

5.

溶液内におけるタンパク質の立体構造決定の新戦略

甲斐荘正恒

東京都立大学・大学院理学研究科、教授

はじめに

タンパク質や核酸など、いわゆる生体高分子の溶液内における立体構造は、NMR法の発展によりはじめて決定することができるようになった。立体構造決定技術としてのNMRの歴史は20年に満たず、未だ揺籃期にある手法ではあるが、生体高分子が実際に機能を果たす場—溶液や生体膜—において適用可能である特徴は、この手法を他に代えがたい重要なものとしている。しかしながら、従来のNMR法の技術水準では構造決定可能なタンパク質の分子量限界は高々3万程度に過ぎず、しかも生物機能解析に必要な高精度の立体構造決定という意味では、NMR法は現時点においても様々な未解決の問題を抱えている。本プロジェクトで開発をめざした新しい安定同位体利用NMR技術は、立体構造決定における分子量限界を大きく広げると同時に、アミノ酸残基側鎖を含めたタンパク質の構造解析精度を飛躍的に高め、かつ解析に要する時間を大幅に短縮することを意図したものである。従って、本技術の完成はNMRによる立体構造決定法の高度化に止まらず、様々な次世代のNMR応用分野における世界標準技術を生み出す基盤を与えることになろう。

安定同位体利用NMR技術の高度化

I. 新しい重水素利用技術の開発

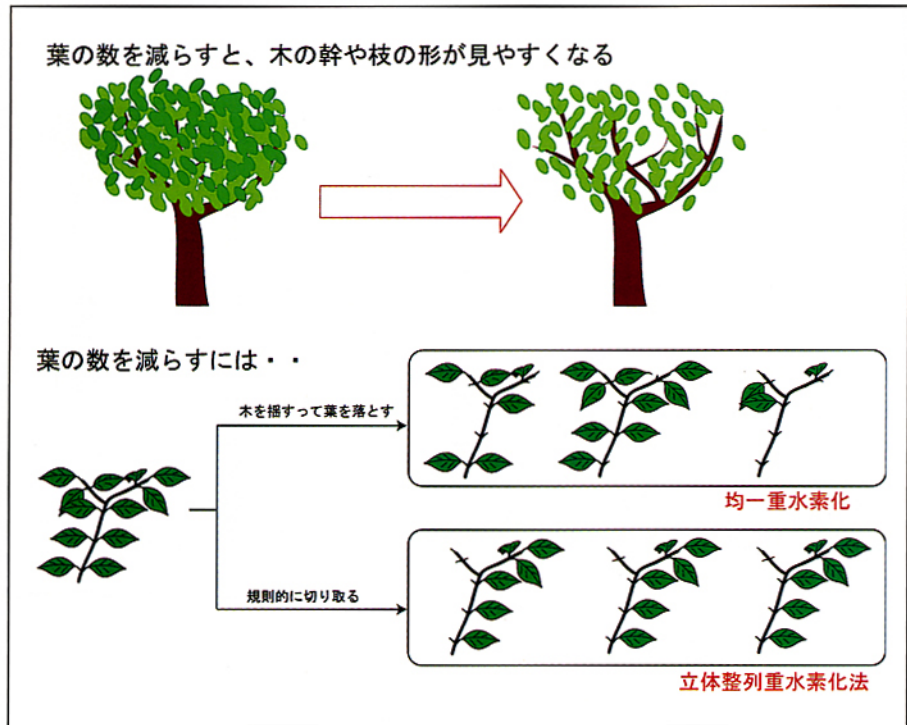
(1) Random-fractional 重水素化

水素の同位元素である重水素は、化学的性質こそ水素と良く類似しているものの、NMR共鳴周波数は大きく異なる。このために、タンパク質の“葉”である水素原子を重水素置換することにより、実質的にプロトン・NMRスペクトル上から消し去ることができる。従来の手法では、“葉”の密度を減らす手法として非選択的(random-fractional)な重水素置換法が利用されてきた。このような重水素置換法は、タンパク質である“樹”を一本、一本揺すっては“葉”を振り落とし作業と類似している。半分程度の“葉”を落とした“樹”は、さっぱりとして“枝”や“幹”の形がより見やすくなるであろう。しかしながら、より詳細に見てゆくと、このような手法で“葉”を透いた一群の“樹”では、残った“葉”の位置や数が、一本、一本の“樹”で全く異なることに気づくであろう。事実、一つとして同じ“葉”を持つ“樹”はないことは、容易に理論的に証明することができる。このような便法では、残った“葉”を構造情報とするNMR法にとって、最も肝心の立体構造情報の一義性も、測定感度の大幅な向上も図れないことは自明である。

(2) 立体整列重水素化 (Stereo-array-deuteration; SAD)

上述した従来の手法に対して、我々のアプローチは全く異なったものである。左右一対の“葉”をもつ枝を考える。これは、分子の言葉では、 CH_2 (メチレン) や CMe_2 (gem-メチル) を意味している。タンパク質中のアミノ酸残基では、メチレンやgem-メチルは立体化学的にも異なった位置にあり、原理的にはスペクトル上でも別々のシグナルを与える。一対の“葉”のうち、いずれか一方を残

せば、どちらの“葉”を取り去ったかという情報さえあれば、他方の“葉”は自動的にその位置が決定できる筈である。メチレンを一つしか持たないアミノ酸残基 (Gly、Asp等) では、メチレンの立体選択的重水素化 (stereospecific deuteration; SSD) により簡単に目的が達成できる。一つの枝に双生の“葉”がズラリと並んでいるような場合もある。例えば、リジン残基のように側鎖に4



つのCH₂ (メチレン) がつながっているのが、このような場合である。これらの“葉”から、片側の一枚を全て同時に取り去ってしまっても、やはりどちら側の“葉”を取り去ったかを知っている限り、失われた“葉”を後で書き足すことは容易である。このように立体的な相関を保ちつつ、全てのメチレン基の一方を立体選択的に重水素化する手法を、我々は“stereo-array-deuteration” (SAD)、“立体整列重水素化”と名づけている。

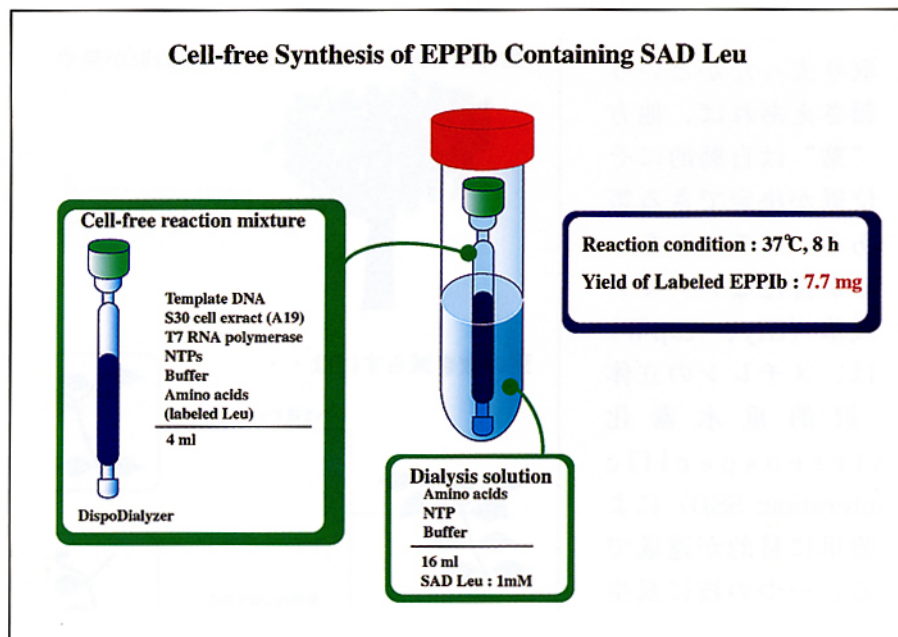
(3) プロトン密度最小化法 (Minimal Proton Density; MPD)

SSD, SAD法によりタンパク質中のプロトン密度を減少させ、シグナルの数を減少させるとともに、得られる構造情報の質を著しく高めることができる。更に、メチル基のように“枝”の先端に3つの水素がある場合には、さらにプロトン密度を減少させることができる。この水素の根元の炭素位置を知るには、一つ水素があれば十分であるからである。この手法を、プロトン密度最小化法 (Minimal Proton Density; MPD) と呼んでいる。フェニル・アラニンの芳香環のように形が固定している側鎖では、必要十分な水素数を残して重水素化することによりMPD法の適用が可能である。このように、タンパク質が素材である20種類のアミノ酸から組みあがっているという情報をフルに利用し、立体構造決定に必要な且つ十分な構造情報をもたらす最小限の“葉”のみを残す手法が我々の開発しつつある新技術である。この手法では、“樹”には全て同じ“葉”が残っている。又、残った“葉”、即ち水素原子は重水素化により全く減少しない。

II. 無細胞タンパク質合成系による標識タンパク質調製

このようにして合成した標識アミノ酸を実際に構造研究の目標タンパク質にどのように組み込むかは、次の重要な要素技術である。従来の大腸菌などを用いる in vivo 高発現系では、菌体自身の成育に添加した標識アミノ酸が利用されるために、貴重な標識アミノ酸類を多量に消費し、またアミノ酸の代謝による標識同位体の拡散による選択性の低下は不可避であった。これらの欠点は、細胞をつぶ

し、内部に含まれるタンパク質合成マシーナリを利用して、外来遺伝子を発現させることにより大幅に軽減されることが予想される。これらの手法を無細胞タンパク質発現 (cell-free protein expression) と呼ぶ。我々は、ヌクレアーゼ活性を欠く大腸菌株A19の生育菌体から分離・精製した無細胞抽出液を利用するin vitro (無細胞) タンパク質合成系を採用した。



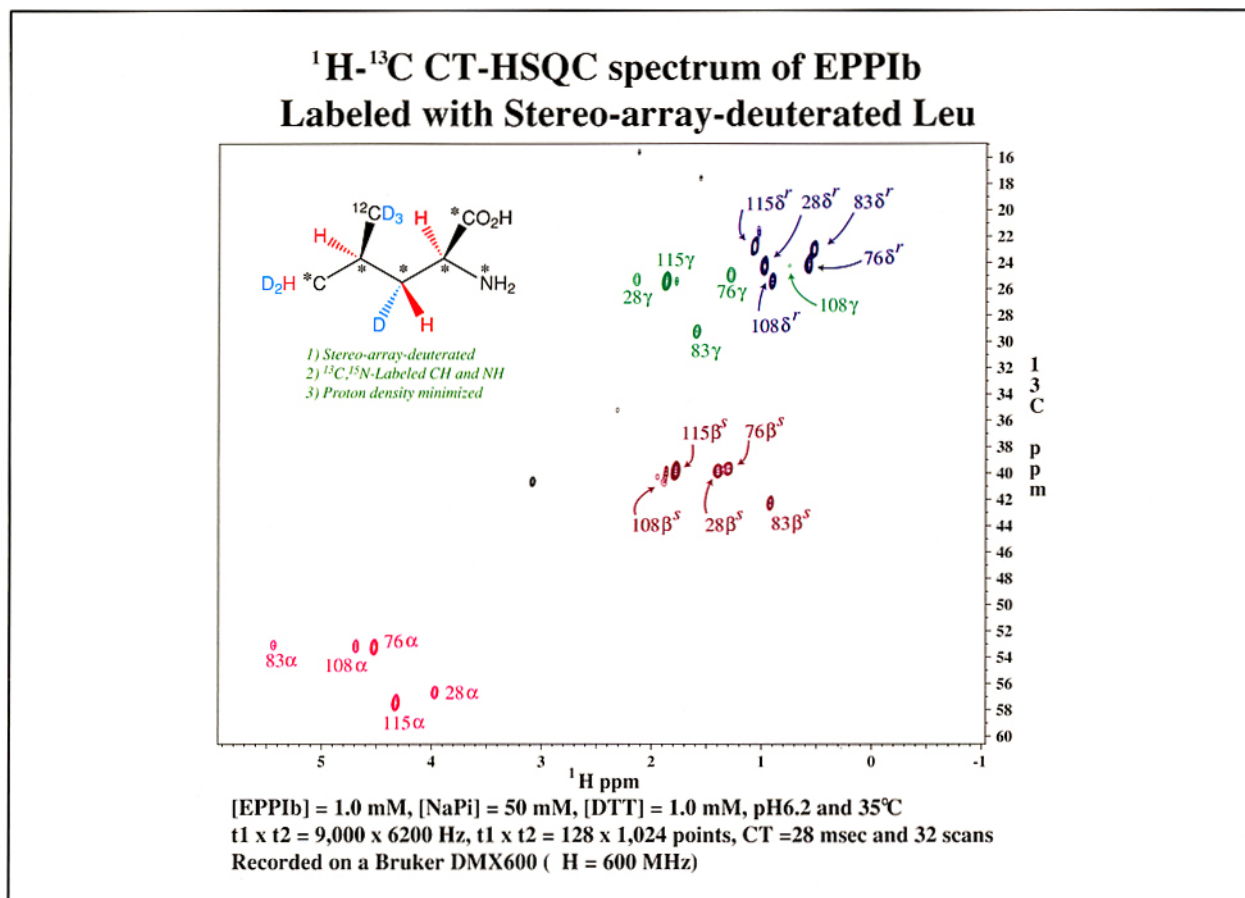
この手法では、目的とするタンパク質に対応するDNAを加えれば、そのまま転写・翻訳過程を経てタンパク質が高濃度で得られるために、本研究の目的に適している。事実、プロトコルの改良は当然必要であったが、通常的手法を用いてアミノ酸混合物から10~30% wt%程度の高収量で目的とするタンパク質を調製することができた。

Ⅲ. 標識タンパク質のNMRスペクトル

Ras, calmodulin, EPPIb, EPPIaなど様々なタンパク質がin vitro (無細胞) タンパク質合成系によりNMR測定に十分な量 (数mg) 合成することができた。アミノ酸混合物中の特定アミノ酸のみを、同位体標識アミノ酸へと入れ替えれば、特定アミノ酸のみを標識したタンパク質が得られる。この場合には、標識アミノ酸を数mg含むアミノ酸混合物からNMRスペクトルの測定に十分な量の標識タンパク質が得られる。当然のことながら、全てのアミノ酸を標識アミノ酸に置換すれば、全てのアミノ酸が標識したタンパク質が得られる。図に示したのは、SAD Leuを標識したEPPIbの¹H-¹³C HSQCスペクトルであり、一見して明らかなように、素晴らしい分解能を示している。これらの利点を致した多くのスペクトル解析技術、構造決定技術が大きく広がっている。

主要論文リスト

1. "Measurement of ³JCP Scalar Couplings in a 17 kDa Protein Complex with ¹³C,¹⁵N-Labeled DNA Distinguishes the BI and BII Phosphate Conformation of the DNA", T. Szyperski, A. Ono, C. Fenández, H. Iwai, S. Tate, K. Wüthrich, and M. Kainosho, *J. Am. Chem. Soc.*, **119**, 9901-9902 (1997).
2. "Differential Isotope Labeling Strategy for Determining the Structure of Myristoylated Recoverin by NMR Spectroscopy", T. Tanaka, J. B. Ames, M. Kainosho, L. Stryer, and M. Ikura, *J. Biomol. NMR*, **11**, 135-152 (1998).
3. "Measurement of Deoxyribose ³J_{HH} Scalar Coupling Reveals Protein Binding-Induced Changes in the Sugar Puckers of the DNA", T. Szyperski, C. Fenández, A. Ono, M. Kainosho, and K. Wüthrich, *J. Am. Chem. Soc.* **120**, 821-822 (1998).
4. NMR with ¹³C-¹⁵N Doubly Labeled DNA: the *Antennapedia* Homeodomain complexed with a 14mer DNA duplex" C. Fenández, T. Szyperski, H. Iwai, A. Ono, S. Tate, M. Kainosho, and K. Wüthrich, *J. Biomol. NMR*, **12**, 25-37 (1998).



5. "NMR Structure of the Streptomyces Metalloproteinase Inhibitor, SMPI, Isolated from *Streptomyces nigrescens* TK-23 Another Example of an Ancestral $\beta\gamma$ -Crystallin Precursor Structure", A. Ohno, S. Tate, S. S. Seeram, K. Hiraga, M. B. Swindells, K. Oda, and M. Kainosho, *J. Mol. Biol.*, **282**, 421-433 (1998).
6. "Elucidation of the Mode of Interaction of Thermolysin with a Proteinaceous Metalloproteinase Inhibitor, SMPI, Based on a Model Complex Structure and a Structural Dynamics Analysis", S. Tate, A. Ohno, S. S. Seeram, K. Hiraga, K. Oda, and M. Kainosho, *J. Mol. Biol.*, **282**, 435-446 (1998).
7. "NMR structure of the Histidine Kinase Domain of the *Escherichia coli* Osmosensor EnvZ", T. Tanaka, S. K. Saha, C. Tomonori, R. Ishima, D. Liu, K. I. Tong, H. Park, R. Dutte, L. Qin, M. Swindells, T. Yamazaki, A. M. Ono, M. Kainosho, M. Inouye, and M. Ikura, *Nature*, **396**, 89-92 (1998).
8. "NMR Scalar Coupling Across Watson-Crick Base Pair Hydrogen Bonds in DNA Observed by TROSY", K. Pervushin, A. Ono, C. Fenández, T. Szyperski, M. Kainosho, and K. Wüthrich, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 14147-14151 (1998).
9. "Determination of the Complete Structure of a Uniformly Labeled Molecule by Rotational Resonance Solid-State NMR in the Tilted Rotational Frame", K. Nomura, K. Takegoshi, T. Terao, K. Uchida, and M. Kainosho, *J. Am. Chem. Soc.*, **121**, 4064-4065 (1999).
10. "Conformational Changes of the BS2 Operator DNA upon Complex Formation with the Antennapedia homeodomain Assessed by $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ Labeling of the DNA" C. Fenández, T. Szyperski, H. Iwai, A. Ono, S. Tate, M. Kainosho, and K. Wüthrich, *J. Mol. Biol.*, **292**, 609-617 (1999).
11. "The 2D: ^{31}P -Spin-echo-difference Constant-time [$^{13}\text{C},^1\text{H}$]-HMQC Experiment for Simultaneous Determination of $^3\text{J}(\text{H}-^{31}\text{P})$ and $^3\text{J}(\text{H}-^{13}\text{C})$ in ^{13}C -labeled Nucleic Acids and their Protein Complexes", T. Szyperski, C. Fenández, A. Ono, K. Wüthrich, and M. Kainosho, *J. Mag. Res.*, **140**, 491-494 (1999).
12. "Stereo-divergent Synthesis of (2S,3S,4R,5R)- and (2S,3S,4R,5S)-[3,4,5- $^2\text{H}_3$]-Proline Depending on the Substituent of the γ -Lactam Ring", M. Oba, A. Miyakawa, K. Nishiyama, T. Terauchi, and M. Kainosho, *J. Org. Chem.*, **64**, 9275-9278 (1999).
13. "Determination of $^2\text{hJ}_{\text{NN}}$ and $^1\text{hJ}_{\text{NH}}$ Coupling Constants Across Watson-Crick Base Pairs in the *Antennapedia*

- Homeodomain-DNA Complex Using TROSY", K. Pervushin, C. Fenández, A. Ono, M. Kainosho, K. Wüthrich, *J. Biomol. NMR*, **16**, 39-46 (2000).
14. "The NMR Structure of a DNA Dodecamer in an Aqueous Dilute Liquid Crystalline Phase", N. Tjandra, S. Tate, A. Ono, M. Kainosho, and A. Bax, *J. Am. Chem. Soc.*, **122**, 6190-6200 (2000).
 15. "Three-dimensional Structure Determination of a Uniformly Labeled Molecule by Frequency-selective Dipolar Recoupling under Magic-angle Spinning", K. Nomura, K. Takegoshi, T. Trerao, K. Uchida, and M. Kainosho, *J. Biomol. NMR*, **17**, 111-123 (2000).
 16. "Backbone ^1H , ^{13}C , and ^{15}N Resonance Assignments of an 18.2 kDa Protein, *E. coli* peptidyl-prolyl cis-trans Isomerase b (EPPIb)", E. Kariya, S. Ohki, T. Hayano, and M. Kainosho, *J. Biomol. NMR*, **18**, 75-76 (2000).
 17. "Studies of Physicochemical Properties of N-H \cdots N Hydrogen Bonds in DNA, Using Selective ^{15}N -labeling and Direct ^{15}N 1D NMR", C. Kojima, A. Ono, and M. Kainosho, *J. Biomol. NMR*, **18**, 269-277 (2000).
 18. "Structural Comparison between WT and P25S Human Cystatin A by NMR Spectroscopy. Does this Mutation Affect the ^{15}N α -Helix Conformation?", N. Shimba, E. Kariya, S. Tate, H. Kaji, and M. Kainosho, *J. Struct. & Funct. Genomics*, **1**, 26-34 (2000).
 19. "A Novel Killer Toxin-like Protein, SKLP, is a Member of the Single-domain $\beta\gamma$ -Crystalline Family Protein", S. Ohki, E. Kariya, K. Haga, A. Wakamiya, T. Isobe, K. Oda, and M. Kainosho, *J. Mol. Biol.* **305**, 109-120 (2001).
 20. " ^{13}C , ^{13}C - and ^{13}C , ^1H -TROSY in a Triple Resonance Experiment for Ribose-base Intrabase Correlations in Nucleic Acids", R. Riek, K. Pervushin, C. Fenández, M. Kainosho, K. Wüthrich, *J. Am. Chem. Soc.*, **123**, 658-664 (2001).
 21. " ^1H - ^{15}N Hydrogen Bond Lengths in Double Stranded DNA from Internucleotide Dipolar Couplings", Z. Wu, A. Ono, M. Kainosho, and A. Bax, *J. Biomol. NMR*, **19**, 361-365 (2001).
 22. "Synthesis of ^{13}C /D Doubly Labeled L-Leucines: Probes for Conformational Analysis of the Leucine Side-chain", M. Oba, M. Kobayashi, F. Oikawa, K. Nishiyama, and M. Kainosho, *J. Org. Chem.*, **66**, 5919-5922 (2001).
 23. "Structural Features of an Influenza Virus Promoter and Their Implications for Viral RNA Synthesis", S.-H. Bae, H.-K. Cheong, J.-H. Lee, C. Cheong, M. Kainosho, B.-S. Choi, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **98**, 10602-10607 (2001).
 24. "Target-induced Conformational Adaptation of Calmodulin Revealed by the Crystal Structure of a Complex with Nematode Ca^{2+} /calmodulin-dependent Kinase Kinase Peptide", H. Kurokawa, M. Osawa, H. Kurihara, N. Katayama, H. Tokumitsu, M. B. Swindells, M. Kainosho, and M. Ikura, *J. Mol. Biol.*, in press.
 25. "Developing Model Systems for the NMR Study of Substituent Effects on the NH...N Hydrogen Bond in Duplex DNA", R. Ishikawa, C. Kojima, A. Ono, and M. Kainosho, *Magn. Res. Chem.*, in press.
 26. "Solution NMR Structure of the Myosin Phosphatase Inhibitor Protein CPI-17 Shows Phosphorylation-induced Conformational Changes Responsible for Activation", S. Ohki, M. Eto, E. Kariya, T. Hayano, Y. Hayashi, M. Yazawa, D. Brautigan, and M. Kainosho, *J. Mol. Biol.*, in press.