

令和 5 年 5 月 30 日現在

機関番号：32607

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K21402

研究課題名（和文）遺伝暗号改変による新規超高感度タンパク質NMR測定法の創製

研究課題名（英文）Creation of a novel ultra-sensitive method for protein NMR signal assignments by genetic code modification with

研究代表者

河野 俊之（Kohno, Toshiyuki）

北里大学・医学部・教授

研究者番号：40416657

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：高分子量のタンパク質NMRシグナルを、より微量の試料を用いて解析できるようにするために、最も感度良くNMR測定ができるメチル基に注目して、そのシグナルの簡便な帰属方法の創製を目的として研究を行った。メチオニン、イソロイシン、ロイシン、バリン残基のメチル基のシグナルをコドンの使い分けや遺伝暗号の改変などを用いて残基番号選択的に安定同位体標識する方法を開発し、メチオニンとイソロイシン残基については、想定通りの結果を得た。ロイシンとバリン残基については、現在実行中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、より分子量の大きなタンパク質をより低い濃度で迅速にNMR解析することができるようになれば、これまでの100倍以上の種類のタンパク質を解析することができるようになり、質量分析計のようにありとあらゆるタンパク質を研究対象とするようになることも夢ではない。そうなれば、タンパク質NMRの分野の飛躍的な展開が期待できる。その学術体系への影響は計りしれない。

研究成果の概要（英文）：In order to make it possible to analyze high molecular weight protein NMR signals using smaller amounts of sample, we focused on the methyl group, which provides the most sensitive NMR signals, and conducted research to create a simple method to assign the NMR signals. We developed a method for site-directed stable isotope labeling of methyl group signals of methionine, isoleucine, leucine, and valine residues by using different codons and modifying the genetic code, and obtained results as expected for methionine and isoleucine residues. The experiments for leucine and valine residues are now in progress.

研究分野：構造生物学

キーワード：生体高分子 NMR タンパク質 安定同位体 微量解析 無細胞タンパク質合成

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

タンパク質の立体構造が次々と明らかにされ、生命現象の理解や創薬開発などの戦略に革命的な変化が起きている。タンパク質の立体構造の解析方法として、X線結晶解析法、電子顕微鏡解析法、NMR解析法などがある。その中でNMR解析法は、生体高分子を溶液状態で立体構造解析可能であり、分子間相互作用の解析に決定的な力を発揮するという長所を持っている。しかしその一方で、NMR解析法は感度が低く、高分子量タンパク質の解析を苦手とし、大量で高濃度の安定同位体標識試料が必要であるという弱点を併せ持っている。

NMRの持つ弱点を克服するため、これまでに多くの改良がなされてきた。例えば、解析可能なタンパク質の分子量を大きくする手法としてはTROSY法 (Pervushin et al., 1997, Riek et al., 1999) や、残余双極子法 (Tjandra & Bax, 1997, Tate et al., 2004) などがある。また、タンパク質立体構造決定の精度をあげる手法としてSAIL法 (Kainosho et al., 2006) がある。

上記の方法はこれまでのNMRの弱点を克服可能な優れた方法ではあるが、これらの方法を実際に適用するには、タンパク質NMRシグナルの帰属が必要となる。しかし、現在行われているタンパク質NMRシグナルの帰属方法は、全体を ^{13}C と ^{15}N で安定同位体標識されたタンパク質の3次元NMR (感度が低い) 測定を使用するため、大量かつ高濃度のタンパク質溶液が必要である。このため学術的あるいは応用的に重要であっても、高濃度の溶液を調製するのが困難なタンパク質に関しては、解析が行えないという深刻な問題が生じていた。

2. 研究の目的

本研究では申請者がこれまで開発してきた手法を格段に発展させ、 $10\ \mu\text{g}$ 以下かつ $1\ \mu\text{M}$ 程度の濃度で迅速なNMR解析を可能にし、タンパク質NMR解析のブレイクスルーをもたらすことを目的とする。現在最も感度良くNMRが測定できるロイシン(Leu)、イソロイシン(Ile)、バリン(Val)、メチオニン(Met)のメチル基に注目し、そのメチル基の ^{13}C NMRシグナルをこれまでに無いほどの高感度で簡便に帰属する方法を創製する。タンパク質のメチル基のNMRシグナルはわずか $1\ \mu\text{M}$ のタンパク質濃度で観測可能であるが、そのシグナルそれぞれがどの残基に属するものかの帰属を行うためには、 $1\ \text{mM}$ 程度の濃度の試料と長時間の3次元NMR測定が必要であり、その方法もメチオニンのメチル基には原理的に適用困難である。そこで、メチオニンも含めた4種類のアミノ酸のメチル基のNMRシグナルの帰属を $1\ \mu\text{M}$ で行える技術を新規に開発し、ボトルネックを解消する。

3. 研究の方法

Leu, Ile, Valの3種類のアミノ酸については、それぞれ複数のコドンと複数のtRNAが対応している。そこで例えば対象タンパク質の着目するLeu残基だけを選択的に ^{13}C で安定同位体標識を行うために、その残基に対応するコドンをminorコドンに変換し、その他のLeu残基をmajorコドンにする。そして、minorコドンに対応するtRNAに ^{13}C で安定同位体標識されたLeuを結合させ、majorコドンに対応するtRNAに非標識のLeuを結合させる。そして、それらのアミノアシルtRNAを無細胞タンパク質合成系に加えることにより、着目するLeu残基だけに ^{13}C の安定同位体標識を導入する。すると、 ^1H - ^{13}C 相関スペクトルの測定で、安定同位体標識を導入したLeu残基由来のNMRシグナルだけを観測することができ、NMRシグナルの容易な帰属が可能になる。

Metは、コドンはAUGの1種類だけでtRNAも1種類しかないので上記のようにmajorコドンとminorコドンを使い分けることができない。そこで、Ileの3番目のコドンのAUAを安定同位体標識用のMetの疑似minorコドンに変換するという新規の遺伝暗号改変法を開発する。

4. 研究成果

ターゲットとなる目的タンパク質を2種類設定し、それぞれについて、Leu, Ile, Valの各残基について、残基番号選択的な安定同位体標識を可能にするために注目する残基に対応するコドンをminorコドンに対応に変換し、そのたの残基をmajorコドンに変換した変異体群を数十種類作成した。またMetについてはIleの全ての残基のコドンをmajorコドンに変換しMetの注目する残基に対応するコドンをIleのminorコドンに変換した変異体群を全てのMet残基に対して作成した。

また、無細胞タンパク質合成で必要となるロイシルtRNA合成酵素(LeuRS)、IleRS、ValRS、MetRS、EF-Tu、イソロイシンtRNA修飾酵素(TiIS)、EF-Tuなどの酵素群の遺伝子クローニングおよび大量発現系の構築を行った。

モデルタンパク質のうち、FKBPタンパク質について、実際に残基番号選択的な安定同位体標識を開始した。FKBPタンパク質に含まれる3カ所のメチオニン残基に対してそれぞれ選択的な安定同位体標識を行い、メチオニン残基のシグナルが1残基分だけ出現することを ^1H - ^{15}N HSQCおよび ^1H - ^{13}C HSQCスペクトルの測定で確認した。また、イソロイシン残基4カ所についてもそれぞれ選択的な安定同位体標識を行ったところ、イソロイシン残基のシグナルが1残基分だけ出現

することを $1\text{H}-15\text{N}$ HSQC および $1\text{H}-13\text{C}$ HSQC スペクトルの測定で確認した。これらの結果よりメチオニン残基とイソロイシン残基については、低濃度でのメチル基シグナルの NMR シグナルの帰属を行う技術を確立できたことがわかった。さらに、バリン残基とロイシン残基については、測定試料の調製まで行っており、現在 NMR シグナルの解析を行っている。

本研究により、より分子量の大きなタンパク質をより低い濃度で迅速に NMR 解析することができるようになれば、これまでの 100 倍以上の種類のタンパク質を解析することができるようになり、質量分析計のようにありとあらゆるタンパク質を研究対象とするようになることも夢ではない。そうなれば、タンパク質 NMR の分野の飛躍的な展開が期待できる。その学術体系への影響は計りしれない。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究協力者	平井 啓子 (Hirai Keiko)		

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