

実施課題名 長距離情報の取得によるマルチドメインタンパク質の構造解析のためのNMR技術の高度化

【背景】

マルチドメインタンパク質は、真核生物のタンパク質全体の約70%を占めるといわれている。しかし、動的な性質のため、その全長では結晶化が容易でないことが多く、現状は、各ドメインに切り出した対象の構造解析が行われている。従って、マルチドメインタンパク質全体の構造解析や構造変化の解析法の確立は、極めて重要な問題である。本課題では、ドメイン選択的標識試料の調製、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長距離情報を統合した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した。またそのために必要なNMR技術の高度化を行った。

【実施内容】

マルチドメインタンパク質であるRNA結合タンパク質Nrd1等を対象に、高活性型のsortaseを用いて低温条件下で連結反応を行い、同位体標識部分と非標識部分を連結した。これにより NMR解析に資する区分(ドメイン) 選択的資料を良い収量で得ることに成功し、ドメイン選択的標識の手法を確立した。さらに従来から用いられているIPAP法やDSSE法といった信号の分裂を測定する方法と、信号の強度変化によりRDCを計測するARTSY法やそれを改良したものを比較検討した。両者とも高磁場の利用により大きなRDC値が得られたが、ARTSY法は帰属の正確さの点や感度の点で有利であった。またマルチドメインタンパク質への常磁性中心の導入方法について、クリックケミストリーを利用したロバストな方法を開発した。非均一測定(NUS)に関しては、再構成したいスペクトルの性状によりその効果が大きく影響を受けることから、様々なサンプルで成績を比較検討した。また、マルチドメインタンパク質試料としては1000残基を超えるvinculinタンパク質で良好なスペクトルを得ることに成功した。

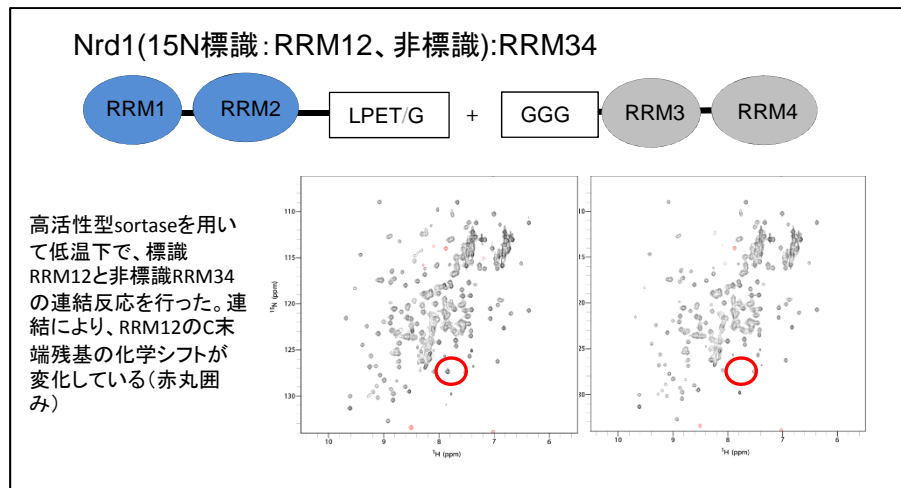


Fig.1 Nrd1のRRM12(左)と、RRM12に非標識のRRM34を連結したものの(右)のHSQCスペクトル

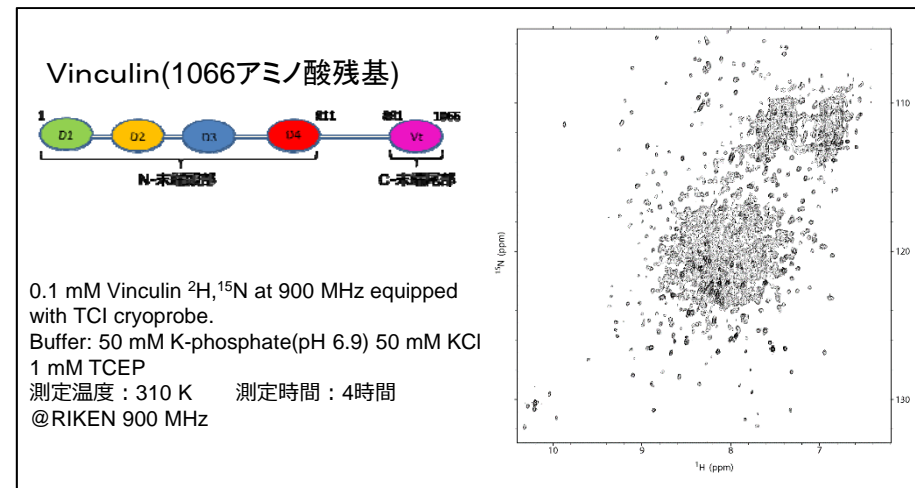


Fig.2 Vinculin(1066アミノ酸残基)のTROSYスペクトル

NMR 共用プラットフォーム 最先端利用開発課題  
利用報告書

|                |  |   |          |
|----------------|--|---|----------|
| 課題受付番号         | PF16-01-R-006  |   |          |
| 利用課題名          | 長距離情報の取得によるマルチドメインタンパク質の構造解析のための NMR 技術の高度化  |   |          |
| 実施機関名          | 首都大学東京   |   |          |
| 実施部署名          | 理工学研究科 (H30 以降は改組により理学研究科)   |   |          |
| 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   |   |          |
| 本課題の概要・目的      | <p>マルチドメインタンパク質である RNA 結合タンパク質 Nrd1 等を対象に、高活性型の sortase を用いて低温条件下で連結反応を行い、同位体標識部分と非標識部分を連結した。これにより NMR 解析に資する区分 (ドメイン) 選択的資料を、良い収量で得ることに成功し、ドメイン選択的標識の手法を確立した。さらに従来から用いられている IPAP 法や DSSE 法といった信号の分裂を測定する方法と、信号の強度変化により RDC を計測する ARTSY 法やそれを改良したものを比較検討した。両者とも高磁場の利用で大きな RDC 値が得られたが、ARTSY 法は帰属の正確さの点や感度の点で有利であった。またマルチドメインタンパク質への常磁性中心の導入方法について、クリックケミストリーを利用したロバストな方法を開発した。非均一測定 (NUS) に関しては、再構成したいスペクトルの性状によりその効果が大きく影響を受けることから、様々なサンプルで成績を比較検討した。また、マルチドメインタンパク質試料としては 1000 残基を超える vinculin タンパク質で良好なスペクトルを得ることに成功した。</p> |   |          |
| 利用実施時期、及び期間    | <p>平成 28 年 8 月 1 日～平成 30 年 7 月 31 日</p> <p>総利用日数： 10 週と 3 日</p> <p>当初計画どおり</p>   |   |          |
| 利用施設<br>理化学研究所 | NMR 装置<br>(該当部分に<br>○)   | <p>利用装置①</p> <p>・ ( ) 溶液 600MHz、( ) 溶液 700MHz、( ) 溶液 800MHz、<br/>(○) 溶液 900MHz、( ) 固体 700MHz、( ) 固体 900MHz</p> <p>利用期間 1：平成 28 年 9 月 26 日～平成 28 年 10 月 3 日</p> <p>利用期間 2：平成 28 年 10 月 11 日～平成 28 年 10 月 25 日</p> <p>利用期間 3：平成 28 年 12 月 19 日～平成 28 年 12 月 26 日</p> <p>利用期間 4：平成 29 年 3 月 10 日～平成 29 年 3 月 13 日</p> <p>利用期間 5：平成 29 年 5 月 29 日～平成 29 年 6 月 4 日</p> <p>利用期間 6：平成 29 年 8 月 28 日～平成 29 年 9 月 3 日</p> <p>利用期間 7：平成 30 年 2 月 21 日～平成 30 年 2 月 25 日</p> <p>利用期間 8：平成 30 年 2 月 26 日～平成 30 年 3 月 4 日</p> |          |

|              |                       |   |
|--------------|-----------------------|---|
|              |                       | <p>利用期間 9 : 平成 30 年 4 月 23 日～平成 30 年 4 月 30 日<br/>         利用期間 10 : 平成 30 年 6 月 18 日～平成 30 年 6 月 24 日</p> <hr/> <p>利用装置②</p> <p>・ ( ) 溶液 600MHz、( ) 溶液 700MHz、( ○ ) 溶液 800MHz、<br/>         ( ) 溶液 900MHz、( ) 固体 700MHz、( ) 固体 900MHz</p> <p>利用期間 1 : 平成 29 年 1 月 16 日～平成 29 年 1 月 23 日</p>  |
| その他の<br>利用施設 |                       | 無し  |
| 成果の<br>概要    | 実施内容                  | <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長距離情報を統合した 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と、そのために必要な NMR 技術の高度化を行った。解析対象は必然的に高分子量、低濃度であるので、理化学研究所に設置された高磁場 NMR の高い分解能、感度を生かすことで、質の高いデータの取得を行った。高磁場のため、アミド基観測の TROSY スペクトルの質の向上も利点として活用した。具体的には以下の項目(1)から(5)について研究を実施した。</p> <p>(1) 試料となるマルチドメインタンパク質の区分標識のための試料調製法の確立。</p> <p>(2) 常磁性緩和効果や擬コンタクトシフトの観測のための、ロバストなタンパク質への常磁性中心の導入法の開発。</p> <p>(3) 残余双極子相互作用の測定のための、ロバストなメディア調製、測定プロトコルの確立</p> <p>(4) 常磁性緩和効果、擬コンタクトシフト、残余双極子相互作用等の情報を取り込んだ立体構造計算プロトコル、特に多形（マイナー構造）を含む構造決定プロトコルの確立</p> <p>(5) NUS (Non uniform sampling) 等による各 NMR 測定の高度化</p> |
|              | 本課題により得られた成果と当初目標との比較 | <p>(1) では、高活性型 sortase を用いて低温下で反応を行うことにより、マルチドメインタンパク質の区分標識のための収率の良い試料調製法を確立させ、当初の目標を十分に達成できた（論文作成中）。</p> <p>(2) ではクリックケミストリーによるタンパク質への常磁性中心のロバストな導入法を開発することに成功し、当初の目標を十分に達成できた（論文 2、3）。</p> <p>(3) では、残余双極子相互作用の測定のためのメディアとして、既存の PEG/hexanol、pf1 フェージを用いたバッファの最適化がもっとも効率が良かった。ほぼ目的を達成できたが、新規なメディアの開発等が今後の課題である。測定法としては、従来から用いられている IPAP 法や DSSE 法といった信号の分裂を測定する方法と、信号の強度変化により RDC を計測する ARTSY 法を改良したものを比較したところ、ARTSY 法は帰属の正確さの点や感度の点で有利であることが分かった。</p> <p>(4) では、立体構造計算プロトコル、特に多形（マイナー構造）を含む構造決定プロトコルの確立を目指したが、マイナー構造に踏み込むようなデータ収集に至らず、今後の課題である。</p>                              |

|             |  |
|-------------|--|
|             | <p>(5)では NUS 等による NMR 測定の高度化を狙ったが (論文 1)、NUS に関しては、再構成したいスペクトルの性状 (タンパク質の種類) によりその効果が大きく影響を受け、統一的に利用できるような高度化に至らなかった。間接測定時で最も長いサンプリングポイントの設定や、その取得のために最適なパルス系列のデザインなど細かな開発要素は未だ多い。</p> <p>(1)に関連して、あらたにマルチドメインタンパク質試料として 1000 残基を超える vinculin タンパク質で良好なスペクトルを得ることに成功した。</p>  |
| <p>成果発表</p> | <p>論文</p> <p>(1) “Structural insights into ubiquitin phosphorylation by PINK1.”<br/>Okatsu K, Sato Y, Yamano K, Matsuda N, Negishi L, Takahashi A, Yamagata A, Goto-Ito S, Mishima M, Ito Y, Oka T, Tanaka K, Fukai S.<br/>Sci. Rep. 2018, 8, 10382.</p> <p>(2) “Chemical shift assignments of the first and second RRM of Nrd1, a fission yeast MAPK-target RNA binding protein.”<br/>Kobayashi A, Kanaba T, Satoh R, Ito Y, Sugiura R, and Mishima M<br/>Biomolecular NMR Assign. 2017, 11, 123-126</p> <p>(3) “A new carbamidemethyl-linked lanthanoid chelating tag for PCS NMR spectroscopy of proteins in living HeLa cells.”<br/>Hikone Y, Hirai G, Mishima M, Inomata K, Ikeya T, Arai S, Shirakawa M, Sodeoka M, Ito Y.<br/>J. Biomol. NMR.(2016) 66, 99-110</p> <p>学会発表</p> <p>(1)会津貴大, 永井敢, 貴堂晃弘, 鈴木拓巳, 伊藤隆, 三島正規 “高活性型 sortase を用いたマルチドメインタンパク質のドメイン選択的標識” 日本ケミカルバイオロジー学会年会, 千代田区, 2018 年 6 月 11~13 日</p> <p>(2)会津貴大, 永井敢, 伊藤隆, 三島正規, “細胞接着に関わるマルチドメインタンパク質 vinculin の溶液 NMR による構造解析”, 2017 年度生命科学系合同年次大会, 神戸, 2017 年 12 月 6-9 日</p> <p>(3)貴堂晃弘, 工藤工, 金場哲平, 伊藤隆, 三島正規, “ライゲーシオン反応を用いたマルチドメインタンパク質 PKC の構造解析に向けた試み”, 2017 年度生命科学系合同年次大会, 神戸, 2017 年 12 月 6-9 日</p> <p>(4)貴堂晃弘, 工藤工, 金場哲平, 伊藤隆, 三島正規, “溶液 NMR を用いたマルチドメインタンパク質 PKC の構造解析”, 第 56 回 NMR 討論会, 八王子, 2017 年 11 月 14-16 日</p> <p>(5)会津貴大, 永井敢, 伊藤隆, 三島正規, “細胞接着に関わるマルチドメインタンパク質 vinculin の溶液 NMR 法による構造解析”, 第 56 回 NMR 討論会, 八王子 2017 年 11 月 14-16 日</p> <p>(6) 貴堂晃弘, 金場哲平, 伊藤隆, 三島正規, “ライゲーシオン反応を用いたマルチドメインタンパク質 PKC の構造解析”<br/>NMR 討論会 広島 2016 年 11 月 16 日~18 日</p> |

|  |  |
|--|--|
| 今後の展開                                  | <p>この課題で得られた知見や、確立されたプロトコルは、現在、解析困難とされるマルチドメインタンパク質の構造解析法の確立へ大きく貢献すると考えられる。そこで、他のマルチドメインタンパク質の構造解析へと応用、展開していく。例えばマルチドメインタンパク質として、さらに 1000 残基を超えるような vinculin 等についても解析を行っていく。また、マルチドメインタンパク質の X 線小角散乱測定も進めており、これら他の分光法との構造情報のマージ、あるいは、相互評価を行うことで、より詳細な、あるいは正確な、マルチドメインタンパク質の構造の理解を目指した研究への展開も考えている。また RDC 測定については、積極的に新規なメディアの探索を続ける。NUS 等による NMR 測定の高度化については、データのプロセシング法にとどまらず、パルス系列の最適化と合わせて、今後も開発をつづける。また、これら NMR 測定の高度化に関しては、高磁場の効果とその最適な利用法も合わせて追究する。また本研究での開発内容を一般的に利用できる解析体系として纏め、review で報告する等、広汎に用いられるように積極的に発信していく。</p> |
| 社会・経済への波及効果の見通し                        | <p>様々な構造解析技術が発達した現在においても、依然、構造情報の取得が困難な対象が、柔らかなマルチドメインタンパク質や天然変性タンパク質である。これらの構造情報を得ることで、複雑な活性制御機構に迫ることができる。また創薬におけるドッキングによる化合物のデザインにおいても、マルチドメインタンパク質等では、現在の狭い領域（ドメイン対リガンド）が対象である状況から、同時にタンパク質側の多点トリガンドが結合するような例が現れてくる可能性もある。以上のように理学的観点からの生命現象の理解や、応用面における創薬にとってもマルチドメインタンパク質の構造研究は大きなインパクトを持ち、本研究はマルチドメインタンパク質の構造解析の進展について一定の貢献をした。</p>  |
| 利用における感想<br>（改善要望等を含む）<br>利用周辺環境に関する希望 | <p>施設の皆様には、いつもご親切に対応していただきまして、深く感謝申し上げます。窓口になって下さっている方々はもちろん、分光器が不調になった際にも、装置のご担当の方に大至急の対応をしていただき、マシンタイムにほぼ影響が出ませんでした（アンプの冷却ファンのトラブルに由来するものですが、私のテーマのご担当者→装置の管理者→メーカーの対応という一連の流れが一日以内という大変な迅速なものでした）。</p> <p>最先端利用課題では無償で高磁場の装置を利用できる点が大変大きな魅力で、このような利用形態を維持するためにご努力くださっている皆様に深く感謝申し上げます。</p>  |
| 今後の NMR 共用プラットフォームに対する期待               | <p>1.2 GHz の NMR が、欧州ではすでに複数台発注済みです。日米では、未だ導入の予定を耳にしたことはありません。是非とも拠点施設で導入して、外部利用が可能なかたちにしていただければと思います。</p>   |
| 成果公開延期の希望の有無                           | <p>( ) あり : ( O ) なし<br/>         「あり」の場合理由 :</p>  |
| その他                                    | <p>(上記の項目以外でご意見等お願いします。)</p>   |