

実施課題名：NMRを用いたウイルス蛋白質の立体構造及びフォールドの検証

【背景】

本研究ではウイルス由来の蛋白質を分子量1～3万のドメインに大腸菌を宿主として発現し、ワクチン抗原に用いることを試みている。蛋白質ドメインを抗原に用いるためには立体(天然)構造が維持されていることが必須条件となる。そこで、我々は種々の分光学的手法(蛍光分光法、熱測定法、解析遠心法など)・生化学的手法(限定分解法、LC-MSによるSS結合同定など)を用いて天然構造維持の有無を検証している。しかし、分光学的手法では立体構造が残基レベルで維持されているか否かを検証することはできない。そこで、我々はNMR(1次元や2次元の予備実験は東京農工大学で実施し、高磁場多核NMRは理研プラットフォームの高磁場装置を利用)を用いて、「高分解能」で構造が維持されているかを検証した。

【実施内容】

1. 新型コロナウイルス(Wuhan、Omega型)の1次元NMR及び15N-HSQCの測定。その際に温度、pHまたは資料濃度を多数条件試した。事前に行っていた分光学的実験では天然構造の維持が示唆されていた。しかし、NMRに於いて構造が維持されている可能性は否定できないものの、かなりダイナミック(動的で揺れが大きい)と判断し、いわゆるフォールドは維持されているが、揺らぎが大きいMolten Globule(MG)的な状態であると判断した(図1)。

2. インフルエンザウイルス(H1N1とH3N2)の1次元NMR及び15N-HSQCの測定。H1N1は天然構造を示唆するスペクトルを得た(図2)。一方で、配列類似性が高いH3N2においては上記の同様のMG状態が示唆された。

現在、新型コロナウイルス(Wuhan、Omega型)に於いては、免疫応答を検証し、研究成果を発表済みである。インフルエンザに於いても免疫実験の一部を終了し、論文を一報発表、もう一執を筆中である。

図1:新型コロナウイルスWuhan型の2次元(NOESY)スペクトル。Aromaticとmethyl間のNOEがあるためfoldしている(赤円)。また、beta sheetはHNとmethyl間のNOEが観測(緑円)。Beta sheet構造は短時間で壊れる(推定<10 ms)。

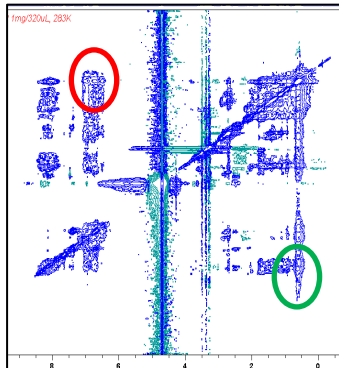
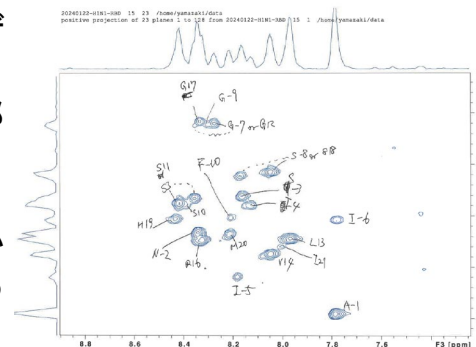


図2:H1N1型インフルエンザウイルスRBDドメインのHNCACBスペクトルの一部簡易的帰属(理研・山崎氏より)。ピークが分離しており、帰属も可能ということから天然構造を維持していると強く示唆される



NMR プラットフォーム
実施課題 利用報告書

課題受付番号	PF23-01-063			
利用課題名	NMRを用いたウイルス蛋白質のドメインの立体構造及びフォールドの検証			
所属機関	国立大学法人東京農工大学			
所属部署	工学研究院生命機能科学部門			
役職・氏名	役職	教授	氏名	黒田 裕
利用実施時期、及び期間	2023 年 8 月 1 日～2025 年 7 月 31 日 総利用日数： 約 10 日 <input 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

本研究では、NMR を用いてフォールド判定を行っている(2022 年には構造決定に関する共同研究を実施し、共著論文を 3 報ほど発表している。ただし、2022 年発表分のため成果リストには含めていない)。フォールド判定においては、天然構造を維持していないサンプルのデータは発表が難しい。そのため、今回検討した 4 種類のタンパク質のうち、高品質なスペクトルが得られ、天然構造を有すると判断できたのは 1 変異体のみであった。したがって、見かけ上の研究成果は少なく見えるが、未発表データの中にも研究遂行上で重要な知見を得たスペクトルが多多く存在する。

2. 成果の概要

実施内容

1. 新型コロナウイルス(Wuhan、Omega 型)の 1 次元 NMR 及び 15N-HSQC の測定。その際に温度、pH または資料濃度を多数条件試した。
2. インフルエンザウイルス(H1N1 と H3N2)の 1 次元 NMR 及び 15N-HSQC の測定。

本課題により得られた成果と当初目標との比較

1. 事前に行っていた分光学的実験では天然構造の維持が示唆されていた(新型コロナウイルス)。しかし、NMR に於いて構造が維持されている可能性は否定できないものの、かなりダイナミック(動的で揺れが大きい)と判断し、いわゆるフォールドは維持されているが、揺らぎが大きい Molten Globule (MG)的な状態であると判断した(図 1)。
2. インフルエンザ H1N1 は天然構造を示唆するスペクトルを得た(図 2)。一方で、配列類似性が高い H3N2 においては上記の同様の MG 状態が示唆された。現在、新型コロナウイルス(Wuhan、Omega 型)に於いては、免疫応答を検証し、研究成果を発表済みである。インフルエンザに於いても免疫実験の一部を終了し、論文を一報発表、もう一執を筆中である。

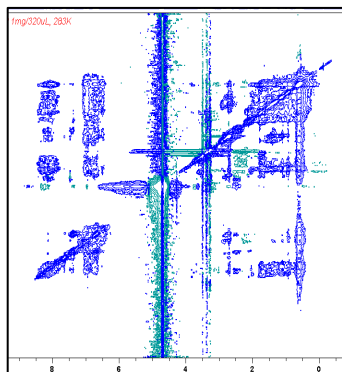


図 1:新型コロナウイルス Wuhan 型の 2 次元 (NOESY) スペクトル。Aromatic と methyl 間の NOE があるため fold している (赤円)。また、beta sheet は HN と methyl 間の NOE が観測 (緑円)。Beta sheet 構造は短時間で壊れる (推定 < 10 ms)。

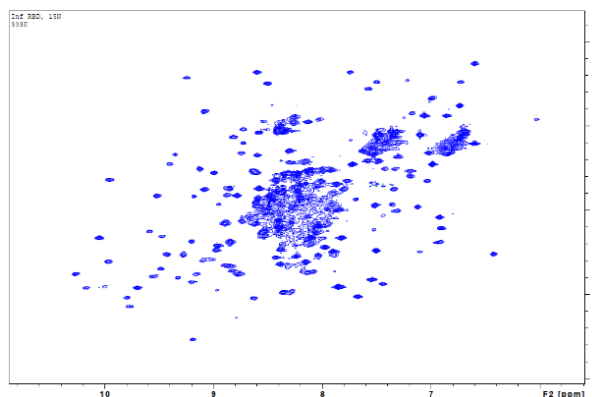


図 2:H1N1 型インフルエンザウイルス RBD ドメインの HSQC スペクトル。ピークが分離しており、帰属も可能ということから天然構造を維持していると強く示唆される。

成果発表

1. Nan Wu, Zhi-Chao Xu, Kai-Dong Du, Shen Huang, Naohiro Kobayashi (理研共同研究者), Yutaka Kuroda, Yan-Hong Bai, A Structural Model of Truncated Gaussia princeps Luciferase Elucidating the Crucial Catalytic Function of No.76 Arginine towards Coelenterazine Oxidation, PLoS Comput Biol (PLOS Computational Biology), 2025 Jan 21;21(1):e1012722. doi: 10.1371/journal.pcbi.1012722. eCollection 2025 Jan., PMID: 39836695, PMCID: PMC11750096
2. Tu T, Rathnayaka T, Kato T, Mizutani K, Saotome T, Noguchi K, Kidokoro SI, Kuroda Y. Design and *Escherichia coli* Expression of a Natively Folded Multi-Disulfide Bonded Influenza H1N1-PR8 Receptor-Binding Domain (RBD). *Int J Mol Sci*. 2024 Apr 1;25(7):3943. doi: 10.3390/ijms25073943. PMID: 38612753; PMCID: PMC11012049. (Acknowledgment)

学会発表:

1. 第 63 回日本生物物理学会年会 (奈良県 (奈良県コンベンションセンター) 2025 年 9 月 24 日 (水) - 26 日
Le Ngoc Thao Tu, Md. Din Islam, Ching-yu Tseng, Wei-li Hsu, Toshio Yamazaki (理研共同研究者), Trong Thang Ha, Allen Huynh, Yutaka Kuroda「*E. coli*-expressed Influenza H1N1 Receptor Binding Domain is immunogenic in mice and produces neutralizing antibodies against live virus」口頭発表 (学生発表賞) Oral Presentations (Student Presentation Award) 2025 年 19 月 24 日
2. 第 24 回日本蛋白質科学会年会 (北海道 (札幌コンベンションセンター) 2024 年 6 月 11 日 (火) - 13 日 (木))
Thao, L.N. Tu, Tharangani Rathnayaka, Toshiyo kato, kenji Mizutani, Tomoki Saotome, Keiichi Noguchi, Toshio Yamazaki, Shun-ichi Kidokoro, Yutaka Kuroda「*Escherichia Coli*-expression of a natively folded influenza H1N1-PR8 Receptor Binding Domain(RBD)」
<https://aeplan.jp/pssj2024/> (共著者)

今後の展開

今後、同様の方法で立体構造の有無を検証することには意義があると考えている。

一方で、大量のサンプルを必要とする点については、今後改善を図りたい。現在、これらの資料を用いた免疫実

験を進めており、免疫応答と構造の有無の関係を解明することを期待している、

3. 社会・経済への波及効果の見通し

我々の研究は蛋白質ドメインをワクチンの抗原に用いた低下額で低環境負荷のワクチンシーズを開発することを目指している。

4. 利用における感想(改善要望等を含む)

共同研究者と通じて利用したこともあり、非常にスムーズに研究を遂行できた。機会があったら今後も NMR プラットフォームを利用したい。

5. 今後の NMR プラットフォームに対する期待

- サンプルは継続的に準備できないこと(分光学的に立体構造を持っていない場合、その後の NMR 実験も進めない)。
- 安定同位体の提供があると助かる。少量しか使わない研究者においては、有料でも歓迎されると思う(実際、10g 購入しても 1g しか使わないことがある)。
- フォールド判定、大量調製、試料精製などの支援があることを知らなかったが、機会があれば利用したいと考えている。

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

8. 利用施設

理化学研究所

溶液 900MHz

利用期間 1: 2023 年 08 月 03 日 17 時 ~ 2023 年 08 月 03 日 19 時 (2 時利用)

利用期間 2: 2023 年 08 月 30 日 14 時 ~ 2023 年 08 月 31 日 12 時 (22 時利用)

利用期間 3: 2023 年 09 月 29 日 13 時 ~ 2023 年 10 月 02 日 9 時 (2 日 20 時利用)

利用期間 4: 2023 年 10 月 27 日 14 時 ~ 2023 年 10 月 27 日 16 時 (2 時利用)

利用期間 5: 2024 年 01 月 22 日 10 時 ~ 2024 年 01 月 29 日 10 時 (1 週利用)

9. その他の利用施設