

2019.10.1 <計3枚>

京都大学記者クラブ加盟社 各位
草津市政記者クラブ加盟社 各位

立命館大学広報課

タンパク質のかたちが壊れるメカニズムを解明 ～タンパク質の産業応用や創薬研究を加速させる技術～

立命館大学薬学部の北原亮教授とオーフス大学(デンマーク)のフランス・モルダー准教授らの研究グループは、タンパク質がかたちを変えて壊れていく様子(変性)を捉える手法を開発し、DNAウイルスであるT4ファージのタンパク質T4リゾチームについて、その詳細な変性過程の解明に成功しました。

タンパク質は、あらゆる生命現象の中心を担う分子で、その機能の破綻はアルツハイマー病などの神経変性疾患にもつながります。これまでに、X線結晶構造解析法、核磁気共鳴(NMR)法、低温電子顕微鏡法などタンパク質が持つ安定なかたち(=立体構造)の解析方法は確立されてきましたが、溶液中でかたちを変え揺れ動くタンパク質の描像については未解明でした。そのような安定な状態(天然状態)を逸脱した“壊れかけ”のかたちこそが、タンパク質の機能発現やアミロイド線維化などの異常な分子凝集に関わっている可能性が指摘されています。僅か0.01%の壊れかけのタンパク質が細胞内にあるだけでも、時間とともに異常凝集が進み神経変性疾患になる可能性が高まるのです。

今回の研究では、生命科学研究では特徴的な技術である「圧力」と、分子運動の検出に優れた R_2 緩和分散NMR法と水素/重水素交換NMR法を併用することにより、酵素機能に関わる速い分子運動(マイクロ秒)から、かたちが壊れ変性する遅い分子運動(秒)までの広範囲の運動を捉えることに成功しました。研究対象としたT4リゾチームは、約160アミノ酸からなる小さな酵素ですが、少なくとも3つの壊れかけのかたち(変性中間体)があることがわかり、天然状態とそれら変性中間体のエネルギー差や体積差も併せて解明されました。

現在、様々な酵素が産業利用され、抗体をはじめタンパク質医薬品も増えつつあります。タンパク質の構造安定性の理解と品質管理は、それらの産業利用、安全使用において最重要課題です。本手法は、NMR測定が可能なあらゆるタンパク質に応用でき、タンパク質の産業応用や創薬研究を加速する可能性があります。

※本研究成果は、2019年10月1日(日本時間)にアメリカ科学アカデミー紀要(オンライン版)に掲載されました。

●取材・内容についてのお問い合わせ先

(内容について)立命館大学薬学部 北原亮 TEL.077-561-5751 E-mail: ryo@ph.ritsumeai.ac.jp

(取材について)立命館大学広報課 担当:中村 TEL.075-813-8300

別紙

【研究の背景】

タンパク質構造解析法の技術発展により、多くのタンパク質のかたち(立体構造)が解明されるようになりました。酵素に代表されるタンパク質は、分子選択性が高く特定の化学反応を触媒するため、その工業的な利用も進んでいます。また、医薬品業界では、がん治療薬としてオプジーボ(小野薬品工業株式会社/ブリストル・マイヤーズ スクイブ)が注目されましたが、抗体医薬品もタンパク質です。ポリペプチド鎖であるタンパク質は、3次元的な立体構造を形成してはじめて特定の機能を発揮しますが、その立体構造は水素結合や疎水性相互作用といった非共有結合により形作られているため、構造安定性はモルあたり数十キロジュールと僅かとなっている場合がほとんどです。具体的にいうと、溶液中にあるタンパク質分子の何万個に1つは壊れた構造を取っていることになり、同じ分子でも時々壊れるのです。このような壊れた構造は、分子間の相互作用によりβアミロイドなど細胞内凝集物をつくり細胞死を誘導する場合があります。タンパク質製剤であれば、不要な凝集物は副作用につながる恐れもあります。タンパク質の構造安定性を詳しく理解することにより、品質制御や機能性を高めることも可能となります。

【研究の方法】

タンパク質のかたちが壊れ失活することを変性と呼びます。以前は、タンパク質は構造形成した「天然状態」と壊れた「変性状態」の2つの状態しか持たないと考えられていましたが、近年では、 R_2 緩和分散法や水素/重水素交換法など優れた核磁気共鳴(NMR)測定により、多数のタンパク質で変性中間体の存在が確認されています。今回の研究では、それらのNMR測定法を用いて、DNAウイルスであるT4ファージのタンパク質T4リゾチームの圧力変性過程を解明しました。特徴的な点は、2500気圧(水深にして2万5000メートル相当)までの高圧力下でNMR測定を行なっていることです。高圧力下では体積の小さな状態が安定化されます(ルシャトリエの法則)。幸いなことに、水溶液中のタンパク質は、かたちが壊れるほど体積(厳密には部分モル体積)が減少する傾向があるため、圧力増加とともに壊れた構造が増えて行きます。つまりは、圧力を用いることにより、T4リゾチームが持つ天然状態から変性状態までの様々な構造を順番に探索でき、様々なNMR測定法から構造や運動性、安定性に関する情報を収集できるのです。

【研究の成果】

今回の研究では、T4リゾチームのC末端側ドメインの内部に空洞(キャビティー)を発生させたL99A変異体(図1)を用いることにより、分子内キャビティーと構造安定性の関係について調べました。圧力によりタンパク質の天然状態を徐々に不安定化させながらNMR測定を行うことにより、順に安定化される変性中間体の構造と安定性の情報を原子レベルで収集することに成功しました。変性はキャビティーが存在するC末端側ドメインから開始され、PUF1、PUF2、PUF3という3つの変性中間体を経て完全変性することがわかりました(図2)。また、C末端ドメインの安定性の減少は、1mLの体積変化あたり0.25kJ(1Å³あたりで36cal)と見積もられました。この数値は、タンパク質内部に疎水性キャビティーを作るのに必要な単位体積あたりのエネルギーと考えられます。実際に、野生型のT4リゾチームでは、C末端ドメインに小さなキャビティーしかなく、安定性はL99A変異体に比べ顕著に高くなります。つまりは、キャビティーの大きさを調整するアミノ酸変異により、酵素活性に必要な構造変化を生じやすくしたり、異常な分子凝集を抑制したりすることが可能となります。本技術の産業利用や創薬研究への応用が期待されます。

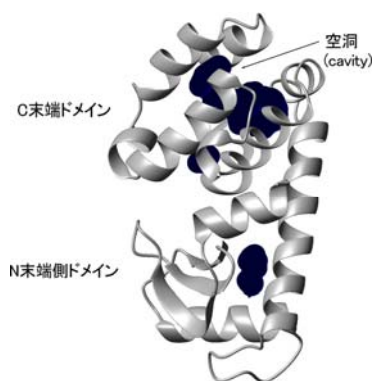


図 1. T4 リゾチーム L99A 変異体の立体構造と分子内空洞 (cavity) の分布。

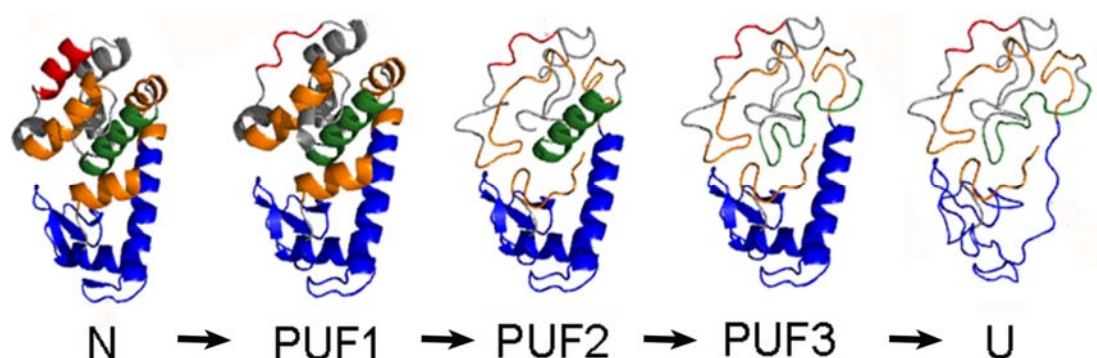


図 2. T4 リゾチーム L99A 変異体の変性過程。N、PUF、U はそれぞれ、天然状態、変性中間体、変性状態を表す。

【論文情報】

題目: How internal cavities destabilize a protein

著者: Mengjun Xue^{a,b}, Takuro Wakamoto^c, Camilla Kejlberg^{a,b}, Yuichi Yoshimura^{a,b}, Tania Aaqvist Nielsen^{a,b}, Michael Wulff Risør^{a,d}, Kristian Wejse Sanggaard^d, Ryo Kitahara^{c,e,*}, Frans A.A. Mulder^{a,b,*}

所属: ^a オーフス大学 iNANO、^b オーフス大学 化学部、^c 立命館大学生命科学研究科、^d オーフス大学 分子生物学・遺伝学、^e 立命館大学薬学部

*: 責任著者

雑誌: Proceedings of National Academy of Science of the United States of America

DOI: 10.1073/pnas.1911181116

URL: <https://www.pnas.org/content/pnas/early/2019/09/25/1911181116.full.pdf>

【用語解説】

核磁気共鳴(NMR)測定: NMR 測定は、水素 ¹H、炭素 ¹³C(安定同位体)、窒素 ¹⁵N (安定同位体) など様々な原子核の情報を、置かれた状況に応じて細かく分類して観測できるため、分子が持つ構造や性質の評価に用いられる。そのため、有機化学や材料科学、生命科学分野で広く使われている。