

博士論文

NMR 多量子遷移の緩和速度を用いた カリウムイオンチャネルの開閉機構の解明

東京大学大学院 薬学系研究科

薬科学専攻 生命物理化学教室

指導教員 嶋田 一夫

平成 24 年度進学 外山 侑樹

目次

目次	1
略語	4
1. 序論	6
1-1. カリウムイオンチャネル	6
1-1-1. カリウムイオンチャネル	6
1-1-2. pH 依存性カリウムイオンチャネル KcsA	6
1-1-3. KcsA の K ⁺ 透過路とゲートの構造的特徴	8
1-1-4. KcsA のゲーティングの構造機構	14
1-1-5. KcsA のサブミリ秒オーダーのゲーティング	18
1-2. 高分子量タンパク質を対象としたミリ秒からマイクロ秒オーダーの化学交換の解析法	22
1-2-1. NMR 法によるミリ秒からマイクロ秒オーダーの化学交換の解析法	22
1-2-2. メチル基を観測対象とした高分子量タンパク質の解析法	26
1-2-3. Methyl-TROSY 法によるマイクロ秒からミリ秒の運動性解析の問題点	27
1-3. 研究目的	32
2. 多量子遷移の緩和速度の差を利用した高分子量タンパク質の化学交換の解析法の開発	33
2-1. 理論的背景	33
2-1-1. 多量子遷移速度の差 ΔR_{MQ} による化学交換の検出	33
2-1-2. ΔR_{MQ} における化学交換非依存項の定式化	37
2-1-3. 異種核二重共鳴法による ΔR_{MQ} の化学交換の寄与の分離	39
2-1-4. 磁場依存性による ΔR_{MQ} の化学交換の寄与の分離	45

2-1-5. 小括.....	47
2-2. 結果.....	48
2-2-1. マルトース結合タンパク質を用いた化学交換非依存項の評価.....	48
2-2-2. FF ドメインを用いた化学交換の寄与の評価.....	55
2-3. 考察.....	62
2-3-1. メチル- ΔR_{MQ} 解析から明らかとできること.....	62
2-3-2. メチル- ΔR_{MQ} 解析法の適用範囲.....	63
2-3-3. メチル- ΔR_{MQ} 解析法の新規性.....	63
2-3-4. 既存の化学交換の解析手法との比較.....	64
3. KcsA のサブミリ秒オーダーの開閉機構の解明.....	65
3-1. 序.....	65
3-2. 結果.....	66
3-2-1. 野生型 KcsA のサブミリ秒オーダーの化学交換が存在する部位の同定.....	66
3-2-2. E71Q 変異体のサブミリ秒オーダーの化学交換が存在する部位の同定.....	75
3-2-3. 野生型と E71Q 変異体での $\Delta R_{MQ,obs}$ の磁場依存的な変化の比較.....	83
3-3. 考察.....	86
3-3-1. Glu71 変異により分子全体の化学交換が変化する機構.....	86
3-3-2. サブミリ秒オーダーの開閉と関連した化学交換の同定.....	87
3-3-3. サブミリ秒オーダーの開閉の構造機構の提唱.....	89
4. 結論.....	92
5. 材料と方法.....	93
5-1. 試薬.....	93
5-2. タンパク質の発現と精製.....	93
5-2-1. 培地組成.....	93

5-2-2. MBP の発現と精製	94
5-2-3. FF ドメインの発現と精製.....	96
5-2-4. KcsA の発現と精製.....	98
5-3. NMR 測定	100
5-3-1. メチル- ΔR_{MQ} 測定.....	101
5-3-2. CPMG 緩和分散解析.....	110
5-4. HDR パルス照射のシミュレーション	114
参考文献	120
謝辞	126

略語

CPMG	Carr-Purcell-Meiboom-Gill
CSA	chemical shift anisotropy
DD	dipolar-dipolar
DDM	dodecyl- β -maltopyranoside
DQ	double quantum
DSS	sodium 2,2-dimethyl-2-silapentane-5-sulfonate
DTT	dithiothreitol
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
EPR	electron paramagnetic resonance
FID	free induction decay
GST	glutathione S-transferase
HBC	helix bundle crossing
HDR	heteronuclear double resonance
HMQC	heteronuclear multiple quantum coherence
HRV-3C	human rhinovirus 3C
HSQC	heteronuclear single quantum coherence
HZQC	heteronuclear zero quantum coherence
IPTG	isopropyl- β -D-1-thiogalactopyranoside
K ⁺	potassium ion
Kir	inwardly-rectifying potassium channel
Kv	voltage-dependent potassium channel

LB	Luria-Bertani
MBP	maltose binding protein
MD	molecular dynamics
methyl-TROSY	methyl transverse relaxation optimized spectroscopy
MQ	multiple quantum
NMR	nuclear magnetic resonance
OD	optical density
PCR	polymerase chain reaction
PDB	protein data bank
PMSF	phenylmethylsulfonyl fluoride
ppm	parts per million
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
SF	selectivity filter
SQ	single quantum
tail-d DDM	n-Dodecyl-d ₂₅ -β-D-Maltopyranoside
ZQ	zero quantum

1. 序論

1-1. カリウムイオンチャネル

1-1-1. カリウムイオンチャネル

生体内においてカリウムイオン (K^+) は、細胞内において約 150 mM、細胞外において約 4 mM と、細胞の内外で濃度差が存在する状態に保たれている。 K^+ チャネルは電気化学ポテンシャルに従って K^+ を膜透過させるタンパク質である[1]。 K^+ チャネルは、膜内外の電位差や、内因性物質、機械刺激などによりイオン透過路が開いた状態と閉じた状態を遷移しており、このような K^+ 透過路の開閉はゲーティングと呼ばれる。ゲーティングの速さや頻度は適切な膜電位を形成するうえで非常に重要なパラメーターであり、神経伝達速度や心拍数の制御などの生理現象につながる。 K^+ チャネルのゲーティングの構造機構を理解することは、これらの生理現象を理解する上で重要であるのみならず、 K^+ チャネルの開閉を変調する化合物は抗不整脈薬などの候補となりうることから、創薬の観点においても重要な課題である。

1-1-2. pH 依存性カリウムイオンチャネル KcsA

放線菌由来の K^+ チャネル KcsA は酸性条件にて開口し、塩基性条件では閉口する pH 依存性 K^+ チャネルである[2] [3]。Fig. 1(A) にはアズレクチン脂質のリポソームに再構成した KcsA を、パッチクランプ法により解析した巨視的電流解析の結果を示した [4]。KcsA は細胞内 pH が中性～塩基性条件では K^+ を透過しないが、細胞内 pH を 5.0 以下に下げると一過的に大きなピーク電流が観測される。電流はその後秒のオーダーで減衰し、やがてピーク電流の 10%程度の一定電流が流れる定常状態に達する。このような一過的なピーク電流と、その後の減衰過程はチャネルの不活性化と呼ばれる。このような KcsA の電気生理学手性質

は、真核生物の電位依存性 K⁺チャンネル (Kv) とよく類似していることが知られている。Fig. 1B にはヒト由来 Kv4.2 の巨視的電流解析の結果を比較のために示した。脱分極刺激により活性化し、一過的に大きなピーク電流を生じた後、数百ミリ秒のオーダーで減衰する不活性化を生じる。

KcsA と Kv チャンネルは不活性化に代表される電気生理学的な性質や、K⁺を透過する部位のアミノ酸配列、立体構造がよく類似しているため、KcsA は真核生物の Kv チャンネルの開閉機構を明らかとするためのプロトタイプと考えられており、その pH 依存的な開閉に伴う構造変化様式が、X 線結晶構造解析や、核磁気共鳴分光法 (nuclear magnetic resonance spectroscopy, NMR)、電子常磁性共鳴法 (electron paramagnetic resonance spectroscopy, EPR) による解析により明らかとされてきた[5, 6] [7] [8] [9]。

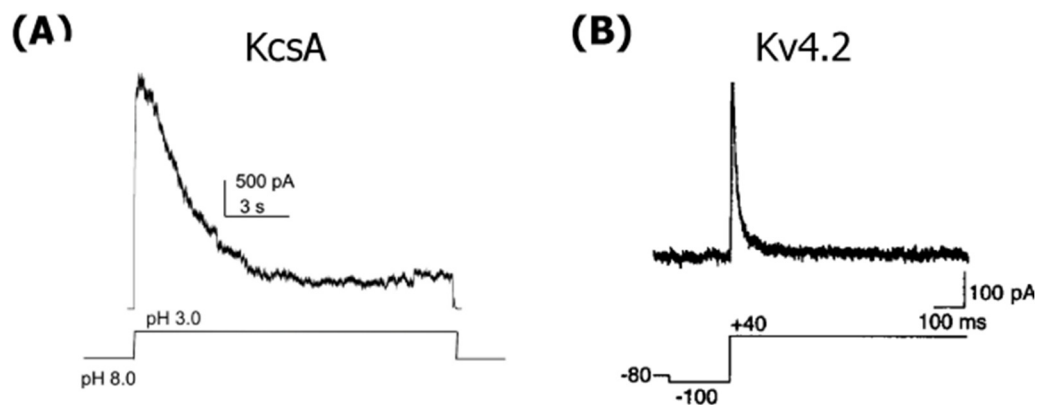


Fig. 1 KcsA, Kv4.2 の巨視的電流解析の結果
横軸は時間、縦軸は電流量を示している。膜中の多数のチャンネルの電流を記録したものである

(A) KcsA の巨視的電流解析の結果[4]Fig.1 より改編して示した。(B) ヒト由来電位依存性 K⁺チャンネル Kv4.2 の巨視的電流解析の結果[10] Fig.2 より。

1-1-3. KcsA の K⁺透過路とゲートの構造的特徴

KcsA の全長構造

KcsA は全長 160 残基からなるサブユニットが、4 量体を形成することによって機能する (Fig. 2A)。Fig. 2(B), (C) には KcsA の結晶構造を膜と平行な方向から見たときの図を示した。KcsA の各サブユニットはアウターヘリックス、ポアヘリックス、インナーヘリックスの 3 本のヘリックスからなる膜貫通領域と、1 本のヘリックスからなる細胞内領域からなる。このサブユニットが対称な 4 量体を形成することで、その中央に K⁺透過路が形成される。KcsA のイオン透過路を形成する膜貫通領域はポア領域と呼ばれ、ポア領域の構造は全ての K⁺チャンネルにおいて高度に保存されている。

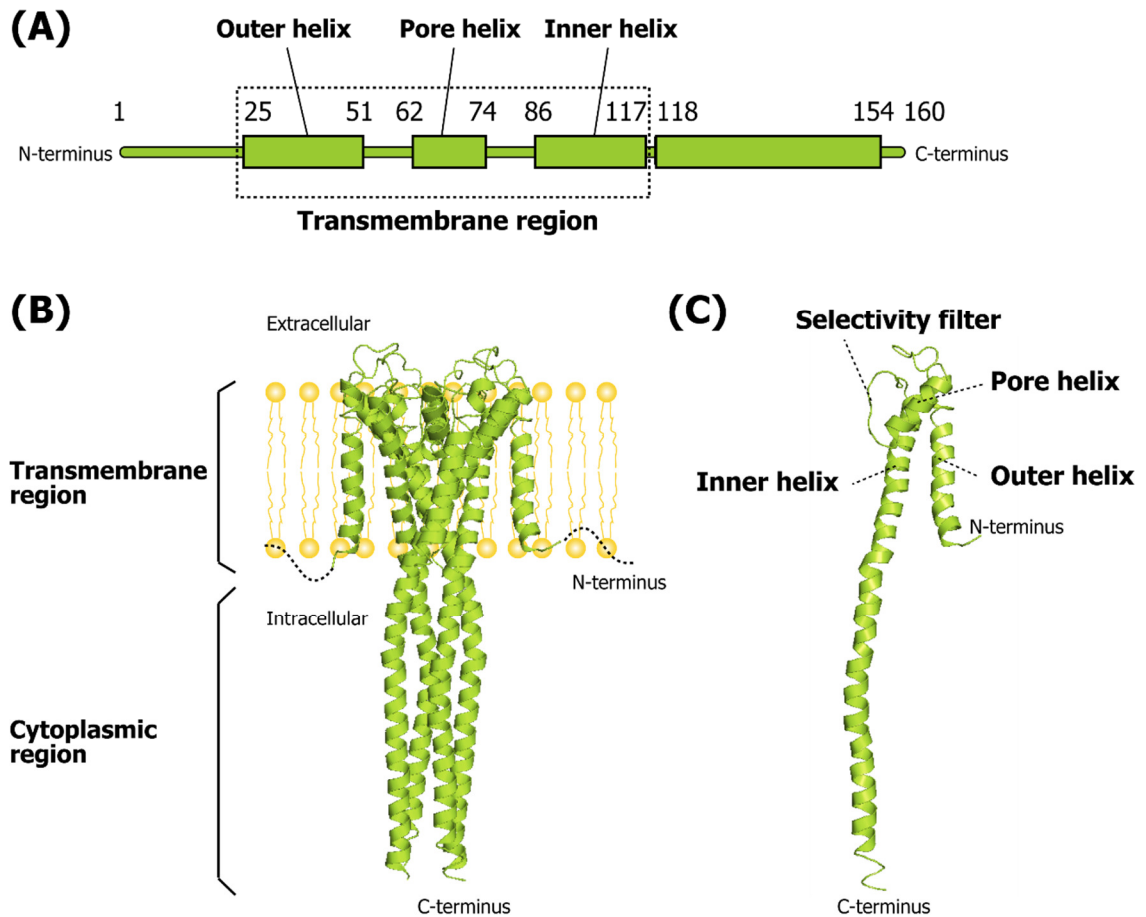


Fig. 2 KcsA の構造

(A) KcsA の 2 次構造。膜貫通領域のヘリックス、ならびに K^+ 透過路を形成するポア領域を形成する範囲を残基番号にて示した。

(B) KcsA 全長の X 線結晶構造[11](PDB ID:3EFF)。4 量体の構造を、膜と平行な方向から見た図を示した。N 末端は電子密度が観測されていないため、点線で示している。

(C) KcsA 全長の単量体の結晶構造[11](PDB ID:3EFF)

K⁺透過路の構造

K⁺透過路中の細胞内側には、各サブユニットの 4 本のインナーヘリックスが組み合わさることで形成されるヘリックスバンドルクロッシング (helix bundle crossing, HBC)、細胞外側には K⁺チャンネル間で高度に保存された Thr-Val-Gly-Tyr-Gly の配列により形成される選択フィルター (selectivity filter, SF) と呼ばれる領域が存在し、これらの 2 つの部位が、K⁺透過を阻むゲートとして機能することが知られている。これらのゲートの pH 変化依存的な構造変化は、アウターヘリックス上の pH センサーである His25 側鎖のプロトン化状態により制御されること報告されている[12] [13] (Fig. 3)

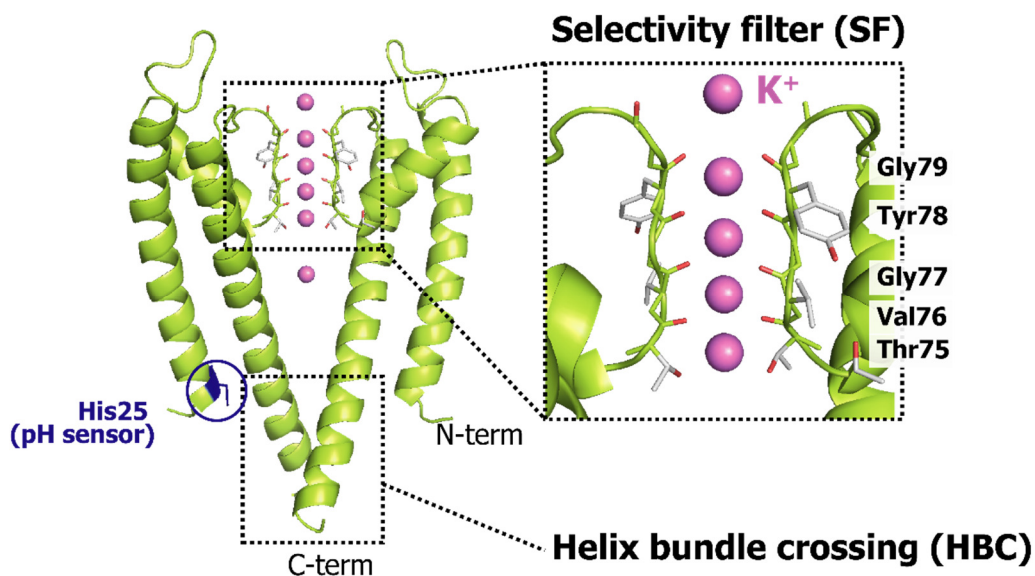


Fig. 3 KcsA の K⁺透過路においてゲートとして機能する選択フィルターと helix bundle crossing の位置

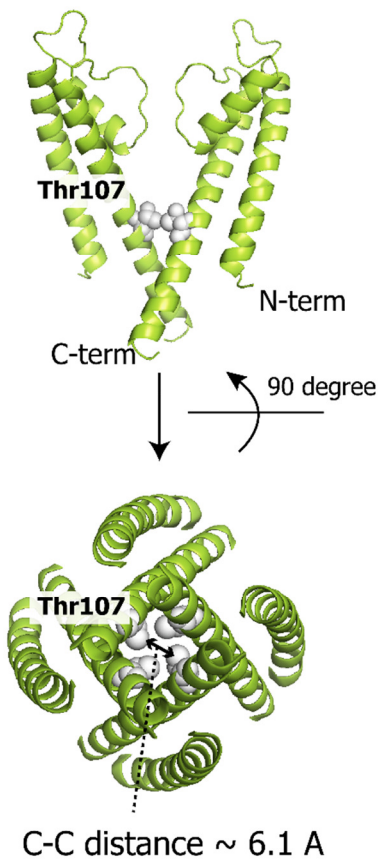
KcsA (1-124) の結晶構造[5] (PDB ID:1K4C) のうち、向かい合う 2 つのサブユニットのみを示した。選択フィルターを構成する Thr75, Val76, Gly77, Tyr78, Gly79 をスティックモデルで、電子密度が観測された K⁺を紫のスフィアモデルで示した。また、pH センサーである His25 を青色のスティックで示した。本構造は HBC ゲートが K⁺の水和半径以下に狭窄していることから、閉じた状態の構造であると考えられている。

pH 依存的な開閉を担う HBC ゲートの構造

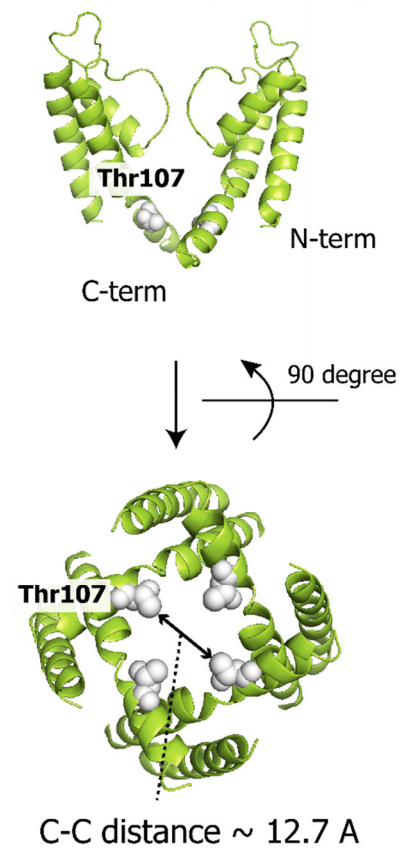
HBC はインナーヘリックスが組み合わさることで形成され、 K^+ 透過路の径を K^+ の水和半径以下に狭窄させることにより、 K^+ の透過を阻むゲートとして機能する部位である。インナーヘリックス上に常磁性プローブを導入した KcsA の EPR 解析からは pH 依存的にその径が変化することが示され、pH 依存的な開閉におけるゲートとして構造変化する部位であることが明らかとなった[6]。

野生型の KcsA の結晶構造は全て HBC ゲートが閉じた状態であるが、pH センサーである His25 をはじめとする細胞内側の荷電性残基を Gln に変異させ、pH 非依存的に常に開口状態となる KcsA-OM (21-124, H25Q, R117Q, E120Q, R121Q, R122Q and H124Q) の結晶構造から HBC ゲートが開いた構造の結晶構造が解かれている[9]。HBC の開閉両構造の比較から、HBC が開口するときには インナーヘリックスが Gly104 において屈曲し、ヘリックスの細胞内側が K^+ 透過路の外側に大きく広がるような構造変化を生じることが明らかとなった [9] (Fig. 4)。

KcsA wildtype
(1-124)



KcsA open mutant
(21-124, H25Q, R117Q, E120Q,
R121Q, R122Q and H124Q)



HBC gate closed

HBC gate open

Fig. 4 KcsA 野生型ならびに KcsA-OM 変異体の結晶構造における HBC ゲートの構造の比較

(A) KcsA 野生型の結晶構造。HBC ゲートの径はインナーヘリックス上の Thr107 において最も狭窄しており、K⁺を透過できない閉じたコンフォメーションである。[7] (PDB ID: 1K4C)

(B) KcsA-OM 変異体(21-124, H25Q, R117Q, E120Q, R121Q, R122Q and H124Q)の結晶構造。K⁺を透過することのできる開いたコンフォメーションである。[9] (PDB ID: 3F5W)

酸性条件における不活性化を担う SF ゲートの構造

SF は主鎖カルボニル酸素が K^+ 透過路に面して K^+ と相互作用し、脱水和された状態を安定化することによって、 K^+ の選択的な透過を担う部位である[5]。SF 近傍の残基の変異体の不活性化速度の解析と EPR 解析から、巨視的な不活性化とその後の定常状態における K^+ 透過を制御するゲートであることが明らかとされた[8]。

野生型 KcsA の X 線結晶構造解析において、結晶化の際の K^+ 濃度が低濃度 (3 mM) のときには透過路を形成するカルボニル酸素が K^+ を配位できない閉じたコンフォメーションにて、 K^+ が高濃度ときにはカルボニル酸素が K^+ を配位することのできる開いたコンフォメーションにて結晶化された[7]。これらの2つのコンフォメーションは、KcsA-OM の結晶構造において HBC ゲートが開いた状態でも観測されていたことから、それぞれ酸性条件での不活性化を担う閉構造と開構造に対応していると考えられている[9] (Fig. 5)。

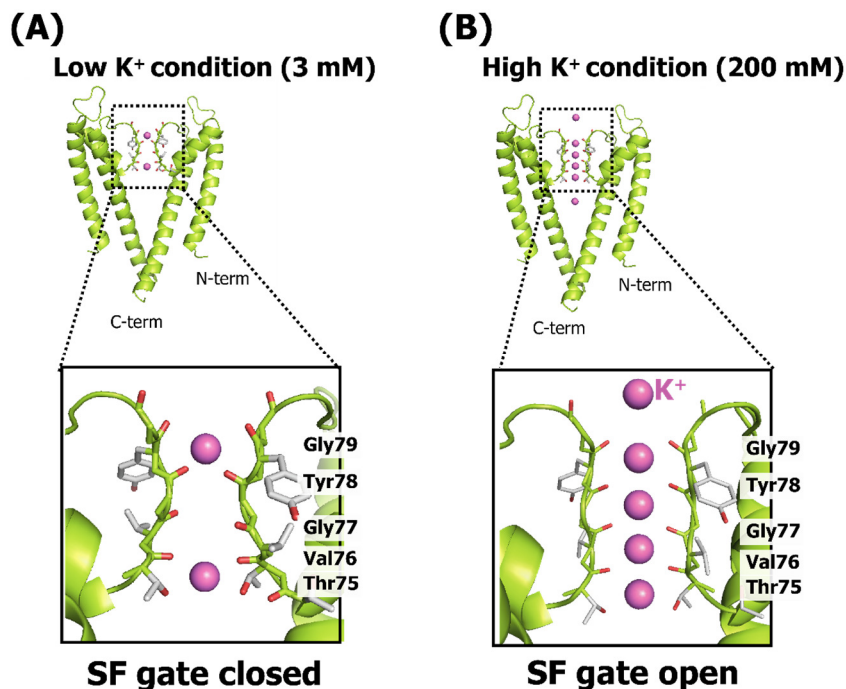


Fig. 5 結晶構造解析から明らかとなった SF の2つのコンフォメーション

(A) 低濃度(3 mM)、(B) 高濃度(200 mM)の K^+ 存在下で結晶化された KcsA の結晶構造と SF の領域の拡大図。SF を構成する Thr75, Val76, Gly77, Tyr78, Gly79 をスティックモデルで、電子密度が観測された K^+ を紫のスフィアで示した。[5] [7] (PDB ID : 1K4C, 1K4D)

1-1-4. KcsA のゲーティングの構造機構

KcsA の pH 依存的な HBC ゲートと不活性化を制御する SF ゲートの構造的特徴が明らかになったものの、これらのゲート開閉が巨視的電流解析における不活性化をどのように生じさせているかを明らかにするには、静的な構造の違いだけではなく、ゲートが開いた構造と閉じた構造の間の動的な遷移過程、すなわち開閉両構造間の化学交換を調べる必要がある。これまでに当研究室における溶液 NMR 解析から、KcsA の各ゲートにどのような化学交換が存在するのかが調べられてきた[12, 13]。

Fig. 6 (A) には界面活性剤ドデシル- β -マルトピラノシド (dodecyl- β -maltopyranoside, DDM) によって可溶化した KcsA の Ile, Leu, Val 側鎖メチル基を対象とした NMR 解析の結果を示した。pH を変化させたときの ^1H - ^{13}C heteronuclear multiple quantum coherence (HMQC) スペクトルの比較から、pH 6.5 では HBC ゲートが閉じた closed 状態のシグナルが観測された。一方 pH 3.2 でのでは、SF ゲート近傍の NMR シグナルにマイナーシグナルが観測されており、SF ゲートの領域が 2 状態の間を秒のオーダーで化学交換していることが明らかとなった (Fig. 6A)。また、不活性化速度を生じない E71A 変異体、不活性化速度が野生型よりも上昇する Y82A 変異体のスペクトルでは、これらの 2 つのシグナルの強度比が変化していたことから、一方のシグナルは SF ゲートが開口し K^+ を透過する permeable 状態、もう一方のシグナルは SF ゲートが閉口し K^+ を透過しない impermeable 状態に由来していることが分かった (Fig. 6B,C)。

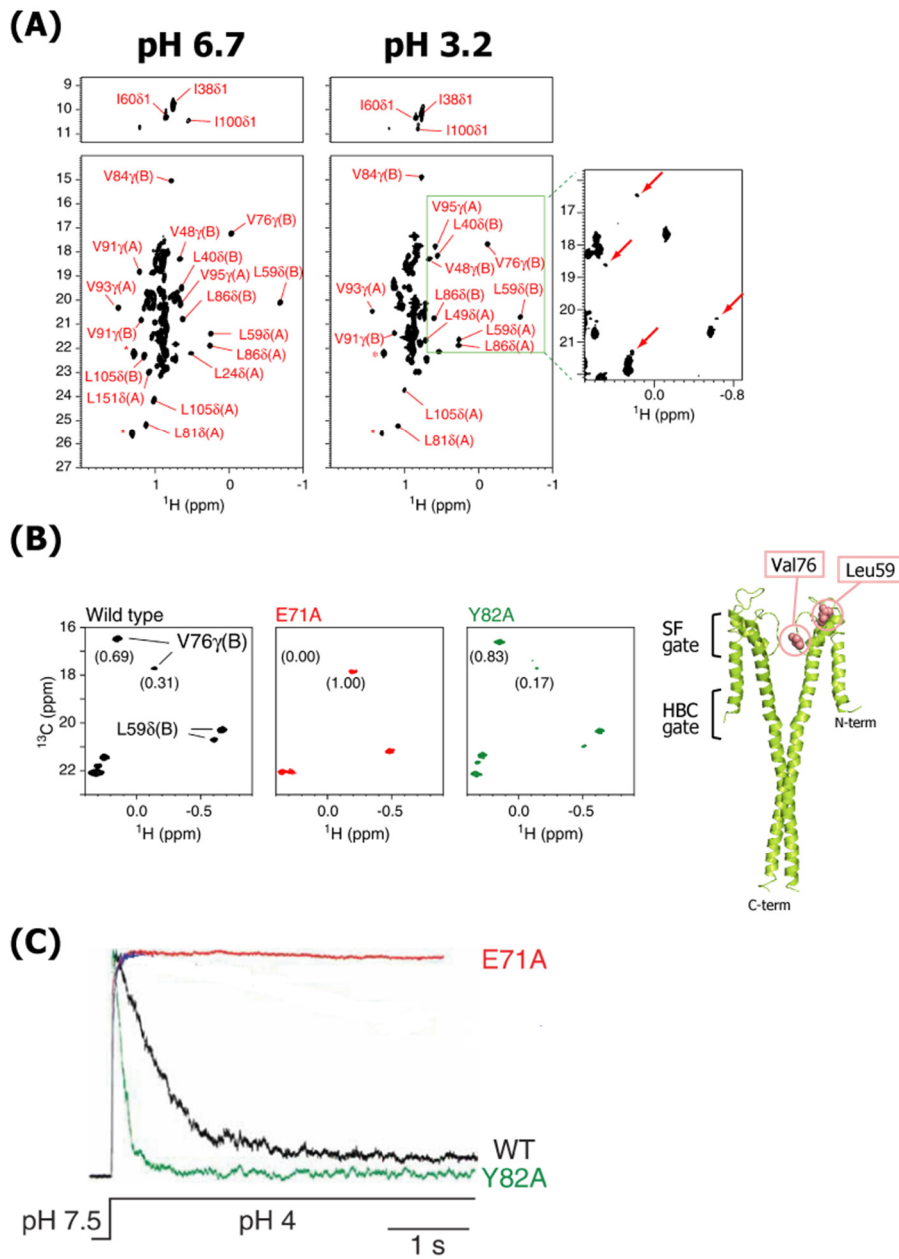


Fig. 6 KcsA の側鎖メチル基を対象とした NMR 解析と、不活性化速度の異なる変異体の電流プロファイル

(A) pH 6.7, pH 3.0 における KcsA の Ile, Leu, Val 側鎖メチル基を観測対象とした ^1H - ^{13}C HMQC スペクトルの比較。pH 3.0 では、一部のシグナルにマイナーシグナルが観測された。(B) 不活性化速度の異なる変異体における、Leu59, Val76 の 2 状態のシグナルの強度比。Leu59, Val76 は全長の構造上に表示した。[11](PDB ID:3EFF) [13] Fig.1, Fig.2 より一部改編して示した。

(C) 野生型と E71A 変異体、Y82A 変異体の巨視的電流における不活性化速度の比較。[8]Fig.3 より一部改編して示した。

また、SF ゲート近傍に位置する Leu59 や Val76 のシグナルは、中性条件における closed 状態と、酸性条件における permeable 状態、impermeable 状態とは異なる化学シフトとして観測されていたことより、SF ゲートの構造は HBC ゲートの構造変化と共役していることが示された。Closed 状態と permeable 状態の K^+ 濃度依存的な化学シフト変化の解析から、closed 構造と permeable 状態は共に K^+ が結合して開いたコンフォメーションであること、その違いは K^+ 親和性に起因しており、closed 構造 ($K_d \sim 6.1$ mM) のほうが permeable 構造 ($K_d \sim 6.1$ mM) よりも 8 倍程度高いことが分かった。そして、水分子の 1H と Val76 のメチル 1H との核オーバーハウザー効果による磁化移動が観測されたことから、impermeable 状態は SF から K^+ が解離し、水分子が結合した状態であることが示された。

以上の知見から、KcsA は中性条件では HBC ゲートが閉じた closed 状態をとるが、酸性条件では HBC が開口し、SF ゲートの開閉に対応する permeable 状態と impermeable 状態の化学交換にあるという 3 状態の開閉モデルが提唱された。そして、巨視的な不活性化は、以下のような 3 状態の遷移により説明できるという機構が明らかとされた (Fig. 7)。

- (1) 中性条件では HBC ゲートが閉口し、SF ゲートは K^+ が結合した closed 状態にある。
- (2) 細胞内 pH が酸性条件になると HBC ゲートが開口する。このとき、SF ゲートの K^+ 親和性が低い permeable 状態に移行し、結合した K^+ が解離することでピーク電流が生じる。
- (3) Permeable 状態と impermeable 状態の間の化学交換によって、巨視的な電流の減少と、その後の定常状態への移行が生じる。

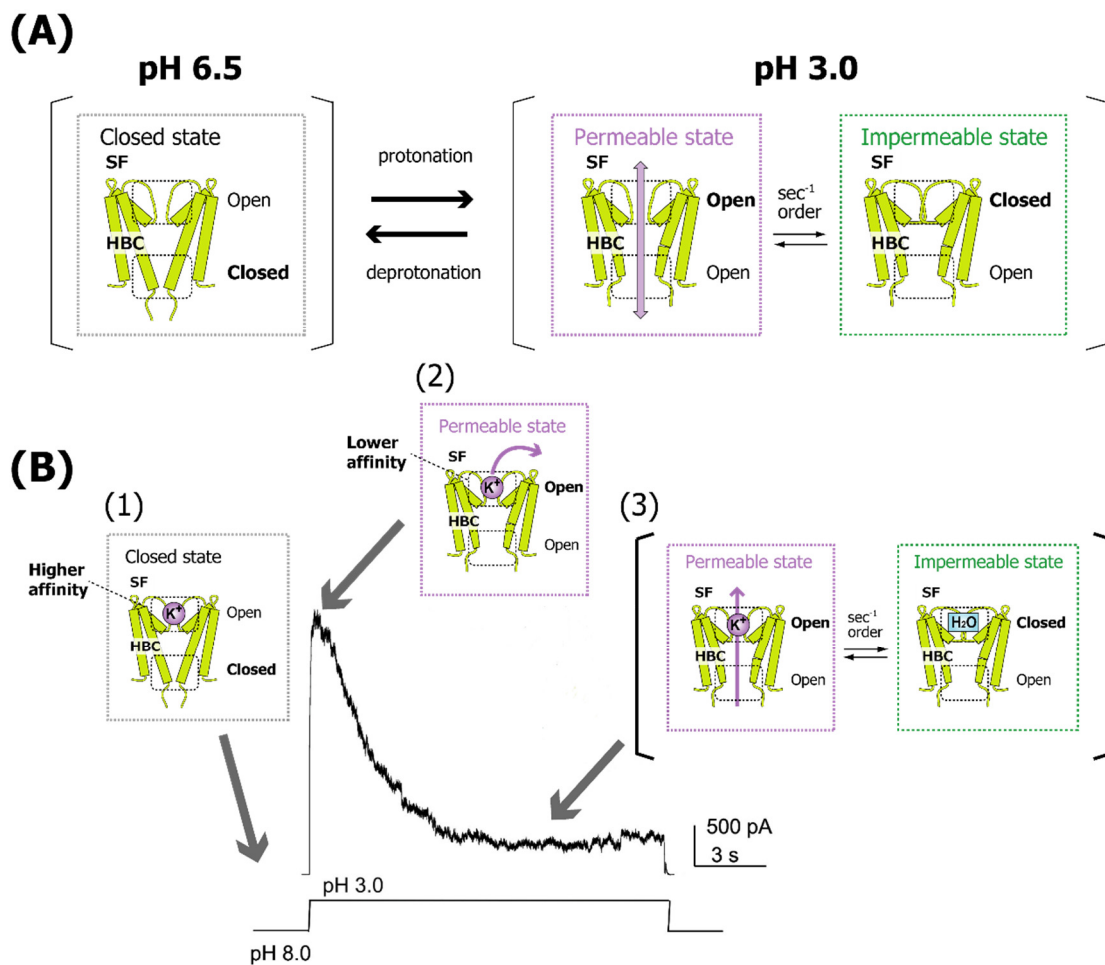


Fig. 7 KcsA の 3 状態モデルと巨視的電流の不活性化機構

(A) NMR 解析から提唱された closed 状態、permeable 状態、impermeable 状態の 3 状態からなる KcsA の開閉機構。各状態におけるゲートの開閉を示している。

(B) 巨視的な電流の不活性化が 3 状態の遷移により生じることを説明する図。番号は本文中の説明と対応している。KcsA の巨視的電流解析の結果は[4]Fig.1 より改編して示した。

1-1-5. KcsA のサブミリ秒オーダーのゲーティング

Fig. 8 にはアズレクチン脂質のリポソームに再構成した pH 3.0 の定常状態における KcsA を対象として、パッチクランプ法による単一チャンネル電流解析の結果を示した。横軸は時間、縦軸は電流量を示しており、10 pA 程度の K⁺電流が観測された部位は KcsA が開口し K⁺を透過したことを示している。pH 3.0 の酸性条件において KcsA は K⁺を透過する状態と透過しない状態との間を秒のオーダーで遷移していること、K⁺を透過する時間は全記録時間の 10 %程度の時間であることが明らかとされている (Fig. 8) [14]。

K⁺を透過する状態の割合が 10 %程度であることは、巨視的電流解析において定常状態における電流量がピーク電流の 10 %程度であることと一致している。また K⁺透過状態と K⁺非透過状態の間を秒のオーダーで遷移していることは、K⁺ 50 mM、温度 40°Cにおける ¹³C ZZ-exchange 実験より、permeable 状態と impermeable 状態との間の交換速度が約 1.4 s⁻¹であったこととタイムスケールが一致している[15]。したがって、単一チャンネル電流における K⁺を透過する状態と、K⁺を透過しない状態の遷移は、SF ゲートの開閉に対応する permeable 状態と impermeable 状態との間の化学交換にそれぞれ対応していると考えられることができる。

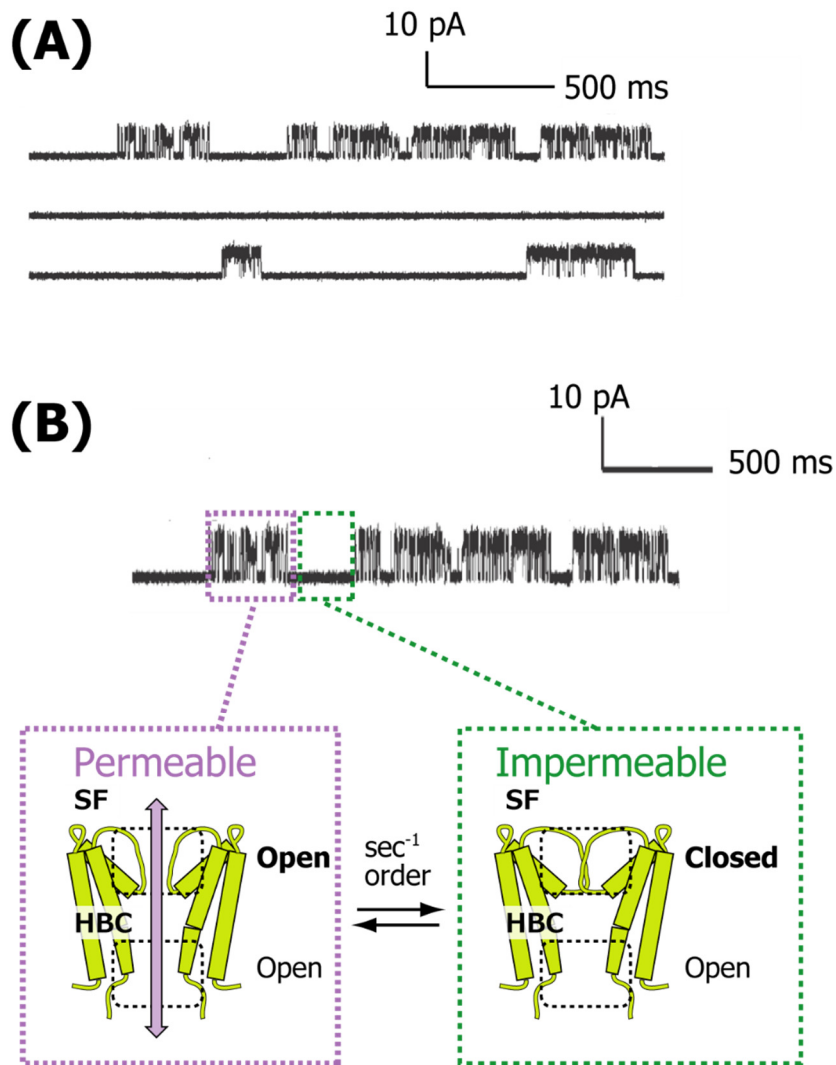


Fig. 8 pH 3.0における KcsA の単一チャネル電流解析

(A) pH 3.0、KCl 200 mM 条件下にて、アゾレクチン脂質中での単一チャネル電流解析の結果

(B) (A) 最上段の電流を拡大して示した図。K⁺を透過する状態(緑)と透過しない状態(紫)を秒のオーダーで遷移している。

[14] Fig.4 より、一部改編して示した。

しかし、permeable 状態の単一チャネル電流をより時間領域を拡大してみた場合、常に開口した状態ではなく実際に K^+ を透過する状態と透過しない状態の間をマイクロ秒からミリ秒のオーダー、すなわちサブミリ秒のオーダーで遷移している (Fig. 9)。このようなサブミリ秒オーダーの開閉は、permeable 状態が単一の構造であるとしては説明することができず、KcsA のどの部位の構造変化、化学交換に起因するのかは不明である。サブミリ秒オーダーの開閉は真核生物の K^+ チャネルにおいても観測されている。例えばタコ由来 Kv1 チャネルは低水温になると RNA 編集によりアウターヘリックス上の Ile321 が変異し、サブミリ秒オーダーの開閉においてチャネルが閉じる速度が増大することで、脱分極後により素早く静止膜電位に戻り、神経細胞の発火頻度が維持されることが示唆されている[16]。このように、サブミリ秒オーダーの開閉は神経伝達速度の制御に関与していることが報告されていることから、サブミリ秒オーダーの開閉機構を明らかにすることは、これらの生理機能を理解するうえで重要である。

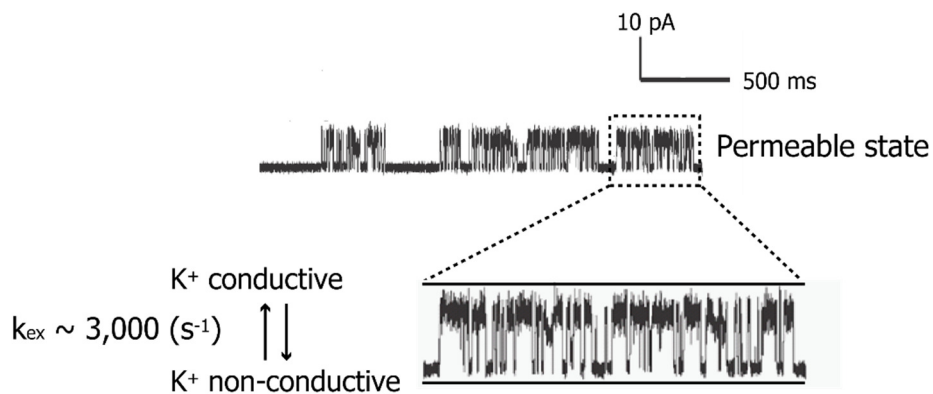


Fig. 9 pH 3.0 における KcsA 単一チャネル電流における、permeable 状態の拡大図
Permeable 状態においても、 K^+ を実際に透過する状態と透過しない状態との間をマイクロ秒からミリ秒のオーダーで遷移している。[14] Fig.4 より、一部改編して示した。

これまでに、主に変異体の電気生理解析や、結晶構造解析、分子動力学 (molecular dynamics, MD) シミュレーションからサブミリ秒オーダーの開閉機構について解析が行われてきた。内向き整流性 K^+ チャンネルの一種である Kir6.2 を対象とした変異体解析では、SF 近傍に位置する Val127 や Gly135, Met137 に変異を導入した場合にサブミリ秒オーダーの開閉の速度が変化することから、サブミリ秒オーダーの開閉は SF の構造変化に起因するということが提唱されている[17]。KcsA を対象とした解析においても同様に、SF を構成する残基と水素結合ネットワークを形成する Glu71 の変異体 (E71H, E71Q, E71A) でサブミリ秒オーダーの開閉の速度が変化したこと、ならびにこれらの変異体の結晶構造を用いた MD シミュレーションから、サブミリ秒オーダーの開閉が SF の構造変化によりが生じることが提唱された [18]。

しかしながら、これらの解析は変異導入に伴う分子全体の構造変化、運動性の変化を考慮していないこと、また MD シミュレーションによる解析は 20 ns の間の構造変化のみしか解析しておらずゲーティングが生じるタイムスケールとは大きく乖離していることが問題であり、ゲーティングの構造機構を十分に説明するものではないと考えた。KcsA のサブミリ秒オーダーの開閉を明らかにするには、KcsA のどの部位に、 K^+ 透過のタイムスケールと一致するサブミリ秒オーダーの化学交換が存在するのか、そして化学交換が K^+ 透過活性の違いを生じさせる機構を明らかにする必要がある。

1-2. 高分子量タンパク質を対象としたミリ秒からマイクロ秒オーダーの化学交換の解析法

1-2-1. NMR 法によるミリ秒からマイクロ秒オーダーの化学交換の解析法

NMR 法はピコ秒から秒オーダーに至る幅広いタイムスケールの運動性を解析することが可能であるが、なかでもマイクロ秒からミリ秒の運動性はタンパク質の機能に密接に関連している例が数多く報告されている[19]。これまでに、このタイムスケールの運動性を解析する手法として、モデルフリー解析[20]、双極子-双極子 (dipolar-dipolar interaction, DD) 相互作用/化学シフト異方性 (chemical shift anisotropy, CSA) 相互作用の干渉効果を利用する手法[21]、 $R_{1\rho}$ 回転座標系緩和解析[22]、Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG) 緩和分散法[23]などが開発されてきた。しかし、高分子量タンパク質ではシグナルの感度、分解能が著しく低下するため、これらの手法を適用することは困難であり、生理的に重要な膜タンパク質やタンパク質複合体などの高分子量タンパク質を対象とした化学交換の解析が困難であることが問題であった。したがって、高分子量タンパク質にも適用可能なマイクロ秒からミリ秒のタイムスケールの運動性解析手法を開発することは、タンパク質の機能を理解するうえで重要な課題である。

NMR 法によりマイクロ秒からミリ秒オーダーのタイムスケールの化学交換の解析は、NMR シグナルとして観測する磁化の減衰速度の観測によって行われるが、本項ではその基本的な原理について概説する。

^1H や ^{13}C をはじめとするスピン $1/2$ の核は、静磁場中におかれるとゼーマン分裂により α 、 β の 2 つのエネルギー準位に分裂する。Fig. 10 図中では α 状態は静磁場方向とスピンの向きを向いた状態、 β 状態は静磁場方向とスピンの向きを逆を向いた状態として表している。このとき、エネルギー差に応じてボルツマン分布をとることにより、エネルギーの低い α 状態をとるスピンの数が、 β 状態をとるスピンの数よりも多くなる。このようなスピン状態の不均

衡によって、静磁場と平行な向き（z 軸上）の巨視的な磁化が生じる。

ここで、巨視的磁化に対してスピンのエネルギー差に対応する強度のラジオ波を y 軸方向から照射すると、巨視的磁化は x 軸方向へと回転し、x 軸方向の磁化の成分が生じるため NMR シグナルとして観測可能な状態となる。この x 軸上の磁化の成分を観測すると、磁化の大きさはスピンのエネルギー差に対応する周波数で振動しながら、指数関数的に減衰する。この減衰は緩和と呼ばれ、その時定数は緩和速度 R により表される。このような振動と指数関数的な減衰を記録してフーリエ変換することにより、周波数成分で分離した NMR シグナルを得ることができる。

化学交換の影響は、NMR シグナルとして観測する磁化の減衰速度、すなわち緩和速度に反映される。化学交換が存在しないスピンでは、緩和速度はスピンの磁気的な相互作用により緩和する一方、振動の周波数が異なる状態との間の化学交換が存在するスピンでは、状態間の遷移により位相が散逸することにより、見かけ上緩和速度が増大して観測される。このときの緩和速度の増分は R_{ex} と呼ばれる。

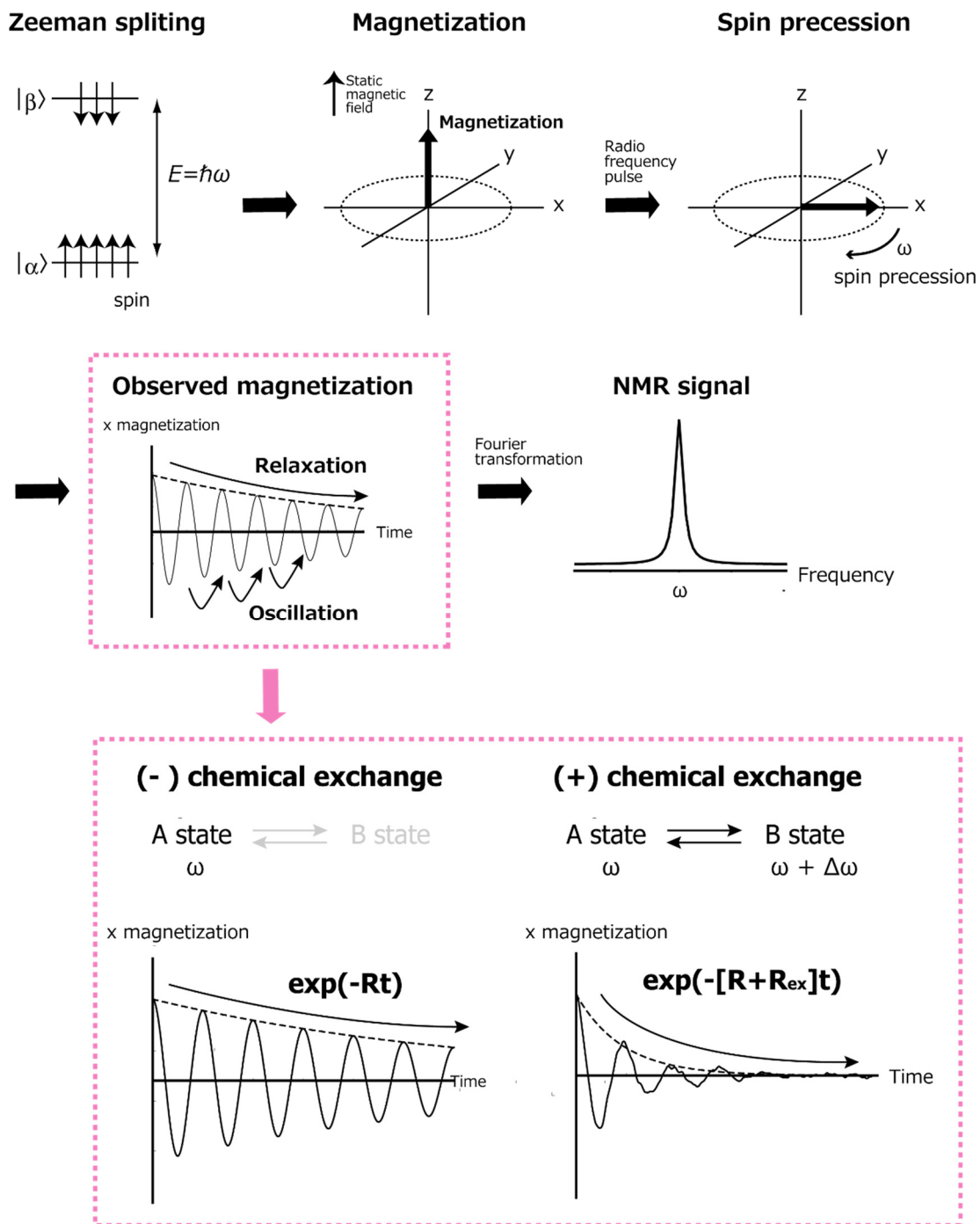


Fig. 10 NMR シグナルを観測するとき、化学交換の影響がどのように反映されるかを模式的に示した図。スピンのラーモア周波数を ω 、A、B 2 状態間の化学交換にあるときに状態間の周波数の違いを $\Delta\omega$ 、緩和速度を R 、化学交換による緩和速度の増分を R_{ex} とした。

ここで、以下のような A, B 2 状態間の化学交換、ならびにそのパラメーターを定義する (Fig. 11)。A 状態の存在割合は B 状態よりも多い、すなわち $p_A > p_B$ であるとする。なお、Fig. 11 の定義は本項目以降においても同様に用いることとする。

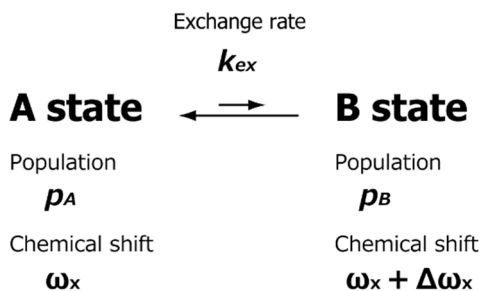


Fig. 11 A, B 2 状態間の化学交換のパラメーターの定義
X は ^1H , ^{13}C などの観測する核種を示す。

A, B 2 状態間の化学交換とパラメーターにより、化学交換による緩和速度の増分 R_{ex} は下記の式によって表すことができる[24]。

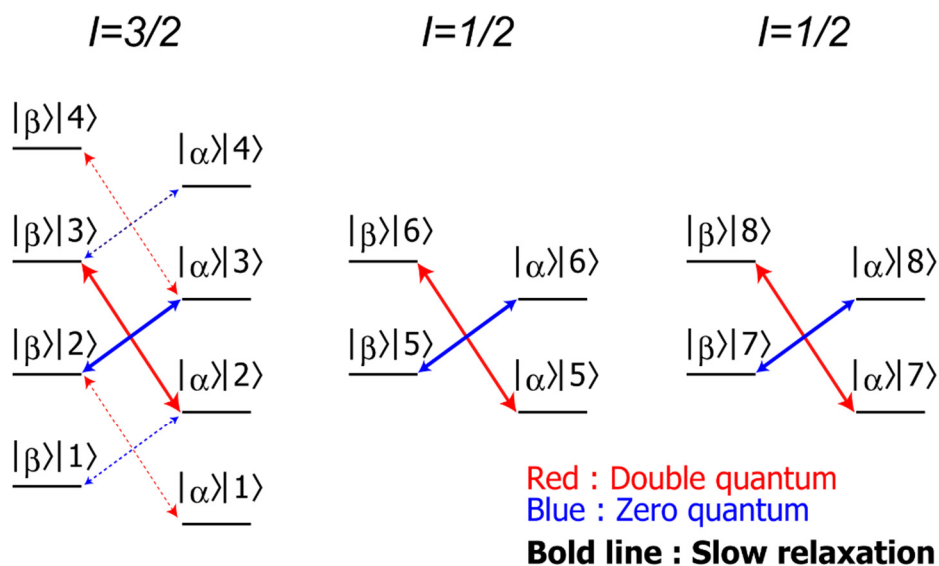
$$R_{ex} = \frac{k_{ex}}{2} - \frac{\sqrt{2}}{4} \left\{ k_{ex}^2 - \Delta\omega^2 + \left[(k_{ex}^2 + \Delta\omega^2)^2 - 16\Delta\omega^2 k_{ex}^2 p_A p_B \right]^{\frac{1}{2}} \right\}^{\frac{1}{2}}$$

したがって、この R_{ex} を大きさを算出することにより化学交換が存在するか否か、そして化学交換の各パラメーターを評価することが可能になる。NMR 法によるマイクロ秒からミリ秒オーダーの化学交換の解析は、 R_{ex} を算出することによって行われてきた[25]。

1-2-2. メチル基を観測対象とした高分子量タンパク質の解析法

NMR 法では観測するタンパク質の分子量の増大に伴い、緩和の原因となる磁氣的相互作用が充進し、NMR シグナルの感度と分解能が顕著に低下する。そのため、一般的なタンパク質の NMR 解析法である均一 ^{15}N 標識したタンパク質の主鎖アミド基の ^1H - ^{15}N 相関の解析する方法は、その適用範囲は分子量が 50 K 以下のものに限られる。高分子量タンパク質を解析する場合には、側鎖メチル基を観測する methyl transverse relaxation optimized spectroscopy (methyl-TROSY) 法の適用が有効である[26]。Methyl-TROSY 法では分子量が数百 K のタンパク質でも解析することが可能であり、これまでも分子量 300 K 以上の大腸菌プロテアーゼ ClpP 複合体 [27]や、1 M 以上の好熱好酸古細菌プロテアソーム複合体[28, 29]などの巨大分子を methyl-TROSY 法により解析した例が報告されている。

Methyl-TROSY 法では、磁化の緩和の原因となるメチル基 ^1H と他の空間的に隣接した ^1H 間の DD 相互作用を抑制するために、側鎖メチル基のみを選択的に ^1H , ^{13}C 標識し、メチル基以外の水素、ならびに他のアミノ酸は全て均一重水素標識したタンパク質を NMR 解析に用いる[30]。この安定同位体標識法の工夫に加え、 ^1H - ^{13}C スピン系のなかで緩和の影響が少ない特定のスピンの遷移に由来する磁化を観測する必要がある。Fig. 12 にはメチル基 ^{13}C - ^1H スピン系のエネルギー図を示した。Methyl-TROSY 法では ^{13}C による周波数ラベルを行う際に、 ^1H と ^{13}C の両方のスピン状態が変化する二量子遷移 (DQ 遷移)と、零量子遷移 (ZQ 遷移)からなる多量子遷移 (MQ) の磁化を観測する。MQ 遷移のうち Fig. 12 の太線で示したエネルギー間の遷移はメチル基軸周りの速い運動性と、メチル基内部の ^1H - ^1H 間 DD 相互作用が打ち消しあうことによって緩和が抑制されるため、MQ 遷移に対応する磁化を観測することで高感度化、高分解能化を達成することができる。これは実験的には、 ^1H - ^{13}C 相関スペクトルを観測する際に、一量子遷移の観測法である heteronuclear single quantum coherence (HSQC) 法ではなく、多量子遷移の観測法である HMQC 法を用いることにより可能である[26] [31]。



Left ket : ^{13}C spin state
 Right ket : ^1H spin state

$$\begin{aligned}
 |1\rangle &= |\alpha\alpha\alpha\rangle & |5\rangle &= (|\alpha\alpha\beta\rangle - |\alpha\beta\alpha\rangle)/\sqrt{2} \\
 |2\rangle &= (|\alpha\alpha\beta\rangle + |\alpha\beta\alpha\rangle + |\beta\alpha\alpha\rangle)/\sqrt{3} & |6\rangle &= (|\beta\alpha\beta\rangle - |\beta\beta\alpha\rangle)/\sqrt{2} \\
 |3\rangle &= (|\beta\beta\alpha\rangle + |\beta\alpha\beta\rangle + |\alpha\beta\beta\rangle)/\sqrt{3} & |7\rangle &= (|\alpha\alpha\beta\rangle + |\alpha\beta\alpha\rangle - 2|\beta\alpha\alpha\rangle)/\sqrt{6} \\
 |4\rangle &= |\beta\beta\beta\rangle & |8\rangle &= (2|\alpha\beta\beta\rangle - |\beta\beta\alpha\rangle - |\beta\alpha\beta\rangle)/\sqrt{6}
 \end{aligned}$$

Fig. 12 メチル基 ^{13}C - ^1H スピン系のエネルギー図[26, 31]

左側のケットが ^{13}C の、右側のケットが ^1H のスピン状態を表す。二量子遷移を赤色、零量子遷移を青色で示しており、methyl-TROSY 効果によって緩和が遅い遷移の成分を太い線で示している。

1-2-3. Methyl-TROSY 法によるマイクロ秒からミリ秒の運動性解析の問題点

側鎖メチル基を対象としてマイクロ秒からミリ秒の運動性を解析する手法は複数報告されているものの[32-38]、高分子量タンパク質にも適用可能な methyl-TROSY 型のもの ^{13}C - ^1H MQCPMG 緩和分散法[39]などごく一部に限られている。これは、methyl-TROSY 法によりマイクロ秒からミリ秒の化学交換を解析するには、MQ 遷移の緩和速度 R_{MQ} の化学交換による緩和速度の増分 $R_{\text{MQ,ex}}$ の大きさを解析する必要があることに起因する

R_{MQ} は DQ 遷移の緩和速度 R_{DQ} と ZQ 遷移の緩和速度 R_{ZQ} の平均値である。

$$R_{MQ} = \frac{1}{2}(R_{DQ} + R_{ZQ})$$

したがって、化学交換による緩和速度の増分もまた、DQ 遷移の増分 $R_{DQ,ex}$ と ZQ 遷移の増分 $R_{ZQ,ex}$ の平均値である。

$$R_{MQ,ex} = \frac{1}{2}(R_{DQ,ex} + R_{ZQ,ex})$$

このとき、 ^1H と ^{13}C の両方のスピン状態が変化する DQ 遷移 (Fig. 12 赤) と、ZQ 遷移 (Fig. 12 青) ではエネルギー差が異なるため、 $R_{DQ,ex}$ は ^{13}C と ^1H の化学シフト差 ($\Delta\omega_C, \Delta\omega_H$) の和 ($\Delta\omega_C + \Delta\omega_H$) によって、 $R_{ZQ,ex}$ は ^{13}C と ^1H の化学シフト差の差 ($\Delta\omega_C - \Delta\omega_H$) によってその大きさが左右される。したがって、 ^{13}C と ^1H の両方の化学シフト差がある場合には、 $R_{DQ,ex}$ と $R_{ZQ,ex}$ は異なる値となる。

$$R_{DQ,ex} = \frac{k_{ex}}{2} - \frac{\sqrt{2}}{4} \left\{ k_{ex}^2 - \Delta\omega_{DQ}^2 + \left[(k_{ex}^2 + \Delta\omega_{DQ}^2)^2 - 16\Delta\omega_{DQ}^2 k_{ex}^2 p_A p_B \right]^{\frac{1}{2}} \right\}^{\frac{1}{2}}$$

$$R_{ZQ,ex} = \frac{k_{ex}}{2} - \frac{\sqrt{2}}{4} \left\{ k_{ex}^2 - \Delta\omega_{ZQ}^2 + \left[(k_{ex}^2 + \Delta\omega_{ZQ}^2)^2 - 16\Delta\omega_{ZQ}^2 k_{ex}^2 p_A p_B \right]^{\frac{1}{2}} \right\}^{\frac{1}{2}}$$

$$\Delta\omega_{DQ} = |\Delta\omega_H + \Delta\omega_C|$$

$$\Delta\omega_{ZQ} = |\Delta\omega_H - \Delta\omega_C|$$

$R_{DQ,ex}$ と $R_{ZQ,ex}$ が ^{13}C と ^1H の化学シフト差に対して異なる挙動を示すことにより、 $R_{DQ,ex}$ と $R_{ZQ,ex}$ の化学シフト差に対する影響が互いに平均化してしまうため、 $R_{MQ,ex}$ の大きさは化

学シフト差の大小とは対応しない。そのため、 $R_{MQ,ex}$ を検出して化学交換の寄与を解析する methyl-TROSY 法に基づいた解析法では化学交換を定量的に解析することが困難であった。

Fig. 13 には具体例として、交換速度 $3,000 \text{ (s}^{-1}\text{)}$ 、マイナー状態の割合が 5 % である条件で、 ^1H の化学シフト差に対する各多量子遷移の R_{ex} の大きさの変化をシミュレーションした図を示す。 $R_{DQ,ex}$ は ^1H 化学シフト差に対して直線的に増大するが、 $R_{ZQ,ex}$ は ^1H 化学シフト差依存的に減少してから、 ^{13}C 化学シフト差が同一の値となった時点で 0 となり、以降は ^1H 化学シフト差依存的に増大するという挙動を示す。これらの R_{ex} の寄与は互いに打ち消しあってしまうため、平均値に対応する $R_{MQ,ex}$ の大きさは ^1H 化学シフト差に対してほとんど変化しないことが分かる。

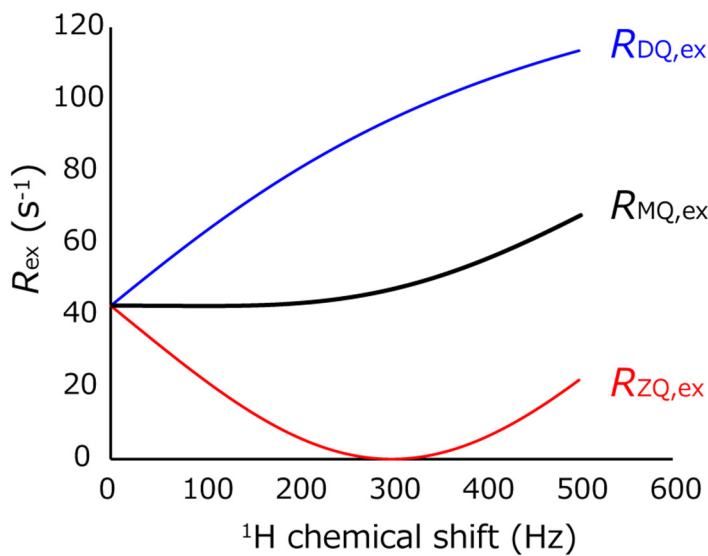


Fig. 13 ^1H の化学シフト差に対する多量子遷移の R_{ex} のシミュレーション
 ^{13}C 化学シフト差が 300 Hz, 交換速度が $3,000 \text{ s}^{-1}$, マイナー状態の存在割合が 5 %
 として、 $R_{DQ,ex}$, $R_{ZQ,ex}$, $R_{MQ,ex}$ の大きさをそれぞれシミュレーションした。

さらに、Fig. 14 では、既存の methyl-TROSY 型の化学交換の解析法である MQ CPMG 緩和分散法[39]により化学交換を解析したときの結果を示した。MQ CPMG 緩和分散法では多量子状態とした磁化に対して 25 ~ 1,000 Hz 程度の CPMG パルスを照射し、その間に生じる

緩和の大きさが CPMG パルスでどの程度抑制されたかから、化学交換の寄与を評価、定量する手法である。Fig. 14 では化学交換による緩和速度の増分に対応する量である、CPMG パルスが 50 Hz と 1,000 Hz のときの緩和速度の変化量 $R_{MQ,eff}$ が、 1H , ^{13}C 化学シフト差の違いをどの程度反映するのかをシミュレーションした。化学シフト差に対する $R_{MQ,eff}$ の変化量は、 1H 化学シフト差と ^{13}C 化学シフト差の大小関係に大きく影響を受け、 $R_{MQ,eff}$ が化学シフト差の増大に伴い増大するか、減少するかが異なっている。そのため、 $R_{MQ,eff}$ が検出された場合であっても化学シフト差の大小を評価することができないため、化学交換が存在する部位の同定や、部位ごとに化学シフト変化量の大小を定量的に比較することは困難である。そのため、これまでに MQ CPMG 緩和分散法を用いた解析では、感度の低い一量子型の実験を組み合わせた解析を行うか[40]、 $R_{MQ,eff}$ の変化が解析しやすい 1H 化学シフト差がないメチル基に解析を限定する必要があった[27]。

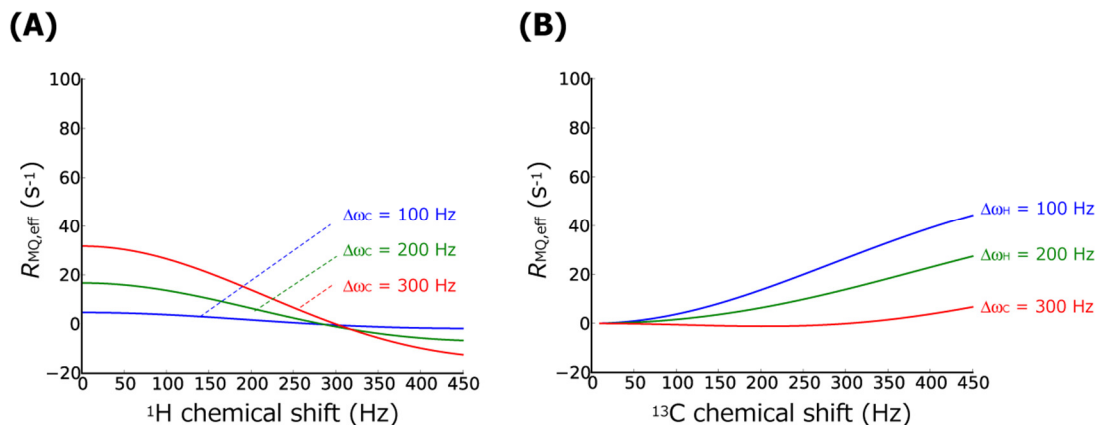


Fig. 14 MQ CPMG 緩和分散解析で算出される $R_{MQ,eff}$ の化学シフト差に対する依存性

(A) ^{13}C の化学シフト差が 100, 200, 300 Hz と異なるときの、 1H 化学シフト差に対する $R_{MQ,eff}$ の変化量のプロット

(B) 1H の化学シフト差が 100, 200, 300 Hz と異なるときの、 ^{13}C 化学シフト差に対する $R_{MQ,eff}$ の変化量のプロット

CPMG パルス周波数が 1,000 Hz と 50 Hz のときの緩和の展開時間中の見かけの緩和速度の差 $R_{MQ,eff}$ を算出した。交換速度が $3,000 s^{-1}$ 、マイナー状態の存在割合が 5% とした[39]。

以上より、methyl-TROSY 法によるマイクロ秒からミリ秒の化学交換の解析からは、MQ 遷移が DQ 遷移, ZQ 遷移の重ね合わせであるという性質のために、化学交換が存在する部位の同定や、化学シフト差の大小や速度論的なパラメーターを定量的に評価することが困難であった。そのため、高分子量タンパク質の機能的運動性を明らかとするには、これらの問題を克服した新規解析手法を確立することが必要であると考えた。

1-3. 研究目的

サブミリ秒オーダーの開閉機構を明らかとするうえで、本研究で解析対象とする KcsA は 4 量体と界面活性剤ミセルを含めると全体の分子量は 120 K 以上となる。そのため、methyl-TROSY 法の適用したうえで、どの部位にサブミリ秒オーダーの化学交換が存在するのかを明らかとし、化学交換が K^+ 透過活性の違いを生じさせる機構を明らかにする必要がある。しかしながら、1-2 節で述べたように methyl-TROSY 法によりマイクロ秒からミリ秒オーダーの化学交換を解析する既存の手法では、化学交換の存在する部位の同定や、化学シフト差の大小や速度論的なパラメーターを定量的に評価することが困難であるという問題があった。

そこで本研究では、(1) 高分子量タンパク質の側鎖メチル基を対象として、マイクロ秒からミリ秒オーダーの化学交換を解析する新規 NMR 手法の開発をすること、そして開発した手法により (2) KcsA のサブミリ秒オーダーの開閉がどの部位の構造変化、化学交換に起因するのかを明らかにすることを目的とした。

本論文の第 2 節では、側鎖メチル基 ^1H - ^{13}C スピン系の多量子遷移の緩和速度の差を利用することで高分子量タンパク質の化学交換を解析する手法を考案し、またモデルタンパク質を用いた検討から手法の妥当性を検証した。第 3 節では確立した手法に基づき、KcsA のサブミリ秒オーダーの化学交換が存在する部位を同定し、サブミリ秒オーダーの開閉の構造機構を提唱した。

2. 多量子遷移の緩和速度の差を利用した高分子量タンパク質の化学交換の解析法の開発

2-1. 理論的背景

2-1-1. 多量子遷移速度の差 ΔR_{MQ} による化学交換の検出

高分子量タンパク質のマイクロ秒からミリ秒オーダーの化学交換を解析するためには、methyl-TROSY 法により算出可能な MQ 遷移の緩和速度 R_{MQ} を解析する必要がある。しかしながら、 R_{MQ} は DQ 遷移と ZQ 遷移の寄与が平均化して算出されるため、化学交換の寄与 $R_{MQ,ex}$ の大きさは化学シフト差の大小と対応せず、定量的な解析が困難であるという問題があった。そこで、高分子量タンパク質の化学交換を解析する汎用性の高い手法を考案するにあたり、methyl-TROSY 法により算出することができ、かつ化学シフト差の大小を定量的に評価することが容易な NMR パラメーターを用いる必要があると考えた。

そこで、本研究では多量子遷移の緩和速度の差 ΔR_{MQ} に着目した[41]。 ΔR_{MQ} はこれまでに主鎖アミド基[41]や $C\alpha-C\beta$ 相関[42]、核酸の $^1H-^{15}N$ [43]、残基間 $C\alpha-C\alpha$ 相関[44] などにおいて適用された実績があり、定式化もなされているものの、高分子量タンパク質の側鎖メチル基 $^1H-^{13}C$ スピン系において化学交換の解析に用いられた例は報告されていない。高分子量タンパク質の ΔR_{MQ} は多量子遷移からなるため methyl-TROSY 効果によって、高感度かつ高精度に解析することが可能であること、ならびに methyl-TROSY 法による化学交換を検出する既存の手法と比べても高い定量性を有していることから、高分子量タンパク質の化学交換を解析するうえで最適な NMR パラメーターであると考えた。

ΔR_{MQ} は下記のように DQ 遷移と ZQ 遷移の緩和速度の差によって定義されるパラメーターである。

$$\Delta R_{MQ} = R_{DQ} - R_{ZQ}$$

ΔR_{MQ} の化学交換の寄与は同様に、DQ 遷移の化学交換の寄与 $R_{DQ,ex}$ と ZQ 遷移の化学交換の寄与 $R_{ZQ,ex}$ の差によって表され、下記式のように計算することができる[24, 45]。

$$\begin{aligned} \Delta R_{MQ,ex} &= R_{DQ,ex} - R_{ZQ,ex} \\ &= -\frac{\sqrt{2}}{4} \left\{ k_{ex}^2 - \Delta\omega_{DQ}^2 + \left[(k_{ex}^2 + \Delta\omega_{DQ}^2)^2 - 16\Delta\omega_{DQ}^2 k_{ex}^2 p_A p_B \right]^{\frac{1}{2}} \right\}^{\frac{1}{2}} \\ &\quad + \frac{\sqrt{2}}{4} \left\{ k_{ex}^2 - \Delta\omega_{ZQ}^2 + \left[(k_{ex}^2 + \Delta\omega_{ZQ}^2)^2 - 16\Delta\omega_{ZQ}^2 k_{ex}^2 p_A p_B \right]^{\frac{1}{2}} \right\}^{\frac{1}{2}} \end{aligned}$$

$$\Delta\omega_{DQ} = |\Delta\omega_H + \Delta\omega_C|$$

$$\Delta\omega_{ZQ} = |\Delta\omega_H - \Delta\omega_C|$$

交換速度が化学シフト差よりも大きい場合には、 $\Delta R_{MQ,ex}$ は以下の式で近似することができる[41]。

$$k_{ex} \gg \Delta\omega_{DQ}, \Delta\omega_{ZQ}$$

$$\Delta R_{MQ,ex} = \frac{4\Delta\omega_H \Delta\omega_C p_A p_B}{k_{ex}}$$

$\Delta R_{MQ,ex}$ の大きさは ^1H , ^{13}C 化学シフト差の積に対して比例することから、 $R_{MQ,ex}$ を検出する場合と比較して、化学シフト差の違いをより鋭敏に反映し、その大きさを定量的に比較することが容易となる。Fig. 15 には Fig. 13 と同一の条件にて、 ^1H 化学シフト差に対する $R_{MQ,ex}$ と $\Delta R_{MQ,ex}$ の変化をそれぞれプロットした。 $R_{MQ,ex}$ が化学シフト差に対してほとんど変化しない条件において、 $\Delta R_{MQ,ex}$ は化学シフト差に対してほぼ直線的に増大することが示された。

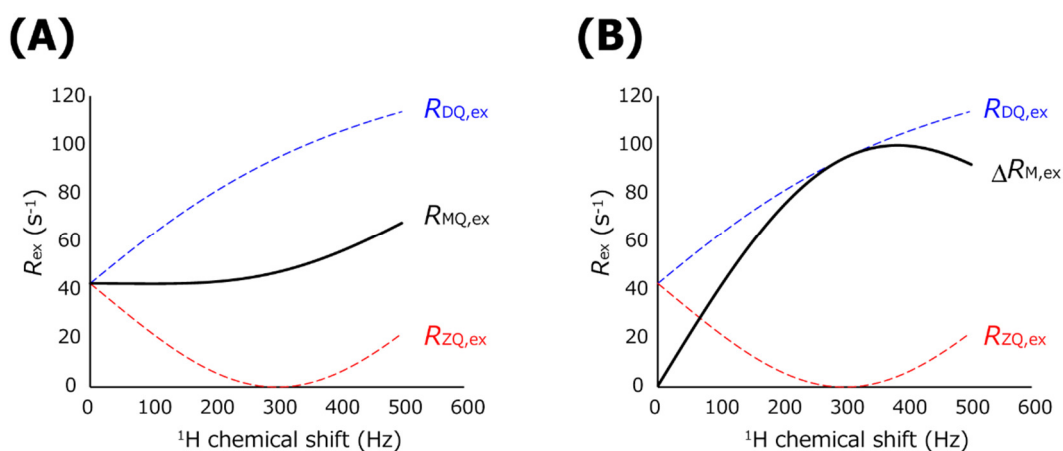


Fig. 15 1H の化学シフト差に対する多量子遷移の R_{ex} のシミュレーション

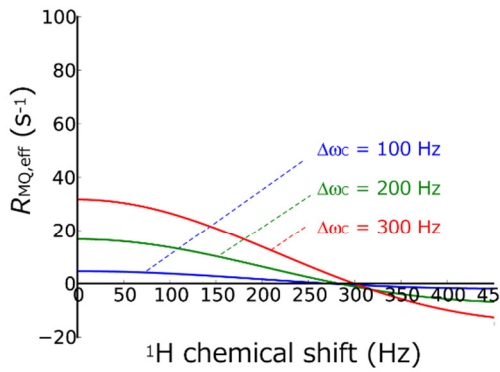
(A) $R_{MQ,ex}$ のシミュレーション。Fig. 13 と同一である。

(B) $\Delta R_{MQ,ex}$ のシミュレーション。

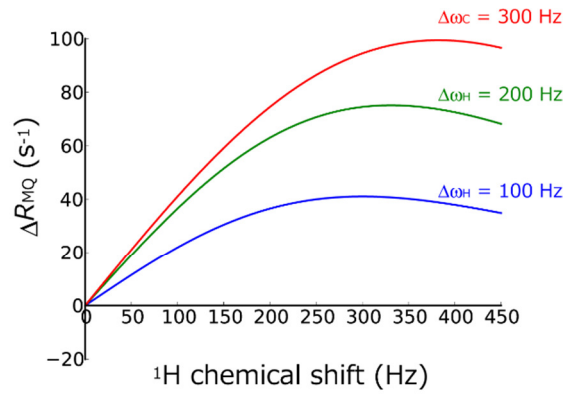
^{13}C 化学シフト差が 300 Hz, 交換速度が $3,000 s^{-1}$, マイナー状態の存在割合が 5% として、 $R_{MQ,ex}, \Delta R_{MQ,ex}$ の大きさをそれぞれシミュレーションした。 $R_{DQ,ex}, R_{ZQ,ex}$ の大きさを参考のために青と赤の点線にて示している。

Fig. 16 では既存の化学交換の解析手法である MQ CPMG 緩和分散実験と、同じ条件にてシミュレーションした $\Delta R_{MQ,ex}$ 解析とを比較した。(A)では 1H 、(B)では ^{13}C の化学シフト差について $R_{MQ,eff}$ ならびに $\Delta R_{MQ,ex}$ の変化量をそれぞれプロットしたところ、 $R_{MQ,eff}$ と比較して $\Delta R_{MQ,ex}$ はより大きな値の変化が観測されること、 $^1H, ^{13}C$ 化学シフト差に対してほぼ直線的に増大することから、既存の MQ CPMG 緩和分散法と比べてもより高感度かつ定量的に化学交換の検出、評価が可能であると考えた。

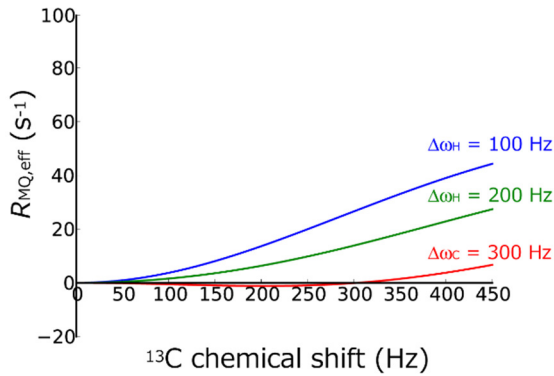
(A) MQ CPMG relaxation dispersion



ΔR_{MQ} analysis



(B) MQ CPMG relaxation dispersion



ΔR_{MQ} analysis

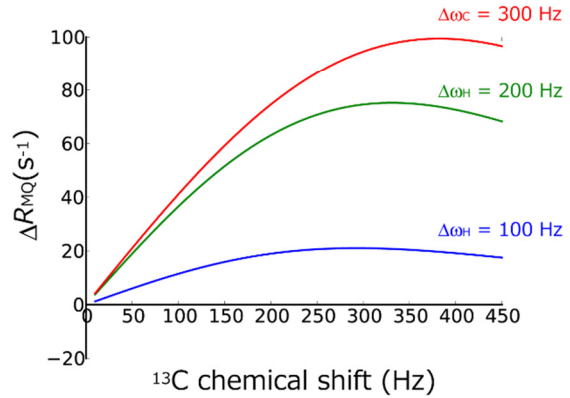


Fig. 16 MQ CPMG 緩和分散解析で算出される $R_{MQ,eff}$ と ΔR_{MQ} の化学シフト差に対する依存性

(A) ¹³C の化学シフト差が 100, 200, 300 Hz と異なるときの、¹H 化学シフト差に対する $R_{MQ,eff}$ と ΔR_{MQ} の変化量のプロット

(B) ¹H の化学シフト差が 100, 200, 300 Hz と異なるときの、¹³C 化学シフト差に対する $R_{MQ,eff}$ と ΔR_{MQ} の変化量のプロット

MQ CPMG 緩和分散実験の結果は Fig. 14 と同じである。交換速度が 3,000 s⁻¹、マイナー状態の存在割合が 5 % とした[39]。

2-1-2. ΔR_{MQ} における化学交換非依存項の定式化

高分子量タンパク質の側鎖メチル基 ^1H - ^{13}C スピン系の ΔR_{MQ} から化学交換を解析する場合、 ΔR_{MQ} の実測値 $\Delta R_{MQ,obs}$ には化学交換の寄与 $\Delta R_{MQ,ex}$ だけではなく、DD 相互作用の寄与 $\Delta R_{MQ,DD}$ と CSA 相互作用の寄与 $\Delta R_{MQ,CSA}$ からなる。

$$\Delta R_{MQ,obs} = \Delta R_{MQ,DD} + \Delta R_{MQ,CSA} + \Delta R_{MQ,ex}$$

DD 相互作用の寄与 $\Delta R_{MQ,DD}$ は、近接する ^2H および ^1H との DD 相互作用により生じる。 ^2H との DD 相互作用では主に残基内の ^2H が緩和源となり、 ^1H との DD 相互作用は標識された他の残基のメチル基の ^1H か、重水素標識されなかった残余の ^1H が緩和源となる。観測するメチル基 ^1H と緩和源となる ^1H との距離を r_{HH}^E 、観測するメチル基 ^1H と緩和源となる ^2H との距離を r_{HD}^E 、観測するメチル基 ^{13}C と緩和源となる ^1H との距離を r_{CH}^E 、観測するメチル基 ^{13}C と緩和源となる ^2H との距離を r_{CD}^E として、分子の回転相関時間 τ_c 、オーダーパラメーター S^2 を用いて以下の式で表せる [46]。総和記号 Σ はタンパク質内に存在する全ての ^1H 、もしくは ^2H についての足し合わせを意味する。

$$\Delta R_{MQ,DD} = \frac{32}{15} \left(\frac{\mu_0}{4\pi} \right)^2 \sum_i \frac{\hbar^2 \gamma_D^2 \gamma_H \gamma_C S^2 \tau_c}{r_{CD_i}^3 r_{HD_i}^3} + \frac{4}{5} \left(\frac{\mu_0}{4\pi} \right)^2 \sum_i \frac{\hbar^2 \gamma_H^3 \gamma_C S^2 \tau_c}{r_{CH_i}^3 r_{HH_i}^3}$$

$\Delta R_{MQ,DD}$ の大きさは周囲の ^1H 、 ^2H 密度、ならびに側鎖の運動性によってメチル基ごとに異なる値となる。また、 $\Delta R_{MQ,DD}$ は分子の回転相関時間 τ_c に比例するため、分子量に依存して大きくなる。Fig. 17 には $\tau_c = 65 \text{ ns}$ の $\{u\text{-}^2\text{H}, \text{Ile}\delta 1\text{-}[^{13}\text{CH}_3], \text{Leu/Val-[}^{13}\text{CH}_3, ^{12}\text{CD}_3]\}$ 大腸菌由来マルトース結合タンパク質 (maltose binding protein, MBP) の実測値から ^1H , ^2H の寄与を算出し、異なる τ_c のタンパク質において各メチル基が取りうる $\Delta R_{MQ,DD}$ の分布を見積

もった図を示した。 $\Delta R_{MQ,ex}$ が一般的に数十 s^{-1} 程度であることを考慮すると、 $\tau_c = 50$ ns を超えるような場合には、 $\Delta R_{MQ,ex}$ と $\Delta R_{MQ,DD}$ の大きさが同程度となるため、化学交換の寄与 $\Delta R_{MQ,ex}$ を定量的に評価することが困難になることが予想される。

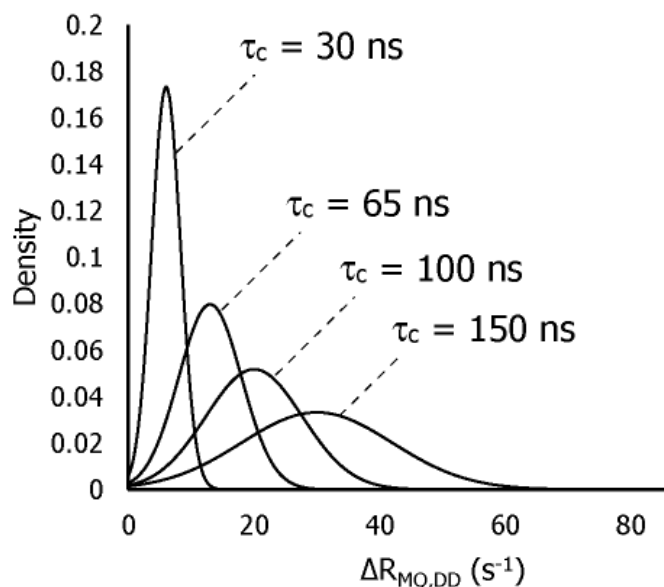


Fig. 17 メチル基側鎖 ΔR_{MQ} における DD 相互作用の寄与 $\Delta R_{MQ,DD}$ の分布の見積もり $\tau_c = 65$ ns の $\{u\text{-}^2\text{H}, \text{Ile}\delta 1\text{-}[^{13}\text{CH}_3], \text{Leu/Val}\text{-}[^{13}\text{CH}_3, ^{12}\text{CD}_3]\}$ MBP の実測データをもとに、異なる τ_c のタンパク質における $\Delta R_{MQ,DD}$ の分布を見積もった。

一方、CSA 相互作用の寄与 $\Delta R_{MQ,CSA}$ は化学シフト異方性 $\Delta\sigma$ 、磁場強度 B_0 、回転相関時間 τ_c 、メチル基回転軸周りのオーダーパラメーター S_{axis}^2 、CSA テンソルの主軸間の角度 θ を用いて以下の式で表される[47]。

$$\Delta R_{MQ,CSA} = \frac{16}{45} \gamma_H \gamma_C \Delta\sigma_H \Delta\sigma_C S_{axis}^2 B_0^2 \tau_c \frac{3 \cos^2 \theta - 1}{2}$$

回転相関時間が 100 ns、磁場強度 18.8 Tesla を仮定した場合、 $2 s^{-1}$ 程度の大きさであると計算することができる。DD 相互作用や化学交換の影響と比較してその大きさは小さいが、

複数磁場で測定したときの磁場依存性を解析する場合には、この $\Delta R_{MQ,CSA}$ の寄与を考慮する必要がある。

以上より、高分子量タンパク質においては ΔR_{MQ} の実測値 $\Delta R_{MQ,obs}$ には化学交換の寄与 $\Delta R_{MQ,ex}$ と同程度の大きさで化学交換非依存項の寄与 (主に $\Delta R_{MQ,DD}$) が存在するため、化学交換を定量的に解析するには $\Delta R_{MQ,ex}$ を抽出するための解析法を確立しなければならないことが分かった。

そこで、本研究では対象とする化学交換の交換速度に応じて化学交換の寄与 $\Delta R_{MQ,ex}$ を分離する 2 つの手法、異種核二重共鳴法と磁場依存性解析法を用いることとした。

2-1-3. 異種核二重共鳴法による ΔR_{MQ} の化学交換の寄与の分離

化学交換の寄与を抽出するための第 1 の方法として、 $^1\text{H},^{13}\text{C}$ に同時にコンポジットパルス照射する異種核二重共鳴 (heteronuclear double resonance, HDR) パルス[48]を用いる手法を考案した。10 kHz 程度の高周波数の HDR パルス照射すると、スピンの状態が変化し、通常は 1 kHz 程度の大きさである化学シフト差がほぼ完全に平均化される。したがって、HDR パルス照射しながら化学シフト差があることにより生じる化学交換の寄与 $\Delta R_{MQ,ex}$ の大きさはほぼ 0 となる (Fig. 18)。

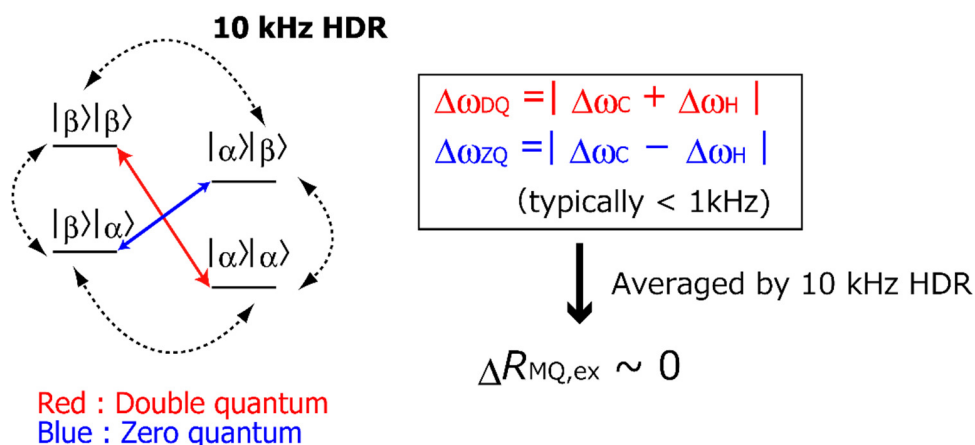


Fig. 18 HDR パルスにより $\Delta R_{MQ,ex}$ の平均化を示した模式図

簡単のため Fig. 12 のエネルギー図のなかで一部のエネルギー状態のみを取り出して示している。DQ 遷移と ZQ 遷移の化学シフト差は通常 1 kHz 程度であることから、10 kHz の周波数の HDR パルスを照射することで化学シフト差が平均化され、 $\Delta R_{MQ,ex}$ の寄与がほぼ 0 となる。

したがって、HDR 非照射時に測定した $\Delta R_{MQ,obs}$ (化学交換非依存項と化学交換の寄与) と HDR を照射しながら測定した $\Delta R_{MQ,obs(HDR)}$ (化学交換非依存項のみ) の差を計算することで、 $\Delta R_{MQ,ex}$ を算出することが可能となると考えた。HDR 照射時に算出される $\Delta R_{MQ,obs(HDR)}$ の値は、コンポジットパルスによる平均化のために値が 1/2 となることを考慮し[48]、以下の関係式から $\Delta R_{MQ,ex}$ を算出することができる。

$$\Delta R_{MQ,obs} = \Delta R_{MQ,DD} + \Delta R_{MQ,CSA} + \Delta R_{MQ,ex}$$

$$2 \times \Delta R_{MQ,obs(HDR)} = \Delta R_{MQ,DD} + \Delta R_{MQ,CSA}$$

$$\Delta R_{MQ,ex} = \Delta R_{MQ,obs} - 2 \times \Delta R_{MQ,obs(HDR)}$$

この HDR パルスを用いた $\Delta R_{MQ,ex}$ の分離法を、HDR 法と呼ぶこととする。

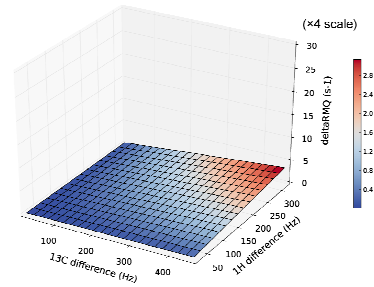
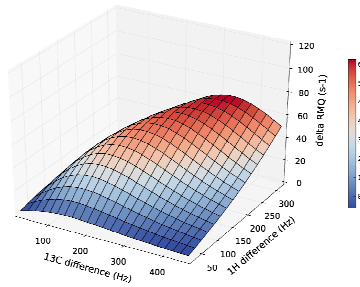
以降では HDR 法により $\Delta R_{MQ,ex}$ をどの程度まで抑制することができるのか、どの程度の交換速度、化学シフト差まで本手法を適用できるかを調べるシミュレーションにより調べ

た結果を示す。交換速度が $1,500 \sim 12,000 \text{ (s}^{-1}\text{)}$ 、マイナー状態の割合が 5% の化学交換において、10 kHz の強度で HDR パルス照射したときに化学交換の寄与 $\Delta R_{\text{MQ,ex}}$ がどの程度抑制されるかを、 ^{13}C の化学シフト差が $20 \sim 460 \text{ Hz}$ 、 ^1H の化学シフト差が $20 \sim 320 \text{ Hz}$ の各条件にてシミュレーションを行った (Fig. 19)。Fig. 19 左の列には HDR パルスを非照射時に観測される $\Delta R_{\text{MQ,ex}}$ の計算値を、右の列には 10 kHz の HDR パルス照射したときに観測される $2 \times \Delta R_{\text{MQ,obs (HDR)}}$ の値を、 ^1H , ^{13}C の化学シフト差に対してプロットした。 $\Delta R_{\text{MQ,ex}}$ の計算値のプロットでは $0 \sim 120 \text{ s}^{-1}$ の領域を示し、 $2 \times \Delta R_{\text{MQ,obs (HDR)}}$ の値のプロットでは $0 \sim 30 \text{ s}^{-1}$ の領域を拡大して示している。交換速度が $1,500$ と $3,000 \text{ s}^{-1}$ の場合には、10 kHz の HDR パルス照射により化学シフト差が最大でも 5 s^{-1} 程度にまで $\Delta R_{\text{MQ,ex}}$ を抑制することができるが、 $6,000 \text{ s}^{-1}$ と $12,000 \text{ s}^{-1}$ ではそれぞれ抑制しきれない $\Delta R_{\text{MQ,ex}}$ が 10 s^{-1} , 14 s^{-1} 程度になることが示された。

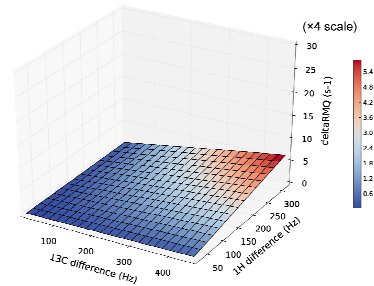
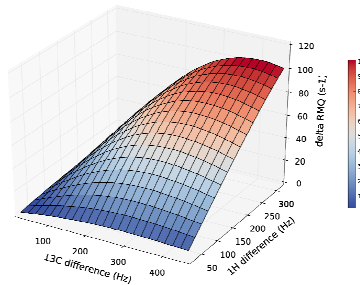
Theoretical ΔR_{MQ}

$2 \times \Delta R_{MQ,obs(HDR)}$ (10 kHz HDR)

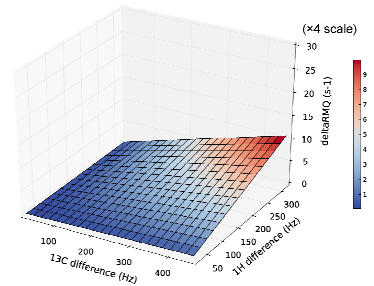
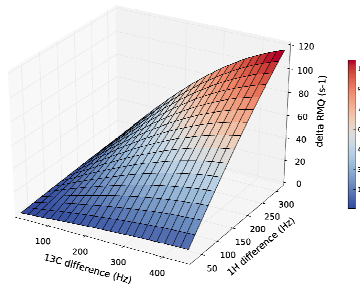
$k_{ex} = 1,500 \text{ (s}^{-1}\text{)}$



$k_{ex} = 3,000 \text{ (s}^{-1}\text{)}$



$k_{ex} = 6,000 \text{ (s}^{-1}\text{)}$



$k_{ex} = 12,000 \text{ (s}^{-1}\text{)}$

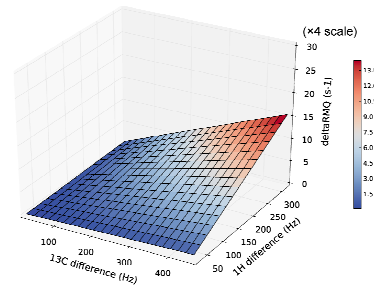
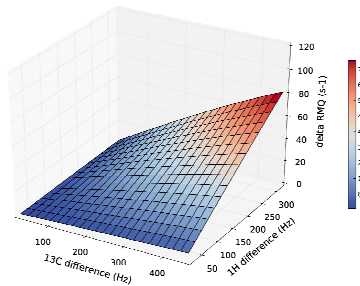


Fig. 19 HDR パルス非照射時と、10 kHz の HDR パルス照射時の $\Delta R_{MQ,ex}$ の 3 次元プロット

(左) $\Delta R_{MQ,ex}$ の理論式から算出される値を、(右) 10 kHz の HDR 照射時に算出される $\Delta R_{MQ,obs(HDR)}$ の 2 倍の値をプロットした。(左) のプロットでは $0 \sim 120 \text{ s}^{-1}$ 、(右) のプロットでは $0 \sim 30 \text{ s}^{-1}$ の領域のみを示している。マイナー状態の割合は 5%とした。xy 軸上は ^1H , ^{13}C の化学シフト差を、z 軸上に $\Delta R_{MQ,ex}$ の大きさをプロットした。値が小さいほど青色、大きいほど赤色となるような色付けをしている。

化学交換の寄与が HDR パルス照射により抑制しきれなかった場合には、 $2 \times \Delta R_{MQ,obs(HDR)}$ の値は真の値よりも大きく算出され、HDR 法の実験手順に基づき下記式より算出される $\Delta R_{MQ,ex}$ の値は過小評価される。

$$\Delta R_{MQ,ex} = \Delta R_{MQ,obs} - 2 \times \Delta R_{MQ,obs(HDR)}$$

そこで、HDR パルス照射により抑制しきれなかった $\Delta R_{MQ,ex}$ の寄与が、測定誤差としてはどの程度の大きさに相当するのかを調べることにした。ここでは、理論式から算出される $\Delta R_{MQ,ex}$ の値と、HDR 法の実験手順に基づき上記式より算出される $\Delta R_{MQ,ex}$ の値の相関プロットを解析した。両者の値が一致している場合には、相関プロットは $y=x$ の傾き 1 の直線状に分布するが、一致しない場合には、誤差の大きさに従って傾きをもって分布することが予想される。

Fig. 19 の各化学シフト差におけるデータについて、理論式から算出される $\Delta R_{MQ,ex}$ の値と、HDR 法の実験手順に基づき算出される $\Delta R_{MQ,ex}$ の値をプロットした (Fig. 20)。交換速度が $1,500 \sim 12,000 \text{ (s}^{-1}\text{)}$ のいずれの場合も、 $\Delta R_{MQ,ex}$ の理論式から算出される値と、HDR 法から算出した $\Delta R_{MQ,ex}$ の値は相関係数 $R > 0.99$ の高い相関を示しているものの、交換速度が大きくなるにつれ、HDR 法から算出した $\Delta R_{MQ,ex}$ の値の方が理論式から算出される値よりも小さくなる傾向があった。これは、交換速度が増大するにつれ HDR パルスによる化学交換の寄与の抑制がより不完全になることに起因する。相関プロットの傾きから HDR 法から算出した $\Delta R_{MQ,ex}$ の誤差を評価したところ、交換速度が $1,500 \text{ s}^{-1}$, $3,000 \text{ s}^{-1}$ では HDR 法から算出した $\Delta R_{MQ,ex}$ と理論式から算出された値のずれは 5%未満、交換速度が $6,000 \text{ s}^{-1}$ でも誤差 8%程度であり、交換速度が $10^4 \text{ (s}^{-1}\text{)}$ オーダーよりも小さい場合には HDR 法により十分な精度で $\Delta R_{MQ,ex}$ の大きさを評価することができる。一方、交換速度が $12,000 \text{ s}^{-1}$ の場合のように交換速度が $10^4 \text{ (s}^{-1}\text{)}$ を超える場合には、誤差が 18%程度にまで増大することから、HDR 法を適

用することが困難であることが分かった。

以上シミュレーションより、HDR 法は交換速度が $10^2 \sim 10^4$ (s^{-1}) 程度の化学交換に対して適用可能であると結論した。

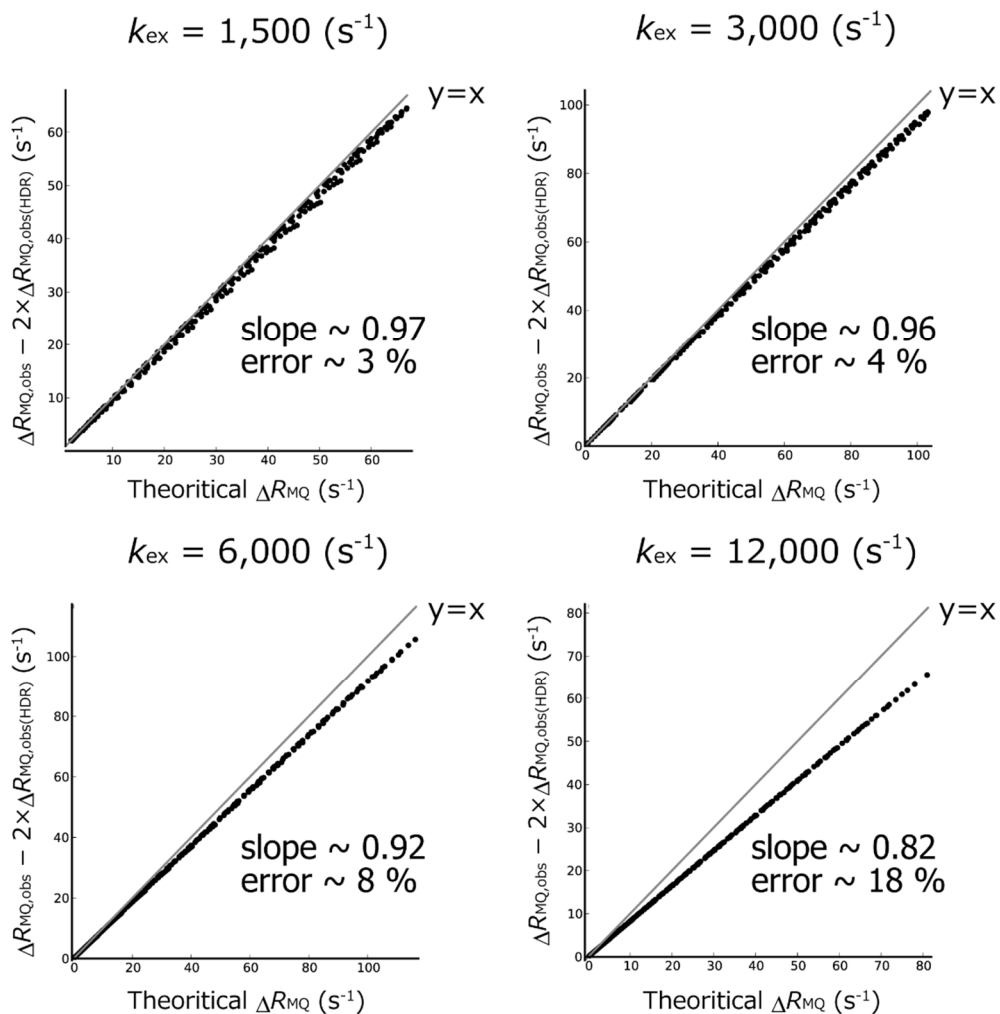


Fig. 20 $\Delta R_{MQ,ex}$ の理論式から算出される値と、HDR 法の実験手順に基づき算出される $\Delta R_{MQ,ex}$ ($\Delta R_{MQ,obs} - 2 \times \Delta R_{MQ,obs}(HDR)$) の値の相関プロット。プロットの各点は Fig. 19 における各化学シフト差のグリッドの値に対応している。データ分布の近似曲線から傾きの大きさ (slope) を算出し、そこから誤差の大きさ、すなわち HDR 法による算出で何%程度 $\Delta R_{MQ,ex}$ が小さく算出されるかを示した。

2-1-4. 磁場依存性による ΔR_{MQ} の化学交換の寄与の分離

HDR 法により化学交換の寄与を正確に評価することが困難な、交換速度が 10^4 (s^{-1}) を超える場合には、化学交換を抽出する第 2 の手法として $\Delta R_{MQ,obs}$ の磁場依存性を解析する方法を用いた。磁場依存性から ΔR_{MQ} の化学交換の寄与を評価する手法は主鎖 1H - ^{15}N スピン系の ΔR_{MQ} 解析において報告されており[49]、本研究ではこれを応用して高分子量タンパク質の側鎖メチル基 1H - ^{13}C スピン系に適用した。

化学シフト差の大きさを各測定磁場で同一となる ppm 単位で表示した ϖ と周波数の単位 (rad/s) で表示した ω は下記の関係にある ($X=^1H$ or ^{13}C)。 ω の大きさは磁場強度 B_0 に対して比例する。

$$\omega_X = \gamma_X B_0 \varpi_X$$

化学交換の寄与 $\Delta R_{MQ,ex}$ の大きさは $k_{ex} \gg \Delta\omega$ の場合には 1H , ^{13}C 化学シフト $\Delta\omega$ の積に比例することより、磁場強度の 2 乗に対して比例する。したがって、複数の磁場強度で測定した $\Delta R_{MQ,obs}$ の磁場強度の 2 乗に対する傾きから、化学交換の寄与を評価することが可能である。

$$\begin{aligned}\Delta R_{MQ,ex} &= \frac{4\Delta\omega_H \Delta\omega_C p_A p_B}{k_{ex}} \\ &= \frac{4\gamma_H \gamma_C \Delta\varpi_H \Delta\varpi_C p_A p_B B_0^2}{k_{ex}}\end{aligned}$$

一方、観測値である $\Delta R_{MQ,obs}$ の化学交換非依存項において、DD 相互作用の寄与 $\Delta R_{MQ,DD}$ は磁場強度依存性を持たないが、CSA 相互作用の寄与は磁場強度の 2 乗に対して比例する。

$$\Delta R_{MQ,CSA} = \frac{16}{45} \gamma_H \gamma_C \Delta \sigma_H \Delta \sigma_C S_{axis}^2 B_0^2 \tau_C \frac{3 \cos^2 \theta - 1}{2}$$

したがって、実際に複数の磁場強度で測定した $\Delta R_{MQ,obs}$ の値を磁場強度の 2 乗に対する傾き S を算出した場合には、化学交換の寄与だけではなく、CSA 相互作用の寄与 Δ_{CSA} を含む値となることに留意しなければならない。

$$\begin{aligned} S &= \frac{\partial(\Delta R_{MQ,obs})}{\partial(B_0^2)} \\ &= \frac{\partial(\Delta R_{MQ,DD} + \Delta R_{MQ,CSA} + \Delta R_{MQ,ex})}{\partial(B_0^2)} \\ &= \frac{4\gamma_H \gamma_C \Delta \omega_H \Delta \omega_C p_A p_B}{k_{ex}} + \frac{16}{45} \gamma_H \gamma_C \Delta \sigma_H \Delta \sigma_C S_{axis}^2 \tau_C \frac{3 \cos^2 \theta - 1}{2} \\ &= \frac{4\gamma_H \gamma_C \Delta \omega_H \Delta \omega_C p_A p_B}{k_{ex}} + \Delta_{CSA} \end{aligned}$$

Δ_{CSA} の大きさは多くの場合は化学交換の寄与よりも小さく、また対象とするタンパク質の分子量から取りうる値の範囲を推定することができることから、傾き S から化学交換の寄与を評価することが十分に可能であると考えた。例えば、 $\Delta \omega_H$ が 0.4 ppm, $\Delta \omega_C$ が 1.0 ppm, 交換速度 $k_{ex} = 12,000$ (s^{-1}), 各状態の割合 $p_A=0.95$, $p_B=0.05$ とした場合には第 1 項の大きさは約 0.11 となる。一方、回転相関時間が 100 ns, 化学シフトテンソルの大きさが $\Delta \sigma_H=1.1$ ppm, $\Delta \sigma_C = 25$ ppm[50] とした場合には第 2 項 Δ_{CSA} の大きさは 0.017 以下になると予想できる。この場合には、化学交換の寄与が Δ_{CSA} の 6 倍以上となるため、化学交換の寄与を検出、評価することが可能である。

磁場依存性から ΔR_{MQ} の化学交換の寄与を評価する手法は、化学交換の寄与の評価は半定量的になるものの、HDR 法の適用が困難な交換速度が 10^4 (s^{-1}) を超える場合であっても適用可能である。したがって、第 1 の解析法である HDR 法と、第 2 の解析法である磁場依存

性解析法を組み合わせることで、幅広いタイムスケールの化学交換を解析することが可能になると考えた。

2-1-5. 小括

以上の理論的背景より、 ΔR_{MQ} を観測パラメーターとすることで化学交換を検出可能であること、 ΔR_{MQ} の実測値には化学交換の寄与 $\Delta R_{MQ,ex}$ に加えて化学交換非依存項の寄与が存在し、高分子量タンパク質では分離して評価する必要があること、そして $\Delta R_{MQ,ex}$ は HDR 法、もしくは磁場依存性解析法により分離して評価できることが明らかとなった。

以降では、これらを踏まえて実際に化学交換の解析するための手順を示した。

(1) 高分子量タンパク質の側鎖メチル基 ^1H - ^{13}C スピン系の $\Delta R_{MQ,obs}$ を methyl-TROSY 法により算出する。

(2) 交換速度に応じて、以下の 2 つの方法で化学交換の寄与 $\Delta R_{MQ,ex}$ を分離する。

(2-1) 交換速度が $10^2\sim 10^4$ (s^{-1}) 程度の場合には、HDR パルスを照射しながら算出した $\Delta R_{MQ,obs(HDR)}$ と、照射せずに算出した $\Delta R_{MQ,obs}$ との差から $\Delta R_{MQ,ex}$ を算出する。

(2-2) 交換速度が $10^4\sim 10^5$ (s^{-1}) 程度の場合には、複数の磁場で算出した $\Delta R_{MQ,obs}$ を、磁場強度の 2 乗に対してプロットし、その傾きの大きさ S から化学交換の寄与を算出する。

(3) 算出した $\Delta R_{MQ,ex}$ 、もしくは S の部位毎の比較や、値の大きさから顕著な化学交換が存在する部位の同定や、 k_{ex} や p_A, p_B などの速度論的なパラメーターを推定する。

以上の、本研究にて提唱する一連の化学交換の解析法をメチル- ΔR_{MQ} 法と呼ぶこととする。メチル- ΔR_{MQ} 法は $\Delta R_{MQ,ex}$ をパラメーターとして化学交換を評価するため、既存の手法よりも化学交換が存在する部位の同定や、その定量的な評価が容易である。また、HDR 法と磁

場強度依存性を組み合わせることで交換速度が $10^2 \sim 10^5$ (s^{-1}) の幅広いタイムスケールの化学交換を解析することが可能であるという利点がある (Table.1)。

Table. 1 メチル- ΔR_{MQ} 解析法による化学交換の寄与の評価法の特徴

	HDR 法	磁場依存性解析法
適用できる交換速度のタイムスケール	$10^2 \sim 10^4$ (s^{-1})	$10^4 \sim 10^5$ (s^{-1})
算出されるパラメーター	化学交換の寄与のみを反映する。	化学交換と CSA の寄与を両方反映する。

以降では、考案したメチル- ΔR_{MQ} 解析法により化学交換の寄与を正しく算出することができるかを、モデルタンパク質を用いて検証した結果を示す。2-2-1 節では顕著な化学交換が存在しないマルトース結合タンパク質を用いて、アーティファクトとして化学交換の寄与が算出されないかを検討した。2-2-2 節では化学交換の存在が既知である FF ドメインを用いて、既存の手法から算出されたパラメーターと一致した値が得られるかどうかを検討した。

2-2. 結果

2-2-1. マルトース結合タンパク質を用いた化学交換非依存項の評価

メチル- ΔR_{MQ} 解析法により、化学交換非依存項の寄与を正しく評価できるかどうか、顕著な化学交換がない系において化学交換の寄与が $\Delta R_{MQ,ex}$ が算出されないかどうか、を、モデルタンパク質として MBP を用いて検討を行った (Fig. 21A)。MBP は全 370 残基、分子量 42 K の可溶性タンパク質であり、分子量が大きく高分子量タンパク質のモデルとなること、

高い安定性を有すること、メチル基の帰属がすでに行われていること、またリガンド結合部位近傍以外には顕著な化学交換がないことが示されていることから[51]、本目的を達成するうえで適したタンパク質であると考えた。

MBP はメチル基の帰属がなされている β -シクロデキストリンとの複合体の状態で解析した。均一 ^2H , Ile δ 1 側鎖メチル基 $^{13}\text{C}^1\text{H}_3$ 標識 MBP は大腸菌発現系にて発現、精製、リガンド交換を行い単一バンドとなるまで精製した (Fig. 21B)。本検討は MBP 配列中に 23 残基存在する Ile の側鎖 δ 1 メチル基を解析対象とし、分子の回転相関時間が 65 ns となる 4°C の条件で解析を行った。各メチル基の帰属は先行研究の 37°C における帰属をもとに、温度変化実験を行って帰属を移行した (Fig. 21C)。

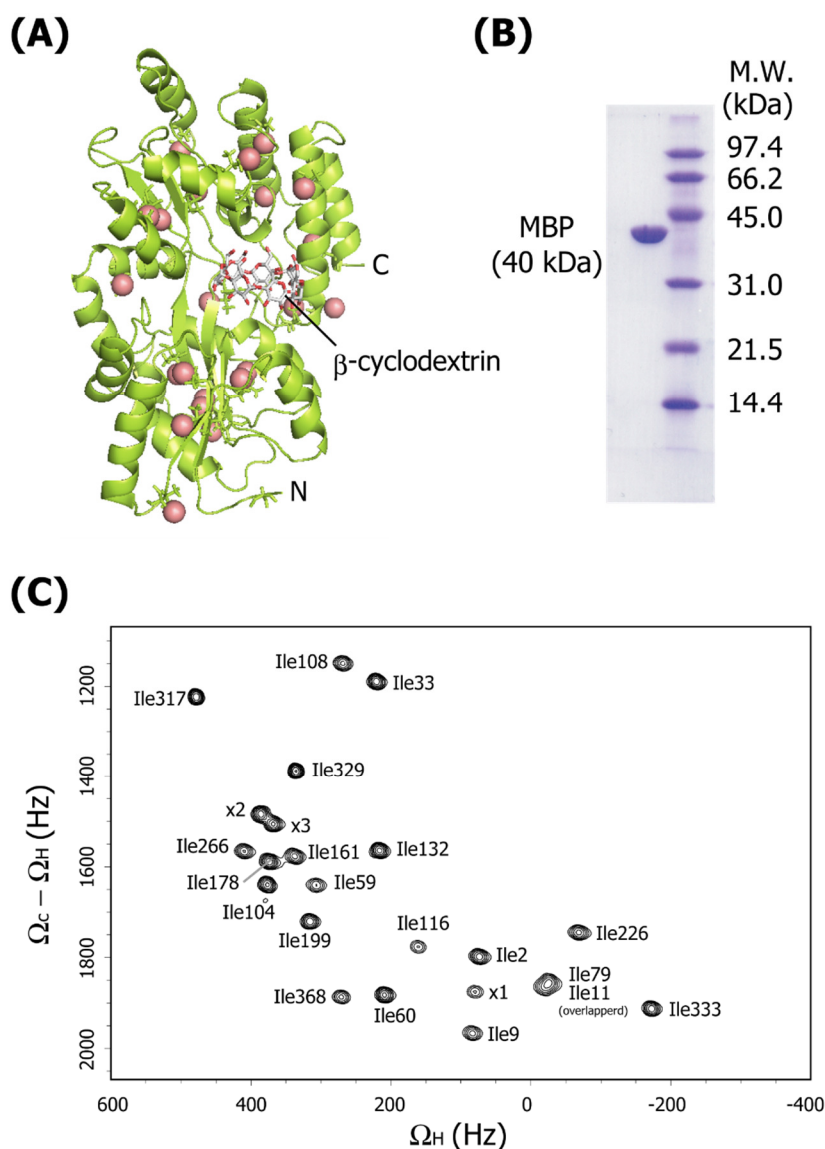


Fig. 21 MBP の結晶構造と SDS-PAGE 解析と NMR スペクトルの帰属
 (A) MBP- β -シクロデキストリン複合体の結晶構造 [52] (PDB ID:1DMB)。 β -シクロデキストリンをスティックモデルで、本検討で用いた Ile 側鎖メチル基の炭素を薄赤色の球にて示した。
 (B) MBP の最終精製後の SDS-PAGE 解析の結果。単一バンドとなるまで精製した。
 (C) $\{\text{u-}^2\text{H, Ile}\delta 1\text{-}[^{13}\text{CH}_3]\}$ MBP の ^1H - ^{13}C HZQC スペクトル。未帰属のメチル基は X+番号でしめしている。測定温度 277 K, 測定磁場は 11.7 Tesla (^1H 共鳴周波数 500 MHz)。

メチル- ΔR_{MQ} 解析法に先立ち、Ile側鎖 $\delta 1$ メチル基に交換速度が $10^2 \sim 10^4 \text{ s}^{-1}$ のオーダーの化学交換が存在しないことを、既存の手法を用いて解析することとした。 ^{13}C の化学シフト差を生ずる ^{13}C single quantum (SQ) CPMG緩和分散実験[35]を行い、 ^{13}C へのCPMGパルス依存的に緩和がどれだけ抑制されたかから化学交換の検出を試みた (Fig. 22)。実験の結果、解析した全てのIle $\delta 1$ メチル基でCPMGパルスに伴う緩和速度の変化は 1 s^{-1} 未満であったことより、Ile側鎖 $\delta 1$ メチル基には本実験で解析可能な交換速度が $10^2 \sim 10^4 \text{ s}^{-1}$ のオーダーの顕著な化学交換が存在しないことが確かめられた。

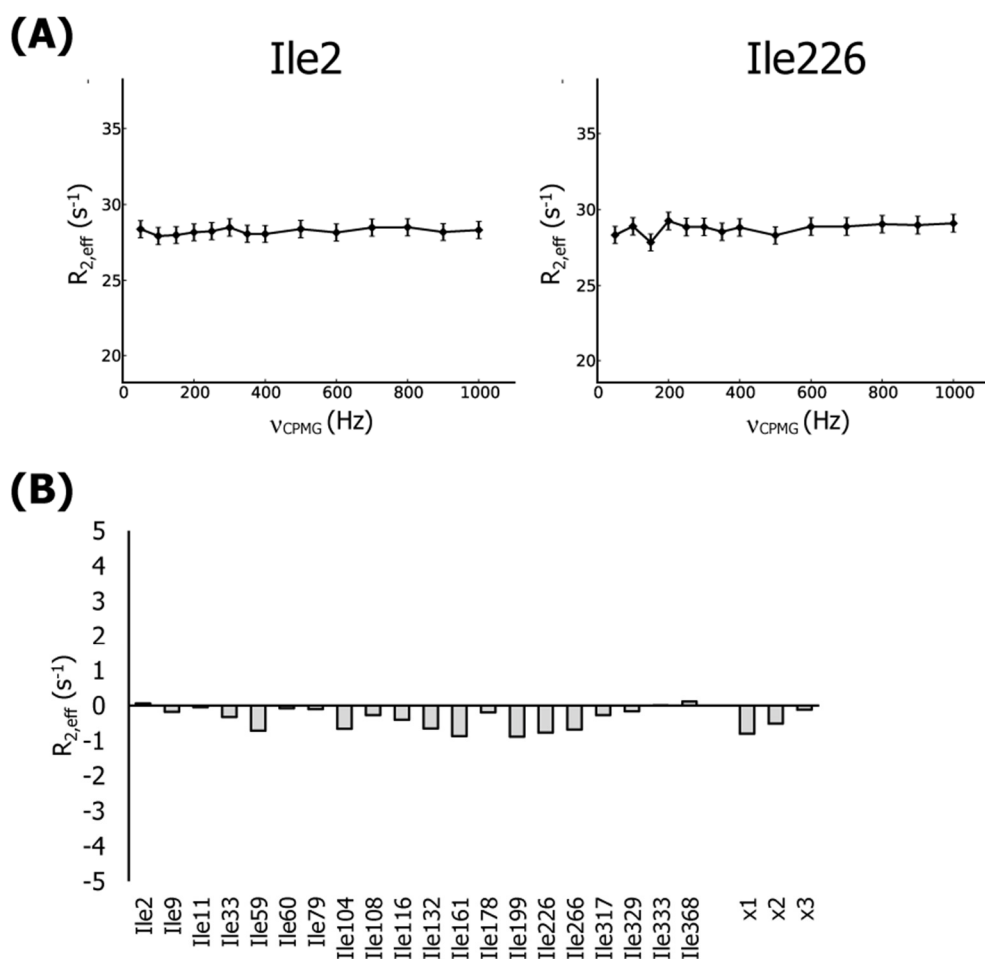


Fig. 22 $\{u\text{-}^2\text{H, Ile}\delta 1\text{-}[^{13}\text{CH}_3]\}$ MBP の ^{13}C SQ CPMG 緩和分散実験

(A) Ile2 と Ile226 について CPMG 周波数に対して、緩和速度の大きさをプロットした図。化学交換が存在する場合には、CPMG 周波数が増大するほど化学交換の寄与が抑制され、緩和速度は減少する。これらのメチル基では緩和速度の変化が見られず、顕著な化学交換が存在していないことが示された。

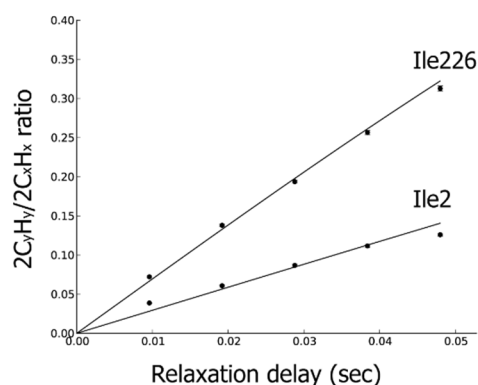
(B) CPMG 周波数が 50 Hz と 1,000 Hz のときの緩和速度の差のプロット。すべてのメチル基で CPMG 周波数依存的な緩和速度の変化はほとんど観測されず、Ile メチル基には化学交換が存在しないことが分かった。

そこで、MBP の Ile 側鎖 $\delta 1$ メチル基を解析対象としてメチル- ΔR_{MQ} 解析を適用し、交換速度が $10^2\sim 10^4$ s⁻¹ のオーダーの顕著な化学交換が存在しないという結果が得られるかを検討した。交換速度が $10^2\sim 10^4$ s⁻¹ のオーダーの対象とするため、本検討では HDR 法による解析を適用した。

緩和の展開時間 T が 9.6 ms から 48 ms まで 9.6 ms 毎に測定した各点において、ZQ 遷移と DQ 遷移の和に相当する $2C_xH_x$ コヒーレンスを観測する実験と、ZQ 遷移と DQ 遷移の差に相当する $2C_yH_y$ コヒーレンスを観測する実験を行い、両スペクトルのシグナル強度比から下記式に従い各メチル基の ΔR_{MQ} を算出した (Fig. 23)。測定は HDR パルス非照射の条件と、10 kHz の HDR パルスを照射する条件にて行った。

$$\Delta R_{MQ} = \frac{1}{T} \operatorname{arctanh} \left(\frac{2C_yH_y}{2C_xH_x} \right)$$

(A) 0 kHz spin echo experiment



(B) 10 kHz HDR experiment

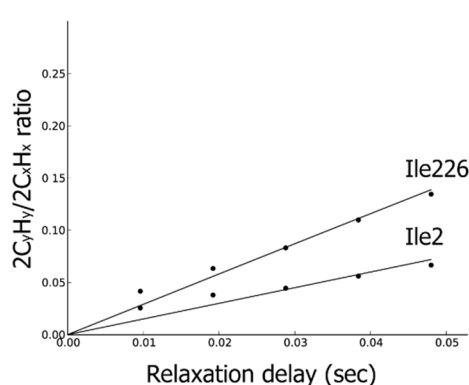


Fig. 23 $\{u\text{-}^2\text{H, Ile}\delta 1\text{-}[^{13}\text{CH}_3]\}$ MBP のメチル- ΔR_{MQ} 解析

(A) HDR を照射しないときの ΔR_{MQ} 解析のプロット。Ile2 と Ile226 のフィッティング結果を示した。

(B) 10 kHz の HDR を照射したときの ΔR_{MQ} 解析のプロット。Ile2 と Ile226 のフィッティング結果を示した。

緩和の展開時間は 38.4 ms、HDR を照射する場合には 10 kHz の強度で照射した。

各メチル基の HDR パルス非照射時と HDR パルス照射時に算出された ΔR_{MQ} 、ならびにその差から算出した化学交換の寄与 $\Delta R_{MQ,ex}$ をメチル基ごとにプロットした (Fig. 24)。すべてのメチル基において HDR パルス照射時と HDR パルス非照射時でほぼ同等の ΔR_{MQ} が算出され、化学交換の寄与 $\Delta R_{MQ,ex}$ は 3 s^{-1} 未満と算出された。このことは、MBP の Ile 側鎖 $\delta 1$ メ

チル基には $10^2 \sim 10^4 \text{ s}^{-1}$ のオーダーの顕著な化学交換が存在しないことを示しており、MBP には顕著な化学交換が存在しないという先行報告[51]、ならびに既存の手法を用いて化学交換が検出されなかったことと一致する結果であった。

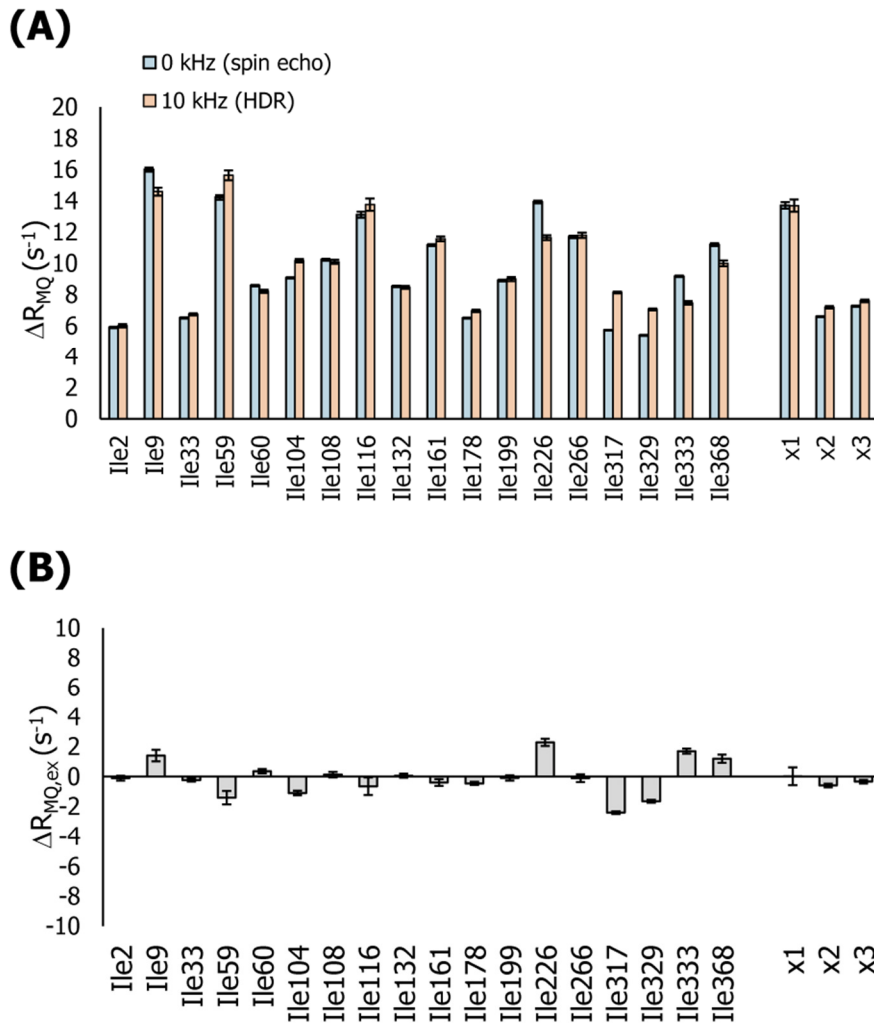


Fig. 24 {u-²H, Ile δ 1-[¹³CH₃]} MBP のメチル- ΔR_{MQ} 解析結果のプロット

(A) 各メチル基の ΔR_{MQ} のプロット。HDR パルス非照射時の結果を青色で、HDR パルス照射時の結果をオレンジで並べて示した。

(B) 各メチル基の化学交換の寄与 $\Delta R_{MQ,ex}$ のプロット。HDR パルス非照射時と、HDR パルス照射時の ΔR_{MQ} の差から算出した。

以上の MBP を対象としたメチル- ΔR_{MQ} 解析から、顕著な化学交換がない系においては $\Delta R_{MQ,ex}$ が増大することが無く、false positive を検出することが無いことを確認した。

2-2-2. FF ドメインを用いた化学交換の寄与の評価

顕著な化学交換が存在することがすでに分かっているタンパク質にメチル- ΔR_{MQ} 解析を適用し、化学交換の寄与を正しく評価できるかどうかを検討した。検討には、分子量が小さく既存の手法によって解析することが可能であり、すでに化学交換の解析が報告されているヒト由来 HYPA/FBP11 FF ドメイン (FF ドメイン) を用いた。FF ドメインは全 60 残基からなる分子量 8.2 K の可溶性タンパク質であり、Ile を 2 残基、Leu を 4 残基、Val を 2 残基有している[53]。これまでに、基底状態 (N 状態) とフォールディング中間状態 (I 状態) の間を 30°Cにおいて $1,800 \text{ s}^{-1}$ の速度で化学交換していることが明らかとされている (Fig. 25A)。N 状態における各メチル基の帰属、ならびに I 状態との間の化学シフト差が報告されていることから[54]、本目的を達成するうえで適したタンパク質であると考えた。

均一 ^2H , Ile $\delta 1$ 側鎖メチル基 $^{13}\text{C}^1\text{H}_3$, Leu/Val 側鎖メチル基 [$^{13}\text{C}\text{H}_3$, $^{12}\text{CD}_3$] 標識 FF ドメインは大腸菌発現系にて発現、精製を行い単一バンドとなるまで精製した (Fig. 25B)。本検討は FF ドメインの Ile 側鎖 $\delta 1$ メチル基、Leu 側鎖 $\delta 1, \delta 2$ メチル基、Val 側鎖 $\gamma 1, \gamma 2$ メチル基を解析対象とした。各メチル基の帰属は先行研究の帰属を移行した[55] (Fig. 25C)。

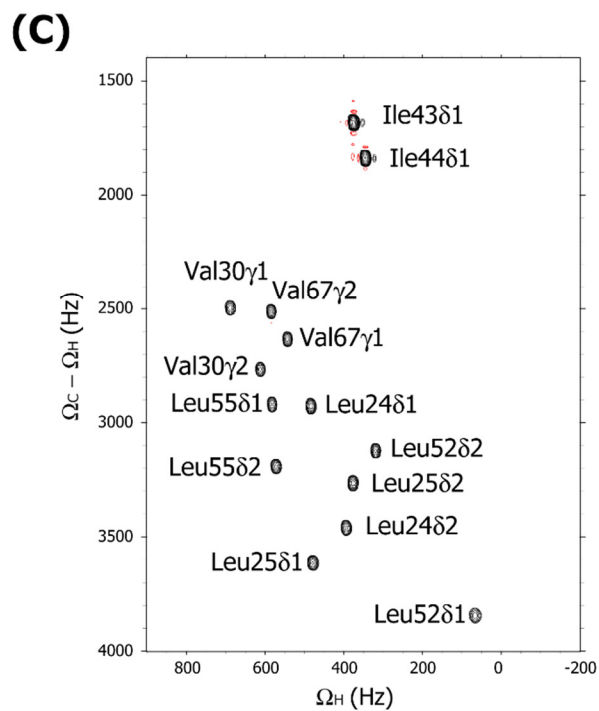
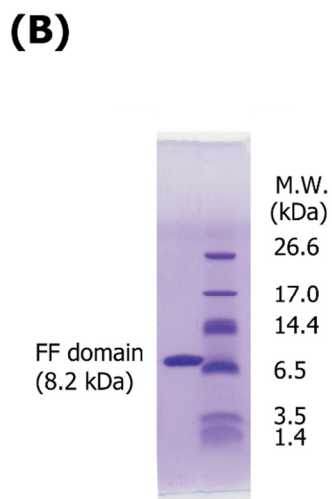
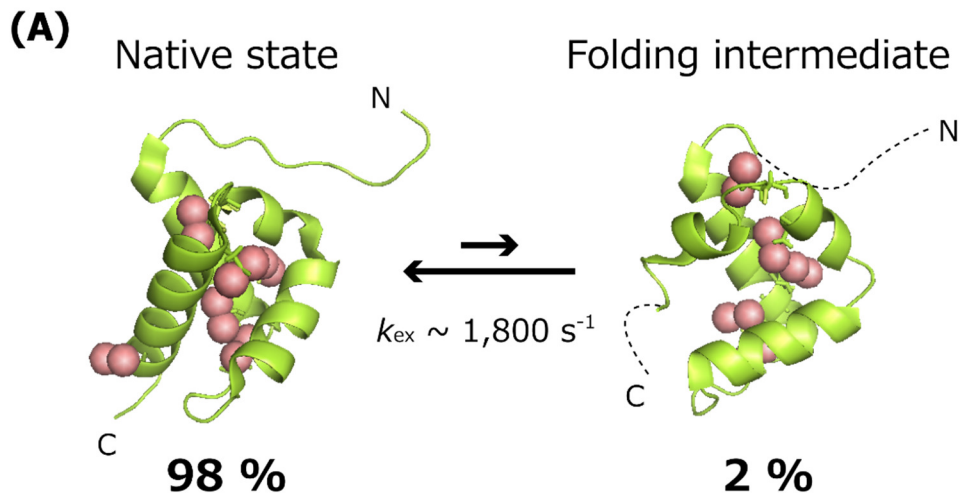


Fig. 25 FFドメインの構造と SDS-PAGE 解析と NMR スペクトルの帰属

(A) FFドメインの基底状態[53] (PDB ID:1UZC) とフォールディング中間状態[54] (PDB ID:2KZG)の NMR 構造。構造アンサンブルのなかで 1つの構造のみを示している。構造非形成領域を点線で示した。

(B) FFドメインの最終精製後の Tricine SDS-PAGE 解析の結果。単一バンドとなるまで精製した。

(C) $\{u\text{-}^2\text{H}, \text{Ile}\delta 1\text{-}[^{13}\text{CH}_3], \text{Leu/Val}\text{-}[^{13}\text{CH}_3, ^{12}\text{CD}_3]\}$ FFドメインの HZQC スペクトル帰属は先行研究[55]を参考に移行した。測定温度 303 K, 測定磁場は 14.1 Tesla (^1H 共鳴周波数 600 MHz)。

メチル- ΔR_{MQ} 解析法に先立ち、FF ドメインの Ile, Leu, Val 側鎖メチル基を対象とした SQ CPMG 緩和分散解析[34, 35]を行い、調製した FF ドメインに化学交換が存在すること、ならびに各化学交換のパラメーターを算出することとした。緩和分散解析は ^1H , ^{13}C の両核種に対して適用し、交換速度 k_{ex} とマイナー状態の割合 p_B を分子全体で同一の値とし、 ^1H , ^{13}C の化学シフト差をメチル基ごとに異なる値としてグローバルフィッティングを行うことで算出した。その結果、 $k_{\text{ex}} = 2030 \pm 100$, $p_B = 0.0147 \pm 0.00124$ であると算出され、これは先行研究[54, 55]の値 $k_{\text{ex}} = 1880 \pm 40 \text{ s}^{-1}$, $p_B = 0.0015 \pm 0.0004$ と一致したことから正しいパラメーターを算出できていると判断した (Fig. 26)。

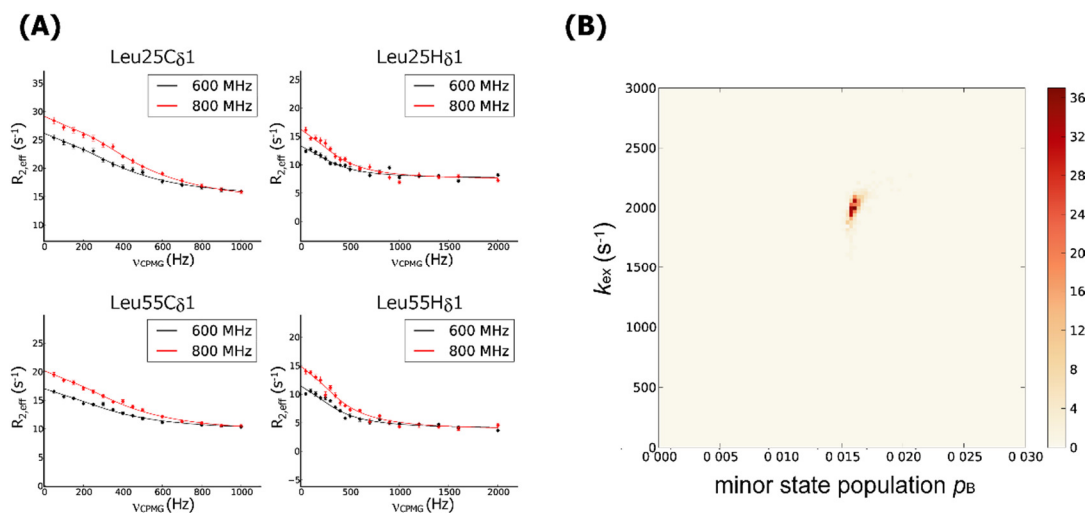


Fig. 26 $\{u\text{-}^2\text{H}$, Ile $\delta 1$ - $[^{13}\text{CH}_3]$, Leu/Val- $[^{13}\text{CH}_3$, $^{12}\text{CD}_3]$ FF ドメインの CPMG 緩和分散解析結果

(A) Leu25 $\delta 1$, Leu55 $\delta 2$ の ^{13}C , ^1H の緩和分散曲線とフィッティング結果を示している。14.1 Tesla (^1H 共鳴周波数 600 MHz) の結果を黒線で、18.8 Tesla (^1H 共鳴周波数 800 MHz) の結果を赤線で示している。

(B) k_{ex} と p_B のブートストラップ解析の結果。500 のブートストラップ標本に対してそれぞれフィッティングしたときの k_{ex} , p_B を 2 次元ヒストグラムによって示した。 $k_{\text{ex}} = 2030 \pm 100$, $p_B = 0.0147 \pm 0.00124$ であると算出した。

次に FF ドメインに対してメチル- ΔR_{MQ} 解析を適用し、顕著な化学交換の寄与 $\Delta R_{MQ,ex}$ が観測されるかどうか、そして算出された $\Delta R_{MQ,ex}$ の大きさが CPMG 緩和分散実験から算出した値と一致するかを検討した。交換速度が $10^2\sim 10^4\text{ s}^{-1}$ のオーダーの対象とするため、本検討では HDR 法による解析を適用した。

緩和の展開時間 T を 38.4 ms として、ZQ 遷移と DQ 遷移の和に相当する $2C_xH_x$ コヒーレンスを観測する実験と、ZQ 遷移と DQ 遷移の差に相当する $2C_yH_y$ コヒーレンスを観測する実験を行い、両スペクトルのシグナル強度比から下記式に従い各メチル基の ΔR_{MQ} を算出した。測定は HDR パルス非照射の条件と、 10 kHz の HDR パルスを照射する条件にて行った。

$$\Delta R_{MQ} = \frac{1}{T} \operatorname{arctanh} \left(\frac{2C_yH_y}{2C_xH_x} \right)$$

各メチル基の HDR パルス非照射時と HDR パルス照射時に算出された ΔR_{MQ} 、ならびにその差から算出した化学交換の寄与 $\Delta R_{MQ,ex}$ をメチル基ごとにプロットした (Fig. 27)。その結果、Leu25 δ 1, Leu55 δ 2 といったメチル基に 10 s^{-1} 以上の顕著な $\Delta R_{MQ,ex}$ が観測されていたことから、本手法により $\Delta R_{MQ,ex}$ の値の増減として化学交換の寄与を検出できていることが分かった。

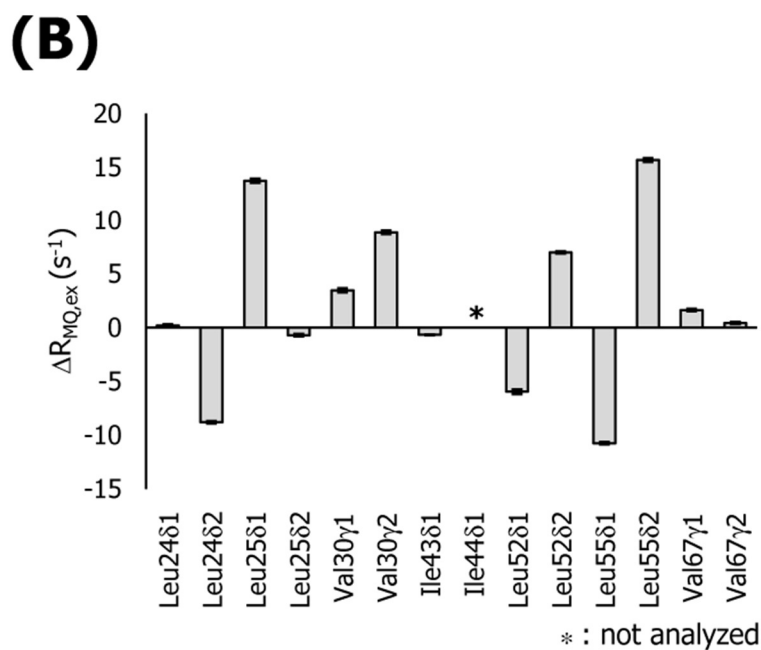
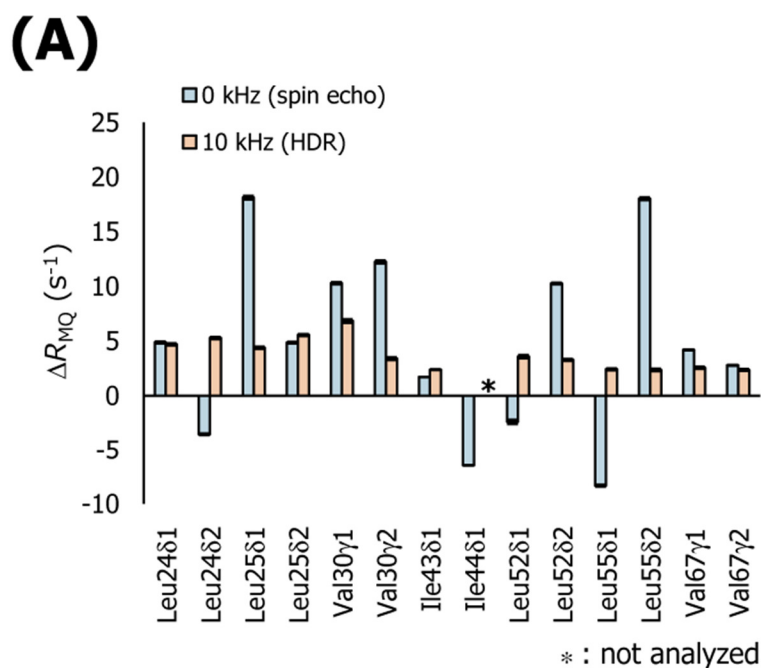


Fig. 27 { u - 2H , Ile δ 1-[$^{13}CH_3$], Leu/Val-[$^{13}CH_3$, $^{12}CD_3$]} FF ドメインのメチル- ΔR_{MQ} 解析結果のプロット

(A) 各メチル基の ΔR_{MQ} のプロット。HDR パルス非照射時の結果を青色で、HDR パルス照射時の結果をオレンジで並べて示した。Ile44 は HDR パルス照射時において、 $2C_{\gamma}H_{\gamma}$ 成分の強度を正しく見積もることができなかったため、プロットからは除外した。

(B) 各メチル基の化学交換の寄与 $\Delta R_{MQ,ex}$ のプロット。HDR パルス非照射時と、HDR パルス照射時の ΔR_{MQ} の差から算出した。

ここで、算出された化学交換の寄与 $\Delta R_{MQ,ex}$ を正確に算出できているか否かを、CPMG 緩和分散実験から算出した交換速度とマイナー状態の割合、各メチル基の 1H , ^{13}C 化学シフト差を用いて逆計算した $\Delta R_{MQ,ex}$ の値と一致しているかから調べた。 $\Delta R_{MQ,ex}$ を比較した結果、両実験で算出された値は相関係数 0.97 と高い相関を示し、値の大きさも一致していることが分かった (Fig. 28)。また、CPMG 緩和分散実験で 1H , ^{13}C のいずれかで化学シフト差が検出されなかったメチル基 (Leu25 δ 2, Val30 γ 1, Ile43 δ 1, Val67 γ 1, Val67 γ 2) は $\Delta R_{MQ,ex}$ を逆計算することができなかったものの、 $\Delta R_{MQ,ex}$ が十分に小さくなることが予想される。これらのメチル基はメチル- ΔR_{MQ} 解析において $\Delta R_{MQ,ex}$ が 4 s^{-1} と他より小さな値で算出されており、整合する結果が得られていた。以上より、メチル- ΔR_{MQ} 解析によって $\Delta R_{MQ,ex}$ を正確に算出できていると判断した。

前節の結果と合わせ、化学交換がない系で $\Delta R_{MQ,ex}$ が検出されないこと、化学交換が存在する系で正しい $\Delta R_{MQ,ex}$ を算出できたことから、メチル- ΔR_{MQ} 解析を確立することに成功したと判断した。

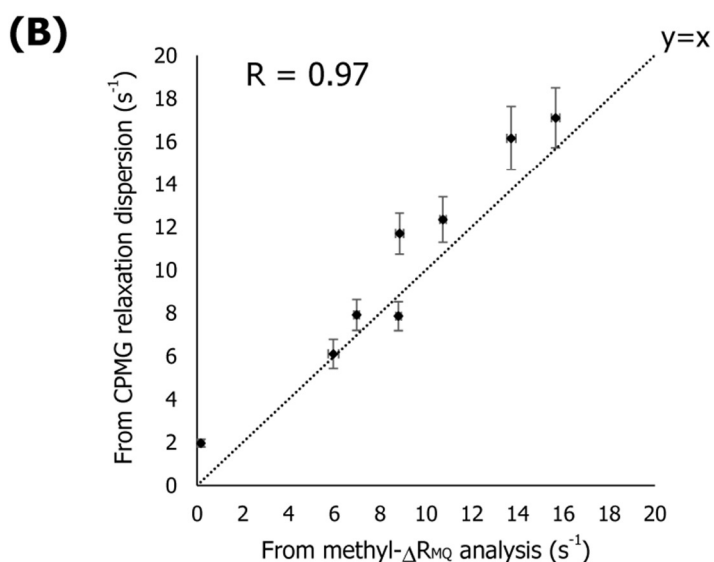
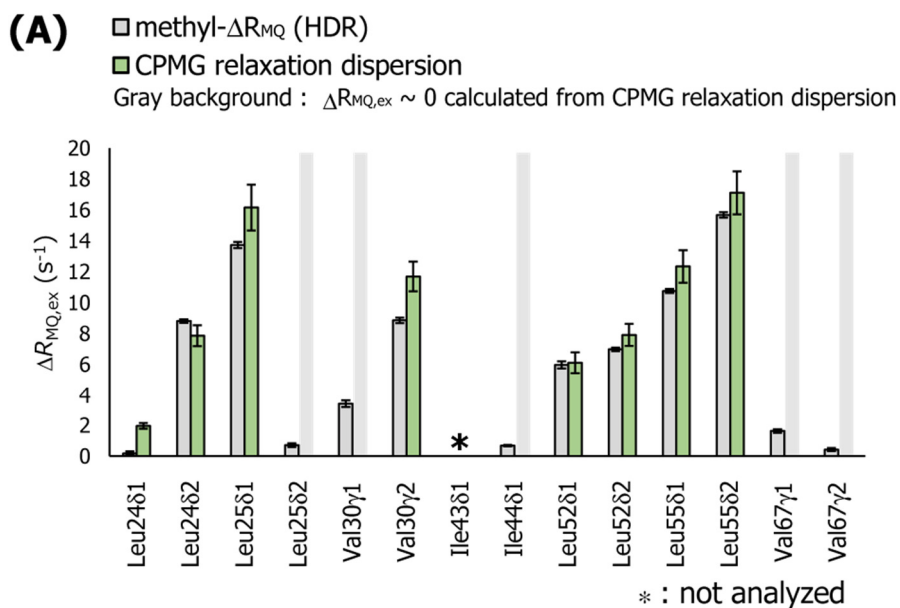


Fig. 28 CPMG 緩和分散実験とメチル- ΔR_{MQ} 解析の比較

(A) 各メチル基について、メチル- ΔR_{MQ} 解析から算出した $\Delta R_{MQ,ex}$ と CPMG 緩和分散実験から逆計算した $\Delta R_{MQ,ex}$ との比較のプロット。灰色の背景とした部分は、CPMG 緩和分散法で 1H , ^{13}C のいずれかの化学シフト差が小さく、 $\Delta R_{MQ,ex}$ を逆計算できなかったことを示す。

(B) メチル- ΔR_{MQ} 解析から算出した $\Delta R_{MQ,ex}$ と CPMG 緩和分散実験から逆計算した $\Delta R_{MQ,ex}$ との相関プロット。両実験で値を算出できたメチル基のみをプロットしている。相関係数は 0.97 と高い相関を示し、値が一致していることが分かった。

2-3. 考察

2-3-1. メチル- ΔR_{MQ} 解析から明らかとできること

HDR 法により算出される $\Delta R_{MQ,ex}$ の値、ならびに磁場依存性から算出される S における化学交換の寄与は、交換速度が化学シフト差よりも大きい場合にはそれぞれ下記式にて表すことができる。

$$\Delta R_{MQ,ex} = \frac{4\Delta\omega_H\Delta\omega_C p_A p_B}{k_{ex}}$$
$$S = \frac{4\gamma_H\gamma_C\Delta\omega_H\Delta\omega_C p_A p_B}{k_{ex}} + \Delta_{CSA}$$

したがって、化学交換にある 2 状態間の化学シフト差が既知であるか、予測できる場合には、 $\Delta R_{MQ,ex}$ や S の大きさと交換速度 k_{ex} や存在割合 p_A, p_B といった化学交換のパラメーターを評価することが可能である。

また、 $\Delta R_{MQ,ex}$ や S の大きさは ^1H , ^{13}C 化学シフト差の積に対して比例するという特徴がある。分子全体が同じ化学交換にある場合には、 $\Delta R_{MQ,ex}$ や S の値の部位ごとの大小は化学シフト差の大小を反映するため、状態間の遷移に伴い顕著に化学環境が変化する部位を同定することが可能である。

以上より、メチル- ΔR_{MQ} 解析からはタンパク質がどのような状態と、どれくらいの速度で構造変化しているかについて評価することが可能であり、そこから得られた情報はタンパク質のフォールディング反応や、チャネルのゲーティング、酵素反応やシグナル伝達反応など、タンパク質の動的な機能を説明しうるものであると考える。

2-3-2. メチル- ΔR_{MQ} 解析法の適用範囲

本手法は側鎖メチル基の ΔR_{MQ} を methyl-TROSY 効果を利用して、高感度に検出するため、大腸菌発現系、もしくは酵母発現系[56]にてメチル基のみを選択的に ^1H , ^{13}C 標識し、他を重水素標識したタンパク質を主に対象とする。ただし、重水素標識は感度向上のために行うものの原理的に必須ではないため、 ^1H , ^{13}C 標識が選択的に導入されている、すなわち他の ^1H , ^{13}C との J カップリングがない場合には、重水素標識されていないタンパク質や、部分重水素化タンパク質であっても解析可能である。

適用できるタンパク質の分子量の範囲について、側鎖メチル基の NMR シグナルが観測可能であり、側鎖メチル基の ΔR_{MQ} を算出するための緩和待ち時間 (数十ミリ秒) の間に磁化が緩和しきらない分子量のタンパク質であれば適用可能である。測定温度 4°C における分子量 42 K の MBP (回転相関時間は 65 ns 程度) で十分な精度で解析できており、これは通常の NMR 測定温度である 30°C においては分子量約 120 K 程度の大きさに相当することから、少なくとも分子量 100 K 程度を超えるタンパク質であっても十分に解析可能であるといえる。

2-3-3. メチル- ΔR_{MQ} 解析法の新規性

本研究で考案したメチル- ΔR_{MQ} 解析法は、これまでに主鎖アミド基などで交換速度が化学シフト変化よりも速い交換の解析[41]や、 ^1H , ^{15}N の協同的な化学交換の解析[42]に主に用いられていた ΔR_{MQ} による化学交換の解析を、methyl-TROSY 効果による感度向上と組み合わせることで高分子量タンパク質の化学交換の解析に応用した点で新規性がある。

近年になってメチル基 ^1H - ^{13}C スピン系の ΔR_{MQ} を測定する方法[57]、ならびにその化学交換への応用例[58]も報告されたが、これらは methyl-TROSY を適用していない分子量が比較的小さいタンパク質の応用であり、高分子量タンパク質への応用は本研究が初めてである。

また、これらのメチル基 ^1H - ^{13}C スピン系の ΔR_{MQ} 解析の先行研究では化学交換非依存項の評価が行われていない。高分子量タンパク質においては化学交換非依存項の寄与が化学交換の寄与と同程度になることから (2-1-2 節)、高分子量タンパク質へ応用するうえで化学交換非依存項を評価するための理論、ならびにその定量的な評価法を確立することが必須であった。本研究は、これらの化学交換非依存項の評価法を確立したという点において、単純に高分子量タンパク質へ適用したということ以上の新規性を有すると考える。

2-3-4. 既存の化学交換の解析手法との比較

メチル- ΔR_{MQ} 解析法は同じくメチル基を観測対象としたマイクロ秒からミリ秒オーダーの化学交換の解析法である $R_{1\rho}$ 回転座標系緩和解析[32]や ^{13}C SQ CPMG 緩和分散解析[35, 36]と比較して、methyl-TROSY 法による高感度化、高分解能化がなされているため、より高分子量のタンパク質に適用できる点で高い汎用性を有すると考えた。また、同じ methyl-TROSY 法による化学交換の解析法である MQ CPMG 緩和分散法[59]と比較した場合、算出するパラメーターが化学シフト差の大小に対応していること、またその変化量が大きいことから、より高い定量性と精度を有すると考えた(2-1-1 節)。

以上より、メチル- ΔR_{MQ} 解析法は高分子量タンパク質のマイクロ秒からミリ秒オーダーの解析の適用範囲を拡大するものであり、既存の手法では解析が困難であった膜タンパク質やタンパク質複合体の機能的運動性の解析が可能になることが期待できる。

3. KcsA のサブミリ秒オーダーの開閉機構の解明

3-1. 序

KcsA は単一チャネル電流解析において、permeable 状態においても常に開口した状態ではなく実際に K^+ を透過する状態と透過しない状態の間をマイクロ秒からミリ秒のオーダー、すなわちサブミリ秒のオーダーで遷移している。このようなサブミリ秒オーダーの開閉が KcsA のどの部位の構造変化、化学交換に起因するのかわ不明であった (Fig. 29)。このようなサブミリ秒オーダーの開閉機構を明らかにするには、KcsA のどの部位に、 K^+ 透過のタイムスケールと一致するサブミリ秒オーダーの化学交換が存在するのかわ明らかとし、そして化学交換が K^+ 透過活性の違いを生じる機構を調べる必要がある。

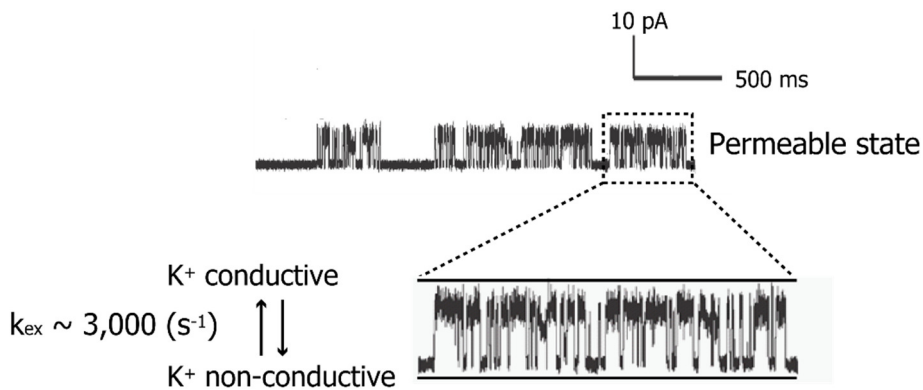


Fig. 29 (Fig. 8 の再掲) pH 3.0 における KcsA 単一チャネル電流における、permeable 状態の拡大図。Permeable 状態においても、 K^+ を実際に透過する状態と透過しない状態との間をマイクロ秒からミリ秒のオーダーで遷移している。[14] Fig.4 より、一部改編して示した。

KcsA は界面活性剤ミセル中の 4 量体として 120 K を超える分子量であるために、methyl-TROSY 法を適用することが必要であったものの、methyl-TROSY 法に基づいた既存の手法ではマイクロ秒からミリ秒オーダーの化学交換を解析することは困難であった。そこで、本

研究で確立したメチル- ΔR_{MQ} 解析法を KcsA に適用することで、KcsA のどの部位に化学交換の存在するのか、そしてサブミリ秒オーダーの開閉においてどの部位がゲートとして機能しているのかを明らかにすることとした。

3-2. 結果

3-2-1. 野生型 KcsA のサブミリ秒オーダーの化学交換が存在する部位の同定

DDM ミセルにて可溶化した野生型 KcsA の Leu, Val 側鎖メチル基を対象としてメチル- ΔR_{MQ} 解析法を適用し、KcsA の化学交換が存在する部位の同定を行った。KcsA は DDM ミセル中において permeable 状態と impermeable 状態の間を秒のオーダーで化学交換しているため、本検討はサブミリ秒オーダーの開閉が生じる permeable 状態の KcsA を解析対象とした。Permeable 状態と impermeable 状態の交換速度は数 s^{-1} 程度と化学シフト差よりも十分に遅いため、両状態で化学環境の変化が生じるメチル基では 2 状態は 2 つの異なるシグナルとして観測、解析することが可能である。Permeable 状態と impermeable 状態との間の化学交換は温度と K^+ 濃度によって遷移し、高温かつ高 K^+ 濃度において permeable 状態の割合が増大する[13]。本検討は通常室温で行われる電気生理解析から大きく温度領域が乖離せず、かつ permeable 状態の割合が少なくなり過ぎないようにするため、permeable 状態の割合が 60%程度となる K^+ 120 mM, 35°C の条件にて解析を行った。

均一 2H , Leu/Val 側鎖メチル基 [$^{13}CH_3$, $^{12}CD_3$] 標識 KcsA は、先行研究に従って大腸菌にて発現、精製を行った。SDS-PAGE 解析において単一バンドとなるまで精製し、先行研究[60]で報告されている通り、4 量体に相当する移動度にバンドが検出されたことから、4 量体を形成していることを確認した (Fig. 30A)。KcsA のアミノ酸配列中に存在する Leu, Val 合わせて 80 個のメチル基の内、35°C においても他のシグナルと縮重せず分離しており、かつ先

行研究から帰属を移行することのできた 22 個のメチル基を解析対象とした(Fig. 30B) 。帰属が得られたメチル基は SF ゲート近傍から HBC ゲート近傍まで分子全体に分布していることを確認した (Fig. 30C) 。

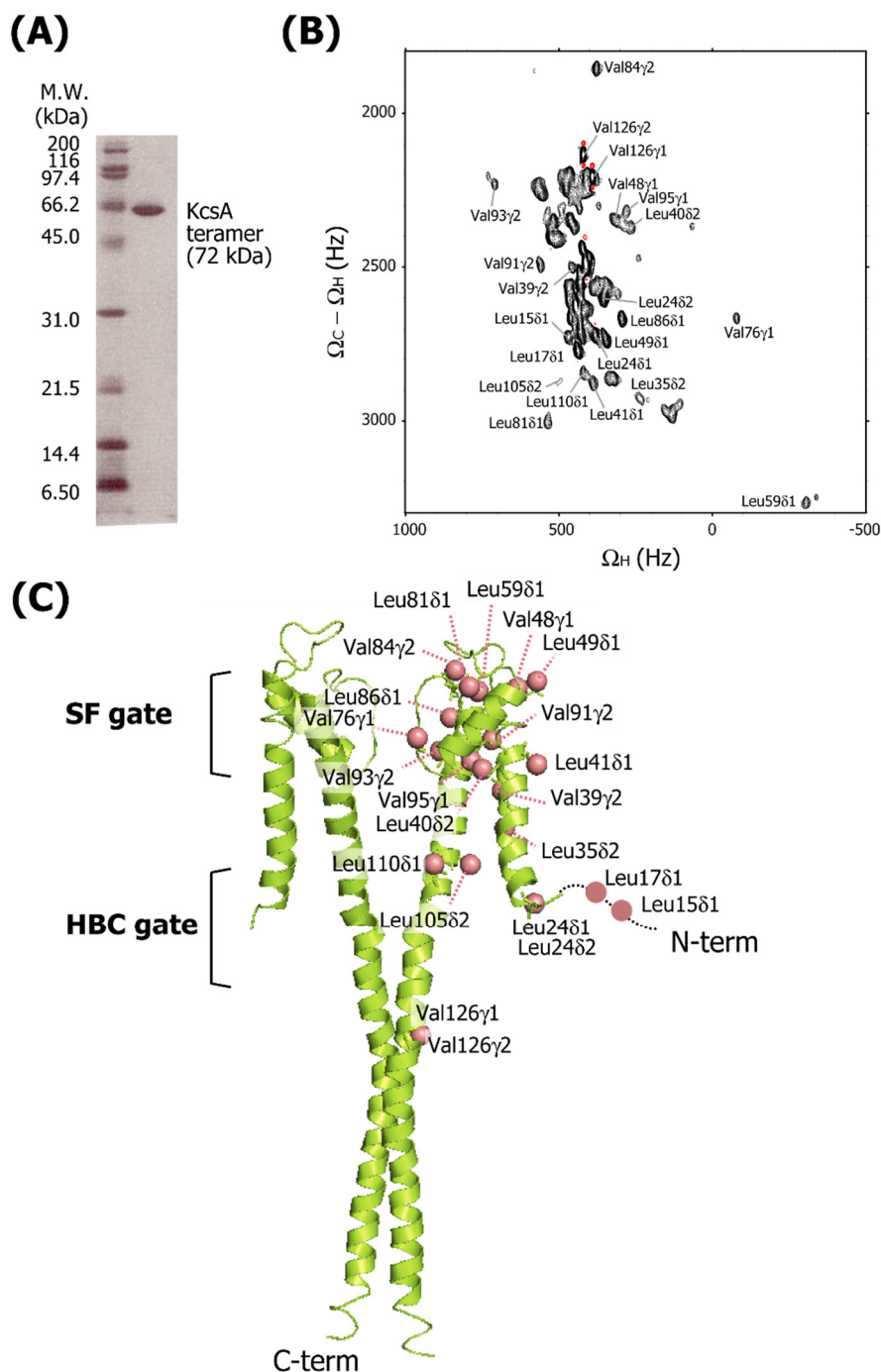


Fig. 30 KcsA の SDS-PAGE 解析と NMR スペクトルの帰属、構造上へのマッピング
 (A) KcsA の SDS-PAGE 解析の結果。単一バンドとなるまで精製し、4 量体の移動度でバンドが検出されたことから、4 量体形成を確認した。(B) $\{u\text{-}^2\text{H}, \text{Leu/Val-}^{13}\text{CH}_3, ^{12}\text{CD}_3\}$ KcsA の HZQC スペクトル。帰属は先行研究[13]を参考に移行した。測定温度 308 K, 測定磁場は 11.7 Tesla (^1H 共鳴周波数 500 MHz)。(C) 帰属が得られたメチル基の KcsA 立体構造上へのマッピング。KcsA 全長の結晶構造[11](PDB ID:3EFF)の向かい合う 2 つのサブユニットにマッピングした。

野生型の KcsA の Leu, Val 側鎖メチル基を対象として、メチル- ΔR_{MQ} 解析を適用して、化学交換が存在する部位を同定することとした。まずは交換速度が $10^2 \sim 10^4 \text{ s}^{-1}$ のオーダーの化学交換を対象とし、第 1 の方法である HDR 法による解析を適用した。

緩和の展開時間 T を 38.4 ms として、ZQ 遷移と DQ 遷移の和に相当する $2C_x H_x$ コヒーレンスを観測する実験と、ZQ 遷移と DQ 遷移の差に相当する $2C_y H_y$ コヒーレンスを観測する実験を行い、両スペクトルのシグナル強度比から下記式に従い各メチル基の ΔR_{MQ} を算出した。測定は HDR パルス非照射の条件と、10 kHz の HDR パルスを照射する条件にて行った。

$$\Delta R_{MQ} = \frac{1}{T} \operatorname{arctanh} \left(\frac{2C_y H_y}{2C_x H_x} \right)$$

各メチル基の HDR パルス非照射時と HDR パルス照射時に算出された ΔR_{MQ} 、ならびにその差から算出した化学交換の寄与 $\Delta R_{MQ,ex}$ をメチル基ごとにプロットした。その結果、一部のメチル基には数 s^{-1} 程度の $\Delta R_{MQ,ex}$ が観測されたものの、その大きさは測定誤差と同程度であり、化学交換に由来する顕著な $\Delta R_{MQ,ex}$ の増減を検出することができなかった (Fig. 31)。

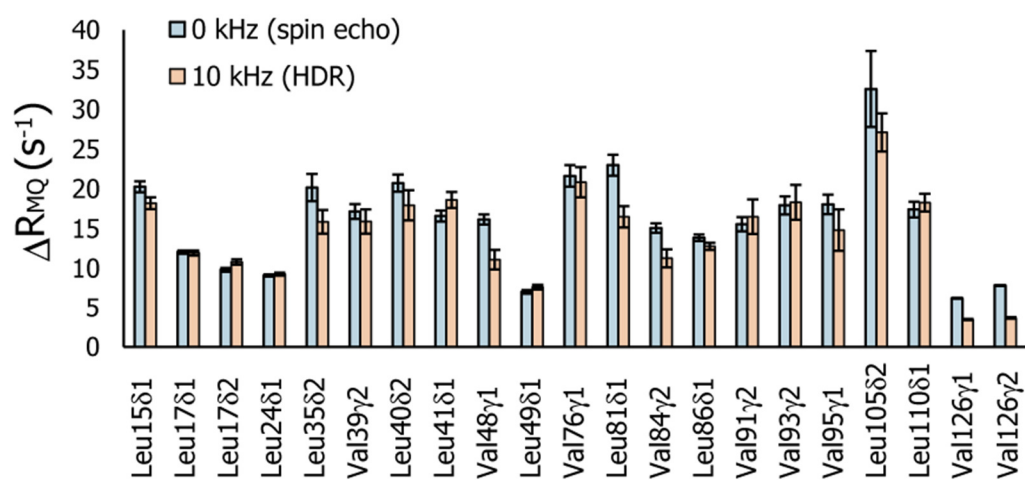
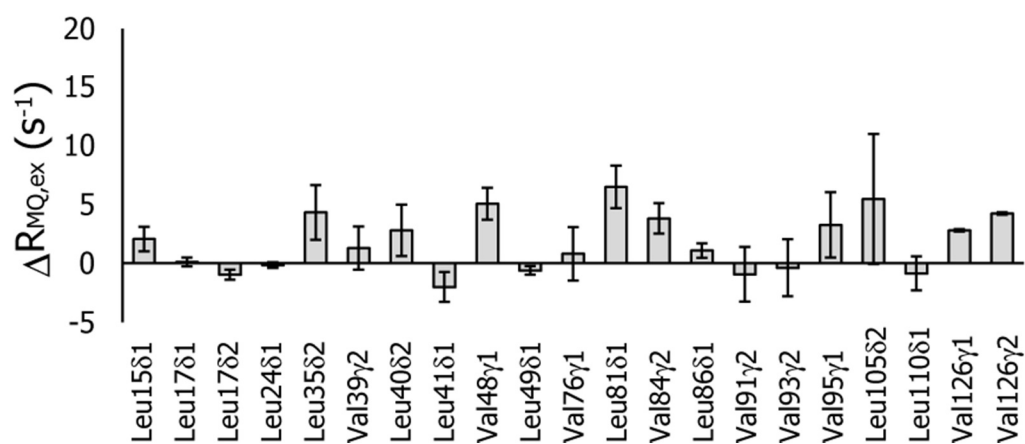
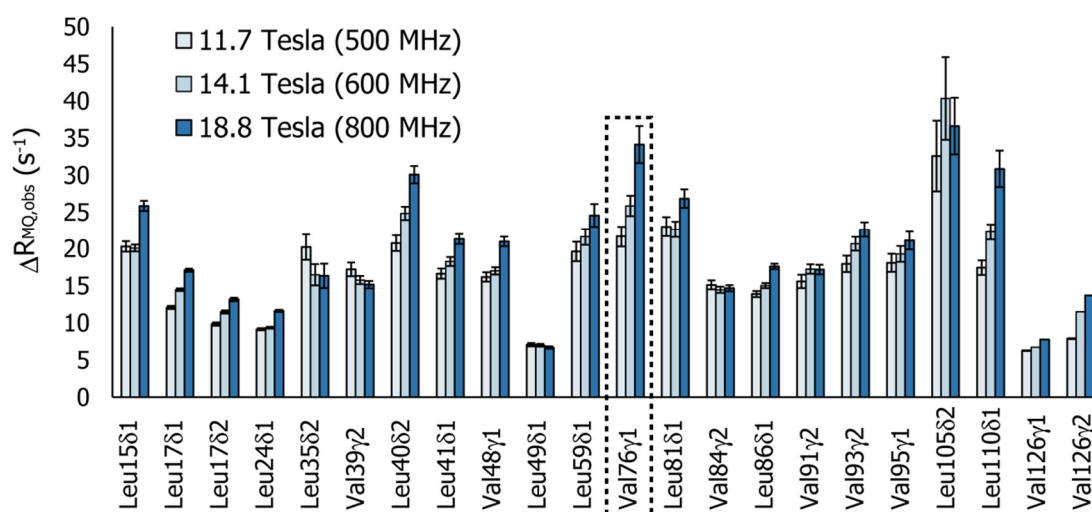
(A)**(B)**

Fig. 31 $\{u\text{-}^2\text{H, Leu/Val-}[^{13}\text{CH}_3, ^{12}\text{CD}_3]\}$ KcsA のメチル- ΔR_{MQ} 解析結果のプロット
 (A) 各メチル基の ΔR_{MQ} のプロット。HDR パルス非照射時の結果を青色で、HDR パルス照射時の結果をオレンジで並べて示した。
 (B) 各メチル基の化学交換の寄与 $\Delta R_{MQ,ex}$ のプロット。HDR パルス非照射時と、HDR パルス照射時の ΔR_{MQ} の差から算出した。

そこで、本 NMR 解析条件下では交換速度が速く、HDR 法では十分に化学交換の寄与を抑制できなかった可能性があると考え、交換速度が $10^4 \sim 10^5$ (s^{-1}) 程度の速い化学交換にも適用可能な第 2 の手法である $\Delta R_{MQ,obs}$ の磁場依存性解析を適用した。

11.7, 14.1, 18.8 Tesla (それぞれ 1H の共鳴周波数として 500, 600, 800 MHz) の 3 条件において各メチル基の $\Delta R_{MQ,obs}$ を測定し、その磁場依存的な変化量を解析した。その結果、多くのメチル基で磁場強度の増大に従い $\Delta R_{MQ,obs}$ の増大が観測された (Fig. 32A)。特に顕著な磁場依存的な変化を示した Val76y1 のシグナルについて磁場強度の 2 乗に対して $\Delta R_{MQ,obs}$ をプロットしたところ、傾きの大きさ $S = 0.057$ と算出された (Fig. 32B)。他のメチル基についても同様に磁場強度の 2 乗に対する傾きを算出した。

(A)



(B)

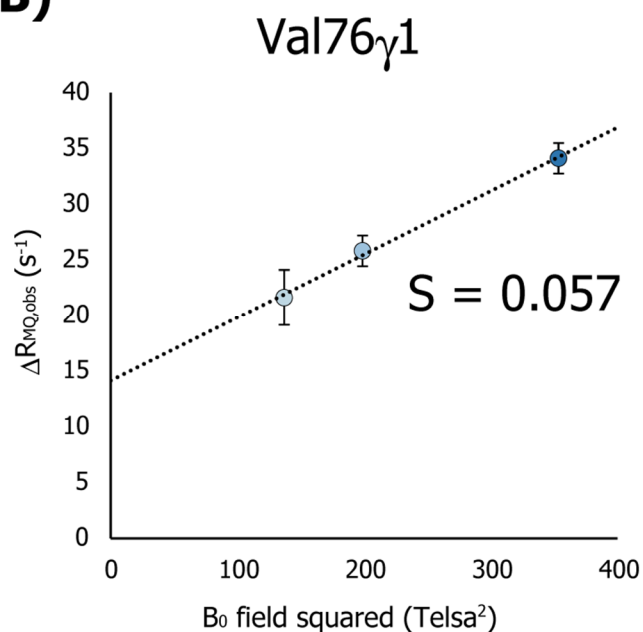


Fig. 32 {u-²H, Leu/Val-[¹³CH₃, ¹²CD₃]} KcsA のメチル-ΔR_{MQ} 磁場依存性析

(A) 各メチル基のΔR_{MQ}のプロット。11.7, 14.1, 18.8 Tesla の各磁場におけるΔR_{MQ,obs}

を各メチル基毎に並べて示した。(B) にてプロットした Val76γ1 を点線で囲っている。

(B) Val76γ1 のΔR_{MQ,obs} の磁場強度の 2 乗に対するプロット。傾き S は 0.057 と算出された。

各メチル基の磁場強度の 2 乗に対する $\Delta R_{MQ,obs}$ の傾きの大きさ S をプロットした (Fig. 33A)。傾きの大きさ S の大きさは、交換速度が化学シフト差よりも十分大きい場合には、化学交換の寄与と CSA 相互作用の寄与 Δ_{CSA} から下記式で表すことができる (2-1-4 節)。

$$S = \frac{4\gamma_H\gamma_C\Delta\omega_H\Delta\omega_C p_A p_B}{k_{ex}} + \frac{16}{45}\gamma_H\gamma_C\Delta\sigma_H\Delta\sigma_C S_{axis}^2 \tau_C \frac{3\cos^2\theta - 1}{2}$$

$$= \frac{4\gamma_H\gamma_C\Delta\omega_H\Delta\omega_C p_A p_B}{k_{ex}} + \Delta_{CSA}$$

Δ_{CSA} の大きさは KcsA の回転相関時間が 100 ns, 化学シフトテンソルの大きさが $\Delta\sigma_H = 1.1$ ppm, $\Delta\sigma_C = 25$ ppm[50]、メチル基の対称軸周りのオーダーパラメーター S_{axis}^2 が 0 ~ 1 の範囲にあるとして計算し、0 ~ 0.018 の範囲にあると見積もった。そこで、傾きの大きさ S が Δ_{CSA} の予測値の範囲外にあるメチル基を、化学交換の寄与が反映されているメチル基として同定した。

化学交換の寄与が検出されたメチル基は Leu15 δ 1, Leu17 δ 1, Leu35 δ 2, Val39 γ 2, Leu40 δ 2, Leu49 δ 1, Val48 γ 1, Val76 γ 1, Leu110 δ 1, Val126 γ 2 であり、Leu15 δ 1, Leu17 δ 1 は N 末端の構造非形成領域、Leu35 δ 2, Val39 γ 2, Leu40 δ 2, Leu49 δ 1 はアウターヘリックス上、Val76 γ 1 は SF ゲート上、Leu110 δ 1 は HBC ゲート上、Val126 γ 2 は細胞内領域に位置していた。なかでもアウターヘリックス上の Leu40 δ 2、SF ゲート上の Val76 γ 1、HBC ゲート上の Leu110 δ 1 は特に顕著な S の増大が観測されていた (Fig. 33B)。

以上の検討から、 $\Delta R_{MQ,obs}$ の磁場依存性解析によって野生型の KcsA において化学交換が存在する部位を同定することに成功した。

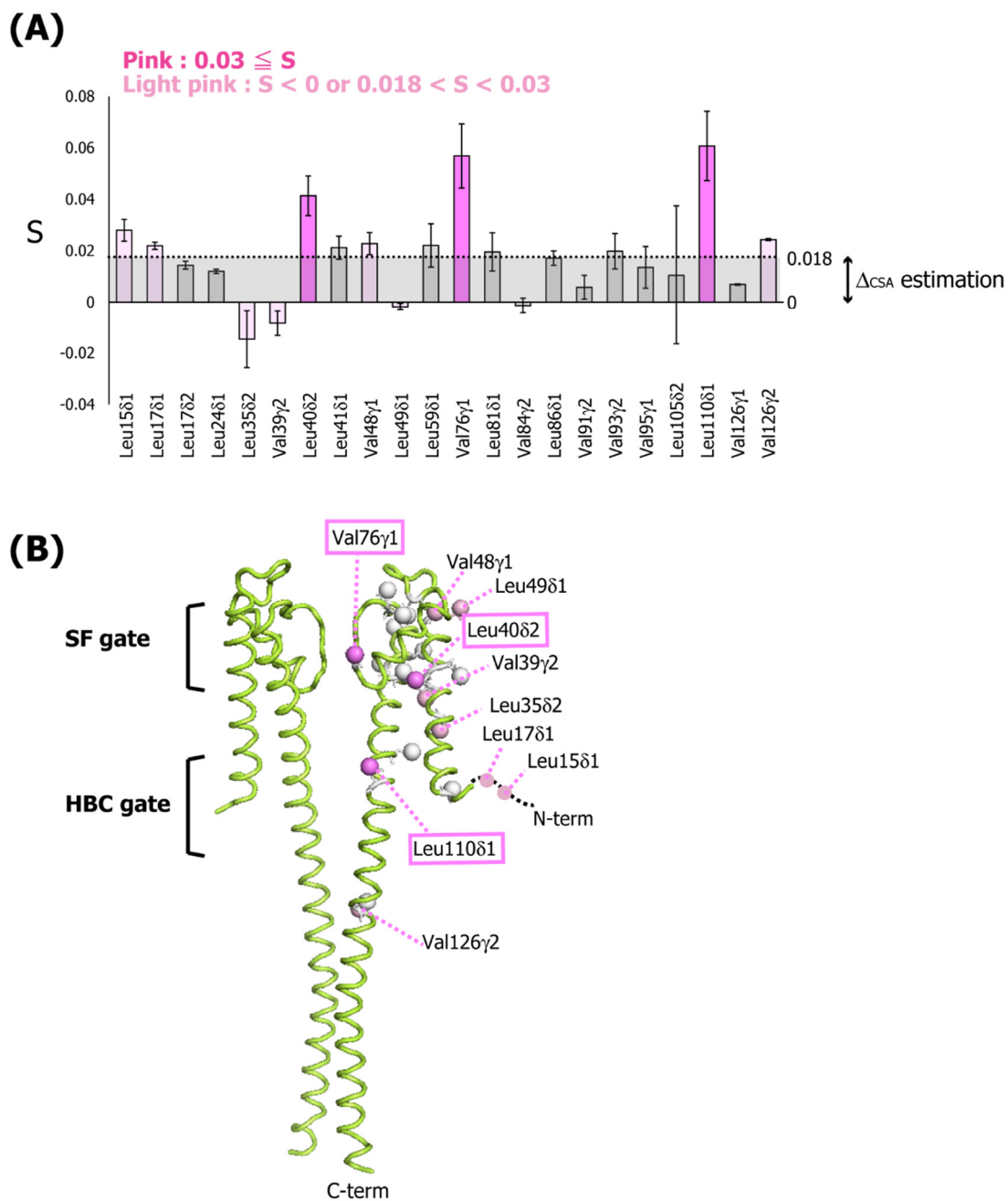


Fig. 33 メチル- ΔR_{MQ} 磁場依存性析の結果

(A) 各メチル基の $\Delta R_{MQ,obs}$ の磁場強度の2乗に対する傾き S のプロット Δ_{CSA} の予測値を灰色の帯で示している。

(B) 顕著な S が観測されたメチル基の立体構造上へのマッピング。KcsA-OM 変異体の結晶構造 [61] (PDB ID:3PJS)へマッピングした。

(A), (B) とともに、0.03 以上の顕著な S が観測されたメチル基をピンク色、0 以下もしくは 0.018~0.03 の大きさの S が観測されたメチル基を薄ピンク色で示した。

3-2-2. E71Q 変異体のサブミリ秒オーダーの化学交換が存在する部位の同定

野生型の KcsA において化学交換が存在する部位を同定できたものの、観測された化学交換がゲート開閉に伴う構造変化を反映しているのかは明らかではなく、それ以外の構造の揺らぎや界面活性剤との結合解離などを反映している可能性がある。そのため、サブミリ秒オーダーの開閉において、どの部位の化学交換がゲート開閉を反映しているかを同定することが困難である。

そこで、本研究ではサブミリ秒オーダーの開閉の性質が異なる変異体と比較することで、ゲート開閉を反映した化学交換を同定することとした。解析はポアヘリックス上に位置する Glu71 を Gln に変異させた E71Q 変異体を用いた(Fig. 34) [18]。

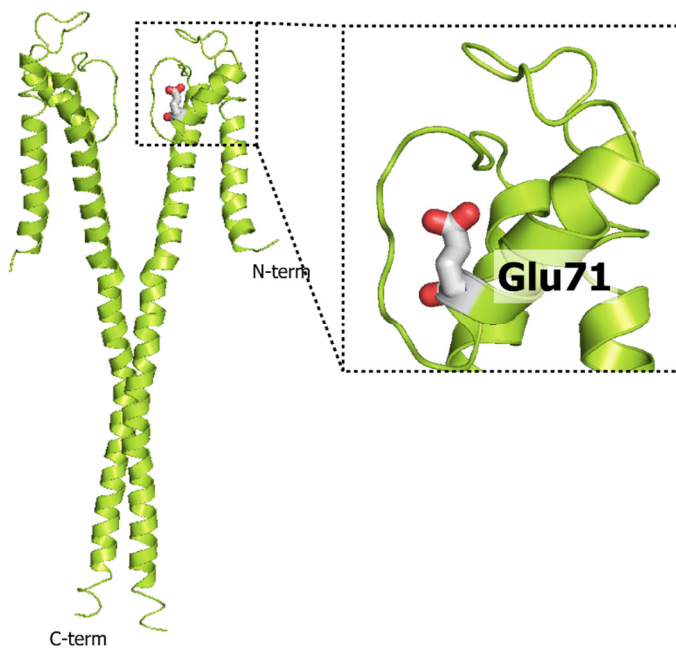


Fig. 34 Glu71 の立体構造上での位置

KcsA 全長の結晶構造[11](PDB ID:3EFF)の向かい合う2つのサブユニットを示し、片側のサブユニット上に Glu71 をスティックモデルで表示した。

野生型と E71Q 変異体とで単一チャンネル電流解析におけるサブミリ秒オーダーの開閉を比較した場合、野生型では K^+ を透過しない状態の割合が 20% 程度となる状態を主にとるのと比較して、E71Q 変異体では K^+ を透過しない状態の割合が 40% 程度にまで上昇している (Fig. 35)。

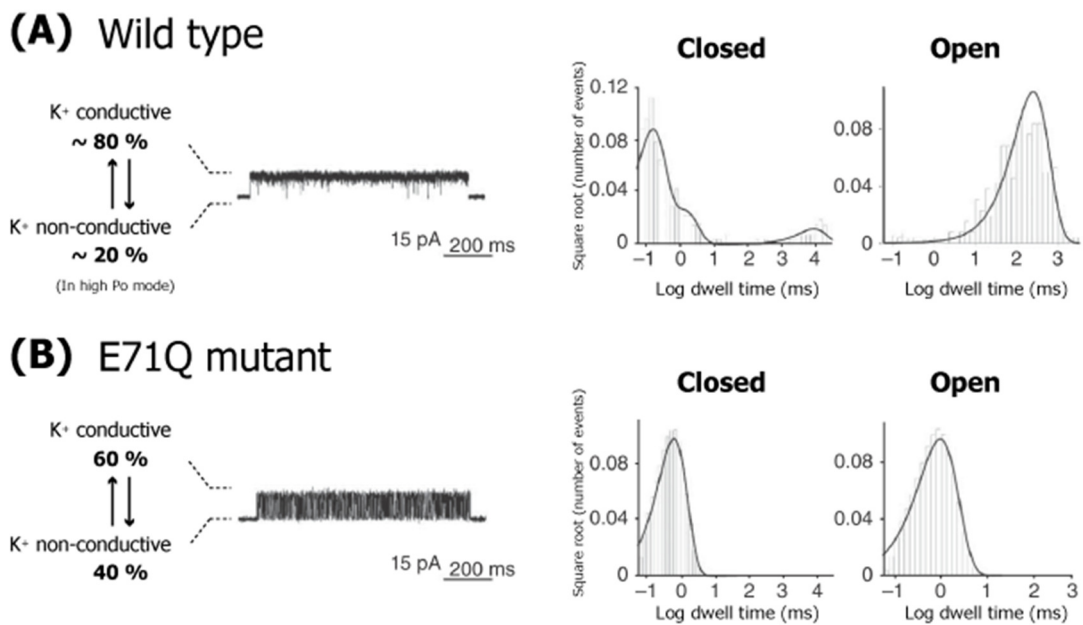


Fig. 35 (A) 野生型と (B) E71Q 変異体の単一チャンネル電流解析の結果[18]
左には単一チャンネル電流解析の結果を、右側には開口時間と閉口時間の分布をヒストグラムにて示している。[18]の Fig.3 より一部改編して示した。

E71Q 変異体は C 末端領域を切除した状態での結晶構造解析がすでに行われており、HBC ゲートが閉じた状態の構造が明らかとされている[18]。野生型 KcsA の C 末端を切除した状態での結晶構造[7]と比較したところ、SF ゲート、HBC ゲートともに顕著な構造変化は生じておらず、主鎖 $C\alpha$ 座標の両構造の平均二乗偏差は 0.3 Å とよく一致していた (Fig. 36)。そのため、ゲーティングの性質の違いは静的な構造の違いだけでは説明することができない。E71Q 変異体におけるゲーティングの違いは、変異導入に伴い化学交換が変調を受けたことに起因すると考え、E71Q 変異体においてもメチル- ΔR_{MQ} 解析を適用し、野生型と比較

することとした。

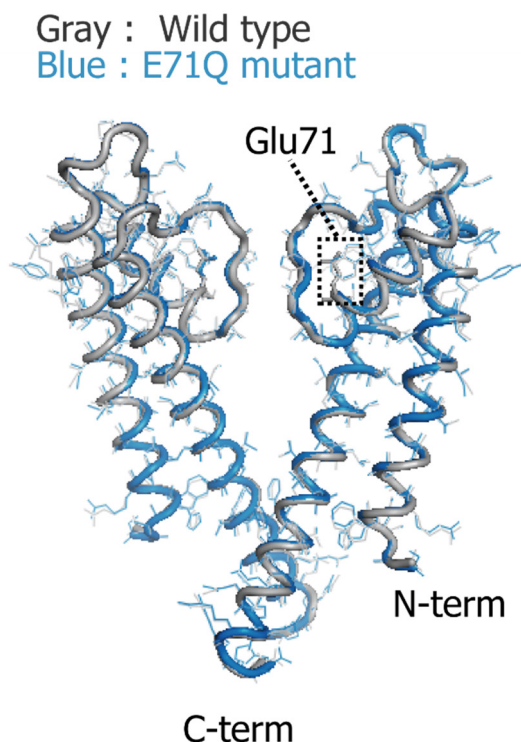


Fig. 36 野生型と E71Q 変異体の結晶構造の比較

野生型の構造[7] (PDB ID : 1K4C) を灰色、E71Q 変異体 [18] (PDB ID : 3OR6) を青色で重ねて示した。残基番号 22-124 の領域を示している。N 末端は構造非形成領域のため、残基番号 125-160 は切除されているために観測されていない。

均一 ^2H , Leu/Val 側鎖メチル基 [$^{13}\text{CH}_3$, $^{12}\text{CD}_3$] 標識 E71Q KcsA は、野生型と同様に大腸菌にて発現、精製を行った。E71Q 変異体の ^1H - ^{13}C 相関スペクトルを野生型のものと比較したところ、野生型で解析対象としていた全てのメチル基の帰属を移行することができたが、一部のメチル基は野生型とは化学シフト値がわずかに異なっていることが分かった。そこで、下記式に従って各メチル基の化学シフト差 δ を算出して比較したところ、測定磁場 14.1 Tesla (^1H 共鳴周波数 600 MHz) において δ が 10 Hz 以上であったメチル基は Val48 γ 1, Val48 γ 2, Leu59 δ 1, Val76 γ 1, Leu81 δ 1 であった。化学シフト値の違いが観測されたメチル基は立体構造上にて変異導入部位である Glu71 の近傍に集中していたことから、E71Q 変異体は溶液

中においても全体構造は野生型と大きく変化していないと判断した (Fig. 37)。

$$\delta = \sqrt{(\Delta\omega_H)^2 + \left(\frac{\Delta\omega_C}{5.6}\right)^2}$$

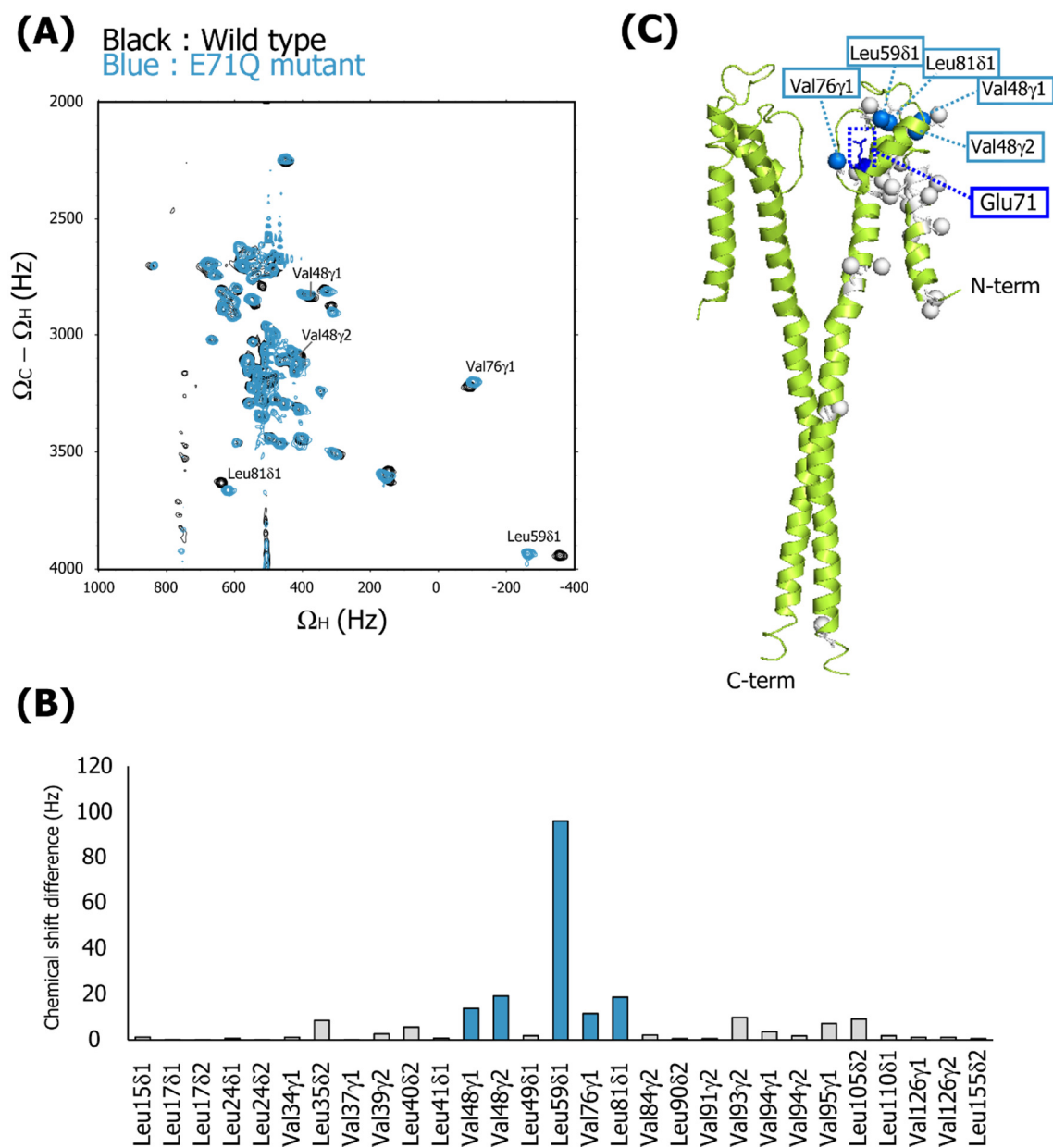


Fig. 37 野生型とE71Q変異体のNMRスペクトルの比較

(A) 野生型(黒)とE71Q変異体(青)の ^1H - ^{13}C HZQC スペクトルの比較。測定温度 318 K, 測定磁場は 14.1 Tesla (^1H 共鳴周波数 600 MHz)。化学シフトの違いが観測されたシグナルの帰属を示した。

(B) 野生型(黒)とE71Q変異体(青)の各メチル基の化学シフト値の違いのプロット。化学シフト差は $[(\Delta\omega_H)^2 + (\Delta\omega_C/5.8)^2]^{0.5}$ から算出した。

(C) 化学シフト値の違いが 10 Hz 以上であったメチル基の立体構造上へのマッピング。Glu71 の位置を青、化学シフトの違いが 10 Hz 以上のメチル基を青で示した。KcsA 全長の結晶構造[11](PDB ID:3EFF)の向かい合う2つのサブユニットを示し、片側のサブユニット上にマッピングした。

そこで E71Q 変異体についても野生型と同様に $\Delta R_{MQ,obs}$ の磁場依存性を解析し、顕著な化学交換が存在する部位を同定することとした。緩和の展開時間 T を 38.4 ms として、ZQ 遷移と DQ 遷移の和に相当する $2C_xH_x$ コヒーレンスを観測する実験と、ZQ 遷移と DQ 遷移の差に相当する $2C_yH_y$ コヒーレンスを観測する実験を行い、両スペクトルのシグナル強度比から下記式に従い各メチル基の ΔR_{MQ} を算出した。

$$\Delta R_{MQ} = \frac{1}{T} \operatorname{arctanh} \left(\frac{2C_yH_y}{2C_xH_x} \right)$$

測定は 11.7, 14.1, 18.8 Tesla (それぞれ ^1H の共鳴周波数として 500, 600, 800 MHz) の 3 条件において行い、各メチル基の磁場強度の 2 乗に対する $\Delta R_{MQ,obs}$ の傾きの大きさ S を算出した (Fig. 38)。交換速度が化学シフト差よりも十分大きい場合には、 S は下記式で表すことができる。

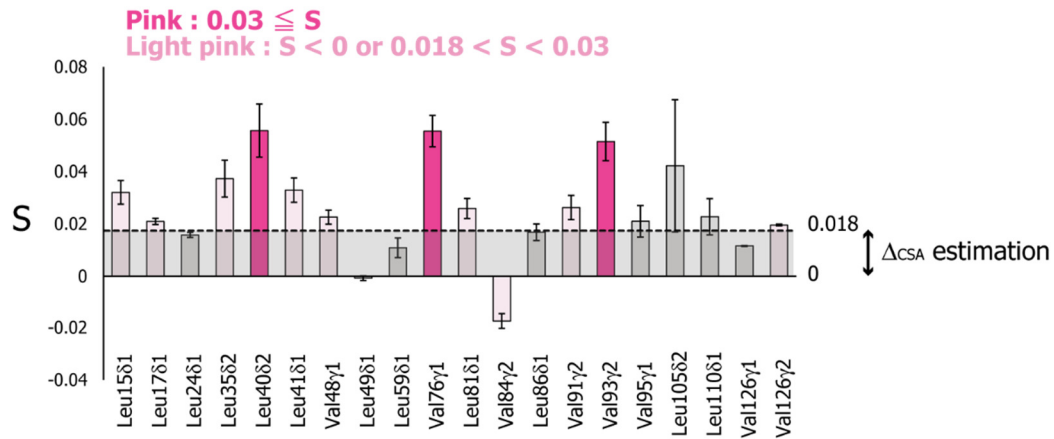
$$S = \frac{4\gamma_H\gamma_C\Delta\omega_H\Delta\omega_C\rho_A\rho_B}{k_{ex}} + \Delta_{CSA}$$

各メチル基の磁場強度の 2 乗に対する $\Delta R_{MQ,obs}$ の傾きの大きさ S をプロットした (Fig. 38A)。傾きの大きさ S が Δ_{CSA} の予測値 0 ~ 0.018 の範囲外にあるメチル基を、化学交換の寄与が反映されているメチル基として同定した。

化学交換の寄与が検出されたメチル基は Leu15 δ 1, Leu17 δ 1, Leu35 δ 2, Leu40 δ 2, Leu41 δ 1, Val48 γ 1, Val76 γ 1, Leu81 δ 1, Val84 γ 2, Val91 γ 2, Val93 γ 2, Val126 γ 2 であり、Leu15 δ 1, Leu17 δ 1 は N 末端の構造非形成領域、Leu35 δ 2, Leu40 δ 2, Leu41 δ 1, Val48 γ 1 はアウターヘリックス上、Val76 γ 1 は SF ゲート上、Leu81 δ 1, Val84 γ 2 は SF とインナーヘリックスの間のループ上、Val91 γ 2, Val93 γ 2 はインナーヘリックス上、Val126 γ 2 は細胞内領域に位置していた。なかで

もアウターヘリックス上の Leu40 δ 2、SF ゲート上の Val76 γ 1、インナーヘリックス上の Val93 γ 2 は特に顕著な *S* の増大が観測されていた。以上の検討から、E71Q 変異体においても化学交換が存在する部位を同定することに成功した。

(A)



(B)

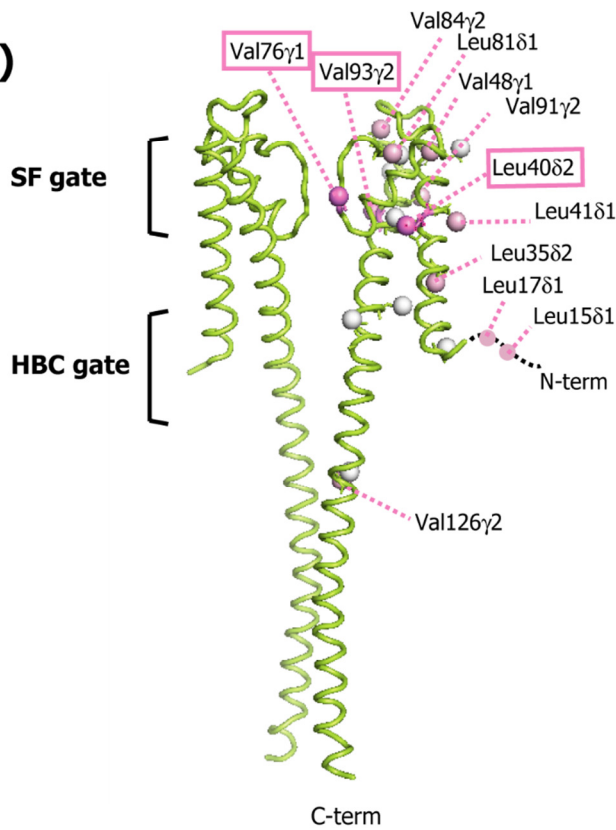


Fig. 38 E71Q 変異体のメチル- ΔR_{MQ} 磁場依存性析の結果

(A) 各メチル基の $\Delta R_{MQ,obs}$ の磁場強度の 2 乗に対する傾き S のプロット Δ_{CSA} の予測値を灰色の帯で示している。

(B) 顕著な S が観測されたメチル基の立体構造上へのマッピング。KcsA-OM 変異体の結晶構造 [61] (PDB ID:3PJS)へマッピングした。

(A), (B) とともに、0.03 以上の顕著な S が観測されたメチル基をピンク色、0 以下もしくは 0.018~0.03 の大きさの S が観測されたメチル基を薄ピンク色で示した。

3-2-3. 野生型と E71Q 変異体での $\Delta R_{MQ,obs}$ の磁場依存的な変化の比較

野生型、E71Q 変異体において顕著な S が観測された部位を比較した (Fig. 39)。野生型、E71Q 変異体ともに SF ゲート近傍の細胞外領域から、細胞内領域にいたるまで分子全体に S の変化が観測された点では一致していたが、部位ごとに比較した場合、一部のメチル基は野生型と E71Q 変異体で異なる S が観測されていた。

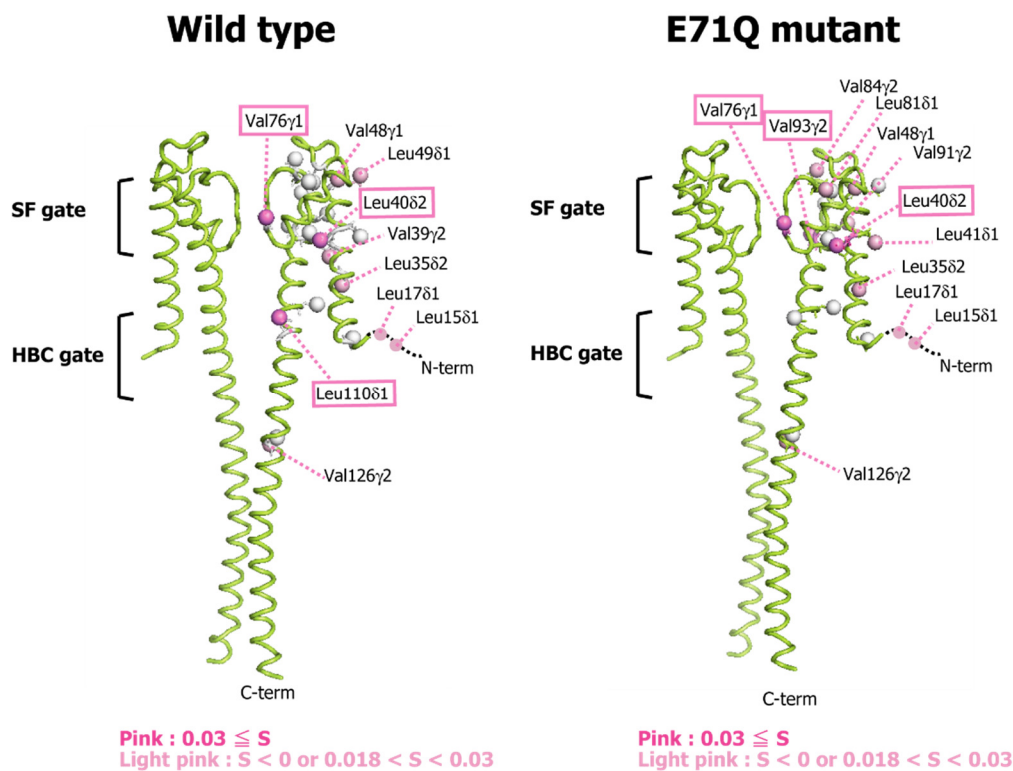


Fig. 39 野生型(A)とE71Q 変異体(B)において顕著な S が観測された部位の比較 KcsA-OM 変異体の結晶構造 [61] (PDB ID:3PJS) へマッピングした。

Fig. 33 ならびに Fig. 38 の (B) 同一の図である。(A), (B) ともに、0.03 以上の顕著な S が観測されたメチル基をピンク色、0 以下もしくは 0.018~0.03 の大きさの S が観測されたメチル基を薄ピンク色で示した。

そこで、野生型と E71Q 変異体の S のプロットを比較することで、 S の違いが観測されている部位を同定することとした。Fig. 40 にはメチル基ごとに野生型と E71Q 変異体の S をそれぞれ並べてプロットし、E71Q 変異体において S の絶対値が増大した部位をマゼンタで、

減少した部位をシアンで色づけして示した。*S* の増減は Glu71 周辺のみならず分子全体に観測されており、*S* の増大が観測されたメチル基は Leu35δ2, Leu41δ1, Val84γ2, Val91γ2, Val93γ2 であり、*S* の減少が観測されたメチル基は Leu110δ1, Val126γ2 であった。Leu35δ2, Leu41δ1 はアウターヘリックス上、Val84γ2 は SF とインナーヘリックスの間のループ上、Val91γ2, Val93γ2 はインナーヘリックス上、Val126γ2 は細胞内領域に位置していた。これらの部位には、E71Q 変異導入に伴い化学交換が変化した部位であることが示唆される。

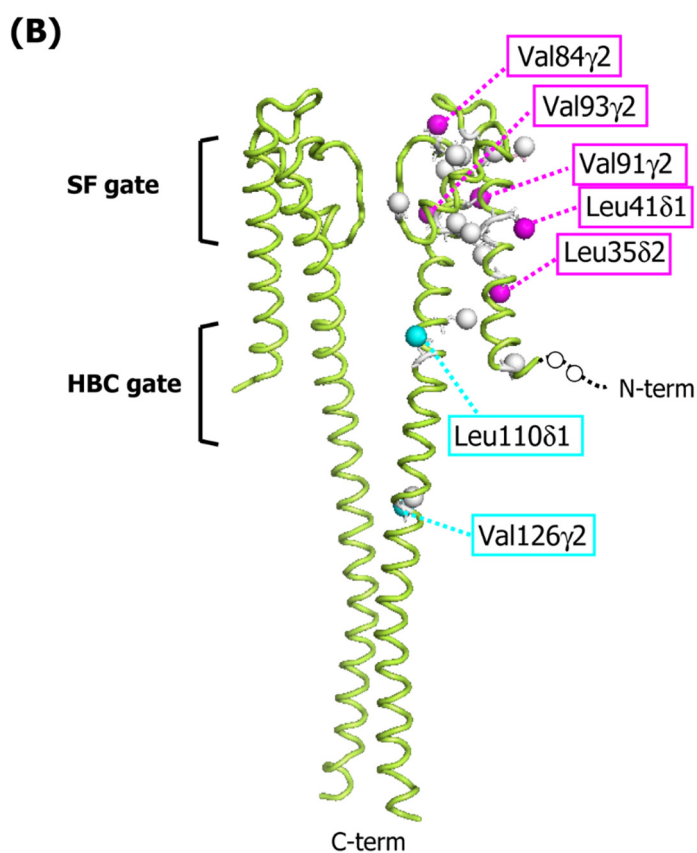
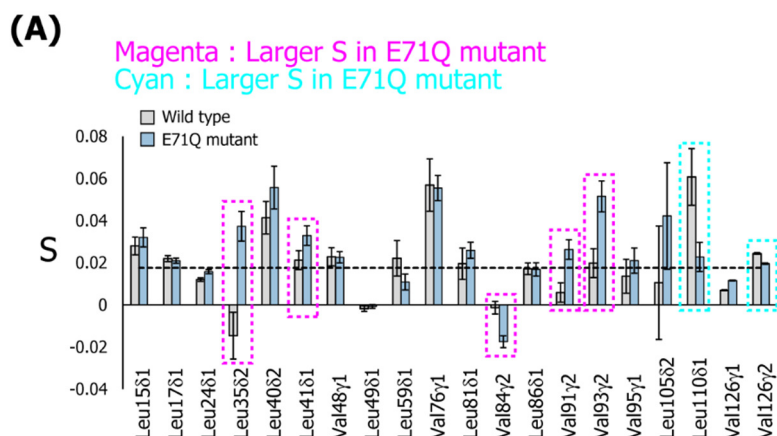


Fig. 40 野生型とE71Q変異体におけるSの比較とマッピング

(A) メチル基ごとに野生型(灰)とE71Q変異体(青)のSを並べてプロットした。E71Q変異体においてSが増大したメチル基をマゼンタで、Sが減少したメチル基をシアンで示した。

(B) E71Q変異体においてSの増減が観測されたメチル基の立体構造上へのマッピング。KcsA-OM変異体の結晶構造 [61] (PDB ID:3PJS)へマッピングした。観測対象のメチル基を白で、Sが増大したメチル基をマゼンタで、Sが減少したメチル基をシアンで示した。

3-3. 考察

3-3-1. Glu71 変異により分子全体の化学交換が変化する機構

野生型と E71Q 変異体とで、磁場強度の 2 乗に対する $\Delta R_{MQ,obs}$ の傾きの大きさ S を比較した時、E71Q 変異体で野生型よりも S の増大、もしくは減少が観測されたメチル基は、変異導入部位近傍のみならず膜貫通ヘリックスにおいても観測されており、分子全体に分布していた。このことは、E71Q 変異導入に伴い分子全体の化学交換が変調を受けたことを示唆している。

Glu71 は SF を構成する残基の主鎖 NH、その近傍に位置する Asp80 側鎖、ポアヘリックス上の Trp68 側鎖、そして水分子を介して水素結合ネットワークを形成している[7]。したがって Glu71 が Gln に置換された水素受容能が低下したときにはポアヘリックス上の構造、運動性の変化が生じることが予想される。ポアヘリックス上で Glu71 のヘリックス裏側に位置する Thr74 側鎖は、インナーヘリックス上の Phe103 側鎖とファンデルワールス接触していることから[62]、ポアヘリックスの構造、運動性の変化はこれらのファンデルワールス接触を介してインナーヘリックスの構造変化を誘起しうる (Fig. 41)。

したがって、E71Q 変異体において分子全体に観測された化学交換の変化は、これらの SF 近傍の相互作用と、膜貫通ヘリックスとの構造上の共役に起因するものであると考えた。

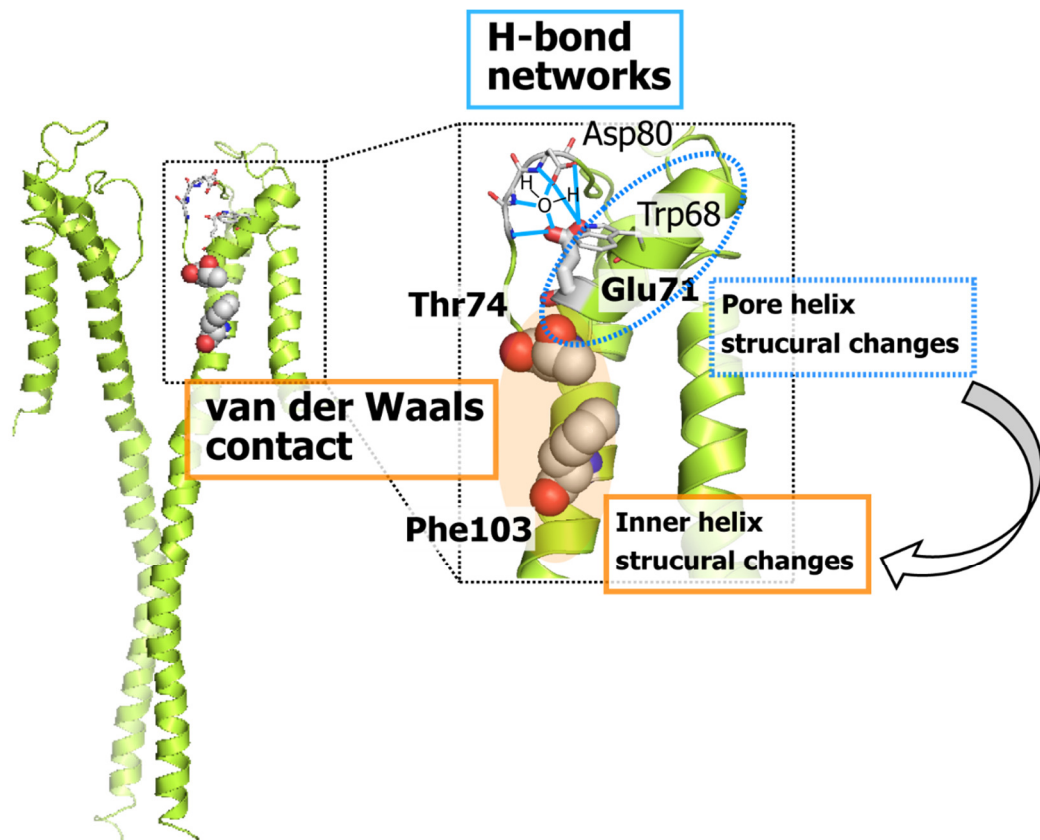


Fig. 41 Glu71 の形成する SF 近傍の水素結合ネットワークと膜貫通ヘリックスの共役を示した図。KcsA 全長の結晶構造[11](PDB ID:3EFF)の向かい合う2つのサブユニットを示し、片側のサブユニット上に水素結合ネットワークを形成する残基をスティックモデルで、ポアヘリックス上の Thr74 側鎖とインナーヘリックス上の Phe103 側鎖を球で示した。

3-3-2. サブミリ秒オーダーの開閉と関連した化学交換の同定

野生型と E71Q 変異体のサブミリ秒オーダーの開閉を比較した時、E71Q 変異体では野生型ではマイナー状態である K^+ を透過しない割合が増大していた (Fig. 35)。したがって、サブミリ秒オーダーの開閉に関連した化学交換がある場合、E71Q 変異体にはマイナー状態の割合 p_B が増大していることが予想される。

一方で、NMR 解析において算出した磁場強度の 2 乗に対する $\Delta R_{MQ,obs}$ の傾きの大きさ S は、交換速度が化学シフト差よりも十分大きい場合には下記式で表されることより、 S の大

木は p_B に対して比例する。

$$S = \frac{4\gamma_H\gamma_C\Delta\varpi_H\Delta\varpi_C p_A p_B}{k_{ex}} + \Delta_{CSA}$$

したがって、E71Q 変異体において S の増大が観測されていた部位では、化学交換においてゲーティングの変化と対応した p_B の増大が生じている部位であることが示唆される。よって、 S の増大が観測されていた部位を、 K^+ を透過しない状態の割合が増大したときに、構造、運動性の変化が生じる部位であると同定した。

S の増大が観測されたメチル基は Leu35 δ 2, Leu41 δ 1, Val84 γ 2, Val91 γ 2, Val93 γ 2 であり、Leu35 δ 2, Leu41 δ 1 はアウターヘリックス上、Val84 γ 2 は SF とインナーヘリックスの間のループ上、Val91 γ 2, Val93 γ 2 はインナーヘリックス上に位置していた (Fig. 42)。これらの部位は、サブミリ秒オーダーの開閉と密接に関連した化学交換が存在する部位であることが示唆される。

なお、E71Q 変異体において S の減少が観測された Leu110 δ 1, Val126 γ 2 についても、変異体において化学交換が変調を受けた部位であり、同様にサブミリ秒オーダーの開閉と関連した化学交換が存在する部位である可能性がある。この場合、 S の減少は局所的な k_{ex} の変化や、 K^+ を透過しない状態との化学シフト差の変化に起因すると考えた。ただし、ゲーティングの変化との対応が、本研究の実験結果だけからでは明確には議論できないため、以降では S の増大が観測されたメチル基に着目して考察を行うこととする。

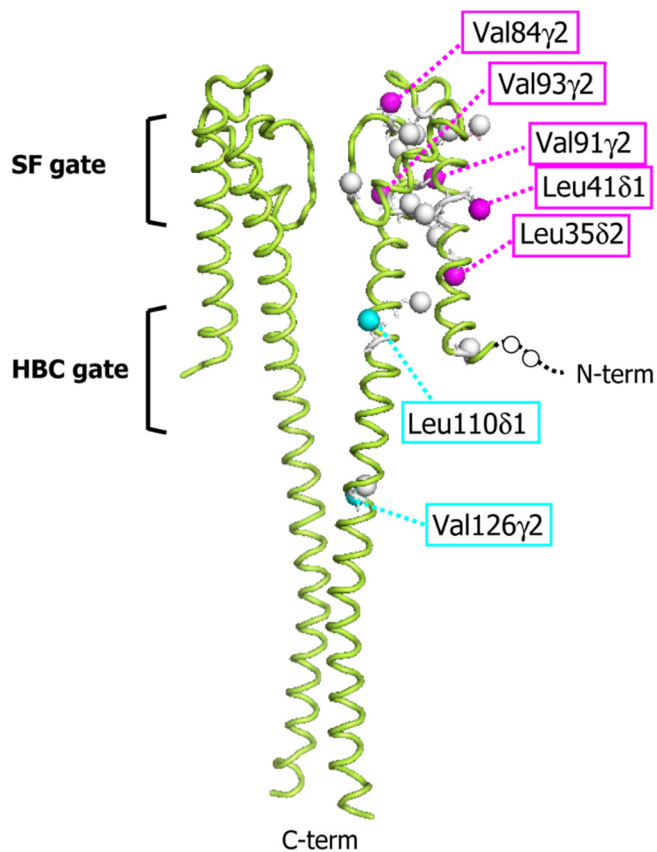


Fig. 42 E71Q 変異体において S の増減が観測されたメチル基の立体構造上へのマッピング。Fig. 40 (B) の再掲。

3-3-3. サブミリ秒オーダーの開閉の構造機構の提唱

E71Q 変異体において S の増大が観測された部位に着目することで、サブミリ秒オーダーの開閉と関連した化学交換が存在する部位を同定した。そこで、化学交換が検出された部位からサブミリ秒オーダーの開閉の構造機構を考察した。

サブミリ秒オーダーの開閉と関連した化学交換は、インナーヘリックスとアウターヘリックスとの接触部位 (Val91 γ 2)、ならびに隣接するサブユニットのポアヘリックスとの接触部位 (Val93 γ 2) に観測されていたことから、これらの化学交換は膜貫通領域のヘリックス同士の相互作用、特にインナーヘリックスの構造変化を伴うものであると考察した (Fig. 43)。インナーヘリックスの細胞内側は HBC ゲートを形成していることから、インナーヘ

リックスの構造変化を伴う化学交換は K^+ 透過活性の変化を誘起しうる。また、HBC ゲートの構造変化が生じていたことは、アウターヘリックス上の HBC ゲート近傍 (Leu3582) に開閉と関連した化学交換が検出されたことから支持される。

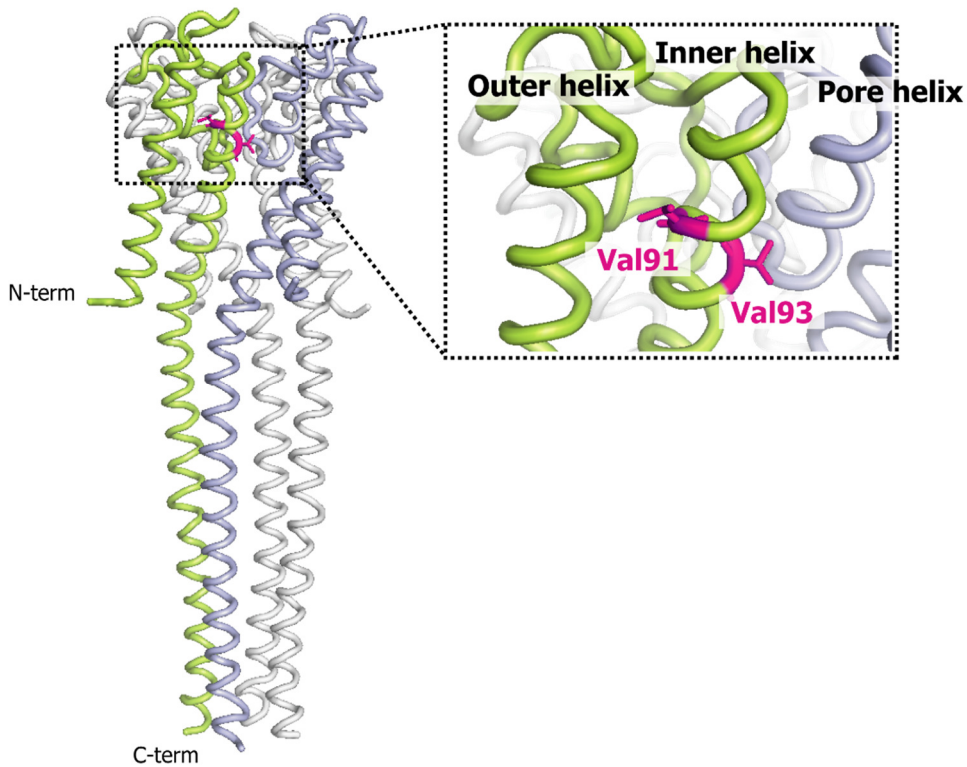


Fig. 43 Val91, Val93 の立体構造上の位置

KcsA-OM 変異体の結晶構造 [61] (PDB ID:3PJS) へ示した。隣接するサブユニットを色分けして示し、Val91, Val93 をマゼンタのスティックモデルで示した。

一方で、SF ゲートを形成する Val76y1 に着目した場合、野生型と E71Q 変異体では *S* の変化は観測されていないことから、SF ゲートはサブミリ秒オーダーの開閉において、顕著な構造、運動性の違いが生じていないことが分かった。

以上より、私はサブミリ秒オーダーの開閉は SF ゲートではなく、HBC ゲートの構造変化に起因するという機構を提唱する (Fig. 44)。

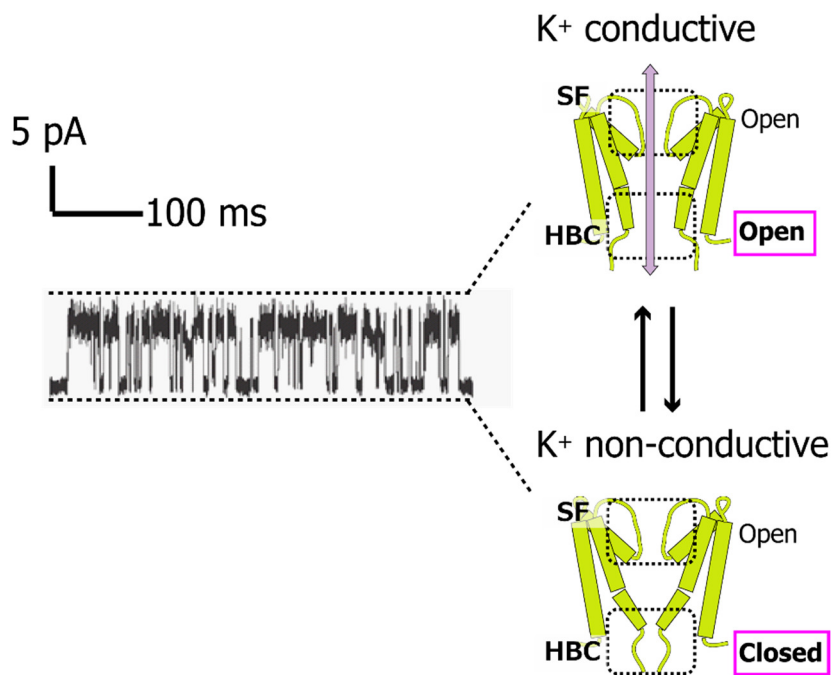


Fig. 44 提唱するサブミリ秒オーダーの開閉の構造機構の模式図

サブミリ秒オーダーで K^+ を透過する状態と透過しない状態との遷移は HBC ゲートの開閉に起因する。単一チャネル電流解析は[14] Fig.4 より、一部改編して示した。

本研究より得られた結論は、サブミリ秒オーダーの開閉が SF ゲートの構造変化に起因するという先行研究[17, 18] とは一致しないが、本研究では変異導入に伴う分子全体の構造、運動性の変化を考慮して解析している点、メチル- ΔR_{MQ} 法を適用することでミリ秒からサブミリ秒オーダーの化学交換を検出しており、ps~ns オーダーの MD シミュレーションよりも実際の K^+ 透過のタイムスケールに近い化学交換を検出しているという点で、既存の研究に対する優位性があると考えられる。

4. 結論

本研究において私は、(1) 高分子量タンパク質のマイクロ秒からミリ秒オーダーの化学交換を解析する新規 NMR 手法の開発すること、そして (2) KcsA のサブミリ秒オーダーの開閉の構造機構を明らかとすることを目的とした研究を遂行した。

(1) においては、高分子量タンパク質の側鎖メチル基を対象として、マイクロ秒からミリ秒オーダーの化学交換を解析するメチル- ΔR_{MQ} 解析法を確立した。確立した手法は NMR 法による化学交換の適用範囲を拡大しうるものであり、これまでに解析することが困難であった高分子量タンパク質複合体や膜タンパク質などの機能的運動性の解明につながるものである。

また、(2) においては KcsA に本研究で確立したメチル- ΔR_{MQ} 解析法を適用し、KcsA においてサブミリ秒オーダーの化学交換が存在する部位を同定した。また変異体との比較から、KcsA のサブミリ秒オーダーの開閉は、HBC ゲートの構造変化を伴う化学交換に起因するという構造機構を提唱した。変異体の電気生理解析や静的なスナップショットの構造の比較を中心とした既存の研究と比較して、本研究はチャンネル開閉の速度のタイムスケールにおける、KcsA の分子全体の動的な性質に着目した点で優位性があり、得られた知見は K^+ チャンネルの機能を十分に説明するものであると考える。本研究で提唱された機構は K^+ チャンネルのポア領域の高い保存性から、他の真核生物の K^+ チャンネルにも適用可能であり、 K^+ チャンネルをターゲットとした新規薬物の開発に資することが期待される。

5. 材料と方法

5-1. 試薬

PCR 反応において使用したオリゴ DNA プライマーは、Invitrogen より購入した。制限酵素はタカラバイオより購入した。安定同位体標識化合物は、ISOTEC, CIL (Cambridge isotope laboratory) より購入した。他の試薬は本文中に断りのない限り Sigma-Aldrich、和光純薬、ナカライテスク、同仁化学研究所より購入した。

また、特に断りのない限りは培地、バッファーは超純水装置 MilliQ (メルクミリポア) にて製造した水を用いた。

5-2. タンパク質の発現と精製

5-2-1. 培地組成

本実験では以下の組成の培地を使用した。

90 % D₂O LB 培地

1.0 g Bacto Tryptone

0.5 g Bacto Yeast Extract

0.5 g NaCl

以上を 90 mL の 99.8% D₂O と 10 mL の水に溶解して、0.22 μm のフィルターを用いて濾過滅菌を行った。MBP と FF ドメインの発現時にはアンピシリンを終濃度 100 mg/L 、KcsA の発現時にはカナマイシンを終濃度 30 mg/L となるよう無菌的に添加した。

重水素化 M9 培地

12.9 g Na₂HPO₄

3.0 g KH₂PO₄

0.5 g NaCl

1.0 g NH₄Cl

2.0 g [1,2,3,4,5,6-D7, 98%] D-Glucose

2 mM MgSO₄

1 μM FeCl₃

0.1 mM CaCl₂

10 mg Thiamine

10 mg Biotin

以上を 1 L 99.8% D₂O に溶解した。上記に加え、MBP と FF ドメインの発現時には 100 mg アンピシリンを、KcsA の発現時には 30 mg カナマイシンを添加した後、0.22 μm のフィルターを用いて濾過滅菌を行った。

5-2-2. MBP の発現と精製

大腸菌由来 MBP 発現系は pMAL-c2x ベクター (New England Biolab) の MBP C 末端側に Arg367-Ile368-Thr369-Lys370-翻訳終始の塩基配列を挿入し全長の同じアミノ酸配列[63]のポリペプチド鎖が発現するようにしたものを用いた。BigDye terminator v3.1 cycle sequencing kit と ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer (ともにアプライドバイオシステムズ) を用いた DNA シークエンシングによって、全発現領域の DNA 配列を確認した。

目的の配列をもつプラスミドベクターは、*E. Coli* BL21 (DE3) CodonPlus® RP (Agilent) に導入した。90% D₂O M9 培地 10 mL にて 37°C、12 時間以上振盪培養した菌体を、2,000 g,

15 分の遠心操作により集菌し、150 mL の重水素化 M9 培地に懸濁した。この培地を 37°C で 14 ~ 16 時間振盪培養した後、350 mL の重水素化 M9 培地に希釈して本培養を開始した。600 nm の濁度 OD_{600nm} が 0.8 程度となった時点で、25 mg の 2-keto-3,3-d₂-4-¹³C-butyrate、Leu、Val 側鎖を標識する場合にはこれに加えて 40 mg の 2-keto-3-methyl-d₃-3-d₁-4-¹³C-butyrate を添加した。37°C で 1 時間振盪培養後に終濃度 1 mM となるようにイソプロピル-β-チオガラクトピラノシド (IPTG) を添加することで発現を誘導し、さらに 10 時間培養した。培養後の培地を 7,000 rpm、15 分間の遠心操作により菌体を回収し、20 mM Tris (pH 8.0) のバッファー (バッファーA) で懸濁し、液体窒素にて急速に凍結した後、精製を開始する直前まで -80°C にて保存した。

菌体を流水にて溶解後、フッ化フェニルメチルスルホニル (PMSF) を 1 mM となるように添加して、Branson Sonifier 450 を用いた間欠超音波パルス (power 5, 4 min × 3) により、氷上にて菌体を破碎した。24,000 g、30 分の遠心操作により不溶物を除去した後、上清をバッファーA で平衡化した Q sepharose fast flow レジン(GE) にアプライした。5 カラムボリューム (CV) のバッファーA で洗浄したのち、50 mM、100 mM、200 mM、300 mM、600 mM の NaCl を含むバッファーA をそれぞれ 5 CV ずつアプライし、カラムの洗浄と MBP の溶出を行った。MBP は NaCl 濃度 100 mM、200 mM の溶出画分に溶出した。

MBP の溶出画分を回収し、20 mM Tris (pH 8.0)、200 mM NaCl のバッファー (バッファー B) で平衡化した Amylose Resin (New England Biolab) にアプライして MBP を吸着させた。10 CV のバッファーB で洗浄したのち、10 mM のマルトースを含むバッファーB を 5 CV アプライすることで MBP を溶出させた。マルトースによる溶出画分の SDS-PAGE 解析により、単一のバンドとなるまで精製できていることを確認した。280 nm の波長の紫外吸光度を測定し、アミノ酸配列から予測されるモル吸光係数 66,350 を用いて収量を算出したところ、1 L 培養あたり約 14 mg であった。

Amylose Resin からマルトースにより溶出させた MBP はマルトース結合型であるため、

NMR 解析のために β -シクロデキストリン (東京化成) へとリガンド交換を行った。マルトース結合型 MBP を含む溶液は分画分子量 10 K の Amicon® Ultra-15 (ミリポア) を用いて 1 mL 程度にまで濃縮した後、等量の 4 M グアニジン溶液を加えて終濃度 2 M とし、室温にて 1 時間インキュベートした。2 M グアニジン (99.8 % D₂O) で平衡化した PD-10 カラム (GE) にてマルトースを除去後、10 倍量のバッファーC (20 mM リン酸ナトリウム (pD 7.2), 0.1 mM エチレンジアミン四酢酸 (EDTA), 2 mM β -シクロデキストリン, 99.8 % D₂O) で希釈することでリフォールディング反応を行った。99.8% D₂O を含むバッファーの pD は、pH メーターの指示値に 0.4 を加えて補正した[64]。

リフォールディングした MBP の溶液は分画分子量 10 K の Amicon® Ultra-15 により 300 μ L まで濃縮、10 mL のバッファーC で希釈する操作を 3 回繰り返した。250 μ L まで濃縮した溶液を回収し、塩化アジドを終濃度 3 mM、2,2-ジメチル-2-シラペンタン-5-スルホン酸ナトリウム (DSS) を 0.1 mM となるように添加した後、遠心操作で不溶物を除去し、直径 5 mm のマイクロ試験管 (Shigemi) に充填して NMR 測定に用いた。NMR サンプルの濃度は、280 nm の波長の紫外吸光度から 590 μ M と算出した。

5-2-3. FF ドメインの発現と精製

ヒト由来 HYPA/FBP11 FF ドメインの DNA 配列は、先行研究[53]で用いられているタンパク質のアミノ酸配列を参考に、大腸菌発現のためにコドン最適化した下記塩基配列を用いた。

アミノ酸配列

GSQPAKKTYTWNTKEEAKQAFKELLKEKRVPSNASWEQAMKMIINDPRYSALAKLSEKKQ
AFNAYKVQTEK

コドン最適化した DNA 配列

GGATCCCAGCCAGCAAAGAAAACCTATACGTGGAACACTAAAGAAGAAGCTAAGCAGG
CCTTTAAGGAACTGCTGAAAGAAAAGCGTGTGCCTTCCAACGCCAGCTGGGAACAGGCT
ATGAAAATGATCATTAACGACCCACGTTATTCCGCCCTGGCGAAACTTCCGAAAAGAAA
CAAGCCTTTAATGCCTACAAGGTGCAGACTGAGAAA

全合成した DNA 配列（フナコシ）を、pGEX-4T2 ベクター（GE）の BamH1、SalI サイトに挿入することで GST 融合タンパク質として発現させる発現系を構築した。このとき、FF ドメイン N 末端側の Gly-Ser の配列をベクター内のトロンビン認識配列と一致させ、GST タグを切断後の余剰配列が残らないようにした。BigDye terminator v3.1 cycle sequencing kit と ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer を用いた DNA シークエンシングによって、全発現領域の DNA 配列を確認した。

目的の配列をもつプラスミドベクターは、*E. Coli* BL21 (DE3) CodonPlus® RP (Agilent) に導入した。90% D₂O M9 培地 10 mL にて 37°C、12 時間以上振盪培養した菌体を、2,000 g、15 分の遠心操作により集菌し、150 mL の重水素化 M9 培地に懸濁した。この培地を 37°C で 14 ~ 16 時間振盪培養した後、350 mL の重水素化 M9 培地に希釈して本培養を開始した。600 nm の濁度 OD_{600nm} が 0.7 程度となった時点で、25 mg の 2-keto-3,3-d₂-4-¹³C-butyrates、40 mg の 2-keto-3-methyl-d₃-3-d₁-4-¹³C-butyrates を添加した。培養温度を 25°C に下げて 1 時間振盪培養後に終濃度 1 mM となるように IPTG を添加することで発現を誘導し、さらに 12 時間培養した。培養後の培地を 7,000 rpm、15 分間の遠心操作により菌体を回収し、50 mM Tris (pH 8.0), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA のバッファー（バッファー D）で懸濁し、液体窒素にて急速に凍結した後、精製を開始する直前まで -80°C にて保存した。

菌体を流水にて溶解後、PMSF を 1 mM となるように添加して、Branson Sonifier 450 を用いた間欠超音波パルス（power 5, 3 min × 5）により、氷上にて菌体を破碎した。24,000 g、

30 分の遠心操作により不溶物を除去した後、上清をバッファーD で平衡化した Glutathione sepharose 4 fast flow レジン(GE) にアプライした。20CV のバッファーD で洗浄した後、2 CV のバッファーD でレジンを懸濁し、トロンビンを 100 ユニット添加して室温で 6 時間インキュベートすることで、オンカラム上での GST タグ切断反応を行った。レジンからの溶出液は水で 5 倍に希釈することで塩濃度を低下させ、0.22 μm のフィルターにより不溶物を除去後、バッファーA で平衡化した HiTrap SP FF カラム 5 mL にアプライした。ÄKTA explorer (GE) を用いた NaCl 濃度 0 mM から 500 mM のグラジエントにより FF ドメインを溶出させた。FF ドメインは NaCl 濃度が約 300 mM にて溶出した。

溶出画分の SDS-PAGE 解析により、単一のバンドとなるまで精製できていることを確認した。280 nm の波長の紫外吸光度を測定し、アミノ酸配列から予測されるモル吸光係数 15,470 を用いて収量を算出したところ、1 L 培養あたり約 4.5 mg であった。

FF ドメインの溶液は分画分子量 3 K の Amicon® Ultra-15 により 300 μL まで濃縮、10 mL のバッファー (20 mM リン酸カリウム (pD 6.8), 50 mM NaCl, 1 mM EDTA, 99.8 % D₂O) で希釈する操作を 3 回繰り返した。600 μL まで濃縮した溶液を回収し、塩化アジドを終濃度 0.2 mM、DSS を 0.1 mM となるように添加した後、遠心操作で不溶物を除去し、直径 5 mm のマイクロ試験管 (Shigemi) に充填して NMR 測定に用いた。NMR サンプルの濃度は、280 nm の波長の紫外吸光度から 400 μM と算出した。

5-2-4. KcsA の発現と精製

野生型 KcsA の発現用プラスミドベクターは、当研究室の竹内恒博士が作製したものを [65]、E71Q 変異体の発現用プラスミドベクターは野生型のプラスミドをもとに当研究室の今井駿輔博士が作製したものをを用いた。これらの発現用プラスミドベクターは、N 末端に 10 残基の His タグと HRV-3C プロテアーゼ認識配列を付加した KcsA の配列が、pET24d(+) ベ

クター (Novagen) の NdeI、Sall サイトに挿入されたものである。

野生型ならびに E71Q 変異体 KcsA の発現と精製は先行研究に従って行った[13, 65]。

目的の配列をもつプラスミドベクターは、*E.Coli* C41 (DE3) (Lucigen) に導入した。90% D₂O M9 培地 10 mL にて 37°C、12 時間以上振盪培養した菌体を、2,000 g, 15 分の遠心操作により集菌し、150 mL の重水素化 M9 培地に懸濁した。この培地を 37°C で 14 ~ 16 時間振盪培養した後、350 mL の重水素化 M9 培地に希釈して本培養を開始した。600 nm の濁度 OD_{600nm} が 0.8 程度となった時点で、40 mg の 2-keto-3-methyl-d₃-3-d₁-4-¹³C-butyrates を添加した。1 時間振盪培養後に終濃度 1 mM となるように IPTG を添加することで発現を誘導し、さらに 8 時間培養した。培養後の培地を 7,000 rpm, 15 分間の遠心操作により菌体を回収し、20 mM Tris (pH 8.0), 150 mM NaCl, 150 mM KCl のバッファー (バッファー-F) で懸濁し、液体窒素にて急速に凍結した後、精製を開始する直前まで -80°C にて保存した。

菌体を流水にて溶解後、pefabloc SC (Roche) を終濃度が 0.1 mg/mL となるように添加して、Branson Sonifier 450 を用いた間欠超音波パルス (power 5, 3 min × 4) により、氷上にて菌体を破碎した。200 mM の DDM 溶液を 1/10 量加えて終濃度 20 mM とし、室温で 1 時間振盪した。14,000 g、30 分の遠心操作により不溶物を除去した後、上清を 0.5 mM の DDM を含むバッファー-E で平衡化した His-SELECT™ Ni²⁺ affinity gel (Sigma) にアプライした。5 mM の DDM と 20 mM のイミダゾールを含む 2.5 CV のバッファー-E と、0.5 mM の DDM と 50 mM のイミダゾールを含む 7.5 CV のバッファー-E で洗浄したのち、0.5 mM の DDM と 500 mM のイミダゾールを含む 10 CV のバッファー-E で KcsA を溶出させた。280 nm の波長の紫外吸光度を測定し、アミノ酸配列から予測されるモル吸光係数 34,950 を用いて KcsA を定量し、タグ切断用プロテアーゼ HRV-3C (Novagen) を 20 unit / mg protein となるように加えた。分画分子量 10 K の透析膜を用い、25 倍量のバッファー-F (10 mM リン酸カリウム (pH 6.5), 100 mM KCl, 1 mM dithiothreitol (DTT), 0.5 mM DDM) に対して 4°C にて 2 日間透析しながら His タグを切断した。

SDS-PAGEにて切断反応が進行したことを確認した後、バッファーFで平衡化した His-SELECT™ Ni²⁺ affinity gel にアプライした。素通り画分と 50 mM のイミダゾールを含む 5 CV のバッファーF 洗浄画分を合わせて回収した。

分画分子量 10 K の透析膜を用い、20 倍量の 10 mM リン酸カリウム (pH 6.5), 10 mM KCl, 0.5 mM DDM (バッファーG) に対して 4°C で 6 時間以上透析することで塩濃度を低下させ、バッファーGにて平衡化した SP sepharose FF (GE) にアプライした。30 CV の 10 mM リン酸カリウム (pH 6.5), 10 mM KCl, 0.4 mM n-Dodecyl-d25-β-D-Maltopyranoside (tail-d DDM) (Anatrace) にて洗浄して DDM を tail-d DDM へと交換し、10 CV の 10 mM リン酸カリウム (pH 6.5), 600 mM KCl, 0.4 mM tail-d DDM にて溶出させた。溶出画分は分画分子量 30 K の Amicon® Ultra-15 により 300 μL まで濃縮、4 mL のバッファー (20 mM リン酸カリウム (pD 6.5), 100 mM KCl, 99.8 % D₂O) で希釈する操作を 3 回繰り返した。250 μL まで濃縮した溶液を回収し、0.1 M の DCl 溶液を用いて pD 3.0 に調整後、遠心操作で不溶物を除去し、直径 5 mm のマイクロ試験管 (Shigemi) に充填して NMR 測定に用いた。NMR サンプルの濃度は 280 nm の波長の紫外吸光度から算出し、野生型では単量体として 600 μM、E71Q 変異体では 650 μM と算出した。

5-3. NMR 測定

¹H の化学シフト値は DSS のメチル基の ¹H の化学シフト値を 0 ppm として補正し、¹³C の化学シフト値は ¹H の補正值をもとに磁気回転比の比を用いて補正した[66]。自由誘導減衰 (free induction decay, FID) の取り込みおよびフーリエ変換は Topspin ver.2.1 もしくは ver.3.1 (Bruker Biospin) を用い、NMR スペクトルの解析には Topspin、Sparky ver.3.114 (T. D. Goddard and D. G. Kneller, Sparky 3, University of California, San Francisco) を用いた。

5-3-1. メチル- ΔR_{MQ} 測定

測定原理

側鎖メチル基の ΔR_{MQ} は、主鎖アミド基 ^1H - ^{15}N スピン系の測定法[41]を参考に、カルテシアン演算子で表記するところの $2C_xH_x$ コヒーレンスと、 $2C_yH_y$ コヒーレンスが ΔR_{MQ} 依存的に交換することを利用して ΔR_{MQ} を算出することとした。

$2C_xH_x$ コヒーレンスと $2C_yH_y$ コヒーレンスは昇降演算子を用いて表記される DQ 成分 (C^+H^+ , C^-H^-) と ZQ 成分 (C^+H^- , C^-H^+) の重ね合わせとして表記できる。

$$2C_xH_x = 0.5 * (C^+H^+ + C^+H^- + C^-H^+ + C^-H^-)$$

$$2C_yH_y = -0.5 * (C^+H^+ - C^+H^- - C^-H^+ + C^-H^-)$$

したがって、時間 T における $2C_xH_x$, $2C_yH_y$ の大きさは、DQ 成分, ZQ 成分の緩和速度 R_{DQ} , R_{ZQ} を用いて以下の式で表せる。

$$\begin{aligned} \langle 2C_xH_x \rangle(T) = & 0.5 * \exp(-R_{DQ}T)[\langle C^+H^+ \rangle(0) + \langle C^-H^- \rangle(0)] + 0.5 \\ & * \exp(-R_{ZQ}T)[\langle C^+H^- \rangle(0) + \langle C^-H^+ \rangle(0)] \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \langle 2C_yH_y \rangle(T) = & -0.5 * \exp(-R_{DQ}T)[\langle C^+H^+ \rangle(0) + \langle C^-H^- \rangle(0)] + 0.5 \\ & * \exp(-R_{ZQ}T)[\langle C^+H^- \rangle(0) + \langle C^-H^+ \rangle(0)] \end{aligned}$$

そのため、 $2C_xH_x$, $2C_yH_y$ の比をとると

$$\begin{aligned}
\frac{\langle 2C_yH_y \rangle(T)}{\langle 2C_xH_x \rangle(T)} &= \frac{-0.5 * \exp(-R_{DQ}T) + 0.5 * \exp(-R_{ZQ}T)}{0.5 * \exp(-R_{DQ}T) + 0.5 * \exp(-R_{ZQ}T)} \\
&= \tanh\left(\frac{R_{DQ} - R_{ZQ}}{2} T\right) \\
&= \tanh\left(\frac{\Delta R_{MQ}}{2} T\right)
\end{aligned}$$

したがって、 $2C_xH_x$ コヒーレンス観測時と、 $2C_yH_y$ コヒーレンス観測時のシグナル強度を各コヒーレンスで展開する緩和の展開時間 T に対してプロットするにより ΔR_{MQ} 算出することができる。

測定方法

側鎖メチル基を対象として $2C_xH_x$ コヒーレンスと $2C_yH_y$ コヒーレンスの交換か ΔR_{MQ} を解析するためのパルスシーケンスを考案した (Fig. 45)。(A) HDR を照射しないスピンエコー型の測定と、(B) 化学効果の影響を抑制した HDR 型の測定の 2 種類からなる。Fig. 45 には (A) スピンエコー型、もしくは (B) HDR 型の ΔR_{MQ} 測定のパルススキームを示した。いずれの測定も $2C_xH_x$ コヒーレンスとした状態で、展開時間 T の間にスピンエコー、もしくは HDR パルスによってリフォーカスし、 $2C_yH_y$ もしくは $2C_xH_x$ を磁場勾配により選択して観測を行う。高分子量タンパク質への応用を踏まえて、シーケンス全体は MQ コヒーレンスになるようにしており、methyl-TROSY 効果が有効である[26, 31]。HDR パルスは先行報告を参考に WALTZ-16 の位相を反転させて連続させた WALTZ-32 スキームを用いた[67]。パルスの周波数は $^1H, ^{13}C$ が同一となるように設定した。また、 t_1 展開期の磁化の展開は感度向上とアーティファクトのピークを抑制するため ZQ コヒーレンスの状態で行い、先行研究の緩和の速い成分のピーク消去するスキームを用いた[57]。

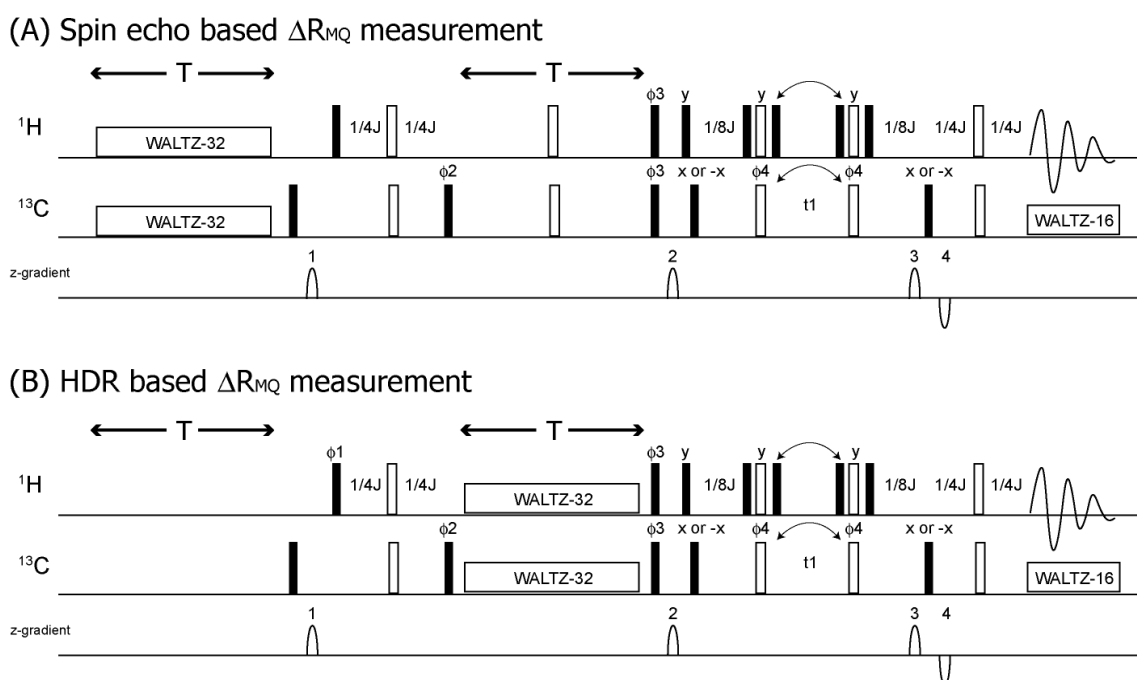


Fig. 45 (A) スピンエコー型, ならびに (B) HDR 型の側鎖 ^1H - ^{13}C メチル基観測型 ΔR_{MQ} HZQC のパルス。

(A)では熱補正のため最初にオフレゾナンス (^1H 5,000 ppm, ^{13}C 20,000 ppm) のHDRを含む。また、溶媒の水シグナルの消去は緩和待ち時間の間 ^1H の化学シフト値 4.7 ppm を事前飽和することで行った。磁化移動は $J=145$ (Hz) として、それぞれ表記の待ち時間で行っている。 $2\text{C}_x\text{H}_x$ スタート実験では $\phi_1=x$, $\phi_2=(2y,-2y)$, $\phi_3=y$ or x , $\phi_4=(x,-x)$ or $(-x,x)$, $\text{rec}=(x,-x,-x,x)$, $2\text{C}_y\text{H}_y$ スタート実験では $\phi_1=y$, $\phi_2=(-2x,2x)$, $\phi_3=y$ or x , $\phi_4=(x,-x)$ or $(-x,x)$, $\text{rec}=(x,-x,-x,x)$, ϕ_3 は $2\text{C}_x\text{H}_x$ 観測時には y , $2\text{C}_y\text{H}_y$ 観測時は x とする。 $g_1 = (15 \text{ G/cm}, 1 \text{ ms})$, $g_2 = (50 \text{ G/cm}, 1 \text{ ms})$, $g_3 = (30 \text{ G/cm}, 1 \text{ ms})$ or $(18 \text{ G/cm}, 1 \text{ ms})$, $g_4 = (-22.5 \text{ G/cm}, 1 \text{ ms})$ 矢印で示したパルスの位置、ならびに ϕ_4 と g_3 は先行研究に従い、outer multiplet が inphase となる FID と anti phase となる FID、ならびに echo, anti-echo を選択しプロセスする。[57]

データ解析方法

スピンエコー型の実験では ① $2\text{C}_x\text{H}_x \rightarrow 2\text{C}_x\text{H}_x$ 観測実験、② $2\text{C}_x\text{H}_x \rightarrow 2\text{C}_y\text{H}_y$ 観測実験の 2 種類の実験を行い、それぞれのシグナル強度の比から $\Delta R_{MQ, \text{obs}}$ を算出した。

- ① スピンエコー型 $2\text{C}_x\text{H}_x \rightarrow 2\text{C}_x\text{H}_x$ 観測実験 ($\phi_3=y$)
- ② スピンエコー型 $2\text{C}_x\text{H}_x \rightarrow 2\text{C}_y\text{H}_y$ 観測実験 ($\phi_3=x$)

$$\frac{2C_yH_y}{2C_xH_x} = \frac{\text{②の強度}}{\text{①の強度}} = \tanh\left(\frac{\Delta R_{MQ,SE}T}{2}\right)$$

HDR 型の実験ではスピンエコー型と同じ ① $2C_xH_x \rightarrow 2C_xH_x$ 観測実験、② $2C_xH_x \rightarrow 2C_yH_y$ 観測実験に加えて、測定の位相を 90° ずらして初期状態を $2C_yH_y$ とした ③ $2C_yH_y \rightarrow 2C_yH_y$ 観測実験、④ $2C_yH_y \rightarrow 2C_xH_x$ 観測実験の計 4 種類の実験を行い、それぞれのシグナル強度の比から $\Delta R_{MQ,obs(HDR)}$ を算出した。これは、HDR シークエンス中の緩和速度が $2C_xH_x$ と $2C_yH_y$ で異なることによる影響を補正するものである[48, 68]。

- ① HDR 型 $2C_xH_x \rightarrow 2C_xH_x$ 観測実験 ($\phi_1=x, \phi_3=y$)
- ② HDR 型 $2C_xH_x \rightarrow 2C_yH_y$ 観測実験 ($\phi_1=x, \phi_3=x$)
- ③ HDR 型 $2C_yH_y \rightarrow 2C_yH_y$ 観測実験 ($\phi_1=y, \phi_3=x$)
- ④ HDR 型 $2C_yH_y \rightarrow 2C_xH_x$ 観測実験 ($\phi_1=y, \phi_3=y$)

$$\frac{2C_yH_y}{2C_xH_x} = \sqrt{\frac{\text{②の強度} \times \text{④の強度}}{\text{①の強度} \times \text{③の強度}}} = \tanh\left(\frac{\Delta R_{MQ,HDR}T}{2}\right)$$

(A) のスピンエコー型の測定、(B) の HDR 型の測定ともに、T を変化させながら $2C_yH_y$ と $2C_xH_x$ のときの強度比を算出し、フィッティングすることにより ΔR_{MQ} を算出した。感度の問題で複数測定を行うのは困難である場合には単一の T における強度比から、 ΔR_{MQ} を算出した。フィッティングはプログラミング言語 python 2.7 (<https://www.python.org/>) を用いた自作のスクリプトにより、scipy パッケージの optimize 関数を用いて実測値と計算値の差の 2 乗和が最小となるよう準ニュートン法により最適化することで算出した。

HDR 法により化学交換の寄与を分離する場合には、スピンエコー型の 2 測定から $\Delta R_{MQ,obs}$ 、

を、HDR 型の 4 測定から $\Delta R_{MQ,obs(HDR)}$ を算出した。これらは下記の化学効果非依存項を含む。

$$\Delta R_{MQ,obs} = \Delta R_{MQ,DD} + \Delta R_{MQ,CSA} + \Delta R_{MQ,ex}$$

$$2 \times \Delta R_{MQ,obs(HDR)} = \Delta R_{MQ,DD} + \Delta R_{MQ,CSA}$$

化学交換の寄与 $\Delta R_{MQ,ex}$ は以下の式から算出した。

$$\Delta R_{MQ,ex} = \Delta R_{MQ,obs} - 2 \times \Delta R_{MQ,obs(HDR)}$$

磁場依存性解析法により化学交換の寄与を評価する場合には、複数の磁場強度で (A) のスピンエコー型の測定から $\Delta R_{MQ,obs}$ を算出し、磁場強度の 2 乗に対する傾きを評価することで行った。傾きはプログラミング言語 python 2.7 を用いた自作のスクリプトにより、scipy パッケージの stats.linregress 関数を用いて計算した。

誤差の評価

誤差の評価はシグナルのシグナルノイズ (SN) 比を用いたモンテカルロシミュレーションにより行った[69]。シグナル強度に対して spraky より算出された SN 比を標準偏差とするランダムな誤差を付与した 250~500 組の仮想データを作成した。各仮想データに対してそれぞれ ΔR_{MQ} を算出し、算出された ΔR_{MQ} 群の標準偏差を誤差として採用した。

MBP の測定条件

{u-²H, Ile δ 1-[¹³CH₃]} MBP のメチル- ΔR_{MQ} 解析は TXI cryo probe を装着した Avance 500 を用いて、4°Cにて解析を行った。緩和の展開時間 T は 9.6, 19.2, 28.8, 38.4, 48.0 (ms) として、

スピンエコー、もしくは 10 kHz の HDR パルスを照射した。2C_xH_x 観測の実験では積算回数 2 回、2C_yH_y 観測の実験では積算回数 8 回とし、繰り返しの待ち時間は 2.5 秒とした。ポイント数とオフセット周波数は以下のとおりである。

Table. 2 MBP のメチル- ΔR_{MQ} 測定条件

	Data point	Spectral width (ppm)	Offset (ppm)
F1 (¹³ C)	80	8	9.56
F2 (¹ H)	1024	10	0.21

FF ドメインの測定条件

{u-²H, Ile δ 1-[¹³CH₃], Leu/Val-[¹³CH₃, ¹²CD₃]} FF ドメインのメチル- ΔR_{MQ} 解析は TXI cryo probe を装着した Avance 600 を用いて、30°Cにて解析を行った。

スピンエコーによる $\Delta R_{MQ,obs}$ の解析は、緩和の展開時間 T を 38.4 (ms) 、繰り返しの待ち時間は 2.5 秒として下記の条件で行った。2C_xH_x 観測の実験では積算回数 8 回、2C_yH_y 観測の実験では積算回数 128 回とし、ポイント数とオフセット周波数は以下のとおりである。

Table. 3 FF ドメインのメチル- ΔR_{MQ} 測定条件①

	Data point	Spectral width (ppm)	Offset (ppm)
F1 (¹³ C)	60	20	20
F2 (¹ H)	1024	12	0.6

HDR パルスを照射しながら測定する $\Delta R_{MQ,obs}$ (HDR) の解析は、照射のオフレゾナンス効果を最小に抑えるために、4 つの測定に分けて行った。いずれの条件も緩和の展開時間 T は 38.4 (ms) 、繰り返しの待ち時間は 2.5 秒とした。

Leu24 δ 1, Val30 γ 1, Val30 γ 2, Leu55 δ 1, Leu55 δ 2, Val67 γ 1, Val67 γ 2 を対象とする測定は、下記の

条件で行った。 $2C_xH_x$ 観測の実験では積算回数 8 回、 $2C_yH_y$ 観測の実験では積算回数 128 回とした。

Table. 4 FF ドメインのメチル- ΔR_{MQ} 測定条件②

	Data point	Spectral width (ppm)	Offset (ppm)
F1 (^{13}C)	48	16	20.0
F2 (1H)	1024	12	0.96

Leu24 δ 2, Leu25 δ 1, Leu25 δ 2, Leu52 δ 2 を対象とする測定は、下記の条件で行った。 $2C_xH_x$ 観測の実験では積算回数 8 回、 $2C_yH_y$ 観測の実験では積算回数 128 回とした。

Table. 5 FF ドメインのメチル- ΔR_{MQ} 測定条件③

	Data point	Spectral width (ppm)	Offset (ppm)
F1 (^{13}C)	48	16	22.2
F2 (1H)	1024	12	0.64

Ile43 δ 1, Ile44 δ 1 を対象とする測定は、下記の条件で行った。 $2C_xH_x$ 観測の実験では積算回数 4 回、 $2C_yH_y$ 観測の実験では積算回数 64 回とした。

Table. 6 FF ドメインのメチル- ΔR_{MQ} 測定条件④

	Data point	Spectral width (ppm)	Offset (ppm)
F1 (^{13}C)	48	16	11.2
F2 (1H)	1024	12	0.58

Leu52 δ 1 を対象とする測定は、下記の条件で行った。 $2C_xH_x$ 観測の実験では積算回数 16 回、

$2C_yH_y$ 観測の実験では積算回数 256 回とした。

Table. 7 FF ドメインのメチル- ΔR_{MQ} 測定条件⑤

	Data point	Spectral width (ppm)	Offset (ppm)
F1 (^{13}C)	18	6	23.1
F2 (1H)	1024	12	0.09

KcsA の測定条件

{ u - 2H , Leu/Val- [$^{13}CH_3$, $^{12}CD_3$]} KcsA のスピンエコーによる $\Delta R_{MQ,obs}$ の解析は、TXI cryo probe を装着した Avance 500, Avance 600 ならびに、TCI cryo probe を装着した Avance 800 を用いて、 $35^\circ C$ にて解析を行った緩和の展開時間 T を 38.4 (ms) 、繰り返しの待ち時間は 2.5 秒とした。 $2C_xH_x$ 観測の実験では積算回数 8 または 16 回、 $2C_yH_y$ 観測の実験では積算回数 32 または 64 回とした。ポイント数とオフセット周波数は以下のとおりである。

Table. 8 KcsA ドメインのメチル- ΔR_{MQ} 測定条件①

	Data point	Spectral width (ppm)	Offset (ppm)
F1 (^{13}C)	96	14	20.6
F2 (1H)	1024	10	1.0

HDR パルスを照射しながら測定する $\Delta R_{MQ,obs} (HDR)$ の解析は、TXI cryo probe を装着した Avance 500 を用いて行った。照射のオフレゾナンス効果を最小に抑えるために、3つの測定に分けて行った。いずれの条件も緩和の展開時間 T は 38.4 (ms) 、繰り返しの待ち時間は 2.5 秒とした。

Val39 γ 2, Leu40 δ 2, Val48 γ 1, Val84 γ 2, Val91 γ 2, Val93 γ 2, Val95 γ 1, Val126 γ 1, Val126 γ 2 を対象とする測定は、下記の条件で行った。 $2C_xH_x$ 観測の実験では積算回数 8 回、 $2C_yH_y$ 観測の実験

では積算回数 80 回とした。

Table. 9 KcsA ドメインのメチル- ΔR_{MQ} 測定条件①

	Data point	Spectral width (ppm)	Offset (ppm)
F1 (^{13}C)	96	14	18.0
F2 (^1H)	1024	10	1.1

Leu15 δ 1, Leu17 δ 1, Leu17 δ 2, Leu24 δ 1, Leu35 δ 2, Leu41 δ 1, Leu49 δ 1, Leu81 δ 1, Leu86 δ 1, Leu105 δ 2, Leu110 δ 1 を対象とする測定は、下記の条件で行った。2C_xH_x 観測の実験では積算回数 8 回、2C_yH_y 観測の実験では積算回数 80 回とした。

Table. 10 KcsA ドメインのメチル- ΔR_{MQ} 測定条件②

	Data point	Spectral width (ppm)	Offset (ppm)
F1 (^{13}C)	96	14	23.0
F2 (^1H)	1024	10	0.8

Leu59 δ 1, Val76 γ 1 を対象とする測定は、下記の条件で行った。2C_xH_x 観測の実験では積算回数 8 回、2C_yH_y 観測の実験では積算回数 80 回とした。

Table. 11 KcsA ドメインのメチル- ΔR_{MQ} 測定条件③

	Data point	Spectral width (ppm)	Offset (ppm)
F1 (^{13}C)	48	7.0	19.6
F2 (^1H)	1024	10	-0.33

5-3-2. CPMG 緩和分散解析

測定方法

^1H の SQ CPMG 緩和分散実験は先行報告[34]に基づき行った。パルスシーケンス中の最初の溶媒除去は事前飽和に変えたものを用いた。 ^{13}C の SQ CPMG 緩和分散実験は先行報告[35]に基づき行った。間接観測軸の周波数展開は MQ 遷移を観測するものを用いた。

データ解析方法

緩和の展開時間における見かけの $R_{2,\text{eff}}$ ならびにその誤差 $\Delta R_{2,\text{eff}}$ は以下の式を用いて算出した。 I と SN は各 CPMG 周波数におけるシグナル強度、シグナルの SN 比である。誤差が 2%未満となる場合には、2%を誤差として計算に用いた。

$$R_{2,\text{eff}}(v_{\text{CPMG}}) = -\frac{1}{T} \ln \left(\frac{I_{v_{\text{CPMG}}}}{I_{\text{ref}}} \right)$$
$$\Delta R_{2,\text{eff}}(v_{\text{CPMG}}) = \frac{1}{T} \cdot \frac{1}{SN_{v_{\text{CPMG}}}}$$

MBP の測定条件

{ $u\text{-}^2\text{H}$, $11\text{e}\delta 1\text{-}[^{13}\text{C}\text{H}_3]$ } MBP の ^{13}C SQ CPMG 緩和分散解析は TXI cryo probe を装着した Avance 500 を用いて、 4°C にて解析を行った。

緩和の展開時間 T は 40 ms とし、CPMG 周波数は v_{CPMG} 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 Hz とした。繰り返しの待ち時間は 1.5 秒、積算回数は 4 回、ポイント数とオフセット周波数は以下のとおりである。

Table. 12 FF ドメインの ^{13}C CPMG 緩和分散測定条件

Channel	Data point	Spectral width (ppm)	Offset (ppm)
F1 (^{13}C)	96	12	9.5
F2 (^1H)	1024	7	4.7

FF ドメインの測定条件

{u- ^2H , Ile δ 1-[$^{13}\text{CH}_3$], Leu/Val-[$^{13}\text{CH}_3$, $^{12}\text{CD}_3$]} FF ドメインの ^1H SQ CPMG 緩和分散解析は TXI cryo probe を装着した Avance 600、ならびに TCI cryo probe を装着した Avance 800 を用いて、 30°C にて解析を行った。

緩和の展開時間 T は 40 ms とし、CPMG 周波数は ν_{CPMG} 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1200, 1400, 1600, 2000 Hz とした。繰り返しの待ち時間は 1.2 秒、積算回数は 36 回、ポイント数とオフセット周波数は以下のとおりである。

Table. 13 FF ドメインの ^1H CPMG 緩和分散測定条件

	Data point	Spectral width (ppm)	Offset (ppm)
F1 (^{13}C)	96	16	17
F2 (^1H)	1024	12	0.8

^{13}C SQ CPMG 緩和分散解析は TXI cryo probe を装着した Avance 600、ならびに TCI cryo probe を装着した Avance 800 を用いて、 30°C にて解析を行った。緩和の展開時間 T は 40 ms とし、CPMG 周波数は ν_{CPMG} 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 Hz とした。繰り返しの待ち時間は 1.2 秒、積算回数は 8 回、ポイント数とオフセット周波数は以下のとおりである。ただし、CPMG 照射中のみ ^1H オフセットは 0.8 ppm とした。

Table. 14 FF ドメインの ^{13}C CPMG 緩和分散測定条件

	Data point	Spectral width (ppm)	Offset (ppm)
F1 (^{13}C)	96	16	17
F2 (^1H)	1024	12	4.7

フィッティング方法

FF ドメインを用いた検討では、得られた CPMG 緩和分散曲線から交換速度、存在割合、各メチル基の化学シフト差を算出した。

$R_{2,eff}$ は下記の Carver & Richards 式に対してフィッティングした[23]。

$$R_{2,eff} = R_{2,0} + \frac{k_{ex}}{2} - \nu_{CPMG} \cosh^{-1}[D_+ \cosh(\eta_+) - D_- \cos(\eta_-)]$$

$$D_{\pm} = \frac{1}{2} \left[\pm 1 + \frac{\Psi + 2 \Delta \omega^2}{(\Psi^2 + \xi^2)^{1/2}} \right]$$

$$\Psi = k_{ex}^2 - \Delta \omega^2$$

$$\xi = -2 \Delta \omega (p_1 k_{ex} - p_2 k_{ex})$$

フィッティングは評価関数 $\chi^2(\mathbf{n})$ を定義し、 $\chi^2(\mathbf{n})$ が最小となるように Nelder-Mead アルゴリズム[70]により各パラメーターを最適化した。 \mathbf{n} はパラメーターの総数である。計算はプログラミング言語 python 2.7 を用いた自作のスクリプトにより、scipy パッケージの optimize 関数を用いて行った。

$$\chi^2(n) = \sum \frac{(R_{2,eff,calc}(n) - R_{2,eff})^2}{(\Delta R_{2,eff})^2}$$

フィッティングは ^1H , ^{13}C のデータを同時に解析に用いた。CPMG 周波数が最も小さいときと大きいときの $R_{2,eff}$ の差 $\Delta R_{2,eff}$ が 5 s^{-1} 以上のデータを用いたグローバルフィッティングによって k_{ex} , p_B を算出し、算出された k_{ex} , p_B を用いて各 ^1H , ^{13}C の緩和分散曲線を個別にフィッティングし、 $R_{2,0}$ と化学シフト差を算出した。

CPMG 緩和分散解析の誤差はブートストラップ法により算出した[71]。フィッティングに用いる n 個のデータ群から重複を許してランダムに n 個のデータを抽出し、抽出したデータにフィッティングすることでパラメーターを算出した。この操作を 500 回繰り返し、算出されたパラメーターの標準偏差を誤差として採用した。

CPMG 緩和分散から算出されたパラメーターを用いた $\Delta R_{MQ,ex}$ の逆計算

CPMG 緩和分散から k_{ex} , p_B , 化学シフト差を用いて下記式により $\Delta R_{MQ,ex}$ の値を逆計算した[45]。

$$\Delta R_{MQ,ex} = -\frac{\sqrt{2}}{4} \left\{ k_{ex}^2 - \Delta\omega_{DQ}^2 + \left[(k_{ex}^2 + \Delta\omega_{DQ}^2)^2 - 16\Delta\omega_{DQ}^2 k_{ex}^2 p_1 p_2 \right]^{\frac{1}{2}} \right\}^{\frac{1}{2}} \\ + \frac{\sqrt{2}}{4} \left\{ k_{ex}^2 - \Delta\omega_{ZQ}^2 + \left[(k_{ex}^2 + \Delta\omega_{ZQ}^2)^2 - 16\Delta\omega_{ZQ}^2 k_{ex}^2 p_1 p_2 \right]^{\frac{1}{2}} \right\}^{\frac{1}{2}}$$

$$\Delta\omega_{DQ} = |\Delta\omega_H + \Delta\omega_C|$$

$$\Delta\omega_{ZQ} = |\Delta\omega_H - \Delta\omega_C|$$

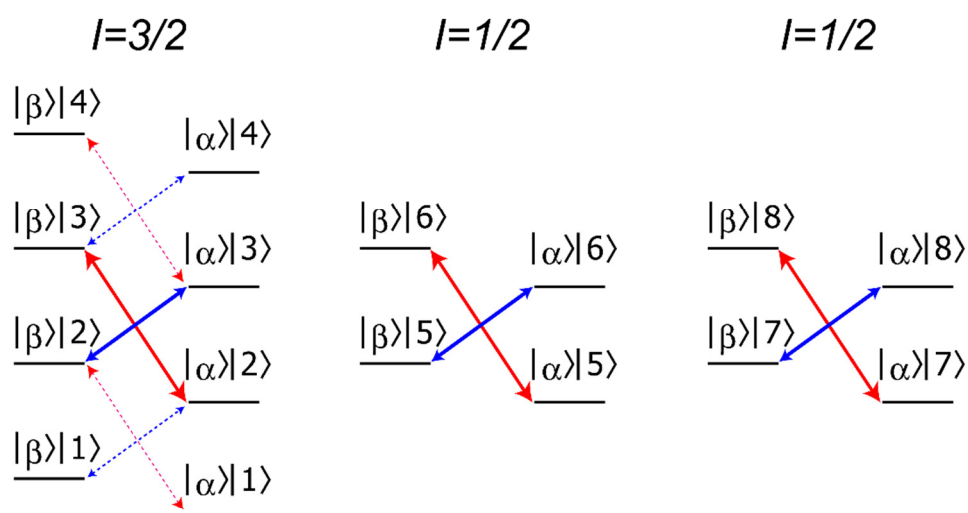
5-4. HDR パルス照射のシミュレーション

シミュレーションに用いるモデルスピンの仮定

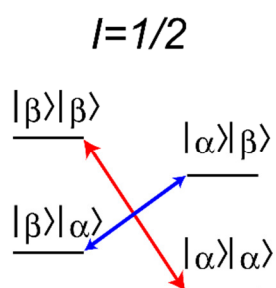
本研究で用いるモデルスピン系についての仮定を行う。

メチル基 $^{13}\text{C}^1\text{H}_3$ のスピン系は Fig. 46(A) で示すように ^1H が 8 つの状態、 ^{13}C が 2 つの状態からなる計 16 の一量子遷移からなり、それぞれ二量子遷移、零量子遷移に対応する矢印を図中に示している。各遷移の緩和速度は異なり、緩和の遅い太線の遷移がメチル TROSY に主において観測される成分となる[26, 31]。本来は Fig. 46 (A) のスピン系でシミュレーションなどを行う必要があるものの、本項では Fig. 46 (B) に示すように緩和の遅い $I=1/2$ の成分のみからなる $^{13}\text{C}^1\text{H}$ の単純な 2 スピン系で近似して取り扱うこととする。この取扱いは、化学交換の影響は 2 スピン系でも同等であること、HDR は高周波数のコンポジットパルス系列から構成されており、緩和速度の異なる遷移の影響が混合する原因となるパルスの不完全性や J カップリングの展開の影響が小さくなると予想できることから妥当であると考えた。

(A) CH₃ Methyl spin system



(B) CH spin system



$ 1\rangle = \alpha\alpha\alpha\rangle$ $ 2\rangle = (\alpha\alpha\beta\rangle + \alpha\beta\alpha\rangle + \beta\alpha\alpha\rangle) / \sqrt{3}$ $ 3\rangle = (\beta\beta\alpha\rangle + \beta\alpha\beta\rangle + \alpha\beta\beta\rangle) / \sqrt{3}$ $ 4\rangle = \beta\beta\beta\rangle$ $ 5\rangle = (\alpha\alpha\beta\rangle - \alpha\beta\alpha\rangle) / \sqrt{2}$ $ 6\rangle = (\beta\alpha\beta\rangle - \beta\beta\alpha\rangle) / \sqrt{2}$ $ 7\rangle = (\alpha\alpha\beta\rangle + \alpha\beta\alpha\rangle - 2 \beta\alpha\alpha\rangle) / \sqrt{6}$ $ 8\rangle = (2 \alpha\beta\beta\rangle - \beta\beta\alpha\rangle - \beta\alpha\beta\rangle) / \sqrt{6}$

Red : Double quantum

Blue : Zero quantum

Bold line : Slow relaxation due to TROSY effect

Fig. 46 メチルスピンのエネルギー図

(A) ¹³C¹H₃ スピン系のエネルギー図[26, 31]

(B) ¹³C¹H スピン系のエネルギー図

各状態のうち左が ¹³C, 右が ¹H のスピンの状態を示している。

二量子遷移をマゼンタの矢印、零量子遷移をシアンの矢印で示した。

Methyl-TROSY 効果により緩和の速い遷移を細い矢印で、緩和の遅い遷移を太い矢印で示した。

する。 iH_A, iH_B は J カップリングとラジオ波パルスの寄与は同一で、化学シフト差 Ω のみが異なるものとする。

化学交換を記述するために、状態の遷移に対応する速度行列を定義する。 k_{AB}, k_{BA} はそれぞれ A 状態から B 状態、B 状態から A 状態への遷移速度を表す。

$$K = \begin{bmatrix} -k_{AB} & k_{BA} \\ k_{AB} & -k_{BA} \end{bmatrix}$$

以上より、系全体の密度演算子 σ 、ならびにリウヴィリアン超演算子 L を以下の式で表す。 E は 16×16 の unity 超演算子である。

$$\sigma = \begin{bmatrix} \sigma_A \\ \sigma_B \end{bmatrix}$$

$$L = \begin{bmatrix} 1 & 0 \\ 0 & 0 \end{bmatrix} \otimes i\mathcal{H}_A + \begin{bmatrix} 0 & 0 \\ 0 & 1 \end{bmatrix} \otimes i\mathcal{H}_B - K \otimes E$$

時間 t における密度演算子 $\sigma(t)$ を以下のマスター方程式を用いて計算を行った。

$$\frac{d}{dt}\sigma(t) = -L \cdot \sigma(t)$$

実際の計算は HDR 中の WALTZ-32 のパルス系列に従いそれぞれの 180° パルスに対応する区間 Δt に分割し、対応する L を順々に作用させて計算を行った。

$$\sigma(t_1 + \Delta t) = \exp(-L\Delta t)\sigma(t_1)$$

初期条件は $2C_xH_x$ もしくは $2C_yH_y$ として、A 状態と B 状態ではそれぞれ $k_{BA}/(k_{AB}+k_{BA})$ と $k_{BA}/(k_{AB}+k_{BA})$ の比となるようにした。A 状態は常にオンレゾナンス ($\Omega=0$) としている。

$\Delta R_{MQ,obs(HDR)}$ の大きさは、下記条件においてシミュレーションした時間 T における $2C_xH_x$ もしくは $2C_yH_y$ の要素を抽出し、その比から計算を行った。

- ① 初期条件 $2C_xH_x \rightarrow 2C_xH_x$
- ② 初期条件 $2C_xH_x \rightarrow 2C_yH_y$
- ③ 初期条件 $2C_yH_y \rightarrow 2C_yH_y$
- ④ 初期条件 $2C_yH_y \rightarrow 2C_xH_x$

$$\frac{2C_yH_y}{2C_xH_x} = \sqrt{\frac{\text{②の要素} \times \text{④の要素}}{\text{①の要素} \times \text{③の要素}}}$$

$$\Delta R_{MQ,obs(HDR)} = \frac{2}{T} \operatorname{arctanh}\left(\frac{2C_yH_y}{2C_xH_x}\right)$$

$\Delta R_{MQ,ex}$ の理論値は以下の式を用いて計算した[41][45]。

$$\Delta R_{MQ,ex} = -\frac{\sqrt{2}}{4} \left\{ k_{ex}^2 - \Delta\omega_{DQ}^2 + \left[(k_{ex}^2 + \Delta\omega_{DQ}^2)^2 - 16\Delta\omega_{DQ}^2 k_{ex}^2 p_1 p_2 \right]^{\frac{1}{2}} \right\}^{\frac{1}{2}} \\ + \frac{\sqrt{2}}{4} \left\{ k_{ex}^2 - \Delta\omega_{ZQ}^2 + \left[(k_{ex}^2 + \Delta\omega_{ZQ}^2)^2 - 16\Delta\omega_{ZQ}^2 k_{ex}^2 p_1 p_2 \right]^{\frac{1}{2}} \right\}^{\frac{1}{2}}$$

$$\Delta\omega_{DQ} = |\Delta\omega_H + \Delta\omega_C|$$

$$\Delta\omega_{ZQ} = |\Delta\omega_H - \Delta\omega_C|$$

$\Delta R_{MQ,ex}$ 計算値と $\Delta R_{MQ,HDR}$ の比較では、直接比較できるようにするため $2*\Delta R_{MQ,obs(HDR)}$ の値をプロットした。

計算はプログラミング言語 python 2.7 を用いた自作のスクリプトにより行った。行列の指数関数は Pade 近似法に基づき scipy パッケージの `linalg.expm` を用いて計算した。

シミュレーション条件

HDR 照射の強度は 10 kHz とし、WALTZ-32 が 10 サイクル分に対応する 48 ms の間計算を行った。交換速度が 1,500、3,000、6,000、12,000 (s^{-1}) の 4 条件において、マイナー状態の割合は 5%、静磁場強度は 14.1 Tesla (1H の共鳴周波数 600 MHz) としとして、10 kHz の強度で HDR パルス照射したときに化学交換の寄与 $\Delta R_{MQ,ex}$ がどの程度抑制されるかを、 ^{13}C の化学シフト差が 20~460 Hz (20 Hz 刻み)、 1H の化学シフト差が 20~320 Hz (20 Hz 刻み) の範囲でそれぞれシミュレーションした。

参考文献

1. Lodish H, B.A., Kaiser CA, Krieger M, Scott MP, Bretscher A, Ploegh H, Matsudaira PT (2007). *Molecular cell biology* 6th edition New York: W. H. Freeman and Company.
2. Schrempf, H., Schmidt, O., Kummerlen, R., Hinnah, S., Muller, D., Betzler, M., Steinkamp, T., and Wagner, R. (1995). A Prokaryotic Potassium-Ion Channel with 2 Predicted Transmembrane Segments from *Streptomyces lividans*. *Embo Journal* *14*, 5170-5178.
3. Cuello, L.G., Romero, J.G., Cortes, D.M., and Perozo, E. (1998). pH-dependent gating in the *Streptomyces lividans* K⁺ channel. *Biochemistry* *37*, 3229-3236.
4. Chakrapani, S., Cordero-Morales, J.F., and Perozo, E. (2007). A quantitative description of KcsA Gating I: Macroscopic currents. *Journal of General Physiology* *130*, 465-478.
5. Doyle, D.A., Morais Cabral, J., Pfuetzner, R.A., Kuo, A., Gulbis, J.M., Cohen, S.L., Chait, B.T., and MacKinnon, R. (1998). The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science* *280*, 69-77.
6. Liu, Y.S., Sompornpisut, P., and Perozo, E. (2001). Structure of the KcsA channel intracellular gate in the open state. *Nature Structural Biology* *8*, 883-887.
7. Zhou, Y.F., Morais-Cabral, J.H., Kaufman, A., and MacKinnon, R. (2001). Chemistry of ion coordination and hydration revealed by a K⁺ channel-Fab complex at 2.0 angstrom resolution. *Nature* *414*, 43-48.
8. Cordero-Morales, J.F., Cuello, L.G., Zhao, Y.X., Jogini, V., Cortes, D.M., Roux, B., and Perozo, E. (2006). Molecular determinants of gating at the potassium-channel selectivity filter. *Nature Structural & Molecular Biology* *13*, 311-318.
9. Cuello, L.G., Jogini, V., Cortes, D.M., and Perozo, E. (2010). Structural mechanism of C-type inactivation in K(+) channels. *Nature* *466*, 203-208.
10. Bähring, R., Dannenberg, J., Peters, H.C., Leicher, T., Pongs, O., and Isbrandt, D. (2001). Conserved Kv4 N-terminal domain critical for effects of Kv channel-interacting protein 2.2 on channel expression and gating. *Journal of Biological Chemistry* *276*, 23888-23894.
11. Uysal, S., Vasquez, V., Tereshko, V., Esaki, K., Fellouse, F.A., Sidhu, S.S., Koide, S., Perozo, E., and Kossiakoff, A. (2009). Crystal structure of full-length KcsA in its closed conformation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *106*, 6644-6649.
12. Takeuchi, K., Takahashi, H., Kawano, S., and Shimada, I. (2007). Identification and characterization of the slowly exchanging pH-dependent conformational rearrangement in KcsA. *Journal of Biological Chemistry* *282*, 15179-15186.
13. Imai, S., Osawa, M., Takeuchi, K., and Shimada, I. (2010). Structural basis underlying the

- dual gate properties of KcsA. *Proc Natl Acad Sci U S A* *107*, 6216-6221.
14. Chakrapani, S., Cordero-Morales, J.F., and Perozo, E. (2007). A quantitative description of KcsA Gating II: Single-channel currents. *Journal of General Physiology* *130*, 479-496.
 15. Imai, S., Osawa, M., Mita, K., Toyonaga, S., Machiyama, A., Ueda, T., Takeuchi, K., Oiki, S., and Shimada, I. (2012). Functional Equilibrium of the KcsA Structure Revealed by NMR. *Journal of Biological Chemistry* *287*.
 16. Garrett, S., and Rosenthal, J.J.C. (2012). RNA Editing Underlies Temperature Adaptation in K⁺ Channels from Polar Octopuses. *Science* *335*, 848-851.
 17. Proks, P., Capener, C.E., Jones, P., and Ashcroft, F.M. (2001). Mutations within the P-loop of Kir6.2 modulate the intraburst kinetics of the ATP-sensitive potassium channel. *Journal of General Physiology* *118*, 341-353.
 18. Chakrapani, S., Cordero-Morales, J.F., Jogini, V., Pan, A.C., Cortes, D.M., Roux, B., and Perozo, E. (2011). On the Structural Basis of Modal Gating Behavior in K⁺ Channels. *Biophysical Journal* *100*, 367-367.
 19. Osawa, M., Takeuchi, K., Ueda, T., Nishida, N., and Shimada, I. (2012). Functional dynamics of proteins revealed by solution NMR. *Current Opinion in Structural Biology* *22*, 660-669.
 20. Mandel, A.M., Akke, M., and Palmer, A.G. (1995). Backbone Dynamics of Escherichia-Coli Ribonuclease Hi - Correlations with Structure and Function in an Active Enzyme. *Journal of Molecular Biology* *246*, 144-163.
 21. Kroenke, C.D., Loria, J.P., Lee, L.K., Rance, M., and Palmer, A.G. (1998). Longitudinal and transverse H-1-N-15 dipolar N-15 chemical shift anisotropy relaxation interference: Unambiguous determination of rotational diffusion tensors and chemical exchange effects in biological macromolecules. *Journal of the American Chemical Society* *120*, 7905-7915.
 22. Davis, D.G., Perlman, M.E., and London, R.E. (1994). Direct Measurements of the Dissociation-Rate Constant for Inhibitor-Enzyme Complexes Via the T-1-Rho and T-2 (Cpmg) Methods. *Journal of Magnetic Resonance Series B* *104*, 266-275.
 23. Carver, J.P., and Richards, R.E. (1972). General 2-Site Solution for Chemical Exchange Produced Dependence of T2 Upon Carr-Purcell Pulse Separation. *Journal of Magnetic Resonance* *6*, 89-&.
 24. Woessner, D.E. (1961). Nuclear Transfer Effects in Nuclear Magnetic Resonance Pulse Experiments. *Journal of Chemical Physics* *35*, 41-&.
 25. Palmer, A.G., 3rd, Kroenke, C.D., and Loria, J.P. (2001). Nuclear magnetic resonance methods for quantifying microsecond-to-millisecond motions in biological macromolecules. *Methods Enzymol* *339*, 204-238.
 26. Tugarinov, V., Hwang, P.M., Ollerenshaw, J.E., and Kay, L.E. (2003). Cross-correlated

- relaxation enhanced ^1H - ^{13}C NMR spectroscopy of methyl groups in very high molecular weight proteins and protein complexes. *J Am Chem Soc* *125*, 10420-10428.
27. Sprangers, R., Gribun, A., Hwang, P.M., Houry, W.A., and Kay, L.E. (2005). Quantitative NMR spectroscopy of supramolecular complexes: Dynamic side pores in ClpP are important for product release. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *102*, 16678-16683.
 28. Sprangers, R., and Kay, L.E. (2007). Quantitative dynamics and binding studies of the 20S proteasome by NMR. *Nature* *445*, 618-622.
 29. Religa, T.L., Sprangers, R., and Kay, L.E. (2010). Dynamic Regulation of Archaeal Proteasome Gate Opening As Studied by TROSY NMR. *Science* *328*, 98-102.
 30. Goto, N.K., Gardner, K.H., Mueller, G.A., Willis, R.C., and Kay, L.E. (1999). A robust and cost-effective method for the production of Val, Leu, Ile (δ 1) methyl-protonated ^{15}N -, ^{13}C -, ^2H -labeled proteins. *J Biomol NMR* *13*, 369-374.
 31. Ollerenshaw, J.E., Tugarinov, V., and Kay, L.E. (2003). Methyl TROSY: explanation and experimental verification. *Magnetic Resonance in Chemistry* *41*, 843-852.
 32. Ishima, R., Louis, J.M., and Torchia, D.A. (1999). Transverse C-13 relaxation of CHD2 methyl isotopomers to detect slow conformational changes of protein side chains. *Journal of the American Chemical Society* *121*, 11589-11590.
 33. Tugarinov, V., and Kay, L.E. (2005). Quantitative C-13 and H-2 NMR relaxation studies of the 723-residue enzyme malate synthase g reveal a dynamic binding Interface. *Biochemistry* *44*, 15970-15977.
 34. Tugarinov, V., and Kay, L.E. (2007). Separating degenerate H-1 transitions in methyl group probes for single-quantum H-1-CPMG relaxation dispersion NMR spectroscopy. *Journal of the American Chemical Society* *129*, 9514-9521.
 35. Lundstrom, P., Vallurupalli, P., Religa, T.L., Dahlquist, F.W., and Kay, L.E. (2007). A single-quantum methyl C-13-relaxation dispersion experiment with improved sensitivity. *Journal of Biomolecular Nmr* *38*, 79-88.
 36. Baldwin, A.J., Religa, T.L., Hansen, D.F., Bouvignies, G., and Kay, L.E. (2010). (CHD2)-C-13 Methyl Group Probes of Millisecond Time Scale Exchange in Proteins by H-1 Relaxation Dispersion: An Application to Proteasome Gating Residue Dynamics. *Journal of the American Chemical Society* *132*, 10992-10995.
 37. Otten, R., Villali, J., Kern, D., and Mulder, F.A.A. (2010). Probing Microsecond Time Scale Dynamics in Proteins by Methyl H-1 Carr-Purcell-Meiboom-Gill Relaxation Dispersion NMR Measurements. Application to Activation of the Signaling Protein NtrC(r). *Journal of the American Chemical Society* *132*, 17004-17014.
 38. Bouvignies, G., and Kay, L.E. (2012). A 2D C-13-CEST experiment for studying slowly

- exchanging protein systems using methyl probes: an application to protein folding. *Journal of Biomolecular Nmr* *53*, 303-310.
39. Korzhnev, D.M., Kloiber, K., Kanelis, V., Tugarinov, V., and Kay, L.E. (2004). Probing slow dynamics in high molecular weight proteins by methyl-TROSY NMR spectroscopy: Application to a 723-residue enzyme. *Journal of the American Chemical Society* *126*, 3964-3973.
 40. Korzhnev, D.M., Mittermaier, A.K., and Kay, L.E. (2005). Cross-correlated spin relaxation effects in methyl H-1 CPMG-based relaxation dispersion experiments: Complications and a simple solution. *Journal of Biomolecular Nmr* *31*, 337-342.
 41. Kloiber, K., and Konrat, R. (2000). Differential multiple-quantum relaxation arising from cross-correlated time-modulation of isotropic chemical shifts. *Journal of Biomolecular Nmr* *18*, 33-42.
 42. Fruh, D., Tolman, J.R., Bodenhausen, G., and Zwahlen, C. (2001). Cross-correlated chemical shift modulation: A signature of slow internal motions in proteins. *Journal of the American Chemical Society* *123*, 4810-4816.
 43. Chiarparin, E., Rudisser, S., and Bodenhausen, G. (2001). Hydrogen bonds in RNA base pairs investigated by cross-correlated relaxation of multiple-quantum coherence in NMR. *Chemphyschem* *2*, 41-45.
 44. Lundstrom, P., Mulder, F.A.A., and Akke, M. (2005). Correlated dynamics of consecutive residues reveal transient and cooperative unfolding of secondary structure in proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *102*, 16984-16989.
 45. Wang, C.Y., and Palmer, A.G. (2002). Differential multiple quantum relaxation caused by chemical exchange outside the fast exchange limit. *Journal of Biomolecular Nmr* *24*, 263-268.
 46. Tugarinov, V., Sprangers, R., and Kay, L.E. (2004). Line narrowing in methyl-TROSY using zero-quantum H-1-C-13 NMR spectroscopy. *Journal of the American Chemical Society* *126*, 4921-4925.
 47. Konrat, R., and Sterk, H. (1993). Cross-Correlation Effects in the Transverse Relaxation of Multiple-Quantum Transitions of Heteronuclear Spin Systems. *Chemical Physics Letters* *203*, 75-80.
 48. Ulzega, S., Verde, M., Ferrage, F., and Bodenhausen, G. (2009). Heteronuclear double resonance in nuclear magnetic resonance spectroscopy: Relaxation of multiple-quantum coherences. *Journal of Chemical Physics* *131*.
 49. Lundstrom, P., and Akke, M. (2004). Quantitative analysis of conformational exchange contributions to H-1-N-15 multiple-quantum relaxation using field-dependent

- measurements. Time scale and structural characterization of exchange in a calmodulin C-terminal domain mutant. *Journal of the American Chemical Society* *126*, 928-935.
50. Tugarinov, V., Scheurer, C., Bruschweiler, R., and Kay, L.E. (2004). Estimates of methyl C-13 and H-1 CSA values ($\Delta\sigma$) in proteins from cross-correlated spin relaxation. *Journal of Biomolecular Nmr* *30*, 397-406.
 51. Gardner, K.H., Zhang, X.C., Gehring, K., and Kay, L.E. (1998). Solution NMR studies of a 42 KDa Escherichia coli maltose binding protein beta-cyclodextrin complex: Chemical shift assignments and analysis. *Journal of the American Chemical Society* *120*, 11738-11748.
 52. Sharff, A.J., Rodseth, L.E., and Quioco, F.A. (1993). Refined 1.8-Angstrom Structure Reveals the Mode of Binding of Beta-Cyclodextrin to the Maltodextrin Binding-Protein. *Biochemistry* *32*, 10553-10559.
 53. Allen, M., Friedler, A., Schon, O., and Bycroft, M. (2002). The structure of an FF domain from human HYPA/FBP11. *Journal of Molecular Biology* *323*, 411-416.
 54. Korzhnev, D.M., Religa, T.L., Banachewicz, W., Fersht, A.R., and Kay, L.E. (2010). A Transient and Low-Populated Protein-Folding Intermediate at Atomic Resolution. *Science* *329*, 1312-1316.
 55. Latham, M., and Kay, L. (2014). A Similar In Vitro and In Cell Lysate Folding Intermediate for the FF Domain. *Journal of Molecular Biology* *426*, 3214-20.
 56. Miyazawa-Onami, M., Takeuchi, K., Takano, T., Sugiki, T., Shimada, I., and Takahashi, H. (2013). Perdeuteration and methyl-selective H-1, C-13-labeling by using a Kluyveromyces lactis expression system. *Journal of Biomolecular Nmr* *57*, 297-304.
 57. Gill, M.L., and Palmer, A.G. (2011). Multiplet-filtered and gradient-selected zero-quantum TROSY experiments for (CH₃)-C-13-H-1 methyl groups in proteins. *Journal of Biomolecular Nmr* *51*, 245-251.
 58. Ergel, B., Gill, M.L., Brown, L., Yu, B., III, A.G.P., and Hunt, J.F. (2014). Protein Dynamics Control the Progression and Efficiency of the Catalytic Reaction Cycle of the Escherichia coli DNA-Repair Enzyme AlkB. *Journal of Biological Chemistry* *289*, 29584-601.
 59. Tugarinov, V., Sprangers, R., and Kay, L.E. (2007). Probing side-chain dynamics in the proteasome by relaxation violated coherence transfer NMR spectroscopy. *Journal of the American Chemical Society* *129*, 1743-1750.
 60. Cortes, D.M., and Perozo, E. (1997). Structural dynamics of the Streptomyces lividans K⁺ channel (SKC1): Oligomeric stoichiometry and stability. *Biochemistry* *36*, 10343-10352.
 61. Uysal, S., Cuello, L.G., Cortes, D.M., Koide, S., Kossiakoff, A.A., and Perozo, E. (2011). Mechanism of activation gating in the full-length KcsA K⁺ channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *108*, 11896-11899.
 62. Cuello, L.G., Jogini, V., Cortes, D.M., Pan, A.C., Gagnon, D.G., Dalmas, O., Cordero-

- Morales, J.F., Chakrapani, S., Roux, B., and Perozo, E. (2010). Structural basis for the coupling between activation and inactivation gates in K⁺ channels. *Nature* *466*, 272-U154.
63. Duplay, P., Bedouelle, H., Fowler, A., Zabin, I., Saurin, W., and Hofnung, M. (1984). Sequences of the Male Gene and of Its Product, the Maltose-Binding Protein of Escherichia-Coli-K12. *Journal of Biological Chemistry* *259*, 606-613.
64. Blanchard, J.S. (1984). Buffers for Enzymes. *Methods in Enzymology* *104*, 404-414.
65. Takeuchi, K., Yokogawa, M., Matsuda, T., Sugai, M., Kawano, S., Kohno, T., Nakamura, H., Takahashi, H., and Shimada, I. (2003). Structural basis of the KcsA K⁺ channel and agitoxin2 pore-blocking toxin interaction by using the transferred cross-saturation method. *Structure* *11*, 1381-1392.
66. Wishart, D.S., Bigam, C.G., Yao, J., Abildgaard, F., Dyson, H.J., Oldfield, E., Markley, J.L., and Sykes, B.D. (1995). H-1, C-13 and N-15 Chemical-Shift Referencing in Biomolecular Nmr. *Journal of Biomolecular Nmr* *6*, 135-140.
67. Salvi, N., Ulzega, S., Ferrage, F., and Bodenhausen, G. (2012). Time Scales of Slow Motions in Ubiquitin Explored by Heteronuclear Double Resonance. *Journal of the American Chemical Society* *134*, 2481-2484.
68. Pelupessy, P., Ferrage, F., and Bodenhausen, G. (2007). Accurate measurement of longitudinal cross-relaxation rates in nuclear magnetic resonance. *Journal of Chemical Physics* *126*.
69. Kamath, U., and Shriver, J.W. (1989). Characterization of Thermotropic State Changes in Myosin Subfragment-1 and Heavy-Meromyosin by Uv Difference Spectroscopy. *Journal of Biological Chemistry* *264*, 5586-5592.
70. Nelder, J.A., and Mead, R. (1965). A Simplex-Method for Function Minimization. *Computer Journal* *7*, 308-313.
71. Choy, W.Y., Zhou, Z., Bai, Y.W., and Kay, L.E. (2005). An N-15 NMR spin relaxation dispersion study of the folding of a pair of engineered mutants of apocytochrome b(562). *Journal of the American Chemical Society* *127*, 5066-5072.
72. Allard, P., Helgstrand, M., and Hard, T. (1998). The complete homogeneous master equation for a heteronuclear two-spin system in the basis of Cartesian product operators. *Journal of Magnetic Resonance* *134*, 7-16.

謝辞

研究を行う機会と最高の環境を与えて下さり、研究を正しい方向へ導くご指導、そして様々な点にわたる御配慮を賜りました、東京大学薬学系研究科生命物理化学教室 嶋田一夫教授に心より深く御礼申し上げます。

研究の方針から、研究者としての在り方に至るまで、常に熱心なご指導、ご鞭撻賜りました、東京大学薬学系研究科生命物理化学教室 大澤匡範講師に心より感謝申し上げます。

本研究に対して多くの御助言、御指導を頂き、また円滑に研究を行うための環境を整えて下さった東京大学薬学系研究科生命物理化学教室 西田紀貴助教、上田卓見助教、幸福裕特任助教に心より感謝申し上げます。

KcsA の発現・精製系の構築、そして NMR 解析条件を確立し、本研究の基礎を築いて頂きました、産業技術総合研究所創薬分子プロファイリング研究センター 竹内恒主任研究員、ならびにハーバード大学博士研究員、今井駿輔博士に心より感謝します。

研究の初期の段階において実験の操作や、研究の進め方など御指導賜りました北海道大学 大学院先端生命科学研究院博士研究員 横川真梨子博士に心より御礼申し上げます。

日々の研究において身近に討論して頂き、多くの御助言を頂きました東京大学薬学系研究科生命物理化学教室の皆様、心より感謝申し上げます。特に、私の稚拙な指導にもかかわらず共に研究に取り組んでくれた岩橋優太学士、加納花穂学士に感謝致します。

そして、これまでの研究生活を支えてくださった家族・友人に心より感謝申し上げます。

外山侑樹は東京大学「ライフイノベーションを先導するリーダー養成プログラム」のコース生です。