タンパク質フットプリント法

国立遺伝学研究所構造遺伝学研究センター
永井宏樹

1. はじめに

DNA フットプリント法は、DNA とタンパク質の相互作用部位を決定するための最も確立された方法の一つである。これと同じ原理を用いてタンパク質とリガンドの相互作用を解析しようというのがタンパク質フットプリント法である。X 線結晶構造解析により立体構造が解かれたタンパク質をモデルとする方法論としてはいくつかのグループから論文が発表されていた(例えばCRP¹⁾) が、特に最近、大腸菌 RNA ポリメラーゼの各サブユニット間相互作用の解析に応用され一定の成果をあげてきている^{2)~4)}。ここでは、タンパク質構造解析の一般的手法として確立されようとしているタンパク質フットプリント法について紹介する。

2. 原理と実際

DNA フットプリント法では、DNA 側のタンパク質相互作用部位を決定することを目的に、末端標識した DNA およびそれと目的タンパク質との複合体を、DNA 分解酵素である DNase I あるいは Fe-EDTA によるヒドロキシルラジカルにより限定分解し、得られる DNA 断片を変性ゲル中で電気泳動し両者の切断プロファイルと比較する。結果として、結合部位における DNA 切断の目的タンパク質による保護、あるいは結合部位近傍における高感受性部位の出現が得られる。これと同様に、目的とするタンパク質を含む複合体を、配列非特異的に切断するようなプロテアーゼあるいは試薬(プローブ)で限定分解し、N 末あるいは C 末を含むペプチドをゲル電気泳動像上で可視化すればタンパク質フットプリントは実現できる。以下に実際にタンパク質フットプリント実験をするにあたり考慮すべき

ことを述べる。

2.1 プローブとして何を用いるか?

プローブとしては Fe-EDTA によるヒドロキシルラジカルが主として使用される。これはプロテアーゼに比べてサイズが小さく、タンパク質主鎖を比較的配列に依存しない形で切断する点で有利である。他にアミノ酸残基特異的修飾と切断を組み合わせたものなどが試みられている⁵⁾。Fe-EDTA を用いる場合、遊離の鉄イオンが目的タンパク質に結合して切断プロファイルに変化をおこす可能性²⁾ をできるだけ排除するため、Fe-EDTA 複合体で市販されているものを用いるのがよい。また、精製タンパク質の保存溶液にはしばしばグリセロールが含まれるが、これはラジカルの強力なスカベンジャーである。したがって、反応溶液からグリセロールを除去するか、一定濃度になるように調節し反応時間を長くとるなどが必要である。典型的な反応時間は前者で 1~2 分、後者で数十分である。

2.2 末端を含むペプチドの可視化

末端配列を認識する抗体を利用したイムノブロットイングか、配列特異的キナーゼによりリン酸化されるようなタグ配列を利用した放射性リン酸による末端標識が用いられるが、感度の点で後者が有利であり多くの場合はこれが用いられる。この目的に使われる代表的なキナーゼに HMK (Heart Muscle Kinase; 例えば Sigma P2645) があげられる⁶⁾ が、他の配列特異的キナーゼも当然利用可能である。ゲル中でのシグナル分離能向上のため³²P の代わりに³³P の利用も可能であるが、引き換えに感度は悪くなる。

2.3 ゲル電気泳動での分離

SDS ゲル中のタンパク質の移動度は、DNA の変性ゲル中での移動度に比べて分解能・整合性に欠ける。このため二次元ゲル電気泳動の利用を試みているグループもあるが、現時点までに報告されているすべての事例では一次元の SDS ゲル電気泳動を用いている。末端近傍の小さなタンパク質断片を分離する必要があるため、トリス・トリシンバッファー系⁷⁾ が好まれる。筆者は DNA シーケンス用のゲル板と 1 mm のスパーサーを用いて長いゲルを作成し 15 時間程度かけて泳動しているが、拡散によるシグナル分離の劣化は経験していない。また、特定のアミノ酸を切断する試薬 (CNBr など) やプロテアーゼ (Lys-C など) を用いて、変性条件下で目的タンパク質を限定分解することにより、目的

Protein footprinting technique

Hiroki Nagai

Structural Biology Center, National Institute of Genetics e-mail: hnagai@labstrg-1.lab.nig.ac.jp

タンパク質断片によるゲル中での移動度マーカーを作ることができる。これは、ラジカルによる切断点のマッピングに必須である。

2.4 その他のヒント

(1) DNAとは異なりタンパク質の性質は個々多様である。実際の実験を始める前に目的タンパク質の性質をよく把握し、バッファー等の条件の最適化をはかるべきである。例えば、実際観察しているシグナルのほとんどは管壁に吸着してしまった不活性タンパク質由来だった、などという事態はキャリアタンパク質によるブロッキングや界面活性剤の活用により避けることができる。

(2) 一度切断されたタンパク質断片は、構造変化の結果二度目以降の切断を受けやすくなる可能性がある。また、核酸とタンパク質の相互作用を解析したい場合には、ラジカルによる切断反応に対して核酸のほうがタンパク質より感受性が高いことが問題になる。いずれにしても、シングルカットを保証し確実な結果を得るためには、切断反応はかなり弱い条件で行なわねばならない。

(3) 結果はゲルイメージとして得られるわけであるが、保護される領域や高感受性になる領域のプレゼンテーションには、ゲルの写真よりもスキャンした結果のプロファイルを示すほうがわかりやすい。そのためにはホスホイメージャーやBAS イメージアナライザを

利用するのが簡便であるし、しかも感度もよい。図1に実際の実験例を示した。図中ブラケットで示した領域のうち、aとbはコア酵素との結合により、cはDNAとの結合によりラジカルによる切断から保護されている。

3. 結果の解釈に関して留意すべき点

図2にタンパク質フットプリント法を用いた仮想実験を示した。タンパク質は高次構造を持っているため、フリーのタンパク質をラジカルで切断してもDNAのようなほぼ均一なラダーは得られない。例えば、疎水性コアの部分などタンパク質表面になくプロープが侵入できない部分は切断が起こらないため、結果としてゲル上でのシグナルの欠落として現れる（パネルB、領域*）。図2の実験では、タンパク質Yとの相互作用の結果、分解から保護される領域（I）と逆により感受性になった領域（II）が得られた。相互接触部位（I）が保護されるのはDNA フットプリントと同様であるが、結合に伴うタンパク質Xの構造変化の結果、溶媒側に露出した部位（II）や分子内接触により保護される部位があればシグナルの変化として結果に現れうる。実際の例を見る限りこのような挙動を示すシグナルは多くはないが、複合体内で特異的に保護される領域が必ずしも目的とするタンパク質間結合の接触部位だと言えないことは頭においておくべきである。これは単にタンパク質間相互作用部位の決定を目的にするなら欠

図1 タンパク質フットプリントの実験例。大腸菌RNAポリメラーゼの σ サブユニットをC末端で標識し、コア酵素・プロモーターDNAの存在・非存在下でラジカルによる切断反応を行い、SDSゲル電気泳動を行った。左側にはそのゲルイメージ（の一部）を、右側にレーン2-4を定量した切断プロファイルを示した。

図2 タンパク質XとYの相互作用のタンパク質フットプリント法による解析。(A) タンパク質Xはタンパク質Yと領域Iを介して結合し、それによって引き起こされる構造変化の結果領域IIが溶媒側に露出する。(B) 期待されるゲルイメージ。

点であるが、これを逆手にとれば、タンパク質自体の構造変化を検出する優れた方法となりうる。両刃の剣だと言えよう。

4. 今後の展望

タンパク質フットプリント法で得られる構造情報は、もちろん解像度の点ではNMRやX線による立体構造解析に遠くおよばないが、簡便に構造変化とその部位を検出できる点で応用範囲の広い技術である。例えば、ラジカルによる切断を短時間にパルス的に行えば、反応過程のある瞬間の構造情報を得ることができる。またここでは詳しくふれなかったが、キレート剤自体を共有結合でタンパク質に結合させることにより、タンパク質の特定部位近傍にだけラジカルによる切断を起こすことができる⁸⁾。切断の対象となるのはタンパク質に限らないため、たとえばDNAやRNA上の相互作用領域のマッピングにも利用できる。これは化学的クロスリンク実験にわかるものとして注目される。

文 献

- 1) Heyduk, T. and Heyduk, E. (1994) *Biochemistry* **33**, 9643-9650
- 2) Greiner, D. P., Hughes, K. A., Gunasekera, A. H. and Meares, C. F. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 71-75.
- 3) Heyduk, T., Heyduk, E., Severinov, K., Tang, H. and Ebright, R. H. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 10162-10166.
- 4) Nagai, H. and Shimamoto, N. (1997) *Genes to Cells*, **2**, 725-734..
- 5) Hanai, R. and Wang, J. C. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 11904-11908.
- 6) Li, B. L., Langer, J. A., Schwartz, B. and Pestka, S. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 558-562.
- 7) Schagger, H. and von Jagow, G. (1987) *Anal. Biochem.* **166**, 368-379.
- 8) Greiner, D. P., Miyake, R., Moran, J. K., Jones, A. D., Negishi, T., Ishihama, A. and Meares, C. F. (1997) *Bioconjugate Chem.* **8**, 44-48.