

第 13 回 若手 NMR 研究会 参加報告

鳥居 実恵

工学系技術支援室 分析・物質技術系

はじめに

工学研究科では NMR 装置を複数台所有しており、技術職員が維持管理を行っている。若手 NMR 研究会は多くの若手研究者に対して、NMR に関する知識を吸収し、研究者同士の交流を通してそれぞれの研究活動に繋げていく事を目的として行われている研究会である。今回 NMR の基礎を学ぶことと、どのような応用方法があるのかその知見を深める目的で参加した。今年度は 2012 年 7 月 19 日から 21 日までの開催で、「生体分子の構造及び相互作用」をテーマに主にタンパク質分野の第一線でご活躍されている先生方の講演を聴講させていただいた。その主な内容について報告する。

1. プログラム

本研究会の講義日程は以下の通りであった。

表 1. 講義日程

日程	内容
1 日目	講義 1 「構造や相互作用の解析に用いられる様々な NMR 測定法の原理」
2 日目	講義 2 「NMR 解析に用いるタンパク質試料の調整技術」 講義 3 「高分子タンパク質の NMR 解析」 講義 4 「NMR によるタンパク質の構造・相互作用研究のための一工夫」 講義 5 「NMR による膜タンパク質の機能解明」 講義 6 「タンパク質の固体 NMR—今できる事、できない事—」
3 日目	講義 7 「NMR のハードウェアと最新の技術」 講義 8 「大きな運動性に起因するサンプリング問題（結晶解析）と意味なし平均問題（NMR）の解決に向けた取り組み」

2. 講義内容

講義 1 「構造や相互作用の解析に用いられる様々な NMR 測定法の原理」 池上貴久先生（阪大）

多次元 NMR 測定では主に空間上の距離か結合上の距離を見ているが、j カップリングした 2 スピン系でのエネルギー準位の説明や実験領域からみた展開のしかたをパルスシーケンスに沿って講義された。NMR の基礎部分で、条件を変えることで多様な測定ができ選択的な情報が得られるようになる。これを踏まえると自身でもパルスシーケンスを組むことができることがわかった。

講義 2 「NMR 解析に用いるタンパク質試料の調整技術」 相沢智康先生（北大）

タンパク質の NMR を測定するに当たって重要なのは、試料の調製法、NMR の測定手法、解析手法の 3 段階にある。この講義ではタンパク質試料の調整方法に関しての技術が講演された。

タンパク質の基本構造はアミノ酸が結合し、ペプチドさらにタンパク質へと大きさを変えていく。通常の一次元測定では信号の重なり合いがはげしい為、帰属の限界がある。そこで試料に安定同位体標識を行い、より測定及び解析を簡便にしている。安定同位体をタンパク質に組み込むには、化学合成（固相合成）、遺伝子組み換え発現、無細胞系が主たる方法である。

化学合成のメリットは、選択標識が自在である事、非天然アミノ酸も導入可能である事、逆にデメリットは、高分子量のタンパクには適さないこと、またアミノ酸原料が高価であることである。遺伝子組み換え法では、高分子のタンパク質でも合成が可能でラベル化コストが低いのが利点であるが、適切な宿主選択が必要であり選択標識にも工夫が必要である。

そこで遺伝子組み換え手法についてデータベースを利用して統計をみたところ、遺伝子組み換え発現の宿主で最も利用されているのは大腸菌で、その時の発現ベクターは PET と呼ばれるものが多かった。ただし NMR データをターゲットにした場合、ベクターは別のものを使っている事も多いという統計が出たりした。また、実際の事例としてメタノール資化酵母を用いた発現系の例や、大腸菌を用いた発現系の例が示された。

講義3「高分子タンパク質の NMR 解析」 梶尾尚哉先生（理研）

創薬ターゲットとなるタンパク質は、分子量 20000 以上の高分子が多く NMR による立体解析は困難を極めているが、適用例は確実に増えている。この講義では、試料調整手法として無細胞タンパク質合成系を用いた標識法を中心に NMR 解析が講演された。無細胞タンパク質発現系は、大腸菌の中身だけを取り出したものを培養する。特徴としては、化合物等の追加が容易であり細胞毒性タンパク質の合成が可能、クローニングが不要、実験操作の規格化が可能である。

事例として、VRK1 というタンパク質の解析をどのように行ったかが講義された。その際有効だったのは、選択的にメチル基を重水素化したメチオニンを組み込むと、かなり解析がしやすいという知見が得られた。

講義4「NMR によるタンパク質の構造・相互作用研究のための一工夫」 小橋川敬博先生（北大）

脂質二重膜の膜モデルについては、ミセル、バイセル、リポソームなどがあるが、ミセル、バイセルは、界面活性剤を混ぜて作成するため、対象タンパク質を変質させる場合がある。また、リポソームは非水溶性であったりして、どれにおいても問題点がある。今回、バイセルの側面に MSP というたんぱく質を巻き込んだ形をしたナノディスクを対象に、脂質-タンパク質における相互作用の解析を行った。

NMR では、ナノディスクをラベル化したタンパクへ滴定したものを、測定により MSP の結合部位の推定を行った。分子量が大きいタンパク質ほど界面領域の立体構造を決定する原子の距離情報を得る事は難しい。常磁性ランタノイドをタグとしてタンパク質に結合させ、化学シフトの変化を見ることで距離情報を得る事が出来る。ナノディスクは、膜モデルとしても相互作用の解析に最も適していると考えている。その他、大分子量マルチドメインタンパク質の解析のためのポイントが講演された。

講義5「NMR による膜タンパク質の機能解明」 嶋田一夫先生（東大）

創薬の標的として、膜たんぱく質（受容体、イオンチャンネル）の研究が大変盛んである。適切な調整法、測定法、解析法など、NMR によるタンパク質の構造解析には、個性やセンス、アイディ

アが問われる為、研究者の腕のみせどころである。嶋田研究室では、巨大タンパクの結合界面の解析を行っており、今回は G-タンパク共役受容体(GPCR)を例にとり、開発された技術とそこからわかったことが講義された。具体的には、転移交差飽和法という手法を用いて、 ^1H - ^{13}C HMQC 測定によりケモカインの1つである SDF-1 とその受容体 CXCR4 の相互作用部位の同定を行った。更に、AMD3100 という阻害物質を添加し、同様に転移交差飽和法を用いて観測したところ、SDF-1 のコア領域は完全には阻害されず、N 末端と効率的に競合することがわかった。また、コア領域は細胞外で、N 末端は膜貫通領域で、それぞれ結合する2段階の結合モデルが得られた。他にも $\beta_2\text{AR}$ というタンパク質の構造解析に関して、NMR 測定を行い、インバース構造・ニュートラル構造・パーシャル構造・フルアゴニスト構造と徐々に化学シフトしている事がわかり、4段階の構造をとっていることが解明された。

講義6「タンパク質の固体 NMR—今できる事、できない事—」松木陽先生（阪大）

固体 NMR においては、化学シフト異方性相互作用及び双極子相互作用、四極子相互作用が強く出る。スピン量子数 1/2 の核においては、CP/MAS 法が用いられることが多い。またスピン量子数 1/2 以上の核では、MQ-MAS 法が用いられている。タンパク質の固体 NMR で現在解析可能なものとしては、結晶タンパク質、アミロイド繊維、膜タンパク、レセプタ結合小分子があり、それぞれ事例を交えて講義された。それと比較して、現在でも測定が困難なものとしては、結晶にならない、あるいは運動平均もないタンパク質系であったり、感度が大変低いものであったりする。こういった物質に対しては、「DNP(動的核分極)という手法」の紹介があった。この手法はマイクロ波を照射して電子から核へ電極移動する事、かつ液体ヘリウムで極低温にする事で、感度を飛躍的に向上させることができる。マイクロ波の条件や極低温の条件、それに耐えうるプローブの開発等課題はあるが、感度が向上すれば超微弱な NMR 信号も観測する事ができ、巨大分子のタンパク質も測定が容易になると考えられる。日々の技術革新が熱く語られた。

講義7「NMR のハードウェアと最新の技術」佐藤一先生（ブルカー・バイオスピン）

ブルカー・バイオスピン株式会社は、NMR 装置メーカーとして、トップシェアを誇る。重要な技術である磁石の高性能化の歴史の紹介、デジタル面からの具体的な装置の構成などについて説明があった。また、NMR の技術開発や工夫（低温測定がより簡便に行えるプローブの開発、高塩濃度のサンプルでのチューニングにはシェイプドチューブを用いること、三次元 NMR のデータの取得の仕方によるスペクトルの感度の違い等）の説明があった。なかでも定量分析については、ハードウェアを改造または追加が必要ではあるが、基準物質を添加することなく電気信号を基準物質として与える方法で、最近注目を集めている。これが実用化すれば、論文データとして定量 NMR が用いられるようになり、NMR の利用が更に拡大する事になると思われる。非常に興味深い内容であった。

講義8「大きな運動性に起因するサンプリング問題（結晶解析）と意味なし平均問題（NMR）の解決に向けた取り組み」神田大輔先生（九大）

通常、リガンドとタンパク質の相互作用は、鍵と鍵穴というように表現されることが多い。しかし、結合状態においてリガンドの運動性が大きかったり、タンパク質のリガンドに対する特異性が広がったりすると、NMR 測定で得られる結晶の距離をとって平均化しても、本来の構造とは異なるものになったりするような問題が出てくる（意味なし平均問題と便宜的に呼んでいる）。この問題

について、Tom20 タンパク質を例にとり、解決に向けたアプローチ法などが講義された。Tom20 は 1000 種ものタンパク質を認識して、ミトコンドリア内部へ輸送しているのだが、どうやって認識しているのか、試行錯誤を経て結合が強く Tom20 の動きを止めないようなリガンドをデザインし、NMR 測定を行った。その結果、6 残基からなるコンセンサス配列が明らかになった。また、Tom20 の広い特異性認識を可能にする分子メカニズムとして、NMR の緩和時間解析を用いた。これにより運動性を調べる事ができ、複数の結合状態を確認する事ができた。意味なし平均問題については、NOESY 測定の再検討が必要であるが、今後が期待されるところである。

おわりに

若手NMR研究会の参加は、今回が初めてであり、講義テーマであるタンパク質については、ほとんど専門外であったため、基礎知識（標識の方法、培養に何を選定するか）から最新の研究成果（TROSY-HSQC等の3次元NMRなど）まで、理解を深める事ができ大変有益であった。

謝辞

本研究会の講義を担当していただいた先生方並びに企画・運営していただいた皆様に心より感謝いたします。また、今回の研究会への参加を快く承諾いただきました本技術支援室の関係者の皆様に厚くお礼申し上げます。

[参考文献] 第13回若手NMR研究会講義資料