

実施課題名: マルチドメイン蛋白質と天然変性蛋白質の相互作用解析

【背景】 申請者らは、これまでに「NMR共用プラットフォーム」を活用し、マルチドメイン蛋白質GRB2やダイユビキチンのドメイン配向の可視化に成功した。本研究では、開発したmulti-state立体構造計算法を用いて、NOEに加え、PRE, PCS, RDCなどの長距離情報を統合解析することで、マルチドメイン蛋白質の構造アンサンブルを可視化した。本課題では、本手法をYUH1, UCHL3, FixJなど複数の試料へ適用し、その汎用性を検証するとともに、タンパク質複合体形成に伴う相互作用様式やドメイン配向変化の解明を目指した。特に、GRB2とSOSの相互作用解析を通じて、液液相分離(LLPS)の形成機構および細胞内シグナル伝達との関連について理解を深めることを目的とした。

【実施内容】 本課題では、マルチドメインタンパク質や天然変性タンパク質など、柔軟性が高く従来法による解析が困難なタンパク質を対象として、相互作用機構やドメイン配向変化の解明に取り組んだ。また、PRE, PCS, RDCなどのNMR長距離情報とmulti-state立体構造計算を組み合わせた解析法を複数の試料へ適用し、本手法の有効性および汎用性の検証を行った。

GRB2とSOS1 (図1a)の解析では、液液相分離(LLPS)に関与する多価相互作用をNMR滴定実験(図1c)および緩和解析により評価した。その結果、GRB2とSOS1の各結合部位の結合親和性が大きく異なること、またGRB2のドメイン配置や運動性に顕著な非対称性が存在することを明らかにした。これらの成果は、GRB2の分子認識機構やLLPS形成機構に関する新たなモデルを提案するものである。

また、YUH1では活性部位近傍の動的構造が酵素機能に重要な役割を果たすことを明らかにした(図2)。さらに、FixJおよびUCHL3については主鎖・側鎖シグナルの帰属に成功し、FixJではリン酸化に伴う構造変化の解析を進めている。特に、FixJでは二量体化後もドメインの動的な揺らぎが保持される可能性が示され、転写制御との関連が示唆された。これらの成果は、複数の専門誌に発表しており、その他の成果についても現在、論文投稿を進めている。

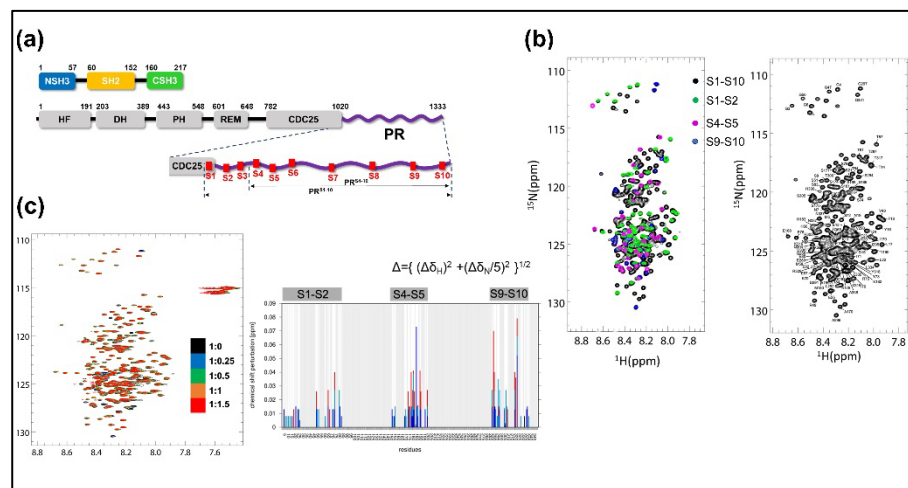


図1 (a) GRB2およびSOS1のドメイン構造図。 (b) SOS1 PRM S1-S10領域における主鎖化学シフト帰属の結果。 (c) ¹⁵N標識SOS1PR S1-10に対する非標識GRB2とのNMR滴定実験

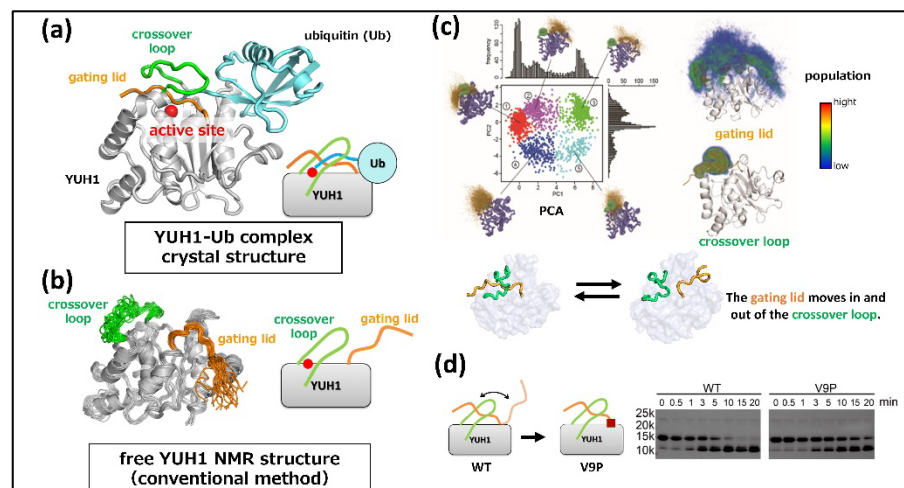


図2 (a) YUH1の結晶構造。 (b) 従来によって得られたYUH1の構造 (c) 新規に開発したmulti-state立体構造計算により得られたYUH1のアンサンブル構造。 (d) YUH1変異体を用いた酵素活性実験。

NMR プラットフォーム
実施課題 利用報告書

課題受付番号	PF24-01-071		
利用課題名	マルチドメイン蛋白質と天然変性蛋白質の相互作用解析		
所属機関	東京都立大学大学院		
所属部署	理学研究科 化学専攻		
役職・氏名	役職	准教授	氏名 池谷 鉄兵
利用実施時期、及び期間	2024 年 4 月 1 日～2026 年 3 月 31 日 総利用日数:31 日 ☒ 当初計画どおり・ ☐ 当初計画変更 (変更理由)		

1. 本課題の概要・目的

申請者らは、これまでに実施されてきた「NMR 共用プラットフォーム 先端研究基盤共用促進事業」課題を活用し、マルチドメイン蛋白質 GRB2 やダイユビキチンのドメイン配向の可視化に成功した。本研究では、我々が開発を進めてきた multi-state 立体構造計算法を応用し、短距離情報である NOE データに加えて、PRE、PCS、RDC などの長距離情報を統合解析することで、マルチドメインの各ドメインの相対配置を構造アンサンブルとして可視化した。この成果を踏まえ、本課題では、本手法を複数の異なる試料に適応することで、本手法の汎用性を実証する。また、マルチドメイン蛋白質が別の蛋白質と結合し複合体形成した際の、相互作用様式の解明や、ドメイン配向変化の可視化を行い、これらの蛋白質の分子認識機構の理解を深めることを目的とする。具体的には、手法の汎用性を検証する対象として、YUH1、UCHL3、FixJ の構造解析を進める。また、マルチドメイン蛋白質の複合体形成におけるドメイン配向の解析については、GRB2 と SOS との相互作用解析を中心に研究を進める。GRB2 と SOS は、複合体を形成することで液液相分離(LLPS)形成を起こすことが知られている。LLPS 形成が、細胞のシグナル伝達を調節しているとも考えられており、その形成機構の解明は、細胞内シグナル伝達機構の理解を深めるうえで重要な知見をもたらすことが期待される。

2. 成果の概要

実施内容

本課題では、マルチドメイン蛋白質の相対的なドメイン配置や、天然変性蛋白質の構造など、柔軟性が高く、X 線結晶構造解析やクライオ電子顕微鏡による解析が困難な蛋白質の相互作用機構を明らかにすることを目的とした。具他的には、これらの蛋白質が複合体を形成する際の相互作用様式の決定や、複合体形成に伴うドメイン配向変化の可視化に取り組んだ。

GRB2 と SOS1 の相互作用解析については、両者の相互作用による液液相分離(LLPS)について解析を進めてきた。GRB2 と SOS1 は、それぞれ 2 箇所と 10 箇所の結合部位を有しており、多価相互作用により液滴を形成していると考えられている。この多価相互作用の分子機構の理解のために、申請者らはこれまでに相互作用部位を追加もしくは欠失させた変異体をそれぞれ作製し、それらの変異体の液滴形成能を評価するとともに、NMR

滴定実験および緩和解析による相互作用の詳細な解析を行った。

NMR 滴定実験の結果、GRB2 と SOS1 の各結合部位における結合親和性は部位ごとに大きく異なることが明らかとなった。また、この結合親和性の違いが液滴形成能に影響を与えていることが示唆された。さらに、SOS1-PR に関する滴定実験では、GRB2 の既知の結合部とは異なる領域にも化学シフト変化が観察された。これは、SOS1-PR との結合によって GRB2 のドメイン相対配置が変化し、2 量体化などの構造変化が生じている可能性を示唆している。

これらの成果の一部は Chemical Science 誌に発表済みである。残りの成果についても現在論文として取りまとめており、投稿準備を進めている。また、multi-state 立体構造計算を用いた YUH1 蛋白質活性部位の動的構造の可視化については、Journal of American Chemical Society 誌に発表した。FixJ と UCHL3 の解析についても、主鎖・側鎖の帰属と、複合体の構造解析に成功した。FixJ については専門誌に報告しており、UCHL3 についても投稿の準備を進めている。

本課題により得られた成果と当初目標との比較

GRB2 と SOS1 の構造解析では、X 線小角散乱 (SAXS) の結果と合わせ、GRB2 の 3 つのドメインのドメイン配向は、結晶構造とは大きく異なっていることが明らかになった。申請者らはこれまでに、GRB2 の構造アンサンブル解析および緩和解析から、nSH3 ドメインと SH2 ドメインは一体となって運動する一方で、cSH3 ドメインは独立して大きく揺らぐことを示している。本研究で得られた結果は、この緩和解析から得られた知見を支持するものであった。また、GRB2 と SOS1 の NMR 滴定実験から、GRB2 の nSH3 ドメインは cSH3 ドメインと比較して著しく高い結合親和性を示すことが明らかとなった。さらに、SOS1 に存在する 10 か所の SH3 結合部位についても、それぞれの結合親和性が大きく異なることが判明した。当初は、GRB2 に存在する 2 つの SH3 ドメインは類似した機能を有すると予想していたが、実際には運動性および結合特性の両面で顕著な非対称性が存在することが示された。この結果は、GRB2 の分子認識機構や機能発現機構に関する新たなモデルを提案する知見となった。

YUH1 の構造解析では、当初、活性部位周辺に大きな構造揺らぎが存在するとは予想していなかった。しかし、本研究により、活性部位近傍に存在する動的な構造揺らぎが酵素機能に深く関与していることを明らかにすることができた。この成果は、酵素活性発現における動的構造の重要性を示す結果となった。FixJ については、主鎖および側鎖シグナルの帰属を完了し、現在リン酸化に伴う構造変化の解析を進めている。FixJ はリン酸化により二量体化することが知られているが、本研究から、二量体化後も C 末端側ドメインが大きな揺らぎを保持している可能性が示された。この動的構造が DNA との結合や転写制御機構に影響を及ぼしている可能性があり、今後の詳細な解析によってその役割を明らかにすることが期待される。

成果発表

(論文)

1. Tateno, K., Ando, T., Tabata, M., Sugasawa, H., Hayashi, T., Yu, S., Sayeesh, P.M., Inomata, K., Mikawa, T., Ito, Y., and Ikeya, T., “Different molecular recognition by three domains of the full-length GRB2 to SOS1 proline-rich motifs and EGFR phosphorylated sites”, *Chem. Sci.* 15, 15858–15872 (2024).
2. Horikawa, A., Okubo, R., Hishikura, N., Watanabe, R., Kurashima, I.K., Sayeesh, P.M., Inomata, K., Mishima, M., Koteishi, H., Sawai, H., Shiro, Y., Ikeya, T., and Ito, Y., “Backbone and side-chain ^1H , ^{13}C and ^{15}N resonance assignments and secondary structure determination of the rhizobial FixJ”, *Biomol. NMR Assign.*, published in online (2025)
3. Sayeesh, P.M., Iguchi, M., Inomata, K., Ikeya, T., and Ito, Y., “Structure and Dynamics of Drk-SH2 Domain and Its Site-Specific Interaction with Sev Receptor Tyrosine Kinase”, *Int. J. Mol. Sci.* 25, 12, 6386–13 (2024)
4. 池谷鉄兵, “溶液 NMR 法を用いた蛋白質立体構造計算の最近の動向”, 細胞 57 (4), 2025

5. Okada, M., Tateishia, Y., Nojiri, E., Mikawa, T., Rajesh, S., Ogasa, H., Ueda, T., Yagi, H., Kohno, T., Kigawa, T., Shimada, I., Güntert, P., *Ito, Y., & *Ikeya, T., Multi-state structure determination and dynamics analysis reveals a unique ubiquitin-recognition mechanism in ubiquitin C-terminal hydrolase, *J. Am. Chem. Soc.* 147 (33), 29884–29894 (2025)
6. Futagawa, K., Namikawa, Y., Morioka, T., Meguro, H., Shida, A., Nagano, Y., Furihata, K., Watanabe, H., Nudelman, F., Okumura, T., Kogure, T., Ikeya, T., Ito, Y., Katayama, H., Nagata, K., and Suzuki, M., Elucidation of the aragonite nanofiber formation mechanism of LICP contained in the hinge ligament of *Pinctada fucata*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 123 (15), e2522686123, (2026)
7. Futagawa, K., Meguro, H., Ngata, K., Ikeya, T., Ito, Y., Suzuki, M., A Methionine-Rich Repeat Forms a Spiral Conformation That Guides Aragonite Nanofiber Organization in Molluscan Ligaments, *Biomacromolecules* 26 (10), 6667–6683, (2025)

(書籍)

1. Ikeya, T. and Ito, Y., “Advances in NMR data acquisition and processing for protein structure determination”, *Experimental Approaches of NMR Spectroscopy I*, Chapter 3, 2024 年 4 月

(学会発表)

1. 池谷鉄兵, “複数構造決定に関する基礎から応用”, 蛋白研セミナー, 創薬コンソーシアム BioNMR WG NMR が繋ぐ分子現象基盤の創薬研究, 2025 年 3 月 19–20 日, 横浜
2. 池谷鉄兵, 菅澤はるか, 兪翔也, 渡辺真歩, 林俊文, 猪股晃介, 美川務, 伊藤隆, “GRB2 と SOS1 の多価相互作用における分子認識機構と液液相分離との関係”, 第 63 回 NMR 討論会, 2024 年 10 月 30 日–11 月 1 日, 札幌
3. Ikeya, T., Sugasawa H., Inomata K., Mikawa T., Ito, Y., “Structural Analysis by Solution NMR Reveals Different Binding Modes in the Interaction between Multi-domain Protein GRB2 and SOS-PR domain”, The 30th International Conference on Magnetic Resonance in Biological Systems (ICMRBS), 2024 年 8 月 18 日–8 月 23 日, Seoul, Korea
4. Ito, Y., Ikeya, T., Suzuki, T., Yamamoto, M., Inomata, K., “In-Cell NMR Studies of the KEAP1-NRF2 System”, The 30th ICMRBS, 2024 年 8 月 18 日–8 月 23 日, Seoul, Korea
5. 堀川皓央, 大久保里香, 伊藤かおり, 猪股晃介, 池谷鉄兵, 澤井仁美, 城宜嗣, 伊藤隆, “異各種多次元 NMR による根粒菌 FixJ 蛋白質の立体構造解析”, 第 3 回 生命金属科学シンポジウム, 2024 年 6 月 22, 23 日, 東京
6. 菱倉直樹, 渡邊史輝, 大久保里香, 堀川皓央, 伊藤かおり, 三島正規, 猪股晃介, 小手石奏康, 澤井仁美, 城宜嗣, 池谷鉄兵, 伊藤隆, “NMR による FixL-FixJ 二成分シグナル伝達系の機能解析”, 第 3 回 生命金属科学シンポジウム, 2024 年 6 月 22, 23 日, 東京
7. 長峰萌華, 猪股晃介, 豊田芽生, 末広志織, 池谷鉄兵, 鈴木隆史, 山本雅之, 伊藤隆, “In-cell NMR による Keap1-Nrf2 系の解析”, 第 3 回 生命金属科学シンポジウム, 2024 年 6 月 22, 23 日, 東京
8. 二川慶, 片山秀和, 池谷鉄兵, 伊藤隆, 永田宏次, 鈴木道生, “アコヤガイ靱帯の酸性ペプチド LICP の構造・機能解析”, 第 3 回 生命金属科学シンポジウム, 2024 年 6 月 22, 23 日, 東京
9. Ito, Y., and Ikeya, T., Effects of the intracellular macromolecular crowding on protein structures, 第 26 回日本蛋白質科学会, 鳥取, 2025 年 6 月 17–19 日
10. Ito, Y., and Ikeya, T., NMR studies of protein conformational multiplicity and dynamics under physiological conditions, International Symposium on Cellular Structural Biology, 2025 年 9 月 18 日
11. Sato, H., Nagamine, M., Akae, Y., Kubota, S., Miyata, H., Sugasawa, H., Inomata, K., Ikeya, T., and Ito, Y., In-cell

NMR study of human UCHL3 in HeLa S3 cells, 第 63 回日本生物物理学会年会, 奈良, 2025 年 9 月 24-26 日

12. Kubo, S., Kato, S., Tagishi, R., Horikawa, A., Sayeesh, P. M., Inomata, K., Ikeya, T., and Ito, Y., Protein 3D structures under macromolecular crowding environment, 第 63 回日本生物物理学会年会, 奈良, 2025 年 9 月 24-26 日
13. Kubota, S., Miyata, H., Sugasawa, H., Ito, Y., and Ikeya, T., NMR analysis of the intermolecular interaction between Ubiquitin C-terminal Hydrolase (UCHL3) and ubiquitin, and their molecular dynamics, 第 63 回日本生物物理学会年会, 奈良, 2025 年 9 月 24-26 日
14. Kamimura, R., Yu, S., Watanabe, M., Hayashi, T., Sugasawa, H., Mikawa, T., Ito, Y., and Ikeya, T., NMR analysis of the multivalent interaction between SOS1 intrinsically disordered region and GRB2 and its liquid-liquid phase separation, 第 63 回日本生物物理学会年会, 奈良, 2025 年 9 月 24-26 日
15. 堀川皓央, 菱倉直樹, 大久保里佳, 伊藤かおり, 渡邊吏輝, 猪股晃介, 三島正規, 小手石泰康, 澤井仁美, 城宣嗣, 池谷鉄兵, 伊藤隆, Structural analysis of the rhizobial multi-domain protein FixJ by heteronuclear multidimensional NMR spectroscopy, 第 64 回 NMR 討論会, 沖縄, 2025 年 11 月 26-28 日
16. 久保柊人, 加藤聖人, 田岸亮馬, 堀川皓央, Sayeesh P.M., 猪股晃介, 池谷鉄兵, 伊藤隆, 分子クラウディング環境が蛋白質の立体構造に与える影響, 第 64 回 NMR 討論会, 沖縄, 2025 年 11 月 26-28 日
17. 窪田滋春, 宮田祐貴, 菅澤はるか, 伊藤隆, 池谷鉄兵, 溶液 NMR による Ubiquitin C-terminal Hydrolase (UCHL3) のユビキチンとの相互作用とダイナミクス解析, 第 64 回 NMR 討論会, 沖縄, 2025 年 11 月 26-28 日
18. 神村理菜, 兪翔也, 渡辺真歩, 林俊文, 菅澤はるか, 美川務, 伊藤隆, 池谷鉄兵, SOS1 天然変性領域の GRB2 との多価相互作用と液-液相分離形成機構の溶液 NMR 解析, 第 64 回 NMR 討論会, 沖縄, 2025 年 11 月 26-28 日
19. 渡辺真歩, 兪翔也, 菅澤はるか, 美川務, 伊藤隆, 池谷鉄兵, 単純化モデル系を用いた GRB2-SOS1 多価相互作用と液-液相分離形成の解析, 第 64 回 NMR 討論会, 沖縄, 2025 年 11 月 26-28 日

今後の展開

本課題では, PRE, PCS, RDC などの長距離構造情報と multi-state 立体構造計算を組み合わせることで, マルチドメイン蛋白質の動的なドメイン配置や構造アンサンブルを可視化できることを示した. さらに, GRB2/SOS1 複合体, YUH1, FixJ および UCHL3 など複数の試料系への適用を通じて, 本手法が蛋白質の動的構造の解析に有効であることを確認した. 今後は, マルチドメイン蛋白質の複合体形成や LLPS に伴う構造変化の解析へと適用範囲をさらに拡大し, 蛋白質の分子認識機構や機能発現機構の解明に活用していく. 特に, 本課題で見出された GRB2 のドメイン間非対称性や SOS1 との相互作用機構については, 構造アンサンブル解析をさらに進めることで, LLPS 形成との関連を原子レベルで理解することを目指す. また, 本課題では IDP の構造アンサンブルの可視化には至らなかったが, 近年, IDP が完全なランダムコイルではなく, 特定の構造傾向を持つアンサンブルを形成していることが示唆されている. 今後は, 本研究で確立した解析手法を IDP へ適用し, その動的構造アンサンブルおよび機能との関連を明らかにしたい. さらに, multi-state 立体構造計算と, 申請者がこれまでに開発してきたベイズ推定に基づく構造解析手法(Ikeya et al., Sci. Rep. 2016)との統合を進める. 加えて, PCS, PRE, RDC などの NMR パラメータに加え, SAXS などの異なる実験データを統合的に取り扱う解析基盤を構築し, 多様な実験情報から統計的に最も妥当な構造アンサンブルを推定する新たな統合構造解析手法の開発を目指す.

3. 社会・経済への波及効果の見通し

本課題では、PRE、PCS、RDCなどのNMR長距離構造情報とmulti-state立体構造計算を組み合わせることで、従来の構造解析手法では解析が困難であったマルチドメイン蛋白質や動的構造を持つ蛋白質の構造アンサンブルを可視化できることを示した。さらに、GRB2/SOS1複合体、YUH1、FixJおよびUCHL3など複数の試料系への適用を通じて、本手法が幅広い生体分子の解析に利用可能であることを実証した。これらの成果は、生体分子の機能発現機構や分子認識機構の解明を促進し、構造生物学分野のさらなる発展に貢献すると期待される。また、本研究で開発したmulti-state立体構造計算法は、NMR構造解析ソフトウェアCYANAを基盤としている。今後、本手法を組み込んだ新たなCYANAパッケージの整備・公開を進めるとともに、アンサンブル構造解析に関するノウハウを共有することで、生体系NMR研究コミュニティの研究基盤強化にも貢献したい。

GRB2とSOS1の解析では、液液相分離(LLPS)に関与する多価相互作用の特徴や、GRB2のドメイン間に存在する機能的な非対称性を明らかにした。LLPSは細胞内シグナル伝達など多くの生命現象に関与し、その異常はがんや神経変性疾患とも関連する。本研究で得られた知見は、LLPS形成機構の理解を深めるだけでなく、将来的には疾患関連蛋白質の機能制御や創薬研究に向けた基礎的知見として活用されることが期待される。

4. 利用における感想(改善要望等を含む)

TeamViewerを使った遠隔操作や、測定後の試料の返送サービスなどは、大変便利で、効率の良いシステムだと感じています。一方で、他のユーザが使用している際には、その装置のユーザのホームディレクトリにアクセスできない点が、少々不便に感じます。また、装置利用の効率化のために、各装置の予約状況が、外部からも確認できるシステムがあるとより便利です。装置の空き状況に応じた実験計画が立てられるため、各ユーザにとってもメリットが大きいと思います。

5. 今後のNMRプラットフォームに対する期待

世界の高磁場施設は、1GHzを超えるNMR装置が複数台導入されています。日本の共用プラットフォームにおいても、海外研究との競争維持のためにも、1.2GHzなどの超高磁場装置の導入と一般への利用開放を期待します。

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 7 日～2025 年 7 月 14 日

溶液 700MHz

利用期間 1: 2024 年 5 月 13 日～2024 年 5 月 20 日
利用期間 2: 2024 年 10 月 8 日～2024 年 10 月 11 日
利用期間 3: 2025 年 10 月 30 日～2025 年 11 月 6 日

溶液 800MHz

利用期間 1: 2024 年 10 月 15 日～2024 年 10 月 18 日

9. その他の利用施設

利用なし.