

実施課題名 NMRによるマルチドメインタンパク質の構造解析のための統合的アプローチ

【背景】

真核生物のタンパク質の約60から80%がマルチドメインタンパク質といわれている。マルチドメインタンパク質では、ドメイン間のリンカーが柔軟である、またドメイン間の相互作用が弱く曖昧であることから、結晶化が容易でないことも多い。本課題では、常磁性緩和効果や擬コンタクトシフト、残余双極子相互作用といった複数の情報を統合したNMR法による、マルチドメインタンパク質の構造解析手法の確立を目指す。その際、理化学研究所に設置された高磁場NMRによって高品質なデータを得て、構造解析を行う。

【実施内容】 マルチドメインタンパク質として、Protein kinase C (PKC) やRNA結合タンパク質であるNegative regulator 1 (Nrd1)を対象に研究開発を行った。ドメイン選択的な同位体ラベル、もしくはスピララベルを行うことで、マルチドメインタンパク質での構造情報を取得し、構造解析を試みた(図1)。

「I. 要素技術の開発」

(1)試料調製におけるドメインライゲーション

PKCとNrd1のsortaseによるドメインライゲーションに取り組み、高活性型変異体の利用や反応条件の検討を行い、収量(30~50%)で、連結された試料を得ることに成功した。

(2)常磁性効果の測定のためのスピララベル法の開発

NMRによって常磁性効果を観測するために適切な性質をもつ、DOTA誘導体の合成と適用を行った。

「II. NMR測定と解析」

合成したDOTA誘導体を用いて、Nrd1のRRM1-RRM2ドメインのドメイン間の常磁性効果の観測に成功した(2)。測定にはメチルトROSYを用いた。構造計算プログラムCYANAをRRM1-RRM2ドメインでの構造計算に取り組んだ。PKCの研究においては、マルチドメインによる制御機構の理解のために、リガンドとの相互作用の情報も重要となる。我々は抗HIV作用をもつ低分子リガンドであるプロストラチンがPKCの特定のドメインとミセル存在下でのみ、強いaffinityで結合することを見出し、NMRによる構造解析を行った。理研の900MHzの装置(クライオプローブ付)では、NOESYの測定で、600MHzに比べて著しくスペクトルが改善した。

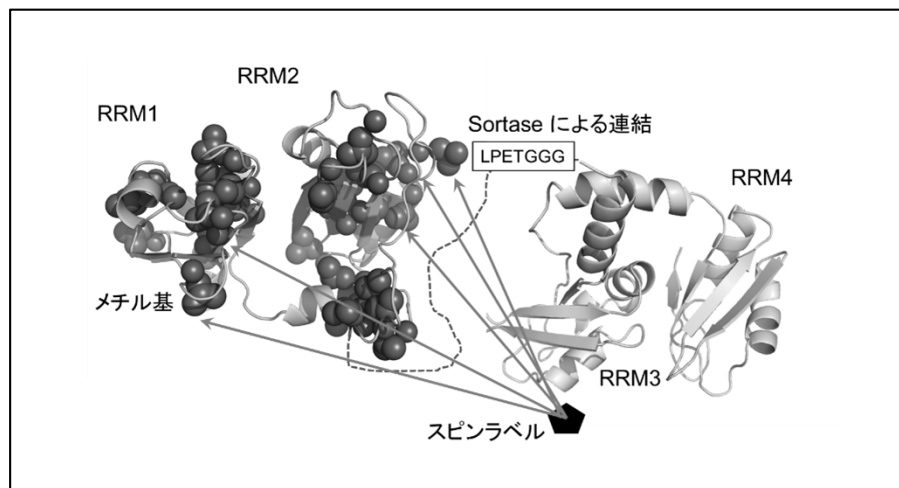


Fig.1 本研究における構造解析のストラテジー

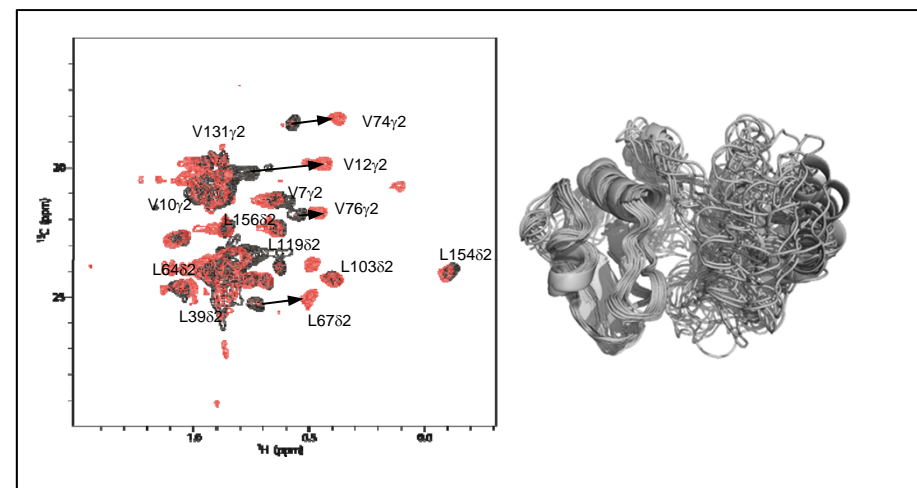


Fig.2 RRM1-RRM2のドメイン間で観測された擬コンタクトシフト(左)。RRM1-RRM2の構造計算をRRM1領域でフィットした20個のアンサンブルを示す。

NMR 共用プラットフォーム 特定課題利用
利用報告書

申請番号	PF006	課題受付番号	PF13-100-002
実施機関名	公立大学法人 首都大学東京		
実施部署名	理工学研究科		
実施責任者管理職名・氏名	職名	准教授	氏名 三島 正規
実施部署所在地	東京都八王子市南大沢 1-1		
利用課題名	NMR によるマルチドメインタンパク質の構造解析のための統合的アプローチ		
本課題の概要・目的	<p>真核生物のタンパク質の約 60 から 80%がマルチドメインタンパク質といわれている。マルチドメインタンパク質では、活性を担うドメインと、制御ドメインとの相互作用によって、機能が精緻に制御されていることが多い。従って、マルチドメインタンパク質全長の構造解析や構造変化の解析は極めて重要であるが、全長では、ドメイン間のリンカーが柔軟である、またドメイン間の相互作用が弱く曖昧であることから、結晶化が容易でないことも多い。</p> <p>本課題では、常磁性緩和効果や擬コンタクトシフト、残余双極子相互作用といった複数の情報を統合した NMR によるマルチドメインタンパク質の構造解析手法の確立を目指す。その際、理化学研究所に設置された高磁場 NMR によって高品質なデータを得て、構造解析を行う。</p>		
利用実施時期、及び期間	平成 26 年 2 月 24 日～平成 28 年 3 月 27 日 総利用日数： 84 日 当初計画どおり		
利用施設 理化学研究所	NMR 装置 (該当部分に ○)	<p>利用装置①</p> <p>・(<input type="radio"/>)溶液 600MHz、(<input type="checkbox"/>)溶液 700MHz、(<input type="checkbox"/>)溶液 800MHz、(<input type="checkbox"/>)溶液 900MHz (<input type="checkbox"/>)固体 700MHz、(<input type="checkbox"/>)固体 900MHz</p> <p>利用期間 1：平成 26 年 4 月 21 日 ～ 平成 26 年 4 月 28 日 利用期間 2：平成 28 年 3 月 22 日 ～ 平成 28 年 3 月 27 日</p> <hr/> <p>利用装置②</p> <p>・(<input type="checkbox"/>)溶液 600MHz、(<input type="checkbox"/>)溶液 700MHz、(<input checked="" type="radio"/>)溶液 800MHz、(<input type="checkbox"/>)溶液 900MHz (<input type="checkbox"/>)固体 700MHz、(<input type="checkbox"/>)固体 900MHz</p> <p>利用期間 1：平成 26 年 2 月 24 日 ～ 平成 26 年 3 月 3 日 利用期間 2：平成 26 年 4 月 14 日 ～ 平成 26 年 4 月 21 日 利用期間 3：平成 28 年 3 月 22 日 ～ 平成 28 年 3 月 27 日</p> <hr/> <p>利用装置③</p> <p>・(<input type="checkbox"/>)溶液 600MHz、(<input type="checkbox"/>)溶液 700MHz、(<input type="checkbox"/>)溶液 800MHz、(<input checked="" type="radio"/>)溶液 900MHz (<input type="checkbox"/>)固体 700MHz、(<input type="checkbox"/>)固体 900MHz</p>	

		利用期間1：平成26年 3月24日～平成26年 3月31日 利用期間2：平成26年 12月24日～平成27年 1月 4日 利用期間3：平成27年 4月20日～平成27年 4月26日 利用期間4：平成28年 1月18日～平成28年 1月24日 利用期間5：平成28年 2月 1日～平成28年 2月 7日 利用期間6：平成28年 2月29日～平成28年 3月 6日
その他の 利用施設		利用無し
成果の 概要	実施内容	<p>マルチドメインタンパク質として、Protein kinase C (PKC) や RNA 結合タンパク質である Negative regulator 1 (Nrd1) を対象に研究開発を行った。ドメイン選択的な同位体ラベル、もしくはスピンラベルを行うことで、マルチドメインタンパク質の構造情報を取得し、構造解析を試みた</p> <p>I. 要素技術の開発</p> <p>(1) 試料調製におけるドメインライゲーション PKC と Nrd1 の sortase によるドメインライゲーションに取り組み、高活性型変異体の利用や反応条件の検討を行い、収量 (30~50%) で連結された試料を得ることに成功した。</p> <p>(2) 常磁性効果測定のためのスピンラベル法の開発 NMR によって常磁性効果を観測するために適切な性質をもつ、DOTA 誘導体の合成と適用を行った。</p> <p>II. NMR 測定と解析</p> <p>(1) Nrd1 合成した DOTA 誘導体を用いて、Nrd1 の RRM1-RRM2 ドメインのドメイン間の常磁性効果の観測に成功した。測定にはメチル TROSY を用いた。構造計算プログラム CYANA を RRM1-RRM2 ドメインでの構造計算に取り組んだ。</p> <p>(2) PKC PKC の研究においては、マルチドメインによる制御機構の理解のために、リガンドとの相互作用の情報も重要となる。我々は抗 HIV 作用をもつ低分子リガンドであるプロストラチンが PKC の特定のドメインとミセル存在下でのみ、強い affinity で結合することを見出し、NMR による構造解析を行った。600MHz の装置 (クライオプローブ付) では、3D ¹³C edited NOESY、3D ¹³C edited (F2) /¹³C, ¹⁵N filtered (F1) NOESY においては十分な S/N がスペクトルを得ることができなかったが、理研の 900MHz の装置 (クライオプローブ付) では、前者の測定で著しくスペクトルが改善した。</p>

<p>本課題により得られた成果と当初目標との比較</p>	<p>本課題では、常磁性効果（常磁性緩和効果や擬コンタクトシフト）、残余双極子相互作用（RDC）といった複数の情報を統合した NMR によるマルチドメインタンパク質の構造解析法の開発を当初目標とした。</p> <p>マルチドメインタンパク質である PKC や Nrd1 に対してこれらの測定を行うため、ドメインライゲーションを要素技術として確立し、実際に、Nrd1 に関して、ドメイン間の常磁性効果を測定することができた。</p> <p>しかし、当初予定していた CYANA、GNS、Xplor-NIH 等の構造計算プログラムを用いたマルチドメインタンパク質の立体構造を決定までは至っていない。PKC、Nrd1 のいずれも構造解析に必要な試料調製が可能であるレベルに達しており、今後はより多数の常磁性効果、RDC の測定を高磁場の装置を用いて行うことで、構造計算のステップへ進めていく。</p> <p>一方、PKC とリガンドとの相互作用に関して、低分子リガンドのプロストラチンがミセル存在下でのみ強い affinity で結合することを見出し、高磁場 NMR による構造解析を行うことが出来た点は、想定以上の進展であった。</p>
<p>成果発表</p>	<p>謝辞を記載した論文を 1 報投稿中。2 報を投稿準備中。</p>
<p>今後の展開</p>	<p>ドメインライゲーションに成功した PKC と Nrd1 について、ドメイン間での「質の高い」常磁性効果を取得するために、今後も高磁場 NMR を利用したい。</p> <p>常磁性効果として擬コンタクトシフトを観測する場合には、得られるスペクトルの分解能が高い点から明らかに高磁場の装置の使用が有効であり、常磁性緩和効果をアミド基の信号で観測する場合においても、TROSY 効果の最大となるような高磁場装置が利点が多い。15N の磁化を緩和させる二種類の緩和源が、互いにキャンセルすることを利用した TROSY において、二種類の緩和源のうち一つが磁場強度に依存し、もう一つが依存しないため、キャンセルの効果は磁場に依存することが知られており、およそ 1000 MHz 程度が最も効果的とされている。今回の 900MHz 利用では TROSY 効果の面で理想的に近い状況を得ることができている。</p> <p>常磁性効果に加えて、RDC の情報も加えて、マルチドメインタンパク質の構造計算を行い、さらに、リガンド結合による構造変化（ドメイン配置の変化）も、同様の手法を用いて解析する。またプロストラチンと PKC とミセルの複合体に関しては、高磁場 NMR を用いて、高品質な RDC の情報を得ることで、精度の高い立体構造決定を行う。</p> <p>測定面の改良としては、常磁性効果の中でも、擬コンタクトシフトは化学シフト変化（信号の周波数の変調）として情報が得られることから、一般的に信号強度に比して周波数の再現性が高いとされる MEM 法や圧縮センシングを用いたスペクトル再現を導入することで、NMR 測定の高度化を行う。</p> <p>本課題で解析を行った Nrd1 は創薬等支援技術基盤プラットフォームにて X 線小角散乱実験(SAXS)も行った。今後は SAXS のような他の溶液状態での構造情報との cross validation や、構造情報のマージといった研究へも展開させる。</p>

<p>社会・経済への波及効果の見直し (字数制限はありません 300 字～600 字以内(程度)でお書きください。)</p>	<p>本課題で確立したマルチドメインタンパク質の構造解析のための要素技術やプロトコルは、他のマルチドメインタンパク質一般への構造解析へと展開でき、現在、解析が困難な種々のマルチドメインタンパク質の構造情報が得られる。得られた動的なドメインの配置の情報は、生体分子における新たな制御機構の解明のみならず、将来的には、その構造(配置)の知見を利用した医薬品開発へとつながると期待できる。例えば、本課題でとりあげた PKC は多くの細胞内シグナル伝達に関与しており、実際、結合するプロストラチンは抗 HIV 薬として期待されている。</p>
<p>利用における感想 (改善要望等を含む) 利用周辺環境に関する希望</p>	<p>(感想) 最高レベルの高磁場の NMR を利用することができ、高磁場でメリットの得られる TROSY や NOESY に関する NMR 測定を試すことができ、大変良かった。また装置には、ほぼ最新の分光計や制御ソフトが装備されており、大変使い易かった。 (要望) マシントイムの混雑状況が外部からオンラインでわかるようなシステムが、もし可能ならば便利と思われる。安全管理上の問題をクリアする必要もあるが、マシンの利用時間が放射光施設のように 24 時間体制だとより有効にマシントイムを利用できる。利用時間が 17:00 までだと、複雑な測定のセットアップには時間が十分でなく、結局、その夜の間の貴重なマシントイムを有効に使えない。また、一部、海外の放射光施設で行われているような、リモートによる利用も将来的には有効と思われる。サンプルの出し入れも、現状すでに機械化できており、技術的には十分可能と思われる。</p>
<p>今後の NMR 共用プラットフォームに対する期待</p>	<p>今後も是非とも継続して NMR 共用プラットフォームを提供していただきたい。</p>
<p>成果公開延期の希望の有無</p>	<p>() あり : (O) なし 「あり」の場合理由:</p>
<p>その他</p>	<p>測定の際に、いつも担当者の方にご親切にいただき、とても利用しやすく感じました。一度、装置に(ソフトウェア上の)トラブルがあった際にも、とても迅速に対応していただきました。審査や運営に関わる先生方、事務の担当者の方にも、様々なご指導やご配慮をいただきましたこと感謝申し上げます。</p>