

実施課題名：タンパク質における特異なプロトン化状態の、NMRによる直接観測とそのための手法開発

【背景】

生化学においてリジン、アルギニン側鎖はプロトン化状態にあり、アスパラギン酸、グルタミン酸の側鎖は脱プロトン化しているということは教科書的な常識である。しかし例えば、AADase (acetoacetate decarboxylase)では、以前の生化学的解析から中性付近でも活性残基のリジンが脱プロトン化した状態であることが提案されている。結晶構造解析が行われたものの(Nature 2009, 459: 393-397)、通常のX線結晶構造解析ではプロトンの存在が議論できないため、プロトン化状態の直接の決定はなされていない。また他にも、近年の高分解X線結晶構造解析や中性子線結晶構造解析から、脱プロトン化したアルギニン側鎖やプロトン化したアスパラギン酸、グルタミン酸等、特異なプロトン化状態が続々と報告されつつある。そこで本申請研究では、光受容体タンパク質(GAFドメイン)において、色素とその近傍のリジンの側鎖のプロトン化状態について解析する。またその他のタンパク質内において存在する特異なプロトン化状態を、先端NMR施設を用いて観測する。またそのために必要な測定法の開発を行った。

【実施内容】

光受容体タンパク質のGAFドメインの発色団とその近傍のリジンのプロトン化状態の観測を行った。GAFドメインでは、 ϵ - ^{13}C ,D2リジンを取り込ませた試料を用いて、温度変化と線形の解析を行い、リジン側鎖のNHの交換速度を調べたところ、溶媒のプロトンとの交換が極めて遅いことが明らかとなった。またAADaseでは重水素化、選択的リジン ϵ - ^{13}C 標識、コア部分を残してトリミングされたAADase発現系構築、試料調製を行い、リジンの観測を試みた。しかし、リジンのプロトン化状態の解析に使用できるNMR信号は観測されなかった。その他の特異なプロトン化状態である、プロトン化した酸性アミノ酸側鎖については、抗がん剤クリゾチニブが結合する修復酵素タンパク質MTH1等を試料に、 ^{13}C 直接観測による観測法の開発も行い、アスパラギン酸側鎖のpKaの効率の良い観測に成功した。測定法として、 ^{13}C detection CGCBCO (^{13}C aliphatic decoupling during acquisition)をデザインし(Fig.1)、クリゾチニブ結合型で「COOH」形で存在すると示唆されるAsp119のpKaが異常であることが明らかになった(Fig.2)。この測定法が有効であったので、GAFドメインにフィードバックし、発色団近傍のGlu217のpKaの解析も行った。

Fig.1

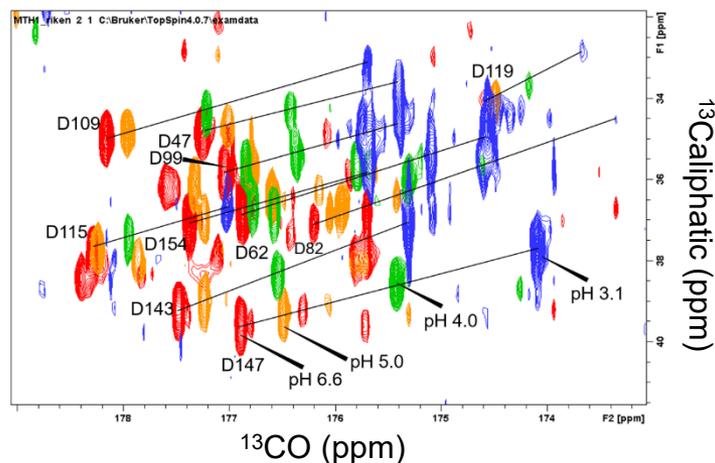


Fig.1 ^{13}C detection CGCBCOスペクトル。pH滴定によるカルボキシ基の化学シフトを容易にモニターできる。

Fig.2

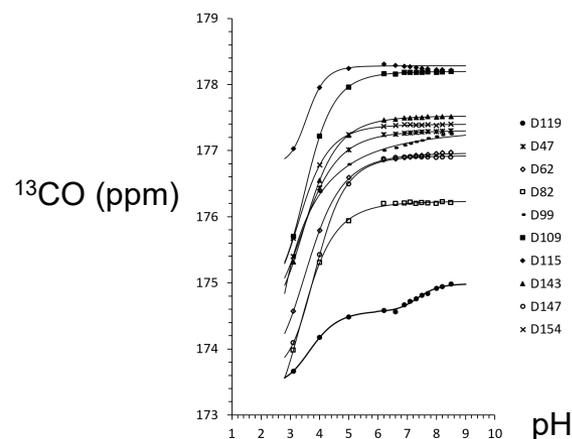


Fig.2 ^{13}C detection CGCBCOによるpH滴定の結果。Asp119のカルボキシ基が特異な挙動を示している。

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

(課題実施者の方へ)

課題選定委員会にて、実施内容のフィードバックを行うため、ご記入下さい。本報告書については、必要な編集・加工を行った上で NMR 共用プラットフォームのホームページにて公開を致します。また、別途開催予定の成果報告会・シンポジウムや委託事業報告書作成時において、本報告書の内容についての発表や資料作成等のご協力をお願いする場合があります。

課題受付番号	PF18-01-R-018		
利用課題名	タンパク質における特異なプロトン化状態の、NMR による直接観測とそのための手法開発		
実施機関名	東京都立大学		
実施部署名	理学研究科・化学専攻		
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 (字数制限はありませんが 400 字～600 字以内(程度)で お書きください。)	<p>生化学においてリジン、アルギニン側鎖はプロトン化状態にあり、アスパラギン酸、グルタミン酸の側鎖は脱プロトン化しているということは教科書的な常識である。しかし例えば、AADase (acetoacetate decarboxylase)では、以前の生化学的解析から中性付近でも活性残基のリジンが脱プロトン化した状態であることが提案されている。結晶構造解析が行われたものの (Nature 2009, 459: 393-397)、通常の X 線結晶構造解析ではプロトンの存在が議論できないため、プロトン化状態の直接の決定はなされていない。また他にも、近年の高分解 X 線結晶構造解析や中性子線結晶構造解析から、脱プロトン化したアルギニン側鎖やプロトン化したアスパラギン酸、グルタミン酸等、特異なプロトン化状態が続々と報告されつつある。</p> <p>そこで本申請研究では、光受容体タンパク質(GAF ドメイン)において、色素とその近傍のリジンの側鎖のプロトン化状態について解析する。またその他のタンパク質内において存在する特異なプロトン化状態を、先端 NMR 施設を用いて観測する。またそのために必要な測定法の開発を行う。</p>		
利用実施時期、及び期間	2018 年 9 月 1 日 ~ 2021 年 3 月 31 日		
	総利用日数 : 188 日		
	<input type="checkbox"/> 当初計画どおり・ <input checked="" type="checkbox"/> 当初計画変更 (変更理由)新型コロナウイルス感染症による研究の進捗への影響のため、研究期間の延長が認められたため。		

<p>利用施設 理化学研究所</p>	<p>NMR装置 (該当部分に ○)</p>	<p>利用装置①</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ (<input type="radio"/>) 溶液 600MHz、(<input type="radio"/>) 溶液 700MHz、(<input type="radio"/>) 溶液 800MHz、 (<input type="radio"/>) 溶液 900MHz、(<input type="radio"/>) 固体 700MHz、(<input type="radio"/>) 固体 900MHz <p>利用期間 1 : 2019 年 1 月 21 日～2019 年 1 月 27 日 (1 週間利用) 利用期間 2 : 2019 年 2 月 4 日～2019 年 2 月 11 日 (1 週間 1 日間利用) 利用期間 3 : 2019 年 3 月 18 日～2019 年 3 月 24 日 (1 週間利用) 利用期間 4 : 2019 年 4 月 15 日～2019 年 4 月 21 日 (1 週間利用) 利用期間 5 : 2019 年 8 月 19 日～2019 年 8 月 25 日 (1 週間利用) 利用期間 6 : 2019 年 9 月 2 日～2019 年 9 月 8 日 (1 週間利用) 利用期間 7 : 2019 年 9 月 30 日～2019 年 10 月 6 日 (1 週間利用) 利用期間 8 : 2020 年 1 月 20 日～2020 年 1 月 26 日 (1 週間利用) 利用期間 9 : 2020 年 2 月 5 日～2020 年 2 月 9 日 (5 日間利用) 利用期間 11 : 2020 年 3 月 2 日～2020 年 3 月 8 日 (1 週間利用) 利用期間 11 : 2020 年 3 月 16 日～2020 年 3 月 22 日 (1 週間利用)</p> <hr/> <p>利用装置②</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ (<input type="radio"/>) 溶液 600MHz、(<input type="radio"/>) 溶液 700MHz、(<input checked="" type="radio"/>) 溶液 800MHz、 (<input type="radio"/>) 溶液 900MHz、(<input type="radio"/>) 固体 700MHz、(<input type="radio"/>) 固体 900MHz <p>利用期間 1 : 2019 年 9 月 2 日～2019 年 9 月 8 日 (1 週間利用) 利用期間 2 : 2019 年 9 月 30 日～2019 年 10 月 6 日 (1 週間利用) 利用期間 3 : 2019 年 11 月 25 日～2019 年 12 月 1 日 (1 週間利用) 利用期間 4 : 2020 年 1 月 6 日～2020 年 1 月 13 日 (1 週間 1 日間利用) 利用期間 5 : 2020 年 3 月 4 日～2020 年 3 月 8 日 (5 日間利用) 利用期間 6 : 2020 年 3 月 19 日～2020 年 3 月 22 日 (4 日間利用) 利用期間 7 : 2020 年 8 月 6 日～2020 年 8 月 10 日 (5 日間利用)</p> <hr/> <p>利用装置③</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ (<input type="radio"/>) 溶液 600MHz、(<input type="radio"/>) 溶液 700MHz、(<input type="radio"/>) 溶液 800MHz、 (<input checked="" type="radio"/>) 溶液 900MHz、(<input type="radio"/>) 固体 700MHz、(<input type="radio"/>) 固体 900MHz <p>利用期間 1 : 2018 年 11 月 19 日～2018 年 11 月 25 日 (1 週間利用) 利用期間 2 : 2018 年 12 月 17 日～2018 年 12 月 24 日 (1 週間 1 日間利用) 利用期間 3 : 2019 年 1 月 4 日～2019 年 1 月 6 日 (3 日間利用) 利用期間 4 : 2019 年 1 月 15 日～2019 年 1 月 20 日 (1 週間利用) 利用期間 5 : 2019 年 3 月 4 日～2019 年 3 月 10 日 (1 週間利用) 利用期間 6 : 2019 年 7 月 8 日～2019 年 7 月 15 日 (1 週間 1 日利用) 利用期間 7 : 2019 年 9 月 30 日～2019 年 10 月 6 日 (1 週間利用) 利用期間 8 : 2019 年 11 月 25 日～2019 年 12 月 1 日 (1 週間利用) 利用期間 9 : 2020 年 1 月 6 日～2020 年 1 月 13 日 (1 週間 1 日間利用) 利用期間 10 : 2020 年 2 月 3 日～2020 年 2 月 9 日 (1 週間利用)</p>
------------------------	--------------------------------	--

その他の 利用施設		特になし。
成果の 概要	<p>実施内容 (字数制限はありませんが400字～800字以内(程度)でお書きください。)</p>	<p>光受容体タンパク質の GAF ドメインの発色団とその近傍のリジンのプロトン化状態の観測を行った。GAF ドメインでは、ϵ-^{13}C,D2 リジンを取り込ませた試料を用いて、温度変化と線形の解析を行い、リジン側鎖の NH の交換速度を調べたところ、溶媒のプロトンとの交換が極めて遅いことが明らかとなった。また AADase では重水素化、選択的リジンϵ-^{13}C 標識、コア部分を残してトリミングされた AADase 発現系構築、試料調製を行い、リジンの観測を試みた。しかし、リジンのプロトン化状態の解析に使用できる NMR 信号は観測されなかった。その他の特異なプロトン化状態である、プロトン化した酸性アミノ酸側鎖については、抗がん剤クリゾチニブが結合する修復酵素タンパク質 MTH1 等を試料に、^{13}C 直接観測による観測法の開発も行い、アスパラギン酸側鎖の pKa の効率の良い観測に成功した。測定法として、^{13}C detection CGCBCO (^{13}C aliphatic decoupling during acquisition)をデザインし、クリゾチニブ結合型で「COOH」形で存在すると示唆される Asp119 の pKa が異常であることが明らかになった。この測定法が有効であったので、GAF ドメインにフィードバックし、発色団近傍の Glu217 の pKa の解析も行った。</p> <p>(研究の過程において、GAF ドメインの発色団のプロトン化状態の解析のために 1D-^{15}N の測定が必要となり、^{15}N コイルが内巻きのクライオプローブが理研になかったため、蛋白質研究所の超高磁場 NMR 共同利用研究課題として、蛋白質研究所にて測定を行った。これは課題の重複申請には当たらないと考えている。)</p>
本課題により得られた成果と当初目標との比較	<p>(字数制限はありませんが400字～800字以内(程度)でお書きください。)</p>	<p>光受容体タンパク質の GAF ドメインの解析ではリジンのプロトン化状態について、予定した測定法で期待通りの成果が得られた。また発色団においては、NH の交換が極めて速く異種核 NMR による感度上昇が使えなかったが、1D-^{15}N を ^{15}N コイルが内巻きのクライオプローブを使用することにより測定に成功し、その化学シフトから脱プロトン化が明らかとなった。AADase では当初の計画した実験方法ではリジンの観測に成功していない。</p> <p>その他の特異なプロトン化状態である、プロトン化した酸性アミノ酸側鎖については、抗がん剤クリゾチニブが結合する修復酵素タンパク質 MTH1 等を試料に、^{13}C 直接観測による観測法の開発も行い、アスパラギン酸側鎖の pKa の効率の良い観測に成功した。測定法として、^{13}C detection CGCBCO (^{13}C aliphatic decoupling during acquisition)をデザインし、クリゾチニブ結合型で「COOH」形で存在すると示唆される Asp119 の側鎖の pKa が異常であることが明らかになった。この測定法が有効であったので、GAF ドメインにフィードバックし、発色団近傍の Glu217 の pKa の解析も行った。</p>
成果発表		<p>【学会発表】</p> <p>(1) 会津貴大、広瀬侑、伊藤隆、三島正規「NMR を用いたシアノバクテリア由来 GAF ドメインの構造解析」第 57 回 NMR 討論会 2018 年 9 月 18 日(月)～9 月 20 日(札幌)</p> <p>(2) 会津貴大、広瀬侑、伊藤隆、三島正規「脱プロトン化状態にある塩基性アミノ酸の NMR による検出」第 8 回日本生物物理学会関東支部会 2019 年 3 月 4 日(月)～3 月 5 日(相模原)</p>

		<p>(3) 小泉太貴, 会津貴大, 伊藤隆, 広瀬侑, 三島正規 “シアノバクテリア由来 GAF ドメインの NMR による構造解析”, 第 58 回 NMR 討論会, 川崎, 2019 年 11 月 7-9 日</p> <p>(4) Taiki Koizumi, Hiroki Nakajima, Yutaka Ito, Masaki Mishima “Direct observation of hydrogen bonds by solution NMR”, 第 57 回日本生物物理学会年会, 宮崎, 2019 年 11 月 24-26 日</p> <p>(5) 小泉太貴、会津貴大、伊藤隆、広瀬侑、永江峰幸、三島正規「シアノバクテリア由来光受容タンパク質 GAF ドメインの立体構造解析」第 58 回日本生物物理学会 9/16-18 オンライン開催</p> <p>(6) Masaki Mishima “NMR studies on the protonation state of cyanobacteriochrome” 第 58 回日本生物物理学会 9/16-18 オンライン開催</p> <p>【論文発表】</p> <p>(1) “Domain selective labeling for NMR studies of multidomain proteins by domain ligation using highly active sortase A.” Aizu T, Suzuki T, Kido A, Nagai K, Kobayashi A, Sugiura R, Ito Y, Mishima M. <i>Biochim Biophys Acta Gen Subj</i>. 2020 Feb;1864(2):129419.</p> <p>(2) “Mechanism of self/nonself-discrimination in Brassica self-incompatibility.” Murase K, Moriwaki Y, Mori T, Liu X, Masaka C, Takada Y, Maesaki R, Mishima M, Fujii S, Hirano Y, Kawabe Z, Nagata K, Terada T, Suzuki G, Watanabe M, Shimizu K, Hakoshima T, Takayama S. <i>Nat Commun</i>. 2020 Oct 1;11(1):4916.</p> <p>(3) “Structural basis of the protochromic green/red photocycle of the chromatic acclimation sensor RcaE.” Nagae T, Unno M, Koizumi T, Miyanoiri Y, Fujisawa T, Masui K, Kamo T, Wada K, Eki T, Ito Y, Hirose Y, Mishima M. <i>Proc Natl Acad Sci U S A</i>. 2021 May 18;118(20):e2024583118.</p>
	<p>今後の展開 (字数制限はありませんが 300 字～600 字以内(程度)でお書きください。)</p>	<p>今後 GAF ドメインでは、ϵ-^{13}C, D2 リジンを取り込ませた試料を用いて、温度変化と線形の解析を行い、リジン側鎖の NH の交換速度を更に詳細に調べる。ダイナミクスに関する情報は、脱プロトン化、プロトン化の意義を考察する上で貴重な知見となる。さらに測定の高難易度の高い AADase(12 量体、分子量 300 kDa)のリジンの観測を行う。重水素化、選択的リジンϵ-^{13}C 標識、コア部分を残したトリミングに加えて、あえて全長を用いた測定にチャレンジしたい(特異な環リジンの環境には全体が必要な可能性もあるため)。天然タンパク質におけるリジンのプロトン化状態の解析は未だ報告がなく、GAF ドメインに加えて AADase でも観測に成功すれば、このような特異なプロトン化状態のリジンの存在を、十分な証拠をもって世界に先駆けて示すことが出来る。また可能であれば、その他の特異なプロトン化状態である、脱プロトン化したアルギニンやプロトン化した酸性アミノ酸側鎖の観測を行う。脱プロトン化アルギニンの観測については、T4 リゾチーム等を試料に、プロトン化した酸性アミノ酸側鎖については、修復タンパク質 MTH1 等を試料に、^{13}C 直接観測による観測法の開発をさらに継続して推進していく。</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>本申請研究で、タンパク質の特異なプロトン化状態を観測する方法の開発に成功し、効率よく明確に観測ができるようになると、現状では曖昧さが残る特異なプロトン化状態の報告例に対して、溶液状態での観測として貴重な判断材料を提供できるようになる。これにより、タンパク質の構造形成、リガンドの分子認識に関する理解が進む。ひいては、創薬における SBDD の効率、正確性の向上などにつながると期待できる。また理学的観点からは、プロトン化状態の解釈が曖昧であったために、詳細が不明であった種々の酵素の反応機構や、光受容体における極大吸収波長のチューニング機構の解明に大きな貢献をすることが期待できる。</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>NMR 装置はいつも整備された状況にあります。また測定に際して、対応してくださる担当者の方々には大変お世話になっており、とても気持ち良く利用させて頂いています。稀に NMR 装置にトラブルが発生した際にも、復旧、修理等も極めて迅速です。深く感謝申し上げます。またリモートで測定も試験的には始まり、幸いにもリモートでの測定も行わせていただきました。ソフトウェアの若干のタイムラグが気になりますが、概ね便利でした。以下、希望を述べます。クライオプローブ全盛ですので、プローブ交換は大変だと思いますが、もう少しプローブの種類が多いと良いと思います。¹³C 内巻き(DCH 等)の数は1本では少ないと思いますし、³¹P,¹⁵N,¹³C,¹H が使える QCI, ¹⁵N の観測ができるクライオプローブ (例えば BBO) があると良いと思います。</p>
<p>今後の NMR 共用プラットフォームに対する期待</p>	<p>コストや汎用性の観点から大学等では設置が困難な、高磁場のマグネットや、DCH のような特殊なプローブを利用することができ、これらが研究の進展を促進しています。むしろ、これらなしでは研究が不可能といえる状況です。是非とも NMR 共用プラットフォームの継続的な運営、外部利用のためのマシンタイムの提供をお願い致します。</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>	<p>特になし。</p>