 演) 2016年3月10日、岐阜薬科大学 (岐阜県)
10. 北原亮、静水圧およびガス圧 NMR 法によるタンパク質の構造揺らぎ研究、日本生物物理学会東北支部会 2015 (招待講演) 2015年12月18日、東北大学(宮城県)
 11. 若本拓朗、北沢創一郎、矢木一内海真穂、加藤晃一、Christian Roumestand、Nicola J. Baxter, Mike P. Williamson、北原亮、高圧力 NMR 法によるユビキチンの局所変性状態の立体構造解析、第54回 NMR 討論会、2015年11月6-8日、千葉工業大学(千葉県)
 12. Takuro Wakamoto, Soichiro Kitazawa, Maho Yagi-Utsumi, Koichi Kato, Christian Roumestand, Nicola J. Baxter, Mike P. Williamson, Ryo Kitahara, Structure and dynamics of the locally unfolded state of ubiquitin studied by high-pressure NMR spectroscopy、6th Asia-Pacific NMR Symposium、2015年8月15日、香港(中国)
 13. Soichiro Kitazawa, Takuro Wakamoto, Tomoshi Kameda, Maho Yagi-Utsumi, Koichi Kato, Nicola J. Baxter, Mike P. Williamson, Ryo Kitahara、High-pressure NMR reveals the structure of high-energy states of ubiquitin.、6th Asia-Pacific NMR Symposium、2015年8月15日、香港(中国)
 14. 北原亮、北沢創一郎、タンパク質の高エネルギー状態を標的とした構造生物学、第53回 NMR 討論会、2014年11月6日、大阪大学(大阪府)
 15. Ryo Kitahara and Soichiro Kitazawa、High-energy conformations of proteins as a new target of structure biology、8th International Conference on High Pressure Bioscience and Biotechnology、2014年7月15日、ナント(フランス)
 16. Soichiro Kitazawa, Tomoshi Kameda, Ayumi Kumo, Maho Yagi-Utsumi, Nicola Baxter, Koichi Kato, Mike Williamson, Ryo Kitahara、Structure determination of the "pure" alternative state N₂ of ubiquitin by high-pressure NMR spectroscopy、7th International Meeting on Biomolecules under Pressure (IMBP)、2014年7月9日、モンペリエ(フランス)
 17. 北原亮、高圧力 NMR による蛋白質の準安定状態の構造解析～創薬研究への展開を目指して～、第3回岐阜構造生物学・医学・論理的創薬研究会シンポジウム(招待講演) 2014年3月18日、岐阜大学(岐阜県)
 18. Ryo Kitahara、High-Energy conformations of Proteins as a New Target of Structural Biology、The 2nd International Symposium on Dynamic Ordering of Biomolecular Systems for Creation of Integrated Functions、2014年1月11-12日、キャンパスプラザ京都(京都府)
 19. Soichiro Kitazawa, Tomoshi Kameda, Ayumi Kumo, Maho Yagi-Utsumi, Nicola J. Baxter, Koichi Kato, Mike P. Williamson, Ryo Kitahara、Ubiquitin-activating-enzyme recognition of ubiquitin occurs by conformational selection、The 2nd International Symposium on Dynamic Ordering of Biomolecular Systems for Creation of Integrated Functions、2014年1月11-12日、キャンパスプラザ京都(京都府)
 20. Soichiro Kitazawa, Ryo Kitahara, and Makoto Urushitani、Misfolding triggers a pathogenic conversion of protein conformations、第51回日本生物物理学会年会、2013年10月28-30日、京都国際会館(京都府)
 21. Ayumi Kumo, Soichiro Kitazawa, Tomoshi Kameda, Nicola J. Baxter, Michael P. Williamson, and Ryo Kitahara、Solution structure of the "pure" high-energy state of ubiquitin: Q41N at 2.5 kbar、第51回日本生物物理学会年会、2013年10月28-30日、京都国際会館(京都府)
 22. 北原亮、Pressure and mutation enhances specific biological motion: Ubiquitin、第51回日本生物物理学会年会、2013年10月29日、京都国際会館(京都府)
- 〔図書〕(計 3件)
1. 「揺らぎ・ダイナミクスと生体機能」寺嶋正秀編、368 (pp147-158)、北原亮、2013年、化学同人
 2. Maho Yagi-Utsumi, Takumi Yamaguchi, Ryo Kitahara, and Koichi Kato, NMR explanations of biomolecular systems with rapid conformational exchanges, Molecular Science of Fluctuations toward Biological Functions (Terazima, Kataoka, Ueoka, Okamoto Eds), 270(pp87-103), 2016, Springer
 3. Ryo Kitahara, High-pressure NMR spectroscopy reveals functional sub-states of ubiquitin and ubiquitin-like proteins, High Pressure Bioscience (Akasaka & Matsuki Eds) 730 (pp199-214), 2015, Springer

〔その他〕

ホームページ等

http://www.ritsumei.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