

樹脂担体固定化技術を用いた NMR による膜タンパク質の立体構造解析法の開発

## Gel-phase NMR for membrane protein

代表研究者 奈良先端科学技術大学院大学 児嶋長次郎 Nara Institute of  
Science and Technology Chojiro KOJIMA

共同研究者 奈良先端科学技術大学院大学 三島正規 Nara Institute of  
Science and Technology Masaki MISHIMA

NMR is one of the most powerful tools to determine protein structure, function, and its binding interface in solution. In structural genomics studies, the solubility and purification of overproduced proteins are serious problems. Here we succeeded the NMR analysis of a glutathione-S-transferase (GST) tagged small protein, ubiquitin, without removing tag, which enables the easier purification and the higher solubility of proteins. The  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC spectra of GST-tagged human ubiquitin were measured in solution and also on the glutathione sepharose column resin where the target protein was immobilized. The measured two spectra were different in linewidth, however, quite similar in resonance position. Site specific interaction with yeast ubiquitin hydrolase was not inhibited by the GST-tagging as well as the immobilization on resin. These results indicated that the ubiquitin portion of GST-ubiquitin retained the same conformation as the isolated ubiquitin, and that its motion was independent of that of GST. This technique will be applicable for hardly soluble proteins that tend to form aggregates, such as membrane protein.

### 研究目的

レジン上に固定した化合物を NMR によって解析する Gel-phase NMR 法は、固相合成において反応生成物がレジンからの開裂により不安定になる系での構造決定や、反応生成物をレジンから開裂させ解析する 'cleave and analyze' 法で多く利用される。

この Gel-phase NMR 法は、溶液 NMR の溶媒条件を適切なバッファーで膨潤させた gel に変更したものであり、それ以外は溶液 NMR の測定と何ら変わるところが無い。しかし固体/溶液という不均一系では、個々の分子が受ける静磁場の影響に均一性を求めることは難しく、特に<sup>1</sup>H に関しては NMR シグナルの線幅の顕著な増大 (<sup>1</sup>H;  $\geq 100\sim 300\text{Hz}$ ) が生じ、<sup>13</sup>C、<sup>19</sup>F、<sup>31</sup>P 等が主に観測されてきた。このため、<sup>1</sup>H が重要な役割を果たすタンパク質の解析に Gel-phase NMR 法を応用する事は難しいものと考えられてきた。しかし、Gel-phase NMR 法をタンパク質等の生体高分子に応用できれば、単純な溶液状態では測定出来なかった膜タンパク質などの難溶性・会合性タンパク質の溶液 NMR による解析が可能になる。

本研究では Gel-phase におけるタンパク質の NMR 測定系の確立を目指し、レジンを吸着条件下でのタンパク質の<sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HSQC を用いて測定条件の検討を行った。また吸着状態でのタンパク質が溶液状態とどの様に異なるのか、物性（運動性、化学シフト）および活性（特異的な分子間相互作用）から見積もることとした。

## 研究経過と考察

### 1. 試料

本研究では、GST 融合ヒト由来ユビキチン (GST-Ub) を用いた。GST および Ub 間のリンカー長はアミノ酸残基数 10、15、20、25 および 30 とした。これらリンカー長の異なる 5 種類の GST 融合 Ub を <sup>15</sup>N 均一標識化タンパクとして大腸菌内で発現させ精製し、溶液条件およびレジンを固定条件で<sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HSQC を測定した。Buffer 条件は 10 mM Phosphate (pH6.5)、50 mM KCl である。溶液条件においてそのサンプル濃度は 1.3 mM であり、レジンを固定化条件では 0.8 mM である。レジンは Glutathione Sepharose 4 Fast Flow (Pharmacia) を使用した。また、レジン上でのタンパク質間相互作用検出の可否を検討するため、Yeast Ubiquitin Hydrolase 1 (YUH1) を大腸菌内で発現させ、精製した。

### 2. レジン上でのユビキチンの<sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HSQC スペクトル

GST 融合ヒト由来 Ubiquitin (GST-Ub) をバッチ法によりレジんに吸着させ、Bruker 社製 DRX800 を用いて<sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HSQC スペクトルを測定した。分解能はサンプルと同量の 10% D<sub>2</sub>O を含む純水を用いて調整した。Fig. 1 にリンカー長 15 a. a. GST-Ub の、溶液条件及びレジンを吸着条件での<sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HSQC スペクトルを示す。

これらスペクトルの比較から、レジン吸着条件下でもタンパク質のシグナルが観測可能であることが確認された。また溶液条件と吸着条件で化学シフトの値に差が無いことから、吸着条件においても溶液中の立体構造が保持されていることが明らかとなった。

溶液条件下での GST-Ub の  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC で、GST 由来のシグナルはほとんど観測されなかった。これは、(1) GST が 2 量体であり、2 量体形成に由来する運動性の減少によって GST 由来のシグナルの線幅が広がったこと、および、(2) リンカーの存在によって Ub の運動性が GST より増加し Ub 由来シグナルの線幅が減少したことが原因と考えられた。またこの結果から、小さなタンパク質やペプチドでは GST 融合条件下において、そのまま立体構造解析が行えると考えられる。

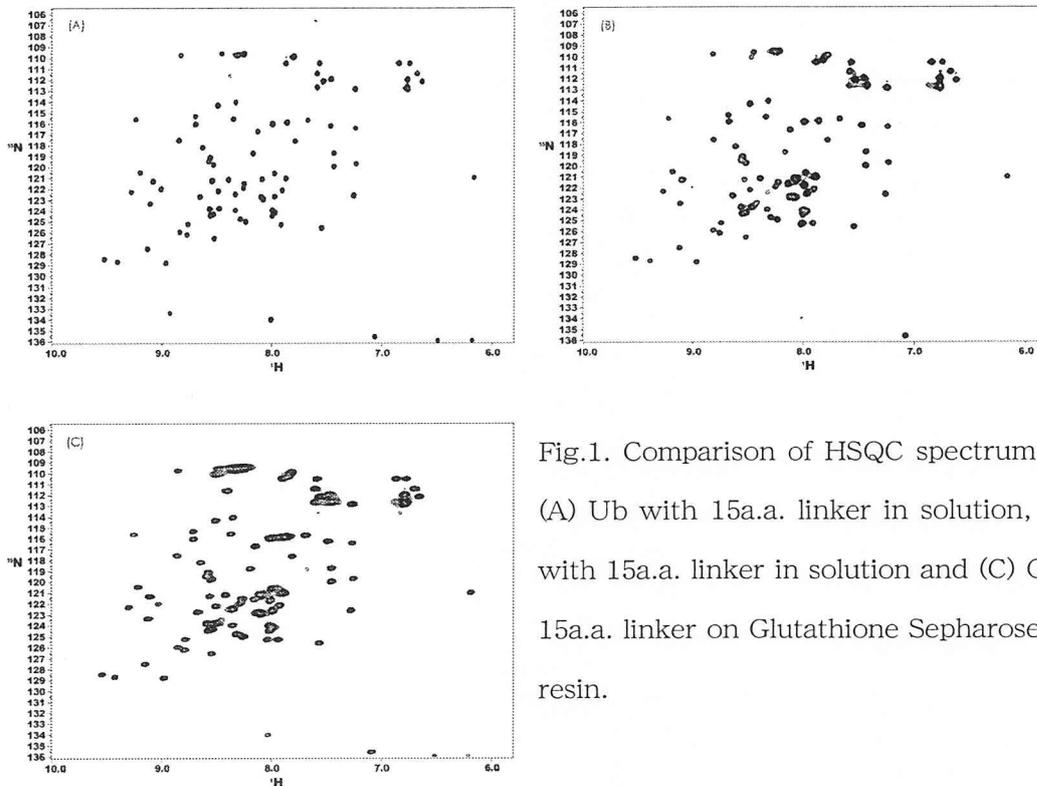


Fig.1. Comparison of HSQC spectrum of GST-Ub. (A) Ub with 15a.a. linker in solution, (B) GST-Ub with 15a.a. linker in solution and (C) GST-Ub with 15a.a. linker on Glutathione Sepharose 4 Fast Flow resin.

### 3. リンカー長とユビキチンの運動性の相関

レジン吸着条件下での GST-Ub のより良好なスペクトルを得るため、最適リンカー長の決定を試みた。リンカー長と Ub の運動性の相関を調べることを目的として、リンカー長 10、20 および 30a.a の、GST 融合 Ub における Ub の T1、T2 を測定し、回転相関時間  $\tau_c$  を求めた。GST-Ub が示す  $\tau_c$  値から算出した Ub の見かけの分子量は、2 量体を形成する GST-Ub の実際の分子量とは異なり、1/2 以下の値を

示した。また、リンカー長は $\tau_c$ に影響を与えず、リンカーを構成するアミノ酸残基数が 10 から 30 の間においてリンカーの長さ $\tau_c$ と Ub の運動性には相関が無いことが示唆された。この結果から、レジン吸着条件下での Ub シグナル観測には、レジン-Glutathione 間、および GST と Ub 間のリンカーの存在自体が重要であり、リンカー長はほとんど影響を与えないと考えられる。

#### 4. レジン上での Ub-YUH1 相互作用の検出

レジン吸着条件下におけるタンパク質間相互作用の検出の可能性を検討するため、レジン吸着条件下のリンカー長 30a.a. GST-Ub に対し、10:1 となるよう YUH1 を加えて $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC スペクトルを観測し、溶液条件下で同様に測定したスペクトルと比較した (Fig. 2)。溶液条件下における GST-Ub と YUH1 との間の相互作用によって生じるシグナル変化のパターンが、レジン吸着条件下で再現された。この結果はレジン吸着条件下においてタンパク質が活性 (特異的な結合能) を維持していることを示す。また Ub-YUH1 複合体が約 35kD であることを考慮すると、本手法は Ub より大きなタンパク質へも適用可能であろう。

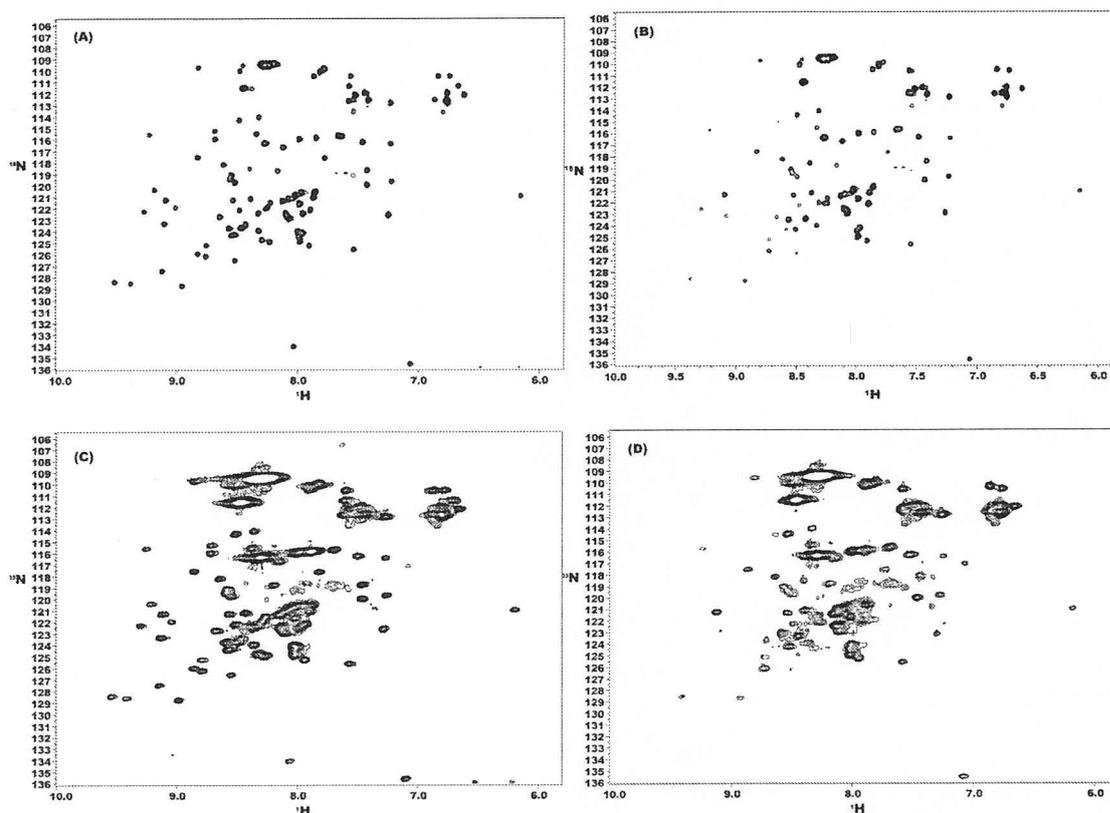


Fig. 2.  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC spectrum of GST-Ub involved 30a.a. linker with or without YUH1 obtained solution condition and absorbed on resin condition. (A) GST-Ub in solution, (B)

(B) GST-Ub with YUH1 in solution, (C) GST-Ub on resin and (D) GST-Ub on resin with YUH1.

## 5. まとめ

今回、我々はリンカーの存在および分解能調整の工夫によって<sup>1</sup>Hの線幅を抑え(≦50Hz)、レジン吸着条件下でタンパク質のシグナルの観測を行うことに成功した。またレジン吸着条件下でのタンパク質は、構造的にも活性的にも溶液状態とほぼ同じであることを明らかにした。本手法は、このように従来法で測定出来なかった膜タンパク質などの難溶性・会合性タンパク質に新たな解析法を与えるだけでなく、HPLC等のフローシステムとの組合せで、立体構造に基づくタンパク質間相互作用をhigh-throughputに検出する非常に有望な手法となる。

## 研究発表

### 口頭発表

1. 児嶋長次郎「遅い分子運動の系に挑む：Gel-phase NMR法と膜貫通型タンパク質」、第41回日本生物物理学会、新潟、2003年9月
2. 小林俊達、河野俊之、三島正規、児嶋長次郎「NMRによるタンパク質構造解析・相互作用解析のための新規手法の開発」、第3回日本蛋白質科学会年会、札幌、2003年6月
3. 小林俊達、河野俊之、三島正規、児嶋長次郎「Gel-Phase NMRのタンパク質への応用」第41回NMR討論会、東京、2002年11月

他 28件

### 誌上発表

1. Yoshiyuki Tanaka, Yasuhiro Kasai, Shunsuke Mochizuki, Akihiro Wakisaka, Eugene H. Morita, Chojiro Kojima, Atsushi Toyozawa, Yoshinori Kondo, Masumi Taki, Yasuomi Takagi, Atsushi Inoue, Kazuhiko Yamasaki, and Kazunari Taira; "Functional roles of the metal ion at the A9/G10.1 site in hammerhead ribozymes." *J. Am. Chem. Soc.*, 126, 744-52 (2004).
2. Kenichiro Fujiwara, Takeshi Tenno, Kaoru Sugawara, Jun-Goo Jee, Izuru Ohki, Chojiro Kojima, Hidehito Tochio, Hidekazu Hiroaki, Fumio Hanaoka, and Masahiro Shirakawa; "Structure of the ubiquitin-interacting motif of S5a bound to the ubiquitin-like domain of HR23B." *J. Biol. Chem.*, 279, 4760-7 (2004).
3. Etsuko Kawashima, Takeshi Sekine, Kaoru Umabe, Kazuo Kamaike, Toshimi Mizukoshi, Nobuhisa Shimba, Ei-ichiro Suzuki, and Chojiro Kojima; "New sequential-assignment routes of nucleic acid NMR signals using a 5'-<sup>13</sup>C-labeled DNA dodecamer." *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids*, in press.
4. Masaki Mishima, Seiji Takayama, Kei-ichi Sasaki, Jun-goo Jee, Chojiro

- Kojima, Akira Isogai, and Masahiro Shirakawa; "Structure of the male determinant factor for Brassica self-incompatibility." *J. Biol. Chem.*, 278, 36389–95 (2003).
5. Hiroki Ashida, Yohtaro Saito, Chojiro Kojima, Kazuo Kobayashi, Naotake Ogasawara, and Akiho Yokota; "A functional link between RuBisCO-like protein of Bacillus and photosynthetic RuBisCO." *Science*, 302, 286–90 (2003).
  6. Zenichiro Kato, JunGoo Jee, Hiroaki Shikano, Masaki Mishima, Izuru Ohki, Hidenori Ohnishi, Ailian Li, Kazuyuki Hashimoto, Eiji Matsukuma, Kentaro Omoya, Yutaka Yamamoto, Teruyo Yoneda, Takane Hara, Naomi Kondo and Masahiro Shirakawa; "The structure and binding mode of interleukin-18." *Nat. Struct. Biol.*, 10, 966–71 (2003).
  7. Shun-ichi Kawahara, Chojiro Kojima, Kazunari Taira, and Tadafumi Uchamaru; "Theoretical study of a correlation between hydrogen bond stability and J-coupling through a hydrogen bond." *Helv. Chim. Act.*, 86, 3265–73 (2003).
  8. Yoshiyuki Tanaka, Yasuhiro Kasai, Eugene H. Morita, Chojiro Kojima, Atsushi Toyozawa, Kazuhiko Yamasaki, Kazunari Taira, and Yoshinori Kondo; "NMR spectroscopic investigations of the roles of the metal ion at A9/G10.1 site in hammerhead ribozymes." *Nucleic Acids Res. Suppl.*, 3, 45–6 (2003).
  9. 三島正規; "多次元 NMR による水素結合の直接測定." *生物工学会誌*, 81, 142–5 (2003).
  10. Yoshiyuki Tanaka, Chojiro Kojima, Eugene H. Morita, Yasuhiro Kasai, Kazuhiko Yamasaki, Akira Ono, Masatsune Kainosho, and Kazunari Taira; "Identification of the metal ion binding site on an RNA motif from hammerhead ribozymes using <sup>15</sup>N NMR spectroscopy." *J. Am. Chem. Soc.*, 124, 4595–601 (2002).
  11. Yasunari Sakai, Masato Furuichi, Masayuki Takahashi, Masaki Mishima, Shigenori Iwai, Masahiro Shirakawa, and Yusaku Nakabeppu; A molecular basis for the selective recognition of 2-hydroxy-dATP and 8-oxo-dGTP by human MTH1. *J. Biol. Chem.*, 277, 8579–87 (2002).
  12. Masayuki Takahashi, Fabrice Maraboeuf, Yasunari Sakai, Hiroyuki Yakushiji, Masaki Mishima, Masahiro Shirakawa, Shigenori Iwai, Hiroshi Hayakawa, Mutsuo Sekiguchi, and Yusaku Nakabeppu; Role of tryptophan residues in the recognition of mutagenic oxidized nucleotides by human antimutator MTH1 protein. *J. Mol. Biol.*, 319, 129–39 (2002).