

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 6月 5日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011 ~ 2012

課題番号：23770111

研究課題名（和文）

核磁気共鳴法による巨大蛋白質の立体構造の新規解析法の開発

研究課題名（英文） Development of new method in structural analysis for larger proteins using nuclear magnetic resonances

研究代表者

宮ノ入 洋平 (MIYANOIRI YOHEI)

名古屋大学・理学研究科・特任助教

研究者番号：80547521

研究成果の概要（和文）：核緩和機構を制御した新規芳香族アミノ酸を開発し、効率よく目的蛋白質に導入する方法を確立した。このアミノ酸を分子量 82kDa の巨大蛋白質に導入し、芳香環 CH シグナルを高感度かつ先鋭的に観測し、帰属する事に成功した。また、芳香環シグナルとメチル基およびアミド基との間の距離情報を高精度に解析する方法も確立した。このことにより、従来の方法では困難であった巨大蛋白質の溶液立体構造の決定が可能となった。

研究成果の概要（英文）：We have developed new SAIL aromatic amino acids which are optimized relaxation properties in aromatic ring and successfully observed extremely well-separated aromatic CH cross peaks in TROSY experiment, even for an 82kDa *E. coli* malate synthase G (MSG) protein. Using our new SAIL aromatic CH TROSY method, we could clearly assign many NOE signals among aromatic CH, methyl and amide signals which are very important for determining the precise structure of large molecular proteins.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：構造生物学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物化学

キーワード：NMR・蛋白質

## 1. 研究開始当初の背景

NMR 法による構造解析の最大の利点は、蛋白質をはじめとする生体高分子の立体構造を、実際の生体内の環境に近い、溶液内において研究できる点にある。溶液内において、蛋白質は様々な時空間領域で揺らいでおり、そのような立体構造の揺らぎは蛋白質の生物機能の発現にとって極めて重要な意味を持つと信じられている。このような背景から、多くの研究者が NMR 法を用いて、様々な蛋白質の立体構造と揺らぎを通じて、各蛋白質の持つ固有の生物機能が発現される仕組みの

原子レベルでの解明を目指している。

しかしながら、NMR 法の適用にあたっては“分子量の壁”という難点が存在する。即ち、解析対象となる蛋白質の分子量が増大すると、増加した NMR シグナル同士の重なりにより、個別シグナルの分離観測が困難となる。更に、分子量の増大に伴い蛋白質の回転相関時間が長くなるために、核スピン間の磁気双極子相互作用等による NMR シグナルの広幅化が加わり、NMR スペクトルの観測や解析は著しく困難となる。このために、通常の NMR 手

法を用いた場合、構造解析対象となる蛋白質の分子量は、実質的には 25kDa 以下程度の比較的小さな蛋白質に限られてきた。この“分子量の壁”を打破すべく、様々な手法が開発されてきた。これらの手法に共通する原理は、観測対象とする蛋白質中の水素原子を重水素置換することにより、 $^1\text{H}$ -NMR シグナルを間引き、且つシグナルを先鋭化しようとするものである。この手法の究極的な形が立体整列同位体置換 (Stereo-array isotope labeling : SAIL) 法であり、分子量 40kDa 程度の高分子量蛋白質の立体構造を迅速、且つ精密に決定することが可能となった [Kainosho 等, *Nature* (2006)]. SAIL 法の持つ利点は、全てのアミノ酸残基のプロキラル基を全て立体選択的に重水素置換する等、NMR 測定・解析を容易にし、また得られ得る構造情報の質を大幅に高めるための高度な安定同位体標識が施されたアミノ酸 (SAIL アミノ酸) からもたらされる。しかしながら SAIL アミノ酸の持つ潜在的な利点はこれまで十分に開拓されてはいなかった。本研究は SAIL アミノ酸を用いて選択的に標識した蛋白質を調製することにより、従来は不可能であった様々な構造情報を得るための手法開発の一環として位置づけられるものである。

選択的 SAIL 標識蛋白質を用いた研究としては、蛋白質中のチロシン残基の水酸基やシステイン残基の SH 基の水素交換速度を測定する新しい手法の開発等に利用されてきた。本代表者は、SAIL 芳香族アミノ酸の新しい応用に着目し、研究を進めてきた。芳香族アミノ酸は、蛋白質内部で疎水性コアを形成して、立体構造形成を担うばかりでなく、分子表面にも存在し、蛋白質-蛋白質相互作用、蛋白質-リガンド相互作用などの生物機能にも関わる。しかしながら、通常の均一  $^{13}\text{C}$ -標識蛋白質においては、芳香環由来の NMR シグナルは複雑なスピン結合により低分子量蛋白質であってもそれらの解析は容易ではなかった。代表者は SAIL-Trp を DNA 結合蛋白質 Myb の核酸結合ドメインに導入し、それらのインドール環シグナルを全て観測・帰属を行い、更に Trp 残基側鎖の立体配座解析手法の開発にも成功した。本研究過程において、SAIL-Trp の芳香環  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  シグナルの TROSY

効果が通常の均一  $^{13}\text{C}$ -標識蛋白質で報告されている 2D ct-TROSY-(H)C(C)H-COSY と比較し、圧倒的に大きく表れることを見出した。このことから、さらに分子量の大きい蛋白質を SAIL 芳香族アミノ酸により選択的に標識し、異なった外部磁場強度で TROSY  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC スペクトルを測定し高分子量蛋白質の芳香環シグナルの観測と帰属の可能性を検討することにした。従来の、 $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  TROSY により主鎖アミド基、及び  $^{13}\text{C}$ -メチル基の  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMQC (Methyl TROSY) によるメチル基の NMR シグナルのみが観測可能であった分子量 100kDa を越えるような巨大蛋白質の構造研究に、もし Trp、Phe、Tyr といった芳香族アミノ酸の芳香環シグナルが加わればそのインパクトは計り知れないものがある。

## 2. 研究の目的

本研究では、NMR 法を利用して、80kDa 以上の高分子量蛋白質の溶液内における立体構造の新しい解析方法を開発する。現在、50kDa を越えるような高分子量蛋白質においては、側鎖メチル基と主鎖アミド基以外の NMR 情報が得られないために、生物機能を解明する上で必要とされる水準での構造解析は不可能である。本代表者は、SAIL 芳香族アミノ酸を利用する新たな高分子量蛋白質の芳香環シグナルの測定・帰属手法を開発し、分子量 82kDa の蛋白質 (MSG: マレイン酸合成酵素 G) の精密立体構造決定を行う。

## 3. 研究の方法

(1) 核緩和機構を制御した、新規 SAIL 芳香族アミノ酸を設計する。

(2) 新規 SAIL 芳香族アミノ酸を特異的に目的蛋白質に標識する調製技術を確立する。確立した選択 SAIL 蛋白質調製法を用い、MSG を含め分子量の異なる数種の巨大蛋白質の NMR 試料を調製する。

(3) 分子量 82kDa の MSG を用いて、芳香環シグナルの観測及び帰属を行う。

(4) 帰属が確定した芳香環シグナルとアミド基及び Ile、Leu 及び Val 残基のメチル基との間の NOE を測定し MSG の構造解析を実施する。

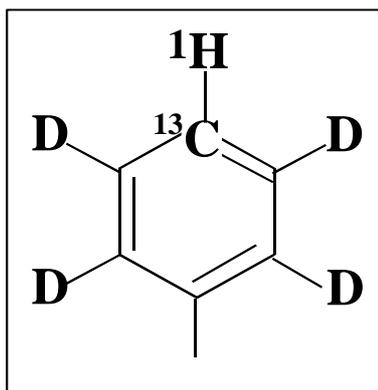
(5) MSG より分子量の大きい蛋白質への

適用を検討し、その限界を見極める。

#### 4. 研究成果

##### (1) 核緩和機構を制御した SAIL 芳香族アミノ酸の設計

NMRシグナルの広幅化は、観測対象となる原子に隣接する原子による核緩和の影響により引き起こされる。そこで、芳香族アミノ酸の芳香環に対して、核緩和過程を最適化した安定同位体標識パターンを設計した。具体的に、Phe 残基のζ位の CH シグナルを観測する為に、ζ位炭素のみ  $^{13}\text{C}$  標識を施し、さらにζ位以外の水素( $^1\text{H}$ )を重水素(D)に置換した(図1)。このことにより、ζ位  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$  原子団に関与する緩和過程を極限まで排除する事が可能となり、NMRシグナルを先鋭的に観測できることが期待できる。同様な概念に則して、Phe, Tyr, Trp 及び His 残基の芳香環に対して核緩和機構を制御した新規 SAIL 芳香族アミノ酸を開発した。



[図1. ζ位の核緩和機構を制御した Phe]

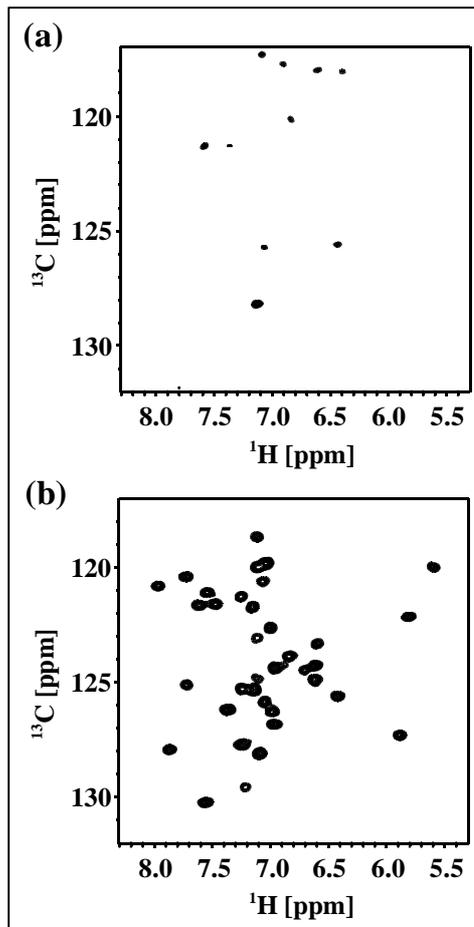
##### (2) SAIL アミノ酸特異的標識蛋白質調製法の確立

従来、SAIL アミノ酸を目的蛋白質に導入する際には、無細胞蛋白質合成反応が利用されていた。しかしながら、NMR 解析に必要な量を調製する事が困難な場合が多々あり、汎用性が乏しかった。そこで、汎用性の高い、

大腸菌による蛋白質生合成法を利用した SAIL アミノ酸特異的標識法の検討を行った。各種アミノ酸に対し、培養培地への添加量や、培養条件を詳細に検討した。その結果、発現量を損なうことなく、SAIL アミノ酸を特異的かつ高効率に目的蛋白質に導入する方法を確立した。実際に、数 mg の SAIL アミノ酸を利用するだけで、NMR 測定に必要な MSG を調製する事が可能となった。このことにより、従来の無細胞蛋白質合成法を利用する場合と比較して、安価に SAIL 標識試料を調製する事が可能となり、SAIL-NMR 法の汎用性を大幅に広げる事が出来た。また、本手法では、芳香族アミノ酸のみならず、様々なアミノ酸を特異的かつ高効率に標識する事が可能である事が分かり、巨大蛋白質の立体構造解析において、より多くのアミノ酸が観測対象となり得ることが見出された。

##### (3) 芳香環 CH シグナルの観測・帰属

分子量 82kDa の MSG 蛋白質を利用して、核緩和機構を制御した SAIL 芳香族アミノ酸の効果を確認した。まず、従来の NMR 法で利用されている均一  $^{13}\text{C}$ 、 $^{15}\text{N}$  安定同位体標識された Trp 残基を MSG に導入し、Aromatic CH TROSY スペクトルを測定し、Trp インドール環 CH シグナルの観測を試みた。しかしながら、シグナル感度は極めて低く、解析する事は不可能であった(図2a)。一方、核緩和機構を制御した新型 SAIL-Trp 残基を利用したところ、Aromatic CH TROSY スペクトルは劇的に改善され、MSG 中のすべての Trp 残基のインドール環 CH シグナルを高感度且つ先鋭的に観測する事に成功した(図2b)。同様に、MSG 中の Phe 残基、Tyr 残基及び His 残基の芳香環 CH シグナルについても、核緩和制御 SAIL アミノ酸を利用する事で、非常に高感度に観測する事に成功した。



[図 2. (a) 均一  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$  Trp 及び、(b)核緩和機構を制御した SAIL-Trp で標識された MSG の Aromatic CH TROSY スペクトル]

さらに、個々のアミノ酸に対して変異を施した試料を用意して、芳香環 CH シグナルを配列特異的に帰属した。具体的には、Trp を Phe や Tyr に、Phe を Tyr や Leu に置換した。各々の変異体について、Aromatic CH TROSY を測定し、野生型のスペクトルと比較する事により、MSG 中の Trp 残基の  $\delta$ 1、 $\eta$ 2、 $\epsilon$ 3 位及び Phe 残基の  $\zeta$ 位の CH シグナルを帰属する事に成功した。

尚、一部の Phe 残基に関しては、アミノ酸変異により、MSG の不安定化を引き起こしてしまい、シグナルを帰属する事は困難であった。このような場合には、対象となる残基に隣接するアミノ酸に変異を施す事や、アンバーコードン法などを利用した部位特異的なアミノ酸標識技術を利用する事も、今後検討された。また、このようなシグナル帰属法では、多くの試料を準備しなければならないとい

う欠点もみられる。今後は、アミノ酸変異や部位特異的な標識法に依存しないシグナル帰属法を検討する。

#### (4) 芳香環 CH シグナル由来の NOE 解析

SAIL 芳香族アミノ酸と Ile, Leu, Val 残基のメチル基を同時に安定同位体標識した MSG を調製し、分子間 NOE の解析を行った。3次元  $^{13}\text{C}$  NOESY の解析により、X 線結晶構造より期待される分子間 NOE シグナルを高感度に観測する事に成功した。芳香環やメチル基は、蛋白質内部で疎水コアネットワークを形成する事が多く、蛋白質の立体構造決定において、重要な役割を担っている。その為、芳香環—メチル基間の残基間 NOE を、高感度かつ正確に捉える事は、巨大蛋白質の立体構造決定に必要な不可欠な技術となる。一方で、巨大蛋白質中には、多くのメチル基が存在している。従来のアミノ酸前駆体を利用したメチル基の安定同位体標識法では、アミノ酸選択的な標識が不可能であり、メチルシグナルの縮重などが生じ、NOE シグナルの帰属に大きな障害をもたらしている。そこで、本研究課題で培った選択アミノ酸標識技術と核緩和制御 SAIL アミノ酸技術を利用して、Leu および Val 残基について、メチル基の立体配座特異的に安定同位体標識を施した新型 SAIL Val/Leu を開発し、アミノ酸特異的に目的蛋白質に標識する方法を確立した。その結果、MSG において、メチルシグナルの縮重を大幅に軽減する事に成功し、芳香環 CH—メチルシグナル間の NOE を非常に正確かつ簡便に帰属する事に成功した。

#### (5) より巨大な蛋白質への適用

ここまで、分子量 82kDa の MSG 蛋白質を中心に、核緩和制御 SAIL アミノ酸による新規立体構造解析法を確立してきた。本手法の適応範囲を明らかにするため、分子量が約 1MDa となる、GroEL-GroES 複合体についても適用した。MSG に利用した新型 SAIL-Phe/Tyr を GroEL-GroES 複合体に導入したところ、高感度に芳香環 CH シグナルを観測する事に成功した。このことから、本手法が様々な巨大蛋白質、蛋白質複合体に適用する事が可能であり、非常に汎用性の高い解析法であることを

示した。

#### (6) 今後の展望

核緩和機構を制御した SAIL 芳香族アミノ酸と大腸菌蛋白質生合成系を利用した新しいアミノ酸特異的標識技術を利用する事により、巨大蛋白質の溶液精密立体構造の新規解析法を確立する事に成功した。核緩和機構の制御技術は芳香環 CH シグナルのみならず、アミノ酸のあらゆる原子団に適用する事が可能である。今後は、多くのアミノ酸に対し、核緩和制御型の新規 SAIL アミノ酸を開発し、巨大蛋白質の観測対象を増やす事で、より精密な立体構造解析法の確立を目指す。また、これらの SAIL アミノ酸を利用して、残基内 NOE 解析による、新たなシグナル帰属法を確立し、より正確かつ簡便な構造解析手法を開発し、本手法を次世代の構造生物学における基盤技術へと拡張する事を目指す。

#### 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3件)

① Ihara M, Hamamoto S, Miyanoiri Y, Takeda M, Kainosho M, Yabe I, Uozumi N, Yamashita A. Molecular bases of multimodal regulation of a fungal transient receptor potential (TRP) channel. *Journal of Biological Chemistry*. 査読有, in press, 2013, DOI:10.1074/jbc.M112.434795.

② Miyanoiri Y, Takeda M, Kainosho M. Stereo-array isotope labeling method for studying structure and dynamics. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 査読無, 992, 2012, pp. 83-93, DOI:10.1007/978-94-007-4954-2\_5.

③ Miyanoiri Y, Takeda M, Jee J, Ono AM, Okuma K, Terauchi T, Kainosho M. Alternative SAIL-Trp for robust aromatic signal assignment and determination of the  $\chi$  (2) conformation by intra-residue NOEs. *Journal of Biomolecular NMR*, 査読有, 51(4), 2011, pp. 425-435, DOI:10.1007/s10858-011-9568-3.

[学会発表] (計7件)

① 宮ノ入洋平, 武田光広, 大熊宏昌, 小野明, 寺内勉, 甲斐荘正恒, SAIL 法による巨大蛋白質の新規立体構造解析法の開発、第51回 NMR 討論会、2012年11月8-11日、ウイנקあいち (愛知県名古屋市)

② Miyanoiri Y, Takeda M, Ono AM, Okuma K, Terauchi T, Kainosho M, SAIL aromatic CH TROSY to investigate larger proteins、International Conference on Magnetic Resonance in Biological Systems LYON 2012, 2012年8月19-24日、Lyon Convention Centre (Lyon, France)

③ Miyanoiri Y, Takeda M, Jee J, Ono AM, Okuma K, Terauchi T, Kainosho M, SAIL aromatic CH TROSY to investigate larger proteins and protein complexes、The international Symposium on Nuclear Magnetic Resonance 2011, 2011年11月15-18日、大さん橋ホール (神奈川県横浜市)

④ Miyanoiri Y, Takeda M, Jee J, Ono AM, Okuma K, Terauchi T, Kainosho M, Various applications of SAIL aromatic amino acids for NMR studies of proteins、The 4<sup>th</sup> Asia-Pacific NMR Symposium, 2011年10月16-19日、Central Garden Beijing Hotel (Beijing, China)

[その他]

ホームページ等

<http://str.bio.nagoya-u.ac.jp:8080/Plone/753265908358>

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

宮ノ入 洋平 (MIYANOIRI YOHEI)  
名古屋大学・理学研究科・特任助教  
研究者番号: 80547521

##### (2) 研究分担者 なし

##### (3) 連携研究者 なし