

平成 30 年 6 月 6 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K06966

研究課題名(和文)核磁気共鳴法を利用した高分子量蛋白質の定量的な動態解析法の開発

研究課題名(英文)Development of new NMR method for studying structural dynamics of large molecular proteins

研究代表者

宮ノ入 洋平 (Miyanoiri, Yohei)

大阪大学・たんぱく質研究所・准教授

研究者番号：80547521

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：高分子量蛋白質の構造動態を明らかにするため、緩和最適化SAILアミノ酸を設計した。また、アミノ酸要求性を有する大腸菌生合成系を新たに確立し、分子量82 kDaのMSGならびに約1M DaのGroEL-GroES蛋白質複合体に緩和最適化SAILアミノ酸を導入した。各種NMR実験より、MSGのCHシグナルを帰属し、圧力可変NMR実験に供した。その結果、グリオキサール酸結合領域を含むコアドメインにおいて、動態変化を示すことが明らかとなった。一方、化学交換の定量解析やGroEL-GroES複合体については十分な感度が得られず、今後の課題が示された。

研究成果の概要(英文)：We developed new relaxation optimized SAIL amino acids for studying structural dynamics of large molecular proteins. Moreover, we also developed cost effective E. coli cellular expression systems, using auxotrophic mutants lacking certain enzymes in the biosynthetic pathways of various amino acids. From these results, we could successfully apply them to the 82 kDa MSG and about 1 MDa GroEL-GroES to observe the ^{13}C side chain moieties. By using high-pressure NMR experiments, we clearly detected structural fluctuations in core domain of MSG which could not be observed in conventional NMR experiments.

Unfortunately, we could not do the quantitative analysis for structural dynamics of MSG and GroEL-GroES due to the lower sensitivity of exchange signals. We will continue to improve and develop the SAIL-NMR methods to solve these problems.

研究分野：構造生物学

キーワード：NMR 蛋白質動態 安定同位体標識 高分子量蛋白質 圧力可変実験

1. 研究開始当初の背景

溶液内における蛋白質は、結晶構造がもたらす静止画像的描像とは異なり、幅広い時間領域を含む平衡状態を通して、動的な相互作用を示す。このような複雑な相互作用動態こそが、多様な蛋白質の生体機能発現の本質と深く関わっていると考えられる。溶液 NMR 法は、様々な構造解析手法の中で、溶液中の蛋白質の立体構造動態に関して原子レベルにおける情報をもたらす唯一の手法である。これまでも数多くの研究者が様々な蛋白質の立体構造動態と生物機能を関連付ける研究に取り組んできた。しかしながら、蛋白質の NMR 研究手法は未だ開発途上であり、様々な方法論的問題点が課題として残されている。その内で未解決の最大の課題が、解析対象となる蛋白質の分子量限界である。従来の構造解析方法を用いる限り、分子量に比例して増加する NMR シグナルの重なりや、核スピン間の磁気双極子相互作用による線幅の拡がりのため、精度良く構造解析可能な分子量限界は実質的に 25kDa 以下に留まってきた。“分子量の壁”と称されるこの問題点を解決するために、安定同位体標識技術の高度化を中心とする様々な努力が積み重ねられてきた [Ohki 等, Prog. Nucl. Magn. Reson. (2008)]。その中でも、観測対象を一部のアミノ酸のメチルシグナルに絞った methyl TROSY 法は広く利用されている [Tugarinov 等, J. Am. Chem. Soc. (2003)]。この手法では、汎用な大腸菌蛋白質生合成系を利用しており、重水素化された最小培養培地に安定同位体標識されたアミノ酸前駆体を加えるだけで、蛋白質中の Ile, Leu 及び Val 残基のメチル基にのみ、¹H, ¹³C 核を導入し、その他のアミノ酸を重水素置換する事が出来る。その為、分子量 100 kDa を超える巨大蛋白質複合体についても、上記アミノ酸のメチル基由来のシグナルのみを高感度に観測する事が可能となり、NMR を利用した高分子量蛋白質の相互作用解析や膜蛋白質の動態解析も盛んに行われるようになった。しかし、観測対象を極端に限定していることや、メチル基の安定同位体標識率の低下、立体特異性の喪失といった問題点があり、また、メチル基由来の NMR シグナル同士の縮重は解決されておらず、十分な立体構造情報を得る事は事実上不可能である。

NMR の分子量の壁を打破するための、もう一つの革新的技術が、代表者の所属する研究室で開発された立体整列同位体標識 (Stereo-array isotope labeling : SAIL) 法である。本手法の特徴は、全てのアミノ酸残基のプロキラル基を全て立体選択的に重水素置換する事が可能であり、NMR シグナルの縮重、広幅化を抑えつつ、構造情報の質を大幅に高めることができる点である。実際に、全てのアミノ酸残基に、この SAIL アミノ酸を適用する事で、分子量 40kDa の高分子量蛋白質の溶液立体構造を迅速かつ精密に決

定する事が可能となった [Kainosho 等, Nature (2006)]。また、選択 SAIL 標識技術を開発し、アミノ酸側鎖の水酸基、SH 基の水素交換速度の測定法、Trp 残基側鎖の立体配座の解析法等、新しい動的立体構造の解析法が確立されてきた [Takeda 等, J. Am. Chem. Soc. (2009), (2010), (2011); Miyanoiri 等, J. Biomol. NMR (2011)]。近年では、圧力変化に伴う蛋白質の物性変化の解析についても開発を進め、蛋白質中に存在する芳香環回転運動に関わる活性化体積を明らかにすることにも成功している [論文作成中]。代表者等は、さらに高分子量の蛋白質について、動的立体構造解析法の開発を目指し、NMR シグナルの広幅化の原因となる核緩和機構を徹底的に制御した、緩和最適化 SAIL アミノ酸を開発してきた。その結果、分子量 80kDa 以上の高分子量蛋白質についても、メチル基のみならず、芳香環や脂肪族等、あらゆる CH シグナルを高感度に観測し、帰属する事に成功した [論文作成中]。同時に、大腸菌蛋白質生合成系を利用した選択 SAIL アミノ酸標識技術も確立し、前述のアミノ酸前駆体を利用したメチル基標識では不可能であった、アミノ酸特異的かつ立体特異的なメチル基標識を可能にした [Miyanoiri 等, J. Biomol. NMR (2013)]。他の緩和最適化 SAIL アミノ酸に関しても、効率よく標識できることを明らかにし、高分子量蛋白質においても、精密な立体構造を決定できることを見出してきた。

このような背景から、代表者は緩和最適化 SAIL 法と高圧 NMR 測定を融合して、高分子量蛋白質について、それらが有する動態の定量的な解析法を確立する事を目指す。緩和最適化 SAIL 法の利用により、高分子量蛋白質についても様々な CH シグナルを観測する事が出来るため、芳香族アミノ酸の芳香環回転運動や、各アミノ酸の立体配座の回転異性体間の交換運動を捉える事が可能となる。さらに、それらの動態の圧力依存性を調べることにより、運動に必要な活性化体積を明らかにすることができる。このことから、相互作用に伴う高分子量蛋白質の構造変化などについて、従来の手法では定性的な情報しか得られなかったが、芳香環の回転運動や、アミノ酸側鎖の回転異性体間の交換運動など詳細な動態を定量化する事が可能となり、機能発現に至る詳細な分子機構を明らかにすることが出来、次世代の構造生物学を開拓する技術となる。

2. 研究の目的

核緩和最適化 SAIL アミノ酸を、分子量 82kDa のリンゴ酸合成酵素 (MSG) に導入し、基質結合に伴う動態変化を定量的に解析する方法を確立する。期間内の目標は、(1) 複数のアミノ酸に対し、メチル基、芳香環、脂肪族の観測に最適化された核緩和最適化 SAIL アミノ酸を設計、(2) 各 SAIL アミノ

酸を MSG に選択的に取り込ませ、蛋白質単体時および基質結合時の NMR シグナルの帰属を行う。その後、(3)様々な圧力条件下で NMR 測定を行い、複合体形成に伴う活性化体積の変化を解析し、動態変化と基質認識機構との相関関係を明らかにする。

3. 研究の方法

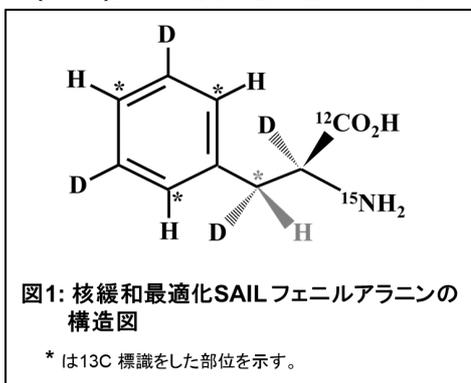
核緩和最適化 SAIL アミノ酸を設計し、SAIL 標識 MSG 試料を調製、高圧 NMR 測定の最適化を行う。また、各アミノ酸由来の NMR シグナルを、主に残基内 NOE 情報を利用して、帰属を進める。NMR シグナルの帰属は、MSG 単体及び MSG-グリオキサル酸複合体について行う。

次に、高圧 NMR 測定を進め、MSG 単体及び MSG-グリオキサル酸複合体について NMR シグナルの変化を解析し、各状態について対象とする領域の活性化体積を算出する。両状態間における活性化体積の変化を明らかにした後、動態変化の鍵となる領域にアミノ酸置換を施し、その変異体に対して、基質結合能と動態変化の解析を行い、MSG の基質認識機構と動態変化の相関関係を明らかにする。

4. 研究成果

(1) 核緩和最適化 SAIL アミノ酸の設計。

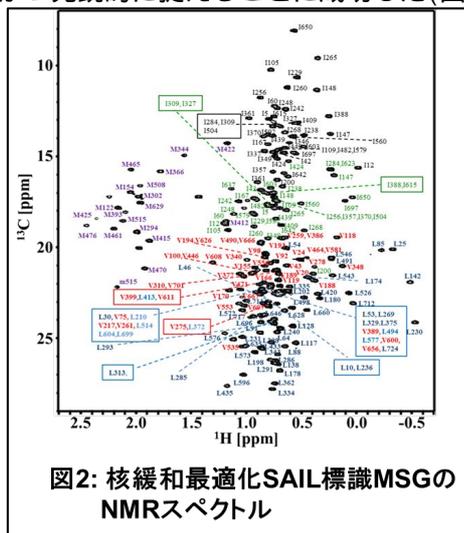
分子量 82 kDa の MSG についてメチル基、メチレン基ならびに芳香環の CH 相関シグナルを得るため、核緩和最適化 SAIL アミノ酸の設計を行った。その一例として、フェニルアラニンの安定同位体標識パターンを示す。まず、¹H 位のメチレン基を高感度に観測するため、隣接する炭素、炭素を ¹²C に保持したうえで、炭素を特異的に ¹³C にする。これにより、¹³C-¹³C 間のカップリングの影響を排除することが出来る。次に、¹H 位の二つのメチレン水素である H₂ と H₃ について、一方のみを立体特異的に重水素化する。さらに、近隣に存在する ¹H 水素についても重水素化を供す。これにより、メチレン周囲からの双極子-双極子相互作用を抑えることが出来る。このような核緩和制御を芳香環にも適用し、¹H 位及び ¹³C 位を各々 ¹³C、¹H とし、残りの ¹H 位には ¹²C、²H を導入した、核緩和最適化 SAIL フェニルアラニンを設計した(図 1)。同様な安定同位体標識をチロシ



ン、トリプトファンなどの芳香族アミノ酸とイソロイシン、ロイシン、バリン、メチオニン等メチル基含有アミノ酸についても設計し、SAIL テクノロジーズ社の協力を得て合成した。

(2) SAIL 標識蛋白質の調製及び NMR シグナルの帰属。

先行研究より、MSG については大腸菌を利用した大量発現系がすでに構築されていた。そこで、同発現系をもとに、SAIL 標識 MSG の調製法を確立することにした。核緩和最適化 SAIL アミノ酸は通常の ¹³C、¹⁵N 均一標識アミノ酸と比較すると高価であることから、少量で高効率に目的蛋白質に取り込まれることが、汎用性を高めるうえで重要であった。培養方法や培地へのアミノ酸添加法を工夫することで、大半のアミノ酸については、培地 1L 当たり 10 mg 添加することで、高効率に標識することが可能となった。しかし、Val や Ala といったアミノ酸に関しては、大腸菌内の生合成反応の活性が高いため、標識率を高めるためには、培地 1L 当たり 100 mg 以上のアミノ酸を添加する必要があった。そこで、大腸菌に内在するアミノ酸合成酵素の一部を遺伝子レベルで破壊することで、Val や Ala の生合成反応を抑制した大腸菌を新たに作製した。このアミノ酸要求性大腸菌を利用することで、通常の大腸菌と比較して、アミノ酸の添加量を 10 分の 1 程度に抑えることが可能となり、SAIL 標識試料を安価かつ高効率に調製することが可能となった([雑誌論文])。このことから、多種多様な標識パターンで SAIL 標識試料を調製することが可能となった。核緩和最適化 SAIL アミノ酸で標識した MSG を NMR 実験に供した結果、メチル基、芳香環および脂肪族 ¹H CH シグナルを高感度かつ鋭的に捉えることに成功した(図 2)。



シグナルの帰属に関しては、NOESY 実験による残基内 NOE の解析ならびにアミノ酸置換体を利用した手法を併用することで、高効率かつ高精度に進めることが出来た。

アミノ酸要求性大腸菌を利用した SAIL 標識試料の調製ならびに核緩和最適化 SAIL による NMR シグナルの高感度化は、研究計画当初の予想よりも大きな効果を生み出していた。そこで、MSG よりもさらに高分子量の蛋白質複合体へ本手法を適用することを試みた。実際に、分子量約 1MDa の GroEL-GroES 複合体に核緩和最適化 SAIL を導入し、試料調製に成功した。

(3) 圧力可変実験

圧力変化に伴う MSG の NMR 信号の変化を解析するため、まず ^2H , ^{15}N 標識 MSG を用いて条件検討を行った。その結果、MSG の場合には圧力 2000 bar 以上の状態で、半日以上に渡る長時間測定を行うと、変性が生じることが分かった。また、その段階で静水圧(1 bar)に戻しても、巻き戻すことはなく、沈殿が生じてしまうことが分かった。そこで、動態変化の解析については、1 - 1500 bar の範囲で加圧することにした。

核緩和最適化 SAIL 標識 MSG について、圧力可変実験を行うと、メチルシグナルならびに芳香環 CH シグナルにおいて、顕著な変化がみられた。特に興味深い現象として、加圧に伴い、シグナルの分裂や広幅化を示す残基が確認された(図 3)。このことは、アミノ酸側鎖の回転異性体間の交換運動や芳香環反転運動の存在を示唆している。また、このような動態を示したアミノ酸残基は、MSG のコアドメインに集中していることが明らかとなった(図 3)。コアドメインはグリオキサール酸の結合部位を含み酵素活性を担う中心ドメインとして知られている。先行研究では、アミド基の緩和速度定数の測定といった動態解析がなされていたが、顕著な動態変化を捉えることはできていなかった。本課題では、緩和最適化 SAIL 法と高圧 NMR 法を駆使することで、従来手法では得ることのできなかった、MSG の動態を捉えることに成功した。

一方、これら動態変化を定量的に解析すべく、EXCY 実験への適用を試みたが、定量解析に資するうえで、十分な感度・分解能を得る

ことが出来なかった。原因として、 ^{13}C - ^1H EXCY 実験においては、通常の TROSY 実験で得られる高感度化の効果を最大限取り入れることが困難であるため、十分なシグナル感度が得られなかった点が考察された。また、MSG への加圧実験が 1500 bar を上限として設定せざるを得なかったため、十分に分離した交換シグナルを得ることが困難であったことが挙げられた。

MSG のほかに、GroEL-GroES 複合体についても、緩和最適化 SAIL 標識試料を高効率に得ることに成功したため、NMR 測定に供した。これまでに、芳香環 CH シグナルの観測には成功していたが、本課題により、 ^1H 位 CH シグナルの観測や立体特異的かつアミノ酸特異的なメチルシグナル観測に成功を収めた。しかしながら、高感度に観測されたシグナルは限定的であり、対象のアミノ酸残基のすべてのシグナルを捉えることはできなかった。この原因としては、分子量の増大が挙げられるが、それ以外にも複合体形成や各種構成因子の精製条件の最適化が必要と考えられる。

(4) 今後の展望

本課題の遂行により、従来捉えることが出来なかった、MSG の構造動態、とくにアミノ酸残基側鎖の動態を捉えることに成功した。さらに、簡便かつ効率的に SAIL 標識蛋白質を調製する手法を確立することが出来た。このことより、様々な蛋白質について緩和最適化 SAIL 法を適用することが可能となり、高度な構造動態研究の汎用性を高めることが出来た。

一方で、構造動態の定量解析に資するためには、NMR シグナルの更なる感度向上、分解能向上が必須であることが浮き彫りとなった。これらの問題を解決すべく、緩和最適化 SAIL アミノ酸の更なる改良および NMR 測定技術の開発が必要となる。

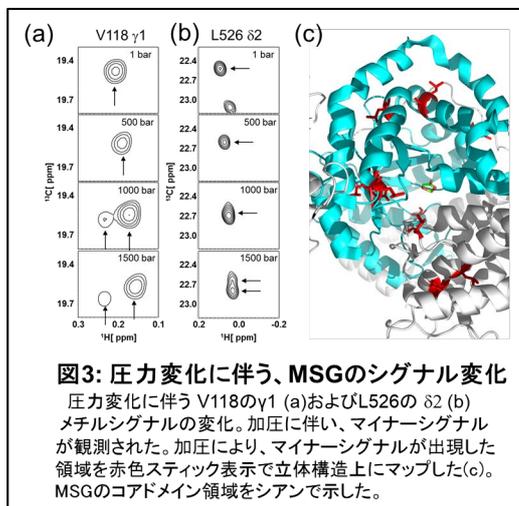
5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 6 件)

Miyanoiri Y., Takeda M., Kainosho M. “Stable-Isotope Aided NMR Spectroscopy.” *Modern Magnetic Resonance*, (査読有) 2: 1-16. (2017)
DOI:10.1007/978-3-319-28275-6_48-1

Miyanoiri Y., Ishida Y., Takeda M., Terauchi T., Inouye M., Kainosho M. “Highly efficient residue-selective labeling with isotope-labeled Ile, leu, and Val using a new auxotrophic *E. coli* strain.” *Journal of Biomolecular NMR*, (査読有) 65: 109-119. (2016)
DOI:10.1007/s10858-016-0042-0



宮ノ入洋平、武田光広、甲斐荘正恒 “高
分子量タンパク質の動態に迫る NMR 技術の開
発” Journal of Japanese Biochemical
Society, (査読有) 88: 452-464. (2016)
DOI:10.14952/SEIKAGAKU.2016.880452

〔学会発表〕(計 9 件)

Miyanoiri Y., “Relaxation Optimized
SAIL-NMR method for studying structures
and dynamics of protein complexes”
Frontiers of Multiscale Structural
Biology: Order-disorder transitions and
dynamic membrane interactions, 2018 年,
Osaka University (Suita, Osaka)

Miyanoiri Y., “Relaxation
Optimization using isotope labeling for
studying larger proteins by NMR”
Japan-Korea Bilateral Symposium between
SNU and IPR on Structure and Folding of
Disease Related Proteins, 2018 年, Seoul
National University (Seoul, Korea)

Miyanoiri Y., “Relaxation
Optimization using isotope labeling for
studying larger proteins by NMR” The 56th
annual meeting of NMR Society of Japan,
2017 年, Tokyo Metropolitan University
(Hachioji, Tokyo)

宮ノ入洋平, “NMR で観る: 高度な安定
同位体標識技術を利用した高分子量蛋白質
の動態構造解析法” 第 21 回 VBL シンポジウ
ム, 2017 年, 名古屋大学 (愛知県名古屋市)

宮ノ入洋平, “大阪大学蛋白質研究所に
おける NMR 共用プラットフォームの運用と
SAIL-NMR 法の新たな展開” 日本分光学会 NMR
分光部会, 2017 年, 京都テルサ (京都府京都
市)

Miyanoiri Y., “Relaxation-optimized
SAIL NMR for structural studies of large
proteins” The 2nd MCLS 2017, 2017
年, Wyndham Hotel (Surabaya, Indonesia)

Miyanoiri Y., “Structural Studies of
Larger Proteins Using Relaxation
Optimized SAIL Amino Acids” XXVIIth
ICMRBS 2016, 2016 年, Kyoto International
Conference Center (Kyoto)

Miyanoiri Y., “Structural studies of
larger proteins using relaxation
optimized SAIL amino acids” The 42nd Naito
Conference, 2016 年, Chateraise Gateaux
Kingdom Sapporo (Sapporo, Hokkaido)

Miyanoiri Y., “Relaxation-optimized

SAIL method for structural studies of
large proteins” The 55th annual meeting of
NMR Society of Japan, 2016 年,
International conference center Hiroshima
(Hiroshima)

〔図書〕(計 1 件)

Kainosho M., Miyanoiri Y., Takeda M.
Springer, “Experimental Approaches of
NMR Spectroscopy; Isotope-Aided Methods
for Biological NMR Spectroscopy: Past,
Present, and Future”, 2017 年, 37-61
〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等
大阪大学蛋白質研究所先端計測研究室
[http://www.protein.osaka-u.ac.jp/rcsfp/
apc/nmr/](http://www.protein.osaka-u.ac.jp/rcsfp/apc/nmr/)

6. 研究組織

(1) 研究代表者
宮ノ入 洋平 (MIYANOIRI Yohei)
大阪大学・たんぱく質研究所・准教授
研究者番号: 80547521

(2) 研究分担者 なし
()

研究者番号:

(3) 連携研究者 なし
()

研究者番号:

(4) 研究協力者 なし
()