

実施課題名 高磁場固体NMRによる7回膜貫通型タンパク質の立体構造解析

【背景】

7回膜貫通型タンパク質は、創薬において重要なターゲットの一つであるGPCRが属するファミリーであり、その構造解析は極めて重要である。近年、固体NMR法の発展により、脂質二重膜中での膜タンパク質の高分解能構造が得られるようになったが、未だに測定・解析は非常に難しく、そのノウハウの蓄積は非常に重要である。本課題の目的は、7回膜貫通型タンパク質のモデルタンパク質である微生物型ロドプシンの立体構造決定を行ない、それによって7回膜貫通型タンパク質の測定・解析ノウハウを蓄積させることである。

【実施内容】

7回膜貫通型光駆動ナトリウムイオン輸送ロドプシン (NaR)を脂質二重膜に再構成し、主鎖帰属に必要な測定を実施した。Na⁺結合状態の試料の二次元¹³C-¹³C、¹⁵N-¹³Ca、¹⁵N-¹³C'相関測定を横浜市立大900 MHz装置にて実施した。高磁場であるため、固体NMRとしては極めて良好なスペクトルが得られた(Fig.1)。これらと各種三次元相関測定データを組み合わせ主鎖帰属をおこない、約60残基について帰属に成功した。

Na⁺非結合状態の試料についても三次元測定と帰属をおこなったところ、Na⁺結合/非結合によって化学シフトが異なる残基があり、Na⁺結合に伴って構造変化を生じることが示唆された(Fig.2)。

また、より高次元での測定を目指し、圧縮センシングの有効性についても検討をおこなった。その結果、三次元測定では10-30%程度まで、データを間引くことが可能だという知見も得た。

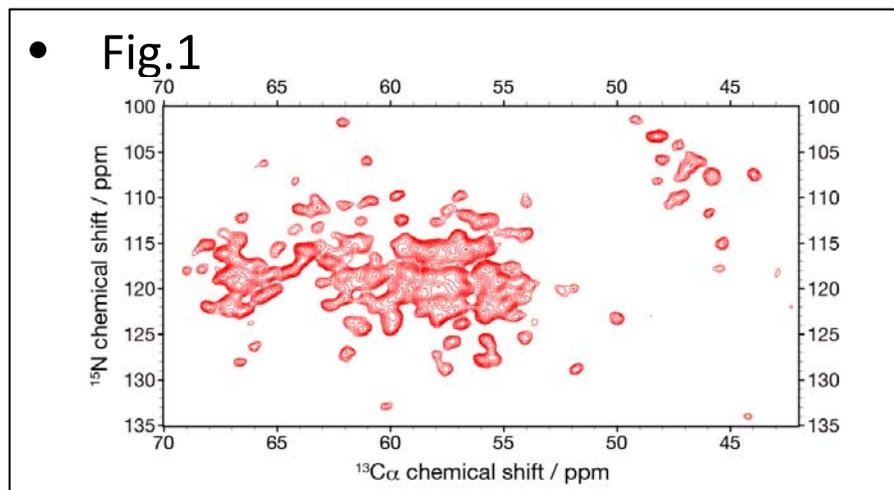


Fig.1 900MHz装置で測定したNaRのNCAスペクトル

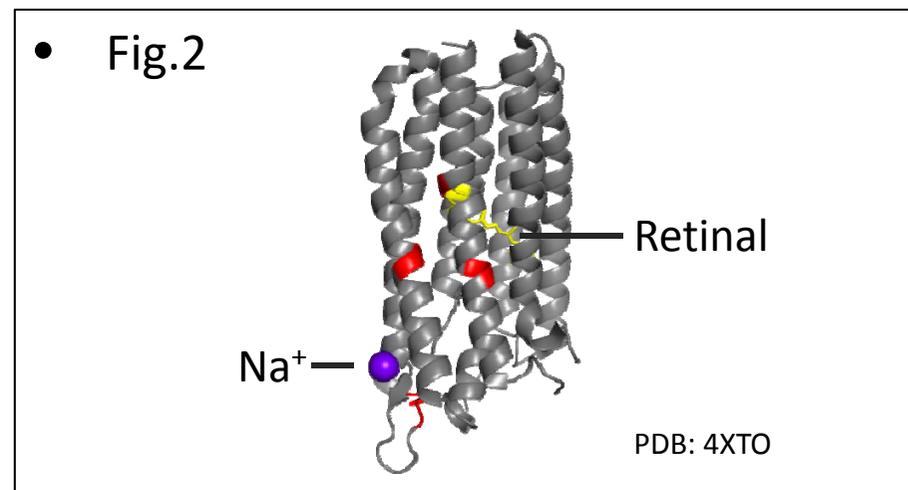


Fig.2 ホモログタンパク質(KR2)にNa⁺結合/非結合による化学シフト変化が大きい残基を赤色でマッピングした。

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	PF009	課題受付番号	PF14-200-002
実施機関名	北海道大学大学院生命科学院		
実施部署名			
実施責任者管理職名・氏名	職名	学振特別研究員(DC)	氏名 田巻 初
実施部署所在地	北海道札幌市北区北 10 条西 8 丁目		
利用課題名	高磁場固体 NMR による 7 回膜貫通型タンパク質の立体構造解析		
本課題の概要・目的	<p>7 回膜貫通型タンパク質は、創薬において重要なターゲットの一つである GPCR が属するファミリーであり、その構造解析は極めて重要である。近年、固体 NMR 法の発展により、脂質二重膜中での膜タンパク質の高分解能構造が得られるようになった。さらに、その構造が結晶中と異なることも報告されている。つまり、固体 NMR 法による 7 回膜貫通型タンパク質の構造解析は、その重要性を増してきている。しかし、未だに固体 NMR 法による測定・解析は非常に難しく、加えて、我が国のもつノウハウは欧米と比べて少ない。本課題の目的は、7 回膜貫通型タンパク質のモデルタンパク質である微生物型ロドプシンの立体構造決定を行ない、それによって測定・解析ノウハウを蓄積させることである。</p> <p>また、測定のターゲットには、近年発見された光駆動ナトリウムイオン輸送型ロドプシンを選択した。このタンパク質は構造生物学的知見が少なく、またオプトジェネティクスへの応用が期待されているため、構造解析の意義は大きい。</p>		
利用実施時期、及び期間	<p>平成 26 年 10 月 27 日～平成 26 年 10 月 31 日</p> <p>総利用日数： 5 日</p> <p>当初計画どおり・当初計画変更 (変更理由)装置トラブルのため。</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 10 月 27 日～平成 26 年 10 月 31 日 利用期間 2：平成 年 月 日～平成 年 月 日 利用期間 3：平成 年 月 日～平成 年 月 日</p>	
その他の 利用施設	阪大蛋白研 700 MHz 固体 NMR 装置(阪大蛋白研 蛋白質研究 共同利用)		

<p>成果の概要</p>	<p>実施内容</p>	<p>7 回膜貫通型光駆動ナトリウムイオン輸送タンパク質 <i>Indibacter alkaliphilus</i> Na⁺ rhodopsin (IaNaR) の構造決定を行うために必要である主鎖帰属のための測定を実施した。DMPC/DMPA 二重膜に再構成された Na⁺結合状態の IaNaR 試料の二次元 ¹³C-¹³C、¹⁵N-¹³C α、¹⁵N-¹³C' 相関測定を横浜市立大 900 MHz 装置にて実施した。さらに、蛋白研 700MHz 装置にて、NCACX, NCOGX, CANCO 等、7 種類の三次元相関測定を実施した。これらのデータを用いて、主鎖帰属をおこなった。つづいて、Na⁺非結合状態の試料についても三次元測定と帰属をおこなった。さらに、Na⁺結合/非結合状態の構造の違いを化学シフトによって評価した。</p> <p>加えて、多次元測定で課題となる間接軸データの分解能不足に対応するため、固体 NMR における圧縮センシングの有効性についても検討をおこなった。</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>取得したスペクトルを解析し、さらに自動帰属プログラム CYANA-ssFLYA でのベリファイを経て、約 60 残基の主鎖について高い確度をもって帰属できた。得られた化学シフトは既知ロドプシン構造を鋳型としたホモロジーモデルから計算されたものと類似しており、IaNaR は再構成された脂質二重膜中で正常にフォールディングしていることが確認された。</p> <p>Na⁺結合/非結合状態での化学シフトを比較したところ、Na⁺結合部位と予想されている周辺の残基で変化が見られた。さらに、発色団周辺にも変化があり、Na⁺結合により、広い領域で構造変化が生じると考えられる。</p> <p>主鎖帰属に時間を要しており、当初の目的である立体構造決定は達成できていない。この原因の一つに、IaNaR の残基数が多く、かつアミノ酸配列に偏りがあるため、一意な帰属が難しいことが挙げられる。これには四次元測定が有効であると考えられる。しかし、四次元測定は長期積算が必要となるため、高速測定手法の利用が必要となる。その一種である圧縮センシングを三次元データに対して適用ところ 10~30%程度までサンプリングを間引くことが可能だという知見を得た。</p>
	<p>成果発表</p>	<p>斉藤優太, 田巻初ほか, “固体 NMR 法を用いたナトリウムポンプ型ロドプシンの構造解析” 第 54 回 NMR 討論会, (2015).</p> <p>田巻初, 斉藤優太ほか, “固体 NMR によるタンパク質測定への圧縮センシングの応用” 第 54 回 NMR 討論会, (2015).</p>
	<p>今後の展開</p>	<p>固体 NMR を用いた七回膜貫通型タンパク質の立体構造解析のノウハウの蓄積が今後必要であると考えている。三次元までの測定については安定して測定が行うことができるまで蓄積ができた。線幅が広く解析者の恣意的な判断の影響を受け易い固体 NMR 信号の帰属に関しても、自動帰属プログラムを併用することにより、その影響を低減できることがわかった。今後はこれまでの知見を活かし、高次元測定や帰属作業に重点を置いて研究を進めたい。高次元測定については、圧縮センシングの応用によって実現可能できると考えられる。高次元測定データの利用や同位体標識の工夫等を駆動力に帰属作業が加速することを期待したい。</p> <p>構造決定までは非常に長い道程ではあるが、固体 NMR 技術の発展のためには必要なステップであるため、一步一步着実に研究を進めたい。</p>

<p>社会・経済への波及効果の見 通し</p>	<p>7 回膜貫通型タンパク質は創薬ターゲットとして非常に重要である GPCR を含むグループである。固体 NMR では、リガンド結合や変異導入等による安定化を施すことなく、しかも脂質二重膜中で GPCR の構造を解くことができる。よって、その技術発展は極めて重要である。固体 NMR による七回膜貫通型タンパク質の立体構造解析は、残念ながら欧米に遅れをとっているのが現状である。しかし、本課題において輸送基質の有無による七回膜貫通型タンパク質の構造変化を示唆するデータを収集することに成功しており、着実に遅れを取り戻しているのではないかと考えている。また、そういった変化を捉えられる高品質なデータを共用プラットフォームの装置で測定できた、ということに大きな意義があると考えている。</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>超高磁場装置を触れられる機会は滅多になく、このような貴重な機会を与えてくださった横浜市大をはじめとする NMR 共用プラットフォームの関係者の皆様に深く感謝致します。</p>
<p>今後の NMR 共用プラットフォームに対する期待</p>	<p>超高磁場等のフラッグシップ装置は導入や維持・更新が非常に難しいですが、研究競争力の発展には必要なものです。今後もプラットフォーム事業は必要だと思えます。</p>
<p>成果公開延期の希望の有無</p>	<p>() あり : (○) なし 「あり」の場合理由 :</p>
<p>その他</p>	