

Studies on the structure and function relationships of the unstructured regions in protein

(タンパク質に内在する非構造領域の構造機能相関に関する研究)

広島大学大学院理学研究科 数理分子生命理学専攻 上脇 隼一

1. 研究の目的と背景

タンパク質はそれぞれ独自の立体構造をしており、その立体構造と機能には相関がある。そのため、タンパク質の機能を明らかにする上でその立体構造を求めることは重要である。これまでに多くのタンパク質の立体構造が NMR や X 線結晶構造解析により決定されており、誰もがインターネットを通してその立体構造情報を得ることができる。近年、タンパク質内に存在する柔軟なリンカーのような構造を持たない領域が、タンパク質機能発現の制御にかかわる例が多く報告されており注目されている。そこで本研究では、分子内に柔軟なリンカーを含むタンパク質である HMGB2 のリンカーの機能に注目し研究を行った。HMGB2 は HMGB1 のホモログであり、2つのドメイン (HMG box A, B) が柔軟なリンカーでつながった構造をしている。この2つのドメインが協同的に作用することで DNA を折り曲げ、ヌクレオソーム形成を促進することが知られている。近年、HMGB1 において A, B ドメインがリンカーでつながったものの立体構造が求められたが、ドメイン間リンカーの柔軟性によりドメイン間相対配向が決定できていない結果になっている。そこで、この柔軟なリンカー領域がタンパク質全体構造や機能にどのような影響を及ぼすかを NMR と X 線小角散乱 (SAXS) を組み合わせた正確な立体構造解析や DNA を用いた相互作用実験により研究した。

2. HMGB2 の立体構造に対するドメイン間リンカーの寄与 (1 章)

まず、リンカー領域の影響を調べるため A, B ドメイン単独 (HMGB2-A, B) と A ドメインと B ドメインがリンカーでつながったもの (HMGB2-A1B) の NMR スペクトル比較を行った (Fig. 1)。すると、HMGB2-A と HMGB2-A1B の A ドメイン領域とでは大きな化学シフトの違いが見られた。そして、その領域が A ドメインの N 末端と C 末端に限定されていることから、ドメイン間リンカーが A ドメインのこれらの領域と特異的に相互作用していることが示唆された (Fig. 1c)。

次に、リンカー内 (Y78VPPKGDKKG⁸⁷) のどのアミノ酸残基が重要であるか明らかにするため、それぞれ Gly に置換した変異体を作成し、それらの NMR スペクトルを野生型と比較した。その結果、P80G/P81G では A ドメインの C 末端領域 (Fig. 2a)、Y78G では A ドメインの N 末端と C 末端領域 (Fig. 2b) に大きな化学シフト変化が見られたため、A ドメイン領域に化学シフト摂動をもたらす重要なアミノ酸残基として Y78 を同定した。

HMGB2-A の立体構造では Y78 以降の部位が不足しているが、HMGB1-A の立体構造はドメイン間リンカーを一部含んでいる。HMGB1-A は HMGB2-A と高いアミノ酸配列相同性を持っているため、これらの構造比較によりドメイン間部位の結合様式の予測を行った。すると、P80, K8, P9 の CH ドナーに対して Y78 リングの一部が π システムのアクセプターの役割を果たしており、Y78 が A ドメインの N 末端と C 末端間で CH- π 相互作用をしていることが明らかになった (Fig. 3)。CH- π 相互作用は 1 結合あたり 0.5-1.0 kcal/mol の非結合性の相互作用であり、一つの水素結合程度の強さである。また、ドメイン間リンカーの $^{15}\text{N}\{^1\text{H}\}$ NOE の値が小さく、 ^{15}N edited NOESY における Y78 と K8 間の NOE シグナルがかなり弱かったことから、構造が揺らいでおり、Y78 が調節するドメイン間リンカーの相互作用は弱く過渡的であることが示唆される。

P80G/P81G, Y78G 変異におけるドメイン間リンカーの機能変化は HMGB2-A1B のドメイン間運動性を変化しうる。そこで、ドメイン間の運動性を野生型と変異体で比較した。これは等方状態と異方性状態間の TROSY 化学シフト変化として観測される残余疑似化学シフト異方性効果(RPCSA)により求められる配向テンソル強度 D_a によって評価することができる。 D_a はドメイン再配向運動性の度合いを示しており、box A と box B 間において D_a 値に大きな差がある場合、それらの独立性が高いことを表す。解析の結果、野生型では誤差範囲内であったが、2 つの変異体のうち特に Y78G において box B に比べて box A に大きな D_a の差が見られた (Table 1)。この結果、Y78G 変異体ではかなり独立して再配向していることが示唆される。

HMGB2-A1B 野生型において box A と box B の配向強度 D_a が近かったため、RPCSA 値と SAXS の散乱データ組み合わせて全体構造決定を行った。その結果、各ドメインの DNA 結合表面が反対側を向いて、縦に伸びた構造をしていることが明らかになった (Fig. 4a)。それに対して Y78G 変異体では、 D_a がドメイン間で大きく異なっており、RPCSA による配向制約は構造決定に使うことができなかつたため、SAXS データのみで決定した。すると、ドメイン間相対配向は野生型と大きく異なる結果になった (Fig. 4b)。以上より、HMGB2 のドメイン間リンカーは HMGB2 の全体構造と分子内ダイナミクスを規定することを明らかにした。

3. ドメイン間リンカー変異による HMGB2 の機能への影響 (2 章)

HMGB2 のドメイン間リンカーが機能にどのような寄与をするか調べるため、野生型と大きな化学シフト摂動を示した 2 つの変異体 (P80G/P81G, Y78G) をもちいて DNA 相互作用実験を行った。

まず、DNA との親和性を調べるため DNA 結合実験を行った。しかし、野生型と 2 つの変異体間で大きな差は見られず、同等の DNA 親和性を持つことが示唆された (Fig. 5)。次に DNA を折り曲げる機能について調べるため、DNA 環状化実験を行った。その結果、野生型ではタンパク質添加量を増加させることで環状化 DNA 量が増加後に減少した (Fig.

6a). 過剰な HMGB2 の添加は DNA を折り曲げすぎてしまい、DNA 末端同士がリガーゼによってつなげられることを阻害することが知られている。それに対して 2 つの変異体では、タンパク質添加量増加とともに環状化 DNA 量の増加が見られたため、DNA を折り曲げる機能が減少することが示唆された (Fig. 6b, c)。DNA 親和性は野生型と変異体間で同等であるため、ドメイン間リンカーがタンパク質全体構造を規定することで HMGB2 機能発現に対して優位な影響を与えることが明らかになった。

4. まとめ

本研究は、タンパク質内に存在する非構造領域がタンパク質全体構造と機能発現に優位な影響を与えるという見解を、ヌクレオソームシャペロンタンパク質 HMGB2 をもちいて構造生物学的に示したものである。

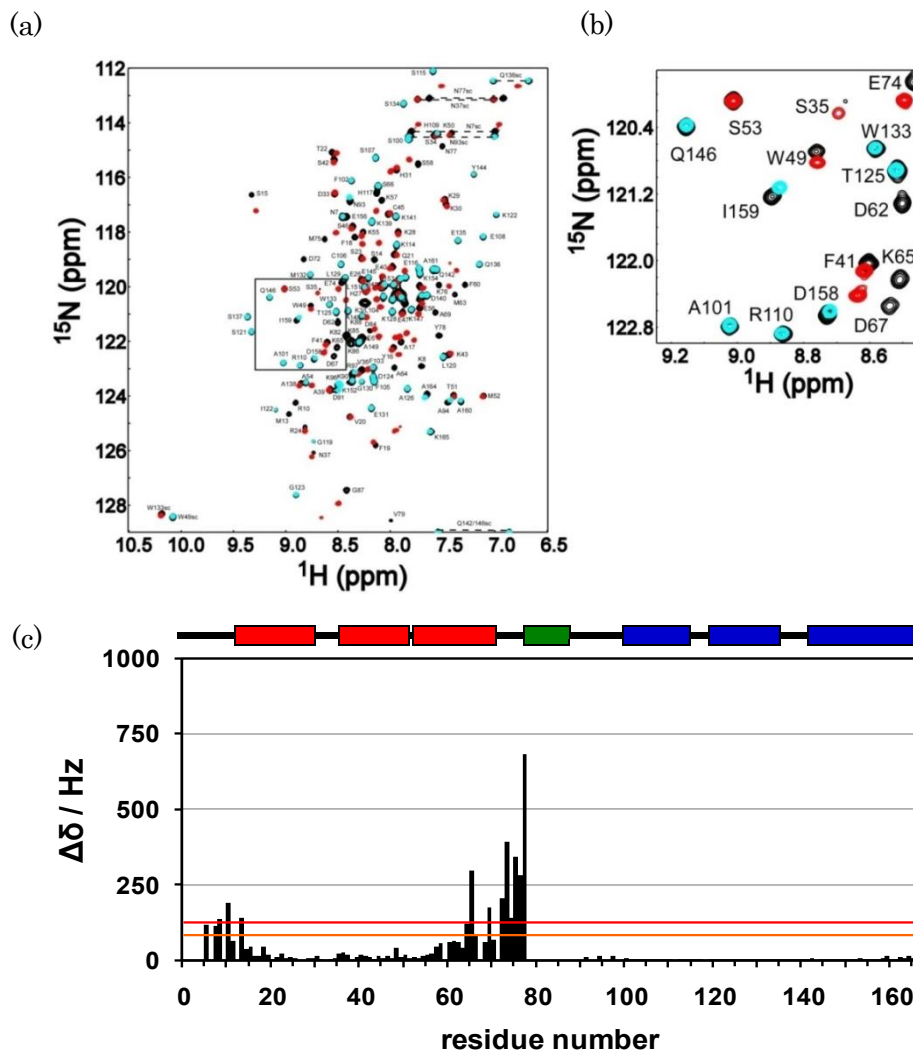


Fig. 1 (a) HMGB2-A(赤), B(シアン), A1B(黒)を重ね合わせたスペクトル図と四角で囲った領域の拡大図(b). (c) HMGB2-A1B と各ドメイン単体との化学シフト差を残基ごとにプロットしたもの。

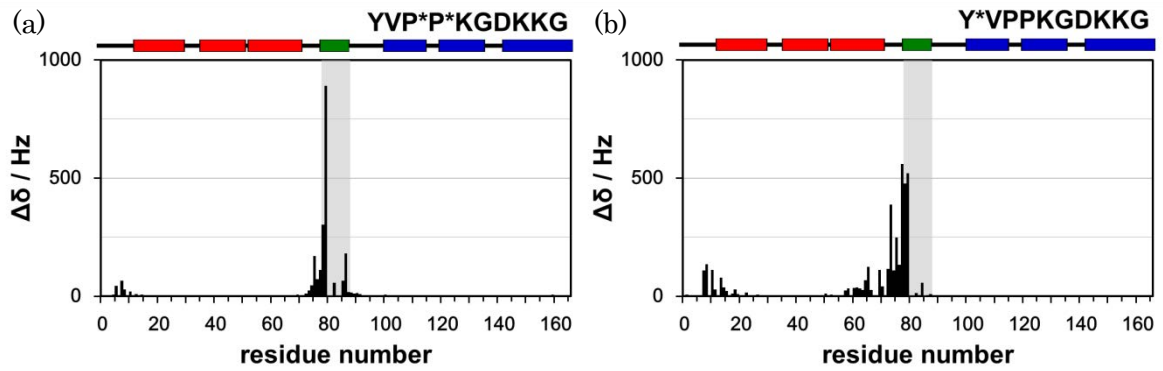


Fig. 2 野生型と変異体の化学シフト差を残基ごとにプロットした図. (a) 野生型と P80G/P81G, (b) 野生型と Y78G.

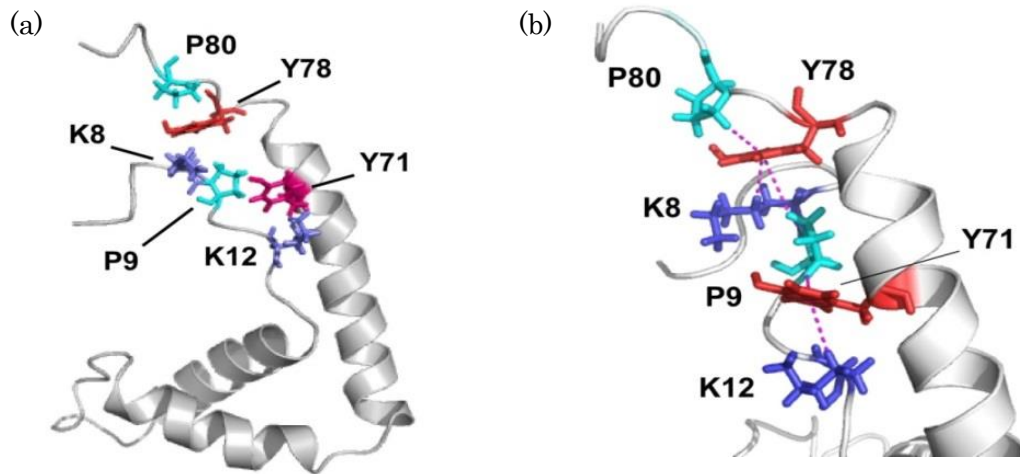


Fig. 3 HMGB1-A における N 末端, C 末端領域の CH- π 相互作用に関与しているアミノ酸残基(a)とその拡大図(b).

Table 1 RPCSA によって決定した野生型と 2 つの変異体における各ドメインの D_a 値.

| Sample | Box | D_a /Hz |
|------------------------|-----|------------|
| HMGB2-A1B wild-type | A | -3.3 (0.4) |
| | B | -3.9 (0.5) |
| HMGB2-A1B P80G/P81G | A | -3.8 (0.5) |
| | B | -5.3 (0.8) |
| HMGB2-A1B Y78G | A | -3.5 (0.6) |
| | B | -7.2 (0.8) |

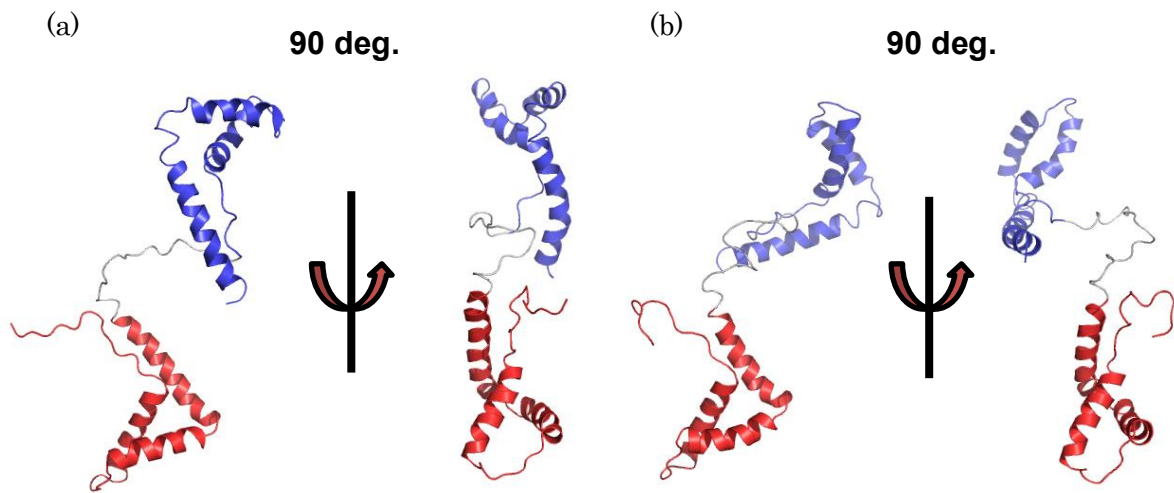


Fig. 4 野生型(a), Y78G(b)の決定したドメイン間相対配向.

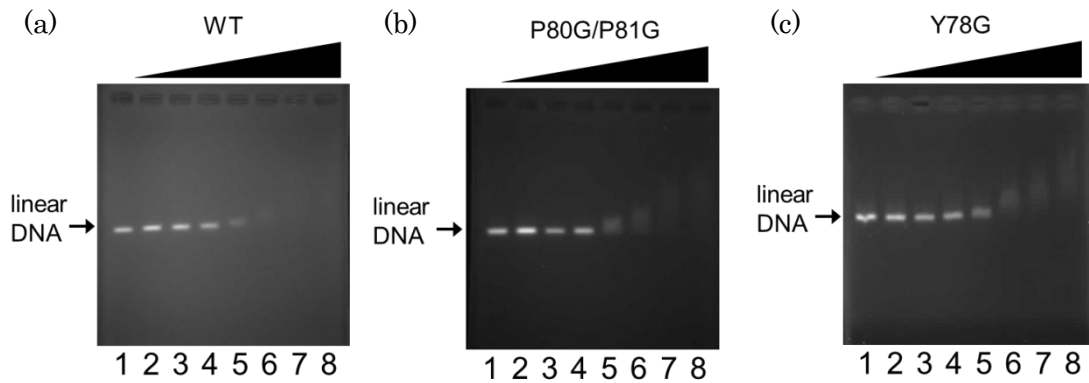


Fig. 5 野生型(a)と変異体 P80G/P81G(b)と Y78G(c)の DNA 結合実験のアガロース電気泳動写真. レーン 1 は DNA のみ, レーン 2~8 はタンパク質濃度がそれぞれ 0.05, 0.25, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 μM .

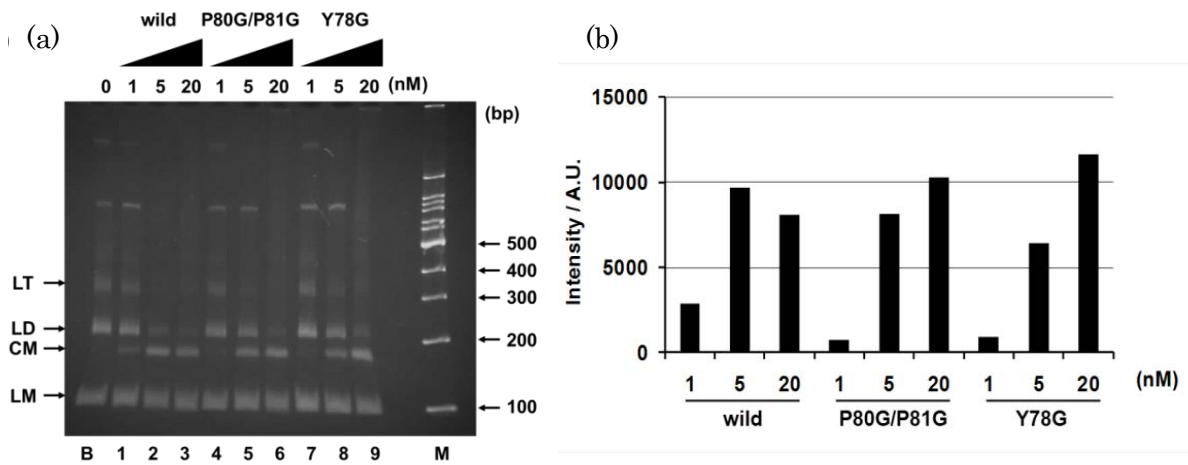


Fig. 6 (a) 野生型と変異体(P80G/P81G, Y78G)の DNA 環状化実験の結果. タンパク質濃度を 1, 5, 20 nM と変化させておこなった. (b) 環状化単体 DNA(CM)の形成量をグラフ化したもの.