The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	核磁気共鳴(NMR)による蛋白質とリガンドとの相互作用の解析
Author(s)	池上, 貴久
Citation	大阪大学低温センターだより. 2004, 127, p. 2-7
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/10865
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

研究ノート

核磁気共鳴（NMR）による蛋白質とリガンドとの相互作用の解析

蛋白質研究所附属プロテオミクス総合研究センター　池　上　貴　久（内線 8598）
E-mail: tiik @protein.osaka-u.ac.jp

1．はじめに

蛋白質研究所は、吹田キャンパスにあり、核磁気共鳴*装置（Nuclear Magnetic Resonance，NMR）が現在７台設置されている。低温センターからは、このNMR装置に充填する液体ヘリウムを供給して頂いており、逆にこちらからは、NMRから蒸発した気体ヘリウムを低温センターに返却するというサイクルを繰り返している。液体ヘリウムを使用する目的は、NMR装置が超伝導を利用して磁力を作り出しているからである。超伝導でないタイプも存在するが、これは発熱量が多く、生物系で活用する比較的大型のNMRは、ほとんど全て超伝導タイプである。ここには800MHzという超高磁場型も設置されているが、このタイプは、通常の液体ヘリウムの温度である４Ｋでも超伝導を維持するのが難しく、液体ヘリウムをポンピングにより蒸発させてさらに２度低い、２Ｋまで超伝導コイルを冷やしている。そのため、液体ヘリウムの消費量は、他の通常のNMRよりもさらに多く、低温センターから安価に供給して頂いている液体ヘリウムは、本当に有難いものである。

低温センターを利用される方には、生物系の方は少ないかもしれない。ましてや、NMRで蛋白質を解析する分野は限られているので、なるべく分かりやすく研究の説明を以下にしたい。

2．立体構造の決定

蛋白質*をNMRで研究するといっても、いろいろなサブ分野が存在する。私がここで研究していることは、蛋白質の立体構造を決定することと、蛋白質と他の分子（リガンドと呼ぶ）がどのようにして結合するかを調べることである。まず前者の「NMRでどうして分子の立体構造が決定できるのか」という点についてである。まず、NMRでスペクトルを測定すると、各原子（特に水素原子核）からそれぞれ一本ずつのピークが観測される。もちろん、蛋白質には、数千もの水素原子核が存在するので、通常スペクトルは複雑極まりないものになる。しかし、平面図よりも立体図の方が分かり易いのと同じ理由で、１次元よりも図１のような２次元（^{1}H-^{15}N相関スペクトル）、そして３、４次元と次元数を増やしていくことによって、解析が可能になる。いろいろな手法を活用することによって、全てのピークがどの水素原子核由来のものかを帰属できる。次に、どの核と核とが空間距離が近いかを測定する。これには、図２のような核磁気双極子どうしの相互作用を示す*NOESY*スペクトルを解析する。これが、NMRで立体構造を組み立てる鍵情報である。この空間距離は、別に化学結合で結びついた核どうしである必要はない。図２のA、B核のように引き延

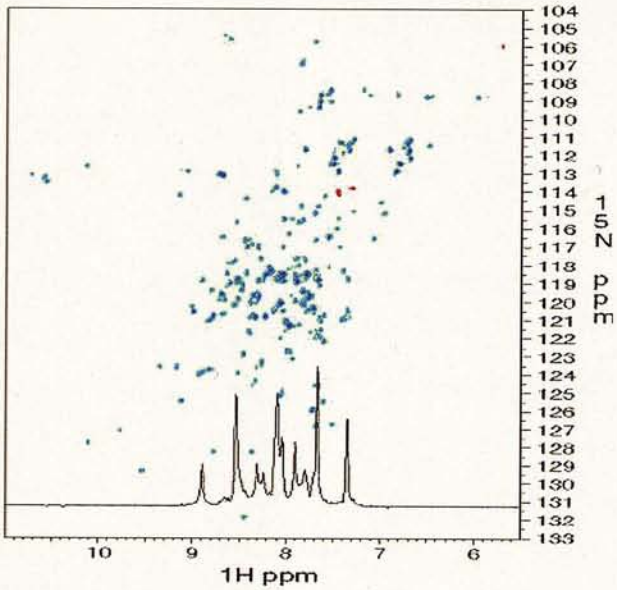

図1

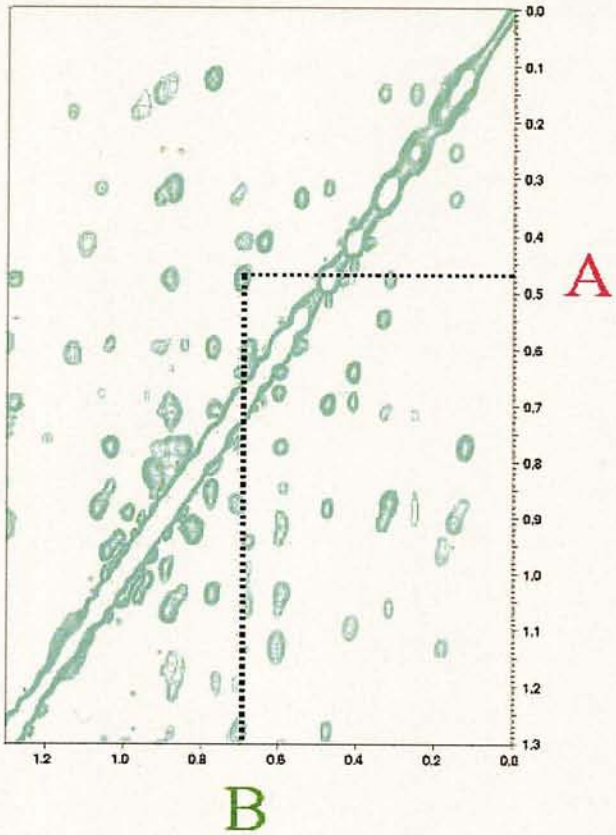

図2

ばすと遠くに離れた核どうしでも、立体構造を形成している時に、お互い空間的に近くに存在すれば、観測されるのである。この距離情報以外にも角度情報も得られるが、立体構造の決定にもっとも貢献するのは距離情報である。あいにく、この距離情報は二つの水素原子核が5Å以内という近くに来た時にしか観測されない。つまり、大きな蛋白質分子の端と端の距離までは分からないのである。しかし、たとえ短い距離情報でも、図3の細い線で示すように数千個も集めると蛋白質の立体構造をほぼ決定してしまうほどの寄与になる。

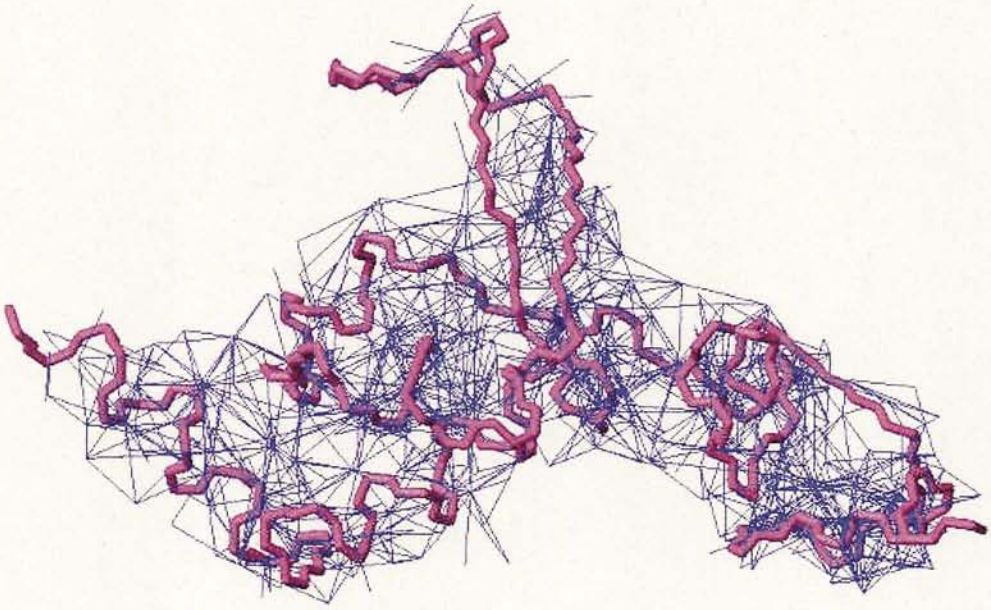

図3

3．相互作用部位の決定

数千もの蛋白質の立体構造が決定された現在、興味の対象は、これらの蛋白質がどのようなしくみでお互いに作用しあい、情報を伝達したり、酵素としての機能を発揮しているかという問題に移りつつある。NMR は、溶液状態のまま測定するので、相互作用する蛋白質とリガンドを混ぜ合わせて測定すると、両者が結合したり解離したりしている平衡状態そのままを観測できる非常に便利な分光器である。相互作用部位を調べる方法でもっともよく用いられるのは、「化学シフト摂動法」と呼ばれる方法である。これには、リガンドがない状態と、混在している状態の２つのスペクトルをとり、両者を比較する。通常、観測する対象である蛋白質側は、^{15}N などの安定同位体でラベルされており、一方、リガンドはラベルされていない。そこで、特殊な測定により、追加されているリガンドからのシグナルを見ずに、蛋白質側の各アミノ酸のアミド基（^{1}H-^{15}N）からのシグナルだけを選択的に観測することができる。リガンドを加えた時にピークが移動していれば（＝化学シフト値がリガンドにより摂動を受けていれば)、蛋白質とリガンドが相互作用している可能性が高く、また、動いたピークがどのアミノ酸由来であるかを立体構造上にプロットすることにより、そのリガンドが蛋白質のどの箇所に結合したかが分かる。単に相互作用したかどうかだけでなく、立体構造上のどの箇所が相互作用部位であるかを決定できる点が特徴的である。さらに、加えるリガンドの量を滴定すると、相互作用の強さを定量的に決定することもできる。

もう一つ最近だんだん使用されるようになってきた方法は、「飽和転移法」である。これには、図４に示すように、リガンド側はラベルされていないが、観測する蛋白質側は、重水素（^{2}H）と^{15}N という少々特殊なラベル法が必要である。両者を混ぜた状態で NMR 中で電磁波を照射し、リガンド側だけを磁化が飽和した状態にもっていく。すると、１－２秒かけて、その飽和状態が蛋白質側にも伝わっていくので、その様子を観測すると、磁気飽和したリガンドに近い部位ほどよく飽和していることから、相互作用部位が同定できる。

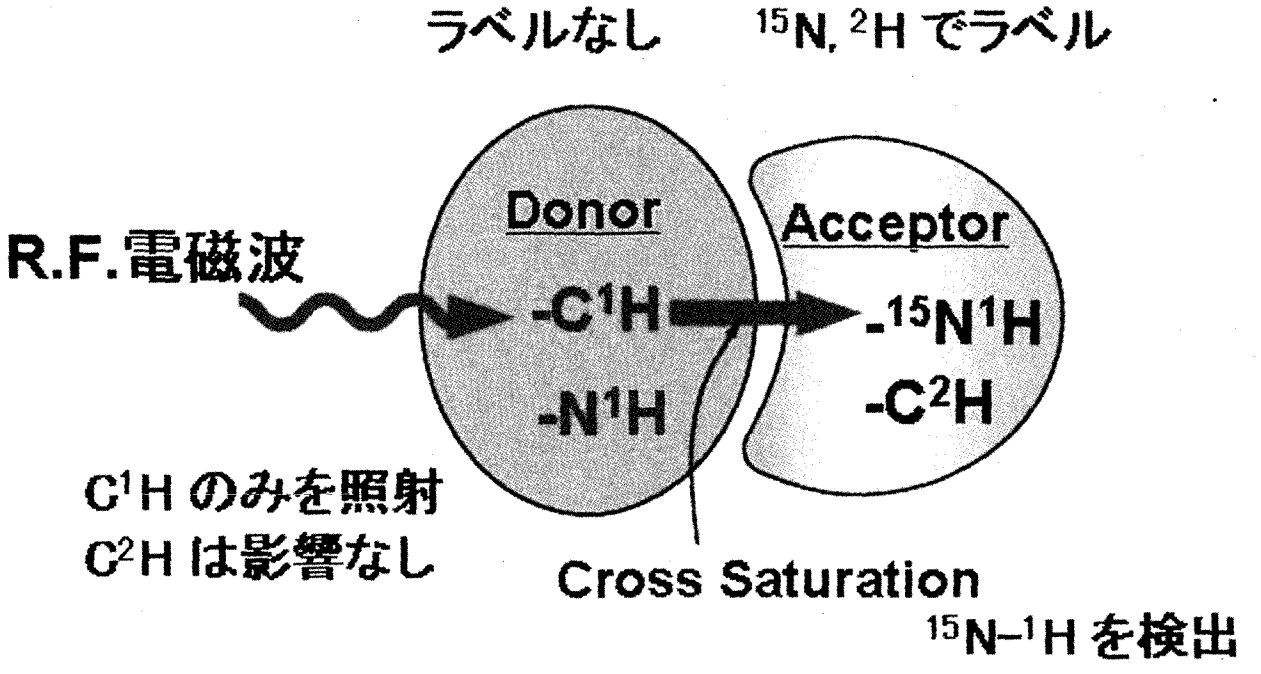

図４

上記二つの方法は、それぞれ長所短所がある。「化学シフト摂動法」は簡単ではあるが、リガンドが結合することによって蛋白質の立体構造が変化してしまう場合、その構造変化によって化学シフト値も変化するため、実際の相互作用部位と異なる部位を同定してしまうことがある。一方、「飽和転移法」は、そのような構造変化に対して比較的強いが、ラベル体を作成するのにある程度コストと手間がかかる。最近、筆者らは、複合体の立体構造を予測するシミュレーションのアルゴリズムに、後者の「飽和転移法」を利用した[1,2]。その理由は、「化学シフト摂動法」は、相互作用部位を示すだけで、摂動の大きさと、リガンド蛋白質間距離との間には相関がないからである。コンピューターシミュレーションでは、何らかの力を作成してリガンドと蛋白質を近づけていき、最終的に複合体の構造に持っていく。「飽和転移法」では、蛋白質側の飽和の程度を、リガンドと蛋白質をサイバー内で近づけるための力に変換することが出来るのである。

4．方向情報の決定

上の章で、NMR で蛋白質の立体構造を決定する場合の鍵となる情報は、5 Å以内という非常に局所的な距離情報であることを述べた。例えば細長い分子の立体構造を決定したい場合、各距離情報の誤差が積もり重なると、実際にその分子の両端の距離などには大きなくるいが生じてくる。また、ドメインと呼ばれる構造の塊が繋がったような立体構造の場合、両ドメイン間の距離が5 Å以内にあるという保証はない。その場合、両ドメインの相対配置を *NOE* スペクトルから決定することは非常に困難になってくる。

ところが、最近、この問題を克服するような方法が考え出された。これには、蛋白質を NMR の静磁場中で配向させる必要がある。双極子相互作用という値を測定すると、その値が核間結合と静磁場との間の角度に依存することから、もし、立体構造がすでに分かっていると、逆に分子全体がどの向きに配向しているかを決定することが出来る。この方法により、核酸のような細長い分子の立体構造もさらに精度良く決定することができるようになり、また、ドメイン間の相対配置も解析できるようになってきた。

筆者らは、この方法を溶液内で相互作用している蛋白質とリガンドの系に適用した。複合体を静磁場中で配向させるために、サンプルにバクテリオファージの外殻の蛋白質を加えた[1,2]。これは、さやのような細長い形をしており、それ自身が棒磁石のような働きをして（反磁性磁化率の強い異方性による）静磁場に平行に配向する性質をもつ。観測の対象である蛋白質リガンド複合体（図5の小さい球）は、このファージ蛋白質に拡散によってぶつかっているうちに、確率的に静磁場方向に対して配向する。ファージ蛋白質以外にも、図5のディスク形をしたポリエチレングリコールを材料とした液晶を、対象を配向させるための媒体として利用し、同様の結果を得

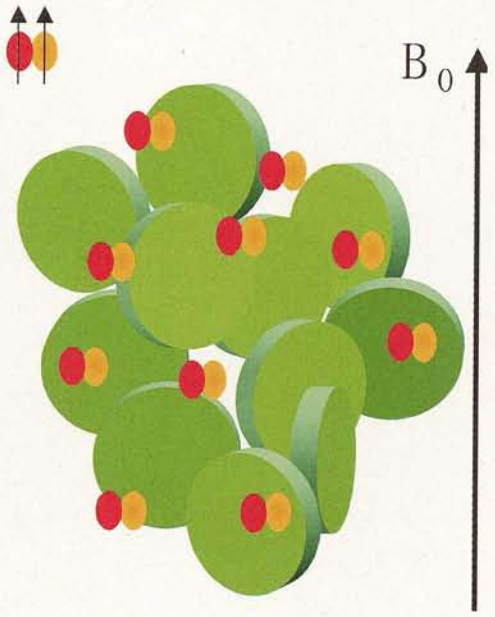

図5

た。そして、複合体の状態で、双極子相互作用値を測定し、蛋白質とリガンド、それぞれが静磁場に対してどの方向に向いているかを決定できた。これは、蛋白質とリガンドの複合体における相対方向を決定したことになるので、非常に有用な情報である。

5．複合体構造予測のためのシミュレーション

さて、複合体のそれぞれの要素である単量体の立体構造が既知である場合に（図6の最上段)、複合体の立体構造を予測するための情報が2種類揃ったことになる。一つは、蛋白質とリガンドがお互いにどの部位に結合するかという情報で、これは、飽和転移法の解析で得た（図6の3段目)。もう一つは、複合体を形成している時の蛋白質とリガンドの相対方向で、これは、液晶などの配向媒体中で双極子相互作用値を解析することにより得た（図6の2段目)。コンピューターシミュレーションのプログラムは、以下の手順になるように開発した[1,2]。1、蛋白質とリガンドを離した状態で、しかし、相対方向が双極子相互作用の実験値を再現するような方向に置いた。2、飽和転移をシミュレーションし、計算値と実験値との違いを見た。3、その違いの大きさが小さくなるように、力場を発生させ、蛋白質とリガンドを近づけた。ただし、相対方向は、最初の双極子相互作用値による方向を維持している。4、飽和転移のシミュレーション値と実験値がもっとも一致する配置を探索した（図6の最下段)。5、蛋白質の主鎖の配置を維持したまま、側鎖の方向だけを、蛋白質とリガンドが立体構造的にもっともフィットするように分子動力学により調整した。

以上の方法により、すでに複合体の立体構造が分かっているCAD-ICADと呼ばれる蛋白質蛋白質複合体について、実際の立体構造と全くといってよいほど同一の複合体の立体構造がシミュレーションにより予測できた（図7)。今後は、これをさまざまな例に適用し、さらなる開発をしていくことにより、アルゴリズムとしての成功率を上げていかなければならない。

この数年で、結晶構造解析やNMRにより多数の蛋白質の立体構造が決定されてきている。しかし、その大半は、単量体としての蛋白質である。蛋白質は生体内で、他の蛋白質、核酸、有機無機分子などと相互作用し、触媒的な作用を行うことによって、その機能を発揮している。また、他の分子といっしょになって、生体の構造そのものを形作っている。つまり、単量体の次は、複合体の立体構造情報が必要なのである。しかし、生体内の相互作用は必ずしも強いものばかりでなく、非常にソフトなものも多い。むしろ、それだから、酵素作用が不必要になった時に、フィードバックにより瞬時にストップすることも可能なのである。そのような弱い相互作用の場合、複合体としての立体構造を結晶解析やNMR、電子顕微鏡などで直接的に観測することは難しい。しかし、上記のようなNMRから得られる間接的な情報（相互作用部位と相対方向）と、それをシミュレートするアルゴリズムにより、ソフトな相互作用における複合体の構造解析も可能になってくると考えている。

謝　辞

本研究は、現在理研博士研究員の松田知己博士（博士論文［2003大阪大学］に詳細記述)、および、蛋白質研究所の中村春木教授が中心に、共同研究の形で進めました。心から感謝いたします。

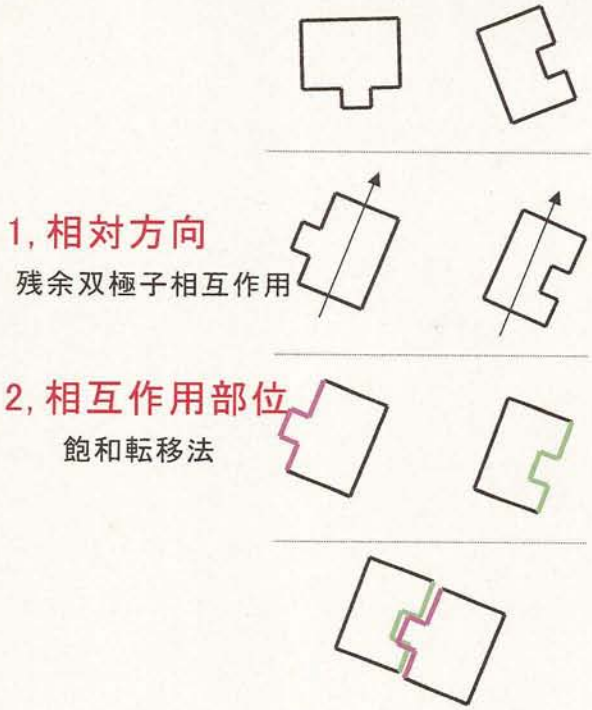

図 6

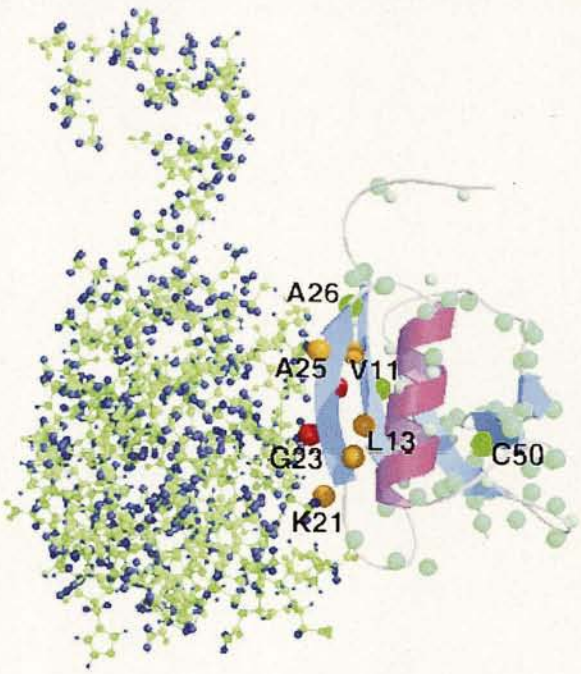

図 7

参考文献

[1] Matsuda, T., Nakajima, N., Yamazaki, T., and Nakamura, H. (2004) CAD-ICAD complex structure derived from saturation transfer experiment and simulated annealing without using pairwise *NOE* information. *J. Mol. Recognit.* **17**, 41-50.

[2] Matsuda, T., Ikegami, T., Nakajima, N., Yamazaki, T., and Nakamura, H. (2004) Model building of a protein-protein complexed structure using saturation transfer and residual dipolar coupling without paired intermolecular *NOE*. *J. Biomol. NMR* **29**, 325-338.

用語説明

核磁気共鳴

水素原子核などを静磁場中に置くと、エネルギー的に安定な α スピンと不安定な β スピン状態に2分裂する。そのエネルギー差に相当する周波数（$\nu = \Delta E/h$）の電磁波を当てると、両スピン状態の間に共鳴現象がおきる。また、エネルギー差に相当する周波数でスピンが歳差運動していると仮定し、そのスピンの回転角速度 ω の位置に NMR ピークが出ると考えてもよい。

蛋白質

生体を構成する主要成分の一つで、遺伝子 DNA の設計図に基づいて、20種類のアミノ酸から構成される。構成物としての機能の他、触媒的な作用、情報を伝達する媒体としての機能などさまざまな機能をもつ。20種類のアミノ酸がどのような順番で並ぶかによって、すでに立体構造が決まる。蛋白質がそれぞれの機能を発揮できるのは、基本的にはこの特有の立体構造のためである。