

「たんぱく質の構造・機能と発現メカニズム」

平成13年度採択研究代表者

甲斐荘 正恒

(東京都立大学大学院 教授)

「ゲノム蛋白質の高効率・高精度NMR解析法の開発」

## 1. 研究実施の概要

蛋白質の立体構造決定手法としては、X線結晶構造解析法とNMR法がある。しかしながら、蛋白質の立体構造決定技術としてのNMR法は未だに成長過程にあり、X線解析のように成熟した段階には達していない。本研究のねらいは、欧米が一貫して主導権を握ってきた生体系NMR技術の発展が、測定装置やパルス技術、さらにはNMRスペクトルの解析や得られるNMR情報を利用した構造計算アルゴリズムの開発に集中してきたことを踏まえ、これまで軽視されてきた蛋白質試料調製技術の抜本的革新を図ろうとするものである。このような視点での技術開発が立ち遅れているために、対象となる蛋白質の分子量が大きくなるにつれ、構造解析に要する時間と労力は急速に過大となり、また得られる立体構造精度の著しい低下は避けられなかった。我々は、NMR試料として利用されてきた蛋白質の持つ、重複したNMR構造情報を徹底的に取り除くことにより、NMR測定・解析時間の大幅な短縮が図れるだけでなく、得られる立体構造精度の向上が同時に達成できる可能性があることを提案課題で指摘した。平成14年度においては、本予測を実証するために不可欠となる、高度選択的安定同位体標識パターンを持つアミノ酸20種類を全て合成した。得られた標識アミノ酸は概ね少量であるが、大腸菌の無細胞抽出液を用いるin vitro蛋白質調製法により、全アミノ酸残基を同時に高度選択的安定同位体標識した蛋白質、立体整列同位体標識蛋白質 (Stereo-Array Isotope-Labeled protein; SAIL蛋白質)、の調製に成功した。予想通り、SAIL蛋白質はNMR解析用試料として類を見ない優れた特徴を持ち、SAIL技術をベースにした蛋白質のNMR構造解析は次世代の世界標準として従来の方法を置き換える構造解析技術となりえることが実証された。今後は、SAIL技術の完成を急ぐと同時に、我が国で開発された独創的な蛋白質構造解析基盤技術を世界に向けて発信し、ゲノム科学・構造生物学研究、さらには医薬開発などへの応用を含めた幅広い分野に普及させるための基本戦略が重要となる。

## 2. 研究実施内容

[目的] NMR法による蛋白質構造決定は、蛋白質を構成する各アミノ酸残基に由来する水素原子(核)間に関し、様々な実験手段により入手した数多くの距離・ベクトル情報を、

最も良く満足する立体構造を算出することにより行われる。NMRスペクトルの解析は多次元NMRスペクトルのシグナル数に比例して困難になり、解析不能なシグナル、解析結果が不確実なシグナルなどが分子量の増加とともに深刻な問題となる。従って、分子量の大きな蛋白質の構造解析は困難となり、しかも得られる構造の精度は著しく低下する。この結果、現行のNMR技術では構造決定可能な蛋白質の“分子量限界”は実質的には2-3万程度に留まっている。多くの蛋白質の単一球状ドメインは5-6万以下であることを考慮すれば、“分子量限界”を従来の倍程度(4-6万)に拡大し、しかもより効率的に高精度構造決定を行うためのNMR解析技術の開発は極めて重要な目標である。前項で述べたように、伝統的な均一同位体標識蛋白質試料を対象とする技術開発は既に限界に達しており、今後は全く新たな発想でNMR構造解析に特化した蛋白質試料を開発する必要があるというのが我々の見解である。従って、本課題の目的は、様々な標識パターンを持つSAIL蛋白質調製技術の開発、及びそれらの試料の特徴を最大限に生かしたNMR測定技術、解析技術の開発、さらには完全自動構造解析を視野に入れた蛋白質構造決定法の開発に集約される。

[方法・結果] 上記の目的を達成するには、次の3つの要素技術の開発がいずれも不可欠である。

- (1) SAILアミノ酸合成: SAIL蛋白質の調製に必要な標識パターンを持つ位置・立体特異的な $^2\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ -三重標識体アミノ酸類を総称してSAILアミノ酸と呼んでいるが、本年度内に全20種類のSAILアミノ酸の合成を小規模ながら完了させた。これらを用いて調製したSAIL蛋白質では、水素を持つ炭素は全て $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$ 対として観測できる。
- (2) in vitro蛋白質調製: SAILアミノ酸は概ね多段階の合成ステップを要し多量合成は容易ではない。このような貴重、且つ少量の標識アミノ酸を用いてSAIL蛋白質を調製するためには、対アミノ酸収率が高く、またアミノ酸代謝変換による同位体希釈のない手法が必要である。我々は、大腸菌の無細胞抽出液を用いたin vitro蛋白質合成系を最適な手法として選択した。本年度においては、SAIL蛋白質調製のための様々な必要条件を満足する方法を開発に向けて基礎的検討を実施し、有用な知見を得た。現在、我々が手元に持つ数十の大腸菌でのin vivo発現が可能なcDNAを利用して、in vitro蛋白質発現を試みたところ、約90%程度の高い確率でNMR試料調製法として利用可能な程度の発現量を得ることができた。この結果、大腸菌のin vitro蛋白質発現系はSAIL蛋白質調製手法として優れた方法であることが確認された。
- (3) SAIL蛋白質のNMR解析への応用: 上記の要素技術が、一応の完成を見たことから、全ての残基を同時にSAILアミノ酸に置き換えたSAIL蛋白質を既に数種類調製することに成功した。その一つである分子量17kDaのカルシウム結合蛋白質カルモジュリン(CaM)の二次元NMRスペクトル(部分)を図-1に示す。左側は通常の $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ -CaM、右側がSAIL-CaMである。SAIL化することによりシグナルが著しく先鋭化し、感度が向上することがわかる。このようなNMRスペクトルの優れた特徴を生かすことにより、通常は分子量17kDa程度の蛋白質であれば2-3ヶ月を要するNOEシグナル帰属

を全く行わずに高精度の立体構造決定が可能となる。例えば、各残基の化学シフトデータ表を基に自動的に構造解析を行うプログラム (CYANA) を用いて僅か30分足らずで立体構造決定を完了することができた (図-2)。

但し、この結果は芳香環シグナルに標識が抜けている不完全なSAIL標識体であり、より高精度の構造解析に関しては完全なSAIL CaMを用いて実験データを現在集積中である。

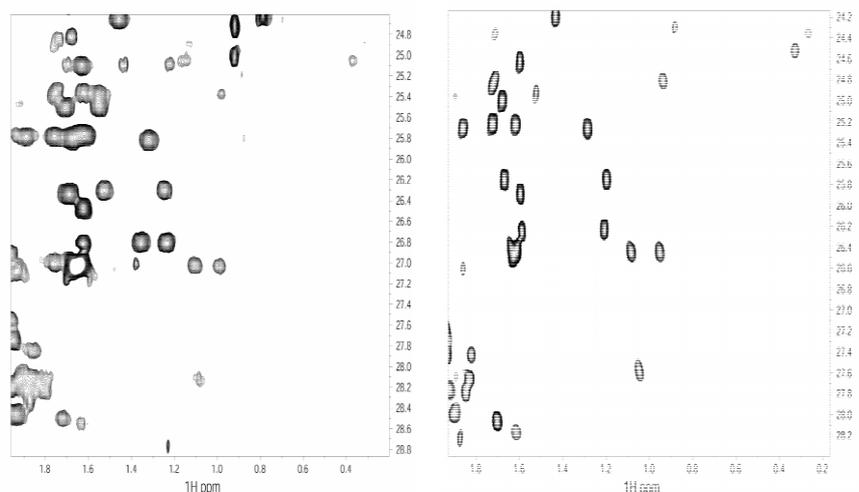


図-1 二次元NMRスペクトル (部分)  
[<sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N]-CaM (左) SAIL-CaM (右)

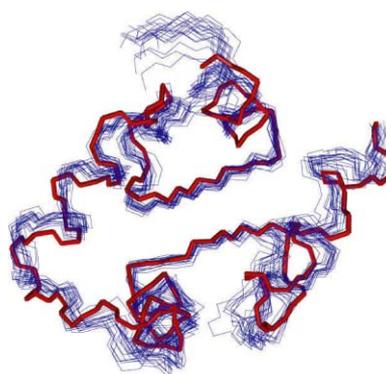


図-2 SAIL蛋白質の自動構造決定  
20個の浩三の重ね合わせ (青)  
結晶構造のワイヤーモデル (赤)

### 3. 研究実施体制

#### 都立大学グループ

- ① 研究分担グループ長：甲斐荘 正恒 (都立大学大学院理学研究科、教授)
- ② 研究項目：SAIL技術の開発 (SAILアミノ酸合成、無細胞系蛋白質発現技術の改良、SAIL蛋白質を利用したNMR測定・解析・構造決定技術の開発)

#### 蛋白研グループ

- ① 研究分担グループ長：阿久津 秀雄 (大阪大学蛋白質研究所、教授)
- ② 研究項目：固体NMR技術の構造生物学への応用 (パルス技術開発、膜蛋白へSAIL法の応用、SAIL標識ペプチドの合成と利用)

#### 東海大グループ

- ① 研究分担グループ長：西山 幸三郎 (東海大学開発工学部素材工学科、教授)
- ② 研究項目：アミノ酸合成のための基礎技術開発 (同位体標識アミノ酸の合成)

### 4. 主な研究成果の発表 (論文発表および特許出願)

#### (1) 論文 (原著論文) 発表

- Y. Tanaka, C. Kojima, E. H. Morita, Y. Kasai, K. Yamasaki, A. Ono, M. Kainosho, K. Taira, "Identification of the Metal Ion Binding Site on an RNA

Motif from Hammerhead Ribozymes Using  $^{15}\text{N}$  NMR Spectroscopy”, J. Am. Chem. Soc., **124**, 4595-4001(2002).

- S.-Y. Ohki, M. Eto, M. Shimizu, R. Takada, D. L. Brautigam, M. Kainosho, “Distinctive Solution Conformation of Phosphatase Inhibitor CPI-17 Substituted with Aspartate at the Phosphorylation-site Threonine Residue”, J. Mol. Biol., **326**, 1539-1547 (2003).
- M. Tashiro, S. Okubo, S. Shimotakahara, H. Hatanaka, H. Yasuda, M. Kainosho, H. Shindo, “NMR Structure of Ubiquitin-like Domain in PARKIN: Gene Product of Familial Parkinson’s Disease”, J. Biomol. NMR, **25**, 153-156(2003).