

令和 2 年 6 月 15 日現在

機関番号：22701

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2019

課題番号：16K14683

研究課題名(和文)炭素核の直接測定によるより高分子量の蛋白質のNMR構造解析への挑戦

研究課題名(英文)Challenges to NMR structural analysis of higher molecular weight proteins by direct measurement of carbon nuclei

研究代表者

池上 貴久(Ikegami, Takahisa)

横浜市立大学・生命医科学研究科・教授

研究者番号：20283939

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文):核磁気共鳴による蛋白質の解析では、信号ピークがどの原子に由来するかを決める帰属が必要である。しかし、帰属は高い pH 条件や高分子量になるほど困難になる。それを克服すべく、筆者はこれまで連鎖帰属の中心であったスピンをアミド基 $1\text{H}/15\text{N}$ から $1\text{H}/13\text{C}$ に移す方法を試みた。その結果、最先端技術をもつ NMR 装置であっても、依然として感度が低く、高分子量では 1mM ほどの濃度が必要であることが分かった。しかし、 13C 測定は金属蛋白質など常磁性中心をもつ試料や、構造をもたない天然変性蛋白質では威力を発揮し、今後パルスプログラムやハードウェアの開発により、さらなる進展が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

核磁気共鳴(NMR)は、病院で使われる MRI と同じ原理で作動する装置である。原子核と原子核の間の距離を見積もることができるため、この情報から例えば蛋白質の立体構造を決定することができる。これまでは蛋白質のアミド基 $1\text{H}/15\text{N}$ を中心に解析が進められてきたが、当該研究ではこれを 13C に置き換えた。結果として 13C は 1H よりも感度が低く、完全な結果を得るまでには至らなかったが、シミュレーションなども通して、何が問題で将来に向けて改善していけばよいかという指標を得ることができた。

研究成果の概要(英文):Analyses of proteins by nuclear magnetic resonance normally require assignment that determines the origins of signal peaks. However, the assignment becomes more difficult to achieve at higher pH conditions and for higher molecular weight proteins. In order to overcome this problem, the author tried shifting the pivot of sequential resonance assignment from the amide group $1\text{H}/15\text{N}$ to $1\text{H}/13\text{C}$. The results showed that even with the most advanced NMR equipment, the 13C -FID sensitivity was still low and a concentration as high as 1mM was required for analysis of high molecular weight proteins. However, 13C measurement is effective for samples with paramagnetic centers, such as metalloproteins, and intrinsically disordered proteins with no particular structure. Further progress is expected in the future with the development of pulse programs and hardware.

研究分野：核磁気共鳴

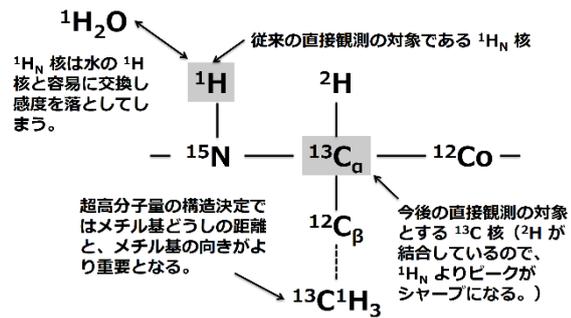
キーワード：核磁気共鳴 NMR 帰属 TROSY 13C 酵素

1. 研究開始当初の背景

蛋白質は生命現象を司る分子であり、その立体構造を決定することは生命現象を深く理解するのに必須である。現在、立体構造の決定には主に X 線結晶構造解析、クライオ電子顕微鏡、核磁気共鳴 (NMR) が利用されている。その中でも NMR は、蛋白質のダイナミクス、相互作用、活性などを解析できる点で優位性をもつ。

しかし、NMR によるほとんどの解析では事前に信号の帰属が必須であるが、その帰属は分子量が増加するごとに困難となる。その理由は一つには信号ピーク数が多くなりピークどうしのオーバーラップが増すこと、もうひとつは磁気 x/y スピンの横緩和速度が増加することである。これらは、選択的安定同位体標識、重水素化、TROSY 法などの先端技術の導入により顕著な進展が見られている。実はもうひとつ見逃されがちな理由があり、それは $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ アミド基を帰属のピボットとしている点である。アミド基は Pro を除く各アミノ酸の主鎖に 1 つずつ存在するため、各 $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ ピークを 1 アミノ酸に代表させることができ、また、 ^{15}N が孤立した核スピンであるため、 ^{15}N 同種核デカップリングを必要とせず、パルス系列を展開させやすい。さらに、きっちりとフォールドした蛋白質では $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ 化学シフトは比較的広い分布をもつ。さらに $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ スピン系は TROSY 効果をもつ。このような理由により、これまではアミド基 ^1H を磁化移動の最初と最後に設定し、 ^1H , ^{15}N , ^{13}C という化学シフトの組み合わせを情報の柱として帰属作業が進められてきた。

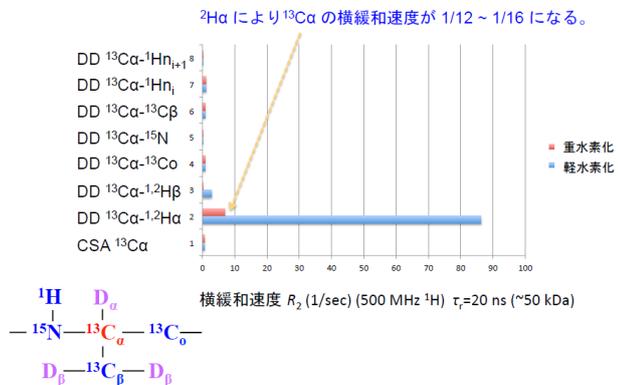
ところが、アミド基 ^1H の化学シフトは水素結合の強さに大きく依存することから、天然変性蛋白質などのフレキシブルな蛋白質ではピークのオーバーラップがむしろ酷くなってしまう。さらにアミド基水素 ^1H が溶媒水の ^1H と化学交換することから、アミド基の信号はその感度が pH に大きく依存してしまうという欠点をもつ。また、 $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ スピン系の TROSY 効果は、 ^1H , ^{15}N スピンの化学シフト異方性を含んでいるため、測定に利用する静磁場強度に依存してしまう。このような欠点を克服するための方法の一つとして、近年はメチル基が注目されている (図 1)。メチル基 $^{13}\text{C}-^1\text{H}_3$ は静磁場強度に依存しない TROSY 効果をもち、また固有的に横緩和が長いという長所をもつため、1 MDa レベルの蛋白質でも観測が可能となっている。しかし、メチル基は主鎖から距離が離れているため帰属が難しく、NOE をもとにした帰属ソフトも出現してはいるものの、現在のところ、メチル基をもつアミノ酸を一つずつ変異するという面倒な方法がおそらく確実であろうと見られている。上記のような状況により、現状では分子量が 50 kDa を超える大きな蛋白質において NMR のピークを効率よく帰属するには多大な労力と経費を必要とする。



2. 研究の目的

筆者は $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ アミド基と $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ メチル基の特徴の間をとって、 $^2\text{H}/^{13}\text{C}^\alpha$, $^{13}\text{C}^\circ$ に着目した。これらはアミド基と同じように各アミノ酸の主鎖に 1 つずつ存在し、これまでの 1 ピーク = 1 アミノ酸の概念を継承することができる。また、 $^{13}\text{C}^\circ$ はメチル基ほどではないが比較的緩和時間が長い (図 2)。むしろ低磁場の方が化学シフト異方性が小さいので、アミド基のように 900-1,200 MHz のような超高磁場を必要とはしない。そして、交換性 ^1H を擁しないため、溶媒水との交換に干渉されない。これは 10 に至るような高い pH 溶液、60°C のような高い温度でも観測が可能であることを意味する。また重水素デカップリングを適用することにより、 $^{13}\text{C}^\alpha$ の緩和時間は ^{15}N よりもむしろ長くなる。

重水素化により、特に ^{13}C , $^1\text{H}_\text{N}$ 核の横緩和時間が長くなる



そこで、筆者は $^2\text{H}/^{13}\text{C}^\alpha$, $^{13}\text{C}^\circ$ を帰属のピボットとする方法により、従来の $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ アミド基をもとにした帰属方法では困難であった蛋白質を解析し、NMR による蛋白質解析の条件幅を拡張することを目指した。

3. 研究の方法

培地の調製

主鎖 ^{13}C , ^{15}N 核の化学シフトの帰属に必要な蛋白質を調製した。大腸菌培養には M9 最少培地を用いた。これの溶媒として重水を用い、炭素源として $[^2\text{H}, ^{13}\text{C}]$ -glucose を、窒素源として $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ を添加した。以上の方法は従来の重水素化蛋白質の調製法と同じである。

蛋白質の発現

解析の対象として、好熱性 *Geobacillus stearothermophilus* 由来の glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (*Bs*GAPDH) を選んだ。これは 4 量体で 150 kDa の分子量をもつため、これまで NMR での構造解析例はない。ホスト大腸菌由来の GAPDH とリコンビナントの GAPDH を区別するため、後者には N 末端に His-tag をつけた。さらに安定性を高めるために還元型 Cys を Ser に置換し C149S/C153S 二重変異体、および、それぞれの 1 アミノ酸変異体を作成した。

同様の試料をヒト由来の hGAPDH でも調製した。好熱性バチルス菌由来の GAPDH とは異なり、ヒト由来 GAPDH は温度に対する安定性が低いため、高くても 37°C が限界である。こちら最終的には同様に His-tag を N 末端につけた。また、C152S/C156S (二重変異体、および、それぞれの 1 アミノ酸変異体) を調製した。

$^{13}\text{C}^\alpha$ - $\{^2\text{H}\}$ を基軸とした NMR 測定と主鎖の帰属

$^{13}\text{C}^\alpha$ を直接観測する形式の多次元実験法 (CANCA, COCA, CONCA, CBCA など) と $^{13}\text{C}^\circ$ を直接観測する形式の多次元実験法 (CBCACO, CONCO, CANCO など) を測定した。これらの実験はアミド基の $^1\text{H}^\text{N}$ を直接観測するこれまでのパルス系列とは異なり、 $^{13}\text{C}^\alpha$ あるいは $^{13}\text{C}^\circ$ を直接観測するパルス系列で構成されている。これらの実験スペクトルから主鎖の化学シフトを連鎖的に帰属する。

その他の工夫点

条件によっては、磁化エネルギーは $^1\text{H}^\text{N}$ からスタートした方がよいかもしれない (ただし、FID 直接観測は ^{13}C 核とする)。この二つの実験法は実際に比べてみて良い方を選ぶ。

4. 研究成果

試料調製

*Bs*GAPDH については、当初、ゲル濾過クロマトグラフィーで凝集体の位置に溶出したり、あるいは、2D ^1H - ^{15}N HSQC できれいなピークが観測されるという不可解な現象が生じた。これの原因究明に時間を要したが、最終的にはベクター由来の余計な 4 残基が C 末端に付加されていることが原因であることが分かった。そこで、これが無いように DNA を設計し直したところ、2D ^1H - ^{15}N HSQC のピークは 150 kDa という分子量から予想される通り消失した。次にこれを

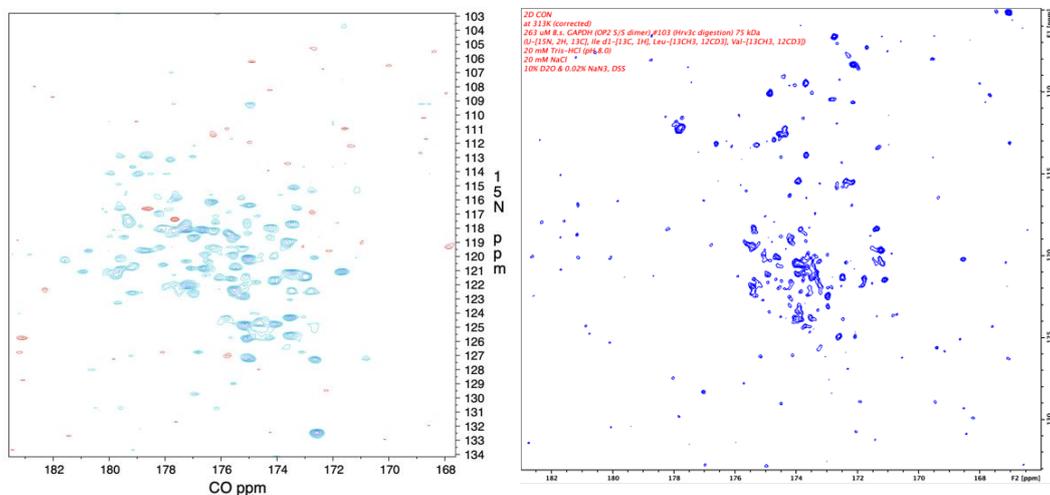


図3) $[^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}, ^2\text{H}]$ -GAPDH OP 二量体のスペクトル。(左) 3D HNCO-TROSY を二次元にプロジェクトしたスペクトル。(右) 2D CON IPAP スペクトル。

^2H , ^{15}N で標識することにより 2D ^1H - ^{15}N HSQC-TROSY および ^1H - ^{13}C methyl-TROSY (^2H , ^{12}C 均一標識 Ile, Leu, Val メチル基特異的 $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ ラセミ体標識) を観測することができた。ところが、数日のうちに impurity のプロテアーゼにより切断されるという予期しない事態が生じた。プロテアーゼ阻害剤カクテルやクロマトグラフィーの種類増加など種々の対策を講じたが非特異的切断を防ぐことができなかった。不純物プロテアーゼは His-tag の切断に用いる thrombin に含まれている可能性が考えられたため (他の試料でも同じロットの thrombin で同現象が生じた)、これを Hrv3c 切断用になるようにベクター-DNA を改変した。これにより最終的には切断されない *BsGAPDH* を得ることができた。また、論文で報告されている活性を保持することを確認した (Roitel, *et al.* 1999)。

次に Y46G/R52G 二重変異体 (さらに C149S/C153S) の重水素化 [^2H , ^{13}C , ^{15}N]-*BsGAPDH* 試料を作成した (Roitel, *et al.* 1999)。これは OP サブユニット二量体であり、分子量は 75 kDa となることを native-blue-PAGE とゲル濾過により確認した。まずはこれについて各種 ^{13}C 測定を行った。その一例を図 3 に示す。2D CON は各種 ^{13}C 測定の中ではもっとも感度の高い測定法である。図 3 右のようにピークは観えてはいるが、単量体でのアミノ酸数に相当する 330 個のピークは確認できない (2つのサブユニットは対称位置にあるため、2つのサブユニットのピークは重なる)。この三重標識体の OP 二量体を用いて 3D HNCO を測定したところ、8割程度のピークを確認できた (図 3 左にその ^{13}C 次元に沿ったプロジェクションを示す)。

この試料は (単量体を単位として) $263\ \mu\text{M}$ の濃度を有し、これは NMR 試料としては決して薄いわけではない。しかし、おそらく分子量が大きくなると、この程度の濃度で全てのピークを観測することは、現時点の最先端 NMR (800 MHz, cryogenic probe, TCI) でもってしても難しいことを示唆している。なお、測定法に誤りがないこと、および、感度が分子量にかなり依存することを別の reference 試料である キチナーゼを用いて確かめた (図 4, 5)

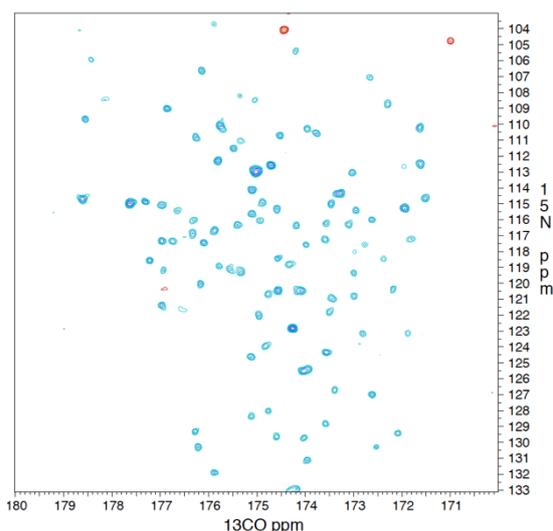


図 4) [^{13}C , ^{15}N]-キチナーゼ (105 a.a.) の二次元 ^{13}C - ^{15}N IPAP スペクトル (800MHz, cryoprobe, TXI at 303K)

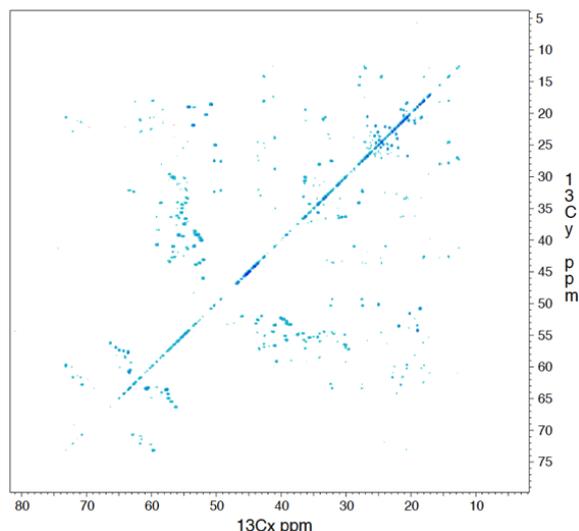


図 5) 2D ^{13}C - ^{13}C TOCSY (18ms-flopsy16) 0.12 mM [^{15}N , ^{13}C]-protein (132 a.a.) in H_2O (90%) 950MHz at 298K

今後の展望

結晶構造解析が Protein Data Bank の登録数の 9 割以上を占めることから、その優位性は揺るぎない。近年、クライオ電顕が顕著な伸びを示している。一方、NMR による構造解析は緩やかな進展に甘んじている。しかし、前者 2つの方法では、立体構造を解くという目的に重点が注がれているのに対して、NMR は構造以外にダイナミクス、活性、相互作用なども解析できるというメリットをもつ。そのため、単純な構造解析手法という観点に収束するのではなく、原子レベルの分解能をもつ分光計という観点に立つと、NMR はすでに結晶構造などが分かっている蛋白質に、さらなる機能面での構造生物学的情報を与える、いわば補完的なツールであることができる。

当研究を通して ^{13}C 測定について理解した点を下記に箇条的にまとめた。

¹³C-NMR が有利な点

- ¹H の磁気回転比 γ^H は大きいので、それに伴って ¹H の双極子相互作用による緩和速度も大きくなる。一方 γ^C は小さいので線幅が狭く、常磁性金属を配位した蛋白質などに適している。
- 四級炭素からも情報を取得可能である。
- 天然変性蛋白質のように構造をとっていないような蛋白質では、¹H の化学シフト値の散らばり具合は小さいが、¹³C ではそれほどでもない。
- 軽水溶媒であっても、水の信号を消す努力が不要である。さらに重水溶媒も可能である。したがって、水消しに伴うアーティファクが無い。
- ¹H^N は labile であるので、¹H-¹⁵N HSQC などでは、水の ¹H との交換が問題となる。例えば、高い pH や高い温度で水と速く交換する ¹H^N は感度が悪い。
- 化学交換や構造交換においても、¹H は幅広化が顕著な場合が多い。
- 高塩濃度による感度の低下率が ¹³C では小さい。
- 結合した水素が重水素化されているので、重水素デカップリングによって第二種スカラー緩和を抑えることができる。残る双極子相互作用による T_2 緩和は遅く、線形が先鋭化される。

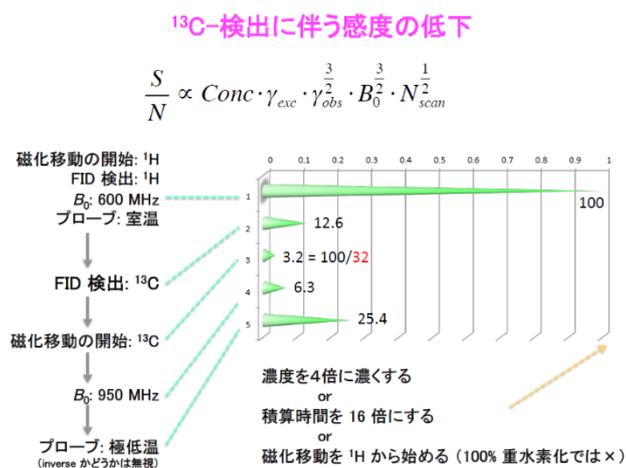


図6) ¹³C スピンを磁化移動におけるスタート、あるいは FID とした際の感度の低下率を示す。

¹³C-NMR が不利な点

- γ^C が小さいので感度が小さい (図6)。
- FID 検出の際に、 $^1J_{CC}$ を除く必要がある。選択的標識や [1-¹³C]-glucose あるいは [2-¹³C]-glucose を利用した標識により、かなり克服できるだろう。このグルコースは重水素化されていないが、重水溶媒の培地に入れて大腸菌を培養すれば、少なくとも ¹³C $^{\alpha}$ の位置は 95% の率で重水素化されることを確認した。なお、当実験では、in-phase と anti-phase のスペクトルをフーリエ変換する前に組み合わせることにより、仮想的に $^1J_{CC}$ をデカップルした。
- T_1 緩和が長いので interscan-delay を長く待つ必要がある。これは常磁性金属の添加によって克服できるだろう (Oktaviani, et al. 2015)。

以上より、¹³C を中心に据えた測定法は、感度の点で ¹H を利用した測定法にかなり劣る。現在のところの折衷案は磁化移動のスタートを少なくとも ¹H にすることである。しかし、その場合は重水素化ができない、あるいは、溶媒 ¹H との交換速度に依存してしまう labile な ¹H^N を使うこととなる。いずれの場合でもそれぞれの欠点があり、難しい問題である。なお、当測定では ¹³C プリアンプも冷却されたクライオプローブを用いたが inverse である。¹³C コイル内巻きプローブを利用することにより、感度が上昇すると考えられる。

参考文献

Roitel, O., Sergienko, E., and Branlant, G. (1999) Dimers generated from tetrameric phosphorylating glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Bacillus stearothermophilus* are inactive but exhibit cooperativity in NAD binding. *Biochemistry* 38, 16084–16091.

Oktaviani, N.A., Risør, M.W., Lee, Y.H., Megens, R.P., de Jong, D.H., Otten, R., Scheek, R.M., Enghild, J.J., Nielsen, N.C., Ikegami, T., and Mulder, F.A. (2015) Optimized co-solute paramagnetic relaxation enhancement for the rapid NMR analysis of a highly fibrillogenic peptide. *J. Biomol. NMR* 62, 129–142.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Konuma, T., Nagadoi, A., Kurita, J., and Ikegami, T.	4. 巻 4
2. 論文標題 Analysis of artifacts caused by pulse imperfections in CPMG pulse trains in NMR relaxation dispersion experiments.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Magnetochemistry	6. 最初と最後の頁 33
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/magnetochemistry4030033	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Mosebach, L., Heilmann, C., Mutoh, R., Gaebelien, P., Steinbeck, J., Happe, T., Ikegami, T., Hanke, G., Kurisu, G., Hippler, M.	4. 巻 134
2. 論文標題 Association of ferredoxin:NADP+ oxidoreductase with the photosynthetic apparatus modulates electron transfer in Chlamydomonas reinhardtii.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Photosynth. Res.	6. 最初と最後の頁 291-306
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s11120-017-0408-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 池上貴久
2. 発表標題 Analysis of Artifacts Derived from Pulse Imperfections in CPMG Pulse Trains
3. 学会等名 The XXVIIth International Conference on Magnetic Resonance in Biological Systems (国際学会)
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考