検出技術:天然変性タンパク質の構造生物学

小田 隆1*·齋尾 智英2

天然変性タンパク質とは

Anfinsenがリボヌクレアーゼの自発的な折れ畳まりを 発見して以来、長い間、タンパク質はポリペプチド鎖が 一定の立体構造に折れ畳まることで機能すると信じられ てきた. しかし、Wrightらの論文¹⁾に代表されるように、 2000年頃から生理的条件下で一定の構造に折れ畳まっ ていないタンパク質:天然変性タンパク質 (Intrinsically disordered protein: IDP) にも重要な機能があることが知 られるようになり、タンパク質研究に大きなパラダイム シフトをもたらした. 天然変性タンパク質は特に真核生 物の核内タンパク質に多いとされる. これらのタンパク 質の多くは分子全体が天然変性状態なのではなく、複数 の折れ畳まったドメインが天然変性領域でつながれたマ ルチドメインタンパク質である. 天然変性タンパク質 (または領域) は構造の柔軟性により複数のパートナー に対して自身の形を変えて相互作用し、細胞内シグナル 伝達のハブとして機能するものも多い. 天然変性タンパ ク質には偏ったアミノ酸組成や繰り返し配列を持つもの も多く、それらは低複雑性タンパク質 (Low complexity: LC) とも呼ばれる. 特に, 液-液相分離 (Liquid-liquid phase separation: LLPS) では、LCによる多価の相互作 用が相分離に深く関わるとされている。 天然変性タンパ ク質の相互作用様式としてもっともよく知られるのは、 結合とカップルした折れ畳まり(Coupled folding and binding)で、折れ畳まったドメインに天然変性タンパク 質が結合すると、天然変性タンパク質が構造を形成すると いうもので、転写因子CREBタンパク質のリン酸化型キ ナーゼ誘導性ドメイン (Phosphorylated kinase inducible activation domain: pKID)とCREB結合タンパク質のKIX ドメイン (KID binding domain) の例などがよく知られ る²⁾. しかし、構造形成するのは全長タンパク質のうち 一部の領域であり、分子全体としては揺らぎを保ったま まである. また近年では、天然変性タンパク質同士が、 固い構造を形成することなく、強固な結合をする例も報 告されている3). つまり、天然変性タンパク質がすべて、 相互作用により固い構造を形成するのであれば、結晶構 造解析のような従来の手法でも解析できるが、むしろそ うでない場合も多いのである. このように書くと天然変 性タンパク質は決まった構造をとらないのだから構造を解析することは意味のないようにも思われるかもしれない. しかし, 実際には折れ畳まったタンパク質ほど安定ではないものの,何かしらとりやすい構造(動的な構造)をとることで天然変性タンパク質は機能しているはずである.そのような柔らかな構造は従来の結晶構造解析や,近年発展の目覚ましいクライオ電子顕微鏡法においても解析困難である.本稿では天然変性タンパク質の柔らかい構造を解析する手法として期待されるX線および中性子小角散乱法(SAXS/SANS), NMR, 高速原子間力顕微鏡法(HS-AFM)について紹介し, LLPS研究への応用の可能性について議論する.

X線小角散乱法 (Small angle X-ray scattering: SAXS)

SAXSは試料(ここではタンパク質や核酸の水溶液)にX線を照射し、散乱X線の角度分布 (I(q)) から試料中の散乱体 (タンパク質や核酸分子) の構造情報を得る手法である。SAXSでは散乱体の慣性半径 (R_g) や最大長 (D_{\max}) などの構造パラメーターが得られるほか、Kratky plotによりそのタンパク質が折れ畳まっているか、変性状態であるかを定性的に知ることができる。

X線結晶構造解析とは異なり、天然変性タンパク質のように大きく揺らいだ構造であっても、水溶液中での構造情報を得ることができる。SAXSデータ (I(q)) をもとに

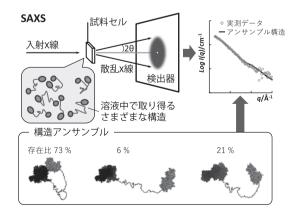


図1. 天然変性領域を持つマルチドメインタンパク質のSAXS解析. 溶液中でのさまざまな構造に由来する散乱曲線の平均が実測データとして観測される. EOMなどのアンサンブル解析法では各モデル構造から散乱曲線を計算し, 実測データを再現できるモデルの組合せと存在比比率を探索する.

天然変性タンパク質の揺らいだ構造を解析する手法としてはEnsemble optimization method (EOM) 4.5) やBILBOMD⁶⁾, MultiFoXS⁷⁾などがある. 詳細は異なるものの, これらの手法では, 天然変性領域のモデル構造をランダムに多数作製し, その中から実測の散乱データを再現できるような少数の構造の組合せ (アンサンブル)を探索する. 図1に示す例は二つの折れ畳まったドメインが天然変性領域でつながれたタンパク質である. MultiFoXS解析では, 二つのドメインが接近した構造が高い存在比で得られドメイン同士が相互作用して機能していることが予測される. このように動的な構造であっても取り得る構造にある程度の偏りがあれば検出することができ有効である.

しかし、SAXSとこれらの解析手法には問題点もある. 一つは分解能の低さである. SAXSで得られる構造情報 は分解能が低いことに加えて、これらの解析手法では天 然変性タンパク質が取り得る構造を少数の構造アンサン ブルで代表させている. そのため、図1の例ではドメイ ン間の相対配置を推定することはできても相互作用の詳 細を知ることはできない. 相互作用や天然変性領域の局 所的な構造情報 (二次構造) はNMRや分子動力学計算 (Molecular dynamics: MD) など、他の手法で補える可能 性がある. 古典的なMD計算では天然変性タンパク質の 非常に大きな構造揺らぎを再現することは困難であった が、近年では計算手法や計算機の発達により、徐々に解 決しつつある. たとえば、粗視化MD計算ではアミノ酸 1残基を1粒子として計算することで計算コストを大幅 に低減し、マイクロ秒からミリ秒という長いスケールで の大規模な構造揺らぎを再現することが可能となり. SAXSと合わせた解析例も報告されている⁸⁾. もう一つ の問題は解釈の任意性である. SAXSではすべてのドメ イン、天然変性領域からの散乱がたった一つの散乱曲線 に集約されて観測される. 特に複数のタンパク質や核酸 からなる複合体では解釈の任意性が高いため、複合体全 体が、コンパクトか?伸びた構造か?という大雑把な解 釈はできるものの、個々のサブユニットの詳細な構造を 議論することは難しい、これを解決する手法として次項 に示す中性子小角散乱法があげられる.

中性子小角散乱法

(Small angle neutron scattering : SANS)

SANSの原理はSAXSとよく似ているが、X線ではなく中性子を用いる。X線との最大の違いは、軽水素 (H)と重水素 (D) で中性子の散乱能 (散乱長密度) が大きく異なることである。そのため、標的タンパク質や核酸を重水素化したり、溶媒中の重水 (D_2O) /軽水 (H_2O) 比

を変えたりすることでタンパク質や核酸からの散乱と溶 媒からの散乱のコントラストを自由に変えることが可能 である(図2). SAXSの項では説明しなかったが、試料 水溶液からの散乱には目的タンパク質からの散乱と溶媒 からの散乱が含まれており、別に測定した溶媒のみの散 乱を差し引くことで標的タンパク質からの散乱を得てい る. 図2Bに示す、40 % D₂Oの溶媒中では、軽水素体 タンパク質からの散乱と溶媒からの散乱のコントラスト が0になるため、差し引き後には重水素化タンパク質か らの散乱のみが残る. つまり特定のサブユニットを不可 視化でき、解釈の任意性を減らすことが可能である. こ の方法はコントラスト同調法と呼ばれ、タンパク質-タ ンパク質複合体のほか、タンパク質 - DNA複合体の解 析などにも利用されている^{9,10)}. また, BSAやFicollな どのクラウダー分子をコントラスト変調法で不可視化 し、目的タンパク質の散乱のみを観測することで、人工 クラウディング下での構造を希薄溶液中と比較した報告 例もあり¹¹⁻¹³⁾, LLPS液滴のような高濃度下でのタンパ ク質の動態解析への応用が期待できる.

また、NMRの分野で開発の進められてきたプロテインライゲーション技術を応用すれば、重水素化したドメインと重水素化していないドメインを連結し、区分重水素化したタンパク質を作製することも可能と考えられる。このタンパク質を用いれば天然変性領域を持つマルチドメインタンパク質であっても、着目する部分からの

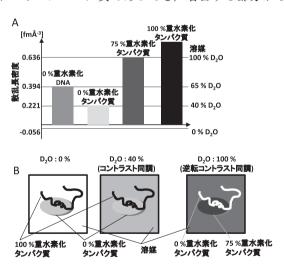


図2. SANSにおけるタンパク質、DNAと溶媒の散乱長密度. A)溶質の散乱長密度 (棒グラフ)と溶媒 (D_2O/H_2O 混合物)の散乱長密度 (横線). 溶質と溶媒の差分がその条件でのコントラストとなる。B) タンパク質と溶媒のコントラストの模式図. 折れ畳まったタンパク質 (楕円)と天然変性タンパク質 (ひも)の複合体を例に図示する。タンパク質と溶媒の散乱長密度を色の濃淡で表す。40% D_2O 溶媒中では0%重水素化タンパク質が不可視化される (コントラスト同調)。100% D_2O 溶媒中では75%重水素化タンパク質が不可視化される (逆転コントラスト同調)。

散乱を取得することができ、解釈の任意性を減らし、全 長タンパク質の揺らいだ構造を解析することができるは ずである. 現在、筆者らのグループではそのような手法 の開発を進めている.

SANSはビームの強度が弱く、精度の高いデータを得 るためにはSAXSと比べて高濃度のサンプルを大量に必 要とすることが最大の欠点であった. しかし. 近年では 中性子ビームの大強度化が図られ、徐々に改善しつつあ る. SANSデータの精度を低下させる非干渉性散乱につ いても解決の手法が開発されている. 軽水素は重水素と 比べてはるかに大きな非干渉性散乱を起こすが、非干渉 性散乱は構造情報を与えず、バックグラウンドノイズと なる. 通常のコントラスト同調法では40 % D₂O溶媒で 実験を行うため、60%のH₂O由来の非干渉性散乱が大き い. 近年開発された逆転コントラスト同調法14)では. 75%重水素化したタンパク質と重水素化していないタン パク質の複合体を調製し、100 % D₂O溶媒中でSANS測 定を行う. この条件では75%重水素化タンパク質が不可 視化され、重水素化していないタンパク質のみ観測でき (図2B右), しかも100 % D₂O溶媒中であるため非干渉性 散乱によるノイズを大きく低減させることが期待できる.

高速原子間力顕微鏡法

(High speed atomic force microscopy: HS-AFM)

HS-AFMは基板上に"緩く"固定化したタンパク質分子を探針でなぞり、試料と探針の間に働く原子間力を検出することでタンパク質分子の形状を観察できる。固定化という制限はあるものの、一度目的タンパク質を基盤上に固定化してしまえば、観察自体は水溶液中で行うことができ、基質やリガンドを加えたり溶液条件を変化させたりしてタンパク質の構造変化をミリ秒から秒程度の時間分解能で観察できる。つまりタンパク質が構造を変化させながら機能している様子をリアルタイムで観察できるという大きな利点がある。この利点を利用し、ミオシンがアクチンフィラメントに沿って歩く様子や、CRISPER-Cas9によるDNAの切断の様子などが観察されている15,16)。また、多数の分子の平均の構造情報が得

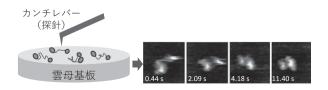


図3. HS-AFMによる天然変性タンパク質の観察. 二つの折れ 畳まったドメインが天然変性領域でつながれたタンパク質の 観察例を示す. 二つのドメインの相対位置が時間とともに変 化している様子が見える.

られる SAXS、SANS、NMRとは異なり、実空間で一つひとつの分子の構造を直接観察できるという利点もある。そのため、天然変性領域を持ったマルチドメインタンパク質の構造の観察にも利用されており(図3) 17 、LCタンパク質の構造的特徴の検出にも利用できると期待される。また、ごく最近LLPS液滴の観察例も報告され 18 、この分野での応用が期待される。

核磁気共鳴法

(Nuclear magnetic resonance: NMR)

溶液中の分子を原子分解能で観測することができる溶液 NMR法は,運動性が高い分子の観測に優れ,実際に多くの天然変性タンパク質の構造解析や相互作用解析に適用されている.タンパク質のNMRにおいては,「H核に加え,「5Nや「3Cなどの安定同位体によって観測対象となるタンパク質を標識することによって,多次元NMRスペクトル利用した高分解能な観測が可能になる.NMR観測においては,安定同位体標識パターンや測定方法などを適切に設定することによって,タンパク質の特定の部位を選択的に観測することが可能であり,アミノ酸残基レベルでの相互作用解析やダイナミクス解析,さらには原子分解能での立体構造解析も可能である.以下に、NMRを用いた解析の特徴について,特に,1.相互作用解析,2.立体構造解析,3.ダイナミクス解析,4.夾雑環境下の観測,について簡単に紹介する.

1. 相互作用解析 安定同位体標識されたタンパク質のNMRスペクトルをリガンドの滴下前後で測定し、リガンドとの結合に伴う信号の変化を評価することで、リガンドの結合部位についての情報を得ることができる。NMR相互作用解析においてもっとも多く用いられるのが、2次元¹H-¹⁵N HSQC (heteronuclear single quantum correlation) スペクトルである。ここではタンパク質のアミド基の信号を観測し、残基レベルで相互作用を解析する(図4)、このような解析は、変性タンパク

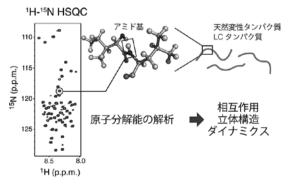


図4. NMRによる変性タンパク質の解析

質とシャペロンの相互作用の解析 $^{19,20)}$ や、Yoshizawa ら が報告したLC タンパク質とLLPS 制御因子の相互作用 解析 $^{21)}$ にも適用されている.

- 2. 立体構造解析 天然変性タンパク質であっても. その立体構造は完全にランダムではなく、一過的にある 特定の高次構造をとったマイナー状態が存在する場合も 多い. このようなマイナー状態や構造多型. その状態間 の存在比の調節がタンパク質の機能制御に重要である場 合も多い²²⁾. NMRは、このような動的な立体構造の解析 に優れたツールである。特に、常磁性効果を用いたNMR によって、変性タンパク質の構造多型のそれぞれの立体 構造を明らかにするアンサンブル解析法が提案されてい る²³⁾. 従来のNMR立体構造解析では,原子核間距離な どの束縛情報に基づいて、1種の立体構造を仮定して構 造決定を行うが、柔軟で動的な立体構造を持つ天然変性 タンパク質への適用は困難である. アンサンブル構造解 析法は、水溶液中でさまざまな状態をとる天然変性タンパ ク質の"真の姿"を捉えるうえで有効な手法である。前述 のSAXSデータと組み合わせた解析もなされている²³⁾.
- 3. ダイナミクス解析 NMR緩和解析によって、天然変性タンパク質の運動性を残基レベルで解析することが可能である。このような解析は、特にLLPS液滴中のLCタンパク質の状態を評価するうえでも有効である 24,25). RNA結合タンパク質であるFUS (fused in sarcoma) はLCドメインにより液滴を形成することが知られているが、LCドメインを対象としたNMR緩和解析によって、LLPS液滴中のLCドメインがdisorderの状態であることが報告されている 24,25). 一方で、溶液NMRでは、運動性が高い分子が優先的に観測されるという特性のため、多量体を形成した分子は検出されにくいという問題もある、特にLLPS液滴については、LCドメインの多量体形成の報告もあるため 26)、液滴中の分子の観測においては、手法開発も含めたさらなる検証が必要である.
- 4. 夾雑環境下での観測 NMRでは、安定同位体標識したタンパク質から信号を選択的に取得することで、夾雑環境下であっても特定の分子を選択的に観測することが可能である。この特性は、クラウディング環境下や細胞内のタンパク質の直接観測²⁷⁾だけではなく、LLPS液滴中の分子の観測においても有益である。LLPS液滴中のタンパク質の立体構造解析においては、これまでは単一のタンパク質によって形成されたLLPS液滴を対象とした研究がほとんどであったが、実際の細胞内でのLLPSは、複数のタンパク質や核酸などが取り込まれた複雑な環境である。今後、このように複数の分子によって形成されるLLPS液滴を解析するうえでも、安定同位

体標識による選択的観測は有効であると予想される.

おわりに

従来, 固い立体構造 (静的構造) に基づいて考えられてきたタンパク質の機能は, 天然変性タンパク質に代表されるように動的構造と結びつけて理解されるようになってきた. 柔らかい構造から機能を理解することは依然として困難な課題であるが, 本稿で紹介した各手法を相補的に利用し発展させることで, 天然変性タンパク質が機能している様子を捉えることができると期待される. また, LLPSにおいては天然変性タンパク質の構造の柔らかさに加えて, 高濃度下での多数の分子間の弱い相互作用などさらなる問題が考えられる. 相分離という"状態"が機能とどのように結びついているかを解明するためには,これらの手法のさらなる発展が必要である.

謝辞

本稿執筆にあたり、HS-AFM画像を提供いただいた金沢大学古寺哲幸教授、安藤敏夫教授、九州大学石野園子准教授、石野良純教授および中性子小角散乱解析について情報提供いただいた京都大学複合原子力科学研究所井上倫太郎准教授、杉山正明教授、横浜市立大学佐藤衛教授にお礼を申し上げます。

文 献

- 1) Wright, P. E. and Dyson, H. J.: J. Mol. Biol., 293, 321 (1999).
- 2) Sugase, K. et al.: Nature, 447, 1021 (2007).
- 3) Borgia, A. et al.: Nature, 555, 61 (2018)
- 4) Bernado, P. et al.: J. Am. Chem. Soc., 129, 5656 (2007).
- 5) Tria, G. et al.: IUCrJ, 2, 207 (2015).
- 6) Pelikan, M. et al.: Gen. Physiol. Biophys., 28, 174 (2009).
- 7) Schneidman-Duhovny, D. et al.: Nucleic. Acid. Res., 44, W424 (2016).
- 8) Powers, K. T. et al.: Nucleic. Acid. Res., 46, 2107 (2018).
- 9) Lapinaite, A. et al.: Nature, 502, 519 (2013).
- 10) Sugiyama, M. et al.: Biophys. J., 106, 2206 (2014).
- 11) Johansen, D. et al.: Biophys. J., 100, 1120 (2011).
- 12) David, P. et al.: Biophys. J., 106, 905 (2014).
- 13) Banks, A. et al.: Biophys. J., 114, 1067 (2018).
- 14) Sugiyama, M. et al.: J. Appl. Cryst., 47, 430 (2014).
- 15) Kodera, N. et al.: Nature, 468, 72 (2010).
- 16) Shibata, M. et al.: Nat. Commun., 8, 1430 (2017).
- 17) Ishino, S. et al.: J. Biol. Chem., 289, 21627 (2014).
- 18) Fujioka, Y. et al.: Nature, 578, 301 (2020).
- 19) Saio, T. et al.: Science, 344, 1250494 (2014).
- 20) Kawagoe, S. et al.: J. Biol. Chem., 293, 15095 (2018).
- 21) Yoshizawa, T. et al.: Cell, 173, 693 (2018).
- 22) Delhommel, F. et al.: Structure, 25, 1645 (2017).
- 23) Kooshapur, H. et al.: Angew. Chem., 57, 13519 (2018).
- 24) Burke, K. A. et al.: Mol. Cell, 60, 231 (2015).
- 25) Murthy, A. C. et al.: Nat. Struct. Mol. Biol., 26, 637 (2019).
- 26) Xiang, S. et al.: Cell, 163, 829 (2015).
- 27) Theillet, F.-X. et al.: Nature, 530, 45 (2016).