

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 28 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25840021

研究課題名(和文)核磁気共鳴法による巨大蛋白質多量体の動態解析法の開発

研究課題名(英文)Development of the new method for dynamics analysis in large molecular protein-protein complex using nuclear magnetic resonance

研究代表者

宮ノ入 洋平(Miyanoiri, Yohei)

名古屋大学・理学(系)研究科(研究院)・特任助教

研究者番号：80547521

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では、分子量884kDaの巨大蛋白質複合体であるGroEL-ES複合体について、核磁気共鳴法を用いて、蛋白質複体内に存在する運動性を捉える手法を開発した。代表者は蛋白質を構成するアミノ酸に対し、部位特異的に高度な安定同位体標識を施すことにより、GroEL-ES複合体の核磁気共鳴信号を高感度に観測する手法を確立し、複合体の形成に伴う運動性の変化を捉えることに成功した。本手法を利用する事により、多くの生体高分子複合体について立体構造、動的側面から生体機能を明らかにすることが期待できる。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the dynamic properties of GroEL-ES protein complexes, We have developed new relaxation optimized Stereo-Array Isotope labelling (SAIL) method. Using new relaxation optimized SAIL amino acids, we could succeed in observing well-separated aromatic, aliphatic and methyl CH signals for GroEL-ES complex. And we could detect the changes in structural fluctuations in several amino acids in GroEL and GroES upon forming GroEL-ES complex. These dynamics may play an important role for controlling a biological function of GroEL-ES complex.

Our new SAIL NMR method will be useful for structural dynamics study in many macromolecular protein complexes.

研究分野：構造生物学

キーワード：NMR 蛋白質動態

1. 研究開始当初の背景

核磁気共鳴 (NMR) 法による立体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。溶液内では、蛋白質は様々な時空間領域でゆらいでおり、さらに蛋白質同士の会合と解離も頻繁に起こっている。このような蛋白質の動態は、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。そこで、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動態を通じて、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」と「不均一状態」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困難となる。また、蛋白質同士や蛋白質 - リガンド間の会合と解離が混在した状態が加わると、NMR スペクトルは、さらに複雑になり、先鋭なシグナルを得ることは非常に困難になる。このため、通常の NMR 手法を用いた場合、構造解析対象となる蛋白質は、実質的には分子量 25kDa 程度の比較的小さな蛋白質で、且つ単量体などの均一な状態で安定に存在する試料に限られてきた。これらの問題を解決すべく、特に見かけの分子量を減少させる様々な安定同位体標識手法が開発されてきた [Ohki 等, *Prog. Nucl. Magn. Reson.* (2008)]。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事により、¹H-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、立体整列同位体標識 (Stereo-array isotope labeling; SAIL) 法である。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、立体選択的に重水素置換する等、高度な安定同位体標識が施された SAIL アミノ酸からもたらされている。これにより、従来手法では困難であった分子量 40kDa の高分子量蛋白質についても、立体構造を迅速かつ精密に決定する事が可能となった [Kainosho 等, *Nature* (2006)]。また、選択 SAIL 標識蛋白質を利用する事で、アミノ酸側鎖の水酸基や SH 基の水素交換速度の測定法や Trp 残基側鎖の立体配座の解析法など、新しい立体構造、蛋白質動態の解析法が確立されてきた [Takeda 等, *J. Am. Chem. Soc.* (2009), (2010), (2011); Miyanoiri 等, *J. Biomol. NMR* (2011)]。さらに代表者等は、より高分子量の蛋白質の立体構造解析に向けて SAIL 法の改良を進め、NMR シグナルの広幅化の原因となる

核緩和機構を制御した新たな SAIL アミノ酸を開発してきた。その結果、分子量 82 kDa の蛋白質において、芳香環 CH シグナルを高感度且つ先鋭的に観測し、帰属する事にも成功した。さらに選択 SAIL 標識蛋白質の簡便な調製法の確立にも成功し、分子量 100 kDa 程度の高分子量蛋白質について精密な立体構造を決定できること見出し、NMR 法の分子量限界を大幅に拡張してきた。

このような背景から代表者は、この改良 SAIL 法を蛋白質複合体にも適用し、複合体形成に伴う立体構造及び動態変化の解析を試みたが、改良型 SAIL アミノ酸を利用しても、NMR シグナルを先鋭的に観測できないケースが見受けられた。例えば、シャペロニン GroEL 蛋白質は、2 回軸対称を持つ分子量 812kDa の 14 量体を形成するが、この場合、NMR シグナルは十分に観測される。しかし、基質となる変性蛋白質や、基質の巻き戻し反応に必須となる GroES が結合した GroEL-ES 複合体 (分子量 884kDa) では、NMR スペクトルは著しく悪化してしまった。これは、複合体形成に伴い、多量体の対称性が大きく崩れ、シグナルの縮重、広幅化が引き起こされた為と考えられる。このような非対称な多量体形成や多量体構造の会合・解離の交換過程の存在は、複雑な NMR スペクトルを提示する為、詳細な解析を困難にしているが、イオンチャネルの活性制御機構など様々な生命活動において、しばしばみられる現象である。従って、このような複雑な蛋白質複合体においても NMR シグナルを先鋭的に観測し、動的な非対称多量体構造を詳細に解析する事が、蛋白質複合体の機能発現機構の解明に必要とされる。本研究では、SAIL 法の有する潜在能力を最大限に応用し、この問題を解決する新手法の開発と位置づけられる。

2. 研究の目的

本研究では、NMR 測定に向けて核緩和機構を極限的に制御した新型 SAIL アミノ酸を開発し、それをシャペロニン GroEL-ES 複合体に導入し、基質巻き戻し反応等における動的な複合体形成過程を解析する方法を確立する。期間内の目標は、(1) 複数のアミノ酸に対し、観測対象とする原子の核緩和機構を極限的に制御した新型 SAIL アミノ酸を設計し、(2) 新型 SAIL アミノ酸を選択的に取り込ませ、他の全ての残基を重水素標識した GroEL14 量体を調製する。その後、(3) この試料を NMR 測定に供し、観測された新型 SAIL アミノ酸由来のシグナルの帰属を行う。(4) さらに、同試料に基質蛋白質や GroES 等を添加していき、各段階で NMR シグナルを帰属し、複合体形成・解離過程の動態を解析する手法を確立する。

3. 研究の方法

(1)新規核緩和制御型 SAIL アミノ酸の設計・確認。NMR 解析に向けた GroEL-ES 複合体の試料調製法の確立。

(2)GroEL-ES 複合体への新規核緩和制御型 SAIL アミノ酸の導入およびシグナル帰属

(3)GroEL-ES 複合体の動態解析

4. 研究成果

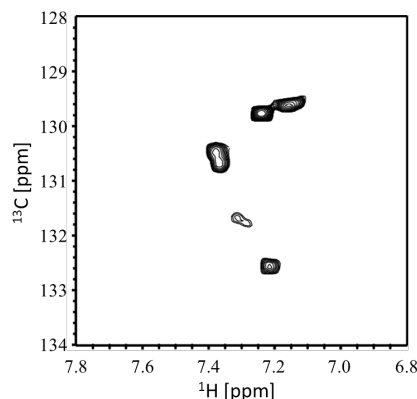
(1) 新規核緩和制御型 SAIL アミノ酸の設計・確認。NMR 解析に向けた GroEL-ES 複合体の試料調製法の確立。

GroEL-ES 複合体のような分子量 900 kDa にもものぼる試料の NMR スペクトルの観測に向けて、多角的に核緩和制御を施した新規 SAIL アミノ酸の設計を行った。

まず、ひとつめの方針として、核緩和機構を極限まで取り除き、分子量増大に伴うシグナルの広幅化を抑えることを目指した。従来の SAIL 技術では、観測対象をアミノ酸残基の特定の C-H 結合としており、その部位に ^{13}C , ^1H を選択的に標識していた。本手法では、更なる緩和過程を取り除くため、観測対象の C-H 結合に ^{13}C , ^2H を導入し、 ^{13}C シグナルを先鋭的に観測する事を目標とした。そこで Met 残基の C 位および Lys 残基の C 位を観測対象とした [^{13}C , ul- ^2H]-Met/Lys を設計し SAIL テクノロジーズ社へ合成依頼した。これら新規核緩和制御型 SAIL アミノ酸を、すでに大量発現・精製法が確立されている分子量 82kDa の MSG 蛋白質に導入し、NMR 測定の予備実験を行った。その結果、 ^{13}C シグナルを非常に先鋭的に観測する事に成功した。このことから、GroEL-ES 複合体においても、複雑な複合体状態を反映した NMR シグナルを観測できることが期待された。一方、シグナル観測に関して問題点も明らかになった。対象とする ^{13}C シグナルを先鋭的に観測するため、観測対象以外の原子は全て ^2H , ^{12}C , ^{14}N に標識されている。そのため、緩和源が極端に少なくなり、観測対象の ^{13}C の縦緩和時間が極端に長くなってしまい、NMR 測定に長い待ち時間が必要になってしまった。待ち時間短縮のために測定条件の最適化を行ったが、本課題で対象とする GroEL-ES 複合体では、さらに分子量が増大するため、測定時間短縮のためには、緩和源をコントロールするための更なる最適化が必須であることが明らかとなった。

そこで、いま一つの方針として、核緩和源が極端に不足する事を防ぐために、観測対象以外の水素原子に関しても、一部 ^1H 標識を施し、シグナルの線幅と縦緩和時間とのバランスを考慮し、シグナル測定に最適な条件を探索した。例えば、従来は Phe 残基の 位のシグナルを観測するためには、位の炭素、水素のみを NMR で観測可能な ^{13}C , ^1H で標識し、その他の Phe 残基内の原子や、Phe 以外のアミノ酸残基には NMR では観測できない

^2H , ^{12}C , ^{14}N で標識していた。しかし、この場合では、前述のように核緩和源が極端に不足し、観測対象となる ^{13}C や ^1H の縦緩和時間が長くなるため、高感度なシグナルを得るためには極端に長い実験時間を要してしまう。そこで、Phe 残基の 位や 位の水素についても ^1H 標識を取り入れ、緩和源を少しずつ増やし、位の縦緩和時間を短くするような標識を行った。その結果、従来では困難であった、GroEL-ES 複合体についても、Phe 位の CH シグナルを感度よく観測する事に成功した(図 1)。さらに、代表者らが開発した新規メチルシグナルの標識法(雑誌論文 : Miyanoiri 等, JBNMR(2013))を応用する事により、より効率的かつ選択的に緩和源を増やし、観測対象のシグナルの広幅化も抑えることに成功した。この緩和源調節の手法は、芳香環シグナルだけでなく、脂肪族 CH シグナルやメチルシグナルの観測にも応用できる。このことから分子量 1MDa にもものぼる巨大蛋白質複合体でも、あらゆる CH シグナルを感度よく観測するための新規核緩和最適化 SAIL アミノ酸の設計および試料調製法を確立できた。



[図 1: GroEL-ES 複合体の Phe CH のスペクトル]

(2)GroEL-ES 複合体への新規核緩和制御型 SAIL アミノ酸の導入およびシグナル帰属

新たに最適化された試料調製法に基づき、GroEL-ES 複合体および GroEL14 量体や GroES7 量体に Phe, Tyr および Met 残基を特異的に標識した試料を調製した。その後、NMR 測定に供し、Phe 残基の 位、Tyr 残基の 位、さらに Met 残基の 位のシグナルを観測する事に成功した。各シグナルの帰属に関しては、各 Phe 残基を Tyr 残基に、各 Tyr 残基を Phe 残基に、および各 Met 残基を Leu 残基に置換した変異体試料を調製し、野生型のスペクトルと比較する事で、確認した。

(3)GroEL-ES 複合体の動態解析

NMR シグナルの帰属により、GroEL-ES 複合体の形成に伴い、顕著なシグナル変化を捉える事ができた。例えば Tyr 残基 位 CH₃シグ

ナルは、GroES7 量体では、非常に先鋭的なシグナルを示していた。一方 GroEL-ES 複合体を形成すると、87 番目の Tyr 残基(Y87)の CH₃シグナルは顕著に広幅化してしまう現象が観測された。このことは Y87 付近では、GroEL-ES 複合体において、複数の構造間を揺らぐ動態が存在していることを示唆している。

また、Met 残基についても複合体形成に伴う動態変化を捉えることができた。315 番目と 542 番目の Met 残基 (M315, M542) のシグナルは GroEL14 量体では一本の先鋭的なシグナルを示していたが、GroEL-ES 複合体を形成すると、M315 と M542 のシグナルは各々が 2 つのシグナルを示すことが明らかとなった。このことから、GroEL-ES 複合体では、M315, M542 近傍において二つの異なる状態で揺らいでいる事が示された。

GroEL-ES 複合体は、すでに X 線結晶解析から立体構造が明らかにされているが、結晶構造からは、Y87 や M315, M542 近傍において異なる状態を示す知見は得られておらず、GroEL-ES 複合体の機能発現の解明に近づくことと期待された。これら残基が有する揺らぎについて、温度可変実験を行い、異なる構造間の交換速度を算出する事を目指したが、温度の低下に伴い、分子全体の回転相関時間が長くなり、非常に広幅化してしまうため、解析が困難となってしまった。また、GroEL14 量体と GroES7 量体から GroEL-ES 複合体を効率よく再構成することは困難を極め、NMR による滴定実験から、複合体形成に伴う上記残基の揺らぎの変化を捉えることは困難であった。

(4)今後の課題

本研究課題で開発した新規緩和最適化 SAIL アミノ酸、ならびに緩和源を調節する安定同位体標識手法の開発により、GroEL-ES 複合体のような巨大蛋白質複合体についても、芳香環、脂肪族およびメチルの ¹³C シグナルないし ¹³C-¹H シグナルを高感度の観測する事に成功した。それだけでなく、GroEL-ES 複合体について、従来の溶液 NMR 法や結晶構造では見出す事が出来なかった、Tyr 残基や Met 残基の揺らぎの存在を明らかにすることが出来た。GroEL-ES 複合体の機能発現機構を明らかにするためには、この揺らぎの変化を定量的に捉えることが必要だが、温度可変実験や複合体形成実験から揺らぎの交換速度を定量化するまでには至らなかった。これらの課題を克服するためには、観測対象とするアミノ酸残基を増やす事も必要であるが、定量的なデータを得るためには、測定条件を変化させて、揺らぎの変化を捉えることが重要となる。本課題では、温度可変実験を取り入れたが、温度の低下に伴い大幅な感度低下が現れ、解析は困難となってしまった。現在、代表者の所属する研究室では、高圧 NMR 測定法を開発中である。高分子量蛋白質や巨大蛋白

質複合体の揺らぎについて、圧力依存性を調べることにより、交換速度や活性化体積の変化として定量的に揺らぎを捉えることを、今後の課題として取り組む予定である。

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)

Sato T, Miyanoiri Y, Takeda M, Naoe Y, Mitani R, Hirano K, Takehara S, Kainosho M, Matsuoka M, Ueguchi-Tanaka M, Kato H. Expression and purification of a GRAS domain of SLR1, the rice DELLA protein. Protein Expression and Purification. 査読有, 95, 2014, 248-258, DOI:10.1016/j.pep.2014.01.006.

Takeda M, Miyanoiri Y, Terauchi T, Yang CJ, Kainosho M. Use of H/D isotope effects to gather information about hydrogen bonding and hydrogen exchange rates. Journal of Magnetic Resonance. 査読有, 241, 2014, 148-154, DOI: 10.1016/j.jmr.2013.10.001.

Miyanoiri Y, Takeda M, Okuma K, Ono AM, Terauchi T, Kainosho M. Differential isotope-labeling for Leu and Val residues in a protein by E. coli cellular expression amino acids. Journal of Biomolecular NMR. 査読有, 57(3), 2013, 237-249, DOI: 10.1007/s10858-013-9784-0.

[学会発表](計 4 件)

宮ノ入洋平, 武田光広, 楊淳竣, 寺内勉, 甲斐荘正恒, 高度な安定同位体標識技術を利用した高分子量蛋白質の立体構造解析法の開発、第四回岐阜構造生物学・医学・論理的創薬研究会シンポジウム、2015年3月5日、岐阜薬科大学(岐阜県岐阜市)

宮ノ入洋平, 石田洋二郎, 武田光広, 寺内勉, 井上正順, 甲斐荘正恒, 大腸菌生合成系を利用した新規 SAIL アミノ酸標識法の開発、第53回 NMR 討論会、2014年11月4-6日、大阪大学コンベンションセンター(大阪府吹田市)

Miyanoiri Y, Takeda M, Yang CJ, Terauchi T, Kainosho M, Structural analysis of large molecular proteins using SAIL method and non-uniform sampling, IPR seminar "Practical Aspects of in Non-uniform Sampling in Multidimensional NMR Spectroscopy & Applications for Biological Systems", 2014年6月18-19日、Nagoya University (Nagoya, Aichi)

宮ノ入洋平、武田光広、寺内勉、甲斐
莊正恒、高分子量蛋白質の立体構造解析に
向けた新規 SAIL アミノ酸標識法の開発、2013
年 11 月 12-14 日、石川県立音楽堂（石川県
金沢市）

〔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：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等
名古屋大学大学院理学研究科附属構造生物
学研究センター 甲斐荘グループ
<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・大学院理学研究科・特任助教
研究者番号：80547521

(2) 研究分担者 なし
()

研究者番号：

(3) 連携研究者 なし
()

研究者番号：