

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 22 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22570109

研究課題名（和文） アミド水素に依存しないタンパク質立体構造解析のための NMR 測定および解析法の開発

研究課題名（英文） Development of NMR measurement and analysis method for protein structural study in  $^2\text{H}_2\text{O}$  solution.

研究代表者

小椋 賢治（OGURA KENJI）

北海道大学・大学院先端生命科学研究院・特任准教授

研究者番号：50270682

研究成果の概要（和文）：

これまで溶液 NMR によるタンパク質の立体構造解析のためには、軽水 ( $\text{H}_2\text{O}$ ) 溶媒に溶解したタンパク質試料を用いて、アミド水素由来の信号を手がかりとして主鎖連鎖帰属をおこなう必要があった。しかし、アミド水素は溶媒中の  $\text{H}_2\text{O}$  分子と交換しうるため、ある条件下ではアミド水素由来信号が検出できず、その結果、スペクトル解析が困難であった。研究代表者らは、新規 NMR 測定法である 3D HCA(N)CO パルスシークエンスを開発した。この手法を用いて、重水 ( $^2\text{H}_2\text{O}$ ) 溶媒中においてもタンパク質の主鎖連鎖帰属が可能となることを示した。

研究成果の概要（英文）：

We developed an NMR pulse sequence, 3D HCA(N)CO, to correlate the chemical shifts of protein backbone  $^1\text{H}\alpha$  and  $^{13}\text{C}\alpha$  to those of  $^{13}\text{C}'$  in the preceding residue. When combined with HCACO, HCAN and HCA(CO)N, the HCA(N)CO sequence allows the sequential assignment using backbone  $^{13}\text{C}'$  and amide  $^{15}\text{N}$  chemical shifts without resort to backbone amide protons. This assignment strategy was demonstrated for  $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -labeled GB1 dissolved in  $^2\text{H}_2\text{O}$ . The quality of the GB1 structure determined in  $^2\text{H}_2\text{O}$  was similar to that determined in  $\text{H}_2\text{O}$  in spite of significantly smaller number of NOE correlations. Thus this strategy enables the determination of protein structures in  $^2\text{H}_2\text{O}$  or  $\text{H}_2\text{O}$  at high pH values.

交付決定額

(金額単位：円)

|         | 直接経費      | 間接経費    | 合計        |
|---------|-----------|---------|-----------|
| 2010 年度 | 1,300,000 | 390,000 | 1,690,000 |
| 2011 年度 | 800,000   | 240,000 | 1,040,000 |
| 2012 年度 | 900,000   | 270,000 | 1,170,000 |
| 年度      |           |         |           |
| 年度      |           |         |           |
| 総計      | 3,000,000 | 900,000 | 3,900,000 |

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, タンパク質, 立体構造解析

## 1. 研究開始当初の背景

NMR 法によるタンパク質立体構造解析において、信号帰属および立体構造決定に必要な NMR スペクトルのデータセットは、タンパク質試料を軽水 ( $\text{H}_2\text{O}$ ) 溶媒に溶解した状態で測

定しなければならなかった。これは、ペプチド主鎖連鎖帰属および水素原子間距離情報取得のために、主鎖アミド水素由来信号が非常に重要な役割を果たしているからである。このための NMR スペクトルとして、HNCACB お

よび CBCA(CO)NH のデータセットが必要である。そのため、軽水溶媒中での NMR 測定が必須となっていた。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、主鎖アミド信号に依存せずタンパク質立体構造解析を実現するための NMR 測定法およびデータ解析法を開発することである。具体的には、ペプチド主鎖連鎖帰属のために主鎖アミド水素の信号を利用せず、その代替として主鎖カルボニル炭素の利用を提案するものである。

## 3. 研究の方法

アミド水素に依存しない主鎖連鎖帰属のための NMR 測定パルスシーケンス 3D HCA(N)CO を新規開発する。このパルスシーケンスにより NMR 測定をおこない、信号の感度および分散の程度を実験データから評価する。

前項で得られた HCA(N)CO スペクトルおよび HCAN, HCACO, HCA(CO)N の各スペクトルからなるデータセットを用いて実際に主鎖連鎖帰属が可能であることを確認する。

アミド水素に依存しないタンパク質立体構造決定を可能にするためのスペクトル解析および構造計算手法を開発する。

## 4. 研究成果

2010 年度は当初研究計画のとおり、新規パルスシーケンス 3D HCA(N)CO 法を開発した。この測定法の感度および分解能については、標準タンパク質試料を重水溶媒に溶解し、さらに重水素デカップルを併用することにより、他の既発表測定法と遜色ないことを確認した。実際に GB1 タンパク質を用いて、他の測定法 (HCACO, HCAN, HCA(CO)N) と併用することでタンパク質主鎖の連鎖帰属が確実にこなえる手法を確立した。さらに、重水溶媒中で得た NOESY スペクトル由来の距離制限を用いて立体構造計算をおこない、軽水溶媒由来の立体構造と比較したところ、ほぼ同一の立体構造が得られ、また、構造収束の指標 (主鎖 rmsd) は、前者が 0.40 Å, 後者が 0.48 Å であった。以上の結果から、重水溶媒中におけるタンパク質の主鎖連鎖帰属および立体構造解析は、従来型の軽水溶媒中での解析と同程度の精度であることがわかった (Ogura et al., Journal of Biomolecular NMR 47, 243, 2010)。

2011 および 2012 年度は 2010 年度の研究成果をさらに発展させ、本手法をタンパク質と相互作用するペプチドの構造およびダイナミクス解析に応用することにした。

Grb2 タンパク質の SH3 ドメインはプロリンを多く含む 10 残基ペプチド (PRR) を認識・結合することで、細胞内シグナル伝達を担う

機能をもっている。すでに SH3-PRR 複合体の立体構造は NMR 法および X 線結晶構造解析法によって解析されているが、PRR が SH3 ドメインと結合していない状態での立体構造、および、SH3 に結合する際の詳細なメカニズムは不明であった。そこで、研究代表者は、本研究で開発した NMR 測定および解析法を適用し、PRR がフリー状態においてもヘリックス構造を有していることをあきらかにした。PRR は主鎖アミド水素含量が極端に少ないため、研究代表者の開発した手法はきわめて有効であった。さらに、NMR 緩和分散法を用いて、このペプチドが SH3 ドメインと相互作用する際の立体構造ダイナミクスを解析した。その結果、ペプチドのうちふたつの残基が SH3 ドメインとの相互作用に重要な役割を担っていることがわかった (Ogura, Scientific Reports, 投稿済み査読中)。

## 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 11 件)

(1) Kumeta H, Ogura K, Nishimiya Y, Miura A, Inagaki F, Tsuda S. NMR structure note: a defective isoform and its activity-improved variant of a type III antifreeze protein from *Zoarces elongates* Kner. Journal of Biomolecular NMR 55, 225-230 (2013). 査読有

(2) Yokogawa M, Kobashigawa Y, Yoshida N, Ogura K, Harada K, Inagaki F. NMR analyses of the interaction between the EEA1 FYVE domain and phosphoinositide embedded in lipid bilayer. Journal of Biological Chemistry 287, 34936-452012 (2012). 査読有

(3) Ogura K, Okamura H, Katahira M, Katoh E, Inagaki F. Conformational dynamics of yeast calmodulin in the Ca(2+)-bound state probed using NMR relaxation dispersion. FEBS Letters 586, 2548-2554 (2012). 査読有

(4) Kobashigawa Y, Saio T, Ushio M, Sekiguchi M, Yokochi M, Ogura K, Inagaki F. Convenient method for resolving degeneracies due to symmetry of the magnetic susceptibility tensor and its application to pseudo contact shift-based protein-protein complex structure determination. Journal of Biomolecular NMR 53, 53-63 (2012). 査読有

(5) Ogura K, Kumeta H, Takahashi K, Kobashigawa Y, Yoshida R, Itoh H, Yazawa M, Inagaki F. Solution structures of yeast *Saccharomyces cerevisiae* calmodulin in calcium- and target peptide-bound states reveal similarities and differences to vertebrate calmodulin. *Genes to Cells* 17, 159-172 (2012). 査読有

(6) Noda NN, Satoo K, Fujioka Y, Kumeta H, Ogura K, Nakatogawa H, Ohsumi Y, Inagaki F. Structural basis of atg8 activation by a homodimeric e1, atg7. *Molecular Cells* 44, 462-475 (2011). 査読有

(7) Saio T, Ogura K, Shimizu K, Yokochi M, Burke TR Jr, Inagaki F. An NMR strategy for fragment-based ligand screening utilizing a paramagnetic lanthanide probe. *Journal of Biomolecular NMR* 51, 395-408 (2011). 査読有

(8) Kobashigawa Y, Harada K, Yoshida N, Ogura K, Inagaki F. Phosphoinositide-incorporated lipid-protein Nanodiscs: A tool for studying protein-lipid interactions. *Analytical Biochemistry* 410, 77-83 (2011). 査読有

(9) Ogura K, Kumeta H, Inagaki F: Structure determination of proteins in  $^2\text{H}_2\text{O}$  solution aided by a deuterium-decoupled 3D HCA (N) CO experiment. *Journal of Biomolecular NMR* 47, 243-248 (2010). 査読有

(10) Kumeta H, Watanabe M, Nakatogawa H, Yamaguchi M, Ogura K, Adachi W, Fujioka Y, Noda NN, Ohsumi Y, Inagaki F. The NMR structure of the autophagy-related protein Atg8. *Journal of Biomolecular NMR* 47, 237-241 (2010). 査読有

(11) Takaku T, Ogura K, Kumeta H, Yoshida N, Inagaki F. Solution structure of a novel Cdc42-binding module of Bem1 and its interaction with Ste20 and Cdc42. *Journal of Biological Chemistry* 285, 19346-19353 (2010). 査読有

[学会発表] (計 19 件)

(1) 小椋賢治, タンパク質 NMR の新展開-ダイナミクスと創薬-, 高知大学大学院博士課程医学専攻 DC セミナー, 2013 年 3 月 13 日, 高知大学 (高知市)

(2) 小椋賢治, 岡村英保, 久米田博之, 矢澤

道生, 稲垣冬彦, 出芽酵母カルモジュリンの立体構造とダイナミクス, 2012 年度日本生物物理学会北海道支部例会, 2013 年 3 月 5 日, 北海道大学 (札幌市)

(3) 小椋賢治, 常磁性 NMR 法の創薬への応用, 第 19 回未来創薬・医療イノベーションセミナー, 2013 年 1 月 16 日, 北海道大学 (札幌市)

(4) 小椋賢治, 住本英樹, 稲垣冬彦, NADPH オキシダーゼ細胞質因子 p47phox の柔軟な構造と機能, 第 85 回日本生化学会大会, 2012 年 12 月 14 日, 福岡国際会議場 (福岡市)

(5) 小椋賢治, 岡村英保, 久米田博之, 矢澤道生, 稲垣冬彦, Structure and dynamics of yeast calmodulin. 第 51 回 NMR 討論会, 2012 年 11 月 8 日, ウィンクあいち (名古屋市)

(6) 小椋賢治, Pseudo Contact Shift が生み出す構造情報とその取り扱い, 平成 24 年度日本分光学会 NMR 分光部会集中講義, 2012 年 10 月 24 日, 東京大学 (東京都)

(7) Ogura K, Okamura H, Kumeta H, Yazawa M, Inagaki F: Structure and dynamics of yeast calmodulin. The 10th International Symposium for Future Drug Discovery and Medical Care, 2012 年 10 月 2 日, 北海道大学 (札幌市)

(8) Ogura K, Okamura H, Kumeta H, Yazawa M, Inagaki F: Structure and dynamics of yeast calmodulin. 25th ICMRBS, 2012 年 8 月 19 日, Lyon Convention Centre, (France)

(9) 小椋賢治, 岡村英保, 久米田博之, 矢澤道生, 稲垣冬彦, Structure and dynamics of yeast calmodulin. 第 12 回日本蛋白質科学会年会, 2012 年 6 月 22 日, 名古屋国際会議場 (名古屋市)

(10) 小椋賢治, 岡村英保, 久米田博之, 矢澤道生, 稲垣冬彦, Structure and dynamics of yeast calmodulin. 第 34 回日本分子生物学会年会, 2011 年 12 月 14 日, パシフィコ横浜 (横浜市)

(11) Ogura K, Okamura H, Kumeta H, Yazawa M, Inagaki F: Structure and dynamics of yeast calmodulin. 第 50 回 NMR 討論会記念国際シンポジウム, 2011 年 11 月 15 日, 大さんばしホール (横浜市)

(12) 小椋賢治, 斎尾智英, 小橋川敬博, 稲垣冬彦, 高圧リフォールディングによるタン

パク質立体構造解析試料の調製法, 第 52 回  
高压討論会, 2011 年 11 月 9 日, 沖縄キリス  
ト教学院大学 (沖縄県西原町)

(13) Ogura K, Okamura H, Kumeta H, Inagaki  
F: Characterizing conformational change  
in yeast calmodulin using NMR relaxation  
dispersion and SAXS. 第 49 回日本生物物理  
学会年会, 2011 年 9 月 18 日, 兵庫県立大学  
(兵庫県姫路市)

(14) 小椋賢治, 久米田博之, 稲垣冬彦, プ  
ロリンリッチペプチドの構造とダイナミク  
ス, 第 11 回日本蛋白質科学会年会, 2011 年  
6 月 8 日, ホテル阪急エキスポパーク (大阪  
府吹田市)

(15) 小椋賢治, 重水溶媒中におけるタンパ  
ク質立体構造解析, よこはま NMR 構造生物学  
研究会第 41 回ワークショップ, 2011 年 3 月  
2 日, 理化学研究所横浜研究所 (横浜市)

(16) 小椋賢治, 丹代翼, 吉永壮佐, 小橋川  
敬博, 久米田博之, 伊藤隆司, 稲垣冬彦, 出  
芽酵母 Bem1 および Cdc24 の PB1 ドメインヘ  
テロダイマーの NMR 構造, BMB2010, 2010 年  
12 月 7 日, 神戸国際会議場 (神戸市)

(17) 小椋賢治, 久米田博之, 稲垣冬彦,  
Deuterium-decoupled 3D HCA(N)CO に支援さ  
れた重水溶媒中におけるタンパク質の立体  
構造解析, 第 49 回 NMR 討論会, 2010 年 11 月  
15 日, タワーホール船堀 (東京都)

(18) Ogura K, Kumeta H, and Inagaki F:  
Structure determination of proteins in  $^2\text{H}_2\text{O}$   
solution aided by a deuterium-decoupled  
HCA(N)CO experiment. 24th ICMRBS, 2010 年  
8 月 22 日, Cairns Convention Centre, Cairns,  
Australia

(19) 小椋賢治, 久米田博之, 高橋清大, 小  
橋川敬博, 吉田良輔, 伊藤浩之, 矢澤道生,  
稲垣冬彦, 酵母カルモジュリンの特異な標的  
認識機構, 第 10 回日本蛋白質科学会年会,  
2010 年 6 月 16 日, 札幌コンベンションセン  
ター (札幌市)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

小椋 賢治 (OGURA KENJI)

北海道大学・大学院先端生命科学研究院・  
特任准教授

研究者番号: 50270682

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者 なし