

# Residue-specific thermodynamic and kinetic NMR study of the two-state protein transition provides insight into the transition state structure

林, 成一郎

<https://hdl.handle.net/2324/7182320>

---

出版情報 : Kyushu University, 2023, 博士 (システム生命科学), 課程博士  
バージョン :

権利関係 : Public access to the fulltext file is restricted for unavoidable reason (4)

氏 名	林 成一郎		
論 文 名	Residue-specific thermodynamic and kinetic NMR study of the two-state protein transition provides insight into the transition state structure.		
論文調査委員	主 査	九州大学	職名 教授 氏名 須山幹太
	副 査	九州大学	職名 教授 氏名 稲葉謙次
	副 査	徳島大学	職名 教授 氏名 齋尾智英

### 論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

EXSY (exchange spectroscopy) NMR は数百ミリ秒オーダーの遅い交換系に対して用いることが可能な NMR 解析法であり、2 状態交換している蛋白質分子の平衡定数  $K$  や交換速度定数  $k$  (行きと帰りの 2 つある) をアミノ酸残基毎に決めることができる。しかし、 $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  などの異種核の相関を用いた多次元 NMR 測定では異種核間の磁化移動中の横磁化のロスなど、緩和によるピーク強度の低下が起こる。EXSY NMR と非線形フッティング解析を使う一般的な方法では、緩和の影響が 2 つの状態で異なっているために、アミノ酸残基毎の正確な  $K$  と  $k$  を得ることは困難である。学位申請者の所属する研究室では、黄色ブドウ球菌由来の抗菌性ペプチドである nukacin ISK-1 の溶液中での異なる立体構造間の 2 状態交換について、EXSY NMR を用いてアミノ酸残基毎の  $K$  と  $k$  を決定した。 $K$  と  $k$  が残基毎に異なる値を持つことから分子全体の構造変化の共同性が低下していることを見出した。さらに、アミノ酸残基ごとに  $\log K$  と  $\log k$  をプロットすると直線関係があることを発見した。このような直線関係は一般的に自由エネルギー直線関係 (Linear Free Energy Relationship, LFER) と呼ばれるが、nukacin ISK-1 の 2 状態交換の LFER は直線上のすべてのデータ点が単一のポリペプチド内の各アミノ酸残基の信号に由来しており、新奇なものであったことから、アミノ酸残基レベルの自由エネルギー直線関係 (residue-based LFER, rbLFER) と命名した。残念なことに、過去の nukacin ISK-1 の NMR 解析においては、上述した緩和の影響を十分に考慮しておらず、アミノ酸残基毎に  $K$  と  $k$  が異なることや rbLFER が成り立つことがアーティファクトである可能性を完全には否定できていなかった。

本論文の第 1 章では緩和バイアスを完全に排除した測定・解析法として、HSQC0 測定と EXSY- $\Pi$  解析を組み合わせた手法を提案し、nukacin ISK-1 の 2 状態交換の  $K$  と  $k$  のバイアスフリーの値を決定した。HSQC0 測定では緩和の原因となる HSQC パルス系列のユニットを 1~3 個連続して繋げた HSQC1~3 の測定を 3 回行い、各測定で求めたアミノ酸残基毎の  $K$  を HSQC0 状態に外挿することによって、2 次元スペクトルの分解能と緩和バイアスがない 1 次元スペクトルの定量性を併せ持った仮想的な状況で  $K$  を決定できる。EXSY- $\Pi$  解析では 4 つのピーク強度を組み合わせることで緩和の項をキャンセルすることで、混合時間の関数として原点を通る単純な 1 次式のフィッティングに近似することで、行きと帰りの交換速度定数の積  $k^*k$  を正確に求めることができる。積  $k^*k$  を行きと帰りそれぞれの交換速度定数に分解するために、HSQC0 の結果 ( $K = k/k$ ) と組み合わせる。以上の手法を用いて決定した緩和バイアスを除いたアミノ酸残基毎の  $K$  と  $k$  はやはり分布を持ち、rbLFER が成り立つことがわかった。rbLFER のデータ点の分布と立体情報情報を組み合わせるこ

とで、遷移状態における構造形成クラスター (foldon) の存在や、遷移状態において特殊なコンホメーションをとるアミノ酸残基を発見することができた。

第2章では HSQC0 と EXSY-II 解析を組み合わせた手法を、単純蛋白質であるスペクトリン SH3 ドメイン (spcSH3) に適応した。spcSH3 は酸性 pH 条件で変性状態 ( $U_{\text{exch}}$ ) と天然状態 (F) の状態交換をしており、2 状態に由来する NMR ピークが同時に観測される。この 2 状態交換のタイムスケールは nukacin ISK-1 と同程度であるため、HSQC0 と EXSY-II 解析を適応し、単純蛋白質のフォールディングにおいても rbLFER が成り立つのか否かを検証するのに適した系である。しかし、期待に反して spcSH3 の酸性 pH 条件でのフォールディングでは rbLFER は成り立たなかった。他グループによる研究で、 $U_{\text{exch}}$  は native な U 状態と non-native な  $U^*$  状態のアンサンブルである ( $U_{\text{exch}} = U + U^*$ ) ことが報告されている。なお、U と  $U^*$  の交換速度は速い (ミリ秒以下) ため、シグナルは一つしか観測されない。すなわち、spcSH3 は化学シフトからみると 2 状態とみなせるが、実際には 3 状態である。rbLFER は 2 状態交換を仮定した関係性ゆえに spcSH3 では rbLFER は成り立たないと結論した。そこで、本研究では野生型 spcSH3 (WT) と 1 アミノ酸置換型 spcSH3 (mutant) を用いてマルチプローブ  $\phi$  値解析を行った。 $\phi$  値とは遷移状態に含まれるフォールド状態の割合 ( $\phi=0\sim 1$ ) である。HSQC0 と EXSY-II 解析を使って WT と mutant の  $K$  と  $k$  をそれぞれ決定し、自由エネルギー変化を求めて、 $\phi$  値 ( $\phi = (\Delta G^{\ddagger}_{\text{WT}} \cdot \Delta G^{\ddagger}_{\text{mutant}}) / (\Delta G^{\circ}_{\text{WT}} \cdot \Delta G^{\circ}_{\text{mutant}}) = \Delta \Delta G^{\ddagger} / \Delta \Delta G^{\circ}$ ) を各残基で決めた。マルチプローブ  $\phi$  値解析で求められる  $\phi$  値を  $\phi_{\text{multi}}$  と表記することにする。いくつかの変異体を作成して  $\phi_{\text{multi}}$  を求めると、ある変異体では値の分布が二次構造とほぼ一致しており、蛋白質のフォールディングのモデルである核形成-凝縮モデルを支持する結果であった。また、他のアミノ酸変異体では  $\phi_{\text{multi}}$  の値が負になり、変異の導入部位が non-native 構造の形成に関与していることが示唆された。これらの結果から、酸性 pH 条件での spcSH3 のフォールディングパスウェイについて議論した。今回の結果は、アミノ酸変異導入部位と観測プローブとの間の遷移状態における共同性に関して新しい定量的解析法の開発につながる可能性があり、蛋白質のフォールディング研究の分野の今後の発展に資するものである。

以上の研究結果は博士 (システム生命科学) の学位に値すると認める。