

「生命活動のプログラム」

平成8年度採択研究代表者

甲斐荘 正恒

(東京都立大学理学部 教授)

「安定同位体利用NMR法の高度化と

構造生物学への応用」

1. 研究実施の概要

今後、生物科学研究の中心は、“遺伝情報”の蓄積から“遺伝子産物”、つまり蛋白質の系統的・網羅的研究へと移行して行くと考えられる。過去数年間における蛋白質の立体構造情報は急速に増加してはいるものの、遺伝情報の蓄積速度とは較べるとその速度は極めて遅い。この為に、蛋白質のもつ多様な生物機能を立体構造を基盤として解明する“構造生物学”の発展が阻害され、延いては医薬品開発を初めとする新しい生物科学応用技術の発展をも妨げる要因となっている。蛋白質の立体構造を、如何に迅速に、効率良く、しかも精密に決定する技術を開発するかは、応用技術の開発にとっても重大な意味を持つ。本研究課題においては、X線解析技術と並び、構造生物学の中心的実験技術となりつつあるNMR(核磁気共鳴)法を、“安定同位体利用技術”の高度化を通じて、抜本的に改良することを目標とする。

2. 研究実施内容

蛋白質・核酸、及びそれらの複合体の立体構造は、NMR法で測定可能な水素原子核間の核オーバーハウザー効果(NOE)を距離制限として決定することができる。X線解析法は蛋白質が結晶として規則的に並ぶ、いわば人工的な環境が必要であるが、NMRによる立体構造決定技術は、蛋白質が実際に機能を果たす場“溶液や生体膜”において適用可能である点に最大の特徴がある。つまり、NMR技術は単に蛋白質等の生体高分子の静止画像的な立体構造情報の蓄積に寄与するに止まらず、それらの生物機能を果たす現場における立体構造の動きを解明するための唯一の方法である。立体構造と生物機能を関連づけることを究極の目標とする構造生物学分野において、NMR法の重要性が急速に高まっている理由がここにある。しかしながら、NMR法はその半世紀の歴史の中で、蛋白質の立体構造決定技術として登場したのは僅か10余年程前に過ぎず、構造決定技術としては未だ揺籃期にある。NMR技術は測定・解析・試料調製の3主要技術を総合して初めて成立する複合技

術であり、その全ての要素技術が激しい開発競争にさらされている。本研究課題で取り上げた「安定同位体標識技術」は試料調製技術の中核をなすものであり、本研究代表者が長年にわたって開発を先導して来た分野であり、国際的にも高い評価を受けている。本研究課題においては構造生物学への応用を念頭に置き、従来の方法論的限界を越えた独創的な手法を開発する。

我々はこれまで、安定同位体標識試料の調製技術の開発に重点をおき、様々な先端的研究を報告してきた。このために、十分に納得の行くNMR技術の開発は困難であった。しかしながら、本課題の実施にあたっては、従来の研究室の守備範囲に止まることなく、NMR測定技術やデータ解析技術を含めた主要な要素技術全般に渡る総合的研究を進めることにした。このような、安定同位体標識試料調製を含む総合的なNMR技術開発は、我が国のみならず、欧米においても稀である。しかしながら、本課題で開発に取り組むような、最先端の安定同位体標識技術を最も有効に利用するNMR技術は、グループ内で一貫した研究開発を実施することにより初めて達成可能であると思われる。

従来のNOEを距離制限として用いる立体構造決定法は、分子量が2万程度迄の蛋白質においては十分有効な方法であることが明らかにされて来たものの、様々な問題点が残されていることも確かである。最大の問題点はNMRで構造決定可能な分子量限界が3万程度に止まっていることである。重水素核の利用技術により、分子量限界はある程度改善されるが、この場合は構造決定の精度が犠牲となる。また、蛋白質は様々な物質と相互作用するが、そのような蛋白質複合体の立体構造決定技術に関しても今後開発すべき要素が多々ある。特に、蛋白質-核酸複合体のNMR法による構造研究は多くの興味を集められているが、核酸(RNA、DNA)部分の立体構造は十分な信頼度で決定することは困難である。最近の総説で指摘したように(Kainosho, M., Nature Struc. Biol., 1997)、このような問題の多くは安定同位体利用技術の高度化により大幅に改善できる。

核酸の多くは棒状の二重鎖を形成しているために、一次構造上離れた位置にある残基間のNOEが殆ど得られず、NMRによる立体構造の決定には困難がともなう。さらに、蛋白質においては様々な安定同位体標識試料が市販されているが、核酸においては安定同位体標識試料の調製技術が未発達であったことも問題点であった。我々は、有機合成化学、微生物発酵技術等を組み合わせた独自の手法により安定同位体標識核酸モノマーを調製し、それらを基に酵素法や固相化学合成法による安定同位体標識RNA、DNAの多量調製技術を確立した。このような安定同位体標識核酸を利用した新たなNMR解析手法の開発は本研究課題における重要な目標の一つである。

より先端的な安定同位体利用NMR技術の開発も当然視野においている。先に述

べたように、NMRによる蛋白質・核酸、或いはそれらの複合体の立体構造決定は分子量の増大とともに著しく困難となる。従来の常識では、“分子量制限の緩和”と“立体構造精度”は両立できないと考えられてきた。もしこのような考えが正しければ、NMR法の構造生物学への応用はごく限られた範囲に止まるであろう。本研究課題においては、高分子量蛋白質の高精度構造解析を目的とした、従来の常識を破る画期的な安定同位体標識技術を目指して、様々なアミノ酸類の高度選択的多重標識技術の開発に着手した。この手法によれば、従来は全く不可能であったプロリン、リジン、アルギニン、グルタミン、グルタミン酸、メチオニン等の長鎖アルキル基を持つアミノ酸類の精密な側鎖構造解析が可能となる。20種類全てのアミノ酸類を完全 ^{13}C , ^{15}N -均一標識し、さらに全てのプロキラル原子団を立体選択的に重水素化することができれば最終的な目標の達成に大きく近づくことができる。

このように極めて高度な安定同位体標識アミノ酸は多量に合成することは困難である。従って、これらを構造決定すべき蛋白質に組み込む手法として、微生物による外来遺伝子の高発現系を用いた標識蛋白質の調製法は、多量の標識アミノ酸を必要とする点、及び標識アミノ酸の代謝拡散が避けられない点から不利である。従って、細胞抽出液中の蛋白質生産系を利用する、所謂“無細胞蛋白合成系”の利用が不可欠になる。このようにして、安定同位体標識技術としては究極の手法が確立するならば、最新のNMR測定技術との組み合わせ、或いはこれらの標識体の利点を徹底的に活かした新たな測定手法を開発することにより、構造生物学への応用に最適な安定同位体利用NMR技術を生み出すことができる。これらの新たに開発したNMR技術を用いて高分子蛋白質の高精度構造決定、或いは蛋白質と拡散複合体における分子認識機構の解明を行い、従来の均一安定同位体標識技術とは全く質的に異なる構造情報が得られることを明らかにする。

3. 主な研究成果の発表 (論文発表)

- 「スピン緩和にもとづくNMRによる蛋白質の内部運動解析」楯 真一、甲斐荘正恒、分光研究、47、3-18 (1998).
(原著論文)
- "Differential Isotope Labeling Strategy for Determining the Structure of Myristoylated Recoverin by NMR Spectroscopy", T. Tanaka, J. B. Ames, M. Kainosho, L. Stryer, and M. Ikura, *J. Biomol. NMR*, 11, 135-152 (1998).
- "Stereospecific Assignment of H5' and H5" in a (5'R)-/(5'S)-Deuterium Labeled DNA Decamer for $^3J_{\text{HH}}$ Determination and Unambiguous NOE Assignments", C. Kojima, E. Kawashima, K. Toyama, K. Ohshima, Y. Ishido, M. Kainosho, and Y. Kyogoku, *J. Biol. NMR*, 11, 103-109 (1998).

- "Dual Amino Acid-selective and Site-directed Stable-isotope Labeling of the Human c-HaRas Protein by Cell-free Synthesis", T. Yabuki, T. Kigawa, N. Dohmae, K. Takio, T. Terada, Y. Ito, E. D. Laue, J. A. Cooper, M. Kainosho, Y. Yokoyama, *J. Biomol. NMR*, **11**, 295-306 (1998).
- "Measurement of Deoxyribose $^3J_{\text{HH}}$ Scalar Coupling Reveals Protein Binding-Induced Changes in the Sugar Puckers of the DNA", T. Szyperski, C. Fernandez, A. Ono, M. Kainosho, and K. Wuethrich, *J. Amer. Chem. Soc.* **120**, 821-822 (1998).
- "NMR with $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ Doubly Labeled DNA: the Antennapedia Homeodomain Complexed with a 14mer DNA duplex", C. Fernandez, T. Szyperski, H. Iwai, A. Ono, S. Tate, M. Kainosho, K. Wuethrich, *J. Biomol. NMR*, **12**, 25-37 (1998).
- "Collision Induced Spectra Obtained by Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry Using a ^{13}C , ^{15}N -Doubly Depleted Protein", S. Akashi, K. Takio, H. Matsui, S. Tate, and M. Kainosho, *Anal. Chem.* **70**, 3333-3336 (1998).
- "Systematic Synthesis of Specifically $^{13}\text{C}/^2\text{H}$ -Labeled Nucleosides from [$ul\text{-}^{13}\text{C}_6$]-D-Glucose", A. M. Ono, T. Shiina, A. Ono, and M. Kainosho, *Tetrahedron Lett.*, **39**, 2793-2796 (1998).
- "Synthesis of [$5\text{'-}^2\text{H}_1$]-Nucleosides with Defined (5'S)/(5'R)-Ratios", Y. Oogo, A. M. Ono, A. Ono, and M. Kainosho, *Tetrahedron Lett.*, **39**, 2873-2876 (1998).
- "Determination of Peptide ϕ Angles in Solids by Relayed Anisotropy Correlation NMR", Y. Ishii, K. Hirao, T. Terao, T. Terauchi, M. Oba, K. Nishiyama, and M. Kainosho, *Solid State Nucl. Magn. Reson.*, **11**, 169-175 (1998).
- "NMR Structure of the *Streptomyces* Metalloproteinase Inhibitor, SMPI, Isolated from *Streptomyces nigrescens* TK-23: Another Example of an Ancestral β γ -Crystallin Precursor Structure", A. Ohno, S. Tate, S. S. Seeram, K. Hiraga, M. B. Swindells, K. Oda, and M. Kainosho, *J. Mol. Biol.*, **282**, 421-433 (1998).
- "Elucidation of the Mode of Interaction of Thermolysin with a Proteinaceous Metalloproteinase Inhibitor, SMPI, Based on a Model Complex Structure and a Structural Dynamics Analysis", S. Tate, A. Ohno, S. S. Seeram, K. Hiraga, K. Oda, and M. Kainosho, *J. Mol. Biol.*, **282**, 435-446 (1998).
- "NMR structure of the Histidine Kinase Domain of the *Escherichia coli* Osmosensor EnvZ", T. Tanaka, S. K. Saha, C. Tomonori, R. Ishima, D. Liu, K. I. Tong, H. Park, R. Dutte, L. Qin, M. B. Swindells, T. Yamazaki, A. M. Ono, M.

- Kainosho, M. Inouye, and M. Ikura, *Nature*, **396**, 89-92 (1998).
- "NMR Scalar Coupling Across Watson-Crick Base Pair Hydrogen Bonds in DNA Observed by TROSY"; K. Pervushin, A. Ono, C. Fernandez, T. Szyperski, M. Kainosho, and K. Wuethrich, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 14147-14151 (1998).
- "DNA Duplex Dynamics: NMR Relaxation Studies of a Decamer with Uniformly ¹³C-labeled Purine Nucleotides, C. Kojima, A. Ono, M. Kainosho, and T. L. James, *J. Mag. Res.*, **135**, 310-330 (1998).