

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 3 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23370056

研究課題名(和文) 超高感度タンパク質NMRシグナル帰属技術

研究課題名(英文) TECHNOLOGY OF NMR SIGNAL ASSIGNMENTS OF PROTEINS WITH HIGH SENSITIVITY

研究代表者

河野 俊之 (KOHNO, TOSHIYUKI)

北里大学・医学部・講師

研究者番号：40416657

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,400,000円、(間接経費) 4,620,000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帰属できるように2つの方法を開発した。まず、すでに我々が開発しているMAGICAL法について各種測定プログラムの改良を行い、測定感度を30%程度向上させることができ、低濃度の試料を短時間で解析することができるようになった。また、新たにメジャーコドンのtRNAとマイナーコドンのtRNAを使い分けることによるアミノ酸残基番号選択的な安定同位体標識方法を開発した。これらの方法を用いることで従来のNMR解析方法に必要であったタンパク質濃度の1/100以下の濃度でシグナル帰属解析が可能になり、様々な分野への貢献が期待できる。

研究成果の概要(英文)： We have improved and/or developed two methods for NMR signal assignments of large proteins with less amount of sample. At first, we improved NMR pulse programs for MAGICAL method that we previously developed with the intelligent stable isotope labeling techniques. As a result, the sensitivity of NMR measurements was dramatically enhanced by 30%. Second, we developed a new method for site-directed stable isotope labeling by changing two kinds of tRNAs of major codon and minor codon for the same amino acid. With these methods, it was indicated that NMR signals of proteins could be assigned which were difficult to analyze by using traditional NMR techniques.

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：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

1. 研究開始当初の背景

近年、NMRによるタンパク質解析は、タンパク質の立体構造決定、タンパク質・タンパク質相互作用解析、タンパク質・低分子相互作用解析及びそれを利用した創薬まで用いられるようになり、ますますその重要性を増してきている。しかし、これらのタンパク質NMR解析を有効に活用するためには、ターゲットとなるタンパク質のNMRシグナルの帰属の作業が必須である。タンパク質NMRシグナルの帰属において現在使われている方法は、3次元NMRを複数測定し解析する方法である。しかし、この方法による解析では、シグナルの分散が良好であり溶解度も1 mMに近い試料濃度が必要であるなど試料の状態が理想的な場合にのみ確実に適用できるものであり、適用可能なタンパク質が非常に限られている。よって、タンパク質を超微量かつ超低濃度でNMRシグナル帰属・解析する方法が開発できれば、上記タンパク質の解析方法を十分に活用し、NMRによるさまざまなタンパク質の解析に多大な貢献ができる。

研究代表者らは、高分子量で不安定なタンパク質でも低濃度で簡便にNMRシグナル帰属可能な新規方法を開発してきた。まず、コムギ胚芽無細胞タンパク質合成系を使い、NMR解析が可能な安定同位体標識タンパク質を合成し、実際にNMR解析することに世界に先駆けて成功している。また、20種類のアミノ酸を完全選択的に安定同位体標識しNMRシグナルを簡略化する方法を開発した。さらにその方法をさらに発展させ、1種類のアミノ酸を $^2\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ 標識し、残りの19種類のアミノ酸を $^2\text{H}/^{15}\text{N}$ 標識した20種類の組み合わせのタンパク質を無細胞合成系により調製し、それぞれのタンパク質に対して2次元HN(CO)/HN(CA)/H(N)CA/H(NCO)CA/H(N)CO/H(NCA)CO-TROSYを測定することで従来法に必要な濃度の1/10程度の低濃度の目的タンパク質を用いて、より高分子量で不安定なタンパク質のNMRシグナルを簡便に帰属する方法(MAGICAL法(Method for AssiGnment with Intelligent Combinatorial Amino acid Labeling))を開発することで20 μM 程度の低濃度でのNMRシグナルの帰属を可能にし、さまざまなタンパク質に適用してきた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、研究代表者らが開発してきたMAGICAL法をさらに発展させるとともに、ピンポイントの安定同位体標識技術を新たに開発することで、従来の3次元NMR解析方法では数10 mgかつ1 mM程度の濃度が必要であったタンパク質NMR解析を、1 mg以下かつ10 μM 以下の濃度で可能にしようとするものである。また、この方法を適用することにより、従来法では解析が不可能であった分子量10万Da以上のタン

パク質のNMRシグナル帰属が可能になるので、高分子量タンパク質に適用可能な他の方法と組み合わせ、高分子量タンパク質の相互作用解析や高分子量タンパク質へのリガンドの結合部位の決定が可能になることが期待される。

MAGICAL法を用いると、分子量5万Da以上のタンパク質を200 μM 以下の濃度で解析可能なことを確認済みである。しかし、この方法にはまだまだ拡大・発展の余地がある。そこで、本研究では、安定同位体標識方法をさらに工夫することで、NMRシグナル帰属に必要な目的タンパク質の濃度を従来のMAGICAL法の1/10以下に下げることが第一の目的とする。そして、改良されたMAGICAL法を用いて実際に超微量タンパク質や高分子量タンパク質のNMRシグナルの帰属を行い、残余双極子法、Cross Saturation法やTransferred Cross Transfer法と組み合わせることで、生体分子相互作用をNMRにより解析する方法の確立を目指すことを第二の目的とする。

本研究を遂行することにより、タンパク質の立体構造解析にNMRをさらにより広い範囲で活用することができる。また、研究代表者らはNMRに加えてX線結晶解析も日常的に行っている。そこで、X線結晶解析とNMR解析の両方の手法を有機的に結びつけることで、新たな研究や研究分野の創造に貢献することも期待できる。

3. 研究の方法

本研究では、1種類のアミノ酸を $^2\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ 標識し、残りの19種類のアミノ酸を $^2\text{H}/^{15}\text{N}$ 標識した20種類の組み合わせのタンパク質を調製し、それぞれのタンパク質に対して2次元HN(CO)/HN(CA)/H(N)CA/H(NCO)CA/H(N)CO/H(NCA)CO-TROSYを測定することで従来の3次元NMR法に必要な濃度の1/10程度の低濃度の目的タンパク質を用いて、より高分子量で不安定なタンパク質のNMRシグナルを簡便に帰属する方法(MAGICAL法(Method for AssiGnment with Intelligent Combinatorial Amino acid Labeling))について、さらに高感度でNMR測定が行えるようなパルスプログラムの改良を試みる。またMAGICAL法と組み合わせるために、標的タンパク質の狙った部位だけのNMRシグナルを取得するためにピンポイント安定同位体標識技術の開発を試みる。タンパク質のアミノ酸残基番号選択的な安定同位体標識技術については、ストップコドンを用いた方法や4塩基コドンを使用した方法などが考えられるが、本研究においては、より高収量のピンポイント安定同位体標識体が得られることが期待されるマイナーコドンを使用した技術を開発する。

具体的には以下のように進めていく。

(1) MAGICAL法におけるパルスプロ

グラムの改良

MAGICAL法に用いるNMRパルスプログラムは、通常解析に用いる3次元NMRパルスプログラムを2次元版に変えたものであるが、このプログラムは均一に安定同位体標識されたタンパク質に最適化されており、MAGICAL法に最適化されていない。そこで、パルスプログラムの各種パラメータを改良し、MAGICAL法標識のタンパク質に最適化されたパルスプログラムを開発する。このことにより、測定感度を2倍～5倍程度に向上させることを目指す。

(2) ピンポイント安定同位体標識技術の開発

ピンポイント安定同位体標識技術においては、アミノ酸残基番号選択的な安定同位体標識を行うために、タンパク質合成系において、メジャーコドンとマイナーコドンの切り分けを行う。ほとんどのアミノ酸は、複数のコドンにコードされており、2種類以上のtRNAによって翻訳が行われている。そこで、例えば特定のロイシン残基だけを選択的に安定同位体標識するためには、その残基に対応するコドンをUCAやUCGなどのマイナーコドンに変換し、その他のロイシン残基をCCU/CCC/CCA/CCGのメジャーコドンにしておく。そして、マイナーコドンに対応するtRNAに安定同位体標識されたロイシンをロイシルtRNA合成酵素を用いて結合させ、メジャーコドンに対応するtRNAに非標識のロイシンを同じくtRNA合成酵素を用いて結合させる。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投入することにより、ねらったロイシン残基だけに安定同位体標識を導入することができる。このとき、アミノアシルtRNAが分解されやすいため、伸長因子(EF-Tu)などを加え、分解を抑えることも検討する。また、無細胞合成系にすでに含まれているロイシルtRNA合成酵素がアミノ酸転移反応を起こして標識アミノ酸と非標識アミノ酸がスクランブルすることを防ぐため、アミノアシルtRNA合成酵素の阻害剤を加えることも検討する。合成したタンパク質のNMRスペクトルを取得し、残基番号選択的にNMRシグナルが観測されるか、また、どのくらい低濃度でNMRシグナルの帰属が可能かを確認する。方法が確立できたら、より高分子量のタンパク質についてこの方法を適用し、残基番号選択的にNMRシグナルが帰属できるかを確認する。

4. 研究成果

研究代表者らが開発したMAGICAL法は、特殊な安定同位体標識を20通り行ったタンパク質試料を無細胞タンパク質合成系により調製し、2次元HN(CO)/HN(CA)/H(N)CA/H(NCO)CA/H(N)CO/H(NCA)COを測定することで従来法に必要な濃度の1/10程度の低濃度の試料を用いて、より高分子量のタ

ンパク質NMRシグナルを簡便に帰属可能な方法である。このMAGICAL法において、より高感度に測定ができるように各種測定プログラムの改良を行い、測定感度を30%程度向上させることができた。

次に、アミノ酸残基番号選択的な安定同位体標識方法の創製のために、タンパク質合成系において、メジャーコドンとマイナーコドンの切り分ける技術を開発した。まず、この目的のために必要な無細胞タンパク質合成系に使用する、大腸菌の各種アミノアシルtRNA合成酵素遺伝子、tRNA遺伝子およびtRNA修飾酵素遺伝子のクローニングを行い、ほぼ全ての対象遺伝子のクローニングと大量発現系構築を完了した。そして、メジャーコドンとマイナーコドンの切り分けの最初のターゲットであるロイシルtRNA合成酵素、イソロイシルtRNA合成酵素、メチオニルtRNA合成酵素、伸長因子(EF-Tu)の大量培養および高純度精製を行った。そして、イソロイシンなどのアミノ酸に対応するマイナーtRNAの遺伝子を用いて、各種tRNAをRNAポリメラーゼを用いた転写反応によって大量調製を行った。ピンポイント安定同位体標識を行う最初のモデルタンパク質としてFKB506結合タンパク質(FKBP)を用い、アミノ酸残基番号選択的な安定同位体標識を行った。その結果、アミノ酸残基番号選択的な安定同位体標識を試みたところ、研究代表者らが構築した系が問題なく適用可能なが示された。また、無細胞タンパク質合成において伸長因子(EF-Tu)を加えておくことによりアミノアシルtRNAの分解を抑えることができた。

次により高分子量のタンパク質についてピンポイント安定同位体標識方法が適用でき、NMRシグナルを簡便に帰属できることを確かめるため、モデルタンパク質を高分子量タンパク質であるマルトース結合タンパク質(MBP, 387残基、分子量42,000)に変えて、イソロイシンのコドンについてメジャーコドンとマイナーコドンの切り分けを行い、アミノ酸残基番号選択的な安定同位体標識を試みた。イソロイシンのマイナーtRNAの遺伝子を用いて、RNAポリメラーゼを用いた転写反応によってtRNAの大量調製を行い、さらにtRNAの機能発現に必要なリジンの修飾塩基を修飾酵素を用いて導入した。そして、これらの材料をもとに、様々なイソロイシンの部位にアミノ酸番号選択的に¹⁵N標識したイソロイシンを組み込み、¹H-¹⁵N HSQCのNMR測定を行った。すでに、他の方法で帰属してあるMBPの¹H-¹⁵N HSQCスペクトルと比較したところ、狙った部位に正しく安定同位体標識イソロイシンが組み込まれていることを確認できた。以上のことより高分子量タンパク質の¹H-¹⁵N HSQCシグナルの帰属に本研究の方法が有効であることが示された。

本研究が進めば、従来のNMR解析方法に必要なであったタンパク質濃度の1/100以下の濃

度でシグナル帰属解析が可能になり、様々な分野への貢献が期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

Tanio, M. Kusunoki, H. and Kohno, T., ¹H, ¹³C and ¹⁵N backbone resonance assignments of the monomeric human M-ficolin fibrinogen-like domain secreted by *Brevibacillus choshinensis*, *Biomol. NMR Assign.*, **8**, 207-211 (2014) doi: 10.1007/s12104-013-9484-4. 査読有

〔学会発表〕(計1件)

谷生 道一、楠 英樹、河野 俊之、
Preparation of secretory proteins produced by *Brevibacillus choshinensis* for NMR study、第52回 NMR 討論会、金沢、2013年11月12日～14日

6. 研究組織

(1)研究代表者

河野 俊之 (TOSHIYUKI KOHNO)

北里大学・医学部・講師

研究者番号：40416657

(2)研究分担者

無し

(3)連携研究者

無し