

実施課題名: 蛋白質立体構造のアンサンブル解析

【背景】

従来のNMRによる蛋白質立体構造決定は、ある一意の構造を決定するために可能な限り収束した構造を得ることを目指してきた。しかしながら、本来蛋白質は溶液中で揺らいでおり、ある存在確率を持った構造のアンサンブルとして存在しているはずである。そこで本課題では、従来のNOEと化学シフトなどの近距離情報に加えて、常磁性効果や残余双極子効果を利用した遠距離情報の取得し、複数のNMRデータをまとめて統計解析することで、より自然で、より複雑な蛋白質構造のアンサンブルを決定する手法の確立を目標とする。

【実施内容】

本課題は、手法の確立のために、複数のモデル蛋白質を使い(YUH1, ユビキチン直鎖ダイドメイン(diUB), GRB2)のNMR測定とその後のデータ解析を行った。課題期間中に、新たに、residual dipolar coupling (RDC), pseudo-contact shift (PCS), paramagnetic relaxation enhancement (PRE), chemical shift, NOEをすべてまとめて統合解析し、multi-stateの蛋白質立体構造計算が可能なアルゴリズムの開発に成功した。また本手法を蛋白質立体構造計算プログラムCYANAに実装した。YUH1蛋白質については、共同利用装置を利用することで、十分なデータを取得でき、新規アルゴリズムを用いて蛋白質のアンサンブル構造決定に成功した(Fig.1)。これにより、特にYUH1の活性部位の構造に大きなダイナミクスが存在することが分かり、YUH1の新たな酵素活性機構のモデルを提案することができた。本成果は、bioRxivで公表し、現在、学術専門誌に投稿中である。構造および化学シフトデータはPDBとBMRBにすでに登録済みである。diUBとGRB2などのマルチドメイン蛋白質の構造解析については、PCS, PRE, NOEなどの複数データの取得と、ドメイン配向決定に成功した(Fig.2)。特にdiUBは、X線結晶構造とは異なる溶液構造が得られており、現在論文投稿の準備を進めている。

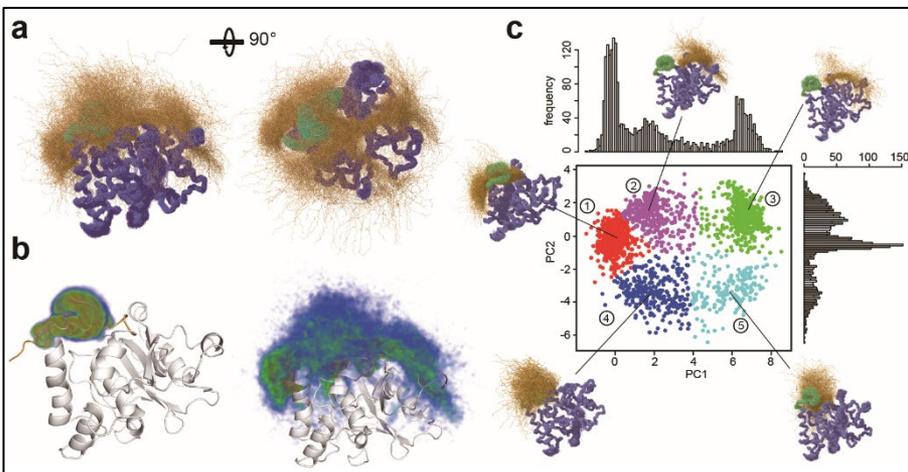


Fig.1 Free YUH1のアンサンブル構造 a,b, 5状態モデルを仮定した multi-state立体構造計算で得られたアンサンブル構造. c, 主成分分析で分析した構造分布.

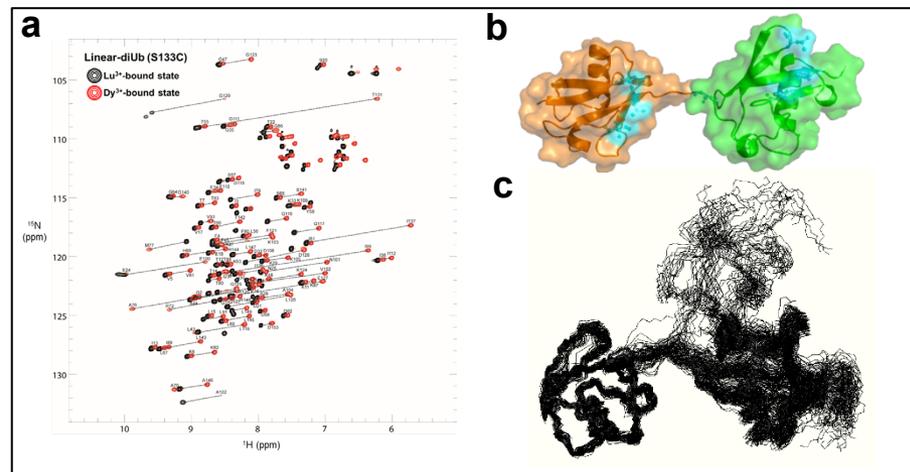


Fig.2 直鎖ダイユビキチンのドメイン配向決定. a, PCSデータ. b, 直鎖ダイユビキチンの変異箇所, c, 直鎖ダイユビキチンの溶液構造

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	PF18-01-R-021		
利用課題名	蛋白質立体構造のアンサンブル解析		
実施機関名	東京都立大学		
実施部署名	理学研究科 化学専攻		
実施責任者管理職名・氏名	職名	助教	氏名 池谷 鉄兵
実施部署所在地	東京都八王子市南大沢 1-1		
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。)	<p>従来の NMR による蛋白質立体構造決定は、ある一意の構造を決定するために可能な限り収束した構造を得ることを目指してきた。しかしながら、本来蛋白質は溶液中で揺らいでおり、ある存在確率を持った構造のアンサンブルとして存在しているはずである。近年、こうした揺らぎは、蛋白質の機能発現の鍵となることも明らかになっている。生体分子の溶液 NMR データは、溶液中の分子のアンサンブル情報であることから、データの解析には、複数状態の構造や存在確率分布を規定しモデル化することが、より自然なデータの解釈につながるはずである。申請者らは、これまでの研究で、NOE データからより統計的に尤もらしいアンサンブル構造を得るための新たな手法として、ベイズ統計を利用した新たな構造解析手法の開発を行ってきた (Ikeya et al, <i>Sci. Rep.</i> 2016)。また、従来の NOE と化学シフト由来の 2 面角角度情報などの近距離情報に加えて、常磁性効果や残余双極子効果を利用した遠距離情報の取得する試料調製法 (Hikone et al, <i>J. Bio. NMR</i> 2014)、NMR 計測法の手法開発 (Ikeya et al, <i>Nat. Protoc.</i> 2010) も進めてきた。本課題では、従来の NOE データによる構造解析に加え、こうした複数の NMR データをまとめて統計解析することで、より自然で、より複雑な蛋白質構造のアンサンブルを求める手法を確立することを目標とする。</p>		
利用実施時期、及び期間	<p>2019 年 1 月 4 日～2021 年 3 月 31 日</p> <p>総利用日数：75 日</p> <p><input type="checkbox"/>当初計画どおり・<input checked="" type="checkbox"/>当初計画変更 (変更理由)</p> <p>当初案より、少ない測定時間となった。コロナ禍により、試料調製が難しくなった点と、横浜に測定に行くことも難しい状況が続いたため。</p>		
利用施設 理化学研究所	NMR 装置	<p>利用装置①</p> <p>・ () 溶液 600MHz、() 溶液 700MHz、(○) 溶液 800MHz、</p>	

<p>(該当部分に○)</p>		<p>() 溶液 900MHz、() 固体 700MHz、() 固体 900MHz</p> <p>利用期間 1 : 2019 年 1 月 25 日～2019 年 1 月 27 日 (3 日間利用) 利用期間 2 : 2019 年 2 月 4 日～2019 年 2 月 11 日 (1 週間 1 日利用) 利用期間 3 : 2019 年 2 月 25 日～2019 年 3 月 3 日 (1 週間利用) 利用期間 4 : 2019 年 3 月 11 日～2019 年 3 月 17 日 (1 週間利用) 利用期間 5 : 2019 年 4 月 19 日～2019 年 4 月 24 日 (6 日間利用) 利用期間 6 : 2019 年 5 月 24 日～2019 年 5 月 26 日 (3 日間利用) 利用期間 7 : 2019 年 6 月 7 日～2019 年 6 月 9 日 (3 日間利用) 利用期間 8 : 2019 年 7 月 22 日～2019 年 7 月 24 日 (3 日間利用) 利用期間 9 : 2019 年 7 月 29 日～2019 年 8 月 1 日 (4 日間利用) 利用期間 10 : 2020 年 9 月 2 日～2020 年 9 月 6 日 (5 日間利用) 利用期間 11 : 2020 年 10 月 27 日～2020 年 11 月 5 日 (10 日間利用)</p>
		<p>利用装置②</p> <p>・ () 溶液 600MHz、(○) 溶液 700MHz、() 溶液 800MHz、 () 溶液 900MHz、() 固体 700MHz、() 固体 900MHz</p> <p>利用期間 1 : 2019 年 6 月 12 日～2019 年 6 月 16 日 (5 日間利用) 利用期間 2 : 2019 年 9 月 2 日～2019 年 9 月 8 日 (1 週間利用) 利用期間 3 : 2019 年 10 月 23 日～2019 年 10 月 24 日 (2 日間利用) 利用期間 4 : 2020 年 12 月 14 日～2020 年 12 月 15 日 (2 日間利用)</p>
<p>その他の 利用施設</p>	<p>他の設備の利用は無し。</p>	
<p>成果の 概要</p>	<p>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。)</p>	<p>蛋白質の構造とダイナミクスを可視化する新たな手法として、複数状態を仮定して立体構造計算を行う multi-state 立体構造計算法の開発を行った。モデル試料には、分子量 26.4kDa の酵母ユビキチンヒドロラーゼ 1 (YUH1) を選択した。YUH1 は、ユビキチン C 末端ヒドロラーゼ (UCHs) ファミリーに属し、ユビキチン蛋白質 (Ub) の C 末端から低分子ペプチドや付加物を切り離す機能を持つ。しかしながら、YUH1 のユビキチン認識の分子機構は未だ不明の点も多い。ここでは multi-state 立体構造計算法を free YUH1 に適用することで、YUH1 の新たな分子認識機構の理解につなげることを目標とした。解析には、NOE、化学シフト、PCS、PRE、RDC などの複数の NMR データを用いた。これらのデータを新規に開発した multi-state 立体構造計算により統合解析することで、free YUH1 のアンサンブル構造の可視化に成功した。今回、新規に開発した複数の NMR データの統合解析と multi-state 立体構造計算により、YUH1 の N 末端と crossover loop の大きなダイナミクスが明らかになった。</p> <p>また、multi-state 立体構造計算法の別の応用として、マルチドメイン蛋白質に適用を試みた。モデル試料として、直鎖ダイユビキチンを用いた。PCS、PRE を測定し、構造計算を行ったところ、結晶構造から予想されている open 型と closed 型の中間に位置する、semi-closed 型と言える構造が得られた。この結果は、直鎖ダイユビキチンは、溶液中では、結晶構造とは異なる状態の構造を保持している可能性を示唆している。</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>今回、新規に開発した複数の NMR データの統合解析と multi-state 立体構造計算法により、YUH1 の N 末端と crossover loop の大きなダイナミクスが明らかになった。当初 YUH1 は、multi-state 立体構造計算法の応用のためのモデル試料の 1 つでしか考えていなかったが、この領域のダイナミクスが予想以上に大きかったことから、この運動性の機能的意義を調べる研究の動機づけにつながった。YUH1 変異体を用いた酵素活性実験、相互作用実験、ダイナミクス解析の結果、N 末端の大きな運動性は YUH1 の酵素活性に大きな役割を担っていることが示唆された。これにより、YUH1 の N 末端は遊離したユビキチンを捕獲して、結合部位や酵素活性部位に導くという N 末端のユニークな機能を提案することができた。このように、multi-state 立体決定とダイナミクス解析から、この運動性の大きな領域の機能を明らかにするための新たな実験計画のデザインにつなげ、YUH1 の新しい分子認識機構を明らかにできた点は、当初目標を超える高い意義のある成果となった。</p>
<p>成果発表</p>	<p>(論文・著書) 報告者に下線 *責任著者, ※co-first author</p> <p>1. Okada, M., Tateishia, Y., Nojiri, E., Mikawa, T., Rajesh, S., Ogasa, H., Ueda, T., Yagi, H., Kohno, T., Kigawa, T., Shimada, I., Güntert, P., *Ito, Y., & *Ikeya, T., Multi-state structure determination and dynamics analysis reveals a new ubiquitin-recognition mechanism in yeast ubiquitin C-terminal hydrolase, biorxiv 2021.04.22.440356 (2021)</p> <p>2. *Ikeya, T., Güntert, P., & *Ito, Y., Protein Structure Determination in Living Cells, Int. J. Mol. Sci. 20(10), 2442 (2019)</p> <p>3. *伊藤隆, 猪股晃介, 三島正規, 池谷鉄兵, 「溶液 NMR および in cell NMR による金属結合タンパク質の動態解析, 生命金属ダイナミクス」 NTS 出版, 433-443 (2020)</p> <p>(学会発表)</p> <p>1. <u>Teppei Ikeya</u> and Yutaka Ito, "Multi-state protein structure determination by integrated analysis of several NMR data sets", 第 58 回 生物物理学会年会, オンライン, 2020 年 9 月 16-18 日 (招待講演)</p> <p>2. 渡邊吏輝, プバティ マキシム サイーシュ, 末元雄介, 木川隆則, 三島正規, 猪股晃介, 池谷鉄兵, 伊藤隆, "NMR を用いたアダプター蛋白質 Drk の動態解析", 第 59 回 NMR 討論会, 群馬県前橋 2020 年 11 月 17-19 日</p> <p>3. 田端真彩子, 池谷鉄兵, 美川務, 川端庸平, 安藤考史, 館野桂太, 三島正規, 伊藤隆, "PRE, PCS を用いたマルチドメイン蛋白質 Grb2 の立体構造解析", 第 59 回 NMR 討論会, 群馬県前橋 2020 年 11 月 17-19 日</p> <p>4. 池谷鉄兵, "生きた細胞中でのタンパク質立体構造決定法の開発", 神奈川大学湘南ひらつかキャンパス開設 30 年記念シンポジウム, 神奈川県平塚市, 2019 年 6 月 19 日 (招待講演)</p> <p>5. Yutaka Ito, <u>Teppei Ikeya</u> "Solution NMR approaches to 3D structure determination of proteins in living eukaryotic cells" 33rd Annual Symposium of the Protein Society, Seattle, USA, 2019 年 6 月 30 日-7 月 3 日 (招待講演)</p>

		<p>6. <u>Teppei Ikeya</u>, Yutaka Ito “High resolution protein 3D structure determination in living eukaryotic cells”, the 8th Asia Pacific NMR Symposium, Singapore, 2019年7月3-6日 (招待講演)</p> <p>7. <u>池谷鉄兵</u>, “MD シミュレーション vs NMR 立体構造計算 (multi-state 立体構造計算)” 第20回若手NMR研究会, 愛知県蒲郡, 2019年8月2-4日 (招待講演)</p> <p>8. 伊藤隆, <u>池谷鉄兵</u> +B14 “溶液NMRを用いた in situ 構造生物学” 第13回バイオ関連化学シンポジウム2019 2019年9月5日、仙台 (招待講演)</p> <p>9. Hisham Dokainish, Yusuke Suemoto, <u>Teppei Ikeya</u>, Takuma Kasai, Takanori Kigawa, Yutaka Ito, Yuji Sugita, “Dynamics and interdomain interactions in a Drosophila adapter protein (Drk) and their correlation to the unfolding of the N-SH3 domain”, 第57回日本生物物理学会年会, 宮崎, 2019年11月24-26日</p> <p>10. <u>池谷鉄兵</u>, “磁性効果による遠距離構造情報を利用したタンパク質 multi-state 立体構造解析”, 第58回NMR討論会, 川崎, 2019年11月7-9日 (招待講演)</p> <p>11. 田岸亮馬, 田中孝, 三島正規, <u>池谷鉄兵</u>, 伊藤隆, “分子クラウディング環境下の蛋白質の緩和解析”, 第58回NMR討論会, 川崎, 2019年11月7-9日</p> <p>12. 田端真彩子, <u>池谷鉄兵</u>, 彦根佑哉, 岡田真由, 田岸亮馬, 八木宏昌, 木川隆則, 三島正規, 伊藤隆, “PRE, PCS を用いた蛋白質立体構造解析のための常磁性金属タグの性能評価”, 第58回NMR討論会, 川崎, 2019年11月7-9日</p> <p>13. 亀井駿, <u>池谷鉄兵</u>, 田仲加代子, 伊藤隆, “分子混雑環境下の Ras 蛋白質の動態解析”, 第58回NMR討論会, 川崎, 2019年11月7-9日</p> <p>14. 立石泰, <u>池谷鉄兵</u>, 岡田真由, 三島正規, 美川務, 八木宏昌, 河野俊之, 木川隆則, 伊藤隆, “常磁性 NMR を用いた Yeast Ubiquitin hydrolase 1 (YUH1) の構造決定及びダイナミクス解析” 第58回NMR討論会, 川崎, 2019年11月7-9日</p> <p>15. <u>Teppei Ikeya</u>, “Multi-state protein structure determination by integrated analysis of several NMR data sets”, IPR seminar, Osaka, 2019年11月19-20日 (招待講演)</p>
	<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>本課題で開発した multi-state 立体構造計算を様々な別の蛋白質に応用し、これらの分子の立体構造とダイナミクスの可視化を試みる。具体的には、マルチドメイン蛋白質(MDP)や天然変性蛋白質(IDP)など、運動性が非常に大きな領域を持つ蛋白質に応用する。得られた構造の分布から生物学的機能と結びつけることを目指す。さらに、本課題で開発した multi-state 立体構造計算を、ベイズ推定を用いた解析と統合する。さらに、複数の異なる NMR データ(PCS, PRE, RDC など)と SAXS、ESR などの他の計測データを包括的に解析し、統計的により尤もらしい構造アンサンブルをデータから抽出可能な統計解析法を開発する。</p>

<p>社会・経済への波及効果の見直し (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>創薬研究分野では、蛋白質立体構造情報を利用した構造基盤薬物設計 (Structural Based-Drug Discovery; SBDD) が、効率的な薬剤設計法として確立している。本課題のアンサンブル構造解析が確立できれば、生体分子の揺らぎを含めた形で、蛋白質-低分子化合物、蛋白質間相互作用等を解析可能となり、こうした情報の蓄積により SBDD 研究にも全く新しい知見を提供できる。また、ここで開発した統計解析のソフトウェアの世界への普及、全世界の生体系 NMR のグループが本技術を共有できるよう世界に還元していくことも本提案の課題の1つである。本提案で開発した新規手法を組み込んだ新しい CYANA パッケージのリリースを行う。CYANA はすでに世界の NMR 研究者の標準ソフトウェアとなっていることから、本手法の普及への障害はない。さらに、CYANA パッケージの現ウェブサイト (CYANA Wiki; http://www.cyana.org/) の拡張を行い、この中で詳細な実験評価データやアンサンブル構造解析に関する実践的なガイドライン等を提供していくことで、世界の生体系 NMR 研究者と情報の共有を図り、本領域の一層の発展に貢献する。</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>自由度の高い形式で使用させていただき、測定環境に関してとても満足している。特に、昨年度から始まった TeamViewer による遠隔操作の導入などは、ユーザにとって利便性が大きく向上した。</p> <p>1点、他のユーザが使用している際には、その装置のユーザのホームディレクトリにアクセスできない点が、少々不便に感じた。また、装置利用の効率化のために、各装置の予約状況が、外部からも確認できるシステムがあると良いのではないかと考える。装置の空き状況に応じた実験計画が立てられるため、ユーザにとっても大変便利になると思われる。</p> <p>施設内のスタッフの方の説明も丁寧で、トラブルなどにも迅速に対応していただいたおかげで、測定に支障が出ることはなかった。ご担当して下さったスタッフの皆様には、この場を借りて感謝いたしたいと思います。</p>
<p>今後の NMR 共用プラットフォームに対する期待</p>	<p>世界の高磁場施設は、1GHz を超える NMR 装置が複数台導入されている。日本の共用プラットフォームにおいても、海外研究との競争維持のためにも、1.2GHz などの超高磁場装置の導入と一般への利用開放を期待する。</p>
<p>成果公開延期の希望の有無</p>	<p>なし</p>
<p>その他</p>	<p>特に無し。</p>