

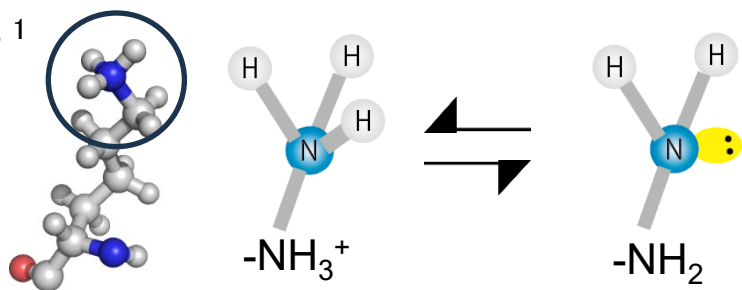
実施課題名：SAIL-NMR法を利用したアルギニン、リジン残基の側鎖と芳香環との原子間相互作用の解析方法の開発

【背景】リジン残基の側鎖アミノ基は、生理条件下において通常プロトンが3つ結合して正電荷を帯びた NH_3^+ の状態が存在するが、疎水性環境下におかれ、電荷の影響が少ない場合、脱プロトン化して水素が2つしか結合しない中性の NH_2 型になり得る(Fig.1). これまで、天然のタンパク質において、 NH_2 状態のリジン残基側鎖アミノ基が存在するとの報告例はなかった。代表の武田は、SAIL法と ^{13}C NMRを利用して、リジン残基側鎖の立体帰属を含めた完全帰属および側鎖アミノ基のプロトン化/脱プロトン化状態を解析するNMR法を開発した(*Magn. Reason.* (2021) 2, 223). しかし、これまで、安定に存在する NH_2 型のリジンは、分子内の疎水性コアに位置するバリンをLysに置換して人工的にLys- NH_2 を形成させたスタフィロコッカスヌクレアーゼの変異体の例しかなく、自然界に存在する野生型タンパク質において NH_2 型が実際に存在ことは示されていない状況であった。本課題では、自然界に存在する天然のタンパク質に含まれる NH_2 型のリジン残基側鎖アミノ基を同定し、それらの生理的機能への関与を解析することを目的とする。

【実施内容】

- ・シアノバクテリアの補色順化の制御を担う緑赤色光吸収型タンパク質RcaEの緑色光吸収型(Pg)において、アミノ基に隣接した ^{13}C に誘起される同位体シフトの解析に基づいて、安定に存在する NH_2 型のリジン側鎖アミノ基を見出した(図2) (*Proc. Natl Acad. Sci, USA* (2024) 121, e2404472121). 自然界に存在する天然のタンパク質に含まれる安定した NH_2 型のリジンを世界で初めて同定した事例となる。
- ・RcaEの類縁タンパク質において、アミノ基に隣接した ^{13}C に誘起される同位体シフト解析を行い、水との交換は速いながら NH_2 型をとるリジンの存在を明らかとした。

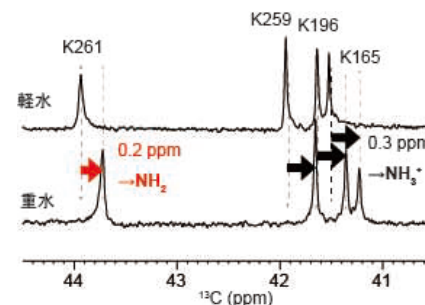
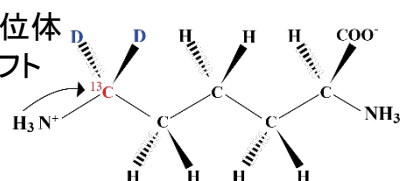
Fig. 1



リジン側鎖アミノ基の脱プロトン化

Fig. 2

同位体
シフト



重水素同位体シフトを利用した NH_2 型リジン側鎖の同定

NMR プラットフォーム
実施課題 利用報告書

課題受付番号	PF23-01-064			
利用課題名	SAIL-NMR 法を利用したアルギニン, リジン残基の側鎖と芳香環との原子間相互作用の解析方法の開発			
所属機関	東京薬科大学			
所属部署	薬学部 分子生物物理学教室			
役職・氏名	役職	講師	氏名	武田光広
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:20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

本課題は, SAIL アミノ酸を利用してリジン, アルギニンのメチレンプロトンのNMRシグナルを観測して, 周囲の側鎖芳香環との原子間相互作用を解析することを当初計画していたが, 原料価格高騰や試料調製体制の変更等により, 脱プロトン化したリジン残基側鎖アミノ基の解析へと実施内容を変更した。リジン残基の側鎖アミノ基は, 通常は正電荷を帯びているが, 時に脱プロトン化して中性の NH₂ 型となり機能発現において重要な役割を果たす場合もある。本課題では, シアノバクテリアの補色順化の制御を担う光センサータンパク質RcaEにおいて安定に存在するNH₂型のリジンを世界に先駆けて同定した。同定した NH₂型は, RcaE に結合した発色団フィコシアノビリンの NH 基との間でアクセプターとして水素結合を形成していた (*Proc. Natl Acad. Sci, USA* (2024) 121, e2404472121)。RcaEの類縁タンパク質についても, アミノ基に隣接した炭素に誘起される重水素同位体シフトを利用した NMR 解析 (*Magn. Reason.* (2021) 2, 223)を活用して, プロトンの脱着が速いがNH₂型をとるリジン側鎖を同定した。本成果は, これまで知見に乏しかったタンパク質中の脱プロトン化リジンについての同定と解析の道筋を示し, 基礎研究, 創薬開発に資することが期待される。

2. 成果の概要

実施内容

当初, SAIL アミノ酸を利用して, リジン, アルギニンの側鎖メチレンプロトンを観測し, NOE, 環電流シフトに基づいて周囲の環境を解析することを計画していたが, 原料価格高騰や試料調製体制の変更等により, 初年度の時点で, 脱プロトン化したリジン側鎖アミノ基の同定と解析へと計画を変更した。以下解析対象としたタンパク質ごとに分けて記述する。

【RcaE】:シアノバクテリアの補色順化の制御を担う緑赤色光吸収型タンパク質 RcaE の緑色光吸収型(Pg)について, ¹H-¹⁵N 相関スペクトル上において, ¹H 軸が 0.69 ppm ¹⁵N 軸が 27.4 ppm の特異な位置にシグナルが検出されたことで NH₂ 型のリジン側鎖アミノ基の存在を見出した。帰属の結果, K261 の側鎖アミノ基が NH₂ 型をとり, さらに同 NH₂ 基は, RcaE に結合したテトラピロール構造を持つ発色団PCBのNH基との間で, アクセプター

として水素結合を形成することを明らかとし(*Proc. Natl Acad. Sci, USA* (2024) 121, e2404472121). また, RcaE は赤色光吸収型(Pr)に変換すると, K261 の側鎖は NH_3^+ 型となり PCB のカルボキシ基に対してドナーとして水素結合を形成することも見出した.

【RcaE 類縁タンパク質】: RcaE の類縁タンパク質である緑赤色光吸収型タンパク質の一つについて, RcaE と同様にリジンの脱プロトン化が生じるか解析した. RcaE の K261 に対応するリジンの側鎖アミノ基に結合したプロトンは水との交換が速く $^1\text{H}-^{15}\text{N}$ 相関測定では直接そのシグナルを検出できなかった. 我々の開発手法である ^{13}C 同位体シフト解析(*Magn. Reason.* (2021) 2, 223)により, 同リジンが NH_2 型をとることが明らかとなった. また, RcaE と同様に PCB の NH 基との間でアクセプターとして水素結合を形成することも見出した.

【グリコシダーゼ J】: 緑赤色光吸収型タンパク質以外で, 脱プロトン化の可能性があるリジン側鎖アミノ基を結晶構造のデータベースに基づいて選定した. その候補の一つであるバクテリア由来のグリコシダーゼ J 蛋白質中の N 末端ドメインに含まれるリジンの解析を進めた. グリコシダーゼ J の N 末ドメイン標的の側鎖アミノ基は交換が速く直接 $^1\text{H}-^{15}\text{N}$ 相関シグナルを検出できなかった.

本課題により得られた成果と当初目標との比較

本課題ではリジン, アルギニンの側鎖メチレン基を介した原子間相互作用の解析を当初の目標としていたが, 初年度の時点で計画を見直し脱プロトン化状態にあるリジン側鎖の同定と解析を目標とした. リジンは塩基性残基だが, 周囲の局所環境により脱プロトン化して中性の NH_2 型となり, 機能発現において重要な役割を担う場合もある. これまで, 安定に存在する NH_2 型のリジンは, 分子内の疎水性コアに位置するバリンを Lys に置換して人工的に $\text{Lys}-\text{NH}_2$ を形成させたスタフィロコッカスヌクレアーゼの変異体の例しかなく, 自然界に存在する野生型タンパク質において NH_2 型が実在するか分からない状況であった. 本課題では, シアノバクテリアの緑赤色光吸収型タンパク質において, 天然に存在する NH_2 型のリジンを世界に先駆けて同定した. さらに, 同定した NH_2 型は, 発色団 PCB の D 環の NH 基との間で, アクセプターとして水素結合を形成しており, 新しい原子間相互作用様式の存在を明らかとした(*Proc. Natl Acad. Sci, USA* (2024) 121, e2404472121). また, RcaE の類縁タンパク質においては, 我々が開発した ^{13}C シグナルに誘起される同位体シフトの解析(*Magn. Reason.* (2021) 2, 223)に基づき, 水との交換が速くて直接 $^1\text{H}-^{15}\text{N}$ 相関シグナルを検出できないが脱プロトン化したリジン側鎖アミノ基を同定した. 本課題は, 自然界に存在する野生型タンパク質においても NH_2 型が存在しアクセプターとして水素結合を形成する事例を世界に先駆けて同定するとともに, 新たな NH_2 を同定する道筋を示した点において, 当初の目標を十分に達成したと考える.

成果発表

- (1) 武田光広, 永江峰幸, 青山洋史, 宮ノ入洋平, 広瀬脩, 三島正規, シアノバクテリア光センサータンパクにおける脱プロトン化したフィコシアノビリンの NMR 解析, 第 24 回日本蛋白質科学会年会 2024 年 6 月 11-13 日 (ポスター)
- (2) 永江峰幸, 武田光広, 青山洋史, 飯塚祐介, 宮ノ入洋平, 広瀬脩, 三島正規, シアノバクテリアが持つ光センサー RcaE の緑色/赤色光吸収状態の構造解析, 第 24 回日本蛋白質科学会年会 (2024) 6 月 11-13 日 札幌コンベンションセンター (ポスター)
- (3) 武田光広, 永江峰幸, 青山洋史, 宮ノ入洋平, 会津貴大, 広瀬脩, 甲斐荘正恒, 伊藤隆, 三島正規, NMR 同位体シフト効果を利用したタンパク質に含まれるリジン残基側鎖アミノ基の脱プロトン化状態の可視化, 日本薬学会第 144 年会, 2024 年 3 月 28-31 日 (口頭発表)
- (4) 武田光広, 永江峰幸, 野地智康, 斉藤圭亮, 青山洋史, 宮ノ入洋平, 会津貴大, 広瀬脩, 甲斐荘正恒, 伊藤隆, 石北央, 三島正規, タンパク質の側鎖官能基に隣接した ^{13}C に誘起される H/D 同位体シフト効果の大きさに基づいた官能基の脱プロトン化状態の可視化, 第 62 回 NMR 討論会 2023 年 11 月 7-9 日 (ポスター)

- (12) 石塚 美葵, 武田 光広, 永江 峰幸, 青山 洋史, 広瀬 侑, 三島 正規, 緑赤色光吸収型のシアノバクテリオクロムの構造研究, 日本薬学会第145年会 (2025) 3月26-29日 福岡国際会議場(ポスター)
- (13) 高橋 直史, 永江 峰幸, 武田 光広, 青山 洋史, 広瀬 侑, 三島 正規, 光センサータンパク質 RcaE 全長の構造解析, 日本薬学会第145年会 (2025) 3月26-29日 福岡国際会議場(ポスター)
- (15) 武田光広, 永江峰幸, 青山洋史, 宮ノ入洋平, 広瀬侑, 三島正規, シアノバクテリア光センサーに含まれる脱プロトン化状態のフィコシアノビリンの NMR 解析, 日本薬学会第145年会 (2025) 3月26-29日 福岡国際会議場(ポスター)
- (16) 武田光広, 永江峰幸, 青山洋史, 宮ノ入洋平, 広瀬侑, 三島正規, 光センサータンパク質に含まれる脱プロトン化したフィコシアノビリンの選択的安定同位体標識と NMR シグナルの帰属, 第63 回 NMR 討論会 (2024) 10 月 30 日-11 月 1 日 北海道大学 学術交流会館(ポスター)
- (17) 三島正規, NMR で明らかになった, プラス電荷を持たないリシン側鎖が担う相互作用, 日本薬学会第145年会 (2025) 3月26-29日 福岡国際会議場(一般シンポジウム口頭発表)
- (18) Masaki Mishima, Direct evidence for a deprotonated lysine serving as a “H-bond acceptor” revealed by NMR, 第63 回 NMR 討論会 (2024) 10 月 30 日-11 月 1 日 北海道大学 学術交流会館(口頭発表)
- (19) 三島正規, 光センサータンパク質における, 電荷を失ったリシン側鎖がアクセプターとなる水素結合の同定, 第 24 回日本蛋白質科学会年会 (2024) 6 月 11-13 日 札幌コンベンションセンター(口頭発表)
- (25) 三島正規, 脱プロトン化したリシン側鎖がアクセプターとなる新規な水素結合の同定, セミナー, (2025) 1 月 10 日 東邦大学 習志野キャンパス
- (26) Masaki Mishima, Identification of a Deprotonated Lysine Serving as a “H-bond acceptor” in a Photoreceptor Protein, The 30th International Conference on Magnetic Resonance in Biological Systems (ICMRBS 2024), (2024) 8 月 18 日 Seoul, Korea (Oral)
- (27) Takayuki Nagae, Mitsuhiro Takeda, Tomoyasu Noji, Keisuke Saito, Hiroshi Aoyama, Yohei Miyanoiri, Yutaka Ito, Masatsune Kainosho, Yuu Hirose, Hiroshi Ishikita and Masaki Mishima “Direct evidence for a deprotonated lysine serving as a H-bond “acceptor” in a photoreceptor protein” Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 121, e2404472121 (2024) DOI: 10.1073/pnas.2404472121
- (29) Yohei Miyanoiri, Mitsuhiro Takeda, Kosuke Okuma, Tsutomu Terauchi, Masatsune Kainosho “Enhancing solution structural analysis of large molecular proteins through optimal stereo array isotope labeling of aromatic amino acids” Biophys. Chem. 264, 106422 (2024) doi.org/10.1016/j.bpc.2024.107328
- (30) Takayuki Nagae, Yuya Fujita, Tatsuya Tsuchida, Takanari Kamo, Ryoka Seto, Masako Hamada, Hiroshi Aoyama, Ayana Sato-Tomita, Tomotsumi Fujisawa, Toshihiko Eki, Yohei Miyanoiri, Yutaka Ito, Takahiro Soeta, Yutaka Ukaji, Masashi Unno, Masaki Mishima, Yuu Hirose, Green/red light-sensing mechanism in the chromatic acclimation photosensor, Sci. Adv. 10, eadn8386 (2024) doi:10.1126/sciadv.adn8386
- (32) 武田 光広, 青山 洋史, 甲斐荘 正恒, 三島 正規 “重水素同位体シフトに基づいたリシン側鎖の脱プロトン化の同定” 細胞 (2025) 57, 76-79

今後の展開

本課題において、緑赤色吸収型光センサータンパク質において、脱プロトン化状態が保持されたリジン側鎖が実在しアクセプターとして水素結合を形成することが示された。今後は、どのような局所環境においてリジンの脱

プロトン化が促進されるか明らかとするため、緑赤色光吸収型の光センサータンパク質以外の機能性タンパク質についても、NH₂型のリジン側鎖アミノ基を探索・同定し、周囲の局所環境に関するデータを蓄積する必要がある。また、中性のpH付近でNH₂型になるリジンは数が限られている可能性もあるため、pHを9付近まで上げて解析を行うことも検討する。pKaが7～9程度のリジンも含めて解析対象を拡張することで、データの蓄積が促進されることが考えられる。

3. 社会・経済への波及効果の見通し

本課題により道筋が示されたリジン側鎖アミノ基の脱プロトン化の研究が進展し、脱プロトン化が促進される周囲の局所環境の要件が明らかとなれば、リジンの脱プロトン化に関連した反応機構の理解が深まり、酵素機能の改変等の産業応用に利用できる。また、pKaが低く求核性の強いリジンは共有結合型薬剤の標的となるため、例えば、キナーゼの活性化部位付近の反応性が高いリジンは、キナーゼ阻害剤の標的として注目されている(*J. Am. Chem. Soc.* 2019; 141, 6553)。現状、タンパク質の立体構造解析技術は高度化しているが、機能発現において重要な役割を担う反応性の高い側鎖官能基を同定・解析する術は限られている。pKaの低いリジンの実験的同定と解析法の開発は、酵素や創薬等の産業に貢献すると考えられる。

4. 利用における感想(改善要望等を含む)

利用施設である理化学研究所においては、¹³C, ¹⁵N核の直接観測が可能な装置が利用できる。このような、通常の研究機関にはない先端的装置は技術開発において極めて重要である。また、オンサイトでの測定は、時間の制約上困難が多い複数のサンプル測定も、リモートでサンプルチェンジャーを操作して実行できる点は便利である。新規測定を試す際に、測定用の標準サンプルとして、¹³C, ¹⁵N ユビキチン等のサンプルが常備されていると便利と思われる。タンパク質の NMR 測定に習熟した運営スタッフが常駐し、アドバイスしてくれる体制もとても頼もしい。

5. 今後の NMR プラットフォームに対する期待

高磁場NMR装置は、日本の生体系 NMR 研究において必要不可欠であり、その維持管理は今後とも維持し続けてもらいたい。日本のNMR測定の最先端施設であるため、ハードウェアのみならず測定法やパルスプログラムといったソフト面の更新の継続も期待したい。

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

特になし

8. 利用施設

理化学研究所

溶液 600MHz

利用期間1: 2025 年 7 月 28 日～2025 年 7 月 31 日

溶液 700MHz

利用期間2: 2025 年 5 月 28 日～2025 年 6 月 2 日

溶液 800MHz

利用期間3: 2024 年 4 月 16 日～2024 年 4 月 19 日

溶液 900MHz

利用期間 4: 2024 年 6 月 10 日～2024 年 6 月 11 日

利用期間 5: 2024 年 6 月 17 日～2024 年 6 月 20 日

利用期間 6: 2025 年 6 月 2 日～2025 年 6 月 5 日

9. その他の利用施設

なし