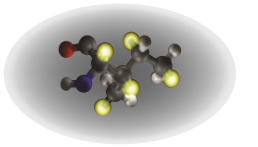


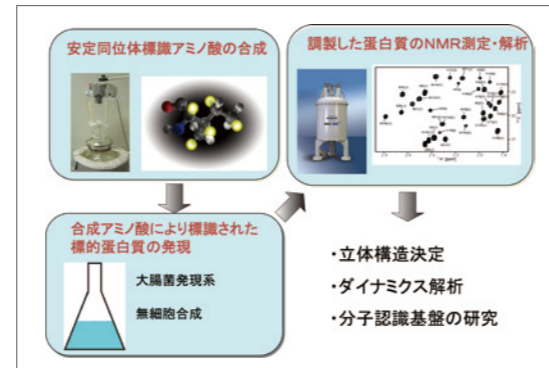
# センターを中心に展開される研究



## 安定同位体利用 NMR 技術の高度化と蛋白質構造動態の研究

### 1. 研究成果:

本グループは生体高分子を対象とする安定同位体利用NMR技術の高度化に取り組んでいる。生体系NMR分野においては、天然存在比の小さい<sup>13</sup>C、<sup>15</sup>N、<sup>2</sup>H等の安定同位元素を用いて均一、或いは選択的に標識した生体高分子試料の調製が重要な基盤技術となってきた。同位体標識試料を用いることにより、非標識試料に比べ、得られる構造情報は質、量とも飛躍的に増大する。この理由から、生物学的に重要な生体高分子、特に蛋白質や蛋白質-リガンド複合体の立体構造、動態、相互作用等に関するより詳細な知見を得るための、安定同位体利用技術の高度化は最重要課題の一つである。甲斐荘等が開発した立体整列同位体標識 (Stereo-Array Isotope Labeling; SAIL) 法(論文1,2)は、安定同位体利用技術の革新こそが生体高分子NMR解析法の更なる発展への突破口を開くことを明確に実証した。SAIL法においては、立体・位置選択的に重水素、重炭素、重窒素標識された様々なアミノ酸(SAILアミノ酸)を合成し、無細胞合成系、或いは細胞合成系を利用して目的蛋白質を標識する。このようにして得られるSAIL蛋白質は、通常用いられる均一安定同位体標識試料において問題となっていたシグナルの広幅化や重なりが一挙に解決され、これまでは実質的に25kDaを上限としていたNMRによる蛋白質の溶液内立体構造決定の分子量限界を、精度を遥かに向上させ、且つ迅速化しつつ40kDa超にまで拡張することに成功した。SAIL法に代表されるような高度な安定同位体利用技術は、単に構造決定における分子量限界の拡大や迅速化、高精度化に止まらず、NMR法の様々な応用範囲の拡大に大きな可能性を秘めており、継続的な研究開発が不可欠である。以下、最近の本グループにおける研究内容について概要を記す。



### 1-1. 高分子量蛋白質の構造情報取得に向けた取り組み:

現在、分子量が50kDaを超える高分子量蛋白質については、観測対象を主鎖アミド基(<sup>15</sup>N<sup>1</sup>H)とメチル基(<sup>13</sup>C<sup>1</sup>H<sub>3</sub>)のみに限定し、線幅の鋭いシグナルのみを観測するためのNMR手法(Transverse Relaxation Optimized Spectroscopy: TROSY法)が広く利用されている。この手法により、高分子量蛋白質の相互作用様式や運動性について、多くの知見が得ることが可能となった。しかし、観測対象が極めて限定されているが故に、精密な立体構造を得ることは不可能であり、また様々なアミノ酸残基の官能基が関与する生物学的機能の理解には根本的な問題点を抱えている。本研究センターにおいては、NMR法を構造生物学研究の最先端に適用可能な手法として発展させることを目標に、従来のSAIL法の改良により、NMR解析の対象となる蛋白質(複合体)の分子量限界の更なる拡張を図っている。

本グループでは、高分子量蛋白質に含まれる全ての炭素に結合するプロトン(<sup>13</sup>C<sup>1</sup>H<sub>n</sub>; n=1-3)を全て測定するためのSAIL法の抜本的改良に取り組んでいる。特に、高い優先度を持つ観測対象は、芳香族アミノ酸残基の構造情報の取得である。芳香族アミノ酸は、蛋白質の内部の疎水性コアに存在し強固な疎水性結合ネットワークを形成していることが多く、芳香環由来のNOEシグナルの観測と帰属は、精密立体構造決定の鍵となっている。しかしながら、分子量が50kDaを越えるような高分子量蛋白質においては、従来の均一<sup>13</sup>C、<sup>15</sup>N-標識体はもとより、これまで開発した全ての残基を一斉にSAIL標識した試料であっても、芳香環<sup>13</sup>C<sup>1</sup>Hシグナルの観測・帰属は極めて困難であった。本グループでは、高分子量蛋白質の<sup>13</sup>C<sup>1</sup>Hシグナルの観測を困難とする横緩和機構(T<sub>2</sub> relaxation mechanism)を最大限に減少させる標識パターンを持つ芳香族アミノ酸を合成し、その有効性を確認した(論文10)。緩和最適化(Relaxation Optimized) SAILアミノ酸を均一に重水素化した蛋白質に組み込むことにより、分子量82 kDaの蛋白質についても、芳香環CH TROSYシグナルの高感度観測・帰属、更には周辺プロトンとのNOEの観測にも成功した。核緩和最適化技術は、アミノ酸側鎖の脂肪族側鎖についても拡張が可能であり、実質的には蛋白質の全ての炭素に結合したプロトン(<sup>13</sup>C<sup>1</sup>H<sub>n</sub>; n=1-3)の構造情報を立体選択的に、且つ高感度に取得するという画期的な技術が完成しつつある。

一方、観測対象となるグループが広がると、従来の手法ではメチル基と主鎖アミド基間のNOEに限られていた構造情報が、一気に増大することになる。このため、多次元NMR法を用いてもNOEシグナル間の重なりが顕著となり、NOEシグナルの一義的解析が困難となる。この事態を回避する目的もあり、構造決定上重要なIle, Leu, Valに各2個含まれるメチル基の残基、及び立体選択的標識技術の開発にも取り組んだ。Ile, Leu, Val残基のメチル基<sup>13</sup>C標識は、アミノ酸前駆体を利用した方法が一般的に用いられているものの、Leuのδ1/δ2、Valのγ1/γ2メチル基が同時に同位体標識(標識率は各>50%)されることとなり、NOEシグナルの解析は困難を極める。この問題を解決する



客員教授  
甲斐荘 正恒

ため、我々は、立体特異的にメチル基に安定同位体標識したLeuとValを用い、一般的に利用されている大腸菌発現系を利用したアミノ酸特異的標識技術を確立した。これにより、高分子量蛋白質中のVal γ1, 2、Leu δ1, 2のメチル基のみを個別に標識することが可能となり、シグナルの感度は2倍に向上、シグナルの大幅な減少、確実な立体帰属が一挙に実現した。また、生合成的にValの下流にあるLeuに関しても添加条件を詳細に検討することにより、立体選択的にメチル標識したValとLeuのあらゆる組み合わせで標識した蛋白質の調製にも成功した(論文14)。

このような、核緩和最適化SAIL法と新規メチル標識技術の融合により、100kDa程度の高分子量蛋白質についても、精密な立体構造決定が可能となってきた。現在、NMR測定技術やSAILアミノ酸標識試料の調製法についても更なる改良を行っており、より効率的な高分子量蛋白質の溶液精密立体構造の解析法の開発が進行しつつある。

### 1-2. 蛋白質の構造揺らぎの解析に向けた新技術の開発:

NMR法の重要な特長として、蛋白質の溶液中における構造の揺らぎ(動態)を原子分解能で捉えられる点が挙げられる。蛋白質の揺らぎには、様々な時空間領域に渡る運動が含まれている。従って、生物機能の発現と関連性の高い特定の動きに着目し、焦点を絞った解析が必要となる。SAIL法に代表される高度な安定同位体利用NMR技術においては、各アミノ酸残基を位置・立体選択的に安定同位体標識することにより、目的とする構造動態情報を選択的、且つ高精度に入手する事ができる。本センターにおいては、上記のSAIL法による対象となる蛋白質の分子量限界の拡張と同時に、NMR法によってのみ得られる様々な動的構造情報の取得技術の開発と応用を並行して進めている。次に、現在本グループが開発を手掛けている技術の中から幾つかを簡潔に紹介する。

### (a)蛋白質側鎖の交換性水素に関する構造情報の取得手法:

蛋白質中のアミノ酸残基側鎖には水酸基(OH)やスルフヒドリル基(SH)等、溶媒の水の水素(重水素)と交換する官能基が含まれる。これらの官能基には、蛋白質の立体構造の形成・維持、更には機能発現に重要な役割を持つものが含まれているが、それらのNMR情報の取得は従来のNMR技術では困難であった。本センターにおいては、これらの官能基に水素が結合するか、重水素が結合するかにより、隣接する炭素の<sup>13</sup>C-化学シフトが僅かにことなる現象(同位体シフト)を利用する全く新しい手法を開発した。この手法により、比較的交換速度の遅い官能基を持つ残基を迅速に同定し、更にその交換速度を定量的に計測することが可能となった(論文6, 9, 11)。本手法を利用し、EPPib中に含まれる比較的水素交換速度の遅いOH, SH基を網羅的に同定し、それらが全て水素結合に関与することを明らかにするとともに、水素結合対の一義的な同定にも成功した。本技術は、分子間側鎖水素結合の同定にも応用できるため、蛋白質複合体界面の構造動態に関する重要な解析法となる。

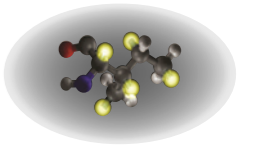
### (b)蛋白質中のジスルフィド結合の立体配座・動態の研究手法:

蛋白質に含まれるジスルフィド結合(SS結合)は蛋白質立体構造を安定化する要因でもあり、またSS結合周囲の回転により異なった立体配座を形成する自由度も兼ね備えている。しかしながら、Cys残基のβ-メチレンはジスルフィド架橋結合により隔てられており、SS結合周囲の立体配座の決定に必要なプロトンペアのNOE距離情報の取得は従来の技術では不可能であった。β-メチレンの一方のみを立体選択的に重水素化した二種類のSAIL Cysを用いることにより、NMR法により初めてSS結合周囲の立体配座決定が可能となった(論文13)。近年 disulfide/thiol 変換等酵素反応に関わるSS結合が、高い配座エネルギーを持つ不安定な捻じれた立体配座を取る傾向がある事が報告されており、本センターで開発した新技術の応用によりSS結合の立体配座と生物機能の関わりを解明につながる事が期待される。SAIL Cysを用いることにより、SS結合周囲の配座変換に関する精密な構造情報が得られることも、本センターにおける最近の研究結果から明らかになっており、従来は見逃されてきたSS結合に関する構造動態に関する研究に新たな展開が期待できる。

### (c)蛋白質中の芳香族アミノ酸側鎖芳香環の反転運動の解析手法:

Phe, Tyr残基の側鎖芳香環は蛋白質内部に埋め込まれた状態においても、芳香環がC<sub>β</sub>-C<sub>γ</sub>軸回りに180°回転する環反転運動が可能である。このような現象は結晶構造解析によっては見出すことのできない反転運動の前後で構造は全く変化しない"縮退遷移"であるとともに、芳香環周囲にある原子団が同時に動き、反転運動に必要な空間(活性化体積)が確保されなくてはならないことから静止画像的な構造からは予想もできない現象として蛋白質動態に関する概念を大きく変換せざるを得ない衝撃的な事実として知られている。しかしながら、1980年代においてこの現象に関して多くの実験、及び理論研究がなされたにも関わらず、根本的な理解には至る道筋すら掴めていない。本センターにおいては芳香環の反転運動は蛋白質の比較的遅い振幅の大きな運動(Large-Amplitude Slow Breathing Motion: LASBM)と連動しており、その運動の理解は蛋白質の機能発現機構と深く関連するとの見通しから、SAIL法を用いて詳しい解析を行っている。このために、反転運動により相互変換可能なδ-及びε-位のみを<sup>13</sup>C<sup>1</sup>HとしたSAIL-Phe及び-Tyrを用いて、従来の手法と比較して遥かに

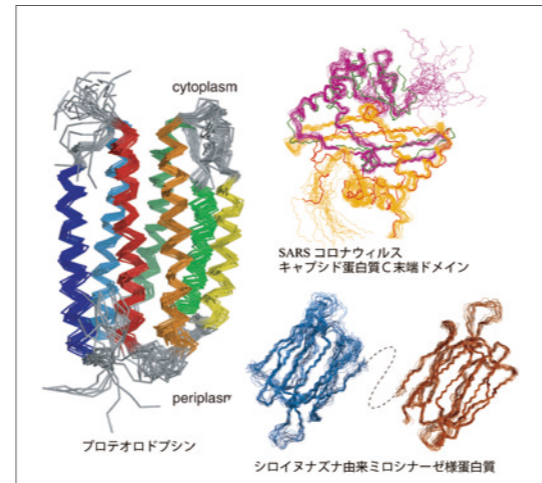
# センターを中心に展開される研究



高精度で、反転現象の研究に有効な標識技術を開発した(論文7)。これらのSAILアミノ酸を用いて標識したウシ臍臓トリプシン阻害剤蛋白質(BPTI)中に含まれる芳香環の反転運動速度を様々な条件下において高精度で測定することができた(論文作成中)。これらの実験から、これまで不可能であった高分子量蛋白質(複合体)における芳香環の反転運動の定量的観測が可能となり、ひいては蛋白質のLASBMの生物学的意味に関して新たな視野が拓けるものと期待している。

### 1-3. 生物学的に興味ある蛋白質へのSAIL法の応用:

本センターにおいて、新たに開発された安定同位体標識技術の学内外研究者への移転も積極的に進めている。例えば、結晶化が困難であったSARS ウィルスに関連する蛋白質は、SAIL法を用いて迅速に溶液内立体構造決定に成功した(論文3)。この結果、SARSウィルスのRNA保持機構の理解に貢献した。また、光センサー膜蛋白質プロテオドプシンの解析においては、SAILアミノ酸を利用して構造決定の要となるメチル基のシグナルを明瞭観測しその精密な構造決定に大きな役割を果たした(論文12)。その他、ミロシナーゼ様蛋白質の立体構造決定、TRPチャンネルの機能機構解析、更にはSAIL法の固体NMRへの展開、SAIL蛋白質を用いた完全自動構造決定への応用等、多岐にわたる分野において共同研究を進めた(論文4,5,8,15)。また、前述した蛋白質の構造揺らぎと生物機能の関わりに関しては、SAIL法が大きな貢献を果たす可能性のある新たな領域であるため、本グループ独自の応用研究によりSAIL法の有効性を示す必要がある。免疫抑制剤FK506、ラバマイシンとFKBP12蛋白質との相互作用に関する研究等はその一環として行われている(論文準備中)。蛋白質-薬剤複合体界面に焦点を置いたSAIL法による動態解析は興味ある新事実を明らかにしつつあり、X線結晶構造のみならず静止画像的描像では捉えることの出来ない分子認識に関連する動的構造情報が捉えられる可能性が示唆された。



### 2. 研究の特色・考え方:

本センターにおいては、蛋白質や蛋白質複体の生物学的機能の解明を目的に、それらが示す幅広い時空間領域に渡る構造動態情報を、高精度、且つ選択的に入手するための安定同位体利用NMR技術手法の高度化に取り組んでいる点に最大の特徴がある。このためには、蛋白質を構成するアミノ酸残基を目的に合わせて位置・立体選択的に多重同位体標識する技術、標識アミノ酸を様々な組み合わせで標識した試料蛋白質の調製技術、更には標識蛋白質試料を利用し、様々なNMR構造・動態情報を効率的に取得する技術を一体化して開発する必要がある。立体整列同位体標識(SAIL)法はこのようなコンセプトで総合的に開発され、今も更なる進歩を遂げている独創的NMR技術として大きな期待が掛けられている。本センターにおいては、限られたリソースを有効に活かすために、主として標識蛋白質調製、及びそれらを用いたNMR応用技術の開発に取り組んでいる。また、学内外において様々な生物学研究に携わる研究者に、本センターで開発された最先端のNMR技術を利用する機会を提供するために、標識試料調製に伴う資金負担を含め、共同研究の実施に伴う依頼者側の積極的な分担を原則に、多くの共同研究を進めている。

### 3. 論文発表:

1. Kainosho *et al.* *Nature*, **440**, 52-57 (2006).
2. Takeda *et al.* *Nature Protocols*, **2**, 2896-2902(2007).
3. Takeda *et al.* *J. Mol Biol.*, **380**, 608-622 (2008).
4. Takeda *et al.* *FEBS Journal*, **275**, 5873-5884 (2008).
5. Ikeya *et al.* *J. Biomol. NMR*, **44**, 261-272 (2009).
6. Takeda *et al.* *J. Am. Chem. Soc.*, **131**, 18556-18562 (2009).
7. Takeda *et al.* *J. Biomol. NMR*, **46**, 45-49 (2010).
8. Takahashi *et al.* *J. Magn. Reson.*, **203**, 253-256 (2010).
9. Takeda *et al.* *J. Am. Chem. Soc.*, **132**, 6254-6260 (2010).
10. Miyanoiri *et al.* *J. Biomol. NMR*, **51**, 425-435 (2011).
11. Takahashi *et al.* *J. Am. Chem. Soc.*, **173**, 17420-17427(2011).

12. Reckel *et al.*, *Angew. Chemie*, **50**, 11942-11946 (2011).
13. Takeda *et al.* *J. Biomol. NMR*, **52**, 127-139 (2012).
14. Miyanoiri *et al.* *J. Biomol. NMR*, **57**, 237-249 (2013).
15. Ihara *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **288**, 15303-15317 (2013).
16. Takeda *et al.* *J. Magn. Res.*, *in press*. doi: 10.1016/j.jmr.2013.10.001

### 日本語総説:

17. 甲斐荘正恒, Peter Guentert, "タンパク質NMRの常識を覆す革新技術SAIL法" *バイオテクノロジージャーナル*, 7-8月号, 467-470(2006).
18. 寺内勉, 甲斐荘正恒, "SAIL法による高分子量タンパク質の構造決定—日本発の次世代世界標準NMR技術をめざして—" *BIONICS*, August, 60-63 (2006).
19. 池谷鉄兵, ペーターギュンター, 甲斐荘正恒, "NMRによる蛋白質構造決定の自動化", *計算シミュレーションと分析データ解析* (日本表面科学会編), 丸善株, 東京, 148-166 (2007).
20. 寺内勉, 武田光広, 甲斐荘正恒 "生体系NMRにおける安定同位体利用技術の開発" *化学と工業*, **60**, 1-8 (2009).
21. 甲斐荘正恒, "動き回るタンパク質の姿を精密に捉える—核磁気共鳴(NMR)法の革新技術—" *Chem Chem Club Newsletter*, No. 11, 8-9 (2009).
22. 武田光広, 甲斐荘正恒, "SAIL法により広がるタンパク質のNMR研究", *生物物理* **49**, 206-209 (2009).
23. 武田光広, 寺内勉, 小野明, 甲斐荘正恒, "SAIL法による高分子量タンパク質構造解析NMR技術の進歩", *蛋白質 核酸 酵素*, **54**, 1506-1511 (2009).

### 4. 招待講演:

1. Kainosho M. "SAILing to Larger Proteins: A Strategy for Optimal Isotope Labeling for Protein NMR Spectroscopy", *The 5th International NCCR Symposium on New Trends in Structural Biology* (2006/9/15-16, Zürich, Switzerland) (Plenary lecture)
2. Kainosho M. "The SAIL method: A way to optimize protein samples for NMR spectroscopy" *ISMAR 2007* (2007/10/14-19, Kenting, Taiwan) (Plenary lecture)
3. Kainosho M. "SAIL-NMR Method for Protein Structures and Dynamics", *The 14th Beijing Conference and Exhibition of Instrumental Analysis (BCEIA 2011)* (2011/13-15, Beijing, China) (Keynote lecture)
4. Kainosho M. "Relaxation Optimized NMR Spectroscopy using the SAIL Approach", *The 4th Asian-Pacific NMR Society Symposium* (2011/10/16-18, Beijing, China) (Plenary lecture)
5. Kainosho M. "Applications of Stable Isotopes for Protein NMR", *The 50th Japanese Nuclear Magnetic Resonance Society Symposium-International Symposium on NMR 2011* (ISNMR2011) (2011/11/15-18) (Memorial lecture)