高難度試料の解析へ向けたNMR試料調製技術

小橋川敬博^{1,2}, 横川真梨子¹, 稲垣冬彦¹

¹北海道大学大学院先端生命科学院構造生物学研究室

²熊本大学大学院生命科学研究部生命分析化学分野

1. はじめに

溶液 NMR はタンパク質の立体構造や分子間相互作用を解析する上で有用な手法である。分子量 2 万程度までのタンパク質であればルーチ的に解析が行えるようになってきた。しかしながら、大分子量のマルチドメインタンパク質や膜タンパク質、脂質結合タンパク質の構造および相互作用の解析は難易度が高い研究課題として残されている。しかし、試料調製上のいくつかの工夫を加えることにより、X 線結晶構造解析では得られない動的な構造情報や相互作用情報を溶液 NMR より得ることができる。本稿では、著者らがやってきた (1) 選択的安定同位体標識手法を駆使したマルチドメインタンパク質の構造動態の解析 (2) ディスク状の脂質 2 重膜モデルであるナノディスクを用いた脂質-タンパク質間相互作用解析の 2 つのトピックについて解説する。

2. マルチドメインタンパク質の解析

マルチドメインタンパク質では、それぞれのドメインがコンパクトにまとまった閉構造と開いた開構造の平衡にあり、リン酸化等の翻訳後修飾により、閉構造から開構造へと変化することで機能が制御されている場合が多い。マルチドメインタンパク質の機能を理解するためには、閉じた構造だけではなく、開いた構造についての構造情報の取得が必要である。しかし、X 線結晶構造解析では分子間のパッキングにより、必ずしも生理的条件を反映した開構造が得られるとは限らない。一方、NMR においても運動性の影響によりドメイン間の相互作用面の信号が消失したり、減弱するため解析が困難となること、分子量が大きくなることにより NMR 信号の重なりや NMR 信号の線幅が広幅化するという問題が生じる。しかし、「安定同位体

標識を工夫することで見たい領域のみを観測する」という NMR の利点を活用することにより、マルチドメインタンパク質の構造および動的挙動に関する情報を得ることが可能となる。本稿ではアミノ酸選択的安定同位体標識とドメイン選択的安定同位体標識の調製と、それを用いた解析法について解説する。

2.1 アミノ酸選択標識

アミノ酸選択標識はタンパク質の特定のアミノ酸のみを標識する手法である。大腸菌での発現の系では Phe, Tyr, Lys, Leu, Pro, Val, Ile, Leu, Arg, His, Met, Trp の 12 種類のアミノ酸残基については、代謝により目的外のアミノ酸が標識されること (スクランブリング) が起こりにくく、選択的標識が可能である。最少培地に対して、上記の (安定同位体で) 標識したアミノ酸を培地 1 l に対して 20~50 mg 程度を発現誘導の 15 分から 1 時間前に添加することで、容易にアミノ酸選択標識試料を得ることができる。上記アミノ酸の中でも Met のメチル基のみが ¹³C で標識された試料については、NMR 信号の線幅が先鋭であり、信号強度が強く、分子量が 5 万程度までであれば NMR 信号の観測が容易に行える。また、価格も比較的安く、1 g で 3 万円程度であり、¹⁵N 均一標識体よりも安価に調製できる。Met は同じメチル基を有する Ile や Val, Leu に比べて個数が少なく、分子表面に露出する頻度が高い傾向にある。そのため、分子表面の相互作用をモニターする上では有効である。また、Met が相互作用面に存在していない、もしくは少ない場合には、人為的に Met を導入することで相互作用面を決める方法¹⁾も提案されており、高分子量タンパク質の解析には、Met のメチル基は有用なプローブである。

Advanced Sample Production Method for Protein NMR Spectroscopy

Yoshihiro KOBASHIGAWA^{1,2}, Mariko YOKOGAWA¹ and Fuyuhiko INAGAKI¹

¹Department of Structural Biology, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Hokkaido University

²Department of Analytical and Biophysical Chemistry, Faculty of Life Sciences, Kumamoto University

※図 1-図 3 は、電子ジャーナル (<https://www.jstage.jst.go.jp/browse/biophys-char/ja/>) ではカラー版を掲載しています。

2.2 セグメント選択的安定同位体標識

同位体標識および非標識の2つのセグメントを別々に発現させた後に Protein Ligation の手法により連結させることで、タンパク質の特定のセグメントのみを選択的に同位体標識を行うことができる。Protein Ligation の手法としてはインティンを用いた方法が90年代より知られているが²⁾⁴⁾、我々は Sortase A を用いて Protein Ligation を行った。Sortase A は細菌の細胞壁のペプチドグリカンに表層タンパク質を固定化するタンパク質であり、2004年に Mao らが Sortase A を用いたタンパク質の Protein Ligation 法について報告した⁵⁾。Sortase A は LPXTG という配列を有するペプチド断片を T と G の間で切断し、その LPXT の後ろに N 末端に露出した Gly-Gly- を有するペプチド鎖を付加する反応を触媒するペプチドリガーゼである (図 1)。単純な酵素反応であるため、インティンの系に比べて反応条件の最適化が行いやすく、高い反応効率を得やすいという利点がある⁶⁾。

2.3 ドメイン間相互作用面情報の取得

それぞれのドメインを別々に発現させた試料とドメインが連結された試料の NMR スペクトルの重ね合わせより、ドメイン間相互作用面の情報を得ることができる。この際にアミノ酸選択標識試料やドメイン選択標識試料を用いることで、標識部分の NMR 信号のみが観測され、シグナルの重なりが緩和され、解析が容易に行える。著者らはユビキチンリガーゼ (E3 酵素) である Cbl-b の N 末端領域の自己阻害機構およびリン酸化による活性化機構の解析に本方法を適用した⁷⁾。図 2a は非リン酸化状態における Cbl-b の自己阻害状態の解析例である。2つのドメイン (Domain-A と Domain-B とする) についての2セットの NMR スペクトルの重ね合わせから双方のドメインの接触面を決定した。ちなみに、Domain-B 側が活性本体であり、ユビキチン結合酵素 (E2) との結合に関わる。Domain-A はアミノ酸選択標識体を用いて、Domain-B についてはドメイン選択標識体を用いてドメイン間相互作用面情報を得た。Domain-A においてドメイン化により変化した信号を基に Domain-A 側の相互作用面の情報を取得する。Domain-B 側についても同様に接触領域を推定した。この領域の一部は E2 との結合面であり、Domain-A が E2 との結合を妨げていることが示唆される。最

図 1
Sortase A によるペプチド連結反応。

後に、これらの接触面情報に基づき HADDOCK⁸⁾ というソフトウェアを用いることでモデル構造を得ることができる。次に、リン酸化状態についてもドメイン選択標識体を用いてドメイン間相互作用情報を得た。リン酸化体における Domain-B の NMR 信号は非リン酸化体とは異なり先鋭であった (図 2b)。また、ドメイン化体のスペクトルともほぼ重なり、リン酸化体では Domain-B は独立して挙動し、E2 結合面は溶媒に露出していることが示唆される (図 2c)。Cbl-b はリン酸化により自己阻害が解除され、E2 との結合が強められることで活性が上昇する。

以上のように選択的安定同位体標識技術を利用することで容易にマルチドメインタンパク質のドメイン間相互作用面に関する情報を得ることが可能である。

3. ナノディスク

ナノディスクとは、脂質2重膜の周囲を膜骨格タンパク質 (MSP) が取り囲んだディスク状の脂質2重膜モデルであり (図 3)、Sligar らによって開発された⁹⁾。膜モデルとして一般的に用いられてきたミセル、バイセル、リポソームと比較して、ナノディスクは、タンパク質に対する変性作用を有する界面活性剤を含まず、生体膜に近い脂質2重膜を有するうえ、水溶性であるため、様々な解析手法への適用が可能である。

3.1 ナノディスクを用いた脂質-タンパク質間相互作用の解析

イノシトールリン脂質 (PI) は生体膜の構成成分であり、PI 結合タンパク質と PI の結合は様々なシグナル伝達に関与する。PI はイノシトール環の3, 4, 5位がリン酸化されることにより、リン酸化部位と数が異なる計8種類の PI が存在する。PI 結合タンパク質の多くは、特定の PI と選択的に結合する。この PI 結合タンパク質による PI 選択性や結合親和性などの相互作用様式の解析には、従来、リポソームを用いた共沈実験や、脂肪鎖を持たない可溶性の PI アナログ、ミセルなどが用いられてきた。PI 結合タンパク質は PI のヘッドグループのみではなく、アシル鎖も認識する。そのため、アシル鎖を持たない可溶性アナログでの解析では不十分である。リポソームを用いた共沈実験においては分析対象タンパク質が沈殿した際には、偽陽性を示す。任意の PI を埋め込んだ PI ナノディスクを用いることで既存の解析手法の欠点を克服できることを著者らは報告している (図 3a)^{10), 11)}。

各種 PI をそれぞれ含む PI ナノディスクおよび PI を含まない空ナノディスクを調製する。これらのナノ

图 2

NMR スペクトルの重ね合わせによる Cblb のドメイン間相互作用面情報の取得. (a) 非リン酸化状態の構造. アミノ酸選択標識体を用いて Domain-A 側の相互作用面情報を取得し, Domain-A の立体構造にマッピングする (パネル左). 次に, ドメイン選択標識体を用いて Domain-B 側の相互作用面情報を取得し, Domain-B の立体構造にマッピングする (パネル右). 最後に, 相互作用面情報を用いて HADDOCK により全体構造モデルを計算する (パネル中央). (b) リン酸化によるドメイン間相互作用の変化. Domain-B のドメイン選択標識体 (赤: 非リン酸化体, 青: リン酸化体) の NMR スペクトルの重ね合わせ (パネル上). リン酸化体では Domain-B が独立して挙動する. (c) NMR データに基づく Cblb の制御モデル. リン酸化により閉じた構造から開いた構造へと変換し, E2 結合面が露出する. それにより, E2 との親和性が強められ, 活性が上がる.

图 3

(a) PI ナノディスクを用いた脂質-タンパク質間相互作用解析の概要. (b) 膜上での EEA1 FYVE と PI(3)P の相互作用モデル. 膜に近接する残基を黒で示した. ナノディスクを用いて決定したモデル (左)¹¹⁾ およびミセルを用いて決定したモデル (右)¹²⁾.

ディスクおよび、GST 融合タンパク質として調製した PI 結合タンパク質を用いたプルダウンアッセイにより、PI 選択性が迅速に決定できる。蛍光標識した PI 結合タンパク質を利用した蛍光偏光解消法により結合親和性の定量的な解析が可能である。また、NMR を用いることで PI のヘッドグループおよび脂質との相互作用領域を決定できる (図 3a)。PI(3)P を特異的に認識する EEA1 の FYVE ドメイン (EEA1 FYVE) について、PI(3)P ナノディスクとの相互作用様式を NMR 法によりさらに詳細に解析し、従来のミセルを用いた解析結果から提唱されていたモデルとは、膜との相対配向が異なることを著者らは報告している (図 3b)^{11), 12)}。EEA1 は生体内においてはダイマーとして機能しており、ナノディスクを用いて決定した膜との相対配向は、EEA1 ダイマーと膜の結合様式としても妥当である。従来のミセルを用いて解析が行われた系についても脂質 2 重膜モデルを用いて再評価することが必要であろう。

ナノディスクには膜タンパク質を埋め込むことも可能である。国内外の複数のグループにより、ナノディスク中に再構成した膜タンパク質の溶液 NMR による解析が進められている。ナノディスクはリボソームに比べてサイズが小さいため (直径 9~12 nm 程度)、溶液 NMR との相性がよい。今後、様々なアプリケーションが開発されていくであろう。

4. おわりに

本稿では高難度試料の NMR による構造、相互作用解析へ向けた調製技術、安定同位体標識技術について概説した。これらの技術を用いることで、大分子量マルチドメインタンパク質、膜タンパク質、脂質-タンパク質間相互作用が解析対象となる。一方で、試料調製が煩雑であるという欠点がある。解析対象に応じて既存手法と使い分けが必要であろう。著者らは高難度試料の構造、相互作用解析技術としてランタノ

イドプローブ法の開発も進めており、本稿で紹介した試料調製技術との組み合わせにより、さらなる高難度試料の解析へと展開していきたいと考えている。

文 献

- 1) Stoffregen, M. C. *et al.* (2012) *Structure* **20**, 573-581.
- 2) 山崎俊夫ら (1999) *生物物理* **39**, 182-184.
- 3) 湊 雄一ら (2012) *日本核磁気共鳴学会機関誌* **3**, 11-18.
- 4) Muralidharan, V. *et al.* (2004) *Nat. Methods* **3**, 429-438.
- 5) Mao, H. *et al.* (2004) *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 2670-2671.
- 6) Kobashigawa, Y. *et al.* (2009) *J. Biomol. NMR* **43**, 145-150.
- 7) Kobashigawa, Y. *et al.* (2011) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **108**, 20579-20584.
- 8) Dominguez, C. *et al.* (2003) *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 1731-1737.
- 9) Bayburt, T. H. *et al.* (2002) *Nano Lett.* **2**, 853-856.
- 10) Kobashigawa, Y. *et al.* (2011) *Anal. Biochem.* **410**, 77-83.
- 11) Yokogawa, M. *et al.* (2012) *J. Biol. Chem.* **287**, 34936-34945.
- 12) Kutateladze, T. G. *et al.* (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 3050-3057.

小橋川敬博

小橋川敬博 (こばしがわ よしひろ)

熊本大学大学院生命科学研究部助教
北海道大学大学院理学研究科博士課程修了, 学振特別研究員 (PD), 北海道大学大学院先端生命科学院研究員を経て現職。

研究内容: 生体物質の NMR とそのための試料調製技術および解析技術の開発

連絡先: 〒 862-0973 熊本市大江本町 5-1

E-mail: kob@sci.hokudai.ac.jp

横川真梨子

横川真梨子 (よこがわ まりこ)

北海道大学大学院先端生命科学院研究員
東京大学大学院薬学系研究科博士課程修了, 学振特別研究員 (PD), 社団法人バイオ産業化コンソーシアム特別研究職員を経て現職。

研究内容: 生体物質の NMR

連絡先: 〒 001-00021 北海道札幌市北区北 21 条西 11 丁目北海道大学次世代ポストゲノム研究棟 2 階

E-mail: yokogawa@mail.sci.hokudai.ac.jp

稲垣冬彦 (いながき ふゆひこ)

北海道大学大学院先端生命科学院特任教授

研究内容: 生体物質の NMR

連絡先: 同上

E-mail: finagaki@pharm.hokudai.ac.jp