

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 3 日現在

機関番号：24302

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26660091

研究課題名(和文)ヘリックスバンドル形成をモデルとした蛋白質の構造エントロピーの定量化

研究課題名(英文)Quantification of protein conformational entropy on helix-bundle formation

研究代表者

織田 昌幸 (Masayuki, Oda)

京都府立大学・生命環境科学研究科(系)・准教授

研究者番号：20318231

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：ヘリックスバンドル構造をもつ蛋白質の疎水性コアにHisを導入し、さらに不安定化することで、金属イオン結合に伴いランダム構造からヘリックスバンドル構造に変化するモデル蛋白質を調製した。同構造変化の構造エントロピーの定量化、さらにアンサンブル量と1分子解析結果の相関解明を目指し、NMR、等温滴定型熱量計(ITC)、高速X線1分子追跡(DXT)実験などを行った。これまでの成果として、目的蛋白質の調製に成功し、ITCを用いて結合熱力学量を決定した。さらにDXTを用いて、動的構造変化の1分子解析を行い、金属イオン結合前後での動きの経時変化を観測した。

研究成果の概要(英文)：I designed a model protein whose structure is changed from random to helix-bundle upon its metal binding to His residues introduced into the hydrophobic core, using another designed protein reported previously as the template. I could successfully generate the protein by additional destabilized mutation into the template protein. The main purpose of this study is to quantify the conformational entropy, and to correlate the structural ensemble with the structural information obtained from single-molecule analysis. To achieve the purpose, I carried out NMR, isothermal titration calorimetry (ITC), and diffracted X-ray tracking (DXT) experiments. The NMR experiments showed that one of the designed proteins was changed from random to helix-bundle structure upon its metal binding. The ITC experiments could determine the binding thermodynamics, and the DXT experiments could detect the structural dynamics and their changes upon the metal-binding at single-molecule level.

研究分野：蛋白質科学

キーワード：動的構造 蛋白質 構造エントロピー

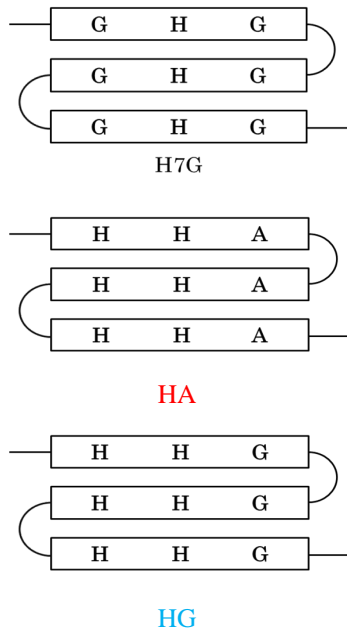


図2．各モデル蛋白質の疎水性コア形成残基のアミノ酸

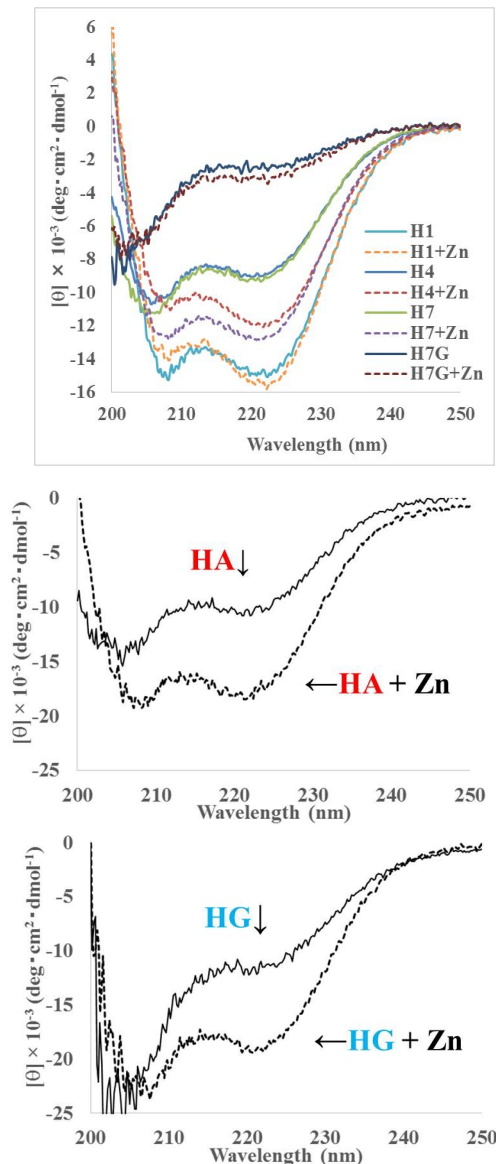


図3．各モデル蛋白質の金属イオン添加前後での遠紫外 CD スペクトル

(2) NMR による立体構造解析

金属イオン添加に伴う構造変化が示唆された HA と HG について、¹H NMR 測定を行った。図4に示すように、金属イオン添加に伴い、シグナルのブロードニングが認められたことから、何らかの高次構造形成が示唆された。さらに HA の高磁場領域において、金属イオン添加後にシグナルが観測されたことから、HA ではヘリックスバンドル構造の形成が示唆された。一方、高磁場シグナルの観測されない HG は、バンドル構造をとらないヘリックス誘起の可能性が示唆された。これらの結果は、CD スペクトルにおける 222 nm と 208 nm の CD 値の比の違いからも支持される。すなわち、金属イオン添加に伴い、HA では安定なバンドル構造が形成されたのに対し、HG ではバンドル形成がない、あるいはヘリックス間の相互作用の弱い立体構造が形成されたものと考えられる。

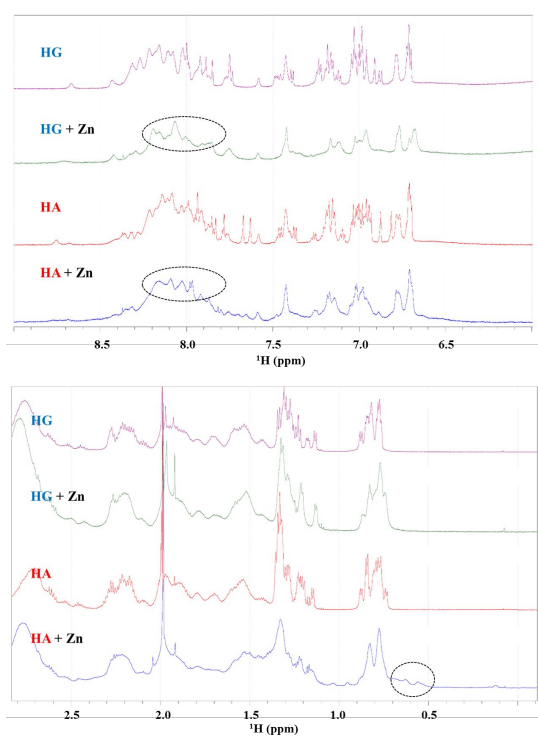


図4．モデル蛋白質 HA、HG の金属イオン添加前後での ¹H NMR スペクトル

(3) 金属イオン結合の熱力学解析

HA と HG について、金属イオン結合の熱力学解析を、ITC を用いて行った。図5に示すように、良好な ITC プロファイルが得られ、解析した結果、HG に比べて HA では、3 倍程度、結合力が強く、より負に大きな結合エンタルピー変化が観測された。結合エントロピー変化も、HA でより負に大きな値が得られた。これらの結果は、HA でより安定に金属イオンと結合し、その効果がエントロピー変化とし

て部分的に補償されたものと解釈できる。

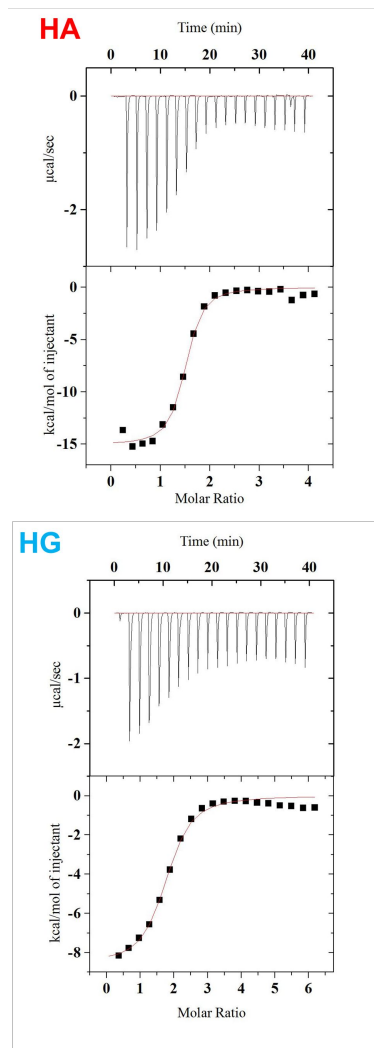


図4．モデル蛋白質 HA、HG の金属イオン結合 ITC プロファイル

(4) 金属イオン添加前後での動的1分子構造解析

HA と HG について、金属イオン添加前後での DXT 測定を行った。HG に比して、HA ではその動きが大きいことが明らかになった。一方、金属イオン添加前後での動きの変化について、結果の再現性に欠けるところがあり、さらなる検討を行う予定である。またケージド化合物を添加し、DXT 測定溶液にレーザーを照射することで溶液の pH を瞬時に変え、金属イオン結合状態から非結合状態への経時変化の解析を試みた。これは His 残基に対する金属イオン結合が、酸性 pH で弱くなることを利用した測定アイデアである。これまでの結果として、適当なレーザー照射条件を決定できずに、試行錯誤を繰り返しているが、成功すれば、蛋白質フォールディングに関するストップフロー的な観測が可能となる。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

第 15 回 日本蛋白質科学会年会

2015 年 6 月 24 日

疎水性コア形成残基置換に伴う 3 本鎖ヘリックスバンドル形成の構造解析

臼井 大樹、小道 信孝、金折 賢二、田中 俊樹、織田 昌幸

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6．研究組織

(1) 研究代表者

織田 昌幸 (ODA Masayuki)

京都府立大学・大学院生命環境科学研究科・准教授

研究者番号：20318231

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

関口 博史 (SEKIGUCHI Hiroshi)

公益財団法人高輝度光科学研究センター・利用研究促進部門・研究員

研究者番号：00401563