

「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理学研究科 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き、さらに緩和時間の増大を図るなどNMR試料としての性質を最適化することにより、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を指摘した。平成14年度迄の期間で、本仮説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、立体整列同位体標識アミノ酸 (Stereo-Array Isotope-Labeled amino acids; SAILアミノ酸)、20種類の合成に成功した。昨年度から、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SAIL体標識した蛋白質の調製を幾つか実施した。これらの結果、分子量40 kDaを超える高分子量蛋白質においてもNMRによる高精度構造解析が可能であることを実証することができた。本年度においては、SAIL-NMR技術の更なる完成を目指して、様々な基礎的実験を繰り返し、本研究の最終的な目標である、ゲノム蛋白質の網羅的構造決定に必要な自動構造決定技術の確立に向けて確かな足がかりを得ることができた。

## 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間に関する空間距離情報を集積し、それらを最も良く満足する立体構造を見出す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）SAIL蛋白質のセル・フリー合成：SAILアミノ酸を効率良く、かつアミノ酸代謝により変換されることなく蛋白質に取り込ませるために、無細胞蛋白質合成系の最適化を実施した。本合成系にとって重要な構成要素の一つは大腸菌抽出液である。従来の手法では抽出液を調製するためには一般に大腸菌A19株が広く用いられてきたが、これをBL21 Star (DE3)株に変更した。これによって合成収率を約20 %程度上昇させることができた。さらにこの大腸菌抽出液がSAIL蛋白質を調製する際に無視できない程度の量の非標識アミノ酸を含んでいることをNMR測定から明らかにした。この結果を受けて、抽出液の活性を低下させることなく含有非標識アミノ酸量を低下させることに取り組み、実用的レベルまで低減することに成功した。また、無細胞蛋白質合成系には発現する蛋白質の遺伝子を含む鋳型DNAが必要である。これまでの手法では遺伝子を含むプラスミドとしてNovagenのpETシステムを主に採用してきたが、これをRocheのpIVEXシステムに変更した。この変更により、無細胞合成反応に大量に用いる鋳型DNAの調製そのものの労力を大幅に減少させることができるようになったのみならず、Rocheの発現量上昇用のDNA配列予測サービスを取り入れることができるようになった。これによっても蛋白質の発現量を上昇させることが、蛋白質によって程度に差があるものの可能となった。さらに、発現蛋白質のN末端にタグが付加されるように鋳型DNAを設計した。そのタグ部分に相当するDNA配列に上記の発現量上昇用の配列変更が含まれるように設計し、タグ用DNAオリゴマーライブラリーを作成した。これによりDNA配列変更による各蛋白質の発現量上昇を効率的に調べられるようなシステムを構築することができた。また、タグを付加させずに蛋白質を発現させた場合はN末端が異なる分子種が存在することになることをNMR解析、N末端アミノ酸分析、およ

び質量分析から明らかにした。したがって上述のようにN末端にタグを付加させて蛋白質を発現し、そのタグを除去するということが、良質な解析用NMRスペクトルを得るためにも役立った。以上のように既存の無細胞蛋白質合成系を発展させたシステムにより、これまでに4種類のSAIL蛋白質を発現させることに成功し、NMR解析の対象とすることができた。

これまでも、モデル系試料として利用してきたカルモジュリン (CaM) については従来の二重標識法と本法から得られた試料のNMRスペクトルを詳細に比較した。その結果、SAIL法を用いた場合に得られるNMRスペクトルは従来の標識法に比べ、数倍、感度良く測定できることが明らかとなった。さらにスペクトル中のシグナルの重なりも大幅に軽減された。これはNMR解析に掛かる時間を大幅に減少することを意味している。また、SAIL蛋白質の立体構造解析に必要なNMR測定のほとんどは従来の標識法から得た試料用の測定を最適化することにより行った。それ以外の場合、例えば芳香族SAILアミノ酸側鎖の帰属のように、従来の標識法とはスピンス系が全く異なるような場合には、新たにそのスピンス系に適したパルスシーケンスを開発した。以上のようなスペクトルを用いて、SAILカルモジュリンの全てのシグナルを帰属した。そして立体構造決定に必要なNOESYスペクトルも得た。このNOESYスペクトルと自動立体構造計算プログラムであるCYANAを用いて、立体構造決定を行い、従来の手法からでは得られないような良質な立体構造を得ることができた (図1)。分子量17 kDaのカルモジュリン以外にも、32 kDaのAt3g16450、42 kDaのMBPといった高分子量蛋白質にも本法を適用し、現段階で比較的収束した構造が得られつつある。



図1 SAIL法から得たカルモジュリンの立体構造  
20構造のC末端ドメインにおける重ね合わせ

### 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) 論文発表

- J. Boisbouvier, Z. Wu, A. Ono, M. Kainosho, A. Bax, “Rotational Diffusion Tensor of Nucleic Acids from  $^{13}\text{C}$  NMR Relaxation”, J. Biomol. NMR, **27**, 133-142 (2003).
- S.-Y. Ohki, M. Eto, R. Takada, M. Shimizu, D. L. Brautigan, M. Kainosho, “Phosphorylation-induced Conformational Change Responsible for the Function of a Myosin Phosphatase Inhibitor, CPI-17”, Sci. & Tech. Adv. Material, **5**, 383-386 (2004).
- R. Ishikawa, A. Ono., M. Kainosho, “The NMR Studies of Substituent Effects on the N-H...N Hydrogen Bond in Duplex DNA using 2'-Deoxynebularine and  $^{15}\text{N}$  Labeled 5-Substituted-2'-deoxyuridine Base Pairs”, Nucleic Acids Res. Suppl. No. 3, 57-58 (2003).

#### (2) 特許出願

H15年度特許出願件数：1件（研究期間累積件数：1件）