

## 実施課題名：蛋白質安定化と光異性化によるNMR構造測定

## 【背景】(実施課題の背景・目的を簡潔に具体的に記載してください。)

アポミオグロビンの折りたたみ観測は、ヘリックスAGHが、まずできて、その後折りたたまれていくことが多くの実験から示されてきた。その速度論的な実験は、ストップフロー装置と蛍光や円偏光2色性を組み合わせたもので行われた。一方、アポミオグロビンはヘムがないアポの形であるので、折りたたみがややゆっくりであったが、安定性が欠けていることによる凝集などへの注意を要した。本研究では、アゾベンゼンの光異性化とそのための安定化に着目し、NMRプローブ内で折りたたみを観測することと、安定構造の樹立が目標である。

## 【実施内容】(別紙の利用報告書に記載してある実施内容を簡潔に具体的に記載してください。)

CYANAによる安定化変異体の構造計算を行った。帰属はMagROと自動帰属を行った。MagROを用いて手作業の方法でも行ったが、自動帰属は強力であり、すぐれたツールであることを実感した。さらに自動帰属後に結果の確認も行った。シグナル帰属は、後述の光異性化のデータ解析に用いられた。安定化変異体の構造の違いを図の説明に下記にまとめた。F2もF4もいいデータが取れつつあった。Amberによる最適化を行った。一番目に気付く点は、構造計算からも化学シフトからも、野生株では見られなかったFヘリックスが、両変異株において観測される点にあった。

アゾベンゼンの構造変化を利用した光異性化の実験をF2とF4を用いて行った。化学修飾を行うためにアゾベンゼンをヘリックスの両端に結合できるようにシステイン二つをEヘリックスあるいはHヘリックスの両端に導入した。Eヘリックスにアゾベンゼンを導入する系において、紫外線照射によるアンフォールドと青色光による折りたたみを調節できた。しかし、スペクトルは特に2次元では、まだ多成分を含んでいるように見えるので、化学修飾の最適化が必要と考えられた。

## • Fig.1

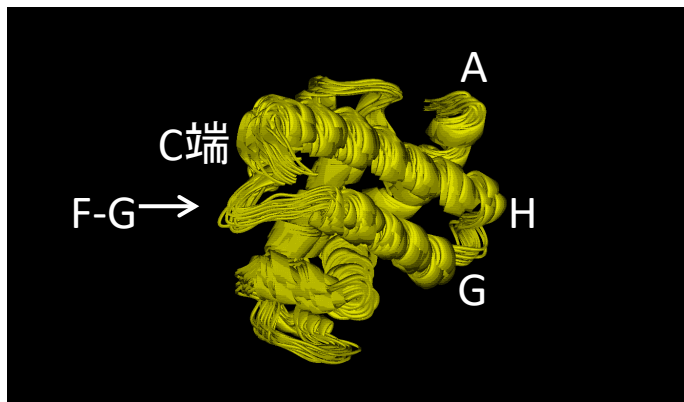


Fig.1: F2 (P88K/S92K) の溶液構造、図左中央、FGループがたるんでいる。C端がその部分を支えている。20構造

## • Fig.2

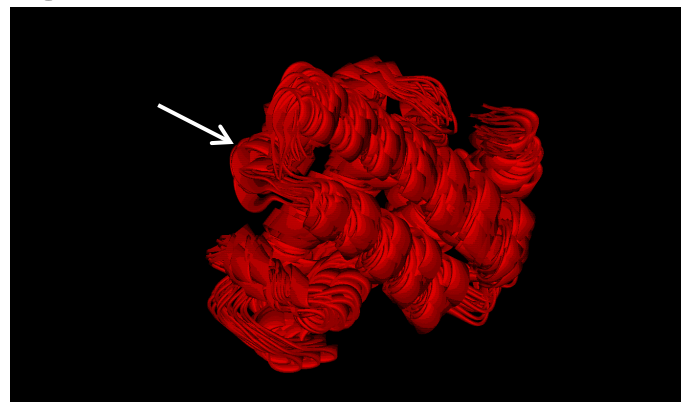


Fig.2: F4 (P88K/A90L/S92K/A94L) : Fヘリックス領域(裏)が収縮し口の様に見える。ヘム結合型に似る。20構造

NMR 共用プラットフォーム 最先端利用開発課題  
利用報告書

(課題実施者の方へ)

課題選定委員会にて、実施内容のフィードバックを行うため、ご記入下さい。本報告書については、必要な編集・加工を行った上で NMR 共用プラットフォームのホームページにて公開を致します。また、別途開催予定の成果報告会・シンポジウムや委託事業報告書作成時において、本報告書の内容についての発表や資料作成等のご協力をお願いする場合があります。

課題受付番号	PF19-01-R-023		
利用課題名	蛋白質安定化と光異性化による NMR 構造測定		
実施機関名	帝京平成大学		
実施部署名	薬学部		
実施責任者管理職名・氏名	職名	教授	氏名 西村 千秋
実施部署所在地	中野区中野 4-21-2		
本課題の概要・目的 (字数制限はありませんが 400 字～600 字以内(程度)で お書きください。)	アポミオグロビンの折り畳みを、リアルタイムで NMR プローブ内で観測できるように、特定のヘリックスをアゾベンゼンで前後において架橋し、紫外線などの光の照射で構造変化を起こさせ、その摂動で蛋白質全体の折り畳みをコントロールしていく目的で実験を行った。構造変化させたヘリックスの影響が、どのように周りの構造に波及するかを調べる実験である。野生株では見えていないシグナルも 20 残基近く存在するので、ヘムポケットを適度に埋めることにより、安定化させた変異体の使用が必要であると考え、デザインを行った。このように不安定なアポミオグロビンの構造を明らかにすることも本研究の目標であり、構造解析には理研開発の MagRO の利用が有用であった。本研究はアゾベンゼンの系を用いたアポミオグロビンの折り畳みの解析であり、アミノ酸残基レベルで詳細に解析していくものである。ヘムのないアポミオグロビンは天然構造が決められておらず、その構造決定も含んでいる。		
利用実施時期、及び期間	2019 年 7 月 1 日～2021 年 3 月 31 日  総利用日数： 32 日  <input checked="" type="checkbox"/> 当初計画どおり・ <input type="checkbox"/> 当初計画変更 (変更理由)		

利用施設 理化学研究所	NMR装置 (該当部分に ○)	利用装置① ・ ( ) 溶液 600MHz、( ○ ) 溶液 700MHz、( ) 溶液 800MHz、 ( ) 溶液 900MHz、( ) 固体 700MHz、( ) 固体 900MHz  利用期間 1 : 2020 年 2 月 7 日～2020 年 2 月 11 日 (5 日間) 利用期間 2 : 2020 年 8 月 13 日～2020 年 8 月 23 日 (11 日間) 利用期間 3 : 2020 年 10 月 5 日～2020 年 10 月 11 日 (7 日間)  利用装置② ・ ( ○ ) 溶液 600MHz、( ) 溶液 700MHz、( ) 溶液 800MHz、 ( ) 溶液 900MHz、( ) 固体 700MHz、( ) 固体 900MHz  利用期間 1 : 2020 年 9 月 14 日～2020 年 9 月 22 日 (9 日間)
その他の 利用施設		※4 NMR 施設以外の装置、支援などを利用した場合は記載してください
成果の 概要	実施内容 (字数制限はありませんが 400 字～ 800 字以内(程度)で お書きください。)	※申請書との整合性にご配慮ください。  アポミオグロビンの安定化変異体を作成した。不安定な F ヘリックス部分の安定化を P88K/S92K 変異 (F2)、P88K/A90L/S92K/A94L 変異 (F4) により行った。シグナル帰属は、主鎖の連鎖帰属とそれに基づいた側鎖帰属により行った。主鎖の帰属では、両変異体において野生株では見えなかった F ヘリックス由来のピークが観測できた。CA の化学シフト解析により、すでにミオグロビンで公表されている 8 本のヘリックスに相当する位置にヘリックスが存在していることを確認した。153 残基中、特にプロリンの前後の 2-3 残基以外はすべて主鎖残基は帰属できた。  主鎖の残基の結果に基づいて、側鎖の残基の帰属を行った。小林直宏博士(現理研)作成のソフトウェア MagRO の機能として、化学シフトテーブルと 3D スペクトル間のジャンプ機能があり、結合している N か C 平面に 15N-NOESY と 13C-NOESY を有効に用いて解析した。さらにソフトウェアの CYANA を構造計算に用いた。  帰属は MagRO と自動帰属により行われた。MagRO を用いて手作業の方法でも行ったが、自動帰属は強力であり、すぐれたツールであることを実感した。さらに自動帰属後に結果確認を行った。これらのシグナル帰属は、後述の光異性化のデータ解析にも利用された。現在さらに計算が進行中であり、F2 も F4 も構造の質が上がりつつある。Amber による最適化を行った。アミノ酸変異を施した F ヘリックスは F4 > F2 で安定化していた。

		<p>アゾベンゼンの構造変化を利用した光異性化の実験を、F2 と F4 安定化変異体を用いて行った。化学修飾を行うため、アゾベンゼンをヘリックスの両端に結合できるように、システイン二つを E ヘリックスあるいは H ヘリックスの両端に導入した。結果は E ヘリックスにアゾベンゼンを導入する系において、紫外線照射によるアンフォールドと青色光によるフォールドを調節できた。しかし、スペクトルはまだ多成分を含んでいるように見えるので、化学修飾の最適化が必要と考えられた。</p>
	<p>本課題により得られた成果と当初目標との比較 (字数制限はありませんが 400 字～800 字以内(程度)でお書きください。)</p>	<p><u>光異性化実験</u>：光異性化の実験では、NMR プローブ内にリアルタイムで光をあて、フォールディングさせると同時に NMR スペクトルを測定するものである。さらに蛋白質の折り畳みを観測しやすいように、フォールディングを遅い速度で行えるように制御することが期待された。またフォールドとアンフォールドにおいて、目的とする構造に実際に辿りついているかを確認する必要がある。1次元の NMR 実験により、これらの目標達成をしているように思われた。特に E ヘリックスにアゾベンゼンを導入し、光異性化したものの折り畳みをうまく制御できることがわかってきた。当初は H ヘリックスによる制御を考えていたが難しいかもしれない。今後も測定条件をいろいろと試みて、折り畳み速度をさらに調節していく。折り畳み速度を制御するために、熱、変性剤添加、光、圧力などを用いて検討を続けていく。</p> <p><u>安定化変異体の作成</u>：ヘムポケットを適度に埋めて安定化させた変異体をデザインし、アポミオグロビンの構造を明らかにすることも本研究の目標である。これまで、アポ型のアポミオグロビン蛋白質の構造決定は、なされていないので重要であり、同時に光異性化の実験蛋白質としても折り畳み研究の観点から重要である。</p> <p>これまで 2 つの安定化変異体の解析を並行して行ってきた。2 つの変異体蛋白質のシグナル帰属を見比べて進めていくことが、有用であることを認識した。実際 F2 と F4 の特にシグナルのオーバーラップが片方にだけあるときに、うまく問題を回避できてきた。F ヘリックスの異なる二つの変異体の結果を比較することで、F ヘリックスのフォールディング機構やヘムの認識機構を調べることができる。</p> <p>側鎖の帰属に基づいて構造計算を実行するが、一方このシグナル帰属を光異性化の解析にも用いていく。F ヘリックスを安定化させ構造決定には大きく進歩したが、光異性化の実験にも帰属が使えるかは現在検討中であり、さらに努力していく。</p>
<p>成果発表</p>		<p>※本課題利用による論文・学会発表・特許（出願中含む）等で本事業に関連する謝辞を記載頂いた成果について、可能な範囲で記載して下さい。</p> <p>（謝辞の記載例【英文】：<i>The NMR experiments were performed at (機関名) of NMR Platform supported by the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology (MEXT), Japan.</i></p> <p>【和文】：本研究の NMR 測定は、文部科学省先端研究基盤共用促進事業「NMR 共用プラットフォーム」の(機関名)を利用しました。）</p> <p>論文：</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>● Okuwaki, R., Shinmura, I., Morita, S., Matsugami, A., Hayashi, F., Goto, Y., and Nishimura, C. “Distinct residual and disordered structures of alpha-synuclein analyzed by amide-proton exchange and NMR signal intensity”</li> </ul>

		<p><i>Biochimica et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics</i> 1868, 140464, 2020</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>● 西村千秋：“アポミオグロビンのフォールディング反応機構” 生物物理 60, 215-221 (2020)</li> </ul> <p>学会発表：</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>● 西村千秋：Dynamic and rigid structures of HIV-1 p17 and p24 proteins： 第 57 回日本生物物理学会年会、宮崎シーガイア、2019 年 9 月</li> <li>● 櫻井一正, 北山寛貴, 八木正典, 池上貴久, <u>西村千秋</u>, 後藤祐児： <math>\beta</math> ラクトグロブリンの折り畳みストラテジー： 第 57 回日本生物物理学会年会、宮崎シーガイア、2019 年 9 月</li> <li>● 西村千秋：<math>\alpha</math>-シヌクレイン変異体の残存構造の NMR 解析： 第 58 回 NMR 討論会 (SEST2019 連合大会)、川崎、2019 年 11 月</li> <li>● 西村千秋：アポミオグロビンと <math>\alpha</math> シヌクレインの構造形成： 第 12 回 BKC バイオインフォマテクス研究会、立命館大学招待講演、2020 年 2 月</li> </ul>
	<p>今後の展開 (字数制限はありませんが 300 字～600 字以内(程度)でお書きください。)</p>	<p>※特に、本課題により得られた NMR 技術を用いた応用について</p> <p>ヘリックス 8 本からなるミオグロビン (ホロタイプ) に類似したアポミオグロビンの構造解析を実行するにあたり、MagRO による手作業では、側鎖のシグナル帰属は困難であったが、自動帰属は大きな力を発揮した。今後も構造未知な蛋白質の構造決定に、MagRO は用いられると思われる。</p> <p>プローブ内の紫外線照射による E ヘリックスの破壊などを行ってきたが、今後は波長が長い赤外線なども試してみる予定がある。</p> <p>H-N タイプの実験以外に、HNCO のタイプの実験も 2 次構造が化学シフトと関連するので行っていくかもしれない。</p> <p>化学修飾法を変えて、きれいなスペクトルが測定できると、解析にも良い。現段階では 1 次元スペクトルだと 2 次元よりきれいに見える。アポミオグロビンは pH によって大きく構造が変化していくので、部分的な変性状態からの部分的な構造形成へと変化させ、光異性化測定を試みる。Φ 値解析がうまくいっているの、その条件で考えていく。</p>
<p>社会・経済への波及効果の見通し (字数制限はありません 300 字～600 字以内(程度)でお書きください。)</p>		<p>アポミオグロビンは、これまでに広く、折り畳みのモデルタンパク質として研究に使われてきた。本研究により厳密な意味での野生株の天然状態の構造は分からなかったが、この変異体の構造決定により、初めてアポ体の構造が明らかになった。</p> <p>またこのモデル蛋白質を用いて、光異性化の研究を積み重ねれば、今までの Protein folding の研究成果をさらに幅広く議論することができる。</p> <p>本研究ではアゾベンゼンによる光異性化を行ってきたが、それに蓄積された経験に基づいて、ヘムの蛋白質への結合のメカニズム解明や、酸素結合の効率化を目指した研究に発展していく。本研究で用いた F2 と F4 変異体はヘムと結合できることがわかっている。ホロ体とアポ体の比較により、ヘム蛋白質の面白い結論を見出す。</p>

<p>利用における感想 (改善要望等を含む) 利用周辺環境に関する希望</p>	<p>※本施設を利用して良かった点、改善してほしい点、提案事項など、施設利用の感想を記載してください。なお複数機関の利用の場合は、どの施設に対する感想かも明記して下さい。</p> <p>NMR 実験に詳しい先生方が所内に集結しているので、とてもアカデミック的にレベルが高く、いろいろな相談にのってもらえて、まるで学会に来ているような感がある。特に改善に関して気づくところはありません。</p>
<p>今後の NMR 共用プラットフォームに対する期待</p>	<p>私自身が溶液の NMR をずっと行ってきたということもあり、最近どうしても劣勢な溶液 NMR が固体 NMR と同じレベル位で流行れば良いと感じています。もちろんさらに NMR 全体も流行って欲しいです。</p>
<p>成果公開延期の希望の有無</p>	<p>※特許取得等の理由により公開の延期を希望する場合は必ず事前に利用機関先の課題担当者にご相談ください。</p> <p>( ) あり      :      ( ○ ) なし</p> <p>「あり」の場合理由 :</p>
<p>その他</p>	<p>(上記の項目以外でご意見等お願いします。)</p>