

## 実施課題名：NMR緩和分散法によるタンパク質の構造ダイナミクスの解析

## 【背景】

天然変性タンパク質(IDP)は単独では変性しているが、標的分子との結合という機能発現と同時にフォールディング(構造形成)する。その反応のメカニズムが、結合してからフォールディングする「誘導適合機構」と、フォールディングしてから結合する「構造選択機構」のどちらなのかを、NMRを用いた $R_2$ 緩和分散法で解明することを目指す。また、酵素の活性が構造ゆらぎと関連しているかどうかを調べるために、野生型よりも高活性化させたジヒドロ葉酸還元酵素(DHFR)の変異体を作製後、その構造ゆらぎを $R_2$ 緩和分散法で測定する。

## 【実施内容】

IDPであるc-MybのKIX結合機構を検証するために、c-Mybの $\alpha$ ヘリックスを安定化させたRRR変異体を作製し、これがKIXと結合する反応をNMRで測定した。まず、2次元HSQC滴定実験により、 $^{15}\text{N}$ ラベルされたRRR変異体は単独では天然変性状態であるが、KIXとの結合によって構造形成することが示された(Fig. 1)。次に、 $^{15}\text{N}$ -RRRがKIXに結合する反応の $R_2$ 緩和分散測定を行った。さらにRRR変異体の主鎖帰属用のデータ測定を行った。これらのデータを現在解析中である。もしRRR変異体が野生型よりも速くKIXと結合するならば構造選択機構であることが示される。同様に、IDPであるMLLがKIXに結合してフォールディングするメカニズムを調べるために $R_2$ 緩和分散測定を行った。その結果、MLLについても $R_2$ 緩和分散が観測され(Fig. 2)、マイクロ秒からミリ秒のタイムスケールでのダイナミクスの存在が示唆された。このデータを解析すれば結合反応機構を解明できる。さらに、野生型よりも高活性化したDHFR変異体を、Rosettaソフトウェアを用いて合理的に設計した。これらの変異体の代謝回転数( $k_{\text{cat}}$ )は野生型の約2~6倍に向上していた。このうちの一つの変異体について、律速段階(生成物解離反応)における構造ゆらぎを $R_2$ 緩和分散法で測定した。その結果は現在解析中である。

Fig. 1

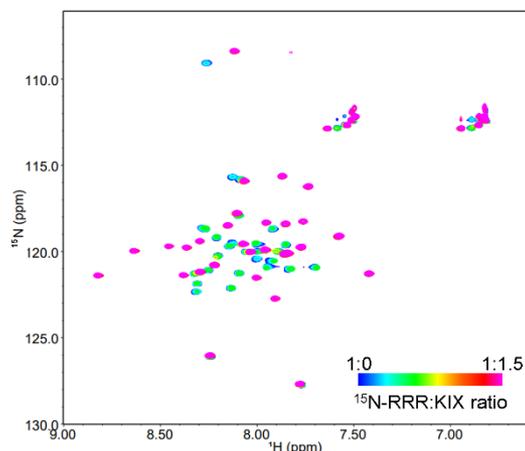
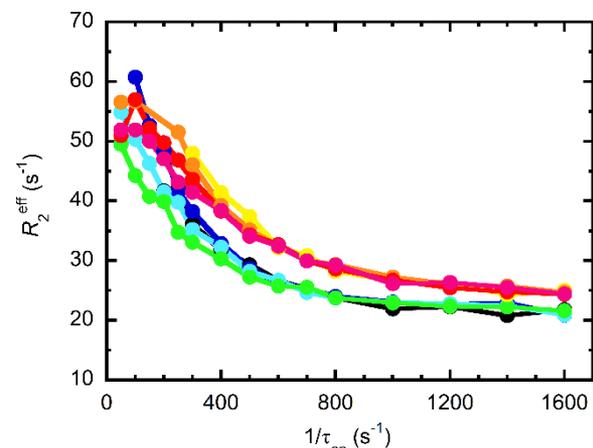
 $^{15}\text{N}$ ラベルしたc-Myb RRR変異体の2次元HSQCスペクトル

Fig. 2

 $^{15}\text{N}$ -MLL/KIX複合体の $R_2$ 緩和分散曲線

NMR 共用プラットフォーム  
実施課題 利用報告書

課題受付番号	PF21-01-R-034		
利用課題名	NMR 緩和分散法によるタンパク質の構造ダイナミクスの解析		
所属機関	東京大学		
所属部署	大学院総合文化研究科 広域科学専攻 生命環境科学系		
役職・氏名	役職	教授	氏名 新井宗仁
利用実施時期、及び期間	2022年 9月21日～2023年 10月31日  総利用日数:31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

本研究では、 $R_2$  緩和分散法という NMR 法を用いて、タンパク質構造のダイナミクスをマイクロ秒からミリ秒の時間分解能とアミノ酸レベルの空間分解能で測定することにより、次の2つの課題の解決を目指す。

**研究1「天然変性タンパク質 (IDP) の標的分子認識機構の解明」:** IDP は単独では変性しているが、標的分子との結合という機能発現と同時にフォールディング (構造形成) する。その代表的なメカニズムとして、結合してから構造形成する「誘導適合機構」と、構造形成してから結合する「構造選択機構」がある。これまでに複数の IDP が誘導適合機構で結合することが報告されている。これに対し、我々は  $R_2$  緩和分散法により、野生型 c-Myb の天然変性領域が転写コアクチベーター CBP の KIX ドメインと結合する際に構造選択機構で結合することを示した (Arai et al. (2015) PNAS, 112: 9614)。しかし他のグループは  $\Phi$  値解析などにより、c-Myb と KIX の結合は誘導適合機構によると主張している (Giri et al. (2013) PNAS, 110: 14942)。この問題を解決するために、c-Myb が構造選択機構で標的タンパク質を認識することの検証を行う。また、IDP による結合機構を統一的に理解するために、他の IDP についても  $R_2$  緩和分散法を用いて結合反応機構を解析する。

**研究2「酵素活性と構造ゆらぎの相関解析」:** 酵素の活性は、酵素反応の律速段階における構造ゆらぎと相関すると考えられている (Boehr et al. (2006) Science, 313: 1638)。これを検証するためには、野生型酵素よりも高活性化変異体のほうが高速に運動しているかどうかを調べる必要がある。そこで、モデル酵素であるジヒドロ葉酸還元酵素 (DHFR) を用い、高活性化変異体を作製後、その構造ダイナミクスを  $R_2$  緩和分散法で測定し、酵素活性と構造ゆらぎの相関を検証する。

## 2. 成果の概要

### 実施内容

研究1「IDP の標的分子認識機構の解明」: IDP である c-Myb が構造選択機構と誘導適合機構のどちらによ

ってKIXと結合するのかが現在、議論になっている。この問題を解決するために、我々は、c-Mybの $\alpha$ ヘリックスを安定化させるアミノ酸置換(Lys→Argへの置換)を3つ導入したc-MybのRRR変異体を作製し、これがKIXと強く結合することを示した(Suetaka et al. (2022) Sci Rep. 816: 12)。もしRRR変異体が野生型よりも速くKIXと結合するならば構造選択機構であることが示される。一方、これが野生型よりも遅く結合するならば誘導適合機構であることが示される。そこで、RRRとKIXとの結合速度などの詳細を解明するために、NMR測定を行った。まず、2次元HSQCでの滴定実験により、 $^{15}\text{N}$ ラベルされたRRR変異体は単独では天然変性状態であるが、KIXとの結合によって構造形成することが示された。次に、 $^{15}\text{N}$ -RRRとKIXとの複合体状態における $R_2$ 緩和分散測定を行った(700と900MHzの2つの磁場と、4つの異なる濃度比)。その結果、RRR変異体についても野生型と同様に $R_2$ 緩和分散が観測され、マイクロ秒からミリ秒のタイムスケールでのダイナミクスの存在が示唆された。また、RRR変異体の主鎖化学シフトの連鎖帰属用の測定も行った。現在これらのデータの解析が進行中である。

KIXタンパク質には2つの転写因子結合部位(c-Myb結合サイトとMLL結合サイト)があり、MLL結合サイトには転写因子MLLが結合する。MLLもIDPであり、KIX結合に伴って構造形成する。そこで、MLLとKIXとの結合反応機構についてもRRRと同様に調べた。まず、2次元HSQC測定により、MLLの転写活性化ドメインは単独では天然変性状態であるが、KIXとの結合によって構造を形成した。次に、 $^{15}\text{N}$ -MLLとKIXとの複合体状態において $R_2$ 緩和分散測定を行った(2つの磁場と、4つの異なる濃度比)。その結果、複数のピークにおいて $R_2$ 緩和分散曲線が観測された。またMLLの主鎖化学シフトの連鎖帰属用の測定も行った。これらのデータについても現在解析中である。

研究2「酵素活性と構造ゆらぎの相関解析」: まず、本研究を進めるうえで適切な変異体を作製するために、タンパク質設計用ソフトウェアRosettaを使ってDHFRの律速段階(生成物解離反応)を高速化する変異体を理論的に設計したところ、代謝回転数( $k_{\text{cat}}$ )が野生型の約2~6倍向上した変異体が複数得られた。これらの変異体ではミカエリス定数( $K_m$ )は野生型とほぼ同じであり、特異性定数 $k_{\text{cat}}/K_m$ についても野生型の約2~4倍に向上していた。また、ストップフロー蛍光測定により、これらの変異体については生成物解離の速度が高速化していることが示された。そこで、作製した変異体の一つについて $^{15}\text{N}$ ラベル体を作製後、生成物結合状態における $R_2$ 緩和分散測定を行った(700と900MHzの2つの磁場)。現在このデータを解析中であり、その結果から、DHFRの構造ダイナミクスが生成物解離反応速度や代謝回転数と相関しているかどうか明らかになると期待される。

### 本課題により得られた成果と当初目標との比較

本課題には、IDPの標的分子認識機構の解明と、酵素活性と構造ゆらぎの相関解析という2つの課題がある。一つ目の課題については、c-MybがKIXと結合するしくみが構造選択機構と誘導適合機構のどちらなのかを解明するという目標と、他のIDPについても $R_2$ 緩和分散法によって結合機構を解明するという目標があった。本研究ではこれら2つの目標達成に向けて、それぞれ、 $\alpha$ ヘリックス構造を安定化させたc-MybのRRR変異体がKIXを認識する反応の $R_2$ 緩和分散測定と、IDPであるMLLがKIXと結合してフォールディングする反応の $R_2$ 緩和分散測定を行った。また、RRRとMLLの主鎖化学シフトの帰属を行うための測定も行った。さらに、二つ目の課題については、モデル酵素であるDHFRを高活性化させた変異体を、Rosettaを用いて合理的に設計後、 $R_2$ 緩和分散測定を行った。これらのデータは現在解析中である。解析が完了すれば、c-Mybが構造選択機構でKIXと結合することの検証や、MLLの分子認識機構の解明、および、酵素活性と構造ゆらぎの相関解析などの当初目標が達成される見込みである。

## 成果発表

なし

## 今後の展開

IDP の分子認識機構に関する研究については、解析を完了させた後に、c-Myb (RRR 変異体) と MLL それぞれについて原著論文としてまとめ、できるだけ高インパクトファクターの雑誌に投稿したいと考えている。また、今後も引き続き様々な IDP について同様の測定を行い、IDP による分子認識機構の統一的解明を目指していきたい。DHFR の酵素活性と構造ゆらぎとの相関解析についても同様であり、今回測定した DHFR の高活性化変異体についてのデータをまとめた論文を執筆後には、他の高活性化変異体についても実験を行い、得られた結果の普遍性を検証する予定である。

$R_2$  緩和分散法はマイクロ秒からミリ秒のタイムスケールでの構造ダイナミクスを測定できる優れた手法である。多くのタンパク質がこのタイムスケールで結合や触媒などの機能を発揮する。したがって、この NMR 技術は今後、多様なタンパク質が機能を発揮するしくみを解明するうえで有用であると期待される。

## 3. 社会・経済への波及効果の見通し

IDP は様々な疾患と関係しているため、IDP と標的分子との結合反応の阻害剤は、それらの疾患に対する治療薬になりうると期待されている。例えば、c-Myb と KIX との結合は白血病と関与しており、様々な低分子化合物や中分子ペプチドなどの阻害剤の開発が進められている。実際、c-Myb の RRR 変異体は、そのような中分子阻害ペプチドを作製する目的で我々が開発したものである。また、KIX の MLL 結合部位には、ウイルス由来のタンパク質などが結合するため、このサイトに強く結合する化合物やペプチド等を開発できれば、ウイルス感染症などに対する阻害薬になりうる。本研究の成果は、このような阻害剤開発を促進できると期待される。

近年、酵素反応の  $k_{cat}$  を決めるのはタンパク質の構造ダイナミクスであることが示唆されている。酵素活性と構造ゆらぎの対応関係が明らかになれば、今後、酵素を合理的に高活性化させる方法の開発につながり、産業や医療などに応用可能な酵素の開発に貢献できるだろう。

## 4. 利用における感想(改善要望等を含む)

理化学研究所の NMR 分光装置は大変感度が良く、非常に高分解能のデータを短時間で得ることができるので、大変ありがたく思っております。また、測定を支援してくださるスタッフは、非常に丁寧に測定のセットアップをしてくださっており、大変感謝しております。利用して良かった点ばかりであり、改善してほしい点は全くございません。今後も引き続き理化学研究所の NMR 装置を使用させていただければ大変幸いに存じます。どうぞよろしくお願い申し上げます。

## 5. 今後の NMR 共用プラットフォームに対する期待

NMR プラットフォームの優れている点は以下の 3 点だと思います。既にこれらは実現されているため、今後もこれらを継続していただけることを切に希望いたします。

- (1) 高分解能の NMR 装置にアクセスできること: 我々の研究室にはノーマルプローブの NMR 装置 (500 MHz) がございますが、感度が非常に低いため測定にかなりの時間がかかっております。NMR プラットフォームによって高分解能の NMR 装置を使用できるならば、研究が飛躍的に効率化されるだけでなく、我々の装置では測定できないような実験 ( $R_2$  緩和分散実験など) を実施することができます。
- (2) 利用しやすいこと: このような高分解能の NMR 装置は通常の科研費では購入することができないほど高価

です。また有料の共同利用をする場合であっても、その使用料金は、科研費で支払うには高額です。国内最高レベルの装置を無料で使用できるのは非常にありがたいです。

- (3) 手厚いサポートがあること：近年の構造生物学の発展には目を見張るものがあり、クライオ電子顕微鏡だけでなく AlphaFold 2 の登場により、NMR を用いたタンパク質の構造決定に対する需要が減ってきているかもしれません。また、ヘリウム供給量の減少や装置の老朽化により、NMR 装置の稼働を停止する話も耳にします。この流れが進むと、今後は NMR の専門家は減少するかもしれません。しかし NMR はダイナミクス測定においては今後も重要な測定法であり続けると考えられます。そこで、NMR の非専門家であっても容易に NMR 装置を使えるようなサポートを提供し続けることが、今後ますます必要になってくるのではないかと思います。これは国内の研究レベルを維持するためにも必要であり、文部科学省の主導で継続していくべき重要な事業であると考えられます。

## 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

利用させていただいた成果をきちんとまとめて論文発表できるように、全力を尽くしていく所存です。引き続きどうぞよろしくお願い申し上げます。

## 8. 利用施設

### 理化学研究所

溶液 900MHz

利用期間 1: 2022 年 9 月 21 日

利用期間 2: 2022 年 10 月 20 日～2022 年 10 月 21 日

利用期間 3: 2022 年 11 月 21 日～2022 年 11 月 25 日

利用期間 4: 2023 年 10 月 24 日～2023 年 10 月 31 日

溶液 700MHz

利用期間 1: 2022 年 10 月 17 日～2022 年 10 月 20 日

利用期間 2: 2022 年 11 月 21 日～2022 年 11 月 29 日

利用期間 3: 2023 年 3 月 14 日

利用期間 4: 2023 年 10 月 24 日～2023 年 10 月 31 日

## 9. その他の利用施設

なし