

実施課題名 : apoEタンパク質によるNε-ピロール化リジン認識の分子機構の解析

【背景】リジン残基のNε-ピロール化は生体内で見いだされた化学修飾の一つで、Nε-ピロール化リジン化されたタンパク質はDNA様分子として認識されること (Miyashita *et al.*, *Sci. Rep.* 4, 5343, 2014)、酸化脂肪酸由来物質によりタンパク質表面のリジン残基が化学修飾を受けNε-ピロール化リジン (Lys(Pyr)) となること (Chikazawa *et al.*, *J. Biol. Chem.* 295, 7697, 2020)、およびLys(Pyr)含有タンパク質が生体内でapoEタンパク質のN末端ドメイン (apoE NTD) に認識され、血清中のN-ピロール化リジン含有タンパク質含有濃度が低下すること (Hirose *et al.*, *J. Biol. Chem.* 294, 11035, 2019) がこれまでに明らかになっている。本課題の目的は、apoE NTD (約190残基) によるLys(Pyr)の認識について、アミノ酸残基単位での寄与を明らかにすることである。本研究により、apoEタンパク質がLys(Pyr)をどのように認識するかが明らかになり、生活習慣病や自己免疫疾患との関連が示唆されるLys(Pyr)含有タンパク質の低減メカニズムを原子レベルで説明できるようになると期待される。

【実施内容】¹³C,¹⁵N-標識apoE NTD単独、および¹³C,¹⁵N-標識apoE NTDにピロール化リジンを過剰量 (モル濃度比で14倍量) 添加した2種類のサンプルについて、¹H-¹⁵N HSQCのピークの帰属を行うために、HSQC、CBCA(CO)NH、HNCACBのスペクトルを測定していただいた。

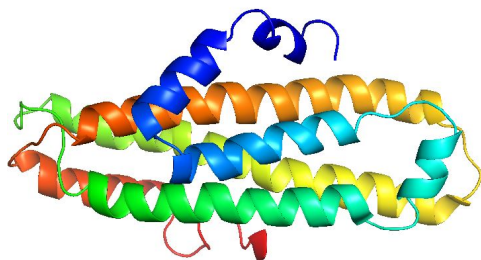
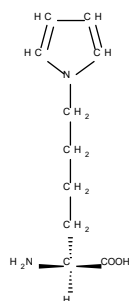
事前に自前の500 MHz NMR分光計を用いて、¹⁵N-標識apoE NTDとピロール化リジンとのHSQCを測定していたが、タンパク質濃度が0.15 mMと低かったため、全残基の信号を観測できずにいた。

今回の測定では、タンパク質濃度を2.0 mMに上げることでS/Nを向上させ、全残基の信号を観測し、帰属することを計画した。

しかし、実際に観測されたシグナルの数はむしろ減っており、タンパク質濃度を2.0 mMに上げたことで、apoE NTDタンパク質が会合または凝集してしまったことが強く示唆された。ピロール化リジンの有無により、観測されたシグナルに顕著な違いは見られなかった。

今回は、BMRBに登録されているapoEのNMRデータを参考に測定条件を決定したが、NMRスペクトルを測定する際に、タンパク質の会合・凝集にもっと注意を払うべきであった。今後、測定条件を改善し、再測定により、apoE NTDのピロール化リジン結合部位を特定できればと考えている。

- Fig.1 ピロール化リジンとapoE NTDの相互作用



ピロール化リジン

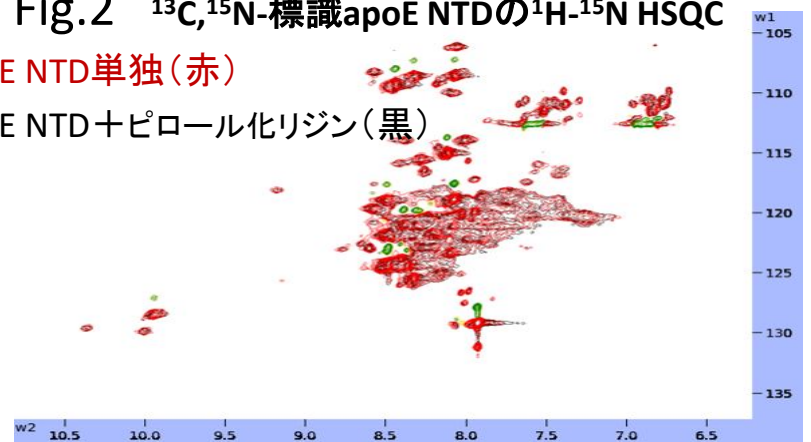
apoEタンパク質N末端ドメイン (NTD)

apoEはNε-ピロール化リジン含有タンパク質に結合し血中の修飾タンパク質濃度を低下させる。

- Fig.2 ¹³C,¹⁵N-標識apoE NTDの¹H-¹⁵N HSQC

apoE NTD単独 (赤)

apoE NTD+ピロール化リジン (黒)



シグナルの重なりが大きいこともあり、ピロール化リジン添加による顕著な違いは見出だされていない。

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-Y-031		
利用課題名	apoE タンパク質による Nε-ピロール化リジン認識の分子機構の解析		
実施機関名	東京大学 大学院農学生命科学研究科 応用生命化学専攻		
実施部署名	食品生物構造学研究室		
実施責任者管理職名・氏名	職名	教授	氏名 永田 宏次
実施部署所在地	東京都文京区弥生 1-1-1		
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>リジン残基の Nε-ピロール化は生体内で見いだされた化学修飾の一つで、Nε-ピロール化リジン化されたタンパク質は DNA 様分子として認識されること (Miyashita et al. and Uchida, Sci. Rep. 4, 5343, 2014)、酸化脂肪酸由来物質によりタンパク質表面のリジン残基が化学修飾を受け Nε-ピロール化リジン (Lys(Pyr)) となること (Chikazawa et al. and Uchida, J. Biol. Chem. 295, 7697, 2020)、および Lys(Pyr) 含有タンパク質が生体内で apoE タンパク質の N 末端ドメイン (apoE NTD) に認識され、血清中の N-ピロール化リジン含有タンパク質含有濃度が低下すること (Hirose et al., Nagata and Uchida, J. Biol. Chem. 294, 11035, 2019) がこれまでに明らかになっている。本課題の目的は、apoE NTD (約 190 残基) による Lys(Pyr) の認識について、アミノ酸残基単位での寄与を明らかにすることである。本研究により、apoE タンパク質が Lys(Pyr) をどのように認識するかが明らかになり、生活習慣病や自己免疫疾患との関連が示唆される Lys(Pyr) 含有タンパク質の低減メカニズムを原子レベルで説明できるようになると期待される。</p>		
利用実施時期、及び期間	2021 年 1 月 4 日～2021 年 3 月 31 日 総利用日数： 15 日 <input type="checkbox"/> 当初計画どおり・ <input checked="" type="checkbox"/> 当初計画変更 (変更理由) 実施者の試料調製が予定より遅れ、測定開始時期が遅れたため。		
利用施設 横浜市立大学	NMR 装置 (該当部分に ○)	利用装置 ・ () 溶液 600MHz、(○) 溶液 700MHz、() 溶液 800MHz、 () 溶液 950MHz、() 固体 950MHz 利用期間 1：2021 年 2 月 22 日～2021 年 3 月 8 日	

		利用期間 2 : 20 年 月 日 ~ 20 年 月 日 利用期間 3 : 20 年 月 日 ~ 20 年 月 日
その他の 利用施設		
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。)	<p>^{13}C, ^{15}N-標識 apoE NTD 単独、および ^{13}C, ^{15}N-標識 apoE NTD にピロール化リジンを過剰量 (モル濃度比で 14 倍量) 添加した 2 種類のサンプルについて、^1H-^{15}N HSQC のピークの帰属を行うために、HSQC、CBCA (CO) NH、HNACACB のスペクトルを測定していただいた。</p> <p>事前に自前の 500 MHz NMR 分光計を用いて、^{15}N-標識 apoE NTD とピロール化リジンとの HSQC を測定していたが、タンパク質濃度が 0.15 mM と低かったため、全残基の信号を観測できずにいた。</p> <p>今回の測定では、タンパク質濃度を 2.0 mM に上げることで S/N を向上させ、全残基の信号を観測し、帰属することを計画した。</p> <p>しかし、実際に観測されたシグナルの数はむしろ減っており、タンパク質濃度を 2.0 mM に上げたことで、apoE NTD タンパク質が会合または凝集してしまったことが強く示唆された。ピロール化リジンの有無により、観測されたシグナルに顕著な違いは見られなかった。</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>S/N を上げるために、タンパク質濃度を従来の 0.15 mM から 2.0 mM に引き上げたが、HSQC スペクトルにおいて観測された NMR シグナルの数はむしろ減ってしまい、apoE NTD にピロール化リジンを添加したことによる HSQC シグナルの顕著な変化は認められなかった。</p> <p>この S/N 低下の影響が大きく、当初目標としたピロール化リジン添加により化学シフトや信号強度が変化した残基の特定には至らなかった。</p> <p>今回は、BMRB に登録されている apoE の NMR データを参考に測定条件を決定したが、NMR スペクトルを測定する際に、タンパク質の会合・凝集にもっと注意を払うべきであったと考えている。</p>
	成果発表	<p>現時点では発表はありませんが、以下の発表を予定しております。</p> <p>隋 苗苗 東京大学博士論文 (2022)</p> <p>Miaomiao Sui <i>et al.</i> and Koji Nagata, Structural basis for the pyrroled lysine recognition by apoE protein (仮題)</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>十分量の ^{13}C, ^{15}N-標識 apoE NTD を取得する方法は確立したので、今後、会合・凝集を抑える条件を検討し、再度、ピロール化リジン有無での apoE NTD の ^1H-^{15}N HSQC のピークの帰属を行うために、HSQC、CBCA (CO)NH、HNCACB のスペクトルを測定したいと考えている。</p> <p>化学シフト摂動のデータが得られ次第、ピロール化リジン認識部位を特定し、その後ドッキングシミュレーションを行い、結合モデルを取得して、論文としてまとめることを計画している。</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>リジン残基のピロール化は自己免疫疾患との関連が示唆されており、本研究により apoE タンパク質によるピロール化リジンの認識の仕方が決定されると、apoE による血液中のピロール化タンパク質濃度低下の分子機構解明に寄与することになる。ピロール化リジンと apoE の相互作用はたいへん弱くミリモル濃度単位の解離定数を有するため、複合体の結晶構造を得るのは難しい。溶液 NMR による相互作用解析に適した課題であると考えている。</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>今回、測定条件や測定法について、随時アドバイスをいただき、たいへん助かりました。高濃度の安定同位体標識サンプルを得ることに成功して、これで問題なしかと思っておりましたが、apoE タンパク質の信号低下が見られたので、当方で、もう少し予備実験を行うべきであったと反省しております。</p>
<p>今後の NMR 共用プラットフォームに対する期待</p>	<p>今後も高磁場 NMR の使用の機会をご提供いただけると幸いです。</p>
<p>成果公開延期の希望の有無</p>	<p>() あり : (O) 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>