

超高分子量蛋白質の分子形態変化を観測する NMR 技術

楯 真一

広島大学大学院理学研究科

1. 研究のねらい

1-1. 研究の目的

タンパク質は、機能を発現する際にドメイン再配向を伴う大きな分子構造変化を示すことがある(図1)。このような大きな振幅の構造の変化(分子形態変化)は、タンパク質機能制御に密接に関わるが、溶液中にあるタンパク質の分子形態変化を原子分解能で計測する適切な技術が存在しないため、その詳細は十分に研究されていない。本研究では、溶液状態におけるタンパク質の分子形態変化を直接観測する新たな NMR 計測技術の確立を目的とした。この技術の確立により、タンパク質の構造変化と機能制御機構との相関関係を系統的に解析する新たなタンパク質構造研究を展開することを目指している。

1-2. タンパク質構造変化計測技術の現状

複数のドメインから構成されるタンパク質の結晶構造では、柔軟な構造部でつながれたドメイン間の相対配置がクリスタルパッキングにより歪められる可能性を否定できない。したがって、結晶構造として得られたドメイン間の相対配置が溶液状態での構造を正確に反映していない場合もあるはずであるが、その判別は一般的には困難である。このため、リガンド結合などに伴うタンパク質の分子形態変化に対する生物学的な意味づけは、その圧倒的な高分解能構造情報にもかかわらず結晶構造解析のみでは一般的には不可能である。一方で、電子顕微鏡単粒子解析による分子形態観測、蛍光標識したタンパク質の FRET 観測、X 線小角散乱などによる研究から、大きな振幅をもつタンパク質構造変化と機能制御の関連が示されてきている。これらの研究では、それぞれの計測法の特徴を生かして溶液中でダイナミックに分子形態を変化させて機能を発現するタンパク質の実態が明らかにされてきた。しかし、いずれの計測技術も原子分解能の構造情報を与えないために、タンパク質構造変化がどのように機能制御に関わるのかという本質を十分に解析しきれない限界があり、タンパク質の動的構造特性と機能制御相関の研究を進める上では必要十分な計測法とはいえない。

タンパク質構造の動的構造と機能制御との関係について徹底して研究を進めることは、タンパク質の静的な立体構造情報が膨大に蓄積されてきた今だからこそ進めるべき新たなタンパク質構造研究である。本研究では、この新たなタンパク質構造研究を推進するために、溶液中にあるタンパク質の分子形態変化を原子分解能で直接観測する新たな計測技術を創出することを目指した。

1-3. NMR を用いたタンパク質の分子形態観測技術

本研究では NMR を用いて上記の目的を実現する計測技術の開発を進めた。従来の NMR 構造解析技術は 30kDa 以下のタンパク質に対してしか原子分解能の構造決定ができないという限界がある。また、NOE など近距離構造情報を用いる従来の解析法では、ドメイン間相対配向のような「巨視的構造情報」を得ることができない。このため、本研究の目的を実現するためには従来の立体構造解析技術とは異なるアプローチが必要となる。

タンパク質を磁場に対して弱く配向させることで観測される異方性核スピン相互作用のひとつである残余双極子相互作用(RDC)を利用することで、タンパク質中の各 NH 結合ベクトルの磁場に対する配向角情報を得ることが可能である。NOE と異なり RDC から得られる情報は、距離の制約を持たない巨視的構造情報を与える。RDC から得られる NH 結合ベクトルの磁場配向角情報を集積



図1: マルトース結合タンパク質が示す基質結合により誘導されるドメイン再配向(分子形態変化)

することでタンパク質中のドメインの磁場配向角を決定できる。また、ドメインごとに決定された磁場配向角情報を用いることで、ドメイン間の相対配向を決定することができる。しかし、RDC を観測するために用いる NMR スペクトルの測定にも分子量限界があり、約 40kDa が分子量限界と見積られる。これは ^1H - ^{15}N HSQC スペクトルの観測限界により規定される。一方で、TROSY と呼ばれる 2 次元相関スペクトルは 100kDa を超えるタンパク質に対しても高い分解能と観測感度のシグナルを与える

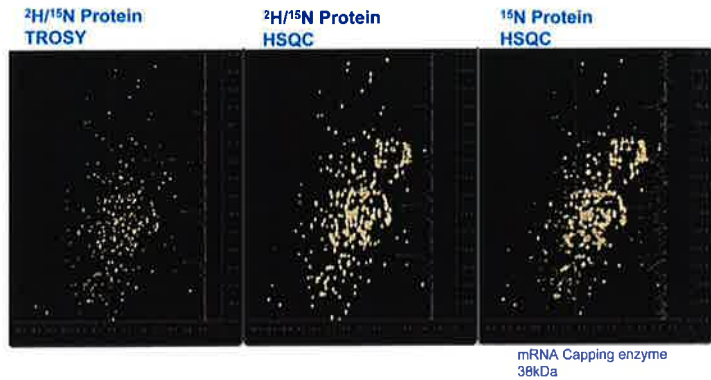


図 2: 38kDa の mRNA capping enzyme の 2次元スペクトルの比較. 重水素標識したタンパク質の TROSY 2次元スペクトルでは高い分解能が実現できている。

(図 2). 複数のドメインから構成されるタンパク質は、必然的に高分子量となり 40kDa をはるかに超える場合が多い。従来の NMR 法の実用上の大きな制約となる分子量限界をなくすことが、多様なタンパク質を対象とした溶液状態での分子形態変化観測を実現する一般的計測技術の前提となる。そこで私は、高分子量タンパク質に対しても高い分解能のシグナルを与える TROSY スペクトルのみを用いて、RDC から得られるのと同様な磁場配向情報を得る計測技術を考案し DIORITE 法と名づけた。DIORITE は、Determination of the Induced ORientation by Troscopy Experiments を表す。

2. 研究成果

2-1. DIORITE 法によるタンパク質のドメイン配向解析の原理と実際

TROSY 2次元相関スペクトル上の各シグナルは、タンパク質を磁場配向状態に置くことで、それぞれシグナルの位置が変化する。私は、 ^{15}N 軸側に沿った TROSY シグナルの変化量 $\Delta\delta_{\text{TROSY}}$ が、対応するアミノ酸残基のペプチド面の磁場に対する配向角に依存することを見出し、観測された $\Delta\delta_{\text{TROSY}}$ から対応するペプチド面の配向角を計算するアルゴリズムを確立した。このアルゴリズムが DIORITE 法の基礎である (図 3)。

図 3 にピンクの網かけで示すドメインを構成するアミノ酸残基由来の TROSY シグナル変化量から、DIORITE 解析によりそのドメインの磁場配向情報 (磁場配向テンソル量) を得ることができる。観測された磁場配向テンソル軸を図 3 では青で示す。緑の網かけで示すもう一つのドメインに対しても、同様に DIORITE 解析により磁場配向テンソルを決定できる。同じタンパク質中にある 2つのドメインで観測された磁場配向テンソル軸は一致するため、結晶構造を用いて 2つの磁場配向テンソルが一致するように一方のドメインの座標を回転させることで溶液中でのドメイン配向を決定できる。

これが DIORITE 法による溶液中にあるタンパク質のドメイン相対配向を決定する原理である。

DIORITE 法によるドメイン相対配向解析を行うためには、タンパク質を磁場に対して弱く配向させる状態を実現することが前提になる。RDC の測定では、タンパク質溶液に磁場配向性液晶分子を共存させることで、タンパク質の弱い磁場配向状態を実現している。しかし、DIORITE 解析

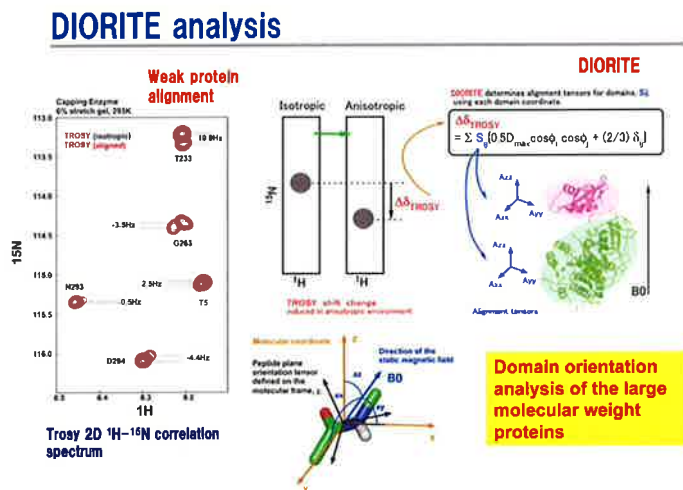


図 3: DIORITE 法によるドメイン相対配向解析の概念図

では、TROSY スペクトル上の化学シフト変化量を用いるために、観測される変化量が厳密に分子配向にのみ依存し、それ以外の要因（例えば試料溶液条件の相違など）から影響を受けないように工夫する必要がある。また、タンパク質試料の溶媒条件（pH、温度、イオン強度）によらず、どのようなタンパク質にも適用できるようにするために化学的に安定な媒体を利用する必要がある。このため、液晶分子を利用する方法は適当ではなく、本研究では異方的に圧縮したアクリルアミドゲルを用いてタンパク質の磁場配向を実現させる方法を用いた。また、参照用のスペクトルは、全く同じ組成を持つが異方性圧縮されていないアクリルアミドゲルを用いた。

異方的に圧縮したアクリルアミドゲル中に取り込まれたタンパク質は、アクリルアミドゲル中に形成される空間的な異方性を持つ格子により等方的な分子回転運動が制約され、分子の形状に応じて特定の方向に向く性質をもつようになり、実効上磁場配向状態に置かれたのと同じスペクトル変化を与える。一方、圧縮を受けないアクリルアミドゲル内には等方的な格子が形成されているため、その中に取り込まれたタンパク質は通常の溶液状態と同様な等方的分子回転を維持することができる。このため、このゲル内のタンパク質は分子配向依存的なスペクトル変化は与えない。この2つのゲル中にあるタンパク質で観測される TROSY スペクトルの差から厳密に分子配向依存的な TROSY シフト変化量を計測できる。アクリルアミドゲルは pH、温度、溶媒に対して化学的に安定であるためにタンパク質の試料条件に依存せず安定に分子配向状態を実現できる。

2-2. DIORITE 解析の例

本研究では、DIORITE 法を一般的なタンパク質構造解析技術として確立することを目指して、分子量・物性の異なる様々なタンパク質を対象として DIORITE 法による構造解析を行った。ここでは、1つの解析例として、mRNA capping enzyme（以下 CE と略す）のドメイン相対配向解析の結果を示す。

CE は2つのドメインを持つ 38kDa のタンパク質である。結晶構造解析から CE は、2つの異なる構造をとることが示された(図4)。図4には GTP 結合型 CE の2つの結晶構造(open 型, close 型)を示す。1つの結晶中にこの2つの構造が観測された(PDB: 1CKM)。CE は溶解度が低く 0.8mM が試料濃度限界である。また、この濃度を長時間安定に維持するためには 200mM という高い濃度のリン酸バッファーと、3%グリセロールをサンプル溶液に添加する必要がある。さらに、CE の構造安定性は pH より大きく変化し、pH7.5 よりも低い pH では測定中に変性、沈殿する。また、CE は熱安定性も低いので 23°C 以上に測定温度を上げることができない。このため、CE は重水素標識したサンプルを用いてもなお十分な質の ^1H - ^{15}N HSQC 相関スペクトルの測定が困難であった。このため、従来の RDC による方法は適用できず、TROSY を用いる DIORITE 法以外では CE のドメイン相対配向を決定することは困難であった。

アクリルアミドゲルの組成を最適化することにより、DIORITE 解析に最適な磁場配向状態を実現することができた(図5)。図5左には、等方的条件下で観測した TROSY スペクトル(黒)と、分子配向条件下で測定した TROSY スペクトル(赤)の重ね合わせを示す。十分な大きさの TROSY シグナル変化が観測されている。CE の N 末端、

C 末端ドメインそれぞれについて DIORITE 解析を行い各ドメインの磁場配向テンソルを決定した。図5右に示すように、観測値と計算値は計測誤差程度で一致しており十分な精度でそれぞれの分子配向テンソルが決定できたことを示す。DIORITE 解析の結果得られた各ドメインの分子配向テンソル軸を結晶構造と共に図6に示す。2つの分子配向軸が一致するように結晶構造を回転させて得た構造が溶液中での CE の構造である。図6には、DIORITE 解析から得られた小ドメイン (OB ドメイン) の相対配向を赤で示す。図6に示すように Apo 型 CE の溶液中での立体構造は、open

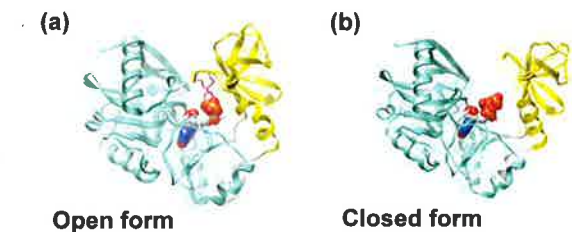


図4: mRNA capping enzyme (CE)の2つの結晶構造 (PDB: 1CKM)

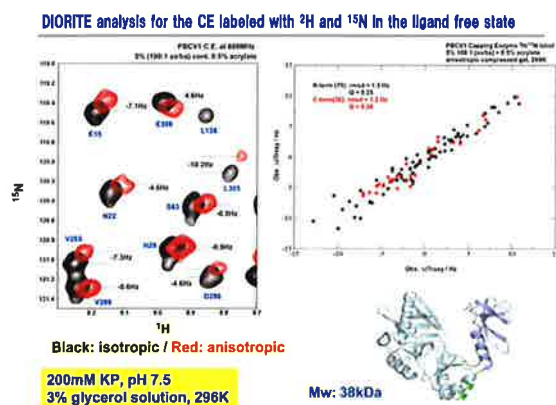


図5: CE の DIORITE 解析の結果

型構造よりもさらに OB ドメインが開いた構造を持つ。CE の結晶中でのパッキングを見ると open 型構造は、結晶中で隣り合う closed 型構造との相互作用により規定されていることがわかる。このため、結晶中の open 型構造は、溶液中でのアポ型構造を反映しないと考えることができる。

CE に関しては、結晶構造解析で得られた 2 つの構造にもとづいてその機能制御機構が議論されてきている。DIORITE 解析の結果は、従来の CE の構造-機能相関に関する議論に大きな修正を加える。

2-3. DIORITE 法の確立と今後

上記の例で示すように、従来の NMR 技術では解析できない高分子量タンパク質を対象としてドメイン相対配向（分子形態）を決定する新たな NMR 技術を確立した。例とした CE の構造解析の結果からも分かるように、高分解能結晶構造が解かれていても、溶液状態でのドメイン相対配向が自明ではない場合があり、溶液状態でのタンパク質の分子形態観測は、タンパク質構造に基づいたタンパク質機能制御機構の議論を進める上では必ず行っておくべき実験になると考える。DIORITE 法は、研究開始時に思い描いた以上に広範なタンパク質構造研究への利用が期待される基盤計測技術になる可能性をもっている。

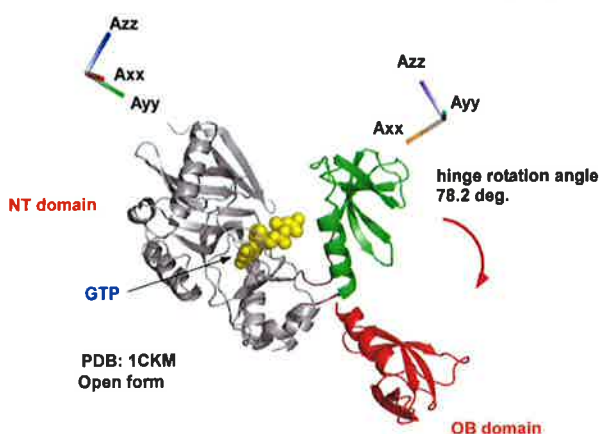


図6: DIORITE 解析の結果得られた CE の溶液中でのドメイン配向 (OB ドメインを赤で表示)

3. 主な発表

論文

- **Tate, S.** : Anisotropic Nuclear Spin Interactions for the Morphology Analysis of Proteins in Solution by NMR Spectroscopy. *Anal. Sci.* 24, 39-49 (2008).
- Ishigaki, T., Ohki, I., Naoko Utsunomiya-Tate and **Tate, S.** : Chimeric structural stabilities in the coiled-coil structure of the NECK domain in human lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor 1 (LOX-1), *J. Biochem. (Tokyo)*, 41: 855-866 (2007).
- **Tate, S.** : Structure and mode of ligand recognition of the oxidized LDL receptor, LOX-1 in *Functional and structural biology on the lipo-network* Research Signpost, Kerala, India, 179-198 (2006).

招待講演

- 楯 真一, 「異方性核スピン相互作用を利用する新規 NMR 構造による超高分子量タンパク質の分子形態観測」 特定領域研究「高次系分子科学」公開シンポジウム「イオンチャネルの構造ダイナミクス」 (2008. 07, 福井)
- Tate, S. "Molecular alignment determination only using the orientation dependent TROSY shift changes" The internal workshop on "Perspectives on Stable Isotope Aided NMR Methods for Protein Structural Analysis" (2007.02, Osaka).
- 楯 真一, 「磁場配向依存的な TROSY シグナル変化で観測する分子形態変化-DIORITE 法」, 大阪大学蛋白質研究所セミナー (2006. 07, 大阪)
- Tate, S. "Structure and ligand recognition mode of oxidized LDL receptor LOX-1", INPEC2006 (2006.06, Elsinore, Denmark).