総説

2次元 NMR 法で決定した EGF の立体構造

東京都臨床医学研究所 神 田 大 輔

The three-dimensional structures of mouse epidermal growth factor (53 residues) in pH 2.1 and pH 6.8 solutions were determined by two-dimensional NMR and distance geometry calculation. Ten structures that satisfied the NMR-derived distance constraints were obtained for each pHs using XPLOR program. The topology of the main chain was identical at both pHs, but the global shape at pH 6.8 was found to be more compact than that at pH 2.1.

epidermal growth factor /EGF/ three-dimensional structure /NMR/
simulated annealing calculation /XPLOR

はじめに

NMR 法を用いてマウスの上皮成長因子 (EGF) の立体構造を決定した。すでに NMR データを満たすように組み立てた分子模型による立体構造については、論文¹⁾や日本語^{2),3)}による総説で発表しているので、今回はその後の進展を中心にまとめる。

1. 上皮成長因子 (EGF) の機能

EGF (epidermal growth factor) は上皮細胞の増殖を促進するペプチド性のホルモンである⁴⁾。S. Cohen によって1962年にマウスの顎下腺から精製された。成熟した雄マウスの顎下腺には幸運にも例外的に多量の EGF が蓄積 (約0.1mg/匹) されていて、今日でも良い抽出材料となっている。マウスの EGF はアミノ酸 53残基、分子量 6 千の単一のポリペプチド鎖であり、分子内に 3つの S-S 結合を持った大変安定な分子である。一次構造を図 1 に示す。EGF 生理活性は標的細胞の細胞膜に存在する EGF レセプターに EGF が結合することから始まる⁵⁾。EGF がレセプターの細胞外ドメインに結合すると、細胞の内側にあるチロシンに特異的なキナーゼが活性化される。これが引き金となって、最終的に DNA 合成や細胞増殖に至る。レセプターのキナーゼ活性が必須であることはキナーゼ活

図 1. マウス EGF のアミノ酸配列
Biochemistry, (1976) 15,2624-2633の Figure1 より

性に必須なリジン残基の置換変異体にこうした活性がないことで証明されている。X 線結晶解析に適する EGF の単結晶を作ることが難しいため、現在までに EGF の立体構造に関する X 線解析の報告はない。最近、姫路工業大学・安岡研究室からヒト EGF の結晶化の報告がなされた⁶⁾。

2. NMR によるタンパク質の立体構造決定

現時点において、タンパク質の立体構造を知る最良の方法は X 線結晶解析である。しかし、近年の NMR 法のハードとソフト両面の革新的な発展とコンピュータの高速化により、NMR によってタンパク質の立体構造を決定することが可能になった⁷⁾。ただし、分子量の上限に制限があり、今のところ分子量15,000が限界である。NMR のハード面では、高磁場の超伝導磁石の導入によりスペクトルの分解能と感度が飛躍的に増大した。特に NMR 法は感度が低いのが短所であり、

Three-Dimensional Structure of Mouse Epidermal Growth Factor Determined by Two-dimensional NMR

Daisuke KOHDA

Department of Molecular Physiology, The Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science

高濃度の試料^{*)}を必要とするので、感度の改善は重要である。ソフト面ではNMRスペクトルの2次元化により、NMRシグナルの重なりの問題が大幅に軽減した。以上のようなNMR法の発展を背景に、Wüthrichらによってタンパク質のNMRスペクトルの解析とNMRデータの基づく立体構造決定法が完成された⁸⁾。1987年頃までは世界的にも握りの研究室しかできない“特権的”な技術であったが、1988年以後、急速に広まり、今後の90年代は一般的なタンパク質の立体構造決定法として結晶解析にならぶ非常に重要な方法になるだろう。

3. pH2.1におけるEGFの立体構造

EGFの等電点は4.6であり、pH3.5~6.5という広い範囲で等電点沈澱をおこす。一方、NMR測定立場から溶液のpHは7以下である必要がある。なぜなら、アミドプロトンは溶媒である水のプロトンと交換する性質があり、その速度は溶液のpHに大きく依存する。NMRでそのシグナルを観測するにはこの交換速度を 10^3 min^{-1} 以下にする必要がある。以上、2つの理由から、最初はpHを2まで下げて測定を行った。非生理的なpHであるが、酸変性など大きな構造変化がないことは1次元NMRスペクトルやCDスペクトルのpH滴定実験により確かめた。マウスEGFについてはアメリカのグループ⁹⁾が、ヒトEGFについては日本¹⁰⁾と、イギリスのグループ¹¹⁾がそれぞれ我々とは独立にNMR解析を進めていたが、すべてpHは2~3で実験をおこなっている。

NMRデータによるタンパク質の立体構造決定の第一歩は、連鎖帰属法(sequential assignment)を用いてNMRシグナルの帰属^{**)}を行う。これにはCOSY^{***)}と略称される2次元スペクトルとNOESY^{****)}と略称される2次元スペクトルをクロスワードパズルのように理論的に組み合わせて帰属していく。pH2.1で測定した

*) タンパク質量にして5~10mgを200~400 μ lに溶かす。

**) どのシグナルがアミノ酸配列上のどの位置に対応しているかという関係

***) correlation spectroscopy の略。Jカップリングと呼ばれる共有結合を通した相互作用を検出する。COSYでクロスピークが観測されると2つのプロトンは2本あるいは3本の共有結合をへだててつながっている。

****) nuclear Overhauser effect spectroscopy の略。空間を介した双極子相互作用を検出する。NOESYでクロスピークが観測されると2つのプロトンは空間的に近くにある。

定したNOESYおよびCOSYスペクトルから連鎖帰属を行い、観測可能な約300個のプロトンシグナルの帰属を完了した¹²⁾。我々と同時に、アメリカのグループが帰属を発表したが結果はほぼ100%一致していた¹³⁾。次にシグナルの帰属を参照して、NOESYスペクトルから立体構造を規定する距離情報をとり出す。2つの水素原子核、すなわち、プロトンが空間的に近くにあるとNOE(核オーバーハウザー効果)が観測できる。一枚のNOESYスペクトルからタンパク質に含まれるすべてのプロトンペアの間のNOEの大きさを見積ることができ、さらにNOEの大きさから2つのプロトンの間の相対距離を計算することができる。とは言っても、NOEの大きさは距離の6乗に反比例するので、距離が少しでも大きくなると急激に小さくなり、実際には相対距離が4~5 Å以下のプロトンペアについてNOEが観測される。NOESYスペクトルに含まれるクロスピークのうち、連鎖帰属が終わった段階では残基内と一次構造上隣同士の残基間のものだけについて実際のプロトンペアと対応がついている。残りのクロスピークは一次構造上離れた位置にあるが、ポリペプチド鎖の折れたたみにより空間的に近くなっているプロトンのペアに由来するもので、立体構造決定に重要である。距離情報を集めるとはこれら残りのクロスピークを実際のプロトンペアに対応させる作業である。実際のNOESYを図2に示す。pH2.1では800個あまりのNOESYクロスピークがあり、その内訳は残基内421、隣接残基間133、残り223個であった。

こうしたプロトン間の距離に関する情報が得られると、これを満足するような立体構造を決めることができる。こうした計算はディスタンスジオメトリと呼ばれ、異なるアルゴリズムが何種類か存在する。よく使われるプログラムにはDADAS(DISMAN)、CHARMM、XPLOR、DISGEOなどがあるが、いずれも高速で大容量のコンピュータを必要とする。京都大学・理学部の郷教授はプログラムDADASの開発者であり、マウスEGFの立体構造を京都大学の大型計算機を使って計算していただいた。その結果は分子模型による立体構造と大変よく似ていた。異なるアルゴリズムに基づくプログラムでも同様な結果がえられるか否かを検討することは重要であるので、当研究所に設置されているワークステーションIris4D上でXPLORを用いて立体構造の計算を行った。XPLORは一種のプログラム言語であり、自分で自由に計算手順を変更できるのが利点である。通常はXPLORの計算の前にDISGEOを用

図2. マウス EGF の2次元 NOESY スペクトルの例
日本電子製の500 MHz NMR 装置を使用. 軽水中,
28℃, pH 2, 混合時間150ms. 縦軸と横軸は化
学シフトを ppm 単位で示してある.

いて、あらかじめだいたいの形を作っておき、次に SA (simulated annealing) とよばれるアルゴリズムによる XPLOR プログラムで最終構造を得る¹⁴⁾。しかし、DISGEO が手もとになかったこともあり、VTF (variable target function) とよばれるアルゴリズムの XPLOR のプログラム¹⁵⁾を DISGEO の代わりに使い、ついで SA の計算を行った。

まず、混合時間80ms の NOESY スペクトルから335個のプロトン間の距離情報を得た。これは先に述べた約800個のクロスピークのうち、アミドプロトンが関与していない残基内 NOE に由来するクロスピークを除いた、すべてのクロスピークから得られる距離情報の総数である。基本的には一つのクロスピークから一つの距離情報が得られるが、立体特異的な帰属ができ

ないプロトングループ(メチレン基や Val や Leu のメチル基)や内部回転による化学シフトの平均化があるプロトングループ(Tyr や Phe のリングプロトン)では2~4個のクロスピークが一つの距離情報に対応する。さらに3つの S-S 結合の情報(距離情報にして9個)を足して VTF 計算を行い、得られた中間座標から存在が推定された8つの水素結合の情報(距離情報にして16個)をさらに付け加えて SA 計算を行い、総計360個の距離情報から EGF の立体構造を計算した。今回用いたプログラムでは、伸びた状態にあるポリペプチド鎖にランダムな初速度を与えて計算を始め、入力距離情報を満足するように折り畳んでいく。1回の計算時間は約3時間である。これを52回行い、10個の良好な解が得られた。ここで捨てた残りの42回の計算

図3. pH2.1でのマウス EGF の立体構造

(A) XPLOR で計算した10個の座標を2-50残基の範囲でベストフィットした。主鎖の RMSD は平均2.1Å。(B) 主鎖構造の模式図。矢印はβシート構造を表す。S-S 結合は黒い棒で示した。挿入図は EGF 分子のおおまかな立体構造を手袋(ミトン)に見立てた。

はターゲット関数が途中で極小値にトラップされてうまく収束しなかったものである。図3 (A)に2番目から50番目までの残基でフィットしたときの10個の座標の重ねあわせを示す。10個の座標間の RMSD* の平均は2.1Åであった。図は省略するが、2-32でフィットすると RMSD は平均1.5Å、33-50のフィットでは平均1.3Åであった。図3 (B)は模式的に描いた EGF の主鎖構造である。実はこの図は計算をする以前に、手で組み立てたモデルをもとにして描いたものではあるが、両者がよく一致したので十分使える。また、DADAS で計算した結果ともよく一致した (RMSD は2-50で2.7~3.2Å)。

EGF はかなり細長い分子であることがわかる。2

*) root-mean-square で表わした2つの座標間のずれ、主鎖 [N, C', C'] のみで計算した。

つの構造ドメインに分けることができ、N 端側ドメイン (1-32) と C 端側ドメイン (33-53) からなっている**。N 端側ドメインには反平行のβシート構造 (19-23+28-32) があり、これにフラグメント1-4が反平行にゆるくより添っている。5-14はゆるい右巻きのヘリックス状の構造を取り、分子の裏側を下りてきて、15-18のターンにつながっている。一方、C 端側ドメインは34-37のタイプIIのβターンと39-43の左回りのループを含み、この2つの部分は反平行のβシート構造 (38-39+44-45) と一つの S-S 結合でかくく組み合わさっている。この構造は“ダブルヘアピン構造”と呼ばれている。C 端51-53 にはコンホメーションを決めるような NOE は観測されないで、溶液中ではきっちりとした構造はとっていないと考えられる。

4. pH6.8 での EGF の立体構造

既に述べたように EGF はレセプターに結合することによってその活性を発現する。pH 5 以下では EGF はレセプターに結合できないことが分かっている¹⁶⁾。中性溶液における EGF の立体構造を知ることが望ましい。確かに CD や 1 次元 NMR スペクトルの pH 滴定で大きな構造変化が起きていないことは調べてあるが、中性溶液において酸性溶液とは独立に立体構造決定を行う必要が是非ともある。NMR の実験サイドからみると pH 7 付近ではアミドプロトンの観測が難しいと思われたが、予想に反しておよそ8割のアミドプロトンが観測でき、連鎖帰属を行うことができた。アミドプロトンが観測できないところでは2次元スペクトルをつかった pH 滴定実験の結果を用いた。こうして pH 6.8でのシグナルの帰属が得られた。

次に、pH 中性溶液での EGF の立体構造を計算した。方法は pH2.1とまったく同じである。総数267個の距離情報を用いて、78回計算を行い10個の良好な解を得た。図4に2-50でのフィットを示す。RMSD は平均2.4Åであった。2-32でフィットすると (ただし、24-27は除く) RMSD は平均1.9Å、33-50のフィットで平均1.6Åであった。図5はそれぞれの pH での10個の構造の平均を計算し、両者を比較した。RMSD は2-50でフィットして2.7Åである。pH 2.1と pH 6.8での主鎖のトポロジーはまったく同じであったが、pH 2.1では全体にかなり細長い形をしているのに対し、

**) ドメインという言葉は普通もっと大きな構造単位に使うが、適当な言葉がないので使用した。NOE のパターンからみて EGF は2つの構造単位に分けられる。

図4. pH6.8でのマウス EGF の立体構造
XPLOR で計算した10個の座標を2-50残基の範囲
でベストフィットした。主鎖の RMSD は平均
2.4Å。

図5. pH2.1と pH6.8でのマウス EGF の立体構造比較
それぞれの pH での10個の座標を単純に平均し、
Restrained Energy Minimization を行ったものを、
2-50でベストフィットした。細線が pH 2.1, 太
線が pH6.8. RMSD は2.7Å. (A) は図3, 図4
と同じ方向から見たもの。(B) は横に90°回転し
た。

pH 6.8ではN 端のメドイン内の β シートがたわんで
曲がり、その結果2つのメドインが近づいて全体的に
まるまった形になっていることがわかった。

5. EGF の立体構造と機能

EGF 全体のおおまかな形は“右手のミトン”によ
く似ている(図3(B)の挿入図)。N 端側のドメイン
がてのひらであり、C 端側のドメインが親指である。
現在の構造決定のレベルは主鎖のトポロジーが決まっ
た程度である。今後は、立体特異的な帰属やカップリ
ング定数から得られる2面角の情報を新たな情報とし
て、DADAS や XPLOR を用いて精密化を進める必要
がある。

立体構造が明らかになって次に問題になるのは、
EGF レセプターとの結合部位が EGF 分子上のどこに
マップされるかということである。いくつかの生化学
的な知見から推定して、ちょうどミトンが物を掴むよ
うに、てのひらと親指の間にできる窪み部分でレセプ
ターと相互作用すると思われるというモデルを提案
した¹⁷⁾。しかし、最近、アミノ酸置換体やC 端を削っ
た変異体の活性比較から、L 47もレセプター結合に関
与していることが指摘されている^{17), 18)}。さらに NMR
を用いて、L 47の置換の影響は局所的であり、大きな
コンホメーション変化は起こっていないことがアメリ
カのグループによって示された¹⁹⁾。L 47の位置はミ
トンの手首でしかも手の甲側にあるので、“ミトンモ
デル”と矛盾する。L 47以降のC 端7 残基は溶液中では
しっかりした立体構造をとっていないことを考えると、
おそらく EGF がレセプターと結合するときに誘導適
合のようなコンホメーション変化がおけると予想され
る^{*}。この結果、L 47がミトンのてのひら側に向くこ
とを考えてもよい。いずれにせよ、EGF とレセプ
ターとの相互作用を知るには、今後、EGF 分子とレ
セプターとの相互作用を直接 NMR を用いて解析し、
その結合部位や相互作用様式を明らかにしていく必要
がある。このような EGF 複合体の分子量は数万から
十万程度にもなるが、安定同位体(²H, ¹³C, ¹⁵N)を利用
することにより、十分に現在の NMR 技術の適用範
囲内にある。

最後に、本稿執筆の機会を与えて下さいました臨床
研・生体活性物質研究部門室長、稲垣冬彦博士に感謝

*) 最近、我々は EGF とドデシルホスホコリンミセル
との相互作用を NMR を用いて解析した。それによ
ると EGF は L47を含むC 端テイル部分でミセルと
相互作用し、両親媒性構造をとることがわかった。
このとき L47はてのひら側を向いている。

いたします。

文 献

- 1) Kohda, D., Go, N., Hayashi, K., Inagaki, F. (1988) *J. Biochem.* **103**, 741-743
- 2) 稲垣冬彦, 神田大輔 (1988) 細胞工学 **7**, 904-909
- 3) 神田大輔, 稲垣冬彦 (1989) 生化学 **61**, 698-704
- 4) (EGF Review) Carpenter, G., Cohen, S. (1979) *Annu. Rev. Biochem.* **48**, 193-216
- 5) (EGF Receptor Review) Yarden, Y., Ullrich, A. (1988) *Annu. Rev. Biochem.* **57**, 443-478
- 6) Higuchi, Y., Morimoto, Y., Horinaka, A., Yasuoka, N. (1988) *J. Biochem.* **103**, 905-906
- 7) Wüthrich, K (1989) *Science*, **243**, 45-50
- 8) Wüthrich, K (1986) *NMR of Proteins and Nucleic Acids*, John Wiley, New York
- 9) Montelione, G. T., Wüthrich, K., Nice, E. C., Burgess, A. W., Scheraga, H. A. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 5226-5230
- 10) Makino, K., Morimoto, M., Nishi, M., Sakamoto, S., Tamura, A., Inooka, H., Akasaka, K. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 7841-7845
- 11) Cooke, R. M., Wilkinson, A. J., Baron, M., Pastore, A., Tappin, M. J., Campbell, I. D., Gregory, H., Sheard, B. (1987) *Nature*, **327**, 339-341
- 12) Kohda, D., Inagaki, F. (1988) *J. Biochem.* **103**, 554-571
- 13) Montelione, G. T., Wüthrich, K., Scheraga, H. A. (1988) *Biochemistry*, **27**, 2235-2243
- 14) Nilges, M., Clore, G. M., Gronenborn, A. M. (1988) *FEBS Lett.* **229**, 317-324
- 15) Nilges, M., Clore, G. M., Brünger, A. T., Gronenborn, A. M. (1988) *Protein Engineering*, **2**, 27-38
- 16) Massagué, J. (1983) *J. Biol. Chem.* **258**, 13614-13620
- 17) Ray, P., Moy, F. J., Montelione, G. T., Liu, J.-F., Narang, S. A., Scheraga, H. A., Wu, R. (1988) *Biochemistry*, **27**, 7289-7295
- 18) Burgess, A. W., Lloyd, C. J., Smith, S., Stanley, E., Walker, F., Fabri, L., Simpson, R. J., Nice, E. C. (1988) *Biochemistry*, **27**, 4977-4985
- 19) Moy, F. J., Scheraga, H. A., Liu, J.-F., Wu, R., Montelione, G. T. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 9836-9840

こうだ だいすけ

1981年, 東京大学理学部生物化学科卒業, 1986年, 同大学院博士課程終了。同年, 東京都臨床医学総合研究所, 研究員。1次元のNMRはタンパク質にはパワー不足の感がありましたが, 2次元のNMRでようやくX線から独立しました。元インスタント食品評論家。昔は新製品のパッケージを見ただけでおいしいかどうか判別できた。

連絡先 東京都文京区本駒込3-18-22

東京都臨床医学総合研究所生理活性物質研究部門

☎ 03-823-2101 内線5264