

SAIL 法の開発と高度化

Development and advancement of the SAIL technology

寺内 勉*

TERAUCHI Tsutomu

構造生物学分野における NMR 法の主要な役割は、立体構造決定から生物学的に重要な高分子量タンパク質・タンパク質複合体における相互作用や動態解析へと急速に移りつつある。安定同位体標識法は、タンパク質 NMR の発展に多大な寄与を果たしてきたものの、このような新たな課題の解決に向け更なる高度化が必要となる。本稿では、高分子量タンパク質の精密構造解析を主要な目的として開発された SAIL (Stereo-Array Isotope Labeling ; 立体整列同位体標識法)の概要を述べ、併せて我々が取り組みつつある SAIL 法を基盤とする最先端安定同位体利用 NMR 技術開発の現状を紹介する。

The major role of NMR spectroscopy in structural biology has been rapidly shifting from structure determinations to analyses of the interactions and dynamics of biologically important high-molecular-weight proteins and protein complexes. Although isotope-aided NMR methodologies have profoundly contributed to the development of protein NMR, further innovations are required to solve these emerging challenges. In this paper, we describe the basic concepts of the stereo-array isotope-labeling (SAIL) method, which was primarily developed to obtain the structural information of large proteins, and our current endeavors to explore the cutting-edge isotope-aided NMR methods derived from the SAIL technology.

1. はじめに

生物を構成する多様なタンパク質は、遺伝子上のアミノ酸配列情報に従いリボソーム上で合成された後、各タンパク質に固有な立体構造を形成することにより生命活動を担う。従って、様々なタンパク質の立体構造と機能の関わりは、基礎生物学のみならず医学、薬学、農学、食品・環境科学等幅広い領域に関連する重要な課題である。核磁気共鳴 (Nuclear Magnetic Resonance ; NMR) 法は、生理的条件に近い溶液内・細胞内におけるタンパク質の立体構造動態、および相互作用を原子レベルで解析するための唯一の分光学的手法であり、X線結晶構造解析やクライオ電子顕微鏡と並び、構造生物学研究手法として中核的な役割を担っている。このため、タンパク質 NMR の発展を黎明期から支える安定同位体標識技術の基盤技術としての重要性は高まるばかりである。

¹³C, ¹⁵N-二重標識タンパク質 ([U-¹³C; ¹⁵N]-タンパク質)

を試料とする NMR 構造解析技術の確立により、今世紀初頭には分子量 25 kDa 程度の低分子量タンパク質であれば容易に構造決定が可能となった。しかしながら、生物学や医学的な重要度がより高い、複雑なタンパク質複合体、膜タンパク質、抗体、糖タンパク質等への NMR 法の応用は大きく立ち遅れていた。このような新たな課題に挑戦する上でも安定同位体技術の更なる高度化は不可欠であることが、微生物発酵・酵素利用技術や不斉有機合成技術を基盤とする独創的安定同位体利用 NMR 技術を創出する契機となった。

SAIL (Stereo-Array Isotope Labeling ; 立体整列同位体標識) 法は、以上のような背景から、1996 年から 2007 年迄の 10 年間に渡り科学技術振興機構・戦略的基礎研究推進事業 (代表: 東京都立大学・甲斐荘正恒教授) により開発された革新的な NMR 解析技術である¹⁾。SAIL 法の開発により、従来法では不可能とされていた分子量 50 kDa に達するような高分子量タンパク質の精密な立体構造決定が可能となった。本稿では、SAIL 法の基

* メディカル事業本部 S I 事業部 S I イノベーションセンター

本的な安定同位体標識戦略とともに、その実現を可能とした高度な安定同位体標識アミノ酸 (SAIL アミノ酸) 合成、及び合成された SAIL アミノ酸を用いて標識したタンパク質 (SAIL タンパク質) の調製手法を解説する。最後に、SAIL 法の開発途上で培われた様々な技術資産を基盤として、社内外と協同して取り組みつつある SAIL 法の高度化による先端的同位体利用 NMR 技術開発の現状と展望を紹介する²⁾。

2. SAIL 法

NMR による立体構造決定は、タンパク質中の水素原子核 (^1H ; プロトン) の核間距離情報 (NOE) を可及的多数集積し、それらを距離制限とする立体構造計算により行われる。しかしながら、タンパク質の分子量が増大するにつれ ^1H -NMR シグナルの縮重や線幅の拡がりにより、立体構造決定は次第に困難となる。このために、 $[\text{U-}^{13}\text{C}; ^{15}\text{N}]$ -タンパク質を用いる NMR 構造解析法においては、分子量 25 kDa 程度が実質的上限とされていた。この状況を大幅に改善するために開発された SAIL 法は、タンパク質を構成する 20 種類のアミノ酸に含まれる重複した構造情報を持つ水素原子を重水素化により徹底的に間引いた、一群の標識アミノ酸 (SAIL アミノ酸) を利用する革新的技術である。SAIL アミノ酸は、構造情報を失うことなくタンパク質の持つ過剰な情報量を著しく圧縮するために、以下に要約する特殊な同位体標識パターンを持つ¹⁾。

高分子量タンパク質の NMR シグナルの観測・帰属を、多次元・多核種 NMR 法を用いて行うためには、水素原子を各炭素あたり一つのみ残し、残りは全て重水素化することにより水素原子数を減らすことが SAIL 法の発想の原点である。このため、メチン炭素は ^{13}CH 、メチレン炭素は $^{13}\text{C}^*\text{HD}$ 、メチル炭素は $^{13}\text{CHD}_2$ とした。ここで*印をつけたメチレン炭素に結合する二つの水素の一方のみを、立体選択的に重水素化する。このことにより、残されたもう一方の ^1H -NMR シグナルは重水素化により失われる構造情報を補って余りある高い付加価値を持つ。同様に、側鎖に各二つの prochiral メチル基を持つ Leu, Val においては、その一方を立体選択的に $^{13}\text{CHD}_2$ とし、他方を CD_3 とすることより、メチレン基の立体選択重水素化と同様、構造情報の高精度化と水素原子数の削減が同時に達成される。このような考えの基に、SAIL 法開発初期に合成した 20 種類の“prototype” SAIL アミノ酸は、各残基の主鎖・側鎖 ^1H , ^{13}C , ^{15}N -NMR シグナルが、直接に結合した ^{13}C - ^1H , ^{13}C - ^{13}C , ^{13}C - ^{15}N , ^{15}N - ^1H 間のスピン結合を介して効率的に帰属できるよう設計されたものである (図-1)¹⁾。

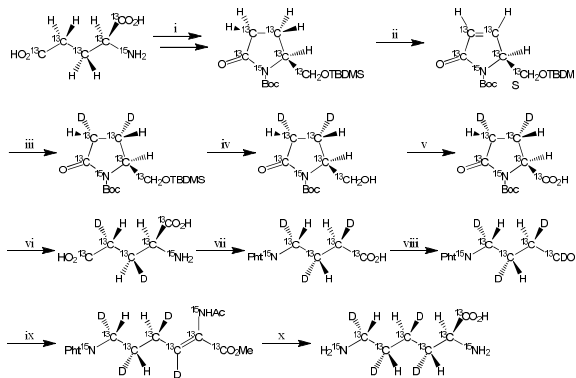
図-1 に示した SAIL タンパク質は、NMR 構造解析に必要な且つ十分な水素原子以外は全て重水素化されているため、 $[\text{U-}^{13}\text{C}; ^{15}\text{N}]$ -タンパク質に比べ、水素原子数は約半数程度に減少する。このような SAIL タンパク質における水素原子数の減少は、 ^1H -NMR シグナル数の削減に留まらず、 ^1H -NMR シグナルの線幅の大幅な先鋭化を通して測定感度の著しい向上をもたらす。このために、40-50 kDa の高分子量タンパク質が、NMR 解析上ではあたかも半分程度の分子量として扱え、迅速かつ高精度の立体構造決定が可能となった。今世紀初めに国際競争が繰り広げられた構造ゲノム科学研究の基盤となる NMR 解析技術として、長期に渡り科学技術国家予算による研究支援を受けることができた。

SAIL 法は、位置・立体選択的に $[\text{D}, ^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}]$ -三重標識した SAIL アミノ酸を合成するための高度な不斉有機合成、SAIL アミノ酸により標識したタンパク質調製法、及び SAIL 標識タンパク質を活かした NMR 解析技術を含めた総合的開発により、初めて完成することができた先端的基盤技術である。

2.1 SAIL アミノ酸合成

安定同位体標識アミノ酸は、様々な同位体標識原料から得られる微生物菌体や藻類等からの抽出・分離法、あるいはアミノ酸発酵・酵素法により製造されてきた。我々は、これらの伝統的手法に加え、不斉有機合成技術を組み合わせることにより、SAIL 法で必要となる高度な新規同位体標識パターンを持つアミノ酸の合成に向けた技術開発に取り組んだ。NMR 技術開発においては、要求される構造情報に応じて最適な同位体標識パターンを持つアミノ酸を試行錯誤的に開発する必要が生じる。このために、これまでに合成した同位体標識アミノ酸は数百種類に上る。それらの合成法は多様であるが、ここではその一例として SAIL リジン合成を紹介する。リジンは 4 つのメチレン (CH_2) からなる長鎖アルキル側鎖を持つために、SAIL-リジンの合成にはそれら全てを同時に、かつ立体選択的に $^{13}\text{C}^*\text{HD}$ 標識する必要がある。この目的を達成するには、高い立体選択性を持つ 4 つの不斉中心を導入するための新規合成法の開発が不可欠となり、次に示すような独創的な SAIL-リジン合成経路が開発された³⁾。

SAIL-リジン合成の出発原料としては、経済性も念頭に置き、微生物発酵法により多量生産が可能な $[\text{U-}^{13}\text{C}; ^{15}\text{N}]$ -グルタミン酸を選んだ。アミノ酸側鎖の不斉重水素化には、不斉還元剤や不斉触媒あるいは α -炭素の不斉性を利用して β 位や γ 位の炭素上への立体選択的に重水素を導入する方法が用いられる。このような手法をリジン合成に適用するには、 α -炭素の不斉中心



Scheme 1. SAIL-グルタミン酸及び SAIL-リジンの合成. 試薬と条件: (i) 4 段階, 77%; (ii) (1) NaHMDS, DMPU, PhSeCl, (2) O₃, 88%; (iii) Pd/C, D₂, quant.; (iv) TBAF, 74%; (v) RuCl₃, NaIO₄, 97%; (vi) 1 M HCl, Δ, 89%; (vii) (1) GAD, PLP, D₂O, pH5, (2) PhNCO₂Et, 75%; (viii) (1) SOCl₂, (2) Bu₃SnD, Pd(PPh₃)₄, 93%; (ix) Phosphorylglycine, DBU, 84%; (x) (1) [(*S,S*-Me-DuPHOS)Rh(COD)]BF₄, H₂, (2) 1 M HCl then H₂NNH₂.

から遠く離れた δ, ε-メチレン炭素上の立体選択的重水素化が問題となる。我々はこの問題を SAIL グルタミン酸を経由する新規合成法により解決した (Scheme 1)。すなわち, [U-¹³C; ¹⁵N]-グルタミン酸を脱水環化して得られる[U-¹³C; ¹⁵N]-ピログルタミン酸の脱水素反応により C_β-C_γ間に二重結合を導入し,その後不斉重水素化により SAIL グルタミン酸とする。SAIL グルタミン酸の重水溶液にグルタミン酸脱炭酸酵素 (GAD) を作用させ,立体配置を保持したまま脱炭酸反応によりカルボキシル基を重水素置換した γ-アミノ酪酸に誘導した。γ-アミノ酪酸のカルボキシル基を還元しアルデヒドに導いた後, [U-¹³C; ¹⁵N]-グリシンと縮合させ,生じた二重結合の不斉重水素化により SAIL リジンが得られた。このようにして合成された SAIL リジンの ε, δ, γ, β-炭素は,それぞれ Glu の α, β, γ, δ-炭素に,また α-炭素は Gly の α-炭素に由来する。

SAIL リジン合成に示されたように,アミノ酸骨格を巧妙に組み替えることによりタンパク質を構成する 20 種類全ての SAIL アミノ酸を合成することに成功した。図-1 に SAIL 法開発当初に合成した “prototype” SAIL アミノ酸の構造を示す。前述したように, NMR 技術開発上の必要性に応じて, これまでに多種多様な同位体標識アミノ酸試料, およびそれらの合成手法が蓄積されている。今後, これらの知的・技術的資産は, 幅広い分野における安定同位体利用技術の重要な開発基盤となる。

2.2 SAIL アミノ酸標識タンパク質の調製法

前節で紹介した SAIL リジン合成法からも明らかのように, SAIL アミノ酸類の合成には高度かつ複雑な経路を経由せざるを得ないものが含まれるために, 供給量は限定され, また高価となる。従って, 必要とする構造情報に応じて, タンパク質中の全てのアミノ酸残基を SAIL アミノ酸に置換した SAIL タンパク質, あるいは特定のアミノ酸残基のみを SAIL アミノ酸に置換した選択的 SAIL 標識タンパク質等, 多様な標識タンパク質試料の効率的な試料調製法の開発は, SAIL 法の普及にとって重要な課題である。大腸菌・酵母等の微生物や植物・動物細胞等の培養細胞を用いる in vivo 発現系による安定同位体標識タンパク質調製は幅広く普及しているが, 添加した標識アミノ酸の代謝拡散や細胞由来の非標識アミノ酸による希釈等が問題となる場合が多い。

これらの in vivo 発現系の抱える問題点は, 細胞抽出液から作成される無細胞系や, タンパク質合成に関わる全ての因子を個別に精製し再構成させた再構成型無細胞タンパク質合成系を用いることにより解決可能である。これらの in vitro 発現系では, タンパク質遺伝子情報に従い, 添加したアミノ酸のみを用いてタンパク

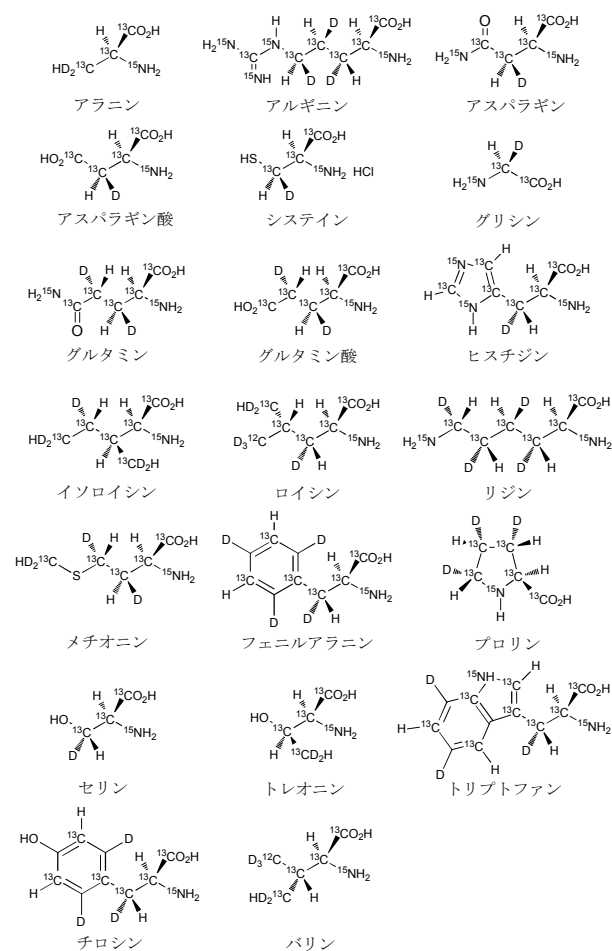


図-1 20 種類の “prototype” SAIL アミノ酸の分子構造

質が合成される。SAIL 法の開発当初においては、大腸菌無細胞タンパク質合成系により SAIL アミノ酸混合物からカルシウム結合タンパク質カルモジュリン (CaM) の場合では、約 10 % の高収率で SAIL タンパク質を調製することができた⁴⁾。このようにして調製した SAIL タンパク質を用いることにより、従来法の分子量限界を大きく上回る 40-50 kDa の高分子量タンパク質の迅速かつ高精度な構造決定が可能となることが立証された¹⁾。

当社製品である無細胞タンパク質合成キット”無細胞くん”では、抽出液中に残存するアミノ酸代謝酵素活性の抑制、ジスルフィド結合を含むタンパク質の発現効率の向上等、多様なタンパク質の調製に向けての様々な改良が加えられている。添加したアミノ酸混合物からのタンパク質の合成収率も約 20% と高いことから、無細胞系は、今後 SAIL 法に幅広く利用されることが期待される。なお、無細胞くんにより調製した SAIL ユビキチンの NMR スペクトルは、過剰なシグナルが削減されているため、NOE スペクトルのみを用いる全自動構造解析にも有用と高い評価を得ている (図-2)⁵⁾。

3. SAIL 関連技術の多様化

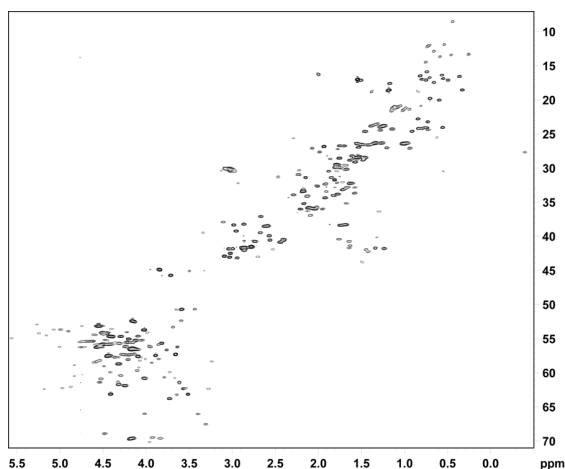


図-2 SAIL ユビキチンの 400 MHz ¹H-¹³C ct-HSQC スペクトル (脂肪族領域)。

SAIL 法の開発から十年余り経過した現在、構造生物学の中心課題は、タンパク質の立体構造を網羅的に集積する構造ゲノム科学 (Structural Genomics) から、膜タンパク質、抗体、超分子複合体等のより複雑な立体構造と生物機能の関わりへと、医学・生物学的な優先度が移行している。この間、高難易度タンパク質・タンパク質複合体の立体構造解析に向けては、伝統的な X 線結晶構造解析法に加え、クライオ電子顕微鏡 (cryo-EM)、更には自由電子レーザー (XFEL) 等の革新的技術が登

場した。統合的構造生物学 (Integrative Structural Biology) は、このような多彩な手法から得られる膨大な構造・機能情報からタンパク質の生物機能を理解しようとする新たな枠組みであり、その中で NMR 分光法が如何なる寄与を果せるかが問われている。一つの方向は、NMR 法の応用をタンパク質の立体構造決定から、活性部位等に存在する特定残基に関する局所的な構造動態情報の取得に限定することである。立体構造決定法としての将来性は競合する諸解析手法と比べ限られてはいるものの、生理学的条件下に近い環境における複雑なタンパク質複合体に関する幅広い時空間領域にまたがる構造動態情報を得る手段として、NMR 法は今後も不可欠な研究手法として発展し続けると考える。このような観点から、高分子量タンパク質中の NMR シグナルの選択的観測技術は極めて重要な開発課題である。

Pervushin, Wüthrich らは 高分子量の [U-D; ¹⁵N]-タンパク質の軽水溶液中での主鎖アミド基 ¹⁵NH 相関シグナルが、¹H-¹⁵N 間の双極子相互作用 (dipole dipole coupling ; DD) と、¹⁵N, ¹H 核の化学シフト異方性 (chemical shift anisotropy ; CSA) 間の交差緩和により、横緩和時間 (transverse relaxation time ; T₂) の長い、すなわち線幅の細い項を含むことを見出した。彼らは、この線幅の鋭い ¹H-¹⁵N 相関ピークを選択的に観測するパルス列を用い、100 kDa を超える高分子量タンパク質のアミド ¹⁵NH シグナルの測定が可能となることを示し、この手法を TROSY (Transverse Relaxation Optimized Spectroscopy) と名付けた^{6a)}。¹⁵NH における TROSY 効果は、CSA 項が磁場強度に依存することから、約 1 GHz で最大となる。残念ながら、¹⁵NH TROSY は主鎖アミドシグナルに限られるために、得られる構造情報は限定されたものとなる。TROSY 法は芳香族アミノ酸の芳香環 ¹³CH シグナルの観測法としても応用が試みられたが、[U-¹³C; ¹⁵N]-タンパク質を試料としたため芳香環のスピンは複雑となり有効性は限定的である^{6b)}。

一方、Tugarinov, Kay らはイソロイシン残基 (I)、ロイシン残基 (L)、バリン残基 (V) のメチル基のみを ¹³CH₃ とし、残り全ての水素を重水素化した [ILV-¹³CH₃; U-D]-タンパク質を大腸菌発現系により調製し、その 2D ¹³CH HMQC スペクトルを測定した。その結果、鋭い ¹³CH 相関シグナルが観測できることを見出し、“Methyl TROSY” と名付けた。彼らは線幅の減少をメチル基の擬三回軸周囲の早い回転 (ピコ秒) による ¹H-¹H 間、¹H-¹³C 間の交差緩和に依存する効果であるとした⁷⁾。この手法の開発により、タンパク質主鎖の ¹⁵NH に加え、タンパク質疎水性領域に多数存在する ILV メチルに関する相補的構造情報がもたらされた。このために、高分

子量タンパク質の NMR 研究においては、 ^{15}NH TROSY と Methyl TROSY が幅広く利用されている。しかしながら、これらの手法により得られる構造情報は限定的であり、アミノ酸残基側鎖のより一般性の高い NMR シグナルの観測技術が必要となる。

先に述べたように、SAIL 法の原理の一つは、安定同位体標識を利用する T_2 緩和過程の制御にある。この方向に特化し、高分子量タンパク質に含まれるあらゆる種類の ^{13}CH シグナルに関して、TROSY 効果を最適化できる同位体標識パターンを追求した。このような SAIL 法の改良にあたっては、高度な同位体標識アミノ酸合成・標識タンパク質調製技術と、新たな NMR 測定解析技術開発にいかにして結びつけるかが重要な鍵となる。以下に、過去数年にわたる甲斐荘グループ (名古屋大学構造生物学研究センター、大阪大学蛋白質研究所、首都大学東京) との密接な共同研究成果の一端を紹介する。

3.1 高分子量タンパク質のメチル $^{13}\text{CH}_3$ 、芳香環 ^{13}CH NMR シグナル観測用試料調製

Tugarinov らが報告した高分子量タンパク質の ILV メチル基 NMR シグナル観測 Methyl TROSY 法は、その後、アラニン (A)、トレオニン (T)、メチオニン (M) の各アミノ酸残基側鎖のメチル基の NMR シグナル観測へと拡張された。メチル基のみを ^{13}CH 標識し、他の水素を全て重水素置換したタンパク質試料は、通常大腸菌の高発現系を用いて調製される。メチル基標識原料としては、ATM 残基では $^{13}\text{CH}_3$ 標識したアミノ酸、ILV 残基ではメチル標識したケト酸前駆体を用いられる。これらのメチル標識原料は合成法が比較的簡単であり、安価に市販品を購入することも普及の追い風となっている。しかしながら、通常の大腸菌発現系を用いた場合、アミノ酸生合成経路の様々な酵素による代謝変換や同位体希釈、更にはロイシンやバリン残基の prochiral メチル基の立体選択標識等、解決すべき問題点を抱えている。立体選択的にメチル標識した Leu や Val を用いることで、このような問題の幾つかは回避できるものの、標識ケト酸前駆体に比べ、高価格である。このような問題はメチル選択標識アミノ酸に限らないため、高度な標識アミノ酸類の添加量や代謝拡散を抑制しつつタンパク質を標識する技術の開発は重要である。無細胞系に加え、タンパク質試料調製法の選択肢を複数提案できることが、高度な同位体標識技術の普及の鍵となる。

リンゴ酸合成酵素 G (Malate Synthase G ; MSG) は、Tugarinov らによる Methyl TROSY 法の開発モデルとして採用された高分子量のタンパク質である (図-3) ⁷⁾。

我々は、この MSG をモデルタンパクとして、阻害剤や代謝酵素欠失変異体を利用したアミノ酸代謝酵素活性の制御が同位体標識率の変化を引き起こすパターンを解析し、残基選択的同位体標識したタンパク質試料調製法としての大腸菌発現系の評価を行った ^{8a)}。この結果、10~数 10 mg/L という少量の同位体標識アミノ酸添加量においても、半数以上のアミノ酸に関して高い同位体標識率でタンパク質が調製できることが明らかとなった。更にこの手法を進展させ、Rutgers 大学の井上教授の協力を得て、アミノ酸代謝酵素活性が制御されたアミノ酸要求株を用いることにより、位置・立体選択的にメチル標識した ILV のあらゆる組み合わせをタンパク質に導入する同位体標識法を開発することにも成功した ^{8b)}。

一方、フェニルアラニン (F)、チロシン (Y)、ヒスチジン (H)、トリプトファン (W) 等の芳香族アミノ

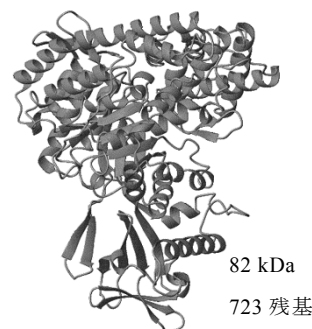


図-3 リンゴ酸合成酵素 G (MSG) のリボン図

酸はタンパク質内部の疎水性領域に存在し、タンパク質の立体構造形成・維持に関わり、生物機能発現にも重要な役割を果たしている。しかしながら、高分子量タンパク質の芳香環 NMR シグナルは、構造プローブとして不可欠であるにも関わらず、これまで有効な観測手法がなかった。Pervushin らにより高分子量タンパク質の方芳香環シグナルの観測に向けて、aromatic CH TROSY 法が提案されてはいるものの、 $[\text{U-}^{13}\text{C}; ^{15}\text{N}]$ -タンパク質中の芳香環 ^{13}CH スピン系は複雑であり、TROSY 効果は限定的であった ⁶⁾。一方、SAIL 芳香族アミノ酸の芳香環においては、 ^{13}C と ^{12}C を交互に標識することにより ^{13}C - ^{13}C 間の直接結合を避け、また隣接 ^{12}C が水素原子を持つ場合にはそれらを重水素化し、 ^{13}CH スピン対を磁氣的に孤立させた ⁹⁾。このような安定同位体標識により芳香環の ^{13}CH 間の TROSY 効果を最適化することが可能となった。図-4 は、Phe の ζ 位のみを ^{13}CH とし残りの全ての水素を重水素化した Phe (ζ -SAL Phe) を用いて選択的に標識し、残り全ての水素を完全重水素化した MSG の芳香環 ^{13}CH TROSY NMR スペクトルで

ある。82 kDa の高分子量を持つ MSG であっても、19 残基含まれる Phe に由来する全ての ζ - ^{13}C シグナルが見事に分離観測され、それらの帰属も示した残基番号のように確定することができた (図-4) ²⁾。このような同位体標識パターンを持つ SAIL アミノ酸を用いて高分子量タンパク質を標識することにより、 ^{13}C 核の化学

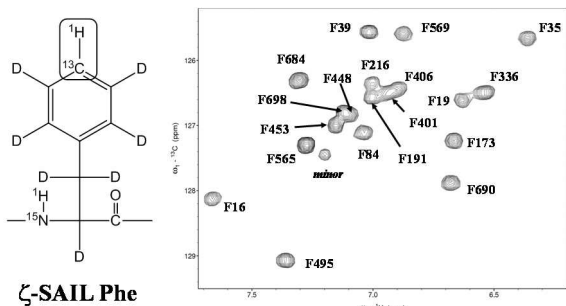


図-4 $[\alpha,\beta,\beta',\delta,\delta',\epsilon,\epsilon'-\text{D}_7; \zeta\text{-}^{13}\text{C}; ^{15}\text{N}]$ -フェニルアラニン (ζ -SAIL Phe) で選択標識した重水素化 MSG の 900 MHz ^1H - ^{13}C TROSY HSQC スペクトル (宮ノ入ら) ²⁾

シフト異方性と ^{13}C に直接結合した ^1H との DD 項がより効果的に相殺されるため、あらゆる芳香環 ^{13}C TROSY シグナルが観測可能となる ²⁾。

SAIL 芳香族アミノ酸、位置・立体選択的メチル標識アミノ酸等、これまで開発した様々な新規同位体標識アミノ酸を用いて標識したタンパク質試料は、従来の標識試料とは桁違いに豊富、かつ有用な構造情報を含んでいる。しかしながら、その普及に際しては試料調製コストの軽減は避けられない課題である。通常の大腸菌発現系では、高濃度の標識率を得るには、芳香族アミノ酸 F, Y (各 20 mg/L), H, W (各 10 mg/L), メチル選択標識に関しては A (300 mg/L), T (10 mg/L), I, L, V, A, T, M (各 20 mg/L) 程度の添加量を要する。発現量の高い MSG の場合、一回の NMR 測定用の試料調製には 200 mL 程度の重水培地を用いて培養するため、芳香族アミノ酸合計 12 mg, Ala を除いたメチル標識アミノ酸は合計 18 mg 程度が必要となる。通常の大腸菌発現系を利用した場合でも、豊富な NMR 情報量を考慮すれば、試料調製に必要な標識アミノ酸コストは決して高価すぎることはない。しかしながら、発現量が低いタンパク質への応用には、使用量の更なる低減が不可欠となる。無細胞系による試料調製は有効な選択肢であり、MSG 発現に関しては以下に示すような良好なデータが得られている。

無細胞くんを 1 キットを用いた場合、11.2 mg の SAIL 標識アミノ酸 (芳香族 SAIL アミノ酸 3.0 mg, メチル標

識アミノ酸 8.2 mg) を含む約 24 mg の重水素化アミノ酸混合物 (図-5) から、NMR 測定に必要な量を上回る 4.0 mg の選択標識 MSG が得られた (収率 36%)。このように、無細胞系の利用により、SAIL 芳香族アミノ酸の使用量を少なくとも 1/4, メチル標識アミノ酸の使用量を約 1/3 へと大きく減らしても、良好な NMR シグナルが観測された (図-6)。一方、大腸菌発現系では芳香族アミノ酸や ILV 要求株を含む様々なアミノ酸要求株、感受性株の導入が可能であることから、種類によって

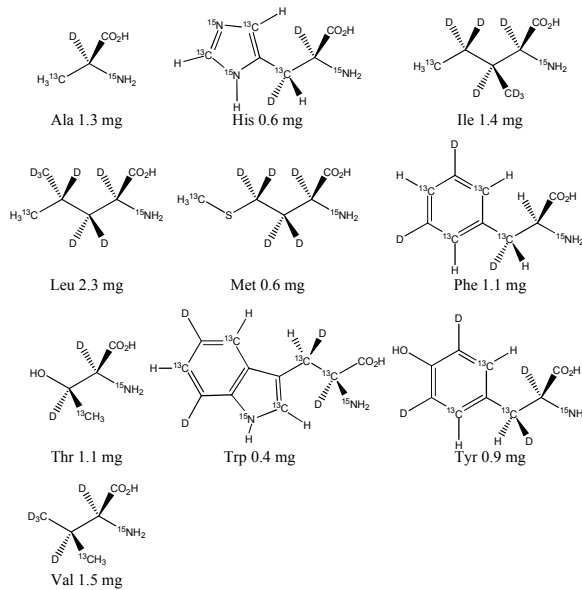


図-5 無細胞くん 1 キットに使用した $[^{13}\text{C}_3]$ -メチル標識アミノ酸、および芳香族 SAIL アミノ酸の構造と使用量

は標識アミノ酸の使用量を大幅に減らせる可能性がある ^{8,10)}。このように、標識タンパク質の調製技術に関しては今後も検討の余地があり、標的タンパク質に関する最適な試料調製法を提示することが SAIL 法をはじめとする安定同位体利用 NMR 技術の普及における課題の一つである。

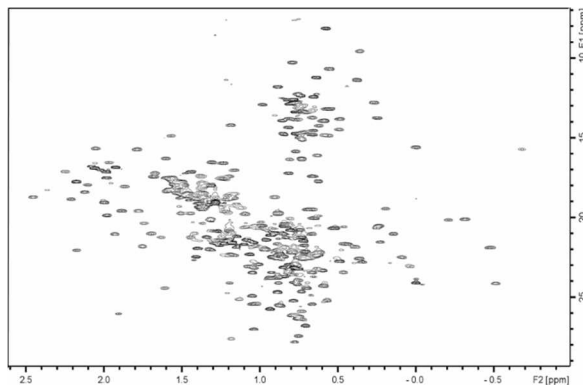


図-6 無細胞くん で調製した芳香族 SAIL アミノ酸、メチル選択標識した重水素化 MSG の 900 MHz スペクトル (メチル領域のみ表示)

3.2 同位体標識 TROSY 法による高分子量タンパク質の全 ^{13}C , ^{15}NH シグナルの観測法

高分子量タンパク質においても、周囲を完全に重水素化すれば、NH TROSY により主鎖アミド基 ^{15}NH シグナル、メチル基を $^{13}\text{CH}_3$ 標識することにより ILVATM 残基の ^{13}CH シグナル (Methyl TROSY), 更には芳香族 SAIL アミノ酸標識することにより FYHW 残基の芳香環 ^{13}CH シグナル (Aromatic CH TROSY) が観測できることを前節で説明した。NH TROSY と Aromatic CH TROSY においては、タンパク質全体を重水素化し、更に ^{13}CH や ^{15}NH に直接結合した炭素を全て ^{12}C にすることで、アミド ^{15}N - ^1H や芳香環 ^{13}C - ^1H スピン対を磁氣的に孤立した環境に置く。これにより、アミド ^{15}N - ^1H や芳香環 ^{13}C - ^1H 間の TROSY 効果がより有効となる。

一方、Methyl TROSY においては事情が異なる。すなわち、飽和炭素の ^{13}C 核の化学シフト異方性は小さく、 T_2 緩和の磁場依存性を利用する TROSY 効果は期待できない。磁氣的に孤立した環境に置かれた $^{13}\text{CH}_3$ 基の ^{13}C , ^1H 核の T_2 緩和には ^1H - ^1H 間、 ^1H - ^{13}C 間の双極子相互作用のみが寄与する。Tugarinov と Kay は溶液中での回転相関時間の長い高分子量タンパク質で $^{13}\text{CH}_3$ の相関シグナルの線幅が鋭くなる理由は、高速で回転運動するメチル基の ^1H - ^{13}C 間の交差緩和が寄与しているとして、Methyl TROSY と名付けた⁷⁾。しかしながら、“prototype” SAIL アミノ酸では、残存水素原子数を最小とするために、炭素原子上に一つだけプロトンを残した $^{13}\text{CHD}_2$ パターンを採用したが、 $^{13}\text{CHD}_2$ を用いても高分子タンパク質のメチル ^{13}CH シグナルは、 $^{13}\text{CH}_3$ と同様に鋭い ^{13}CH 相関シグナルを与えるのである。この事実が、メチレン基 (CH_2), メチン基 (CH) における高速回転が全く不可能な部位の ^{13}CH シグナルの観測手法の開発につながった。

アミノ酸側鎖に数多く含まれるメチレン基 ($^{13}\text{CH}_2$) やメチン基 (^{13}CH) は、末端メチル基とは異なり高速で回転することはできないため、メチレン基を $^{13}\text{CH}_2$ 標識しただけでは、高分子量タンパク質の ^{13}CH シグナルは観測することはできない。その理由は、空間的に極めて近距離にある *geminal* ^1H - ^1H 間に働く双極子相互作用緩和による線幅の拡がりに加え、20 Hz 近くの大きなスピンの結合 (*geminal* spin coupling) により分裂するからである。しかしながら、これまでの SAIL 法開発過程で得た知見から、*geminal* ^1H - ^1H 間の双極子相互作用緩和も 2J スピン結合も一方の水素原子を立体選択的に重水素化することにより同時に解消できる。後は $^{13}\text{C}^*\text{HD}$ を更に磁氣的に孤立させることで ^{13}C - ^1H スピンの緩和過程を最小化できる。我々は、芳香環の ^{13}CH シグナルは隣接

炭素を全て核スピンのない ^{12}C とし、更に隣接する水素を重水素化することにより、緩和過程が最適化され TROSY ^{13}CH シグナルを観測することに成功した。同様に、側鎖メチレン基の場合には、“ $^{-12}\text{C}(\text{D})$ - $^{13}\text{C}^*\text{HD}$ - $^{12}\text{C}(\text{D})$ ”、メチン基の場合には“ $^{12}\text{C}(\text{D})$ - ^{13}CH - $^{12}\text{C}(\text{D})$ ”の標識パターンを用いれば鋭い ^{13}CH シグナルが観測できると予想した。

図-7 は以上の予想を裏付けるために合成した二種のトリプトファン ($[\beta_2\text{-D}; \beta\text{-}^{13}\text{C}]\text{-Trp}$, $[\beta_3\text{-D}; \beta\text{-}^{13}\text{C}]\text{-Trp}$) を用いて選択的に標識した MSG の 2D ^1H - ^{13}C スペクトルを示したものである。今回の実験では芳香環水素は $\beta\text{-}^1\text{H}$ から離れているために重水素化していないが、トリプトファン残基以外のアミノ酸は全て重水素化してある。MSG に 12 残基含まれるトリプトファン残基側鎖の β -メチレンの ^1H -シグナルは完全に分離した鋭いシグナルとして現れ、それらの立体帰属、配列帰属も完全に確定することができた²⁾。また、同様な手法で MSG のプロリン残基の $^{13}\text{C}_\alpha\text{H}$ や $^{13}\text{C}_\gamma\text{H}$, ロイシン残基の $^{13}\text{C}_\beta\text{H}$ 等の他のアミノ酸に関しても観測できている¹¹⁾。これらの結果、高分子量タンパク質であっても、緩和過程を同位体標識により制御した緩和最適化 SAIL アミノ酸を利用すればあらゆるプロトン NMR シグナル情報を高感度で取得できることが明らかとなった。我々の研究の結果により、高分子量タンパク質においては主鎖アミド ^{15}NH と側鎖メチル $^{13}\text{CH}_3$ のみが観測可能であるというこれまでの常識を覆し、側鎖メチレン、側鎖メチンにおいても構造解析に資する NMR シグナルとして観測可能であることが示された。

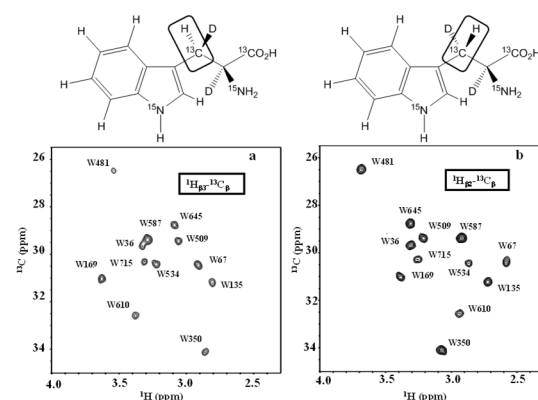


図-7 (a) $[\alpha,\beta_2\text{-D}_2; \beta\text{-}^{13}\text{C}]\text{-Trp}$ と (b) $[\alpha,\beta_3\text{-D}_2; \beta\text{-}^{13}\text{C}]\text{-Trp}$ で選択標識した重水素化 MSG の 900 MHz ^1H - ^{13}C HSQC スペクトル (宮ノ入ら)²⁾

4. 安定同位体利用 NMR 技術の今後の展望

タンパク質 NMR から得られる最も有用な ^1H -NMR

構造情報は、[U- ^{13}C ; ^{15}N]-タンパク質や SAIL タンパク質を試料とし、 ^1H , ^{13}C , ^{15}N -間のスピン結合や空間を介した双極子相互作用を利用した多次元 NMR 法により得られてきた。このような間接検出法の利点は、 ^1H シグナルが ^{13}C や ^{15}N の化学シフト軸を含む多次元空間に展開されるため、良く分離して観測できる点にある。他方、間接検出法では ^1H -シグナルは複数の磁化移動過程を経由する間に磁化が減衰するため、大幅な感度低下は避けられない。また解析上必要となる複数の多次元 NMR データセットを得るには、高価な測定装置を長時間にわたり占有する必要がある。SAIL 法による測定感度の著しい向上により、NMR 装置占有時間は大幅に短縮できるものの、間接検出法を用いる限りその原理的な問題から逃れることはできない。しかしながら、何らかの手法を用いて特定残基の ^1H -NMR シグナルの帰属が一旦確定した後は、それらの ^1H -NMR 情報の取得に際し間接検出法の利用をできる限り回避する可能性を検討する必要がある。タンパク質 NMR の歴史上、安定同位体利用技術の先駆けとして半世紀前に誕生したものの、その後長い間進歩が滞っていた ^1H -シグナルの直接観測法を再度見直す機会が訪れた。

安定同位体を利用したタンパク質 NMR 技術の黎明期である 1965 年、東京で開催された磁気共鳴国際会議において、Jardetzky はタンパク質の ^1H -NMR が解析困難となるのは NMR シグナルの重なりが主因であると考へ、情報を得たい特定の amino 酸残基以外を全て重水素化した“選択的重水素化”タンパク質を試料とする新たな戦略を提案した。もし、このような選択的重水素化タンパク質が利用できれば、 ^1H -NMR スペクトルは大幅に単純化され、様々な有用な構造情報が得られる筈であると述べた^{12a)}。Jardetzky はこの発表後の 1968 年に、分子量 17 kDa のヌクレアーゼの選択的重水素化による His や Tyr の芳香環 ^1H -NMR シグナルの観測に成功した^{12b)}。残念ながら、この画期的な手法は様々な周辺技術が未発達であったこともあり、タンパク質 NMR 研究手法としてその後広く利用されることはなかった。

Jardetzky の発表から半世紀を経た現在、SAIL 法の多様化を通じ、ヌクレアーゼの 5 倍に達する高分子量タンパク質 MSG の全残基の全部位の ^{13}C H NMR シグナルが観測できる革新的手法を確立した。この緩和最適化 SAIL 法の核心となるアイデアは、 ^{13}C - ^1H スピン対を磁氣的に孤立させることに尽きる。そのような環境に置かれた芳香環 ^{13}C は Aromatic CH TROSY 効果により、鋭い ^{13}C の線幅を示す。一方、芳香環 ^1H は化学シフト異方性が小さく、その T_2 緩和機構には直接結合し

た ^{13}C 核との DD 項のみが支配的である。従って、 ^{13}C - ^1H の代わりに ^{12}C - ^1H を磁氣的に孤立させることができれば、核スピンの無い ^{12}C に結合した芳香環上の ^{12}C - ^1H シグナルは高感度で観測できる可能性がある。この予想は次の実験により見事に裏付けられた。

ζ - ^1H 以外の芳香環を全て重水素化した $[\delta,\delta',\epsilon,\epsilon'\text{-D}_4]$ -Phe を添加した重水培地中で、大腸菌発現系により MSG を調製した。得られた MSG 試料は、19 残基の Phe の芳香環では ζ - ^1H 以外は全て重水素化されている。Phe 側鎖 β -メチレンは CH_2 ではあるが、その水素原子は ζ - ^1H からは距離的に遠いため、 ^{12}C - ^1H 対を磁氣的にほぼ孤立させることができる。図-8 はこのようにして得られた MSG の 900 MHz 1D ^1H -NMR の芳香環領域である。主鎖アミドは重水置換してあるために、この領域に現れるのは 19 ヶ所あるフェニルアラニン残基の ζ - ^1H のみである。事実、観測された 1D ^1H -NMR シグナルの化学シフトは、図-4 に示した Aromatic CH TROSY で得られた ^1H -化学シフト比較することにより容易に確定することができた。観測された 1D ^1H -NMR シグナルの線幅は TROSY ^{13}C - ^1H シグナルから得られる ^1H -シグナルの線幅に比べ遥かに鋭く、そのために 0.2 mM の希薄な試料溶液を用いても、積算数僅か 512 回でこのような見事なシグナルが観測できたことは予想を超える素晴らしい成果であった。高分子量タンパク質の NMR 観測上、最大の問題点である線幅の増加が、TROSY by isotope labeling ともいべき安定同位体標識パターンの最適化を通じて制御可能なことが立証されたのである²⁾。

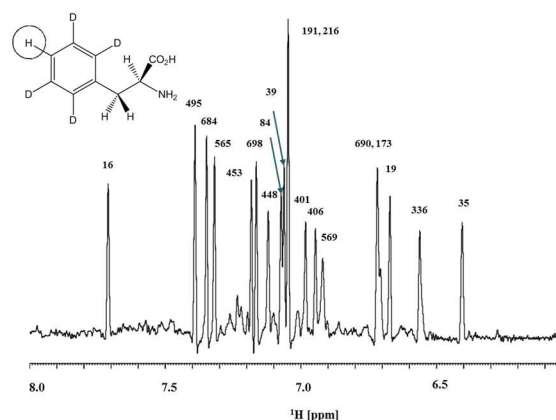


図-8 $[\delta,\delta',\epsilon,\epsilon'\text{-D}_4]$ -Phe で選択標識した重水素化 MSG の 900 MHz 1D ^1H -NMR スペクトル (宮ノ入ら)²⁾

本稿で紹介した Tugarinov 等の MSG の ^{13}C -NMR シグナル帰属には、4組の 4D NMR と 3組の 3D NMR の測定を必要とし、600 MHz, 800 MHz 装置を 1,096 時間使用した⁷⁾。シグナルの帰属のためだけに、1.5 ヶ月の長期にわたり装置を占有したことになる。今から数年内には完成が予想されている高温超電導材料を用いた 1.1-1.3 GHz 級の高分解能 NMR 装置は、一台 20 億円を越える高価格となるようであることから、しばらくは共同利用施設として各研究者が長時間装置を独占的に使用することは困難となるであろう。従って、長時間の実験には、既に広く普及している 500-900 MHz 級の装置を利用し、1 GHz 超の装置に関しては、本稿で述べたより高感度な ^1H -直接観測法を用いて装置占有時間を短縮することが有効となる。このため、間接検出法、 ^1H -直接観測法を組み合わせた新たな安定同位体利用 NMR 技術の発展が切に望まれる。

5. おわりに

SAIL 法は、 $[\text{U-}^{13}\text{C}; ^{15}\text{N}]$ -試料を用いる従来の NMR 解析手法の分子量限界を大きく上回る高分子量のタンパク質の迅速且つ高精度な立体構造解析や構造動態情報の取得を可能とする独創的技術として開発され、これまでに様々な新たな NMR 応用技術を生み出し続けてきた¹³⁾。しかしながら、構造生物学分野における NMR 分光法の役割は、過去数年来の様々な構造解析手法の発展に伴い、新たな局面を迎えつつある。今後数年内には普及が始まると予想される 1 GHz を越える超高磁場 NMR 時代において、NMR 法が統合構造生物学の中核的基盤技術として期待される役割を担うには、圧倒的な高感度を持つ ^1H -NMR 直接観測法の利用を含め、多彩な NMR 解析技術の総合的発展が不可欠である。

本稿で解説したように、SAIL 法は不斉有機合成、発酵・酵素法を組み合わせた高度な安定同位体標識アミノ酸合成技術、タンパク質を効率良く同位体標識するための無細胞系・細胞系発現技術等、様々な先端技術を含む複合的技術であり、今なお進化を遂げつつある。SAIL 法の開発により蓄積された類をみない学術資産が、次世代の NMR 技術開発への貢献に留まらず、PET、質量分析法、MRI、中性子散乱法など様々な異分野における安定同位体事業展開への契機となることを期待している。

6. 謝辞

SAIL 法は 1996 年から 2007 年迄の II 期 10 年間に渡る JST 戦略基礎研究推進事業(代表: 都立大学・甲

斐荘, 研究費総額 16.5 億円)により開発された革新的基盤技術である。その後、事業化を含め文科省、JST 等からの多大な支援を受けて今日に至っている。本稿で紹介した最新の NMR 研究成果は、大陽日酸、SAIL テクノロジーズの協力のもとに、名古屋大学構造生物学研究センターの NMR 装置を用い、首都大学東京(甲斐荘)、及び大阪大学蛋白質研究所(宮ノ入)において得られたものである。本稿への掲載を快く許可していただいた関係各位に感謝する。最後に、執筆にあたり詳細なご指導を頂いた甲斐荘教授に深く感謝する。

参考文献

- 1) Kainosho M, Torizawa T, Iwashita Y, Terauchi T, Ono AM, Güntert P: *Nature* **2006**, *440*, 52.
- 2) Kainosho M, Miyanoi Y, Terauchi T, Takeda T: *J Biomol NMR* **2018**, *71*, 119.
- 3) Terauchi T, Kamikawai T, Vinogradov MG, Starodubtseva EV, Takeda M, Kainosho M: *Org Lett* **2011**, *13*, 161.
- 4) Torizawa T, Shimizu M, Taoka M, Miyano H, Kainosho M: *J Biomol NMR* **2004**, *30*, 311.
- 5) (a) Ikeya T, Takeda M, Yoshida H, Terauchi T, Jee JG, Kainosho M, Güntert P: *J Biomol NMR* **2009**, *44*, 261; (b) Ikeya T, Jee JG, Shigemitsu Y, Hamatsu J, Mishima M, Ito Y, Kainosho M, Güntert P: *J Biomol NMR* **2011**, *50*, 137.
- 6) (a) Pervushin K, Riek R, Wieder G, Wüthrich K: *Proc Natl Acad Sci USA* **1997**, *94*, 12366; (b) Pervushin: *Q Rev Biophys* **2000**, *33*, 161.
- 7) (a) Tugarinov V, Hwang PM, Ollerenshaw JE, Kay LE: *J Am Chem Soc* **2003**, *125*, 10420; Tugarinov V, Kay LE: *J Am Chem Soc* **2003**, *125*, 13868.
- 8) (a) Miyanoi Y, Takeda M, Okuma K, Ono AM, Terauchi T, Kainosho M: *J Biomol NMR* **2013**, *57*, 237; (b) Miyanoi Y, Ishida Y, Takeda M, Terauchi T, Inouye M, Kainosho M: *J Biomol NMR* **2016**, *65*, 109.]
- 9) (a) Torizawa T, Ono AM, Terauchi T, Kainosho M, *J Am Chem Soc* **2005**, *127*, 12620; (b) Takeda M, Ono AM, Terauchi T, Kainosho M: *J Biomol NMR* **2010**, *46*, 45; (c) Miyanoi Y, Takeda M, Jee JG, Ono AM, Okuma K, Terauchi T, Kainosho M: *J Biomol NMR* **2011**, *51*, 425.
- 10) Yang CJ, Takeda M, Terauchi T, Jee JG, Kainosho M: *Biochemistry* **2015**, *54*, 6983.
- 11) 甲斐荘正恒, 寺内勉, 大陽日酸株式会社, 特願 2014-530478, 2013
- 12) (a) Jardetzky O: In *Proceeding of International Conference on Magnetic Resonance* (Tokyo) **1965**, N3; (b) Markley JL, Putter

I, Jardetzky O: *Science* **1968**, *161*, 1249.

- 13) Kainosho M, Miyanoiri Y, Takeda M: In *Experimental Approaches of NMR Spectroscopy-Methodology and Application to Life Science and Material Science* (Ed. The Nuclear Magnetic Resonance Society of Japan) Springer, New York **2018**, 37.