

実施課題名: 高磁場NMR, MagRO, 特殊ラベル化による大型タンパク質p120GAPのNMR高速測定・解析

【背景】溶液NMR法では蛋白質などの分子を原子レベルでの構造・運動性に関する情報を直接的に得ることが可能な技術である。近年の安定同位体修飾、NMR測定、解析などの技術的向上により、分子量10~20kDa程度の小分子では数週間程度で精密な立体構造モデルが得られる時代になった。しかしながら40kDaクラスの蛋白質を従来法で挑む場合、測定・解析期間は優に半年を超えるのが実情である。本研究課題においてはがん関連タンパク質と相互作用するp120GAPの**特殊同位体ラベル体**と**測定・解析技術の高度化**を図りつつ、帰属されたデータから分子生物学的知見を得ることを目的とする。

【実施内容】本課題では ^2H , ^{13}C , ^{15}N で**均一標識**したp120GAP(DCN-GAP)とIle,Val,Leu,Metメチル基のみを観測しやすくした特殊ラベル体p120GAP(Ile,Val,Leu,Metのメチル基のみ $^1\text{H}/^{13}\text{C}$, その他の主鎖、側鎖は $^2\text{H}/^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ 標識だが、一部が $^2\text{H}/^{12}\text{C}$:ILVM-GAP)、およびHis,Lysのみ主鎖 ^{15}N ラベルしたH-GAP,K-GAPの4つのサンプルを産総研竹内博士らが作成、理研にて多次元測定を全て非線型サンプリング法(NUS)により高速測定し、40kDaレベルの蛋白質における連鎖帰属、側鎖メチル基帰属を半自動解析により実施した。直面した問題はサンプル寿命が1月程度であり、重水培養発現によるアミド基の重水素置換が不十分、連鎖帰属と側鎖帰属が独立に進行させる必要があり、新規帰属戦略を立案する必要があった。昨年10月より本課題測定を開始、12月に必要な測定は完了した。本年3月に解析を終え80%以上の主鎖・側鎖信号の帰属を達成、新しい特殊同位体への対応(**Graph_Robot+isotope.lib**)、4次元NMRの解析効率を向上させる技術(**Double-Sync-Jump**)を開発した。P120-GAPのX線構造は得られているため、NOESY系の測定では距離情報を推定し、重水素化同位体効果を考慮するisotope.lib機能を加えた**特殊ラベル体での信号シミュレーション**を高速実行するGraph_Robotによる半自動解析を行った。新規方法では同位体ラベルの性質上、Met残基が ^{15}N ラベルされていないため全測定で観測されない、K-,H-GAPによるHis, Lys信号位置特定、Ile,Val残基では ^{13}C βの信号が見えないことを利用し、**Double-Sync-Jump**により4次元NMRデータは帰属の効率を大規模に向上させた。新規技術つは年度内に国際誌あるいは国際学会で発表する予定であり、帰属された信号による分子生物学的実験は竹内らが今後おこなっていく予定である。

• Fig.1

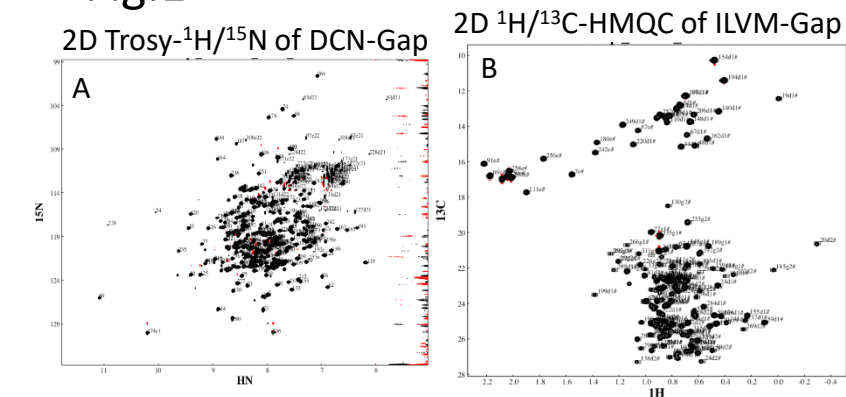


Fig.1 A. $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ 信号帰属 278残基(86%)
B. $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ メチル基信号帰属 116個(81%)

• Fig.2

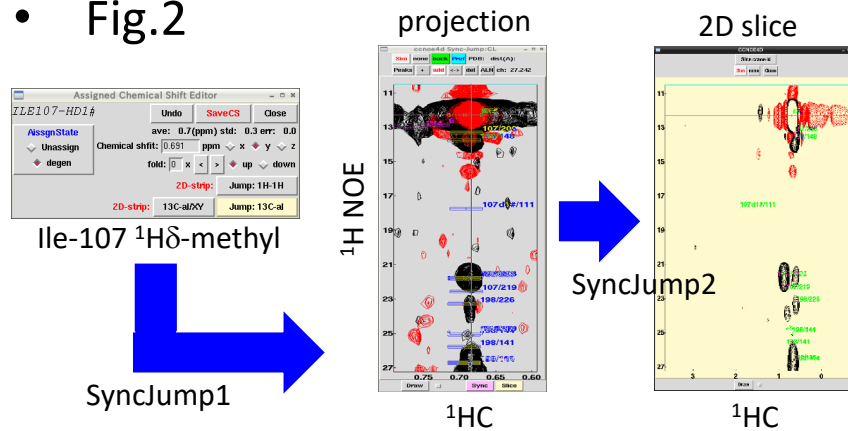


Fig.2 開発された **double-sync-jump** 機能の事例
ILVM-GAP 4D $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -HMQC-NOESY- $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -HMQC

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	PF20-01-R-030		
利用課題名	高磁場 NMR, MagRO, 特殊ラベル化による大型タンパク質 p120GAP の NMR 高速測定・解析		
実施機関名	産業技術総合研究所		
実施部署名	細胞分子工学研究部門 動的創薬モダリティ研究グループ		
実施責任者管理職名・氏名	職名	研究グループ長	氏名 竹内 恒
実施部署所在地	〒135-0064 東京都江東区青海 2 丁目 3-2 6		
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>溶液 NMR 法ではタンパク質などの生体高分子についてその極めて高い分解能を利用することで観測対象となる原子のほぼ全ての信号を一意に決定することが可能であり、分光学的極めて特殊な技術である。特に残基あるいは原子団ごとの化学シフト情報を得ることで、原子間距離情報などによる構造モデル構築ばかりではなく、原子レベルでの運動性あるいは薬剤相互作用に関する情報を直接的に得ることが可能となる。近年の安定同位体ラベル法、NMR 測定法、自動解析と計算機の高速化、NMR 装置の高磁場化など様々な技術的向上により、分子量 10～20kDa 程度の小分子のタンパク質ならば数週間程度で正確な立体構造モデルと化学シフト情報が得られる時代になった。しかしながら例えば 40kDa クラスのタンパク質の信号解析で化学シフト情報を得ることを従来法で挑む場合は例え立体構造が既知であっても測定・解析期間は優に半年を超えるのが実情である。本研究課題においてはがん関連タンパク質と相互作用する p120GAP について、均一 $^2\text{H}^{15}\text{N}^{13}\text{C}$ 標識と ILV メチル $^1\text{H}^{13}\text{C}$ 標識を組み合わせた特殊同位体ラベル体を効果的に用いた測定・解析技術の高度化・高速化を図りつつ、帰属されたデータから分子生物学的知見を得ることを目的とする。</p>		
利用実施時期、及び期間	2020 年 10 月 1 日～2021 年 3 月 20 日 総利用日数：20 日 <input checked="" type="checkbox"/> 当初計画どおり・ <input type="checkbox"/> 当初計画変更 (変更理由)		
利用施設 理化学研究 所	NMR 装置 (該当部分) ○)	利用装置① ・() 溶液 600MHz、() 溶液 700MHz、() 溶液 800MHz、 (○) 溶液 900MHz、() 固体 700MHz、() 固体 900MHz 利用期間 1：2020 年 10 月 7 日～2020 年 10 月 9 日 利用期間 2：2020 年 10 月 15 日～2020 年 10 月 20 日	
		利用装置②	

		<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 : 2020 年 12 月 7 日~2020 年 12 月 16 日 利用期間 2 : 2021 年 2 月 3 日~2021 年 2 月 8 日</p>
その他の 利用施設		
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>本研究課題では ^2H, ^{13}C, ^{15}N で均一標識した p120GAP (DCN-GAP) と Ile, Val, Leu, Met のメチル基のみを観測しやすくした特殊ラベル体 p120GAP (Ile, Val, Leu, Met のメチル基のみ $^1\text{H}/^{13}\text{C}$, その他の主鎖、側鎖は $^2\text{H}^{15}\text{N}^{13}\text{C}$ 標識だが、一部が $^2\text{H}/^{12}\text{C}$: ILVM-GAP), および His, Lys のみ主鎖 ^{15}N ラベルした H-GAP, K-GAP の 4 つのサンプルを作成し、多次元測定を全て非線型サンプリング法 (NUS) により高速測定し、通常極めて困難な 40kDa レベルの蛋白質における連鎖帰属、側鎖メチル基帰属を半自動解析により実施した。直面した問題はサンプル寿命が 1 月程度であり、重水培養発現によるアミド基の重水素置換が不十分、連鎖帰属と側鎖帰属が独立に進行する必要であり、特殊ラベルにおけるそれぞれのサイトにおける ^{13}C 標識の割合などにも対応した新規帰属戦略を提案する必要があるがあった。昨年 10 月より本課題の測定を開始、12 月に必要な測定は完了した。本年 3 月に解析を終え 80%以上の主鎖・側鎖信号の帰属を達成、新しい特殊同位体への対応 (Graph_Robot+isotope. lib), 4 次元 NMR の解析効率を向上させる技術 (Double-Sync-Jump) を理研担当者が開発し、本研究に活用させていただいた。</p>
	<p>本課題により得られた成果と当初目標との比較 (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>本課題を開始する以前より、特殊ラベルされた大型タンパク質解析を想定した試験測定は行っていた。本測定では ILVM-, DCN-GAP について ^{13}C による化学シフト異方性緩和を軽減するため、低磁場装置 (600MHz) で主鎖系の測定: HN(CO)CACB, HNCB, HN(CA)CO を、高磁場装置 (900MHz) ではより Trosy 効果を期待できる測定: HNCACB, HNCA, ^{15}N-edited NOESY, HN(NCA)NH, (H)N(NCA)NH (全て 3D-Torsy), 4D-HMQC (^{13}C)-NOESY-HMQC (^{13}C) などを測定した。3D, 4D 測定は全て非線型サンプリング法 (NUS) を適用し、実に多数の測定を短期間に完了することができた。NUS データの復元には IST あるいは IRLS を用い、ノイズ・偽信号の少ないデータを得た。半自動帰属には MagRO ver. 3 (理研・小林ら) を用い、モジュールの一つ: 磁化移動シミュレータ Graph_Robot に重水素同位体シフト効果を取り入れる改良をおこなっていただいている。実際には大腸菌発現によって得られた高度重水素化 ILVM-, DCN-GAP の HN の 10%以上の残基がおそらく DN のままであり連鎖帰属に苦戦を強いられた。また、3D ^{15}N-edited NOESY や 3D ^{13}C-edited NOESY では主鎖: メチル基帰属との連携は難航した。このためラベルの特性を見直したところ、特殊ラベルを施した ILVM-GAP における Ile, Val では ^{13}C の信号が極めて弱いことを考慮する、Met が ^{15}N ラベルされていないことを利用して Met 残基の Met 残基を特定する、His-, K-GAP の選択ラベル情報を使う、4D データ解析のために新規開発した機能 double-sync-jump を活用するなどのデータ取得と解釈の最適化を行うことで、連鎖性が断片的であっても 80%近い信頼できる主鎖・メチル基帰属を達成することに成功した。</p>

成果発表	国際誌、国際学会へ、2021 年度内に発表の予定
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。)	本課題は想定していたより重水素交換されていない残基が固い 2 次構造部位に存在するため、非常に分離の良いデータであるにも関わらず連鎖帰属の難易度を上げていた。更に、原因は確定できていないが ILVM-, DCN-GAP 間での $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ 信号が僅かにずれてしまうという現象に悩まされた。またメチル基間の NOE 解析は良好である一方、その代償として主鎖をつなぐ原子団が $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ ラベルされていないことによる主鎖・メチル基帰属の連携が難しいケースであった。例えば X 線構造座標があっても解析に苦戦を強いられた理由である。しかし、本課題によって強化された新機能・新規解析戦略によって克服されたことにより今後も同様のサンプルへの応用が可能と言える。ここで得られたデータ群は貴重な事例であり、半自動からさらなる高度な自動化ルーチン開発に展開していくものと期待できる。また帰属された信号を活用した分子間相互作用実験、運動性に関する NMR 実験を予定しており、それによる分子生物学研究での展開も期待できるため、これらをまとめた成果は国際誌や国際学会での発表を予定している。
社会・経済への波及効果の見通し (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。)	p120GAP の分子量は分子生物学者の視点からはたかだか 40kDa であるが NMR 学者からの視点ではこのレベルでの主鎖連鎖帰属、メチル基帰属を半自動的に実行することは容易ではない。高度重水素化サンプル作成の低コスト化も重要である。本研究で開発した技術が普及すれば 20kDa 程度のタンパク質でも特殊ラベルして NMR による高速測定・解析することも経済的に意味が出てくる。また、本課題で多用した NUS は適正に用いることで短寿命のサンプル解析についても優位性を見出せたと言える。理研担当者により開発された MagRO による新機能は特殊同位体も含め複雑で多数のスペクトルデータを効率よく管理でき、手作業では不可能とも思える解析を強く支援できるようになった。これらツールと解析戦略が論文化され公開されれば社会的インパクトは極めて大きい。
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	本研究においては、極めて挑戦的な課題である 40kDa レベルの蛋白質における連鎖帰属、側鎖メチル基帰属を半自動解析により実施した。その際、NMR 共用プラットフォームで管理する NMR 装置を利用させていただくことで、必ずしも寿命が長くない今回のようなサンプルについても、多様な磁場における高感度かつ高速な測定を実現頂いた。これは、NMR 共用プラットフォーム事業が無くては実現できなかったものであり、この場を借りて理研担当者、そしてそのような研究を可能にいただいた NMR 共用プラットフォーム事業とそれにかかわる関係者の皆様に感謝申し上げます(NMR 測定は理研横浜で行った)。また、測定および解析において、理研担当者に全面的な協力をいただき、驚くべき速度で、解析を進めてることが出来た。その際、MagRO ver. 3 を利用させていただくことで、各サイトにおいてラベル化率が異なるという特殊なサンプルへの対応が可能になった。その際、最新のモジュールの適用や必要に応じた改良を行っていただいた結果、80%近い信頼できる主鎖・メチル基帰属を初めて達成することが出来たように思う。これは、MagRO ver. 3 が、

	<p>完全に国産の NMR 解析ソフトであったことが大きい。よって、本プログラムスイートは日本の NMR の国際競争力を示す重要な研究資産と考える。ここで理研担当者とともに確立した技術は、NMR 解析にボトルネックの一つである帰属作業の効率化と負担軽減を実現する基盤的な技術であり、その応用範囲が広い。そのため、本共同利用研究は、利用者のニーズと NMR 共用プラットフォームの技術力がマッチすることで大きな波及効果を生む技術発展を誘起することが出来ることを示す重要な事例ではないかと考える。</p>
<p>今後の NMR 共用プラットフォームに対する期待</p>	<p>本研究がコロナ禍という極めて制限の強い特殊な環境下で行われたにも拘らず重要な成果を得ることが出来たのは、そのような中でも研究インフラの維持、整備に力を尽くしてこられた NMR 共用プラットフォーム事業とそれにかかわる関係者の皆様の努力の賜物であり、感謝申し上げます。今後も、このような共用研究事業が全国的に展開を見せながら、継続的に行われることに期待をしたい。特に測定や解析を全面的に進めていただいた理研担当者には、NMR 共用プラットフォームの枠組みの中で、NMR 解析技術の発展と利用者のニーズとのマッチングに心を砕いて行っていただいた。NMR という極めて情報量が多く、解釈に多くの知識と経験を必要とする技術が、利用者にとってより使いやすくなるためには、エキスパートによる介助が不可欠である。また、そのような介助を一回行うことで、次回からは同様の作業について助けを受ける方、施す側の双方の effort の大きな削減が可能になる。よって、本事業は NMR 研究全体の効率化にも繋がるものである。今後も人的・物的に貴重な NMR 共用プラットフォームの貢献に期待をしたい。</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>(上記の項目以外でご意見等お願いします。)</p>