



研究ノート

多次元NMRによる蛋白質の立体構造解析

京 極 好 正*

Determination of Solution Structure of Proteins by Means of Multi-dimensional NMR

Key words : Protein, Solution Structure, Multi-dimensional NMR

蛋白質の働きにどの部分に関与しているかを知り、また特定の働きをする蛋白質分子を設計したりするには、蛋白質のアミノ酸配列のみでなく立体構造もわからねばならない。立体構造解析にはこれまで主にX線結晶解析法が用いられて大きな成果を上げてきた。しかしすべての蛋白質が結晶になるわけでもないし、溶液中の構造は結晶中のものと違う可能性もある。そんな理由で、溶液中の蛋白質の立体構造を決めることが必要になっていたが、その願いを部分的にもかなえてくれたのが高分解能NMRであった。私共の研究室もこの手法の導入と利用に取り組んできた。

NMRによる蛋白質の立体構造解析の第1期は、今から8,9年前に始まった。超伝導磁石技術の発展で、当時、プロトンの共鳴周波数が500MHz程度のNMR装置が普及し、オリゴペプチドや分子量一万以下の小さな蛋白質では、数百個あるプロトンシグナルも殆んど分離可能となった。しかもエルンスト(1991年度ノーベル化学賞受賞)らの開発した2次元NMRによってそれらプロトン間の相互作用たとえばスピン結合や磁気双極子相互作用が容易に検出できるようになって、NMRの技術のみで、各プロトンシグナルの化学構造上での結合位置への帰属

が可能となった。それと同時にこの相互作用の情報から、プロトン間の距離の情報も抽出できる。各プロトン間の距離がわかれば、ディスタンスジオメトリーという数学的な手法を適用して、各プロトンの3次元的位置、ひいてはそれに連るCやNの位置もある範囲内で求まり、従ってその蛋白質のグローバルな立体構造が求まる。この方法を適用して、世界では100近い、生理活性ペプチド、小蛋白質の構造が決定された¹⁾。私共も我国で初めてアミノ酸13個の貝の毒性ペプチドコノトキシンの構造を決め、その後10個近い数のホルモン、毒素ペプチドの構造を決めている²⁾。

しかし、この方法の最大の限界はシグナルの重りの問題である。性質のよい蛋白質ならアミノ酸数110個位のものでも結構シグナルの分離が良いが、こういった蛋白質は数が限られ、大体βシートの多いもの、構造がきっちりして揺ぎの少ないもの、NMR測定濃度で会合しないものである。アミノ酸数が60個位のものでもαヘリックスやループの多い柔い蛋白質はシグナルの重りが厳しい。シグナルの分離にはもっと高い磁場のNMR装置を用いればよいが、最近やっと600MHzの装置が普及する程度で、この7~8年間の磁場の伸びは2割程度であって、飛躍的な発展は望めない。そこに一つのブレイクスルーをもたらしたのが、安定同位体標識と組み合わせた多次元NMR法である。これによってNMRによる蛋白質の構造解析は第2期を迎えたことになる。

この方法によって蛋白質中の¹H核のシグナ



*Yoshimasa KYOGOKU

1935年5月1日生

昭和33年東京大学・理学部・化学科卒業

現在、大阪大学蛋白質研究所、蛋白質物性部門、教授、理博、生物構造化学

TEL 06-877-5111(内線3826)

ルを分離する原理は次のようになる。 ^1H 核は必ずCやNの異核と結合しているが、核磁気共鳴に関係しているのは核スピン $1/2$ を持つ ^{13}C か ^{15}N 核である。もし、プロトン核の共鳴に重りがあっても、そのプロトンの結合している ^{13}C 核や ^{15}N 核の共鳴周波数に差異があれば、 ^1H と ^{13}C または ^{15}N の周波数軸をとった2次元 NMR 上ではシグナルは分離することになる。この方法自体は異核種2次元 NMR として用いられてきたが、その際は、観測は ^{13}C または ^{15}N 核の共鳴吸収として観測され、それ故に感度的には ^1H の $1/64$ または $1/1000$ しかなかった。しかももし ^{13}C や ^{15}N を天然存在比のものを使えばそれぞれ、その 1% と 0.3% とさらに悪くなる。分子量が小さく、濃度的に濃くできる天然有機化合物ではそれでもよいが、蛋白質では実用的でない。そこに、検出を ^{13}C や ^{15}N 核でなく ^1H 核で行う方法 (HMQC とか HSQC と呼ばれている) が開発され飛躍的に感度が上がった³⁾。さらに ^{13}C や ^{15}N を人工的に外から取り

込ませて、含有量を 100% に近づければ、この方法の感度は普通の ^1H 測定の感度とほぼ同じになる。こういった試料調製は、最近の蛋白質工学の発展によって、異種生物の蛋白質を大腸菌を用いて大量生産できるようになったので、その方法が利用できる。目的の蛋白質の遺伝子をプラスミドに入れ、それを大腸菌に抽入する。大腸菌の培養の際、ちっ素源として $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ 、炭素源として ^{13}C -グルコースを加えて、培養して、菌から目的の蛋白質を分離精製すると ^{15}N 、 ^{13}C の片方または両方とも同位体ラベルされた蛋白質がとれる。菌体 1l から $1\sim 10\text{mg}$ の蛋白質がとれば実用的に使える。

多次元 NMR の測定には、これまでの装置に ^1H 、 ^{13}C 、 ^{15}N の周波数が同時に発振できるチャンネルを備えていること、 ^1H の検出コイルが内側に、 ^{13}C や ^{15}N の照射コイルが外側に巻かれたいわゆるインパース検出のプロープが必要である。我々はこの手法を用いて各種の DNA 結合蛋白質の DNA 結合ドメインを安定同位体

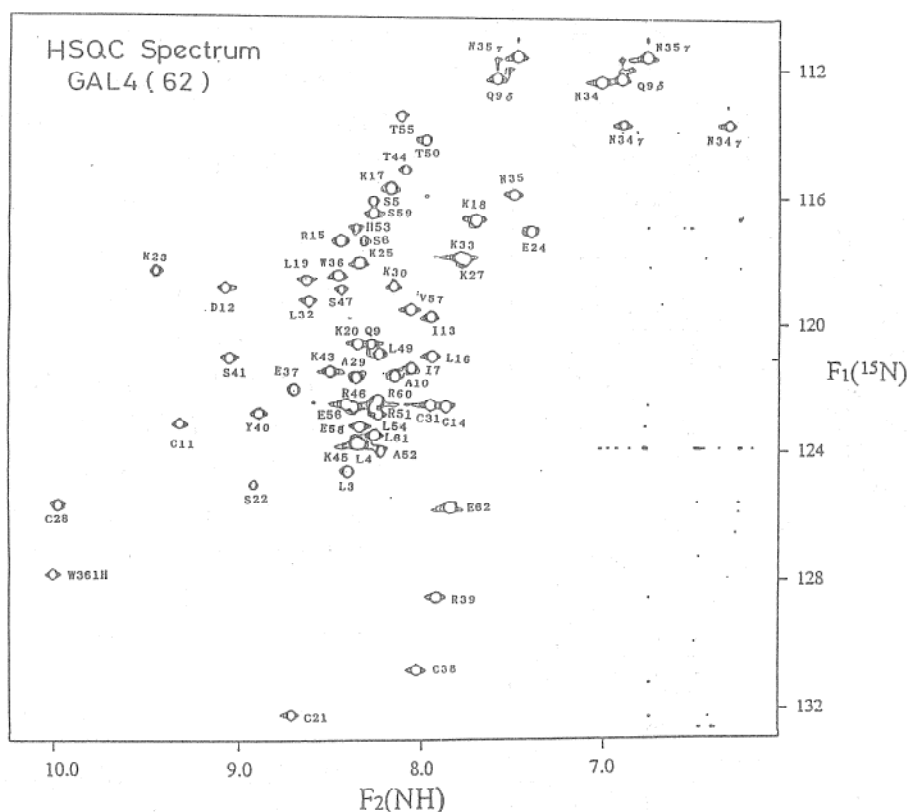


図1 GAL4蛋白質の62残基DNA結合ドメインの ^1H - ^{15}N HSQCスペクトル。

標識して得て測定に供している。酵母のグルコース遺伝子群の制御にかかわっている GAL4 蛋白質の DNA 結合ドメイン 62 残基の ^{15}N -HSQC スペクトルを図 1 に掲げる。このスペクトル上で殆んど全部のアミドプロトンとアスパラギン、グルタミン側鎖のアミドプロトンのシグナルが分離観測される。ここにもう一軸プロトンの周波数をとって展開すると ^1H - ^1H の 2 次元 NMR の断面が得られ、そこからスピンスピン結合や距離情報を含む NOE が得られる。従って ^1H - ^1H - ^{15}N または ^{13}C の 3 次元 NMR は、 ^1H - ^1H の 2 次元 NMR での重りがある程度解除し、距離情報も得ることが出来るわけである。それでも分離が不十分でしかも ^{15}N , ^{13}C の同時標識試料が得られれば、もう 1 軸 ^{13}C か ^{15}N を加えた 4 次元 NMR に展開でき、一層分離がよくなる (図 2)。単に分離というだけでなく、 ^{13}C と ^{15}N のスピンスピン結合をも介して、核の近接関係も同定できるので、 ^1H のスピンスピン結合と距離の情報にのみ頼っていた第 1 期の解析法より、

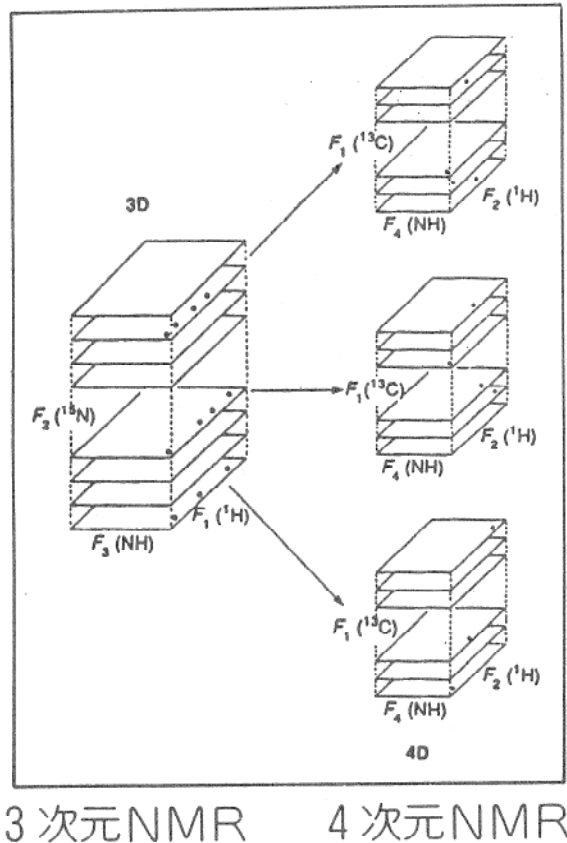


図 2 ^{15}N , ^{13}C 標識蛋白質についての 2 次元, 3 次元, 4 次元 NMR の展開例。

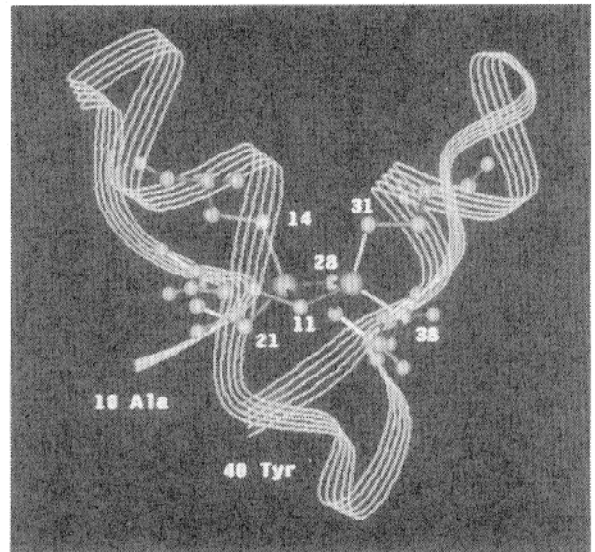


図 3 GAL4 蛋白質 DNA 結合ドメイン中の 10-42 残基部分主鎖の折れたたまり方。

より確実な帰属が出来、それにもとづいて正確なグローバルフォルディングが求められることになる⁴⁾。先程の GAL4 の DNA 結合ドメインを ^{13}C , ^{15}N で二重標識した試料で、 ^1H , ^{13}C , ^{15}N 核の共鳴周波数を完全解析し、3 次元, 4 次元 NMR から得られた距離情報にもとづいて立体構造を計算した結果が図 3 に掲げてある⁵⁾。62 残基のうち N 末端 9 残基と C 末端 20 残基は運動が激しいので、その部分を除いたコア部分の構造のみ記してある。この蛋白質は Zn が必須で、このコアには 2 分子の Zn が 6 個の Cys に配位したいわゆる Zn_2Cys_6 クラスタを形成していた。このコア構造のみに関しては他のグループも同じ頃報告している。このようにして安定同位体標識と多次元 NMR の組み合わせが溶液中の蛋白質構造解析の主流になるだろうが、それでも会合しない蛋白質で分子量 20,000 位のものまでである。巨大な蛋白質では、その一部を取り出したり、また、同位体標識したドメインと置き換えるような技術が定着すれば、構造解析の新たな展望が開けるだろう。

参 考 文 献

- 1) Wüthrich, K. (1986) NMR of Rroteins and Nucleic Acids, Wiley, New York. 京極好正, 小林祐次訳「タンパク質と核酸の NMR」東京化学同人。

- 2) Kobayashi, Y., Takashima, H., Tamaoki, H., Kyogoku, Y., et al., (1991) *Biopolymers*, **31**, 1213-1220.
- 3) Bax, A., Griffey, R. H. and Hawkins, B. L. (1983) *J. Magn. Reson.*, **55**, 301-315.
- 4) 白川昌宏, 伊倉光彦 (1992) *生物物理* **32**, 116-119.
- 5) Shirakawa, M., Fairbrother, W. J., Serikawa, Y., Matsuo, H., Ohkubo, T., Kyogoku, Y. and Wright, P. E. (1993), *Biochemistry*, 印刷中.

