

実施課題名：NMRと電子顕微鏡を用いたハイブリッド動的構造解析

【背景】

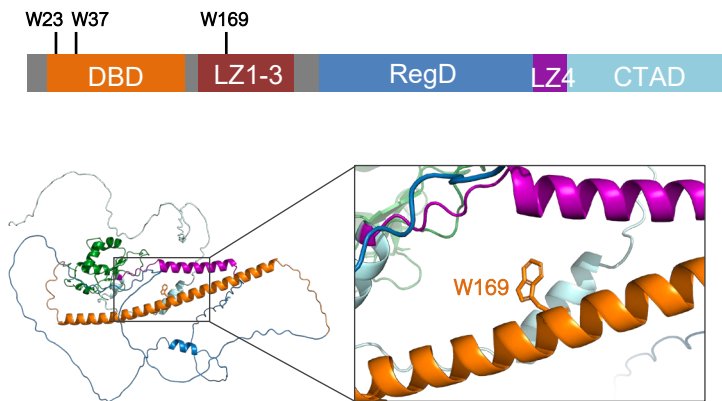
生体分子の動的な姿は、依然として謎に包まれている。溶液NMR技術の発展により、溶液中での生体分子の立体構造、ダイナミクス、分子認識などについての理解は格段に深まったが、それでもなお高分子量タンパク質に対するNMR解析においては、良好な2次元NMRスペクトルが取得できたとしても、立体構造解析に十分な情報を取得できない場合も多い。そこで本研究では、申請者らがこれまで研究開発を進めてきた常磁性プローブを用いたNMR法に加え、電子顕微鏡解析を取り入れたハイブリッド構造解析法の開発と適用を目指す。

【実施内容】

本研究では、シャペロンや転写因子などのマルチドメインタンパク質およびその複合体について、NMR測定およびクライオ電顕解析を実施した。中でも、転写因子に関する研究と、シャペロンについての研究は、NMRを用いた研究成果の一部を論文またはプレプリントとして発表した。転写因子についての研究においては、Heat shock factor 1 (Hsf1) の熱ストレスに応答した機能変調のメカニズムを解明するために、温度に依存した構造変化や多量体形成について、NMRを用いた評価を行った。Hsf1が持つ2つのTrp残基について¹⁹F標識を導入し、Trp残基周辺の環境変化を¹⁹FのNMR信号から評価した。分光データ等とも組み合わせ、Hsf1が温度上昇に伴って構造変化し、多量体形成へと至るメカニズムを解明した。

シャペロンについての研究においては、小胞体シャペロン、特にPDIとErp46について、基質タンパク質との相互作用をNMRで評価することによって、基質認識のメカニズム特性を明らかにした。

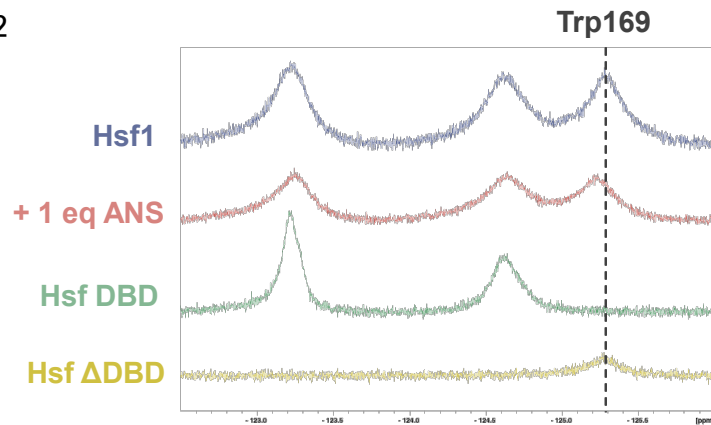
Fig. 1



Kawagoe et al. *Biochemistry* 2022

Hsf1のドメイン構成と予測構造

Fig. 2



Kawagoe et al. *Biochemistry* 2022

¹⁹F標識Hsf1のNMRスペクトル

NMR プラットフォーム
実施課題 利用報告書

課題受付番号	PF22-01-051		
利用課題名	NMR と電子顕微鏡を用いたハイブリッド動的構造解析		
所属機関	徳島大学		
所属部署	先端酵素学研究所		
役職・氏名	役職	教授	氏名 齋尾 智英
利用実施時期、及び期間	2022 年 11 月 1 日～2024 年 1 月 30 日 総利用日数: 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)		

1. 本課題の概要・目的

生体分子の動的な姿は、依然として謎に包まれている。溶液 NMR 技術の発展により、溶液中での生体分子の立体構造、ダイナミクス、分子認識などについての理解は格段に深まった。さらに、安定同位体標識法や測定法などの開発により、数百 kDa を超える高分子量タンパク質に対する高分解能 NMR スペクトルの取得も現実的なものとなった。しかし、それでもなお、100 kDa を超える高分子量タンパク質についての高分解能立体構造解析は困難である。高分子量タンパク質に対する NMR 解析においては、良好な 2 次元 NMR スペクトルが取得できたとしても、立体構造解析に十分な情報を取得できない場合が多い。常磁性プローブなどの利用も有効ではあるが、タンパク質全体の立体構造を高分解能で決定するほどの情報量を得ることは困難である。

そこで本研究では、申請者らがこれまで研究開発を進めてきた常磁性プローブを用いた NMR 法に加え、電子顕微鏡解析を取り入れたハイブリッド構造解析法の開発と適用を目指す。電子顕微鏡構造解析は近年目覚ましい発展を遂げ、高分子量タンパク質やその複合体についての立体構造解析に広く用いられるようになったが、運動性の高いマルチドメインタンパク質や複合体に対する適用は依然として困難である。本研究では、電子顕微鏡解析から得られる立体構造情報に対して、NMR から得られる動的情報を組み合わせることで、マルチドメインタンパク質およびその複合体について動的な姿を可視化する。

2. 成果の概要

実施内容

本研究では、電子顕微鏡解析から得られる立体構造情報に対して、NMR から得られる動的情報を組み合わせることで、マルチドメインタンパク質およびその複合体について動的な姿を可視化することを目指した。具体的には、シャペロンや転写因子などのマルチドメインタンパク質およびその複合体について、NMR 測定およびクライオ電顕解析を実施した。中でも、転写因子に関する研究と、シャペロンについての研究は、NMR を用いた研究成果の一部を論文またはプレプリントとして発表した。

転写因子についての研究においては、Heat shock factor 1 (Hsf1) の熱ストレスに応答した機能変調のメカニ

ズムを解明するために、温度に依存した構造変化や多量体形成について、NMRを用いた評価を行った。Hsf1 が持つ2つの Trp 残基について ^{19}F 標識を導入し、Trp 残基周辺の環境変化を ^{19}F の NMR 信号から評価した。分光データ等とも組み合わせ、Hsf1 が温度上昇に伴って構造変化し、多量体形成へと至るメカニズムを解明した。

シャペロンについての研究においては、小胞体シャペロン、特にPDI とErp46について、基質タンパク質との相互作用をNMRで評価することによって、基質認識のメカニズム特性を明らかにした。具体的には、安定同位体標識した変性タンパク質のNMR信号を観察し、シャペロン添加による信号変化を解析することにより、相互作用の特性についての情報を得た。

本研究課題と関連した成果について、1報の査読ありの原著論文と、2報のプレプリント、複数の学会等での発表を行なった。常磁性プローブを用いたNMRデータや電子顕微鏡のデータも蓄積されており、今後データの整理と成果発表を進めていく。

本課題により得られた成果と当初目標との比較

本研究では、申請者らがこれまで研究開発を進めてきた常磁性プローブを用いたNMR法に加え、電子顕微鏡解析を取り入れたハイブリッド構造解析によって、溶液中におけるタンパク質の動的複合体の構造動態を明らかにすることを目指した。具体的には、生体内のタンパク質品質管理を担うシャペロン複合体についての構造解析を実施し、細胞内のタンパク質恒常性維持のメカニズムを明らかにし、神経変性疾患についての治療法・予防法の開発基盤を得ることを目指した。研究は概ね計画通りに進行し、その一部については論文や学会発表での成果発表に繋がった。そればかりではなく、当初想定していなかった発展的・派生的な展開が得られたものもある。具体的には、タンパク質の液-液相分離における多量体形成など、当初計画していた「複合体」よりもより高次の複合体形成が見いだされ、NMRを用いた解析に取り組んだ。本研究に関連した複数のプロジェクトについて、論文投稿へ向けて準備を進めており、今後順次成果発表を進めていく。以上の様に、NMRプラットフォームを用いた本研究は、当初の計画に基づいて順調に進行したばかりではなく、当初の想定を超える発展も得られた。

成果発表

【原著論文】

Kawagoe S, Kumashiro M, Mabuchi T, Kumeta H, Ishimori K, Saio T. Heat-Induced Conformational Transition Mechanism of Heat Shock Factor 1 Investigated by Tryptophan Probe. *Biochemistry*. 2022 Dec 20;61(24):2897–2908. doi: 10.1021/acs.biochem.2c00492.

Saio T, Ishii K, Matsusaki M, Kumeta H, Kanemura S, Okumura M Client recognition differences between PDI and ERp46 to guide oxidative folding
bioRxiv doi: <https://doi.org/10.1101/2024.03.04.583432> (プレプリント)

Naohiko Iguchi, Noriyoshi Isozumi, Yoshikazu Hattori, Tomohiro Imamura, Masatomo So, Hitoki Nanaura, Takao Kiriya, Nobuyuki Eura, Minako Yamaoka, Mari Nakanishi, Masashi Mori, Shinya Ohki, Hiroyuki Kumeta, Hironori Koga, Mai Watabe, Takuya Mabuchi, Shingo Kanemura, Masaki Okumura, Takuya Yoshizawa, Ichiro Ota, Naoki Suzuki, Masashi Aoki, Yoshito Yamashiro, Tomohide Saio, Kazuma Sugie, Eiichiro Mori
Zinc finger domains bind low-complexity domain polymers
bioRxiv doi: <https://doi.org/10.1101/2023.10.29.564599> (プレプリント)

【学会発表】

シャペロンにおけるキネティクスー活性相関、齋尾 智英、第 22 回日本蛋白質科学会年会、2022/6/9、国内、口頭

分子から理解する相分離制御と破綻、齋尾 智英、第 74 回 日本細胞生物学会年会、2022/6/30、国内、口頭

Structural and kinetic views of regulators for protein folding and assembly, Tomohide Saio, International Symposium: Protein Folding, Aggregation, Misfolding Disease, and Disease Crosstalk, 2022/9/2、国際（オンライン）、口頭

シャペロンから解き明かすタンパク質フォールディングと集合の分子メカニズム、齋尾 智英、第 18 回 Organelle zone seminar、2022/12/8、国内（オンライン）、口頭

Structural insight into regulation and dysregulation of protein assembly and folding, Tomohide Saio, The 1st IMEG Meeting of The Research Center for High Depth Omics, 2023/1/16、国内（オンライン）、口頭

NMR investigation of the regulators in protein folding and assembly, Tomohide Saio, ZOOMinar on Molecular Bases of Proteinopathies, 2023/2/13、国際（オンライン）、口頭

Conformational distribution of a multi-domain protein enzyme investigated by paramagnetic NMR and ESR, Tomohide Saio, 3rd India-Japan NMR WORK SHOP, 2023/2/28、国際、口頭

常磁性プローブを用いたマルチドメインタンパク質の構造解析、齋尾 智英、蛋白研セミナー 基礎から学ぶ最新 NMR 解析法 第 6 回ワークショップ 統合型構造生物学研究、2023/3/16、国内（オンライン）、口頭

ランタノイドタグを用いた蛋白質の動的構造解析、齋尾 智英、日本化学会第 103 春季年会(2023)、2023/3/25、国内（口頭）

高次多量体形成が駆動する heat shock factor-1 液滴の酸化的相転移, 川越聡一郎, 松崎元紀, 石森浩一郎, 齋尾智英, 第 22 回日本蛋白質科学会年会、2022/6/9、国内、口頭

Mechanistic insight into chaperone-mediated protein folding, Tomohide Saio, The 7th bilateral Taiwan-Japan NMR Symposium, 2024/2/29, 国際, 口頭

Integrative Structural Study on a Multidomain Protein Enzyme Utilizing Paramagnetic Lanthanide Ion, Tomohide Saio, 2023 Asia-Pacific NMR Symposium, 2023/9/6, 国際, 口頭

NMR investigation of the regulators in protein folding and assembly, Tomohide Saio, International symposium on kinetic driven supramolecular chemistry, 2023/7/25, 国際, 口頭

Visualizing conformational changes of a multidomain protein enzyme using paramagnetic probes, Tomohide Saio, International Society of Magnetic Resonance (ISMAR) 2023 conference, 2023/8/22, 国際, 口頭

動的タンパク質複合体の構造・キネティクス理解, 齋尾 智英, 日本薬学会第 144 年会, 2024/3/28, 国内, 口頭

速度論の観点から理解するシャペロンによるフォールディング制御メカニズム, 齋尾 智英, 日本化学会第 104 春季年会(2024)「遅延制御超分子化学」成果 報告会 -遅延から創る生命 機能と高次構造-, 2024/3/20 国内, 口頭

相分離シャペロンの機能阻害メカニズム, 齋尾 智英, 第 46 回 日本分子生物学会年会, 2023/12/6, 国内, 口頭

液-液相分離制御と神経変性疾患の動的構造基盤, 齋尾 智英, 第 93 回 日本生化学会大会, 2023/10/31, 国内, 口頭

多様な結合様式を介した環境応答性相分離と相転移, 齋尾 智英, 第 23 回日本蛋白質科学会年会, 2023/7/5, 国内, 口頭

生命を駆動する動的相互作用の機序解明, 齋尾 智英, 奈良県立医科大学 V-iCliniX 講座 最終成果報告会, 2024/2/16, 国内, 口頭

シャペロンによるフォールディングと分子集合の制御メカニズム, 齋尾 智英, 千里ライフサイエンスセミナーV1 相分離がもたらす医療・創薬の新展開, 2023/5/26

シャペロンによるタンパク質集合とフォールディングの制御機構, 齋尾 智英, 日本薬学会 構造活性相関部会 構造活性フォーラム 2023, 2023/8/25

タンパク質アンフォールディングを担うシャペロン複合体の構造解析, 朱 浩傑, 川越 聡一郎, 久米田博之, 石森 浩一郎, 齋尾 智英, 第 62 回 NMR 討論会, 2023/11/7

神経変性疾患関連変異によるプロリン異性化酵素 PPIA のダイナミクス変調, 服部良一, 熊代宗弘, 高麗王, 姜 泰成, 久米田博之, 松崎元紀, 齋尾智英, 第 62 回 NMR 討論会, 2023/11/7

局所構造形成と連動した heat shock factor-1 の会合状態変化, 川越聡一郎, 馬淵拓哉, 久米田博之, 熊代宗弘, 石森浩一郎, 齋尾智英, 第 23 回日本蛋白質科学会年会, 2023/7/5

今後の展開

本研究では, シャペロン複合体や転写因子を対象とした研究を推進し, その中で動的な高分子量複合体についての構造解析技術の整備も行なった. 本研究で対象としたタンパク質やシステムだけではなく, 生体内には多くの動的な分子システムが機能している. 本研究の遂行によって確立される構造解析戦略は, 他の多くの動的な生体分子の解析に適用可能であり, 幅広い生命化学研究を発展させると期待される. 特に, 大きな構造変化を伴うような動的な分子, μM オーダーの解離定数をもつ弱い相互作用などによって駆動される生命システムについてのメカニズム解明において, 本研究によって構築された技術基盤が役立つと期待される.

3. 社会・経済への波及効果の見通し

本研究で対象としたシャペロンやストレス応答転写因子は、細胞内のタンパク質恒常性維持において中心的役割を担うものであり、それらの機能不全は、ミスフォールディングタンパク質やタンパク質凝集体、アミロイド繊維などの蓄積を引き起こし、神経変性疾患などの難病発症の要因となると考えられている。多くの神経変性疾患については有効な治療法、予防法がない状況であるが、その最大の要因の一つは、タンパク質恒常性維持や恒常性破綻のメカニズムが不明な点である。本研究では、細胞内のタンパク質恒常性維持に関わるシャペロンや転写因子の作用機序、および疾患関連変異などによる機能不全の機序の一端を明らかにした。本研究によって得られた成果は、神経変性疾患など、タンパク質恒常性の制御不全が関係する疾患に対する治療薬・予防法の開発における分子基盤として、社会に還元されると期待される。

4. 利用における感想(改善要望等を含む)

本研究では、北海道大学の溶液 NMR 装置を利用し、推進した。北海道大学の NMR 装置はリモート測定環境が整備されているため、私のような地方のユーザーであっても効率的な研究推進が可能になっている。さらに、装置管理者の久米田 博之 博士は、装置管理や最新の測定手法に精通しているのみならず、構造生物学研究にも造詣が深いため、研究プロジェクトの本質を理解していただいた上での的確な技術的サポートを享受できる点が最大の利点の一つである。さらに、学生や若手スタッフに対するオンライン技術講習会なども実施され、ユーザーコミュニティの技術基盤の向上を目指した試みもなされている。以上のように、北海道大学の NMR 装置群は、単純な装置使用のみならず、技術向上、学术交流の観点から多くのシナジー効果を生み出す基盤組織として機能しており、申し分のない利用環境を提供していただいている。今後も、このような基盤的機能の継続と発展を期待する。

5. 今後の NMR プラットフォームに対する期待

生命科学分野において、NMR から得られる分子レベル、原子レベルの情報に対するニーズは一層高まっているように感じる。しかし、NMR 測定環境へのアクセス、サンプル調製やデータ解析に必要とされる専門技術などが障壁となり、NMR を取り入れた研究を展開することは必ずしも容易ではない。このような状況において、NMR プラットフォームに対する期待は、今後さらに高まると予想される。リモート化によって、外部機関の装置利用は格段に効率化され、NMR 利用への参入障壁を下げていると考えられる。今後も、NMR 研究分野への新規参入や、既存ユーザの技術向上に対して、NMR プラットフォームが重要な位置付けにあると考えている。

また、世界的には市販装置として最高磁場強度である 1.2GHz の NMR 装置導入が進む中、日本での導入も幅広い研究分野において望まれている。最新の大型装置の導入や運用においても、NMR プラットフォームに対する分野内外の期待は大きいと考える。

6. 成果公開延期の希望の有無

() あり : (○) なし

「あり」の場合理由:

7. その他

各機関の装置管理、組織運営をされている先生方、並びに NMR プラットフォームの運営をされている先生方に深く感謝申し上げます。北海道大学の装置を利用させていただきましたが、北海道大学 相沢 智康 教授、久米田 博之 博士から多大なるご支援をいただきました。この場を借りて、厚く御礼申し上げます。装置共用、並びにそれを基盤としたユーザー間の交流は、わが国のコミュニティが世界に誇る強みであり、今後の NMR 業界の発展になくてはならないものだと思います。

8. 利用施設

北海道大学

溶液 800 MHz (migi)

2022/10/18 13:00～2022/10/24 12:00

溶液 800 MHz (hidari)

2022/12/16 13:00～2022/12/21 13:00

2023/ 1/11 13:00～2023/1/16 13:00

2023/ 1/25 13:00～2023/1/30 13:00

2023/12/4 9:00～2023/12/5 19:00

2024/1/4 9:00～2024/1/6 20:00

2024/1/9 9:00～2024/1/10 20:00

2024/1/25 9:00～2024/1/27 20:00

2024/1/29 9:00～2024/2/2 9:00

9. その他の利用施設