

# P1

固液界面における蛋白質間相互作用解析に向けた、  
転移交差飽和法へのマジック角回転の適用

○豊永翔<sup>1</sup>、大澤匡範<sup>1</sup>、横川真梨子<sup>1</sup>、嶋田一夫<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> 東大・院薬系、<sup>2</sup> 産総研・バイオメディシナル情報研究センター

## Transferred Cross-Saturation Method under Magic Angle Spinning for Structural Analysis of Protein – Protein Interaction at the Solid – Liquid Interface

Shou Toyonaga<sup>1</sup>, Masanori Osawa<sup>1</sup>, Mariko Yokogawa<sup>1</sup> & Ichio Shimada<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Grad. Sch. Pharm. Sci., The Univ. of Tokyo, <sup>2</sup> BIRC, AIST

Bead-linked proteoliposomes (BPLs), where membrane proteins are stabilized in the lipid bilayers at high concentration, can be used as the cross-saturation (CS) donor in the transferred cross-saturation (TCS) analyses. However, solid beads disturb the local magnetic homogeneity, causing the signal broadening of the CS-acceptor. Furthermore, the decreased mobility of the bead-linked protein enhances the dipolar-dipolar (DD) interactions, which might preclude the precise identification of the binding interface by TCS. In order to overcome these problems, we applied magic angle spinning (MAS) to TCS, where a bead-linked protein and its binding protein in solution were used as the CS-donor and acceptor, respectively. MAS-TCS successfully identified the interacting residues at the solid – liquid interface. The effect of MAS rate on the TCS results will be discussed.

**【背景・目的】** 従来の構造生物学的手法では、膜蛋白質は界面活性剤により可溶化された状態で解析されてきた。しかし、膜蛋白質は界面活性剤ミセル中でしばしばその高次構造が不安定化することが知られており、脂質二重膜中にて活性を保持した状態での試料調製法が必要とされる。

これまでに我々は、膜蛋白質をビーズに固定化した状態で脂質二重膜中に再構成する”bead-linked proteoliposome (BPL)”を開発し、NMRを用いた相互作用解析法である転移交差飽和(TCS)法の適用により、カリウムチャンネルとその阻害毒素の複合体解析に成功した(Yokogawa M. *et al.* 2005)。しかし、ビーズの混在により局所磁場が不均一となり、NMR シグナルが大きく広幅化するため、観測対象は 40 残基程度までの蛋白質に制限されていた。また、脂質二重膜中の膜蛋白質のように運動性の低下した分子においては双極子-双極子 (DD) 相互作用が亢進しており、TCS 法において交差飽和が結合界面に限局されず、結合界面が明確に同定できない可能性が懸念されていた。

---

転移交差飽和法、MAS、相互作用解析

○とよなが しょう、おおさわ まさのり、よこがわ まりこ、しまだ いちお

これらの問題に対し、局所磁場の不均一性を解消し DD 相互作用を減弱することが知られているマジック角回転 (MAS) の適用により、スペクトルを高分解能・高感度化すると同時に、遠位の交差飽和の抑制による明確な結合界面の同定が可能になると考えた。

そこで本研究では、MAS 条件下においてビーズに固定化した蛋白質と溶液中の蛋白質の間(固液界面)における相互作用解析を可能とする NMR 手法を確立することを目的とし、試料調製法の開発および TCS 法に対する MAS の効果の評価を行なった。(Fig. 1)

【方法】解離定数(18  $\mu\text{M}$ )および複合体の立体構造が明らかとなっている yeast ubiquitin (Ub : 8.6 kDa)と yeast ubiquitin hydrolase 1(YUH1 : 26 kDa)の相互作用系を用いた。

### (1) 固定化担体・固定化方法の検討

固定化担体としてカルボキシメチル (CM) 基にて修飾された多孔性シリカビーズを用い、ビーズにアミノ基を介して共有結合させた YUH1 の Ub 結合活性を解析した。

### (2) MAS による高感度・高分解能化の評価

ビーズ混在時の Ub の  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC スペクトルを MAS 適用時・非適用時に観測し、Ub 溶液単独の  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC スペクトルとの比較により、感度・分解能を評価した。

### (3) 複数の回転速度における TCS 実験の結果の比較

2 mM 均一  $^2\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$  標識 Ub 溶液 (50 mM NaCl, 50 mM NaPi, pH5.0, 80%  $\text{D}_2\text{O}$ ) にて YUH1 固定化ビーズを平衡化し、NMR 試料とした。25°C において複数の回転速度にて TCS 実験を行ない、結果を比較した。

【結果】(1) 多孔性 CM シリカビーズに固定化した YUH1 の 90%以上は Ub 結合活性を保持していることを明らかとした。

(2) MAS の適用により、ビーズ混在試料の感度・分解能が 5 倍向上した。

ビーズ混在下での Ub の  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC スペクトルの線幅は、MAS により 1/5 に先鋭化し、縮重していた Ub のシグナルをほぼすべて分離して観測することに成功した。

(3) MAS 条件下の TCS 実験において、Ub の YUH1 結合界面を明確に同定できた。

7.0 kHz および 14.5 kHz の MAS 回転速度において TCS (MAS-TCS) 実験を行ったところ、ともに Ub 上の YUH1 結合界面に交差飽和が観測された。7.0 kHz では結合界面だけでなくその周辺残基にも交差飽和が観測されたことから、より高速の MAS により DD 相互作用が抑制されることが示唆された。

【考察】本研究にて得られた結果は、MAS により局所磁場の不均一性が解消されるとともに、ビーズへの固定化により亢進した DD 相互作用が減弱されたことを示している。BPL は膜蛋白質を高濃度で安定に脂質二重膜中に存在させることができるため、今回開発した MAS-TCS 法を適用することにより、脂質二重膜中の膜蛋白質の高感度・高分解能な相互作用解析が可能となった。

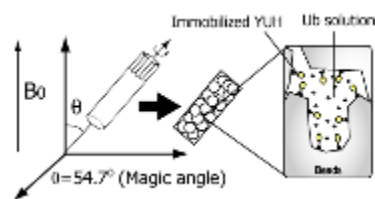


Fig. 1 MAS(左)および MAS 条件下における試料内部の模式図(右)

## 新しい NMR 差スペクトル法

○鶴澤 洵<sup>1,4</sup>、久保田由美子<sup>2</sup>、堀 浩<sup>3</sup>、関 宏子<sup>4</sup>、丑田公規<sup>1</sup>  
理研基幹研<sup>1</sup>、微化研<sup>2</sup>、玉川大生命科学部<sup>3</sup>、千葉大分析センター<sup>4</sup>

## New NMR Difference Spectroscopy

Jun Uzawa<sup>1,4</sup>, Yumiko Kubota<sup>2</sup>, Hiroshi Hori<sup>3</sup>, Hiroko Seki<sup>4</sup> and Kiminori Ushida<sup>1</sup>

<sup>1</sup>RIKEN, Advanced Research Institute, <sup>2</sup>Institute of Microbial Chemistry, Tokyo,

<sup>3</sup>Dept. Life Science, Tamagawa University, <sup>4</sup>Chemical Analysis Center, Chiba University

## Abstract

Difference spectroscopy is a powerful method for the selective observation of small changes against dominant but unchanging background. In this presentation, we will cover some difference spectroscopy technique, such as <sup>1</sup>H {<sup>31</sup>P selective} difference, DPGFSE-SPT-difference, DPGFSE-NOE/ROE-SPT-difference spectroscopy methods.

For Q-mucin, we applied <sup>1</sup>H {<sup>31</sup>P sel.} diff. technique, and obtained the information of coupling constants implying the AEP substituted GalNAc at 2 or 3 positions. Also, we applied DPGFSE-ROE-SPT-diff. technique to analyze a branched mannopentose as model of high mannose type *N*-glycan.

## 序論

構造解析の主流である X 線回折装置、質量分析装置、NMR 装置の進歩は目覚ましいものがある。これらを比較すると、結晶なら Spring8 を含む X 線結晶回折、微量ならば質量分析となり、NMR の出番はこれらに挟まって減って来ており、高価な装置を有効に使いきって無い面も見受ける。一方で、結晶化が困難なもの、単離の困難なもので、生物活性や薬効等で興味深いものでも構造解析が棚上げされているものも多い。NMR は他に比べて混合物の解析が詳細にできる特徴を持っている。スペクトルが重なり合って解析が困難なものについては一次元の差スペクトル法が古くから使われてきたが、多次元 NMR の発展で影を潜めていた。一次元測定には、測定時間の短縮と一番知りたいことに焦点を絞れるというメリットがある。

近年、糖鎖および糖タンパク質類の研究はポストゲノム時代を迎えて重要性を増している。とりわけ、リン酸の結合した糖鎖類は生命科学的にも重要であるが、その詳細な構造解析には困難が伴っている。演者らはくらげから抽出したムチン(Q-mucin)の構造研究を行っている。Q-mucin は 8 個のアミノ酸からなるププチド (-Val-Val-Glu-Thr-Thr-Ala-Ala-Pro-) が数十個タンデムに連なって構成された糖タンパク質である。このペプチド鎖の Thr に結合した GalNAc の 6 位に Amino- Ethyl-Phosphonate(AEP) が結合している化合物が多く存在することがわかった。<sup>1,2)</sup>

---

キーワード：差スペクトル、糖鎖、ムチン

うざわ じゅん、くぼた ゆみこ、ほり ひろし、せき ひろこ、うしだ きみのり

本発表では、 $^{31}\text{P}$  デカップリング差スペクトル法や Selective Population Transfer (SPT) 法を捉え直して、ポストゲノムのテーマの一つである糖鎖ならびに糖タンパク質の構造解析に応用できるような測定法についてまとめたので報告する。差スペクトル法には宿命的に Bloch-Siegert シフト (BS シフト) があり、これが最も利用価値の高かった  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  間の差スペクトル法の普及を妨げたが、 $^{31}\text{P}$  を照射する場合は共鳴周波数が全く違うので BS シフトが無く、SPT では観測時にデカップリングをしてないので問題にならない。

本発表では、市販のリン酸が結合した糖および Q-mucin ならびにアスパラギン型糖鎖の基本的なマンノオリゴ糖を例に、これらの応用例について述べる。

## 結果と考察

### 1 BS シフト

NMR の分野における BS シフトは下記の式であらわされる。<sup>3)</sup>

$$\Delta = \nu_n - \nu_0 = K / \nu_{\text{irr}} - \nu_0 \quad [1]$$

ここで、 $\Delta$  は BS シフトの周波数、 $\nu_n$  は二重共鳴による新しい周波数、 $\nu_0$  はオリジナル共鳴周波数、 $K$  は照射周波数強度で  $(\gamma B_2 / 2\pi)^2 / 2$ 、 $\nu_{\text{irr}}$  は二重共鳴の照射周波数である。[1] 式によれば、照射周波数が離れていれば BS シフト小さくなり、照射強度が小さければ BS シフトは小さくなる。最近流行の STD (Saturation Transfer Difference) 法では照射領域をアロマティック領域として BS シフトを避けている。

### 2 $^{31}\text{P}$ デカップリング差スペクトロスコピー

今回、 $^{31}\text{P}$  を選択的にデカップリングしてオフレゾナンス部分をデカップリングしたスペクトルとの差をとることにより、複雑に重なり合ったスペクトルからリン酸基の結合した部分のみを特異的に観測する方法を検討した。 $^{31}\text{P}$  のデカップリング差スペクトルでは照射周波数が大きく離れているので BS シフトは問題にならない。

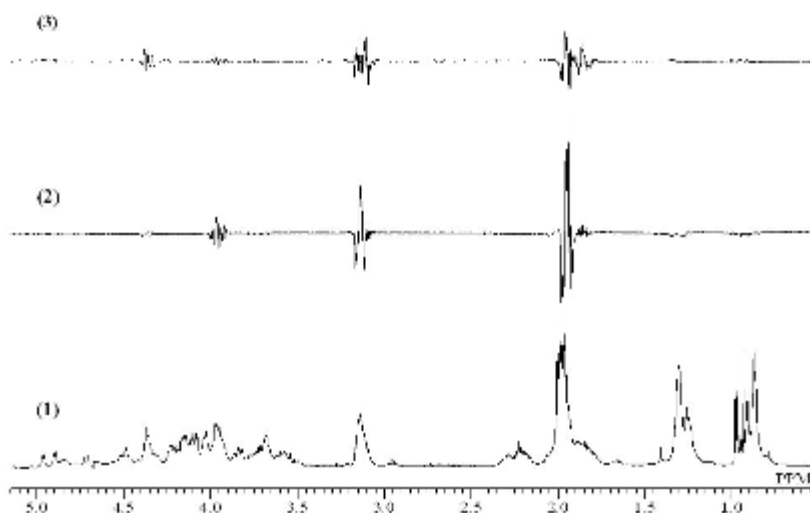


Fig. 1  $^1\text{H}$   $\{^{31}\text{P}$  sel. $\}$  diff. spectra of Q-mucin in  $\text{D}_2\text{O}$ . (1) Original 1D (pre-saturation for HDO).

(2)  $^{31}\text{P}$  irradiation at 22.1ppm. (3)  $^{31}\text{P}$  irradiation at 21.7ppm.

まず市販のリン酸化糖について検討を行い、グルコース 1 リン酸と 6 リン酸、マンノース 6 リン酸については  $\alpha$  と  $\beta$  について個別にデカップリングして 6 位プロトンの詳細なスピン結合定数を求めることができた。

Q-mucin について測定した結果を Fig.1 に示す。 $^{31}\text{P}$  の 22.1ppm は Q-mucin の主成分であり、 $^1\text{H}$  の 4.0ppm は GalNAc の 6 位メチレン、3.15ppm と 2.0ppm は AEP のメチレンである。 $^{31}\text{P}$  の 21.7ppm と結合している  $^1\text{H}$  の 4.4ppm は差スペクトルのシフトとパターンから結合部位は 6 位でなく、両サイドのプロトンと trans 結合している位置に AEP が結合しているのではないかと考えている。

### 3 DPGSE\_SPT\_差スペクトロスコピー

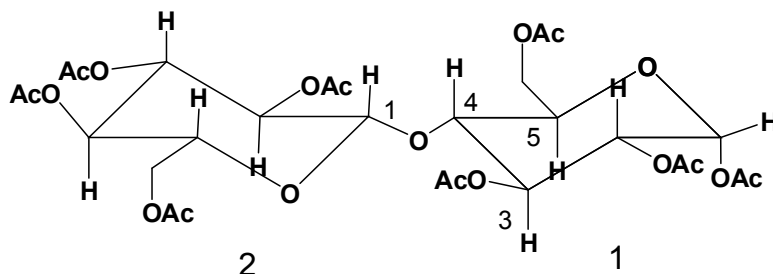
SPT 法には、スピン結合により分裂した 1 本のピークを照射するための照射パワーが非常に弱く選択性が良いことと BS シフトが無いという利点を持っている。<sup>4)</sup>

2004 年に発表された SPT 法<sup>5)</sup> を基本に、スピン結合で分裂した複数のピークを照射して差をとる方式に変え、位相回しを再検討することにより 2 倍程度感度を向上させることができた。複雑に分裂したピークにこれを適用する場合は注意を要する。

### 4 DPGSE\_NOE/ROE\_SPT 差スペクトロスコピー

一次元の DPGSE-NOE/ROE 法は二次元全盛の今日でも小さな NOE/ROE をみることができるので構造解析の分野で定着している。この情報をさらに発展させる目的で、NOE/ROE により出てきた信号を SPT により、これとスピン結合した相手に伝えるシーケンスを考案した。これを Cellobiose-8OAc を例に Fig.2 で説明する。

1-4 結合の糖では 1 位を照射したときは結合した相手の 4 位に NOE が (1) のように見られる。この時 4 位を SPT 照射すると (2) のようにスピン結合した相手の 3 位と 5 位に SPT 信号が見られる。3 で述べた Diff-SPT 差スペクトル法では (3) に示すように、SPT のみ感度良く測定できる。1-4 結合ばかりでなく、1-3 結合の糖でも全く同様の考え方で進めることができる。この測定法は NOE/ROE 信号が複数出て、しかも重なって出た場合にも判別できる。また、アスパラギン型糖鎖の基本骨格を構成する mannose 5 個のオリゴ糖の 1-6 結合した部位に関する 6 位の配座解析に必要な情報を ROE-SPT 差スペクトルにより、より正確に決めることができた。ただし、スピン結合定数が大きく化学シフトが近接している場合は解析に困難が伴う。



Structure of Cellobiose-8OAc

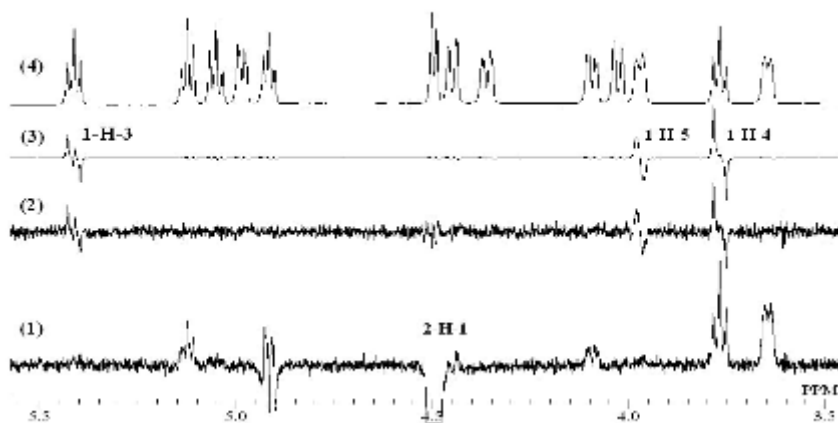


Fig. 2 NOE, NOE-SPT-diff, Diff-SPT spectra of Cellobiose-OAc in  $\text{CDCl}_3$ .

(1) NOE irr. at 4.50ppm. (2) NOE-SPT-diff; NOE irr. at 4.50ppm and SPT irr. at 3.75 and 3.78ppm. (3) Diff-SPT spectra; SPT irr. at 3.75 and 3.78ppm. (4) Original 1D.

### 結びにかえて

1  $^1\text{H}$   $\{^{31}\text{P}$  selective} 差スペクトル法ではリン酸結合部位の情報を二次元法に比べて短時間で得られた。注意深く測定することによりスペクトルパターンから、化学シフトばかりでなく、糖との結合部位のカップリング情報が得られるという利点がある。これによって、文献2において帰属不可能であった糖の部分について知見を得た。

2 本発表の DPFGE\_SPT 差スペクトル法は、オフレゾナンス周波数を照射するのではなく、もう1本のピークを照射して差をとる方式とし、位相回しを Cyclope 式にして、従来のほぼ2倍の感度で測定できた。

3 COSY/TOCSY 信号を NOE/ROE に展開して、より詳細な情報を得るための測定法は開発されてきたが<sup>6,7)</sup>、逆に NOE/ROE 信号を COSY/TOCSY に展開することは、NOE/ROE 照射のプロトンからの COSY/TOCSY 信号が圧倒的に強く出たため実用的ではない。今回、NOE/ROE 信号を SPT に展開することで、糖鎖間の結合情報などを得る測定法として提起したい。

### References

- 1 J.Uzawa, M.Urai, T.Baba, H.Seki, K.Taniguchi and K.Ushida, *J. Nat. Prod.*, **72**, 818 (2009).
- 2 M.Urai, T.Nakamura, J.Uzawa, T.Baba, K. Taniguchi, H.Seki and K.Ushida, *Carbohydr.Res.*, **344**, 2182 (2009).
- 3 J.D. Mersh and J.K.M. Sanders, *J.Magn.Reson.*, **50**, 289(1982).
- 4 J.K.M.Sanders and B.K.Hunter, *Modern NMR spectroscopy*, P-143, Oxford-Univ.Press, 1987.
- 5 J. Uzawa and S. Yoshida, *Magn. Reson. Chem.*, **42**, 1046(2004).
- 6 M.J.Grandwell, H.Kogelberg and T.A.Frenkiel, *J.Magn.Reson.*, **124**, 267(1997).
- 7 H.Dvorakova, R.Hrabal and L.Knienzo, *Magn.Reson.Chem.*, **38**, 738(2000).

# P3

## 低分子リガンド-標的タンパク質の新規エピトープマッピング法

○水越 弓子<sup>1,2</sup>、阿部 綾<sup>1,2</sup>、竹内 恒<sup>2</sup>、嶋田 一夫<sup>2,3</sup>、高橋 栄夫<sup>2,4</sup>

<sup>1</sup>(社)バイオ産業情報化コンソーシアム, <sup>2</sup>(独)産総研・バイオメディシナル情報研究センター, <sup>3</sup> 東大薬, <sup>4</sup>横浜市大院・生命ナノ

### A novel epitope-mapping method by NMR

○Yumiko Mizukoshi<sup>1,2</sup>, Aya Abe<sup>1,2</sup>, Koh Takeuchi<sup>2</sup>, Ichio Shimada<sup>2,3</sup>, Hideo Takahashi<sup>2,4</sup>

<sup>1</sup>Japan Biological Informatics Consortium (JBIC), Tokyo, Japan. <sup>2</sup>Biomedical Information Research Center (BIRC), National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), Tokyo, Japan. <sup>3</sup>Graduate School of Pharmaceutical Sciences, The University of Tokyo, Tokyo, Japan. <sup>4</sup>Department of Supramolecular Biology, Graduate School of Nanobioscience, Yokohama City University, Yokohama, Japan.

NMR spectroscopy has become an indispensable tool in chemical biology, drug discovery, and structural genomics. To date, a broad range of experiments is available to screen for or to analyze protein-ligand interactions. Among them, the saturation transfer difference (STD) experiment is most widely used for the investigation of protein-ligand interactions. However, there exists a potential problem of STD method that the longitudinal relaxation of ligand protons severely interferes with the derived epitope mapping. In this paper, we propose an alternative and simple approach for epitope mapping, which utilizes the difference between the longitudinal relaxation rates of ligand protons with and without irradiation of target protein protons. We applied this method to some ligand/protein interactions and obtained qualitatively consistent results with the estimated proton density around each ligand proton.

溶液NMR法において、リガンド創薬デザインに供するような構造情報を得る手法としては、これまでSTD (saturation transfer difference) 法を活用した、簡便で感度の高いエピトープ解析法が提案されている。しかしながら、薬物分子のような多種の官能基を持つ低分子ではそのプロトン毎の縦緩和時間 ( $T_1$ ) の差が大きく影響を与えるため、得られたデータの定量性が失われることが問題視されてきた(*J. Magn. Reson*, **2003**, *163*, 270-276.)。

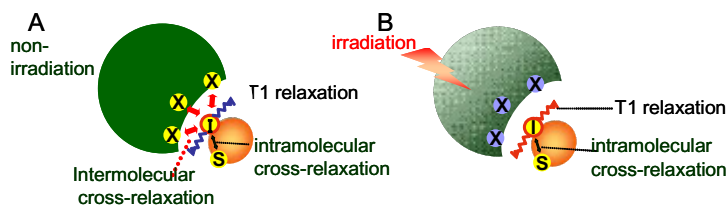


Figure1. A schematic representation of longitudinal relaxation of ligand proton (I) in the bound state.

### Epitope mapping, STD, longitudinal relaxation rates

○みずこし ゆみこ、あべ あや、たけうち こう、しまだ いちお、たかはし ひでお

Fig. 1 に模式図で示すように、タンパク質を照射したことによる飽和の影響は、リガンドのプロトンとタンパク質のプロトン間の距離によって変わるとともに、リガンドの各プロトンの $T_1$ にも影響されるため、 $T_1$ がそれぞれのプロトンで異なるときにはSTDの定量性が著しく損なわれる。この $T_1$ の影響を排除することができれば、精度の高いエピトープマッピングが可能となり、リガンドベース創薬開発に活用可能な情報が得られることになると考えられる。図1中リガンドプロトンIの緩和機構を式で表すと、

$$\frac{dI_z}{dt} = -R_I I_z - \sum_S \sigma_{IS} S_z - \sum_X \sigma_{IX} X_z$$

となる。 $I_z$ 、 $S_z$ 、 $X_z$ は、それぞれ核I, S (リガンド内の他のプロトン) , X (標的タンパク質のプロトン) の平衡磁化の影響を消去した後のZ磁化である。ここで、 $dI_z/dt$  は $I_z$ の時間当たりの変化、右辺第1項はプロトンI本来の縦緩和、第2項はリガンド内の他のプロトンとの交差緩和の総和、第3項は標的タンパク質との分子間交差緩和の総和によるものである。タンパク質の照射時・非照射時の緩和速度の差は、右辺の第3項の分子間の交差緩和の寄与が主となるため、各プロトン固有の $T_1$ の影響は排除できる。この原理に基づき、複数のリガンド-タンパク質を用いてエピトープマッピングを行った。

標的タンパク質MAPK p38 $\alpha$ 、およびその低分子リガンドSB203580 (MAPK 阻害剤) (Fig. 2a) を用いたエピトープマッピングの結果をFig. 2b に示した。非照射時と照射時の縦緩和速度の差はH1, H4/5, H6に比べてH2, H3, Meで小さかった。この結果の妥当性を調べるため、SB203580とMAPK p38の複合体のX線結晶解析座標(PDB code: 2ewa)をもとに、分子間プロトン距離の6乗分の1の総和 $\Sigma(1/r^6)$ を計算した。この $\Sigma(1/r^6)$ はリガンドがタンパク質から受ける交差緩和の影響と比例すると期待される。Fig. 2cに示す様に、それぞれのプロトンがタンパク質から受ける交差緩和の影響の大小は、NMRによる新規エピトープマッピングによる結果から得られたものと良く一致していた。

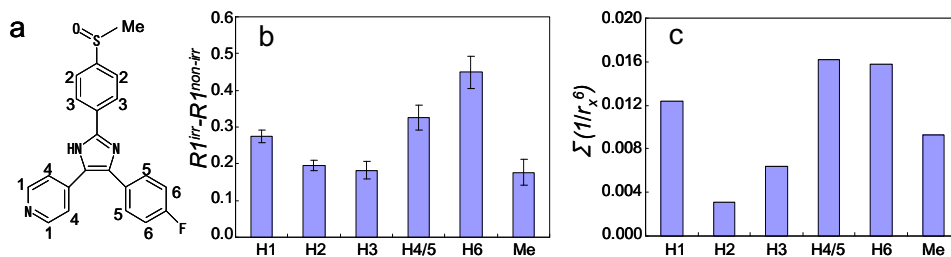


Figure 2. a; p38 MAPK inhibitor SB203580, b; the experimental result of a novel epitope mapping, c; predicted proton density around inhibitor proton (<10 Å) from PDB code: 2ewa.

事実、複合体の結晶解析から、H1, 4, 5, 6のある二つの芳香環は結合ポケットの奥深くに入り、H2, 3の芳香環はポケット入り口付近に存在していることが明らかとなっている。本研究で開発した手法によって定量性に優れたエピトープマッピングが可能になったことで、結合に重要な官能基をより正確かつ簡便に求めることができると期待される。



## P4

### 常磁性ランタニドプローブ法を用いた薬剤探索

○齊尾智英<sup>1</sup>、小椋賢治<sup>2</sup>、小橋川敬博<sup>2</sup>、横地政志<sup>2</sup>、稲垣冬彦<sup>2</sup>

<sup>1</sup>北大生命科学、<sup>2</sup>北大先端生命

#### **Paramagnetic lanthanide probe as a tool for drug discovery**

○Tomohide Saio<sup>1</sup>, Kenji Ogura<sup>2</sup>, Yoshihiro Kobashigawa<sup>2</sup>, Masashi Yokochi<sup>2</sup>  
and Fuyuhiko Inagaki<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Graduate School of Life Science, Hokkaido University, and

<sup>2</sup>Faculty of Advanced Life Science, Hokkaido University

We are developing an NMR ligand screening method, which can rapidly determine the structure of the ligand-protein complex as well as identify the ligand from the compound library. This method exploits the paramagnetic lanthanide probe. The paramagnetic lanthanide ion is attached to the target protein *via* the two-point anchored lanthanide-binding peptide tag. By observing the paramagnetic effects from the <sup>1</sup>H NMR spectrum of the ligand, the ligand that binds to the target protein can be identified. Furthermore, the structure of the ligand-protein complex can be determined by the quantitative analysis of the paramagnetic effects. This method is demonstrated using the Grb2 SH2 domain and its inhibitors, as an example.

【序論】薬剤探索手法の一つである FBDD (Fragment Based Drug Discovery) は、比較的小さな化合物 (フラグメント) に対するスクリーニングによって結合活性のあるフラグメントを探索し、それらを連結 (リンキング) または拡張 (グローイング) することでより高活性な化合物を作り出す手法である。NMR は FBDD 初期のフラグメントスクリーニングで用いられることが多いが、NMR を用いたスクリーニング手法には、タンパク質側の NMR 信号を観測するものとリガンド側の信号を観測するものの2種がある。タンパク質信号を観測する場合、<sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HSQC スペクトルなどを用いてリガンド結合に伴うタンパク質信号の化学シフト摂動を評価する。この手法はリガンドの結合部位に関する立体構造情報を取得できるという利点があるが、一方で安定同位体標識したタンパク質試料が多く必要であることや NMR 測定時間が長いためにスループット性が低いという欠点も存在する。リガンドベースの手法では、主にリガン

---

key words: 常磁性ランタニド, ランタニド結合タグ, リガンドスクリーニング

○さいお ともひで、おぐら けんじ、こばしがわ よしひろ、よこち まさし、  
いながき ふゆひこ

ドの  $^1\text{H}$  次元 NMR 測定を主体とするため比較的高スループットであるが、タンパク質に対する結合部位の情報を得るのが困難であるという短所もある。そこで我々は、常磁性ランタニドプローブ法を応用し、スループット性が高く、かつリガンド-タンパク質間の立体構造情報が取得可能なスクリーニング手法の開発に着手した。

【実験・結果】我々は常磁性ランタニドプローブを応用し、ヒット化合物を同定するとともに複合体構造を迅速に決定する次のような NMR スクリーニング手法を考案した (Fig. 1)。

①対象タンパク質にランタニド結合タグ (LBT) を導入し、ランタニドイオンを固定する。タンパク質の NMR 信号から pseudo-contact shift (PCS) を観測し、磁化率テンソルを決定する。  
 ②化合物溶液に対象タンパク質を加え、NMR スペクトルを取得する。  
 ③ランタニドイオンを加え、NMR スペクトルを取得する。  
 ④差スペクトル (②-③) をとることでヒット化合物由来の NMR 信号を抽出する。このとき、正符号の信号を解析することでヒット化合物を同定し、正負の信号の化学シフト差から PCS の値を得る。  
 ⑤PCS に基づいてドッキング計算を行うことで、ヒット化合物-タンパク質の複合体構造を決定する。

複合体の立体構造が既知である Grb2 SH2 ドメインとその阻害剤をモデルとし、手法の検証を行った。まず Grb2 に LBT を導入してランタニドイオンを固定し、Grb2 の PCS に基づいて磁化率テンソルを決定した。次に  $\text{Tm}^{3+}$ 、 $\text{Tb}^{3+}$  の 2 種のランタニドイオンを用いて阻害剤の PCS を計 39 個取得し、それらに基づいて構造計算を行った。その結果、NOE に基づいて構造決定した場合 (1X0N.pdb) と同様の複合体構造を得た (Fig. 2)。現在は、より実際のスクリーニングを近似した系として、より親和性の低い化合物を用いた解析を行っている。

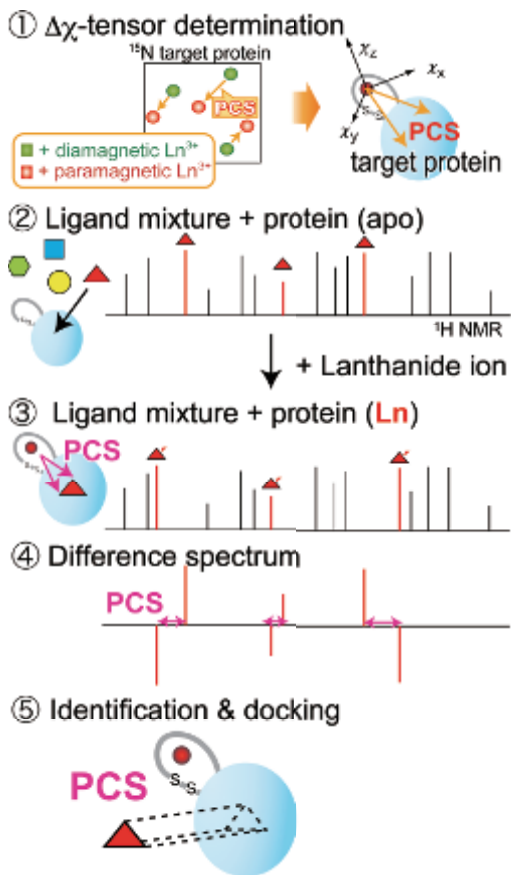


Fig. 1 Schematic overview of the lanthanide probe-based ligand screening method

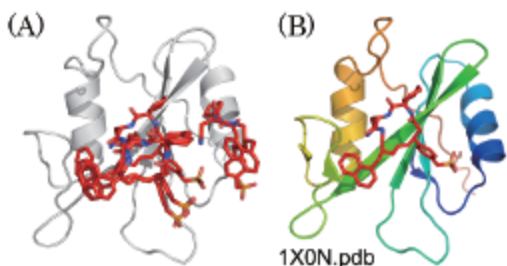


Fig. 2 Structure of Grb2 SH2-inhibitor complex, determined based on PCS (A), and NOE (B).

## P5

### 950 MHz NMRによる蛋白質の<sup>13</sup>C直接観測

○古板 恭子<sup>1</sup>、池上 貴久<sup>1</sup>、藤原 敏道<sup>1</sup>、児嶋 長次郎<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>阪大・蛋白研、<sup>2</sup>奈良先端大・バイオ

#### <sup>13</sup>C-direct detection of protein using 950 MHz NMR

○Kyoko Furuita<sup>1</sup>, Takahisa Ikegami<sup>1</sup>, Toshimichi Fujiwara<sup>1</sup> and Chojiro Kojima<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Institute for Protein Research, Osaka University, Osaka, Japan., <sup>2</sup>Graduate School of Biological Sciences, Nara Institute of Science and Technology, Nara, Japan.

<sup>13</sup>C-direct detection NMR experiments are now becoming routinely available for protein researches in solution, thanks to increased sensitivity of NMR due to developments of high-field magnets and cryogenic probes. Here, we measured various <sup>13</sup>C-detected 2D NMR spectra using 950 MHz NMR. A high-quality <sup>13</sup>C-detected 2D NMR spectrum was successfully measured in about five minutes with a 1 mM protein sample. Comparison of the measured <sup>13</sup>C-detected 2D NMR spectra showed that long  $T_1$  and short  $T_2$  period characteristic of high magnetic field clearly affect qualities of spectra.

#### [導入]

超高磁場化や極低温プローブなどによる溶液NMR装置の高感度化に伴い、タンパク質の<sup>13</sup>C核直接測定が現実的なものとなりつつある。大多数のNMR測定では、<sup>1</sup>H核がその感度の良さから直接観測核として用いられる。しかしながら、<sup>1</sup>H核に高感度をもたらすそのγ値の高さは同時に核スピン緩和を促進するため、高分子量のタンパク質や、常磁性金属を含むタンパク質では、<sup>1</sup>H核検出は困難となる。<sup>13</sup>C核直接測定は<sup>1</sup>H核検出が困難な系において、タンパク質の情報を得るための有力な手段となり得る。本研究では、<sup>13</sup>C核直接観測の実用性を検討するため、950 MHz超高磁場溶液NMR装置を用いて各種<sup>13</sup>C核直接観測二次元スペクトルを測定し、それらの感度を比較した。

#### [方法]

すべての測定は、極低温プローブを備えた AVANCE III 950 MHz NMR装置 (Bruker) を用い、303 Kで行った。サンプルには1 mM <sup>13</sup>C,<sup>15</sup>N標識ユビキチンを用いた。パルスプログラムはBruker標準のものを用いた。シグナル/ノイズ (S/N) 比は、TOPSPIN 2.1 (Bruker)を用いてプロセッシングした各スペクトルから、単離した2つのピークを選び、それぞれのS/N比をTOPSPINのSINOコマンドにより求め、それらの平均をとることで決定した。スペクトル間のS/N比の比較に用いた測定は、積算回数4 (ただし、in-phase antiphase (IPAP)もしくはspin-state-selective excitation (S<sup>3</sup>E) virtual decouplingを含む測定に関しては2、double IPAP (DIPAP) virtual decouplingを含む測定に関しては1)、パルス繰り返し時間は1秒で行った。パルス繰り返し時間のS/N比への影響を調べるための測定は、IPAP virtual decouplingを含む Single Quantum Constant Time evolution (SQCT)-CACOパルス系列を用い、積算回数1で行った。全ての測定においてレシーバーゲインの値は統一した。

---

超高磁場、溶液、<sup>13</sup>C 直接測定

○ふるいた きょうこ、いけがみ たかひさ、ふじわら としみち、こじま ちょうじろう

Table 1. S/N ratios of various  $^{13}\text{C}$ -detected spectra.

CACO sequence	S/N
MQ	13.0
SQCT	13.0
SQCT-IPAP	14.3
SQCT-S <sup>3</sup> E	16.8
COCA sequence	
SQCT	12.1
SQCT-DIPAP	8.9
CON sequence	
MQ	4.2
SQCT	4.4
MQ-IPAP	5.0
SQCT-IPAP	5.0

Table 2. S/N ratios of spectra measured with different repetition delays.

repetition delay	S/N
1 sec.	8.1
3sec.	16.0
5sec.	20.4

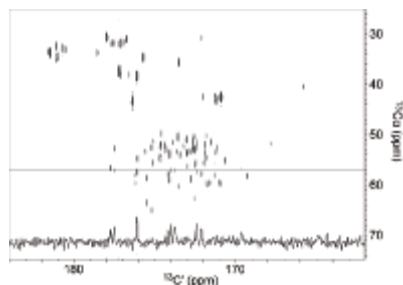


Figure 1.  $^{13}\text{C}$ -direct detected SQCT-CACO spectrum with IPAP virtual decoupling of 1 mM ubiquitin measured in about 5 minutes. 1D slice corresponding dotted line in the spectrum is shown at the bottom of the spectrum.

### [結果と考察]

$^{13}\text{C}$ 核直接観測スペクトルの感度を調べるため、CACO系列（直接観測： $\text{C}'$ 、間接観測： $\text{C}^\alpha$ ）のMultiple Quantum (MQ)-CACO、SQCT-CACO with or without IPAP or S<sup>3</sup>E virtual decoupling、COCA系列（直接観測： $\text{C}^\alpha$ 、間接観測： $\text{C}'$ ）のSQCT-COCA with or without DIPAP virtual decoupling、CON系列（直接観測： $\text{C}'$ 、間接観測： $\text{N}$ ）のMQ-CON with or without IPAP virtual decoupling、SQCT-CON with or without IPAP virtual decouplingスペクトルを測定した。これらのS/N比をTable 1に示す。CONスペクトルは $\text{C}'$ - $\text{C}^\alpha$ 相関スペクトルよりも感度が劣っていた。これは、 $^1\text{J}_{\text{C}'\text{N}}$ は15 Hz、 $^1\text{J}_{\text{C}'\text{C}^\alpha}$ は55 Hzであること、及び $^{15}\text{N}$ 核の $\gamma$ 値が $^{13}\text{C}$ 核より小さいことから、CON系列は $\text{C}'$ - $\text{C}^\alpha$ 相関係列よりも磁化移動のための時間が長いからだと考えられる。CACO及びCON系列では、virtual decouplingを用いることでS/N比が向上した。IPAPより、S<sup>3</sup>Eを用いる方がS/N比が良かった。これはS<sup>3</sup>Eの方が短時間だからだと考えられる。COCA系列では、直接観測軸（ $\text{C}^\alpha$ ）に $\text{C}'$ 及び $\text{C}^\beta$ の2つの核とのカップリングの影響がでるため、virtual decouplingにDIPAP法を用いる必要があるが、これを用いたスペクトルは、用いないものよりもS/N比が低下していた。これは、DIPAP法が複雑であることと、acquisitionまでに通常のCTSQ-COCAパルス系列に余分の時間が追加されていることが関与していると考えられる。比較したスペクトルのうち、比較的感度の良かったCTSQ-CACO with IPAP virtual decouplingスペクトルの積算回数を1として測定したところ、およそ5分間で良好なスペクトルが得られた (Figure 1)。

次にパルス繰り返し時間のS/N比への影響を検討した。1、3及び5秒に設定し測定をしたところ、パルス繰り返し時間の増加に伴いS/N比の向上が見られた (Table 2)。

950 MHz NMR装置で測定した各種 $^{13}\text{C}$ 核直接観測スペクトルには、高磁場条件下における長い $T_1$ と短い $T_2$ の影響が明らかに現れていた。そのため、従来の $^{13}\text{C}$ 核直接測定パルス系列では高磁場化による感度上昇のメリットが生かしきれないと考えられた。そこで、我々は高磁場条件下における緩和特性に適した高感度化高速化を可能にする新規 $^{13}\text{C}$ 核直接観測パルス系列を開発中である。発表では、この新規パルス系列の詳細とタンパク質への応用についてもふれたい。

# P6

## バイオマスの特性とその分解に関わる微生物叢の共相関解析の試み

○小倉 立己<sup>1</sup>, 伊達 康博<sup>1,2</sup>, 菊地 淳<sup>1,2,3,4</sup>

<sup>1</sup>横浜市大院生命, <sup>2</sup>理研PSC, <sup>3</sup>名大院生命農, <sup>4</sup>理研BMEP

### Correlation analysis of the microbiota responsible for a variety of biomass characters

○ Tatsuki Ogura<sup>1</sup>, Yasuhiro Date<sup>1,2</sup>, Jun Kikuchi<sup>1,2,3,4</sup>

<sup>1</sup>Grad. Sch. NanoBio., Yokohama City Univ., <sup>2</sup>RIKEN PSC, <sup>3</sup>Grad. Sch. Bioagri., Nagoya Univ., <sup>4</sup>RIKEN BMEP.

Understanding degradation process of lignocelluloses based on their chemical compositions and structures in soil microbial ecosystems could be contributed for effective use of plant biomass and searching useful bacteria and degradation enzymes. We are attempting an elucidation of the microbial activity of biomass degradation process in soil ecosystems by using the meta correlation analysis based on various factors such as soil types, microbial community, and structures of lignocelluloses. In this study, we focused on analysis of biomass degradation activity in rice paddy soil from rice straw samples pretreated different higher-order structure of lignocelluloses. Obtained time-course NMR data were calculated as principal component analysis for monitoring the metabolic dynamics of microbial ecosystems in soil during its biomass degradation process.

【序論】 土壌環境に棲息する多種多様な微生物は、様々な分解反応場を形成し、地球科学的に極めて重要な各種元素の物質循環を担っている<sup>1)</sup>。これら土壌微生物叢によるバイオマスの分解特性に言及すると、既往研究では不明な点が多い。一方、植物バイオマスの主成分で難分解性物質であるリグノセルロースは、再生可能な有機資源として現在注目されており<sup>2)</sup>、リグノセルロースの構造情報に

基づいた土壌中微生物分解特性を評価することは、自然環境中におけるバイオマス分解特性の理解と工学的な応用の両面において重要である。そこで我々は、入力する植物バイオマス種や高次構造の相違、反応場としての種々の土壌等、多様な因子におけるメタ相関解析を試みており、その一端として本会では、収穫後に水田環境中で放置され分解されるイネワラに着目し、物理的破碎条件の違いに基づく水田土壌生態系のバイオマス分解特性の評価を試みた。

微生物叢、バイオマス分解、メタ相関解析

○ おぐら たつき、だて やすひろ、きくち じゅん

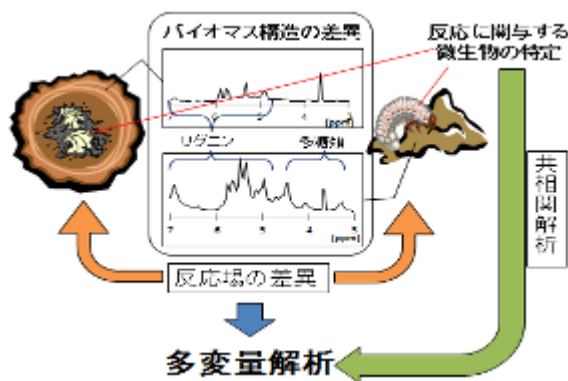


Fig.1 Illustration of our meta correlation analysis system between biomass characters and their degrading microbiota.

【方法】本研究では物理的破碎条件の違いに基づく水田土壤生態系のバイオマス分解特性を明らかにするため、バイオマス原料としてイネワラを凍結乾燥し、ミキサーを用いて粗粉碎した。得られたバイオマス粉末は、オートミルやボールミル等を用いて微粉碎処理を施すことにより、バイオマスの立体構造が異なるサンプルを用意した。これら各々を水田土壤とともに振とう培養を行うことで、水田土壤生態系におけるバイオマス分解特性を評価した。サンプリングは、時系列的に毎日行い、固体中および溶液中の微生物叢およびその代謝産物の時系列変化をNMRや分子生態学的解析手法を用いて計測した。

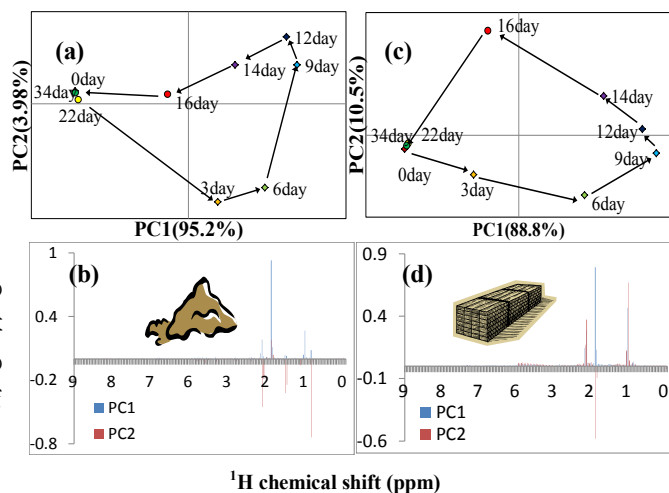
### 【結果および考察】

水田土壤微生物叢によって代謝された溶液中の代謝産物をNMRにより計測し、得られたデータをbin化処理により数値マトリクス化し、PCAを行った(Fig.2)。スコアプロットの結果から、代謝産物は時間依存的に変化していた。またPCAのローディングプロットから、ボールミルにより微粉化されたバイオマスを添加した実験系においては、酢酸、プロピオン酸がPC1方向に、酪酸がPC2方向に大きく寄与していた。一方、微粉碎処理を施していないバイオマスを添加した実験系においては、酢酸がPC1方向に、プロピオン酸がPC2方向に大きく寄与していた。これらの結果を総合すると、物理的破碎条件の違いによって、産生される代謝産物に違いが認められた。すなわち、水田土壤中に存在する微生物叢は、物理的破碎条件の違いに起因して異なる反応場を形成し、異なるバイオマス分解活性を示すことが明らかとなった。このことは、微粉碎処理を施すことによりバイオマスの高次構造が壊れ、土壤微生物が利用しやすい状態となったために異なる代謝活性を示す結果になったと考えられる。

【展望】今回の解析結果から、物理的破碎条件の違いは土壤中微生物叢の分解反応に影響することが示された。本会ではさらに、高次構造が破壊されたリグノセルロースの分解に関わる有用微生物叢についても解析を行い、今回得られた代謝動態との共相関性についても議論したい。また、このような微生物叢の解析を行うことで、様々な既往研究で蓄積された土壤微生物叢に関する知見との統合が図れると期待している。

### 【参考文献】

- 1) Dorrepaal *et al.* (2009) *Nature* **460**, 616-619; Taylor *et al.* (2010) *Nature* **464**, 1178-1181.
- 2) 菊地淳, 植物の生長調節, **43**, 144-155 (2008). 菊地淳ら, 未利用バイオマスの活用技術と事業性評価, Sci&Tech.出版 (in press).



**Fig.2.** PCA of 1D-NMR data matrices for degradations of rice straw biomass. (a): Score plot of ball-milling rice. (b): Loading plot of (a). (c): Score plot of blender-cutting rice. (d): Loading plot of (d).

# P7

## The Orange Domain of Basic-Helix-Loop-Helix Transcription Factor SHARP2 binds to class B E-box sequence

OMohammed S. Mustak<sup>1</sup>, Riyo Yoshikawa<sup>1</sup>, Kazuya Takahashi<sup>1</sup>, Ojeiru F. Ezomo<sup>1</sup>, Yuta Nakamura<sup>1</sup>, Kazuya Yamada<sup>2</sup>, Shunsuke Meshitsuka<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Institute of Regenerative Medicine and Biofunction, Graduate School of Medical Science, Tottori University, 86 Nishi-machi, Yonago 683-8503, Japan.*

<sup>2</sup>*Department of Health and Nutritional Science, Faculty of Human Health Science, Matsumoto University, 2095-1 Niimura, Matsumoto, Nagano 390-1295 Japan*

The basic helix-loop-helix (bHLH) proteins that belong to a super-family of DNA binding transcription factors play an important role in development and differentiation of the eukaryotic cells. The SHARP2 belong to the bHLH superfamily of proteins and consists of 411 amino acids with bHLH motif (residues 53-109 amino acids) in the N terminal region, an orange domain (residues 140-184 amino acids) in the central region and a proline rich domain (residues 310-385 amino acids) in the C-terminal region. The E-box sequence (5'-CANNTG-3') has been identified in promoter and enhancer elements of a number of cell type-specific genes and controls the transcription of these genes in important developmental processes. The basic region, HLH domain and C-terminal of bHLH proteins are known for their DNA binding, dimerization and repression function respectively. However, the function of Orange domain is still unclear. Therefore, the present study was aimed to explore function and structure of the Orange domain of SHARP2. Interestingly, the present NMR, Surface Plasmon Resonance and Gel shift assay results showed that the Orange domain has ability to interact with E-box DNA.

The Orange domain of SHARP2 have sub-cloned into pGEX-2T vector and expressed in BL21 (DE3) bacterial system. The purified proteins were subjected to the NMR spectroscopy and measured the <sup>15</sup>N HSQC to study the binding site of the Orange domain to E-box. The NMR measurements were performed on varion Unity Inova (500 MHz) spectrometer equipped with a triple resonance probe and z-axis pulsed. The side chain and backbone <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N, <sup>15</sup>N, <sup>13</sup>C $\alpha$ / $\beta$  resonances were assigned using a combination of HSQC, TOCSY-<sup>15</sup>N HSQC, HNCACB, CBCA(CO)NH and HNCA, HN (CO)CA experiments.

---

Orange domain, bHLH transcription factor, E-box binding



To examine the binding site of Orange/E-box DNA sequences, the  $^{15}\text{N}$  HSQC spectrum of  $^{13}\text{C}^{15}\text{N}$ - Orange domain with and without E-box DNA sequences were measured. The spectra of  $^{15}\text{N}$ -HSQC of Orange domain were compared with E-box orange domain spectra. The few signals appeared and also the enhancement of the peak intensity of  $^{15}\text{N}$ -HSQC spectrum of  $^{13}\text{C}^{15}\text{N}$ -Orange domain was observed in the presence of E-box DNA (Figure 1). This result indicates that the structure of Orange domain is affected by the binding of E-box DNA and showed the amino acid residues interacting with DNA. The heteronuclear 3D triple resonance NMR experiments were done with  $^{13}\text{C}^{15}\text{N}$  double-labeled protein to determine the assignments of backbone resonance. The backbone signals  $C_{\alpha}$ ,  $C_{\beta}$ , N and NH of 45 amino acid residues of Orange domain were assigned sequentially using a combination of connection of HNCACB and CBCACONH spectra. The overlaid  $^{15}\text{N}$ -HSQC spectrum of Orange domain with E-box DNA and Orange clearly showed the differences in chemical shift are seen particularly in five amino acids (F3, E22, D26, L32 and V40). This suggests that these residues play important roles in the interaction between Orange domain and E-box DNA. We also observed that orange domain attain stable structure with E-box DNA compared to its native form. Our present results suggest that Sharp2-Orange domain might function as DNA recognition domain in monomeric form and mediate the transcriptional activities.

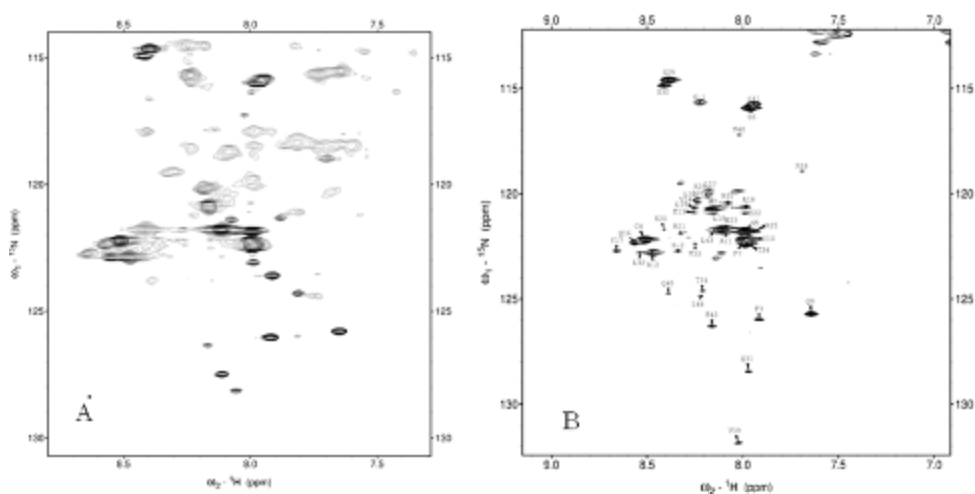


Fig 1. Conformational effects of E-box DNA binding. (A)  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC spectra of the Orange domain alone and (B)  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC spectra of the  $^{13}\text{C}^{15}\text{N}$  Orange/E-box DNA (0.8mM) complex at 500 MHz. Conditions: 0.35mM  $^{15}\text{N}$  Orange in 66mM phosphate buffer (pH7.0), 50 mM KCl, 10mM DTT at 25oC. ni =512, nt=32.



## P8

### プリオンタンパク質への結合様式による抗プリオン化合物の分類と作用機構の解明

○鎌足 雄司<sup>1</sup>、早野 陽介<sup>1</sup>、山口 圭一<sup>1</sup>、武藤(細川) 淳二<sup>1</sup>、  
桑田 一夫<sup>1</sup>

<sup>1</sup>岐阜大学・人獣感染防御研究センター

#### Classification of anti-prion compounds based on the binding properties of prion proteins

○Yuji O. Kamatari<sup>1</sup>, Yosuke Hayano<sup>1</sup>, Kei-ichi Yamaguchi<sup>1</sup>, Junji Hosokawa-Muto<sup>1</sup>, and  
Kazuo Kuwata<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Center for Emerging Infectious Diseases, Gifu Univ..

To date, a variety of anti-prion compounds have been reported that are effective in *ex vivo* and *in vivo* experiments. However, the molecular mechanisms of most of these compounds are unknown. To understand those mechanisms, we have classified representative anti-prion compounds into several classes according to their binding properties for PrP<sup>C</sup>. Surface plasmon resonance and NMR spectroscopy were used to determine the binding affinities and the binding sites of the compounds, respectively. Generally, compounds were classified into one of three classes. Compounds in the first class, including GN8 and GJP49, bound to the native structure and acted as ‘medicinal chaperones’ to stabilize the native conformation and prohibit its pathogenic conversion. The second class of compounds, including Congo red, directly bound to PrP<sup>C</sup> and promoted aggregation of the protein, which prevents further conformational change of prion. The third class of compounds did not bind to PrP<sup>C</sup> but may interact with PrP<sup>Sc</sup> or other relevant proteins. The proposed categorization of diverse anti-prion compounds would be useful for understanding the mechanisms of anti-prion compounds as well as facilitating further anti-prion drug discovery.

これまでに *ex vivo* や *in vivo* の試験により数多くの抗プリオン化合物が報告されているが、いまだ確立した治療法は見つかっていない。さらにそれらの作用機構もほとんどのものが不明である。そこで、抗プリオン化合物の作用機構を理解し、新たな治療薬・治療法を開発するために、我々は正常型プリオンタンパク質 (PrP<sup>C</sup>) への抗プリオン化合物の結合能を調べることにより、これらの化合物の作用機構を明らかにし分類した。タンパク質と化合物の親和性を求めるために表面プラズモンレゾナンス (SPR) 法を、また、結合部位を明らかにするために NMR 法を用いた。一般的に、これらの化合物は 3 つのタイプに分けられることが分かった (Fig. 1)。一つ目のクラスは、我々の開発した GN8 や GJP49 を含む化合物群で、これらは PrP<sup>C</sup> に結合し、天然構造を安定化する、または、異常構造との相互作用をブロックすることにより、抗プリオン機構を発揮すると考えられる化合物群 (Fig. 2) であり、我々はこれらの化合物を

---

Prion disease, Prion protein, Anti-prion compounds, Binding site

○かまたり ゆうじ、はやの ようすけ、やまぐち けいいち、むとう(ほそかわ)  
じゅんじ、くわた かずお

“medicinal chaperones”と呼んでいる。二つ目は、Congo redなどの化合物を含む化合物群で、これらは天然構造と結合し凝集を引き起こすことにより、異常構造へ変換される前の天然構造のポピュレーションを減らし、抗プリオン機構を発揮すると考えられる。3つ目は、天然状態とは相互作用しない化合物群で、これらは、異常構造または、プリオンタンパク質以外のタンパク質と相互作用をすることにより、抗プリオン作用を示すと考えられる。この抗プリオン化合物の分類は、プリオン病の伝播機構の解明や抗プリオン化合物の改良にも役に立つ。

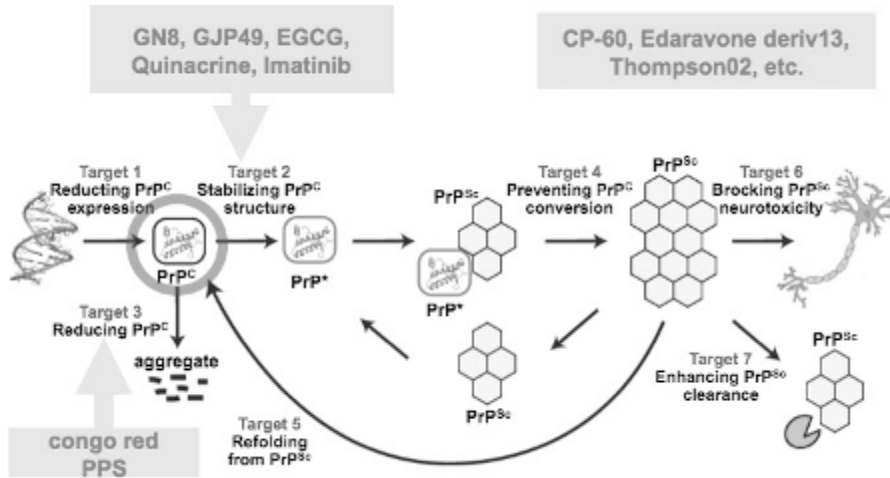


Fig. 1. Working mechanism of anti-prion compounds

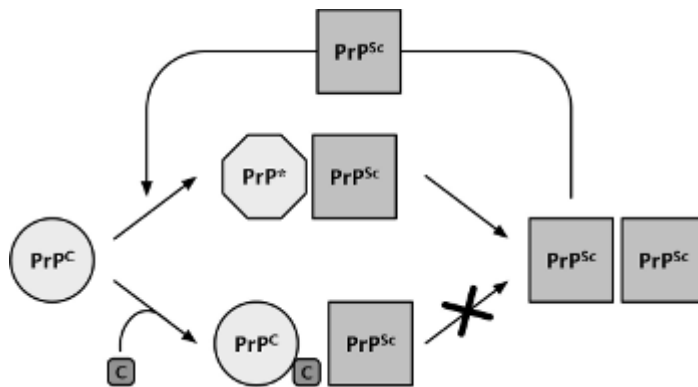


Fig. 2. A model of inhibitory mechanism of anti-prion compounds GN8 derivatives.

# P9

## Musashi1タンパク質—標的RNA複合体に含まれる新たな核酸塩基認識機構

○大山 貴子<sup>1</sup>、永田 崇<sup>2</sup>、今井 貴雄<sup>3</sup>、岡野 栄之<sup>3</sup>、山崎 俊夫<sup>1</sup>、片平 正人<sup>4</sup>

<sup>1</sup>理研・生命分子システム

<sup>2</sup>横浜市大院・生命ナノシステム

<sup>3</sup>慶大・医

<sup>4</sup>京大・エネルギー理工学研究所

### NMR Study of Musashi1 in Complex with Target RNA: The Role of Aromatic Stacking for Specific RNA Recognition

○Takako Ohyama<sup>1</sup>, Takashi Nagata<sup>2</sup>, Takao Imai<sup>3</sup>, Hideyuki Okano<sup>3</sup>, Toshio Yamazaki<sup>1</sup>, Masato Katahira<sup>4</sup>

<sup>1</sup>SSBC, RIKEN

<sup>2</sup>Grad. Sch. Nanobiosci., Yokohama City Univ.

<sup>3</sup>Keio Univ. Sch. Med.

<sup>4</sup>Inst. Adv. Energy, Kyoto Univ.

Musashi1(Msi1) is strongly expressed in neural stem cells (NSCs) and is concerned to controlling of self renewal and differentiation of the NSCs. Msi1 has two RNA Binding domains (RBD). These two RBDs are prohibiting a translation of Numb protein by binding to 3'-UTR of the *numb* mRNA, then “turn-off” the Notch signaling, which promotes differentiation of NSCs. To search the target sequences of each individual RBD of Msi1, we prepared systematically fragmented RNAs of *numb* mRNA 3'-UTR, and performed titration experiment. We identified target sequences of each RBD. Also we determined the RBD1-r(GUAGU) complex structure by NMR. The complex is stabilized by pi-stacking interactions involving case that two phenylalanine rings sandwich an adenosine ring, and some specific hydrogen bondings between protein and RNA.

Musashi1 タンパク質(Msi1)は神経幹細胞に強く発現し、神経幹細胞の自己再生と分化の制御に携わっている。マウス Msi1 は、362a.a.からなる RNA 結合タンパク質で、N 末端側に 2 つの RNA 結合ドメイン(RBD)を持つ(Fig. 1)。SELEX 法を用いた標的 RNA 配列の探索から、マウス

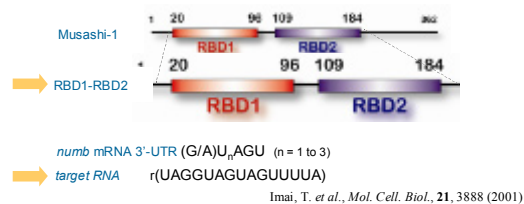


Figure 1 Schematic drawing of Msi1 and target RNA sequence.

Musashi, RNA, <sup>13</sup>C- <sup>15</sup>N- filter

○おおやまたかこ、ながたたかし、いまたかお、おかのひでゆき、やまぎとしお、かたひらまさと

Msi1 は、(G/A)<sub>n</sub>AGU (n = 1 to 3)配列に結合することが報告されている(Imai *et al.*)。マウス *numb* mRNA 3' UTR には、UAGGUAGUAGUUUUA 配列が存在し、この部位がマウス Msi1 の標的部位と考えられている。我々は、この 15mer の RNA を系統的に 6mer RNA に断片化し、RBD1, RBD2 それぞれ単独ドメインにこれらの 6merRNA を添加する NMR 滴定実験を行った。その結果、r(GUAGU) (*numb5*)が RBD1 のコンセンサス配列であることがわかった。そこで、*numb5* と RBD1 との複合体の立体構造解析を NMR を用いて行った。得られた立体構造を Fig. 2A に示す。RBD1 は Gua1, Ura2, Ade3, Gua4 の 4 つの塩基を特異に認識していることがわかった。

Gua1 は Ser28 側から Trp29 のインドール環にスタッキングし、さらに Trp29 の反対側から Lys88 の側鎖が Gua1 のプリン環に近づく構造が得られた(Fig. 2B)。Gua1 N7 が Trp29 主鎖 NH に接近し、水素結合を形成可能な距離と角度になる。*numb5* の添加に伴い Trp29 主鎖 HN が低磁場シフトを示したことは、Gua1 N7-Trp29 HN 間の水素結合形成を支持している。Ade3 は Phe23 と Phe96 にサンドイッチされた構造が得られた(Fig. 2C)。Phe96 主鎖 HN と Ade3 N1 は立体構造上水素結合可能な位置にあり、また、Phe96 主鎖 HN が *numb5* の添加に伴い大きな低磁場シフトを示したことから、Phe96 主鎖 HN と Ade3 N1 間に水素結合が形成されていることが示唆される。この、2 つの Phe が核酸塩基をサンドイッチする結合様式はマウス Msi1 の RBD1 の特徴的な部分であると言えるだろう。Gua4 は Phe65 のベンゼン環とスタッキングし、さらに、Lys21 の側鎖末端のアミノ基が Gua4 O4、あるいは N7 に近づく構造が得られた(Fig. 2C)。

また、得られた立体構造から、タンパク質主鎖と核酸塩基以外との相互作用として、Arg61 側鎖末端のグアニジノ基が Ade3 あるいは Gua4 のリン酸骨格と静電相互作用可能な距離にあることがわかった。

近年、Msi1 の標的は *numb* 以外も複数報告されており、本研究は、Msi1 が標的とする RNA を認識する機構を理解する上で重要な知見となるであろう。

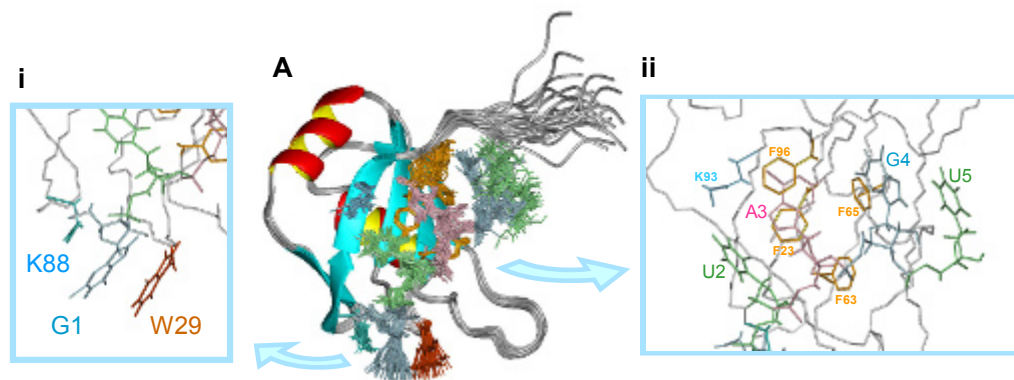


Figure 2 NMR structure of Msi1 RBD1-*numb5* complex. NMR 20 structure ensemble of Msi1 RBD1 - *numb5* complex, A. Close-up view of Gua1-Trp29 purine - indole stacking and Gua1-Lys88 interaction, i. Close-up view of Ura2-Ade3-Gua4 and RBD1 binding interface, ii.

## P10

### 乾燥・高塩およびジャスモン酸によって誘導されるイネ根特異的タンパク質 RSOsPR10 の構造機能解析

○鈴木倫太郎, 藤本瑞, 土屋渉, 山崎俊正  
農業生物資源研究所

### Structure and function relationships of rice protein RSOsPR10, which is specifically induced in roots by drought, salt and jasmonic acid

○Rintaro Suzuki, Zui Fujimoto, Wataru Tsuchiya, and Toshimasa Yamazaki  
*National Institute of Agrobiological Sciences, Tsukuba, Japan.*

Root Specific *Oryza sativa* Pathogenesis Related 10 (RSOsPR10) is a rice protein which is induced specifically in roots by salt and drought stress. mRNA of RSOsPR10 accumulated upon drought, NaCl, and jasmonic acid, but not by abscisic acid or salicylic acid. We determined the 3D structure of RSOsPR10 both in solution and crystal. The structure of RSOsPR10 resembled other PR10 family proteins and consisted a long C-terminal  $\alpha$ -helix surrounded by a seven-stranded antiparallel  $\beta$ -sheet and two N-terminal short  $\alpha$ -helices between  $\beta$ 1 and  $\beta$ 2 strands. A large hydrophobic pocket was found in the center of the protein. The binding assay against several plant hormones and anti-auxins are also examined.

#### [序論]

Root Specific *Oryza sativa* Pathogenesis-Related 10 (RSOsPR10)は、乾燥、塩ストレス、いもち病菌の感染によりイネ根特異的に発現するタンパク質である[1]。RSOsPR10 の mRNA は乾燥、NaCl、ジャスモン酸 (JA) 処理によっても誘導されるが、アブシジン酸 (ABA)、サリチル酸によっては誘導されず、ジャスモン酸シグナル伝達経路によって制御されると考えられる。RSOsPR10 を過剰発現させることにより、イネでは乾燥耐性が、シバでは塩耐性と乾燥耐性が強くなることが知られているため、ストレス耐性作物の育種への応用が期待されている。しかし、本タンパク質の機能はわかっていない。我々は RSOsPR10 の機能解明のため、立体構造とリガンド結合能の解析を行った。

#### [方法]

RSOsPR10 遺伝子を pET-16b に組み込んだベクターは首都大学東京の小柴恭一教授より提供を受けた。これを大腸菌株 Rosetta 2(DE3)に形質転換・発現し、菌体破碎後 Ni アフィニティークロマトグラフィーにより精製、タグを切断・除去の後ゲルろ過を用いて最終精製とした。NMR 測定は Bruker DMX750 で 30°C、50 mM リン酸ナトリウム緩衝液、pH6、100 mM NaCl、5 mM DTT の条件で行った。データプロセス、化学シフト帰属および構造決定には NMRPipe、Sparky3 および Cyana2.1を用いた。また、RSOsPR10 のリガンド複合体の X 線結晶構造解析を行った。

---

イネ、ジャスモン酸、ストレス耐性

○すずきりんたろう, ふじもとずい, つちやわたる, やまぎとしまさ

## [結果]

RSOsPR10 は、C 末端の  $\alpha 3$ ヘリックスとそれを包む 7 本の  $\beta$  ストランドからなる逆平行  $\beta$  シート、および N 末端の短い二つの  $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ ヘリックスからなる球状タンパク質であり、分子中央に大きな疎水性ポケットを持っていた。この立体構造は既に構造が報告されている他の PR10 タンパク質とよく類似していた。また、これらの PR10 タンパク質の立体構造は近年報告された ABA 受容体と類似している[2]。ただし PR10 ファミリーと ABA 受容体のアミノ酸配列の相同性は 20~30%と低い。

RSOsPR10 はジャスモン酸シグナル伝達経路により発現が制御されているが、同時に植物ホルモンをリガンドとする可能性があると考え、植物ホルモンおよび抗オーキシンの結合試験を NMR により行った。リガンド候補としては JA、ABA、ジベレリン(GA3)、オーキシシン(IAA)、ナフトレン酢酸(NAA)、2,4-Dを用いた。リガンド候補の添加による<sup>15</sup>N-HSQC スペクトルの化学シフト変化は、JA、ABA、NAA、2,4-D で顕著に見られ、分子内部の大きなポケットに結合することが示唆された。一方、GA3 ではわずかな変化しか見られず、IAA ではほぼ変化しなかった。オーキシシン活性を持つ NAA や 2,4-D に結合するにもかかわらず、IAA に結合しないことは興味深いが、その生理的な意義は今後の課題である。

RSOsPR10 単体では、<sup>15</sup>N-HSQC スペクトルにおいて F23 残基のシグナルが 2 つ観察されたが、添加による化学シフト変化が顕著であった 4 種の化合物では、F23 のシグナルは単体におけるマイナーピークに相当する 1 つだけが観察された。F23 は  $\alpha 1$ ヘリックス上にあり、ポケットの底に位置する。GA3 および IAA では、F23 のシグナルは単体と同様に 2 つ見られた。以上の結果は JA、ABA、NAA、2,4-D の結合により、F23 のコンフォメーションが固定されることを示唆している。

さらに、我々は JA と RSOsPR10 の複合体の構造を明らかにするために、X線結晶構造解析を行い、1.6 Å の分解能の立体構造を得ることができた。全体の構造は溶液構造および他の PR10 タンパク質とほぼ同様であった。複合体に結合した JA はポケットの底で F23 残基と近接しており、NMR による結合試験の結果と一致した。

ABA 受容体-ABA 複合体の立体構造では、ABA は  $\alpha 1$ ヘリックスとは反対側の、ポケットの入り口付近に結合している。したがって、RSOsPR10 は ABA 受容体とは結合様式が異なることが明らかになった。ABA と RSOsPR10 の複合体の構造は明らかではないが、F23 の挙動から、JA と同様に ABA もまたポケットの底に結合するものと考えられる。

## [結論]

これまでに様々な植物由来の PR10 たんぱく質についてリボヌクレアーゼ活性、サイトカニンやブラシノステロイドをはじめとする多様なリガンドに対する結合活性、二次代謝酵素活性などが報告されており、生理機能としても抗菌活性、ストレス耐性が知られている[3]。一部の PR10 については植物ホルモンシグナル伝達に関与する可能性も指摘されているが、JA、ABA と相互作用する PR10 の例は本報告が初めてである。RSOsPR10 は根の JA および ABA シグナル伝達において重要な役割を果たしている可能性が高いと考えられる。

## [引用文献]

1. Hashimoto, M. *et al. Plant Cell Physiol.* **45**, 550-559 (2004).
2. Miyazono, K. *et al. Nature* **462**, 609-614 (2009).
3. Liu, J.-J. & Ekramoddoullah, A.K.M. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **68**, 3-13 (2006).

# P11

## IgA1 ヒンジ領域の Pro 残基シス／トランス異性化平衡への糖鎖付加の影響とその構造的要因

○山崎和彦<sup>1</sup>、成松由規<sup>2</sup>、古川早苗<sup>2</sup>、森井尚之<sup>1</sup>、成松久<sup>2</sup>、  
久保田智巳<sup>2</sup>

<sup>1</sup>産総研・バイオメディカル研究部門、<sup>2</sup>産総研・糖鎖医工学研究センター

### Structural basis for the effect of glycosylation on *cis/trans* isomerization of prolines in IgA1-hinge peptide

○Kazuhiko Yamasaki<sup>1</sup>, Yoshiki Narimatsu<sup>2</sup>, Sanae Furukawa<sup>2</sup>, Hisayuki Morii<sup>1</sup>,  
Hisashi Narimatsu<sup>2</sup>, and Tomomi Kubota<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Biomed. Res. Inst., <sup>2</sup>Res. Cen. Med. Glycosci., AIST, Tsukuba, Japan

Human immunoglobulin A1 (IgA1) possesses a hinge region, connecting the Fab and Fc domains, mostly composed of Ser, Thr, and Pro (VPSTPPTSPSTPPTSPSPS; hinge peptide). Five of the Ser/Thr residues in this region are known to be naturally *o*-glycosylated. Here we investigated the structural changes in the hinge peptide upon *o*-glycosylation by N-acetylgalactosamine (GalNAc), especially focusing on the *cis/trans* isomerization of Pro residues. *Cis/trans* ratios of the Pro residues at the C-terminal side of the glycosylated Ser/Thr were reduced from 9~13% to 2~3% by enzymatic glycosylation, as observed in <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HSQC spectra. Thermodynamic parameters indicated that this decrease is enthalpy-driven. Consistently, hydrogen bonds between the amide group of GalNAc and carbonyl oxygen of the peptide backbone were formed in the *trans* conformers, as revealed by further NMR analyses.

【目的】タンパク質への糖鎖付加については、その機能への影響とは対照的に、構造への影響は軽微と考えられがちである。実際に、X線結晶解析においては、付加された糖鎖を酵素切断してから結晶化を行うことが一般的である。本研究で対象とする免疫グロブリン A1 (IgA1) 分子の Fab および Fc の 2 つのドメインをつなぐヒンジ領域部には約 20 残基の Ser、Thr、Pro で構成される特徴的なペプチド配列 (VPSTPPTSPSTPPTSPSPS: ヒンジペプチド) が存在し、Ser および Thr に糖鎖 (GalNAc がタンパク質と直接結合する) が付加される (Figure 1)。本研究では、本来運動性が

---

糖鎖、異性化平衡、免疫グロブリン

○やまさきかずひこ、なりまつよしき、ふるかわさなえ、もりいひさゆき、  
なりまつひさし、くぼたともみ

高いと考えられるこの領域において、糖鎖の付加による構造変化があるかどうかを調べ、その要因を解明することを目的とし、特に Pro 残基の *cis/trans* 異性化に着目した解析を行った。この領域は Fab と Fc のドメインをつなぐことから、特に主鎖構造の変化はドメイン間の位置関係、すなわち分子全体の構造に大きな影響を与えると考えられる。

【方法】非標識もしくは 5、8、10、13、16 番目の Pro 残基をそれぞれ  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$  標識した IgA1 ヒンジペプチドを Fmoc 法による固相合成で調製した。糖転移酵素 pp-GalNAc-T2 もしくは pp-GalNAc-T10 により GalNAc の付加を行い、逆相 HPLC により糖ペプチドを精製した。

DMX-500 (Bruker) の装置を用い、

NOESY、TOCSY、ROESY 等の  $^1\text{H}$ -NMR スペクトルや  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC、 $^{13}\text{C}$ -filtered ROESY の異種核スペクトル測定を行った。278K~323K の温度で測定した  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC スペクトル上で *cis/trans* 比率を解析した。温度依存性について van't Hoff 解析を行い、比率の変化に関する熱力学的パラメータを決定した。さらに、重水素交換実験や CNS を用いた立体構造計算により、水素結合形成についての解析を行った。

【結果・考察】 $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$  標識を行った Pro 残基を持つヒンジペプチドの  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC において、major コンフォーマーと minor コンフォーマーを観察した (Figure 2)。TOCSY や ROESY スペクトルの解析により、前者を *trans* 型、後者を *cis* 型と帰属し、HSQC クロスピーク強度から、両者の存在比率を定量した。糖鎖 (GalNAc) の付加を行ったところ、特に糖鎖が付加される残基の C 末端側に隣接する Pro において、*cis* 型/*trans* 型の比率が 9~13% から 2~3% へと大きく減少し、従って、主鎖構造が大きく影響を受けることが明らかになった (Figure 2, Table 1)。

この比率の温度依存性の解析から熱力学的パラメータを計算した結果、自由エネルギー変化に対する糖鎖付加の影響 ( $\Delta\Delta G$ ) においては、エンタルピーの寄与 ( $\Delta\Delta H$ )

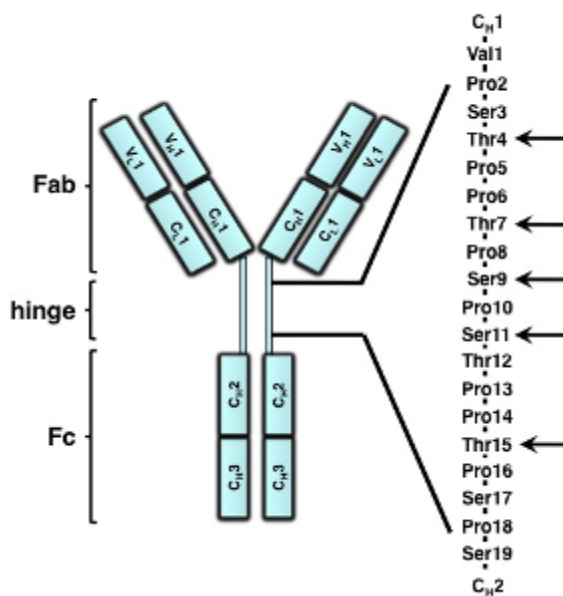


Figure 1: Domains in IgA1 molecule. The hinge region connecting the Fab and Fc domains is mostly composed of Ser, Thr, and Pro. Arrows indicate the naturally occurring *o*-glycosylation sites.



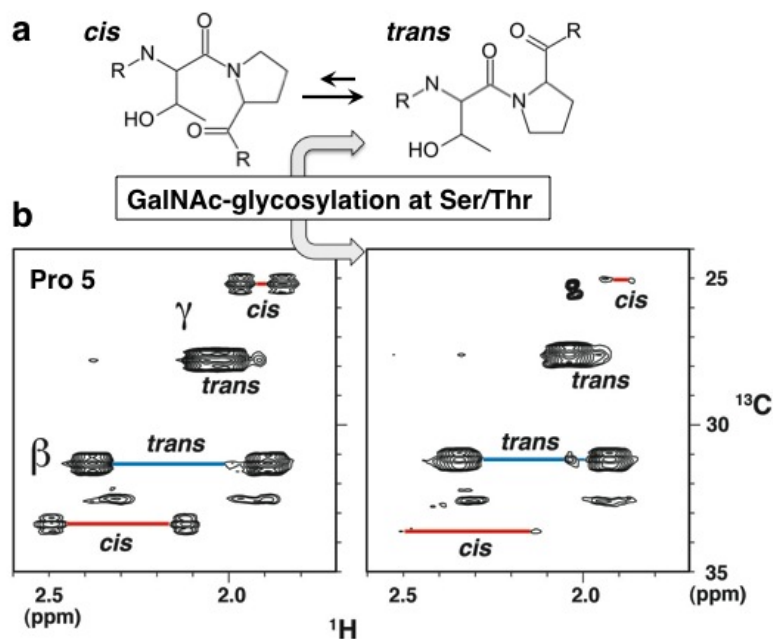


Figure 2: (a) *Cis/trans* isomerization regarding the Thr/Ser-Pro peptide bond. (b)  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC spectra for IgA1 hinge peptide containing a [ $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ]Pro residue, with (right) or without (left) enzymatic *o*-glycosylation on Ser/Thr residues. The glycosylation significantly shifts the equilibrium, reducing the *cis* conformers.

Table 1: *Cis/trans* ratio for Pro residues in IgA1 hinge peptides and relevant thermodynamic parameters. HP and glyco-HP stand for hinge peptides without and with GalNAc-glycosylation, respectively. Signs for the thermodynamic parameters are defined for the *trans* to *cis* transition. Ser/Thr residues at the N-terminal sides of Pro5, Pro8, Pro10, and Pro16 are glycosylated in glyco-HP.

		Pro5	Pro8	Pro10	Pro13	Pro16
ratio	HP	0.126	0.092	0.088	0.115	0.095
	glyco-HP	0.022	0.027	0.015	0.051	0.033
	fold decrease	5.7	3.5	6.0	2.3	2.9
$\Delta G$ (kJmol $^{-1}$ )	HP	4.9	5.9	5.9	5.3	5.8
	glyco-HP	9.7	9.8	10.4	7.7	9.1
	$\Delta\Delta G$	4.8	3.9	4.5	2.4	3.3
$\Delta H$ (kJmol $^{-1}$ )	HP	2.3	7.3	4.5	3.1	6.3
	glyco-HP	16.7	22.2	18.8	10.8	18.9
	$\Delta\Delta H$	14.5	14.9	14.3	7.7	12.5
$\Delta S$ (kJmol $^{-1}$ )	HP	-0.009	0.006	-0.004	-0.007	0.003
	glyco-HP	0.027	0.046	0.031	0.013	0.037
	$\Delta\Delta S$	0.036	0.041	0.036	0.02	0.034

は同符号でより大きいのに対し、エントロピーの寄与 ( $-T\Delta\Delta S$ ) は逆符号でより小さいこと、すなわち糖鎖付加による効果はエンタルピー駆動であることが判った (Table 1)。これは、*trans*型コンフォマーにおいてのみ新たな水素結合が形成されることで説明できる。実際に、重水交換実験を行ったところ、*trans*型コンフォマーのGalNAcThrの糖アミド基の交換速度が単糖のGalNAcやbenzylGalNAcに比べて1/20程度に減少し、水素結合形成が示された。さらに、糖ペプチド (*trans*型) のNOEに基づく立体構造解析を行ったところ、GalNAc-Thr残基においてGalNAcのアミド基とペプチド主鎖のカルボニル酸素の間に水素結合が形成されることが示された (Figure 3)。

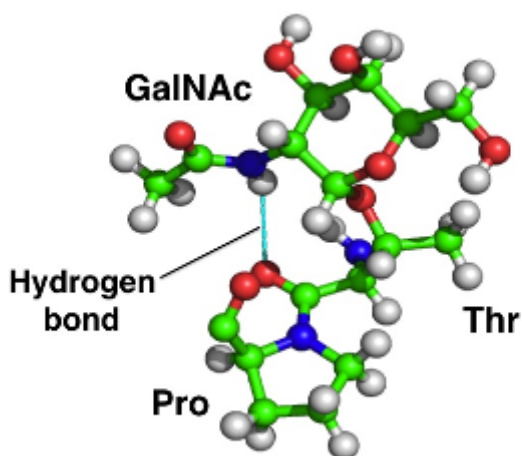


Figure 3: A hydrogen bond between GalNAc amide proton and peptide backbone oxygen of a GalNAc-Thr residue observed for the *trans* conformer, as revealed by the NMR structure analysis. This restricts  $\psi$  angle and causes steric hindrance in the presumable *cis* conformer.

この水素結合は、GalNAc-Thrのペプチド主鎖の $\psi$ 角をほぼ固定する。その結果、単純に*cis*型にすると強い立体障害が生じることが、モデル解析によって明らかになった。すなわち、*trans*型においてのみこの水素結合が形成される。これが、*trans*型を相対的に安定化させ、*cis*型を減少させる主因となっていると考えられる。

本研究では、IgA1ヒンジペプチドにおいて、糖鎖付加により、Pro残基の*cis/trans*異性化平衡が大きく*trans*型にシフトすることを明らかにした。これにより、主鎖構造のバリエーションが顕著に減少することとなる。さらに、水素結合形成により、GalNAc-Thrの $\psi$ 角も制限を受ける。これらの結果、糖鎖が主鎖構造の自由度を減らし、ひいてはFabドメインとFcドメインの相対位置に関する自由度も減らすことにより、分子の全体構造へ影響を及ぼすと結論できる。

#### 【参考文献】

Narimatsu, Y., Kubota, T., Furukawa, S., Morii, H., Narimatsu, H., and Yamasaki, K. (2010) *J. Am. Chem. Soc.* 132, 5548-5549. "Effect of glycosylation on *cis/trans* isomerization of prolines in IgA1-hinge peptide"

# P12

## Mapping the Interactions of the Intrinsically Disordered p53 Transactivation Subdomains with the TAZ2 Domain of CBP by NMR

○新井宗仁<sup>1,2</sup>, Josephine C. Ferreon<sup>1</sup>, H. Jane Dyson<sup>1</sup>, Peter E. Wright<sup>1</sup>

<sup>1</sup>The Scripps Research Institute

<sup>2</sup>東大・総文・生命環境

## Mapping the Interactions of the Intrinsically Disordered p53 Transactivation Subdomains with the TAZ2 Domain of CBP by NMR

○Munehito Arai<sup>1,2</sup>, Josephine C. Ferreon<sup>1</sup>, H. Jane Dyson<sup>1</sup>, and Peter E. Wright<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Dept of Molecular Biology, The Scripps Research Institute, La Jolla, CA, USA.*

<sup>2</sup>*Dept of Life Sciences, Grad. Sch. Art. Sci., University of Tokyo, Tokyo, Japan.*

Using NMR chemical shift perturbations we show that the isolated AD1 and AD2 binding motifs, derived from the intrinsically disordered N-terminal transactivation domain of the tumor suppressor p53, both interact with the TAZ2 domain of the transcriptional coactivator CBP at two binding sites. Unexpectedly, the site of binding of AD2 on the hydrophobic surface of TAZ2 overlaps with the binding site for AD1, but AD2 binds TAZ2 more tightly. The results highlight the complexity of interactions between intrinsically disordered proteins and their targets. Furthermore, the association rate of AD2 to TAZ2 is estimated to be greater than  $3 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , approaching the diffusion-controlled limit and indicating that intrinsic disorder plus complementary electrostatics can significantly accelerate protein binding interactions.

癌抑制因子p53は細胞周期やアポトーシス誘導を制御しており、ゲノムの守護神と呼ばれている。p53の転写活性化ドメイン(N末端側の61残基)は天然変性領域であり、単独では特定の構造を形成していない。この中には2つの活性化ドメイン(AD1とAD2)が存在しており、これらが転写コアクチベータCBPのTAZ2ドメイン等と相互作用することによって、p53は活性化されることが知られている(文献1-3)。しかし、p53とTAZ2との相互作用の詳細は未解明であった。そこで本研究では、TAZ2上どの領域がp53のAD1およびAD2と相互作用するのかを明らかにすることを目的として、NMR滴定法(化学シフト摂動法)による実験を行った。

TAZ2を<sup>15</sup>Nラベルし、p53 AD1を少量ずつ滴定していき、二次元<sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HSQCスペクトルの変化を測定した結果、fast exchangeでピーク位置がシフトしていく様子が観測された。しかしピークシフトは直線的ではなく、曲線的であった。特異値分解法で解析した結果、結合部位が2つ存在するモデルが妥当であることがわかった。そこで、2サイト結合モデルの滴定曲線へのフィッティング・プログラムを自作して解析した結果、TAZ2上には2つのAD1結合部位が存在し、解離定数はそれぞれ24 μM と 164 μM であることがわかった。同様に、TAZ2へのp53 AD2滴定実験から、TAZ2上には2つのAD2結合部位が存在し、解離定数はそれぞれ32 nMと10 μM であることが示された。驚くべきことに、AD1とAD2結合部位は同じサイトであった。このことは、天

天然変性蛋白質が関与する相互作用の複雑さを表している。

1 サイト結合モデルの場合には、蛋白質濃度よりも極めて小さな解離定数を求めることは困難である。しかし、様々なシミュレーションを行った結果、2 サイト結合モデルの場合には、10 nM 程度の小さな解離定数であっても、NMR 滴定実験で fast exchange を示しうること、および、滴定曲線のフィッティングから正確な解離定数を求められることが明らかになった。したがって、上記の TAZ2-AD2 結合の解離定数は信頼できる値である。

面白いことに、TAZ2-AD2 間相互作用においては、解離定数 32 nM という強い結合であるにも関わらず、fast exchange によるピークシフトが観測された。線形のシミュレーションから、TAZ2-AD2 結合が fast exchange になるための条件は解離速度  $k_{\text{off}} > 1000 \text{ s}^{-1}$  であった。このことから、結合速度は  $k_{\text{on}} > 3 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  となり、拡散律速限界に近い値と見積もられた。この値は、これまでに知られている結合速度のうち最速である。TAZ2 は +14 の電荷を持つのに対し、p53 AD2 は -8 の電荷を持っており、非常に強い静電相互作用によって、極めて速い結合反応が実現されたと考えられる。このように素速い結合反応は、天然変性蛋白質の特性の一つかもしれない。

#### 参考文献

1. Lee, C.W., Ferreon, J.C., Ferreon, A.C.M., Arai, M., & Wright, P.E. (2010) Graded enhancement of p53 binding to CBP by multisite phosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* in press.
2. Ferreon, J.C., Lee, C.W., Arai, M., Martinez-Yamout, M.A., Dyson, H.J. & Wright, P.E. (2009) Cooperative regulation of p53 by modulation of ternary complex formation with CBP/p300 and HDM2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106(16): 6591-6596.
3. Lee, C.W., Arai, M., Martinez-Yamout, M.A., Dyson, H.J. & Wright, P.E. (2009) Mapping the interactions of the p53 transactivation domain with the KIX domain of CBP. *Biochemistry* 48(10): 2115-2124.

---

天然変性タンパク質，NMR 滴定法，転写コアクチベータ

○あらいむねひと，じよせふいんふえれおん，じえいんだいそん，ぴーたーらいと

# P13

## Major facilitator superfamily トランスポーター LacY の輸送機構の解明

○古川 大祐<sup>1</sup>、吉浦 知絵<sup>1</sup>、町山 麻子<sup>1</sup>、湊 雄一<sup>1</sup>、上田 卓見<sup>1</sup>、嶋田 一夫<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>東大・院薬系

<sup>2</sup>産総研・バイオメディシナル情報研究センター

### Elucidation of the transport mechanism of the major facilitator superfamily transporter LacY

○Daisuke Furukawa<sup>1</sup>, Chie Yoshiura<sup>1</sup>, Asako Machiyama<sup>1</sup>, Yuichi Minato<sup>1</sup>, Takumi Ueda<sup>1</sup>, and Ichio Shimada<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Grad. Sch. of Pharm. Sci., the Univ. of Tokyo

<sup>2</sup>BIRC, AIST

The major facilitator superfamily (MFS) transporters transport their ligands by alternatively assuming their inward-facing and outward-facing conformations. However, the structure of the outward-facing MFS transporters has not been solved, because of their instability. The outward-facing conformation of lactose permease (LacY), which belongs to MFS, is stabilized by its binding with Enzyme IIA<sup>Glc</sup> (EIIA). Here, we show that the LacY-binding site on EIIA is the hydrophobic cavity that involves His90, by transferred cross-saturation experiment using LacY reconstituted in rHDL. The loop that connects the N- and C- terminal domains of LacY are also hydrophobic, thus EIIA may bind to this loop and fix the outward-facing conformation of LacY.

【目的】 Major facilitator superfamily (MFS) は、12 もしくは 14 個の膜貫通ヘリックスを持つ膜トランスポーター群であり、腎臓での有害物質の排出等の重要な役割を担う。MFS は、リガンド結合部位が細胞外を向いた状態と細胞内を向いた状態を交換して、リガンドを輸送すると考えられている。しかし、細胞外を向いた MFS は不安定であり、その構造は解か

れていないため、輸送機構の多くは不明である。ラクトースを輸送する MFS である Lactose permease (LacY) は、細胞外を向いた状態で、蛋白質 Enzyme IIA<sup>Glc</sup> (EIIA) と複合体を形成する (Fig. 1)。したがって、LacY では、EIIA との結合により、細胞

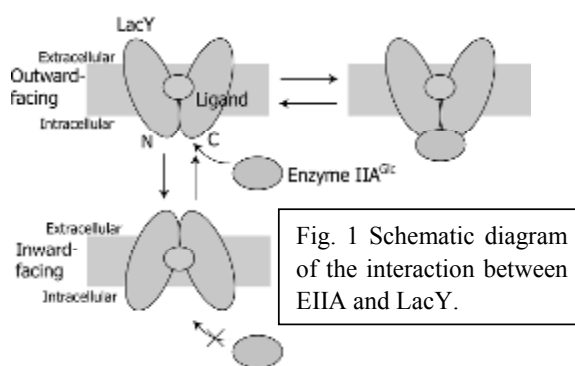


Fig. 1 Schematic diagram of the interaction between EIIA and LacY.

トランスポーター、膜蛋白質、transferred cross-saturation

○ふるかわだいすけ、よしうらちえ、まちやまあさこ、みなとゆういち、うえだたくみ、しまだいちお

外を向いた状態が安定化されると考えた。そこで本研究では、LacY と EI1A の結合様式を解明することにより、MFS の輸送機構を明らかにすることを目的とした。

【方法】大腸菌由来 LacY を、大腸菌にて大量発現し、膜画分を抽出した上で、2% DDM で可溶化して、C 末端に付加した His タグを用いて精製した。精製した LacY を、*E. coli* polar lipid と MSP1E3 を用いて、rHDL へ再構成した (LacY-rHDL)。Native-PAGE および抗 His-tag 抗体を用いた western blotting により、LacY が rHDL に再構成されたかどうかを調べた。加えて、蛍光リガンドである 4-nitrophenyl- $\alpha$ -D-galactopyranoside (NPG) との結合を競合阻害した際の、蛍光強度の変化を用いて、調製した LacY-rHDL のリガンド結合活性を調べた。

大腸菌由来 EI1A を、大腸菌にて大量発現し、陰イオン交換カラム、ゲルろ過カラムを用いて精製した。ITC を用いて、得られた EI1A と LacY-rHDL との解離定数を算出した。さらに、EI1A の LacY 結合界面を同定するために、EI1A と LacY-rHDL の間の transferred cross-saturation (TCS) 実験を行った。

【結果および考察】発現条件や rHDL 再構成の条件を最適化した結果、最終的に、1 L の培地から、4.5 nmol の LacY-rHDL が得られた。調製した LacY-rHDL を native-PAGE および western blotting により解析した結果、空の rHDL と同等の泳動度を持ち、LacY を含むバンドが観測された。したがって、LacY が rHDL 内に組み込まれたことが示された。また、NPG との結合を競合阻害した際に蛍光強度が上昇したので、調製した LacY-rHDL はリガンド結合活性を保持していることが示された (Fig. 2)。

ITC 実験により、LacY-rHDL と EI1A の結合に伴う吸熱が観測され、両者の解離定数が 170 nM であることが示された。

TCS 実験を行った結果、F41、F77、F88、H90 など、疎水性に富む H90 近傍溝に位置する、立体構造上連続する残基に有意な強度減少が観測され、LacY 結合界面であることが示された (Fig. 3)。LacY の N 末端と C 末端の両ドメイン間をつなぐループにも疎水性残基に富む領域が存在することから、EI1A は、このドメイン間ループと結合することにより、LacY

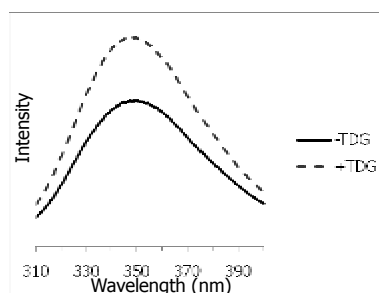


Fig. 2 Ligand binding activity of LacY-rHDL.

Solid and dashed lines show the emission spectra of the fluorescence ligand NPG before and after adding the competitive ligand (TDG), respectively.

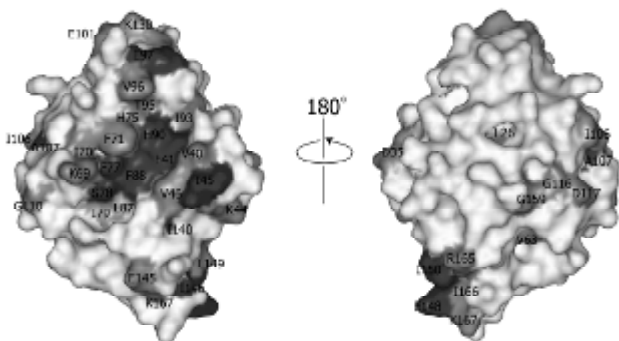


Fig. 3 Determination of the LacY-binding site on EI1A by TCS. The residues with intensity ratio > 0.2 and > 0.15 are shown in black and gray, respectively.

# P14

## 細胞質ダイニンの微小管親和性制御機構の解明

○宝田 理<sup>1</sup>、西田 紀貴<sup>1</sup>、梅本 良<sup>1</sup>、吉川 雅英<sup>2</sup>、嶋田 一夫<sup>1,3</sup>  
<sup>1</sup>東大・院薬系、<sup>2</sup>東大・院医系、  
<sup>3</sup>産総研・BIRC

### Structural Mechanism for the Affinity Regulation of Cytoplasmic Dynein

○Osamu Takarada<sup>1</sup>, Noritaka Nishida<sup>1</sup>, Ryo Umemoto<sup>1</sup>, Masahide Kikkawa<sup>2</sup>, Ichio Shimada<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Grad. Sch. Pharm. Sci., The Univ. of Tokyo, Tokyo, Japan. <sup>2</sup>Grad. Sch. Med., The Univ. of Tokyo, Tokyo, Japan. <sup>3</sup>BIRC, AIST

Cytoplasmic dynein is a motor protein that uses ATP to power the movement toward the minus end of microtubules (MTs). It has been considered that the microtubule-binding domain (MTBD) of dynein changes its affinity for MT by altering the association mode of the neighboring coiled-coil helices. However, the structural mechanism of the affinity regulation of MTBD remains elusive. Here, we analyzed conformational changes of MTBD, using mutants where disulfide bonds introduced in MTBD are utilized for locking the association mode of the coiled-coil. We made two mutants, termed MTBD-High and MTBD-Low, which showed high and low the affinity for MT, respectively. We examined the difference in the conformation and identified the MT-binding site of MTBD-High and MTBD-Low by NMR. Based on these results, the mechanism for the affinity regulation of the MTBD is discussed.

#### 【背景・目的】

細胞質ダイニンはATP加水分解のエネルギーを利用して微小管上を細胞膜側の+端から中心体方向の-端に向かって運動するモータータンパク質である。細胞質ダイニンの微小管結合ドメイン(MTBD)は逆平行のコイルドコイル鎖を介してATPaseドメインと連結されており、ATPの結合および解離と連動してMTBDの微小管親和性が変化することで、微小管上の連続的な運動が達成される。これまでの研究から、MTBDの微小管親和性はコイルドコイル鎖の会合状態の変化によって制御されると考えられている。例えば、異なる長さのコイルドコイル鎖を含むMTBDをSRS (Seryl tRNA Synthetase)のコイルドコイル鎖に融合することで、MTBDの微小管親和性を高親和性および低親和性状態に制御できることが示されており、また低親和性状態を反映するSRS融合MTBDの結晶構造が明らかとなっている。しかし、高親和性状態の構造はいまだ不明であり、コイルドコイル鎖の会合状態の変化がどのような構造変化をMTBDに誘起するのかわかり解明されていない。本研究では、コイルドコイル鎖間にS-S結合を導入して親和性を制御したMTBDを作製し、それらの構造をNMR法を用いて解析することにより、MTBDの親和性制御機構を解明することを目的とした。

---

細胞質ダイニン， 親和性制御， TCS実験

○たからだ おさむ， にしだ のりたか， うめもと りょう， きっかわ まさひで，  
しまだ いちお

## 【材料と方法】

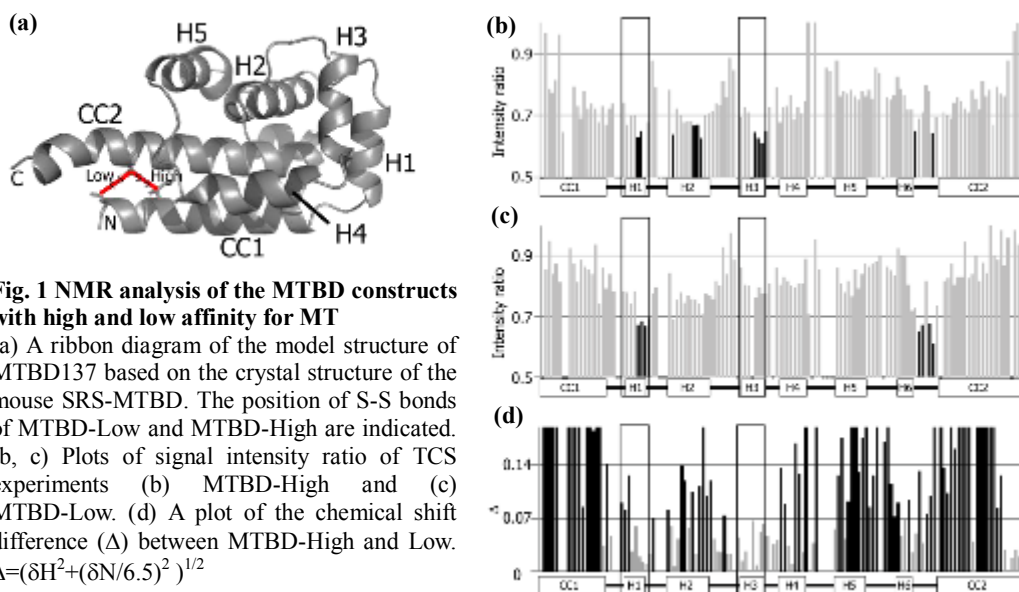
本研究では酵母由来細胞質ダイニンの MTBD とコイルドコイル鎖の一部を含む 137 残基の領域 (MTBD137) を大腸菌により発現し解析に用いた。SRS 融合 MTBD の結晶構造を参考に、MTBD137 のコイルドコイル鎖間で近接する疎水性残基対に Cys 変異を導入した変異体を複数作製した。コイルドコイル鎖間の S-S 結合形成は SDS-PAGE により確認した。得られた変異体の微小管親和性は、超遠心を利用した微小管共沈実験により算出した。NMR による構造解析では、三重共鳴法により主鎖連鎖帰属を行い、変異体間で  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC スペクトルの比較を行った。また、各変異体の微小管結合部位を、当研究室が開発した転移交差飽和 (TCS) 法を用いて解析した。

## 【結果と考察】

コイルドコイル鎖間に S-S 結合の形成が確認された MTBD 変異体の微小管との親和性を測定したところ、MTBD137 と同程度の高い親和性 ( $K_d \approx 10 \mu\text{M}$ ) を示す変異体と、親和性が大きく低下した ( $K_d > 100 \mu\text{M}$ ) 変異体が得られた。これらの変異体を MTBD-High, MTBD-Low と呼び、以後の解析に用いた (Fig. 1(a))。

まず転移交差飽和 (TCS) 法を用いて、各変異体の微小管結合界面を同定した。その結果、MTBD を構成する 6 つのヘリックス (H1~H6) のうち、H1 は両方の変異体で結合界面として検出され、H3 は MTBD-High でのみ界面として検出された (Fig. 1(b, c))。次に MTBD-High と MTBD-Low 間の立体構造の違いを  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC の化学シフト差に基づいて解析した。その結果、S-S 結合を導入したコイルドコイル鎖 (CC1, CC2) 近傍のみならず、MTBD 全体にも化学シフト差が観測された。特に TCS 実験で微小管との相互作用することが示された H1 と H3 に着目すると、両者に共通する界面である H1 に大きな化学シフト差を示す残基が観測された (Fig. 1(d))。

以上の結果から、コイルドコイル鎖の会合状態の変化によって MTBD の H1 の構造変化が誘起され、H3 を含めた新たな微小管結合面を形成することで、低親和性状態から高親和性状態に移行する仮説が示された。現在、より詳細な微小管親和性制御機構を解明するために、MTBD-High と MTBD-Low の立体構造決定が進行中である。





# P15

## In-cell NMR法を用いた生細胞内におけるプロテインG B1ドメインの高次構造解析

○花島 知美<sup>1</sup>, 浜津 順平<sup>1</sup>, 池谷 鉄平<sup>1</sup>, 三島 正規<sup>1</sup>,  
Peter Güntert<sup>2</sup>, 白川 昌宏<sup>3</sup>, 伊藤 隆<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>首都大院・理工, <sup>2</sup>Frankfurt大, <sup>3</sup>京大院・工)

### Structure determination of protein G B1 domain in living cells by in-cell NMR spectroscopy

○Tomomi Hanashima<sup>1</sup>, Junpei Hamatsu<sup>1</sup>, Teppei Ikeya<sup>1</sup>, Masaki Mishima<sup>1</sup>, Peter Güntert<sup>2</sup>, Masahiro Shirakawa<sup>3</sup> and Yutaka Ito<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>Dept. of Chem., Tokyo Metropolitan Univ., <sup>2</sup>Inst. of Biophysical Chemistry and Center for Biomolecular Magnetic Resonance, J. W. Goethe-Univ. Frankfurt, <sup>3</sup>Dept. of Eng., Univ. of Kyoto)

Recent developments in NMR hardware and methodology have enabled the measurement of high-resolution heteronuclear multi-dimensional NMR spectra of macromolecules in living cells (in-cell NMR). With this method, we recently reported the world's first 3D protein structure calculated exclusively on the basis of information obtained in living cells.

In this presentation, as another demonstration of our strategy for protein structural analyses *in vivo*, we report in-cell NMR studies of *Streptococcus* protein G B1 domain (GB1) overexpressed in *E. coli* cells. While backbone resonances were completely assigned, side-chain assignment suffers from low sensitivity of triple-resonance NMR spectra, thus requires additional experiments, which presumably due to lower expression level of GB1 in *E. coli*. Methyl-selectively protonated samples as well as <sup>13</sup>C/<sup>15</sup>N-labelled samples were used for the collection of NOE-derived distance restraints. Structure calculations are in progress.

#### 【序】

細胞内の蛋白質の構造やダイナミクスを高分解能で測定することが可能な in-cell NMR という手法が注目されている。わたしたちは既に in-cell NMR を用いて生細胞内蛋白質の世界初の高次構造解析を試み、大腸菌内で発現させた高度好熱菌 *Thermus thermophilus* HB8 由来蛋白質 TTHA1718(66 a.a.)の高分解能構造を得た [Sakakibara *et al. Nature* (2009) and Ikeya *et al. Nat. Protoc.* (2010)]. 本研究では、わたしたちの手法の次なる応用例として、*Streptococcus* protein G B1ドメイン(57 a.a., 以下 GB1 と略)をターゲット試料とし in-cell NMR による構造解析を試みた。

---

キーワード: In-cell NMR, 異種核多次元NMR, 立体構造

○はなしま ともみ, はまつ じゅんぺい, いけや てっぺい, みしま まさき,  
ペーター ギュンタート, しらかわ まさひろ, いたう ゆたか

### 【実験、結果および今後の展望】

GB1 の大腸菌内大量発現系を用いて細胞内試料を調製し、測定を行った。前例の TTHA1718 細胞内試料の試料管内蛋白質濃度 (3-4 mM と推定) と比較して GB1 の発現量は少なく、細胞内試料の試料管内蛋白質濃度は 1 mM を下回ると推定される。

主鎖及び側鎖 NMR シグナルの帰属のため、 $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$  均一標識した細胞内試料について、TTHA1718 の際と同様の 9 種の 3 重共鳴 3 次元 NMR 測定を非線形サンプリング法を用いて行い、2D 最大エントロピー法で処理することによってスペクトルを得た。全ての主鎖シグナルの帰属が完了したが (Figure 1), (TTHA1718 と比べて低い蛋白質濃度が原因と考えられるが) 側鎖シグナルの解析は困難であった。現在さらに追加の 3 重共鳴 3 次元 NMR 測定と解析を行っており、可能な限り多数の側鎖シグナルの帰属を目指している。

NOE 由来の距離情報の収集については、まず  $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$  標識細胞内試料について 3D  $^{13}\text{C}$  or  $^{15}\text{N}$ -separated NOESY スペクトルの測定を行った。また、Ala/Ile/Leu/Val 残基のメチル基選択的  $^1\text{H}/^{13}\text{C}$  標識を行った細胞内試料を調製し、3D  $^{13}\text{C}/^{13}\text{C}$ -separated HMQC-NOE-HMQC スペクトルを測定することで、メチル基間の距離構造情報の選択的取得も行った。3D NOESY スペクトルの測定の際にも、非線形サンプリング法を適用することによって、短時間で感度・分解能とも良好なスペクトルの取得に成功した。現在 NOE 情報の解析を進めており、発表では詳細な高次構造決定を報告する予定である。1 mM を下回る濃度での構造解析が可能となれば、in-cell NMR の応用範囲の拡大が期待できる。

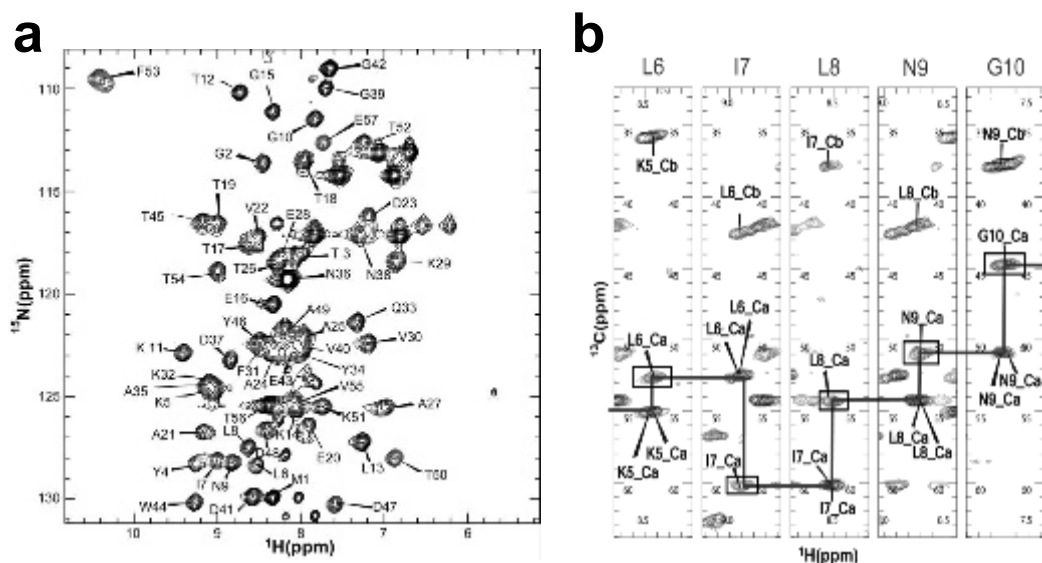


Figure 1

a. 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC spectrum of the  $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -labelled GB1 in living *E.coli* cells. Cross peaks are labelled with their corresponding backbone assignments.

b. Overlaid  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  cross-sections of the 3D HNCA and CBCA(CO)NH spectra corresponding to the  $^{15}\text{N}$  frequencies of residues from Leu6 to Gly10. Sequential connectivities are represented by lines. Intraresidue correlations (HNCA) are indicated with boxes.

# P16

## 転移交差飽和法を用いたインスリン-インスリン受容体の相互作用解析

○中村 壮史<sup>1,2,3</sup>、高橋 栄夫<sup>3</sup>、高橋 三雄<sup>1</sup>、榛葉 信久<sup>1,2,3</sup>、鈴木 榮一郎<sup>1,2</sup>、嶋田 一夫<sup>3,4</sup>

<sup>1</sup>味の素ライフ研、<sup>2</sup>バイオ産業情報化コンソーシアム、<sup>3</sup>産総研BIRC、<sup>4</sup>東大薬

## Direct Determination of the Insulin-Insulin Receptor Interface Using Transferred Cross-Saturation Experiments

○Takefumi Nakamura<sup>1,2,3</sup>, Hideo Takahashi<sup>3</sup>, Mitsuo Takahashi<sup>1</sup>, Nobuhisa Shimba<sup>1,2,3</sup>, Ei-ichiro Suzuki<sup>1,2</sup>, Ichio Shimada<sup>3,4</sup>

<sup>1</sup>The Institute of Life Sci., Ajinomoto Co. Inc., <sup>2</sup>JBIC, <sup>3</sup>BIRC, AIST, <sup>4</sup>Grad. Sch. of Pharm. Sci., the Univ. of Tokyo

Insulin initiates metabolic control by binding to the insulin receptor (IR) on target cells. Kinetic and mutational analyses have revealed two binding sites on the insulin molecule and the residues that compose them. However, direct determination of the insulin-IR interface is required to distinguish those residues that contribute to receptor binding from those required for structural stability. Here, we successfully characterized one binding site using the NMR transferred cross-saturation (TCS) method, which can directly determine the binding interface of a large protein-protein complex. The results showed that this binding site contained three residues that have not been identified previously by mutational analyses. Based on the structure of the contact site, we also identified a molecule that can displace insulin from the IR.

インスリンは21残基のA鎖と30残基のB鎖からなるペプチドホルモンであり、糖、タンパク質、脂質の代謝に関与している。インスリンは亜鉛を抱合した安定な六量体として膵臓に保存されるが、血中では単量体としてその機能を発現する。一方、インスリン受容体 (IR) は細胞外に存在する135 kDaの $\alpha$ 鎖2本と膜貫通部位を含む95 kDaの $\beta$ 鎖2本からなり、 $\alpha$ 鎖にインスリンが結合すると構造変化を引き起こし、 $\beta$ 鎖細胞内のチロシンキナーゼ領域が活性化することによりシグナル伝達を開始する。

インスリンとIRとの相互作用は、糖尿病治療薬創製の対象として、これまでに部位特異的変異法や化学修飾法、動態解析法などによって研究されてきた。その結果、インスリンはIRに結合した際に構造変化を生じることや、インスリンは2つの結合面によってIRと相互作用することが明らかとなっている。しかし、インスリンの結合残基やIRとの相互作用様式については、いくつかの仮説が提唱されてはいるものの、未だにその詳細は解明されていない。

インスリンとIRとの相互作用解析を困難にしている原因として、インスリンは疎水性のコアを有する難溶性の球状タンパク質であること、IRは巨大な不溶性の膜タンパク質でありインスリンとの複合結晶が得られていないこと、などが挙げられる。本研究では、これらの課題を克服するため、近年我々が開発したNMR転移交差飽和法 (TCS)<sup>(1)</sup>を用いることにした。TCSでは、リガンド分子へ相互作用部位を検出するための部位特異的変異や化学修飾を導入する必要がないことから、結合に寄与する残基のみを

同定することが可能である。また、解離状態にあるリガンド分子のみを検出することから、レセプター分子を多量に調製し、複合結晶を得る必要もない。TCSのこれらの特長は、インスリンとIRとの相互作用を解析するには適した実験方法であるといえる。

我々はインスリン-IRの相互作用をTCSにて解析するにあたり、まず可溶性の試料を調製した。すなわち、インスリンについては生物活性を保持することが確認されている可溶性インスリン<sup>(2)</sup>として調製し、IRについてはインスリンとの相互作用が野生型とほぼ同等であることが知られているFcキメラ (IRFc)<sup>(3)</sup>を構築した。次に、TCSについては検出感度を高めるため、側鎖にメチル基または芳香環を含む残基をプローブとして検出する方法<sup>(4, 5)</sup>を適用した。可溶性インスリンはA鎖とB鎖を合わせて50残基からなるが、この方法においては最大17残基についての相互作用情報を測定することができる。実験の結果、可溶性インスリンの5残基がIRFcとの相互作用に関与していることが明らかとなった。また、このうちの3残基 (TyrA14、LeuB6、およびValB18)は、これまでにIRと相互作用することが知られていない残基であることも明らかとなった。

次に、TCSにて得られた5残基のうち、立体構造上の位置関係をもとに3残基 (LeuA13、TyrA14、およびLeuB17)をファーマコフォアとして設定しデータベース検索を行ったところ、約500種類の化合物を得るに至った。このうちの59種類の化合物についてインスリンのIRFcに対する阻害活性をシンチレーション近接法により評価したところ、インスリンとIRFcとの相互作用を阻害する化合物を得ることができた。

#### [参考文献]

- (1) Nakanishi, T. et al. *J. Mol. Biol.* **2002**, *318*, 245-249.
- (2) Olsen, H.B. et al. *Biochemistry* **1996**, *35*, 8836-8845.
- (3) Bass, J. et al. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 19367-19375.
- (4) Takahashi, H. et al. *J. Biomol. NMR* **2006**, *34*, 167-177.
- (5) Nakamura, T. et al. *J. Med. Chem* **2010**, *53*, 1917-1922.

---

#### 相互作用、受容体、インスリン

○なかむら たけふみ、たかはし ひでお、たかはし みつお、しんば のぶひさ、すずき えいいちろう、しまだ いちお

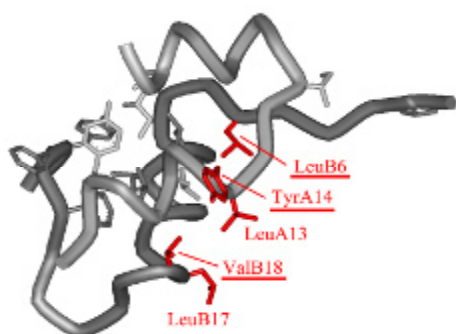


Figure 1. The side chains with intensity loss in the TCS experiments are shown in red and the other are shown in gray. Underlines represent the three residues that have not been identified previously by mutational analyses.

# P17

## 気孔密度を正に制御するストマジエンの構造解析

○ 竹内 誠<sup>1</sup>、菅野 茂夫<sup>2</sup>、嶋田 知生<sup>2</sup>、西村 いくこ<sup>2</sup>、  
森 正之<sup>3,4</sup>、大木 進野<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup>北陸先端大学院大, <sup>2</sup>京大理, <sup>3</sup>石川県立大, <sup>4</sup>JST先端計測

### Structural analysis of stomagen: a positive regulator of stomatal density

○ Makoto Takeuchi<sup>1</sup>, Shigeo S. Sugano<sup>2</sup>, Shimada Tomoo<sup>2</sup>, Ikuko Hara-Nishimura<sup>2</sup>, Masashi Mori<sup>3,4</sup>, Shin-ya Ohki<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup>Japan Advanced Institute of Science and Technology, Ishikawa, Japan.

<sup>2</sup>Graduate School of Science, Kyoto University, Kyoto, Japan.

<sup>3</sup>Reserch Institute for Bioresources and Biotechnology, Ishikawa Prefectural University, Ishikawa, Japan.

<sup>4</sup>Japan Science and Technology Agency-SENTAN.

Stomata are small pores on the surfaces of leaves and stalks in plants. They exchange gases, such as water vapor and CO<sub>2</sub>, in and out of plants for photosynthesis. No positive regulator of stomatal development had been reported, although several negative regulators are already known. Recent studies have identified a first positive regulator, stomagen (1, 2). Stomagen is a 45-residue peptide containing six Cys residues. To study structure-function relationship of stomagen, we tried NMR experiments. For the NMR study, stable-isotope labeled samples were prepared by using plant cells with inducible virus vector system. In this presentation, we will report the structure of stomagen and discuss the functional mechanism.

#### 【序論】

植物の気孔は光合成のために水蒸気や二酸化炭素を通す働きをする小さな孔である。この気孔の数は光などの環境的な外的要因の他に植物個体の産生する生体物質によっても制御されている。気孔の数を負に調節する(= 減らす)因子は数種類知られていたが、正の調節因子は長い間不明であった。ごく最近、気孔の密度を正に調節するペプチドが初めて発見された。このペプチドは6つのCysを含む計45アミノ酸残基からなり、ストマジエンと命名された(1)。ほぼ同時期に、ストマジエン分子内の3組のジスルフィド結合の組合せが決定された(2)。このように気孔の数の制御機構の分子レベルでの研究は、まだ始まったばかりである。

我々はこのストマジエンの構造-機能相関をNMRで研究することにしたが、既存の大腸菌や酵母の発現系では試料を作製できなかった。そこで、我々が開発した植物培養細胞とウイルスベクターを用いた試料調製システムを使って安定同位体標識されたストマジエンを調製し、NMRによる構造解析を試みた。

---

structural analysis, differentiation of stomata, plant cell

○たけうちまこと, すがのしげお, しまだともお, にしむらいくこ, もりまさし, おおきしんや

## 【実験】

ストマジエンをコードしている遺伝子を組み込んだトマトモザイクウイルス由来のウイルスベクターをタバコ培養細胞(BY-2)に取り込ませた(1, 3)。安定同位体標識試薬を含む液体培地で培養細胞を増殖させた後、ホルモン添加によってストマジエンを発現誘導した(4)。誘導後3日目の細胞を回収し各種生化学的な手法でストマジエンを精製した。また、受託合成したストマジエンのリフォールディングと精製を行った(1)。これらのサンプルを用いて立体構造解析に必要な各種NMRデータを取得した。NMR測定にはBruker AVANVE III 800を用いた。得られたデータをNMRPipeで処理し、NMRViewJで解析した。立体構造計算にはXplor-NIH(ver. 2.21)を使用した。

## 【結果・考察】

図1に示したようにストマジエンは良好な $^{15}\text{N}$ -HSQCスペクトルを与えた。主鎖シグナルの帰属の結果をもとにCSIを利用して2次構造を予測したところ、2本の $\beta$ ストランドがあることが推定された。NOEデータからこれら2本の $\beta$ ストランドがシートを形成していることが示された。また、異種核NOE実験の結果より、N末端側には運動性が大きい領域が存在することも明らかになった。現在、立体構造の精密化を行っている。ポスターでは立体構造の詳細と作用機序のモデルを発表する。

## 【参考文献】

- 1) Sugano, S. S., Shimada, T., Imai, Y., Okawa, K., Tamai, A., Mori, M. and Hara-Nishimura, I. (2010) *Nature* **463**, 241-244.
- 2) Kondo, T., Kajita, R., Miyazaki, A., Hokoyama, M., Nakamura-Miura, T., Mizuno, S., Masuda, Y., Irie, K., Tanaka, Y., Takada, S., Kakimoto, T. and Sakagami, Y. (2010) *Plant Cell Physiol.* **51**, 1-8
- 3) Dohi, K., Nishikori, M., Tamai, A., Ishiwaka, M., Meshi, T. and Mori, M. (2006) *Arch. Virol.* **151**, 1075-1084.
- 4) Ohki, S., Dohi, K., Tamai, A., Takeuchi, M. and Mori, M. (2008) *J. Biomol. NMR* **42**, 271-277.

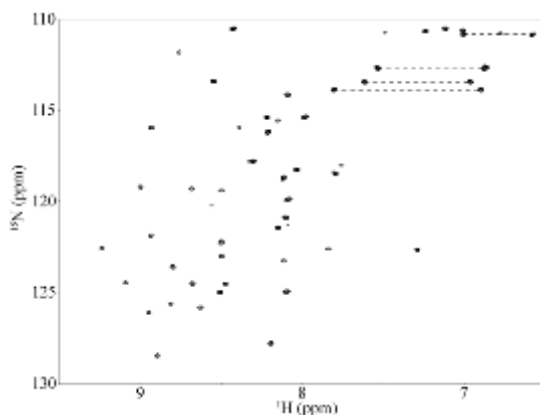


Fig. 1.  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC spectrum of STOMAGEN at 25°C.

# P18

## 疎水性コア安定化によるシトクロム *c* の熱安定性の増大と機能調節

○太 虎林、入江清史、長友重紀、山本泰彦  
筑波大院数物

### Enhancement of thermostability and control of redox activity of cytochrome *c* through stabilization of its hydrophobic core

○Hulin Tai, Kiyofumi Irie, Shigenori Nagatomo, and Yasuhiko Yamamoto  
Dept. of Chem., Univ. of Tsukuba

Thermophile *H. thermophilus* cytochrome *c*<sub>552</sub> (HT) and mesophile *P. aeruginosa* cytochrome *c*<sub>551</sub> (PA) are small monoheme-containing electron transfer proteins, which exhibit high sequence identity (56 %) to each other, and their main-chain folding is almost identical. But HT is much more stable than PA. A detailed comparison of the protein interior between them highlighted sizable differences in packing among amino acid side chains, and site-directed mutants of PA, for which amino acid substitutions were selected with reference to corresponding residues in HT, exhibited thermostabilities between those of the two proteins. We extended our efforts to stabilize the heme pocket of HT by an amino acid substitution, V28I, in order to design and prepare proteins even more thermostable than HT. The study demonstrated that Ile improved the hydrophobic packing of heme pocket by the additional methyl group, leading to the enhancement of the thermostability of HT.

**【背景・目的】** 好熱性水素細菌 (*Hydrogenobacter thermophilus*) シトクロム *c*<sub>552</sub> (HT) の変性温度 ( $T_m$ ) は、酸化型と還元型でそれぞれ 109.8、129.7 °C である。一方、HT の相同タンパク質である緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) シトクロム *c*<sub>551</sub> (PA) の  $T_m$  は、酸化型の場合 HT より 28 °C も低い。私共は、両者のアミノ酸配列の違いに着目し、PA のアミノ酸を HT での対応するアミノ酸に置換した一連の人工変異体の研究を通して、タンパク質の熱安定性発現機構と酸化還元電位 ( $E_m$ ) 調節機構の解明を行ってきた<sup>[1]</sup>。本研究では、これまでの研究から得られた知見に基づき、ヘム活性部位周辺の原子パッキングをより密にすることで、野生型 HT より熱安定性の高いタンパク質の創製を試みた。HT の X 線結晶構造解析により<sup>[2]</sup>、ヘム近傍の疎水性コアの中心に存在する Val28 の周囲には、比較的大きな空隙が存在することが示されていることから (Fig. 1)、この空隙を埋めて疎水性コアを安定化すれば、タンパク質の熱安定性はさらに増大すると期待される。そこで、Val28 を Ile または Leu に置換した変異体 (V28I, V28L) を調製し、タンパク質の  $T_m$  や  $E_m$  に及ぼす影響を解析した。

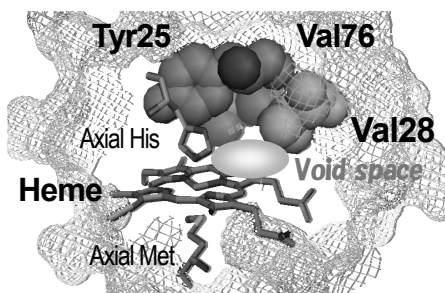


Fig. 1 Void space near Val28 of HT (pdb: 1YNR). Val28, Tyr25, and Val76 are shown as a CPK model and the heme, together with Fe-coordinated His and Met, is shown as a stick model. The void space is schematically illustrated as a gray ellipse.

### 【結果・考察】

#### アミノ酸置換がタンパク質の熱安定性に及ぼす影響

酸化型 HT、V28I 及び V28L の <sup>1</sup>H NMR スペクトルを Fig. 2 に示す。ヘムメチル及び軸配位子 Met 側鎖プロトンシグナルが常磁性シフトにより大きく分離して観測され、これらのシグナルはヘム近傍の立体構造の変化を鋭敏に反映する。V28I、V28L はいずれも野生型 HT と類似した NMR スペクトルを示したことから、アミノ酸置換はヘム近傍の立体構造には

キーワード：常磁性 NMR、シトクロム *c*、酸化還元電位

○たい こりん、いりえ きよふみ、ながとも しげのり、やまもと やすひこ

ほとんど影響を及ぼさないことが確認された。円二色性の温度依存性の解析から、酸化型と還元型 V28I の  $T_m$  はそれぞれ 113.2、129.9 °C であると求められた (Table 1)。このように V28I は酸化型だけを選択的に安定化することが明らかになり、野生型より熱安定性の高いタンパク質の調製に成功した。従って、Ile 側鎖の  $C_6H_5$  はヘム近傍の空隙を埋めるのに適切な大きさであり、予想通り疎水性コアが安定化されたと考えられる。一方、V28L では、酸化型と還元型タンパク質の  $T_m$  はそれぞれ 106.6、124.4 °C であると求められ、両者の熱安定性は共に低下した。従って、Leu 側鎖の 2 つの  $C_6H_5$  はヘム近傍の空隙に対して大きすぎるため、疎水性コアが逆に不安定化されたと考えられる。還元型 HT、V28I 及び V28L の  $^1H$  NMR スペクトルを Fig. 3 に示す。低磁場領域には、Val28 と近接し、ヘム 17 プロピオン酸と水素結合を形成している Trp54 側鎖の  $N_5H$  シグナルが観測されており、Val28 周辺の立体構造変化の指標として用いることができる。Trp54 の  $N_5H$  シグナルは、V28I のアミノ酸置換によりほとんど影響を受けないのに対して、V28L では明確な高磁場シフトを示した。V28L のアミノ酸置換による高磁場シフトからは、Trp54 とヘム 17 プロピオン酸の水素結合が弱くなったと考えられることから、Leu はヘム近傍の空隙を埋めるのには立体的に大きすぎることを示された。

### アミノ酸置換がタンパク質の機能に及ぼす影響

V28I と V28L の  $E_m$  は、サイクリックボルタンメトリーにより、それぞれ 199、196 mV であると求められ、両者とも野生型 (245 mV) より  $E_m$  は低下した (Table 1)。V28I における  $E_m$  の低下は、酸化型が選択的に安定化することにより、酸化型と還元型のエネルギー差が小さくなってことに起因すると考えられる (Table 1)。一方、V28L では、還元型がより顕著に不安定化され、酸化型と還元型のエネルギー差が小さくなったことに起因すると考えられる (Table 1)。従って、Val28 の周辺の疎水性コアの安定性の変化は、機能調節に密接に関与することが明らかになった。

**【結論】** Val28 周辺の疎水性コアにおける原子パッキングをより密にすることで、野生型より熱安定性の高いタンパク質を創製することに成功した。また、Val28 周辺の疎水性コアの安定性は、導入するアミノ酸側鎖のサイズに依存すること、及びタンパク質の熱安定性と機能調節に密接に関与することが明らかになった。

**References:** [1] H. Tai *et al.*, *Biochemistry*, 49, 42-48 (2010); S. Mikami *et al.*, *Biochemistry*, 48, 8062-8069 (2009); S. J. Takayama *et al.*, *J. Biol. Inorg. Chem.*, 14, 821-828 (2009). [2] C. Travaglini-Allocatelli *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 280, 25729-25734 (2005).

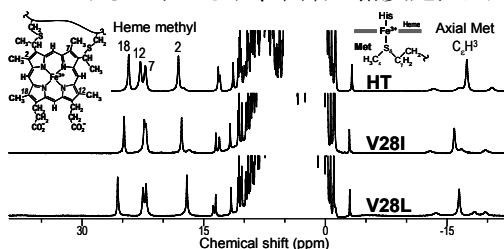


Fig. 2  $^1H$  NMR spectra of the oxidized HT, V28I, and V28L. The heme methyl and axial Met59 side chain proton signals are resolved in downfield and upfield shifted regions, respectively.

Table 1 Denaturation temperatures ( $T_m$ ) and redox potentials ( $E_m$ ) of HT, V28I, and V28L.

	$T_m^a$ (°C)				$E_m^b$ (mV)
	oxidized	$\Delta T_m$	reduced	$\Delta T_m$	
HT	109.8	—	129.7	—	245
V28I	113.2	+3.4	129.9	+0.2	199
V28L	106.6	-3.2	124.4	-5.2	196

<sup>a</sup> Observed at pH7.0. Errors  $\pm 0.5$  °C.

<sup>b</sup> Observed at 25 °C, pH6.0. Errors  $\pm 2$  mV.

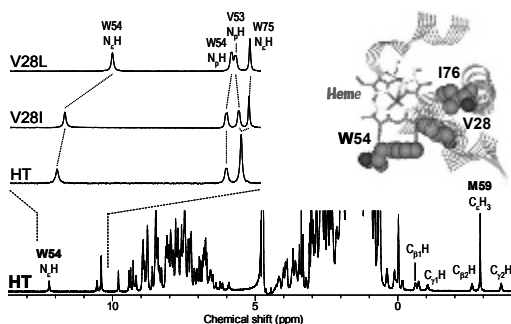


Fig. 3  $^1H$  NMR spectra of reduced HT (bottom). Portions, 12.6 – 10.2 ppm of  $^1H$  NMR spectra of reduced HT, V28I, and V28L are illustrated in the upper left corner, and the molecular structure of HT in the upper right corner.



# P19

## ミミズ由来R型レクチンC末端ドメインのラクトースとの結合状態でのNMR構造

○逸見 光<sup>1</sup>, 久野 敦<sup>2</sup>, 海野幸子<sup>2</sup>, 平林 淳<sup>2</sup>

<sup>1</sup>農研機構・食総研

<sup>2</sup>産総研・糖鎖医工学研究センター

### NMR structure of the C-terminal domain of an R-type lectin from earthworm in the lactose-binding state

○Hikaru Hemmi<sup>1</sup>, Atsushi Kuno<sup>2</sup>, Sachiko Unno<sup>2</sup>, and Jun Hirabayashi<sup>2</sup>

<sup>1</sup>National Food Research Institute, National Agricultural and Food Research Organization (NARO), Tsukuba, Japan.

<sup>2</sup>Research Center for Medical Glycoscience, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), Tsukuba, Japan.

The C-terminal domain of an R-type 29-kDa lectin (EW29Ch) from the earthworm *Lumbricus terrestris* has two sugar-binding sites ( $\alpha$  and  $\gamma$ ). Our recent paper<sup>1</sup> showed that the K<sub>d</sub> value of the  $\alpha$  sugar-binding site were approximated to 0.01-0.07mM for lactose, whereas that of the  $\gamma$  sugar-binding site was 2.66mM for lactose. Although the crystal structure of the complex between EW29Ch and lactose was reported, it is still unclear why the  $\alpha$  sugar-binding site binds to lactose more strongly. In the present study, the high-resolution NMR structure of EW29Ch in the lactose-binding state was characterized by a  $\beta$ -trefoil fold as expected from the crystal structure of lactose-liganded EW29Ch. The NMR relaxation experiments for the backbone of EW29Ch in the sugar-free state and in the lactose-binding state showed that the differences between the two states were particularly observed for the  $\alpha$  sugar-binding site.

分子量が2万9千のミミズ由来レクチン (EW29) は、27%アミノ酸配列が同一の2つのドメインからなり、さらに、そのアミノ酸配列中に“Gly-X-X-X-Gln-X-Trp”と言うモチーフ構造を持つ<sup>2</sup>。このモチーフ構造は、これまで多くの糖認識タンパク質で発見されており、R-typeレクチンファミリーを形成している。さらに、このレクチンの特徴として、R-typeレクチンファミリーに属する他のタンデムリピートタンパク質がドメイン毎に一つの糖結合部位しか持たないことから単独のドメインでは赤血球凝集活性を持たないと考えられているが、EW29においてC末端ドメイン単独 (EW29Ch)でもEW29に比べ10倍程度低い活性ではあるが赤血球凝集活性を持つことが知られている。また、最近EW29 Chと糖との結晶構造が解析され、分子内に2つの糖結合部位 ( $\alpha$ 結合部位と $\gamma$ 結合部位)が存在することがわかった<sup>3</sup>。さらに、我々は最近、EW29Chと各種糖との相互作用について、NMR滴定実験法を用いて解析を行い、 $\alpha$ 結合部位が $\gamma$ 結合部位に比べて約100倍高い糖結合能をもつことを報告した<sup>1</sup>。

---

レクチン, 糖, 相互作用

○へんみひかる, くのあつし, うんのさちこ, ひらばやしじゅん

今回、我々は、 $^{15}\text{N}$ ,  $^{13}\text{C}$ ラベル体EW29Ch／非ラベル体ラクトース = 1 / 8 の試料を調製し、0.7-1mMの濃度とした。Bruker社製Avance600MHzを用いて、25°CでNMR測定を行った。NOEによる距離情報、二面角情報、さらに水素結合情報により構造計算を行った後、残余双極子相互作用 (RDC) を加えて、より精密なラクトース結合状態における立体構造を解析した。さらに、 $^{15}\text{N}$ ラベル体EW29Ch及び $^{15}\text{N}$ ラベル体EW29Ch／非ラベル体ラクトース = 1 / 8 の各試料を用いて、 $^{15}\text{N}$ 核緩和 ( $R_1$ ,  $R_2$ , 及び  $\{^1\text{H}\}$ - $^{15}\text{N}$  NOE) の測定を行い、遊離状態とラクトースとの結合状態における分子内運動性の解析を行ったので、その結果について報告する。

#### [結果と考察]

今回、我々は、X線結晶構造解析で糖との複合体解析において、2つの糖結合部位 ( $\alpha$  と  $\gamma$ ) での糖との相互作用についてほとんど同じ相互作用を示すことが報告されているにも関わらず、NMR滴定実験において  $\alpha$  結合部位が  $\gamma$  結合部位に比べラクトースに対して約100倍高い結合能を持つことから、 $\alpha$  結合部位のラクトースとの相互作用を重点的に解析するため、非ラベル体ラクトースに対して $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ラベル体EW29Chを糖／タンパク質比が8になるようにサンプルを調製し、多核多次元NMRの測定を行った。RDCの測定については、PEG/Hexanol系液晶溶媒を用いて試料を調製し、IPAP-HSQCの測定を行った。それらのNMRデータを用いてラクトース結合状態での立体構造を解析した結果、予想通り  $\beta$ -trefoil構造を形成し、遊離状態でのNMR構造やラクトースとの結合状態での結晶構造と大変類似していたが、一部ループ構造や糖結合に関係する残基において違いが見られた。

遊離状態及びラクトース結合状態におけるそれぞれの分子内運動性を解析するために、 $^{15}\text{N}$ 核の緩和測定を行った。その結果、 $\{^1\text{H}\}$ - $^{15}\text{N}$  NOE及び $R_1$ のデータにおいて、遊離状態及びラクトース結合状態で大きな違いが見られなかった。また、RCI (Random Coil Index) <sup>4</sup>から予測されたオーダーパラメーターの比較においても大きな違いが見られなかった。一方、 $R_2$ においては、結合部位、特に $\alpha$ 結合部位において、違いが見られた。これらの結果より、遊離状態とラクトース結合状態間での分子内運動性の違いは、 $R_{ex}$  (化学交換の速度定数) によるものと示唆された。

今回のラクトースとの結合状態におけるNMR構造及び $^{15}\text{N}$ 核緩和解析より、EW29Chの糖との結合活性に対する分子内運動性の重要性が推測されたが、さらに、現在、糖との複合体等についても解析を進めている。

#### References

1. Hemmi, H., Kuno, A., Ito, S., Suzuki, R., Hasegawa, T., and Hirabayashi, J. (2009) FEBS J. 276, 2095-2105.
2. Hirabayashi, J., Dutta, S. K., and Kasai, K. (1998) J. Biol. Chem. 273, 14450-14460.
3. Suzuki, R., Kuno, A., Hasegawa, T., Hirabayashi, J., Kasai, K., Momma, M., and Fujimoto, Z. (2009) Acta Crystallogr D 65, 49-57.
4. Berjanskii, M. V., and Wishart, D. S. (2005) J. Am. Chem. Soc. 127, 14970-14971.

## P20

### 巨大タンパク質複合体のモデル構築を目的とした 残基選択的交差飽和法の開発

○小澤 新一郎<sup>1</sup>、五十嵐 俊介<sup>1</sup>、鈴木 勉<sup>2</sup>、甲斐荘 正恒<sup>3, 4</sup>  
大澤 匡範<sup>1</sup>、嶋田 一夫<sup>1, 5</sup>

<sup>1</sup>東大・院薬系、<sup>2</sup>東大・院工系、<sup>3</sup>名大・院理、<sup>4</sup>首都大東京・戦略研究センター、<sup>5</sup>産総研・バイオメディシナル情報研究センター

### Development of residue selective cross-saturation (RSCS) method for modeling a large protein-protein complex

○Shin-ichiro Ozawa<sup>1</sup>, Shunsuke Igarashi<sup>1</sup>, Tsutomu Suzuki<sup>2</sup>, Masatsune Kainosho<sup>3, 4</sup>,  
Masanori Osawa<sup>1</sup>, and Ichio Shimada<sup>1, 5</sup>

<sup>1</sup>Grad. Sch. Pharm. Sci., The Univ. of Tokyo, <sup>2</sup>Grad. Sch. Eng., The Univ. of Tokyo, <sup>3</sup>Grad. Sch. Sci., Nagoya Univ., Center for Priority Areas, Tokyo Metropolitan Univ., <sup>5</sup>BIRC, AIST

Structural analyses of protein-protein complexes provide information about their structural mechanism of the functions. We previously developed NMR techniques, cross-saturation (CS) and amino acid selective CS (ASCS) methods. The ASCS method provides the candidates of the proximal residue pairs between two protein molecules, which enables to build a structural model of the complex with reference to the structural complementarity of the individual structures. In order to identify the proximal residue pairs unambiguously, we propose here a residue selective CS (RSCS) method, which uses a residue selective <sup>1</sup>H-labeled protein as a CS-donor. In this presentation, the selectivity and efficiency of the residue selective <sup>1</sup>H-labeling as well as the application of the RSCS method to a complex of yeast ubiquitin (Ub) and yeast ubiquitin hydrolase 1 (YUH1) will be discussed.

#### 【背景・目的】

タンパク質の機能を解明するためには、タンパク質単体の立体構造に加え、標的分子との特異的な認識機構を解明する必要がある。

これまでに当研究室では、タンパク質複合体の分子認識様式を解明する NMR 手法として、結合界面残基を同定する交差飽和法 (CS 法、[1]) および分子間の近接残基対を同定するアミノ酸選択的 CS 法 (ASCS 法、[2]) を開発してきた。ASCS 法は CS ドナー分子をアミノ酸選択的に <sup>1</sup>H 標識し、交差飽和源を一種類のアミノ酸に限定する手法である。複合体中の個々のタンパク質の立体構造が既知の場合、CS ドナー分子表面の <sup>1</sup>H 標識アミノ酸の分布と CS アクセプター分子上の交差飽和を受けたアミドプロトンの位置関係から、分子間の近接残基対を同定でき、複合体モデルが構築可能となる。

しかしながら、高分子量複合体においては分子表面積の増大とともに CS ドナー分子表面に類似したアミノ酸分布パターンが複数出現し、近接残基対の一義的な決定が困難となることが問題であった。

---

タンパク質間相互作用、交差飽和法、無細胞タンパク質合成

○おざわ しんいちろう、いがらし しゅんすけ、すずき つとむ、  
かいのしょう まさつね、おおさわ まさのり、しまだ いちお

そこで本研究では、特定の一残基を $^1\text{H}$ 、 $^2\text{H}$ を $^2\text{H}$ 標識して交差飽和源を一残基のみに限定する「残基選択的CS法 (RSCS法)」の開発を目的とした。RSCS法においては、交差飽和源となるCSドナー上の残基と交差飽和を受けたCSアクセプター上の残基が1対1で対応するため、巨大タンパク質複合体においても近接残基対の一義的な同定および複合体モデルの構築が可能となる。

#### 【材料・方法】

複合体の立体構造が既知である酵母ユビキチン(Ub)-酵母ユビキチン加水分解酵素C90S変異体(YUH1)複合体にRSCS法を適用することとし、CSドナーであるYUH1のL165の一残基選択 $^1\text{H}$ 標識を試みた。

はじめに、均一 $^2\text{H}$ 標識タンパク質調製を可能とする無細胞発現系を構築した。次に、amber変異を導入したYUH1鋳型プラスミド、amberコドン認識するサプレッサーtRNA(stRNA)およびstRNAにアミノ酸を付加するアミノアシルtRNA合成酵素を調製した。stRNAはCCA付加酵素を添加した転写反応によって高純度に調製し、 $[\text{^1H}, \text{^{13}C}]$ -Leuにてアミノアシル化した。これらを用いて、L165選択 $[\text{^1H}, \text{^{13}C}]$ 標識YUH1を調製した。

次に、一残基選択 $[\text{^1H}, \text{^{13}C}]$ 標識率をNMR法によって算出後、L165選択 $[\text{^1H}, \text{^{13}C}]$ 標識YUH1をCSドナー、均一 $[\text{^2H}, \text{^{15}N}]$ 標識UbをCSアクセプターとしたRSCS実験を行った。

#### 【結果】

L165選択 $[\text{^1H}, \text{^{13}C}]$ 標識YUH1の $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ HSQCスペクトルから、YUH1のL165選択的に $[\text{^1H}, \text{^{13}C}]$ 標識されたことを確認した。また、L165側鎖の $^1\text{H}/^2\text{H}$ 率は50%程度と算出した。

そこで、次にこの試料をCSドナーとしたRSCS実験を行った。その結果、UbのR74およびG75においてNMRシグナル強度の減少が観測された。したがって、UbのR74およびG75がYUH1のL165に近接すると結論した。

#### 【考察】

UbのR74およびG75とYUH1のL165は、結晶構造において5Å以内に近接する残基対である。したがって、今回のRSCS実験結果はUb-YUH1複合体の残基間距離を反映する妥当な結果である。一方、YUH1のL165周辺には他にも複数のLeu残基が存在するため、YUH1上のすべてのLeuが交差飽和源となるASCS実験のみではUbのR74およびG75がYUH1のL165に近接することを一義的には決定できていなかった。

今回、ASCS実験で得られた近接残基対候補に対してRSCS実験を適用することにより、Ub-YUH1複合体の近接残基対を一義的に同定することができた。同様の方法により、従来法では解析が困難であった巨大タンパク質複合体についても近接残基対の一義的な同定および複合体モデルの構築が可能となると期待される。

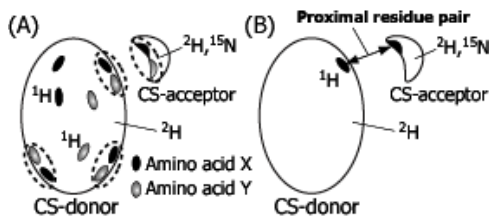


Fig.1 Schematic representation of the ASCS (A) and RSCS (B) methods.

(A) Multiple candidates are provided by the ASCS method.

(B) A proximal residue pair can be unambiguously identified by the RSCS method.

[1]Shimada I. et al., *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **54**, 123-140 (2009)

[2]Igarashi S. et al., *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 12168-12176 (2008)