

## 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25日現在

機関番号： 22604  
 研究種目： 若手研究（B）  
 研究期間： 2010年～2011年  
 課題番号： 22770106  
 研究課題名（和文） 非均一サンプリングNMR法のデータ検証ツールの確立と  
 難しいタンパク質への応用  
 研究課題名（英文） Development of safe non-uniform sampling processing method and its  
 application into proteins  
 研究代表者 Jee Jun Goo（ジー ジュン グー）  
 首都大学東京・戦略研究センター・准教授  
 研究者番号： 50381554

## 研究成果の概要（和文）：

(1) 本研究ではNUSデータから出るbaselineの歪みはスペクトルの強いピークが原因であることを明らかにした。特にNOEスペクトルでは強い対角ピークが間接軸方向に強いbaselineの歪みを生じることを証明した。本研究では対角ピークが出ないNOEスペクトルに非均一サンプリング法適用する測定法でこの問題点を解決した。

(2) 3次元均一低密度サンプリング(uniform sparse sampling、US)法で測定したデータを3次元に構築することなしに2次元で利用するプロトコルを確立した。この場合間接軸の化学シフト値が変わり、NOEスペクトルから従来の方法で自動構造計算を行うのは困難である。本研究ではCYANAを改良しこの問題を解決した。

## 研究成果の概要（英文）：

The aim of this study is to establish an integrated tool for non-uniform sampling (NUS) in multidimensional NMR for challenging the structures of proteins that are difficult to be determined with conventional NMR experiments. In this study, there were two advances. (1) We clarified that the distorted baselines in NUS spectra are mainly caused by strong peaks. By combining NUS and experiments that do not yield diagonal peaks in NOESY experiments, we could safely apply NUS method into NOESY data. (2) By modifying CYANA to handle with the chemical shifts in sparse sampling experiments, we could determine the structure of proteins without reconstructing the sparsely sampled data into 3D format.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物化学

キーワード：非均一低密度サンプリング、多次元NMR法、自動構造計算

## 1. 研究開始当初の背景

核磁気共鳴法(NMR)は元来感度が低い物理現象を基盤とするが、高磁場の開発、低温プローブの登場を含む装置の発展により感度は上昇している。それでも生体高分子の三次元構造を正確に決定するためのデータを得るには、まだ高濃度の試料( $> 0.1$  mM)と数週間にも及ぶ測定時間が必要である。

近年、多次元 NMR では既存の方法よりも測定時間を大きく短縮することができる新しい実験法が発表されている。これらには (i) 新しいハードウェア (ii) スキャンとスキャン間の T1 回復時間の短縮 (iii) 低密度サンプリング(sparse sampling)という、三つのコンセプトが利用されている。低密度サンプリングはまた、サンプリングスケジュールの規則性可否にしたがって、均一(uniform)と非均一(non-uniform)に分けることができる。均一サンプリングには GFT、PR(Projection-Reconstruction)、APSY などの実験法が含まれる。非均一サンプリング(non-uniform sampling、NUS)は均一サンプリングに比べ、サンプリング数の減少に由来するノイズが、サンプリングのランダム化によって最小化される利点がある。スペクトルの分解能は、入力時間ドメインの最大値に比例するので、従来の NMR 実験法による結果と同程度の分解能を持つスペクトルを NUS-NMR によってより短時間で測定することができる。

## 2. 研究の目的

本研究では (1) 非均一サンプリング(non-uniform sampling、NUS) NMR とそのプロセッシング法である最大エントロピー法(MaxEnt)と多次元分解法(MDD)の検証ツールを確立し、NMR 実験とサンプルの条件に合う信用できる NUS スケジュールを実行前に決めることを可能にすること、(2) この結果から従来 NMR で構造研究が困難だったタンパク質の構造研究を可能にすることを目的としている。

特に、低濃度タンパク質( $< 0.05$  mM)と巨大タンパク質( $> 50$  kDa)を構造研究するため、日本発のユニークな新技術である立体整列同位体標識(SAIL)タンパク質を共に利用し、感度と分解能面で NUS-NMR との相乗効果を期待する。

## 3. 研究の方法

MFT は MaxEnt/MDD と違い、DFT と同じく順方向アルゴリズムである。MFT による結果は分解能と感度が MaxEnt/MDD より落ちると言われている。ベースラインのアーティファクト

を完全に除くこともできない。しかし、アルゴリズム上、誤った結果が出ることは無いと考えられる。申請者はこの MFT と MaxEnt/MDD 結果の比較が検証のツールになると考えている。少なくとも、MFT のピークが無い領域に出た MaxEnt/MDD のピークはプロセッシングのエラーと判断することが可能である。本研究は、(1) MFT による三次元 NUS-NMR データのプロセッシング法を確立する、(2) 多様なスケジュールと感度を持つ NUS-NMR データをシミュレーションし、MaxEnt、MDD、MFT でプロセッシング、その結果を比較する、(3) これにより NUS-NMR データの MaxEnt/MDD プロセッシングの検証ツールを確立し、NMR 測定前に実験とサンプルの条件に適した信用できる NUS スケジュールを作成することを可能にする、(4) この結果から従来 NMR で構造研究が困難だったタンパク質の構造研究を行う、という手順で進む。

## 4. 研究成果

(1) 本研究では NUS データから出る baseline の歪みはスペクトルの強いピークが原因であることを明らかにした。特に NOE スペクトルでは強い対角ピークが間接軸方向に強い baseline の歪みを生じることを証明した。本研究では対角ピークが出ない NOE スペクトルに非均一サンプリング法適用する測定法でこの問題点を解決した。

(2) 3次元均一低密度サンプリング(uniform sparse sampling、US)法で測定したデータを3次元に構築することなしに2次元で利用するプロトコルを確立した。この場合間接軸の化学シフト値が変わり、NOE スペクトルから従来の方法で自動構造計算を行うのは困難である。本研究では CYANA を改良しこの問題を解決した。

## 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 12 件)

(1) N. Sekiyama, J. Jee, S. Isogai, K. Akagi, T.H. Huang, M. Ariyoshi, H. Tochio, and M. Shirakawa (2012) NMR analysis of Lys63-linked polyubiquitin recognition by the tandem ubiquitin-interacting motifs of Rap80. *J. Biomol NMR.* 52, 339-350.

(2) M. Takeda, J.-G. Jee, A.M. Ono, T. Terauchi, and M. Kainosho (2011) Hydrogen

Exchange Study on the Hydroxyl Groups of Serine and Threonine Residues in Proteins and Structure Refinement Using NOE Restraints with Polar Side-Chain Groups. *J. Am. Chem. Soc.* 133, 17420-17427.

(3) Y. Miyanoiri, M. Takeda, J.-G. Jee, A. M. Ono, K. Okuma, T. Terauchi, and M. Kainosho (2011) Alternative SAIL-Trp for robust aromatic signal assignment and determination of the  $\chi$  (2) conformation by intra-residue NOEs. *J. Biomol. NMR* 51, 425-435.

(4) K. Kim, B.I. Khayrutdinov, C.K. Lee, H.-K. Cheong, S.W. Kang, H. Park, S. Lee, Y.-G. Kim, J.-G. Jee, A. Rich, K.K. Kim\*, and Y.H. Jeon (2011) Solution structure of the Z $\beta$  domain of human DNA-dependent activator of IFN-regulatory factors and its binding modes to B- and Z-DNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 108, 6921-6926.

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

(6) K. Furuita, S. Murata, J.-G. Jee, S. Ichikawa, A. Matsuda, and C. Kojima (2011) Structural feature of bent DNA recognized by HMGB1. *J. Am. Chem. Soc.* 133, 5788-5790.

(7) B.-H. Kim, M. Kim, C.-H. Yin, J.-G. Jee, C. Sandoval, H. Lee, E. Bach, D.-H. Hahm, and G.-H. Baeg (2011) Inhibition of JAK3 alleviates inflammation in monoarthritic rats. *Br. J. Pharmacol.* 164, 101-118.

(8) A. Sato, M. Mishima, A. Nagai, S.-Y. Kim, Y. Ito, T. Hakoshima, J.-G. Jee, and K. Kitano (2010) Solution structure of the HRDC domain of human Bloom syndrome protein BLM. *J. Biochem.* 148, 517-525.

(9) M. Takeda, J.-G. Jee, T. Terauchi, and M. Kainosho (2010) 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  $^{13}\text{C}$  NMR signals. *J. Am. Chem. Soc.* 132, 6254-6260.

(10) J.-G. Jee, T. Mizuno, K. Kamada, H.

Tochio, Y. Chiba, K.-I. Yanagi, G. Yasuda, H. Hiroaki, F. Hanaoka, and M. Shirakawa (2010) Structure and mutagenesis studies of the C-terminal region of licensing factor Cdt1 enable the identification of the key residues for binding to replicative helicase Mcm proteins. *J. Biol. Chem.* 285, 15931-15940.

(11) K. Furuita, J.-G. Jee, H. Fukada, M. Mishima, and C. Kojima (2010) Electrostatic interaction between oxysterol binding protein and VAMP-associated protein-A revealed by NMR and mutagenesis studies. *J. Biol. Chem.* 285, 12961-12970.

(12) B.-H. Kim, J.-G. Jee, C.-H. Yin, C. Sandoval, S. Jayabose, D. Kitamura, E.A. Bach, and G.-H. Baeg (2010) NSC114792, a novel small molecule identified through structure-based computational database screening, selectively inhibits JAK3. *Mol. Cancer* 9, 36-48.

[学会発表] (計0件)

[図書] (計0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

J e e J u n G o o (ジー ジュンゲー)

首都大学東京・戦略研究センター・准教授

研究者番号： 5 0 3 8 1 5 5 4

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：