



Development of temperature-jump NMR spectroscopy and its application to the protein folding study

川上, 勝

(Degree)

博士 (理学)

(Date of Degree)

1999-03-31

(Date of Publication)

2008-06-23

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲1916

(JaLCD0I)

<https://doi.org/10.11501/3156317>

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1001916>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏名・（本籍）	かわ 川 ^{かみ} 上 ^{まさる} 勝 (大阪府)
博士の専攻分野の名称	博士（理学）
学位記番号	博い第113号
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位授与の日付	平成11年3月31日
学位論文題目	Development of temperature-jump NMR spectroscopy and its application to the protein folding study (温度ジャンプ NMR 法の開発とそのタンパク質フォールディングへの応用)
審査委員	主査 教授 赤坂 一之 教授 富宅 喜代一 教授 中前 勝彦 助教授 富永 圭介

論文内容の要旨

本研究の第一の目的は、水溶液系を対象とした高速温度ジャンプ NMR 装置の開発にあり、NMR 試料に対してマイクロ波照射を誘電体共振器を介して行うことによりこれに成功した。NMR 分光法は、原子レベルで分子の構造、ダイナミクスを調べることのできる分光法である。装置や測定法的发展により、これまでに高度に発展を遂げてきた。特に生体高分子、タンパク質を対象としてその進展は目覚ましい。しかしながらそれは平衡状態にある系に対しての話であり、非平衡にある系に対しては充分発展しているとは言えない。これに関し、これまでストップフロー NMR が開発されている。しかしこれは溶液混合のために反応は一度であり、NMR 信号の積算に問題がある。

温度や圧力も系の平衡を変化させる因子である。反応がこれらの変化に対して可逆的に起こる場合には、反応を繰り返すことで NMR 信号の積算が可能となる。これまでに当研究室を含め Baldwin, Scheraga 等のグループにより温度ジャンプ NMR 法の開発がなされてきたが、これらは水浴やガス流を用いた温度ジャンプ法であるため、熱伝達効率は非常に悪く、ジャンプに長時間を要した。そこで近年、当研究室において、大出力のマイクロ波発生装置を導入したマイクロ波温度ジャンプ NMR の開発が開始された。しかし当初開発された方法は導体のコイルをマイクロ波照射の媒体として利用するもので、液晶を対象とする研究には適していたが、タンパク質といった水溶液系の試料に対しては NMR 検出感度が十分でなく、また安定性に難点があり、本格的な応用には到らなかった。そこで本研究では、マイクロ波照射の媒体として誘電体共振器の導入を試みた。具体的には、誘電体共振器の空洞部分に試料溶液を配置し、同軸ケーブルでループを作り、これを誘電体共振器とカップリングさせて、マイクロ波を試料に吸収させるというものである。この結果、マイクロ波を高効率で試料に吸収させることに成功し、100 μ l の水溶液試料に対し、20ミリ秒間のマイクロ波照射によって20度もの温度上昇を実現することに成功した。また、誘電体共振器と NMR 検出コイルの干渉は小さく、その結果、感度は飛躍的に向上し、磁場の均一度が良くなり、タンパク質の構造を検討するのに十分な分解能をもつスペクトルを得ることができるようになった。しかし、この時点では、まだ温度ジャンプ直後の試料溶液内の温度不均一性が大きな課題点の一つであった。これを解消するため、非磁性の材

料を用い、高速で試料を攪拌する装置を新たに設計し、製作を行った。この装置の利用により、約100ミリ秒以内で温度を均一化することができ、本装置のデッドタイムが飛躍的に短縮され、より速い反応に対しての応用範囲が広まった。この装置の詳細と性能についてを2章に記した。

次にこの手法をタンパク質のフォールディング研究に応用した。タンパク質が立体構造を形成するメカニズムの解明は、生物物理学の中心課題の一つであり、その解明には、タンパク質の折畳み（フォールディング）過程で現われる種々の状態（変性状態、中間状態）の構造的特性を原子レベルの分解能で解明することである。このためには、タンパク質のフォールディング、アンフォールディング過程を引き起こす温度ジャンプの手法と、原子レベルでの分子構造解析に適する NMR の手法とを組み合わせることが極めて有効であると考えられるが、本研究で開発したマイクロ波温度ジャンプ NMR 法はこれに適している。

3章では、種々のタンパク質のアンフォールディング過程を本手法を用いて調査した結果を報告した。具体的には、タンパク質の温度ジャンプによって引き起こされる熱変性状態へのアンフォールディングの時間変化を1次元 NMR により原子レベルで追跡し、さらに温度ジャンプを2次元 NMR に組み込んだ状態相関2次元 NMR 法 (SC-2D) により、熱変性状態やそれに到る過渡的状态の NMR 信号の帰属に成功し、それらの化学シフト値、線幅からこれらの状態での蛋白質構造に関する知見を得た。

ウシ臍臓リボヌクレアーゼ A において、pH3.5で50°Cから20°Cの1次元温度ジャンプ NMR の測定により、ジャンプ直後のスペクトルはすでに変性状態に近いスペクトルを示し、その後のスペクトルに時間変化がほとんど認められない。このことは、70°Cでリボヌクレアーゼ A の高次構造は温度ジャンプ時間内 (20ミリ秒) で崩壊することを示す。しかし、天然状態と温度ジャンプ直後、また天然状態と200ミリ秒後の間で SC-2D スペクトルを測定し、両スペクトルを比較した結果、ジャンプ直後には存在しなかった信号が200ミリ秒後の SC 2D で現れることを発見し、これは92番のチロシンの δ プロトン由来のものと帰属された。このことは、ジャンプ直後では、まだタンパク質分子内のチロシン92番とプロリン93番残基のペプチド結合は天然状態のシス型の配位をとっていることを示唆している。つまりジャンプ直後に観測されるのはプロリンが異性化して完全にアンフォールディングする前の過渡的分子種であり、SC-2D 法によってその直接検出に成功した。

ウシ α -ラクトアルブミンにおいて、25mM の Ca^{2+} 、4 M の尿素存在下で pH7.2、40°C から65°C へのジャンプ直後、NMR スペクトルは既に変性状態のものに近かった。しかし、いくつかの NMR 信号が幅広くなっている事が観測され、これが時間経過に伴いゆっくりと変性状態に相当する鋭い信号へと変化する現象が認められた。このゆっくりと変化する信号は、SC-2D 法により、26, 60, 103, 107番残基のものと帰属された。これまでの他の研究者により、酸変性状態で、100-110番残基領域が天然状態とは異なる局所的な疎水性クラスターを形成する事が数多く報告されてきた。今回の測定でも、熱変性状態において、これらの残基の化学シフト値がランダムコイル状のものから大きく高磁場へシフトしており、クラスターの存在が示唆された。したがって、温度ジャンプ直後の NMR スペクトルは、 α -ラクトアルブミンの高次構造がほぼ全面的に崩壊したものであり、26, 60, 100-110番残基周辺の構造は、その幅広な信号が示すように、揺らいだ構造をとり、1次元 NMR で見られたジャンプ後のゆっくりとした変化は、この部分が崩壊して行くことを反映しているものと推測された。

4章に本研究のまとめと今後の展望を記した。本手法は、原子レベルの空間分解能を持った NMR に、他の手法では到達できない、短い時間スケールでの時間分解能と、積算による多次元化を組み込

んだ新しい NMR の分野といえる。特に、リボヌクレアーゼの研究の際に新たに考案された、待ち時間を変えた状態相関スペクトルを比較するという方法は、2次元 NMR 法に時間分解能を持たせたことを意味する。本研究ではタンパク質のアンフォールディングのみを追跡したが、タンパク質は低温においても変性することが知られている。したがって低温での変性状態から室温付近への温度ジャンプ1次元 NMR, SC-2D 法により、タンパク質のフォールディングを追跡し、その中間体を検出することが期待される。これらの研究法は現在、マイクロ波を用いた速い温度ジャンプ法によってのみ可能であり、本手法がタンパク質フォールディングの分野へ独自の貢献をして行くことが期待される。また、温度ジャンプ NMR 法は、タンパク質のフォールディングに限らず、温度に依存する反応であれば何に対しても適用可能である。この研究結果は、NMR という原子レベルの眼で、化学的、物理的、生物学的な反応を追跡できる可能性を示した。

論文審査の結果の要旨

NMR 分光法は、平衡状態にある生体高分子、特にタンパク質の構造、ダイナミックスを原子レベルで調べることのできる分光法として、近年高度に発展を遂げてきた。しかし、これまで NMR 分光法は温度、圧力、溶媒条件一定の下で適用され、これらの外部条件を急激に変化させたときに生じる過渡的な状態にある系に対して適用できる、いわゆる kinetic NMR の発展は、濃度ジャンプに対応するストップフロー NMR を除き、その開発は遅れていた。しかし、生体高分子の機能にとって重要な立体構造は、一種の相移転によってポリペプチド鎖から自律的に形成される。ポリペプチド鎖の立体構造形成過程の解明は、遺伝情報発現の最終段階として、生命分子科学の中心課題の一つである。本研究は過熱に伴う蛋白質の構造変化を時間を追って原子毎の分解能で観測する初めての方法である高速温度ジャンプ NMR を、マイクロ波を巧みに利用することにより開発し、その応用の端緒を開いたものである。

温度の急激な変化に伴って起こる反応を、時間を追って原子毎の分解能で記録する温度ジャンプ NMR は、濃度ジャンプ NMR とは異なり、反応が温度の変化に対して可逆的に起こる場合には、温度サイクルを繰り返すことによって信号の積算が可能となり、NMR による蛋白質の構造移転の研究に適している。これまでに当研究室を含め Baldwin, Scheraga 等のグループにより温度ジャンプ NMR 法の開発が試みられてきたが、これらは水浴やガス流を用いた温度ジャンプ法であるため、熱伝達効率は非常に悪く、10~20度のジャンプに数秒以上を要した。

本研究の第一の目的は、水溶液系を対象としたさらに高速の温度ジャンプ NMR 装置の開発にある。これを、NMR 試料に対してマイクロ波照射を誘電体共振器を介して行うという、独創的な技術開発によって成功し、これによって試料温度の20度ジャンプの時間を20ミリ秒程度以下にまで短縮することに成功した。さらにマイクロ波照射に対する操作安定性と NMR の信号検出感度及び分解能が飛躍的に向上した。このことによって、温度ジャンプ NMR 法が初めて、希薄な蛋白質溶液のような水溶液系に有効に適用できるものとなった。

次にこの手法を複数のタンパク質溶液(ウシ臍臓リボヌクレアーゼ A, ウシ α -ラクトアルブミン, ニワトリ卵白リゾチーム)に適用した。温度ジャンプによって引き起こされるポリペプチド鎖のアンフォールディングの過程を、ジャンプ後の時間を追って1次元 NMR によって測定した。さらに温度ジャンプを2次元 NMR と同期して行うことによって、ジャンプ前とジャンプ後との間で自己相関2次元 NMR (状態相関2次元 NMR, SC2D) の測定が可能となり、熱変性状態やそれに到る過渡的状

態にある蛋白質の芳香族プロトン NMR 信号の帰属を行った。化学シフト値，線幅，記号強度から，ジャンプ直後の過渡的分子種の構造に関して新しい知見を得たものである。

本研究は，多くの創意と工夫によって，原子レベルの空間分解能を持った NMR 分光法に，初めてミリ秒程度の短い時間スケールでの時間分解能を持ち込み，多次元化を組み込んだ新しい NMR 分光学の分野を開発し，さらに蛋白質フォールディング研究への新たな道を開いた。本研究は化学及び生物物理学の分野における価値ある貢献であると認める。よって，学位申請者 川上 勝は，博士（理学）の学位を得る資格があると認める。