解説

蛋白質の動的構造と機能相関解明に向けた 熱力学解析

稲葉 理美,織田 昌幸

京都府立大学 大学院 生命環境科学研究科

(受取日:2016年4月14日,受理日:2016年5月12日)

Thermodynamic Studies on Protein Structural Dynamics and Its Correlation with Function

Satomi Inaba and Masayuki Oda

Graduate School of Life and Environmental Sciences, Kyoto Prefectural University

(Received Apr. 14 2016; Accepted May 12, 2016)

Protein structural dynamics in solution closely correlate with its function. Although a great number of protein structures have been determined at atomic resolution, most of them are static or averaged structures and information is lacking on their structural dynamics. We have studied the thermodynamic properties of a DNA-binding protein, c-Myb R2R3, and their correlation with protein structure-function relationships using biophysical methods. The analysis of pH-dependent conformational stability showed that the α -helical content correlated with the enthalpy change. Under physiological pH conditions, c-Myb R2R3 exists in an enthalpically unstable but entropically stable state. The temperature-dependent NMR measurements showed that some signals were broadened with an increase in temperature even below 37°C, indicating that extensive conformational fluctuations within the folded manifold are activated at a physiological temperature. We also analyzed the effects on the stability and function of different conformational states induced by the mutations. The thermodynamic analysis using DSC and ITC showed that the increased conformational fluctuation in the native state of protein results in a decreased entropy change for either unfolding or DNA-binding. The effects of the increased fluctuation could be detected not only by the binding but also by the folding thermodynamics, both of which well correlated.

Keywords: binding thermodynamics, calorimetry, circular dichroism, DNA-binding protein, folding thermodynamics, NMR

稲葉 理美 Satomi Inaba E-mail: inaba@kpu.ac.jp



織田 昌幸 Masayuki Oda E-mail: oda@kpu.ac.jp

1. はじめに

蛋白質は各々固有の立体構造と機能を有しており、特異 的な「生物学的な揺らぎ」により、個々のダイナミックな 機能が発揮される。昨今、蛋白質の構造機能相関解明を目 指し,多くの蛋白質の立体構造が X 線結晶構造解析や核磁 気共鳴 (NMR), クライオ電子顕微鏡 (Cryo-EM) 等を用 いて,原子レベルで詳細に決定されているが,これらは「揺 らぐ」蛋白質の最安定構造や平均構造であり、「揺らぎ」の 寄与を含む蛋白質の「実像」解明には至っていない。一方 で、これまで蛋白質工学を利用した高機能化や、特定の蛋 白質を標的としたドラッグデザインなどが盛んに進められ ているものの、上述の手法で得られる立体構造情報のみで は不十分であることも分かってきた。すなわち、ポストゲ ノムの重要課題である蛋白質の構造機能相関の解明には, 溶液中での揺らぎ―動的構造―に関する知見の獲得が必要 不可欠である。1,2) この揺らぎの理解には、熱測定で得ら れる熱力学量が極めて有効で,NMR など他の物理化学的手 法と相補することで, 生命科学研究の進展に大きく貢献す る。^{3,4)}本総説では、DNA 結合蛋白質に関する我々の最近 の知見を中心に、その動的挙動と機能との相関解析を紹介 する。

研究対象の転写因子 c-Myb は、N 末端側に DNA 結合領 域を、C 末端側に転写活性化および負の制御領域を有する 分子量約7万の蛋白質である。DNA 結合領域は、アミノ酸 配列の異なる3つのリピート(R1, R2, R3)より構成され、 このうち R2R3 が PyAAC(G/T)G 配列を含む DNA と特異的 に結合する(Fig.1)。¹⁾ 各リピートの立体構造は非常に類似 している一方で、アミノ酸配列や物性、役割は大きく異な る。^{5,6)}一連の研究では、機能に重要な「生物学的揺らぎ」 に着目し、R2R3 各種変異体を比較対照として、各種物理 化学的手法を用いて解析を行った。



Fig.1 The complex structure of c-Myb R2R3 with DNA containing consensus sequences determined by solution NMR (PDB code: 1MSE). ⁵⁾

フォールディング熱力学量と 構造安定性との相関

蛋白質が機能する環境に近い状態, すなわち生理的条件 下 (37°C, pH 7.4) での c-Myb R2R3 の構造特性を明らかに すべく, pH ならびに温度変化による構造揺らぎを解析した。 pH 4.0~7.5 における溶液条件として, pH 4.0~5.5 は 20 mM 酢酸緩衝液を, pH 6.0~7.5 は 20 mM リン酸緩衝液を用い て行った。遠紫外円二色性分散 (CD) スペクトル測定から, 酸性 pH では, c-Myb R2R3 特有のαヘリックス構造とは異 なり, 二次構造が大きく崩れることが明らかとなった。ま た, pH 上昇に伴い 222 nm 付近の CD 値が負に増加し, pH (Table 1)。各 pH 条件下での変性中点温度(T_d)を比較し たところ, pH 5.0 において T_d = 56°C と最も熱安定性が高く, pH 上昇とともに T_dが低下した。さらに, pH 7.0 での熱安 定性を基準とし ($T_d = 50.4^\circ C, \Delta G_{unfold} = 0$), 各 pH 条件下で 得られたΔC_pを利用して,各種の熱力学量を算出したとこ ろ、 ΔG_{unfold} は pH 5.0 で最大となり、一方で、 ΔH_{unfold} およ $び \Delta S_{unfold} \ t \ pH 6.5 \ \tau 最大 となった。興味深いことに、生理$ 的条件に近い pH 7.5 においては、いずれの熱力学量も最安 定な状態をとらず、少なからず不安定な状態で存在するこ とが明らかとなった。ここで、構造形成という観点から観 た安定性を解析し、遠紫外 CD スペクトル測定により得た α ヘリックス含量に対して、 ΔG_{unfold} 、あるいは ΔH_{unfold} をプ ロットしたところ、 ΔG_{unfold} に関しては特筆すべき特徴は見 られなかったものの, ΔH_{unfold} に関しては pH 5.0 から 7.5 の 範囲で,直線的な相関があることを明らかにした(Fig.3)。 すなわち、蛋白質の構造形成に関わる熱力学量は、 ΔG_{unfold} ではなく、 ΔH_{unfold} として反映されることが明らかとなった。 以上より, 生理的 pH に近い条件においては, 全ての熱力 学量が最安定状態とはならないが、この状態が特異的な機能発現に重要であることを示した。⁷ DNA 特異的結合のた め、蛋白質の柔らかさが優先されたと考えられる。



Fig.2 Secondary structural analysis under different pH conditions. (A) Far-UV CD spectra of R2R3 at pH 4.0 (thin solid line), 5.0 (broken line), 6.0 (dotted line) and 7.0 (solid line). (B) Plots of α -helix contents as a function of pH.

pН	$T_{\rm d}/^{\circ}{\rm C}$	$\Delta T_{\rm d}/{\rm ^{o}C}^{\rm a}$	$\Delta G / \text{kJ mol}^{-1}$	$\Delta H / \text{kJ mol}^{-1}$	$\Delta S / J \text{ mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$
4.0	51.9 ± 0.4	1.5 ± 0.4	0.66 ± 0.15	145 ± 7	446 ± 22
4.5	55.5 ± 0.2	5.2 ± 0.2	2.3 ± 0.09	141 ± 9	428 ± 26
5.0	56.5 ± 0.4	6.1 ± 0.4	2.8 ± 0.14	149 ± 4	451 ± 13
5.5	54.3 ± 0.4	3.8 ± 0.4	1.9 ± 0.25	158 ± 8	483 ± 25
6.0	53.2 ± 0.2	2.7 ± 0.2	1.6 ± 0.17	182 ± 12	557 ± 36
6.5	51.5 ± 0.2	1.0 ± 0.2	0.71 ± 0.16	221 ± 3	680 ± 10
7.0	50.4 ± 0.2	0.0 ± 0.2	0.0 ± 0.1	215 ± 11	663 ± 33
7.5	49.6 ± 0.3	-0.8 ± 0.3	-0.50 ± 0.22	191 ± 22	593 ± 69

Table 1 Thermodynamic parameters for denaturation of R2R3 at different pHs at denaturation temperature of pH 7.0 (50.4°C).

^a $\Delta T_{\rm d}$ values were calculated from the equation, $\Delta T_{\rm d} = T_{\rm d}$ (at pH x.x) – $T_{\rm d}$ (at pH 7.0)



Fig.3 Correlation between secondary structure and thermodynamics. Plots of α -helix contents as a function of (A) ΔG or (B) ΔH determined from DSC analysis. The pH values are indicated on the plots.

次に、温度による R2R3 の挙動を精査することで、生体 内温度での物性解明を目指した。遠紫外 CD スペクトル測 定から、R2R3 はαヘリックス・リッチな構造を有するこ とが明らかとなり,また温度による 222 nm の強度変化から 得た転移温度 ($T_{\rm m}$) は 48.6°C, $\Delta H_{\rm vH}$ は 160 kJ mol⁻¹であっ た。すなわち、蛋白質のグローバルな構造転移は、約50°C で起こることが明らかとなった。一方, NMR による原子レ ベルでの解析から,転移温度以下の40°C付近における交差 信号の顕著なブロードニングが、主鎖・側鎖いずれにおい ても確認された(Fig.4)。これらの結果は、生体内温度に 近い条件下において, 蛋白質がグローバルな転移に達せず とも,原子レベルで顕著に揺らいだ物性を有することを示 唆する。⁸⁾ すなわち,蛋白質は天然構造といっても均一な 構造体ではなく、溶液中で、まさに揺らいでおり、様々な 構造をとること、さらに本対象蛋白質では、生理温度付近 でその揺らぎの程度が大きく、これが機能に重要であるこ

とが示唆された。DNA 結合蛋白質で,最近,天然変性蛋白 質とよばれるものが多く発見されていることを鑑みる と,⁹⁾本対象蛋白質は,天然変性状態には至らないものの, その疑似体であると考えられ,さらに推察すると,こうし た揺らぎの大きさが,DNA 結合という機能発現に重要であ るのかもしれない。ネットチャージとして負電荷の DNA 上で,正電荷の DNA 結合蛋白質が特異的結合部位を探索 し,同部位でより強固に結合するといったメカニズムを考 えた場合,生理条件下の DNA 結合前では揺らぎが大きく, 結合後に固い構造に変化するという構造機能相関は,矛盾 なく同仮説を説明できる。¹⁰⁾



Fig.4 Temperature-dependent ¹H-NMR spectra for R2R3. (A) The entire spectral region, (B) the low-field region (Trp ${}^{1}\text{H}^{\epsilon 1}$), and (C) the high-field methyl proton region.

疎水性コア形成残基置換による 蛋白質の安定性と機能への影響

前章では、同じ天然構造内でも、複数の構造が存在する ことについて述べた。通常の蛋白質では、これらをアンサ ンブル量として、全体の平均として熱力学量としても、構 造情報としても観測することになるが、本研究対象蛋白質 では,2 つの構造を安定にとらえうる変異体があり,野生 型と比較することで、その多型性の熱力学的寄与を解明で きる。先行研究において, c-Myb R2R3 の2 つのリピートの うち, R3 のアミノ酸置換体 I155L/I181L 変異体において, 多型構造をとることが、NMR 解析により報告されている。 ¹¹⁾ これは、変異により構造の均一性が失われ、NMR 時間 軸内で複数の構造が同時に観測されたものと考えられてい る。すなわち、I155L/I181L 変異に伴う構造エントロピーの 増大に起因し、揺らぎの程度が大きくなって、R3ではエネ ルギー差の小さい2つの構造が同時に観測されたと考えら れる。そこで我々は、安定性と DNA 結合の 2 つの熱力学 量に着目し、これら構造多型性の熱力学量特性を実験的に 証明すべく、主にカロリメトリーを用いた解析を行った。 先行研究では、R3のみを用いた解析が行われたが、著者ら は DNA 結合機能からも構造揺らぎを評価するために, R2R3 ユニットでの蛋白質を用いた。すなわち,野生型 R2R3 (R2R3 wt) に加え, Ile-155 を Leu に置換した I155L 変異 体とIle-155とIle-181を同時に置換したI155L/I181L変異体 を作製した。まず,変異による構造への影響を精査すべく, 遠紫外ならびに近紫外 CD スペクトルによる高次構造解析 を行った結果、変異体の二次構造は野生型と類似している 一方で, 疎水性コアの Trp 周囲の環境の変化が認められた。 これは, Ile-155 と Ile-181 が, リピートに保存された Trp 残基周囲に存在することとも一致する。次に、詳細な熱力 学特性を明らかにすべく, DSC 測定を行った(Fig. 5)。野 生型,変異体ともに、メインピークが1つ得られ、N ⇔ D の二状態転移に基づく解析を行った。変性中点温度(Ta) は、I155L≈R2R3 wt>I155L/I181Lの順となり、別に CD を 用いて行った温度依存的な二次構造変化の結果とほぼ一致 した。また I155L/I181L の熱安定性低下は,熱力学的には ΔH に依存することも明らかとなった。さらに興味深いこ とに、 ΔH_{vH} と ΔH_{cal} の比は 1.6 程度となり、R2 と R3 が一部 協同的な変性を伴うことも判明した。DSC 解析においては, 前述のように N ⇔ D の二状態平衡を仮定して解析を行っ たが、さらに複雑なモデル解析の必要性も示唆する。ここ で, R2R3 野生型の変性中点温度である 50.3℃ における各 種熱力学量を、各測定で得られたΔC_pを利用して算出し、 Table 2 にまとめた。I155L/I181L の熱安定性低下はΔH 依存 的であること、またその補償効果としてΔSが小さいことが 明らかとなった。次に、ITC による DNA との分子間相互作

用解析を行い、各種熱力学量を決定した(Table 3)。 I155L/I181L では結合 ΔS に依存した結合定数の低下が認め られた。ここで、DSC により得られた ΔS_{unfold} と ITC により 得られた ΔS_{bind} を模式的に表したものを示す(Fig. 6)。以上 より、I155L/I181L では DNA 結合前の立体構造の揺らぎが 大きくなり、これが熱安定性や DNA 結合の ΔS に反映され たものと考えられる。すなわち、アミノ酸置換に伴う側鎖 の構造エントロピー増大に起因するであろう、多型性をと るような揺らぎの増大が、蛋白質の立体構造や機能に反映 され、これらを定量的に実証したと言える。¹²⁾



Fig.5 The heat capacity curves of R2R3 wt (solid line), 1155L (dotted line), and 1155L/1181L (broken line).



Fig.6 Schematic diagram representing the entropy levels of folded or DNA-free, DNA-bound, and unfolded states.

 Table 2
 Thermodynamic parameters for denaturation of R2R3 wt and its mutants at the denaturation temperature of R2R3 wt (50.3°C).

	$T_{\rm d}/^{\rm o}{\rm C}$	$\Delta T_{\rm d}/{}^{\circ}{\rm C}^{\rm a}$	$\Delta G / \text{kJ mol}^{-1}$	$\Delta H/\text{kJ mol}^{-1}$	$\Delta S / J \text{ mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$
R2R3 wt	50.3 ± 0.02	0	0	266 ± 5	822
I155L	51.2 ± 0.03	0.9	0.77	271 ± 4	834
I155L/I181L	45.8 ± 0.1	-4.5	-2.8	216 ± 5	674

^a ΔT_d values were calculated from the equation, $\Delta T_d = T_d$ (R2R3 mutant) – T_d (R2R3 wt)

Table 3. Thermodynamic parameters of specific DNA binding to R2R3 wt and its mutants at 1	20°	°C
---	--------------	----

	п	$K_{\rm a} / (\times 10^7) {\rm M}^{-1}$	$\Delta G / \text{kJ mol}^{-1}$	$\Delta H/\text{kJ} \text{ mol}^{-1}$	$\Delta S / J \text{ mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$
R2R3 wt	0.96 ± 0.02	3.03 ± 0.30	-42.0	-43.3 ± 0.4	-4.43
I155L	1.00 ± 0.02	2.52 ± 0.29	-41.6	-43.5 ± 0.6	-6.48
I155L/I181L	1.00 ± 0.02	1.67 ± 0.01	-40.5	-45.7 ± 1.3	-17.7

Averaged values from the three experiments with standard errors.

Netsu Sokutei 43 (4) 2016

リピート間リンカー領域が及ぼす 構造安定性への熱力学的寄与

最後に、c-Myb R2R3 のリンカーが及ぼす影響について紹 介する。R2 と R3 は Asn-139, Pro-140, Glu-141 の短いリ ンカーで繋がれ,構造的に両リピートは独立して存在する。 一般に、ループ領域に位置する Pro 残基の変異は、変性状 態でのエントロピー準位を高くすることで、天然状態を安 定化することが知られている。先行研究において、この Pro-140の変異に伴う結合エントロピー量依存的な DNA 結 合定数の低下が報告され、これは DNA 非結合状態におけ るエントロピー準位が増加したためと考えられている。13) すなわち、2 つのリピートの相対配置を制限することで、 DNA 結合能を高めていると考えられる。これらの結果を踏 まえ、さらに我々は、このリンカー領域に起因する柔軟性 変化が、構造や安定性へ及ぼす影響を精査することとした。 Pro-140 を Gly もしくは Ala に置換した P140G, P140A 変異 体に加え、リンカー3 残基全てを Gly 置換した N139G/P140G/E141G (G3 と表記) を作製し, 各種物性解 析を行った。遠紫外 CD スペクトルでは、いずれの変異体 も野生型と同様のスペクトルを示し、リンカー部位の変異 による二次構造への影響はほとんどないことが示された。

一方, DSC 測定の結果, いずれの変異体も野生型と比べ熱 安定性の低下が認められ,その順は P140A > P140G > G3 で あった。さらに、野生型の変性中点温度である 50.3℃ にお ける各種熱力学量を,各測定で得られたΔC,を利用して算 出したところ(Table 4), リンカー変異体の熱安定性の低 下は, ΔH に依存することが明らかとなった。その補償効 果として、いずれの変異体もΔS は小さくなった。ここで、 エントロピー準位について考えると、先述の通りループや リンカー領域に位置する Pro 残基は、変性状態でのエント ロピー準位が低くなり、14,15) 今回の場合ではリンカー領域 に Pro 残基を持つ野生型がこれにあたる。各変異体は、リ ンカー部位の Pro 残基が Ala もしくは Gly に置換されてい るため、野生型と比べ変性状態でのエントロピー準位は高 くなる。一方で,熱変性に伴うΔSは野生型の方が変異体よ りも大きいことから、天然状態でのエントロピー準位も変 異体のそれより低く、その程度は変性状態よりも天然状態 で大きくなる。本対象蛋白質のように, Pro が 2 つのリピ ート間の相対配置を規定する位置にある場合、天然構造の 揺らぎの制限に「より大きく」寄与することが明らかにな ったといえる。¹⁶⁾ 以上, リンカー領域は, グローバルな熱 力学安定性に大きく寄与し、機能発現を制御するべくリピ ート間の配向維持にも重要な役割を担っている。

Table 4 Thermodynamic parameters for denaturation of R2R3 mutants at the denaturation temperature of R2R3 wt (50.3°C).

	$T_{\rm d}/^{\circ}{\rm C}$	$\Delta T_{ m d}/{}^{ m o}{ m C}^{ m a}$	$\Delta G / \mathrm{kJ} \mathrm{mol}^{-1}$	$\Delta H / \text{kJ mol}^{-1}$	$\Delta S / J \text{ mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$
P140A	48.9 ± 0.1	-1.8 ± 0.1	-0.84 ± 0.08	198 ± 4	615 ± 11
P140G	47.6 ± 0.6	-2.7 ± 0.6	-1.5 ± 0.3	190 ± 1	591 ± 3
G3	47.1 ± 0.2	-3.2 ± 0.2	-1.7 ± 0.1	178 ± 4	555 ± 14

^a $\Delta T_{\rm d}$ values were calculated from the equation, $\Delta T_{\rm d} = T_{\rm d}$ (R2R3 mutant) – $T_{\rm d}$ (R2R3 wt).

5. おわりに

転写因子 c-Myb DNA 結合ドメインを対象とし、比較対 照となる変異体を用いて、各部位に着目した動的構造機能 解析を行った。同蛋白質は、生理条件に近い温度における R2 の顕著な揺らぎが機能に必須である一方で、R3 やリン カー領域の構造揺らぎの増大は、安定性の低下のみならず、 機能の低下をもたらすことが明らかとなった。さらに生理 的 pH 条件下においては,熱力学的にも最安定な構造をと らないまでも、これらが機能と深く関わる状態であること が示された。以上、生理的条件下において生物が作り出す ユニークな構造揺らぎにより、その機能が巧妙に制御され ることが明らかとなった。熱力学解析を、蛋白質など生体 高分子の構造物性に適用した場合、安定性が向上した、な ど、現象論的な指標のみに扱われがちであるが、各熱力学 量を精査し、定量化することで、構造揺らぎの寄与にまで 言及することができる。これは構造生物学分野において, X線やNMR などで得られるスナップショット構造(静止 画)から,揺らぎの寄与も含めた動的構造(動画)が必要 とされる課題とも一致し, 蛋白質の動的挙動に関する熱測 定研究の, 今後の益々の進展が期待される。

謝 辞

本研究の DSC 解析は、大阪府立大学・生命環境科学研究 科の深田はるみ博士と共同で行った。また、科学研究費助 成事業(15J03576)、大阪大学蛋白質研究所共同利用研究支援事業下で行われた。

文 献

- K. A. Henzler-Wildman, M. Lei, V. Thai, S. J. Kerns, M. Karplus, and D. Kern, *Nature* 450, 913-916 (2007).
- T. Haliloglu and I. Bahar, Curr. Opin. Struct. Biol. 35, 17-23 (2015).
- T. Wiseman, S. Williston, J. F. Brandts, and L-N. Lin, Anal. Biochem. 179, 131-137 (1989).
- 4) J. B. Chaires, Annu. Rev. Biophys. 37, 135-51 (2008).
- K. Ogata, S. Morikawa, H. Nakamura, A. Sekikawa, T. Inoue, H. Kanai, A. Sarai, S. Ishii, and Y. Nishimura, *Cell* 79, 639-648 (1994).
- M. Oda, K. Furukawa, K. Ogata, A. Sarai, S. Ishii, Y. Nishimura, and H. Nakamura, *Protein Eng.* 10, 1407-1414 (1997).
- S. Inaba, H. Fukada, and M. Oda, *Int. J. Biol. Macromol.* 82, 725-732 (2016).
- S. Inaba, A. Maeno, K. Sakurai, S.N. Puthenpurackal, T. Ikegami, K. Akasaka, and M. Oda, *FEBS J.* 282, 4497-4514 (2015).
- 9) H. J. Dyson, Mol. Biosyst. 8, 97-104 (2012).
- 10) M. Oda, and H. Nakamura, *Genes to Cell* 5, 319-326 (2000).
- 11) K. Furukawa, M. Oda, and H. Nakamura, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 13583-13588 (1996).
- 12) S. Inaba, H. Fukada, T. Ikegami, and M. Oda, Arch. Biochem. Biophys. 537, 225-232 (2013).
- 13) M. Oda, K. Furukawa, K. Ogata, A. Sarai, and H. Nakamura, J. Mol. Biol. 276, 571-590 (1998).
- 14) B. W. Matthews, H. Nicholson, and W. J. Becktel, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 6663-6667 (1987).
- 15) K. Yutani, S. Hayashi, Y. Sugisaki, and K. Ogasahara, Proteins: Struct. Funct. Genet. 9, 90-98 (1991).
- 16) S. Inaba, H. Fukada, and M. Oda, J. Therm. Anal. Calorim. 123, 1763-1767 (2016).