

高分子量タンパク質の動態に迫る NMR 技術の開発

宮ノ入 洋平¹, 武田 光広^{1,2}, 甲斐荘 正恒^{1,3}

タンパク質構造生物学において、NMR法に期待される主要な役割は単なる立体構造決定から、より幅広い時間領域にまたがる構造動態の解明へと展開しつつある。その中で、これまでもタンパク質NMR研究の発展に深く関わってきた安定同位体標識技術のさらなる高度化に寄せる期待はますます大きくなっている。我々は、長年にわたり生体高分子のNMR解析技術の高度化を視野に入れ安定同位体標識技術開発に取り組んできた。SAIL (stereo-array isotope labeling: 立体整列同位体標識) 法はその成果のいわば集大成である。本稿では、SAIL法をさらに発展させることにより初めて実現する高分子量タンパク質の多様な構造情報の取得、および大きな振幅を持つタンパク質動態の検出手法に関して紹介する。

1. はじめに

タンパク質の立体構造解析技術の進歩はめざましく、かつては困難であった膜タンパク質やタンパク質複合体に関する精密な原子座標情報の蓄積も急速に進みつつある。1980年代半ばに登場したNMRによるタンパク質構造決定法は、溶液中における立体構造を原子分解能で決定できる新技術として、今世紀初頭に華々しく展開された構造ゲノムプロジェクトにおいてはX線解析法と並ぶ主要な構造決定技術として注目を集めた。以来、十年余を経た現在、X線解析法や電子顕微鏡法に比べ、立体構造決定手法としてのNMR法は存在感が薄れつつあるとの印象は拭えまい。一方、膨大なタンパク質の高精度な原子座標情報が得られる状況となったにも関わらず、立体構造情報から生物機能の解明へと至る道は依然として険しい。生体高分子が関与する生物機能発現の解明には、幅広い時空間軸にわたり過渡的に形成される複雑な相互作用ネットワークの統合的理

解が不可欠であろう。この意味で、タンパク質の溶液内における多彩な動態情報を捉えることのできるNMR法は、依然として可能性に富む実験手法である。タンパク質の立体構造の集積段階を乗り越え、構造生物学がさらなる発展を遂げるためにNMRが果たすべき役割がここにある。

NMR法の持つ弱点の一つは、解析対象となるタンパク質の分子量が比較的小さいものに限られる点にある。分子量が大きくなるにつれ、NMRシグナル数が増加するとともに、シグナルの線幅の広がりも加わり、NMRスペクトルの観測・解析自体が困難となる。多次元NMR法の発展により、改善されたとはいうものの、この問題は常に大きな壁として立ちふさがっている。我々は安定同位体利用技術の高度化を通して本課題の克服に取り組んでおり、SAIL (stereo-array isotope labeling: 立体整列同位体標識) 法はその抜本的解決を目指して開発した手法である¹⁾。本手法はタンパク質を構成する水素、炭素、窒素を高度選択的に安定同位体標識し、必要とするNMR情報のみを効率よく取得することを基本的戦略としている。このためにタンパク質を構成する20種類すべてのアミノ酸に関して、位置・立体選択的に [²H, ¹³C, ¹⁵N] 三重標識したアミノ酸 (SAILアミノ酸) を合成し、さらにSAILアミノ酸のみから構成されるタンパク質 (SAILタンパク質) を無細胞発現系により調製した。このようにして調製したSAILタンパク質を用いることにより、通常用いられる [¹³C, ¹⁵N] 均一標識タンパク質のNMR解析上の障害であったシグナルの重なりや広幅化は著しく軽減され、40kDaを超える高分子量タンパク質の精密、かつ迅速な立体構造決定が可能となった¹⁾。

SAIL法の開発から十年余経た現在、分子量限界のさらなる拡大への期待は依然として大きいものの、NMR法の

¹名古屋大学大学院学理学研究科付属構造生物学研究センター (〒464-8601 愛知県名古屋市千種区不老町)

²熊本大学大学院生命科学研究部構造生命イメージング分野

³首都大学東京大学院理工学研究科 (〒192-0397 東京都八王子市南大沢1-1)

Recent advances in NMR methods for determining the structures and dynamics of larger proteins

Youhei Miyanoiri¹, Mitsuhiro Takeda^{1,2} and Masatsune Kainosho^{1,3}

(¹Structural Biology Research Center, Graduate School of Science, Nagoya University, Furo-cho, Chikusa-ku, Nagoya 464-8602, Japan,

²Kumamoto University, ³Graduate School of Science and Engineering, Tokyo Metropolitan University, 1-1 Minami-ohsawa, Hachioji, Tokyo 192-0397, Japan)

DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2016.880452

© 2016 公益社団法人日本生化学会

果たすべき新たな期待を背景に、より複雑なタンパク質複合体や膜タンパク質の動態情報の取得に向けたSAIL法の展開が求められるようになった。本稿では、このような要求に応えるために開発した、高分子量タンパク質中のメチル基や芳香環シグナルの観測・帰属手法を紹介する。さらに、SAIL法により定量的計測が可能となる芳香環反転運動を通じて明らかとなる、タンパク質内部やタンパク質-薬剤相互作用界面における振幅の大きな揺らぎに関する研究も紹介する。

2. タンパク質構造生物学研究へのSAIL法の展開

高分子量タンパク質においては、立体構造決定に必要なNMR構造情報の取得が困難となることは先に述べた。SAIL法はこれら問題を克服するための優れた手法ではあるが、結晶構造既知のタンパク質を対象とする場合には、NMR法により立体構造を再度決定する必要は必ずしもない。むしろ、タンパク質複合体や膜タンパク質においては、タンパク質中の特定のアミノ酸残基のNMRシグナルをプローブとして、他の手法では得にくい構造動態情報を入手することの方がより重要であろう。このため、高分子量タンパク質の特定部位に関するNMRシグナルの高感度測定・帰属技術開発には多くの興味が集中し、 ^1H - ^{15}N TROSY (transverse relaxation optimized spectroscopy) 法はその先駆けとなった²⁾。本手法では、高分子量タンパク質中の窒素を均一に ^{15}N 標識し、また炭素原子に結合する水素を均一に重水素置換したタンパク質試料が利用される。このような同位体標識高分子量タンパク質の ^1H - ^{15}N 相関スペクトルには、異なった緩和機構が相殺するために ^1H 、 ^{15}N 軸の線幅が著しく狭い成分が含まれる。TROSYシグナルと呼ばれるこのような成分を選択的に検出することにより、100kDaを超えるような高分子量のタンパク質の主鎖 ^1H - ^{15}N シグナルが高感度・高分解能で観測できるようになったことは大きな進歩であった²⁾。 ^1H - ^{15}N TROSY法に続いて、Ile/Leu/Val (以下、ILVと略称) 残基のメチル基のみを $^{13}\text{CH}_3$ にし、それ以外をすべて重水素化したタンパク質を用いることにより、鋭い ^1H - ^{13}C HMQCシグナルを観測する手法が“Methyl TROSY”法として報告され、高分子量タンパク質へのNMR法の応用範囲が一挙に拡大した^{3,4)}。このようにアミノ酸残基の主鎖アミド基やメチル基のNMRシグナルに限定されてはいても、それらのアミノ酸配列上の部位が帰属できれば、タンパク質の立体構造や動態に関する情報をもたらすプローブとして有用である。このような“NMRの窓”をさらに広げることにより、立体構造決定自体は困難であるような高分子量タンパク質複合体についても、それらの局所的構造の揺らぎ、あるいはタンパク質間やタンパク質-リガンド間の相互作用動態に関する貴重な情報が得られる可能性がある。NMR法に期待される構造生物学への寄与が、溶液内における相互作用・動態解析に傾きつつあるなかで、メチル基、主鎖ア

ミド基以外のさまざまなNMRの窓を高分子量タンパク質に開くことは最先端の安定同位体利用NMR技術としてのSAIL法に託された重要な開発課題である。このような背景から、我々は高分子量タンパク質に含まれる芳香環や脂肪族側鎖を含めた、すべてのNMRシグナルを選択的、かつ高感度に観測・帰属するためにSAIL法のさらなる改良に取り組んできた。

1) 高分子量タンパク質中のLeu/Valメチルシグナルの立体選択的観測

タンパク質には、メチル基を持つアミノ酸残基 (Ile, Leu, Val, Ala, Thr, Met) が数多く含まれているため、これらの残基のメチル基 ($^{13}\text{C}^1\text{H}_3$) シグナルは、タンパク質全体の立体構造変化や分子間相互作用を俯瞰するための格好のNMRの窓を提供する。現在では、ILV残基のみではなく、Ala, Thr, Metを含めたすべてのメチル基のNMRシグナルがNMRの窓として利用されている⁵⁻¹¹⁾。ILV残基はタンパク質の疎水性領域を構成する主要なアミノ酸であり、またそれらのメチル基は他のシグナルとは比較的離れた化学シフトを持ち観測上有利なために有用性は高い。ILVメチル基を残基選択的、および位置・立体選択的に同位体標識する技術開発に多くの関心が寄せられているのはこの理由による。タンパク質中の特定のアミノ酸残基のみを選択的に同位体標識するためには、標識アミノ酸を発現用培地に添加する方法が伝統的に用いられてきた。しかしながら、ILVに各2か所含まれるメチル基を位置・立体選択的に ^{13}C 標識したILVの入手が困難であったために、合成が容易な同位体標識生合成中間体を用いる方法が広く利用されている。たとえば、 α -ケトイソ吉草酸 (α -ketoisovalerate: α -KIV) がVal/Leuのメチル基の ^{13}C 標識前駆体として、 α -ケト酪酸 (α -ketobutyric acid: α -KB) がIleの δ_1 メチル基の ^{13}C 標識前駆体として開発され、市販もされている⁵⁻⁸⁾。ValとLeuのプロキラルメチル基の一方を $^{12}\text{CD}_3$ 、他方を $^{13}\text{CH}_3$ とした $[4\text{-}^{13}\text{CH}_3]\text{-}\alpha\text{-KIV}$ (図1a) を重水素化培地中に添加すれば、Valを経由して生合成されるLeuも同時に標識されるために、タンパク質中のすべてのVal/Leu残基の γ_1/γ_2 、および δ_1/δ_2 -メチル基が $^{13}\text{CH}_3$ 標識された重水素化タンパク質試料が得られる。このように、立体非特異的にプロキラルメチル基の一方のみを標識した $[4\text{-}^{13}\text{CH}_3]\text{-}\alpha\text{-KIV}$ を前駆体として調製したリンゴ酸合成酵素 (malate synthase G: MSG) の ^1H - ^{13}C HMQCスペクトルを図1cに示す。MSGは723残基からなる82kDaの高分子量タンパク質であり、LeuとValをそれぞれ70および46残基を持つために、計算上は232個の ^1H - ^{13}C 相関シグナルが観測されるはずである。実際に得られた ^1H - ^{13}C HMQC (hetero-nuclear multiple quantum coherence) スペクトルにおける ^1H - ^{13}C 相関シグナルの分離はきわめて良好である。

このように、メチル基を立体非特異的に同位体標識した α -KIVをLeu/Valの標識前駆体として用いる方法は経済性、実用性に優れた方法であるが、欠点もある。すなわ

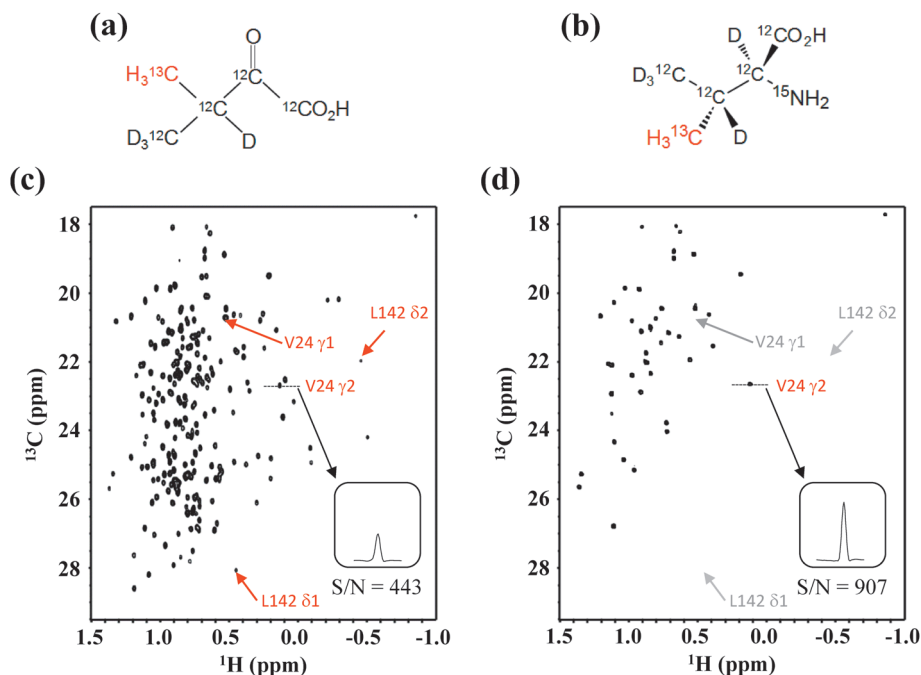


図1 Val/Leu メチル NMR シグナルの立体特異的・残基選択的観測法

(a, b) $[4\text{-}^{13}\text{CH}_3]\text{-}\alpha\text{-KIV}$, および $\gamma_2\text{-Val}$ の化学構造 (赤は $^{13}\text{CH}_3$ 標識部位). (c, d) $[4\text{-}^{13}\text{CH}_3]\text{-}\alpha\text{-KIV}$, あるいは $\gamma_2\text{-Val}$ により標識したリンゴ酸合成酵素 MSG の 900 MHz $^1\text{H}\text{-}^{13}\text{C}$ HMQC スペクトル. (c) のスペクトルにおいて, 赤で示した V24 の γ_1/γ_2 , L142 の δ_1/δ_2 シグナルのうちで, $\gamma_2\text{-Val}$ で標識した (d) のスペクトルでは V24 の γ_2 -メチルシグナルのみが, 2 倍以上の S/N 比で観測された.

ち, Val/Leu 残基のプロキラルメチル基は非選択的に一方が $^{13}\text{CH}_3$, 他方が $^{12}\text{CD}_3$ となるために, それらのシグナルの立体選択的帰属が別途必要となり, また Val/Leu の γ_1/γ_2 -, および δ_1/δ_2 -メチル基の標識率が 50% 以下にとどまる点も問題である. このような問題点は, 同位体標識中間体の代わりに, 立体選択的にメチル基を同位体標識した Val および Leu を用いることにより完全に解決できる¹²⁾. たとえば, $[4\text{-}^{13}\text{CH}_3]\text{-}\alpha\text{-KIV}$ の代わりに, γ_2 -メチル基のみを立体選択的に標識した“ $\gamma_2\text{-Val}$ ” (図 1b) を用い, さらに Val から Leu への生合成経路を抑制するために, 十分な量の重水素化 Leu, $[\text{U-D}]\text{-Leu}$ を添加することにより, Val の γ_2 -メチル基のみを立体選択的に標識した MSG を調製することができる¹²⁾. このようにして得られた標識 MSG の NMR スペクトルにおいては, メチル基領域に 46 残基の Val に由来する γ_2 -メチルシグナル以外, Val の γ_1 -メチルシグナル, Leu の δ_1/δ_2 -メチルシグナルはまったく観測されない (図 1d). 同一条件下で測定したメチルシグナルの強度を Val24 の γ_2 について比較したところ, $\gamma_2\text{-Val}$ を用いた標識 MSG では予想どおり約 2 倍の感度向上が得られた. 同様に, プロキラルメチル基の一方のみを $^{13}\text{CH}_3$ 標識した“ $\gamma_1\text{-Val}$ ”, “ $\delta_1\text{-Leu}$ ”, “ $\delta_2\text{-Leu}$ ” を単独, あるいは組み合わせて標識することにより, 標識中間体を用いては不可能な組み合わせで残基・立体特異的に高濃度標識したタンパク質試料の調製が可能となる. 立体選択的に標識アミノ酸を用いれば, プロキラルメチル基の立体帰属の不確定さは避けられ, 倍以上の同位体標識率が得られるために, 立体構造決定に必要な NOE 情報を迅速, かつ高精度に得ることができる (図 2).

$\alpha\text{-KIV}$ を用いて標識した MSG では, 図 2a の $^1\text{H}\text{-}^{13}\text{C}$ 相関シグナルは Val のメチル基に帰属されるが, その線形から単一のシグナルによるものではないと推定される. 事実, 図 2b に示すように, “ $\gamma_1\text{-Val} + \delta_2\text{-Leu}$ ”, および “ $\gamma_2\text{-Val} + \delta_1\text{-Leu}$ ” の組み合わせで標識した MSG の当該部分のシグナル (それぞれ, 赤と青で表示) を比較すると, $\alpha\text{-KIV}$ 標識で得られるシグナルは, ほぼ重なり合った V118 γ_1 と V193 γ_2 -メチルシグナルに由来することが判明した. このように重なり合ったシグナルを個別に観測できることは, 立体構造情報としての NOE の価値を高める. すなわち, 標識 $\alpha\text{-KIV}$ 中間体を用いて調製した非立体選択的メチル標識 MSG では, 重なり合った V118 γ_1 と V193 γ_2 -メチルシグナルに近接したメチル基を特定するための NOE シグナルは図 2c のように重なり合うために解析不能であるが, $\gamma_1\text{-Val} + \delta_2\text{-Leu}$, および $\gamma_2\text{-Val} + \delta_1\text{-Leu}$ の組み合わせで標識した MSG では, 中間体法で得られる NOE 強度の 4 倍の高感度で, よく分離した NOE シグナルが得られる (図 2d, e). この結果, MSG の V118 γ_1 と V193 γ_2 -メチルの近傍にそれぞれ V119 γ_1 および L198 δ_1 -メチルが存在していることが明瞭となった. このように, メチル選択標識アミノ酸を用いる選択的標識技術は, 高分子量タンパク質の構造情報の取得に有用である¹²⁾.

最近になり, ILV 生合成経路を遺伝子レベルで制御した ILV 要求性大腸菌変異株を用いて, 標識 ILV をより高い効率と選択性をもって目的タンパク質を標識する技術開発にも成功した. この結果, これまで報告されているさまざまな標識中間体を用いる手法に比べ, 位置・立体選択的標識

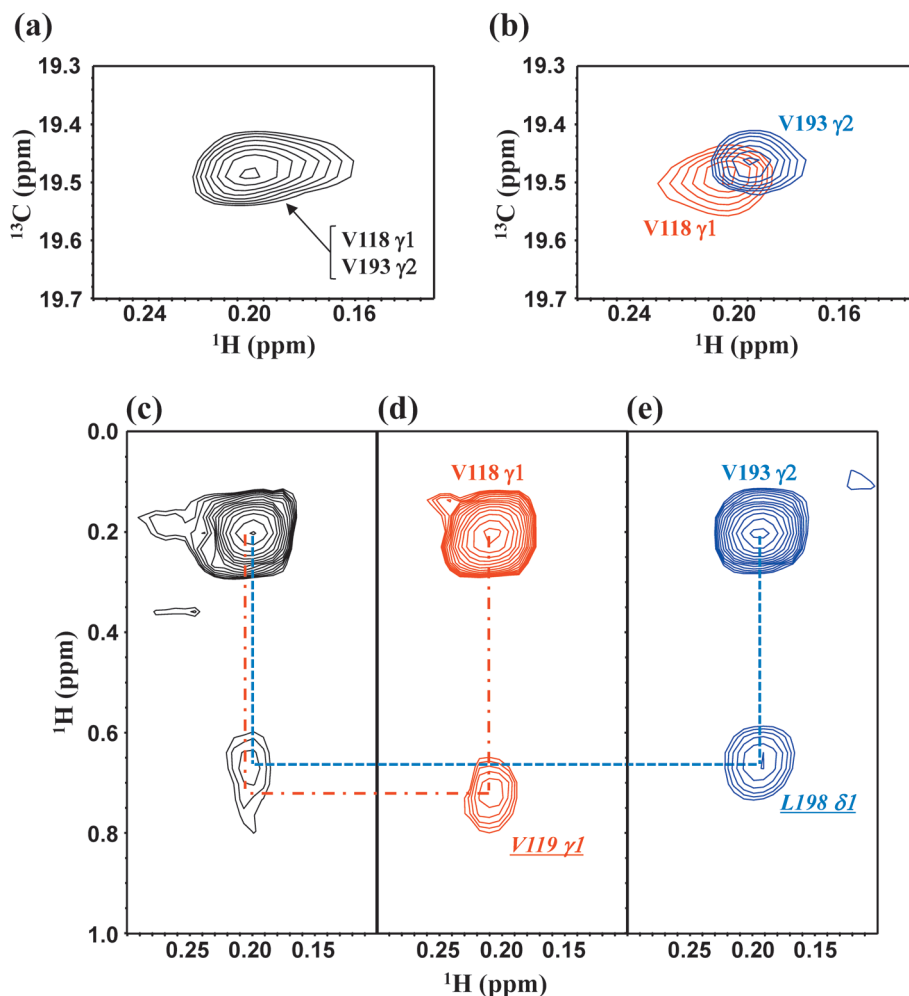


図2 立体特異的、および残基選択的なVal/Leu標識法のメチル間NOE解析における利点

(a) [4- $^{13}\text{CH}_3$]- α -KIVにより標識したMSGの900MHz ^1H - ^{13}C HMQCスペクトルの部分拡大図。(b) γ_1 -Val + δ_2 -Leu (赤), および γ_2 -Val + δ_1 -Leu (青)の組み合わせで標識したMSGの ^1H - ^{13}C HMQCスペクトルの重ね合わせ図。(c) [4- $^{13}\text{CH}_3$]- α -KIVにより標識したMSGのNOESYスペクトル(部分)。(d, e) γ_1 -Val + δ_2 -Leu (赤), あるいは γ_2 -Val + δ_1 -Leu (青)の組み合わせで標識したMSGの(c)と同一領域のNOESYスペクトル。(d)ではV118 γ_1 -V119 γ_1 メチル間、(e)ではV193 γ_2 -L198 δ_1 メチル間NOEシグナルが高感度に観測された。

したILVを用いる手法の経済性、実用性がさらに高まると期待される¹³⁾。

2) 芳香環NMRシグナルの観測と構造情報の取得

高分子量タンパク質のNMR構造決定の精密化を達成するには、主鎖アミド (^{15}NH) と側鎖メチル ($^{13}\text{CH}_3$) 以外の原子に関する、できる限り多くの構造情報を取得することが望ましい。特に、芳香族アミノ酸の側鎖芳香環はかさ高く、またタンパク質内部の疎水性領域に数多く存在し、高次構造の形成や維持に深く関わるために、それらに関連したNMR構造情報は立体構造の精密化にとって重要である。従来の [^{13}C , ^{15}N] 均一標識試料を用いる手法では、10~20kDa程度のタンパク質においても、芳香環のNMRシグナルは複雑となるために、解析や帰属は困難な場合が多い。一方、SAIL法を利用することにより、NMRシグナルの測定や解析を妨げるさまざまな要因を取り除くことができるため、より高分子量のタンパク質でも芳香環NMRシ

グナルの構造情報の取得が可能となる^{14, 15)}。芳香族アミノ酸のみをSAIL標識したタンパク質試料の調製には、通常の大腸菌発現系が利用できるため実用性も高い。次に、転写因子Mybの高い相同性を持つ3ドメイン中、DNA結合に直接関与するR2-R3部位(Myb-R2R3)を例にとり、Trp残基のNMR情報の取得におけるSAIL法の利点を解説する。

Myb-R2R3は12kDaの小さなタンパク質ではあるが、相同性の高い両ドメインに各6残基のTrp残基を含むため、均一標識体を用いる従来の方法では芳香環部分のスペクトルは複雑となり解析は困難である。一方、インドール環を構成する8個の炭素のうち、直接に結合していない δ_1 , ϵ_3 , η_2 の3か所のみを ^{13}CH とし、残りの水素をすべて重水素(D)、炭素を核スピンのない ^{12}C のままにしたSAIL [δ_1 , ϵ_3 , η_2]-Trp (図3a)では、芳香環のスピンス系が著しく単純化される。このようなSAIL Trpを用いて選択標識したMyb-R2R3では、6残基のTrpの δ_1 , ϵ_3 , η_2 部位に由来する ^{13}CH シ

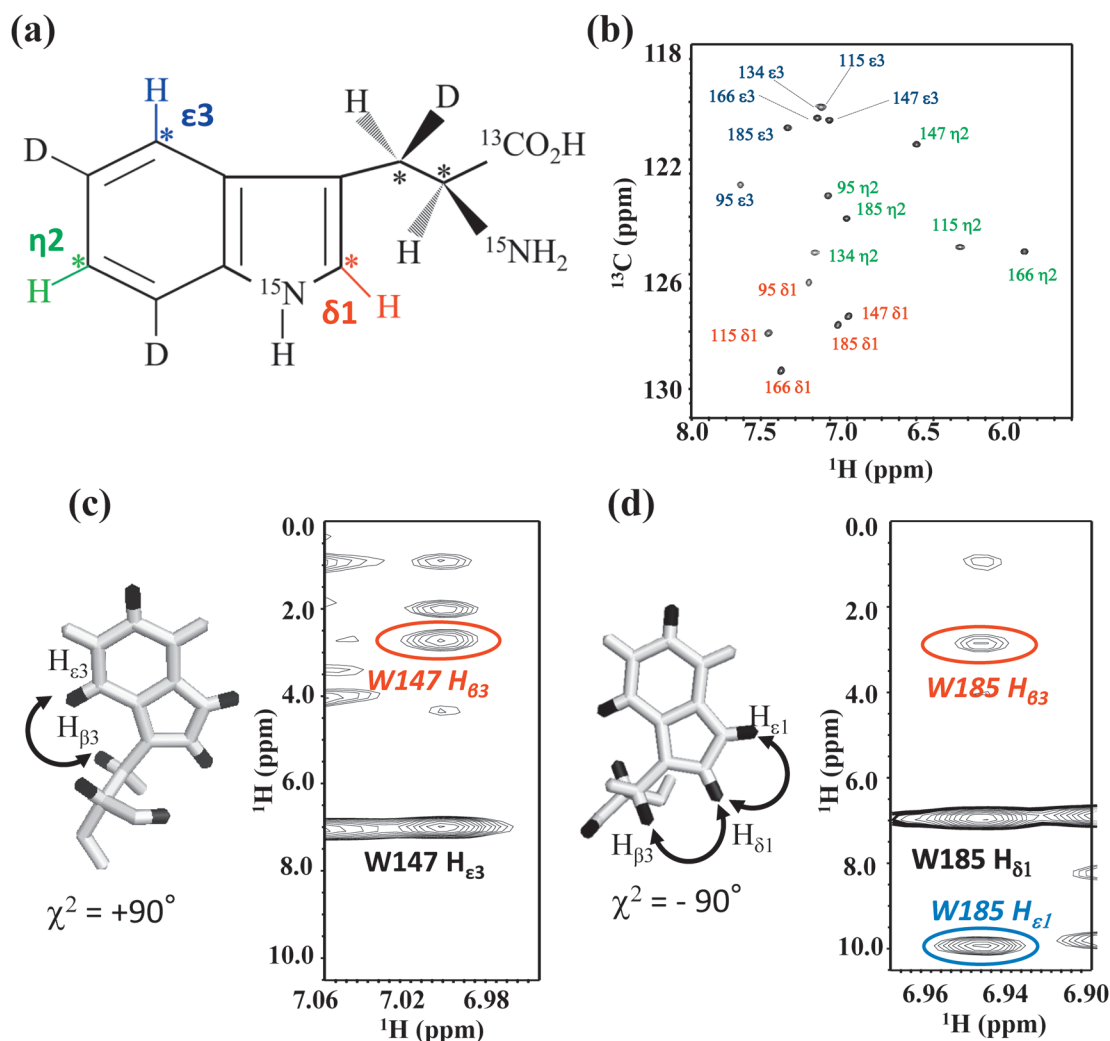


図3 SAIL Trpを利用した側鎖立体配座解析

(a) SAIL [$\delta_1, \epsilon_3, \eta_2$]-Trpの化学構造 (*は ^{13}C 標識部位). (b) SAIL [$\delta_1, \epsilon_3, \eta_2$]-Trpで標識したMybR2R3の800 MHz ^1H - ^{13}C HSQC スペクトル. (c, d) 芳香環プロトンを中心とするNOEスペクトルによるTrp側鎖の C_β - C_γ 周囲の立体配座解析. Trp147では H_{ϵ_3} - H_{β_3} 間, Trp185では H_{δ_1} - H_{β_3} 間に強いNOEが観測されたため, これらの原子間距離は短いことがわかる. したがって, これらの残基の側鎖 χ^2 はそれぞれ $+90^\circ$ と -90° であることが明らかとなった. なお, Trp185では H_{δ_1} に隣接するインドール環NH (H_{ϵ_1}) との間のNOEも明瞭に観測できる¹⁶⁾.

グナルがよく分離して観測された (図3b)¹⁶⁾. 本実験に用いたSAIL Trpは芳香環に加えて, 脂肪族側鎖の炭素原子をすべて ^{13}C 標識, さらにプロキラル β -メチレン中の β_2 (*proR*) 水素のみを立体選択的に重水素標識してあるために, 芳香環NMRシグナルを β - ^{13}CH 経路で帰属することが可能である. さらに, 芳香環 δ_1 - ^1H , ϵ_3 - ^1H と β_3 - ^1H , および α - ^1H と β_3 - ^1H との間に観測されるNOE強度を比較することにより, 側鎖立体配座 (χ^1, χ^2) に関する構造情報が得られることも大きな利点である (図3c, d).

SAIL芳香族アミノ酸を用いて, どの程度までの高分子量タンパク質の芳香環領域のNMR構造情報が入手できるのであろうか? この疑問に答えるために, 我々は高分子量NMR技術開発に広く利用されている82 kDaのリンゴ酸合成酵素 (MSG) を対象にさまざまな検討を行った. このような高分子量のタンパク質では, NMRシグナルの線幅が広がるために標識部位のアミノ酸以外をすべて重水素

化しなくてはならない点が最初の課題となる. Mybタンパク質のように低分子量の場合には, 周囲のアミノ酸が軽水素のままでも標識部位の芳香環シグナルの広幅化は無視できる. しかしながら, 分子量が大きくなるにつれ周囲の軽水素 (^1H) 核の影響 (双極子緩和) や ^{13}C 核の化学シフト異方性の効果が重なり, 芳香環 ^1H - ^{13}C NMRシグナルの観測が次第に困難となる. たとえば, 炭素源として通常の (軽水素) グルコースにSAIL Trp ($\sim 10 \text{ mg/L}$) を添加した軽水最小培地を用いて, 大腸菌高発現系により調製したMSGの ^1H - ^{13}C TROSY HSQC スペクトルでは, 辛うじていくつかの δ_1 -, ϵ_3 -, η_2 - ^{13}CH 相関シグナルが観測できるにすぎない (図4a). この程度のSAIL Trp添加量でも標識率は95%以上となるものの, 周囲がすべて軽水素のために芳香環 ^1H -NMRの線幅は著しく広がりシグナルの観測を妨げるのである. 一方, 重水素化グルコースを用いた重水最小培地中にSAIL Trpを添加して調製したMSGの ^1H - ^{13}C TROSY

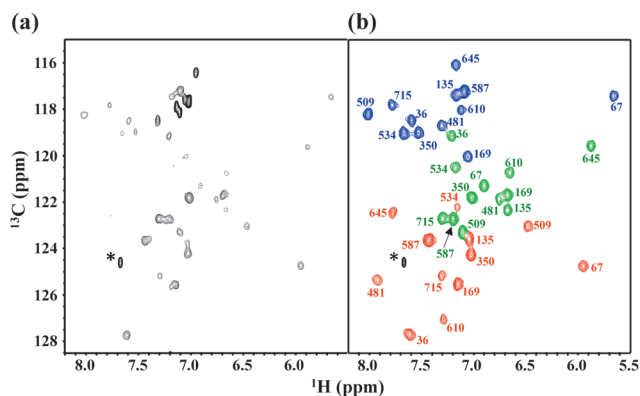


図4 SAIL [δ_1 , ϵ_3 , η_2]-Trp 標識 MSG の ^1H - ^{13}C TROSY-HSQC スペクトル

(a) 軽水最小培地中で調製した SAIL [δ_1 , ϵ_3 , η_2]-Trp 標識 MSG. 周囲の軽水素の影響による SAIL Trp 残基のシグナルは広幅化し、一部のシグナルのみしか観測されない。(b) 重水最小培地中で調製した SAIL [δ_1 , ϵ_3 , η_2]-Trp 標識 MSG. 周囲がすべて重水素化されているために 12 残基の Trp の TROSY シグナルがすべて観測・帰属できた。残基番号は数字、インドール環における部位は図 3a に対応させ、 δ_1 : 赤、 η_2 : 緑、 ϵ_3 : 青で表示。* は NMR 試料中に添加したプロテアーゼ阻害剤に由来。

HSQC スペクトルでは、 ^{13}C 核の化学シフト異方性緩和と直接に結合した ^1H 核との双極子緩和が相殺されるため、よく分離した ^{13}CH 相関シグナルが観測された (図 4b)。これら 36 個のシグナルは、MSG に 12 残基含まれる Trp の δ_1 -, ϵ_3 -, η_2 - ^{13}CH シグナルに由来し、全シグナルの帰属にも成功した (宮ノ入ら, 投稿準備中)。82 kDa の MSG に含まれる Trp 以外の芳香族アミノ酸 (Phe, Tyr, His) に関しても、同様な手法で芳香環 ^{13}CH シグナルの観測・帰属が可能となる。このようにして SAIL 法を用いることにより、前項で紹介したメチルシグナルに加えて芳香環シグナルの NMR 情報が得られ、高分子量タンパク質の溶液内での精密構造決定への道が切り開かれた。紙面の制限もあるために、SAIL 法を用いた構造決定技術の最近の進歩に関しては別の機会に譲り、次節では芳香環反転運動を指標とするタンパク質動態について解説する。

3. タンパク質動態研究への SAIL 法の展開

1) 芳香環反転現象を捉える NMR 手法

SAIL 法がタンパク質 NMR 研究にもたらした最大の貢献は、各アミノ酸の安定同位体標識パターンの最適化により、難易度の高いタンパク質からも多様な NMR 情報を合目的、かつ高感度で取得する可能性を大きく広げたことにあろう。前節で紹介した SAIL [δ_1 , ϵ_3 , η_2]-Trp の場合では芳香環の炭素を交互に $^{13}\text{CH}/^{12}\text{CD}$ 標識することにより、従来の NMR 技術では困難であったインドール環 NMR シグナルの高感度測定と配座解析への応用が可能となった。SAIL 芳香族アミノ酸はこのような構造情報の取得に有用だけでなく、芳香環部分の同位体標識パターンの特徴を活かしたタンパク質動態に関する研究にも大きく寄与す

る。

前節で述べたように、芳香族アミノ酸側鎖の立体配座は二つの二面角、 χ^1 , χ^2 で定義される。このうち、 χ^2 は C_α - C_β と C_γ - C_δ 間の二面角で定義され、 C_β - C_γ 軸周りの立体配座に対応する。Trp のインドール環は非対称な χ^2 周りの回転構造を持っており、タンパク質中で χ^2 は $+90^\circ$, 0° , -90° の 3 種類の異なった立体配座をとりうる。溶液内においては、結晶中と同様に Trp 残基の χ^2 周りの立体配座はこれらの配座のいずれか、あるいはそれらの平衡混合物として存在すると考えられる。Phe/Tyr 残基の芳香環の χ^2 周りの構造は対称性を持ち、結晶構造中では χ^2 はおおむね $\pm 90^\circ$ 近辺の値をとるが、この二つの立体配座は定義により異なった符号を与えられものの、本質的には同一の配座である。 χ^2 周りの回転構造が対称的であることは、Phe/Tyr の芳香環の反転前後の構造が完全に同一であるため、結晶構造解析により χ^2 軸周りに静止しているのか、あるいは反転運動をしているのかを区別する手立てがないことを意味している。一方、溶液内では結晶中と同様 χ^2 は $\pm 90^\circ$ 近辺の値に集中するものの、芳香環の χ^2 周りの動態を NMR 法により捉えることができる。すなわち、Phe/Tyr の芳香環 δ_1 -, ϵ_1 -シグナルは、 C_β - C_γ 軸周りの反転運動が存在しなければ芳香環の両側面にある一対の δ_1/δ_2 -, および ϵ_1/ϵ_2 -CH が構造上非対称な局所的環境にとどまるために、それらは本質的に異なった化学シフトを持つ一対の NMR シグナルを与える。芳香環の周囲は疎水性アミノ酸側鎖に取り囲まれており、かさ高い芳香環の反転運動は抑制されると考えられるため、 δ_1/δ_2 -, ϵ_1/ϵ_2 -CH が異なった化学シフトを示す残基が多数を占めるはずである。ところが、予想に反してタンパク質の ^1H -NMR スペクトルが測定可能となった 1970 年代当初から、タンパク質内部の Phe/Tyr 残基においても一対の δ_1/δ_2 -, および ϵ_1/ϵ_2 -NMR シグナルを示すものはむしろ例外的であることが明らかとなった¹⁷⁻¹⁹⁾。この事実は、芳香環の C_β - C_γ 軸周りの速い反転運動により δ_1/δ_2 -, および ϵ_1/ϵ_2 -NMR シグナルが平均化され単一のシグナルを与えるとしてみ説明できる。結晶構造において、タンパク質内部の疎水性コア部分は揺らぎの少ない固い領域とされていた当時、その領域に埋め込まれた Phe/Tyr の芳香環のようなかさ高い側鎖の速い反転運動を可能とする振幅の大きな揺らぎを持つことは予想もしなかった驚きであったであろう。繰り返しになるが、Phe/Tyr の芳香環の反転前後におけるタンパク質立体構造は不変であり、芳香環の反転現象は NMR によってのみ実験的に検証できる現象であることにもぜひ注目してほしい。芳香環はかさ高いといっても平面的であり、周囲を疎水性側鎖に緊密に取り囲まれて安定な位置を保ちうるが、その反転に際してはタンパク質内部に大きな空間が過渡的にでも生じる必要がある。このような過渡的空間の生成は、タンパク質内部に存在する協同的揺らぎに深く関わる動的現象として、現在に至るも多くの興味が集められている。歴史的には、1970 年代末より精力的に行われたウシ膵臓トリプシン阻害剤 (bovine pan-

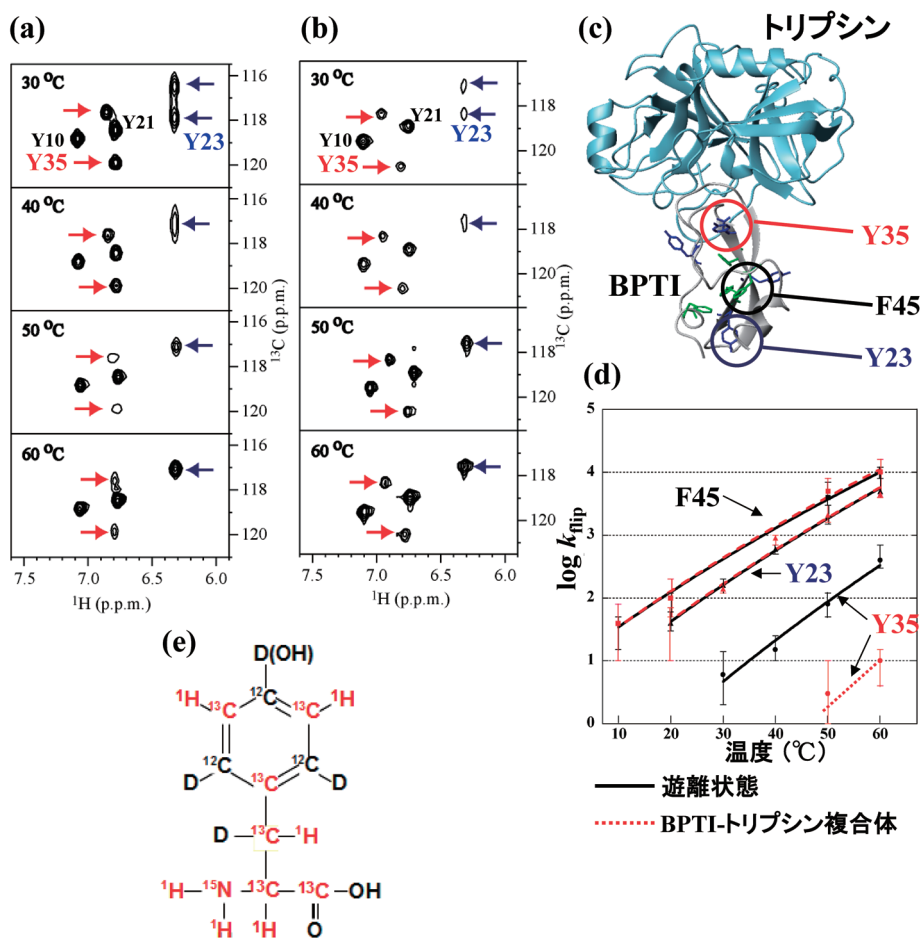


図5 ϵ -SAIL Phe/Tyr 標識BPTIの600MHz ^1H - ^{13}C 相関スペクトルのTyr ϵ -CH領域と芳香環反転速度の温度依存性 (a)遊離BPTIのHSQCスペクトル. (b)BPTI-トリプシン複合体のTROSY HSQCスペクトル. (c, d) 芳香環反転速度の遅いBPTI中のTyr23, Tyr35, Phe45のBPTI-トリプシン複合体における位置とそれらの芳香環反転速度の温度依存性. 黒線は遊離状態, 赤線はトリプシン複合体における反転速度. (e) ϵ -SAIL Phe/Tyrの構造式. Tyrの場合は ζ -位が水酸基となる. NMRで観測される原子を赤で示す.

creatic trypsin inhibitor : BPTI) に関する Wüthrich-Wagner グループによる一連の先駆的研究が広く知られているものの, その後のNMR研究は遅々として進まず今日に至っている¹⁹⁾. このような遅れの主な理由は, 観測される芳香環NMRシグナルが, 反転運動速度に依存する線形 (line-shape) 変化を含めて, 複雑となり定量的解析が困難となることによる. このような実験的障壁がSAIL法による芳香環スピン系の画期的な簡略化により大幅に取り除かれ, 芳香環反転現象を利用したタンパク質の振幅の大きな揺らぎ (large-amplitude slow breathing motion : LASBM) の物理化学的研究, さらにタンパク質の生物機能発現との関わりに向けた研究の新たな突破口が開かれた. 次項では, この研究分野の嚆矢となったBPTIをモデルケースとして, SAIL法によって明らかにされる芳香環の反転運動とその構造生物学的意義に関して解説する.

2) トリプシン結合によるBPTIのLASBM揺らぎへの影響

BPTIは58残基のアミノ酸からなるトリプシン阻害性の小タンパク質であり, 高い熱的安定性を持つために, さまざまなNMR研究手法開発のモデルとして長い間利用さ

れてきた¹⁹⁾. 我々は, 芳香環反転運動のトリプシン結合による影響を調べるために, BPTI中に各4残基存在するPhe/Tyrを, ϵ -SAIL Phe/Tyr (図5e) により選択的標識したBPTIを調製した. このSAILアミノ酸の芳香環は, ϵ 位のみが $^{13}\text{C}^1\text{H}$, 残りはすべて ^{12}C , あるいは ^{12}CD としてあるために, 芳香環のNMRシグナルの線形解析には理想的な標識パターンを持つ. [ϵ -SAIL Phe/Tyr] BPTI, [ϵ -SAIL Phe/Tyr] BPTI-トリプシン複合体に関して, 10~60°Cの範囲で測定した ^1H - ^{13}C 相関NMRスペクトルから, 複雑さを避けるため, 図5a, bでは30~60°Cの範囲で測定したTyr 4残基の ϵ - $^{13}\text{C}^1\text{H}$ シグナル部分のみを示した. なお, 遊離状態のBPTIは低分子量タンパク質であるために通常のHSQC (図5a), トリプシン複合体中のBPTIでは分子量が増大するためTROSY HSQC (図5b) を測定した. この温度範囲では, Tyr23, Tyr35, Phe45残基以外の5残基のすべての ϵ_1/ϵ_2 -CHは速い環反転運動により平均化され, 各1本シグナルを生じる. したがって, 図5a, b中, 矢印のない2個の相関シグナルは平均化されたTyr10, Tyr21の ϵ_1/ϵ_2 -CHに由来する. 一方, 青矢印で示したTyr23シグナルは30°Cにおいて, ϵ_1/ϵ_2 - ^1H シフト差が ϵ_1/ϵ_2 - ^{13}C シフト差に比べて小さ

いために ^1H 軸（横軸）ではすでに平均化されており、 ^{13}C 軸（縦軸）に並んだシグナルとして観測される。しかしながら、 30°C では ^{13}C 軸の線幅の広がりも顕著であり、 40°C 以上では平均化され1本のシグナルとなる。このように、Tyr23の $\varepsilon\text{-CH}$ シグナルの線形から、Tyr23の芳香環反転運動はトリプシンとの複合体形成により大きく影響されないことが明らかとなった。スペクトルは示さないが、Phe45の $\varepsilon_1/\varepsilon_2\text{-CH}$ のシグナルもTyr23と同様、複合体形成により反転運動は大きく影響されない。一方、赤矢印で示したTyr35は 30°C では $\varepsilon_1/\varepsilon_2$ 位の ^{13}C -, ^1H -化学シフト差がともに反転速度に比べて大きいために、 40°C までは遊離状態、トリプシン結合状態のいずれにおいても類似したシグナルを与える。遊離状態では ^1H -化学シフトが小さいため 50°C 付近の ^1H 軸ではすでに平均化され、化学シフト差の大きい ^{13}C 軸では 60°C 付近になると ^{13}C 軸での線幅の広がりが初めて明瞭となる（図5a）。遊離BPTIに関する結果は、はるか以前に報告されたWüthrichらによる ^1H -NMRスペクトルの測定と基本的には一致する¹⁹⁾。一方、SAIL法により初めて測定可能となったトリプシン複合体のスペクトルにおいては、Tyr35の $\varepsilon_1/\varepsilon_2$ 位の化学シフト差は ^{13}C 軸ではほぼ等しく、 ^1H 軸では遊離状態の2倍程度に拡大する。しかしながら、 60°C においても ^1H , ^{13}C 軸における環反転による線幅の広がりも顕著ではない（図5b）。

以上の推測をより定量的に検証するために、BPTIのTyr23, Tyr35, Phe45の遊離状態、およびトリプシン複合体中における環反転速度を、化学交換を測定するNMR実験（EXSY法）により測定したところ、Tyr35の芳香環の反転速度のみが複合体形成により顕著に低下することが明らかとなった（図5d）。Tyr35残基の芳香環は、BPTI-トリプシン複合体の結晶構造（図5c）中では、直接にトリプシンと接触してはいないものの、複合体形成界面の近傍のBPTI内部に浅く埋め込まれた状態にある。遊離状態、複合体中におけるBPTIの結晶構造はきわめて類似していることから、BPTI-トリプシン相互作用は“硬い鍵と鍵穴の分子認識”の典型例として広く知られてきた。NMRにより明らかとなった、BPTIの活性部位ループ近傍に見いだされたLASBM揺らぎは、複合体形成後には大きく抑制されるものの、トリプシンとの複合体形成時には有利に働くと思われる（武田ら、投稿準備中）。

Phe/Tyr残基の芳香環反転は、 $\text{C}_\beta\text{-C}_\gamma$ 単結合周囲のピコ秒以下で起こるきわめて速い回転振動現象であることを強調しておきたい。したがって、NMR法で測定される“速度”とは、実際にはかさ高い芳香環が反転するために必要な、ピコ秒程度の寿命を持つ $160\sim 170\text{ \AA}^3$ の過渡的空間が当該芳香環の周囲に生成する時間あたりの“頻度”を意味する²⁰⁾。このような大きな過渡的空間は分子表面近くであれば比較的頻繁に生じる可能性もあろうが、タンパク質内部等ではその生成頻度ははるかに低いと思われる。タンパク質主鎖や側鎖のランダムな揺らぎから偶然に大きな空間が生じ、その瞬間に芳香環が反転すると考えるのが妥当で

ある。 $\varepsilon\text{-SAIL Phe/Tyr}$, あるいは $\delta\text{-SAIL Phe/Tyr}$ により選択標識したタンパク質を利用すれば、芳香環反転現象を通じたタンパク質のLASBM揺らぎとタンパク質間相互作用との関わりに関して新たな展望が得られる。次項では、このような観点から行ったタンパク質-薬剤相互作用界面におけるLASBM揺らぎに関する研究を紹介する。

3) タンパク質-薬剤相互作用界面の構造動態と薬剤認識

現在のタンパク質立体構造情報に基づく薬剤設計（structure based drug design）においては、薬剤-相互作用界面の立体構造は静止していることを前提としている。しかしながら、前項で紹介した芳香環の反転現象に反映されるタンパク質のLASBM揺らぎは、タンパク質内部の疎水性コア領域に限定されるわけではなく、薬剤-タンパク質相互作用界面においても同様に存在しうる。したがって、リガンドと結合することにより生物機能を発現するさまざまなタンパク質にとって、相互作用界面の構造動態と生物機能発現との関連は興味ある課題である。タンパク質-薬剤複合体界面の精密な立体構造情報に加え、さまざまな振幅とタイムスケールで揺らぐ構造動態を含めることにより、新たな薬剤設計指針にもつながる可能性がある。このような期待から、細胞内で免疫抑制剤FK506やラパマイシンと複合体を形成し、両薬剤に固有の生物活性の発現を促すFKBP12タンパク質をモデルとして、薬剤-タンパク質相互作用界面におけるLASBM揺らぎ変化を比較した²¹⁾。

FK506とラパマイシンは、いずれも放線菌から見いだされた天然の環状マクロライド系免疫抑制剤であり、FKBP結合部位（FKBP binding domain）の化学構造は高い相同性を持つ。FK506（tacrolimus；タクロリムス）は細胞内に内在するFKBP12（FK506 binding protein）と複合体を形成することにより、マクロライド環におけるFKBP結合部位の逆側にある、固有のエフェクター結合部位（effector binding domain）と脱リン酸酵素カルシニューリン（calcineurin）との結合が著しく加速されることにより免疫作用が抑制される。一方、ラパマイシンにおいては、FKBP結合部位の構造はFK506とほぼ同一であるものの、エフェクター結合部位は大きく異なっている。この結果、ラパマイシンはFKBP12と複合体を形成することにより、mTOR（mammalian target of rapamycin）と特異的に結合し免疫作用を抑制する。このように、生物機能の発現機序は異なっているものの、両薬剤とFKBP12との複合体の高分解能結晶構造中の相互作用界面、すなわちFKBP12の薬剤結合部位、およびFK506, ラパマイシンのFKBP結合部位、に関して顕著な立体構造上の差異は見いだされない^{22, 23)}。両薬剤とFKBP12は解離定数がnM以下の強い複合体を形成することを考慮すると、複合体の相互作用界面は揺らぎのきわめて少ない構造をとっている可能性が高いようにも思える。このことを確認するために、我々はFKBP12の薬剤結合界面に芳香族アミノ酸5残基（Phe46, Phe48, Phe99, Tyr26, Trp59）からなる特徴的な芳香環クラスター構造が

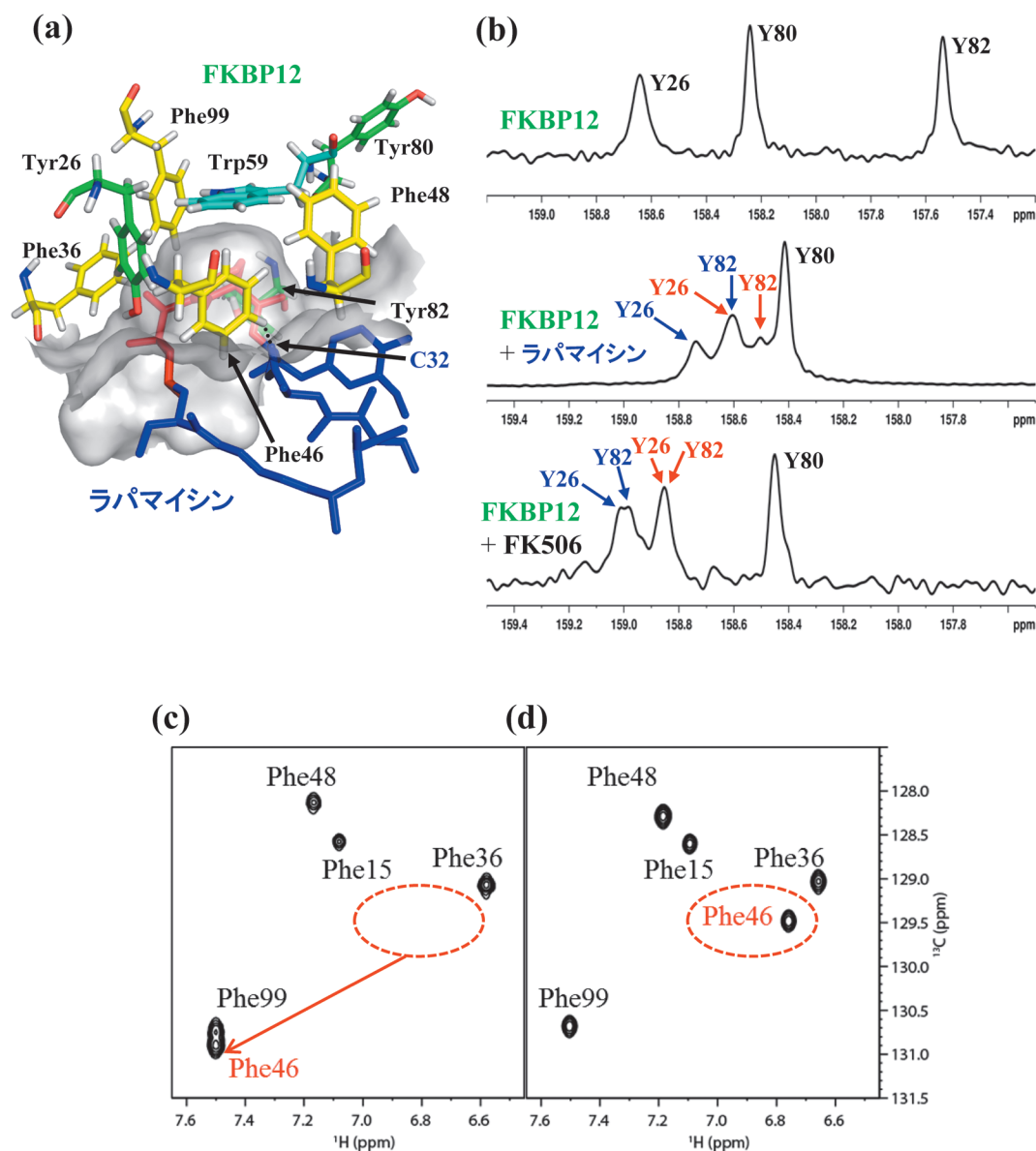


図6 FKBP12-ラパマイシン, FKBP12-FK506 複合体の相互作用界面の結晶構造とNMR スペクトル
 (a) FKBP12-ラパマイシン複合体の結合界面の結晶構造 (PDB# 2DG3). Pheを黄, Tyrを緑, Trpを水色で表示, さらにラパマイシン中のFKBP12結合部位を赤で表示. Phe46の ζ -水素とラパマイシンのC32のカルボニル酸素との間の水素結合を点線で示した. (b) $[\zeta\text{-}^{13}\text{C}]\text{-Tyr}$ 標識FKBP12の軽水:重水 (1:1) 中における 125 MHz 1D Tyr $\zeta\text{-}^{13}\text{C}$ シグナル. (上段) 遊離FKBP12, (中段) FKBP12-ラパマイシン複合体, (下段) FKBP12-FK506 複合体. Tyr水酸基の重水素化に伴い $\zeta\text{-}^{13}\text{C}$ は0.1 ppm程度高磁場に同位体シフトするために, 水素交換速度が遅いTyr26, Tyr82の $\zeta\text{-}^{13}\text{C}$ シグナルは強度が等しい2本のシグナルに分裂する. 水酸基がODのTyr残基は赤, OHのTyr残基は青, また交換の速い水酸基に結合したTyr残基 (ζ -炭素は平均化されたシグナルを与える) は黒で表記した. (c, d) ζ -SAIL Phe標識FKBP12のラパマイシン結合状態(c), およびFK506結合状態(d)の $\zeta\text{-CH}$ HSQC スペクトル.

存在することに注目し, 芳香環反転運動を指標として両複合体の相互作用界面のLASBM揺らぎを比較した. 結晶中では両複合体のFKBP12の薬剤結合界面の芳香環クラスターの立体配置はきわめて類似しており, Trp59のインドール環の周囲をPhe46, Phe48, Phe99, Tyr26の芳香環がほぼ垂直に取り囲んだ半円筒形の疎水性ポケットを形成している. FKBP12-ラパマイシン複合体について図示したように, 免疫抑制剤のFKBP結合部位 (赤で表示) は疎水性ポケット内深くに挿入されている (図6a)^{22, 23)}. このように, FK506やラパマイシンが高い親和性を持ちFKBP12と強固

に結合した状態においても, 芳香環クラスター内のPheやTyr残基の芳香環反転が可能か否かは, タンパク質-薬剤複合体界面におけるLASBM揺らぎに関する新たな情報をもたらす.

4) FKBP12の薬剤結合界面の水素結合

薬剤結合に伴うFKBP12界面近傍の芳香族アミノ酸側鎖の水素結合に関する情報はTrp59の $^{15}\text{N}\text{H}\epsilon$ -化学シフト, およびTyr26の水酸基の $^1\text{H}\eta$ -化学シフト, 水素交換速度から得られる. Tyr26の水酸基の水素交換速度 (pH 7.0, 30°C)

は、我々が開発したTyr残基の $\zeta^{13}\text{C}$ -化学シフトへの水酸基の重水素化に伴う同位体効果を利用する手法により正確に測定した(図6b)²⁴⁾。すなわち、Tyr26の水酸基の水素交換速度は遊離のFKBP12では測定不能なほど速いものの、ラパマイシン複合体では約 5.3 s^{-1} に低下し、FK506複合体では $<0.5\text{ s}^{-1}$ とさらに1桁低下する。また、FK506複合体のTyr26の水酸基のOH化学シフト(9.75 ppm)はラパマイシン複合体(8.68 ppm)に比べて約1 ppm低磁場にシフトする。したがって、結晶構造から推定されていたFKBP12のAsp37側鎖カルボキシ基とTyr26の水酸基との水素結合は溶液中でも存在し、FK506複合体中ではラパマイシン複合体と比較して、この水素結合がより強固であることが示された。一方、Trp59のインドール環 $^{15}\text{NH}\epsilon$ のNMRシグナルも有用な情報を与える。すなわち、通常は10 ppm付近にシグナルが観測されるインドール環 $^1\text{H}\epsilon/^{15}\text{N}\epsilon$ シグナルは、FK506複合体では5.25 ppm/120.4 ppm、ラパマイシン複合体では5.19 ppm/119.8 ppmに現れ、 ^1H シグナルは約5 ppmもの大きな高磁場シフトを示す。両複合体における化学シフト差は比較的小さいものの、この高磁場シフトはTrp59のインドール環NHがPhe99の芳香環とNH- π 水素結合を形成しており、大きな環電流効果を受けていることを示している(図6a)。

これらの水素結合は、いずれもFKBP12の分子内水素結合であるが、 ζ -SAIL Phe標識FKBP12を用いて、FKBP12に5残基含まれるPheの $\zeta^{13}\text{CH}$ NMRシグナルを両複合体間で比較したところ、予期せぬ重要な知見が得られた²¹⁾。両複合体中のPhe残基は全般的にはきわめてよく似た $\zeta^{13}\text{CH}$ 化学シフトを持ち、Phe残基周囲の局所構造の高い相同性を示唆している。しかしながら、Phe46残基の $\zeta^{13}\text{CH}$ シグナルに関しては、FK506複合体と比べラパマイシン複合体では約0.8 ppm (^1H)、約1.5 ppm (^{13}C) もの大きな低磁場シフトを示す(図6c)。このことから、ラパマイシン複合体の結晶構造中では2.5 Åの近距離にあるC32位のカルボニル酸素とPhe46の ζ -水素間の水素結合が示唆された。このようなCH-O=C水素結合は結晶構造中では原子間距離や角度から、その存在がしばしば推定されてはいたが、NMRによる直接的証拠が得られた例はこれまでなかった。FK506ではこのカルボニル酸素の位置がメチル基となっているために水素結合を形成できず、Phe46の ζ -CHに低磁場シフトは観測されない(図6d)。FKBP12と薬剤間のこのわずかな一つの分子間CH-O=C水素結合の有無が両複合体の結合界面の揺らぎに大きく影響する理由は後述する。

5) 芳香環反転現象に現れるFKBP12-薬剤結合界面におけるLASBM揺らぎ

遊離状態のFKBP12においては、薬剤結合部位に存在するPhe46, Phe48, Phe99, Tyr26はタンパク質表面近くに存在しており、それらの δ_1/δ_2 および ϵ_1/ϵ_2 シグナルは速い反転運動により化学シフト位置、すなわち $(\delta_1 + \delta_2)/2$ および

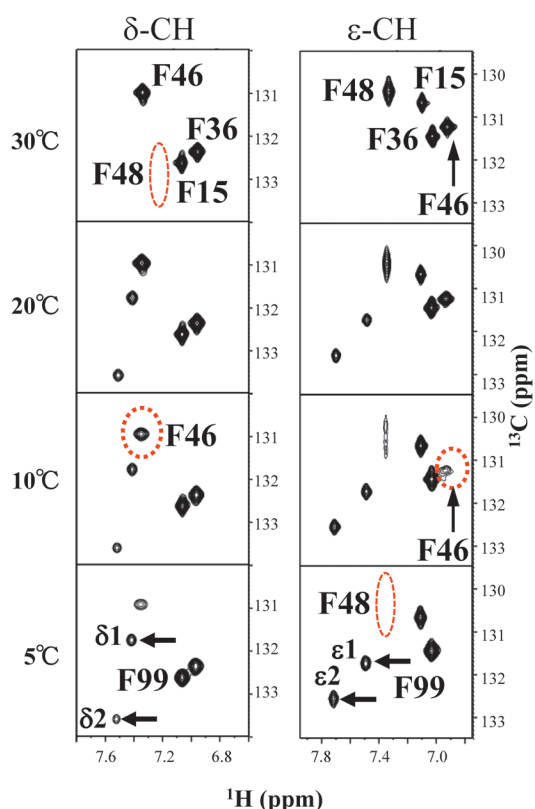
$(\epsilon_1 + \epsilon_2)/2$ 、に平均化された各1本の $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ シグナルとして観測される。一方、FK506、ラパマイシン複合体においては、芳香環クラスター内のPhe46, Phe48, Phe99, Tyr26の δ -, ϵ -CHシグナルは反転頻度に依存した明瞭な線形変化を示すが、クラスター外に存在する芳香環は測定条件下ではすべて平均化された1本のシグナルを与える。前述したように、芳香環の反転そのものはピコ秒程度の短時間で起こる $\text{C}_\beta\text{-C}_\gamma$ 軸周りの回転振動現象であり、芳香環周囲に反転に必要な $160\sim 170\text{ \AA}^3$ 程度の空間が過渡的に生じる頻度が見かけの反転速度となる²⁰⁾。このような大きな空間が、はるかに頻度の高い主鎖や側鎖の振幅の小さなランダム運動(stochastic motion)からタンパク質内部のみならず薬剤結合界面においても偶発的に生じ、芳香環の反転に必要なピコ秒程度の間保持されることは、結晶構造からは予想できない事実であり、タンパク質による薬剤認識過程を理解する上で重要な知見となる。芳香環反転の前後でタンパク質の立体構造は完全に保たれるため、Phe/Tyrの芳香環反転現象はNMRによってのみ検出することができるタンパク質動態である点もあらためて強調したい。

ラパマイシン複合体の δ -, ϵ 位の $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ スペクトル(図7)においては、Phe99の δ_1/δ_2 -, ϵ_1/ϵ_2 シグナルは 20°C 以下で分裂し2本のシグナルとして現れる。一方、FK506複合体中では δ -, ϵ シグナルはより低温の 5°C において初めて分裂する。両複合体におけるPhe99の δ_1/δ_2 -, ϵ_1/ϵ_2 シグナル間の化学シフト差はほぼ等しいことから、シグナルが分裂し始める温度がラパマイシン複合体に比べ、FK506複合体では著しく低いことはPhe99の反転速度がはるかに速いことを意味している。このように一定温度以下で δ_1/δ_2 -, ϵ_1/ϵ_2 シグナルが分裂して観測できる場合には、反転速度をEXSY法により精密に決定することが可能であり、その結果 5°C におけるFK506複合体のPhe99の反転速度(k_{app})はラパマイシン複合体に比べて約6倍速いことが見いだされた。さらに興味深いことに、両複合体界面に存在するTyr26の 5°C における環反転速度は、ラパマイシン複合体中で約50倍もFK506複合体中に比べて速い。このように、FKBP12と薬剤が結合する界面に隣接して存在するPhe99とTyr26の芳香環反転速度比が両複合体で大きく異なることが明らかとなった²¹⁾。このことは、芳香環反転は複合体が解離し遊離状態となったFKBP12を経由せず、複合体上で生じることを意味している。それでは、なぜFKBP12の薬剤結合部位の芳香環クラスター中で隣接した位置にあるPhe99とTyr26は、両複合体の結晶構造中に顕著な差異が見いだされないにも関わらず、構造動態が大きく異なるのであろうか。この疑問は芳香環クラスター内のPhe46, Phe48残基の芳香環シグナルの線形の温度依存性から明らかとなる。

6) FKBP12-薬剤相互作用部位のLASBM揺らぎは薬剤構造の差異を鋭敏に反映する

Phe46, Phe48の芳香環 δ_1/δ_2 -, ϵ_1/ϵ_2 -CHシグナルは、実験条件下において顕著な温度依存性を示すものの、Phe99や

(a) FKBP12-ラパマイシン



(b) FKBP12-FK506

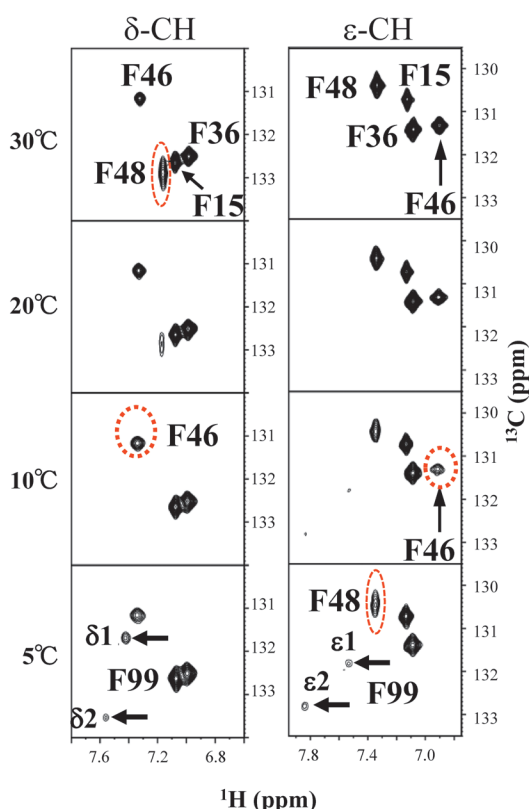


図7 FKBP12-ラパマイシン, FKBP12-FK506 複合体中のPhe δ-CH, ε-CH スペクトルの温度変化

(a)FKBP12-ラパマイシン複合体のPhe δ-CH (左側) およびε-CH (右側) スペクトルの温度変化. (b)FKBP12-FK506複合体のPhe δ-CH (左側) およびε-CH (右側) スペクトルの温度変化. 上段から下段にかけて30°C, 20°C, 10°Cおよび5°Cにおけるスペクトルを示す.

Tyr26とは異なり分離したシグナルを与えないため、芳香環の反転速度を正確に測定することはできない(図7). また、Phe/Tyr残基の芳香環シグナルの線形は、反転速度と δ_1/δ_2 、 ϵ_1/ϵ_2 -CHシグナル間の化学シフト差の両者に依存するために、ある温度で見かけの線幅が両複合体で異なっている。その差を直ちに反転速度と関連づけることはできない。しかしながら、前述したように速い反転速度により平均化され1本のシグナルとなった場合の化学シフトは、その温度における δ_1/δ_2 、 ϵ_1/ϵ_2 -CHシグナルの平均値となる。したがって、20°C以上の温度で観測されるPhe46, Phe48のε-CHの平均化されたシグナルの化学シフトが両複合体ではほぼ等しいのは、Phe46, Phe48の芳香環 ϵ_1/ϵ_2 シグナルの化学シフト差が同程度であることを強く示唆している。ラパマイシン複合体中でのPhe48のε-CHシグナルは10°Cにおいて顕著に広幅化し、5°Cにおいて完全に消失するが、FK506複合体中では5°Cにおいてもシグナルが明瞭に観測される(図7a, b)。このことは、FK506複合体中でのPhe48の環反転速度がラパマイシン複合体中に比べて格段に速いことを示している。同様に、両複合体のPhe46のδ-/ε-CHシグナルの線幅を詳しく比較すると、ラパマイシン複合体中でのPhe46の反転速度がわずかに遅いことが示された。これらのことから、Phe46のζ-水素がラパマイ

シンのC32位のカルボニル酸素と水素結合をしている影響は、Phe46自身の芳香環の反転速度よりも、むしろ隣接するPhe48残基の芳香環の反転速度に大きな影響を与えることが判明した。我々は、この理由をPhe48の芳香環が反転するためには、隣接するPhe46のζ-水素とラパマイシンのC32位のカルボニル酸素との間の水素結合が過渡的に切断されなければならないためであろうと推定した(図6a)。FK506複合体には存在しないζ-水素とカルボニル酸素との間の水素結合は、DFT計算から0.34 kcal/mol程度と推定される弱い水素結合ではあるが²¹⁾、ラパマイシン複合体中でPhe46に隣接するPhe48の芳香環の反転速度を低下させるには十分であろう。

ラパマイシン複合体におけるPhe48の芳香環周囲の揺らぎがこの弱い水素結合で抑えられる影響は、FKBP12の芳香環クラスターの上蓋となるTrp59のインドール環を介して対岸のPhe99の芳香環周囲の揺らぎの低下を招く。この結果、ラパマイシン複合体中のPhe99の芳香環反転頻度は、FK506複合体の約1/6に低下する。FK506複合体におけるPhe99周囲のより大きい揺らぎは隣接するTyr26を押しやり、その結果、水酸基(OH)の低磁場シフトと水素交換速度の低下に反映されるようにTyr26の水酸基とAsp37側鎖カルボキシ基との水素結合は強まり、ひいて

はTyr26の芳香環反転速度の著しい低下を招く。このように、FKBP12中のPhe46, Phe48, Trp59, Phe99, Tyr26から構成される芳香環クラスターの揺らぎは互いに密接に連携しており、Phe46とラパマイシンの間のわずか一つの水素結合の影響は薬剤相互作用部位全体へと伝播すると思われる²¹⁾。ラパマイシンはFKBP12と複合体を形成することにより、mTORのFRB (FKBP-rapamycin-binding) ドメインと強く結合し、mTORの機能を阻害し免疫作用を抑制することは既に述べたが、その理由に関しては必ずしも明確ではない^{25, 26)}。FKBP12-ラパマイシン-FRB複合体 (ternary complex) の結晶構造ではわずかな直接的相互作用がFRBとFKBP12間に観測されるものの、ラパマイシンのFRB結合ドメイン (エフェクター結合部位) の構造はFKBP12-ラパマイシン複合体 (binary complex) とほぼ等しい²⁷⁾。このように、結晶構造を詳細に調べても何故FKBP12と結合することによりラパマイシンとmTORとの結合が遊離状態の2000倍も強まるのかは解明することはできない²⁶⁾。

以上に述べたように、FKBP12のラパマイシン、およびFK506との複合体形成部位を形成する芳香環クラスターは、両複合体の結晶構造をみる限りきわめて類似しているものの、クラスター内に存在する芳香環反転現象をSAIL法により詳細に検討したところ、両複合体の複合体形成界面のLASBMには特徴的な差異が見いだされた。このような複合体形成界面の動態変化が、FKBP12-ラパマイシン複合体にのみ存在するC32位のカルボニル基とFKBP12のPhe46の ζ -H間の水素結合に起因するならば、ラパマイシンのFKBP結合部位における構造上の微細な違いにより引き起こされる複合体界面のLASBM変化が、mTORとの相互作用に影響を与えるか否かを実験的に検証することはきわめて興味深い。たとえば、ラパマイシンのC32位のカルボニル基をメチレン基に置換できたとすれば、FKBP12-薬剤結合部位のLASBM変化がエフェクター結合部位の動態変化を介してmTORとの相互作用に影響が見られるであろうか？ もし、タンパク質の薬剤結合部位の構造動態を薬剤設計により制御できるならば、SAIL法により明らかとなるタンパク質-薬剤複合体界面の構造動態は新たな薬剤設計指標となる可能性がある。

4. 今後の展望

構造生物学の潮流が、多様な手法により得られるタンパク質複合体の構造情報と生命機能を結びつける統合構造生物学 (Integrative Structural Biology) へと向かうなか、NMR法に期待される主要な貢献も変わりつつある。いうまでもなく、NMR法にとって分子量限界の拡張は永遠の課題であり、より複雑なタンパク質複合体や膜タンパク質へのNMR法の応用において、その重要性はますます高まっている。しかしながら、NMR技術開発を駆り立てる主たる動機は、単に難易度の高いタンパク質複合体の立体構造決定への技術的挑戦から、生体膜内や細胞内に存在す

る状態、いわば生体機能を果たす場に限りなく近い状態におけるタンパク質相互作用ネットワークの構造動態の解明に向けられているようにみえる。従来は研究対象とはならなかったような、複雑なタンパク質複合体においては、多様な個別的手法からもたらされる情報を統合することにより、初めてその全体像が明らかとなる。構造生命科学の新たな潮流のなかで、NMR法が引き続き主要な役割を担うためには、他の手法では得られない独自の構造情報をNMR法がもたらしうるか否かが鍵となるであろう。本稿で紹介した、SAIL法を含めた安定同位体利用NMR技術のさらなる高度化は、わが国の生体系NMR研究者が世界をリードしてきた数少ない伝統的分野であり、統合構造生物学において期待されるNMR法の新たな貢献を果たす上で、さらなる強化に努めるべき不可欠な基盤技術であることを理解していただければ幸いである。

文 献

- 1) Kainosho, M., Torizawa, T., Iwashita, Y., Terauchi, T., Ono, A.M., & Güntert, P. (2006) *Nature*, **440**, 52–57.
- 2) Pervushin, K., Riek, R., Wider, G., & Wüthrich, K. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 12366–12371.
- 3) Tugarinov, V., Hwang, P.M., Ollerenshaw, J.E., & Kay, L.E. (2003) *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 10420–10428.
- 4) Tugarinov, V. & Kay, L.E. (2005) *ChemBioChem.*, **6**, 1567–1577.
- 5) Gardner, K.H., Rosen, M.K., & Kay, L.E. (1997) *Biochemistry*, **36**, 1389–1401.
- 6) Goto, N.K., Gardner, K.H., Mueller, G.A., Willis, R.C., & Kay, L.E. (1999) *J. Biomol. NMR*, **46**, 127–133.
- 7) Gans, P., Hamelin, O., Sounier, R., Ayala, I., Dura, M.A., Amero, C.D., Noirclerc-Savoye, M., Franzetti, B., Plevin, M.J., & Boissbouvier, J. (2010) *Angew. Chem.*, **122**, 2002–2006.
- 8) Lichtenegger, R.J., Weinhäupl, K., Reuther, L., Schörghuber, J., Schmid, W., & Konrat, R. (2013) *J. Biomol. NMR*, **57**, 205–209.
- 9) Isaacson, R.L., Simpson, P.J., Liu, M., Cota, E., Zhang, X., Freemont, P., & Matthews, S. (2007) *J. Am. Chem. Soc.*, **129**, 15428–15429.
- 10) Velyvis, A., Ruschak, A.M., & Kay, L.E. (2012) *PLoS ONE*, **7**, e43725.
- 11) Fisher, M., Kloiber, K., Häusler, J., Ledolter, K., Konrat, R., & Schmid, W. (2007) *ChemBioChem.*, **8**, 610–612.
- 12) Miyanoiri, Y., Takeda, M., Okuma, K., Ono, A.M., Terauchi, T., & Kainosho, M. (2013) *J. Biomol. NMR*, **57**, 237–249.
- 13) Miyanoiri, Y., Ishida, Y., Takeda, M., Terauchi, T., Inouye, M., & Kainosho, M. (2016) *J. Biomol. NMR*, **65**, 109–119.
- 14) Torizawa, T., Ono, A.M., Terauchi, T., & Kainosho, M. (2005) *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 12620–12626.
- 15) Takeda, M., Ono, A.M., Terauchi, T., & Kainosho, M. (2010) *J. Biomol. NMR*, **46**, 45–49.
- 16) Miyanoiri, Y., Takeda, M., Jee, J.G., Ono, A.M., Okuma, K., Terauchi, T., & Kainosho, M. (2011) *J. Biomol. NMR*, **51**, 425–435.
- 17) Dobson, C.M., Moore, G.R., & Williams, R.J. (1975) *FEBS Lett.*, **51**, 60–65.
- 18) Campbell, I.D., Dobson, C.M., Moore, G.R., Perkins, S.J., & Williams, R.J. (1976) *FEBS Lett.*, **70**, 96–100.
- 19) Wagner, G., DeMarco, A., & Wüthrich, K. (1976) *Biophys. Struct. Mech.*, **2**, 139–158.

- 20) Wagner, G. (1980) *FEBS Lett.*, **112**, 280–284.
- 21) Yang, C.J., Takeda, M., Terauchi, T., Jee, J.-G., & Kainosho, M. (2015) *Biochemistry*, **54**, 6983–6995.
- 22) Van Duyne, G.D., Standaert, R.F., Karplus, P.A., Schreiber, S.L., & Clardy, J. (1993) *J. Mol. Biol.*, **229**, 105–124.
- 23) Wilson, K.P., Yamashita, M.M., Sintchak, M.D., Rotstein, S.H., Murcko, M.A., Boger, J., Thomson, J.A., Fitzgibbon, M.J., Black, J.R., & Navia, M.A. (1995) *Biol. Crystallogr.*, **51**, 511–521.
- 24) Takeda, M., Jee, J.-G., Ono, A.M., Terauchi, T., & Kainosho, M. (2009) *J. Am. Chem. Soc.*, **131**, 18556–18562.
- 25) Leone, M., Crowell, K.J., Chen, J., Jung, D., Chiang, G.G., Sareth, S., Abraham, R.T., & Pellecchia, M. (2006) *Biochemistry*, **45**, 10294–10302.
- 26) Banaszynski, L.A., Liu, C.W., & Wandless, T.J. (2005) *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 4715–4721.
- 27) Liang, J., Choi, J., & Clardy, J. (1999) *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, **55**, 736–744.

著者寸描

●甲斐荘 正恒 (かいのしょう まさつね)



首都大学東京大学院理工学研究科客員教授。名古屋大学大学院理学研究科構造生物学研究センター客員教授。理学博士(70年, 都立大学)。

■略歴 1942年横浜市に生る。64年都立大学理学部化学科卒業。73～75年カルフォルニア工大博士研究員, 80年都立大学理学部助教授, 92年同教授, 2007年同特任教授。07年名古屋大学理学研究科特

任教授, 12年より現職。

■研究テーマと抱負 安定同位元素標識を利用する生体物質(核酸・タンパク質)のNMR研究手法の開発。我が国の誇る微生物発酵, 不斉有機合成技術を有効に取り入れた高度な標識技術を用い, 独自のNMR測定・解析手法を世界に向けて発信したい。

■趣味 野菜作り・園芸, 散歩。