

実施課題名: マルチドメイン蛋白質と天然変性蛋白質のアンサンブル構造解析

【背景】 申請者らは、2021年度までの「最先端利用開発」課題において、複数のNMRデータを統合解析し、溶液中での蛋白質構造を揺らぎを加味して決定するmulti-state立体構造計算法を開発に成功した。前課題では、本手法をシングルドメイン蛋白質に適用し、活性部位付近の大きな運動性の可視化に成功している。本課題では、この手法をマルチドメイン蛋白質(MDP)に拡張し、より運動性の大きな生体高分子のアンサンブル構造の可視化を目指す。シグナル伝達と液液相分離の形成に関わるMDP について、PRE, RDC, PCSなどから遠距離情報を取得し、本計算法に適用する。細胞内シグナル伝達や液液相分離(LLPS)形成機構を詳細に明らかにすることを目指す。

【実施内容】 Multi-state立体構造計算法をMDPに応用することで、ドメイン配向の可視化を目指した。モデル試料には、分子量27kDaのGRB2と17kDaの直鎖ユビキチンダイドメイン(diUB)を選択した。2つの試料ともにmulti-state立体構造計算を適用可能な十分な短距離、長距離の空間情報の取得に成功した。GRB2は、3つのドメイン(nSH3-SH2-cSH3)からなり、細胞内シグナルに関与するアダプター蛋白質である。直鎖diUBは、2つのユビキチンがN末端とC末端で直鎖状につながった構造で、NF- κ Bの活性化に関与する。いずれも結晶構造は決定されているが、溶液中でのドメイン配向は十分に解析されていなかったことから、アンサンブル構造の可視化を試みた。GRB2の構造解析では、GRB2の3つのドメインの配向は、結晶構造とは大きく異なっていることが示された。アンサンブル構造と緩和解析から、nSH3とSH2は一体となって運動しているのに対し、cSH3は独立して大きく揺らいた構造であることが明らかになった(図1)。また、GRB2のSOS1-PRとの滴定実験より、nSH3ドメインはcSH3よりも結合親和性がかなり強いことが示された(図2a)。また、LLPS形成下でのNMR観測にも成功した(図2b)。diUBの解析では、multi-state構造解析に加え、in-cell NMRでのドメイン間PCSの観測を成功し、細胞内でのドメイン配向を決定できる空間情報を得ることができた。現在解析を進めており、細胞内でのMDPの立体構造決定につながる大きな進展が得られた。

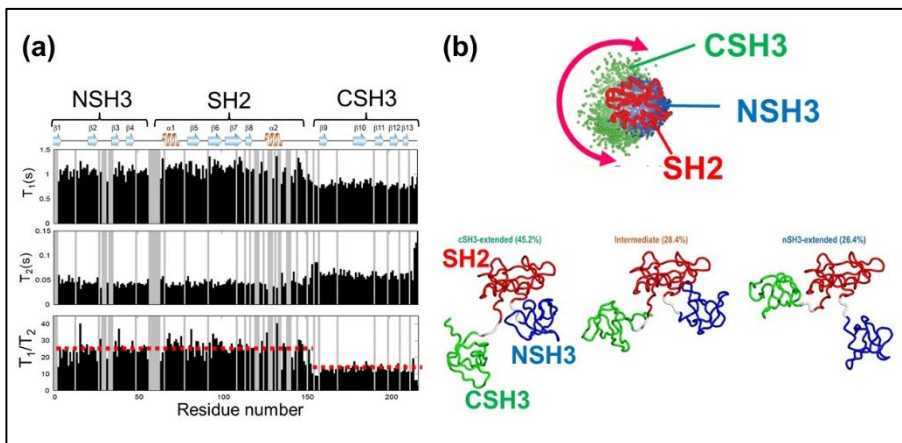


図1. GRB2の主鎖 ^{15}N 緩和解析(a) と得られたアンサンブル構造(b). (a) CSH3ドメインの T_1/T_2 の値は顕著に小さくなっている。(b) アンサンブル構造のドメイン中心を点で表示(上). 3つの代表構造(下).

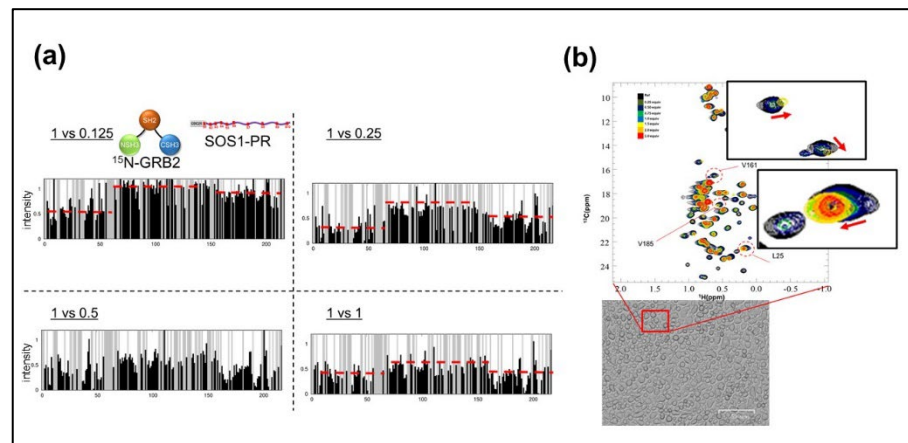


図2. SOS1-PRの滴定によるGRB2のスペクトル変化. (a) ^{15}N 標識GRB2のピーク強度変化. nSH3側のピーク強度が滴定点の初期段階で減数する. (b) LLPS形成下でのGRB2のメチル基の信号変化.

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-RYO-036		
利用課題名	マルチドメイン蛋白質と天然変性蛋白質のアンサンブル構造解析		
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	2021 年 11 月 1 日～2023 年 10 月 31 日 総利用日数:10 日 <input type="checkbox"/> 当初計画どおり・ <input checked="" type="checkbox"/> 当初計画変更 (変更理由) 2021 年 12 月に起こった東京都立大内での火災の影響により、1 年近くの間、実験室に電気が通じない状態が続いたため、仮設の小規模な実験室しか試料調製を行うことができなかった。このため、試料調製のスケジュールが当初よりも大きく遅れ、申請時に予定していた NMR 測定は十分にできなかった。一方、2023 年は、研究グループ内に 500MHz NMR 装置を新たに導入できたため、高磁場装置を必要としない測定はこれを使用し、共用装置を利用する時間はそれほど必要としなかった。		

1. 本課題の概要・目的

申請者らは、2021 度までに実施されてきた「NMR 共用プラットフォーム 最先端利用開発」課題を利用して、複数の NMR データを統合解析し、溶液中での蛋白質構造を揺らぎを加味して決定する multi-state 立体構造計算法を開発に成功した。前課題では、本手法をシングルドメイン蛋白質である YUH1 に適用し、YUH1 の活性部位付近における大きな運動性の可視化に成功した。本課題では、天然変性蛋白質(IDP)やマルチドメイン蛋白質(MDP)など、より運動性の大きな生体高分子のアンサンブル構造を可視化する手法の開発を目指す。具体的には、MAPK シグナル伝達と液液相分離の形成に関わる IDP や MDP (GRB2, SOS, Drk., FixJ, Ras など)の試料について、PRE, RDC, PCS などから遠距離情報を取得し、本計算法に適用する。IDP や MDP に特有の大きなダイナミクスを考慮した構造をアンサンブルとして可視化することで、これらの蛋白質が関与する細胞内シグナル伝達の分子認識機構の解明や、近年細胞生物学分野で特に注目を集めている液液相分離形成機構を詳細に明らかにすることを目標とする。

2. 成果の概要

実施内容

本課題では、これまでに申請者らが開発してきた multi-state 立体構造計算法を、特にマルチドメイン蛋白質(MDP)に応用することで、ドメイン配向の可視化を目指した。モデル試料には、分子量 27.0 kDa のヒト GRB2、シヨウジョウバエ由来 Drk., 22.2 kDa の根粒菌由来の FixJ、および 17.2 kDa の直鎖ユビキチンダイドメインを選択

した。このうち、GRB2 と直鎖ユビキチンダイドメインは、multi-state 立体構造計算を適用可能な十分な短距離、長距離の空間情報の取得に成功した。GRB2 は、3 つのドメイン(nSH3-SH2-cSH3)からなり、MAPK シグナル伝達経路において、EGFR などの膜蛋白質から、SOS や RAS などの下流蛋白質に細胞内シグナルを伝達するアダプター蛋白質である。また、今回試料として用いたユビキチンダイドメインは、2 つのユビキチンが N 末端と C 末端で直鎖状につながったポリユビキチンの 1 つであり、NF- κ B の活性化に関与する。いずれも結晶構造は決定されているが、溶液中でのドメイン配向は十分に解析されていなかったことから、PCS や PRE などの長距離情報を観測し、multi-state 立体構造計算を用いて構造の可視化を試みた。

本課題により得られた成果と当初目標との比較

GRB2 の構造解析では、PRE, RDC, NOE, 化学シフト由来の 2 面角情報などの複数構造情報をもとに、multi-state 立体構造計算を行った。解析の結果、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示された。GRB2 のアンサンブル構造と緩和解析から、nSH3 と SH2 は一体となって運動しているのに対し、cSH3 は独立して大きく揺らいだ構造を取っていることが明らかになった。また、GRB2 の SOS との NMR 滴定実験より、nSH3 ドメインは cSH3 よりも結合親和性がかなり強いことが示された。運動性や結合親和性において、2 つの SH3 ドメインのこのような非対称性は、当初予想しておらず、GRB2 の機能や分子認識機構に関する新たなモデルを提示する結果となった。

直鎖ユビキチンダイドメインの構造解析では、multi-state 構造計算に加え、in-cell NMR でのドメイン間 PCS の観測に成功し、細胞内での 2 つのドメインの配向を決定できる空間情報の取得にも成功した。現在、この解析を進めており、細胞内での MDP の立体構造決定につながる大きな進展が得られた。

成果発表

(論文)

1. Sayeesh, P.M., Ikeya, T.*, Sugasawa, H., Watanabe, R., Mishima, M., Inomata, K., & Ito, Y.*, “Insight into the C-terminal SH3 domain mediated binding of Drosophila Drk to Sos and Dos”, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 625, 87–93 (2022), DOI: 10.1016/j.bbrc.2022.08.007
2. P.M. Sayeesh, M. Iguchi, Y. Suemoto, J. Inoue, K. Inomata, T. Ikeya*, Y. Ito* “Interactions of the N- and C-Terminal SH3 Domains of Drosophila Drk with the Proline-Rich Peptides from Sos and Dos” *Int. J. Mol. Sci.*, 24, 14135 (2023). DOI: 10.3390/ijms241814135
3. M. Tariq, T. Ikeya, N. Togashi, L. Fairall, S. Kamei, S. Mayooramurugan, L.R. Abbott, A. Hasan, C. Bueno-Alejo, S. Sukegawa, B. Romartinez-Alonso, M.A.M. Campillo, A.J. Hudson, Y. Ito, J.W.R. Schwabe, C. Dominguez, K. Tanaka* “Structural insights into the complex of oncogenic KRas4BG12V and Rgl2, a RalA/B activator” *Life Sci. Alliance*, 7, e202302080 (2023) DOI: 10.26508/lsa.202302080
4. K. Futagawa, T. Morioka, K. Furihata, H. Watanabe, Y. Ito, T. Ikeya, A. Hokura, K. Nagata, M. Suzuki* “Structural and Functional Analyses of the Acidic and Basic Amino Acid Repeat Sequence (DDRK) in Pif 80 from *Pinctada fucata* on the Aragonite Crystal Surface Using NMR” *Cryst. Growth Des.*, 23, 5264–5278 (2023). DOI: 10.1021/acs.cgd.3c00467

* corresponding authors

(総説・書籍)

1. Y. Ito, T. Ikeya, K. Inomata: “Chapter 5: In-cell Structural Biology Through the Integration of Solution NMR Spectroscopy and Computational Science” *New Developments in NMR (Vol.30) “Integrated Structural Biology”* Royal Society of Chemistry (2023)

2. 池谷鉄兵, 伊藤隆「溶液 NMR を用いた細胞内での蛋白質構造解析と多形構造の可視化への応用」*Precision Medicine* 6(10), 827-822, 2023 年

(学会発表)

1. 豊田芽生, 猪股晃介, 末広志織, 島海翔, 池谷鉄兵, 鈴木隆史, 山本雅之 & 伊藤隆, In-cell NMR による Keap1/Nrf2 系の研究, バイオカンファレンス 2022, 2022 年 11 月 11 日, 東京
2. 大久保里佳, 池谷鉄兵, 渡邊吏輝, 菱倉直樹, 三島正規, 猪股晃介, 小手石泰康, 澤井仁美, 城宣嗣 & 伊藤隆, 常磁性 NMR を用いた根粒菌マルチドメイン蛋白質 FixJ の立体構造解析, バイオカンファレンス 2022, 2022 年 11 月 11 日, 東京
3. 館野桂太, 菅澤はるか, 安藤考史, 田端真彩子, 美川務, 猪股晃介, 甲斐荘正恒, 三島正規, 杉田有治, 池谷鉄兵 & 伊藤隆, マルチドメイン蛋白質 GRB2 と SOS1-PRM 領域の相互作用解析, バイオカンファレンス 2022, 2022 年 11 月 11 日, 東京
4. 富樫直之, 宮田裕貴, 亀井駿, 菅澤はるか, 美川務, 猪股晃介, 田仲加代子, 伊藤隆 & 池谷鉄兵, GMPPNP 結合型 K-Ras^{G12V} と Rgl2^{RBD} の相互作用解析, バイオカンファレンス 2022, 2022 年 11 月 11 日, 東京
5. 安藤考史, 菅澤はるか, 館野圭太, 田端真彩子, 美川務, 宮ノ入洋平, 川端庸平, Hisham Dokainish, Weitong Ren, 大出真央, 寺内勉, 猪股晃介, 三島正規, 甲斐荘正恒, 杉田有治, 池谷鉄兵 & 伊藤隆, 常磁性 NMR を用いたマルチドメイン蛋白質 GRB2 の立体構造解析, バイオカンファレンス 2022, 2022 年 11 月 11 日, 東京
6. 屋部祥大, 田岸亮馬, 鴨志田一, 美川務, 猪股晃介, 池谷鉄兵 & 伊藤隆, In-cell NMR による linear diubiquitin の in-situ 立体構造解析, 第 61 回 NMR 討論会(2022), 2022 年 11 月 8-10 日, 高知
7. 豊田芽生, 猪股晃介, 末広志織, 島海翔, 池谷鉄兵, 鈴木隆史, 山本雅之 & 伊藤隆, In-cell NMR による Keap1/Nrf2 系の研究, 第 61 回 NMR 討論会(2022), 2022 年 11 月 8-10 日, 高知
8. 大久保里佳, 池谷鉄兵, 渡邊吏輝, 菱倉直樹, 三島正規, 猪股晃介, 小手石泰康, 澤井仁美, 城宣嗣 & 伊藤隆, 常磁性 NMR を用いた根粒菌マルチドメイン蛋白質 FixJ の立体構造解析, 第 61 回 NMR 討論会(2022), 2022 年 11 月 8-10 日, 高知
9. 館野桂太, 菅澤はるか, 安藤考史, 田端真彩子, 美川務, 猪股晃介, 甲斐荘正恒, 三島正規, 杉田有治, 池谷鉄兵 & 伊藤隆, マルチドメイン蛋白質 GRB2 と SOS1-PRM 領域の相互作用解析, 第 61 回 NMR 討論会(2022), 2022 年 11 月 8-10 日, 高知
10. 安藤考史, 菅澤はるか, 館野圭太, 田端真彩子, 美川務, 宮ノ入洋平, 川端庸平, Hisham Dokainish, Weitong Ren, 大出真央, 寺内勉, 猪股晃介, 三島正規, 甲斐荘正恒, 杉田有治, 池谷鉄兵 & 伊藤隆, 常磁性 NMR を用いたマルチドメイン蛋白質 GRB2 の立体構造解析, 第 61 回 NMR 討論会(2022), 2022 年 11 月 8-10 日, 高知
11. 富樫直之, 宮田裕貴, 亀井駿, 菅澤はるか, 美川務, 猪股晃介, 田仲加代子, 伊藤隆 & 池谷鉄兵, GMPPNP 結合型 K-Ras^{G12V} と Rgl2^{RBD} の相互作用解析, 第 61 回 NMR 討論会(2022), 2022 年 11 月 8-10 日, 高知
12. Y. Ito, M. Toyoda, K. Inomata, S. Suehiro, K. Shima, T. Ikeya, T. Suzuki, M. Yamamoto, K. Inomata: "In-cell NMR studies of the Keap1-Nrf2 system" Asia-Pacific Nuclear Magnetic Resonance (APNMR) 2023, Taipei, Taiwan, 7 September (2023).
13. Y. Sugita, M. Oide, T. Ikeya, Y. Ito: "The monomeric structures of GRB2 in solution by integrated modeling", EMBO Workshop Computational structural biology, Heidelberg, Germany, Dec. 6 (2023)
14. 猪股晃介, 豊田芽生, 島海翔, 長峰萌華, 末広志織, 池谷鉄兵, 鈴木隆史, 山本雅之, 伊藤隆「In-cell

NMRにおける細胞試料管理」NMR 討論会, 横須賀, 2023年11月7日

15. 池谷鉄兵, 菅澤はるか, 富樫直之, 林 俊文, 美川 務, 杉田有治, 伊藤 隆「GRB2とSOS1による多価相互作用と液液相分離の溶液 NMR 解析」NMR 討論会, 横須賀, 2023年11月9日
16. T. Ikeya, M. Oide, W. Ren, K. Tateno, T. Ando, H. Sugasawa, Y. Sugita, Y. Ito: "Analysis of the mechanism underlying multivalent interactions between GRB2 and SOS1 and their LLPS using solution NMR", 日本生物物理学会第61回年会, 名古屋, 2023年11月16日
17. P.M. Sayeesh, M. Iguchi, H. Sugasawa, K. Inomata, T. Ikeya, Y. Ito: "Interaction of N- and C-terminal SH3 domains of Drosophila adapter protein Drk with Sos and Dos" The 19th European Magnetic Resonance Congress, Glasgow, UK, July 11 (2023)
18. 屋部祥大, 田岸亮馬, 鴨志田一, 美川 務, 猪股晃介, 池谷鉄兵, 伊藤 隆「In-cell NMRを用いた linear diubiquitin の細胞内での立体構造解析」NMR 討論会, 横須賀, 2023年11月7日
19. 大久保里佳, 堀川皓央, 伊藤かおり, 菱倉直樹, 渡邊吏輝, 三島正規, 猪股晃介, 小手石泰康, 澤井仁美, 城 宣嗣, 池谷鉄兵, 伊藤 隆「異種核多次元 NMRによる根粒菌マルチドメイン蛋白質 FixJ の立体構造解析」NMR 討論会, 横須賀, 2023年11月7日
20. P.M. Sayeesh, M. Iguchi, T. Ikeya, Y. Ito: "Structural and dynamic studies on the Drosophila adapter Protein Drk" NMR 討論会, 横須賀, 2023年11月7日
21. 豊田芽生, 猪股晃介, 末広志織, 島 海翔, 長峰萌華, 池谷鉄兵, 鈴木隆史, 山本雅之, 伊藤 隆「ストレス応答型の転写制御に関する Keap1-Nrf2 複合体の In-cell NMR 解析」NMR 討論会, 横須賀, 2023年11月9日
22. 助川咲良, 富樫直之, P.M. Sayeesh, 菅澤はるか, 猪股晃介, 田仲加代子, 伊藤 隆, 池谷鉄兵「溶液 NMRによる KRAS と RGL2 の相互作用の解析」NMR 討論会, 横須賀, 2023年11月9日
23. 富樫直之, 助川咲良, 菅澤はるか, 美川 務, 猪股晃介, 田仲加代子, 伊藤 隆, 池谷鉄兵「NMR ピークの線形解析を用いた KRAS/RGL2RBD 滴定データの定量化」NMR 討論会, 横須賀, 2023年11月9日
24. 井口真由美, P.M. Sayeesh, 池谷鉄兵, 伊藤 隆「Drk 蛋白質の N 末端および C 末端 SH3 ドメインと Sos/Dos 由来ペプチドとの相互作用解析」NMR 討論会, 横須賀, 2023年11月9日
25. 宮田裕貴, 菅澤はるか, 猪股晃介, 伊藤 隆, 池谷鉄兵「溶液 NMRによる Ubiquitin C-terminal Hydrolase L3 (UCHL3)の構造・ダイナミクス解析」NMR 討論会, 横須賀, 2023年11月9日
26. 林 俊文, 館野桂太, 菅澤はるか, 池谷鉄兵, 伊藤 隆「GRB2とSOS1による多価相互作用の溶液 NMR 解析」NMR 討論会, 横須賀, 2023年11月9日
27. 加藤聖人, P.M. Sayeesh, 池谷鉄兵, 伊藤 隆「蛋白質の立体構造に対する分子クラウディングの影響の解析」NMR 討論会, 横須賀, 2023年11月9日
28. 菱倉直樹, 渡邊吏輝, 大久保里佳, 堀川皓央, 伊藤かおり, 三島正規, 猪股晃介, 小手石泰康, 澤井仁美, 城 宣嗣, 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」NMR 討論会, 横須賀, 2023年11月9日

今後の展開

本課題により, PRE, PCS, RDC などの長距離情報を統合解析し, multi-state 立体構造計算を行うことで, マルチドメイン蛋白質のドメイン配向のアンサンブルを可視化できることを示した. 今後は, 本手法をさらに多くの試料に適用し, より汎用性の高い技術に拡張する. 本課題では, 天然変性蛋白質(IDP)の構造アンサンブルの可視化までは行うことはできなかった. いくつかの IDP は, 構造は完全にランダムではなく, 特定の傾向をもったアンサンブル構造を取っていることを示唆する報告がある. 今後は, こうした IDP に対して, 本手法を適用することで, IDP のアンサンブル構造の可視化も試みる. また, 本課題で開発した multi-state 立体構造計算を, 申請者が過去に開発したベイズ推定を用いた解析手法(Ikeya et al, *Sci.Rep.* 2016)と統合する. さらに, 複数の異なる

NMR データ(PCS,PRE,RDC など)と SAXS,ESR などの他の計測データを包括的に解析し, 統計的により尤もらしい構造アンサンブルをデータから抽出可能な統計解析法を開発する.

3. 社会・経済への波及効果の見通し

本課題により, マルチドメイン蛋白質のような柔軟なリンカーを持ち, ドメイン配向を一意に決定できない生体分子についても, 溶液 NMR 法と multi-state 立体構造計算法を用いることで, そのアンサンブル構造を可視化できることを示せた. 本手法を様々なマルチドメイン蛋白質に応用することで, 構造生物学の一層の発展に貢献する. 本提案で開発した multi-state 立体構造計算法は, NMR 構造解析プログラム CYANA を利用している. ここで開発した新規手法を組み込んだ新しい CYANA パッケージのリリースも今後進めていく. 実験評価データやアンサンブル構造解析に関する実践的なガイドライン等を提供していくことで, 世界の生体系 NMR 研究者と情報の共有を図り, 本領域の一層の発展に貢献する.

GRB2 の構造解析では, 液液相分離を起こした状態での GRB2-SOS の相互作用解析に成功した. 今後は, これを発展させることで, 液液相分離形成の分子機構の解明に貢献できると期待できる. 特に, GRB2-SOS の液液相分離は, 細胞内シグナル伝達の調節に関わっていると考えられており, シグナル伝達機構のより詳細の理解にも貢献できる.

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る. 一点, 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, 少々不便を感じる. 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良いのではないかと考える. 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われる.

5. 今後の NMR 共用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る. 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する.

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

特になし.

8. 利用施設

理化学研究所

溶液 700MHz

利用期間 1: 2023 年 10 月 10 日~2023 年 10 月 13 日

溶液 800MHz

利用期間 1: 2022 年 6 月 6 日~2022 年 6 月 13 日

9. その他の利用施設

なし