

## 研究課題別評価書

### 1. 研究課題名

超高分子量蛋白質の分子形態変化を観測するNMR技術

### 2. 氏名

楯 真一

### 3. 研究のねらい

蛋白質は、機能を発現する際にドメイン再配向など大きな振幅を持った立体構造変化(分子形態変化)を示すことが多い。蛋白質が示す分子形態変化は、機能制御と密接に関係するものであるが、その実態を正確に観測することは一般的には困難である。結晶構造解析では、もともと柔軟な構造体によって結び付けられているドメイン間の相対配向は、結晶中でのパッキングの影響を受けやすいものであり、ドメイン間の配向の柔軟性が高いほど、すなわち分子形態変化を示す蛋白質であるほど溶液状態における正確な分子形態の観測が困難になる。一方でNMRについては、既存の技術では30kDa程度の蛋白質までしか高分解能の立体構造解析ができないという構造解析上の分子量限界があるため、本質的に高分子量になる複数のドメインからなる蛋白質の分子形態変化を観測することは困難である。本研究では従来のNMR計測上の分子量限界を超えて、30kDaを超える高分子量蛋白質を対象としても蛋白質が機能する際に発現する分子形態変化を定量的にかつ原子分解能で観測するNMR技術を開発することを目的とした。

### 4. 研究成果

#### 研究開発の背景

本開発研究では、ドメイン間相対配向という巨視的な蛋白質構造情報を取得するために蛋白質を磁場に対して弱く配向させることで観測される異方性核スピン相互作用を利用する。蛋白質を磁場配向状態に置くことで観測される残余双極子結合RDC(Residual dipolar coupling)を用いた蛋白質のドメイン相対配向解析は、20kDa以下の低分子量蛋白質ではよく行われてきている。RDCは蛋白質を磁場配向状態に置くことで観測される見かけのスピン結合強度の変化から観測される。例えば、 $^{15}\text{N}$ 核で均一標識した蛋白質の2次元相関スペクトル上では、アミド結合部の $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ 核スピンの単結合スピン結合定数を1対のシグナル分裂幅として観測することができるが(図1A)、蛋白質を磁場配向状態に置くとこの分裂幅が変調を受け、等方的な溶液状態で観測される分裂幅とは異なる値を示す(図1A)。この見かけのスピン結合の変調強度が、残余双極子結合RDC値となる。この値は、それぞれの相関シグナルに対応するアミド結合ベクトルの磁場に対する配向角を与える(Tjandra and Bax, Science, 278, 1111 (1997))。蛋白質の構造が既知である場合、各NH結合ベクトルの磁場に対する配向角情報を集積することで、蛋白質分子全体の磁場に対する配向状態を表す量(配向テンソル:磁場に対する蛋白質分子の配向角と配向強度を表現する量)を求めることができる。蛋白質を構成する各ドメインに対してRDCから磁場配向テンソルを決定し、各ドメインで決定された配向テンソルの主軸が一致するように2つのドメインの座標を回転させることで蛋白質中におけるドメイン相対配向を決定できる。

RDCから得られる巨視的な構造パラメータは従来のNMR構造解析では得られない特徴的な構造情報であるが、RDC測定における分子量限界は通常の溶液における測定よりもさらに厳

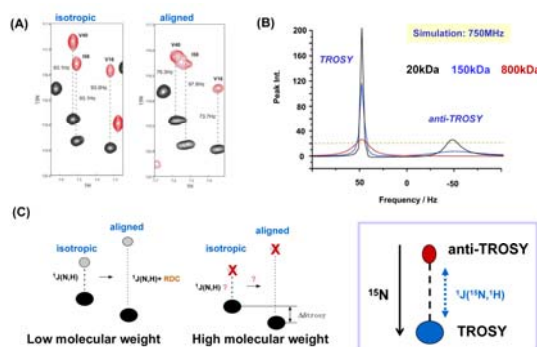


図1: RDCの分子量限界と高分子量蛋白質における Trosy シグナルの耐性

しくなる。溶解性の良い蛋白質を対象として 20kDa 程度が実際上の分子量限界である。これは、RDC を測定するために用いる2次元相関スペクトル上で観測されるスピン結合で分裂した一対の NMR シグナルのうち高磁場側シグナルの横緩和が低磁場側よりも速いことによる。加えて、蛋白質が磁場配向状態に置かれることで核スピン双極子間相互作用が強まることにより、さらに両シグナルの横緩和速度の差が促進されることによる。図 1B には、分裂した一対のシグナルの線幅が蛋白質の分子量に応じてどのように変化するかをシミュレーションした結果を示す。分裂シグナルの高磁場成分である anti-Trosy シグナルは、100kDa を超えると低磁場側のシグナルである Trosy シグナルの比べて大きく広幅化しておりシグナル強度が極端に低下するため観測できなくなることが分かる。しかし、このシミュレーションから、Trosy シグナルを用いることで 100kDa を超える蛋白質であっても十分な感度でシグナルを観測できることが分かる。

RDC 観測における分子量限界を、高分子量蛋白質でも高感度で観測できる Trosy シグナルの磁場配向依存的変化から分子配向テンソルを決定する事により克服するというのが本研究で提案する計測技術である。これを DIORITE (Determination of the Induced ORientation by Trosy experiments) と名づけた。

### DIORITE法の着想-高分子量蛋白質の磁場配向テンソルの決定法

DIORITE 法は、磁場配向状態にある蛋白質のアミド結合で観測される2つの異方性核スピン相互作用(化学シフト異方性、残余双極子効果)を同時に考慮することで、磁場配向依存的に誘導される Trosy シグナルのみから蛋白質の磁場配向テンソルを決定する方法である。図 1B のシミュレーションに示したように Trosy シグナルは 30kDa を超える蛋白質においても高分解能・高感度の NMR シグナルを与えるために、RDC を用いた方法では解析が不可能な 30kDa 以上の高分子量蛋白質を対象として磁場配向テンソルを決定することができる。したがって、複数のドメインを持つ高分子量蛋白質を対象として分子量の制約なく蛋白質の溶液状態における分子形態変化を観測することができる。本研究の基盤は、この DIORITE 法とよぶ Trosy シグナルの分子配向依存的な変化量から蛋白質分子の磁場配向テンソルを計算するアルゴリズムの発見にある。

### DIORITE法の一般化にむけて-最適な磁場配向条件の実現

本研究では、独自に着想した DIORITE 法を用いて実際に TROSY スペクトルの変化のみから蛋白質の磁場配向テンソルを正確に決定する一般的な技術確立し、実際に複数の高分子量蛋白質の溶液中でのドメイン相対配向を決定することを目的とした。この目的のために、まず克服しなくてはならない問題は、分子量あるいはサンプルの状態によらず確実に適切な分子配向状態を実現する試料調製技術の確立である。本研究では、異方性圧縮アクリルアミドゲルを用いて、10kDa-50kDa までのさまざまな性質の蛋白質に対して最適な磁場配向状態を作るための実際的なプロトコルを確立した。高分子量蛋白質になるほど最適な磁場配向性の実現は困難になる。私たちは、アクリルアミド中に電荷をドーピングすることにより浸透圧を利用してアクリルアミドの膨張率を調節することで、アクリルアミドの圧縮率を微調整することによりこの問題を解決できることを見出した。アクリルアミドゲル格子の粗さの調整に比べて、ゲル中への荷電のドーピング量の調節は微調整が容易でありかつ再現性よく行える。膨大な試行実験から、これまでに 50kDa 程度までの蛋白質に対しては最適なアクリルアミドの化学組成と荷電ドーピング量についての経験的規則を見出しており、DIORITE 法によるドメイン配向解析の汎用化の前提となる試料調製上の基盤は確立できた。

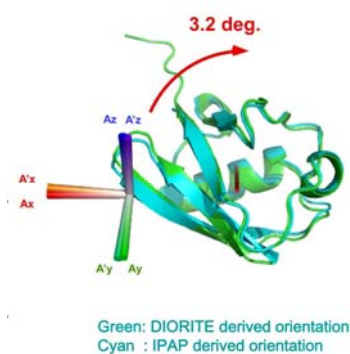


図 2: RDC で決定した分子配向と DIORITE により決定した分子配向の違い(900MHz データによる解析)。600MHz で測定したデータを用いると誤差は 1.2 度

## DIORITE法の解析精度の検証

RDCで磁場配向テンソルを決定することができる低分子量蛋白質ユビチキン(8kDa)を対象として、RDCで決定したユビチキンの磁場配向テンソルとDIORITE法で決定した磁場配向テンソルを比較し、DIORITE法により決定される分子配向角の誤差を検証した。その結果、600MHzで測定したデータを用いた解析では、誤差は回転角で1.2度であった。蛋白質骨格にある<sup>15</sup>N核の化学シフト異方性テンソル値を解析上仮定するDIORITE法解析では、高磁場で測定されたデータを用いる場合には分子配向テンソル値の系統誤差が増加する傾向があることが予測される。ユビチキンを用いた実験では、Trosyシグナルがもっとも先鋭になると期待される900MHzでの測定においても、配向テンソルに含まれる系統誤差は分子回転角として3.2度にとどまり、実用上十分な解析精度でドメインの相対配向を決定できることが実験的に証明できた(図2)。

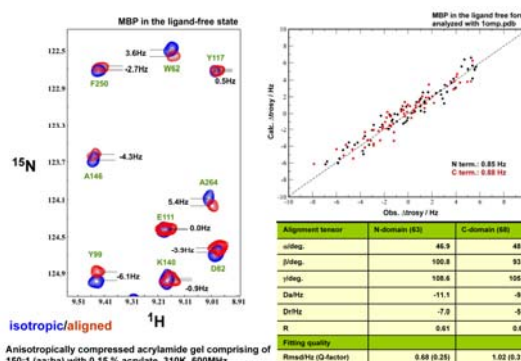


図3: アポ型 MBP の DIORITE 解析結果

## DIORITE法を適用した高分子量蛋白質の分子形態解析

上記の検証実験で DIORITE 法は、実用上十分な精度で蛋白質分子配向を決定できることが分かった。次に、実際に高分子量蛋白質を対象としたドメイン相対配向解析を行った。まずは、複数のリガンド複合体結晶構造が解かれており、その結果リガンドに依存したドメイン相対配向変化が明らかになっているマルトース結合蛋白質(MBP; 42kDa)を対象として DIORITE 法による解析を行った。MBP のアポ型およびマルトース結合型の溶液中でのドメイン相対配向を決定した。図3には、解析結果を示す。最適化した分子配向条件により、明瞭なシグナル強度で Trosy シグナル変化を観測できている。観測値と配向テンソルから逆計算した Trosy シグナル変化量は計測誤差の範囲で一致する精度で分子配向を解析できた。解析の結果得られた溶液中でのアポ型 MBP の2つのドメインの相対配向は、結晶構造から8.0度回転しており、溶液状態と結晶状態とでわずかにドメイン相対配向が変化していることがわかった。

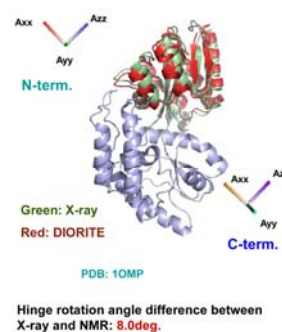


図4: DIORITE 解析の結果得られたアポ型 MBP の溶液構造

次に、リガンドであるマルトースとの複合体の解析結果を示す。図5には、マルトース結合型の MBP 結晶構造を用いた解析例を示すが結晶構造から11度N末端ドメインが回転した構造が溶液状態での MBP の構造であり、結晶構造とわずかに異なるドメイン配向を持つことがわかった。さらに、同じ観測データを用いてアポ型の結晶構造を用いて解析して得たマルトース結合型の溶液構造は、マルトース結合型の結晶構造から5度の回転角の違いを持つことが分かった。系統誤差や計測誤差を考えれば、異なる結晶構造を用いて解析したマルトース結合型の溶液構造は一致することがわかる。アポ型構造を用いて DIORITE 解析から得たマルトース結合型構造は、アポ型構造からN末端ドメインがC末端ドメインに対して32.9度ヒンジ回転している。これはアポ型結

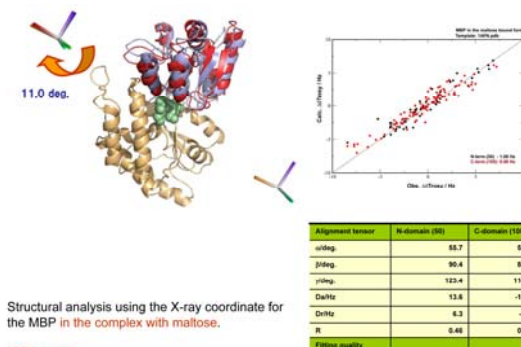


図5: DIORITE 解析で得られたマルトース結合型の MBP の溶液構造



晶構造とマルトース結合型結晶構造から計算された N 末端ドメインのヒンジ回転角 32.5 度と非常に近い値である。この解析例から、アポ型の結晶構造情報がない場合でも DIORITE 解析によりリガンド結合状態の構造を十分な精度で解析可能であることが確認できた(図 6)。つまりリガンドにより誘導される分子形態変化を観測できることが分かった。

上記の研究から DIORITE 法によりリガンド依存的な分子形態変化を十分な精度

で観測することが実際に可能であることを示せたので、次に構造が未知な蛋白質に対して DIORITE 法を適用した。mRNA キャッピング酵素(CE)を対象とした。CE は 38kDa の分子量をもつが、試料の溶解性はきわめて低く室温以下の温度(20° C)で 3%グルセロールを用いた溶液を用いて carousel で 2次元相関スペクトル測定が可能な濃度を維持できる試料である。3%グリセロールを添加することにより溶液の粘性が高くなり、その結果蛋白質の溶液内での回転拡散運動が低下するため、実質的には 50kDa の蛋白質を対象とした場合と同じ測定条件である。CE については GTP 結合型の結晶構造は明らかになっているが、アポ型構造に関する立体構造情報は無い。DIORITE 解析の結果、アポ型 CE の構造は、結晶構造中で open 型構造と呼ばれている構造よりもさらに大きく GTP 結合サイトを広げた立体構造を持つことが明らかになった。このことは CE の酵素反応サイクルを理解する上で重要な知見となった(図 7)。

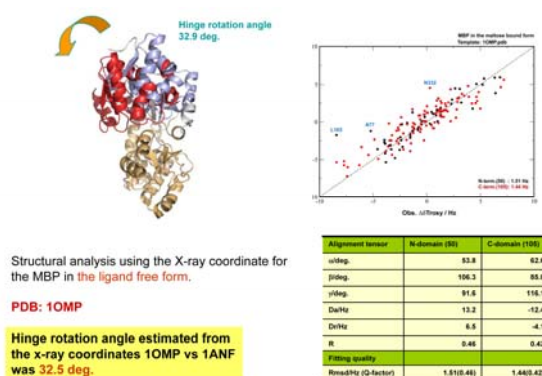


図 6: アポ型の結晶構造を用いて解析したマルトース結合型 MBP

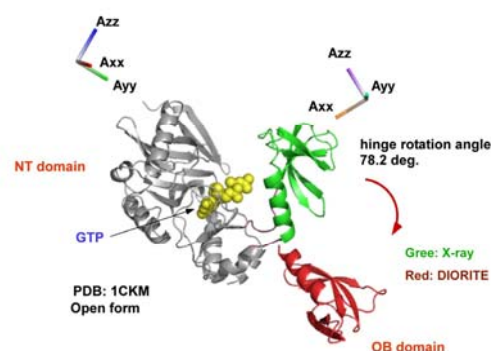


図 7: DIORITE 解析で得られたアポ型 CE の溶液構造

## 5. 自己評価

従来の NMR 技術では、容易に解析ができない高分子量蛋白質を対象として Trosy スペクトル上のシグナル変化のみから蛋白質のドメイン再配向など分子形態変化を解析する技術を実用上利用可能な技術として確立することができた。また、この方法をいかなる分子量の蛋白質であっても試料の条件(イオン強度, pH, 温度)を選ばずに適用できるようにするという汎用化の点においても、異方性圧縮アクリルアミドゲルの圧縮率を化学的に制御するという技術を見出すことで実現できた。応用事例としては現段階では 50kDa 程度までに限られているが、技術的にはこの分子量以上の蛋白質に対しても適用可能であると考えている。以上を踏まえて、計測技術開発という点では成功裏に終わったと自己評価する。

本研究は、前職の研究所が閉鎖しその後処理を進める中で開始し、その後現職に異動後も1年間は大学内での設置場所が定まらないために研究室の NMR 装置を移設できない状況が続いたという事情もあり、集中的に実験研究を進めることができたのは後半の1年半程度であった。ただし、前半の期間は、方法の理論的な検証をもう一度やり直し、解析に必要なソフトウェアを作成するなど後半の研究を効率的に進める上の基礎の整備という意味では重要な時間であった。当初は生化学的に重要な意味を持ち、かつ従来の NMR 技術では解析が困難な膜蛋白質あるいは細胞内受容体蛋白質の分子形態変化観測を実現するところまでを目標と定めていたが、上記の事情も災いし現時点では解析を完了していない。しかし、2つの対象に対してもすでにデータの集積を開始しており一部解析を始めるところまでにはきているため、研究期間終了後に成果を出して行ける。また、構造解析技術として完全に確立できるまでケーススタディーを繰り返していたため、

まとまった研究成果の論文報告はこれから順次進めることになる。上記をまとめて考えると自己評価は70点(良)である。

## 6. 研究総括の見解

分子量の大きなタンパク質の中には溶液状態でドメイン間での配向状態変化を決めることがしばしば極めて重要であるが、本研究者は新しいNMR手法を開発、確立した。すなわち、異方性圧縮アクリルアミドゲルを用いて磁場に対して弱く配向させ、分子配向依存的に誘導されるTROSYシグナルの変化からドメイン間の配向変化を決定する方法である。各ドメインの構造は前提条件として必要であり、また、いくつかのNMR解析上の仮定は必要とするものの、他に代えがたい手法であり、その有効性もいくつか例示された。NMR技法としては完成度が高い。生物的に意義のあるタンパク質分子形態変化の事例を増やしていただきたい。優れた成果として高く評価したい。

## 7. 主な論文等

(A) さきがけ個人研究者が主導で得られた成果

### (1) 論文(原著論文)発表

論文(国際)

・Tate, S. Structure and mode of ligand recognition of the oxidized LDL receptor, LOX-1 (review article) in “Functional and structural biology on the lipo-network” Research Signpost, Kerala, India, 179-198 (2006).

・Ishigaki, T., Ohki, I, Naoko Utsunomiya-Tate and \*Tate, S. Chimeric structural stabilities in the coiled-coil structure of the NECK domain in human lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor 1 (LOX-1), J.Biochem. (Tokyo), 141: 855-866 (2007).

・\*Tate, S. Oxidized low-density lipoprotein receptor, LOX-1, on the endothelial cell - The receptor structure and functions of LOX-1 in atherogenesis. J.Biomol.Macromol. (review article), J.Biomol.Macromol. 7:11-22 (2007).

・\*S.Tate. Anisotropic Nuclear Spin Interactions for the Morphology Analysis of Proteins in Solution by NMR Spectroscopy. Anal. Sci. 24: 39-49 (2008).

(2) 特許出願           なし

### (3) 著書

・楯 真一 日本化学会 化学実験講座8 NMR・ESR 1.NMRの基礎 1.5節「核スピン系のダイナミクス」p40-69 (2006).

・楯 真一 日本化学会 化学実験講座8 NMR・ESR 3.溶液における各種二次元NMR法 3.2節「異種核相関」p162-192 (2006).

・楯 真一 「タンパク質構造の「揺らぎ」を捉える新しいNMR構造解析技術」  
化学と工業 6, 234-235 (2008)

### (4) 招待講演

招待講演(国際)

・Shin-ichi Tate

Transient folding of the mediator binding domain of TFIIIEb and its functional significance  
NMR association for structural biology in Yokohma “Intrinsically disordered proteins”

(2006.11, Yokohama)

•Shin-ichi Tate

Structure and ligand recognition mode of oxidized LDL receptor LOX-1  
INPEC2006 (2006.6, Elsinore, Denmark)

•Shin-ichi Tate

Molecular alignment determination only using orientation dependent TROSY shift changes  
The international workshop on “Perspectives on stable isotope aided NMR methods for protein structural analysis” (2007.03, Osaka, Japan).

## (B) その他の主な成果

### (1) 論文(原著論文)発表

論文(国際)

• Okuwaki, M., Kato, K., Shimahara, H., Tate, S., and Nagata, K. (2005): Assembly and disassembly of nucleosome core particles containing histone variants by human nucleosome assembly protein-I, *Mol. Cell Biol.*, 25:10639–10651.

• Takeshima, H., Suetake, I., Shimahara, H., Ura, K., Tate, S. and Tajima, S. “Distinct DNA methylation activity of Dnmt3a and Dnmt3b towards naked and nucleosomal DNA”, *J. Biochem. (Tokyo)*, 173:503–515 (2006).

• Shimahara, H., Yoshida, T., Shibata, Y., Shimizu, M., Kyogoku, Y., Sakiyama, F., Nakazawa, T., Tate, S., Ohki, S., Kato, T., Moriyama, H., Kishida, K. i., Tano, Y., Ohkubo, T., and Kobayashi, Y. Tautomerism of Histidine 64 Associated with Proton Transfer in Catalysis of Carbonic Anhydrase. *J. Biol. Chem.* 282: 9646–9656 (2007).

### (2) 著書

• 大前英司、村上千穂、楯 真一、月向邦彦、加藤千明「蛋白質に対する圧力の効果」*高圧バイオサイエンスとバイオテクノロジー* 2巻 (38–44) 2008.