

平成23年 5月31日現在

機関番号： 82401
 研究種目： 新学術領域研究（研究課題提案型）
 研究期間： 2008～2010
 課題番号： 20200035
 研究課題名（和文）
 超微量蛋白質 NMR 解析技術
 研究課題名（英文）
 TECHNOLOGY OF NMR ANALYSES FOR A ULTRA LOW AMOUNT OF PROTEIN
 研究代表者
 河野 俊之（KOHNO TOSHIYUKI）
 独立行政法人理化学研究所・NMR パイプライン高度化研究チーム・客員研究員
 研究者番号： 40416657

研究成果の概要（和文）：

我々が開発してきた MAGICAL 法について、NMR のパルスプログラムの改良と安定同位体標識方法の改良とを行うことによって、測定感度を格段に向上させることができ、低濃度の試料を短時間で解析することができるようになった。また、この改良した MAGICAL 法を、難溶性の蛋白質や高分子量蛋白質に適用したところ、従来の NMR 測定方法では解析困難であった蛋白質も NMR シグナルの帰属が可能となることが示された。

研究成果の概要（英文）：

We have developed the MAGICAL method for NMR analyses of protein by the combination of the improvement of NMR pulse programs and the improvement of stable isotope labeling techniques. As a result, the sensitivities of NMR measurements are dramatically enhanced and the proteins with low concentration can be analyzed with much less NMR experiment time. We applied to this improved MAGICAL method for less soluble proteins and large proteins. Thus, it was indicated that NMR signals of proteins could be assigned which were difficult to analyze by using traditional NMR techniques.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	8,400,000	2,520,000	10,920,000
2009年度	7,900,000	2,370,000	10,270,000
2010年度	7,900,000	2,370,000	10,270,000
年度			
年度			
総計	24,200,000	7,260,000	31,460,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：生物分子科学・生物分子科学

キーワード：生物物理、NMR、無細胞蛋白質合成、シグナル帰属、選択的安定同位体標識

1. 研究開始当初の背景

近年、NMRによる蛋白質解析は、蛋白質の立体構造決定、蛋白質・蛋白質相互作用解析、蛋白質・低分子相互作用解析及びそれを

利用した創薬まで用いられるようになり、ますますその重要性を増してきている。しかし、これらの蛋白質NMR解析を有効に活用するためには、ターゲットとなる蛋白質のNMRシグナ

ルの帰属の作業が必須である。そして、現在用いられている3次元NMR解析方法を代表とする蛋白質のNMRシグナル帰属方法では、 $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ などの安定同位体標識を行った目的蛋白質を数10mg用意し、1mM程度の高濃度溶液に溶解させることが必須であり、蛋白質のNMR解析の適用範囲を著しく狭めていた。我々は、この問題を解決するために、独自の方法として、コムギ胚芽無細胞蛋白質合成系を駆使した完全選択的なアミノ酸安定同位体標識方法、それを用いた新規な系統的アミノ酸選択的安定同位体標識方法および2次元NMRだけを用いた蛋白質NMRシグナル帰属方法を開発してきた。この方法を具体的に説明すると、1種類のアミノ酸を $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}/^2\text{H}$ 標識し、残りの19種類のアミノ酸を $^{15}\text{N}/^2\text{H}$ 標識した20種類の組み合わせの蛋白質を無細胞合成系で調製し、それぞれの蛋白質に対して2次元HNCO/HNCA/HN(CO)CA/HN(CA)CO-TROSYを測定することで実効的に $2 \times 20 = 40$ 次元の分解能により曖昧さの少ない主鎖NMRシグナル帰属を可能にする方法である。この方法を用いることにより、従来法より1桁少ない100 μM 濃度の蛋白質を容易に解析することができる。しかし、より難溶性のタンパク質を解析するためには、10 μM 程度の濃度でNMRシグナル解析ができる方法が必要とされてきた。

2. 研究の目的

蛋白質の立体構造の解析方法として、X線結晶解析、電子顕微鏡解析、NMR解析などの方法があり、それぞれ長所と短所を持っている。高分子量の蛋白質の立体構造を解析する場合に、現状で最も適していると考えられるのはX線結晶解析と電子顕微鏡解析である。しかし、NMR解析には、生体高分子を溶液状態のまま解析できるという大きな長所を持っている。NMRによる蛋白質立体構造解析に関してさまざまな手法が開発され、より高分子量の蛋白質も解析が可能になりつつある。例えば、分子量100万Da近くの蛋白質までスペクトルを測定可能にするTROSY法、シグナルの帰属ができていれば分子量100万Da近くの蛋白質でも立体構造情報が得られる残余双極子法などは、蛋白質へのNMRに適用範囲を飛躍的に広げた。蛋白質立体構造を正確に決定する方法としては、従来のNMR法の2倍程度の大きさまで分子量限界を広げたSAIL法が知られている。また、NMRは分子間相互作用様式を解明するのに適した測定方法であるが、蛋白質-蛋白質、膜-蛋白質相互作用面を非常に正確に決定する方法であるCross Saturation法やTransferred Cross Saturation法（は、相互作用する相手が巨大分子（分子量の制限が無い）でも相互作用を解析可能である。こ

れらの方法は高分子量蛋白質に適用可能な優れた方法であるが、実際に適用するためには、蛋白質NMRシグナルの帰属が必要である。蛋白質NMRシグナルの帰属において現在使われている方法は、3次元NMRを複数測定し解析する方法である。しかし、この方法による解析では、シグナルの分散が良好であり溶解度も1mMに近い試料濃度が必要であるなど試料の状態が理想的な場合にのみ確実に適用できるものであり、適用可能な蛋白質が非常に限られている。よって、蛋白質を超微量かつ超低濃度で解析する方法が開発できれば、上記蛋白質の解析方法を十分に活用し、NMRによるさまざまな蛋白質の解析に多大な貢献ができる。

我々は、高分子量で不安定な蛋白質でも低濃度で簡便にNMRシグナル帰属可能な新規方法を開発してきた。まず、コムギ胚芽無細胞蛋白質合成系を使い、NMR解析が可能な安定同位体標識蛋白質を合成し、実際にNMR解析することに世界に先駆けて成功している。また、20種類のアミノ酸を完全選択的に安定同位体標識しNMRシグナルを簡略化する方法を開発した。さらにその方法をさらに発展させ、1種類のアミノ酸を $^2\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ 標識し、残りの19種類のアミノ酸を $^2\text{H}/^{15}\text{N}$ 標識した20種類の組み合わせの蛋白質を無細胞合成系により調製し、それぞれの蛋白質に対して2次元HN(CO)/HN(CA)/H(N)CA/H(NCO)CA/H(N)CO/H(NCA)CO-TROSYを測定することで従来法に必要な濃度の1/10程度の低濃度の目的蛋白質を用いて、より高分子量で不安定な蛋白質のNMRシグナルを簡便に帰属する方法（MAGICAL法(Method for Assigment with Intelligent Combinatorial Amino acid Labeling)）を開発した。

本研究の目的は、我々が開発してきたMAGICAL法をさらに拡大・発展させ、従来の3次元NMR解析方法では数10mgかつ1mM程度の濃度が必要であった蛋白質NMR解析を、1mg以下かつ10 μM 以下の濃度で可能にしようとするものである。また、この方法を適用することにより、従来法では解析が不可能であった分子量10万Da以上の蛋白質のNMRシグナル帰属が可能になるので、高分子量蛋白質に適用可能な他の方法と組み合わせ、高分子量蛋白質の相互作用解析が可能になることが期待される。

MAGICAL法を用いると、分子量5万Da以上の蛋白質を200 μM 以下の濃度で解析可能なことを確認済みである。しかし、この方法にはまだまだ拡大・発展の余地がある。そこで、本研究では、安定同位体標識方法をさらに工夫し、測定パルスプログラムを最適化することで、NMRシグナル帰属に必要な目的蛋白質の濃度を従来のMAGICAL法の1/10以下に下げることが第一の目的とする。そして、改良されたMAGICAL法を用いて実際に超微量蛋白質や高分子量蛋白質のNMRシグナ

ルの帰属を行い、残余双極子法、Cross Saturation 法や Transferred Cross Transfer 法と組み合わせることで、生体分子相互作用をNMRにより解析する方法の確立を目指すことを第二の目的とする。

3. 研究の方法

(1) MAGICAL法における標識方法の改良

MAGICAL法は、1種類のアミノ酸を $^2\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ 標識し、残りの19種類のアミノ酸を $^2\text{H}/^{15}\text{N}$ 標識した20種類の組み合わせの蛋白質を無細胞蛋白質合成系により調製し、それぞれの蛋白質に対して2次元HN(CO)/HN(CA)/H(N)CA/H(NCO)CA/H(N)CO/H(NCA)CO-TROSY(下図参照)を測定し、解析することで従来法に必要な濃度の1/10程度の低濃度の目的蛋白質を用いて、より高分子量で不安定な蛋白質のNMRシグナルを簡便に帰属可能な方法であり、我々が独自に開発したものである。この方法ですでに分子量5万Da以上の蛋白質を200 μM 以下の濃度で解析可能なことを確認済みである。このMAGICAL法で使う測定方法のうち、HN(CO)/HN(CA)/H(N)CO-TROSYについては、上記標識方法を用いれば問題はないが、 $\text{C}\alpha$ の展開時間を観測するH(N)CA/H(NCO)CA-TROSYは、 $\text{C}\beta$ とのカップリングにより、 $\text{C}\alpha$ のシグナルが2つに分裂し、解像度が低下するとともに測定感度が1/2に低下してしまう。またH(NCA)CO-TROSYに関しては、 $\text{C}\alpha$ からCOに磁化を移動する際に $\text{C}\beta$ とのカップリングにより著しい磁化のロスを引き起こし感度が数分の1に低下する。その感度低下は、 $\text{C}\alpha$ と $\text{C}\beta$ の化学シフトが非常に近いセリン残基とスレオニン残基において特に顕著である。そこで、通常の $^2\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ 標識アミノ酸のかわりに $^2\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ 標識でもCOと $\text{C}\alpha$ のみが ^{13}C 標識され $\text{C}\beta$ が ^{13}C 標識されていないアミノ酸を用いることで、これらの測定の感度低下の問題を解決し、MAGICAL法の限界を大きく引き上げることができると考えられる。そこで、平成20年度は、このような特殊標識アミノ酸を用いた新規標識法開発を行い、従来のMAGICAL法と比較してどの程度の感度向上が見られるかを検証する。新規安定同位体標識を行う蛋白質は分子量が大きくこれまでのMAGICAL法開発にも使用してきたマルトース結合蛋白質とする。

(2) MAGICAL法におけるパルスプログラムの改良

MAGICAL法に用いるNMRパルスプログラムは、通常の解析に用いる3次元NMRパルスプログラムを2次元版に変えたものであるが、このプログラムは均一に安定同位体標識された蛋白質に最適化されてお

り、MAGICAL法に最適化されていない。そこで、(1)の試料を用い、パルスプログラムの各種パラメータを改良し、MAGICAL法標識の蛋白質に最適化されたパルスプログラムを開発する。また、巨大蛋白質のNMR解析を行うためには、感度とTROSY効果の点から高磁場NMRの利用が不可欠であるが、700MHz以上のNMRで巨大蛋白質の測定を行うとH(NCO)CAの測定において、カルボニル炭素の異方性により著しい感度低下を引き起こす。H(NCO)CA-TROSYはNMRシグナルの帰属に重要な情報を与えるので、この測定方法と同様の情報が得られつつ高磁場NMRにおいても測定感度が低下しない新しいパルスプログラムを開発する。

(3) 改良MAGICAL法の生体分子相互作用解析への応用

平成20年度で開発した改良MAGICAL法の実際に生体分子相互作用解析への適用を試みる。分子量が5万Da以上のものかあるいは溶解度が10 μM 程度のものなど、従来のNMR解析方法ではNMRシグナルの帰属が困難でありターゲットとなり得なかったものをターゲットとする。

まず、ターゲットの蛋白質について、コムギ胚芽無細胞蛋白質合成系による発現システムを確立する。次に、次に、 $^2\text{H}/^{15}\text{N}$ 二重標識された試料を調製し、TROSY-HSQC測定を行い、 $^1\text{H}-^{15}\text{N}$ のシグナルが期待される残基数分現れるかどうかを指標にして、NMR測定条件の検討を行う。バッファーの種類、pH、塩の有無とその種類、界面活性剤の有無とその種類を検討することにより、良い $^1\text{H}-^{15}\text{N}$ TROSY-HSQCスペクトルが得られるような溶液条件を決定する。

測定条件が決定できたら、コムギ胚芽無細胞蛋白質合成系を用い、1種類のアミノ酸だけが $^2\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ または $^2\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ (1,2- ^{13}C)で三重標識され、他のアミノ酸が $^2\text{H}/^{15}\text{N}$ で二重標識されたものを合計20種類作成する。必要に応じて、1種類のアミノ酸だけが $^2\text{H}/^{15}\text{N}$ で標識され、他のアミノ酸が ^2H で標識されたものも作成する。標識を行った20種類の蛋白質について、順次2次元HN(CO)/HN(CA)/H(N)CA/H(NCO)CA/H(N)CO/H(NCA)CO-TROSY等のスペクトルを測定し、NMRシグナルの帰属を行う。

帰属が完了したら、残余双極子法(等のNMR測定を行い、蛋白質・蛋白質や蛋白質・低分子などの分子間相互作用を解析する。

4. 研究成果

我々が開発したMAGICAL法は、特殊な安定同位体標識を20通り行った蛋白質試料を無細胞蛋白質合成系により調製し、それぞれの蛋白質に対して2次元HN(CO)/HN(CA)/H(N)CA/H(NCO)CA/H(N)CO/H(NCA)CO-TROSYを測定し、解析することで従来法に必

要な濃度の 1/10 程度の低濃度の目的蛋白質を用いて、より高分子量で不安定な蛋白質の NMR シグナルを簡便に帰属可能な方法である。

まず、この MAGICAL 法を、より高感度に測定ができるように各種測定プログラムの改良を行った。まず、従来の最適化されていないパルスプログラムのパラメータの最適化を行うことで、HN(CA)/ H(N)CA/ H(NCA)CO- TROSY において、測定感度を 30% 程度向上させることができた。これは、同じ測定時間であれば、従来の 3/4 の濃度の試料を用いれば良く、同じ濃度であれば従来の 3/5 の測定時間で同等のスペクトルが得られることに相当する。また、700 MHz のなどの高磁場 NMR 装置において、H(NCO)CA-TROSY の著しい感度低下を回避するために、新規に intra-H(N)CA-TROSY の測定パルスプログラム（既存の intra-HNCA とは異なる）を完成させた。この方法を用いると H(NCO)CA-TROSY と同等の情報得られるスペクトルを、従来の 3 倍以上の感度で測定することができる。これは、同じ測定時間であれば、従来の 1/3 の濃度の試料を用いれば良く、同じ濃度であれば従来の 1/9 の測定時間で同等のスペクトルが得られることに相当する。以上のことより、高分子量蛋白質の NMR シグナルを帰属するために必要な試料濃度の大幅に低下、あるいは測定時間の大幅な短縮が可能になった。

次に、特に、H(N)CA/H(NCO)CA-TROSY や H(NCA)CO-TROSY などの測定感度を大幅に向上させるために、通常は $^2\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ 標識アミノ酸のかわりに $^2\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ 標識でも CO と C α のみが ^{13}C 標識され C β が ^{13}C 標識されていないアミノ酸を用いる方法を検討した。その結果、HN(CA)/ H(NCO)CA-TROSY においては、感度が 2 倍に向上した。これは、同じ測定時間であれば、従来の 1/2 の濃度の試料を用いれば良く、同じ濃度であれば従来の 1/4 の測定時間で同等のスペクトルが得られることに相当する。また、スレオニン残基やセリン残基の H(NCA)CO-TROSY においては感度が 10 倍程度向上した。これは、同じ測定時間であれば、従来の 1/10 の濃度の試料を用いれば良く、同じ濃度であれば従来の 1/100 の測定時間で同等のスペクトルが得られることに相当する。以上のことより、高分子量蛋白質の NMR シグナルを帰属するために必要な試料濃度の大幅に低下、あるいは測定時間の大幅な短縮が可能になった。

次に、この改良 MAGICAL 法を、小胞体ストレスセンサー蛋白質である IRE1p 蛋白質に適用することを試みた。この蛋白質は非常に素性が悪く、最高でも 30 μM 程度の溶解度しかなく、従来の 3 次元 NMR を用いたシグナル帰属方法では解析が不可能であ

った。しかし、昨年度我々が改良した MAGICAL 法を適用し、20 通りの安定同位体標識を行い、2 次元の HN(CO)/ HN(CA)/ H(N)CA/ intra- H(N)CA/ H(NCO)CA/ H(N)CO/ H(NCA)CO- TROSY スペクトルを測定し、NMR スペクトル解析を行うことでほぼすべての HN シグナルの帰属を行うことができた。

また、改良 MAGICAL 法の応用として昨年度から続けてきた小胞体ストレスセンサー蛋白質である IRE1p 蛋白質の HN シグナルの帰属を完了させた。また、新たな解析対象の一つとして単量体では 10 μM 程度しか溶解しない植物の光受容体フィトクロームのヒスチジンキナーゼ様ドメインを選び改良 MAGICAL 法を適用することで、ほぼすべての HN シグナルの帰属を完了した。さらに、分子量が大きく溶解度も低い Paramecium bursaria Chlorella virus l mRNA Capping Enzyme に改良 MAGICAL 法を適用したところ、この蛋白質は構造多型を持ちきわめて NMR 解析が困難であるにもかかわらずほぼすべての HN シグナルを帰属することができた。また、得られた帰属情報をもとに残余双極子法を適用したところ、この蛋白質は、基質の有りと無しとで極めて大きなドメイン配置の変化が起きることが明らかになった。以上のように改良 MAGICAL 法は、蛋白質 NMR シグナルの帰属およびその応用に対する非常に強力なツールで有ることが明らかになった。

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 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

河野 俊之 (KOHNO TOSHIYUKI)

独立行政法人理化学研究所・NMR パイプライン

高度化研究チーム・客員研究員

研究者番号：40416657

(2) 研究分担者

無し

(3) 連携研究者

無し