

実施課題名: タンパク質における特異なプロトン化状態とその動態のNMR観測と、そのための手法開発

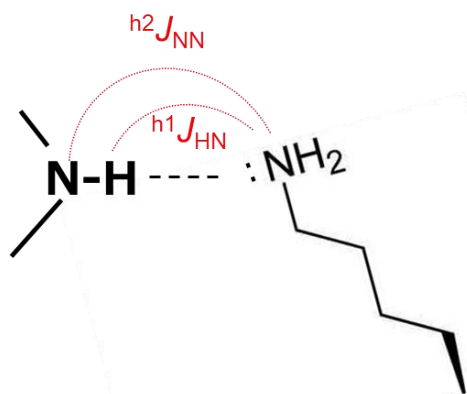
【背景】

本研究では、光受容体タンパク質RcaEのGAFドメインにおいて、発色団であるフィコシアノビルと、その近傍のリシンの側鎖のプロトン化状態について解析を行い、タンパク質内において、リシン側鎖の脱プロトン化を捉えた。先端NMR施設を用いて、リシン側鎖のプロトン化状態を詳細に観測し、また脱プロトン化した際のリシンが、どのように機能しているのかを探り、そのために必要な測定法の開発を行った。

【実施内容】

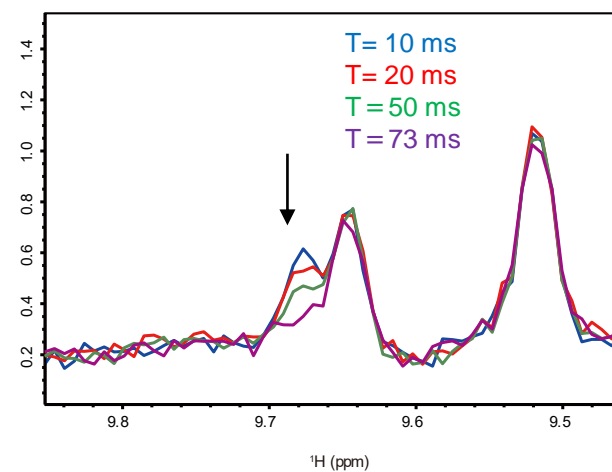
X線結晶構造解析から得られた立体構造情報と、NMRによる発色団の測定から、GAFドメインの発色団近傍のLys261の側鎖がNH₂型となり、そのNH₂が発色団のイミノ基と水素結合を形成し、水素結合のアクセプターとなっていることが想定された。実際にLys261の側鎖がアクセプターになっていることを確認するため、¹⁵Nパルスの照射位置の調整や、選択パルスによりLys261の側鎖の観測に最適化したHNN-COSYを測定した。また線形の良い理研の高磁場の装置を用いて、この水素結合経路のスカラーカップリングの大きさを調べるため、スピンエコーを用いた定量的な測定を行った。均一標識した試料では、対象にしている信号が、線形の良い高磁場の装置を用いても他の信号と重なっており、定量的な測定に影響を及ぼすため、リジンと発色団のみを選択的に¹⁵N標識した試料を調製し、スピンエコー実験を行うことで、精密な^{h2}J_{NN}を計測した。

Fig. 1



発見した新奇な水素結合。通常ならばプラス電荷を持つリジン側鎖が脱プロトン化して、水素結合のアクセプターとなっている。

Fig. 2



1D Spin-echo difference ¹H-¹⁵N TROSY. 信号の強度変調から ^{h2}J_{NN} が、2.5 Hzであることが明らかになった。

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-RH-035		
利用課題名	タンパク質における特異なプロトン化状態とその動態の NMR 観測と、そのための手法開発		
所属機関	東京薬科大学		
所属部署	薬学部		
役職・氏名	役職	教授	氏名 三島 正規
利用実施時期、及び期間	2021 年 12 月 ~2023 年 10 月 総利用日数: 52 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

生化学において、タンパク質中のアミノ酸リシンの側鎖はプロトン化状態にあり、プラス電荷をもつと常識として捉えられている。しかし、例えば AADase (acetoacetate decarboxylase) では、以前の生化学的解析から中性付近でも活性残基のリジンが脱プロトン化した状態であることが提案されている。AADase の結晶構造解析が行われているもの (Nature 2009, 459: 393-397)、通常の X 線結晶構造解析ではプロトンの存在が議論できないため、プロトン化状態の直接の決定はなされていない。他のリシンの脱プロトン化が提唱されている酵素も同様である。申請者らは、光受容体タンパク質 RcaE の GAF ドメインにおいて、色素であるフィコシアノビルとその近傍のリシンの側鎖のプロトン化状態について解析を行い、タンパク質内において、リジン側鎖の脱プロトン化を捉えていた。本課題では、先端 NMR 施設を用いて、リジン側鎖のプロトン化状態を詳細に観測し、また脱プロトン化した際のリジンがどのように機能しているのかを探り、また、そのために必要な測定法の開発を行った。

2. 成果の概要

実施内容

光受容体タンパク質 RcaE の GAF ドメインの発色団と、その近傍のリジンのプロトン化状態の観測を行った。並行して行っていた X 線結晶構造解析から得られた立体構造情報と、NMR による発色団の測定から、発色団近傍の Lys261 の側鎖が NH₂ 型となり、その NH₂ が発色団のイミノ基と水素結合を形成し、水素結合のアクセプターとなっていることが想定された。実際に Lys261 の側鎖がアクセプターになっていることを確認するため、¹⁵N パルスの照射位置の調整や、選択パルスの利用により Lys261 の側鎖の観測に最適化した HNN-COSY を測定した。また線形の良い理研の高磁場の装置を用いて、この水素結合経路のスカラーカップリングの大きさを調べるため、スピンエコーを用いた定量的な測定、またスプリット幅の直接観測を行った。均一標識した試料では、対象にしている信号が、線形の良い高磁場の装置を用いても他の信号と重なっており、定量的な測定に影響を及ぼすため、リジンと発色団のみを選択的に ¹⁵N 標識した試料を調製し、スピンエコー実験を行い、精密な ^{h2}J_{NN} を計測した。また ε-¹³C, D₂ リジンを取り込ませた試料を用いて、溶媒の軽水を重水の置換したときの ε-¹³C

に観測される二次の同位体シフトを観測し、リシン側鎖の脱プロトン化と、そのNHの交換速度を調べた。北海道大学の800MHzクライオTCI(N)を用いて¹⁵N核を直接観測する場合にどれくらいの感度があるのか検討した。

本課題により得られた成果と当初目標との比較

Lys261側鎖の観測に最適化したHNN-COSYの測定から、発色団のイミノ基(N-H)とリシン側鎖のN ζ との間に明確にクロスピークを確認した。これによりLys261が水素結合のアクセプターになっていることが裏付けられた。またリシンと発色団のみを選択的に¹⁵N標識した試料を調製し、かつ、線形の良い高磁場の装置を用いてTROSYタイプの¹⁵Nスピンエコー実験を行い、一連の強度変調された信号を得た。ここから h^2J_{NN} の大きさを求めたところ、 $2.5 \text{ Hz} \pm 0.1 \text{ Hz}$ という値が得られた。従来から知られている核酸の塩基対のあいだの h^2J_{NN} に対して60%程度の大きさであり、妥当と考えている。また理化学研究所の800MHzクライオTXOを用いて¹⁵N核を直接観測し、実際に信号の分裂幅からの h^2J_{NN} の定量を試みたが、高磁場の装置を用いても、線幅の問題から、分裂として観測するには至らなかった。また ϵ -¹³C,D2リジンを取り込ませた試料による ϵ -¹³C上の二次の同位体シフトの観測では、低温にしたとき、50%重水の溶媒中ではNH₂、NH(D)、ND₂に由来する二次の同位体シフトによる1:2:1の分裂が明瞭に観測され、交換が比較的遅いことが明らかになった。また800MHzクライオTCI(N)は、¹⁵N核を直接観測する場合、十分に実用的な感度をもつことを確認した。以上のように当初目標を十分に達成することが出来た。

成果発表

<論文>

(1) "Insight into the C-terminal SH3 domain mediated binding of Drosophila Drk to Sos and Dos."

Sayeesh PM, Ikeya T, Sugawara H, Watanabe R, Mishima M, Inomata K, Ito Y.

Biochem Biophys Res Commun. 2022 Oct 15;625:87-93. doi: 10.1016/j.bbrc.2022.08.007. Epub 2022 Aug 5.

(2) "Efficient synthesis of γ -oxo carboxylic esters and isotope-labeled 5-aminolevulinic acid (5-ALA) by Pd(OAc)₂/phosphonium tetrafluoroborates catalyzed Fukuyama coupling reaction"

Aoyama H, Iizuka Y, Kawanishi R, Shibatomi K, Arakawa Y, Tsuji H, Yuu Hirose, Mishima M. (2023)

Tetrahedron Lett., 123, 154570

(3) 「シアノバクテリア光センサータンパク質のプロトン化状態のNMR解析」

波紋 32巻、25-28頁、日本中性子科学会 2022年 三島正規

(4) 「¹⁵N NMRによるシアノバクテリオクロムのプロトン化状態の解析」

永江峰幸、青山洋史、三島正規

日本核磁気共鳴学会 機関誌 第12号

<学会発表>

(1) 「シアノバクテリアの光センサーの構造研究」

日本薬学会第142年会 2022年3月26日(オンライン)

飯塚 佑介、永江 峰幸、青山 洋史、伊集院 良祐、伊藤 隆、広瀬 侑、三島 正

(2) 「¹⁵N 直接観測 NMRによるシアノバクテリア光センサーのプロトン化状態の解析」

日本薬学会第142年会 2022年3月26日(オンライン)

三島 正規、永江 峰幸、小泉 太貴、青山 洋史、伊集院 良祐、伊藤 隆、広瀬 侑

(3) 「光遺伝学を指向したシアノバクテリオクロムの構造基盤」

日本薬学会第 143 年会 2023 年 3 月 27 日(札幌)

永江峰幸、飯塚佑介、青山洋史、宮ノ入洋平、神野智司、伊藤隆、広瀬侑、三島正規

(4) 「電荷が中性なりシン側鎖の同定」

第 62 回 NMR 討論会 2023 年 11 月 9 日

三島正規

(5) 「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 9 日

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、広瀬侑、甲斐荘正恒、伊藤隆、石北央、三島正規

今後の展開

本研究で、水素結合のアクセプターとして機能することを見出した、Lys261 側鎖のアミノ基の pK_a は、通常のリシンの 9 付近から大きく中性側にずれているはずであり、この pK_a を決定することは生化学的基礎データとして大変重要である。そのためには pH タイトレーションによる測定が必要であるが、用いる測定法が簡便であることが望ましい。その測定法として、 ^{15}N 核の直接観測を高い感度で行うことができる装置(現状では利用できる施設が増えて、北大、理研、阪大)を用いた ^{15}N の 1D 直接測定を行うのが良いと考えている。この測定は他のタンパク質にも応用が可能であり、最新の装置の有効な利用法の 1 つと言える。また他のタンパク質において、リシン側鎖が NH_2 型となり、水素結合のアクセプターになっているケースを実際に観測していきたい。そのための試料調製に取り組んでおり、近々、再度、最先端利用枠での高度な NMR 装置の利用を計画している。

3. 社会・経済への波及効果の見通し

もともとは、核酸の塩基対における水素結合を介したスピン結合を経由して信号を観測する測定 HNN-COSY を用いて、 ^{15}N パルスの照射位置の調整、選択的パルスを利用することにより、リシン側鎖をアクセプターとする新奇な水素結合の観測に成功している。このような水素結合は X 線結晶構造解析の結果のみからは、到底、その存在に気づくことができないものであり、従来の構造生物学研究で蓄積された構造のなかにも、実際は存在していたのにも関わらず見過ごされてきたのではないかと考えている。また Lys-NH₂ は酵素の活性部位において求核性が高く有利であるため、過渡的に生成すると想定されているが、実験的にその存在を捉えるのは容易でない。本課題において用いた $^{13}\text{C}_\alpha$ の二次の同位体シフトを用いる手法では、比較的感度が良いため、遷移中間体として存在するような NH_2 型のリシンを可視化できるかもしれない。その場合にはフロー装置による基質の補充や、アナログの利用も必要である。こういった NMR 測定によってもたらされる Lys-NH₂ の生成の理解は、酵素の反応機構について理解が深まるとともに、非共有結合を介した新たな可逆的な酵素阻害剤の開発といった応用研究にも資するものである。

4. 利用における感想(改善要望等を含む)

とても気持ちよく利用させていただいています。Teamviewer による遠隔測定も快適です。ご担当の皆様にはと

でも丁寧にご対応いただいています。また随時、装置が部分的でも更新されており、最新の分光器を使うことができる点も良い点です。

5. 今後の NMR 共用プラットフォームに対する期待

先端利用枠(できる限り無償のもの)を今後も是非、継続していただきたいです。

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

北海道大学

溶液 800MHz

利用期間 1: 2022 年 3 月 3 日～2022 年 3 月 7 日

利用期間 2: 2022 年 5 月 26 日～2022 年 6 月 2 日

理化学研究所

溶液 900MHz

利用期間 1: 2022 年 5 月 20 日～2022 年 5 月 23 日

利用期間 2: 2023 年 3 月 14 日～2023 年 3 月 17 日

利用期間 3: 2023 年 3 月 20 日～2023 年 3 月 23 日

利用期間 4: 2023 年 4 月 7 日～2023 年 4 月 10 日

利用期間 5: 2023 年 7 月 18 日～2023 年 7 月 20 日

利用期間 6: 2023 年 7 月 21 日～2023 年 7 月 24 日

溶液 800MHz

利用期間 1: 2021 年 11 月 25 日～2021 年 11 月 29 日

利用期間 2: 2021 年 12 月 9 日～2021 年 12 月 13 日

利用期間 3: 2022 年 1 月 12 日～2022 年 1 月 17 日

利用期間 4: 2022 年 1 月 28 日～2022 年 1 月 31 日

利用期間 5: 2022 年 3 月 22 日～2022 年 3 月 28 日

利用期間 6: 2023 年 7 月 31 日～2023 年 8 月 2 日

9. その他の利用施設

本研究と相補的な構造情報を取得する目的で、¹⁵N 直接観測のためのクライオ BBFO プローブを有する大阪大学の超高磁場 NMR 共同利用研究事業を利用した。