

業績紹介：電子伝達活性中心の酸化還元による蛋白質の構造揺らぎの変化

石森浩一郎

(北大院理・A01 公募研究代表者)

論文題目："Redox-controlled backbone dynamics of human cytochrome *c* revealed by ^{15}N NMR relaxation measurements"

著者：Koichi Sakamoto, Masakatsu Kamiya, Takeshi Uchida, Keiichi Kawano, Koichiro Ishimori

雑誌巻号：Biochem. Biophys. Res. Commun. **398**, 231-236 (2010)

生体内で重要な役割を果たしている蛋白質間の電子伝達反応の制御機構を明らかにするため、代表的な電子伝達蛋白質であるシトクロム *c* (Cyt *c*) の構造的揺らぎを NMR の緩和測定で検討し、その揺らぎの大きさが電子伝達の活性中心であるヘムの酸化状態に依存することを見出したので、以下にその概要を報告する。

Cyt *c* は、呼吸鎖の電子伝達系において、シトクロム *bc*₁ 複合体からシトクロム *c* 酸化酵素 (CcO) への電子伝達を担う分子量 12 kDa のヘム蛋白質である。これまでの研究から、Cyt *c* はアミノ酸が両側から配位した 6 配位のヘムを有するため、その構造的揺らぎは小さいとされてきたが、各アミノ酸残基の構造的揺らぎの定量的検討は行われていなかった。さらに、電子伝達反応においては構造的揺らぎが大きな役割を果たしていると推定されているものの、実際に電子伝達反応と構造的揺らぎの相関についても明らかではない。

本論文では NMR の緩和測定から主鎖 NH 基についての order parameter (S^2) を算出することで、主鎖 NH 基の運動性からその構造的揺らぎを検討し、さらに、その電子伝達反応との相関を議論するため、ヘム鉄が 2 価の状態 (還元型) と 3 価の状態 (酸化型) での order parameter を比較した (Table)。その結果、還元型では主鎖 NH 基の平均の order parameter は 0.883 となり、運動が完全に束縛された 1 に近く、予想通り Cyt *c* は構造的揺らぎの小さい蛋白質であることが示された。また、比較的構造上の自由度が高いと考えられるループ部分 (L1~L8) においても、その order parameter は他の蛋白質におけるヘリックス構造に相当するほど運動性は制限されており、Cyt *c* は構造全体にわたって

運動性が制限された構造であることが明らかになった。

このような主鎖 NH 基の運動性は、ヘム鉄が酸化されて酸化型 Cyt *c* になることでより制限を受け、酸化型での主鎖 NH 基の平均の order parameter は 0.921 を示し、さらに 1 に近くなった。特に、この運動性のさらなる制限は 2 つの軸配位子アミノ酸残基近傍のループ部分 (L3、L6、L7) において、より顕著に ($\Delta S^2 = +0.055 \sim 0.072$) 現れていることから、ヘム鉄の酸化によるヘム鉄と軸配位子間の結合の変化が、軸配位子アミノ酸残基近傍の主鎖の構造的揺らぎをさらに小さくすることを示唆している。

以上の結果は、ヘム鉄の酸化状態によって、Cyt *c* の主鎖の運動性が影響を受けることを示しており、ヘム鉄の酸化状態の変化、つまり、電子伝達反応の前後において Cyt *c* の構造的揺らぎは異なっていること意味している。さらに、Cyt *c* は、そのヘム鉄の酸化により運動性が大きく変化する領域である軸配位子 Met 80 付近のアミノ酸残基を介してその電子受容体である CcO と相互作用することを考えると、このような運動性の変化、つまり構造的な揺らぎの変化によって、Cyt *c* と CcO の相互作用が変化し、その相互作用の変化による電子伝達反応の制御の可能性を示している。

Table. Average order parameter values (S^2) for structural elements of reduced and oxidized Cyt *c*

Residues	Structural Elements	Reduced Cyt <i>c</i> (S^2_{red})	Oxidized Cyt <i>c</i> (S^2_{ox})	ΔS^2 ($S^2_{\text{ox}} - S^2_{\text{red}}$)
1 - 2	L1	0.862	0.810	-0.052
3 - 13	H1	0.905	0.917	+0.012
14	Cys (thioether)	0.854	0.990	+0.145
15 - 16	L2	0.867	0.860	-0.007
17	Cys (thioether)	0.902	0.870	-0.032
18	His (axial ligand)	-	0.850	-
19 - 49	L3	0.857	0.929	+0.072
50 - 55	H2	0.916	0.925	+0.009
56 - 60	L4	0.823	0.873	+0.050
61 - 69	H3	0.933	0.952	+0.019
70	L5	0.776	0.890	+0.114
71 - 74	H4	0.896	0.903	+0.007
75 - 79	L6	0.887	0.942	+0.055
80	Met (axial ligand)	0.921	0.920	-0.001
81 - 87	L7	0.874	0.943	+0.069
88 -101	H5	0.912	0.931	+0.017
102 -104	L8	0.829	0.863	+0.034
average		0.883	0.921	+0.038

業績紹介：アミロイド線維伸長における反応中間体の捕捉と観察

茶谷絵理（立命館大学薬学部）

後藤祐児

（大阪大学蛋白質研究所・A01 公募研究代表者）

論文題目："Pre-steady-state kinetic analysis of the elongation of amyloid fibrils of β_2 -microglobulin with tryptophan mutagenesis"

著者：Eri Chatani, Reina Ohnishi, Tsuyoshi Konuma, Kazumasa Sakurai, Hironobu Naiki and Yuji Goto

雑誌巻号：J. Mol. Biol. 400, 1057-1066 (2010)

アミロイド線維は、タンパク質の誤った折りたたみによって形成される立体構造である。アミロイド線維が原因とされる疾患はアミロイドーシスと総称され、現在では約30種類報告されている。これらの疾病の伝播は、アミロイド線維の核依存的な伸長による線維の複製に関わると考えられているが、モノマー分子がどのように線維末端を認識し、自己の構造を複製してゆくのかの分子機構は明らかにされていない。そこで我々は、アミロイド線維の伸長過程で経由する速度論的中间体を捉えて観察することでアミロイド形成機構の理解につながる具体的な構造イメージを明らかにしようと考えた。

本研究では、透析アミロイドーシスの原因タンパク質である β_2 ミクログロブリンのアミロイド線維を解析した。核依存的伸長反応は、シード（アミロイド線維断片）とモノマーの2分子反応であることを考えると、核線維の末端にモノマー分子が結合した中间体を經由することが予想されるが、実際の捕捉例は存在していない。しかし、従来のモノマー溶液にごく少量のシードを添加するのは逆に、過剰量のシードに少量のモノマーに添加することで、添加したモノマータンパク質が全てシード末端に結合し、シード・モノマー複合中间体を過渡的に蓄積できる可能性がある。まず、60と95位のトリプトファン残基をすべてフェニルアラニンに置換した無蛍光性の変異体でシードを作製し、これに少量の野生型タンパク質を添加する反応系を構築した。これにより、反応開始時点でモノマーとして添加したタンパク質由来の蛍光のみを観測することが可能になり、高シード濃度条件でのトリプトファン蛍光スペクトル変化の追跡が可能となった（図1A-C）。

様々なシード濃度での伸長反応を解析した結果、低シード濃度での見かけの伸長速度定数はシード濃度に

比例して中间体は見出されなかったが、高シード濃度では伸長速度が飽和する現象が見られた（図1D）。これは、酵素反応の前定常状態のように、中间体が過渡的に蓄積したことを意味する。興味深いことに、速度定数が一定になるのはシード末端数1に対してモノマー数がおおよそ10程度であることが示された。すなわち、線維の末端にはモノマーが1分子ではなく側面付近にも不活性型として複数同時に結合しているようであり、アミロイド線維形成に関わる新たなイメージを捉えたと考えられる（図2）。

さらに中间体の構造特徴を解析するために、トリプトファンを一残基のみもつ変異体を解析したところ、中间体構造の構造形成レベルは低いことが示唆された。現在、重水素交換-NMR法による中间体構造の解析を進めており、中间体における構造形成の程度および領域がより詳細に明らかになることを期待している。

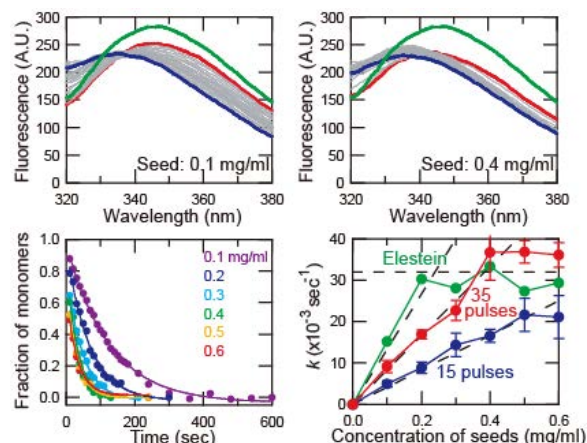


図1. (A,B)アミロイド線維伸長反応にともなうトリプトファン蛍光スペクトル変化例（モノマー濃度は常に0.03 mg/ml）と蛍光強度をもちいて作製した各シード濃度での伸長反応プロット(C)。得られた速度定数をシード濃度に対してプロットすると、高シード濃度領域において速度定数の飽和が観察された(D)。さらに、超音波破碎レベルを変えることでシード線維末端の濃度を変えてゆくと、伸長速度が飽和する点も変化する点も確認した(D)。

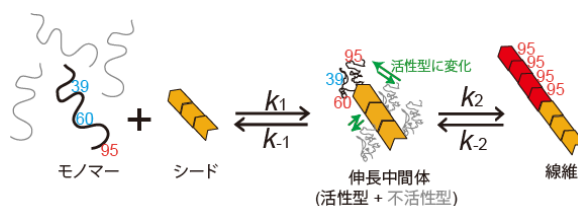


図2. 本研究から提案されたアミロイド線維の伸長スキーム。中间体において、複数のモノマー分子がアミロイド線維の先端および側面に結合していることが考えられる。

業績紹介：水和水のパーコレーションがタンパク質ダイナミクスを制御する

片岡幹雄

(奈良先端大物質創成・A02 計画研究代表者)

論文題目："Percolation of hydration water as a control of protein dynamics"

著者：Hiroshi Nakagawa and Mikio Kataoka

雑誌巻号：J. Phys. Soc. Jpn. 79, 083801 (2010)

タンパク質機能発現に必須な非調和な運動は、水和水によって活性化される。したがって、水和水のどのような性質がタンパク質動力学を制御するのかという問題は、タンパク質機能発現の分子機構を理解する上で、最も本質的な課題である。我々は、中性子非干渉性散乱と MD シミュレーションにより、この問題に取り組んでいる。

タンパク質は、200K 近傍で非調和な運動が活性化し構造変化が可能になって機能を発現する。中性子非干渉性散乱により、タンパク質の内部運動による平均二乗変位 (MSD) を評価することができる。動力学転移は、MSD の温度依存性の傾きの不連続な増加として観測される。200K 以上の傾きを様々な水和水率で測定することにより、200K 転移は、水和水率 0.37g D₂O/g protein 以上で起きることを示した (図 1、赤)。この水和水率は、第一水和水層の占有率 0.59 に対応する。理想的な格子モデルでは、この占有率でパーコレーション転移が起きる。様々な水和水率に対して、MD シミュレーションを行い、水和水構造を解析した (図 2)。低水和水では、水和水は孤立している (図 2 の青)。水和水率が上がるにつれ、水和水はクラスターを形成し、パッチ状に存在するようになる (図 2C、赤、緑、黄)。同色のクラスター内の水分子は水素結合により連結できるが、異なる色のクラスターとの間では水素結合による連結はできない。さらに、水和水率が上がるとこのクラスターが成長してタンパク質表面を覆い、水素結合によってタンパク質を取り囲むことができるようになる (パーコレーション)。クラスターサイズの水和水率依存性を見ると、200K 転移開始の水和水率依存性とまったく一致する (図 1)。水和水だけの MSD を測定したところ、パーコレーション転移前の水和水率では、水和水の MSD は、タンパク質の MSD とまったく同一で

あったが、パーコレーション転移後かつ動力学転移後の MSD は、水和水のものがタンパク質のものよりはるかに大きかった。すなわち、タンパク質の動力学は水和水に支配されていることになる。以上の結果から、水和水のパーコレーションがタンパク質動力学を制御していると結論した。

これらの成果は、タンパク質の働きに必要な水和水の本質的な性質を明確に示した最初の研究であり、耐乾燥性を示す生物の細胞等の保護機構の理解等基礎生物学のみならず、食品工学等の他の分野への貢献も期待される。

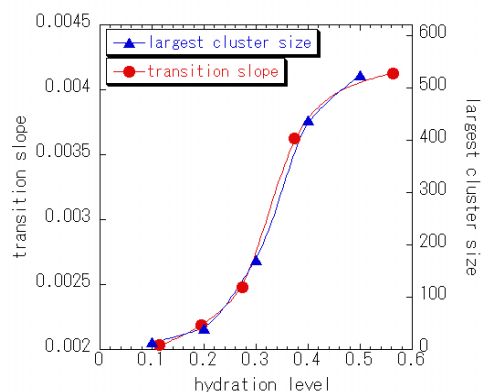


図 1. 200K 転移 (赤丸) と水和水クラスターサイズ (青三角) の水和水率依存性。

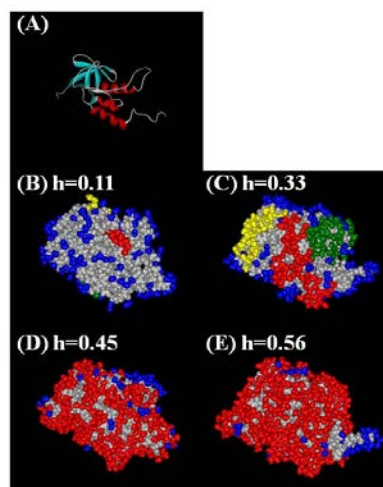


図 2. 水和水構造の水和水率依存性。

業績紹介：スイッチ型人工ジンクフィンガータンパク質の創製

今西未来

(京大化研・A02 公募研究代表者)

論文題目："Metal-Stimulated Regulation of Transcription by an Artificial Zinc Finger Protein"

著者：Miki Imanishi, Tomohiro Nakaya, Tatsuya Morisaki, Daisuke Noshiro, Shiroh Futaki, Yukio Sugiura

雑誌巻号：ChemBioChem 11, 1653-1655 (2010)

刺激への応答性を有する人工 DNA 結合タンパク質は、転写調節のためのツールや環境変化のセンシングツールとしての有用性が期待されている。本研究では、転写因子に見られる代表的な DNA 結合モチーフの一つである C2H2 型ジンクフィンガーの「構造形成能」と機能発現、すなわち「DNA 結合能」に着目し、Zn(II) 濃度応答性の人工 DNA 結合タンパク質を創製した。

転写因子の代表的な DNA 結合モチーフの一つである C2H2 型ジンクフィンガーモチーフは、約 30 アミノ酸から成り、2つのシステインとヒスチジン残基への Zn(II) の結合および、保存された疎水性アミノ酸による疎水性コアの形成によって $\beta\beta\alpha$ 構造をとり、配列特異的に DNA へ結合する。通常、システインとヒスチジンへの Zn(II) の結合は極めて安定であり、Zn(II) 濃度依存的な DNA 結合能の制御は困難である。

本研究では、保存された配位子に着目し、「配位子に変異を加え、あえて Zn(II) との結合を不安定化させる」ことによって、金属濃度依存的な機能発現 (DNA 結合) 能を有する人工 DNA 結合タンパク質および転写因子の作製を試みた (図 1)。DNA 配列特異性は維持しておくために、DNA 認識に関与するヘリックスではなく、シート上に存在する保存されたシステインをアスパラ

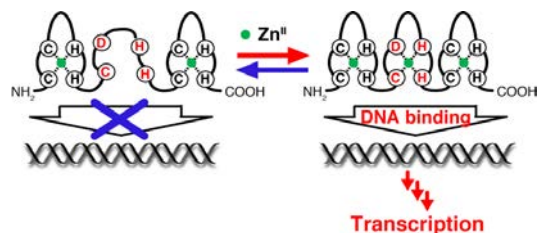


図 1. 配位子置換型人工ジンクフィンガータンパク質の Zn(II) 依存的機能発現

ギン酸に置換した、CDH2 型ジンクフィンガーを作製した。その結果、CDH2 型の Zn(II) 結合親和性は野生型 (C2H2 型) と比較し約 500 倍低下することが明らかとなった。また、3つの連続する C2H2 型ジンクフィンガーを有する Zif268 ジンクフィンガードメインにおいて、2 番目のフィンガーを CDH2 型に置き換えた CDH2-ZF3 を作製した。野生型では亜鉛濃度を低下さ

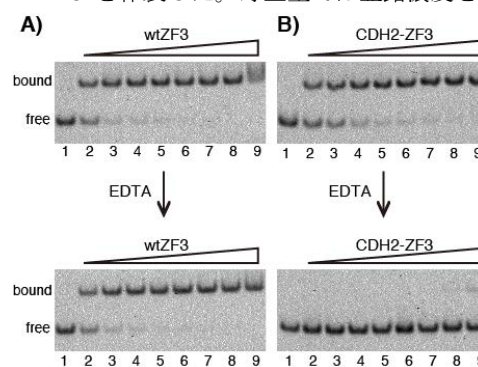


図 2. ゲルシフトアッセイ A) wtZF3, B) CDH2-ZF3. (上) Zn(II) 存在下、(下) キレート存在下。

せても、その DNA 結合能に変化は認められなかったのに対し、CDH2-ZF3 は、亜鉛濃度依存的な DNA 結合能を発揮することが明らかとなった (図 2)。

さらに、細胞内環境において、CDH2-ZF3 を有する人工転写因子は、亜鉛濃度依存的に機能発現することを示すことができた (図 3)。意図的な構造形成能の不安定化、すなわち、揺らぎをコントロールすることによって、逆に、天然には無い新しいスイッチ機能の獲得に成功した興味深い例であると考えられる。

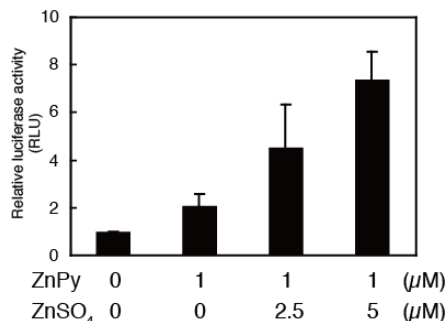


図 3. CDH2-ZF3 を DNA 結合ドメインとする転写因子は、細胞内で亜鉛濃度依存的な転写活性化能を示す。

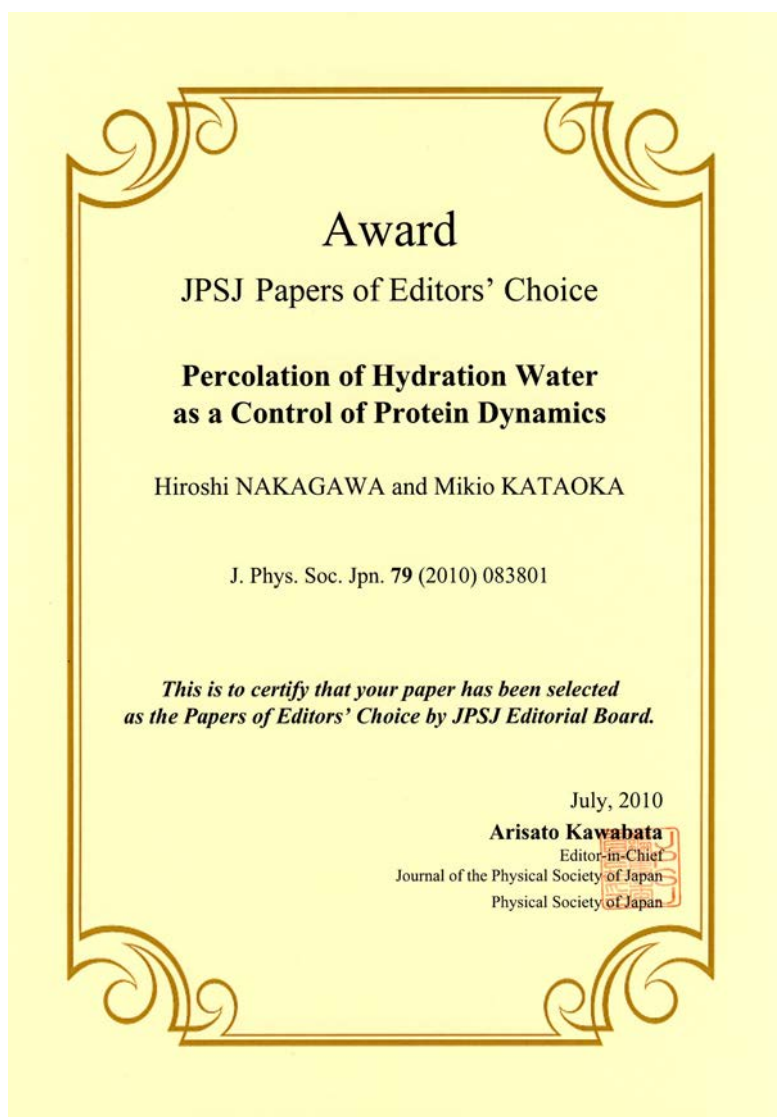
片岡氏の論文が JPSJ Papers of Editor's Choice Award を受賞

片岡幹雄

(奈良先端大物質創成・A02 研究計画代表者)

片岡幹雄氏らが、Journal of the Physical Society of Japan に公表した論文"Effect of conformational states on protein dynamical transition"が、同誌 1804 巻 8 号の編集

委員の選ぶ注目すべき論文に選ばれ、賞状を授与されました。同論文の内容は、今月号のニュースレターで紹介されています。



片岡グループの芝るみさんが The 4th Shanghai International Conference on Biophysics and Molecular Biology において優秀ポスター賞を受賞

片岡幹雄

(奈良先端大物質創成・A02 計画研究代表者)

片岡グループ (A02 班計画研究) の芝るみさん (博士後期課程 3 年) が、8 月 4 日から 12 日まで、上海郊外の嘉善市で開かれていた The 4th Shanghai International Conference on Biophysics and Molecular Biology (2010SICBM) において、優秀ポスター賞を受賞しました。Shanghai International Conference on Biophysics and Molecular Biology は、上海の生物物理学会が主催する国際会議で、5 年に 1 度開催されています。会議には、中国のほか、日欧米の第一線の生物物理学研究者や脳研究者が参加しました。

芝さんは、"Extraction of the regions encoded foldability and/or functionability from dihydrofolate reductase by the systematic alanine insertion" の演題で発表しました。ジヒドロ葉酸還元酵素に対し、網羅的アラニン挿入変異を行い、各変異体を精製した後、

構造と酵素活性を測定することにより、構造形成と酵素活性発現のために必須な一次構造上の領域を明らかにしたものです。配列をアラニン挿入で分断することにより、構造形成能を失う領域、酵素活性を失う領域が明確に決定できます。機能発現に必須な領域は、さらに補酵素(NADPH)結合に関与する領域、基質 (ジヒドロ葉酸) の結合に関与する領域および触媒活性に関与する領域に分類することができました。触媒活性に関与する領域には、活性部位を含んでいない領域もあり、揺らぎとの関係が注目されます。A02 班公募研究代表者の新井宗仁さんが、円順列変換により DHFR の folding element を同定していますが、今回の結果は、この結果を支持するとともに、folding element のうちのいくつかは、機能発現に必須で必ずしも構造形成に必須な領域ではないことも示されました。8 月 11 日に行われた Farewell Banquet で、会議の議長である Ruan 教授から、賞状と副賞を授与され、大勢の参加者から、祝福の拍手を受けました。



表彰式で Ruan 教授とともに。



領域代表の寺嶋先生とともに記念撮影。

片岡班員らの研究成果が新聞に掲載される。

A02 班、計画研究代表者の片岡幹雄博士と日本原子力研究開発機構の中川洋博士のグループの共同研究の成果が科学新聞（8月6日）、日経産業新聞(8月16日)、日刊工業新聞（8月23日）に掲載されました。

日経産業新聞 22年8月16日(朝)7面

科学新聞 22年8月6日(朝)1面

タンパク質と水和水

— 原子力機構と奈良先端大 —

熱揺らぎを中性子で観測

日本原子力研究開発機構
原子力工学用研究部門の
中川洋研究員と、奈良先端
科学技術大学院大学の片岡
幹雄教授の共同研究グルー
プは、タンパク質表面を覆
っている水和水が「ゲットワ
ーク」を形成することが、タ
ンパク質が生命機能発現に
するために必要であること
を明らかにした。日本物理
学会のJPS第77月26日
掲載された。

生体内で様々な生理機能
を担うタンパク質は、周囲
の熱揺らぎにさらされなが
ら、その構造を巧みに変化
させることで機能を発揮し
ている。タンパク質表面に
は水和水が張り付いてお
り、様々な相互作用をして
いるが、水和水が熱揺らぎ
の関係は十分分かっていな
かった。研究グループは、
モデルタンパク質の核酸分
解酵素スクリロコカル
ヌクレアーゼを用いて、段
階的に水和水の量を変化さ
せた試料について、JRRR
3による中性子散乱実験を

行つたことに、分子動力学法によるミューレーション計算を行い、タンパク質の揺らぎが水和の構造や揺らぎと如何に係しているのかを詳細に解析した。

その結果、動力学転移の出現タンパク質の活性化に必要な水和率と水和水のネットワーク形成に必要な水和率がともに0.37であることが分かった。さらに、水和水のネットワークサイズとタンパク質の動力学転移の水和率依存性を比較プロットしたところ、両者の水和率依存性の傾向が一致した。このことから、

水和水がタンパク質表面全体を覆うネットワークを形成し、その揺らぎがタンパク質の機能発現に關する揺らぎを誘發すると、つまり水和水ネットワーク形成こそが、タンパク質の働きに必要なその本質的役割であることが示された。

これまでの創薬研究などでは、タンパク質の構造に着目してきたが、水体内でのタンパク質の活性が変化する可能性があるため、中性子散乱実験による水とタンパク質の關係に着目が集まりつつある。

構造、表面の水が作用

質はたんぱく
構造、表面の水が作用
原子力機構・奈良先端大
他分子との結合支援

日本原子力研究開発機構と奈良先端科学技術大学院大学の研究チームは、たんばく質が働くときは、たんばく質に結合した水分子が重要な役割を果たすことを明らかにした。水分子の作用でたんばく質表面の構造が細かく変化し、ほかの分子との結合を助けている。酵素が結合し、たんばく質の表面に結合した「水和水」と呼ぶ水分子が十分にあ

るとたんばく質表面の構造は細かく変化するが、少ないと構造変化が起ることになることが分かった。

コンピュータを使ったシミュレーションの結果、十分な水がある状況下では、水分子がその状況になつてたんばく質を取り囲むことも起き止めた。原子力機構の中川洋研究員は「水と水がたんばく質を取り囲んで摩擦などを調節し、ほかの分子との結合などを助けていると考えられる」と話す。

たんばく質が機能する際には、表面の構造変化が重要と考えられているが、たんばく質の表面を覆う水と水の詳しい働きは不明だった。

日刊工業新聞 22年8月23日(朝)16面

たんぱく質と水の水の揺らぎ

生命機能発現に役割

原子力機構
明解など

日本原子力研究開発機構と奈良先端科学技術大学院大学による共同研究チームは、細胞内の水中で、たんぱく質とその表面を覆っている水(水和水)の分子運動(揺らぎ)がたんぱく質の生命機能発現に大きな役割を果たしていることを明らかにした。同機構の研究用原子炉の中性子散乱実験で観測して分かった。今後、酵素活性メカニズムの解明や創薬設計手法の高度化などの広い分野での貢献が期待される。

研究では中性子散乱実験で観測するとともに、計算機によるシミュレーションを行い、その揺らぎに対する水和水の影響を定量的に実施。たんぱく質や水和水の温度状態の関係から、水和水の分量が小さいと、たんぱく質、水和水とも、それらの動きは温度上昇とともに直線的にわずかなずつ増えた。しかし、水和水の分量

が大きな試料では240℃(ケルビン)は絶対温度)以上の温度領域で、それらの動きが急激に大きくなったとしている。たんぱく質の機能を発現するためには240℃近傍以上の温度で活性化されるたんぱく質の揺らぎが重要といわれる。その揺らぎはたんぱく質が水和することによって生じることが分かっていたが、これまで水和水と揺らぎの関係はよく分からなかった。

たんぱく質の機能を発現するためには240℃近傍以上の温度で活性化されるたんぱく質の揺らぎが重要といわれる。その揺らぎはたんぱく質が水和することによって生じることが分かっていたが、これまで水和水と揺らぎの関係はよく分からなかった。