

「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 正恒

(首都大学東京大学院 客員教授)

「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法の歴史は20年に満たず、X線解析のように成熟段階に達した技術ではない。本研究のねらいは、これまで欧米における研究者が一貫して追求してきた生体系NMR技術の発展が、測定装置やパルス技術の改良、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り、併せて革新 NMR 技術を開発しようとするものである。このような試料調製技術までを含めた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。SAIL (Stereo-Array Isotope Labeling; 立体整列同位体標識) 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全種類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。

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の増加、解析精度の低下が分子量の増加とともに深刻な問

題となる。従って、分子量の増大につれ蛋白質の NMR 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・結論] 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、既に全 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。本研究過程で得た合成技術は極めて重要な知的資産であり、より高分子量の蛋白質の構造解析に向けた第二世代の SAIL アミノ酸(Overlapping and Resolution Optimized SAIL; oro-SAIL) の合成へ向けた不可欠な研究開発基盤である。計算機シミュレーションにより、従来の SAIL アミノ酸を更に重水素化し、シグナルの重複と線幅の拡大を押さえ、且つ立体構造情報として十分な実効的精度を持って立体構造決定を可能とする第二世代のアミノ酸の立体構造を設計した。これを組み入れた蛋白質を計算機上で合成し、その NMR 構造決定シミュレーションを行った結果、高分子量においては oroSAIL 法が従来法に比べより精度の高い構造をより迅速にもたらすことが明らかとなった (Ikeya, T., *et al.*, *Magn. Reson. Chem.*, 2006;44)。この結果に基づき、SAIL テクノロジーズ社に依頼し、第二世代の SAIL アミノ酸の合成を実施した (現在合成中)。

(2) SAIL 蛋白質調製: SAIL 蛋白質の合成がどの程度まで一般化でき、実用的に利用出来るかが SAIL 法にとっての重要課題である。我々はこれまで、大腸菌での *in vivo* 発現が可能な蛋白質は基本的には大腸菌での *in vitro* (cell-free) 発現が可能であるとの見通しを得てきた。しかしながら、実際に膜蛋白質、ジスルフィド結合を持つアミノ酸等様々な蛋白質に関してそれらを SAIL 化し NMR 試料として実験的に評価するには、現在の研究規模では到底不可能である。これは理研の GSC における発現専門ラボでの数十人から百人規模での研究体制と比較する迄もなく明白である。従って、限られたリソースを有効に利用し、より大規模な SAIL 技術の世界標準化に向けた取り組みの前段階となる知見を得るために今年度から外部との共同研究による SAIL 蛋白質調製技術の多様化を検討することにした。

ゾイジーンズ社は愛媛大学の遠藤教授の開発したコムギ胚芽からのセelfリー抽出液を市販しているベンチャー (三菱化学系) 企業である。既に、この系に関しては米国の Wisconsin 大学 Madison 校の Markley 研究室との共同研究でシロイヌナズナ蛋白質の SAIL 化への応用を検討し

た経験を持っているが、一般的な蛋白質の発現への応用を、特に SAIL 法への適用という観点から検討することにした。これまでに EPPIb をターゲットにして発現をチェックし、ある程度の結果を得たものの大腸菌のセルフリー系と比べ画期的な収量の向上が見られるといった結果ではない。更に検討を加える予定ではあるが、より経済性の高い大腸菌のセルフリー系との比較を慎重に進める必要があろう。

一方、SAIL アミノ酸の利用として大きな需要が見込まれる領域としてドラッグスクリーニングなど、低分子化合物の結合に伴う NMR シグナルへの影響を利用する手法がある。SAR by NMR では主として蛋白質の主鎖アミド基の NH シグナルが利用されてきた。しかしながら、一般に低分子リガンドの結合は側鎖官能基を介するケースが多く、従来手法では大きな制約があった。SAIL アミノ酸を利用すれば、高分子量蛋白質においても側鎖シグナルの観測・帰属が可能となるためにより正確な結合部位、結合強度に関する情報が得られると期待される。このような、立体構造決定を目的としない場合には特定の官能基を有するアミノ酸残基のみを選択的に SAIL 化した蛋白質の利用が寧ろ好ましい場合がある。選択 SAIL 蛋白質の調製にあたっては必ずしもセルフリー発現系に拘る必要はなく、様々な発現系の積極的な利用の検討を始めた。次年度も引き続き検討を行う。

(3) SAIL-NMR 技術の開発 : SAIL 法による蛋白質の NMR 構造決定は、NOE の自動帰属アルゴリズム CYANA の利用により専門的な知識を要せずに短時間で行うことができる。17kDa のカルモジュリン (CaM)、42kDa のマルトース結合蛋白質 (MBP) の SAIL 法による精密な立体構造決定は *Nature* 誌において発表し、大きな反響を得た。SAIL 法は従来の蛋白質解析に関する NMR 手法全般の再構築を迫る革新技术であることは広く認知された。これまで、海外では *Nature* (March 2), *News & Views*; *Chem. & Eng. News* (March 6), *News of the Week* (top news); *Nature Methods* (May), *Research Highlight* 等に取り上げられ次世代の世界標準としての SAIL 法への期待は大きい。次の重要なステップは SAIL 技術の実用化に向けた取り組みであるが、特に SAIL 法の利点を十分に活かした NMR 測定・解析技術の開発はこれからも重点的に進める必要がある。また、蛋白質構造の産業利用という観点からはより分子量の大きい蛋白質複合体や膜蛋白質の構造決定への SAIL 法の拡張も次のステップとして重要である。Oro-SAIL と現在名付けている第二世代の SAIL アミノ酸の設計と合成を行っており、アミノ酸の合成は間もなく終了する。これらを適当なモデル蛋白質に組み入れ、計算機による予想通り、精密構造決定が可能かどうかを検証する。NMR 構造決定の全自動化も SAIL 法にとって大きな期待が掛かる重要な開発課題である。しかしながら、現在の人員ではソフトウェアの開発を含めた総合的な開発は困難と判断し新たな取り組みは本 CREST 課題とは別の枠組みで行う。

3. 研究実施体制

SAIL 法開発グループ

①研究分担グループ長：甲斐荘 正恒（首都大学東京、客員教授）

②研究項目：

(1) SAILアミノ酸合成

(2)無細胞系蛋白質発現法の改良

(3) SAIL-NMR 技術の開発

固体 NMR 応用グループ

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：

(1) SAIL法の固体NMR 技術への応用

(2) 固体NMR用パルス技術開発

(3) 膜蛋白へSAIL法の応用

(4) SAILペプチドの合成

アミノ酸合成法開発グループ

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：

(1) アミノ酸合成のための基礎技術開発

(2) SAILアミノ酸の多量合成のためのプロセス開発

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）等発表

- M. Kainosho, T. Torizawa, Y. Iwashita, T. Terauchi, A.M. Ono, P. Güntert, Optimal isotope labeling for NMR protein structure determinations, *Nature*, **440**, 52-57(2006).
- T. Ikeya, T. Terauchi, P. Güntert, M.Kainosho Evaluation of stereo-array isotope labeling (SAIL) patterns for automated structural analysis of proteins with CYANA, *Magn. Reson. Chem.*, **44**, 000-000(2006).
- S.-W. Chi, S.-H Lee, D.-H. Kim, M.-J. Ahn, J.-S. Kim, J.-Y. Woo, T. Torizawa, M. Kainosho, K.-H. Han, Structural details on mdm2-p53 interaction, *J. Biol. Chem.*, **280**, 38795-38802 (2005).
- K. Uchida, J.L. Markley, M. Kainosho, Carbon-13 NMR method for the detection of correlated hydrogen exchange at adjacent backbone peptide amides and its application to hydrogen exchange in five antiparallel β -strands within the hydrophobic core of *Streptomyces* subtilisin inhibitor (SSI), *Biochemistry*, **44**, 11811-11820(2005).
- T. Torizawa, A.M. Ono, T. Terauchi, M. Kainosho, NMR assignment methods for the aromatic ring resonances of phenylalanine and tyrosine residues in proteins, *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 12620-12626(2005).
- M. Umitsu, H. Morishita, Y. Murata, K. Udaka, H. Akutsu, T. Yagi, and T. Ikegami, ^1H , ^{13}C and ^{15}N resonance assignments of the first cadherin domain of Cadherin-related neuronal receptor

(CNR)/ Protocadherin a. *J. Biomol. NMR*, **31**, 365–366 (2005).

- S.-M. Kim, T. Yamamoto, Y. Todokoro, Y. Takayama, T. Fujiwara, J.-S. Park, and H. Akutsu, Phospholipid-dependent regulation of cytochrome c3-mediated electron transport across membranes. *Biophys. J.*, **90**, 506–513 (2006).
- T. Nakano, T. Ikegami, T. Suzuki, M. Yoshida, H. Akutsu, A new solution structure of ATP synthase subunit c from thermophilic *Bacillus PS3*, suggesting a local conformational change for H⁺-translocation. *J. Mol. Biol.*, **358**, 132–144 (2006).
- Y. Takayama, Y. Kobayashi, N. Yahata, T. Saitoh, H. Hori, T. Ikegami and H. Akutsu, Specific binding of CO to *Tetraheme* cytochrome c3, *Biochemistry*, **45**, 3163–3169 (2006).
- M. Oba, H. Ohkuma, Y. Nikawa, A. Shirai, K. Nishiyama, *J. Labelled Compds. Radiopharm.*, **49**, 229–235(2006).
- 鳥澤拓也、寺内勉、小野明、甲斐荘正恒、SAIL 法による高分子量蛋白質の立体構造解析；蛋白質 核酸 酵素、**50**(10), 1375–1381 (2005).
- 甲斐荘正恒、蛋白質 NMR 構造解析の可能性を拓げる：SAIL 法、生体の科学、**56**(6), 606–613 (2005).
- 阿久津秀雄、核磁気共鳴法 (NMR) によるリボソーム系の研究、リボソーム応用の新展開 (秋吉、辻井監修) NTS、90–99(2005).
- 八木宏昌、阿久津秀雄、H⁺-ATP合成酵素F1の回転駆動力は何か、蛋白質 核酸 酵素、**50**(10), 1160–1166(2005).

(2) 特許出願

H17 年度出願件数：2 件 (CREST 研究期間累積件数：5 件)