

平成 21 年 4 月 28 日現在

研究種目：基盤研究 (A)  
 研究期間：2006 ～ 2008  
 課題番号：18207007  
 研究課題名 (和文) SAILタンパク質を用いる全自動化NMR構造システムの開発  
 研究課題名 (英文) Development of automating completely NMR structure system that uses SAIL protein  
 研究代表者  
 PETER GUENTERT (ペーター ギュンタート)  
 首都大学東京・戦略研究センター・客員教授  
 研究者番号：20392110

## 研究成果の概要：

SAIL-FLYA 法は、NMR 法でのタンパク質の三次元立体構造を、人手による介入をまったく必要とせずに高精度に決定できる全自動解析システムである。SAIL-FLYA 法を用いれば、従来法で必要とされる NMR スペクトルより格段に少ないデータ数でも、正確な構造決定が可能となる。本研究では、このシステムを開発、改良を加え、比較的分子量のタンパク質であるユビキチンを例としてその性能評価を行った。加えて、さらなる性能向上のために、CYANA 計算法の改良、及び FLYA 法に適用可能な新たな自動化学シフト帰属法の開発等も行った。また、従来難しかったタンパク質に SAIL-CYANA 法を適用し、その構造決定に成功した。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	16,100,000	4,830,000	20,930,000
2007 年度	11,500,000	3,450,000	14,950,000
2008 年度	10,100,000	3,030,000	13,130,000
総計	37,700,000	11,310,000	49,010,000

## 研究分野：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, SAIL 法, NMR データの自動帰属, 構造計算

## 1. 研究開始当初の背景

ヒトの生命機能の分子レベルでの理解においては、様々な生命過程に基本的な役割を持つタンパク質、或いは疾病に関与するタンパク質の研究が不可欠である。タンパク質機能の推論を可能にする三次元構造情報はタンパク質の研究で最も重要な情報となっている。これまで、X線結晶構造解析やNMRによる手法はタンパク質の構造決定に多くの役目を果たしてきたが、一方で、現在もなお、これらの手法を適用し難い試料も数多く存在している。NMR法はタンパク質が機能し

ている環境に近い条件下でそれらの立体構造、相互作用、及びダイナミクスを研究できる理想的な手法であることは広く知られている。しかしながら、タンパク質のNMR構造解析においてはシグナルの配列帰属が必要となるために分子量30kDaを越える高分子量タンパク質への適用は極めて困難とされてきた。立体整列同位体標識 (stereo-array isotopelabeling : SAIL) 法は安定同位元素<sup>2</sup>H、<sup>13</sup>C、<sup>15</sup>Nを位置・立体選択的にタンパク質構成アミノ酸に導入することにより、必要な構造情報を失うことなくタンパク質のNMRスペクトルを簡略化し、シグナルのS/N比を

大幅に高めることができる NMR 試料の最適化技術である。SAIL 法により従来の NMR 法では不可能であった高分子量タンパク質・タンパク質複合体の構造解析が可能になる。SAIL 法がもたらす単純かつ高品質な NMR スペクトルは、NMR 法の信頼性の向上、及び構造解析の自動化という観点からも大きな効果が期待できる。

## 2. 研究の目的

構造決定までの非効率的なスペクトルの手動解析は、NMR 法の問題点の一つである。この手動解析は、数週間に及ぶこともあり、さらに解析者の熟練度によっても最終結果が大きく異なってしまうという危険性をはらんでいる。本課題において、溶液タンパク質の構造解析プログラム CYANA を基に我々が開発した完全自動構造解析化アルゴリズム FLYA を、SAIL 法との融合することで、全く人間の介入なしに、自動的に、正確で客観的な構造決定を可能にすることを目的としている。

## 3. 研究の方法

全自動 SAIL-NMR 構造決定システムを、CYANA ソフトウェア・パッケージの枠組みの中に組み込まれ、以下に示すステップで行う。

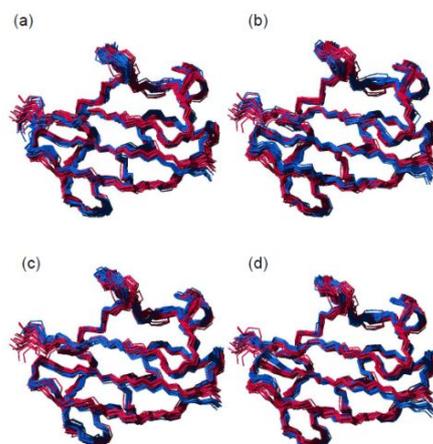
- (1) ピーク位置の決定(Peak picking)
- (2) 雑音ピークの除去(Peak filtering)
- (3) 様々な NMR 測定データを解析し、化学シフトの初期帰属を行う。その結果を基に、個々のスピンに関して複数の化学シフト観測値を集積する
- (4) 集積された個々のスピンに関する複数の化学シフト値を統合し、矛盾のない統一化学シフト値(Consensus chemical shift values)を決定する
- (5) NOESY シグナルの帰属
- (6) 構造計算
- (7) 溶媒(水)分子を含めたエネルギー最小化計算によるタンパク質構造の最適化

ステップ(3)-(6)は、数回の”ステージ”において繰り返し実行される。第二ステージでは、

第一ステージで得られた粗い初期立体構造を参照にして、化学シフト値の精密化が実施される。同様に、後続のステージの各々において、通常の CYANA のプロトコルに従って、7回の”サイクル”でステップ 5 と 6 を繰り返す。2-4 次元 NMR データセットが入力データとして利用され、その結果 3 次元構造とともに、化学シフトとピーク帰属が得られる。

## 4. 研究成果

(1) SAIL-FLYA 法では FLYA 法より少数の NMR データセットを用いても全自動で正確



な構造決定が可能となった。SAIL ユビキチン(分子量 8 kDa)の場合、二つの 2D [1H, 15N]、[1H, 13C] HSQC と二つの 13C、15N-edited 3D NOESY と一つの 3D triple resonance データセットがあれば、手動解析で決定した構造とほぼ変わらない程度の正確な構造を全自動で決定することができた。

図 1. SAIL-FLYA 法によるユビキチン構造 (a) Run 1 (b) Run 3 (c) Run 7 (d) Run 14 サイクル(青色)と従来法(赤色)の構造

(2) 全自動解析の精度向上のために、SAIL-FLYA 法でも応用が可能な新たな自動化学シフト帰属法である DYNASSIGN アルゴリズムを開発した。これは、ピークを粒子と表現し予測した帰属と実際のピーク位置との差をエネルギー関数に変換して、これ分子動力学法によりエネルギー最小化するユニークな方法である。

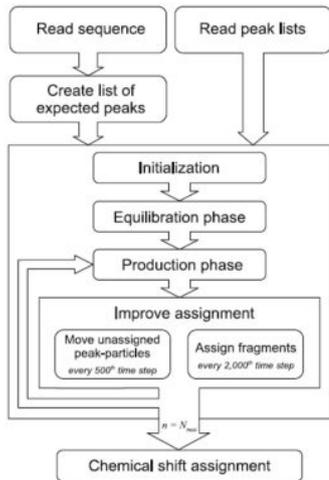


図2. DYNASSIGN アルゴリズムのフローチャート

(3) CYANA の応用例としては、二量体タンパク質の構造計算に分子間 NOESY 実験由来の距離制限を用いずに、通常の  $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -edited 3D NOESY のみを用いて構造決定することに成功した。R64 plasmid 由来 NikA の N-末端 51 残基のフラグメントは二量体の Ribbon-Helix-Helix を形成している。280 個の分子間 NOESY が通常の NOESY から帰属され、高品質立体構造を決定することが可能になった。これは、甲斐荘正恒教授との共同研究である。

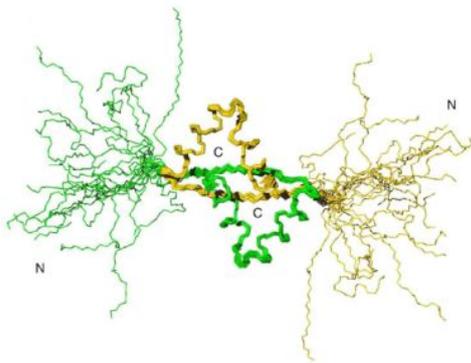


図3. NikA の N-末端フラグメントは二量体 NMR 構造

(4) in-cell NMR は、異種核多次元 NMR 法を用いて、生きた細胞の中の蛋白質を、原子レベルで観測する手法である。これまで、ヒトなど高等生物の生きた細胞内のたんぱく質の形（立体構造）や働く仕組みを原子レベルで詳細に観察する方法がなく、精製したたんぱく質を使って研究されていた。ここでは、高度好熱菌である *Thermus thermophilus* HB8

由来で、重金属結合タンパク質と想定される TTHA1718 を、大腸菌細胞内で大量発現させ、その構造を in-cell NMR を用いてタンパク質構造決定に成功した。これは、伊藤隆教授との共同研究である。

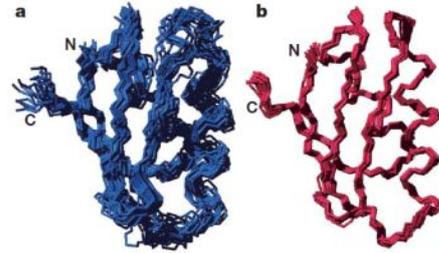
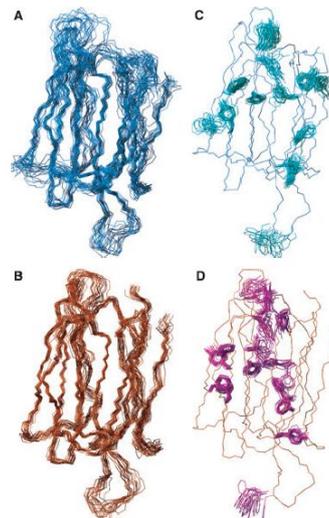


図4. TTHA1718 NMR 構造(a) in-cell. (b) in-vitro.

(5) SAIL 法と CYANA 融合により従来難しかったタンパク質の構造決定を行った。シロイヌナズナ由来 At3g16450.1 タンパク質を SAIL 法でラベルし CYANA により構造を決定した。このタンパク質は比較的分子量が大きい 299 残基(32 kDa)であり、配列上に二つの高い相同性を持つ領域が存在して、N、C 末端の二つのドメインが独立の運動性を持ったため、多くの NMR シグナルの重複し、N 末端ドメインの一部のシグナルは線幅が広がって、解析が困難な試料であった。しかしながらこうした問題点にもかかわらず、SAIL-CYANA 法を用いることで、これらの問題を克服し精度のよい構造を決定すること



が可能となった。

図5. At3g16450.1 の NMR 構造 (A,C) N-末端 (B,C) C-末端ドメイン

また、SARS coronavirus nucleocapsid 蛋白質 C

末端ドメイン(28KDa)の二量体構造も決定した。これにより、タンパク質-核酸相互作用によるRNAパッキング機構に関する知見が得ることができた。これらは甲斐荘正恒教授との共同研究である。

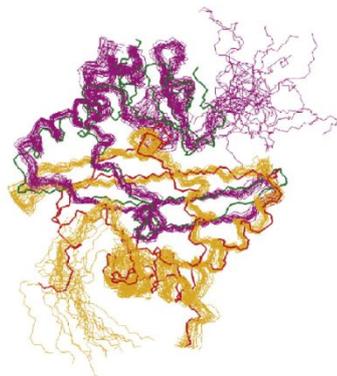


図 6. SARS coronavirus nucleocapsid C 末端ドメイン二量体構造

(6) *Bacillus subtilis* 由来の II 型チオエステラーゼ(thioesterase) のチオール化 (T) ドメインに関して、複合体の形成時、非形成時、それぞれについて三次元構造を決定した。これは、細菌や菌類に存在する非リボソームペプチドシンターゼ (NRPS) やポリケチドシンターゼ (PKS) に 1 つであり、タイプ I と II の 2 つの異なるのチオエステラーゼを用いて、高い活性をもつ生体化合物を合成する機能を持つ。Dötsch 教授との共同研究である。

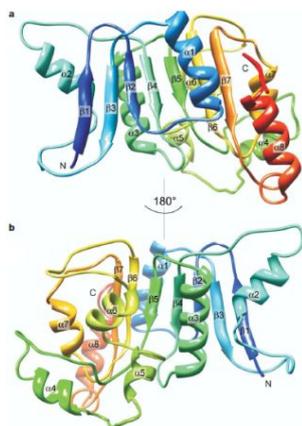


図 7. SrfTEII の三次元構造

## 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 32 件)

- ① Sakakibara, D., Sasaki, A., Ikeya, T., Hamatsu, J., Hanashima, T., Mishima, M., Yoshimasu, M., Hayashi, N., Mikawa, T., Wälchli, M., Smith, B. O., Shirakawa, M., Güntert, P. & Ito, Y. Protein structure determination in living cells by in-cell NMR spectroscopy. *Nature* 458, 102-105 (2009)
- ② He, F., Dang, W., Saito, K., Watanabe, S., Kobayashi, N., Güntert, P., Kigawa, T., Tanaka, A., Muto, Y. & Yokoyama, S. Solution structure of the cysteine-rich domain in Fn14, a member of the tumor necrosis factor receptor superfamily. *Protein Sci.* 18, 650-656 (2009)
- ③ Peroza, E. A., Schmucki, R., Güntert, P., Freisinger, E. & Zerbe O. The  $\beta$ E-domain of Ec-1 metallothionein: A metal-binding domain with a distinctive structure. *J. Mol. Biol.* 387, 207-218 (2009)
- ④ He, F., Dang, W., Abe, C., Tsuda, K., Inoue, M., Watanabe, S., Kobayashi, N., Kigawa, T., Matsuda, T., Yabuki, T., Aoki, M., Seki, E., Harada, T., Tomabechi, Y., Terada, T., Shirouzu, M., Tanaka, A., Güntert, P., Muto, Y. & Yokoyama, S. Solution structure of the RNA binding domain in the human muscleblind-like protein 2. *Protein Sci.* 18, 80-91 (2009)
- ⑤ Güntert, P. Automated structure determination from NMR Spectra. *Eur. Biophys. J.* 38, 129-143 (2009)
- ⑥ Schmucki, R., Yokoyama, S. & Güntert, P. Automated assignment of NMR chemical shifts using peak-particle dynamics simulation with the DYNASSIGN algorithm. *J. Biomol. NMR.* 43, 97-109 (2009)
- ⑦ Ohnishi, S. Pääkkönen, K., Koshiba, S., Tochio, N., Sato, M., Kobayashi, N., Harada, T., Watanabe, S., Muto, Y., Güntert, P., Tanaka, A., Kigawa, T. & Yokoyama, S. Solution structure of the GUCT domain from human RNA helicase II/Gu $\beta$  reveals the RRM fold, but implausible RNA interactions. *Proteins* 74, 133-144 (2009)
- ⑧ Takeda, M., Sugimori, N., Torizawa, T., Terauchi, T., Ono, A. M., Yagi, H., Yamaguchi, Y., Kato, K., Ikeya, T., Jee, J., Güntert, P., Aceti, D. J., Markley, J. L. & Kainosho, M. Structure of the putative 32 kDa myosinase binding protein from Arabidopsis (At3g16450.1) as determined by the SAIL-NMR method. *FEBS J.* 275, 5873-5884 (2008)
- ⑨ Yoshida, H., Furuya, N., Lin, Y. J., Güntert, P., Komano, T. & Kainosho, M. Structural basis of the role of the NikA ribbon-helix-helix domain in initiating bacterial conjugation. *J. Mol. Biol.* 384, 690-701 (2008)
- ⑩ Lin, Y. J., Umehara, T., Inoue, M., Saito, K., Kigawa, T., Jang, M. K., Ozato, K., Yokoyama, S., Padmanabhan, B., Güntert, P.

Solution structure of the extraterminal domain of the bromodomain-containing protein BRD4. *Protein Sci.* 17, 2174–2179 (2008)

⑪ Koglin, A., Löhr, F., Bernhard, F., Rogov, V. R., Frueh, D. P., Strieter, E. R., Mofid, M. R., Güntert, P., Wagner, G., Walsh, C. T., Marahiel, M. A. & Dötsch, V. Structural basis for the selectivity of the external thioesterase of the surfactin-synthetase. *Nature* 454, 907–911 (2008)

⑫ Nagata, T., Suzuki, S., Endo, R., Shirouzu, M., Terada, T., Inoue, M., Kigawa, T., Güntert, P., Hayashizaki, Y., Muto, Y. & Yokoyama, S. The RRM domain of poly(A)-specific ribonuclease (PARN) has a non-canonical binding site for mRNA cap analog recognition. *Nucl. Acids Res.* 36, 4754–4767 (2008)

⑬ Takeda, M., Chang, C. K., Ikeya, T., Güntert, P., Chang, Y. H., Hsu, Y. L., Huang, T. H. & Kainosho, M. Solution structure of the C-terminal dimerization domain of SARS coronavirus nucleocapsid protein determined by the SAIL-NMR method. *J. Mol. Biol.* 380, 608–622 (2008)

⑭ Reckel, S., Sobhanifar, S., Schneider, B., Junge, F., Schwarz, D., Durst, F., Löhr, F., Güntert, P., Bernhard, F. & Dötsch, V. Transmembrane segment enhanced labeling as a tool for the backbone assignment of helical membrane proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105, 8262–8267 (2008)

⑮ Kuwasako, K., Takahashi, M., Tochio, N., Abe, C., Tsuda, K., Inoue, M., Terada, T., Shirouzu, M., Kobayashi, N., Kigawa, T., Taguchi, S., Tanaka, A., Hayashizaki, Y., Güntert, P., Muto, Y. & Yokoyama, S. Solution structure of the second RNA recognition motif (RRM) domain of murine T cell intracellular antigen-1 (TIA-1) and its RNA recognition mode. *Biochemistry* 47, 6437–6450 (2008)

⑯ Kuwasako, K., Dohmae, N., Inoue, M., Shirouzu, M., Taguchi, S., Güntert, P., Séraphin, B., Muto, Y. & Yokoyama, S. Complex assembly mechanism and an RNA-binding mode of the human p14-SF3b155 spliceosomal protein complex identified by NMR solution structure and functional analyses. *Proteins* 71, 1617–1636 (2008)

⑰ Ikeya, T., Güntert, P. & Kainosho, M. NMR による蛋白質構造決定の自動化. In 計算シミュレーションと分析データ解析. *Maruzen*, Tokyo, pp. 148–166 (2007) (in Japanese)

⑱ Takeda, M., Ikeya, T., Güntert, P. & Kainosho, M. Automated structure determination of proteins with the SAIL-FLYA NMR method. *Nature Protocols* 2, 2896–2902 (2007)

⑲ Kobayashi, N., Iwahara, J., Koshiba, S., Tomizawa, T., Tochio, N., Güntert, P., Kigawa, T. & Yokoyama, S. KUIJIRA, a package of integrated modules for systematic and interactive analysis of NMR data directed to high-throughput NMR structure studies. *J. Biomol. NMR* 39, 31–52 (2007)

⑳ Hwang, E., Ryu, K. S., Pääkkönen, K., Güntert, P., Cheong, H. K., Lim, D. S., Lee, J. O., Jeon, Y. H. & Cheong, C. Structural insight into dimeric interaction of the SARAH domains from Mst1 and RASSF family proteins in the apoptosis pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104, 9236–9241 (2007)

㉑ Ohnishi, S., Güntert, P., Koshiba, S., Tomizawa, T., Akasaka, R., Tochio, N., Sato, M., Inoue, M., Harada, T., Watanabe, S., Tanaka, T., Shirouzu, M., Kigawa, T. & Yokoyama, S. Solution structure of an atypical WW domain in a novel  $\beta$ -clam-like dimeric form. *FEBS Lett.* 581, 462–468 (2007)

㉒ Jurt, S., Aemissegger, A., Güntert, P., Zerbe, O. & Hilvert, D. A photoswitchable miniprotein based on the sequence of avian pancreatic polypeptide. *Angew. Chem. Int. Ed.* 45, 6297–6300 (2006)

㉓ Kuwasako, K., He, F., Inoue, M., Tanaka, A., Sugano, S., Güntert, P., Muto, Y. & Yokoyama, S. Solution structures of the SURP domains and the subunit-assembly mechanism within the splicing factor SF3a complex in 17S U2 snRNP. *Structure* 14, 1677–1689 (2006)

㉔ López-Méndez, B. & Güntert, P. Automated protein structure determination from NMR spectra. *J. Am. Chem. Soc.* 128, 13112–13122 (2006)

㉕ Pääkkönen, K., Tossavainen, H., Permi, P., Rakkolainen, H., Rauvala, H., Raulo, E., Kilpeläinen, I. & Güntert, P. Solution structures of the first and fourth TSR domains of F-spondin. *Proteins* 64, 665–672 (2006)

㉖ Kainosho, M. & Güntert, P. 高分子量タンパク質のNMR構造決定-より速く、より正確に: タンパク質 NMR の常識を覆す革新技術 SAIL 法. Stereo-array isotope labeling for faster and more accurate NMR structure determinations of high molecular weight proteins. *Biotechnology J. (Tokyo)* 6, 467–470 (2006) (in Japanese)

㉗ Scott, A., López-Méndez, B. & Güntert, P. Fully automated structure determinations of the Fes SH2 domain using different sets of NMR spectra. *Magn. Reson. Chem.* 44, S83–S88 (2006)

㉘ Ikeya, T., Terauchi, T., Güntert, P., Kainosho, M. Evaluation of stereo-array isotope labeling (SAIL) patterns for automated structural

analysis of proteins with CYANA. *Magn. Reson. Chem.* 44, S152–S157 (2006)

㉞ Hamada, T., Ito, Y., Abe, T., Hayashi, F., Güntert, P., Inoue, M., Kigawa, T., Terada, T., Shirouzu, M., Yoshida, M., Tanaka, A., Sugano, S., Yokoyama, S. & Hirota, H. Solution structure of the antifreeze-like domain of human sialic acid synthase. *Protein Sci.* 15, 1010–1016 (2006)

㉟ Aachmann, F. L., Svanem, B. I. G., Güntert, P., Petersen, S. B., Valla, S. & Wimmer, R. NMR structure of the R-module - A parallel  $\beta$ -roll subunit from an *Azotobacter vinelandii* mannuronan C-5 epimerase. *J. Biol. Chem.* 281, 7350–7356 (2006)

㊱ Kainosho, M., Torizawa, T., Iwashita, Y., Terauchi, T., Ono, A. M. & Güntert, P. Optimal isotope labeling for NMR protein structure determinations. *Nature* 440, 52–57 (2006)

㊲ Güntert, P. Symbolic NMR product operator calculations. *Int. J. Quant. Chem.* 106, 344–350 (2006)

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

ペーター ギュンタート(Guentert, Peter)

首都大学東京 ▪ 戦略研究センター ▪ 客員教授

### (2)研究分担者

池峻求 (Jee, JunGoo)

首都大学東京 ▪ 戦略研究センター ▪ 准教授