

Title	NMR Approach to Probe Protein-Protein Interactions Using ¹³ C-Methylation of Lysine Residues
Author(s)	服部, 良一
Citation	大阪大学, 2014, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/34040
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

論文内容の要旨

氏名 (服部 良一)

論文題名

NMR Approach to Probe Protein-Protein Interactions Using ¹³C-Methylation of Lysine Residues
(リジン残基の¹³Cメチル化を用いたNMRによるタンパク質間相互作用検出)

論文内容の要旨

【序論】

タンパク質の NMR 解析を行うためには、部位選択的な検出および感度向上のために安定同位体標識が必須である。これには一般に、大腸菌を用いた組換え発現系によるタンパク質生産時に、安定同位体元素を取り込ませる。しかしながら、高分子量タンパク質や高等生物由来のタンパク質は、大腸菌での生産が困難であることが多い。一方で、化学修飾による安定同位体標識では、精製後のタンパク質の部位特異的な化学反応により、安定同位体を含む化合物を付加するため、タンパク質の生産方法に関する制約がない。

リジン残基の ¹³C メチル化法は、化学修飾によるタンパク質の安定同位体標識法の 1 つである (図 1)。この修飾法は中性 pH かつ 4°C の条件において高効率で反応が進行するため、さまざまな対象に適用が可能である。これまでに、この修飾法を用いて、タンパク質と金属、小分子、核酸およびペプチドとの相互作用が解析されてきたが、本研究では、これをタンパク質間相互作用解析に応用し、その有用性を実証した。具体的には、76 アミノ酸中 7 つのリジンを有するタンパク質であるユビキチンのリジン側鎖に導入したメチル基をプローブとして、3 種のタンパク質との相互作用解析を行った。

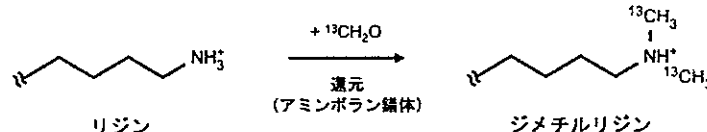


図1 リジン残基の¹³Cメチル化反応

【結果と考察】

ユビキチンに ¹³C メチル化反応を行った結果、すべてのリジン残基がジメチル化されており、均一なサンプル状態であることが確かめられた。また、ユビキチンのメチル化修飾がユビキチンの C 末端を認識する加水分解酵素である YUH1 との相互作用に大きな影響を与えないことが、等温滴定型熱量測定および ¹H-¹⁵N NMR より示された。

メチル化ユビキチンに対する YUH1 の相互作用を、メチル基を検出する ¹H-¹³C NMR で解析した結果、特異的なスペクトル変化が観測された。その化学シフト変化の解析から、既知の複合体結晶構造から推定される妥当な相互作用部位、および等温滴定型熱量測定の結果と合致する解離定数の決定に成功した。また別のタンパク質 2 種類との相互作用実験においても、妥当な相互作用部位および解離定数の決定に成功し、相互作用実験におけるメチル基の化学シフト変化と主鎖アミド基の化学シフト変化の比較より、メチル基では主鎖アミド基の化学シフト変化からは同定できないタンパク質側鎖間の相互作用が同定可能であった。また、メチル化ユビキチンと YUH1 の相互作用実験を低濃度環境下で行ったところ、最低で 0.2 μM 濃度のメチル化ユビキチンを用いた相互作用の検出に成功した。これらから、リジン側鎖に導入したメチル基は極めて高感度な NMR プローブであると考えられる。

【結論】

リジン側鎖に導入したメチル基を用いた NMR 解析によって、タンパク質間の相互作用部位および解離定数が決定可能であった。とりわけ、タンパク質側鎖間の相互作用を鋭敏に反映すること、そして NMR 検出において極めて高い感度を示すことから、リジン側鎖の ¹³C メチル化を用いた NMR 解析は、タンパク質間相互作用検出において有効な手法となることが示された。

【発表論文】

Yoshikazu Hattori, Kyoko Furuita, Izuru Ohki, Takahisa Ikegami, Harumi Fukada, Masahiro Shirakawa, Toshimichi Fujiwara, Chojiro Kojima. Utilization of lysine ¹³C-methylation NMR for protein-protein interaction studies, J Biomol NMR, 55, 13-31, 2013

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (服 部 良 一)			
	(職)		氏 名
論文審査担当者	主 査	教 授	藤 原 敏 道
	副 査	教 授	上 田 貴 洋
	副 査	教 授	奥 村 光 隆

論文審査の結果の要旨

タンパク質の高分解能 NMR 解析に必要な異種核相関 NMR 測定を行うには、安定同位体標識が必須である。これには一般に、大腸菌を用いた組換え発現系でのタンパク質生産時に、安定同位体元素を取り込ませる。しかしながら、高等生物由来の重要な機能を持つタンパク質は大腸菌での生産が困難となることが多い。一方、化学修飾による安定同位体標識では、精製タンパク質への部位特異的な化学反応によって安定同位体を含む化合物を付加するため、タンパク質の生産方法に関する制約がない。リジン残基の ^{13}C メチル化は、化学修飾によるタンパク質の安定同位体標識法の 1 つである。タンパク質表面に存在するリジン残基の側鎖を選択的に検出することは、他の分子との相互作用検出に有利だと期待されるが、これをタンパク質間の相互作用検出へ応用した例はほとんど知られていない。本論文において申請者は、リジン残基の ^{13}C メチル化を用いた NMR 法によってタンパク質間相互作用を検出し、その有用性を実証した。そのために、76 アミノ酸中 7 つのリジンを有するタンパク質であるユビキチンを ^{13}C メチル化し、3 種のタンパク質との相互作用解析を行った。

はじめに、ユビキチンのメチル化修飾がタンパク質間相互作用に与える影響を、等温滴定型熱量測定および主鎖アミド基を検出する ^1H - ^{15}N NMR 測定より解析した。その結果、ユビキチンを認識するタンパク質である YUH1 との相互作用への熱力学的寄与およびその相互作用面が、メチル化によって大きな影響を受けないことが示された。次に、メチル化ユビキチンと YUH1 の相互作用を、メチル基を検出する ^1H - ^{13}C 相関二次元 NMR より解析した。その結果、相互作用による化学シフト変化量の比較から、既知の複合体結晶構造から推定される妥当な相互作用部位が同定された。また、化学シフト変化の定量解析から、等温滴定型熱量測定の結果と合致する解離定数が決定された。さらに、YUH1 を別のタンパク質 2 種類に変えて行った相互作用実験においても、相互作用部位の同定および解離定数の決定が可能であった。以上のメチル化ユビキチンと 3 種のタンパク質との相互作用実験について、リジン残基メチル基と主鎖アミド基両者の化学シフト変化を系統的に比較した。その結果、メチル基の化学シフト変化では、主鎖アミド基の化学シフト変化では同定できない、リジン側鎖を介したタンパク質間相互作用が同定可能であることが示された。長いアルキル鎖を有するリジン側鎖への相互作用を直接的に検出できることは、タンパク質間相互作用解析において有用である。また、メチル化ユビキチンと YUH1 の相互作用実験を低濃度条件で行ったところ、最低で $0.2\ \mu\text{M}$ 濃度のメチル化ユビキチンが YUH1 と相互作用した状態が NMR 検出された。この高感度性は、高濃度条件で凝集しやすいタンパク質複合体や、高分子量タンパク質複合体の NMR 検出に有用である。

以上のように、申請者の論文は、化学修飾を用いたタンパク質間相互作用検出のための NMR 解析法を発展させた。この成果は今後、生物学的に重要な未解明のタンパク質間相互作用を解析する上で、有用な知見となる。よって、本論文は博士（理学）の学位論文として十分価値あるものと認める。