

2003年7月18日

独立行政法人 理化学研究所
独立行政法人 物質・材料研究機構

世界最高磁場の NMR でタンパク質の超高感度計測が実現

- 物質・材料研究機構がタンパク 3000 プロジェクトで協力 -

わが国は現在、3000 種類の主要なタンパク質の構造・機能解析を実施する「タンパク 3000 プロジェクト」を進めており、この一環として、理化学研究所（小林俊一理事長）では内 2500 種類を対象に、横浜研究所において、NMR 装置を用いて解析に鋭意取り組んできました。

理化学研究所では、物質・材料研究機構（岸輝雄理事長）との共同研究により、日本電子(株)の協力を得て、同機構の所有する世界最高の感度と分解能を持つ 920MHz NMR 装置^{*1}をタンパク質の構造解析に適用する準備を進め、このたびこの装置に 3 重共鳴設備を整備し、800MHz NMR に比べて 30% から 40% 多い数の NOESY シグナル(立体構造を決定する上で必須な情報)を得る事に成功しました。

今後はこの装置により解析できるタンパク質基本構造（ドメイン）の範囲が飛躍的に大きく広がることが期待され、プロジェクトの一層の進展が望まれるところです。

1. 背景

物質・材料研究機構では、文部科学省の超伝導材料研究マルチコアプロジェクト第 2 期（平成 7 年～平成 13 年）の一環として、世界最高の磁場で動作する 920MHz の NMR 磁石を開発しました。磁石は、物質・材料研究機構強磁場研究センター（つくば市桜地区）に新しく建設された非磁性実験棟に設置され、平成 14 年 4 月に 920MHz での永久電流モードの運転を開始しました（図 1 を参照）。磁石はタンパク質の構造・機能解析を行う上で十分な性能を持つことが確認され、理化学研究所と物質・材料研究機構は共同でタンパク質の立体構造解析に向けた NMR としての整備を進めてきました。NMR の分光計とプローブは日本電子（株）が製作しました。平成 14 年 8 月に水素核信号を検出できる NMR 装置が完成しましたが、さらに、分子量が大きく複雑な構造を持つタンパク質の立体構造解析を進める上で必要になる、水素核/炭素核/窒素核の NMR 信号を同時に計測する 3 重共鳴 NMR 装置の整備を進めてきました。

2. 今回の成果

理化学研究所はタンパク 3000 プロジェクトを推進しておりますが、今回、物質・材料研究機構との共同研究により、日本電子(株)の協力を得て、生体高分子用の 920MHz 3 重共鳴 NMR 装置と、タンパク質の立体構造解析に必要とされるパルスシーケンス^{*2}を使用し、性質の異なる数種類のタンパク質について NMR 計測を実施した結果、タンパク質の立体構造解析に適用する上で世界最高の感度と分解能が実現しました。

得られた信号の例を図 2 に示します。この信号は、アポトーシス（細胞死）の最

終段階で DNA 切断化に関与するタンパク質 (DEF-C/ICAD) のスペクトルです (DFE-C/ICAD の構造は図 3 参照)。パルスシーケンスには、窒素核編集 NOESY (nuclear Overhauser effect spectroscopy) 法を用いています。NOESY スペクトルにおける一つ一つのシグナルの大きさから水素核間の距離を求め、タンパク質の立体構造を決定していきます。920MHzNMR は感度と分解能が高いため、500MHzNMR の 3 倍の数の NOESY シグナルを計測できます。また、800MHzNMR より 30% から 40% 多い数の NOESY シグナルを計測できます。NOESY シグナルの感度と分解能が高いほど、タンパク質の立体構造の決定が容易になりますから、本装置の適用により、立体構造解析の精度が更に向上できると期待できます。また、発現量が少なくサンプル濃度が不十分なタンパク質の基本構造 (ドメイン) についても、高感度な計測が可能になります。

長い間、NMR で構造解析の対象となるタンパク質は 20~30kDa^{*3} 以下の比較的小さな分子量のものに限られていました。しかし、昨年ノーベル賞を受賞した Wuthrich 博士らが、TROSY 法^{*4} という新しいパルスシーケンスを開発してから、大きな分子量のタンパク質でも、構造解析の対象とすることが可能になりつつあります。TROSY 法は 1GHz 付近の高磁場で最も強い効果が得られます。920MHzNMR で得られた TROSY 信号を図 4 に示します。この信号は、DNA 結合タンパク質である Abp1 タンパク質と DNA 鎖の複合体について計測したものです (複合体の構造は図 5 参照)。従来法によるスペクトルに比べて TROSY 法のスペクトルのシグナルが小さいのは、TROSY 法の効果でシグナルが急峻で高いピークとなり、シグナルの検出感度が向上しているためです。TROSY 法の効果は、タンパク質の分子量が大きいほど顕著になります。これまで計測が困難であると考えられてきた膜タンパク質^{*5} でも、920MHz で明確なシグナルを得ることができました。膜タンパク質は重要な創薬ターゲットであり、今後この方面への展開が期待されます。

3. 今後の展開

今後、理化学研究所では、物質・材料研究機構との共同研究により、さらに強い磁場で動作する NMR 装置の開発も進めていく予定です。また、膜タンパクなどを含む大きな分子量のタンパク質の構造解析を可能とする、より高感度の計測を目指していきます。この装置を利用することで、従来の装置では計測が困難であった、発現量が少なくサンプル濃度が不十分で弱いシグナルしか得られない基本構造や、分子量が大きく明確なシグナルが得られない基本構造についても構造・機能解析を進めることができるようになります。

これにより、理化学研究所がタンパク 3000 プロジェクトを推進するに当たって、より一層重要な創薬・医療等に有用なタンパク質の解析を正確に行っていくことが可能となるとともに、我が国のタンパク質の構造解析研究においても、大きな威力を発揮するものと期待されます。

(問い合わせ先)

独立行政法人理化学研究所 横浜研究所

ゲノム科学総合研究センター

タンパク質構造・機能研究グループ

プロジェクトディレクター 横山 茂之

チームリーダー 前田 秀明

Tel : 045-508-7211 / Fax : 045-508-7360

横浜研究所 研究推進部

高橋 正海

Tel : 045-503-9117 / Fax : 045-503-9113

独立行政法人物質・材料研究機構 強磁場研究センター

センター長 和田 仁

Tel : 029-863-5411 / Fax : 029-863-5441

(報道担当)

独立行政法人理化学研究所 広報室

駒井 秀宏

Tel : 048-467-9272 / Fax : 048-462-4715

独立行政法人物質・材料研究機構 広報室

Tel : 029-859-2026 / Fax : 029-859-2017

<補足説明>

※1 NMR

NMR (核磁気共鳴) は、物質内部の原子核の位置や価電子状態に依存する電磁波を、原子核が吸収・放出する現象である。放出されたエネルギーを測定することによって、物質の微細な原子・分子構造を決定できる。プロトンの場合、21.6Tの磁場中で920MHzの周波数の電磁波を吸収・放出することから、この装置を920MHz NMRと呼ぶ(図6参照)。

※2 パルスシーケンス

NMR法では、ラジオ周波数帯域の電磁波をパルス状に数 μ 秒程度サンプルに加え、サンプルからの信号を受信してデジタル化し、フーリエ変換してNMRスペクトルを得る。この電磁波パルスの長さ、励起核の順番に応じて、100種類以上の多次元NMRパルスシーケンスがあり、タンパク質のどの原子核のNMR信号を計測するかに応じて使い分ける。

※3 Da(ダルトン)

分子や原子の質量を表す単位。炭素の同位元素 ^{12}C (炭素)原子の1個の質量を12Daとする。したがって、 $1\text{Da}=1.661\times 10^{-27}\text{kg}$ 。一般には、1molあたりのタンパク質の

相対質量である分子量の単位として便宜的に使用している。

※4 TROSY 法

一般に分子量の大きなタンパク質では、NMR シグナルがブロードで弱い。強磁場下で TROSY 法を用いると、分子量の大きなタンパク質でも、シャープで強い NMR シグナルが得られるようになる。TROSY 法は 1GHz 付近で最も効果大きい。

※5 膜タンパク質

生体膜を構成しているタンパク質で、全ゲノムをコードするタンパク質の 1/3 を占める。生体膜の表面にあるタンパク質と、内部に埋もれたタンパク質がある。外界からの刺激に反応する受容体、イオンポンプなどの輸送体など、環境からの刺激を強く受けるタンパク質であるため、創薬の重要なターゲットとされ、高効率な構造・機能解析法の創出が待たれている。

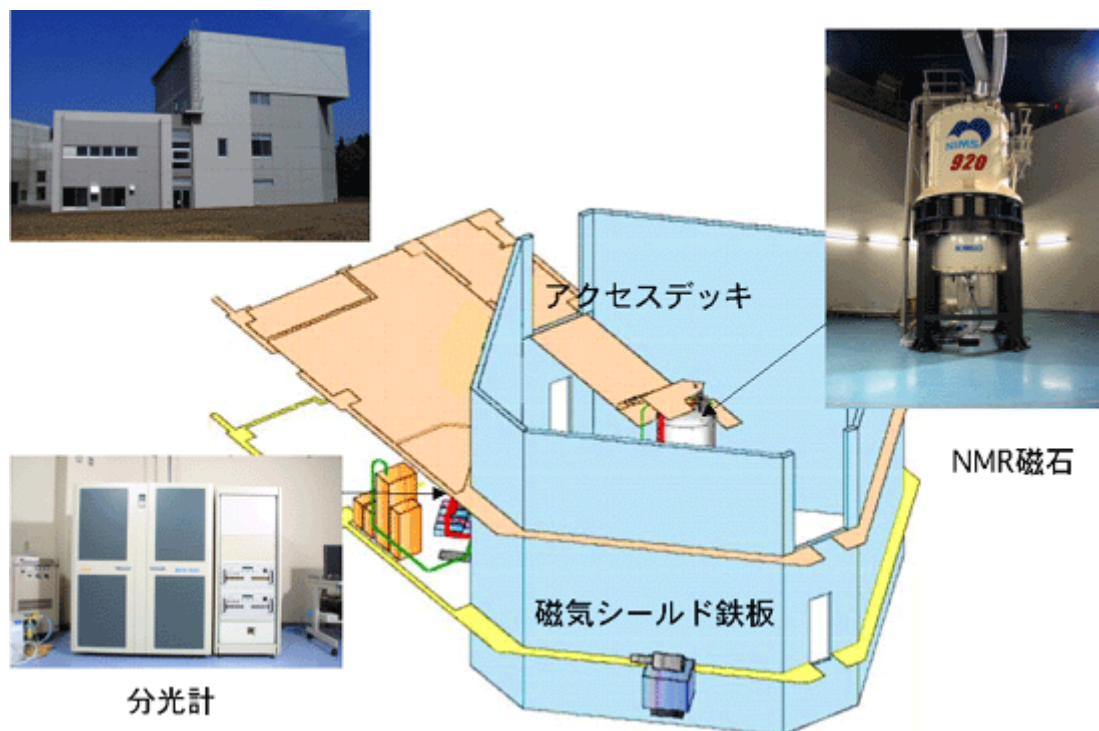


図1 920MHzNMR スペクトロメータ（物質・材料研究機構 強磁場研究センター）

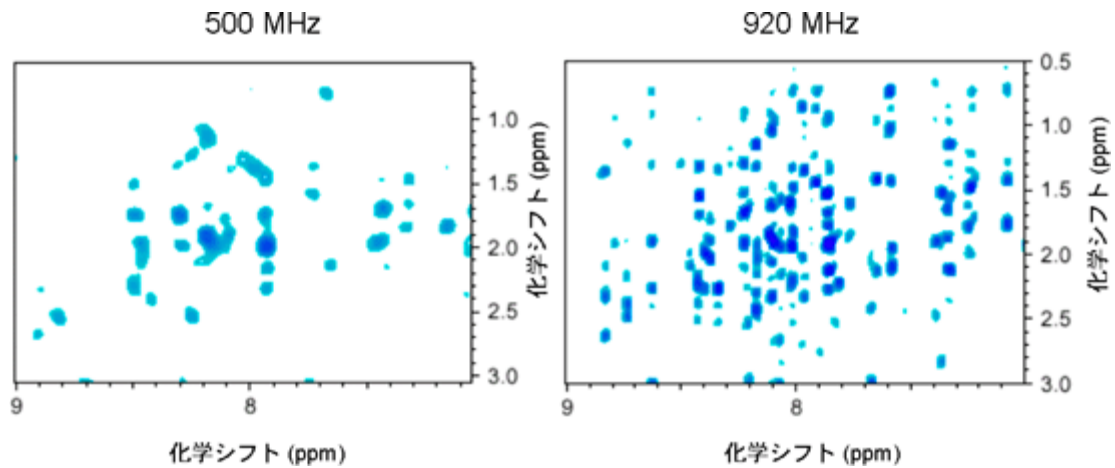


図2 DFF-C/ICAD^(注)のNOESYスペクトル

(注) DFF-C/ICAD：アポトーシス（細胞死）の最終段階でDNA切断化に関与するタンパク質

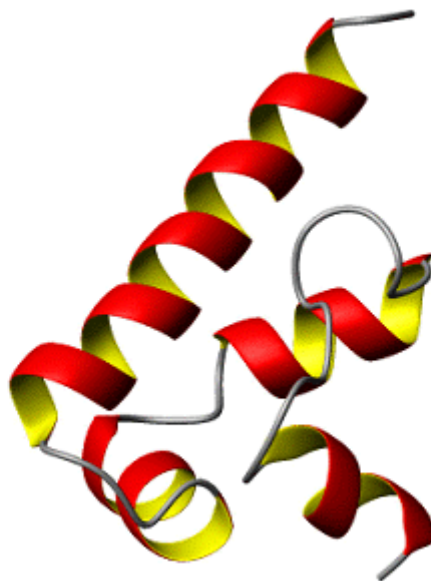
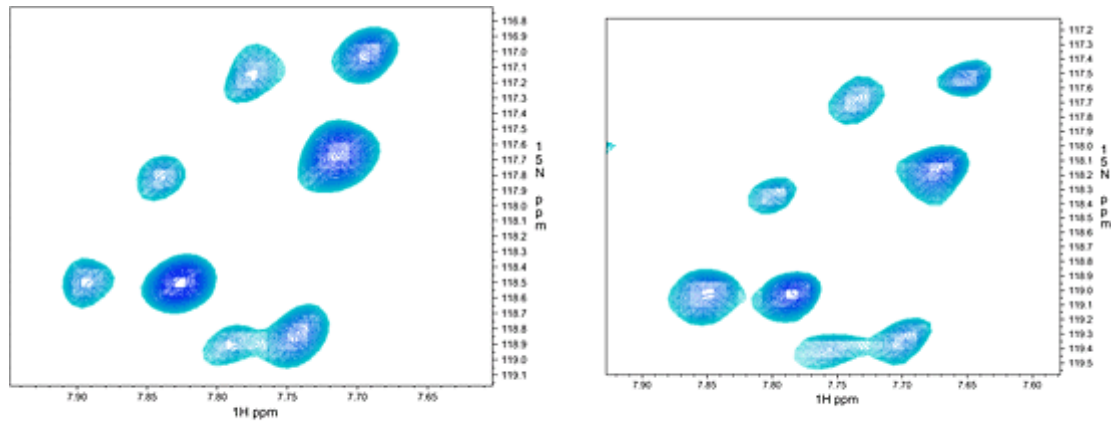


図3 DFF-C/ICAD^(注)の立体構造

(注) DFF-C/ICAD：アポトーシス（細胞死）の最終段階でDNA切断化に関与するタンパク質



従来法のスペクトル

TROSY法のスペクトル

図4 従来法とTROSY法によるスペクトルの比較^(注1)
Abp1・DNA複合体^(注2)

(注1) 従来法に対して、TROSY法の方がよりシャープなものとなっている。

(注2) Abp1・DNA複合体：Abp1とは、染色体分配に関わるタンパク質



図5 DNA結合タンパクAbp1とDNA（21塩基対）複合体^(注)の立体構造

(注) Abp1：染色体分配に関わるタンパク質

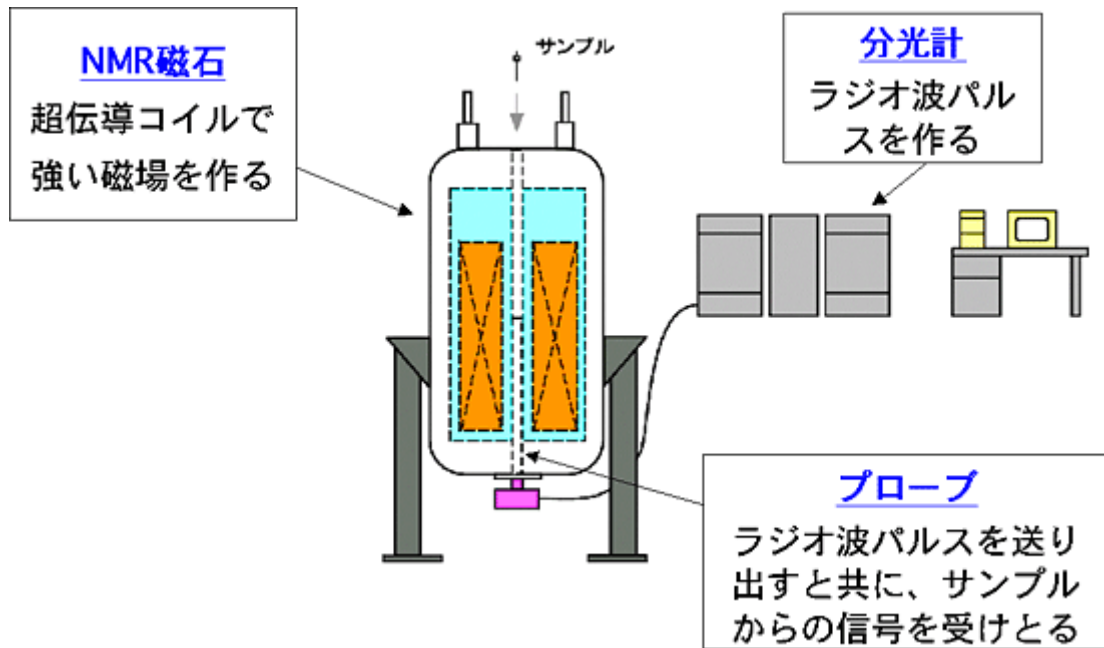


図6 NMR装置の構成