

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：82401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26650027

研究課題名(和文) 標識スクランブルの影響を受けず、あらゆる発現系で利用可能な選択標識法の開発

研究課題名(英文) Selective labeling strategy, tolerant of amino-acid scrambling, for various expression systems

研究代表者

葛西 卓磨 (KASAI, Takuma)

国立研究開発法人理化学研究所・生命システム研究センター・研究員

研究者番号：70446516

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：タンパク質のNMR解析にとってシグナル帰属は、さまざまな解析の基礎となる重要な工程だが、対象タンパク質や測定環境によっては困難な工程でもある。このような場合アミノ酸選択的安定同位体標識法が有用だが、標識スクランブルが抑制された発現系以外では、スクランブルに起因するアミノ酸の混同が問題となる。本研究では、スクランブルに起因する安定同位体標識率の変化を未知変数として推定することにより、この問題の克服を目指した。このために必要となる、広いパラメータ空間を効率的に探索する方法を開発し、ノイズの多いスペクトルの解析などに応用が可能となった。

研究成果の概要(英文)：Amino-acid selective stable isotope labeling is a powerful method for signal assignment processes for protein analyses with NMR. This method relies on expression systems with suppressed amino-acid scrambling, such as cell-free protein synthesis. The basic idea of this study is to estimate change of isotope labeling ratio derived from the amino-acid scrambling as unknown parameters from NMR spectra. Such approach requires a method for searching huge parameter space. Therefore we developed a parameter-optimization method for analyses of NMR spectra of amino-acid selectively isotope labeled proteins, using replica exchange Monte Carlo. This method also enabled analyses of low signal-to-noise-ratio spectra.

研究分野：構造生物学

キーワード：蛋白質 NMR アミノ酸選択的安定同位体標識 符号化標識法 ピークフィッティング レプリカ交換モンテカルロ法

1. 研究開始当初の背景

(1) NMR法はタンパク質の立体構造、動態、相互作用などの情報を、原子分解能で得ることのできる方法である。特に¹H-¹⁵N 2次元NMRスペクトルを用い、タンパク質中のアミド基を観測してアミノ酸残基ごとの情報を得る手法は広く用いられている。この場合、アミド基NMRシグナルの帰属は、¹³C/¹⁵N標識体を用い、三重共鳴法と呼ばれる多種の3次元NMR測定をおこなって、隣接するアミノ酸残基のアミド基を対応付けていく連鎖帰属法によることが一般的である。しかし、高分子量タンパク質や細胞内のタンパク質を測定するin-cell NMRでは、NMR信号の緩和が促進されることで一部の三重共鳴測定が困難であり、結果的に連鎖帰属法によるアミド基シグナル帰属が困難であることが多い。

(2) このような場合でもアミド基シグナル帰属に有用な情報を得る方法として、アミノ酸選択的安定同位体標識法がある。シングル選択標識では、1種類の標識体につき1種類のアミノ酸のみを¹⁵N標識して、¹⁵N-HSQCなどの¹H-¹⁵N 2次元NMRスペクトルを測定する。例えばアラニンのみを¹⁵N標識しておけば、アラニン残基由来のアミド基シグナルのみが観測される。プロリン以外のアミノ酸19種類に対応する19種類の標識体を作成すれば、各アミド基シグナルについて、由来するアミノ酸を決定することができ、アミド基シグナル帰属に貢献する。さらに、デュアル選択標識()では、アミド基が含まれるアミノ酸残基(i位)だけでなく、ひとつN末端側のアミノ酸残基(i-1位)とのつながりを利用してさらに帰属の可能性を絞り込む。すなわち、あるアミノ酸のアミド窒素を¹⁵N標識しておき、またあるアミノ酸のカルボニル炭素を¹³C標識しておく。この標識体を用いて、¹⁵N-¹³Cの単結合を利用するNMR測定をおこなえば、該当するアミノ酸の組み合わせのみを観測することができる。これは、アミド基シグナルの帰属可能性の絞り込みに非常に大きく貢献するものの、最大でアミノ酸の組み合わせの数(19種類×20種類=380種類)の種類の標識体を用意する必要があり、網羅的におこなうことは現実的でなかった。

(3) そのようななか、アミノ酸選択標識において必要な標識体の種類の数を減らす方法として、1種のアミノ酸を1種の標識体に対応させるのではなく標識体の組み合わせに対応させる組み合わせ選択標識法が、さまざまなグループから提案されていた()。

2. 研究の目的

(1) 研究開始時期と前後して、代表者は、すべての従来の組み合わせ選択標識法よりも必要な標識体の種類の数を減らすことができる、符号化標識法(Stable isotope labeling,

SiCode)を開発しつつあった。この方法は、アミノ酸選択標識法を「符号化と復号」の過程とみなす、すなわち、アミノ酸の情報は複数の標識体の標識パターンに変換(符号化)され、観測したNMRスペクトルにおけるシグナル強度比からその情報を得る(復号する)とみなすものである。この考え方に基づくと、情報科学のさまざまな考え方・手法を取り入れることができる。例えば、標識体の種類の数を減らすためには、1標識体に盛り込む情報の量を増やさなければならない。このために、代表者は、中間の標識率も活用した定量的な安定同位体標識を利用することにした。例えば、従来の標識が標識なし(0%)、標識あり(100%)の2進数的な標識だとすると、3進数の各数字0(0%)、1(50%)、2(100%)に対応させた標識率を用いることで、情報量を増やすことができる。

(2) こうした発想を実現するには、定量的で精度のよいアミノ酸選択的安定同位体標識を実現する仕組みが必要であった。代表者の属する研究室で開発された無細胞タンパク質合成法()はアミノ酸代謝がかなり抑えられた発現系であり、この用途に最適であった。しかし、ごくわずかにアミノ酸代謝が残っており、研究開始当時はこの代謝を完全に抑えるための代謝阻害剤()を安定的に得ることが困難であったなど、狙った通りの標識がまだ完全にはおこなえない状態であった。また、無細胞タンパク質合成法以外の発現系でも符号化標識法が可能になれば、発現系を自由に選べない対象タンパク質や実験系についても応用が可能となるし、対象タンパク質を細胞内で発現させて細胞内での構造や動態を調べるin-cell NMR法への活用が期待された。

3. 研究の方法

(1) 標識スクランブルによりアミノ酸の標識率が変わってしまう発現系でも符号化標識を可能にする方法のひとつとして、標識パターンをうまく設計することで、スクランブル後にも判別しやすいものとするのが考えられる。まず比較的アミノ酸スクランブルの少ない無細胞タンパク質合成系でこれを達成し、続いて大腸菌発現系や哺乳類発現系に拡張することを考えた。

(2) もうひとつの手法として、アミノ酸スクランブルによって変化してしまう標識率を未知変数として推定する手法が考えられた。このためには、広いパラメータ空間を効率的に探索する方法が不可欠であり、その開発からおこなうこととした。

4. 研究成果

(1) 無細胞タンパク質合成系で、一部の代謝酵素阻害剤が使えず、アミノ酸スクランブルが残ってしまう場合の対処法を開発した。

研究開始当時に主に用いていた合成条件では、アスパラギンからアスパラギン酸、グルタミンからグルタミン酸への変換が合成反応中におこり、標識スクランブルとなって現れることが確認された。アスパラギン酸よりアスパラギンの、またグルタミン酸よりグルタミンの標識率が常に同じかもしくは大きいという制限を満たすように標識パターンを設計し、かつ、アスパラギン酸とアスパラギン、グルタミン酸とグルタミンの標識率が異なる標識体については、観測される標識スクランブルの程度から逆算して、アスパラギン酸およびグルタミン酸の安定同位体標識率を意図的に一定程度低くして合成反応をはじめすることで、設計通りの標識率を達成することができた(発表論文)。現在では標識スクランブルを事実上完全に抑えることができる無細胞タンパク質合成系が開発されたため、このような措置は不要となっているが、標識スクランブルがある系についてうまく標識パターンを設計し、意図的に安定同位体標識率を変化させることで設計通りの試料を得るという方法がうまくいくことを示せたことは、無細胞タンパク質合成系以外の、標識スクランブルが避けられない発現系でも同様の措置により符号化標識法が可能である可能性を示唆しており、重要な成果である。

(2) もうひとつの、標識率を未知変数として推定する手法のためには、広いパラメータ空間を効率的に探索する仕組みが必要であり、永田、岡田らとの共同研究として、レプリカ交換モンテカルロ計算による符号化標識 NMR データ解析法を開発した(発表論文)。この方法は、標識率の推定のみならず、一般の符号化標識 NMR データの解析に使えるものである。すなわち、符号化標識法ではシグナルの強度比にアミノ酸の情報がのっているが、スペクトルの S/N (信号強度) 比が低かったり、重なったりしている場合には、そもそも正しいシグナル強度を得ること自体が困難であり、復号を誤る原因となる。そこで、発想を転換し、強度を得てからアミノ酸の情報に変換するのではなく、標識パターンやアミノ酸配列は既知であるのだから、それらを事前知識として活用し、このような強度比のシグナルがあり得るといモデルを列挙し、それらのなかから観測スペクトルを最もよく説明するものを選ぶという、モデル選択の問題として、復号をおこなうこととした。この用途のためには、離散変数と連続変数からなる高次元の説明変数空間を効率的に探索する大域的最適化手法が必要であり、レプリカ交換モンテカルロ法はこれに適している。符号化標識法を解析するためのレプリカ交換モンテカルロ演算を実装し、重なったシグナルや、S/N 比が低い場合において、従来の復号法よりも推定精度が向上することが確かめられた(発表論文)。

(3) 大域的最適化により、スクランブルによって変化する標識率を未知変数として推定する手法は、S/N 比の高いスペクトルを用いた例ではあるが、スクランブルの起こりやすいアミノ酸の標識率を完全に未知とするなどの条件でテストした場合にも成功し、当初の目的に向けた基盤技術を確立することができた。

(4) 大域的最適化による未知変数推定では、標識スクランブルによって変化した標識率以外にも、さまざまな変数を推定できる。符号化標識法では、標識体間のシグナル強度比から情報を解読しようとするので、標識体どうしの濃度差や NMR 測定時の磁場均一性の差など、強度に影響を与えるような差がないことが重要である。なるべく濃度差がないように試料調製をおこなうものの、実験上の誤差は避けられないので、あとから補正する仕組みを設けている。従来法では、グリシンなど特定のシグナルを利用している(発表論文)。この濃度比も推定することが可能であることが確かめられた。標識率を単独推定するときよりも精度は低下するが、濃度比と標識率の両方を推定することも可能であった。もちろん、標識率が既知であれば濃度比のみの推定を精度よくおこなうことが可能である。

(5) モデル選択による復号アプローチ、および大域的最適化アルゴリズムによるその実現は、符号化標識法の性能向上に大きく貢献することとなった。タンパク質が実際に働く環境である細胞内での、タンパク質の構造や動態を調べようとする in-cell NMR は、NMR の特長を活かした優れた解析手法であるが、細胞内の分子混雑等によりタンパク質 NMR シグナルの緩和が促進され、感度が著しく低下する欠点がある。そうした低感度の in-cell NMR でも、本手法で解析が可能であること、また、in-cell NMR のように実験間のばらつきが大きくなることが避けられない場合でも、前項の手法により精度よく標識体間の感度差が補正できることにより、in-cell NMR であってもよい成績で復号ができることが確かめられた。

<引用文献>

- Kainosho and Tsuji, 1982, *Biochemistry*, 21:6273-6279.
Parker *et al.*, 2004, *J Am Chem Soc*, 126: 5020-5021.
Shi *et al.*, 2004, *J Biomol NMR*, 28: 235-247.
Trbovic *et al.*, 2005, *J Am Chem Soc*, 127:13504-13505.
Staunton *et al.*, 2006, *Magn Reson Chem*, 44:S2-S9.
Wu *et al.*, 2006, *J Biomol NMR*,

34:13-21.
Maslennikov *et al.*, 2010, Proc Natl Acad Sci USA, 107:10902-10907.
Sobhanifar *et al.*, 2010, J Biomol NMR, 46:33-43.
Hefke *et al.*, 2011, J Biomol NMR, 49:75-84.
Krishnarjuna *et al.*, 2011, J Biomol NMR, 49:39-51.
Jaipuria *et al.*, 2012, Adv Exp Med Biol, 992:95-118.
Löhr *et al.*, 2012, J Biomol NMR, 52:197-210.
Maslennikov and Choe 2013, Curr Opin Struct Biol, 23:555-562.
Kigawa *et al.*, 1999, FEBS Lett, 442:15-19.
Matsuda *et al.*, 2007, J Biomol NMR, 37:225-229.
Kigawa, 2010, Methods Mol Biol, 607:1-10, 53-62, 101-111.
Yokoyama *et al.*, 2011, Anal Biochem, 411:223-229.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計4件)

葛西卓磨、木川隆則、情報科学を活用した安定同位体標識によるタンパク質 NMR 解析法、生物物理、査読有、vol. 57、2017、印刷中

葛西卓磨、池谷鉄兵、木川隆則、生命分子の NMR 計測・解析への応用、電子情報通信学会誌、査読無、vol. 99、2016、pp. 439-443

Takuma Kasai, Kenji Nagata, Masato Okada, Takanori Kigawa, NMR spectral analysis using prior knowledge, Journal of Physics: Conference Series, 査読有, vol. 699, 2016, 012003, DOI: 10.1088/1742-6596/699/1/012003

Takuma Kasai, Seizo Koshiba, Jun Yokoyama, Takanori Kigawa, Stable isotope labeling strategy based on coding theory, Journal of Biomolecular NMR, 査読有, vol. 63, 2015, pp. 213-221, DOI:10.1007/s10858-015-9978-8

〔学会発表〕(計11件)

Takuma Kasai, Kae Higuchi, Kohsuke Inomata, Takanori Kigawa, Signal assignment strategy for protein NMR under challenging conditions, 第54回日本生物物理学会大会、2016年11月27日、つくば国際会議場(茨城県つくば市)

葛西卓磨、樋口佳恵、猪股晃介、木川隆則、情報科学を活用したシグナル帰属法の in-cell NMR への応用、第55回 NMR 討論会、2016年11月18日、広島国際会議

場(広島県広島市)

Takuma Kasai, Kenji Nagata, Masato Okada, Takanori Kigawa, Model Fitting Method for Accurate Analyses of NMR Spectra, 27th International

Conference on Magnetic Resonance in Biological Systems, 2016年8月22日、国立京都国際会館(京都府京都市)

葛西卓磨、永田賢二、岡田真人、木川隆則、NMR スペクトルから正しい情報を得るための変数探索による解析法、第16回日本蛋白質科学会年会、2016年6月7日、福岡国際会議場(福岡県福岡市)

Takuma Kasai, Kenji Nagata, Masato Okada, Takanori Kigawa, Spectral analysis using prior knowledge, The 57th Experimental Nuclear Magnetic Resonance Conference, 2016年4月11日、ピッツバーグ(アメリカ合衆国)

Takuma Kasai, Takanori Kigawa, NMR spectrum analysis with error detection mechanism, International Meeting on "High-Dimensional Data Driven Science", 2015年12月16日、メルパルク京都(京都府京都市)

Takuma Kasai, Kenji Nagata, Masato Okada, Takanori Kigawa, NMR spectral analysis using prior knowledge, International Meeting on "High-Dimensional Data Driven Science", 2015年12月14日、メルパルク京都(京都府京都市)

葛西卓磨、永田賢二、岡田真人、木川隆則、安定同位体標識率等の事前知識を活用する NMR スペクトル解析法、第54回 NMR 討論会、2015年11月6日、千葉工業大学津田沼キャンパス(千葉県津田沼市)

葛西卓磨、符号化標識法を用いた NMR シグナル帰属戦略、Computational aspects in biomolecular & in-cell NMR、2015年5月24日、首都大学東京秋葉原サテライトキャンパス(東京都千代田区)

葛西卓磨、小柴生造、横山順、木川隆則、誤り検出符号によるノイズに強いアミノ酸選択標識法、第53回 NMR 討論会、2014年11月4日、大阪大学コンベンションセンター(大阪府吹田市)

Takuma Kasai, Seizo Koshiba, Jun Yokoyama, Takanori Kigawa, Amino-Acid Selective Stable Isotope Labeling Strategy Based on the Coding Theory, 26th International Conference on Magnetic Resonance in Biological Systems, 2014年8月25日、ダラス(アメリカ合衆国)

6. 研究組織

(1)研究代表者

葛西 卓磨 (KASAI, Takuma)

理化学研究所・生命システム研究センタ

一・研究員
研究者番号：70446516