

7-2 920MHz NMR の点検評価

7-2-1 Christian Griesinger 教授

原文

To: Hiroki Nakamura, Director-General of IMS

From: Prof. Dr. Christian Griesinger, NMR-basierte Strukturbiologie, Max-Planck-Institut für Biophysikalische Chemie, Göttingen, Germany

Subject: Public report on the activities of the NMR facility, January, 4, 2010

Sir,

the NMR facility's focus is on the 920 MHz instrument that was purchased in 2004 and whose use was described by Prof. Toshihiko Yokoyama and Prof. Koichi Kato to me. Let me first state, that the facility operates extremely successfully and attracts a large fraction of users from the outside of IMS. Only 30% of the measurement time was used for IMS research, while the rest was used by external users that are in collaboration with IMS researchers or who even only use technical support from the IMS in operating the 920 MHz instrument. This is outstanding for a facility. On an international scale I have not seen such a diverse usership. For example, the EU large scale facilities offer no more than 20% of their measurement time to outside users. It is also interesting to observe that both in-house and non-IMS projects that have used the instrument lead to published articles in top journals of the respective sciences. The instrument truly and clearly enables top level research.

At the time of purchase the 920 MHz instrument represented the highest commercially available field for high resolution NMR spectroscopy. The instrument was purchased from JEOL which also maintain it. According to the time sheets, approximately 5400 hours were used for project work out of which 60% are on solution state NMR problems mainly focused on structural biology of proteins and uniquely to Japanese science but also worldwide for glycobiology. 40% of the time is devoted for solid state NMR spectroscopic problems, here mainly focused on materials sciences. The remaining 3300 hours per year were used for spectrometer maintenance including adaptation of NMR pulse sequences to the 920 MHz instrument.

The instrument is equipped with a standard probe, but not yet a cryo-probe. Cryo probes boost sensitivity for samples in organic solvents conventionally by approximately a factor of 3 to 4 and of samples in aqueous solution by a factor of 2 to 3 depending a little on the salt concentration. Compared to other high field NMR instruments in Japan but also worldwide (800, 900, 950 MHz) the Okazaki facility may have a disadvantage with respect to sensitivity especially of protein or glycoprotein samples whose solubility is sub-millimolar or where only limited quantities are available such as for isolated natural compounds. If available a cryo probe should be installed into the 920 MHz instrument. This would maintain this instrument in a unique scientific environment as a national facility with highest sensitivity and resolution power.

The research done on the 920 MHz instrument is state of the art for proteins as well as natural compounds and cutting edge in certain areas. I would like to mention especially the work on glycobiology where the facility could develop into a worldwide center for glycobiological research. Facilities need to adapt to the needs of the scientific communities and researchers in glycobiology will not only require access to the instrumentation but also optimized pulse sequences as well as strategies and possibilities to label their oligosaccharide samples in an optimal way for NMR investigation. This is possible in Okazaki and potentially more users could be attracted by intensifying advertisement of the possibilities. The facility management could also consider organizing a dedicated

structural glycobiochemistry conference in Okazaki in order to make this point even more.

The 920 MHz instrument is also used for solid state NMR applications (40% of the usable time). From the publications it is obvious that here materials science applications are in the focus of the users. The materials science research that originates from this instrument is remarkable, internationally visible and highly collaborative on an international level.

Subject: Public report on the activities of Dr. Kato's group, January, 4, 2010

Sir,

Professor Kato's work is focused on three main aspects of structural biology: Multidomain proteins, glycoproteins and intrinsically disordered proteins: For the first topic he has created a very interesting system, namely di-ubiquitin that is biologically very relevant since ubiquitination redirects proteins into various organelles or molecular machines in the cell. Since the cell has to distinguish the number of ubiquitins as well as the way they are linked together the study of di- and oligoubiquitin is of great interest. With the covalently linked cyclodiubiquitin, a model for the closed conformation has been created and its study will allow to characterize its NMR properties better, but also study whether the open or the closed conformation are recognized by various downstream interaction partners. Another protein is PDI, that catalyzes Cystein-oxidation of proteins. It has been enigmatic why the protein is a dimer, but only one domain is involved in the oxidation. Prof. Kato found out that the structure and especially dynamics of the "passive" domain is affected upon change of the redox state of the other domain. Together with SAXS data recorded at SPring-8 he could further suggest that the reduced form is closed pushing out the oxidized substrate, while the oxidized form is open receiving the reduced substrate. The project is a very nice example of how to use several methods of structural biology to advantage.

The project on protein domain mobility nicely fits to the study of glycoproteins, since more or less the same methodology that is useful to study protein domain mobility can be used to study mobility of sugars with respect to the protein as well as mutual mobility of saccharide moieties in oligosaccharides. Also, oligosaccharides exhibit the most congested NMR spectra such that working at highest magnetic field (920 MHz) is mandatory.

Of course, glycoproteins have to be prepared in a way that they are amenable for NMR investigations: Dr. Kato's laboratory has established worldwide unique ways of characterizing the heterogeneity of glycosylation but even more importantly of expressing glycosylated proteins with the sugars ^{13}C labeled as required for sophisticated NMR analysis. I am not aware of any other laboratory in the world, that can do what he is doing, namely, looking at biologically important complex oligosaccharides prepared isotopically labeled for NMR purposes. The combination of 920 MHz NMR and the preparation of the mentioned samples, makes Okazaki a prime place for NMR based structural glycobiochemistry world-wide.

Professor Kato's research on $\text{A}\beta$ and its interaction with gangliosides is also a very appropriate and fruitful topic merging his interests in glycobiochemistry and structurally diverse proteins. A very interesting topology of binding of the protein is emerging.

All in all, Professor Kato's research makes optimal use of the research environment he is in, applying several IMS-available biophysical techniques to most challenging topics such as glycobiochemistry, especially highest field NMR spectroscopy. This puts him internationally in a very visible position and more highest quality cutting edge results can be expected from his laboratory in the future if it manages also to stay on top of the instrumental development in highest field NMR.

To: 分子科学研究所 中村宏樹所長

From: Christian Griesinger (マックスプランク生物物理化学研究所・NMR 構造生物学部門・教授, ドイツ連邦共和国ゲッティンゲン)

Subject: 分子研 NMR 施設の業績に関する評価報告, 2010 年 1 月 4 日

分子研 NMR 施設は 2004 年に購入された 920MHz 装置に集約される。この装置の利用に関して横山利彦教授と加藤晃一教授から説明を受けた。まず、この装置は非常に良好に運用されており所外からの多くの利用者を引き付けていることを述べておきたい。マシンタイムのわずか 30% が所内利用で、残りの利用は、所内研究者との共同研究が技術的なサポートを受けるだけの施設利用に充てられている。このことは施設として特筆すべき事項である。国際的に考えてこれほど共同利用を拡張している例を私は見たことがなかった。例えば、EU の大型施設ではマシンタイムの 20% 以下を外部利用者に充てるのが普通である。また、この装置を利用した内部外部利用者ともにそれぞれの専門分野において最も権威ある雑誌に論文を発表できている点も注目すべきである。本装置は疑いなく明確に最高水準の研究を可能にしているといえる。

購入時 本 920MHz NMR は市販の高分解能 NMR 分光器で最高磁場の仕様であった。装置は日本電子から購入され、現在まで維持も日本電子が行っている。報告書によると、年間約 5400 時間のマシンタイムのうち 60% が溶液 NMR に利用され、その研究内容は、主としてタンパク質の構造生物学的研究であり、その中でも日本が独創的な成果を挙げつつ世界的にも注目される分野である糖鎖生物学が対象となっている。残りの 40% のマシンタイムは物質科学をターゲットとした固体 NMR に充てられている。さらに残りの 3300 時間程度は 920MHz NMR 装置のパルスシーケンス最適化などを含めた分光器の維持管理に充てられている。

この装置は標準的なプローブを装備しているがクライオプローブは装備されていない。クライオプローブは、通常の有機溶媒中の試料において感度をおおよそ 3-4 倍向上させ、水溶液中の試料でも溶解する塩の濃度にも若干依存するが 2-3 倍の感度向上が見込める。この点において、岡崎の設備は、日本あるいは諸外国の高磁場 NMR 装置 (800, 900, 950 MHz) と比べて不利であろう。特に、溶解度がミリモラー以下のタンパク質および糖タンパク質試料、あるいは、天然物のように非常に微量しか単離できない試料において感度的に不利となる。この点は高感度高分解能を有する国立施設として特徴のある装置・研究環境を維持していくために必要かもしれない。

920MHz NMR 装置により行われた研究はタンパク質構造解析のみならず天然物や他の分野においても最先端研究である。特に糖鎖生物学研究に関しては、施設を糖鎖生物学研究の世界的な中心施設に発展させることもできるのではないか。この場合、糖鎖生物学コミュニティや研究者は装置利用に留まらずパルスシーケンスの最適化やオリゴ糖試料を最適なやり方で標識するための戦略や可能性まで求めるであろうし、施設はこれらの要望に応える必要があらう。岡崎ではこれが可能であり、この可能性を広報することによりさらに多くの潜在利用者を引き付けることもできよう。施設運営としても、この点を目標として、構造糖鎖生物学の国際会議を開催できるのではないか。

920MHz NMR 装置は固体 NMR にも応用されている (マシンタイムの 40%)。発表論文リストから判断しても物質科学領域の研究者に主として利用されていることがわかる。これらの物質科学研究は秀逸であり国際的にも成果が認識されており、また国際共同研究も含めて共同利用に利用されている。

加藤教授の研究は、多ドメインタンパク質・糖タンパク質・天然変性タンパク質の3つに関する構造生物学に集約できる。第1の課題において彼は非常に興味深い系であるダイユビキチンを創製した。これは、ユビキチン化によりタンパク質がさまざまなオルガネラや細胞中の分子マシンに方向づけられることから生物学的に大変意義のある系である。細胞はユビキチンの結合様式と連結数を識別する必要があるため、ユビキチン二量体やオリゴユビキチンの研究は大変興味深い。共有結合で結ばれた環状ジユビキチンは閉じたコンフォメーションのモデルとなり、これを用いることによりそのNMR特性を評価できる。さらに、開いたコンフォメーションと閉じたコンフォメーションのいずれがさまざまな下流のパートナーに認識されるのかなどの研究も可能となる。もう1つの例は、タンパク質のシステイン残基の酸化を触媒するPDI(プロテインジスルフィドイソメラーゼ)である。これまで、この酸化反応にあずかるのは1つのドメインだけであるのに基質結合部位が2つのドメインから構成されていることの理由がこれまで明らかではなかった。加藤教授は、反応に直接関与しない方のドメインの立体構造ととりわけダイナミクスが、反応に関与するもう一方のドメインの酸化還元状態の変化による影響を受けて変化することを見出した。SPring-8で測定された小角X線散乱の結果と併せて、彼は、還元体が閉じた構造となることで酸化された基質を追い出し、酸化体は開いた構造をとって還元された基質を受け入れると結論付けた。この研究成果は構造生物学において複数の構造解析手法を用いる利点を示すよい例であるといえる。

タンパク質のドメインの動きに関する研究は糖タンパクの研究にもうまく適合する。これは、ドメインの運動性に関する研究に有用な方法論が、多かれ少なかれ、オリゴ糖鎖を構成する糖の相対的な運動やタンパク質に対する糖鎖の運動を研究するためにも用いることができるからである。また、オリゴ糖は非常に複雑に重なるNMRスペクトルを呈し、超高磁場(920 MHz) NMR測定が必須な系であることも付記したい。

言うまでもなく糖タンパク質はNMR研究にかなったかたちで調製されるべきものである。加藤教授の研究室は、糖鎖修飾の不均一性を評価するため独創的な手法や、さらに重要なこととして、洗練されたNMR解析に必要とされる¹³Cで標識された糖による修飾をうけたタンパク質を発現する手法といった世界的に見ても類例のない方法論を確立している。生物学的に重要で大変複雑なオリゴ糖鎖をNMR研究のために同位体標識体として調製することが可能な研究室は世界的にみても彼の研究室以外に存在しないのである。920MHz NMR装置とこうした試料調製技術を併せることで岡崎はNMR構造糖鎖生物学における世界的な拠点となり得ているといえる。

アミロイドβとそのガングリオシドとの相互作用に関する加藤教授の研究も、彼の糖鎖生物学と多様な構造を持つタンパク質への興味を融合させるものとして大変ふさわしく、成果の期待できる研究課題である。大変興味深いタンパク質との結合トポロジーが見出されつつある。

総じて、加藤教授の研究は、糖鎖生物学のような非常に挑戦的な研究課題に対して分子研で利用可能な生物物理学的技術、特に超高磁場NMR分光法を用いたもので、研究環境を最大限に活用できているといえる。これにより彼は国際的にも著名な研究者になっており、最高磁場のNMR分光器の開発をも掌握することができるならば、彼の研究室から、きわめて価値の高い最先端研究成果が挙がるのが期待できるであろう。