

## 実施課題名：NMR分光法による球状および天然変性タンパク質の機能発現ダイナミクスの解析

## 【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。)

タンパク質の機能発現機構を解明するためには、タンパク質構造のダイナミクスを調べる必要がある。天然変性タンパク質(IDP)は、生理的条件下では特定の構造を持たないが、標的分子を認識・結合するという機能発現と同時にフォールディングする。そのメカニズムは $R_2$ 緩和分散法というNMR分光法で解明できるが、そのような研究例は少ない。そこで本研究では、さまざまなIDPの機能発現機構の統一的理解という最終目標のために、c-JunというIDPが標的分子と結合する反応を $R_2$ 緩和分散法で測定することを目的とした。

## 【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。)

天然変性タンパク質c-Junの天然変性領域(IDR)が、球状タンパク質である転写コアクチベーターCBPのKIXドメインと結合する反応を詳細に調べた。まず、c-Jun IDRの単独状態、および、KIX結合状態における主鎖帰属を行った。また、c-Jun IDRのリン酸化を模倣した変異体に対しても同様の実験を行った。その結果、化学シフト摂動から、c-JunとKIXとの結合部位についての知見が得られた。また、c-Jun IDRの一部は25%ほどの $\alpha$ ヘリックス構造を形成していたが、KIXとの結合によってヘリックス構造が安定化される様子が見られた(Fig. 1)。

次に、c-Jun IDRの野生型と変異体のそれぞれがKIXと結合する反応を、 $R_2$ 緩和分散法で測定した。c-Jun IDRの野生型では緩和分散はほとんど観測されなかったが、c-Jun IDRのリン酸化模倣変異体では、KIXとの結合に伴う $R_2$ 緩和の分散を観測することができた。このことは、c-Jun IDR変異体とKIXとの反応はマイクロ秒からミリ秒の時間域で起き、野生型よりも強く結合することを示唆している。

• Fig.1

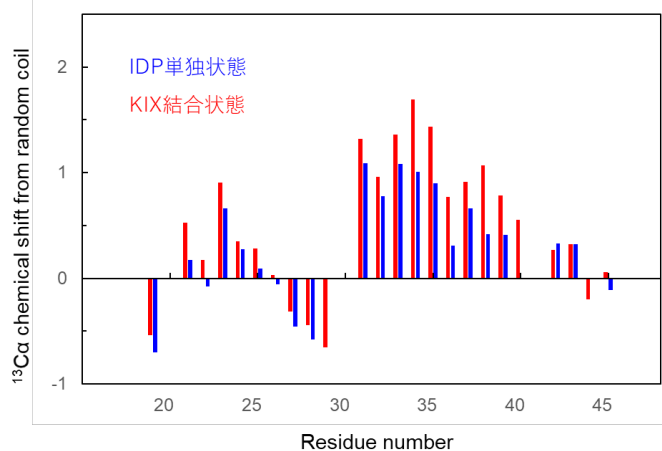


Fig.1説明：c-Jun IDRのリン酸化模倣変異体の化学シフトインデックス。この値が大きいほどヘリックスが形成されていることを示す。

• Fig.2

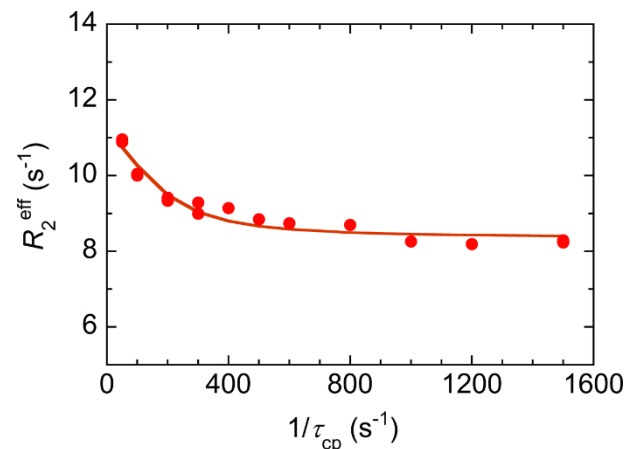


Fig.2説明：c-Jun IDRのリン酸化模倣変異体とKIXタンパク質との共存下で測定された $R_2$ 緩和分散曲線の例。

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                                                       | PF20-01-R-028                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |    |    |       |
| 利用課題名                                                        | NMR 分光法による球状および天然変性タンパク質の機能発現ダイナミクスの解析                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |    |    |       |
| 実施機関名                                                        | 東京大学                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |    |    |       |
| 実施部署名                                                        | 大学院総合文化研究科 広域科学専攻 生命環境科学系                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |    |    |       |
| 実施責任者管理職名・氏名                                                 | 職名                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | 教授 | 氏名 | 新井 宗仁 |
| 実施部署所在地                                                      | 東京都目黒区駒場 3-8-1                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |    |    |       |
| 本課題の概要・目的<br>(字数制限はありませんが<br>400 字～600 字以内(程度)で<br>お書きください。) | <p>タンパク質はダイナミックに運動することによって機能を発揮するため、タンパク質構造のダイナミクスを明らかにすることは、タンパク質の機能発現機構を解明するために必要不可欠である。本研究では特に、天然変性タンパク質による分子認識機構の解明を目指した研究を行う。</p> <p>天然変性タンパク質 (IDP) は高等生物が持つタンパク質の約 4 割を占めることから、その機能発現機構の解明が重要課題である。IDP は生理的条件下では特定の構造を持たないが、標的分子を認識・結合するという機能発現と同時にフォールディングする。そのメカニズムとして、誘導適合機構と構造選択機構の 2 つが提唱されている。両者の違いは、結合とフォールディングの順序であり、結合が速ければ誘導適合機構、フォールディングが速ければ構造選択機構になる。我々は以前、<math>R_2</math> 緩和分散法という NMR 分光法を用いて、c-Myb という IDP が構造選択機構と誘導適合機構の両方を用いて標的タンパク質と結合することを明らかにした (Arai <i>et al.</i> (2015) <i>PNAS</i>, 112, 9614)。しかし、このような研究例は少ない。</p> <p>そこで本研究では、さまざまな IDP による機能発現機構を統一的に理解するという最終目標のために、c-Myb 以外の IDP による標的分子結合反応を <math>R_2</math> 緩和分散法で測定する。具体的には、転写因子である c-Jun が、転写コアクチベーター CBP (CREB 結合タンパク質) の KIX ドメインという球状タンパク質と結合する反応の測定を行う。</p> |    |    |       |
| 利用実施時期、及び期間                                                  | 2020 年 4 月 1 日～2021 年 3 月 31 日                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |    |    |       |
|                                                              | 総利用日数 : 8 日                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |    |    |       |
|                                                              | <input type="checkbox"/> 当初計画どおり・ <input checked="" type="checkbox"/> 当初計画変更<br>(変更理由)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |    |    |       |
|                                                              | 新型コロナウイルス感染症対策のために大学への登校や学内での研究時間に制限                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |    |    |       |

|                |                                                          |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
|----------------|----------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                |                                                          | があり、サンプルの準備が当初の予定通りに進まなかったため。                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
| 利用施設<br>理化学研究所 | NMR装置<br>(該当部分に<br>○)                                    | <p>利用装置①</p> <p>・ (○) 溶液 600MHz、( ) 溶液 700MHz、( ) 溶液 800MHz、<br/>( ) 溶液 900MHz、( ) 固体 700MHz、( ) 固体 900MHz</p> <p>利用期間 1 : 2021 年 3 月 1 日～2021 年 3 月 3 日 (3 日間利用)<br/>利用期間 2 : 2021 年 3 月 8 日～2021 年 3 月 10 日 (3 日間利用)<br/>利用期間 3 : 20 年 月 日～20 年 月 日</p> <hr/> <p>利用装置②</p> <p>・ ( ) 溶液 600MHz、(○) 溶液 700MHz、( ) 溶液 800MHz、<br/>( ) 溶液 900MHz、( ) 固体 700MHz、( ) 固体 900MHz</p> <p>利用期間 1 : 2021 年 3 月 9 日～2021 年 3 月 10 日 (2 日間利用)<br/>利用期間 2 : 20 年 月 日～20 年 月 日<br/>利用期間 3 : 20 年 月 日～20 年 月 日</p>                                                                                                                                                                                                                                             |
| その他の<br>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<br>概要      | <p>実施内容<br/>(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>※申請書との整合性にご配慮ください。</p> <p>本研究では、天然変性タンパク質である c-Jun が、球状タンパク質である転写コアクチベーターCBP の KIX ドメインと結合する反応を詳細に調べた。まず、c-Jun の天然変性領域 (IDR) 断片と KIX タンパク質を大腸菌で大量発現後に精製した。c-Jun については、<sup>15</sup>N ラベル体と、<sup>13</sup>C,<sup>15</sup>N ラベル体を作製した。その後、c-Jun IDR の単独状態、および、KIX 結合状態における主鎖 H<sub>N</sub>、C<sub>α</sub>、CO と C<sub>β</sub> の化学シフトの帰属を行った。また、c-Jun の IDR 領域の 2 ヶ所がリン酸化されると、標的タンパク質との結合様式が変わることが報告されている。そこで、2 ヶ所のリン酸化部位のセリン残基をそれぞれアスパラギン酸に置換し、リン酸化を模倣した c-Jun IDR の変異体を作製後、これについても同様に、単独状態と KIX 結合状態でのピーク帰属を行った。以上の測定は、600 MHz の装置を用いて行った。</p> <p>次に、c-Jun IDR の野生型と変異体のそれぞれについて、球状タンパク質 KIX との結合機構を反応速度論的な観点から解明するために、R<sub>2</sub> 緩和分散法を用いて、c-Jun の IDR が KIX と結合する反応の測定を行った。この測定では、複数の磁場を用いて測定する必要があるため、600 MHz と 700 MHz の両方の装置を用いて測定した。</p> |
|                | <p>本課題により得られた成果と当初目標との比較<br/>(字数制限はありませんが 400 字～</p>     | <p>c-Jun IDR 単独状態と KIX 結合状態での NMR スペクトルの化学シフト摂動から、c-Jun と KIX との結合部位についての知見が得られた。また、c-Jun IDR の一部は 25%程度のヘリックス構造を形成していたが、KIX との結合に伴ってヘリックス構造が安定化される様子が見られた。さらに、リン酸化を模倣した変異体では、単独状態においてもこのヘリックス構造がやや安定化されていることが示唆され</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |

|                                                             |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
|-------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p>800 字以内 (程度) で<br/>お書きください。</p>                          | <p>た。</p> <p>次に、<math>R_2</math> 緩和分散法で c-Jun IDR の野生型と変異体がそれぞれ KIX と結合する反応を測定した。この測定法では、マイクロ秒からミリ秒の時間域で結合・解離反応が起きる場合には、CPMG パルスを入れる時間間隔に応じて <math>R_2</math> 緩和速度が変化する様子が見られる。測定の結果、c-Jun IDR の野生型では <math>R_2</math> 緩和の分散を確認することが難しく、結合・解離反応の速度がマイクロ秒からミリ秒のタイムスケールよりも遅いことが示唆された。これに対し、c-Jun IDR のリン酸化模倣変異体では、KIX との結合に伴う <math>R_2</math> 緩和の分散を観測できたことから、この反応がマイクロ秒からミリ秒の時間域で起き、野生型よりも強く結合することが示された。</p> <p><math>R_2</math> 緩和分散法を用いてタンパク質間の結合反応機構を詳細に解明するためには、IDR と KIX との混合比を 3~4 つ程度変えた <math>R_2</math> 緩和分散測定を、2 つの磁場で測定する必要がある。当初はここまで実施することを計画していたが、試料調製や、<math>R_2</math> 緩和分散が観測できる条件検討等に時間を要したため、実施できていない。また当初は、酵素反応のダイナミクスを <math>R_2</math> 緩和分散法で測定することも計画していたが、新型コロナウイルス感染症対策のために大学への入構や研究時間が制限されたことにより、計画通りに実施することができなかった。しかし、本研究によって、c-Jun IDR のリン酸化模倣変異体では <math>R_2</math> 緩和分散が観測されることが明らかになったため、今後はこのサンプルを用いて、複数の混合比での測定を行う予定である。</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>本課題研究による成果は、原著論文としてまとめて発表するとともに、学会などにおいても発表する予定である。</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| <p>今後の展開<br/>(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><math>R_2</math> 緩和分散法を用いてタンパク質間の結合反応機構を詳細に解明するためには、IDR と KIX との混合比を 3~4 つ程度変えた <math>R_2</math> 緩和分散測定を、2 つの磁場で測定する必要がある。本研究によって、c-Jun IDR のリン酸化模倣変異体では <math>R_2</math> 緩和分散が観測されることが明らかになったため、今後はこのサンプルを用いて、複数の混合比での測定を行う。タンパク質の結合機構としては、誘導適合機構と構造選択機構という 2 つの代表的なメカニズムがあるが、<math>R_2</math> 緩和分散測定の結果からこれらのメカニズムのうちのどちらで結合するのかを解明することが可能となる。</p> <p>今後は、本研究で用いた手法をさまざまな IDP に適用することによって、IDP による標的分子認識機構の統一的な描像が明らかになると期待される。さらに、本研究の手法は酵素などの球状タンパク質にも適用することが可能であり、当初予定し</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |

|                                                                  |                                                                                                                                                                                                                     |                                           |
|------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------|
|                                                                  |                                                                                                                                                                                                                     | <p>ていた酵素反応ダイナミクスの解明にも適用していくことを予定している。</p> |
| <p>社会・経済への波及効果の見直し<br/>(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>天然変性タンパク質 (IDP) は様々な疾患と密接にかかわっており、創薬のターゲットにもなっている。しかし IDP は構造をダイナミックに変化させて標的分子を認識することから、IDP に対する創薬を実現するためには、IDP の構造やダイナミクス、標的分子との結合機構などを詳細に調べることが必要である。本研究で得られるこうした知見は将来、IDP に対する医薬品を開発する際に重要な知見をもたらすと期待される。</p> |                                           |
| <p>利用における感想<br/>(改善要望等を含む)<br/>利用周辺環境に関する希望</p>                  | <p><i>※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。</i></p> <p>手厚いサポートをしていただきまして、誠にありがとうございました。特に長島先生と林先生には大変お世話になりました。この場をお借りして御礼申し上げます。</p>                                  |                                           |
| <p>今後の NMR 共用プラットフォームに対する期待</p>                                  | <p>最先端利用開発では無料で高分解能の装置を利用でき、大変ありがたいです。今後も、通常よりも安価で利用できる方式をご検討いただけましたら幸いに存じます。</p>                                                                                                                                   |                                           |
| <p>成果公開延期の希望の有無</p>                                              | <p><i>※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。</i></p> <p>( ) あり : ( O ) なし<br/>「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>                                                                                                                                                                                        |                                           |