

平成 26 年 6 月 3 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24750014

研究課題名(和文) 固体NMRによる結晶化が困難なタンパク質のための構造解析法の開発

研究課題名(英文) Development of the structure analytical method for protein having difficulty in crystallization by the solid-state NMR

研究代表者

大橋 竜太郎 (OHASHI, Ryutaro)

金沢大学・物質化学系・助教

研究者番号：50533577

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、固体2次元交換核磁気共鳴測定を用いてアミノ酸の固体粉末試料の炭素核距離を解析した。試料には2つの炭素原子核を炭素13で標識したアミノ酸(ロイシン, アラニン)を用いた。解析の結果、アラニンのメチン基とメチル基の炭素核間距離(文献値は1.53 Å)は0.9～1.6 Åと見積もることができた。また、ロイシンのメチン基とカルボキシ基の炭素核間距離(文献値は1.53 Å)は1.6 Å以下と見積もられたが、距離の範囲の下限を見積もることができなかった。以上より、本手法は水素核が直接結合した炭素同士であれば、距離の範囲を見積もることができる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, the distances between two carbon nuclei in amino acids were estimated from time-dependence of signals recorded by measurements of two-dimensional exchange solid-state nuclear magnetic resonance. We analyzed two amino acids (l-Leucine, l-Alanine) which were labeled two carbon nuclei with carbon-13. We succeeded to estimate the distance between the two carbons of methine and methyl groups in l-Alanine from 0.9 to 1.6 angstroms. Although it was estimated that the distance between carbon nuclei of methine and carboxyl groups in l-Leucine was less than 1.6 angstroms, we could not estimate the lower limit of the distance of l-Leucine. From the above, it is indicated that ranges of distances among carbon nuclei directly-bonding hydrogen nuclei are possibly estimated.

研究分野：化学

科研費の分科・細目：基礎化学・物理化学

キーワード：分子構造 固体NMR

1. 研究開始当初の背景

タンパク質の立体構造は、その機能とも大きく関わっている。そのため、生命現象の解明、および創薬への応用や生体分子の工学的な応用にはタンパク質の構造情報が不可欠であり、X線結晶構造解析、溶液NMR (Nuclear Magnetic Resonance)などの方法を用いた構造解析が盛んに行われている。しかし、難溶性で結晶化が困難な膜タンパク質や繊維状タンパク質などの解析は、これらの手法では困難であった。**固体NMRは結晶化されていない粉末試料でも測定を行えるため、固体NMRを用いたタンパク質の構造解析法が希求されている。**

2. 研究の目的

(1) **固体2次元交換NMRを用いた炭素核間距離の解析法を確立を目指す。**この手法開発には、構造が既知の試料の2つの炭素核のみが炭素13で標識された、できるだけ単純な系を用いる。**標識された2つの炭素核間の距離の解析を行い、文献値と比較することで、開発した解析法の妥当性を示す。**

(2) 開発した解析法の有用性を示すために、まず微結晶化したタンパク質試料の構造解析とX線結晶構造解析の結果の比較を行い、**開発した解析法が妥当なものであることを示す。**次に、微結晶化していない粉末タンパク質試料の構造解析を行い、**結晶化が困難な試料でも解析可能であることを示す。**

3. 研究の方法

(1) 解析方法の検討のため、**2つの炭素原子核を炭素13で標識したアミノ酸 (I-Leucine, I-Alanine) を用いて固体2次元交換NMRを行い、本研究で開発した理論式を用いて、炭素核間距離の解析を行った。**また、固体2次元交換NMRを行う時の炭素間の相関を得るためのラジオ波照射の手法として、長距離の炭素間の相関を得られるDARR法を用いた。固体2次元交換NMRを用いた距離の解析では、NMR信号強度の時間依存性は、炭素核間距離とゼロ量子緩和と呼ばれる緩和の時定数に影響され、正確な距離を求めることが困難となる。そこで本研究では、固体2次元交換NMR測定を2つの実験条件で行い、両者を満たすような変数を探すことで、距離の解析を行った。

(2) **タンパク質試料 (ferredoxin) の粉末化条件を検討したところ、**硫安沈殿後アセトンで洗浄する条件が固体NMRに最も適していたため、この方法でFerredoxin粉末試料を作成した。次に**固体<sup>13</sup>C NMR信号の帰属のため、短い交換時間での炭素核間の固体2次元交換NMR測定を行った。**

4. 研究成果

【研究成果の概要】

本研究では、  
 (1) 理論式の計算：DARR法を用いた固体2次元交換NMRにおける**交換速度の理論式を導いた。**  
 (2) アミノ酸の解析：**2つの炭素核がどちらも水素核と結合している場合 (I-Alanine の解析) は、炭素核間の距離の範囲を求めることができた。**  
 (3) タンパク質試料の解析：**固体NMRに適した精製法を検討した。**また、固体NMR信号の帰属を試みたが、十分な分解能が得られず、帰属を行えなかった。

【研究成果の詳細】

(1) 理論式の計算  
 本研究では、まず、解析のためのDARR法を用いた固体2次元交換NMRの交換速度の計算を行った。DARR法による炭素間の交換速度の理論式の概要を図1に示す。図1のように、2つの炭素A、B間の交換速度  $k_{AB}$  は、炭素A、B間の距離  $r_{AB}$ 、ゼロ量子緩和の緩和時間  $T_R$ 、DARR法の実験条件によって異なる値となる炭素-水素間の相互作用の大きさ ( $D_{CH}$ ) に依存することが分かった。図中の  $n = 1$  or  $2$  はそれぞれDARR法の実験条件を示す。従来は、交換速度が炭素核間距離とゼロ量子緩和時間の2つの変数に依存するため、距離の精度を上げることが困難であった。しかしDARR法を用いた場合、CH相互作用の大きさを実験条件によって変えることが可能なため、異なる条件での測定を比較することで炭素核間距離  $r_{AB}$  とゼロ量子緩和時間  $T_R$  を分離できる可能性が示唆された。

図1：交換速度の計算式

$$k_{AB} \propto \frac{1}{r_{AB}^6} \cdot \frac{1}{1 + [D_{CH}(n=1 \text{ or } 2) T_R]^2}$$

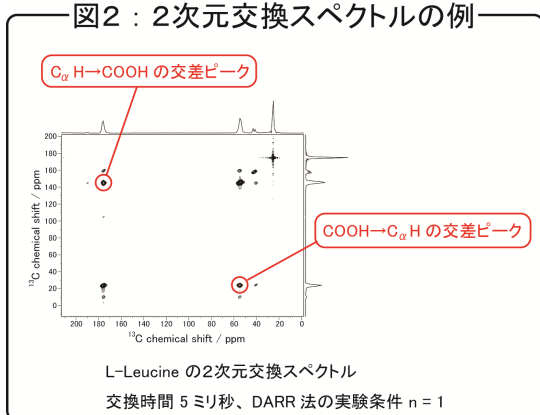
交換速度  $k_{AB}$ 、C-C間の距離  $r_{AB}$ 、ゼロ量子緩和時間  $T_R$ 、CHの相互作用 ( $D_{CH}$ ) (DARR法の照射条件によって異なる)

以上のように、**交換速度の理論式を導くことで、解析のための実験方法を考案することができた。**

(2) アミノ酸の解析

2次元交換NMRの測定結果  
 メチン基とメチル基を炭素13で標識したI-Alanineとメチン基とカルボキシ基を炭素13で標識したI-LeucineをDARR法の2つの条件 (図1の  $n = 1$  と  $n = 2$  の条件) による固体2次元交換NMR測定を行った。測定した2次元スペクトルの1例を図2に示す。図2の赤い丸で示したような、2次

図2：2次元交換スペクトルの例



元スペクトルの2つの交差ピークの強度は、対象となる炭素核間の距離、交換NMRの交換時間、DARR法の実験条件 ( $n = 1, 2$ ) などによって変化する。その2つの交差ピークの強度の交換時間に対して変化を図3に示す。

図3：交差ピーク強度の時間変化

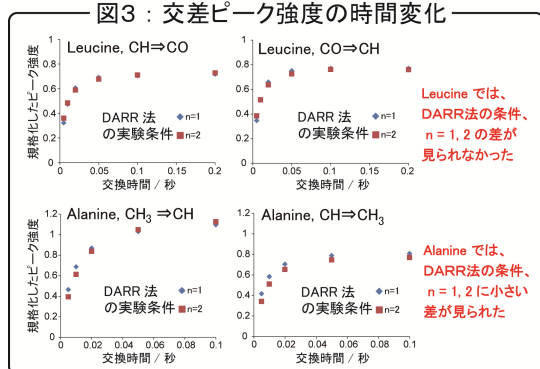


図3の上の2つのグラフが L-Leucine の2つの交差ピークの時間変化、下の2つのグラフが L-Alanine の2つの交差ピークの時間変化を示す。図中の青い四角がDARR法の実験条件が  $n = 1$  のとき、赤い四角が  $n = 2$  のときの結果を示す。この図のように、L-Leucine では  $n = 1, 2$  による違いはほとんど見られなかったが、L-Alanine では、小さな差を観測することができた。L-Alanine で標識したメチン基、メチル基はともに炭素核に水素核が直接結合しているため、CH間の相互作用が大きい。L-Leucine では、メチン基の炭素核には水素核が直接結合しているが、カルボキシ基の炭素核には水素核が直接結合していないため、CH間の相互作用がL-Alanine よりも弱い。このため、DARR法の実験条件、 $n = 1, 2$  の差が、L-Leucine では見られなかった、と考えられる。

#### 炭素核間距離の範囲の決定

図3のピーク強度を図1で示した交換速度の理論式を用いて解析することで、炭素核間の距離の範囲を求めた。その結果、L-Alanine では、 $n = 1, 2$  の違いを利用し、メチン基とメチル基の炭素核間距離 (文献値は 1.53) の範囲を 0.9 ~ 1.6 と見積もることができた。また、L-Leucine では、メチン基とカルボキシ基の炭素核間距離 (文献値は

1.53) の上限は 1.6 以下と見積もることができたが、距離の範囲の下限を見積もることはできなかった。

#### アミノ酸の解析のまとめ

以上より、**本手法は水素核が直接結合した炭素同士であれば、距離の範囲を見積もることができる可能性が示唆された。** 今後は、3つ以上の炭素核を炭素 1 3 で標識した試料を用いて、複数の炭素間距離の比較を行うことで、炭素間距離の精度を上げられると考えている。

### (3) タンパク質試料の解析

#### 精製法の検討

天然存在比のタンパク質試料 (ferredoxin 試料) を以下の8通りの方法で粉末化した試料の固体  $^{13}\text{C}$  NMRスペクトルを図4に示す (次ページ)。これらのスペクトルの分解能と、バッファー由来の粉末中の不純物の量などから、**精製法8が現時点では最も固体NMR測定に適した精製法であった。**

#### 【Ferredoxin の精製法】

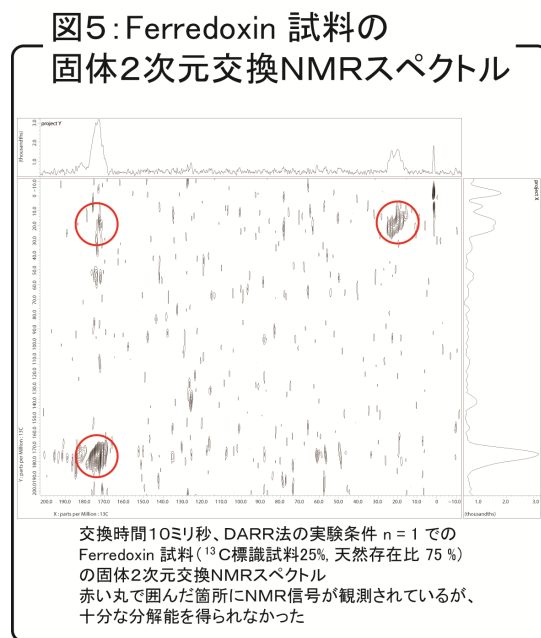
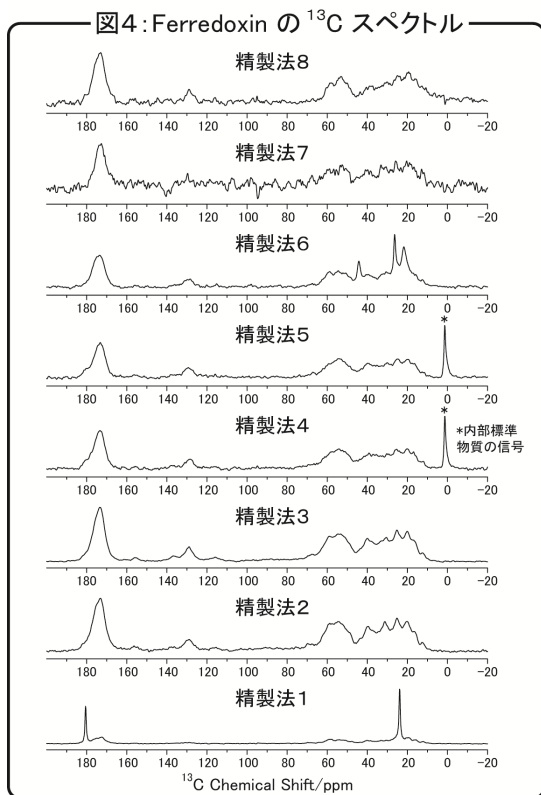
- 精製法 1 : 酢酸アンモニウムバッファーから凍結乾燥
- 精製法 2 : 酢酸アンモニウムバッファーからアセトンで沈殿させ、凍結乾燥
- 精製法 3 : 酢酸アンモニウムバッファーからアセトンで沈殿させ、水で洗って凍結乾燥
- 精製法 4 : 酢酸アンモニウムバッファーから水への透析による沈殿後、凍結乾燥
- 精製法 5 : 酢酸アンモニウムバッファーから水への透析による沈殿後、少量の水で洗って凍結乾燥
- 精製法 6 : 酢酸アンモニウムバッファーから硫酸沈殿後、少量の水で洗って凍結乾燥
- 精製法 7 : 水酸化ナトリウムバッファーから硫酸沈殿後、硫酸で洗って凍結乾燥
- 精製法 8 : 水酸化ナトリウムバッファーから硫酸沈殿後、アセトンで洗って凍結乾燥

#### NMR信号の帰属

全炭素を炭素 1 3 で標識した Ferredoxin 試料を作成し、天然存在比の試料と、標識 : 天然存在比 = 1 : 4 の割合で混合した試料を、精製法 8 で粉末化した。この混合は、分子間の相互作用をできるだけ抑制するために行った。この試料を用いて短い交換時間での炭素核間の固体 2 次元交換 NMR 測定を行ったが、図5に示した2次元スペクトルのように十分な分解能を得られず、NMR信号の帰属が出来なかった。

#### タンパク質試料の解析のまとめ

本研究で用いた Ferredoxin 試料に関しては、**硫酸沈殿後、バッファーを溶解し、タンパク質を溶解しない溶液 (今回はアセトン) で洗浄する方法が固体NMRに適した精製法であると考えられる。**



今後は同試料の精製法の更なる検討が必要と考えられる。また、炭素-窒素間の異種核間の固体2次元相関NMR，超高速試料回転を用いたNMR測定などを用いてNMR信号の帰属を行うことを検討中である。

#### 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 0 件)

[学会発表](計 2 件)

大橋 竜太郎、瀧澤 直樹、井田 朋智、水野 元博、  
固体2次元交換NMRによる炭素核間距離の解析法の開発、  
学会名：日本化学会第94春季年会(2014)、  
発表日：2014/3/27、  
学会会場：名古屋大学 東山キャンパス

大橋 竜太郎、笹川 匡裕、水野 元博、  
DARR照射下での $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$ 交換速度の計算、  
学会名：第51回NMR討論会(2012)、  
発表日：2012/11/8、  
学会会場：ウインクあいち(愛知県名古屋市)

[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：  
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

大橋 竜太郎 (OHASHI, Ryutaro)  
金沢大学理工研究域物質化学系・助教  
研究者番号：50533577

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：