

平成 30 年 6 月 27 日現在

機関番号：12701

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14681

研究課題名(和文) NMR分子置換法の開発

研究課題名(英文) NMR Molecular Replacement Method

研究代表者

児嶋 長次郎 (Kojima, Chojiro)

横浜国立大学・大学院工学研究院・教授

研究者番号：50333563

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：溶液NMRによる蛋白質の立体構造解析にはX線の分子置換法に相当する技術が存在せず、未だに立体構造決定に多大な時間を要している。そこで本研究ではNMRによる蛋白質の立体構造解析を劇的に高速化する新規手法の開発を目指し、大阪大学にて開発を進めている構造解析ソフトウェアMagROを拡張発展させた。最終的には150残基程度の小さな蛋白質であれば半日程度で完全自動での立体構造決定が可能となった。

研究成果の概要(英文)：Molecular replacement method is a key technique to accelerate the protein structure determination by X-ray crystallography. For NMR, no such method is available, and thus, it still takes time to determine protein structure. In this research, we have developed an NMR method to accelerate the protein structure determination. Our method is based on software MagRO and FLYA/CYANA developed by Prof Kobayashi and Prof Guentert, and validated by some NMR parameters, including RDC values. Finally, we have succeeded to determine protein structure fully automatically within half day.

研究分野：構造生命科学

キーワード：NMR 蛋白質 立体構造

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19(共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 溶液 NMR による蛋白質の立体構造決定には、化学シフト帰属・NOE 帰属・構造計算の 3 ステップが必要である。NOE 帰属と構造計算では自動化・高速化が大幅に進み (Herrmann, Güntert, Wüthrich, J Mol Biol 2002)、現在では化学シフト帰属のみがボトルネックとして残っている。世界中の多くの研究グループが化学シフト帰属の自動化・高速化に挑戦しているが、中でも Güntert 教授 (ゲーテ大) が開発したプログラム FLYA は固体 NMR のような重複の激しい系においても 8 割近い帰属精度を示すなど類似プログラムと比較して顕著に優れている (Schmidt, Güntert, J Am Chem Soc 2012)。化学シフト帰属・NOE 帰属・構造計算の 3 つのステップを一体的に最適化することで、さらに帰属精度が向上するが、それでも専門家によるマニュアル構造解析の精度には到達していない。一般的な立体構造解析に使用可能なレベルまで精度を向上させるには X 線の分子置換法の様な既知構造を直接参照する手法が効果的であると考えられているが、その様な手法は今まで開発されていない。そこで、研究代表者は類似蛋白質の既知構造を“構造計算ステップの鋳型として用い”、化学シフト帰属・NOE 帰属・構造計算の 3 つのステップを一体的に自動最適化することで“化学シフト帰属の自動化・高速化を達成し”、NMR による蛋白質の立体構造解析を劇的に高速化する「NMR 分子置換法」を開発することを着想した。

### 2. 研究の目的

溶液 NMR による蛋白質の立体構造解析には X 線の分子置換法に相当する技術が存在せず、未だに立体構造決定に多大な時間を要している。そこで本研究では NMR による蛋白質の立体構造解析を劇的に高速化する新規手法を開発する。

### 3. 研究の方法

#### (1) 自動化学シフト帰属の評価法の確立

阪大独自の NMR 統合解析ソフト MagRO を拡張発展させ、化学シフト帰属・NOE 帰属・構造計算の 3 ステップを一体的に自動最適化し、決定された立体構造を主鎖  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  の RDC 値で評価するシステムを構築する。

#### (2) 花成ホルモン受容体の試料調製

花成ホルモン受容体の立体構造決定を行うために、各種安定同位体標識体を作成する。まず初めに、主鎖帰属のための  $2\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$  均一標識体、および、構造情報を得るためのメチル基選択的軽水素

( $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ ) 標識体を作成する。さらに、研究代表者らが開発した大腸菌低温発現系を用いる高効率なアミノ酸選択標識法を適用し、線幅の広がりや信号の重なりが激しい

場合、構造情報が不足する場合等に対応する。

(3) 類似蛋白質の既知構造を鋳型として利用する完全自動 NMR 構造解析システムの開発

(1) で開発した簡易型完全自動 NMR 構造解析システムを自動化学シフト帰属の評価法として利用しつつ、高分子量蛋白質への適用が可能な類似蛋白質の既知構造を鋳型として利用する完全自動 NMR 構造解析システムを開発する。まず始めに、高分子量蛋白質の NMR 構造解析では常法となっているメチル基選択的軽水素標識体を用いたメチル領域の 4D 高分解能 NOESY を測定する。最初の試料は (1) でテスト済みの小さな蛋白質とし、簡易型完全自動 NMR 構造解析システムを適用することで自動化学シフト帰属の評価を行う。次に、MagRO を拡張発展させ、類似蛋白質の既知構造を鋳型として利用する完全自動 NMR 構造解析システムを開発し、(1) でテスト済みの小さな蛋白質に適用する。高分子量蛋白質に関してはシミュレーションを行い、決定可能な構造精度と構造決定に必要な構造情報の量を推定する。

#### (4) 花成ホルモン受容体の立体構造解析

(2) で準備した花成ホルモン受容体の試料を用い、TROSY 法などの高分子量蛋白質のための常法で NMR 測定を行う。さらに、(3) で検討したメチル領域の 4D 高分解能 NOESY 等を測定し、(3) で開発した類似蛋白質の既知構造を鋳型として利用する完全自動 NMR 構造解析システムを適用する。専門家でも帰属困難な高分子量蛋白質の 4D 高分解能 NOESY の解析には、鋳型構造を用いた自動帰属が最適だと考えられる。得られた立体構造の正確さや収束度を指標とし、構造情報が不足している場合は L/I/Y/F/T/V/A の各アミノ酸選択標識を行い、分子量 5 万の花成ホルモン受容体の完全自動 NMR 構造決定を試みる。

### 4. 研究成果

(1) 自動化学シフト帰属の評価法の確立では、Güntert 教授 (ゲーテ大) や小林博士 (連携研究者) らと共同で MagRO の機能拡張に取組み、150 残基程度の小さな蛋白質に適用可能な鋳型構造を用いない簡易型完全自動 NMR 構造解析システムを開発した。このシステムでマラリア原虫の FK506 結合蛋白質 (PkFKBP35) を評価した結果、専門家による構造解析 ( $R \approx 0.9$ ) と同レベルの精度であった。PkFKBP35 の結果は自動化学シフト帰属が専門家と同レベルの高い精度で得られていることを示している。そこで本システムを化学シフト帰属の評価法として確立するため、150 残基程度の PkFKBP35 以外の蛋白質にも本システム適用した。遺伝

病を引き起こす変異体4種に本システムを適用し、その立体構造決定に成功した。

最終的に、150残基程度の小さな蛋白質に適用可能な鋳型構造を用いない簡易型完全自動NMR構造解析システムの開発に成功し、自動化学シフト帰属の評価法を確立した。

(2) 花成ホルモン受容体の試料調製では、<sup>2</sup>H/<sup>13</sup>C/<sup>15</sup>N均一標識体の作成プロトコルを確立し、良好なNMRスペクトルを得た。また、構造情報に富むLeu, Ile, Tyr, Phe, Thr, Val, Alaについては<sup>13</sup>C/<sup>15</sup>N標識アミノ酸を選択標識する技術を開発した。また、無細胞蛋白質合成系などを活用して重水素標識やアミノ酸選択標識に成功した。

(3) 類似蛋白質の既知構造を鋳型として利用する完全自動NMR構造解析システムの開発では、メチル基選択的軽水素標識体を用いたメチル基領域の4D高分解能NOESYの測定とその解析に成功した。さらに、MagROを拡張発展させ、簡易型完全自動NMR構造解析システムにメチル領域の解析ルーチンを組み込むことにも成功した。

(4) 花成ホルモン受容体の立体構造解析では、主鎖の7割ほどの信号帰属に成功し、運動性に富む領域が存在することを見出した。

## 5. 主な発表論文等

### [雑誌論文](計 24 件)

(1) Miho Kaneko-Suzuki, Rie Ishikawa, Chiaki Terakawa, Chojiro Kojima, Misa Fujiwara, Izuru Ohki, Hiroyuki Tsuji, Ko Shimamoto, and Ken-ichiro Taoka\*. TFL1-like proteins in rice antagonize rice FT-like protein in inflorescence development by competition for complex formation with 14-3-3 and FD. *Plant Cell Physiol.*, 59, 458-468 (2018). 査読有. doi: 10.1093/pcp/pcy021.

(2) Toshihiko Sugiki, Kyoko Furuita, Toshimichi Fujiwara, and Chojiro Kojima\*. Current NMR Techniques for Structure-Based Drug Discovery. *Molecules*, 23, 148 (2018). 査読有. doi: 10.3390/molecules23010148.

(3) Natsuki Fukuda, Kentaro Noi, Lidong Weng, Yoshihiro Kobashigawa, Hiromi Miyazaki, Yukari Wakeyama, Michiyo Takaki, Yusuke Nakahara, Yuka Tatsuno, Makiyo Uchida-Kamekura, Yoshiaki Suwa, Takashi Sato, Naoki Ichikawa-Tomikawa, Motoyoshi Nomizu, Yukio Fujiwara, Fumina Ohsaka, Takashi Saito, Katsumi Maenaka, Hiroyuki Kumeta, Shoko Shinya, Chojiro

Kojima, Teru Ogura, and Hiroshi Morioka\*. Production of Single-Chain Fv Antibodies Specific for GA-Pyridine, an Advanced Glycation End-Product (AGE), with Reduced Inter-Domain Motion. *Molecules*, 22, 1695 (2017). 査読有. doi: 10.3390/molecules22101695.

(4) Yohei Miyanoiri, Atsushi Hijikata, Yuuki Nishino, Mizuki Gohara, Yasuhiro Onoue, Seiji Kojima, Chojiro Kojima, Tsuyoshi Shirai, Masatsune Kainosho, and Michio Homma\*. Structural and functional analysis of the C-terminal region of FliG, an essential motor component of Vibrio Na<sup>+</sup>-driven flagella. *Structure*, 25, 1540-1548 (2017). 査読有. doi: 10.1016/j.str.2017.08.010. Epub 2017 Sep 14.

(5) Yoshikazu Hattori, David Heidenreich, Yuki Ono, Toshihiko Sugiki, Kei-ichi Yokoyama, Ei-ichiro Suzuki, Toshimichi Fujiwara, and Chojiro Kojima\*. Protein <sup>19</sup>F-labeling using transglutaminase for the NMR study of intermolecular interactions. *J Biomol NMR*, 68, 271-279 (2017). 査読有. doi: 10.1007/s10858-017-0125-6.

(6) Jakub Sebera, Yoshikazu Hattori, Daichi Sato, David Reha, Radim Nencka, Takashi Kohno, Chojiro Kojima\*, Yoshiyuki Tanaka\*, and Vladimir Sychrovsky\*. The Mechanism of the Glycosylase Reaction with hOGG1 Base-Excision Repair Enzyme: Concerted Effect of Lys249 and Asp268 During Excision of 8-Oxoguanine. *Nucleic Acids Res.*, 45, 5231-5242 (2017). 査読有. doi: 10.1093/nar/gkx157

(7) Shoko Shinya, Mariana G. Ghinet, Ryszard Brzezinski, Kyoko Furuita, Chojiro Kojima, Sneha Shah, Evgenii L. Kovrigin\*, and Tamo Fukamizo\*. NMR Line Shape Analysis of a Multi-State Ligand Binding Mechanism in Chitosanase. *J Biomol NMR*, 64, 309-319 (2017). 査読有. doi: 10.1007/s10858-017-0109-6.

(8) Hisashi Tatebe\*, Shinichi Murayama, Toshiya Yonekura, Tomoyuki Hatano, David Richter, Tomomi Furuya, Saori Kataoka, Kyoko Furuita, Chojiro Kojima, and Kazuhiro Shiozaki\*. Substrate specificity of TOR complex 2 is determined by a ubiquitin-fold domain of the Sin1 subunit. *eLife*, 6, e19594 (2017). 査読有.

doi: 10.7554/eLife.19594.

(9) Toshihiko Sugiki, Toshimichi Fujiwara, and Chojiro Kojima\*. Cold-Shock Expression System in *E. coli* for Protein NMR Studies. *Methods Mol. Biol.*, 1586, 345-357 (2017). 査読有.  
doi: 10.1007/978-1-4939-6887-9\_23.

(10) Ju Yaen Kim, Misaki Kinoshita, Satoshi Kume, Guy T. Hanke, Toshihiko Sugiki, John E. Ladbury, Chojiro Kojima, Takahisa Ikegami, Genji Kurisu, Yuji Goto, Toshiharu Hase, and Young-Ho Lee\*. Noncovalent forces tune the electron transfer complex between ferredoxin and sulfite reductase to optimize enzymatic activity. *Biochem. J.*, 473, 3837-3854 (2016). 査読有.  
doi: 10.1042/BCJ20160658

(11) Takenori Dairaku, Kyoko Furuita, Hajime Sato, Jakub Šebera, Katsuyuki Nakashima, Jiro Kondo, Daichi Yamanaka, Yoshinori Kondo, Itaru Okamoto, Akira Ono, Vladimír Sychrovský\*, Chojiro Kojima\*, and Yoshiyuki Tanaka\*. The Structure Determination of AgI-mediated Cytosine-Cytosine Base Pair within DNA Duplex in Solution with  $^1\text{H}/^{15}\text{N}/^{109}\text{Ag}$  NMR Spectroscopy. *Chemistry*, 22, 13028-13031 (2016). 査読有.  
doi: 10.1002/chem.201603048.

(12) Nesreen Alsanousi, Toshihiko Sugiki, Kyoko Furuita, Masatomo So, Young-Ho Lee, Toshimichi Fujiwara, and Chojiro Kojima\*. Solution NMR structure and inhibitory effect against amyloid- $\beta$  fibrillation of Humanin containing a D-isomerized serine residue. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 477, 647-653 (2016). 査読有.  
doi: 10.1016/j.bbrc.2016.06.114.

(13) Kenichi Harada, Eiki Yamashita, Kento Inoue, Koji Yamaguchi, Toshimichi Fujiwara, Atsushi Nakagawa, Tsutomu Kawasaki, and Chojiro Kojima\*. Expression, purification, and crystallization of a plant-specific DUF1110 protein from *Oryza sativa*. *Acta Crystallogr. F Struct. Biol. Commun.*, 72, 480-484 (2016). 査読有.  
doi: 10.1107/S2053230X16007573.

(14) Masashi Yokochi, Naohiro Kobayashi, Eldon L. Ulrich, Akira R. Kinjo, Takeshi Iwata, Yannis E. Ioannidis, Miron Livny, John L. Markley, Haruki Nakamura, Chojiro Kojima, and Toshimichi Fujiwara\*.

Publication of nuclear magnetic resonance experimental data with semantic web technology and the application thereof to biomedical research of proteins. *J. Biomed. Sem.*, 7, 16 (2016). 査読有.  
2016 May 5;7(1):16.  
doi: 10.1186/s13326-016-0057-1

(15) Takenori Dairaku, Kyoko Furuita, Hajime Sato, Jakub Šebera, Katsuyuki Nakashima, Akira Ono, Vladimír Sychrovský, Chojiro Kojima, and Yoshiyuki Tanaka\*. HgII/AgI-mediated base pairs and their NMR spectroscopic studies. *Inorg. Chim. Acta*, 452, 34-42 (2016). 査読有.  
doi: 10.1016/j.ica.2016.03.018.

(16) Takenori Dairaku, Kyoko Furuita, Hajime Sato, Yoshinori Kondo, Chojiro Kojima, Akira Ono and Yoshiyuki Tanaka\*. Exploring a DNA sequence for 3-dimensional structure determination of a silver(I)-mediated C-C base pair in a DNA duplex with  $^1\text{H}$  NMR spectroscopy. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, 34, 877-900 (2015). 査読有.  
doi: 10.1080/15257770.2015.1088160.

(17) Misaki Kinoshita, Ju yaen Kim, Satoshi Kume, Yukiko Sakakibara, Toshihiko Sugiki, Chojiro Kojima, Genji Kurisu, Takahisa Ikegami, Toshiharu Hase, Yoko Kimata-Arigo, and Young-Ho Lee\*. Physicochemical natures of interfaces control activity of ferredoxin NADP+ reductase through its interprotein interactions with ferredoxin. *BBA - Bioenergetics*, 1847, 1200-1211 (2015). 査読有.  
doi: 10.1016/j.bbabi.2015.05.023.

(18) Takenori Dairaku, Kyoko Furuita, Hajime Sato, Jakub Šebera, Daichi Yamanaka, Hiroyuki Otaki, Shoko Kikkawa, Yoshinori Kondo, Ritsuko Katahira, F. Matthias Bickelhaupt, Célia Fonseca Guerra, Akira Ono, Vladimír Sychrovský\*, Chojiro Kojima\* and Yoshiyuki Tanaka\*. Direct Detection of the Mercury-Nitrogen Bond in the Thymine-Hg<sup>II</sup>-Thymine Base-pair with  $^{199}\text{Hg}$  NMR Spectroscopy. *Chem. Commun.*, 51, 8488-8491 (2015). 査読有.  
doi: 10.1039/c5cc02423d.

(19) Saori Kataoka, Kyoko Furuita\*, Yoshikazu Hattori, Naohiro Kobayashi, Takahisa Ikegami, Kazuhiro Shiozaki,

Toshimichi Fujiwara and Chojiro Kojima\*.  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$  and  $^{13}\text{C}$  resonance assignments of the conserved region in the middle domain of *S. pombe* Sin1 protein. *Biomol. NMR Assign.*, 9, 89–92 (2015). 査読有.  
doi: 10.1007/s12104-014-9550-6.

(20) Kyoko Furuita, Saori Kataoka, Toshihiko Sugiki, Yoshikazu Hattori, Naohiro Kobayashi, Takahisa Ikegami, Kazuhiro Shiozaki, Toshimichi Fujiwara and Chojiro Kojima\*. Utilization of paramagnetic relaxation enhancements for high-resolution NMR structure determination of a soluble loop-rich protein with sparse NOE distance restraints. *J. Biomol. NMR*, 61, 55–64 (2015). 査読有.  
doi: 10.1007/s10858-014-9882-7.

(21) Kazuya Ishikawa, Koji Yamaguchi, Kazuaki Sakamoto, Satomi Yoshimura, Kento Inoue, Seiji Tsuge, Chojiro Kojima and Tsutomu Kawasaki\*. Bacterial effector modulation of host E3 ligase activity suppresses PAMP-triggered immunity in rice. *Nature Commun.*, 5, 5430 (2014). 査読有.  
doi: 10.1038/ncomms6430.

(22) Ken-ichi Kosami, Izuru Ohki\*, Minoru Nagano, Kyoko Furuita, Toshihiko Sugiki, Yoji Kawano, Tsutomu Kawasaki, Toshimichi Fujiwara, Atsushi Nakagawa, Ko Shimamoto and Chojiro Kojima\*. The crystal structure of the plant small GTPase OsRac1 reveals its mode of binding to NADPH oxidase. *J. Biol. Chem.*, 289, 28569–28578 (2014). 査読有.  
doi: 10.1074/jbc.M114.603282.

(23) Hiroshi Yamaguchi, Jakub Šebera, Jiro Kondo, Shuji Oda, Tomoyuki Komuro, Takuya Kawamura, Takenori Dairaku, Yoshinori Kondo, Itaru Okamoto, Akira Ono, Jaroslav V. Burda, Chojiro Kojima, Vladimír Sychrovský\*, and Yoshiyuki Tanaka\*. The structure of metallo-DNA with consecutive T-Hg<sup>II</sup>-T base-pairs explains positive entropy for the metallo-base-pair formation. *Nucleic Acids Res.*, 42, 4094–4099 (2014). 査読有.  
doi: 10.1093/nar/gkt1344.

(24) Toshihiko Sugiki, Toshimichi Fujiwara and Chojiro Kojima\*. Latest approaches for efficient protein production in drug discovery. *Expert*

*Opin. Drug Discov.*, 9, 1189–1204 (2014). 査読有.  
doi: 10.1517/17460441.2014.941801.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

児嶋 長次郎 (KOJIMA, Chojiro)  
横浜国立大学・大学院工学研究院・教授  
研究者番号：50333563

### (2) 連携研究者

小林 直宏 (KOBAYASHI, Naohiro)  
大阪大学・蛋白質研究所・特任准教授  
研究者番号：80272160

杉木 俊彦 (SUGIKI, Toshihiko)  
大阪大学・蛋白質研究所・特任助教  
研究者番号：70635698

古板 恭子 (FURUITA, Kyoko)  
大阪大学・蛋白質研究所・特任助教  
研究者番号：30727665