

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 6月 5日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011 ~ 2012

課題番号：23770109

研究課題名（和文）

蛋白質内部の芳香環回転運動速度の核スピン緩和解析法の開発

研究課題名（英文） The development of a method for studying aromatic ring flipping motion in the interior of proteins

研究代表者

武田 光広 (TAKEDA MITSUHIRO)

名古屋大学・理学研究科・特任助教

研究者番号：90508558

研究成果の概要（和文）：蛋白質分子内のフェニルアラニン、チロシン残基芳香環の反転運動は蛋白質の稀に生じる大きな構造揺らぎと関連し、同揺らぎに関する唯一の情報源ともなる。本課題では、SAIL-NMR法とCPMG緩和分散法を組み合わせた芳香環反転速度の解析法の開発を行った。これにより、定量解析可能な反転速度の時間領域がミリ秒からマイクロ秒近くまで拡張され、環反転速度に基づいた構造揺らぎの研究が促進されることが期待される。

研究成果の概要（英文）：Aromatic rings of phenylalanine and tyrosine residues in the interior of proteins infrequently rotates about their C<sub>β</sub>-C<sub>γ</sub> axis in concert with the large amplitude slow breathing motion of protein molecules. An NMR method for evaluating ring-flipping rate based on a Carr-Purcell Meiboom Gill relaxation experiments and SAIL-NMR method is developed. This method enables the quantitative evaluation of the ring-flipping phenomenon on the micro-second time scales.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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

## 1. 研究開始当初の背景

近年 NMR 法による蛋白質の構造解析技術は急速に進歩し続けている。この背景には蛋白質の安定同位体標識技術の高度化が多大な貢献をしており、特に甲斐荘等（名大・首都大）が開発した立体整列同位体標識（stereo-array isotope labeling; SAIL）法は国際的に高い関心が寄せられている。同手法は蛋白質試料の高度安定同位体標識に基づく技術であり、従来不可能であった 40kDa 超の蛋白質の NMR 構造決定を実現し、現在も改良を進め構造決定の分子量限界を押し上げて続けている。今後は、立体構造決定に加えて蛋白質の生物機能に関する動態解析手法としての開発研究も並行して進める

事が重要である。

溶液中の蛋白質は、large amplitude slow breathing motion と呼ばれる大きな構造揺らぎを生じる。同現象は、蛋白質が持つフェニルアラニン(Phe)、チロシン(Tyr)残基の側鎖芳香環が分子内部でもフリップフロップ運動(以下、“反転運動”と記す)をするという観測事実からその存在が知られている。蛋白質の分子内部に位置する同芳香環は結晶構造中ではその周りに他の原子が密にパッキングし動く余地が無いが、溶液 NMR 法により芳香環の $\delta 1$ ,  $\delta 2$ 、或いは $\epsilon 1$ ,  $\epsilon 2$ のシグナルを観測すると、むしろ両者が平均化して観測されることが一般的であり、芳香環がその C $\beta$ -C $\gamma$ 軸上に関して速く反転している事を示

している。(図1)この反転運動速度は圧力に依存して変化することから、蛋白質の構造が過渡的に大きく揺らぎ、芳香環の周りに空間が形成される事で分子内部の芳香環反転運動が生じることが明らかとされている。同現象の研究は、スイス工科大学 Wüthrich 教授のグループを中心として長年にわたり精力的に行われてきたが、当時から現在に至るまでその解析は低分子量蛋白質の芳香族アミノ酸の NMR スペクトルの線形解析に限られ、このような揺らぎ構造と蛋白質の生物機能との関連性を幅広く検証することは不可能であった。

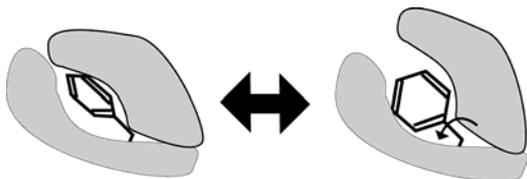


図1 芳香環反転と蛋白質の構造揺らぎ

我々は、過去数年に渡って芳香族アミノ酸の NMR 解析に焦点を絞った SAIL 法の新たな技術開発に取り組んできた。芳香環のシグナルを明瞭に観測するため、環の中で解析対象となる CH 対以外の炭素、水素は全て  $^{13}\text{C}$ 、 $^2\text{H}$  と位置選択標識された SAIL 芳香族アミノ酸を利用することで、従来不可能であった高分子量蛋白質中の芳香族シグナル観測などが実現するものであり、本課題はその応用研究の一つとして取り組むものである。

## 2. 研究の目的

$^{13}\text{C}$  Carr-Purcell Meiboom-Gill (CPMG) 緩和分散法と SAIL 技術を利用した蛋白質中の Phe、Tyr 残基側鎖の芳香環フリップフロップ運動の新たな速度解析法を開発することを目的とする。

解析法の原理:蛋白質内部において、Phe/Tyr 芳香環の  $\delta 1$  と  $\delta 2$  位の水素/炭素原子は互いに局所的化学環境が異なるため、芳香環の回転が十分遅ければ両者の NMR シグナルは分離して観測される。これに対して芳香環の回転速度が  $\delta 1$  と  $\delta 2$  との間の化学シフト差より速くなると両シグナルは平均化して観測される。この線形に基づいた解析は精度が低く解析可能な時間域も秒からミリ秒の間に限定されていた。これに対し、 $\delta$ 位にある芳香族原子の核スピン緩和現象はミリ秒より速い領域でも回転運動による影響を受けるため、より幅広い時間域における交換速度の定量化が可能となり、シグナル強度に基づいた方法なので線形解析と比べて解析精度の向上も期待される。同核スピン緩和の解析には、現在化学交換の解析として幅広く利用され

ている CPMG 緩和分散法を適用する。同手法は、観測対象となるスピン系が孤立している必要があるため、SAIL 技術により合成した SAIL アミノ酸を利用する。

CPMG 法の実証試験:本課題の実施期間内に、新たに開発する手法の実証実験を行う。このため、大腸菌高発現系を用いて調製した SAIL 標識 BPTI (6.5 kDa)を用いて CPMG 法の実証試験を行う。BPTI は4分子の Phe と4分子のチロシンを含む窮状蛋白質である。

(図2)この中で、Phe45, Tyr23, Tyr35 は10度から60°Cの温度領域で環反転速度が化学シフト差に近い速度となるため、温度変化に伴う線形変化が明瞭に捉えられる。

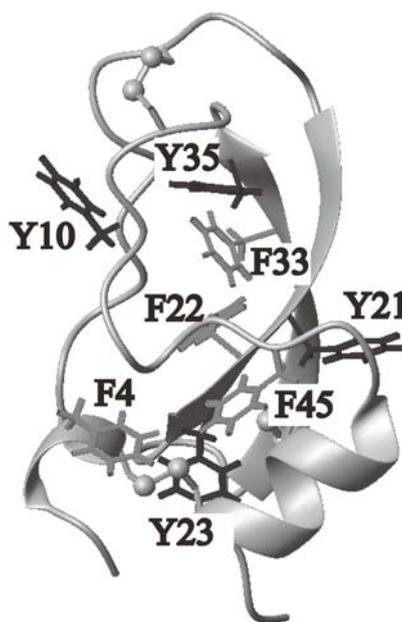


図2 BPTI 中の Phe, Tyr 残基

## 3. 研究の方法

本課題では、芳香環  $^{13}\text{C}$  炭素に関する  $^{13}\text{C}$  CPMG 緩和分散実験を行う。同実験では、厳密には  $^{13}\text{C}$  が他の  $^{13}\text{C}$  核とスピン相互作用せず、孤立状態に有る事が要求される。その観点からすると、従来の  $\delta 1$  と  $\delta 2$  位が  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  とされ他は全て、 $^{12}\text{C}$ 、 $^2\text{H}$  とされたデルタ型 SAIL チロシンは有用であると考えられる。しかし、この標識パターンでは、 $\delta 1$  と  $\delta 2$  炭素間に 5 Hz 程度のスピン結合が存在し、同スピン結合の CPMG 緩和分散解析に対する影響が懸念される。そのため、本課題では  $\delta 1$ -SAIL Tyr を、協力関係にある SAIL テクノロジーズ社から入手する。同芳香族アミノ酸は、芳香環  $\delta$ 位の片側のみが  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  となっており、他の芳香族炭素、水素は全て  $^{12}\text{C}$ 、 $^2\text{H}$  となっている。

実施手順として、 $\delta 1$ -SAIL Tyr 選択標識 BPTI 蛋白質を調製する。予備実験より、BPTI 蛋白質は無細胞合成反応における発現が芳しくない事実を得ているため、同蛋白質の発

現は大腸菌発現系を用いる。我々は、BL21 (DE3)大腸菌株を用いて、発現誘導時直前に 1L 培養液当たり、2-3 mg の SAIL アミノ酸を添加することにより精製収量 1-2 mg で同蛋白質を調製した。

NMR 測定は、500 MHz、600MHz と 900MHz の NMR 装置を用い、 $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  relaxation compensated CPMG 緩和分散法のパルス系列を適用することで実験を行った。得られた緩和分散プロファイルに対して、Mathlab ソフトウェアによる線形回帰を行い、反転速度と化学シフト差を見積もった。

#### 4. 研究成果

##### (1) 検証実験

CPMG 実験に先立ち、デルタ型 SAIL Phe, Tyr ラベル化 BPTI について温度を 10 から 60 度の範囲内で変化させて、 $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC スペクトルを測定し、そのデルタ位の  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  シグナルの線形から、CPMG 解析に適した intermediate 領域 (kex~dw) の線形を示す残基・温度を探索した。その結果、Tyr23 由来のデルタシグナルが 50 度で炭素軸に有意に化学交換による広幅化を生じており、考案手法の検証に適していると結論した。解析にあたり、SAIL テクノロジーズ社の協力のもと、環のデルタ位の片側のみが、 $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$  とされたチロシンを合成して、BPTI 蛋白質に取り込ませた試料を調製した。調製試料に対して、 $^1\text{H}$  共鳴周波数が 500 MHz、600 MHz、900 MHz、950 MHz (950 MHz マシンは大阪大学蛋白質研究所にて測定)にて、 $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  relaxation compensated Carr-Purcell-Meiboom-Gill 緩和分散実験を実施した。CPMG 全体の時間は 30 ms と設定し、Tyr23 のデルタ位  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  シグナルの effective field strength に対する強度変化をプロットし、得られた理論式による線形回帰解析を行った。

まず、得られた分散緩和曲線は反転速度が化学シフトスケールに比べて非常に速いチロシン残基 (Tyr10) に対してフラットなプロファイルが得られた。この結果は、CPMG 解析実験が正しく実施されていることを示す。一方で、焦点となる Tyr23 については、effective field の増加に対してシグナル強度の減少が観測された。NMR マシンの磁場が大きくなるに従い、化学シフト差が大きくなるため、effective field に対する緩和分散プロファイルの影響は顕著となる。しかし、シグナル全体の強度も顕著に減衰するため、磁場が増加するほど解析の精度が落ちるといった問題も明らかとなってきた。特に、950 MHz マシンのデータは非常に effective field に対して大きく強度減衰が生じるが、化学交換の影響が非常に顕著なため、測定誤差が大きいものとなった。従来の CPMG 実験

では、相互変換する副状態の存在比率が偏っている場合と比べると、環反転運動の場合は比率が 1:1 であり化学交換による広幅化の影響が非常に大きい。

以上の結果から、500 MHz、600 MHz で取得した 2 点のデータを利用して、速度解析を実施した。その結果、反転速度が  $2000 \pm 460 \text{ s}^{-1}$  と見積もられた。これは、以前に実施された線形解析より得られた値と同じオーダーである。

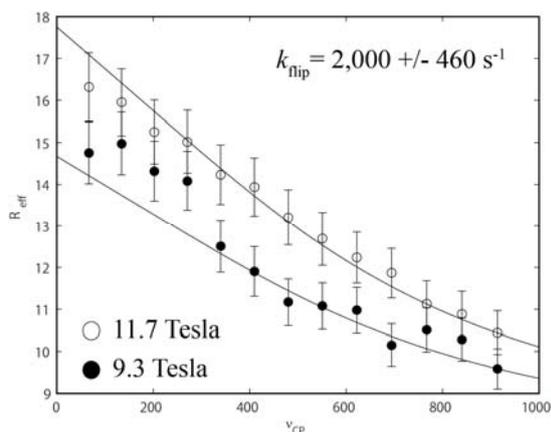


図 3 得られた緩和分散プロファイル

なお、本課題では片側チロシンを利用しているため、デルタ位両側に  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$  対がある・SAIL Tyr において問題となる、2J の影響はないことが保障されている。現在、本課題のデータをまとめて、論文投稿の準備を進めている段階であるが、その過程において比較対象となる、デルタ位の両側が  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$  対となった Tyr を合成して同実験を行った結果、驚くべき事に、片側ラベルと両側ラベル体との間には、緩和分散曲線に有意な差が観測されなかった。可能性として、デルタ 1、デルタ 2 はスピン結合しているが、環反転運動により化学交換を受けているため intermediate 領域ではその効果が実効的に無視出来る程小さくなってしまっているのではないかと考え、次項で示す numerical な解析を行った。

##### (2) 理論的考察

デルタ 1 炭素とデルタ 2 炭素には約 5 Hz のスピン結合が存在している。CPMG 実験では、5 Hz のスピン結合であっても、無視出来ず、緩和分散プロファイルにおいて振動が観測されてくる。しかし、2つの核は、環反転運動により相互変換している。環の反転速度が小さければ、スピン結合の効果は緩和分散プロファイルに顕れるが、環の反転速度が化学シフト差に比べて非常に早ければ、その影響は実効的になくなる。問題は、intermediate 領域 (kex~dw) において、スピン結合の影

響が無視出来る程小さくなるかである。そのことを密度行列を利用したスピン系の計算から検証した。一般に、化学シフト、スピン結合の影響下における NMR の核スピンの振る舞いを計算するには、リュウビル・ホン・ノイマン (Liouville-von-Neumann) 方程式が利用される。ここに、緩和、化学交換の影響を含めたものが、マスター方程式がある。ここでは、スピン緩和の影響を無視し、化学シフト、スピン結合、化学交換の3つのハミルトニアンを設定して、CPMG ユニットにおける磁化の時間発展を計算した。計算では、2スピン系とし、スピン結合の大きさは 5 Hz と設定した。化学交換によるハミルトニアン の時間発展を入れるため、従来の密度行列を (4x4) の行列で表示する Hilbert 空間表示形式から、(1x16) の列ベクトルで表示する Liouville 空間表示のもと Matlab ソフトウェアによる計算を行った。J がある場合とない場合とで計算結果を比較した結果、以下の2点が明らかとなった。1点目：交換速度が化学シフト差より小さい場合はプロファイルに顕著な差が生じるが、交換速度が化学シフト差より大きい場合はプロファイルに差がほとんどなくなる結果が得られる。2点目：CPMG 時間が長くなるほど、J の有無による緩和分散プロファイルの影響の差が出てくる。また、今回実験で設定した 30 ms 程度の CPMG 時間では、影響の差はほとんど顕れない。この2点の結果から、両側ラベル体でも、CPMG 時間を 30 ms 程度にして、intermediate で解析を行っても、片側ラベル体と同等の結果が得られると予想される。この結果は、今後、両側ラベル体を調製、CPMG 解析を行い、実験的に検証する。その後、データをまとめて論文投稿する予定である。

#### 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 7 件)

① Takeda M, Kainosho M. "Cell-Free Protein Synthesis Using E. coli Cell Extract for NMR Studies." *Adv. Exp. Med. Biol.* 992, 167-77 (2012) doi: 10.1007/978-94-007-4954-2\_9. (査読無)

② Takeda M, Kainosho M "Cell-free protein production for NMR studies." *Methods Mol. Biol.* 831, 71-84 (2012) doi: 10.1007/978-1-61779-480-3\_5 (査読無)

③ Takeda M, Terauchi T, Kainosho M "Conformational analysis by quantitative NOE measurements of the  $\beta$ -proton pairs across individual disulfide bonds in

proteins." *J. Biomol. NMR*, 52, 127-139 (2012) doi: 10.1007/s10858-011-9587-0 (査読有)

④ Takeda M, Jee J, Ono AM, Terauchi T, Kainosho M "Hydrogen exchange study on the hydroxyl groups of serine and threonine residues in proteins and structure refinement using NOE restraints with polar side-chain groups." *J. Am. Chem. Soc.* 133 17420-17427 (2011) doi: 10.1021/ja206799v (査読有)

[学会発表] (計 7 件)

① 武田光広, 寺内勉, 甲斐荘正恒, SAIL-NMR 法によるジスルフィド結合の立体配座決定と動態解析, 第 51 回 NMR 討論会 (2012) 11 月 8—10 日 ウィンク愛知 (愛知県)

② Takeda M, Terauchi T, Kainosho M "Analysis of Connectivities and Conformations of Disulfide bonds in Proteins by Quantitative NOE Measurements of the beta-Proton Pairs across the Bonds" International Conference of Magnetic Resonance in Biological System (2012) August. 19-24 The Lyon Convention Center (Lyon) France

③ Takeda M, Hallenga K, Shigezane M, Waelchli MR, Markley JL, Kainosho M, "Construction and performance of a sample tube with slot-shaped sample cavity fabricated from magnetic susceptibility-matched glass" *ISNMR* (2011) November. 15-18, 大さん橋ホール (神奈川県)

④ 武田光広, 甲斐荘正恒, SAIL-NMR 法によるタンパク質動態構造の研究, 第 49 回生物物理学会 (2011) 9 月 16-18 日 兵庫県立大学 (兵庫県)

⑤ 武田光広, Chun-Jing Yang, JunGoo Jee, 小野明, 寺内勉, 甲斐荘正恒, 隣接炭素科学シフトへの重水素同位体効果を利用したタンパク質側鎖 OH/SH 基の新しい NMR 研究手法, 第 49 回生物物理学会, (2011) 9 月 16-18 日 兵庫県立大学 (兵庫県)

⑥ 武田光広, SAIL-NMR 法により広がるタンパク質の NMR 研究, 第 6 回構造生物学に関する先端技術講演会—NMR、AFM、EM 解析のトピック—生体防御医学研究所共同利用研究集会, (2011) 9 月 2 日 九州大学 (福岡県)

[その他]

ホームページ等

<http://str.bio.nagoya-u.ac.jp:8080/Plone/753265908358>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

武田 光広 (TAKEDA MITSUHIRO)  
名古屋大学・理学研究科・特任助教  
研究者番号：90508558

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし