

実施課題名: NMRと高速原子間力顕微鏡による小胞体内シャペロンの動的構造解析

【背景】

リボソームによって合成された新生タンパク質は、高次構造の形成や翻訳後修飾によって活性を持った天然状態へと成熟していく。特に、多くの新生タンパク質の成熟がおこる小胞体においては、protein disulfide isomerase (PDI) ファミリーをはじめとする多種のシャペロンが機能しているが、そのメカニズムの詳細は謎に包まれている。そこで本研究では、小胞体シャペロンを対象とした統合的構造解析によって、小胞体シャペロンの作用機序を解明することを目指した。

【実施内容】

本研究では小胞体シャペロンについてのNMRによる構造・ダイナミクス解析を行った。特に、小胞体シャペロンP5についてのNMR解析について取り組んだ。申請者らのこれまでの研究によって、P5はN末端ドメインを介して2量体を形成し、その2量体形成が活性に重要であることが明らかにされている。さらに、結晶構造解析によって、P5 N末端ドメインは、ロイシンジッパーと類似の新規相互作用様式によって量体を形成していることが明らかになった。ここで、この2量体形成がP5ドメインの構造安定性に与える影響を評価するために、結晶構造に基づいたアミノ酸変異によって単量体化した試料に対し、NMR測定を行った。NMR信号を帰属した後に、野生型と変異体でのNMR信号変化を評価した結果、P5 N末端ドメインは、2量体形成によってドメインのフォールドを安定化しており、単量体への解離によってドメイン構造が不安定化することが明らかになった。細胞内P5単量体の過剰発現は今回小胞体ストレスを引き起こすことを明らかにしたが、本研究によってそのメカニズムの一端が明らかになった。

参考文献: Okumura, Saio, Kumeta, et al. 2021 *Structure* S0969-2126, 00114-3.

• Fig.1

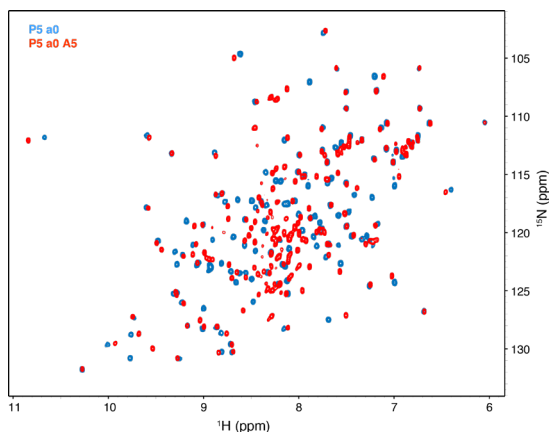


Fig.1 P5 a0ドメインの単量体化変異体と野生型のNMRスペクトル。二量体界面のアミノ酸残基をAlaに変異させたA5変異体では多数の信号が変化している。

• Fig.2

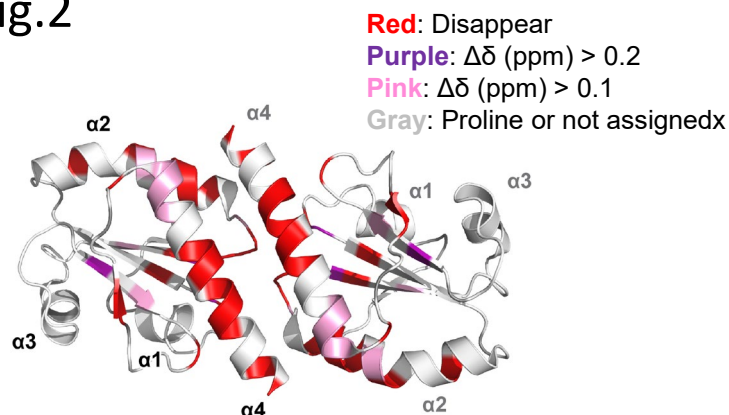


Fig.2 P5 A5変異体での信号変化のマッピング。二量体界面および周辺領域に由来する多数の信号から変化が観測され、P5 a0ドメインの構造が単量体化によって影響を受けていることが示唆された。

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

課題受付番号	PF19-01-H-026		
利用課題名	NMR と高速原子間力顕微鏡による小胞体内シャペロンの動的構造解析		
実施機関名	東北大学		
実施部署名	学際科学フロンティア研究所		
実施責任者管理職名・氏名	職名	助教	氏名 奥村 正樹
実施部署所在地	仙台市青葉区荒巻字青葉 6-3		
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>リボソームによって合成された新生タンパク質は、高次構造の形成や翻訳後修飾によって活性を持った天然状態へと成熟していく。特に、多くの新生タンパク質の成熟がおこる小胞体においては、protein disulfide isomerase (PDI) ファミリーをはじめとする多種のシャペロンが機能しているが、そのメカニズムの詳細は謎に包まれている。一方で、このようなタンパク質フォールディング制御の破綻は神経変性疾患や糖尿病などの様々な重篤疾患を引き起こすため、疾病治療や予防の観点からも、小胞体内シャペロンの作用機序解明が望まれている。</p> <p>申請者はこれまでに、高速原子間力顕微鏡 (hsAFM) を主体としたアプローチによって、フォールディング補助において PDI が大きな構造変化と二量体形成を繰り返しながら機能していることを明らかにしている。生化学的アッセイからも、このような動的な構造変化が PDI の活性に重要であることが示されているが、その詳細なメカニズムは未だ明らかにされていない。さらに、PDI だけではなく、P5 などの他の小胞体シャペロンの機能においても、動的な性質が重要であることが明らかになっている。</p> <p>そこで申請者は、溶液 NMR 法を取り入れた研究を展開する。高速 AFM から得られる連続的な構造変化についての情報に対し、NMR から得られる原子分解能での立体構造情報とダイナミクスに関する情報を組み合わせることによって、動的に機能する小胞体シャペロンの機能する姿を可視化し、フォールディング制御の詳細なメカニズムを明らかにする。</p>		
利用実施時期、及び期間	2019 年 12 月 1 日～2021 年 3 月 31 日 総利用日数：26 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 北海道大学	NMR 装置 (該当部分に ○)	利用装置① ・ () 溶液 600MHz、() 溶液 700MHz、(○) 溶液 800MHz (migi)、 () 溶液 950MHz、() 固体 950MHz 利用期間 1：2020 年 7 月 30 日～2020 年 8 月 10 日 利用期間 2：2020 年 8 月 14 日～2020 年 8 月 20 日	

		<p>利用装置②</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ () 溶液 600MHz、() 溶液 700MHz、(○) 溶液 800MHz (hidari)、 () 溶液 950MHz、() 固体 950MHz <p>利用期間 1 : 2020 年 8 月 14 日～2020 年 8 月 20 日</p>
<p>その他の 利用施設</p>		<p>該当なし。</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>本研究ではまず、PDI シャペロンと基質タンパク質との複合体についての NMR による構造・ダイナミクス解析を行った。構造解析のために、PDI が持つ活性システインを変異させた変異体を設計し、基質タンパク質との複合体の長期安定性を担保することを旨とした。作成した PDI 変異体について安定同位体標識試料を作成し、3次元 NMR 測定を行った。得られたデータに基づき、BMRB 登録情報を参照しながら帰属を行った。さらに、基質タンパク質との相互作用解析についても行い、基質認識に使われる PDI の領域について推定した。</p> <p>本研究ではさらに、小胞体シャペロン P5 についての NMR 解析についても取り組んだ。申請者らのこれまでの研究によって、P5 は N 末端ドメインを介して 2 量体を形成し、その 2 量体形成が活性に重要であることが明らかにされている。さらに、結晶構造解析によって、P5 N 末端ドメインは、ロイシンジッパーと類似の新規相互作用様式によって量体を形成していることが明らかになった。ここで、この 2 量体形成が P5 ドメインの構造安定性に与える影響を評価するために、結晶構造に基づいたアミノ酸変異によって単量体化した試料に対し、NMR 測定を行った。NMR 信号を帰属した後に、野生型と変異体での NMR 信号変化を評価した結果、P5 N 末端ドメインは、2 量体形成によってドメインのフォールドを安定化しており、単量体への解離によってドメイン構造が不安定化することが明らかになった。細胞内 P5 単量体の過剰発現は小胞体ストレスを引き起こすことを今回明らかにしたが、本研究によってそのメカニズムの一端が明らかになった。以上の成果の一部は、Structure 誌に論文発表した。</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>本研究では、当初は小胞体シャペロンPDIについてのコンフォメーション変化について常磁性プローブを用いて解析することを主眼としていたが、研究を進める中で、常磁性プローブに限定せず総合的に解析する必要が出てきたため、PDI シャペロンと基質タンパク質との相互作用の解析や、P5 シャペロンの二量体ドメインの安定性の評価などを含めた解析を実施した。一方で、新たに取り入れた実験系は、小胞体シャペロンの作用機序を、立体構造とダイナミクスの観点から分子レベルで明らかにするという当初の目的に合致したものである。PDI シャペロンについては、基質タンパク質との複合体構造解析や、常磁性プローブを用いたコンフォメーション解析のためのNMR信号帰属や相互作用解析が進み、また、P2 シャペロンについては、変異体を用いたNMR観測により、2量体形成によるドメイン構造安定化のメカニズムの一端が明らかになるなどの成果が得られた (Okumura, Saio, Kumeta et al. 2021 Structure)。</p>
<p>成果発表</p>	<p>【英文】: A unique leucine-valine adhesive motif supports structure and function of protein disulfide isomerase P5 via dimerization Okumura, M., Kanemura, S., Matsusaki, M., Kinoshita, M., Saio, T., Ito, D., Hirayama, C., Kumeta, H., Watabe, M., Amagai, Y., Lee, Y.H., Akiyama, S., and Inaba, K. Structure Apr 9:S0969-2126(21)00114-3. 【和文】: 学会発表、第21回蛋白質科学会年会、ポスター発表予定。</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>本研究ではこれまでに、小胞体シャペロンPDIの基質認識メカニズムとP5の2量体形成メカニズムの一端を明らかにした。今後は、PDIについては基質タンパク質との複合体立体構造解析を進めることにより、基質認識メカニズムについてより詳細に理解することを目指す。また、常磁性プローブを用いてドメイン配置についての情報を取得することで、溶液中でのPDIの動的構造を観測し、また基質タンパク質との結合による影響を評価する。P5については、これまでの申請者らの研究によって、カルシウムイオンが結合することが明らかになったが、カルシウムイオンの結合部位、さらにはカルシウムイオンがP5の立体構造に与える影響について評価する。</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>本研究では、NMR を用いることで、小胞体シャペロン PDI の基質認識メカニズムと P5 の 2 量体形成メカニズムの一端を明らかにした。さらに本研究では、NMR に加えて、X 線結晶構造解析や SAXS、生化学実験などを用いた統合的な戦略によって、小胞体シャペロンによる小胞体内タンパク質の品質管理メカニズムを明らかにした。小胞体シャペロンは、小胞体だけではなく細胞外にも存在することが知られ、様々な整理機能や神経疾患や糖尿病などの複数の疾患との関連が明らかにされている。そのため、本研究で得られた成果は医学研究・創薬研究の分野にインパクトを与え、疾患治療法・予防法の開発につながると期待される。さらに、本研究で推進した統合的解析構造生物学研究は、動的な性質を持ち、弱い相互作用によって機能する多くのタンパク質に対する有効な構造解析戦略となると期待される。</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>本研究では北海道大学の NMR 装置を利用しました。測定に際しては、サンプルを郵送し、リモートでの測定をするなど、移動制限がある中でも効率的に測定を実施することができました。測定を進めるにあたって、北海道大学 久米田 博之 博士には、測定試料の受け取りなどの実務的なところから、リモート環境の整備、測定や結果の解釈における技術的な助言など、多大なるご支援をいただきました。久米田博士のご協力なしには、このコロナ禍においてここまで効率的に研究を進めることは困難だったと思います。このような、高度な技術と手厚いサポートの体制は、北海道大学の NMR 施設の特色の一つであると思います。今後とも、このような特色を維持、発展させていただけると、大変有り難く存じます。</p>
<p>今後の NMR 共用プラットフォームに対する期待</p>	<p>構造解析技術が多様化・高度化する現状では、複数の手法を適切に用い、相補的に組み上げていく統合的構造解析の重要性は高まっています。その実現のためには、大型の機器と、それを使いこなす高い技術を持った管理者による共用事業が非常に重要であると考えます。今後とも、このような機器共用の仕組みが継続され、恒常的な基盤として定着することを期待します。</p>
<p>成果公開延期の希望の有無</p>	<p>() あり : (○) なし 「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>