検出技術:天然変性タンパク質の構造生物学

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

小田 隆^{1*}·齋尾 智英²

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(D₂O)/軽水(H₂O)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(D₂O/H₂O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%D₂O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%D₂O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、¹H核 に加え、¹⁵Nや¹³C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).
- 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).