

令和 2 年 5 月 30 日現在

機関番号：22604

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07312

研究課題名(和文) 高分子量蛋白質のNMR構造解析を目指したスパース選択標識とNMR自動解析法の開発

研究課題名(英文) Enabling NMR studies of sparsely labelled large proteins by automated assignment

研究代表者

PETER GUENTERT (Guentert, Peter)

首都大学東京・理学研究科・客員教授

研究者番号：20392110

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：従来の溶液NMR法では、高分子量蛋白質や細胞中の蛋白質などの構造解析は、困難とされてきた。こうした分子は、信号の幅広化と重なりにより、原子核共鳴信号帰属が複雑・不確定になるためである。そこで、スペクトルの単純化が可能なメチル基選択などのスパース選択標識法が考案されているが、これは情報のスパース性が高く、帰属は難しいままであった。本課題では、Methyl FLYA法の開発に取り組んだ。これは、既知の構造の情報を利用することで、NOESYスペクトルのみから、メチル基選択標識蛋白質の自動帰属を可能にする。本手法を用いて、468kDaの高分子量蛋白質や、生きた細胞内の蛋白質の自動解析に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

The methods developed in this research project makes new classes of proteins more easily accessible to detailed NMR studies. Previously, NMR resonance assignments for these proteins could only be determined by time-consuming experimental methods such as extensive mutagenesis.

研究成果の概要(英文)：Proteins that are large, membrane-bound, or studied in living cells by in-cell NMR can in general not be assigned by the conventional solution NMR method that relies on uniform $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -labeling because the resonance lines become too broad and overlapping. Interpretable spectra can be restored by sparse labeling of methyl groups although resonance assignments remain difficult to obtain. Here we developed the MethylFLYA method that can assign large, methyl-labeled proteins using NOESY spectra in conjunction with a known 3D structure. MethylFLYA finds assignments by optimizing a mapping between expected peaks based on the protein sequence, and the measured peaks identified by peak picking. The new approach has been applied to large proteins up to 468 kDa size and to proteins in living cells.

研究分野：Biomolecular NMR spectroscopy

キーワード：protein NMR in-cell NMR resonance assignment automated assignment methyl groups isotope labeling

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

As structural biology trends towards larger and more complex biomolecular targets, a detailed understanding of their interactions and underlying structures and dynamics is required. The development of methyl-TROSY has enabled NMR spectroscopy to provide atomic-resolution insight into the mechanisms of large molecular assemblies in solution. However, the applicability of methyl-TROSY has been hindered by the laborious and time-consuming resonance assignment process, typically performed with the help of domain fragmentation, site-directed mutagenesis, and analysis of NOE data in the context of a crystal structure, or combinations thereof. In response to such difficulties, automated methyl resonance assignment strategies have been proposed but practical implementations remained unsatisfactory.

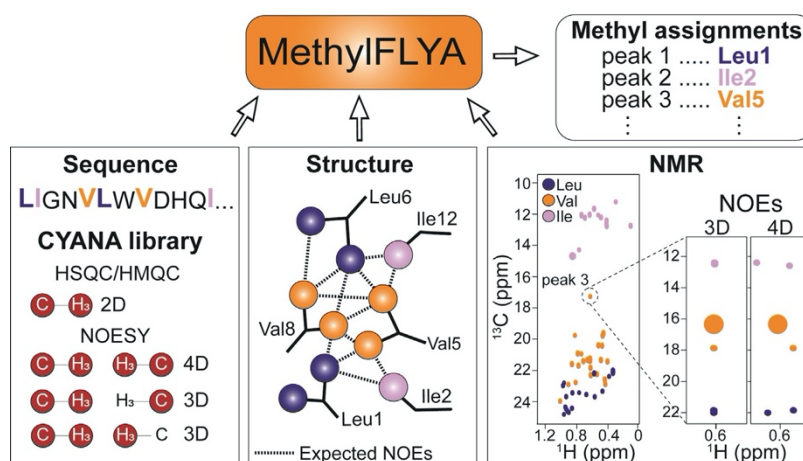
In recent years we have developed a general automated assignment, FLYA, that determines resonance assignments by optimizing a mapping between the expected peaks, which one anticipates to see based on the protein sequence, and the measured peaks that have been identified by peak picking in virtually any type of NMR spectrum. In particular, we could show that FLYA can assign proteins using as input exclusively NOESY spectra. FLYA thus provided a promising platform for the present project.

2. 研究の目的

We proposed to develop a robust automated method based on our existing FLYA automated assignment algorithm for the assignment of large methyl-labeled proteins that relies on NOESY data and a known 3D structure, and to apply the method to large proteins, protein complexes, and proteins in living cells (Tanaka et al., 2019; Ikeya et al., 2019). The aim of this research was to enable and speed up NMR studies of such proteins in order to better understand their structural changes, interactions, dynamics, and ultimately their function in basic and pharmaceutical research.

3. 研究の方法

The FLYA algorithm determines resonance assignments by establishing an optimal mapping between expected peaks that are derived from knowledge of the protein sequence, experimental types, and, if available, 3D structure, and the observed peaks that are identified in the corresponding measured spectra. This mapping, and hence the assignments, are optimized by an evolutionary algorithm coupled to a local optimization routine. MethylFLYA adopts the general FLYA algorithm for the assignment of methyl groups based on methyl-methyl NOEs and a known 3D structure (Pritišanac et al., 2020). MethylFLYA uses the atom positions from the input protein structure and magnetization transfer pathways defined for each NMR experiment type to compute a network of expected peaks. The mapping of expected peaks to measured ones starts from an initial population of random assignment solutions, which are optimized through successive generations by an evolutionary algorithm. To select the best individuals for recombination, a scoring function is employed, which takes into account the alignment of peaks assigned to the same atom, the completeness of the assignment, and the minimization of chemical shift degeneracy. In each generation, a local optimization routine reassigns a subset of expected peaks through a defined number of iterations. This protocol is repeated multiple times starting from different random initial assignments.



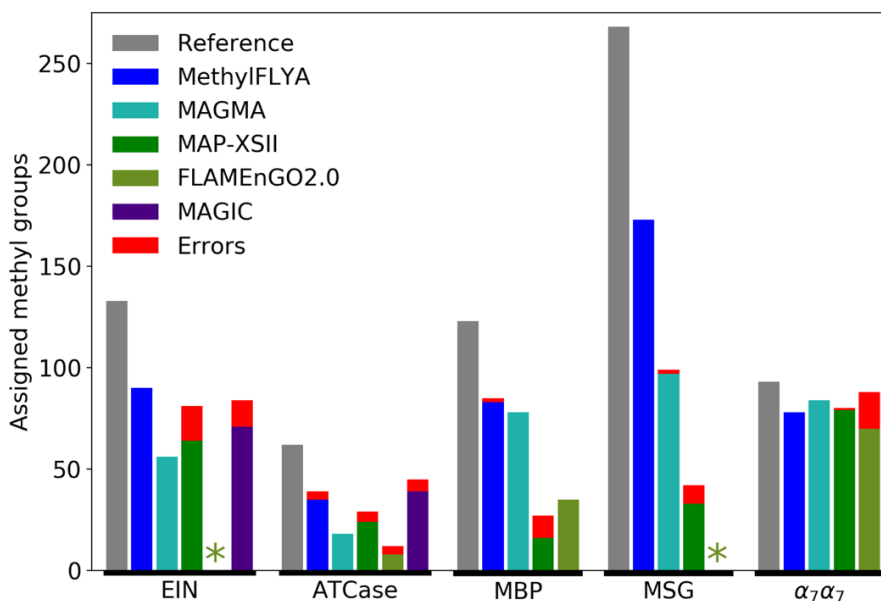
To establish the confidence of the assignment of an individual atom, MethylFLYA analyzes the chemical shift values obtained in a series of independent runs of the optimization algorithm. MethylFLYA thus defines a consensus chemical shift value for each atom. A consensus assignment is classified as reliable if more than 80% of the individual runs yielded (within a tolerance) the same chemical shift value. In MethylFLYA, consolidation into consensus assignments is enhanced over the original FLYA algorithm by running three series of 100 individual runs with three slightly different distance cutoffs for the generation of expected NOESY peaks.

4. 研究成果

MethylFLYA was applied to five proteins of varying molecular mass and shape for which NOESY data from specifically methyl-labeled samples, assignments, and 3D structures were available: the N-terminal domain of *E. coli* Enzyme I (EIN; molecular mass 28 kDa), a dimer of regulatory chains of aspartate transcarbamoylase from *E. coli* (ATCase; 34 kDa), maltose binding protein (MBP; 41 kDa), malate synthase G (MSG; 81 kDa),¹⁸ and the “half-proteasome” 20S core particle, a 14-mer ($\alpha_7\alpha_7$; 358 kDa).

MethylFLYA assigned between 63% (ATCase) and 84% ($\alpha_7\alpha_7$) of the methyl resonances for which reference assignments are available, with no assignment errors for EIN, MSG, and $\alpha_7\alpha_7$ (Pritišanac et al., 2019). Two incorrect methyl assignments were found for MBP, and four for ATCase. In the 3D structures, all incorrectly assigned methyls were located in proximity to their correct assignment positions. Such spatially localized assignment errors are expected to have minor impact on studies that do not require very high-resolution information, for instance, when identifying an interaction interface.

A performance comparison of MethylFLYA with the other available NOE-based automatic methyl assignment software packages is shown in the Figure below (Pritišanac et al., 2020).



The same input data for five different proteins were used in all programs. On average, MethylFLYA yielded correct assignments for significantly more methyl groups than alternative algorithms, has an average error rate of 1%, modest runtimes of 0.4–1.2 h, and can handle arbitrary isotope labeling patterns and data from other types of NMR spectra.

In addition, we have applied a similar automated assignment method based on FLYA in an integrated structure determination approach that simultaneously uses NMR and EM data for the structure determination of the 468 kDa large dodecameric aminopeptidase TET2 with high accuracy, significantly exceeding current standards of NMR structure determination (Gauto et al., 2019). Automated assignments were also obtained for the 42 kDa maltose binding protein MBP (Stanek et al., 2020) and for the helical integral membrane protein bacteriorhodopsin (Kooijman et al., 2020).

<引用文献>

1. Pritišanac, I., Würz, J. M., Alderson, T. R. & Güntert, P. Automatic structure-based NMR methyl resonance assignment in large proteins. *Nature Communications* 10, 4922 (2019).
2. Pritišanac, I., Alderson, T. R. & Güntert, P. Automated assignment of methyl NMR spectra from large proteins. *Progress in NMR Spectroscopy* 118–119, 54–73 (2020).
3. Tanaka, T., Ikeya, T., Kamoshida, H., Suemoto, Y., Mishima, M., Shirakawa, M., Güntert, P. & Ito, Y. High resolution protein 3D structure determination in living eukaryotic cells. *Angewandte Chemie International Edition* 58, 7284–7288 (2019).
4. Ikeya, T., Güntert, P. & Ito, Y. Protein structure determination in living cells. *Int. J. Mol. Sci.* 20, 2442 (2019).
5. Gauto, D. F., Estrozi, L. F., Schwieters, C. D., Effantin, G., Macek, P., Sounier, R., Sivertsen, A. C., Schmidt, E., Kerfah, R., Mas, G., Colletier, J.-P., Güntert, P., Favier, A., Schoehn, G., Schanda, P. & Boisbouvier, J. Integrated NMR and cryo-EM atomic-resolution structure determination of a half-megadalton enzyme complex. *Nature Communications* 10, 2697 (2019).
6. Stanek, J., Schubeis, T., Paluch, P., Güntert, P., Andreas, L. B. & Pintacuda, G. Automated backbone NMR resonance assignment of large proteins using redundant linking from a single simultaneous acquisition. *Journal of the American Chemical Society* 142, 5793–5799 (2020).
7. Kooijman, L., Ansorge, P., Schuster, M., Baumann, C., Löhr, F., Jurt, S., Güntert, P., & Zerbe, O. Backbone and methyl assignment of bacteriorhodopsin incorporated into nanodiscs. *Journal of Biomolecular NMR* 74, 45–60 (2020).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計16件（うち査読付論文 16件／うち国際共著 16件／うちオープンアクセス 11件）

1. 著者名 Pritisanic, I., Alderson, T. R., Guentert, P.	4. 巻 118-119
2. 論文標題 Automated assignment of methyl NMR spectra from large proteins	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Progress in NMR Spectroscopy	6. 最初と最後の頁 54-73
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.pnmrs.2020.04.001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Stanek, J., Schubeis, T., Paluch, P., Guentert, P., Andreas, L. B., Pintacuda, G.	4. 巻 142
2. 論文標題 Automated backbone NMR resonance assignment of large proteins using redundant linking from a single simultaneous acquisition	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of the American Chemical Society	6. 最初と最後の頁 5793-5799
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/jacs.0c00251	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Kooijman, L., Ansorge, P., Schuster, M., Baumann, C., Loehr, F., Jurt, S., Guentert, P., Zerbe, O.	4. 巻 74
2. 論文標題 Backbone and methyl assignment of bacteriorhodopsin incorporated into nanodiscs	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Biomolecular NMR	6. 最初と最後の頁 45-60
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10858-019-00289-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Pritisanic, I., Wuerz, J. M., Alderson, T. R., Guentert, P.	4. 巻 10
2. 論文標題 Automatic structure-based NMR methyl resonance assignment in large proteins	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 4922
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-019-12837-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Gauto, D. F., Estrozi, L. F., Schwieters, C. D., Effantin, G., Macek, P., Sounier, R., Sivertsen, A. C., Schmidt, E., Kerfah, R., Mas, G., Colletier, J.-P., Guentert, P., Favier, A., Schoehn, G., Schanda, P., Boisbouvier, J.	4. 巻 10
2. 論文標題 Integrated NMR and cryo-EM atomic-resolution structure determination of a half-megadalton enzyme complex	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 2697
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-019-10490-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Ikeya, T., Guentert, P. & Ito, Y.	4. 巻 20
2. 論文標題 Protein structure determination in living cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Science	6. 最初と最後の頁 2442
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms20102442	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Tanaka, T., Ikeya, T., Kamoshida, H., Suemoto, Y., Mishima, M., Shirakawa, M., Guentert, P., Ito, Y.	4. 巻 58
2. 論文標題 High resolution protein 3D structure determination in living eukaryotic cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Angewandte Chemie International Edition	6. 最初と最後の頁 7284-7288
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/anie.201900840	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Moebius, K., Kazemi, S., Guentert, P., Jakob, A., Heckel, A., Becker-Baldus, J., Glaubitz, C.	4. 巻 9
2. 論文標題 Global response of diacylglycerol kinase towards substrate binding observed by 2D and 3D MAS NMR	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 3995
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-40264-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Kobayashi, N., Hattori, Y., Nagata, T., Shinya, S., Guentert, P., Kojima, C., Fujiwara, T.	4. 巻 34
2. 論文標題 Noise peak filtering in multi-dimensional NMR spectra using convolutional neural networks	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Bioinformatics	6. 最初と最後の頁 4300-4301
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/bioinformatics/bty581	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Pritisanic, I., Wuerz, J. M., Guentert, P.	4. 巻 1036
2. 論文標題 Fully automated assignment of methyl resonances of a 36 kDa protein dimer from sparse NOESY data	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Physics: Conference Series	6. 最初と最後の頁 12008
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1088/1742-6596/1036/1/012008	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Nichols, P. J., Born, A., Henen, M. A., Strotz, D., Celestine, C., Riek, R., Guentert, P., Voegeli, B.	4. 巻 19
2. 論文標題 Extending the applicability of exact nuclear Overhauser enhancements to large proteins and RNA	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 ChemBioChem	6. 最初と最後の頁 1695-1701
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cbic.201800237	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Pritisanic, I., Wuerz, J. M. & Guentert, P.	4. 巻 1036
2. 論文標題 Fully automated assignment of methyl resonances of large proteins from sparse NOESY data	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Physics Conference Series	6. 最初と最後の頁 12008
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1088/1742-6596/1036/1/012008	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Wuerz, J. M., Kazeni, S., Schmidt, E., Bagaria, A. & Guentert, P.	4. 巻 628
2. 論文標題 NMR-based automated protein structure determination	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Arch. Biochem. Biophys.	6. 最初と最後の頁 24-32
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.abb.2017.02.011	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Bibow, S., Polyhach, Y., Eichmann, C., Chi, C. N., Kowal, J., Albiez, S., McLeod, R. A., Stahlberg, H., Jeschke, G., Guentert, P. & Riek, R.	4. 巻 24
2. 論文標題 Solution structure of discoidal high-density lipoprotein particles with a shortened apolipoprotein A-I	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Nat. Struct. Mol. Biol.	6. 最初と最後の頁 187-193
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/nsmb.3345	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Kuwasaki, K., Nameki, N., Tsuda, K., Takahashi, M., Sato, A., Tochio, N., Inoue, M., Terada, T., Kigawa, T., Kobayashi, N., Shirouzu, M., Ito, T., Sakamoto, T., Wakamatsu, K., Guentert, P., Takahashi, S., Yokoyama, S. & Muto, Y.	4. 巻 26
2. 論文標題 Solution structure of the first RNA recognition motif domain of human spliceosomal protein SF3b49 and its mode of interaction with a SF3b145 fragment	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Protein Sci.	6. 最初と最後の頁 280-291
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/pro.3080	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Wuerz, J. & Guentert, P.	4. 巻 67
2. 論文標題 Peak picking multidimensional NMR spectra with the contour geometry based algorithm CYPICK	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J. Biomol. NMR	6. 最初と最後の頁 63-76
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10858-016-0084-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 8件 / うち国際学会 6件）

1. 発表者名 Peter Guentert
2. 発表標題 Structure calculation and automated assignment with CYANA
3. 学会等名 4th G-NMR School, Goettingen, Germany (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Peter Guentert
2. 発表標題 Automatic methyl assignment in large proteins
3. 学会等名 The 12th Australian and New Zealand Society for Magnetic Resonance (ANZMAG) Conference (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Peter Guentert
2. 発表標題 NMR structure calculation
3. 学会等名 EMBO Practical Course on Structure Determination of Biological Macromolecules by Solution NMR, Munich, Germany (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Peter Guentert
2. 発表標題 Structure-based methyl resonance assignment and multi-state eNOE analysis with CYANA
3. 学会等名 28th International Conference on Magnetic Resonance in Biological Systems (ICMRBS 2018) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Iva Pritisnac, Julia Wuerz & Peter Guentert
2. 発表標題 Fully automated assignment of methyl resonances of a 36 kDa protein dimer from sparse NOESY data
3. 学会等名 International Meeting on "High-Dimensional Data-Driven Science" (HD3-2017), Kyoto, Japan (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Peter Guentert
2. 発表標題 Automated biomolecular NMR spectrum analysis for protein structure and dynamics
3. 学会等名 Euromar 2017, Warsaw, Poland (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Peter Guentert
2. 発表標題 Automated NMR spectrum analysis for protein structure and dynamics
3. 学会等名 Gordon Research Seminar "Frontiers of NMR in Life Sciences", Newry ME, USA (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Peter Guentert
2. 発表標題 NMR structure calculation
3. 学会等名 EMBO Practical Course on Structure Determination of Biological Macromolecules by Solution NMR, Basel, Switzerland (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 Ikeya, T., Guentert, P., Ito, Y.	4. 発行年 2020年
2. 出版社 Royal Society of Chemistry	5. 総ページ数 25
3. 書名 In-cell NMR Spectroscopy: From Molecular Sciences to Cell Biology (Eds. Y. Ito, V. Doetsch, M. Shirakawa)	

1. 著者名 Kazemi, S., Wuerz, J. M., Schmidt, E., Bagaria, A. & Guentert, P.	4. 発行年 2017年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 18
3. 書名 Modern Magnetic Resonance 2nd Ed. (Ed. G. A. Webb)	

〔産業財産権〕

〔その他〕

CYANA Home Page http://www.cyana.org/
--

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	池谷 鉄兵 (IKEYA Teppei) (30457840)	東京都立大学・理学研究科・助教 (22604)	

