COMMENTARY

質量分析法を用いた巨大タンパク質複合体の H/D 交換の研究

H/D Exchange Study of Macro-Protein Complexes by Mass Spectrometry

山本竜也^{1*, §}・月向邦彦²Tatsuya YAMAMOTO^{1*, §} and Kunihiro GEKKO²¹ 広島大学量子生命科学プロジェクト研究センター Center for Quantum Life Sciences, Hiroshima University, Higashi-Hiroshima, HIROSHIMA, JAPAN² 広島大学大学院理学研究科数理分子生命理学専攻 Department of Mathematical and Life Sciences, Graduate School of Science, Hiroshima University, Higashi-Hiroshima, HIROSHIMA, JAPAN

The 70S ribosome of *Escherichia coli*, which plays a central role in peptide synthesis in cells, is a super-macro complex (2.7 MDa) comprising three RNA molecules and more than 50 proteins. We succeeded in measuring the hydrogen/deuterium exchange of 55 ribosomal proteins by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. The results revealed the structural flexibility and solvent accessibility of individual proteins, and provided useful information on the structure–flexibility–function relationships of 70S ribosome.

(Received February 2, 2007; Accepted February 22, 2007)

1. はじめに

ポストゲノムの研究としてタンパク質の構造と機能の関係が重要であり、その解明のため構造生物学が世界規模で大きく発展してきた。日本においても“タンパク 3000 プロジェクト”を中心に、X 線結晶構造解析や nuclear magnetic resonance (NMR) により、多くのタンパク質の原子座標が決定されてきた。しかし、これらの静的構造だけではタンパク質の機能を正確に理解し予測することは難しく、構造と機能の研究も一つの転換期を迎えている。タンパク質が機能を発現するためには柔軟性（揺らぎ）をもったダイナミックな構造でなくてはならず、普段は構造をもたないフレキシブルな領域が機能にかかわっている場合もあり、タンパク質の構造・揺らぎ・機能相関の研究が重要な課題となってきた。その中でも、生命現象において重要な働きを果たしている数百 kDa～数 MDa の巨大分子や複合体に対しては、結晶化やケミカルシフトの同定が困難なため構造すら決定することが難しく、それらの構造・

揺らぎ・機能相関は実験・理論両面から未開拓な研究領域として残されている。ここでは、質量分析法による巨大タンパク質複合体の揺らぎの研究例として、マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析計 (matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry: MALDI-TOF MS) を用いてリボソームの H/D 交換を測定した筆者らの研究を中心に紹介する。

2. 巨大タンパク質複合体の H/D 交換測定

質量分析法による H/D 交換測定は、タンパク質を重水中に移したときに主鎖のアミドプロトンが重水素に交換する速度や量を質量経時変化から算出し、溶媒露出度や揺らぎの大きさを定量的に扱う研究手法である¹⁾。筆者らは以前に H/D 交換とペプシン消化を組み合わせることで、比較的小さな単量体タンパク質であるジヒドロ葉酸還元酵素 (18 kDa) のフラグメント特異的な揺らぎを特定し、構造・揺らぎ・機能相関について重要な知見を得ることに成功した²⁾。巨大タンパク質複合体に対しても、ほぼ同じプロトコルで実験を行うことができる³⁾。まず、サンプル溶液と過剰量の重水を混合することで H/D 交換を開始し (15°C, pH 7)、一定時間ごとに反応液の一部を取り出して温度と pH を下げることで反応をクエンチする (0°C, pH 2.6)。クエンチされた溶液は液体窒素により瞬間凍結することで一時保存され、測定直前に解凍し質量分析計にて測定される。エレクトロスプレーイオン化 (electrospray ionization: ESI) と MALDI の両方法でイオン化が可能であるが、質量の再現性や誤差を考慮すると ESI でイオン化するほうが優れており、同時測定するタンパク質数が多い場合

* Correspondence to: Tatsuya YAMAMOTO, Center for Quantum Life Sciences, Hiroshima University, Kagamiyama 1-3-1, Higashi-Hiroshima 739-8530, JAPAN

山本竜也, 広島大学量子生命科学プロジェクト研究センター, 〒739-8530 広島県東広島市鏡山 1-3-1 総合研究実験棟 701 号

§ Present address: Biometal Science Laboratory, RIKEN Spring-8 Center, Harima Institute, 1-1-1 Kouto, Sayo, Hyogo 679-5148, JAPAN, e-mail: tyamamoto@spring8.or.jp
現連絡先: 理化学研究所播磨研究所放射光科学総合研究センター城生体金属科学研究室, 〒679-5148 兵庫県佐用郡佐用町光都 1-1-1

は MALDI のほうが解析に適している。

3. 質量分析法によるリボソームの H/D 交換測定

大腸菌由来の 70S リボソームは、一つの RNA 分子に 22 種類のタンパク質（以後“S1, S2, …”とラベルされたタンパク質）が非共有結合した 30S と、2 種類の RNA 分子に 34 種類のタンパク質（以後“L1, L2, …”とラベルされたタンパク質）が非共有結合した 50S の二つのサブユニットからなる超巨大複合体 (2.7 MDa) である。2000 年以降、高熱菌由来のリボソームを中心として X 線結晶解析により続々と原子座標が決定され^{4)~7)}、近年はクライオ電子顕微鏡との組み合わせで新たな知見が次々と得られているが^{8), 9)}、溶液中での揺らぎの情報を直接的に得る方法はこれまでなかった。そこで、筆者らは MALDI-TOF MS を用いて H/D 交換測定を行うことにより、リボソームの揺らぎをタンパク質ごとに解析することを試みた。

まず、Arnold と Reilly らの研究¹⁰⁾とゲノム配列を基にスペクトル上のピークの同定を行い、56 種類のタンパク質のうち 55 種類の情報をすべて一つのスペクトル上に記述することに成功した (Fig. 1)。

その同定結果を基に H/D 交換を 200 分間行った。得られた質量経時変化 (Fig. 2) は二つのフェーズをもつ一次反

Fig. 1. Mass spectrum of 70S ribosome in water. The peak for S1 protein is expanded 100-fold because of its low intensity. [Modified from ref. 3.]

Fig. 2. H/D-exchange time courses of S12, L31, S13, L11, S3, and S7. [Modified from ref. 3.]

応として解析可能で、

$$D_t = D_\infty - A_1 \exp(-k_{ex1}t) - A_2 \exp(-k_{ex2}t) \quad (1)$$

の式でフィッティングすることにより H/D 交換パラメーター、 D_∞ (交換飽和割合)、 A (各フェーズがもつ交換割合)、 k_{ex} (各フェーズの交換速度定数) を得た。ここで、 D_∞ は各タンパク質の交換可能なプロトンの割合を示しており、 D_∞ が小さければ硬い部分（ヘリックスや β シートなど）が多く存在する構造を、大きければ柔軟な（揺らいでいる）構造であることを示している。リボソームタンパク質の D_∞ は 0.48~0.92 に分布しており、0.7 程度の値をもつものが多い (Fig. 3)。Fig. 4 は X 線結晶構造上にそれらの D_∞ 値をモノトングラデーションで色づけした H/D 交換マップである。この図から、50S と 30S サブユニットいずれにおいても活性部位やリガンド結合部位が集中している上側のほうが、下側に比べよく交換していることがわかり、揺らぎと機能との間に相関があることが示唆される。リガンド結合タンパク質を中心にさらに詳細に考察すると、tRNA の導入口 (S12, L16, L25)、排出口 (L31, L33)、フレームシフト (S13) に関連するタンパク質や、伸長因子と相互作用するタンパク質 (L11) は、すべて D_∞ が 0.8 以上と高い値を示すのに対し、mRNA の導入口 (S3, S4, S5) や排出口 (S7, S11) に位置するタンパク質は平均的な値であった。これらのことから、リガンド結合に関与するタンパク質は基本的に柔軟な構造をしているが、guanosine triphosphate (GTP) の加水分解によりエネルギーを得ている mRNA の導入や排出に対しては、出入口のタンパク質が大きく揺らぐ必要はないことが推察される。ま

Fig. 3. Deuterium incorporation into ribosomal proteins, 50S (upper) and 30S (lower), at $t = \infty$. [Reprinted from ref. 3.]

Fig. 4. Deuterium incorporation map of 70S ribosomal proteins at $t=\infty$. [Modified from ref. 3.] Ribbons and spacefills show ribosomal RNAs and proteins, respectively (PDB ID: 1PNS and 1VOR).^{4), 5)}

た、リボソームが mRNA 上を進むときにそのラチェットモーションを制御していると考えられている L7 と L12 の D_{∞} 値は、それぞれ 0.90 と 0.91 と高く、これらのタンパク質は著しく大きく揺らいでいることがわかる。X 線構造解析でこれらの原子座標が決定できないのは、このような大きな揺らぎに起因するものと思われる。さらに、 D_{∞} の値がリボソーム構造の自己組織化による複合体形成過程と密接な関係にあることも見いだすことができた³⁾。

このように、MALDI-TOF MS により H/D 交換を測定することで、超巨大タンパク質複合体であるリボソームの揺らぎに関する情報を得ることが可能となった。これらの結果は、55 種類のタンパク質と 3 種類の RNA の相互作用を初めてアセンブリー状態でかつ経時的に解析した事例であり、巨大タンパク質複合体の構造・機能相関の研究にとって重要な知見を与えるものである。

4. 今後の展望

質量分析技術の飛躍的な発展により、巨大タンパク質複合体の溶液構造や揺らぎの研究が可能になってきた。Robinson らは 70S リボソームを複合体のまま ESI-MS で測定することに成功し¹¹⁾、Reilly らは、筆者らと類似のアプローチでタンパク質内アミンをアミジン化することにより、リボソームの溶媒露出度を求めている¹²⁾。筆者らは、

上述の研究と平行してカルボキシペプチダーゼを用いたアミノ酸残基レベルでの H/D 交換測定にも成功しており、巨大タンパク質複合体に対しても残基レベルで H/D 交換の解析が行える可能性がでてきた。これらの技術は、これまで未解明であった巨大タンパク質複合体の構造・揺らぎ・機能相関をアミノ酸残基レベルで明らかにし、生命現象の解明や医薬の開発など多くの分野に応用できるものと期待される。

謝 辞 最後に、実験指導をいただいた泉 俊輔助教 (広島大学大学院理学研究科) に感謝いたします。また、MALDI-TOF 質量分析計を使用させていただいた広島大学自然科学研究支援開発センター (N-BARD) に感謝いたします。

文 献

- 1) T. Yamamoto and K. Gekko, *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.*, **51**, 412 (2003).
- 2) T. Yamamoto, S. Izumi, and K. Gekko, *J. Biochem.*, **135**, 17 (2004).
- 3) T. Yamamoto, S. Izumi, and K. Gekko, *FEBS Lett.*, **580**, 3638 (2006).
- 4) A. Vila-Sanjurjo, B. S. Schuwirth, C. W. Hau, and J. H. Cate, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **11**, 1054 (2000).
- 5) A. Vila-Sanjurjo, W. K. Ridgeway, V. Seyman, W. Zhang, S. Santoso, K. Yu, and J. H. Cate, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 8682 (2003).
- 6) N. Ban, P. Nissen, J. Hansen, P. B. Moore, and T. A. Steitz, *Science*, **289**, 905 (2000).
- 7) B. T. Wimberly, D. E. Brodersen, W. M. Clemons, Jr., R. J. Morgan-Warren, A. P. Carter, C. Vornrhein, T. Hartsch, and V. Ramakrishnan, *Nature*, **407**, 327 (2000).
- 8) H. Gao, J. Sengupta, M. Valle, A. Korostelev, N. Eswar, S. M. Staggs, P. Van Roey, R. K. Agrawal, S. C. Harvey, A. Sali, M. S. Chapman, and J. Frank, *Cell*, **108**, 557 (2003).
- 9) M. Diaconu, U. Kothe, F. Schlüzen, N. Fischer, J. M. Harms, A. G. Tonevitsky, H. Stark, M. V. Rodnina, and M. C. Wahl, *Cell*, **121**, 991 (2005).
- 10) R. J. Arnold and J. P. Reilly, *Anal. Biochem.*, **269**, 105 (1999).
- 11) A. A. Rostom, P. Fucini, D. R. Benjamin, R. Juenemann, K. H. Nierhaus, F. U. Hartl, C. M. Dobson, and C. V. Robinson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 5185 (2000).
- 12) R. L. Beardsley, W. E. Running, and J. P. Reilly, *J. Proteome Res.*, **5**, 2935 (2006).

Keywords: 70S ribosome, MALDI mass spectrometry, H/D exchange, Structure–flexibility–function relationship