3D1130

タンパク質複合体の界面残基を同定する NMR 測定法の開発

○中西 民二、宮沢 真由美、高橋 栄夫、嶋田 一夫（東大・院薬系）

【序】近年、様々な生物種のゲノム計画の進展に伴い、それぞれの種におけるタンパク質の配列および立体構造が加速度的に明らかになってきた。今後は、タンパク質がいかにして他の生体高分子と相互作用し機能発現しているかを原子レベルで解明することが必須である。

以上を踏まえ、われわれは交差飽和現象を利用した、高分子量タンパク質複合体(分子量100K程度)の分子間界面を高い精度で同定するNMR測定法を開発した*。しかし、この方法では複合体のNMRシグナルを観測するため、測定対象に分子量の制限が存在する。そこで、本研究ではその分子量制限を越えたタンパク質複合体での界面同定法の開発を目的とした。

【方法】タンパク質複合体において、一方の分子を過剰量加えることにより、その分子について非結合状態と結合状態間の交換系を作り出すことができる。かつ交換が適当な頻度で起こっている場合、非結合分子は結合状態で生じた交差飽和の影響を保持したまま解離し、非結合状態になる。このとき非結合状態由来のNMRシグナルを観測することにより、相互作用界面情報を得ることができると考えた。そこで、測定試料として黄色ブドウ球菌の産生する免疫グロブリン結合タンパクであるプロテインAのBDメイン(FB)と免疫グロブリンG(mouse IgG1)との複合体(分子量>150K)を取り上げた。

【結果および考察】²Hおよび¹⁵Nで均一標識したFBを非標識IgG1に対し過剰量加えたFB-IgG複合体溶液を調製し、非結合状態FBに対し交差飽和法を適用したところ、界面残基であるGln11、Phe14およびTyr15由来のシグナルに交差飽和による強度減少が顕著に見られた。

*H. Takahashi *et al.*, *Nature Struct. Biol.* **7**, 220-223(2000)

T. Nakanishi, M. Miyazawa, H. Takahashi and I. Shimada. : Development of NMR method for determining the interfaces of protein-protein complexes.

3D1315

質量分析法による DHFR とメトトレキサートの相互作用の解析

○山本 竜也、神田 昇、大前 英司、泉 俊輔、月向 邦彦（広島大・院理）

大腸菌由来のジヒドロ葉酸還元酵素 (DHFR) は 159 残基からなる分子量 18,000 の単量体蛋白質であり、メトトレキサート (MTX) によって拮抗的に阻害されることが知られている。今回我々は DHFR - MTX 複合体をエレクトロスプレーイオン化質量分析計 (ESI-MS) により測定し、DHFR に対する MTX の結合機構を調べた。また、H/D 交換における質量変化を測定し、MTX 存在下での DHFR のゆらぎの変化を観測した。

まず ESI-MS により各種 pH での DHFR および DHFR - MTX 複合体の多価イオンを観測した。ESI-MS は JEOL 製 SX-102A 型二重収束質量分析計に ESI10HS を装着して測定した。その結果、pH4.0 では DHFR の ESI-MS は 13 価を Base ion とする 9 価から 16 価の多価イオンをとり、その分子量は 18,016 と計算された。一方、DHFR - MTX 複合体ではその Base ion は 9 価で、7 価から 10 価の多価イオンが観測され、その分子量は、18,430 となった。このことより、DHFR は 1 分子の MTX を捕捉する事により、分子表面のプラスチャージが減少していることが示された。また DHFR - MTX 複合体のシグナルは pH 2.5 から観測され始め、pH 3.5 以上では安定に存在することがわかった。

次に DHFR - MTX 複合体の H/D 交換速度を測定した。H/D 交換は 28℃で 40 μ l の DHFR - MTX 複合体溶液を 160 μ l の重水とクエンチさせることで行った。その結果、DHFR - MTX 複合体の H/D 交換速度は DHFR のみの場合に比べより速くなった。この結果は、MTX の結合により分子全体のゆらぎが大きくなったことを示唆しており、分子内キャビティや断熱圧縮率の増加と符合している。

以上の結果より、ESI-MS により蛋白質-リガンド間の相互作用を解析できる可能性が示された。

T.Yamamoto,N.Kanda,E.Ohmae,S.Izumi,K.Gekko : Mass spectrometry of DHFR-methotrexate interaction

3D1145

多次元 NMR による水素結合の直接観測

○三島 正規、白川 昌宏 (奈良先端大・バイオ)

【背景】一般に蛋白質中の水素結合は、X 線結晶構造解析や NMR 法によって得られた立体構造や NMR におけるアミドプロトンの交換速度、化学シフトなどを基に推定されている。したがって水素結合の受容基、供与基の同定は得られている立体構造の精度や研究者の推定などに依存している。水素結合の直接観測は構造決定をより正確かつ精密にすると期待できる。

【hMTH 1 の水素結合の直接観測による構造決定】Grzesiek, Bax らの方法により、我々は DNA 修復酵素 hMTH 1 (18kDa) について、N-H...O=C 型の水素結合を形成する ¹⁵N 核と ¹³C 核の間の弱いスピン結合 (0.2-0.8Hz) を 3 次元 HNCO-TROSY 法により観測した。その結果 hMTH 1 中の 38 個の水素結合を分光学的に直接決定することができた。この水素結合情報と NOE を用いた定法による構造解析法の両者を用い、高精度での hMTH 1 の立体構造決定をおこなった。

【分子間水素結合の直接測定】さらに蛋白質-スクレオチド間の分子間水素結合のために新たな測定法 HNPO-TROSY を開発した。この手法を癌遺伝子産物 Ras-GDP 複合体に適用し、Ala18 の主鎖と α 位のリン酸基への分子間の水素結合を直接観測に成功した。また Spin-echo difference 法を用いた測定から ¹⁵N 核-³¹P 間の 3 結合を介したスピン結合定数と ¹H 核-³¹P 間の 2 結合を介したスピン結合定数を決定したところ、それぞれ 4.62+0.01Hz、3.36 +0.09Hz であった。(Mishima, M. *et al. J. Am. Chem.Soc.* 2000 122 5883-5884) この HNPO-TROSY 法は今後蛋白質-核酸複合体の立体構造解析を行う上で有効な方法であると考えられる

Mishima, M. and Shirakawa, M. : Direct observation of hydrogen bonds by multi-dimensional NMR

3D1330

放射光を利用した真空紫外円二色性分散計の開発 (7)

○松尾 光一¹、酒井 憲一¹、仲村 宗平¹、尾島 典行²、松井 高志³、深沢 知行⁴、月向 邦彦¹ (¹広島大・院理、²広島大・医総薬、³広島大・放射光、⁴日本分光 (株))

円二色性 (Circular Dichroism CD) は、生体物質の立体構造を敏感に反映するため、非常に有力な立体構造解析法として広く活用されている。しかしながら、市販の CD 分散計では、190 nm 以下の CD スペクトル測定が困難である。そこで我々は、広島大学放射光科学研究センター (HiSOR) BL15 (McPherson 1 m 直入射分光器) の放射光源を採用し、140 nm まで測定可能な真空紫外円二色性分散計 (VUVCD) の開発を行ってきた。

これまで課題として残されてきた問題点は、S/N 比の悪さによって生じるスペクトルの信頼性であった。今回我々は、この S/N 比を向上させるため以下に示す光量対策とノイズ対策を実行し、全測定波長領域における正確な VUVCD スペクトル観測に成功した。光量対策として、(1) 分光器回折格子をブレース波長 80 nm 回折格子から 120 nm 回折格子に交換した。(2) 再度ビームライン全体の正確なアラインメントを行った。(3) HiSOR 蓄積リングの蓄積電流を 100 mA から 180 mA に増加させた。ノイズ対策として、(1) トランスを設置し電源からのノイズ除去を行った。(2) 排気系ポンプからの振動を減少させた。本装置の性能評価は、CD 標準試料 d-10-カンファスルホン酸アンモニウム (ACS) を用いて行った。さらに、真空紫外領域における性能評価として、L-アラニンと D-アラニンの VUVCD スペクトルを測定した。その結果、両アミノ酸はそれぞれ正と負の対称性をもった CD スペクトルを与え、本装置が真空紫外領域において正常に作動していることが確認された。本発表では、他に短波長領域でしか CD スペクトルを示さない数種の多糖類やその他の生体物質についての測定結果も含め、本装置の現状と今後の課題、生体物質の構造解析への有用性について報告する。

K.Matsuo, K.Sakai, S.Nakamura, N.Ojima, T.Matsui, T.Fukazawa, K.Gekko : Construction of Synchrotron Radiation Vacuum Ultraviolet Circular Dichroism Spectrometer (7)