放射光円二色性によるタンパク質の構造解析
—構造生物学へのCD分光法の挑戦—

松尾光一 広島大学放射光科学研究センター・日本学術振興会特別研究員 / 米国コロラド州立大学客員研究員

1. はじめに

円二色性 (CD) 分光法は、さまざまな種類のタンパク質試料を対象にでき、また温度や pH などの溶媒変化にも対応できるため、水溶液中でのタンパク質の構造解析法として広く利用されている。しかし、立体構造が原子レベルで決定できる X 線結晶学や NMR 法に比べ、得られる構造情報には限界がある。そこで、CD 分光法からより詳細で新規な構造情報を得るために、通常光源の限界である 190 nm 以下 (真空紫外; VUV) の CD が測定可能な、放射光源を利用した装置開発が強く望まれた。この装置は、現在世界 9 ヶ国 11 施設で稼動あるいは建設中である¹⁾。わが国では、広島大学の放射光科学研究センターにおいて、世界に先駆けて水溶液中で 140 nm までの CD 測定が可能な真空紫外円二色性 (VUVCD) 分散計が開発されている。本稿では、世界で急速に広まりつつある VUVCD 分光法を用いたタンパク質の構造解析について紹介する。

2. VUVCD による天然状態の構造解析

典型的な 4 種の天然タンパク質の VUVCD スペクトル (260 ~ 160 nm) を図 1a に示す²⁾。これらは 2 次構造が大きく異なるため、190 nm 以下の VUV 領域でそれぞれ特徴的なスペクトルを示す。VUV 領域での測定の効果を調べるため、計 31 種の構造既知タンパク質の VUVCD スペクトルを測定し、 α -helix, β -strand, turn, unordered structure の含有率を解析プログラム SELCON3³⁾ を用いて予測した。X 線と VUVCD から見積もられた 2 次構造含有率の差 (RMSD; δ) を短波長限界に対してプロットした結果 (図 1b), CD 測定を VUV 領域へ拡張するほど δ は小さくなり、予測精度が大きく改善されることがわかる。また、VUV 領域の CD 測定により 6 つの 2 次構造成分の予測が容易となり、 α -helix と β -strand の本数予測が可能となる³⁾。160 nm までの CD スペクトルから見積もられた α -helix と β -strand の本数を X 線構造に対してプロット

した結果を図 1c に示す。 α -helix の予測本数は X 線構造の結果と非常に近く、 β -strand の本数でも全体的に精度よく予測できることがわかる。さらに、ここで得られた 2 次構造情報を、アミノ酸配列情報から 2 次構造部位を予測する Neural Network (NN) 法に回帰させることで、アミノ酸配列上での α -helix と β -strand の位置が精度よく予測できる⁴⁾。NN 法は部位特異的スコア行列 (PSSM) を組み合わせた方法を用いた。30 種類のタンパク質を対象にした 2 次構造の位置予測から、NN 法のみでは予測精度 (Q_3) が 70.9% であったが、VUVCD より得られる α -helix と β -strand の残基数と本数を考慮することで 74.9% まで上昇することがわかった⁴⁾。NN 法の改良により、さらに 80% 以上まで向上すると期待される。このように、VUVCD 分光法を用いることで、構造未知タンパク質の 2 次構造の含有率と本数、そしてそれらの位置が高い精度で予測できることがわかる。

3. VUVCD による非天然状態の構造解析

VUVCD 分光法は、タンパク質の天然状態だけでなく

図 1 (a) 典型的な 4 種の天然タンパク質の VUVCD スペクトル: (赤) ミオグロビン, (橙) コンカナバリン A, (茶) 大豆トリプシンインヒビター, (緑) リゾチーム (b) 短波長限界に対する α -helix, β -strand, total の予測精度 δ の変化 (c) 160 nm までの VUVCD スペクトルから見積もられた α -helix と β -strand の本数と X 線結晶構造の結果との相関図 (r は相関係数)。

Structure Analysis of Proteins by Synchrotron Radiation Circular Dichroism: Challenge of CD Spectroscopy to Structural Biology

Koichi MATSUO

Hiroshima Synchrotron Radiation Center, Hiroshima University / Department of Biochemistry and Molecular Biology, Colorado State University, USA

く非天然状態についても重要な構造情報をもたらす。タンパク質分子の巻き戻り機構や安定性の理解に重要なタンパク質の変性構造を解明するために、ミオグロビン (Mb) の低温、熱、酸、塩酸グアニジン変性状態の VUVCD スペクトル測定を行った⁵⁾。図 2 に Mb の各変性状態の 2 次構造含有率をヒストグラムで示す。VUV 領域の CD 測定により poly-L-proline type II (PPII) 構造を含めた 5 つの構造含有率が精度よく算出でき、どの変性状態も α -helix は減少し、PPII と unordered structure は増加することがわかった。特に、変性状態での β -strand の含有率の増加は興味深く、水素結合 (β -sheet) を形成しない β -strand に近い 2 面角をもつ短いペプチドが、PPII や unordered structure と同様に、タンパク質の変性構造に多く存在することを示していた⁵⁾。

α_1 -酸性糖タンパク質 (AGP) は、分子量の大きいことと結晶化の難しさから立体構造が未知であるが、リポソームとの相互作用により、 β -strand を多く含む天然構造から、 α -helix を多く含む非天然構造へと変化する⁶⁾。その構造と機能に及ぼすリポソームの影響を調べるため、AGP の VUVCD 測定から、 α -helix と β -strand の含有率と本数を決定し、NN 法を取り入れたアミノ酸配列上での 2 次構造の位置予測を行なった。その結果、AGP は、天然状態では 2-13 残基からなる 11 本の β -strand を形成するのにに対して、リポソーム存在下では 9-21 残基からなる 7 本の α -helix を形成することがわかった。リポソーム存在下では、AGP とリガンドとの結合能が低下するが、この解析から、リガンド結合部位の一部が構造変化して結合能の低下がおこると示唆された。これらの結果は、VUVCD 分光法がタンパク質の高精度構造解析のみならず、タンパク質の構造-機能相関の解明にも新たな知見を与えることを示している。

図 2 Mb の天然状態と低温・熱・酸・塩酸グアニジン (完全) 変性状態の 2 次構造含有率: α -helices (□), β -strands (□), turns (■), PPII (■), and unordered structures (■).

4. おわりに

本稿では、放射光を用いた VUVCD 分光法が、従来よりも詳細で新規なタンパク質の構造情報を提供できることを示した。また、タンパク質の構造・機能相関についても幅広い議論が可能になることを紹介した。最近では、VUV 領域に含まれるアミド間の電子遷移を考慮することで CD 理論の研究が進み、タンパク質の立体構造から CD スペクトルの算出が高精度で可能になっている⁷⁾。そのため、VUVCD 分光法と CD 理論、そして分子動力学を組み合わせた解析から、まったく新しいタンパク質の構造解析法が開拓されつつある。X 線や NMR では構造解析が困難なタンパク質やその複合体が次々と発見されている近年において、VUVCD 分光法の有効性が高まり、今後の構造生物学の発展に大きく貢献できるものと期待される。

謝 辞

本研究は、広島大学の月向邦彦教授と共同で行った。変性タンパク質の構造解析については奈良先端科学技術大学院大学の片岡幹雄先生から、VUVCD の将来の展望については米国コロラド州立大学の Robert. W. Woody 教授から多くのコメントをいただいた。放射光装置の維持管理は、広島大学放射光科学研究センターの谷口雅樹先生、生天目博文先生、有田将司先生に協力していただいた。ここに深く感謝致します。

文 献

- Wallace, B. A. (2000) *Nature Struct. Biol.* **7**, 708-709.
- Matsuo, K., Yonehara, R. and Gekko, K. (2005) *J. Biochem.* **138**, 79-88.
- Sreerama, N. and Woody, R. W. (2004) *Methods Enzymol.* **383**, 318-351.
- Matsuo, K., Watanabe, H. and Gekko, K. (2008) *Proteins* **73**, 104-112.
- Matsuo, K., Sakurada, Y., Yonehara, R., Kataoka, M. and Gekko, K. (2007) *Biophys. J.* **92**, 4088-4096.
- Nishi, K., Maruyama, T., Halsall, H. B., Handa, T. and Otagiri, M. (2004) *Biochemistry* **43**, 10513-10519.
- Woody, R. W. and Koslowski, A. (2002) *Biophys. Chem.* **101-102**, 535-551.

松尾 光一

松尾 光一 (まつお こういち)

広島大学放射光科学研究センター日本学術振興会特別研究員/米国コロラド州立大学客員研究員
2004 年広島大学大学院理学研究科博士課程修了・博士 (理学)、同年同大学にて日本学術振興会特別研究員、05 年広島大学放射光科学研究センター研究員、07 年より現職。

研究内容: 放射光真空紫外円二色性を用いた生体分子の構造解析

連絡先: 〒739-0046 広島県東広島市鏡山 2-313

E-mail: pika@hiroshima-u.ac.jp

URL: <http://www.hsrrc.hiroshima-u.ac.jp>