S1Z02

Site-specific Detection of Conformational Fluctuation by High Pressure NMR

○鎌足 雄司¹, Smith Lorna², Dobson Chris³, 横山 茂之¹, 赤坂 一之⁴ (¹ 理研・細胞情報伝達, ² University of Oxford, ³ University of Cambridge, ⁴ 近畿大・理工)

タンパク質の構造は、その基底構造（いわゆる天然構造）から準安定構造や変性構造などの多様な構造との平衡状態にある。一般的に天然構造以外の構造はその存在割合が低く、通常の生理的条件下では分光学的に検出することが困難である。圧力は、分子体積を軸に、もともと存在する蛋白質の多様構造間の平衡を部分モル体積の小さな方へシフトさせる。これによって、天然状態から逸脱した構造が観測可能となる。蛋白質の準安定構造は、天然構造以上に、機能発現などに重要である可能性もあり、高圧 NMR は原子レベルでその構造解析を可能にする唯一の手法である。高圧 NMR 法によりニフトリリゾチムの天然構造内での揺らぎの大きい部位を同定した。また、高圧かつ低温で、準安定構造が安定化されることも見いだした。それら、天然構造内部での揺らぎの大きい部位、および、高圧・低温での変性部位は、いずれもタンパク質内部のキャビティーや水和水近傍に位置し、その一部は活性部位近傍に位置する。このことは、原子のパッキングや水和水が、天然構造内部での揺らぎや天然構造から準安定構造への転移、ひいては機能発現をコントロールしている可能性があることを示唆している。

Y.O.Kamatari, L.J.Smith, C.M.Dobson, S.Yokoyama, K.Akasaka : Site-specific Detection of Conformational Fluctuation by High Pressure NM

S1Z04

溶液中で揺らぐ蛋白質の NMR スナップショット：初の NOE による BPTI 高圧構造

○李 華^{1,2}, 山田 博昭¹, 赤坂 一之^{1,3} (¹ 神戸大・自然, ² 理研・GSC, ³ 近畿大)

Knowing an average structure of a protein is one thing; knowing its fluctuation is another. Extracting information on the fluctuation of a protein structure from NMR measurements remains as a challenging subject, as NMR parameters such as chemical shift, J-coupling and NOE are normally averaged out over an ensemble of fluctuating conformers during signal accumulation, which requires a time range of milliseconds or longer. In short, the fluctuation disappears, in the first approximation, from the NMR spectrum.

To recover the information on the fluctuation, we apply pressure because of the following reason. Conformational fluctuation of a protein takes place along with a volume fluctuation, the squares of which is linearly related to compressibility (Cooper, 1976). Thus, the measurement of pressure-induced changes of a protein structure in site-specific detail will be a direct manifestation of site-specific conformational fluctuation.

In this report, the NOE-based structure of a 58-residue protein BPTI at 2 kbar will be reported as an "NMR snap shot" of a fluctuating protein in solution. All the hydrogen bond lengths and the torsion angles are changed in characteristic ways under pressure, depicting the intrinsic nature of their fluctuations. Most notably, the well-known cavity inside BPTI redistributes at high pressure, experimentally verifying the high mobility of cavities within the protein architecture, as proposed earlier as "mobile defect" (Lumry and Rosenberg, 1975).

H.Li, H.Yamada and K.Akasaka : "NMR snap shot" of a fluctuating protein in solution: The first NOE-based structure of BPTI at high pressure

S1Z03

The plasticity of proteins probed by NMR chemical shifts: effects of pressure and temperature

○Williamson M. P.¹, Refaee M.¹, Akasaka K.² (¹ University of Sheffield, ² Kinki University)

Results are described showing how proteins alter under pressure, and how temperature-dependent chemical shift changes allow us to characterise the alternative states available to a range of proteins. We have used pressure-dependent changes in chemical shift as restraints to calculate structural changes of BPTI and lysozyme using a restrained simulated annealing protocol. The proteins compress slightly (0.5% / kbar), with b-sheet being almost incompressible, but much more easily deformed than a-helix. Compression is largely due to reduction in volume of packing defects. Hydrogen bonds compress by 0.25% / kbar, with longer hydrogen bonds compressing more. In both proteins, there are large structural changes in the active site. The largest changes (both compression and expansion) are seen close to buried structural water molecules, which are therefore implicated as sites important for volume change with pressure. Because compressibility is related to volume fluctuation under normal conditions, this suggests that local changes in protein volume (needed for example for ligand binding, channel opening and pressure denaturation) are most easy around buried water molecules. Curvature of the temperature dependence of chemical shift is shown to give information on low-lying alternative folded states. These states are less ordered than the ground state, consist of approximately 5 residues each, and are accessed randomly. The results are consistent with models of protein unfolding requiring the accumulation of small disordered states.

M. P. Williamson, M. Refaee and K. Akasaka : The plasticity of proteins probed by NMR chemical shifts: effects of pressure and temperature

S1Z05

高圧 NMR 法によるユービキチンフォールディング中間体の構造解析

○北原 亮¹, 横山 茂之^{1,2}, 赤坂 一之^{1,3} (¹ 理研・細胞情報, ² 東大・院理, ³ 近大・生物理工)

蛋白質の多様構造に関する研究は、蛋白質の機能と構造の関係、蛋白質の巻戻り問題、プリオンに代表される蛋白質の異常構造への転移問題等様々な問題に知見を与える。我々は天然状態から逸脱した蛋白質の構造を捉える新しい方法として高圧 NMR 法を用いた。高圧 NMR 法は、もともと存在する蛋白質の多様構造間の平衡を、分子体積を軸に、加圧により部分モル体積の小さな方へシフトさせることによって、天然状態から逸脱した構造を観測可能とする方法である。これによって分光学的検出限界外にある“稀な”構造も、高圧下で安定に捕捉され検出可能になる。細胞内でポリユビキチンを形成し蛋白質分解の信号となるユビキチンについて、これまでにその構造の全体像を明らかにした。すなわち広い圧力範囲で全残基レベルでの高圧 NMR 実験 (-21~35℃, 30~3700 bar) を行うことによって、ユビキチンは N1, N2, I, U の少なくとも 4 つの構造間の平衡状態にあることを明らかにした。高圧下で観測された I 構造は、残基 33-42、C 末端残基 70-76 の部分で構造が壊れた局所変性構造であり、これは速度論的重水素ラベル法により観測された巻き戻り中間体の構造と極めて似ていることが分かった。またその構造が壊れている部分は、一連の酵素 (E1-E3) との相互作用部位と一致することから、我々はこの局所変性構造こそが機能に直接関係する構造であると考えている。最近、その前駆的構造体である N2 構造について、3000 bar の加圧下でのプロトン-プロトン NOE 情報に基づく座標解析を行うことに成功した。この結果に基づいて、ユビキチンが広い構造空間での揺らぎによって、どのように機能を発揮するのかについて考察する。

R. Kitahara, S. Yokoyama, K. Akasaka : Structure determination of a folding intermediate in ubiquitin using high pressure