

実施課題名： 甲殻類血糖値上昇ホルモン(CHH)の溶液構造解析

【背景】 クルマエビの甲殻類血糖値上昇ホルモン(Crustacean Hyperglycemic Hormone, CHH)の結晶構造はホモ二量体構造であった。一方で、他の甲殻類のCHHのNMR溶液構造では単量体の構造が報告されている。本課題の達成目標は以下の3点:

達成目標1 クルマエビCHHが溶液中で単量体か二量体かを決定する。

達成目標2 クルマエビCHHの溶液構造を決定する。

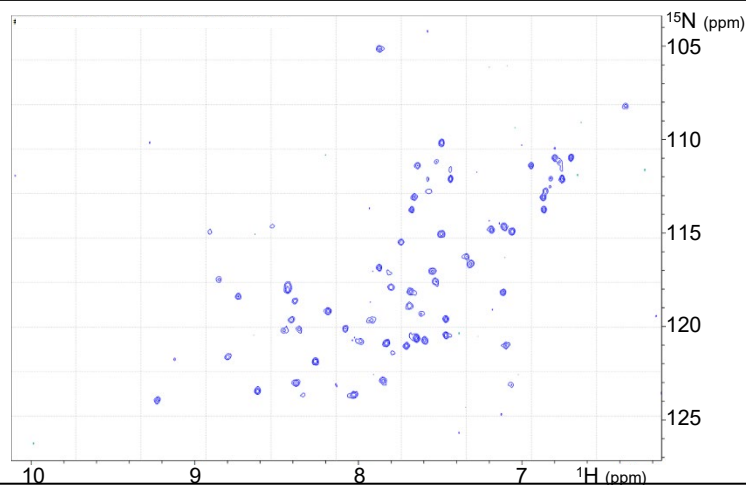
達成目標3 クルマエビCHHのC末端アミド化により、活性型になる。C末端アミド化がCHHの構造に及ぼす影響を明らかにする。

【実施内容】 最初はM9培地2 Lあたり0.01 mgの ^{15}N 標識CHH-Glyしか得られず、試料濃度は5 μM であった。大腸菌の株を複数検討し、ジスルフィド結合形成を促進するSHuffle T7株において、可溶性CHH-Glyが最高収量で得られた。精製工程も再検討し、最終的に約0.1 mgの ^{15}N 標識CHH-Glyを得ることができ、初回測定時と比較して収量を約10倍向上させることができた。

竹内恒先生(東京大学大学院薬学系研究科)から、実験計画についてご助言いただき、10 μM (^{15}N 標識CHH-Gly 10 μM)、30 μM (^{15}N 標識CHH-Gly 30 μM)、60 μM (^{15}N 標識CHH-Gly 30 μM + 無標識CHH-Gly 30 μM)、75 μM (^{15}N 標識CHH-Gly 30 μM + 無標識CHH-Gly 45 μM)の4条件で ^1H - ^{15}N HSQCを測定し、期待される約80個の交差ピークがほぼすべて観測された。一部のアミノ酸残基では濃度依存的な化学シフト変化が認められ、CHH-Glyが溶液中で自己会合、特にホモ二量体形成に関与する可能性が示唆された。

今後は、主鎖シグナルの帰属により、濃度依存的に化学シフト変化する残基を特定する。さらに、CHH-Glyの結晶構造(PDB: 5B5I)をモデルとして、それらの残基がホモ二量体界面に位置するかを検証する。さらに、 ^{13}C , ^{15}N 二重標識CHH-Glyを調製し、多次元NMRスペクトルの取得と立体構造解析を進める予定である。

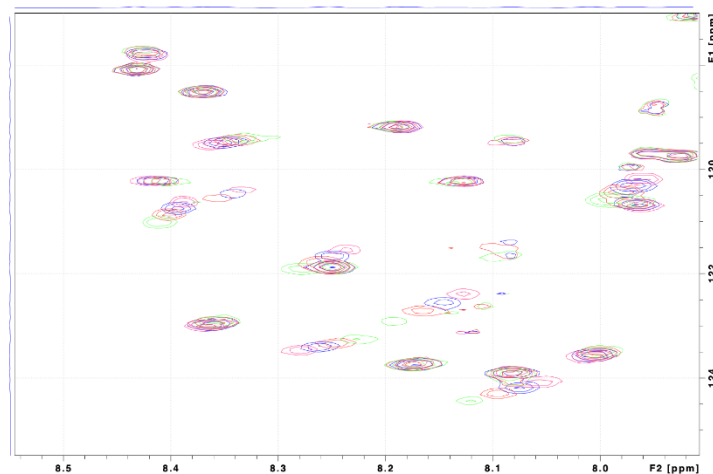
Fig. 1



^{15}N 標識CHH-Gly (5 μM)の ^1H - ^{15}N HSQC。

巻戻しを経て得られたCHH-Glyは既報の結晶化条件(Tsutsui et al., 2016)で結晶化したため、本来の立体構造を有すると示された。

Fig. 2



^{15}N 標識CHH-Glyの ^1H - ^{15}N HSQCに見られる一部のシグナルの濃度依存的化学シフト変化。

桃色:10 μM ; 青色:30 μM ; 赤色:60 μM ; 緑色:75 μM 。

NMR プラットフォーム
実施課題 利用報告書

課題受付番号	PF24-01-078			
利用課題名	甲殻類血糖値上昇ホルモン(CHH)の溶液構造解析			
所属機関	東京大学			
所属部署	大学院農学生命科学研究科			
役職・氏名	役職	教授	氏名	永田 宏次
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: 4 日 ☐ 当初計画どおり・ ☒ 当初計画変更 (変更理由) 安定同位体標識体の調製(巻戻しを含む)に予想以上に時間がかかったため			

1. 本課題の概要・目的

クルマエビの甲殻類血糖値上昇ホルモン(Crustacean Hyperglycemic Hormone、CHH)の結晶構造を2016年に報告した(<https://febs.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/febs.13926>)が、それはホモ二量体構造(74 アミノ酸残基×2)であった。一方で、他の甲殻類のCHHのNMR溶液構造では単量体の構造が報告されている。本課題では、クルマエビCHHの溶液構造を解くことを目的とし、結晶構造と同じく二量体か、それとも溶液中では単量体なのかを明らかにする。また、C末端アミド化により生理活性型になると考えられているため、もし精密な溶液構造解析が可能であれば、C末端のアミド化前後の構造比較も行えればと考えている。結晶構造の二量体ではC末端領域は電子密度が弱くトレースできず、分子全体でもアミド化前後で構造変化はほとんどなかった。この点を明らかにできればと考えている。

2. 成果の概要

実施内容

初回の ^1H - ^{15}N HSQC 測定では、M9 培地 2 L あたり 0.01 mg の ^{15}N 標識 CHH-Gly しか得られず、試料濃度は 5 μM にとどまった。中間報告後、毒性タンパク質の発現に適した大腸菌株 C41(DE3)および C43(DE3)を用いた低温誘導発現を検討したが、CHH-Gly の収量は改善しなかった。さらに複数の発現株を比較した結果、ジスルフィド結合形成を促進する SHuffle T7 株において、安定な可溶性 CHH-Gly が最も高い収量で得られた。この結果は、本タンパク質の構造安定化において、分子内 3 本のジスルフィド結合の形成が重要であることを示唆している。精製工程についても条件を再検討し、最終的に約 0.1 mg の ^{15}N 標識 CHH-Gly を得ることができ、初回測定時と比較して収量を約 10 倍向上させることができた。

次に、1D ^1H NMR 測定により緩衝液条件を検討したうえで、竹内恒先生(東京大学大学院薬学系研究科)に実験計画についてご助言いただき、 ^{15}N 標識 CHH-Gly 10 μM 、 ^{15}N 標識 CHH-Gly 30 μM 、60 μM (^{15}N 標識 CHH-Gly 30 μM + 無標識 CHH-Gly 30 μM)、75 μM (^{15}N 標識 CHH-Gly 30 μM + 無標識 CHH-Gly 45 μM) の 4 条件で ^1H - ^{15}N HSQC 測定を実施していただいた。その結果、期待される約 80 個の交差ピークがほぼ

すべて観測され、クルマエビ CHH-Gly が NMR 解析に適した折りたたみ状態で存在することが確認された。また、一部のアミノ酸残基では濃度依存的な化学シフト変化が認められ、CHH-Gly が溶液中で自己会合、特にホモ二量体形成に関与する可能性が示唆された。

今後は、主鎖シグナルの帰属により、濃度依存的に化学シフト変化する残基を特定する。さらに、CHH-Gly の結晶構造 (PDB: 5B5I) をモデルとして、それらの残基がホモ二量体界面に位置するかを検証する。あわせて精製法をさらに改良し、 ^{13}C , ^{15}N 二重標識 CHH-Gly を 0.1 mM 程度で調製し、立体構造解析に必要な多次元 NMR スペクトルの取得と解析を進める予定である。

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、クルマエビ CHH が溶液中で単量体として存在するのか、結晶構造と同様にホモ二量体を形成するのかを明らかにし、さらに溶液構造の決定、および C 末端アミド化が構造に及ぼす影響の解明を目標とした。初回の測定では、 ^{15}N 標識 CHH-Gly の収量が M9 培地 2 L あたり 0.01 mg にとどまり、試料濃度も 5 μM と低かったため、十分な NMR 解析には至らなかった。その後、C41(DE3)、C43(DE3) など毒性タンパク質発現に適した株を検討したが収量は改善せず、最終的にジスルフィド結合形成を促進する SHuffle T7 株を用いることで、安定な可溶性 CHH-Gly を最も効率よく得られることを見いだした。精製工程の改良も加え、 ^{15}N 標識 CHH-Gly の収量を約 0.1 mg まで向上させ、初回測定時の約 10 倍に改善した。さらに、緩衝液条件を検討したうえで、10、30、60、75 μM の各条件で ^1H - ^{15}N HSQC 測定を実施し、期待される約 80 個の交差ピークをほぼすべて観測することができた。これは、調製した CHH-Gly が NMR 解析に適した折りたたみ状態を保持していることを示す重要な成果である。また、一部の残基で濃度依存的な化学シフト変化が認められ、CHH-Gly が溶液中で自己会合またはホモ二量体形成に関与する可能性が示唆された。当初目標である溶液中での単量体・二量体状態の最終決定、溶液構造決定、および C 末端アミド化の影響解析にはまだ至っていないが、本課題により、構造解析に向けた試料調製法と NMR 測定条件の基盤が確立され、今後の多次元 NMR 解析へ進むための重要な進展が得られた。

成果発表

現時点ではなし。今後も解析を続け、論文発表する予定。

今後の展開

現在の課題は、濃度依存的な化学シフト変化の原因を明確にし、CHH-Gly が溶液中で単量体として存在するのか、あるいはホモ二量体を形成するのかを判定することである。この課題に対し、以下の 3 点から検証を進める。

方策 1: ^{15}N 標識体および ^{13}C 標識体を組み合わせた NOESY 実験により、鎖間相互作用に由来する NOE シグナルの検出を試みる。

方策 2: 濃度依存的な化学シフト変化が飽和する濃度域まで滴定実験を行い、ホモ二量体形成に関する親和性 (K_d 値) を見積もる。

方策 3: 3D NMR 実験を導入し、主鎖および側鎖シグナルの帰属を進め、化学シフト変化が観測される残基を特定する。

今後は、3D NMR による主鎖シグナル帰属を最優先に進める。そのために、 ^{13}C , ^{15}N 二重標識 CHH-Gly の調製条件を最適化し、さらなる高収量化を図る。これにより、濃度依存的な化学シフト変化を示す残基とホモ二量体界面との対応を検証し、クルマエビ CHH-Gly の溶液中における会合状態と立体構造の解明につなげる。

3. 社会・経済への波及効果の見通し

甲殻類血糖値上昇ホルモン (CHH) は、甲殻類における血糖調節、脱皮、生殖、浸透圧調節などに関与する

CHH ファミリーペプチドホルモンの代表的分子である。本課題により、クルマエビ CHH の溶液中での構造状態や自己会合性を明らかにするための基盤が整備されれば、甲殻類ペプチドホルモンの作用機構の理解が進むと期待される。特に、CHH の活性発現に重要と考えられる C 末端アミド化や、溶液中での単量体・二量体平衡の構造的意義を明らかにすることは、甲殻類の内分泌制御機構の解明に資する。将来的には、エビ類の成長、脱皮、ストレス応答、生殖制御などに関わる基礎知見として、水産養殖における生産性向上や飼育管理技術の高度化につながる可能性がある。また、ジスルフィド結合を有する小型ペプチドホルモンの発現・精製・NMR 解析条件に関する知見は、類似の難解析性ペプチドの構造研究にも応用可能であり、生命科学・水産科学・構造生物学分野への波及効果が期待される。

4. 利用における感想(改善要望等を含む)

竹内恒先生(東京大学大学院薬学系研究科)には、NMR スペクトル測定のご支援に加え、試料調製および実験計画に関するご助言、今後の方針に関するご提案、立体構造解析法に関する最新情報のご提供など、多方面にわたり親身にご指導いただいた。深く感謝しております。

5. 今後の NMR プラットフォームに対する期待

今後も NMR プラットフォームの活動が継続されることを強く期待しております。本課題では、試料調製が当初の想定どおりには進まず、期間内に当初目標のすべてを達成するには至りませんでした。しかし、 ^{15}N 標識 CHH-Gly の高収量化、測定条件の最適化、濃度依存的な化学シフト変化の観測など、今後の構造解析につながる重要な基盤を得ることができました。本研究は今後も継続する予定であり、さらなる展開に際して、改めて NMR プラットフォームへの利用申請を検討したいと考えております。

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

東京大学

溶液 600MHz

利用期間 1: 2025 年 7 月 8 日～2025 年 7 月 9 日

利用期間 2: 2026 年 3 月 30 日～2026 年 3 月 31 日

9. その他の利用施設

該当なし。