

令和 6 年 9 月 9 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20H03193

研究課題名（和文）極低温超偏極固体NMRによる蛋白質の動的機能構造解析法の開発とGPCRへの応用

研究課題名（英文）DNP-Solid-State NMR Method Development for Proteins Dynamic Structure Analysis, Application to GPCR

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） 11,600,000円

研究成果の概要（和文）：蛋白質の動作機構の理解には、揺らぎをもつ構造とその分布の理解が必須だ。本研究ではDNP-固体NMR法と計算機科学的解析法を組み合わせ、膜蛋白質の構造分布を解析できる新しい方法を開発することを目的とした。

計画は(i) 試料調製, (ii) 高感度DNP-NMR法の発展, (iii) 計算機科学的方法論の開拓, (iv) 膜蛋白質への応用で、2022年度までの3年で(i)-(iii)を実行、試料を確立し、DNP法を最適化、計算科学的方法論のモデル系への応用と論文発表を終えた。2023年度からはGPCRへの応用に際し、細胞内夾雑環境も取り入れた構造解析を含む計画に再構築し、新計画として始動する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

機能性蛋白質の動作機構のより深い理解には、揺らぎをもつ構造とその分布の理解が必須である。従来の溶液NMR法、結晶回折法などの解析法はそれぞれ溶液中の運動平均構造、結晶格子中での最安定構造を決める手法であり、動的平衡にある構造群全体の解析は難しかった。本研究で開発した方法は、動的核偏極(DNP)による超高感度固体NMRスペクトルの計算科学的な解析から、蛋白質の動的平衡構造を明示的に解析する新手法で、これまで解析が難しかった構造アンサンブルと蛋白質機能の解明を可能にする基盤技術である。

研究成果の概要（英文）：Understanding dynamical structure distribution is essential for understanding the mechanism of protein function. The aim of this study was to develop a new method to analyze the structural distribution of membrane proteins by combining DNP-solid-state NMR and computational methods.

The plan was (i) sample preparation, (ii) development of a highly sensitive DNP-NMR methods, (iii) development of computational methodology, and (iv) application to membrane proteins, and in the three years through FY2022, (i)-(iii) were performed, samples were established, the DNP method was optimized, then the computational methodology was applied to model systems, which was published. From FY2023, we will restructure the project to a new plan including structural analysis of intracellular crowding environment in application to GPCR, and start as a new plan.

研究分野：構造生物学

キーワード：DNP-固体NMR 膜タンパク質

### 1. 研究開始当初の背景

従来の構造生物学は蛋白質の静的な立体構造の解明をまず目標に掲げたが、多くの機能性蛋白質は分子の運動性や動的構造平衡を作動機序の重要な基盤とするのであって、動作機構のより深い理解には、揺らぎをもつ構造とその分布の理解が必須である。したがって、構造生物学は、動的平衡にあるソフトな分子集合の構造分布にその描写を広げ、さらに発展することを求められている。X線自由電子レーザーと微小結晶を用いる蛋白質構造変化のタイムラプス解析は大きな注目を集めるが結晶試料にしか適用できず、動的平衡にある構造群の解析もできない。これらとは相補的な方法論が必要だ。

### 2. 研究の目的

本研究では動的核スピン偏極(DNP)-固体NMR法と計算機科学的な解析法を組み合わせ、結晶にも溶液にもならない系、特に膜環境にある膜蛋白質の動的平衡にある構造群の分布とその変化を解析できる新しい方法を開発する。蛋白質構造の分布をそのままに瞬間凍結した上で、極低温(30-100 K)条件・DNPによる超高感度固体NMR測定を行い、得たスペクトルを計算科学的に解析、動的平衡にある構造群の特徴を明示的に解析する新手法を開発する。非結晶性試料について、構造アンサンブルの知見は従来法で得られず、独自性が高い。

### 3. 研究の方法

全体計画は以下とする。

- (i) 試料調製・極低温試料マウント技術の確立：膜蛋白質GPCRの無細胞調製プロトコルの確立、NMR相関信号の分離を最大化する同位体標識法の確立、試料の瞬間凍結法とNMRプローブへのマウント技術の開発
- (ii) 高感度DNP-NMR法の発展的展開：感度利得を最大化する手法の開発、超高次元スペクトル分解法の開発
- (iii) 計算機科学的方法論の開拓：MD計算と高次元NMRスペクトル解析を同期させる、新しい構造情報抽出法の開発、モデル蛋白質(液液相分離 シヌクレインなど)試料に応用
- (iv) GPCRのバイアス形成の動的構造基盤の解明に応用：無細胞発現系を用いたGPCRの発現と膜への再構成法の確立、複数の異なる作動薬でGPCR構造の動的平衡分布の差を明らかにし、バイアス形成の構造基盤にせまる

### 4. 研究成果

- (i) 試料の確立：

標的蛋白質のGPCR (  $\beta$ 2アドレナリン受容体 ) について、無細胞系発現・精製・調製法を確

立した。テンプレートDNPの最適設計、FLAGタグの導入、反応時間最適化、コレステロール添加などを試み、ゲルアッセイ、ウェスタンブロットングで同定、定量を行った(図1a)。DOPC-コレステロール膜リポソームへの再構成、ラジオリガンドアッセイによるリ

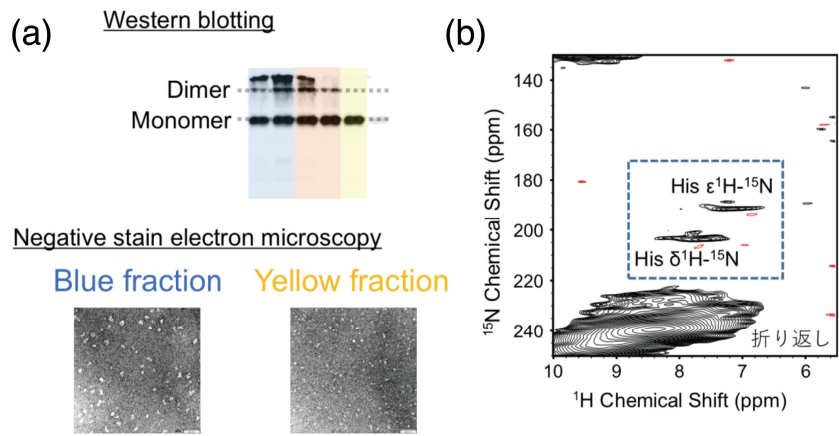


図1 (a)目的 GPCR の発現をウエスタンブロットングで、再構成後の単分散性を TEM で確認した。(b)固体 NMR スペクトルで試料の均一性を確認した。側鎖 His 信号がシャープに検出されている。

ガンド結合活性も確認した。固体NMR試料管へのパッキングを向上するのに、脂質量の最適化が必要であった。リガンドの結合に伴う構造変化を最も反映するヒンジ部位への選択的同位体標識スキームも設計した。蛋白質試料の均一性は二次元 $^1\text{H}$ 観測 $^{15}\text{N}$  NMRスペクトルで検証した(図1b)。並行してセレノメチオニン選択標識法も確立し、プロトン観測二次元 $^{77}\text{Se}$ -NMR信号の解析から、側鎖の構造アンサンブルに迫るアプローチも実行、学会発表した。

(ii) DNP法の発展:

DNPによる高感度に基づいて、目的信号を高次元スペクトル展開する新規ラジオ波パルス列を作成した。構造分布の残基をまたいだ相関情報を取得する目的で、残基間主鎖信号相関パルスを作成、モデルペプチド試料で検証した。より高い感度の測定をめざして、条件の更なる低温化にも挑戦した。ヘリウム用ベローズポンプの追加増強工事に加え、真空断熱度の向上などで20 Kでの安定DNP測定を実現した。これに加えて、極低温検出器を新たに導入したプローブを作成し、定量的な性能試験を行った結果、従来固体NMR法と比べ、純粋に熱雑音の低減から5倍程度の感度利得があると分かり、論文で発表した(図2a)。DNP感度向上に加え、検出系の熱雑音抑制の効果から、総合感度利得は従来法の4000倍を超えることを示した。

スピン超偏極にもとづくDNP測定では、装置の長期超安定性が従来以上に求められることが判明し、装置と測定室の温度安定性の向上に注力した。高次元・残基間相関用のラジオ波パルス列も完成し、観測信号の質向上を目指した最

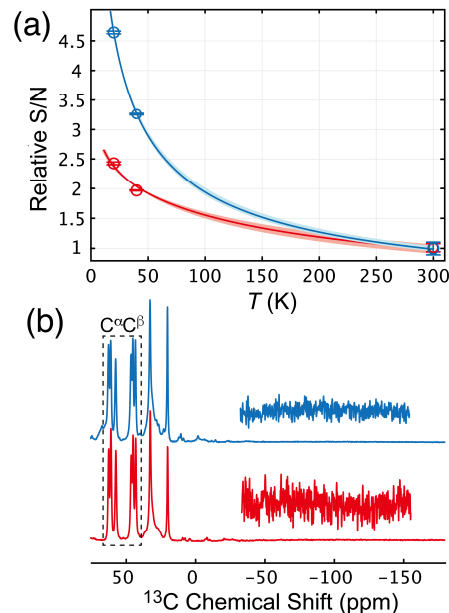


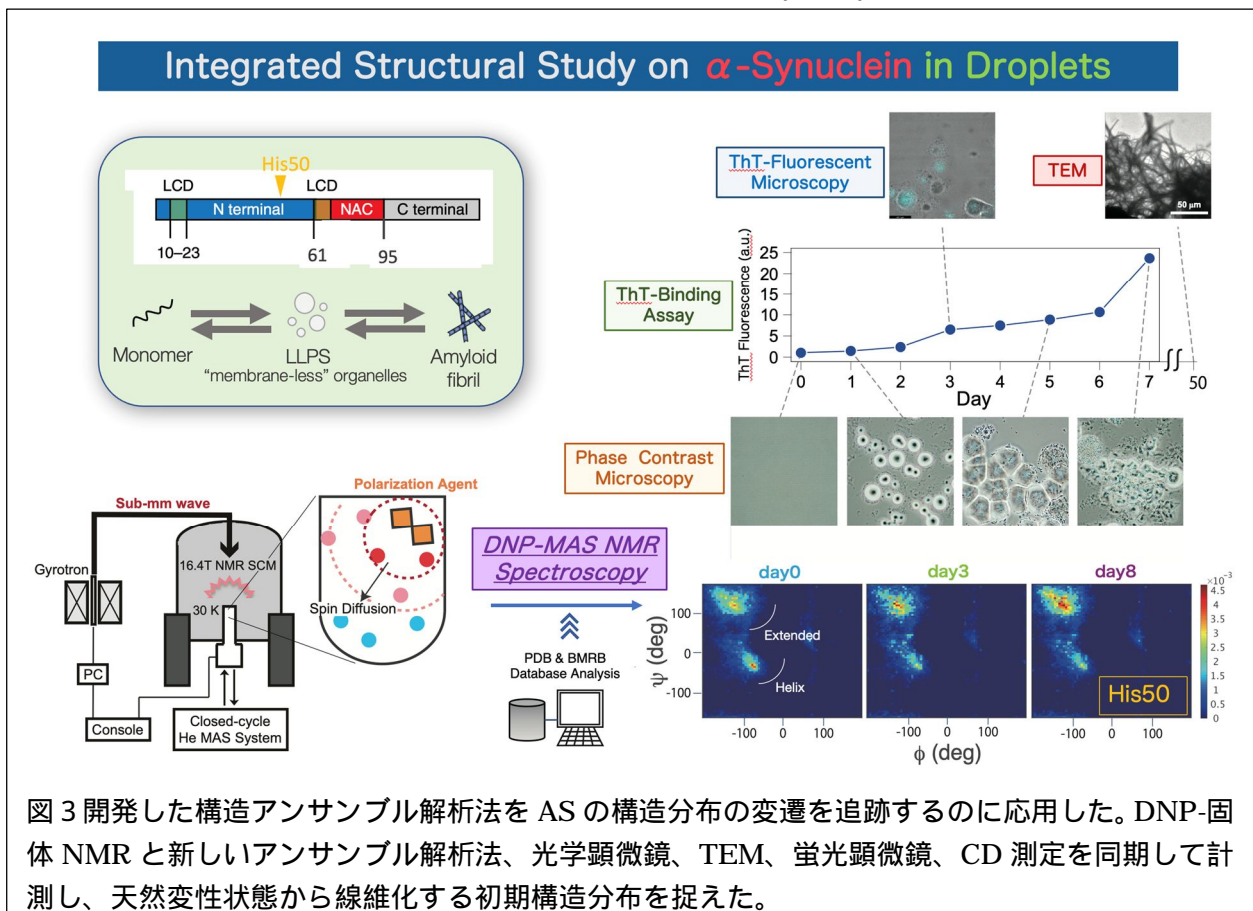
図2 (a)極低温検出器の有(青)無(赤)で実測した相対的信号雑音比の温度依存性。(b)30 K で比較したトリペプチドMLFの $^{13}\text{C}$  NMR スペクトル。極低温検出器あり(青)で、SN比は極低温同士の比較でも2倍以上向上している。

適化を行った。装置の長期・超・安定性を得るために、微小な磁場不均一性を補正するシム電源の改良も行った。この結果、解析に耐える質の高い相関スペクトルの取得に成功した。DNP測定用のパルスシーケンスの作成、最適化、装置の長期安定性の向上などで、今後のより低感度測定においてもノイズを低減して、有用な情報を得られるよう基盤を作った。

(iii) 解析法の開拓と応用：

高次元NMRスペクトル線形の解析から、構造アンサンブルの情報を抽出する新しい解析法の開発も行った。蛋白質構造と化学シフトデータベースの相関をもとに、ベイズ推論を基盤とした手法でスペクトル解析し、構造アンサンブルの情報を抽出する方法である。分布した構造アンサンブルの検出と構造の特徴づけをGPCRで行う前に、計画にしたがい、開発した新解析法を比較的単純なモデル系の解析に供した。モデルには脳神経疾患関連の天然変性蛋白質（IDP）である シヌクレイン（AS）をとった。ASのアミロイド線維が病態と深く関係することは知られるが、線維の発生機構は未だ不詳である。そこでASが液液相分離(LLPS)状態からアミロイド線維へ転換する経路を仮定し、ASの構造アンサンブルの変遷を経時的に追跡することを目的とした。

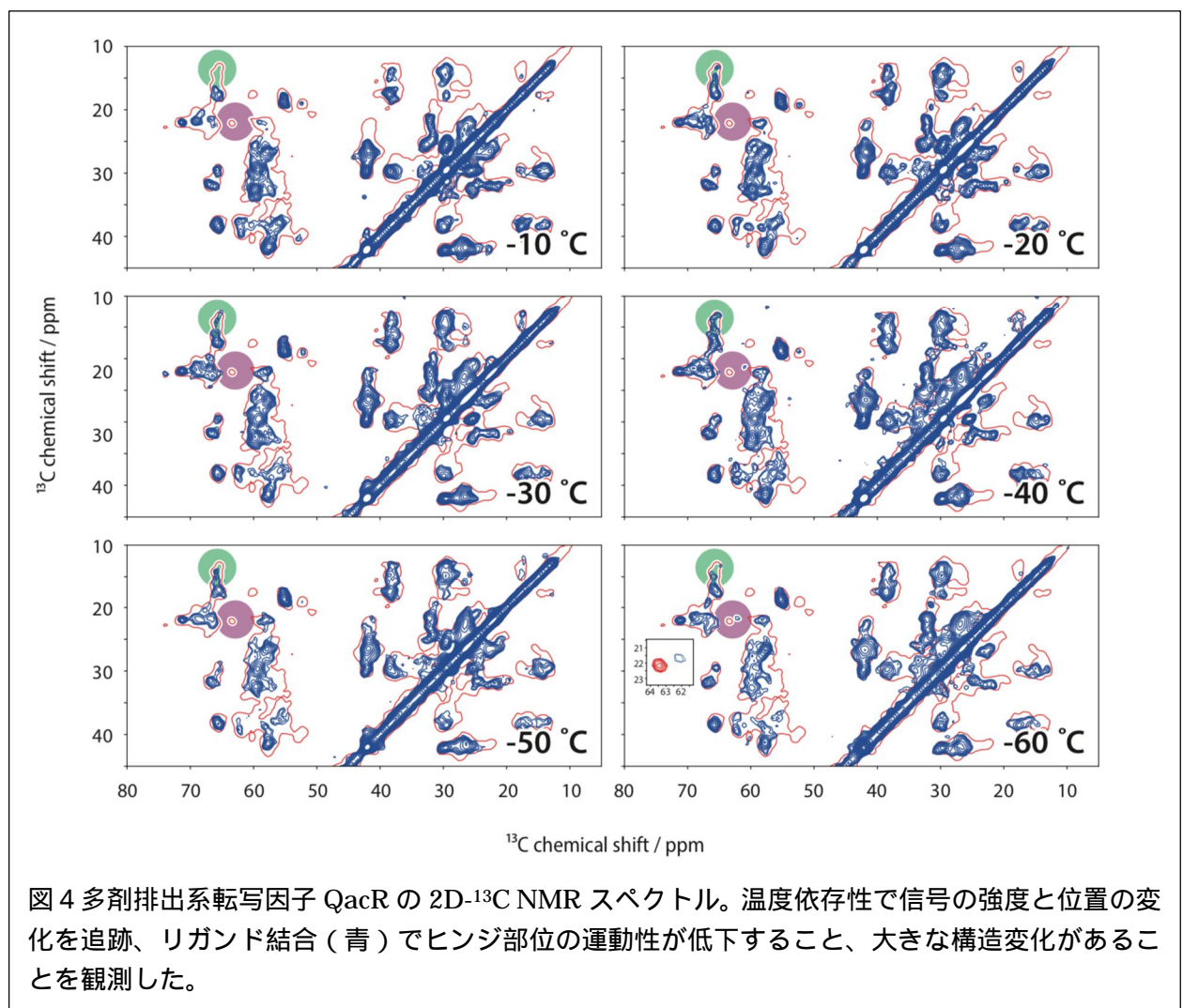
信号分離を最適化する標識法の検討を行った結果、アミロイド原生NAC領域直近に存在する His-53を選定し、His選択的に<sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N完全同位体標識のASの発現・精製系を構築した。また構造分布を保ったまま固体NMR試料管に移送するプロトコルも作成した。LLPSによるドロップレット形成過程を実体顕微鏡、蛍光顕微鏡、CDスペクトル、ThTアッセイで追跡し、ランダムコイル状態から、ベータ性の向上する様子をドロップレット形状の変遷とともに捉えた。ASアミロイド線維がドロップレット内から発生していることも蛍光顕微鏡観察で証明した。成果は複数の学会発表、また論文として公表した（図3）。





GPCR以外の分子系で、やはり構造アンサンブルの動的平衡が機能発現に關与するモデル系として多剤排出系転写因子QacRの発現、精製も行った。QacRの微結晶状試料について、 $^{13}\text{C}$ 相關スペクトルの解析から動的平衡の存在が側鎖信号に捉えられることを見出し、学会発表した(図4)。

以上のように2020年度-2022年度の3年で、モデル系、標的GPCR蛋白質試料ともに試料調製法を確立した。また、DNP-固体NMR測定法、解析法、いずれについても計画に沿って順調に発展させ、膜蛋白質の二重膜中、構造アンサンブル解析の基盤を作った。2023年度からはGPCRへの応用に際し、細胞内夾雑環境も取り入れた構造解析を含む、新しい試料作製を含む計画に再構築し、新計画(基盤B)として始動する。



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Mika Takamuku, Tomoaki Sugishita, Hajime Tamaki, Lingyingzi Dong, Masatomo So, Toshimichi Fujiwara, Yoh Matsuki	4. 巻 157
2. 論文標題 Evolution of $\alpha$ -synuclein conformation ensemble toward amyloid fibril via liquid-liquid phase separation (LLPS) as investigated by dynamic nuclear polarization-enhanced solid-state MAS NMR	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Neurochemistry International	6. 最初と最後の頁 105345
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neuint.2022.105345	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yoh Matsuki, Takeshi Kobayashi, Jun Fukazawa, Frederic A. Perras, Marek Pruski and Toshimichi Fujiwara	4. 巻 23
2. 論文標題 Efficiency analysis of helium-cooled MAS DNP: case studies of surface-modified nanoparticles and homogeneous small-molecule solutions	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Phys. Chem. Chem. Phys.	6. 最初と最後の頁 4919-4926
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/d0cp05658h	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Matsuki Yoh, Nakamura Shinji, Hobo Fumio, Endo Yuki, Takahashi Hiroki, Suematsu Hiroto, Fujiwara Toshimichi	4. 巻 335
2. 論文標題 Cryogenic signal amplification combined with helium-temperature MAS DNP toward ultimate NMR sensitivity at high field conditions	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Magnetic Resonance	6. 最初と最後の頁 107139 ~ 107139
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jmr.2021.107139	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yoh Matsuki, Tomoaki Sugishita, and Toshimichi Fujiwara	4. 巻 124
2. 論文標題 Surface-Only Spectroscopy for Diffusion-Limited Systems Using Ultra-Low-Temperature DNP MAS NMR at 16.4 T	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Physical Chemistry C	6. 最初と最後の頁 18609-18614
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jpcc.0c04873	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計16件（うち招待講演 8件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 松木 陽
2. 発表標題 高磁場・極低温DNP - MAS-NMRの装置と方法論
3. 学会等名 大阪大学蛋白質研究所セミナー（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 松木 陽
2. 発表標題 細胞内構造生命科学にむけたDNP-MAS-NMRの装置・方法論開発と応用
3. 学会等名 第61回NMR討論会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 加藤賢，田巻初，杉下友晃，藤原敏道，松木陽
2. 発表標題 ナノダイヤモンドを分極剤として用いたDNP-MAS-NMRの生体分子への応用
3. 学会等名 第61回NMR討論会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田巻初，藤原敏道，松木陽
2. 発表標題 極低温MAS-DNP固体NMRによる多剤結合転写因子QacRの構造分布解析
3. 学会等名 第61回NMR討論会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 杉下友晃, 田巻初, 加藤賢, 藤原敏道, 松木陽
2. 発表標題 無細胞合成系による 2アドレナリン受容体発現とその構造アンサンブルの固体NMR解析
3. 学会等名 第61回NMR討論会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 張仲良, 松木陽, 藤原敏道
2. 発表標題 変調したマイクロ波を用いた動的核偏極効率の向上
3. 学会等名 第61回NMR討論会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 松木 陽
2. 発表標題 動的核偏極(DNP)による高感度・高分解能固体NMR法 - 装置と方法論の開発と応用
3. 学会等名 Japan Analytical Instruments Active Users Network Symposium
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yoh Matsuki
2. 発表標題 Methods and Instruments for High-Field Ultralow Temperature DNP-MAS-NMR
3. 学会等名 日印固体NMRシンポジウム(招待講演)(国際学会)
4. 発表年 2022年



1. 発表者名 松木 陽
2. 発表標題 Conformational Evolution of Alpha-Synuclein in Droplets - an Integrated Study with DNP-Enhanced MAS NMR -
3. 学会等名 相分離生物物理学研究会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yoh Matsuki
2. 発表標題 Conformational Evolution of Alpha-Synuclein in Droplets - an Integrated Study with DNP-Enhanced MAS NMR -
3. 学会等名 University of Michigan Zoominar Series, Molecular Basis of Proteinopathies (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 松木 陽
2. 発表標題 生体系メソスケール構造研究に向けたDNP-NMR法
3. 学会等名 蛋白質科学会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松木 陽
2. 発表標題 極低温DNP-MAS NMR法の開発と応用
3. 学会等名 高分子学会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yoh Matsuki
2. 発表標題 Methods and Instruments for High-Field DNP MAS NMR
3. 学会等名 22nd international society of magnetic resonance conference (ISMAR)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yoh Matsuki
2. 発表標題 Absolute 1H Hyperpolarization Measurement and Mesoscale Sample Domain Selection by Ultra-Low Temperature MAS DNP at 16.4 T
3. 学会等名 Pacifichem The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies 2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yoh Matsuki
2. 発表標題 surface-only spectroscopy, DNP MAS NMR at 30K and 16.4T
3. 学会等名 MIT Zoominar series on SSNMR (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 松木 陽
2. 発表標題 高磁場極低温DNP法の発展と応用
3. 学会等名 日本核磁気共鳴学会、NMR討論会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 ナノダイヤモンド型DNP用分極剤およびその製造方法並びに使用方法	発明者 松木 陽、加藤憲、 藤原敏道	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2022/031633	出願年 2022年	国内・外国の別 外国

産業財産権の名称 ナノダイヤモンド型DNP分極剤の製造法・使用法	発明者 1.松木陽、加藤賢、 藤原敏道	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2021-135920	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計6件

産業財産権の名称 極低温で抜けないマジック角回転試料管キャップ	発明者 8.松木陽、遠藤由宇 生、根本貴宏、末松 浩人、藤原敏道	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、6750819	取得年 2021年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 アーキング防止DNPプローブ	発明者 T. Fujiwara, Y. Matsuki, et al.	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、US11,061,088 B2	取得年 2021年	国内・外国の別 外国

産業財産権の名称 サブミリ波伝送効率向上型NMRプローブ	発明者 T. Fujiwara, Y. Matsuki, et al.	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、US10,955,489 B2	取得年 2021年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 極低温で抜けない試料管キャップ	発明者 T. Fujiwara, Y. Matsuki, et al.	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、US10,914,799 B2	取得年 2021年	国内・外国の別 外国

産業財産権の名称 真空二重窓DNPプローブ	発明者 4.藤原敏道、松木 陽、中村新治、高橋 大樹	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、6823305	取得年 2021年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 アーキング防止DNPプローブ	発明者 3.藤原敏道、松木 陽、遠藤由宇生、中 村新治、高橋大樹	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、6823304	取得年 2021年	国内・外国の別 国内

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

#### 7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
米国	米国エネルギー省Ames研究所			