

実施課題名: 反応中間体分子の動的構造解析のためのreal-time計測技術開発～タンパク質・DNA相互作用を中心に

【背景】

溶液の混合などによって誘起される反応の機序など、非平衡状態を解析するためには、real-timeでの計測を行う必要があるが、通常の測定法では、迅速に作業を行っても混合から測定開始まで5分程度は要するため、それ以下の秒のオーダーでの反応を追うことは不可能である。私たちは、NMRチューブ内での高速溶液混合によって反応を開始させ、複合体形成過程などの反応機序について、秒レベルのreal-time NMR計測を行うためガラスマイクロ流路デバイスを試作した。本課題では、主としてこのデバイスを活用し、高磁場・高感度のNMR装置を用いて、タンパク質・核酸相互作用やタンパク質フォールディングの反応機序について詳細な解析を行うことを目的とした。

【実施内容】

NMRノーマルチューブ内にガラスマイクロ流路デバイスを挿入してNMRマグネット内に設置し、キャピラリーチューブにより、デバイスとシリンジポンプを接続するシステムを構築した(Fig.1)。タンパク質溶液とDNA溶液を送液することにより、複合体形成反応を、変性剤共存下のタンパク質溶液とバッファを送液することでタンパク質のフォールディング反応を解析した。この時、シリンジポンプを常時作動させたcontinuous flowモードにより、反応後一定時間の状態を擬定常状態として観察することと、シリンジポンプを分光計からの信号によって、送液のON/OFFと測定を同期させ、stopped flowモードによって変化をモニターすることの両方を行った。前者はもちろん、後者においても、FIDの積算が可能である。

タンパク質フォールディングについては、RNase Aを用いた。溶液混合によって変性剤の希釈を行い、stopped flowモードでの測定によって反応をモニターした。因子分析を組み合わせた解析を行った結果、第1成分のscore vector(時間変化に対応)が概ねsingle exponential curveにfitし、速度定数を得ることができた(Fig.2)。同時に、loading vector(スペクトル成分に対応)により、反応前と反応後のピーク(それぞれ正、負のピーク)についての情報が得られた。

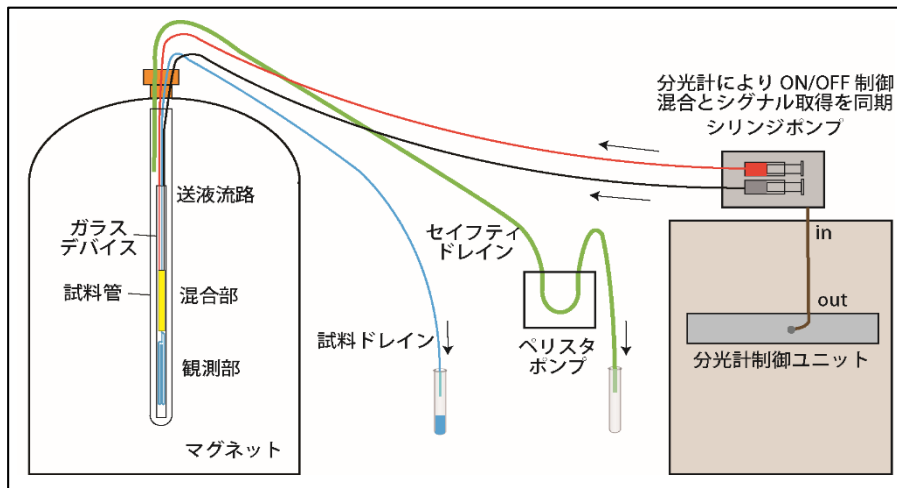


Fig.1: 混合用ガラスデバイスを用いた測定のための構成

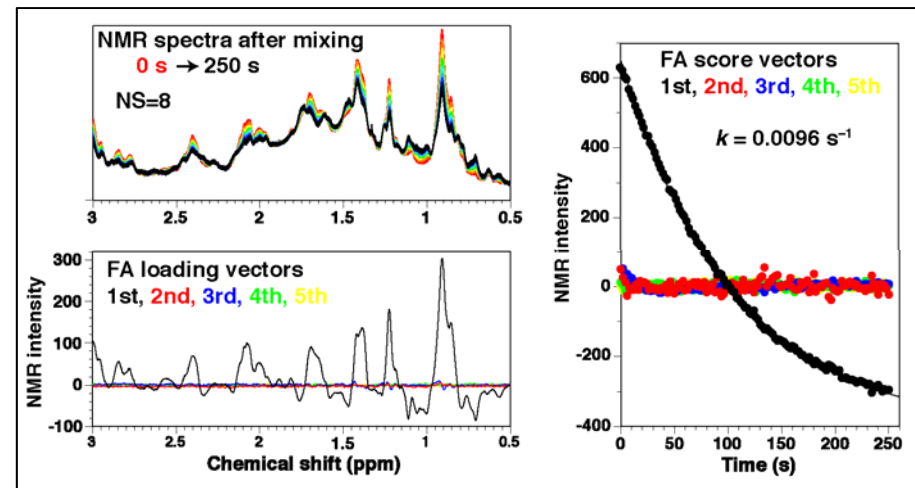


Fig.2: stopped-flow modeでの測定と因子分析(FA)

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	PF013	課題受付番号	PF14-100-005
実施機関名	国立研究開発法人・産業技術総合研究所		
実施部署名	バイオメディカル研究部門		
実施責任者管理職名・氏名	職名	主任研究員	氏名 山崎 和彦
実施部署所在地	〒305-8566 茨城県つくば市東1-1-1 中央第6		
利用課題名	反応中間体分子の動的構造解析のための real-time 計測技術開発～タンパク質・DNA 相互作用を中心に		
本課題の概要・目的	<p>NMR は最も情報量の多いスペクトル分光法であり、生体高分子の立体構造変化を検知し、詳細な情報を得ることができる。内部運動性など動的な性質について解析できることも大きな特長である。さらに、溶液の混合などによって誘起される反応過程での構造変化など、非平衡状態を解析することも可能である。しかし、通常の測定法では、迅速に作業を行っても混合から測定開始まで5分程度は要するため、それ以下の秒のオーダーでの反応を追うことは難しい。私たちは、NMR チューブ内での高速溶液混合によって反応を開始させ、複合体形成過程などの反応機序について、秒レベルの real-time NMR 計測を行うためのガラスマイクロ流路デバイスを試作した。本課題では、このデバイスを活用し、高磁場・高感度の NMR 装置を用いて、タンパク質と DNA の相互作用反応における反応中間体を同定し、その NMR 構造解析を行うことを目的とする。分子系としては、2つの転写因子 (SATB1、TBP) を対象し、複数の DNA 結合ドメインの結合順序の有無や、DNA bending などに注目した解析を行う。また、他の分子系、例えば、タンパク質のフォールディングにおける中間構造の解析にも応用可能か検討したい。必要に応じ、他の溶液混合の方法として、ゲルやビーズによる分子トラップを用いた新手法も試みる。</p>		
利用実施時期、及び期間	平成26年1月1日～平成28年3月31日 総利用日数：25日 概ね当初計画どおり		
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>・ ( ) 溶液 600MHz、( ) 溶液 700MHz、( ) 溶液 800MHz、(○) 溶液 900MHz ( ) 固体 700MHz、( ) 固体 900MHz</p> <p>利用期間1：平成26年2月23日～平成26年2月27日 利用期間2：平成27年12月14日～平成27年12月18日 利用期間3：平成28年1月18日～平成28年1月22日 利用期間4：平成28年2月15日～平成28年2月19日 利用期間5：平成28年3月14日～平成28年3月18日</p>	
その他の 利用施設			

<p>実施内容</p>	<p>NMR ノーマルチューブ内にガラスマイクロ流路デバイスを挿入して NMR マグネット内に設置し、キャピラリーチューブにより、デバイスとシリンジポンプを接続するシステムを構築した（概要の Fig. 1 参照）。タンパク質溶液と DNA 溶液を送液することにより、複合体形成反応を、変性剤共存下のタンパク質溶液とバッファを送液することでタンパク質のフォールディング反応を解析した。この時、シリンジポンプを常時作動させた continuous flow モードにより、反応後一定時間の状態を擬定常状態として観察することと、シリンジポンプを分光計からの信号によって、送液の ON/OFF と測定を同期させ、stopped flow モードによって変化をモニターすることの両方を行った。なお、前者はもちろん、後者においても、FID の積算が可能である。</p> <p>DNA 結合タンパク質としては 2 種候補（SATB1、TBP）があったが、SATB1 は予備実験の結果、反応直後に白沈を生じることなどから除外した。TBP は超好熱古細菌のものをを用い、予備実験により、25-50 度で測定可能かつ 50 度で最良のスペクトルを与えることや、常時性緩和法によって、結合方向性を決定できることなどを確認できた。しかし、<sup>15</sup>N 標識タンパク質と DNA の複合体がガラスマイクロ流路デバイス中に存在する条件で、SOFAS-HMQC や HSQC 測定を行ったが、良好なスペクトルが得られなかった。これは、シムがあまり良好ではなかったことが原因と考えられる。一方、<sup>1</sup>H の 1D 測定については、良好なスペクトルが得られたため、上述の混合実験を行うことができた。しかし、反応が極めて早く、追跡、評価することは不可能であった。</p> <p>タンパク質フォールディングについては、RNase A を用いた。溶液混合によって変性剤の希釈を行い、stopped flow モードでの測定によって反応をモニターした。因子分析を組み合わせた解析を行った結果、第 1 成分の score vector（時間変化に対応）が概ね single exponential curve に fit し、速度定数を得ることができた（概要の Fig. 2 参照）。同時に、loading vector（スペクトル成分に対応）により、反応前と反応後のピーク位置についての情報が得られた。</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>当初の目標は、2 次元 NMR 法の適用により、混合直後の状態を詳細に解析することであった。今回の成果では、感度と適用できる試料濃度の関係から 1 次元 NMR しか得られなかったのが、大きな誤算といわざるを得ない。これは、通常のパイレックスガラスを用いたデバイスとノーマル試料管に満たした重水との磁化率が合わずに理想的なシム値が得られなかったことが 1 つの原因と考えている。今後、磁化率調整ガラスを用いてデバイスを作成し直す予定である。また、TBP と DNA の相互作用は、予想よりも早く、現時点では解析が難しい状況であった。これについては、温度を下げたり、DNA の配列（特に長さ）を見直すなどの工夫が必要と考えている。一方、当初は、第 2 候補の分子系として考えていたタンパク質フォールディングについては、stopped flow モードにおいて、反応をモニターし、速度定数を決定することができた。反応速度としては、想定よりも遅く、250 秒でほぼ反応をモニターできる状況であった。これでも通常の測定での real-time monitoring では解析できない速度であり、デバイスの有効性を確認できた。装置の構成としては、1-2 桁早い反応を追うことができるため、今後は、混合後の変性剤濃度を下げる（混合液の容積比率を変える）などの対応により、反応を加速させることを考えている。また、今回は非標識のタンパク質を用いたが、<sup>15</sup>N 標識タンパク質を用意して、2 次元 NMR 測定を行って詳細な情報を得ていきたい。</p>

成果発表	現時点での成果発表はないが、今後、特許を出願し、その後、論文や学会発表を行う予定である。 山崎 和彦・高橋 正春・末松 浩人、特願 2016-255932 号、「NMR 測定用混合マイクロチップ」
今後の展開	この技術は、タンパク質・DNA 相互作用、タンパク質のフォールディング、タンパク質・低分子相互作用など、様々な生体分子反応の機序を詳細に解析できるため、応用範囲は極めて広い。上述のように今後磁化率を調整したガラスを用いてデバイスを作り直すか、あるいはチューブ型など全くデザインを変えたものなどを作成し、より高感度で測定できるものに改良していきたい。その上で、当初の予定であった 2 次元 NMR や緩和時間測定などを遂行し、真に新しい世界初の知見を得ていきたい。解析できる時間についても、FID の取得法を工夫することにより、ミリ秒レベルに対応するようにしていきたい。 また、本デバイスは試料管の出し入れをしないで試料交換を行うシステムと捉えることもできる。例えば、創薬開発においては、多数の阻害剤候補化合物と標的酵素の結合等を解析する必要があるが、シリンジポンプの代わりに、試料分注ロボットを接続し、さらに分光計による制御を行うことで、試料交換やシム調整の時間を省略したハイスループット・自動測定を行うことが可能となるかもしれない。
社会・経済への波及効果の見通し	上述のように、本研究の成果は、基礎研究だけではなく、創薬開発の現場でも極めて有効に使える系を構築できる可能性がある。特に、Fragment-Based Drug Discovery (FBDD) においては、10000 程度の fragment library からのスクリーニングが行われることがあるが、NMR は表面プラズモン共鳴などと比較してスループットが悪く、1000 程度に圧縮された library からのスクリーニングか、二次スクリーニングに用いられる傾向がある。自動試料交換機によって、最大 500 程度の試料の測定が自動で行えるものの、測定そのものにかかる時間が例えば 1 分程度なのに対し、試料交換に伴う温度安定化、チューニング、シムなどにかかる時間は、最低でも 5 分以上ある。したがって、試料管を磁石内に維持したまま試料交換が行えれば、スピードを 5 倍以上にできると考えられ、それにより、創薬開発での NMR の位置付けも大きく変わる可能性がある。
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	高磁場・高感度の装置を利用できる貴重な機会をいただき、とても感謝しています。また、測定について、親身にサポートいただき、大変助かりました。
今後の NMR 共用プラットフォームに対する期待	各ユーザーが自らの研究室で高磁場・高感度の装置を保有・維持することがコスト的にもとても難しい時代です。共用プラットフォームのような集中拠点において高磁場・高感度の装置を良好な状態で運営し、各ユーザーが本当に必要な分だけ、無駄なく利用できる環境は、国内の NMR 研究を進展させる上で、極めて理想的です。
成果公開延期の希望の有無	(○) あり : ( ) なし 「あり」の場合理由：本課題の結果、混合用ガラスデバイスについての実施例を取得することができたため、特許の出願を予定しています。企業との共同出願となるため、2 年程度の公開延期を希望します。 ⇒公開延期期間済み
その他	