

高分子量タンパク質複合体立体構造解析技術開発

広島大学

楯 真一

1. 成果の概要 (1~2 ページ)

実施内容

(※実際に行った作業の概要について記載してください。)

■TROSY の異方性シフトから高分子量蛋白質の分子形態を計測する技術の構築と応用

弱い分子配向状態に置かれたタンパク質の TROSY シグナルは、等方的環境下で観測されたシグナル位置からずれるが、この変化量は観測された ^{15}N 核スピンを含む NH 結合ベクトルの磁場に対する配向を反映するため大きな振幅をもつ分子形態変化の観測に利用できる。TROSY シグナルは、高磁場になるほどシグナルの線幅が先鋭になるために 900MHz の装置で配向依存的に誘導される TROSY シグナル変化を観測して、研究室の 700MHz の計測結果と比較した。

分子配向依存的な TROSY シフト変化は、化学シフト異方性効果と核スピンの双極子間相互作用による残余双極子効果の二つの効果により誘導される。観測磁場強度が大きくなると化学シフト異方性効果により誘導される TROSY シフト変化は大きくなる。一方で、残余双極子効果は磁場依存性を示さないため、残余双極子効果が原因となる TROSY シフト変化量は磁場依存性を示さない。この結果、磁場強度が強くなることによる化学シフト異方性効果の増大は、分子配向依存的な TROSY シフト変化量を小さくする。しかし、TROSY シグナルの線幅は観測磁場強度が上がると先鋭化するために、分子配向が誘導する TROSY シフト変化量が高磁場下で減じても、シグナルが先鋭化するために観測精度が向上することが期待される。シミュレーションからは、900MHz での観測が観測されるシグナルの線幅に対する、分子配向による TROSY シフト変化の割合は最大になる。すなわち、900MHz での測定が TROSY シフト変化から分子配向を決定するには最適な条件であると予測される。

実際に計測した結果では、900MHz での測定結果と研究室の 700MHz での結果を比較したところ、計測された配向テンソル値の精度には統計的に有意な差は観測されなかった。ただし、この実験では分子量が小さなユビキチンを用いたため、分子量によるシグナルの広幅化が十分に先鋭であるために TROSY によるシグナル線形の先鋭化の効果が顕著でないといえる。

この観測結果により、研究室の 700MHz で計測されるデータで十分な精度の分子配向が決定できることが確認できたため、その後の分子形態変化解析は研究室の NMR を用いて進めた。

■ T_2 緩和分散法を用いた、変異によるタンパク質化合物複合体ダイナミクス変化と酵素機能変調の相関解析

T_2 緩和分散法は、msec 時間域のタンパク質の構造ダイナミクスを定量的に観測することができる。二種類の観測磁場で観測する T_2 緩和分散データを用いる事で、構造ダイナミクスにあるタンパク質の励起構造(過渡的に形成される高エネルギー構造)の存在率と、励起構造へ遷移する頻

度(構造遷移速度)を計測することができる。理研の保有する 600MHz/900MHz の 2 台の装置を利用して ^{15}N 核の T_2 緩和分散を測定することにより酵素 DHFR の msec 時間域での構造ダイナミクスを解析した。

私の研究室では、DHFR に対するアミノ酸変異のその酵素反応に対する影響を系統的に解析している。その過程で見つかった活性部位から離れた残基に対するアミノ酸置換が msec 域における DHFR の構造ダイナミクスを促進することを見いだした。

この時間域における DHFR の構造ダイナミクスは酵素反応を促進すると考えられていたが、私達が見いだしたアミノ酸変異体は明らかな酵素活性の低下を示す。この結果は、DHFR の msec における構造ダイナミクスが必ずしも DHFR の酵素活性に関与するものではなく、大きな振幅を持つ構造をとまなうこの時間域での構造ダイナミクスはむしろ酵素反応阻害的に働くことを明らかにした。このことは逆に、酵素反応制御は特定の構造の状態での局所の速い時間域での構造ダイナミクスが規定していることを示す。

本課題により得られた成果、当初目標と結果との比較

(※本課題実施の結果得られた成果および当初目標に対する達成度などについて記載してください。)

分子配向試料を用いた TROSY による分子形態計測解析では、理論的にわずかな計測精度の向上が期待された。今回の実証実験により、分子配向テンソル値の計測精度の向上は解析の質を大きく左右するものではないことが分かった。しかし、高磁場における高分子量蛋白質の TROSY シグナルに対する先鋭化効果と、スペクトル域の拡大によるシグナルの重なりによる低減は高分子量蛋白質のシグナル位置の正確な計測に必要である。100kDa を越えるタンパク質での応用の場合には、異方性スピン効果というよりは、高磁場測定によるスペクトル分解能の向上というより直接的な効果が分子配向テンソル決定の精度向上につながるということが明らかになった。十分に期待していた成果が得られた。

スピン緩和分散計測については、予想していたのとは反対の結果が得られたため、より深いタンパク質の構造動態と機能との相関について考察する足がかりが得られた。この解析には、異なる磁場で同定に安定な分光器を利用する必要があり、理研の施設の利用が不可欠であった。計画段階では先行研究の成果を追認するような成果しか期待していなかったため、今回の測定で得られた成果は期待以上である。

今後の展開、課題

(※本課題の結果を踏まえた今後の展開方針および目的達成に向けた今後の課題などについて記載してください。)

構造があるタンパク質で進めて来た上記研究成果の上に、天然変性領域を含むタンパク質に対して新たな NMR の応用研究を展開する。

2. 利用における感想(改善要望等を含む)

(※本施設を利用して良かった点、改善してほしい点、提案事項など、施設利用の感想を記載してください。)

予定していた装置が、利用直前に故障するなどのトラブルもあったが理研スタッフが臨機応変に他の装置利用をアレンジしてくれたため計画どおり測定を実施できた。特に緩和時間の実験については、光感受性の基質をもつタンパク質を対象としていたため経時的に僅かずつ緩和時間が変化することも分かっていたので、試料が日持ちしないため大変に助かった。

装置の状態についても、理研スタッフは気軽に相談にのってくれたため、現場での測定パラメーターの変更やパルスプログラムの変更などを装置の状態に応じて行うことができ、良好なデータを集積できたことはとても良かった。

3. 利用周辺環境に関する希望

ゲストハウスをキャンパス内に設けていただくと、1 週間のマシンタイムで利用中の実験の利便性が上がる。

4. 今後の利用予定

研究室の装置も最新型に更新できたことと、研究テーマが、より細胞を使った実験との融合の方向に向かっているために理研 NMR ファシリティーを利用する頻度は減る。

5. 今後期待するその他のサービス

若手研究者に対する NMR の先端利用の講習会(実機操作)があると、NMR を利用する若手研究者が増えるかもしれない。NMR 構造生物学の生命科学研究全体における注目度はかつてほど高くはないが、一方で、NMR を利用する解析研究は専門家以外でも利用しやすい状況になっている。専門家ではない研究者が、先行論文を参考にして NMR を利用することで精度の高い情報を得て研究の質を向上することが容易にできる。NMR の専門家がいないうるグループの若手研究者が、研究目的に応じて適切に NMR を利用することができるようにするための技術講習は必要かと思う。

6. その他

(上記の項目以外でご意見等お願いします。)

特に無し。

7. 利用実施時期及び期間

2015 年 4 月 1 日 ~ 2016 年 7 月 31 日

当初計画どおり

8. 利用研究基盤

溶液 700MHz 2016 年 07 月 07 日 9 時~2016 年 07 月 14 日 9 時 (7 日間利用)