

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 17 日現在

機関番号： 22604
研究種目： 基盤研究 (B)
研究期間： 2009~2011
課題番号： 21370045
研究課題名 (和文)
SAIL-FLYA NMR 法による蛋白質全自動構造解析の応用と拡張、及び普及
研究課題名 (英文)
Applications, Development, and Dissemination of the SAIL-FLYA
NMR Method for Fully Automated Protein Structure Analysis
研究代表者 PETER GUENTERT (ペーター ギュントर्ट)
首都大学東京・理工学研究科・特任教授
研究者番号： 20392110

研究成果の概要 (和文)：

本研究課題の結果、SAIL-NMR法を用いて膜内在性蛋白質プロテオロドプシンの構造決定に成功した[*Angew. Chem. Int. Ed.* **50**, 11942-11946 (2011)]。本成果は、7回膜貫通ヘリックスからなる膜蛋白質の初のNMR構造決定の例である。Cell-freeシステムを用いて、一方のプロキラルメチル基のみ観測可能な改良SAILアミノ酸 LeuとValを導入することで、ピークの重なりを大幅に低減させた。これにより、すべてのValと60%のLeuの側鎖帰属を可能にしたことから、より多くのNOE距離情報を得ることができ、常磁性緩和効果と組み合わせることで、CYANAによる構造決定の成功につながった。

NOESYスペクトルのみを用いた新規構造決定手法であるNOESY-FLYA法の成果に関して論文発表した[*J. Biomol. NMR.* **50**, 137-146 (2011)]。本手法は、NOESY以外の他のどのスペクトルも用いずに、化学シフト帰属と、構造決定に必要な拘束情報を取得可能な点が際立った特徴である。この手法をSAILユビキチンに適用させ、高精度の構造解析に成功した。構造計算により得た複数構造中で、類似構造領域を客観的指標により自動で識別、構造を重ね合わせるアルゴリズムCYRANGE [*BMC Bioinformatics* **12**, 170 (2011)]と二面角空間内で単一構造と複数構造を同時表現する手法[*J. Biomol. NMR* **52**, 351-364 (2012)]を開発した。

また、NMRデータのみから自動構造決定する方法論を競うCASD-NMRプロジェクトにCYANAで参加し、他のソフトウェアに対するCYANAの性能の優位性を示すことができた[*Structure* **20**, 227-236 (2012)]。

研究成果の概要 (英文)：

We have successfully applied the SAIL method to solve the structure of the integral membrane protein proteorhodopsin [*Angew. Chem. Int. Ed.* **50**, 11942-11946 (2011)]. This was the first *de novo* NMR structure determination of a seven-transmembrane-helix membrane protein. Using the cell-free system we could employ SAIL variants of Leu and Val with the advantage that only one of the prochiral methyl groups is detectable and signal overlap is considerably reduced. SAIL permitted the side-chain assignment of all Val and 60% of the Leu residues. This was crucial for obtaining NOE distance restraints that were used in conjunction with paramagnetic relaxation enhancement data for the structure calculation with CYANA.

We published our NOESY-FLYA method for the exclusively NOESY-based structure determination of proteins [*J. Biomol. NMR.* **50**, 137-146 (2011)], which does not require any other NMR spectra than NOESY for obtaining the resonance assignments and the conformational restraints for the NMR structure calculation with CYANA. This approach was successfully applied to SAIL-ubiquitin. The CYRANGE algorithm for the objective and automated identification of residue ranges for the superposition of protein structures [*BMC Bioinformatics* **12**, 170 (2011)], and a method for the simultaneous single-structure and bundle representation of protein NMR structures in torsion angle space [*J. Biomol. NMR* **52**, 351-364 (2012)] were developed.

The program CYANA was applied in the CASD-NMR project, a blind testing of methods for the automated determination of protein structures from NMR data. [Structure **20**, 227-236 (2012)].

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	5,400,000	1,620,000	7,020,000
2010年度	4,900,000	1,470,000	6,370,000
2011年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
年度			
年度			
総計	14,500,000	4,350,000	18,850,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学

キーワード：NMR, SAIL 法、自動帰属、構造計算

1. 研究開始当初の背景

平成 18-20 年度に掛けて行われた科研費基盤 A (Guentert 代表：首都大学東京 客員教授) において、SAIL-FLYA 法の開発は大きく進展したものの、解析に人力の介入を全く無しに NMR スペクトルの解析からタンパク質の立体構造決定に到達するには更なる方法論の改良と、実証実験が不可欠であった。網羅的なタンパク質立体構造決定にとって、このような全自動立体構造解析アルゴリズムの確立と普及は、研究開始時には大きな期待が寄せられていた。この分野の国際的なリーダーである本申請者が Frankfurt 大学を主務として移動した後も首都大学の客員教授として、基盤 A で整備された PC クラスター等の研究環境をそのまま利用できることを保障されていた。研究上必要な NMR 装置は連携研究者甲斐荘の名古屋大学/首都大学、及び Frankfurt 大学において最大 950 MHz までを含めて整備されている。基盤 A で開発されたアルゴリズムは今後、実際的な応用とそれに基づく改良を待つ段階にあり、本課題の実施には首都大学が最も適した環境にあった。

2. 研究の目的

研究代表者は基盤 A (平成 18-20 年度) 課題

「SAILタンパク質を用いる全自動NMR構造解析システムの開発」により、タンパク質の新しい全自動構造解析計算システムをSAIL-FLYA法を開発した。本システムはNMR解析用に最適化した立体整列同位体標識 (SAIL) タンパク質試料と完全自動化NMRスペクトル解析・構造計算アルゴリズム (FLYA) から構成されている点に最も大きな特徴があり、従来の分子量限界を少なくとも2倍以上上回る高分子量タンパク質の自動構造解析が可能であると期待される。本課題では、SAIL-FLYA法をより生物学的に重要なタンパク質へ適用し、その有効性を実証すると同時に、様々な機能をより拡充することを通して、本システムを幅広く普及させることを目的としている。

ヒトの生命機能の分子レベルでの理解においては、様々な生命過程に基本的な役割を持つタンパク質、或いは疾病に関与するタンパク質の研究が不可欠である。これまで 50,000 を越えるタンパク質の立体構造が解かれPDBに登録されてはいるものの、タンパク質の機能を理解する上で、今後はそれらが本来機能を発現する環境に近い状態にお

る立体構造、相互作用、及びそれらのダイナミックスに関する研究がますます要求されることは明らかである。さらに、生命活動の理解において重要と考えられるタンパク質群、例えば膜タンパク質、においては、従来のX線結晶構造解析やNMRによる手法が適用し難いものが数多く含まれている。NMR法はタンパク質の機能を果たす環境に近い条件下でそれらの立体構造、相互作用、及びダイナミックスを研究できる理想的な手法であることは広く知られている⁵⁹。しかしながら、タンパク質のNMR構造解析においてはシグナルの配列帰属が必要となるために分子量30kDaを越える高分子量タンパク質への適用は極めて困難とされてきた。事実、生体物質のNMR DB (BMRB; www.bmrbl.wisc.edu)によれば、2008年9月当時において、分子量30kDaを越えるタンパク質において主鎖・側鎖NMRシグナルの帰属が70%を越える報告は僅か7例に留まる。実質的には完全帰属が達成されたとみなせる7例中の2例は本申請者の基盤A課題の成果でもある。

SAIL タンパク質はより鋭いシグナルと構造情報を失わずにスペクトルを単純化できる優れた特徴を持つ。このため、SAIL法では、均一に¹³C/¹⁵N標識した試料を用いる従来のNMR手法に比べ2倍以上の高分子量タンパク質の構造決定を迅速、且つ高精度に行うことができるため、これまではNMR構造解析の対象にならなかった多くのタンパク質が、溶液内構造解析の対象として新たに加わることになる。なお、これらのNMR構造決定は手動によるスペクトル解析と、申請者が開発した自動NOE解析・構造計算アルゴリズムCYANAを組み合わせで行った。しかしながら、SAILタンパク質試料のもつ特性をさらに活かすことによりタンパク質構造決定の効率を著しく高めることができる。

この予測は、申請者が代表として実施した基盤A課題「SAILタンパク質を用いる全自動NMR構造解析システムの開発」(平成18-20年度)により実証された。即ち申請者等が開発したCYANAを中核とした全自動構造解析アルゴリズムFLYAをSAIL法と組み合わせた新しいシステムを用いて、比較的低分子量のモデルタンパク質を対象としてではあるが、予想通り迅速に高精度のタンパク質構造解析を実施することに成功した。FLYAは人力の介在なしに、多次元NMRデータセットから直接にタンパク質の三次元構造を決定するアルゴリズムである。FLYAアルゴリズムにおいては、これまでの人力による構造決定と同様に、既知の立体構造や経験的に予測された構造モデル等を一切利用しない、完全に実験的に得られるNOE距離制限のみから構造決定を行う。FLYAでは主鎖、側鎖スペクトルの自動解析により全ての化学シフト情報を取得し、それに基づき全てのNOE相関ピークの帰属と構造決定を連続して行う。

これらの研究の結果得られたSAIL-FLYA全自動構造決定システムの技術移転や普及への取り組みは、SAIL法の国際標準化にとっても重要である。これは代表者の開発したCYANAの普及に成功した経験を踏まえ、広くNMR研究グループに本研究の結果開発される拡張型SAIL-FLYAソフトウェアパッケージの公開、及びSAIL-FLYA法の応用例として適切なタンパク質に関して他の研究グループとの共同研究へと発展させることにより促進されるであろう。

3. 研究の方法

本課題は、ソフトウェア開発、NMR構造解析、開発した技術の普及への取り組みの3つの取り組みからなる。ソフトウェア開発については、研究計画を滞りなく遂行するために、自動計算全体の各過程を「モジュール」とい

う形で独立に分割して開発していく計画である。それぞれの過程の計算に機能面を強化した新規発想のアルゴリズムを盛り込み、各モジュールが完成、十分な実証実験が行われた後、SAIL-FLYA ソフトウェアにそれらを盛り込んでいく。このような開発形式をとることによって、ある特定のモジュール(計算アルゴリズム)の実装の遅れが全体の開発の遅延を招くことを避けることができる。NMR 構造解析については、本課題の共同研究者によって、SAIL 法を用いて構造決定を行う予定の構造未知のタンパク質についてすでに十分な発現検討がなされており、それらが NMR 試料としても良好な性質を持つものであることが予備実験のデータから示唆されている。またこれとは別に、本課題の方向性と一致する学術的価値の高いタンパク質の構造解析を進めている別の研究グループとの共同研究を新規開始する計画もあるため、ある特定のタンパク質の NMR 解析の停滞が、本プロジェクト全体に重大な影響を与えることは考えられない。

本課題の研究体制は、研究代表者として Peter Guentert、研究分担者として首都大学東京(戦略研究センター准教授 池峻求、及び連携研究者として名古屋大学特任教授甲斐荘正恒が担当し、それぞれはプロジェクトの各必須部門で下記に示すように、異なった役割を担う。研究代表者の Guentert は全体のプロジェクトを統括し、拡張型 SAIL-FLYA システムのためのソフトウェア開発をさらに追求していく。池は、NMR 測定に従事し、スペクトル解像度の向上を目指した非線形サンプリング法の改良を進める。また、代表者の Guentert が Frankfurt 大学の自身の研究室に滞在中は、池が首都大学の研究活動の監督を行う。甲斐荘は NMR 測定のための SAIL タンパク質調製を担当し、研究代表者、共同

研究者に、SAIL 技術のあらゆる面に対するアドバイザーとしての役割を担う。

4. 研究成果

NOESY スペクトルのみを入力データとし、蛋白質の立体構造を全自動構造解析する手法 - NOESY-FLYA 法- の実証実験に初めて成功した。即ち、クロレラ由来のユビキチン(76 a. a. : SAIL 標識)、及び高熱性細菌 HB8 由来の TTHA1718 (66 a. a. : 二重標識)に NOESY-FLYA 法を適用し、従来の手動解析による構造解析と同程度の精度で立体構造解析が全自動的に可能となることを示した。本法を用いれば、NOESY 以外のスペクトル・構造情報を全く必要とせず、化学シフト帰属から立体構造決定の至るまで全ての解析過程を自動化することができる。ユビキチンの場合には SAIL 標識体を試料として用いたために、NMR シグナルの先鋭化、及びシグナル数の大幅な減少が得られ、自動構造解析上問題となる可能なシグナル帰属の組み合わせ数を一挙に減少させることにつながり、NOESY-FLYA 法の成功に導いた。SAIL 標識試料は、同程度のアミノ酸残基数の二重標識試料と比較して、6 倍程度低濃度の試料溶液を用いても NOESY-FLYA を用いた全自動構造解析が十分可能であることが示された。本法を更に高分子量の蛋白質へと適用範囲を拡張する試みにも着手した。このために分子量 21kDa の蛋白質 DsbA の SAIL 標識体の調製を行い、既に一連のスペクトル測定も終了している。現在、進めている解析が成功すれば、20kDa を超える蛋白質を対象とした完全自動解析の世界初の成功例となる。また、本研究課題に関連し、更なる高分子量蛋白質や膜蛋白質の主鎖 NMR シグナルの帰属に有効なアミノ酸選択的標識の組み合わせを最適化するアルゴリズム UPLABEL の開発も行った。

また、SAIL 法を使った膜内在性蛋白質プロテオロドプシンの構造決定に成功した。本成果は、7 回膜貫通ヘリックスからなる膜蛋白質の初の NMR 構造決定の例となった。Cell-free システムを用いて、一方のプロキラルメチル基のみ観測可能な改良 SAIL アミノ酸 Leu と Val を導入することで、ピークの重なりを大幅に低減させた。これにより、すべての Val と 60%の Leu の側鎖帰属を可能にしたことからより多くの NOE 距離情報を得ることができ、常磁性緩和効果と組み合わせたことで、CYANA による構造決定の成功につながった。構造計算により得た複数構造中で、類似構造領域を客観的指標により自動で識別、構造を重ね合わせるアルゴリズム CYRANGE と 二面角空間内で単一構造と複数構造を同時表現する手法を開発した。また、NMR データのみから自動構造決定する方法論を競う CASD-NMR プロジェクトに CYANA で参加し、他のソフトウェアに対する CYANA の性能の優位性を示すことができた。

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 21 件)

(1) Ikeya, T., Takeda, M., Yoshida, H., Terauchi, T., Jee, J., Kainosho, M. & Güntert, P. Automated NMR structure determination of stereo-array isotope labeled ubiquitin from minimal sets of spectra using the SAIL-FLYA system. *J. Biomol. NMR* 44, 261-272 (2009).

(2) Coutandin, D., Löhr, F., Niesen, F. H., Ikeya, T., Weber, T. A., Schäfer, B., Bullock, A. N., Yang, A., Güntert, P., Knapp, S., McKeon, F., Der Ou, H. & Dötsch, V. Conformational stability and activity of p73 require a second helix in the tetramerization domain. *Cell Death Diff.* 16, 1582-1589 (2009).

(3) Khayrutdinov, B. I., Bae, W. J., Yun, Y. M., Lee, J. H., Tsuyama, T., Kim, J. J., Hwang, E., Ryu, K. S., Cheong, H. K., Cheong, C., Ko, J. S., Enomoto, T., Karplus, P. A., Güntert, P., Tada, S., Jeon, Y. H., Cho, Y. Structure of the Cdt1 C-terminal domain: Conservation of the winged helix

fold in replication licensing factors. *Prot. Sci.* 18, 2252-2264 (2009).

(4) Rosato, A., Bagaria, A., Baker, D., Bardiaux, B., Cavalli, A., Doreleijers, J. F., Giachetti, A., Guerry, P., Güntert, P., Herrmann, T., Huang, Y. J., Jonker, H. R. A., Mao, B., Malliavin, T. E., Montelione, G. T., Nilges, M., Raman, S., van der Schot, G., Vranken, W., Vuister, G. W. & Bonvin, A. M. J. J. CASD-NMR: a rolling experiment for the critical assessment of automated structure determination of proteins from NMR data. *Nature Methods* 6, 625-626 (2009).

(5) Tsuda, K., Kuwasako, K., Takahashi, M., Someya, T., Inoue, M., Terada, T., Kobayashi, N., Shirouzu, M., Kigawa, T., Tanaka, A., Sugano, S., Güntert, P., Muto, Y. & Yokoyama, S. Structural basis for the sequence specific RNA-recognition mechanism of human CUG-BP1 RRM3. *Nucl. Acids Res.* 37, 5151-5166 (2009).

(6) Kainosho, M. & Güntert, P. SAIL - Stereo-array isotope labeling. *Q. Rev. Biophys.* 42, 247-300 (2009).

(7) Sobhanifar, S., Schneider, B., Löhr, F., Gottstein, D., Ikeya, T., Mlynarczyk, K., Pulawski, W., Ghoshdastider, U., Kolinski, M., Filipek, S., Güntert, P., Bernhard, F. & Dötsch, V. Structural investigation of the C-terminal catalytic fragment of presenilin-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107, 9644-9649 (2010).

(8) Ikeya, T., Sasaki, A., Sakakibara, D., Shigemitsu, Y., Hamatsu, J., Hanashima, T., Mishima, M., Yoshimasu, M., Hayashi, N., Mikawa, T., Nietlispach, D., Wälchli, M., Smith, B. O., Shirakawa, M., Güntert, P. & Ito, Y. NMR protein structure determination in living E. coli cells using nonlinear sampling. *Nature Protocols* 5, 1051-1060 (2010).

(9) Hamada, T., Matsunaga, S., Fujiwara, M., Fujita, K., Hirota, H., Schmucki, R., Güntert, P., Fusetani, N. Solution structure of polytheonamide B, a highly cytotoxic non-ribosomal polypeptide from marine sponge. *J. Am. Chem. Soc.* 132, 12941-12945 (2010).

(10) He, F., Umehara, T., Inoue, M., Harada, T., Watanabe, S., Kigawa, T., Takahashi, M., Kuwasako, K., Tsuda, K., Matsuda, T., Aoki, M., Seki, E., Kobayashi, N., Tanaka, A., Sugano, S., Güntert, P., Muto, Y. & Yokoyama, S. Structural insight into the zinc finger CW domain as a novel histone

modification reader. *Structure* 18, 1127-1139 (2010).

(11) Handa, Y., Hikawa, Y., Tochio, N., Kogure, H., Inoue, M., Koshihara, S., Güntert, P., Inoue, Y., Kigawa, T., Yokoyama, S. & Nameki, N. Solution structure of the mitochondrial protein ICT1 that is essential for cell vitality. *J. Mol. Biol.* 404, 260-273 (2010).

(12) Hefke, F., Bagaria, A., Reckel, S., Ullrich, S. J., Dötsch, V., Glaubitz, C. & Güntert, P. Optimization of amino acid type-specific ¹³C and ¹⁵N labeling for the backbone assignment of membrane proteins by solution- and solid-state NMR with the UPLABEL algorithm. *J. Biomol. NMR* 49, 75-84 (2011).

(13) Reckel, S., Gottstein, D., Stehle, J., Löhr, F., Verhoeven, M. K., Takeda, M., Silvers, R., Kainosho, M., Glaubitz, C., Wachtveitl, J., Bernhard, F., Schwalbe, H., Güntert, P. & Dötsch, V. Solution NMR structure of proteorhodopsin. *Angew. Chem. Int. Ed.* 50, 11942-11946 (2011).

(14) Ikeya, T., Jee, J. G., Shigemitsu, Y., Hamatsu, J., Mishima, M., Ito, Y., Kainosho, M. & Güntert, P. Exclusively NOESY-based automated NMR assignment and structure determination of proteins. *J. Biomol. NMR* 50, 137-146 (2011).

(15) Kirchner, D. K. & Güntert, P. Determination of optimal residue ranges for the superposition of protein structures. *BMC Bioinformatics* 12, 170 (2011).

(16) Tsuda, K., Someya, T., Kuwasako, K., Takahashi, M., Fahu, H., Inoue, M., Harada, T., Watanabe, S., Terada, T., Kobayashi, N., Shirouzu, M., Kigawa, T., Tanaka, A., Sugano, S., Güntert, P., Yokoyama, S. & Muto, Y. Structural basis for the dual RNA-recognition modes of human Tra2- β RRM. *Nucl. Acids Res.* 39, 1538-1553 (2011).

(17) Yamashita, S., Nagata, T., Kawazoe, M., Takemoto, C., Kigawa, T., Güntert, P., Kobayashi, N., Terada, T., Shirouzu, M., Wakiyama, M., Muto, Y. & Yokoyama, S. Structures of the first and second double-stranded RNA-binding domains of human TAR RNA-binding protein. *Protein Sci.* 20, 118-130 (2011).

(18) He, F., Inoue, M., Kigawa, T., Takahashi, M., Kuwasako, K., Tsuda, K., Kobayashi, N., Terada, T., Shirouzu, M., Tanaka, A., Sugano, S., Güntert, P., Yokoyama, S. & Muto, Y. Solution structure of the Splicing Factor Motif (SFM) of the

human Prp18 protein. *Proteins* 80, 968-974 (2012).

(19) Gottstein, D., Kirchner, D. K. & Güntert, P. Simultaneous single-structure and bundle representation of protein NMR structures in torsion angle space. *J. Biomol. NMR* 52, 351-364 (2012).

(20) Bagaria, A., Jaravine, V., Huang, Y. J., Montelione, G. T. & Güntert, P. Protein structure validation by generalized linear model RMSD prediction. *Protein Sci.* 21, 229-238 (2012).

(21) Rosato, A., Aramini, J. M., Arrowsmith, C., Bagaria, A., Baker, D., Cavalli, A., Doreleijers, J. F., Eletsky, A., Giachetti, A., Guerry, P., Gutmanas, A., Güntert, P., He, Y. F., Herrmann, T., Huang, Y. J., Jaravine, V., Jonker, H. R. A., Kennedy, M. A., Lange, O. F., Liu, G., Malliavin, T. E., Mani, R., Mao, B., Montelione, G. T., Nilges, M., Rossi, P., van der Schot, G., Schwalbe, H., Szyperski, T., Vendruscolo, M., Vernon, R., Vranken, W. F., de Vries, S., Vuister, G. W., Wu, B., Yang, Y. & Bonvin, A. M. J. J. Blind testing of routine, fully automated determination of protein structures from NMR data. *Structure* 20, 227-236 (2012).

[学会発表] (計 件)

[図書] (計 件)

[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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

ペーター ギュンタート (Guentert, Peter)
首都大学東京 ▪ 戦略研究センター ▪ 客員教授
研究者番号 : 20392110

(2) 研究分担者

池 峻求 (Jee, JunGoo)
首都大学東京 ▪ 戦略研究センター ▪ 准教授 (平成 23 年 3 月退職)
研究者番号 : 50381554

(3) 連携研究者

甲斐荘 正恒
名古屋大学大学院理学研究科構造生物学
センター ▪ GCOE 特別招へい教授
研究者番号 : 20137029