

「生命活動のプログラム」
平成 8 年度採択研究代表者

甲斐 正恒

(東京都立大学大学院理学研究科 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、"遺伝子情報"の蓄積から"遺伝子産物"、つまり蛋白質の生命過程における系統的、網羅的研究へと展開して行くと予想される。その中核となる情報は蛋白質の立体構造情報であるが、その蓄積量・蓄積速度は近年急速に増加してはいるものの、遺伝子情報の蓄積速度と比較すれば、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"の発展は著しく阻害されてきた。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、構造生物学の中心の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び、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 - において自由に動き回る状況において、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できる唯一の方法である。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揺籃期にあるに過ぎない。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厳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もある。国際的にも期待の大きい、且つ重要性の高い構造生物学的応用を念頭に置き、従来の方法的限界を越えた独創的な手法を開発することを主目的とする。

我々はこれまで、研究資金、装置、人的資源の有効的活用を考え、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。このことは安定同位体標識技術の高度化という観点からは多大な成果を生んだものの、我々自身の手で安定同位体標識技術を生かし切ったNMR測定・構造情報取得技術の開発を実施できなかった。このことは、上述した3主要技術を総合的に進める上では大きなマイナスと考えてきた。幸い、本課題の実施にあたっては、従来の研究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が可能となった。このような、安定同位体標識試料調製迄を含む総合的なNMR技術開発は、我が国のみならず、欧米においても極めて稀である。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測定・構造解析技術の開発は、一つ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。本課題の実施にあたっては、このような利点を如何に生かし切るかが、最も重要なポイントである。

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、様々な問題点も明瞭となって来たことも確かである。最大の問題点はNMRで構造決定可能な分子量限界が2-3万程度に止まっていることである。従来の非選択的重水素化法の応用により、分子量限界はある程度改善されるものの、この場合には立体構造決定の精度が犠牲となる欠陥がある。また、今後の蛋白質構造研究の大きな流れの一つに、蛋白質-蛋白質間、蛋白質-核酸間、或いは薬剤等を含む様々な物質との相互作用の研究がある。NMR技術は、そのような蛋白質を含む相互作用解析を溶液、さらには生体膜上において実施できる唯一の方法として期待されている。例えば、蛋白質-核酸複合体のNMR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入手できるが、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、従来のNMR解析手法の改良も本研究課題における重要な目標の一つである。

しかしながら、より先端的・独創的な安定同位体利用NMR技術の創出こそ、本課題の究極の達成目標と捉えている。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、NMR法の対象となる試料の"分子量制限の緩和"と、得られる"立体構造精度の向上"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甚だ限られたものになるであろう。本課題において開発しつつあるNMR技術では、より高分子量の蛋白質(及び蛋白質複合体)の立体構造を、より高精度に、しかもより迅速に決定することができる。このような、従来の常識を破る画期的な安定同位体標識技術の基盤となるものは、位置・立体選択的に多重同位体標識したアミノ酸類の調製とそれらの標的蛋白質への組み込み技術の開発にある。本技術の詳細は紙面の都合上述べることはいできないが、このような新規標識技術の開発により、従来は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NMR法により可能となる。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、最終的な目標である高分子量蛋白質の迅速精密構造解析法の開発基盤が整う。

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。また、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が致命的な欠陥となる。本課題では、大腸菌の細胞抽出液中の蛋白質生産系を利用する、cell-free蛋白合成系の利用を選択した。既に、幾つかのモデル蛋白質を用いて、高度標識アミノ酸の組み込み、さらには得られた標識蛋白質の立体構造情報の取得に成功しており、数年内には独創的な蛋白質安定同位体標識技術が確立する見通しを得た。現在、続々を報告されつつある最新の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きっ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究極の安定同位体利用NMR技術が生みだすことができる。これらの新しいNMR技術を用いれば、高分子蛋白質の高精度・迅速構造決定が可能になるに止まらず、蛋白質複合体における分子認識機構の解明等、今後NMRに期待される部分の多い領域においても安定同位体利用NMR技術は不可欠な手法となるであろう。

3 . 主な研究成果の発表 (論文発表)

- 「安定同位体利用NMR技術の新しい展望 蛋白質-蛋白質、蛋白質-核酸複合体の構造解析への応用」大木 進野、甲斐荘 正恒、蛋白質 核酸 酵素、44、574-581 (1999).
- 「遺伝子DNAの形を観る」甲斐荘 正恒、遺伝子産物 (タンパク質) の形を観るー構造生物学とは何か?、クバプロ、8-23 (1999) .
- "Mutational Analysis of Reactive Site Loop of Streptomyces Metalloproteinase Inhibitor, SMPI", Kazumi Hiraga, Sailaja S. Seeram, Shin-ichi Tate, Naoki Tanaka, Masatsune Kainosho, and Kohei Oda, J. Biochem..., 125, 202-209 (1999).
- "Quantitative Measurements of Transverse and Longitudinal Cross-Correlation between ^{13}C - ^1H Dipolar Interactions and ^{13}C Chemical Shift Anisotropy: Application to a ^{13}C -Labeled DNA Duplex", Chojiro Kojima, Akira Ono, Masatsune Kainosho, and Thomas L. James, J. Mag. Res., 136, 169 -175 (1999).
- "Determination of the Complete Structure of a Uniformly Labeled Molecule by Rotational Resonance Solid-State NMR in the Tilted Rotational Frame", Kaoru Nomura, Kiyonori Takegoshi, Takehiko Terao, Ken-ichi Uchida, and Masatsune Kainosho, J. Am. Chem. Soc., 121, 4064-4065 (1999).
- "Analysis of the Relationship between Enzyme Activity and its Internal Motion using Nuclear Magnetic Resonance: ^{15}N Relaxation Studies of Wild-type and Mutant Lysozyme", Shouhei Mine, Shin-ichi Tate, Tadashi Ueda, Masatsune Kainosho, and Taiji Imoto, J. Mol. Biol., 286, 1547-1565 (1999).
- "Conformational Changes of the *BS2* Operator DNA upon Complex Formation with the *Antennapedia* Homeodomain Assessed by $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ Labeling of the DNA", César Fernández, Thomas Szyperski, Martin Billeter, Akira Ono, Hideo Iwai, Masatsune Kainosho, and Kurt Wuethrich, J. Mol. Biol., 292, 609-617 (1999).
- "The 2D: $\{^{31}\text{P}\}$ -Spin-echo-difference Constant-time [$^{13}\text{C}, ^1\text{H}$]-HMQC Experiment for Simultaneous Determination of $^3\text{J}_{\text{H}3\text{P}}$ and $^3\text{J}_{\text{C}4\text{P}}$ in ^{13}C -Labeled Nucleic Acids and Their Protein Complexes", Thomas Szyperski, César Fernández, Akira Ono, Kurt Wuethrich, and M. Kainosho, J. Mag. Res., 140, 491-494 (1999).
- "Backbone ^1H , ^{13}C , and ^{15}N Resonance Assignment of *Streptomyces* Subtilisin Inhibitor", Hiroaki Sasakawa, Atsuo Tamura, Kazuyuki Akasaka, Yoko Miyake, and Masatsune Kainosho, J. Biomol. NMR, 14, 285-286 (1999).
- "Stereoselective Synthesis of (2*S*,3*S*, 4*R*, 5*R*)- and (2*S*, 3*S*,4*R*, 5*S*)-[3,4,5- D_3]Proline Depending on the Substituent of the γ -Lactam Ring", Makoto Oba, Akiko Miyakawa, Kozaburo Nishiyama, Tsutomu Terauchi, and Masatsune Kainosho, J. Org. Chem., 64,

9275-9278 (1999).

- "Well-Controlled Polymerization of Phenylacetylenes with Organorhodium (I) Complexes: Mechanism and Structure of the Polyenes", Yasuhisa Kishimoto, Peter Eckerle, Tatsuya Miyatake, Masatsune Kainosho, Akira M. Ono, Takao Ikariya, and Ryoji Noyori, J. Am. Chem. Soc., 121, 12035-12044 (1999).
- "N6-Methoxyadenine in damaged DNA has two faces in property of Watson-Crick base pairing", Chatake T., Ono A., Ueno Y., Matuda A., Takenaka A., Nucleic Acids Symposium Series, 42, 121-122. (1999)
- "Preparation of 2'-deoxyribonucleosides with an identically 2H/13C-labeled sugar residue.", Oogo Y., Nonaka K., Ono (Mei) A., Ono A., Kainosho M. Nucleic Acids Symposium Series, 42, 123-124. (1999)