

「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法は未完成であり、X線解析技術のように成熟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、スペクトル測定装置や多次元NMRパルス技術の改良、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、これまで著しく軽視されてきたNMR測定用蛋白質試料の調製技術の抜本的改良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きたために、対象となる蛋白質の分子量が25kを越えたあたりから、構造解析に要する時間と労力は急速に過大となり、また大変な労力を費やして得られる立体構造精度は満足すべきものではなかった。我々は、蛋白質のNMRによる構造決定プロセスを詳しく検討し、測定試料としての従来から利用されてきた蛋白質から重複した立体構造情報を徹底的に取り除き、合わせて緩和時間の増大を図るなどNMR試料としての最適化を追求することにより、NMR測定・解析時間の大幅な短縮のみならず、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。立体整列同位体標識 (Stereo-Array Isotope Labeling; SAIL) 法と名付けた新たな技術がそれである。本課題の開始から2年余りの間に、SAIL技術の有効性を実証するために不可欠となる20種類の蛋白質構成アミノ酸に関して立体整列同位体標識体 (SAILアミノ酸) の合成に成功し、更に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標識化した蛋白質の調製を行った。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、最終的な目標の一つである、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 (核) 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。多くの蛋白質の持つ単一の球状ドメインとしては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解析技術を開発することは極めて重要なターゲットとなる。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。

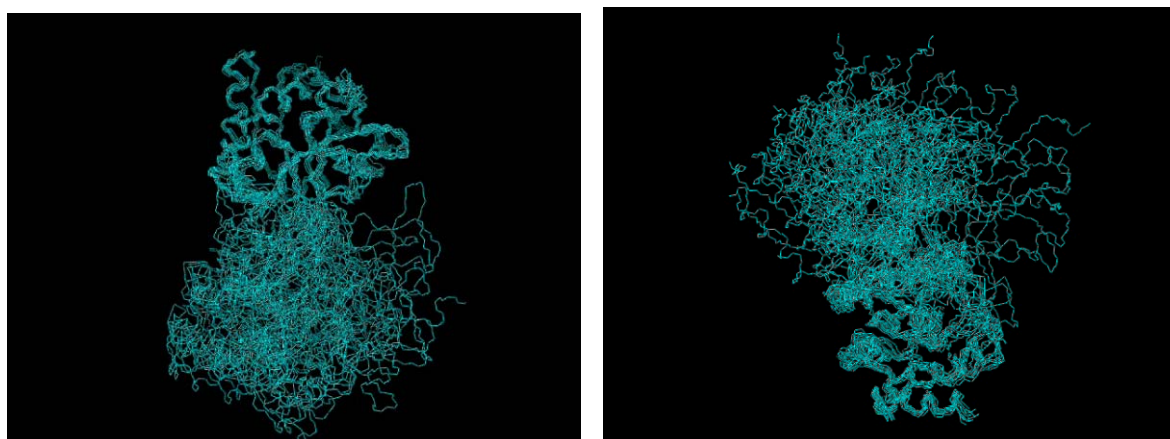
[方法・結果] 上記の目的を達成するには、次の3つの要素技術開発のいずれもが不可欠である。

(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 ^2H , ^{13}C , ^{15}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}C - ^1H 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5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系が全く異なるような場合には、新たにそのスピン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。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た。図-1にMBPの立体構造を示す。



MBP (N-domain)

MBP (C-domain)

図-1. Maltose Binding Protein (42kD)のSAIL法による立体構造

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

- S. 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”, *Science and Technology of Advanced Materials*, **5**, 383-386(2004).
- T. Torizawa, M. Shimizu, M. Taoka, H. Miyano, M. Kainosho, “Efficient production of isotopically labeled proteins by cell-free synthesis: A practical protocol”, *J. Biomol. NMR*, **30**, 311-325(2004).
- Y. Matsuki, H. Akutsu and T. Fujiwara, Precision ^1H - ^1H distance measurement via ^{13}C NMR signals: Utilization of the ^1H - ^1H double-quantum dipolar interactions recoupled under MAS conditions. *Magn. Reson. Chem.*, **42**, 291-300 (2004).
- T. Fujiwara, Y. Todokoro, H. Yanagishita, M. Tawarayama, T. Kohno, K. Wakamatsu and H. Akutsu, Signal assignments and chemical-shift structural analysis of uniformly ^{13}C , ^{15}N -labeled peptide, Mastoparan-X, by multidimensional solid-state NMR under magic-angle spinning. *J. Biomol. NMR*, **28**, 311-352 (2004).
- M. Sato, N. Shibata, Y. Morimoto, Y. Takayama, K. Ozawa, H. Akutsu, Y. Higuchi and N. Yasuoka, X-ray induced reduction of the crystal of high-molecular weight cytochrome *c* revealed by microspectrometry. *J. Synchrotron Rad.*, **11**, 113-116 (2004).
- T. Saitoh, Y. Tachibana, Y. Higuchi, H. Hori, and H. Akutsu, Correlation between the g tensors and the nonplanarity of porphyrin rings in *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki F cytochrome c_3 , studied by single

crystal EPR. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **77**, 357-363 (2004).

- A. Y. Nosaka, T. Fujiwara, H. Yagi, H. Akutsu and Y. Nosaka, Characteristics of water adsorbed on TiO₂ photocatalytic system on temperature increase as studied by solid-state ¹H-NMR Spectroscopy. *J. Phys. Chem.*, **108**, 9121-9125 (2004).
- Y. Takayama, E. Harada, R. Kobayashi, K. Ozawa and H. Akutsu, Roles of non-coordinated aromatic residues in redox regulation of cytochrome *c*₃ from *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki F. *Biochemistry*, **43**, 10859-10866 (2004)
- J.-H. Lee, C.-J. Park, J.-S. Shin, T. Ikegami, H. Akutsu, and B.-S. Choi, NMR structure of the DNA decamer duplex containing double T·G mismatches of *cis-syn* cyclobutane pyrimidine dimer: implications for DNA damage recognition by the XPC-hHR23B complex. *Nucl. Acid Res.*, **32**, 2474-2481 (2004).
- S. Iimura, H. Yagi, K. Ogasawara, H. Akutsu, Y. Noda, S. Segawa, and K. Yutani, Unusually Slow Denaturation and Refolding Processes of Pyrrolidone Carboxyl Peptidase from a Hyperthermophile are Highly Cooperative: Real-Time NMR Studies. *Biochemistry*, **43**, 11906-11915 (2004).
- H. Yagi, T. Tsujimoto, T. Yamazaki, M. Yoshida, and H. Akutsu, A Conformational Change of H⁺-ATPase *b* Monomer Revealed on Segmental Isotope Labeling NMR Spectroscopy *J. Am. Chem. Soc.*, 16632-16638 (2004).

(2) 特許出願

H16年度特許出願件数：0件 (CREST研究期間累積件数：1件)