

実施課題名 選択的安定同位体標識導入技術を利用したNMR法によるタンパク質と核酸の機能・構造解析技術の実用化

【背景】
 NMR法の適用範囲が拡大し、近年では、高難度タンパク質や高分子核酸およびその複合体が解析対象となっている。また、創薬では、NMR法による分子間相互作用の解析が不可欠となり、これらに対応した生体系NMR解析技術の高度化が強く求められている。本課題では、安定同位体(SI)標識技術と測定・解析を一貫したシステムとして捉え、その体系化を図り、将来統合的なソリューションとして提供するための基盤を構築することを目的とする。

【実施内容】
 高分子量核酸の解析に際しては、蛋白質に比べ化学シフトの分布が狭いため、シグナルの重なりの問題がより顕著となる。まず、本課題では対称性が非常に高く、K⁺イオン存在下ではNMRシグナルの重なりが著しいd(TTAGGGTTAGGG)鎖をモデルとして部位選択的安定同位体標識技術を用いた立体構造解析を行い、シグナルの重なりが著しい系での立体構造解析技術の確立を目指した。その解析の結果、この配列は二量体化しparallel propellerの四重鎖構造をとることがわかり、部位選択的同位体標識技術が有用であることが示された(Fig.1)。さらに、この部位選択的安定同位体技術の長鎖DNAに対しての応用として、601配列中の20base pairを部位選択的に標識を行いDNA信号の検出を試みた。その結果、イミノシグナルの検出はTROSY法を用いても検出することは出来なかったが、dT由来のMethyl基に対してはMethyl-TROSY法により検出することができた(Fig2.)。この結果は高分子量においても核酸と蛋白質の相互作用を部位選択的標識によって検出することが期待できる。また、高難度タンパク質の構造解析向けに様々な部位特異的アミノ酸の開発を進めると共に、これらを効率的にタンパク質に導入するための無細胞タンパク質合成技術の改良を実施した。

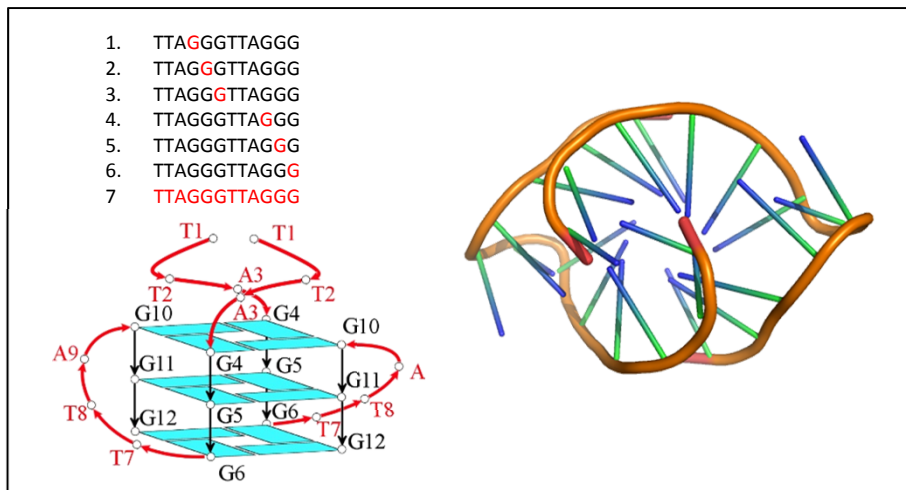


Fig.1 選択的安定同位体標識試料(赤:¹³C¹⁵N標識塩基:左上)、d(TTAGGGTTAGGG)2の立体構造(右)

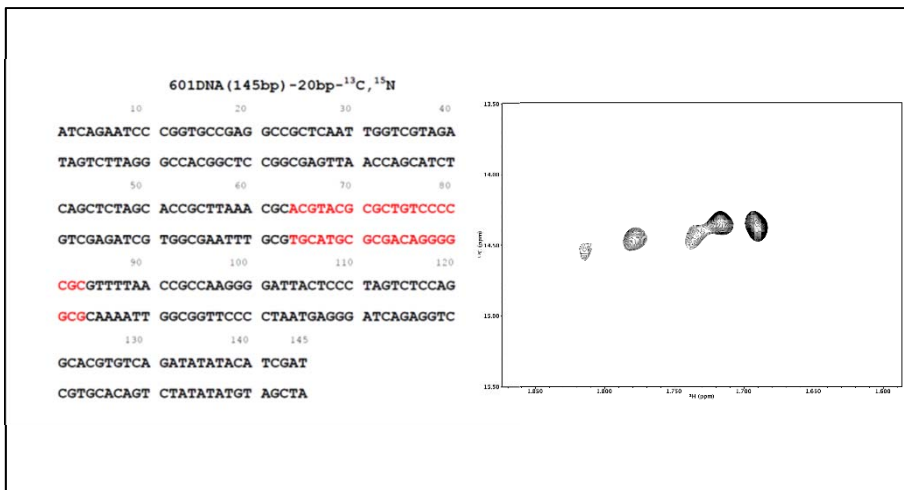
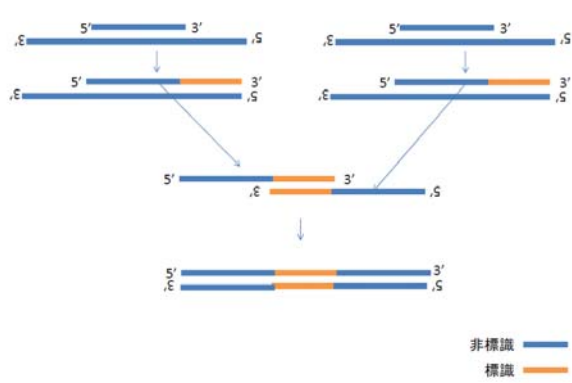


Fig.2 部位選択安定同位体標識601配列(左)DNAMethyl-TROSY(右)

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	PF004	課題受付番号	PF13-400-001
実施機関名	大陽日酸株式会社		
実施部署名	メディカル事業本部 S I 事業部 S I イノベーションセンター		
実施責任者管理職名・氏名	職名	課長	氏名 横山 順
実施部署所在地	東京都多摩市和田 2008-2		
利用課題名	選択的安定同位体標識導入技術を利用した NMR 法によるタンパク質と核酸の機能・構造解析技術の実用化		
本課題の概要・目的	<p>NMR 法の適用範囲が拡大し、近年では、高難度タンパク質や高分子核酸およびその複合体が解析対象となっている。また、創薬では、NMR 法による分子間相互作用の解析が不可欠となり、これらに対応した生体系 NMR 解析技術の高度化が強く求められている。本課題では、安定同位体 (S I) 標識技術と測定・解析を一貫したシステムとして捉え、その体系化を図り、将来統合的なソリューションとして提供するための基盤を構築することを目的とする。</p> <p>申請者の有する S I 標識技術を活用し、解析目的 (測定方法、取得したい構造・相互作用情報等) に応じ、最適な選択的 S I 標識タンパク質 (膜たんぱく質、分泌系タンパク質、シグナル伝達系タンパク質等) および高分子核酸 (DNA) を取得する技術を高度化する。さらに、その機能・構造解析を円滑に進めるための支援ソフトウェアを開発する。利用施設のプラットフォーム (高磁場 NMR、LC-NMR、タンパク質発現) を駆使し、一連の技術が有効であることを実証するとともに、国内の著名研究者・企業においてフィールド実証試験を実施し、そのフィードバックにより解析システムをより利用価値の高いレベルへ引き上げる。これらにより、広く一般に利用できるものとして確立し、実用化を目指す。</p>		
利用実施時期、及び期間	<p>平成 26 年 11 月 28 日～平成 28 年 3 月 31 日</p> <p>総利用日数： 10 日</p> <p>当初計画どおり・当初計画変更 (変更理由)</p>		
利用施設 横浜市立大学	NMR 装置 (該当部分に ○)	<p>利用装置①</p> <p>・ () 溶液 500MHz、() 溶液 600MHz、() 溶液 700MHz、 () 溶液 800MHz、() 溶液 900MHz、(○) 溶液 950MHz、 () 固体 900MHz、() 固体 950MHz</p> <p>利用期間 1：平成 26 年 11 月 28 日～平成 26 年 12 月 3 日 利用期間 2：平成 26 年 1 月 16 日～平成 26 年 1 月 18 日 利用期間 3：平成 26 年 2 月 13 日～平成 26 年 2 月 16 日 利用期間 4：平成 26 年 3 月 26 日～平成 26 年 3 月 31 日 利用期間 5：平成 26 年 4 月 13 日～平成 26 年 4 月 14 日 利用期間 6：平成 26 年 7 月 21 日～平成 26 年 7 月 27 日 利用期間 7：平成 26 年 7 月 27 日～平成 26 年 7 月 28 日</p>	

		<p> 利用期間 8 : 平成 26 年 7 月 28 日～平成 26 年 8 月 5 日 利用期間 9 : 平成 26 年 8 月 6 日～平成 26 年 8 月 10 日 利用期間 10 : 平成 26 年 8 月 10 日～平成 26 年 8 月 17 日 利用期間 11 : 平成 27 年 1 月 8 日～平成 27 年 1 月 12 日 利用期間 12 : 平成 27 年 1 月 26 日～平成 27 年 1 月 27 日 </p> <hr/> <p> 利用装置② ・ () 溶液 500MHz、() 溶液 600MHz、() 溶液 700MHz、 () 溶液 800MHz、(○) 溶液 900MHz、() 溶液 950MHz、 () 固体 900MHz、() 固体 950MHz </p> <p> 利用期間 1 : 平成 26 年 3 月 6 日～平成 26 年 3 月 6 日 利用期間 2 : 平成 26 年 4 月 15 日～平成 26 年 4 月 21 日 利用期間 3 : 平成 26 年 4 月 21 日～平成 26 年 4 月 28 日 </p> <hr/> <p> 利用装置③ ・ () 溶液 500MHz、() 溶液 600MHz、(○) 溶液 700MHz、 () 溶液 800MHz、() 溶液 900MHz、() 溶液 950MHz、 () 固体 900MHz、() 固体 950MHz </p> <p> 利用期間 1 : 平成 26 年 1 月 26 日～平成 26 年 1 月 30 日 利用期間 2 : 平成 26 年 2 月 2 日～平成 26 年 2 月 8 日 利用期間 3 : 平成 26 年 2 月 10 日～平成 26 年 2 月 10 日 利用期間 4 : 平成 26 年 2 月 21 日～平成 26 年 2 月 24 日 利用期間 5 : 平成 26 年 2 月 25 日～平成 26 年 2 月 25 日 利用期間 6 : 平成 26 年 4 月 1 日～平成 26 年 4 月 8 日 利用期間 7 : 平成 26 年 4 月 30 日～平成 26 年 4 月 30 日 利用期間 8 : 平成 26 年 7 月 3 日～平成 26 年 7 月 6 日 利用期間 9 : 平成 26 年 7 月 6 日～平成 26 年 7 月 12 日 利用期間 10 : 平成 26 年 7 月 13 日～平成 26 年 7 月 14 日 </p> <hr/> <p> 利用装置④ ・ () 溶液 500MHz、(○) 溶液 600MHz、() 溶液 700MHz、 () 溶液 800MHz、() 溶液 900MHz、() 溶液 950MHz、 () 固体 900MHz、() 固体 950MHz </p> <p> 利用期間 1 : 平成 26 年 1 月 19 日～平成 26 年 1 月 20 日 利用期間 2 : 平成 26 年 2 月 10 日～平成 26 年 2 月 12 日 利用期間 3 : 平成 26 年 2 月 17 日～平成 26 年 2 月 18 日 利用期間 4 : 平成 26 年 4 月 4 日～平成 26 年 4 月 9 日 利用期間 5 : 平成 26 年 4 月 23 日～平成 26 年 4 月 24 日 利用期間 6 : 平成 26 年 4 月 27 日～平成 26 年 5 月 2 日 利用期間 7 : 平成 26 年 5 月 4 日～平成 26 年 5 月 7 日 </p>
その他の		

利用施設		
成果の概要	実施内容	<p>横浜市立大学</p> <p>1. 解析対象とする DNA の選定</p> <p>DNA の構造解析ではタンパク質における構造解析に比べ分子中に約 2/3 しか水素原子が存在せず、^1H-^1H NOESY による距離情報が希薄な上で構造を決定せざるを得ない。また、タンパク質に比べ化学シフトの分布が狭く、シグナルの重なりが問題になるケースが多い。このため、高分解能でしかも部位選択的な測定を行う必要があり、部位選択的 ^{13}C、^{15}N 安定同位体 (S I) 標識および超感度高磁場 NMR 施設が必須である。本目的のテストケースとして非常に対称性が高く G-quadruplex を形成する TTAGGGTTAGGG 配列を選び、さらに長鎖な DNA として既にヌクレオソームとして結晶構造が解かれている DNA 配列 (601 配列) もテストケースとして選び、その配列の中心 20 残基に対し部位選択的に標識をおこなうこととした。</p> <p>2. ^{13}C、^{15}N 標識長鎖 DNA の NMR 測定による評価</p> <p>長鎖 DNA の解析意に先立って、TTAGGGTTAGGG の短鎖ではあるが非常に対照的である DNA の測定を ^{13}C、^{15}N 標識 DNA ユニット 1 種類と ^{13}C、^{15}N 部分標識 DNA ユニット 6 種類を弊社で開発・製造し、横浜市立大学の高磁場高感度 NMR 装置にて行った。この DNA は特殊な DNA 構造を形成するが、NMR スペクトルが重なっており通常の ^{13}C、^{15}N 標識 DNA ではスペクトルの帰属と構造解析が難しい状況であった。しかし、部分標識 DNA を用いることによって今まで帰属することができなかったスペクトルも帰属することができた。次に 146bp の中心 20 塩基を部位特異的に標識した二重鎖 DNA ユニットの弊社で開発・製造し、横浜市立大学の高磁場高感度 NMR 装置で測定を行い NMR 測定の可能性を調査した。その結果、横浜市立大学の高磁場高感度 NMR なら長時間の測定ではあるものの Methyl-TROSY 法により ^1H-^{13}C 相関スペクトルを得ることができた (それ以外のスペクトルに関しては ^1H-^{15}N TROSY は 3 日積算にてシグナル一つだけ確認、また糖部 ^1H-^{13}C のスペクトルは重なりが酷く、遥かに多い non-label のシグナルとラベル由来のシグナルが確認が出来ない状態であった。)</p>  <p>図 1. 部分安定同位体標識 DNA の合成法</p>

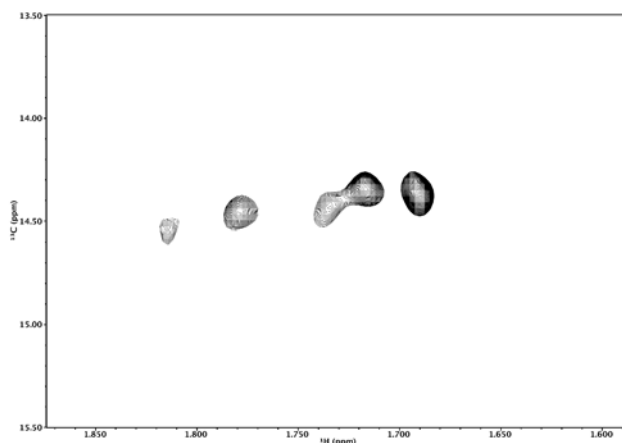


図 2. Methyl-TROSY

3. DNA 構造解析による有効性の実証

弊社の有する安定同位体標識のための「DNA 合成技術」を利用して DNA を高度に安定同位体標識することで、高磁場・高感度 NMR を活用し、これまで困難であった帰属を実施することができた。また、シグナルオーバーラップのモデルケースである TTAGGGTTAGGG 配列に対しては、部位特異的標識法によって得られた帰属を用い、その立体構造を得ることができた(図 2)。長鎖 DNA のモデルケースではその低感度ゆえに構造解析をするに至らなかったが、メチル基であれば観測可能であるという知見を得た。本課題は横浜市立大学の NMR 専門家によって測定や帰属の指導を受け、進めることができた。

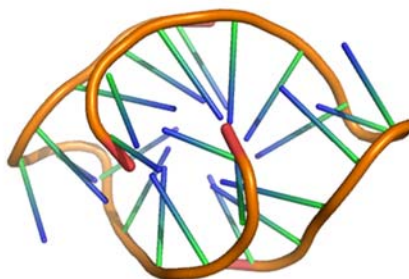


図 3. tr12 立体構造

<p>本課題により得られた成果と当初目標との比較</p>	<p>申請者の有するS I 標識技術を活用し、解析目的（測定方法、取得したい構造・相互作用情報等）に応じ、最適な選択的S I 標識核酸（DNA）を取得する技術を高度化することを目指した。</p> <p>目標とした 13C, 15N 標識長鎖 DNA（50mer 以上）を 5mg 以上に対し、150mer 以上の 13C, 15N 均一標識長鎖 DNA を 8mg 以上合成した。さらに、長鎖 DNA の内、特定領域のみを 13C, 15N 標識する技術開発に成功した。</p> <p>上記部分選択的標識 DNA 合成技術は、対称性が非常に高いシグナルのオーバーラッピングのモデル試料に対しては、非常に有効であることを示すことができたが、長鎖 DNA に対しては予想以上に分子量の効果が大きく Methyl 基以外のシグナルの検出は出来なかった。しかしながら Methyl 基ならば検出できるという知見は、長鎖の DNA の相互作用研究に Methyl 基に限定すれば可能であるということを示したといえる。</p> <p>核酸以外の目標課題については、鋭意申請者社内での研究開発を進め、様々な選択的S I 標識アミノ酸の開発に成功したものの、これらを高分子量タンパク質に導入した構造解析研究までには至らなかった。</p>
<p>成果発表</p>	
<p>今後の展開</p>	<p>本課題を通じて様々なS I 標識アミノ酸、核酸合成技術の開発を推進することができた。また、長鎖 DNA の NMR 解析において、高磁場 NMR と部分選択的な SI 標識 DNA が非常に有用であることが示された。同様に申請者が社内で行っている NMR 解析に有効な部位特異的標識アミノ酸及びそれらをタンパク質に的確に導入できる無細胞タンパク質技術を実用化することにより、高磁場 NMR を最大限に有用化できるものと確信している。今後は、本課題で開発した SI 標識長鎖 DNA や部位特異的 SI 標識アミノ酸および改良無細胞タンパク質合成キットを製品化し、NMR 共用プラットフォームとも連携を図りながら、更なる NMR 法の適用範囲拡大を目指す。</p>
<p>社会・経済への波及効果の見直し</p>	<p>申請者が保有するS I 標識技術をより成熟させ、上述の SI 標識長鎖 DNA や部位特異的 SI 標識アミノ酸および改良無細胞タンパク質合成キットを製品化する。上記を含めた高度な標識研究材料を提供できる技術基盤を確立することで、創薬分野における基礎研究を始め、多くの事業分野において生体高分子の NMR 研究とそれに関わる様々な研究開発の推進に貢献できるものと期待している。また、将来的にはこれら基礎研究基盤を通じて蓄積した技術を活用し、革新的な製品の開発を目指す。</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>非常に丁寧にご対応頂き、今後の発展につながる大変有意義な成果を得ることができました。</p>
<p>今後の NMR 共用プラットフォームに対する期待</p>	<p>NMR の有用性を広く認知して頂くためにビギナー向けの講習会もっと多く開催いただけると良いと感じました。</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>	