

NMRによるタンパク質とリガンドの相互作用解析

大久保忠恭

生物工学的研究において欠かせないのがタンパク質-リガンド間、またはタンパク質-タンパク質間相互作用の包括的な理解である。多くの実験的手法により相互作用部位の同定と構造解析が可能となってきた。NMRは分子量が約30 kDa以下の生体高分子の高次構造を解明する手段として広く認められている。NMRによる相互作用の研究においてよく用いられるのは化学シフト、緩和時間、NOEなどである。各NMRシグナルの化学シフト値はリガンドの結合に伴う結合部位近傍環境の変化を敏感に反映する。環境の変化は立体構造に起因するが、関与する要素が多いため、化学シフト値の変化から直接立体構造の変化量を導くのは困難である。緩和時間よりタンパク質とリガンドの相互作用の動的側面に関する情報を得ることができる。タンパク質とリガンドが強く結合している場合、NOEから複合体の立体構造情報を直接、得ることができる。

NMRの時間スケール このNMRスペクトルの様相は結合状態と遊離状態の交換寿命 τ_{ex} に依存する。

$$1/\tau_{ex} = 1/\tau_{complex} + 1/\tau_{free}$$

ここで $\tau_{complex}$ は複合体状態の寿命、 τ_{free} は遊離型状態の寿命を表す。

個々の化学シフトや緩和時間に対する影響は2つの状態におけるNMRパラメータの差の程度と τ_{ex} の逆数(=交換速度)の相対比により決定され、交換速度の方が大きい場合を速い交換、小さい場合を遅い交換という。結合状態と遊離状態におけるNMRパラメータの差の典型的な値は化学シフトで0-1000 s⁻¹、緩和時間で0-50 s⁻¹の範囲内にある。このため、緩和時間の変化は速い交換過程にあるが、化学シフトの変化は速い交換過程の場合もあれば遅い交換過程の場合もある。遅い交換の場合、結合状態と遊離状態由来のNMRシグナルが個別に観測され、シグナルの強度比は各状態の存在比に比例する。速い交換の場合、結合状態と遊離状態間の交換が速いため、NMRの時間スケールでは2つの状態を区別できなくなり、2つの状態の存在比を加重した化学シフトの平均値の位置にNMRシグナルは観測される(図1)。遅い交換の場合、結合状態のシグナルが観測されるため結合状態

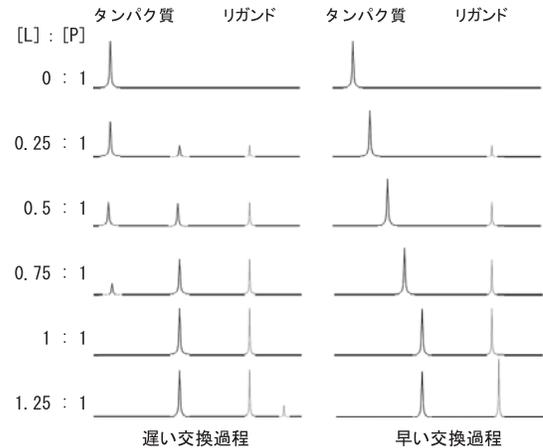


図1. 遅い交換過程, 早い交換過程における典型的NMRスペクトルの変化の様子

の立体構造情報を得やすい。逆に解離定数 K_d の値を決定する場合、速い交換の場合の方がシグナルの変化を追いつきやすいので有利である。以下にNMRを用いた相互作用研究の応用例を示した。

DNA修復タンパク質AdaとDNAの相互作用¹⁾ 生体中のDNAは、細胞内、細胞外のさまざまなアルキル化因子によって絶えず化学的な損傷を受けている。大腸菌においてDNAのアルキル化によるDNA損傷は、Adaを中心とした一連の応答システムにより修復される。Adaは、DNAの修復反応に伴うCys残基のメチル化により特定のDNA配列に対する結合能が大幅に上昇し、DNA修復タンパク質から転写制御因子へ機能をスイッチさせるタンパク質である。AdaのN末16 kDaのドメイン(N-Ada16k)が機能スイッチを行う最小ドメインであることが明らかになっていたが、その活性化の機構は未解明であった。そこで、機能スイッチ機構を原子レベルで明らかにするためにNMRを用いて立体構造決定と相互作用解析を行った。

N-Ada16kは、DNAメチルトランスフェラーゼ(MTase)活性を有し、DNAリン酸骨格のメチル化損傷であるメチルホスフォトリエステルのメチル基を選択的に自身のCys残基へ不可逆的に転移してDNA損傷を修復する。

この時、Cys残基にメチル基が付加したN-ada16kは、特定のDNA配列(ada遺伝子のプロモーター領域および他のDNA修復タンパク質をコードするalkA遺伝子のプロモーター領域)に対する親和性が增大してさまざまなDNA修復酵素の発現を制御する転写制御因子として作用する。これまでの構造生物学的知見から、N-Ada16kには立体構造保持に重要な1個の亜鉛イオンが配位していることが知られており、その配位子は4つの保存されたシステイン残基(Cys38, Cys42, Cys69, Cys72)であることが明らかにされていた。しかし、DNA上のメチル基を受容するメチル化部位の残基については、Cys38もしくはCys69が可能性として示唆されていた。そこで、N-Ada16kのメチル化部位の同定を行った。メチル化部位の同定には、Cys残基に転移したメチル基のシグナルのみを選択的に検出して帰属すればよい。そこで、タンパク質を ^{13}C で均一にラベルシラベル化していないアルキル化DNAと反応させた。付加したメチル基だけが $^{12}\text{CH}_3$ である。HMBC法を改良して、転移した ^{12}C を持つメチル基とシステイン残基の $^{13}\text{C}\beta$ との相関を検出した。

図2に測定した2D ^{13}C -filtered ^1H - ^{13}C HMBCスペクトルを示す。2.27 ppm (^1H)/45.1 ppm (^{13}C)に転移したメチル基のプロトン($^{12}\text{CH}_3$)とシステイン残基の $^{13}\text{C}\beta$ の相関に対応するクロスピークが1個だけ観測された。連鎖帰属法で帰属されたCys残基の $^{13}\text{C}\beta$ の化学シフト値はCys38: 45.2 ppm, Cys42: 31.1 ppm, Cys69: 34.9 ppm, Cys72: 32.7 ppmであったので、Cys38がN-Ada16kのメチル化部位であることが明らかとなった。また、この結果は並行して行ったMSスペクトルの解析結果とも一致した。次に、メチル化型N-Ada16k(me-C38 N-Ada16k)の溶液構造を決定した。その結果、N-Ada16kが

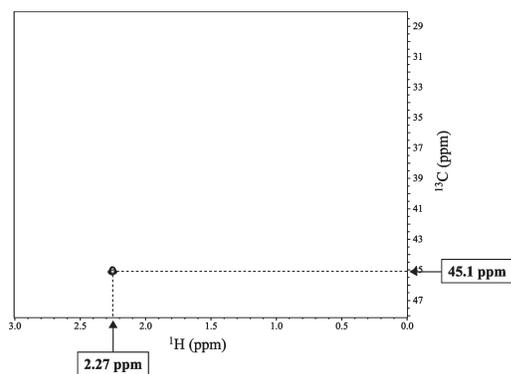


図2. ^{13}C -filtered ^1H - ^{13}C HMBC スペクトル

2つのサブドメイン、 $\text{ZN}(\text{Cys})_4$ 四面体配位(zinc-thiolate center)を持つN末MTaseサブドメインとヘリックス-ターン-ヘリックス構造を持つC末helicalサブドメインから構成されていることがわかった。meC38 N-Ada16kの配列特異的DNA結合領域を同定するため、非メチル化型・メチル化型N-Ada16kとadaプロモーター配列を含むDNAフラグメント複合体の2D 1H-15N HSQCスペクトルを測定した。DNA結合にともない、一部の主鎖のシグナルのシフトが観測された。図3にこれらのシフトした領域を一次構造上および立体構造上に示した。メチル化型において、2つの部位-MTaseサブドメインの β -シート領域とhelicalサブドメインのHTHモチーフがおもにDNA結合に寄与していた。一方、非メチル化型では、helicalサブドメインのHTHモチーフのみが、DNAと相互作用していた。

MTaseサブドメインのメチル化前後での立体構造を比較したところ、顕著な立体構造変化は観測されなかった。タンパク質表面電荷の比較より、zinc-thiolate center周辺の負電荷がメチル化型で著しく減少していることを見いだした。このことから、非メチル化型MTaseサブドメインではDNAとzinc-thiolate centerの間に生じる負電荷の静電反発力によって、DNAとの相互作用が抑制されていると考えられた。そして、Cys38のメチル化に伴うタンパク質-DNA間の静電反発力の減少により、メチル化型MTaseサブドメインが配列特異的にDNAに結合することが明らかとなった。

L-PGDSと疎水性リガンドの相互作用^{2,3)} 脳内でのプロスタグランジン H_2 (PGH_2)からプロスタグランジン D_2 (PGD_2)への異性化反応をリポカリン型PGD合成酵素(L-PGDS)は触媒している。 PGD_2 は内因性睡眠誘発物質であり自然な睡眠を誘発することから、L-PGDSの酵素としての機能の解明は、従来の睡眠薬より副作用の少ない睡眠導入薬の開発につながると考えられる。また、L-PGDSはリポカリンファミリーと呼ばれる疎水性低分子輸送タンパク質ファミリーに属している。一般にリポカリンファミリータンパク質は、 β バレルの内部で特定の疎水性低分子と結合する。しかし、L-PGDSは際立って広いリガンド選択性を有しており、基質である PGH_2 だけでなく化学構造や大きさがまったく異なるレチノイド、ビリルビン、アミロイド β ペプチドとも強く結合するため、脳内の組織障害性脂溶性物質の捕捉タンパク質(スカベンジャー)として働いていると考えられている。しかし、L-PGDSの疎水性低分子認

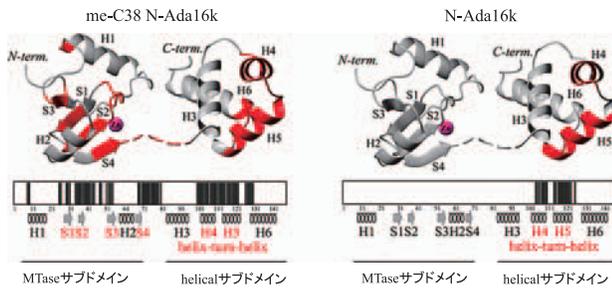


図3. N-Ada16k/DNA 複合体のNMR シグナル変化

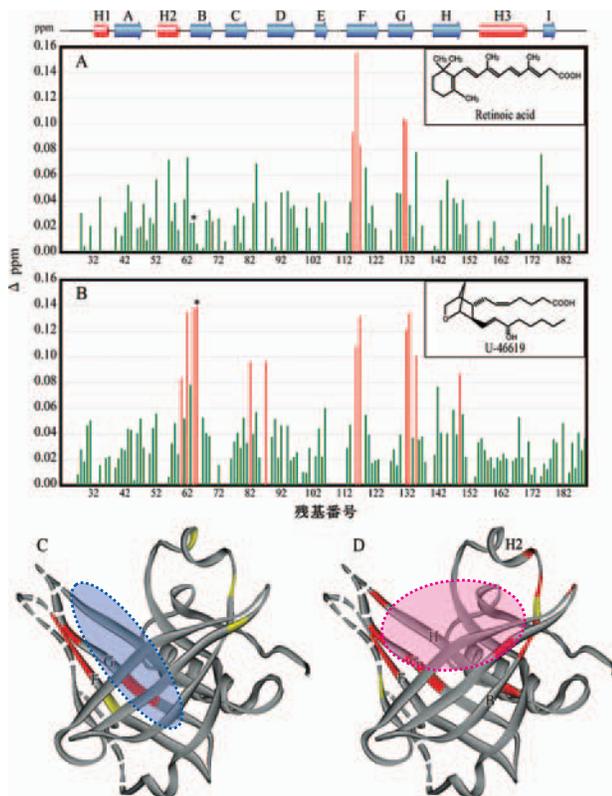


図4. (A) レチノイン酸と(B) 基質誘導体U-46619 滴定時の化学シフトの変化. (C) レチノイン酸と(D) U-46619 添加時に化学シフト値が大きく変化した残基を立体構造上で示し、両者の結合部位を点線で囲んだ。

識機構は解明されていなかった。そこで、NMRによる立体構造決定と相互作用解析を行った。

大腸菌を用いたL-PGDSの大量発現系・精製系を構築し、NMRを用いて溶液中の遊離型L-PGDSの立体構造決定を行った。L-PGDSは一般的なリポカリンファミリータンパク質に比べて、大きなcavityをβバレルの内部に持っていた。次に、レチノイン酸および安定基質誘

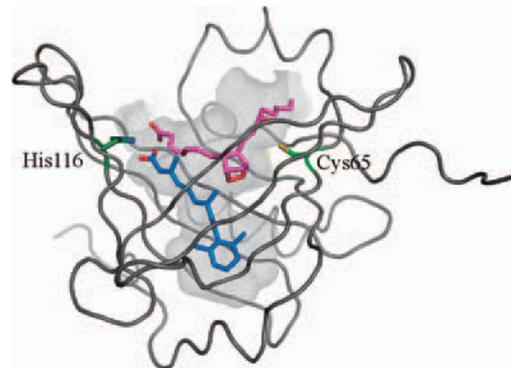
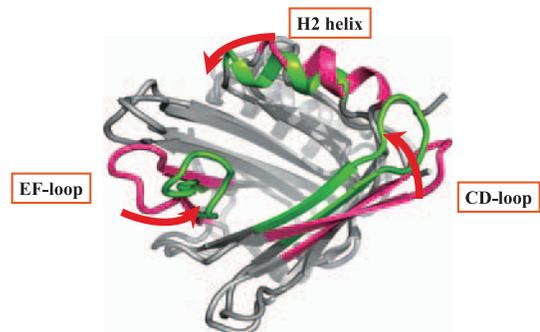
図5. レチノイン酸とPGH₂の結合モデルの重ね合わせ図。左側がレチノイン酸、右側がPGH₂。

図6. L-PGDS遊離型(マゼンタ)から基質誘導体結合型(緑色)への構造変化

導体U-46619とL-PGDSの2D ¹H-¹⁵N HSQCスペクトルを測定した。レチノイン酸とU-46619の結合に伴う化学シフト値の変化をプロットした(図4 A, B)。大きな変化が観察された残基をL-PGDSの立体構造上で示した(図4 C, D)。

レチノイン酸の結合による化学シフト値の変化がもっとも大きかった残基は、ストランドF, Gからβバレル底部に集中していた。このことから、レチノイン酸の結合領域は、図4Cの青色の円で囲まれた領域であると考えられた。一方、U-46619の結合による変化が大きかった残基は、βバレル上部に広く分布していた。これらのことから、U-46619およびPGH₂の結合領域は、図4Dのマゼンダ色の円で囲まれたβバレル上部の領域であると考えられた。レチノイン酸とPGH₂の結合領域は異なっていた。

さらに、より詳細なリガンド結合様式を明らかにするため、ソフトウェアAutoDockを用いて、リガンド結合モデルを作成した(図5)。モデルでは、レチノイン酸は

β ストランドF,Gに添って、シクロヘキセン環が β バレル底部に挿入する形で結合していた。一方で、PGH₂結合モデルにおいて、PGH₂は親水的な領域を含む β バレル上部に結合していた。酵素反応を受けるPGH₂のペルオキシド基は、活性中心のCys65と約4 Åで近接しており、両者が接触して反応することが十分に可能であることが示された。レチノイン酸とPGH₂の結合モデルを重ね合わせたところ、両者とも互いに重大な立体障害を引き起こしておらず、両者同時にL-PGDSと結合できる可能性が示唆された。

そこで、レチノイン酸のL-PGDS酵素活性阻害様式を調べた。その結果、レチノイン酸はL-PGDSの酵素活性を非競合阻害し、図5のモデルを支持した。

次に、NMRを用いてL-PGDSと基質安定誘導体U-46619の複合体溶液構造を決定した。

図6に遊離型と複合体型の立体構造を示した。複合体型と遊離型では β バレル中核の構造は、ほとんど変化し

ていないが、 β バレル上部のCD-ループ、EF-ループおよびH2-ヘリックスの領域で構造が大きく変化して複合体形成に伴い β バレル上部の入り口を閉じて蓋をするように構造変化を起こしていた。このことは、リガンド結合によりL-PGDSの慣性半径が減少するというX線小角散乱法の結果とも一致していた。以上のことから、L-PGDSは、さまざまな形状・大きさの疎水性リガンドに自らの構造を適応させるという、他のリポカリンファミリータンパク質に見られない特徴を持つことが明らかとなった。このようなリガンド捕捉機構により、L-PGDSは“広いリガンド選択性”と“リガンドとの強い結合”を成り立たせていると考えられる。

文 献

- 1) Takinowaki, H. *et al.*: *Protein Sci.*, **15**, 487 (2006).
- 2) Shimamoto, S. *et al.*: *J. Biol. Chem.*, **282**, 31373 (2007).
- 3) Miyamoto, Y. *et al.*: *J. Struct. Biol.*, **169**, 209 (2009).