タンパク質の溶液構造

NMR と距離幾何法とによるアプローチ

伊倉 貞吉／郷 信広

Teikichi Ikura / Nobuhiro Gō, 京都大学理学部

タンパク質の立体構造決定

今から約 30 年前, M. Perutz と J. Kendrew はヘモグロビンとミオグロビンの立体構造を決定した。これが世界で最初に成し遂げられたタンパク質の立体構造決定であり, 彼らが用いた手段は X 線結晶解析法であった。以後今日までに X 線結晶解析法によって構造決定されたタンパク質の数は, 約 300 である。アミノ酸配列の決定されているタンパク質がすでに 1 万を越えていることに比して, この数は極めて小さい。もちろん実験方法および解析方法は, コンピュータの発達に伴い, 30 年間でずいぶん進歩してきた。しかし, 結晶解析にとっては決定的な意味をもつ, よい結晶を確実に得るための方法がないため, 30 年が経過した今日でも X 線結晶解析は決して容易な実験手段にはなっていない。

ところが最近 NMR で, 結晶化しなくても溶液状態のタンパク質の立体構造を X 線結晶解析法と同程度の解像度で決定し得ることがわかった。その最初の成功例は 1986 年 5 月に発表されたテンダミスタットの立体構造である¹⁾。これにより, 対象となりうるタンパク質分子の大きさに限界 (現在は, 分子量 1 万程度まで) があるものの, X 線結晶解析法に代わりうる実験手段として NMR が登場したことになる。以来, 世界各地で NMR によるタンパク質の構造決定

が猛烈な勢いで進められ, すでに 30 種類近くもの構造が決定されている。

1. NMR 法

NMR では測定する試料を強い磁場中に置いて測定する。分子を構成する原子の原子核がスピンのもっている場合には, それに付随する磁気モーメントが磁場に対して整列する。整列状態は量子化されており, 異なった整列状態間の遷移は, それぞれの状態のもつエネルギーの差に関係する共鳴周波数を持つ電磁波により引き起こすことができる。磁場中に置かれた分子は, 分子の構造に依存した反磁場を生じる。この反磁場は, 分子中の場所ごとに大きさが異なるので, 分子中の同一種類のスピンも, その存在する分子中の場所により異なる大きさの磁場を感じることであり, その結果共鳴周波数にずれを生じる。これを化学シフトという。そのため, たとえば同じ水素原子の共鳴吸収も, 多くの異なった一連の周波数で起こる。共鳴周波数の分離がよい場合には, 理想的には, 個々の共鳴吸収線は分子中の特定の原子に対応する。いったん, 観測されたスペクトルが各々対応する原子に帰属されれば NMR はタンパク質分子について多くの情報を与えてくれる。

NMR の情報の中で, タンパク質の構造決定に最も重要なものは NOE (nuclear Overhauser effect) に関するデータである。NOE が観測されるのは, 2 つの

Determination of Three-dimensional Structures of Proteins in Solution by NMR Experiment and Distance Geometry Calculation

伊倉貞吉 京都大学理学部化学教室量子化学研究室 (606 京都市左京区北白川追分町) 大学院修士課程 2 年 (写真左)

1987 年京大理学部卒。専門は生体高分子の物性理論。＜趣味＞アメリカンフットボール観戦, テニス, サイクリング

郷 信広 (同上) 教授, 理博 (写真右)

1961 年東大理学部物理学科卒, 1965 年東大大学院博士課程中退。東大助手, 九大理学部物理学科助教授を経て, 1987 年京大理学部教授。専門は理論化学, 生物物理学。

スピン（タンパク質の構造決定の場合には、普通プロトンを用いる）が空間的に近く（約4〜5Å以内）にある時である。したがって、NOEの観測により、どのプロトンとどのプロトンとが近接しているのか、という情報が得られる。ただし、この情報はプロトン間の距離の上限としてしか利用できない。

2. 距離幾何

一般に、与えられた距離関係を満足するように個々の点の相対配置を決定するという命題を距離幾何とよぶ。NMRによるタンパク質の構造決定においては、プロトン間の距離情報を満足するようなプロトンの相対配置を決定することに対応する。距離情報が十分な場合、鏡像対称なものを除けば構造は一意的に定まるはずである。しかし、NMRによる距離情報は質的にも量的にも不十分なのでさまざまな工夫が必要である。

近年のコンピュータの発達に伴い、さまざまな距離幾何法のアルゴリズムが考案され、そのいくつかは成功を収めている。しかし、いまだどのアルゴリズムも完全とはいえず、それぞれ大なり小なりの問題点を含んでいる。したがって、ここでは代表的な方法をその特長および問題点を明らかにしつつ紹介してゆきたい。

2-1. 計量行列 (metric matrix) 法²⁾

基本的には、与えられた距離の束縛条件を満たす点の配置をたいへんに高次元な空間内でまず実現しておく、次に、それらの点の高次元空間内での広がり方が最も大きい3つの方向を探し出し、それらの方向で決まる3次元空間に射影して点の位置を求める、といった方法である。実際には、各原子間の距離を成分とする距離行列 (distance matrix) から、分子の重心から各原子までのベクトルの内積を成分とする計量行列を生成し、この計量行列の対角化によって各原子の座標を得ている。筆者らは、はじめ G.M. Crippen が展開していたこの方法を改良し、グルカゴンというペプチドホルモンがミセルに結合した状態の立体構造の決定に用いた³⁾。ところが、これをタンパク質に適用しようとすると、膨大な計算時間を必要とする。この主な原因は、化学結合の結合長と結合角を計算の過程で標準値に合わせていかなければならないところにある。この問題に関しては、T.F. Havel⁴⁾、M.J. Sippl⁵⁾、G.M. Crippen⁶⁾ らにより計算の効率を上げる工夫がなされ、タンパク質にも適用できるようになっている。また、最近の研究⁷⁾で、計量行列法によって決定された構造には系統的なひずみが生じることが明らかになっている。

2-2. DADAS 法

計量行列法の限界を認識した筆者は全く新しい方法を開発した⁸⁾。この方法は、計算機内に生成された構造における原子間距離と、実験的に与えられた距離の制限情報との差を表わす目的関数 (target function) いわゆる誤差関数 (error function) を定義し、これを最適化することによって構造を決定しようとするものである。最初の NMR によるタンパク質の溶液構造の決定に用いられたのはこの方法である。

この方法の特長は2つある。

第1に、計算時間が飛躍的に向上していることである。これは次の2つの工夫による。ひとつは、化学結合の結合長、結合角を初めから標準値に固定しておく、独立変数として二面角を用いているので、変数の個数が極めて少ないことである (DADAS とは、二面角空間における距離解析法という意味の英語、Distance Analysis in Dihedral Angle Space の頭文字をとったものである)。もうひとつは、筆者らが発見した関数の1次微分的高速計算法^{9),10)}を利用しているので、通常、原子数の3乗に比例する計算が2乗ですむことである。この方法は扱う分子が大きくなるにつれ、その威力を発揮することになる。

第2に、局所的極小に落ち込みにくい。これは、目的関数自身を極小化の過程で変えて行くという可変目的関数法を利用しているからである。

しかし、局所的極小の問題は完全に排除されたわけではない。目的関数をどのように変えて行けば局所的極小に落ち込まずにすむのかというノウハウが確立していないからである。

2-3. 分子動力学的方法 (Restrained M.D.)

A.T. Brunger, G.M. Clore¹¹⁾ らによって開発され発展してきている方法である。DADAS法と同様に、距離の制限情報から誤差関数を定義する。それをポテンシャルエネルギーの一つに見立て、経験的な構造エネルギーに加えて分子動力学の計算を行うことにより構造を決定しようとするものである。

この方法の問題点は、一度局所的極小に落ち込むとそこから抜け出すことが難しいということにある。したがって、初期構造に何を用いるかが重要である。かつてはペプチド鎖を引き伸ばした構造が主であったようだが、現在では計量行列法の結果の利用が主流を占めている。

最近、M. Nilges¹²⁾ によりシミュレイテッド・アニーリング (simulated annealing) という方法が開発された。この方法は分子動力学の計算を、最初高温状態で、その後徐々に温度を下げながら行うことにより、また、経験的な構造エネルギーを簡便なもので置き換

図 1 メリチンの NOESY スペクトル (ミキシング時間は 150 ms)

えることにより (この結果, ポテンシャルエネルギーの形式は DADAS 法の目的関数の形式と類似したものになった), 局所的極小の問題を解決しようとしている。

3. メリチンの構造決定

筆者らは, 二次元 NMR より求まる距離の情報と DADAS 法とを用いて, 全重水素化ドデシルホスホコリン (DPC) ミセル中におけるメリチン (蜜蜂の毒の主成分であり, アミノ酸残基 26 個より成る塩基性ポリペプチドである。生体内ではリン脂質膜に直接作用し, 赤血球溶血などを引き起こすことが知られている) の構造を決定した^{13),14)}。

図 1 はスピン交換二次元 NMR スペクトル (NOESY, nuclear Overhauser effect spectroscopy) の一部である。各々のスペクトルの強度からプロトン間の距離の上限値を見積り, それを DADAS 法の入力データとして用いる。距離の上限値およびデータの個数を表 1 に示した。このように極めて粗くかつ少ない情報で構造を決定できるところに距離幾何法の有用性がある。NOE からの情報以外にも, ジスルフィド結合, 水素結合, カップリング定数などの情報が得られている場合には, それらを入力データとして用いることができる。

距離幾何法には常に局所的極小の問題がついてまわる。したがって, 結果として得られたひとつの構造を

表 1 距離の上限値 (Å) およびデータの個数

プロトン対 の 位 置	スペクトルの強度				データ の 個 数
	強	中強	中	弱	
残 基 内	2.5	3.0	3.5	4.0	68
隣接残基の主鎖	2.5	3.0	3.5	4.0	52
上 記 以 外	5.0	5.0	5.0	5.0	119

もって解とするのは危険である。そこでわれわれは初期構造を広くサンプリングすることによってこの問題に対処している。広くサンプリングされた多くの初期構造からはじめた計算が, 結果として狭い範囲に収束した時に, われわれはその構造範囲をもって解とする。筆者らはメリチンの計算において, 100 個のランダムな初期構造 (平均 RMSD: 10 Å) を用いて距離幾何法の計算を行った。結果として得られた構造のうち 5 個の構造を重ね合わせたものが図 2 である。平均 RMSD の値は 1.5 Å と, 極めてよい収束を示している。おおまかには, 2 本の α -ヘリックスが T11 と G12 で結合した構造をとっていることがわかる。詳しい解析の結果, W19, I20 においても標準的な α -ヘリックスからのひずみがあることが判明し, ミセルに結合した場合における構造に特徴的な様相が明らかになった。

4. 今後の動向

NMR の実験技術と距離幾何法のめざましい進歩に

図 2 NMR と DADAS 法によるメリチンの立体構造のステレオ図

より分子量 1 万以下のタンパク質の溶液構造決定は、今やルーチンワークになろうとしている。今後、NMR の実験技術、および距離幾何法がいかに発展していくか注目したい。

4-1. NMR の実験技術

タンパク質の溶液構造決定を可能にした 2 次元 NMR も分解能の点から構造決定可能なタンパク質の大きさに限界がある。最近、この限界を乗り越えようとする試みがいくつか成されている。安定同位体 (^{13}C , ^{15}N など) ラベル法^{15)~17)}、3 次元 NMR^{18),19)} などの実験技術、ハード面でのより強力な磁石と感度のよい分光器、解析化などの開発は日進月歩である。これらにより、分子量 2 万から 3 万程度のタンパク質の構造の決定が可能になると期待される。

4-2. 距離幾何法

最近、距離幾何法を NMR のスペクトルの帰属に利用する試みがいくつかのグループで行われ成果をあげている。筆者ら²⁰⁾は、距離幾何の結果を用いて不確実な NOE スペクトルの帰属を行い、それを新たに距離の制限情報に加えて計算するという操作を繰り返し、解析を進めている。また、T.L. James ら²¹⁾は、NOE スペクトルから距離を(上限だけでなく下限も)高い精度で求め、さらに立体構造から NOE ピークの強度を計算するためのプログラムを開発している。

1988 年 12 月に発表された、DADAS 法によりリファインされたテンダミスタットの構造は、X 線結晶解析の結果を凌いでいた²²⁾。

文 献

- 1) A.D. Kline, W. Braun, K. Wüthrich: *J. Mol. Biol.*, **189**, 377 (1986)
- 2) G.M. Crippen: *J. Comp. Phys.*, **24**, 96 (1977)
- 3) W. Braun, C. Bösch, L.R. Brown, N. Gö: *Biochimica et Biophysica Acta*, **667**, 377 (1981)
- 4) T.F. Havel, K. Wüthrich: *J. Mol. Biol.*, **182**, 281 (1985)
- 5) M.J. Sippl, H.A. Scheraga: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 2283 (1986)
- 6) G.M. Crippen: *J. Comp. Chem.*, **10**, 896 (1989)
- 7) G. Wagner, W. Braun, T.F. Havel, T. Shaumann, N. Gö, K. Wüthrich: *J. Mol. Biol.*, **196**, 611 (1987)
- 8) W. Braun, N. Gö: *J. Mol. Biol.*, **186**, 611 (1985)
- 9) T. Noguti, N. Gö: *J. Phys. Soc. Japan*, **52**, 3685 (1983)
- 10) H. Abe, W. Braun, T. Noguti, N. Gö: *Computers and Chemistry*, **8**, 239 (1984)
- 11) G.M. Clore, A.T. Brünger, M. Karplus, A.M. Gronenborn: *J. Mol. Biol.*, **191**, 523 (1986)
- 12) M. Nilges, G.M. Clore, A.M. Gronenborn: *FEBS Letters*, **229**, 317 (1988)
- 13) F. Inagaki, I. Shimada, K. Kawaguchi, M. Hirano, I. Terasawa, T. Ikura, N. Gö: *Biochemistry*, **28**, 5985 (1989)
- 14) T. Ikura, N. Gö, F. Inagaki: *Proteins*, **1989**, submitted
- 15) D. Marion, L.E. Kay, S.W. Sparks, D.A. Torchia, A. Bax: *J. Am. Chem. Soc.*, **111**, 1515 (1989)
- 16) B.J. Sotckman, M.D. Reilly, W.M. Westler, E.L. Ulrich, J.L. Markley: *Biochemistry*, **28**, 230 (1989)
- 17) H. Senn, B. Werner, B.A. Messerle, C. Weber, R. Traber, K. Wüthrich: *FEBS Letters*, **249**, 113 (1989)
- 18) H. Oschkinat, C. Griesinger, P.J. Kraulis, O.W. Sorensen, R.R. Ernst, A.M. Gronenborn, G.M. Clore: *Nature*, **332**, 374 (1988)
- 19) D. Marion, P.C. Driscoll, L.E. Kay, P.T. Wingfield, A. Bax, A.M. Gronenborn, G.M. Clore: *Biochemistry*, **28**, 6150 (1989)
- 20) 伊倉貞吉, 郷 信広, 神田大輔, 稲垣冬彦: 日本生物物理学会, 第 26 回年会講演予稿集, **28**, S62 (1988)
- 21) B.A. Borgias, T.L. James: *J. Magn. Reson.*, **79**, 493 (1988)
- 22) A.D. Kline, W. Braun, K. Wüthrich: *J. Mol. Biol.*, **204**, 675 (1988)