

令和 2 年 6 月 8 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H03089

研究課題名(和文) 膜蛋白質高次構造解析のための光励起常磁性タグを利用する新規固体NMR法の開発

研究課題名(英文) New methods for protein structural analysis using light-excitable transiently paramagnetic species

研究代表者

松木 陽 (Matsuki, Yoh)

大阪大学・蛋白質研究所・准教授

研究者番号：70551498

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 11,800,000円

研究成果の概要(和文)：固体核磁気共鳴(固体NMR)法について近年、不対電子を安定に保持する常磁性化合物を試料に混入し、核スピンの緩和を意図的に増進することで感度向上や長核間距離測定につなげる技術が発展したが、信号取り込み期にも常磁性が残ることから、いくつか重大な問題も抱えていた。本課題では過渡的常磁性分子の磁性を励起光のオンオフで高速にスイッチする新しいアプローチを開拓し、これらの問題が解決可能であることを示した。これは膜蛋白質を含め広い応用を拓く基盤技術となる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本課題では励起光のオン/オフによってRFパルス列実行中とFID取り込み中で、試料に混入した分子の磁性を高速に切り換え利用する実験法を開発し、複数の機能性化合物(色素)を見出した。これは従来法の主要な欠点を克服する最初の例であり、分解能低下の心配なく感度を増強でき、また修飾残基の根元を含めた短距離から長距離情報までの核間距離情報を残さず取得できる手法の基盤となる。試料調製の面での要求も軽減するので、発現困難な試料、複合体試料の構造研究の新発展を推進する潜在能力がある、重要な基盤技術である。

研究成果の概要(英文)：Magic-angle spinning solid-state NMR methods has recently witnessed a maturation of methodologies utilizing paramagnetic dopants for accelerating signal averaging and long-range internuclear distance measurements. These original methods had however some own limitations coming from the paramagnetism that remains during the signal acquisition period, resulting in line broadening or signal loss. In this study, light-excitable transiently paramagnetic species were explored to make a functional dopants and protein-tag whose magnetism is switchable by making on/off the excitation light. This is shown here to resolve the conventional methodological limitations, which will become a basis for new and more efficient tools for structural study of proteins.

研究分野：固体核磁気共鳴分光

キーワード：過渡的常磁性タグ 固体NMR

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

生体系固体核磁気共鳴(固体 NMR)法は、膜蛋白質やアミロイド線維など医学-生理学的な重要性に反して構造研究が大きく遅れている、いわゆる「難関試料」の解析を牽引できる手法である。特に近年、不對電子を安定に保持する常磁性化合物を試料に混入し、核スピンの緩和を意図的に増進することで固体 NMR の(i) 高感度化や(ii) 長い核間距離測定につながる技術が大きく発展した。固体 NMR の信号積算ではラジオ波(RF)パルス列の照射と信号取り込み(計~20ms)の後、スピンの縦緩和で熱平衡に戻るまでの時間が長く(~3s)、装置占有時間の実に 99%以上を待ち時間に費やしている事から、(i)の縦緩和増進による高速積算の重要性が際立つ。一方、横緩和増進による核間距離測定は不對電子による強い常磁性緩和の効果は遠くの核にまで及ぶ事から、従来(<5Å)よりも長い核間距離(>20Å)の情報を取得できる利点があり、蛋白質複合体中の構成蛋白質の相対配置(4次構造)決定や、丸くフォールドしない蛋白質の3次構造決定に大きな力を発揮した。

一方でこれらの現行法には問題もある。(i)では、常磁性試薬と目的の蛋白質に予測困難な非特異的な相互作用があると、意図しない横緩和増進から表面残基の信号を軒並み広幅化させ、解析不能にする。現況では常磁性分子が結晶内部にまでは入り込めないことを利用してこの効果を最小限に抑える、蛋白質微結晶試料への応用が見られるが、固体 NMR の本丸である膜蛋白質への公汎な応用が難しい。(ii)では、修飾残基とその周辺 10Å 程度以内にある核の全信号が強い横緩和増進でスペクトルから消失する問題がある。修飾残基から遠い核への長距離情報をとれる反面、中距離、短距離の情報をほぼ失う事になり、試料あたりに取得できる情報量は激減する。これに伴い、修飾位置を変えた試料を多数調製する必要が出るし、それぞれに反磁性類似化合物で修飾した照査試料が必要な事もあり、大量調整が難しい膜複合体試料などへの応用を阻んできた。

### 2. 研究の目的

常磁性試薬の混入が分解能の低下を招いたり、修飾残基周辺の信号を消したりするのは、NMR 信号(FID)の取り込み中に試料内に常磁性種が存在するからである。これらの問題を逃れるには、パルススキームの実行中必要な間はずっと常磁性なのに、FID 取り込み中の 10ms ほどだけは反磁性にスイッチできる、そんな化合物があれば良い。

本研究の目的は、光のオン/オフによって RF パルス列実行中、FID 取り込み中で、試料に混入した分子の磁性を高速に切り換え利用する実験法の開発、および機能性化合物(色素)の探索である。(i)で、測定の際繰り返しディレイ中は常磁性、FID 取り込み中に反磁性にスイッチできるなら、目的蛋白質との非特異的な相互作用や信号のブロードニングを気にせず、測定の際繰り返しだけを高速化できる。また、(ii)では修飾残基の近隣を含めた短距離から長距離情報までの核間距離情報を残さず取得できることになる。さらに常時光を切った実験を行えば、同一試料がそのまま反磁性照査試料になるので、試料調製の面での要求が軽減され、発現困難な試料、複合体試料への応用に最適な技術基盤となるだろう。

### 3. 研究の方法

(i)については効率の高い試料管周りの光照射セットアップの最適化、100 K MAS の長期安定化に向けた装置作りから始め、PRE の効果をより効率的にバルクな試料に拡散させられる堅い有機マトリクスの開発に進んだ。ついで増感剤色素分子の広範囲探索を進めた。色素の検討では、吸収係数の高さ、吸収波長において手に入る光源の出力、高い水溶性、低い退色性を指標とした。耐光性テストには uv-vis 分光器に 460nm LED の光ファイバーを導入して、耐光時間の測定、添加物の影響、脱酸素の影響もテストした。NMR 測定で色素は溶質とともに有機マトリクスに固定し、0.3mm 壁厚のジルコニアロータに封入した。有機マトリクスの開発では、約 20 種の糖、糖アルコールと水の二元系マトリクスについてガラス転移温度の計測、電子スピン緩和測定、核スピン緩和測定から分子運動性の抑制具合、マトリクスの微視的な硬さを指標に選定した。100K におけるマジック角試料回転(MAS)は

温度制御ガスを液体窒素に熱交換して得た。 $T_{1H}$ 測定は標準的な飽和回復法で、回復時間に 460nm 光、あるいは白色光を照射した。TTL 信号はパルスプログラムから制御し、分光計から得た生信号をシグナル生成器で加工し、LED 制御用、あるいはゼノンランプシャッター制御用電圧とした。

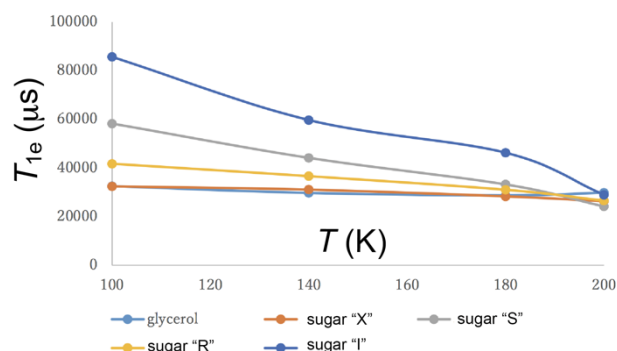


図1 糖マトリクス中の電子スピン縦緩和時間、温度依存性 (W-band)。

(ii)については、フラビン誘導体に MTS 基、マレイミド基などを結合させ、光感受性タグを合成した。これを標準的な小型球状タンパク質に結合させ、(i)で用いたのと同じ

光照射系統を持つ固体 NMR プローブにて、PRE 測定を行った。

#### 4. 研究成果

##### (0) 装置改良

緩和時間測定は長時間にわたり安定な測定条件が維持できることがデータの信頼性に必要で、100 K-MAS の長期安定化が最初の課題であった。試料の温度は温度制御用ガス流を試料管中心に当てて実現した。このガス流は一般的な膜フィルターを多段に用いて得た乾燥窒素ガスであるが、1%程度の酸素を含むように調整した。酸素は液体窒素との熱交換時に液化し、プローブ入力までの伝送経路で揮発して安定に熱を奪う。これにより純粋な低温窒素流よりもより低温の試料温度を経時的に達成した。試料回転推進用のガス流は、PSA 方式によって露点-100°C程度まで乾燥した高純度 99.9%窒素ガス流を採用し、試料管周りの霜の生成を極力抑えることで長期間の試料回転でも安定性を失わない測定を実現した。試料管には従来のサファイアでなく壁薄のジルコニアロータを採用した。試料管の破損確率を下げ、低い熱伝導から回転用ガスの温度に試料温度が左右されにくい利点を利用した。これらのセットアップで、4mm 試料管で試料温度 100K、10kHz MAS を安定に実現できた。

##### (i) 増感法

糖・糖アルコールマトリクスの検討では、2017年に学会報告したキシリトールマトリクスの性能を上回るマトリクスを新たに見出した。微視的なマトリクス硬さを電子と核スピン緩和測定から推定し、いずれも良い相関で糖マトリクス”I”の優位性を見出した(図1、図2)。これは本課題において PRE 効果のバルク試料への高い拡散性能を示す。さらに同様の能力は動的核分極(DNP)による感度固体 NMR 測定でも偏極の拡散から総合的な DNP 効率の向上に重要である。本課題に関係しない予備測定によれば、特に高温条件での感度利得を増強する効果が見いだされ、高い有用性が認められた(投稿準備中)。

色素についてはピレン系、アセン系、ポルフィリン系合計10種を検討、主に水溶性と吸収波長の光源の入手可能性と価格を検討し、フラビンモノヌクレオチドとその誘導体、フロレセインとその誘導体その他に絞った。耐光性を増加する目的で脱酸素酵素も複数検討するも効果は見出せなかった。アジ化ナトリウムの添加は照射時間 300s に於ける耐光性を 10%程度向上する効果が認められた(図3)。

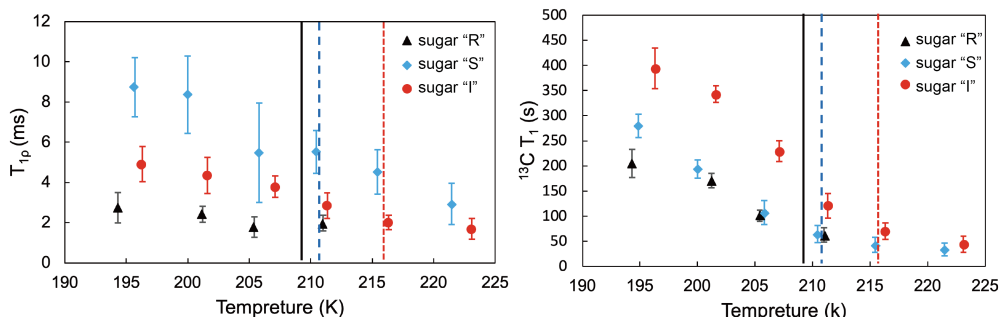


図2 糖マトリクス中のプローブ分子の核スピン緩和時間、温度依存性。回転系での縦緩和(左)と実験室系縦緩和時間(右)。

過渡的常磁性による縦緩和増進( $T_1$  PRE)効果は  $1\text{H}$  の飽和回復法で測定し、回復期に選択的に光照射した。最良の色素候補フラビン誘導体 F の利用で、 $T_1$  PRE は最大で7倍増進され、高速の繰り返し積算が可能となった。期待通り増感剤色素存在下でもスペクトル分解能は維持され、確かに信号取り込み中、分子は反磁性であることが示された。これにより分子の常磁性を励起光のオンオフで高速スイッチできることを確かめた(図4)。

##### (ii) 距離情報

色素タグの合成は、吸光係数も高く、吸収波長(460nm)での光源も入手が容易なりボフラビンを出発点にした。まずは吸収スペクトルの変化を最小にするべく、リビチル鎖に対して、アップル反応でアルキルハライド、スルホ

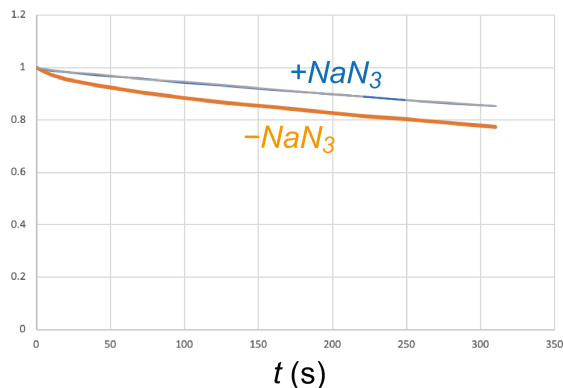


図3 460nm 光照射時間と吸収強度の減衰。

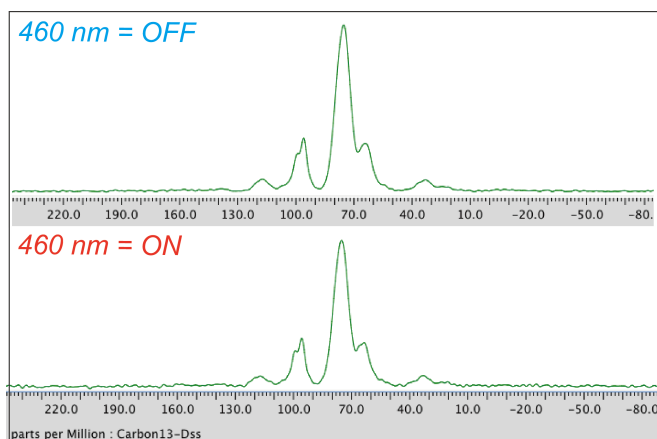


図4 糖マトリクス中のプローブ分子の $(H)\text{-}^{13}\text{C}$ -交差緩和スペクトル。  $T = 100\text{ K}$ 。

マレイミド酸塩とのアミド結合形成で、加水分解に安定なマレイミド化フラビンの合成を試みた。しかし最終アミド化反応は複数の溶媒、塩基の分量で試行したものの反応が進まないか、進行中に原料とともに分解し、目的物を得なかった。

最後に、イソアロキサジン環 3 位を直接カルボキシル化しマレイミドを縮合する案を実行し、目的物を得ることに成功した。吸収スペクトルはタグ化前とほぼ変化無しであることを確認した。この新規タグは水溶性が高く、加水分解に強いアミド結合を持つ。またリンカーは当初の計画より 1 炭素減炭しており、構造の分布が抑えられた優れたタグとなった。得たタグはシステイン変異・標的蛋白質 T53C-GB1 に結合、精製した。ここから固体 NMR 測定用の微結晶試料を作成した。 $^{13}\text{C}$  反転回復法で部位特異的な緩和促進(PRE) が確認できるかテストした。

図5はフラビンタグ化 GB1 微結晶試料の反転期(反転時間=1s)における固体  $^{13}\text{C}$  NMR スペクトルである。GB1 が持つ  $\beta$  シートで、タグ化された Cys53 側鎖と同一平面で近傍にある側鎖信号位置をスペクトル上部に示してある。期待通り光照射下では励起過渡的常磁性種周辺の部位特異的な緩和促進が示唆された。これは二次元展開測定により残基の特定をすることはできる。

本課題では過渡的常磁性分子と励起光のオンオフで分子の磁性を高速にスイッチし、分解能を落とさず高速積算が可能にできること、過渡的常磁性分子を蛋白質タグ化し、部位特異的な緩和促進が観測可能であることを示した。距離測定法、増感法共にこれまでに報告のない過渡的常磁性種の特性を生かした新しい試みとなり、膜蛋白質を含め広い応用を拓く基盤技術を整備した。

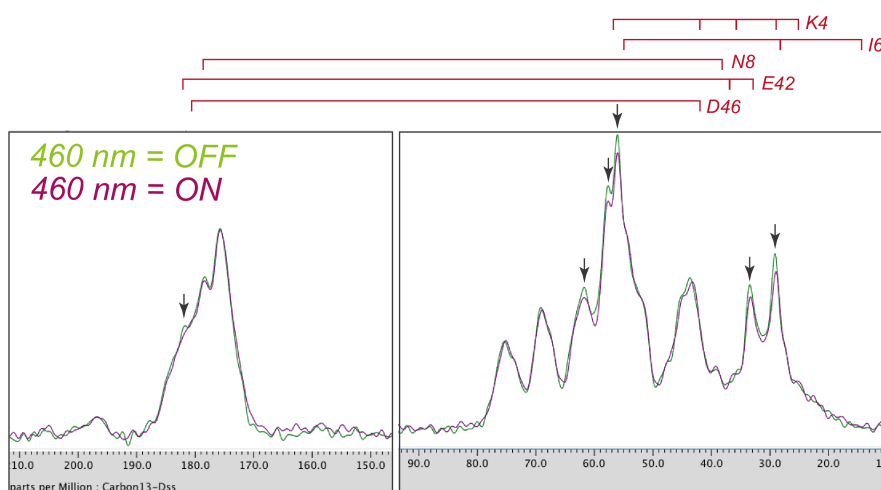


図5 フラビンタグ-GB1 微結晶試料の  $^{13}\text{C}$  反転回復縦緩和時間測定。  $T = 110\text{ K}$ ,  $\nu_R = 10\text{ kHz}$ 。反転回復緩和測定(delay=1s)のスペクトルで、位相を上下反転したもの。光照射化で、矢印の部分でのみ緩和の増進が見られる。

ンチオエーテルのカップリングでフラビン MTS タグを合成、T53C-GB1 へのタグ化を実行した。しかしながらタグ化反応中の加水分解が激しく、定量的な結合に失敗した。これはイソアロキサジン環のラジカル発生位置から硫黄原子にかけて六員環が形成しうることから、フラビンが光照射によってラジカル的にタグの C-S 結合を開裂していると考えられた。次に、リビチル鎖の酸化開裂による減炭とアセタール化を経て、また末端の酸化でカルボキシル化フラビンを得、さらにこれに DMT-MM による活性化を利用した N メチル



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 8件 / うち国際学会 7件）

1. 発表者名 Yoh Matsuki
2. 発表標題 Sensitivity-enhanced NMR using closed cycle He MAS system and Dual gyrotron system
3. 学会等名 MigMag Meeting at University of California Santa Barbara (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yoh Matsuki
2. 発表標題 Sensitivity-enhanced NMR spectroscopy at 16.4 T
3. 学会等名 3rd International Conference on spin chemistry and spin physics (Novosibirsk, Russia) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yoh Matsuki
2. 発表標題 Sensitivity-enhanced NMR spectroscopy at 16.4 T and 30K
3. 学会等名 3rd Joint Conference of the Asia-pacific EPR society and international EPR society (Brisbane, Australia) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yoh Matsuki
2. 発表標題 Future of Solid-state DNP NMR
3. 学会等名 IAS Seminar (OIST, Okinawa) (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yoh Matsuki
2. 発表標題 Advanced Instrumentation for Sensitivity-enhanced Solid-State NMR and Biological Applications
3. 学会等名 10th International Workshop on Strong Microwaves and Terahertz Waves (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Yoh Matsuki
2. 発表標題 Advanced Instrumentation for DNP-enhanced Solid-State NMR at 16.4T and 30 K
3. 学会等名 AWEST, International Workshop on Electron Spin Science and Technology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Yoh Matsuki
2. 発表標題 Advanced Instrumentation for DNP-enhanced Solid-State NMR
3. 学会等名 The 6th International Workshop on Far-Infrared Technologies (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 Yoh Matsuki and Toshimichi Fujiwara	4. 発行年 2018年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 636
3. 書名 Experimental Approaches of NMR Spectroscopy	

1. 著者名 Yoh Matsuki and Toshimichi Fujiwara	4. 発行年 2019年
2. 出版社 Wiley	5. 総ページ数 472
3. 書名 Handbook of High field Dynamic Nuclear Polarization	

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----