総説と解説

NMR 法によるタンパク質の高次構造研究

稲垣 冬彦

東京都臨床医学総合研究所 生理活性物質研究部門
東京都文京区本駒込 3-18-22

(1993 年 9 月 20 日受理)

NMR Studies on Protein Structures

Fuyuhiko INAGAKI

Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science,
3-18-22, Honkomagome, Bunkyo-ku, Tokyo 113 Japan

(Received September 20, 1993)

1. はじめに

現代生物学の目的の一つは細胞の成長や分化を、関与するタンパク質相互の分子認識過程として捉えることである。細胞内で重要な機能を果たしている微量なタンパク質のクローニングが行われ、タンパク質の大量調製の道が開かれた事、アミノ酸配列の相同性ではなく、立体構造に基づいてタンパク質の機能を理解しようとする機運が盛り上がってきたからである。タンパク質の立体構造解析には X 線結晶解析と並び NMR 法が重要な貢献をしている事は注目すべき点である。長い伝統を誇る X 線結晶構造解析と比べると NMR によるタンパク質の立体構造解析はこの 10 年ほどの間に確立してきた新しい方法であるが、NMR 法が生化学者や分子生物学者にとって重要な構造解析法の一つとなったことは疑い無い¹⁻²⁾。NMR 法はタンパク質の結晶化を必要としない点や溶液中のタンパク質の立体構造や運動性がわかるという大きなメリットを持っている。本稿ではこの新しい方法論の歴史的な発展に触れると共に、我々が行ってきたタンパク質の高次構造研究を題材として NMR 法によるタンパク質立体構造解析法の原理と現状について紹介したい。

2. NMR 法によるタンパク質の立体構造研究の歴史

タンパク質の立体構造がプロトン間の距離情報を用いて決定できることを初めて示したのはスイス連邦工科大学 (ETH) の Wüthrich 教授である。牛腓臓トリプシンインヒビター (BPTI) をモデルとして NMR 法による詳細な構造研究を行っていた。一次元 NMR 法を用いた核オーバーハウザー効果 (NOE) の測定など今では古典的となった方法を駆使した一連の研究の過程で、NOE より求められるプロトン間の短距離情報でも数多く集めることにより高次構造を決定できるという確信を抱いた。しかしタンパク質のようにシグナルの重なるの多い系では、これらのシグナルを分離し、帰属を行う一般的な方法論の確立が必要であった。幸いこの様な研究を始めた頃、同じ ETH の Ernst 教授 (パルス FT-NMR 法および二次元 NMR 法の開発で 1991 年度のノーベル化学賞授与) が二次元 NMR の理論面、実験面での検討を始めており、ここにチューリッヒグループの共同研究が始まった。新しい実験法の開発、解析方法そして構造計算法の開発等 NMR 法によるタンパク質の立体構造決定は Wüthrich 教授により築かれた物であり、

教授の個性が遺憾なく発揮されている。興味のある方は Wüthrich 教授の著書 “NMR of Proteins and Nucleic Acids” を参照されたい (この本は東京化学同人から訳がでている)³⁾。しかし NMR 法により水溶液に於けるタンパク質の立体構造を決定できるというアイディアはなかなか受け入れられなかった。一つの理由は溶液ではタンパク質は様々な構造を取るのではないかという素朴な疑問であり、二つ目は既に報告されていた BPTI の結晶構造を参考にしたからこそ立体構造決定を行なえたのであり、一般的な方法になりえないのではないかという批判であった。この様な疑問や批判はマックスプランク研究所の Huber 博士との共同研究により一掃された。二つのグループは立体構造未知のアミラーゼの阻害タンパク質、テンダミスタット (アミノ酸残基数 73) の構造を X 線結晶構造解析と NMR によりそれぞれ独立に決定した。これらの結果はお互いの結果を参照する事無しに J. Mol. Biol. の 1986 年 5 月 20 日号に並んで掲載された^{4,5)}。二つの構造は殆ど同じ構造であり、特に活性部位の構造は側鎖の配向を含めて一致していた。これらの構造比較の結果、タンパク質内部や疎水的クラスターを形成する部位では、側鎖の位置も含めて両者の構造は比較的良く似ていることがわかった。しかし溶液構造では N 末、C 末部分およびループの先端部分の構造については結晶構造と異なり決定されない。溶液ではこれらの部位はフレキシブルな構造を取るのに対し結晶では分子間相互作用や結晶のパッキングの影響を受けて一形に固定されたと考えるのが妥当のようである。このようにして高分解能の溶液構造が決定されて初めて結晶と溶液における立体構造の比較が可能となり、二つの状態

における立体構造の差異を議論できるようになった。テンダミスタットの研究は NMR 法が結晶構造解析とならんでタンパク質の立体構造解析の手法である事を示した点で意義深い仕事と言えよう。その後いくつかのタンパク質について NMR 構造と結晶構造の比較が行われたが、主鎖のトレースが間違っていた二三の結晶構造解析の例を除くと溶液と結晶状態でタンパク質はかなり良く似た構造を取っていることがわかってきた。しかし二つの構造解析法は相対立する方法として捉えるのではなく、むしろ相補的な手法として捉えることが必要である。結晶構造解析では分子全体のグローバルな構造を捉えるのが特異なのに対し、NMR 法ではむしろ主鎖のトレースを基礎にして分子全体を組み上げていく。従ってふたつの構造情報を組み合わせることにより、より迅速な構造解析が行うことができるはずである。による溶液におけるタンパク質の立体構造決定は重要な研究分野の一つとして着実に育って来ている。

3. NMR によるタンパク質構造解析の原理

図 1(a) に X 線結晶構造解析により明らかにされたエラプトキシン b (アミノ酸残基数 62) の構造を示す⁶⁾。エラプトキシン b は沖縄近海に生息するエラブウミヘビの毒腺に含まれている神経毒タンパク質であり、アセチルコリンレセプターに結合し、レセプターの機能をブロックすることにより筋肉の麻痺を起こす⁷⁾。従って毒蛇に咬まれると筋肉が麻痺し呼吸困難で死ぬ。エラプトキシン b は図 1(a) に示すように 3 本指のループ部分とそれを束ねるコアの部分から成っている。このコア部分には 4 本の SS 結合があり四つの SS 結合によってループ

図 1 結晶構造解析に基づいたエラプトキシン b の立体構造 (a) 重原子のみ, (b) プロトンのみを示している。黒丸のプロトンを中心として半径 5Å 以内に存在するプロトンをグレーで示す。

が束ねられた非常に扁平なディスク様の構造をとる。真中と右側のループの先端部分がアクティブサイトとして、アセチルコリンレセプターと結合すると考えられている。図 1(b) はプロトンを通してみたエラプトキシン b の構造である。NMR で見ているのはプロトンであるからこの様な世界を見ているといえる。プロトンは骨格原子に結合している事、この骨格は一次構造の配列に従って結合している。プロトン間の短距離情報と骨格原子が化学結合を通して結合しているという情報を使ってタンパク質の高次構造を作り上げていく。しかし NMR 法より得られる距離情報はたかだか $5\text{\AA}$ 程度の短距離情報である。あるプロトンを中心として半径 $5\text{\AA}$ の球を描くと一体どのくらいの数のプロトンが含まれるのであろうか。図 1(b) の黒丸で示したプロトンに注目すると、14, 15 個のプロトンが存在していること、隣のプロトンについても同じような状況であることがわかる。こういった球でタンパク質全体を覆いつくすことができるならば、短距離間の構造情報でも、 $30\text{\AA}$ とか $40\text{\AA}$ といった長距離にわたるタンパク質の高次構造決定が可能になるはずである。タンパク質の高次構造がわかっているときには高次構造をディスタンスマップという形で示すことができる⁹⁾。図 2 はエラプトキシンのディスタンスマップであり、縦軸、横軸は NMR 実験と対応させてそれぞれ 1 番から 62 番のアミノ酸残基に対応するプロトンが目盛ってある。プロトン対の距離が設定した敷居値以

下の場合に、対応する格子点を黒く塗っていく。そうすると、タンパク質の高次構造を 2 次元的に視覚化することができる。 $2\text{\AA}$ の敷居値ではほとんど何も出ていない (図 2(b))。メチレンプロトンしかこの敷居値を満足しないからである。しかし敷居値を $3\text{\AA}$ に設定すると、かなりの数の格子点が見れる (図 2(b))。 $4\text{\AA}$ (図 2(c))、 $5\text{\AA}$ (図 2(d)) と広げていくと塗りつぶされる格子点の数は多くなる。しかし格子点の作るパターンは $3\text{\AA}$ の時点で見られるものと変わりはない。このような考察から少なくともラフなフォールディングは、 $3\text{\AA}$ 程度の短距離な情報に既に現れていることがわかる。上の例ではタンパク質の立体構造がわかっていてディスタンスマップをつくったが、逆に、ディスタンスマップ (プロトン間の距離) よりプロトン相互の配置即ち立体構造を求められないかということになる。これが NMR 法に基づくタンパク質の立体構造決定である。この場合にはたくさんの構造情報を集めてやるが必要であり、NMR による高次構造決定の精密化は、なるべくたくさんの NOE 情報を集めることと同義である⁹⁾。距離情報が集まると、次にディスタンスジオメトリーという数学を使い、距離情報を満足する立体構造を組み立てる。我々は EXPLOR という構造計算のプログラムを用いて立体構造決定を行っている¹⁰⁾。計算方法の詳細については、日本生化学会編、新生化学実験講座、タンパク質 III、高次構造¹¹⁾を参照されたい。

4. 1 蛇神経毒タンパク質、エラプトキシン b および LSIII の構造決定

図 3 に日本電子製 600 MHz NMR 装置で測定したエラプトキシン b の NOESY スペクトルを示す。NOESY スペクトルの交差ピークは、対応するプロトンのペアが、大体 $5\text{\AA}$ 以下の距離に存在するときに観測される。プロトンの帰属 (測定方法については日本化学会編、実験化学講座 5 巻 NMR¹²⁾ を、帰属の詳細については生化学会編、新生化学実験講座、タンパク質 III、高次構造¹¹⁾を参照されたい) ができていれば、プロトン間の距離を NOESY シグナルの強度から算出することができる。アミドプロトンからの NOE の展開領域が通常解析に用いられるが、エラプトキシン b の場合には、この領域だけで 1,000 近いシグナルが観測される。これらのピークを間違いなく帰属していくためにも、質の高い立体構造解析を行うためにもコンピューターによる NOE ピークの帰属の自動化は必要となる。しかし NOESY 交差ピークは、図 3 のスペクトルに示すように数が多いばかりでなく、重なりもあるため、複数の NOESY ピ

図 2 結晶構造に基づいて計算したエラプトキシンの b プロトンについて求めたディスタンスマップ。(a) 敷居値を $2\text{\AA}$ (b) $3\text{\AA}$, (c) $4\text{\AA}$, (d) $5\text{\AA}$ に設定

図3 エラプトキシン b の構造解析に用いた NOESY スペクトル. 混合時間は 75 ms に設定している. 実線で囲まれたアミド, アリファティックプロトンの交差領域および点線で囲まれたアリファティックプロトン相互の領域の NOESY ピークを計算に用いた.

図4 自動構造解析のためのプログラムの流れ図

ークの帰属の可能性が出てくる. 複数の帰属の中から, 正しい帰属を選び出すプロセスを自動的に行うこと, そしてかつ短時間に客観的に立体構造決定を進めていくアルゴリズムの開発が必要となる. 図4は我々が用いている自動構造解析のためのプログラムの流れ図を示している. 一義的に帰属のついた NOESY ピークと, 二次構造の情報を入れて, 最初のラフな構造を作り上げる. 前述したように, NOESY ピークの数が少ない場合でも, 正しい NOE の情報が得られていれば, 正しいフォルディングを持った構造を作ることができる. したがって, 始めにこのようなラフな構造をつくり, さらにこのラフな構造に合うような NOE のセットをたくさんの候補者の中から選び出す. このようなサイクルを繰り返すことにより最終的に NOE の帰属と構造決定が完了する. エ

ラプトキシン b について計算の過程を示したのが図5である. 一義的に帰属のついた NOE 83 個と二次構造情報を初期情報として, 10 個の構造を計算すると主鎖のトポロジーが同じものが得られる. この中から距離情報をよく満たしている上位四個の構造を選び, これらの構造をもとにして正しい NOE セットを選ぶ.

この様にして最初の構造を満足するような帰属を確立する. この過程で 266 個のピークを一義的に帰属することができた. つぎにこれら帰属のついたピークも含めて2回目の計算を行いあらたな帰属を確立する. このサイクルを繰り返してほぼ全てのピークの帰属を確立した. 帰属の確立した全ての NOE ピークを用い, ランダムな初期構造 50 個から始め, 最終的に得られた構造のうち 14 個の構造を重ね書きしたのが図6である. 平均構造

図5 エラプトキシン b の構造計算の精密化の計算過程 A. 83 個の NOESY 交差ピークおよび二次構造を入力データとして求めたエラプトキシン b の構造. B. A に基づき, 一義的に帰属のついた 266 個の NOE ピークを加えて計算した構造. C. B の構造に基づき, 一義的に帰属のついた 176 個の NOE を加えて計算した構造. D. C の構造に基づき, 一義的に帰属のついた NOE ピーク 151 を加えて計算した構造. 10 個の計算結果のうち収束のよい4つの構造を示している.

図 6 最終的に帰属のついた NOE ピーク 676 個を用い、50 個のランダム構造より始めて計算したエラプトキシン b の立体構造。14 個の構造を重ねている。

図 7 側鎖を含めたエラプトキシン b の構造。構造のよく定義された疎水的クラスターと周辺の構造が決まらない領域よりなる。

からのずれを RMSD として表すと、RMSD の値は主鎖について $0.5\text{\AA}$ 、側鎖の重原子についてみると、 $1.0\text{\AA}$ となる。側鎖も含めて示したのが図 7 である。構造の精密化がすすむと、側鎖の位置も良く定義されるようになる。特に疎水性残基はクラスターを形成する。このクラスター内部ではチロシン、トリプトファン、イソロイシンの側鎖の位置を明確に定義できる。しかしながら周辺部位、例えばループの先端部分というのは、側鎖の位置を定義できないところが出てくる。これは、この部分については NOE が少ないということである。NOE が得られない理由としては、一つには、周辺部分はプロトンの密度が少ないこと、もう一つは、周辺部位が非常にフ

レキシブルで、NOE の強度が弱くなり、観測される NOE の数が少なくなるという二つの可能性がある。溶液におけるタンパク質の構造の特徴は、構造が比較的良く定義できる疎水性クラスターと、定義できない周辺部とに区別できる点である。エラプトキシン b の溶液構造は大体 X 線結晶構造解析で $2.5\text{\AA}$ 程度の分解能に匹敵する構造である。エラプトキシン b については Low 等により $1.4\text{\AA}$ の結晶構造が報告されており⁹⁾、溶液と結晶構造の比較を行うには適した系といえる。溶液構造（平均構造）と結晶構造の RMSD は $1.3\text{\AA}$ であり、分子全体としては良く似た構造をとることがわかる。しかし第三番目のループについては顕著な構造上の差異が見いだされた。結晶構造では第三番目のループの内部には大きなクレフトが存在する。このクレフトはアセチルコリンレセプターの機能発現に重要な役割を果たしている Trp 残基の結合部位として示唆されてきたが⁶⁾、溶液構造では Val 46 の側鎖がその間隙を満たし、Leu 52, Ile 50 の側鎖とともに疎水的クラスターを形成し、クレフトは存在しないことがわかる。各残基について溶液構造の RMSD と結晶構造の B 因子の比較を行うと、溶液構造ではループ部分の RMSD はいずれも $1\text{\AA}$ 程度であるが、B 因子は第 3 ループについては顕著に大きな値を取ることがわかる。B 因子の大きな領域は運動性あるいは構造上の乱れの存在する部位と考えられる。実際第三ループは分子間の接触が見られる部位である。最近結晶構造の再検討がなされたが、第三ループは二つのコンフォメーションを取る可能性が報告されている¹³⁾。

溶液構造と結晶構造で構造上の差異が見いだされたもう一つの部位は第一ループである。我々は NMR 実験より His 6 が ① 埋もれていること、② Phe 4 の近傍に存在すること、③ タンパク質全体が酸変性して初めてプロトン化するなど異常な挙動をすることを報告してきた^{14,15)}。実際、溶液中では結晶構造よりも His 6 のイミダゾール環は Phe 4 の芳香環と近接していること、さらに His 6 に近接して Arg 39 のグアデニノ基が存在することがわかった。このような His 6 の存在環境は上記の異常な挙動をよく説明している。

蛇神経毒タンパク質にはエラプトキシン b の様にアミノ酸残基数 62 よりなる短鎖神経毒タンパク質とそれより長い長鎖神経毒タンパク質がある。長鎖神経毒タンパク質のもう一つの特徴はセンターループの先に 5 番目の S-S 結合が存在する点である。我々は長鎖神経毒タンパク質である LSIII についてエラプトキシン b の場合と同じ構造解析システムを用いて立体構造を決定した。主鎖および全重原子の RMSD としてそれぞれ $0.5, 0.9\text{\AA}$

図 8 長鎖神経毒タンパク質 LSIII の立体構造。

を得た (図 8)。エラプトキシン b 同様三本のループが根元の 4 本の S-S 結合で束ねられた構造である。第一ループが短くなったかわりにテール部分が伸び、背後から中央ループを支えている。また 5 番目の S-S 結合を含む中央ループ先端部分の RMSD は大きい。RMSD の大きな部位に毒性発現に必要な残基が局在していることは神経毒タンパク質の機能を理解する上で興味深い。

5. ボンビキシンの高次構造決定

ボンビキシンはカイコの脳において産生されるインシュリン族のペプチドである。その主要分子種ボンビキシン II は、20 残基の A 鎖と 28 残基の B 鎖の二本鎖からなる分子である。 α ヘリックス含量が高く化学シフトの狭い範囲にアミドプロトンが集中するため、連鎖帰属は難航したが、NOESY スペクトルの解析システムそのものは 2 本鎖を扱えるように拡張した以外はほぼ問題なく動作した。最終的に得られた立体構造は主鎖の RMSD が A 鎖 (太線) で 0.7 Å, B 鎖 (細線) で 0.9 Å, 全体で 0.8 Å となった (図 9)。1 本のペプチド鎖はジスルフィド結合 (点線) による連結しているが、共有結合を会さない会合体のケースについても同じ方法で複合体全体の構造決定が行える。無脊椎動物のインシュリン族ペプチドとしては初めての構造決定例となるが、脊椎動物ではインシュリン、リラキシン、インシュリン様増殖因子 I について立体構造が報告されている。今回のボンビキシン II の溶液構造は A 鎖はインシュリンに、B 鎖はリラキシンに似ていることを示しており、交差活性のないこれら 3 種の分子の間の構造機能相関を議論するため

図 9 カイコのインシュリン族ペプチド、ボンビキシンの構造。A 鎖を太線、B 鎖を細線で示している。

の基礎を与えている。

6. フェレドキシンの高次構造決定

植物型フェレドキシンは $[2 \text{ Fe}-2 \text{ S}]$ クラスターを持つ鉄硫黄タンパク質である。既に 4 種の結晶構造が知られており、また一方で好熱性生物由来の $[2 \text{ F}-2 \text{ S}]$ 型フェレドキシンの一次配列は複数知られていて耐熱性の議論に用いられてきたが、まだ耐熱性タンパク質の立体構造は知られていない。そこで好熱性ラン色細菌 *S. elongatus* のフェレドキシン (97 残基) の構造決定を行った。1205 個の NOE より 925 個の距離制限が得られたが、常磁性の鉄硫黄センター近傍のシグナルはブロードニングを起こし、観測されなかった。しかしこの部分の残基は耐熱性而非耐熱性のフェレドキシンを通じてほぼ完璧に保存されており、熱安定性の議論には無関係である。そこで、この領域の 18 残基相互の位置関係については *Spirulina platensis* のフェレドキシンの結晶構造上でプロトン対の距離を計算し、5 Å 以下のもの 201 個を距離制限の上限として加え構造を計算した。20 個のランダム構造から出発して 10 個の構造を得た (図 10)。主鎖の RMSD は 0.6 Å であった。NOE からの距離制限だけ、結晶構造からの距離制限だけでの計算結果は 2 つの領域がほぼ独立に決定されていることを示している。得られた溶液構造を *S. platensis* の結晶構造と比較すると、51-58 残基目のセグメントと 83-89 残基目のセグメントの間で、静電的相互作用、疎水的相互作用が集中的に補強されていることから、この 2 本のセグメントとの間の相互作用が耐熱化の分子の基盤になっているとかがえられる。興味深いことにこの部分は *S. platensis*

図 10 フェレドキシンの構造. 鉄常磁性の影響のためシグナルが観測できなかった領域を点線で示す, NMR で構造決定を行った領域を実線で示す, 点線部分については *Spirulina platensis* の結晶構造に基づいて距離制限を計算し, ディスタンスジオメトリーの計算に加えた.

フェレドキシンの結晶構造では部分的に崩れていた部位とはほぼ一致する. おそらく非耐熱性のフェレドキシンではこの部位が構造上のウイークポイントとなっており, そのため結晶によってここが unzip した像が得られたものと考えられる.

以上4つのタンパク質について自動構造解析プログラムを用いた解析例についてのべた. いずれも高分解能の溶液構造が得られた.

7. 上皮成長因子 (EGF) とレセプターを介するシグナル伝達

EGF は細胞の増殖分化を促進するペプチドホルモンと考えられる. EGF を細胞に与えると, 細胞膜の形状の変化, DNA 合成の促進等増殖, 分化に関与する種々の細胞内のシステムが動き出す. このような一連の反応は細胞膜上の EGF レセプターに EGF が結合することにより誘起される¹⁰⁾. EGF の結合によりレセプター細胞質側ドメインのチロシンリン酸化酵素の活性が昂進され, 自分自身のチロシンをリン酸化すると同時に, 標的タンパク質をリン酸化する. リン酸化により標的タンパク質の酵素活性が変化すると同時に下流のタンパク質との相互作用を通してシグナルを伝達する. すなわちタンパク質相互の分子認識そのものがシグナル伝達と考えることができる. シグナル伝達の機構を明らかにしていくためには, 関与するタンパク質の高次構造および分子認識の機構そのものを調べる必要がある. ここでは, まず初めに上皮成長因子 (EGF), TGF α 等リガンドの立体構造について話を進めてみたい.

7.1 EGF および TGF α の立体構造

EGF は, 非常に結晶化しにくく, 現在でも X 線結晶構造解析のデータはなく NMR による立体構造が唯一である. 小さなタンパク質であるが, 細胞増殖, 分化に関連した種々の生理活性を持っている. 実際にこの分子の

図 11 NMR により決定した 10 個の EGF の立体構造の重ね合わせ (立体図). 主鎖のフォールディングを挿入図にて示す.

どこがセレプターへの結合面であるか構造活性相関の立場からも、興味深い。我々が NMR 法とディスタンスジェオメトリーを用いて決定した EGF の立体図と主鎖のトレースを図 11 に示す^{17,18)}。N 末側からヘリカルに降りてきて β シートをつくる。シートの端で β ターンをして、ダブルヘアピンループと言われる特徴的な構造を作り、C 端にいく。細長い構造をとること、N 端ドメイン、C 端ドメインとわかれた構造を取るために、N 端と C 端側ドメインの相対的な配置は決めにくい。しかし N 端、C 端ドメインをそれぞれ独立に構造をみると、全重原子について RMSD は $1.0\text{\AA}$ 程度であり、側鎖の配向を含めて構造は良く決っている。EGF の立体構造は β シート部分を手の平、N 端のヘリカルな部分を手の甲、C 端のダブルヘアピン部分を親指とする右手のミトンのような構造をしている。丁度ミトンが物を掴むように β シート部分とダブルヘアピン部分とでレセプターに

図 12 NMR 法により決定した EGF と $\text{TGF}\alpha$ の構造の重ね合わせ。 β シート部分とダブルヘアピン部分はよく似ている。細線が EGF, 太線が $\text{TGF}\alpha$ を示す。

図 13 EGF の結合による EGF レセプターの会合のスキーム。

結合していると考えられる。手の平、および親指部分を含むペプチド断片に対する抗体は EGF のレセプターへの結合を阻害したが、手の甲や手首に対する抗体には阻害活性は無かった¹⁸⁾。このような実験からミトンモデルの妥当性が支持される。実際 EGF はミトンの様な動きをしているのかもしれない。そしてこの様な動きが EGF のレセプターへの結合に必要なのかもしれない。

EGF は、一つの大きなファミリーを形成している分子である。EGF レセプターに結合し、EGF 活性を有するものとしては、TGF α があげられる。EGF とのアミノ酸の相同性から言うと、大体 40% ぐらいであるが、システイン初め構造形成に必要な残基が保存されている。TGF α 以外にもアンフィレギュリンも EGF レセプターに結合し、細胞増殖を引き起こす。そこでこのような一次構造上相同性の高いタンパク質が立体構造のうえでどのくらい相同性が高いかどうか調べる事は興味深い。この意味で TGF α の構造決定を行なった²⁰⁾。図 12 は EGF と TGF α の構造の重ね合わせを示している。細線が EGF、太線が TGF α である。シート部分と、ダブルヘアピンからなる親指部分は非常によく重ね合わせることができる。このように一次構造上 40% 程度のホモロジーであっても、システイン等重要な残基が保存されていれば、かなりよく似た構造をとり得ることがわかった。

7.2 EGF の結合による EGF レセプターの会合

EGF がレセプターに結合すると、EGF レセプターのチロシンリン酸化能が昂進する。チロシンリン酸化能の昂進は細胞の増殖、分化の最初のステップである。一体どのようにして、チロシンリン酸化能が昂進されるのであろうか。幾つかのモデルが出ているが、その一つに会合モデルというものがある。ここに示したのは、会合モデルによるレセプターのチロシンリン酸化能昂進の機構である (図 13)。① EGF レセプターに EGF が結合するとレセプターの構造変化が誘起され、② 二量体を形成する。二量体を形成すると、分子間反応で、阻害剤としてチロシンキナーゼの活性部位に結合していたレセプター C 末端テールのチロシンのリン酸化を行なう。③ C 末端テールのチロシンがリン酸化されると、このリン酸化チロシンにレセプターの標的タンパク質が結合する。④ ついでレセプターのチロシンキナーゼの活性により標的タンパク質のチロシンがリン酸化される。⑤ リン酸化により標的タンパク質は活性化されるというモデルである。これがシュレジンジャーが提出した会合モデルである¹⁰⁾。EGF 刺激によるレセプターの会合が、ここで述べた一連の過程の契機となる。この点で EGF 結合

による会合の有無を調べることは重要な研究課題となる。これまで架橋試薬を用いた検討が行われてきたが、アーチファクトが多く研究者により異なる結果が報告されている。そこで NMR を使ってこの問題の検討を行った。我々は EGF レセプターそのものではなく EGF レセプターの細胞外ドメインを使って会合の有無を検討した。もしも、細胞外ドメインだけで、分子会合が起きるならば、細胞外から細胞内への特別なシグナル伝達のメカニズムを考える必要はない。ここではスピン拡散という NMR の方法を用いた。分子量が小さいと、スピン拡散が起こりにくいために、あるシグナルをラジオ波で照射しても、他のシグナルの強度は変化しない。ところが、分子量が大きくなると、このスピン拡散という現象は非常に起こりやすくなり、ラジオ波で特定のシグナルを照射すると、他のシグナル強度も弱くなるという現象が起こる。この現象は熱伝導と類似しており、分子量が大きいものほど、熱伝導度はよく、分子量が小さいものは熱伝導度は悪いと考えればよい。即ち、ラジオ波で温めてやると分子量が大きいものほど熱が伝えられやすいことになる。図 14 は α プロトンの照射強度を変えると、メチルシグナルの強度が減少する様子を示したものである。このシグナルの減り方が分子量の目安を与える。EGF レセプター細胞外ドメインに EGF を加えると、面積強度の減り方は細胞外ドメインのみの場合と比較して同じ照射強度でも激しくなる。EGF レセプター

400 MHz ^1H NMR Spectra of sEGFR (0.1 mM, $^2\text{H}_2\text{O}$, 37°C, pH 7.1)

図 14 EGF レセプター細胞外ドメインのスピン拡散。 α プロトン領域をラジオ波で照射し、メチル領域のシグナルの減少を観測する。ラジオ波強度を大きくして行くとスピン拡散の効果によりシグナル強度は減少する。

に EGF を加えるとスピン拡散が起こり易い事, すなわち高分子量化しているということの直接的な証拠になる. 標準分子量のタンパク質を用いて同様の実験を行い標準曲線を求め, 分子量を見積ってみると EGF レセプターそのものは 160 キロダルトンぐらい. それが EGF を加えると大体 260 キロダルトンぐらいになるということがわかった. EGF の刺激によって, EGF レセプターは会合しダイマーを形成することがわかる. 会合モデルは妥当なものであることが, このような実験からも証明することができた.

7.3 PLC γ のサークホモロジー 3 の構造

最近, EGF レセプターの標的タンパク質が同定され, 共通にサークホモロジー 2 (SH2), サークホモロジー 3 (SH3) という相同配列を持っていることが明らかにされた²¹⁾. SH2 に関しては, リン酸化チロシン, 例えば EGF レセプター場の場合には, レセプターのリン酸化された C 末端テールのチロシン残基を認識していることが明らかになった²²⁾. また SH3 は他の分子と相互作用してシグナルを下流のタンク質に伝える構造エレメントであることが示唆されている²³⁾. シグナル伝達に関与

図 15 NMR により求めた PLC γ の SH3 ドメインの二次構造. 観測された鎖間の NOE を矢印で示している. β 鎖の組合せを挿入図にて示す.

する種々のタンパク質を並べてみると、SH2, SH3 は必ずタンデムになって存在している。例えば PLC γ では、の活性に必要な部位の間に SH2-SH2-SH3 と挿入されている。我々は PLC γ の SH3 について、NMR 法により立体構造決定を行った²⁴⁾。

NMR 解析より求めた PLC γ の SH3 ドメインの二次構造は図 15 に示すように非常に β シートに富んでいる。興味深いことは N 末端と C 末端がシート構造を組む点で、SH3 は一つの構造モジュールとして存在することを示唆している。下流の標的タンパク質との相互作用を考えると、ドメインのみで相互作用できることは有利である。SH3 で保存されている残基を二次構造上に表示すると、ほとんどの保存残基が β シートの上に来る。この

図 16 PLC γ SH3 ドメインの立体構造のリボン表示。モルスクリプトを使用した。

図 17 シグナル伝達に関与していると考えられる三重鎖 β シート上端とループ部分を含む領域。Pro 55 はこの面に存在し、変異によりシグナル伝達能を失う。

β シートの形成は、特異的な構造をとるためには必要なものであるということがわかる。実際保存残基であるプロリン 55 を他の残基に変えると活性がなくなる。

図 16 に SH3 の立体構造を示すが、三つの β シートが互いに直交したバレル構造をとっている。特徴的な構造で、今までこのようなフォールディングというのは報告されていない。こういった一つの構造ユニットをうまく生体は利用していると考えられる。保存された残基のうち表面に存在する残基は下流の標的タンパク質と相互作用する可能性が高いと考えられる。この様な残基は $\beta 5$, $\beta 6$, $\beta 7$ と三重鎖の β シートの上端とループ部分に局在している。で作られる面を図 17 に示す。この面に含まれる保存残基をあげると、トリプトファン等芳香族残基やロイシンなどの疎水性残基が存在する。これらの疎水性残基に近接してグルタミン酸、アスパラギン酸が存在している。SH3 ドメインはプロリンに富んだペプ

チドと相互作用することが報告されている。今後は SH3 の結合ペプチドを探索し、結合実験を行い、SH3 とターゲットタンパク質の認識様式を明らかにしていきたい。

8. おわりに

NMR 法に基づく構造生物学はもともとヨーロッパで生まれた。多くの若手研究者が、チューリッヒやオックスフォード等有力な NMR 研究室で NMR を学び、そしてアメリカに渡っていった。現在この分野でアメリカは質、量共に圧倒的な研究力を誇っているが、大部分の研究はヨーロッパ出身の研究者によるといっても過言ではない。この様な若手研究者を中心として NMR は更に新しい発展を遂げている。Wüthrich 教授の作り上げた方法は分子量 1 万程度までの低分子量タンパク質にしか適用できなかった。従って NMR 法をさらに高分子

量タンパク質に適用するためにはなんらかのブレイクスルーが必要であった。これが安定同位体を用いた三次元 NMR の開発であった²⁵⁾。 ^{13}C , ^{15}N をタンパク質に導入し、新たに導入した核の化学シフトを用いてシグナルを分離する。この様にして事実上シグナルの重なりを取り除く事ができる。この様なアイディアはさらに四次元 NMR にも拡張され NMR 法の適用できる分子量の上限は 3 万程度まで引き上げられる可能性ができた²⁶⁾。現在の NMR は NMR の分野だけにとどまっているのではなく、安定同位体ラベルによるタンパク質の大量調製、NMR 測定技術およびコンピューターを用いた構造計算と学際的な研究へと発展している。この様な段階に達すると一研究室がカバーできる範囲を超えていることは明かである。欧米ではこの様な方向に沿って多くの学際的な研究機関が創設され、わが国でも通産省の主導のもとに蛋白質工学研究所が設立されている。

NMR 法にとってこの 10 年間は疾風怒濤の時代であった。そして多くの研究者の努力により立体構造の精密化の方法が検討され、 $2\text{\AA}$ 程度の分解能の結晶構造に匹敵する溶液構造の決定も可能になった。現在では NMR 法により決定されたタンパク質の立体構造が X 線結晶構造解析とならびプロテインデータバンクに登録されている。プロテインデータバンクは構造生物学の共通の資産であり、データの登録は科学の分野での重要な国際貢献である。我々の研究室でも上皮成長因子、サークホモロジー 3 (SH3) の座標を登録している。立体構造決定はアミノ酸配列決定とは比べものにならないほど労力と時間を要する仕事である。しかしこの様な地道な努力に基づいてこそタンパク質の機能の真の理解が可能となる。

謝 辞

本研究は当研究部門、畠中秀樹博士、神田大輔博士、岡美由紀修士 (早稲田大学理工学部)、永田宏次修士 (東京大学農学部) との共同研究の結果である。

エラプトキシン b, LSIII を提供して下さいました東北大学名誉教授田宮信雄先生、ボンビキシンについて御討議頂いた東京大学農学部教授鈴木昭恵先生、フェレドキシンについて御討議頂いた東京大学理学部教授加藤栄先生に御礼申し上げます

文 献

- 1) "Methods in Enzymology", ed. by N. J. Openheimer and T. L. James, Vol. 176, 177, Academic Press, New York (1989).
- 2) G. M. Clore and A. M. Gronenborn: *Annu. Rev. Biophys. Chem.* **20**, 29 (1991).
- 3) K. Wüthrich "NMR of Proteins and Nucleic Acids", John Wiley, New York (1986).
- 4) J. W. Pflugrath, W. Wiegand, and R. Huber: *J. Mol. Biol.*, **189**, 383 (1986).
- 5) A. D. Kline, W. Braun, and K. Wüthrich: *J. Mol. Biol.*, **189**, 337 (1986).
- 6) P. E. Bourne, A. Sato, P. W. R. Corfield, L. R. Rosen, S. Birken, and B. Low: *Eur. J. Biochem.*, **153**, 521 (1985).
- 7) T. Endo and N. Tamiya: *Pharmacol. Ther.* **34**, 403 (1987).
- 8) G. E. Schulz and R. H. Schirmer: *Principles of Protein Structure* Springer-Verlag, (1979).
- 9) G. W. Clore and A. M. Gronenborn: *Science*, **252**, 1390 (1991).
- 10) A. T. Brünger: *XPLOR Software Manual*, version 2.1, Yale University, New Haven, CT (1990).
- 11) 日本生化学会編, 新化学実験講座 1, "タンパク質 III, 高次構造" 105 東京化学同人 (1989).
- 12) 日本化学会編, 実験化学講座 5 "NMR", 269 丸善 (1991).
- 13) B. W. Low and W. R. Corfield: *Eur. J. Biochem.*, **161**, 579 (1986).
- 14) F. Inagaki, T. Miyazawa, H. Hori, and N. Tamiya: *Eur. J. Biochem.*, **433** (1978).
- 15) F. Inagaki, N. Tamiya, T. Miyazawa, and R. J. P. Williams: *Eur. J. Biochem.*, **118**, 621 (1981).
- 16) J. Schlessinger: *TIBS*, **13**, 443 (1988).
- 17) D. Kohda, N. Go, K. Hayashi, and F. Inagaki: *J. Biochem. (Tokyo)*, **103**, 741 (1988).
- 18) D. Kohda and F. Inagaki: *Biochem* **31**, 11928 (1992).
- 19) M. Katsuura, K. Kurosawa, M. Katoh, M. Inagaki, and S. Tanaka, in *Peptide Chemistry*, ed. T. Shiba, Protein Research Foundation, Osaka (1988).
- 20) D. Kohda, I. Shimada, T. Miyake, T. Fuwa, and F. Inagaki: *Biochemistry*, **28**, 953 (1989).
- 21) I. Sadowski, J. C. Stone, and T. Pawson: *Mol. Cell. Biol.*, **6**, 4396 (1986).
- 22) C. A. Koch, D. Anderson, M. F. Moran, C. Ellis, and T. Pawson: *Science*, **252**, 668 (1991).
- 23) A. Musacchio, T. Gibson, V. Lehto, and M. Saraste: *FEBS Lett.*, **307**, 55 (1992).
- 24) D. Kohda, H. Hatanaka, M. Odaka, V. Mandiyan, A. Ullrich, J. Schlessinger, and F. Inagaki: *Cell*, **72**, 953 (1993).
- 25) L. Kay, M. Ikura, R. Tschudin, and A. Bax: *J. Magn. Reson.*, **89**, 496 (1990).
- 26) L. Kay, G. M. Clore, A. Bax, and A. M. Gronenborn: *Science*, **249**, 411 (1990).