

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21770110

研究課題名(和文)

SAIL法を用いたジスルフィド架橋結合の位置および立体配座決定法の開発

研究課題名(英文)

The determination of disulfide connectivity and conformation by the SAIL method

研究代表者：

武田 光広 (TAKEDA MITSUHIRO)

名古屋大学・理学研究科・研究員

研究者番号：90508558

研究成果の概要(和文)：蛋白質中のジスルフィド(S-S)結合の位置および立体配座の情報は蛋白質の構造形成・安定化機構の理解に重要であるが、その有効な解析手法が確立していない。本研究においては、S-S結合を構成する2つのシステイン残基のベータプロトン間NOEを、高度安定同位体標識タンパク質調製技術 SAIL(立体整列同位体標識)法を利用して観測することにより、その位置と立体配座を決定する方法を開発した。同手法は、解析対象のベータプロトン以外の水素を完全に重水素置換する事により、従来の均一標識タンパク質において問題となるシグナルの縮重やスピン拡散の問題を回避する。この結果、高感度かつ高い定量性を保持したままNOEを観測し、S-S結合の位置・立体配座を決定出来る。

研究成果の概要(英文)：The determination of disulfide connectivity and conformation in a protein is essential for understanding the structural stability of the protein. However, no method for investigating them has been established. Here, a method for observing cross-bridge NOEs involving two β -protons of different cysteine residues has been developed. In a conventional uniformly isotope-labeled protein, the observation of such a NOE is difficult due to signal overlap and spin diffusion effect. In our approach, a protein whose protons are exclusively deuterated except for the two Cys's β -protons is employed, such that the connectivity and proton-proton distance can readily be determined.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：ライフサイエンス(共通基礎研究)

科研費の分科・細目：構造生物化学

キーワード：蛋白質、NMR

1. 研究開始当初の背景

(1) 蛋白質内の S-S 結合は、 $\chi^2(i), \chi^3, \chi^2(j)$ で規定される結合の自由度により、複数の立体配座をとり得る。S-S 結合を形成する残基の特定、及びその立体配座解析は蛋白質の立体構造の形成・維持にとって重要であるだけでなく、蛋白質の動態制御、更には機能発現機

構の理解においても重要な知見となる。しかしながら、有効な研究手法に欠けるために S-S 結合周囲の動的構造解析は立ち遅れていた。例えば、S-S 結合位置の特定ですら、いまだに蛋白質を加水分解して得られるペプチド断片の質量分析に頼る状況であり、未だに S-S 結合位置を直接決定するための有効な NMR 手法すら報告されていない。

(2) NMR 法による蛋白質立体構造解析技術は急速に発展しており、特に過去 10 年余りの間に達成された様々な測定装置、スペクトル解析・構造決定技術の進歩は著しく、従来の技術的限界を遥かに越えた多くの成果を産んでいる。しかしながら、このような NMR 測定・解析技術の進歩を支える基盤となる蛋白質資料調製技術の重要性は見過ごされ勝ちであった。甲斐荘等(首都大)が開発した立体整列同位体標識 (Stereo-array isotope labeling; SAIL) 法(*Nature*, **440**, 52-57 (2006)) は蛋白質試料の最適化技術であり、高分子量蛋白質の NMR 構造決定上の最大の障壁となっていた分子量増加に伴う NMR シグナルの広幅化と重なりを同時に回避できる革新的手法として国際的にも高い関心が寄せられており、SAIL 法の普及と実用化は重要な課題である。SAIL 法の特徴を更に活かすためには、立体構造決定への応用に留まらず、蛋白質の生物機能に深く関わる動態解析手法としての発展が不可欠である。

2. 研究の目的

(1) 本課題で開発をめざす S-S 結合周囲の配座解析方法は、SAIL 法を利用した種々のアミノ酸側鎖の立体配座手法の一環として行うものであるが、特に S-S 結合の特性を利用した新規な動的配座解析技術の開発をめざした。すなわち、S-S 結合を形成する一対のメチレン水素間、 $H\beta^s(i)-H\beta^s(j)$, $H\beta^s(i)-H\beta^r(j)$, $H\beta^r(i)-H\beta^s(j)$, $H\beta^r(i)-H\beta^r(j)$ の 4 組の 1H 間距離が、S-S 結合の立体配座に依存して変化する点に着目し、対応する 4 つの 1H 間 NOE を SAIL-NMR 法により一挙に観測し、それらの相対強度を比較し、S-S 結合周囲の立体配座解析方法を開発しようとするものである。

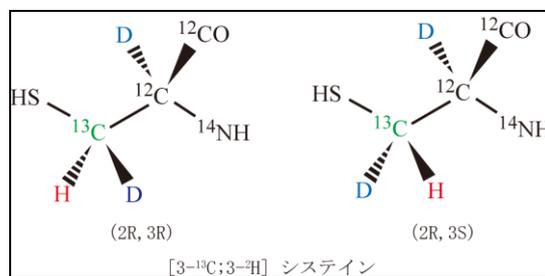
(2) S-S 結合が構造・機能相関に密接に関与する例として、蛋白性プロテアーゼ阻害剤が挙げられる。本課題で扱う、ウシ膵臓由来トリプシン阻害剤 (Bovine pancreatic trypsin inhibitor; BPTI) はその一つである。BPTI は、分子量 6.5 kDa の蛋白質でありセリンプロテアーゼのひとつトリプシン蛋白質に強く結合し ($K_D = \sim 10^{-14}$ M)、その酵素活性を阻害する。BPTI は、 $^5Cys-^{55}Cys$, $^{14}Cys-^{38}Cys$ および $^{30}Cys-^{51}Cys$ 間の 3 箇所分子内ジスルフィド結合を形成している。これらのジスルフィド結合の精密な立体配座は X 線結晶回折法から解明されており、本考案手法の実証実験に適している。また、 $^{14}Cys-^{38}Cys$ 間のジスルフィド結合については、同蛋白質の活

性部位に位置しその配座が複数の異なる配座間の動的平衡にある事が報告されている。

(3) □炭素上のメチレンを選択的に重水素化する技術は既に開発済みであり、異なったプロキラル水素を同時に観測するための SAIL システイン ($2R,3RS$)- $[3-^{13}C;3-^2H]$ システインを新たに合成し、それらにより選択標識を施した BPTI 試料を用いて新たな手法開発を実施する。さらに、これらの SAIL システインを利用した S-S 結合周囲の動態の研究についても新たな手法開発を試みる。

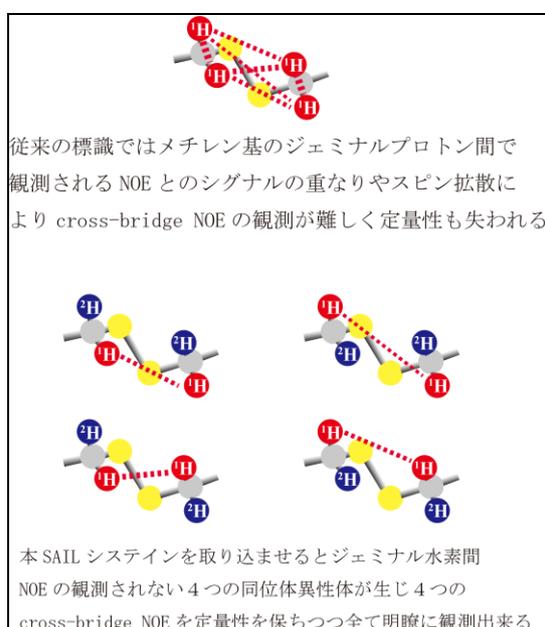
3. 研究の方法

(1) メチレン基の *pro-R*, あるいは *pro-S* の 1H を 2H に置き換えた二種類の SAIL アミノ酸を同時に取り込ませた BPTI 蛋白質を利用して、S-S をはさんだ $H\beta-H\beta$ 間 NOE を観測し、S-S 結合の位置を同定する。準備研究より ($2R,3RS$)- $[3-^{13}C;3-^2H]$ システインの合成法は確立している。本システインの安定同位体標識パターンは、システインの β 位の炭素が ^{13}C , ひとつの β 水素が 1H とし、他の炭素、水素は全て ^{12}C , 2H の安定同位体標識パターンを持つ。本アミノ酸の β 位は立体選択性がなく、($2R,3R$)- $[3-^{13}C;3-^2H]$ システインと ($2R,3S$)- $[3-^{13}C;3-^2H]$ システインの等量混合物ともみなせる。



(2) BPTI の $^5Cys-^{55}Cys$, $^{14}Cys-^{38}Cys$ および $^{30}Cys-^{51}Cys$ 間における S-S をはさんだ $H\beta-H\beta$ 間 NOE の検出を最初の目標とする。BPTI のシステイン β 位の 1H , ^{13}C シグナルの帰属は立体特異的帰属も含め完了している。本同位体標識法が本課題において必要不可欠であることを示すため、均一 ^{13}C 標識システイン選択標識試料も調製し比較対象とする。従来の非重水素化、ランダム重水素化試料では、観測したい S-S をはさんだ $H\beta-H\beta$ 間 NOE シグナルに加えて、同一メチレン基内の $^1H-^1H$ 間に高い強度のジェミナル NOE シグナルが観測される。そのため、取得した NOE スペクトルは複雑なため、解析が困難になると予想される。これに対して、SAIL システ

イン選択標識体では、メチレン基内の片方の¹Hが²Hに立体選択的に置換されているため、同一メチレン基内 NOE は観測されない。その結果、目的の S-S を挟むメチレン基間 NOE の同定が容易に行えると考えた。S-S 結合近傍に存在するシステイン以外のアミノ酸に含まれる¹H核が、システイン H β シグナルの広幅化、NOE のスピン拡散を生じ、観測したい S-S 結合内の NOE 検出を妨げる可能性は考えられる。この問題点は、システイン以外のアミノ酸に含まれる¹Hを²Hに置換することで回避出来ると考えられる。そこで、システイン以外を重水素化した BPTI 試料を調製し、軽水素体のものとの間で、NOE シグナル強度の混合時間依存性、および最適混合時間設定時における強度を比較する。



(2) H $\beta^s(i)$ -H $\beta^s(j)$ 間, H $\beta^s(i)$ -H $\beta^r(j)$ 間, H $\beta^r(i)$ -H $\beta^s(j)$ 間, H $\beta^r(i)$ -H $\beta^r(j)$ 間の 4 つの S-S をはさんだ H β -H β 間 NOE シグナルの相対強度から、S-S 結合の立体配座を決定する。BPTI 結晶構造中の ⁵Cys-⁵⁵Cys、¹⁴Cys-³⁸Cys および ³⁰Cys-⁵¹Cys 間の S-S 結合の精密な立体配座は既知である。例えば ⁵Cys-⁵⁵Cys 間 S-S 決後の場合 H $\beta^r(i)$ -H $\beta^r(j)$ 間が 2~3 Å、H $\beta^s(i)$ -H $\beta^r(j)$ 間および H $\beta^r(i)$ -H $\beta^s(j)$ 間が 3-4 Å、H $\beta^s(i)$ -H $\beta^s(j)$ 間が 5-6 Å の距離にある。本課題では、この距離関係を反映した NOE パターンを明瞭に観測出来ることを実証する。

(3) BPTI の活性部位に存在する、¹⁴Cys-³⁸Cys 間のジスルフィド結合は複数の立体配座間の動的平衡状態にある。本 NOE 測定においては、同交換過程に対応する化学交換ピーク

を検出出来ると考えられる。

4. 研究成果

(1) (2*R*,3*RS*)-[3-¹³C;3-²H]システインにより選択標識し他のアミノ酸は重水素化した BPTI 蛋白質を調製した。発現には、大腸菌 (BL21(DE3)株) 発現システムを利用した。発現に際しては、重水 M9 培地を用い、SAIL システインを IPTG 誘導の直前に添加することにより効率良く添加アミノ酸を目的蛋白質に取り込ませた。調製試料の質量分析、NMR 測定の結果、目的蛋白質は、同 SAIL システインによる標識率が 67 %、重水素化率が 96%以上となった。

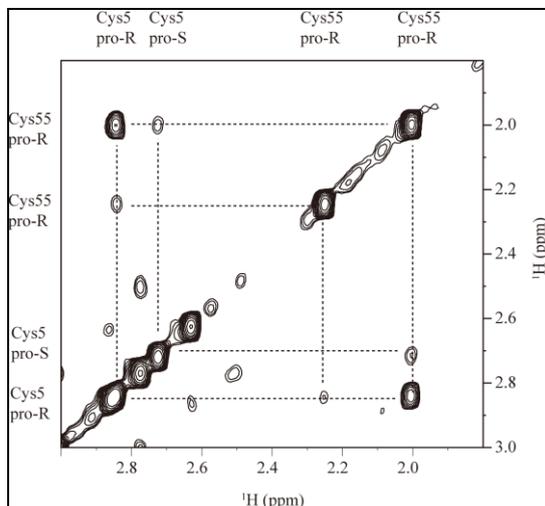
(2) 調製した (2*R*,3*RS*)-[3-¹³C;3-²H]システインラベル化 BPTI 試料の 2 次元 [¹H,¹H] NOESY スペクトルの測定の結果、目的の cross-bridge NOE を明瞭に観測することに成功した。従来の均一 ¹³C 標識蛋白質と比較して、以下の改善点が認められる。

① 観測対象となる Cross-bridge NOE 以外の NOE が観測されず、スペクトルが単純化された。特に、高強度のシステインのメチレン基内ジェミナル NOE が観測されない点はスペクトルの質の向上に大きく寄与している。

② Cross-bridge NOE の混合時間に対する強度曲線を比較すると、従来の標識体に比べて、(2*R*,3*RS*)-[3-¹³C;3-²H]システイン選択ラベル体においてはスピン拡散が大幅に抑えられている。システイン β プロトンの縦緩和時間 (T₁)を比較すると、従来の標識パターンに比べて、SAIL 標識体が 2-4 倍程度長くなることを確認した。例えば、10 度の条件下では、従来の均一 ¹³C システイン標識体において、NOE 混合時間が 200 ミリ秒程度において、ピーク強度の減衰が生じ始めるが、SAIL 標識体においては、混合時間 500 ミリ秒の時点でもピーク強度の上昇が見られる。この観測結果は、SAIL タンパク質におけるスピン拡散の抑制も示している。混合時間を長く設定できることは、近距離間に比べて強度が低い 4 Å 超の遠距離 NOE を観測するのに適している。

③ BPTI の各 cross-bridge NOE の交差緩和定数より算出した β プロトン間の距離が、BPTI 結晶構造における同距離と良く一致した。NOE 混合時間に対する cross-bridge NOE のピーク強度変化に対して線形回帰を行い、その交差緩和定数を求めた。また、別にペー

タ炭素におけるスピン緩和解析を行い分子全体の回転相関時間を算出した。この交差緩和速度と回転相関時間より、各βプロトン間の実効距離を算出した。算出した実効距離はBPTI結晶構造中の距離と良く一致した。同結果は、本手法の精度が高いことを示す。



(3) BPTI 分子中の ^{14}Cys - ^{38}Cys 間 S-S 結合の立体配座の変化に対応する化学交換ピークを検出出来た。同 SS 結合は、その ^{38}Cys の χ_1 が +60 度の主状態と -60 度の稀な状態との間の平衡状態にある。通常の直接測定では、同 minor conformation はその割合が 2% 程度しかなく、交換による広幅化も生じるため、検出は難しい。本標識体における NOESY スペクトルにおいても、その対角ピークは検出出来なかったが、興味深いことに major 成分と minor 成分との間の化学交換ピークは明瞭に観測された。この結論は、従来の方法では難しい存在比率の少ない立体配座状態のシグナルの検出法としての利用の可能性を示す。

(4) 4つのβプロトン間距離情報が得られると、18種類存在する SS 結合の立体配座を 2~3種類に絞り込まれてくる。従来の NMR タンパク質の動力学構造計算過程では、各αおよびβプロトンと周囲のプロトンとの NOE 距離情報を利用しているが、ここに本手法により得られたβプロトン間距離情報を追加することで、立体配座を一義的に決めることが可能になると考えられる。

5. 主な発表論文等 (研究代表者には下線)

[雑誌論文] (計 7 件)

① Takeda M, Jee J, Ono AM, Terauchi T,

Kainosho M. "Hydrogen exchange rate of tyrosine hydroxyl groups in proteins as studied by the deuterium isotope effect on C(zeta) chemical shifts." *J. Am. Chem. Soc.* 2009, 131, 18556-18562 (査読有)

② Takeda M, Ono AM, Terauchi T, Kainosho M. "Application of SAIL phenylalanine and tyrosine with alternative isotope-labeling patterns for protein structure determination." *J. Biomol. NMR*, 2010, 46, 45-49 (査読有)

③ Takeda M, Jee J, Terauchi T, Kainosho M. "Detection of the sulfhydryl groups in proteins with slow hydrogen exchange rates and determination of their proton/deuteron fractionation factors using the deuterium-induced effects on the ^{13}C (beta) NMR signals." *J. Am. Chem. Soc.* 2010, 132, 6254-6260. (査読有)

④ Takeda M, Hallenga K, Shigezane M, Waelchli M, Löhr F, Markley JL, Kainosho M. "Construction and performance of an NMR tube with a sample cavity formed within magnetic susceptibility-matched glass." *J. Magn. Reson.* 2011, 209, 167-173. (査読有)

[学会発表] (計 4 件)

① Mitsuhiro Takeda, Akira Mei Ono, Tsutomu Terauchi, Masatsune Kainosho, "Application of SAIL phenylalanine and tyrosine residues with different isotope labeling patterns for structure", Asia-Pacific NMR, 2009.10.25, Jeju Korea

② 武田光広, 甲斐荘正恒, SAIL 芳香族アミノ酸による蛋白質の構造・動態解析、第 48 回 NMR 討論会、2009.11.10、福岡

③ Mitsuhiro Takeda, Akira M Ono, Tsutomu Terauchi, JunGoo Jee, Masatsune Kainosho, "NMR Hydrogen Exchange Study of Tyrosine Hydroxyl and Cysteine Sulfhydryl Groups by Deuterium Isotope Shift Effects" Joint EUROMAR 2010 and 17th ISMAR Conference, 2010.07.04, Florence Italy

④ 武田光広, Chun-Jiun Yang, JunGoo Jee, 小野明, 寺内勉, 甲斐荘正恒, 蛋白質側鎖

OH/SH の水素交換速度の解析、第 49 回
NMR 討論会、2010.11.15、東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

武田 光広 (TAKEDA MITSUHIRO)
名古屋大学・理学研究科・研究員
研究者番号：90508558

(2) 研究分担者 なし

(3) 研究連携者 なし