

実施課題名：NMRを用いた酵素の反応速度論解析

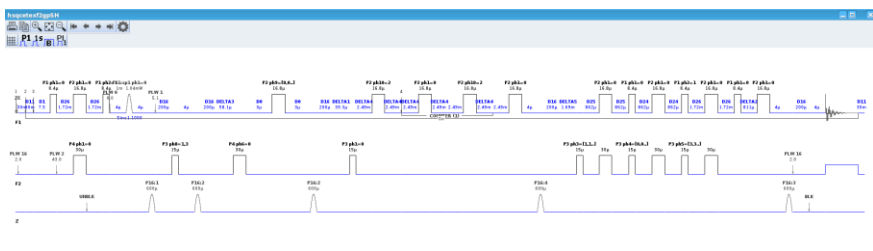
【背景】

NMRは原子分解能で分子構造情報を取得できる分光法であり、タンパク質の構造変化速度を原子または残基ごとに解析できる。利用者はこれまでに、ペプチドの二状態トポロジー異性化やSH3ドメインの二状態フォールディングにおいて、構造変化速度が残基ごとに異なることを示してきた。この速度定数のばらつきは、遷移状態の協同性を反映すると考えられる。また、速度定数と平衡定数の関係から遷移状態の反応座標上の位置を推定できる可能性がある。本課題では、この解析概念を酵素触媒反応へ拡張することを目指した。

【実施内容】

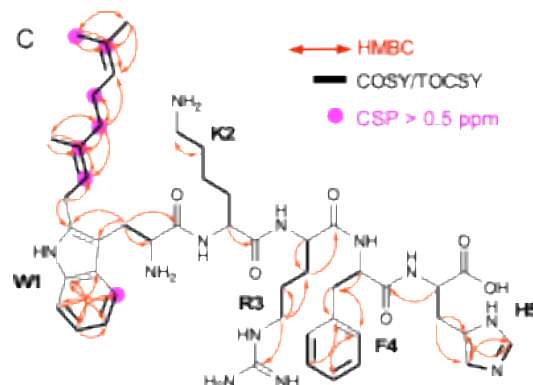
^{13}C ZZ-exchange測定用パルスプログラムを作成し(Fig. 1)、トランドラプリル中のペプチド結合cis-trans二状態異性化速度を、近傍の複数の炭素原子をプローブとして解析した。その結果、局所的なペプチド結合異性化反応では、測定プローブ間の速度定数の差が小さいことが明らかとなった。この結果は、構造変化速度のばらつきには、構造変化が及ぶ空間スケールが重要に寄与することを示唆している。また、CypA-peptide架橋複合体についても測定を実施し、試料安定性やピーク広幅化が今後の解析における重要な課題であることを明らかにした。さらに、酵素反応産物であるプレニル化トリプトファン含有ペプチド(Fig. 2)について、NMRを用いた構造解析を行い、論文として報告した(JACS, 147: 25642–25651, 2025)。

Fig. 1



^{13}C ZZ-exchange測定用パルスプログラム

Fig. 2



プレニル化トリプトファンの化学構造

NMR プラットフォーム
実施課題 利用報告書

課題受付番号	PF24-01-074		
利用課題名	NMR を用いた酵素の反応速度論解析		
所属機関	静岡県立大学		
所属部署	食品栄養科学部		
役職・氏名	役職	助教	氏名 藤浪大輔
利用実施時期、及び期間	2024 年 8 月 1 日 ~ 2026 年 3 月 31 日 総利用日数: 11 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

NMR は原子分解能で分子構造情報を取得できる分光法であり、タンパク質の構造変化速度を原子またはアミノ酸残基ごとに解析することが可能である。利用者はこれまでに、27 残基ペプチドの二状態トポロジー異性化 (JPCL 2021) および 63 残基 SH3 ドメインの二状態フォールディング (BPPB 2026) において、構造変化速度がアミノ酸残基ごとに異なることを示してきた。このような構造変化速度のばらつきは、構造変化過程においてエネルギー的に最も不安定な遷移状態の協同性に起因すると解釈している (BPPB 2023)。また、構造変化速度と二状態間の平衡定数の間には、速度-平衡自由エネルギー関係 (RFER: rate-equilibrium free energy relationship) が成立し、その直線の傾きは遷移状態の反応座標上の位置を表す ρ 値、すなわち 0 から 1 の値をとる指標に相当すると解釈している。本研究の目的は、この RFER の概念を酵素触媒反応および分子間相互作用へ拡張できるかを検証することである。将来的には、NMR により得られる速度論的情報から、遷移状態に関する構造的示唆を得ることを目指す。酵素反応系として、プロリンペプチド結合の cis-trans 二状態異性化を触媒する CypA、および単糖の α - β 二状態異性化を触媒する mutarotase を選定した。加えて、プレニル転移酵素反応により生じるプレニル化トリプトファンを含むペプチド結合の cis-trans 二状態異性化、およびトランドラプリル中のペプチド結合の cis-trans 二状態異性化についても検討した。さらに、分子間相互作用系として、SH3 ドメインと AI 設計バインダーの結合系を選定した。

2. 成果の概要

実施内容

単純な非酵素的二状態異性化のモデルとして、トランドラプリル中のペプチド結合の cis-trans 二状態異性化を対象に、 ^{13}C ZZ-exchange 測定用のパルスプログラムを作成した。その結果、トランドラプリル中のペプチド結合の cis-trans 二状態異性化は局所的な構造変化であり、先行研究で報告してきたような構造変化速度の残基間ばらつきは観測されないことが明らかになった (MRC, 64: 555-567, 2026)。また、プレニル化トリプトファンを含むペプチド結合の cis-trans 二状態異性化について解析を行い、この異性化がプレニル化に続くピロリジン環形成

に起因することを明らかにした(JACS, 147: 25642–25651, 2026)。さらに、プレニル転移酵素に関しては予想外の進展があり、アデニン N6 位のプレニル化を担う酵素を発見することができた(<https://doi.org/10.64898/2026.04.03.716432>)。一方、CypA-peptide 架橋複合体および mutarotase については、試料の不安定性やピークの広幅化のため、ZZ-exchange 解析に適したスペクトルを取得するには至らず、これらの酵素反応系では当初想定した仮説を検証することができなかった。分子間相互作用系として検討した SH3 ドメインと AI 設計バインダーの結合では、アミノ酸残基間で平衡定数がばらつくことが明らかになった。しかし、バインダーの結合に伴って平衡が折り畳まれた状態へ大きく偏ること、また交換ブロードニングが顕著であったことから、バインダー存在下における正確な folding 速度を求めるには至らなかった。

本課題により得られた成果と当初目標との比較

当初の主要目標であった CypA-peptide 架橋複合体および mutarotase については、酵素反応速度を原子または残基ごとに求めることはできなかった。所属組織内に NMR 装置がなく、測定条件の最適化や予備的検討を十分に行うことが難しかった点は、本課題における反省点である。一方で、今回の測定結果から、今後は CypA-peptide 架橋複合体を対象を絞ることで、より実現可能性の高い解析系を構築できる可能性が示された。プレニル化トリプトファンを含むペプチドについては、主に化学構造決定の面で大きな進展があり、新規構造に関する成果を JACS 誌に掲載することができた。さらに、新たに発見した核酸プレニル化酵素についても、その酵素反応産物の構造決定を行うことができた。これにより、当初計画で確保していた測定機会を有効に活用し、新たな研究展開につながる成果を得ることができた。本成果については bioRxiv に投稿した。SH3 ドメインと AI 設計バインダーの系についても研究の進展があり、AI 設計バインダーが SH3 ドメインに結合し、折り畳まれた状態を安定化することでアミロイド形成を阻害することを示すことができた。本成果は 2025 年の日本生物物理学会で発表しており、現在、論文投稿に向けて準備を進めている。

成果発表

Ozawa H, Miyata A, Hayashi S, Miyoshi N, Kato K, Ito S, Fujinami D. Expanding the Chemical Space of Antimicrobial Peptides via Enzymatic Prenylation. J Am Chem Soc. 2025 Jul 23;147(29):25642–25651. doi: 10.1021/jacs.5c06850. Epub 2025 Jul 13. PMID: 40653658.

This work was supported by MEXT through the Promotion of Development of a Joint Usage/Research System Project: Spin-L (JPMXP1323015488 and spin24XN012)

Ichikawa K, Tamura K, Fujitani K, Chisuga T, Takeda R, Sato T, Hayashi S, Kato K, Miura S, Nakano S, Ito S, Fujinami D. A cyanobacterial adenine prenyltransferase enables longer-chain N6 prenylation. bioRxiv. 2026 Apr 4;2026.04.03.716432. doi: 10.64898/2026.04.03.716432. Preprint.

This work was supported by the NMR Platform supported by MEXT, Japan; and MEXT through the Promotion of Development of a Joint Usage/Research System Project, Spin-L (JPMXP1323015488 and spin24XN012)

今後の展開

トランラプリル中のペプチド結合の cis-trans 二状態異性化速度定数を、近傍の複数の炭素原子をプローブとして測定したところ、測定部位間で顕著な差は認められなかった。この結果は、構造変化速度のばらつきには、構造変化が及ぶ空間スケールが重要に寄与することを示唆している。したがって、今後は、ペリ環化反応のように複数の化学結合の形成・切断を伴う反応や、複数の遷移状態を経由する化学プロセスに対して、本課題で構築した ^{13}C ZZ-exchange 測定法を適用することで、反応過程における部位ごとの速度論的情報を取得できる可能性がある。また、CypA が触媒するプロリンペプチド結合の cis-trans 二状態異性化については、活性中心に対するアロステリック効果が報告されていることから、今後も継続して実験を行い、この効果が残基ごとの反応速

度や遷移状態の性質にどのように反映されるかを検証したい。本課題を通じて、CypA 系では試料安定性が重要な課題であることが明らかになったため、今後は CypA の安定性を向上させる変異導入や測定条件の最適化を行い、酵素触媒反応における RFER 解析の実現を目指す。

3. 社会・経済への波及効果の見通し

本課題は、NMR を用いて分子の構造変化速度を原子または部位ごとに解析し、遷移状態に関する情報を抽出する基盤技術の確立を目指すものである。酵素反応、ペプチド結合異性化、タンパク質フォールディング、分子間相互作用に共通する「分子がどのように状態を変えるか」を定量的に理解する技術として、創薬、酵素工学、タンパク質設計への波及が期待される。特に、酵素触媒反応における遷移状態の性質を実験的に推定できれば、反応効率を高める酵素改変や阻害剤設計に新たな指針を与える可能性がある。

4. 利用における感想(改善要望等を含む)

本測定を実施するにあたり、加藤晃一教授および林成一郎博士には、リモートでのパルスプログラム作成から現地での測定に至るまで、非常に丁寧かつ親身にご支援いただいた。申請者の所属機関には NMR 装置がないため、本支援がなければ本課題の実施は困難であったが、実際には多くの有用なデータを取得することができ、研究を大きく発展させることができた。特に、測定条件の検討や実験上の課題について専門的な助言をいただけたことは、今後の研究展開にとっても極めて有益であった。この場を借りて、関係の先生方に深く感謝申し上げたい。

5. 今後の NMR プラットフォームに対する期待

今後も、NMR 装置を有しない研究機関の研究者が高度な NMR 測定にアクセスできる体制が継続・発展することを期待している。

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

生命創成探究センター

溶液 800MHz

利用期間 1: 2025 年 2 月 5 日～2025 年 2 月 7 日

利用期間 2: 2025 年 9 月 5 日～2025 年 9 月 12 日

9. その他の利用施設