

News Release



令和2年12月4日

各報道機関文教担当記者 殿

天然変性タンパク質の動的かつ多様な構造の定量的解析に成功 ～天然変性タンパク質の理解に新しい道を拓く～

【本研究成果のポイント】

- 全タンパク質の約半数を占める天然変性タンパク質の構造は、いくつかの状態の間で大きく揺らぐため、従来手法による構造解析は難しく、その理解は遅れている。
- 高速 AFM による可視化は天然変性タンパク質の動的構造の定量的解析を可能にした。
- 定量的解析により、天然変性タンパク質の構造機能相関の理解が進み、天然変性タンパク質の異常により起こる疾病の理解と治療薬の開発に道が拓けることが期待される。

金沢大学ナノ生命科学研究所の安藤敏夫特任教授、古寺哲幸教授らは、**高速 AFM イメージングにより、天然変性タンパク質 (IDP) の動的構造を高い精度で解析することに成功**しました。

約 20 年前に発見され、現在ではタンパク質全体の約半分を占めると推定されている IDP は分子全体、あるいは、一部の大きな領域が秩序だった構造をとりません。にもかかわらず、広範な生命現象に重要な役割を果たしています。しかし、大きく揺らぐ IDP 分子の姿・形を詳しく知る手段がないために、IDP の理解は通常のタンパク質に比べ非常に遅れています。

本研究グループは、**個々の IDP 分子を高速 AFM で観察し、その分子映像の解析により、従来手法よりもはるかに具体的、かつ、アミノ酸レベルの高い精度で定量的に動的な構造を解明することに初めて成功**しました。これまで曖昧にしか捉えられなかった IDP の構造を詳細に知ることができるようになったため、秩序構造から成る従来のタンパク質と同様に、構造と機能の関係の理解が進むものと期待されます。Rett 症候群に代表されるような病気につながる IDP の構造異常も容易に捉えることが可能になったことから、分子レベルでの病理の理解と治療薬開発の進展も期待されます。

本研究成果は、2020 年 11 月 23 日 (英国時間) に英国科学誌「*Nature Nanotechnology*」のオンライン速報版で公開されました。

【研究の背景】

一定のアミノ酸配列を持つポリペプチド鎖は特定の構造に折れ畳まれ（フォールドして）タンパク質となり、一つの機能を担うという常識は、約 20 年前に発見された IDP の存在により覆されました。αヘリックスやβシートといった二次構造から、さらに三次元構造へとフォールドしたタンパク質では、その構造が機能を理解するための基礎であることから、X線回折、電子顕微鏡、核磁気共鳴（NMR）といった手法によって多くのタンパク質の構造が決定されてきました。IDP でも構造は機能と密接に関係しています。しかし、分子全体にわたり、あるいは、分子内の大きな領域で二次構造をとらない IDP では常に構造が大きく揺らいでいるため、構造解析は非常に困難です。IDP は結晶化しないため X線回折を用いることができず、解けた（アンフォールドした）領域（IDR）は細すぎて電子顕微鏡では可視化できません。NMR は IDP 内の秩序構造領域の構造解析と IDR の位置決定に有効ですが、完全にアンフォールドしているのか緩くフォールドしているかなどの情報を得ることができません。NMR が与える局所構造情報を補い、分子全体の広がりや形の情報を得るために X線小角散乱（SAXS）が利用されています。しかし、NMR も SAXS もアンサンブル平均手法であるため、互いの間を動的に遷移するそれぞれの構造を抽出することも、それらの割合を決めることもできません。このように、姿・形とその変化を明確に捉えられないという問題があるため、IDP の理解は従来型のタンパク質に比べ非常に遅れています。IDP がタンパク質世界の約半分を占め、さまざまな生命現象に重要な役割を担っていることを考えると、IDP の構造解析に有効な手法を見いだすことは生命科学全体にとって非常に重要な課題です。



（左）安定した秩序構造をとる従来型のタンパク質、（右）安定した秩序構造をとらない天然変性タンパク質

【研究成果の概要】

金沢大学のグループが開発した高速 AFM は、タンパク質分子の構造と動作を可視化できることから、秩序構造をとるタンパク質の機能中の動的プロセスの観察に広く用いられ、従来技術では不可能なメカニズムの発見に貢献してきました。本研究では、高速 AFM が、構造が大きく揺らぐ IDP の構造解析にどこまで有効であるかを探りました。分子全体がアンフォールドした IDP よりも、秩序構造部分と IDR（ひも）から成る IDP の方が多いことが知られています。NMR は秩序構造部分の詳細構造とひもの位置を特定できるものの、それが与える描像は IDP が「球」と「ひも」でできているといった単純なものでした。この描像を高速 AFM 解析により、さらに具体的に写實的に記述できるかが重要なポイントでした。

まず, NMR などの手法で球とひもの位置がアミノ酸レベルでほぼ決定されている IDP (PQBP-1) を高速 AFM で観察しました。PQBP-1 はひも 1 本とその端にある球 1 つからなり, 球の大きさは変わらず, ひもは常に太さが約 0.5 nm のひもとして観察されました。これを反映して, 大きく揺らぐひもの両端距離 R_{2D} の分布は単一のピーク (平均両端距離 $\langle R_{2D} \rangle$) を示しました。そこで, ひもを短くした 4 種の PQBP-1 変異体の $\langle R_{2D} \rangle$ 値を測定し, 合計 5 個の $\langle R_{2D} \rangle$ 値とそれぞれのひもに含まれるアミノ酸数 N_{aa} との関係を調べたところ, $\langle R_{2D} \rangle = 1.18 \text{ (nm)} \times N_{aa}^{0.51}$ というべき乗則が成り立っているようでした。5 種類の PQBP-1 のひもに含まれるアミノ酸の成分は異なっているにもかかわらず, $\langle R_{2D} \rangle$ と N_{aa} の間に一定の関係があるという意外な事実を示唆しています。さらに, このべき乗則の普遍性を調べるべく, 球とひもの位置がアミノ酸レベルでほぼ決定されている他の IDP (Atg1, Atg13, N_{TAIL}, FACT) についても高速 AFM を用いて観察しました。その結果, NMR が与える描像よりもかなり複雑で, 球とひもとの結合解離や, 球が解けて小さい球になり再び大きな球に戻るといった振舞いが観察されました。これらの振舞いを反映して, R_{2D} の分布には二つのピークが現れました。短い方の $\langle R_{2D} \rangle$ 値はイオン条件に依存して変化しますが, 長い方の $\langle R_{2D} \rangle$ 値は一定でした。長い方の $\langle R_{2D} \rangle$ を採用し, PQBP-1 のデータと合わせてみると, 上記のべき乗則より精度の高い $\langle R_{2D} \rangle = 1.16 \text{ (nm)} \times N_{aa}^{0.52}$ という関係が得られました。このべき乗則は解けたひもに対する普遍則と考えられます。このことは非常に重要で, アミノ酸成分と配列がまったく異なる場合でも, 太さ 0.5 nm のひもとして観察されれば, その両端距離の平均値からそこに含まれるアミノ酸数を決定できます。アンサンブル平均手法では, 異なる状態を分けて観察することができませんが, 高速 AFM では個々の状態を区別して観察できるため, このべき乗則を有効に利用できます。

そこで, このべき乗則を利用して, NMR ではいまだ十分に特定できない IDP (PNT と Sic1) の構造を高速 AFM で解析しました。どちらの IDP もひもはひものままでいることはなく, フォールドした状態とアンフォールドした状態を行き来していました。アンフォールドした状態に上記のべき乗則を適用し, 両状態の構造を解析した結果を図 1b,c に示します。図 1a は N_{TAIL} についてのもので, NMR の結果と一致します。PNT の結果も NMR の結果に一致しますが, N 端側の α ヘリックスとひもがまとまった領域が存在するという NMR では検出されていない事実に加え, この領域と負電荷に富んだひもが結合解離するという新事実が明らかになりました。このまとまった構造の存在は, N 端から 99 残基までの領域はタンパク質分解酵素で分解されないという生化学的事実と一致し, 高速 AFM の構造解析の精度の高さを物語っています。緩くフォールドする Sic1 についてはこれまで有効な手法がなかったため比較すべきデータは皆無ですが, この精度の高さから判断して, 図 1c に示す結果は信頼できると判断できます。

他の手法では調べることができない IDP の状態間の構造遷移の速さを高速 AFM のデータは与えることができます。ひもの長さ変化や球の高さ変化の時系列データを解析すると, 図 1 に示すように状態間の遷移速度を決定することができます。構造についても遷移速度についてもここまで詳細かつ定量的に IDP の姿を記述する方法は他にはありません。

【今後の展開】

NMR で得られる局所構造情報と高速 AFM で得られる種々の情報を組み合わせると、片方だけからの情報と比べはるかに詳細な IDP の構造情報が得られることがはっきりしました。この融合手法を利用すれば、IDP の構造解析は各段に進展し、それにより IDP の理解が加速されるものと期待されます。現在金沢大学と米国の大学との間で、本研究で開発した手法を活用して、病気の原因となる IDP の複数の変異体の構造解析を進めています。IDP 内の遠く離れた部位間での相互作用が変異に影響されることや、秩序・無秩序状態間を遷移する領域の構造安定性と生理活性との間に相関があることなどが分かりつつあります。病気の原因となる IDP の構造異常を可視化できるようになったことから、病理の分子レベルでの理解が深まるだけでなく、構造異常を元に戻すような化合物の開発も可能になることが期待されます。

本研究は、日本学術振興会科学研究費助成事業（基盤研究 S (17H06121), 新学術領域研究 (21113002, 26119003)), 科学技術振興機構戦略的創造研究推進事業（CREST (JPMJCR13M1), さきがけ (JPMJPR13L4)), フランス国立研究機構 (ANR), フランス国立科学研究センター (CNRS), 国際ヒューマン・フロンティア・サイエンス・プログラム (HFSP) の支援を受けて実施されました。

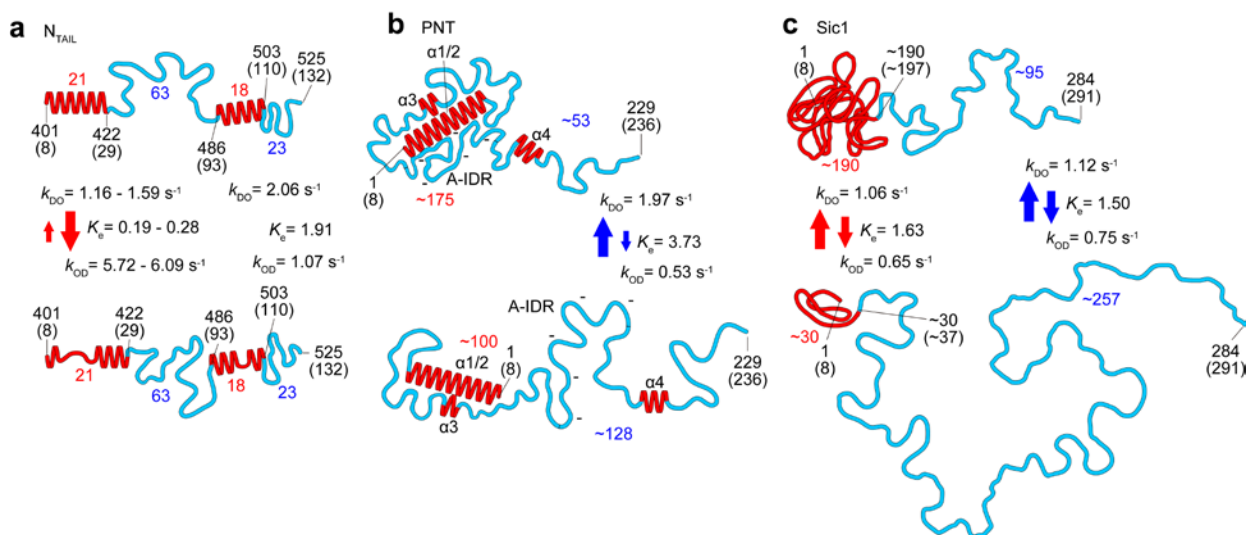


図 1. 高速 AFM 解析で得られた三種の IDP の構造とダイナミクス。図中の赤で示した部分は α ヘリックスないしは緩くフォールドした構造を、水色で示した部分はフォールドした構造をとっていない天然変性領域を示す。上のパネルはフォールドした構造状態を、下のパネルはアンフォールドした構造状態を示す。赤字の数値はフォールドした構造に含まれるアミノ酸数を、青字の数値はアンフォールドした構造に含まれるアミノ酸数を示す。赤の矢印は高さの変化から判断される遷移を、青の矢印はアンフォールドした構造の両端距離の変化から判断される遷移を示す。 K_e の値はフォールドしやすさを示す。 k_{OD} はフォールド状態からアンフォールド状態への遷移速度を、 k_{DO} はアンフォールド状態からフォールド状態への遷移速度を表わす。

【掲載論文】

雑誌名 : Nature Nanotechnology

論文名 : Structural and dynamics analysis of intrinsically disordered proteins by high-speed atomic force microscopy

(天然変性タンパク質の構造とダイナミクスの高速 AFM による解析)

著者名 : Noriyuki Kodera¹, Daisuke Noshiro¹, Sujit K. Dora², Tetsuya Mori³, Johnny Habchi⁴, David Blocquel⁴, Antoine Gruet⁴, Marion Dosnon⁴, Edoardo Salladini⁴, Christophe Bignon⁴, Yuko Fujioka⁵, Takashi Oda⁶, Nobuo N. Noda⁵, Mamoru Sato⁶, Marina Lotti⁷, Mineyuki Mizuguchi⁸, Sonia Longhi^{4,*} and Toshio Ando^{1,*}

(古寺 哲幸, 能代 大輔, Sujit K. Dora, 森 哲哉, Johnny Habchi, David Blocquel, Antoine Gruet, Marion Dosnon, Edoardo Salladini, Christophe Bignon, 藤岡 優子, 小田 隆, 野田 展生, 佐藤 衛, Marina Lotti, 水口 峰之, Sonia Longhi, 安藤 敏夫)

1. 金沢大学ナノ生命科学研究所
 2. 金沢大学理工研究域数物科学系
 3. 金沢大学大学院自然科学研究科数物科学専攻博士前期課程
 4. エクス=マルセイユ大学 (Aix-Marseille University) ・フランス国立科学研究センター (CNRS, Laboratoire Architecture et Fonction des Macromolécules Biologiques (AFMB))
 5. 微生物化学研究所
 6. 横浜市立大学大学院生命医科学研究科
 7. ミラノ=ビッコカ大学バイオテクノロジー・バイオサイエンス学科 (Department of Biotechnology and Biosciences, State University of Milano-Bicocca)
 8. 富山大学薬学部
- * 責任著者

掲載日時 : 2020 年 11 月 23 日 (英国時間) にオンライン速報版に掲載

DOI : 10.1038/s41565-020-00798-9

【用語解説】

※1 高速 AFM

高速原子間力顕微鏡 (高速 Atomic Force Microscopy)。探針と試料の間に働く原子間力を基に、分子の形状をナノメートル (10^{-9} m) 程度の高い空間分解能で可視化する顕微鏡。溶液中で動いているタンパク質などの生体分子をナノメートルの空間分解能とサブ秒という時間分解能で観察することが可能。

※2 天然変性タンパク質 (IDP)

Intrinsically Disordered Proteins。整った三次元構造を持たないタンパク質。全タンパク質の約半数を占め、生体内で重要な役割を果たすことが知られているが、従来手法による構造解析が難しく、その理解は遅れている。

【本件に関するお問い合わせ先】

■研究内容に関すること

金沢大学ナノ生命科学研究所 特任教授

安藤 敏夫 (あんどう としお)

TEL : 076-264-5663

E-mail : tando@staff.kanazawa-u.ac.jp

■広報担当

金沢大学総務部広報室

上沼 孝平 (かみぬま たかひら)

TEL : 076-264-5024

E-mail : koho@adm.kanazawa-u.ac.jp

金沢大学ナノ生命科学研究所事務室

米田 洋恵 (よねだ ひろえ)

TEL : 076-234-4556

E-mail : nanolsi-office@adm.kanazawa-u.ac.jp