

学位論文題名

Novel Protein Structure Information From Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy : the Use of ^{15}N Chemical Shift, ^1H - ^{15}N Dipolar Couplings, and ^{15}N Relaxation Times

(NMR から得られるタンパクの新規構造情報： ^{15}N 化学シフト、 ^1H - ^{15}N 双極子カップリング、および ^{15}N 緩和時間の利用)

学位論文内容の要旨

1. 背景

NMR によるタンパクの立体構造解析には、約 5 Å 以内で近接している水素ペアの情報(NOE)が従来から用いられてきた。しかし長距離の情報を得ることができないため、離れた位置にある分子やドメイン間の相対配置・配向に関する知見を得ることができない。そこで NOE を補足する立体構造情報として、NMR から得られる各種異方性パラメーターに着目した。 ^{15}N 化学シフト、 ^1H - ^{15}N 双極子カップリング、残余 ^1H - ^{15}N 双極子カップリング、および ^{15}N 緩和時間であり、これらはすべて、ペプチドアミド NH ボンドベクトルの、ある参照軸に対する角度情報を含み、したがって距離に制限されないという利点を持つ。

今回は、(1)ウナギカルシトニンが細胞膜と相互作用するときの膜に対する配向、および(2)フィブロネクチンコラーゲン結合ドメインの $^6\text{F1}$ / $^1\text{F2}$ モジュールペアの $^6\text{F1}$ と $^1\text{F2}$ のモジュール間相対配向の決定に用いることを検討した。ただし、角度情報は NH ボンドの配向に関して、軸対称な拘束条件しか与えないため、精度の良い構造決定が出来ないという問題があった。本問題は、複数の角度情報を得て、同時に拘束条件として用いることによって克服することを試みた。

2-1. 結果 (カルシトニン)

カルシトニン (CT) は、32 アミノ酸残基からなり、血清カルシウムの恒常性を保つホルモン群の一種である。破骨細胞膜表面受容体に結合し骨吸収抑制作用を発揮することで、血中カルシウム濃度を低下させる。そのため骨粗鬆症治療薬として広く用いられている。

われわれは、CT の活性をさらに向上させることを目的に、糖鎖による化学修飾を検討している。本学位論文では、糖鎖修飾が CT の細胞膜との相互作用に与える影響を解析した例を報告する。とくに両親媒性ヘリックスの細胞膜に対する配向性に焦点を当て、以下の 3 サンプルを比較した。a)CT (糖修飾されていないカルシトニン)、b) [Asn(GlcNAc) $_3$]-CT (Asn3 が GlcNAc で修飾：CT-GlcNAc)、および c)[Asn(Man $_6$ -GlcNAc $_2$) $_3$]-CT (Asn3 が M6 糖鎖で修飾：CT-M6)。なお

Leu12 のアミド窒素は ^{15}N で同位体標識した。細胞膜環境は、りん脂質を CT とともにガラスプレート上に配向させることで実現した。

これらを固体 NMR で測定した結果、いずれのサンプルにおいても 70ppm の化学シフト、および 10kHz の ^1H - ^{15}N 双極子カップリング値が得られた。これらの値は、NH ボンドベクトルが磁場に対して 90° の角度をなし、つまり磁場に垂直に挿入された細胞膜に対しては平行に存在することを示す。ヘリックスと NH ボンドの方向はほぼ同じであるため、ヘリックスが細胞膜面に対して平行に配向していると考えられる。また、糖鎖の影響が無いことも示している。このように異なる分子間 (CT とりん脂質) の相対配向を、化学シフトや双極子カップリングによって決定することが出来た。今後はレセプターと CT の相互作用に関する知見を得たい。

2-1. 結果 (フィブロネクチン $^6\text{F1}$ $^1\text{F2}$)

フィブロネクチンのコラーゲンと結合するドメインは $^6\text{F1}$ - $^1\text{F2}$ - $^2\text{F2}$ - $^7\text{F1}$ - $^8\text{F1}$ - $^9\text{F1}$ のように、6つのモジュールから構成される。コラーゲンとの結合様式を解明するためにはドメイン全体の形に関する知見が必要である。我々は、モジュールペアの NMR 解析により個々のモジュール間の相対配向を決定することで、全体像を組み立てるアプローチをとっている。しかし、モジュール間 NOE が数少なく、精度良い構造決定が困難である。そこで今回、 ^{15}N 緩和時間 (T_1/T_2)、および ^1H - ^{15}N 双極子カップリングを新たな構造情報として用いることを検討した。双極子カップリングは溶液中では、分子の速いランダムな運動のために平均化されてゼロとなる。そこで、分子の運動を抑制するために、磁場で配向する液晶を用いた (1,2-O-ditridecanyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine:DTDPC と 1,2-O-dihexyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine:DHOPC を 3/1 比で混合した 5%濃度水溶液)。液晶存在下ではタンパクの運動は抑制され、したがって双極子カップリングも完全には平均化されない (残余双極子カップリング:RDC-A の観測)。本学位論文においては、 $^6\text{F1}$ $^1\text{F2}$ モジュールペアのモジュール間相対配向の決定を述べる。

T_1/T_2 および RDC 値を、構造計算時に各残基の NH ボンドベクトルの角度拘束条件として用いた。その結果、 T_1/T_2 、RDC-A とともに、NOE のみで計算された構造よりもモジュール間配向の精度が向上した ($^1\text{F2}$ で重ね合わせたときの $^6\text{F1}$ の RMSD は、NOE : $7.3 \pm 3.1 \text{ \AA}$ 、 T_1/T_2 : $5.2 \pm 2.0 \text{ \AA}$ 、RDC-A : $4.5 \pm 2.1 \text{ \AA}$)。ただし、問題点も明らかになった。すなわち、 T_1/T_2 や RDC は参照軸に対して対照的な拘束しか与えないために、不確かさが大きい。この問題を克服することができれば、構造計算精度のさらなる向上が期待できる。

そこで複数の角度情報を組み合わせて計算に組み込むことを試みた。まず、バイセルに cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) を DTDPC に対して 1/30 モル加えて RDC 測定を行った。その結果、RDC-A とは異なるパターンを持つデータが得られた (RDC-B)。バイセルに導入された CTAB 由来のポジティブのチャージが、タンパク分子の配向性を変えたためである。それぞれ異なるタンパクの配向から得られた RDC-A と RDC-B を同時に構造計算に組み込んだ結果、さらなる精度の向上が見られた (RMSD : $3.2 \pm 1.2 \text{ \AA}$)。さらには RDC-A、RDC-B および T_1/T_2 の 3つの拘束条件を同時に用いた結果、NOE のみを用いた場合に比して 3 倍の精度向上が達成できた (RMSD : $2.6 \pm 0.9 \text{ \AA}$)。

このように複数の角度情報を同時に用いることによって精度の高いモジュール配向の決定が出来た。今後コラーゲン結合ドメイン全体の立体構造決定に応用したい。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 稲 垣 冬 彦
副 査 教 授 加 茂 直 樹
副 査 助 教 授 宮 内 正 二
副 査 助 教 授 森 岡 弘 志

学位論文題名

Novel Protein Structure Information From Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy : the Use of ^{15}N Chemical Shift, ^1H - ^{15}N Dipolar Couplings, and ^{15}N Relaxation Times

(NMR から得られるタンパクの新規構造情報： ^{15}N 化学シフト、 ^1H - ^{15}N 双極子カップリング、および ^{15}N 緩和時間の利用)

マルチドメインからなる蛋白質は細胞外マトリックスや細胞内シグナル伝達蛋白質に多く見られる。機能ドメイン間の協調的な相互作用を通して多種多様な機能を発現していると考えられている。このような蛋白質の機能を理解するためには、ドメインの構造を決定することとならんで、ドメイン間の相対配置を決定することが重要となる。X線結晶構造解析では、クリスタルパッキングの影響が現れやすく、溶液状態での構造を直接決定できるNMR法が重要な意義を持つ。しかし、NOEの解析を中心とした従来のNMR法では、ドメイン間に観測されるNOEの数が少ないため、二つのドメインの相対配置を決定することは通常できない。従って、この問題の解決にはNOEに代わる新しい方法論を確立することが望まれてきた。

申請者は、NIHのBax等により検討された蛋白質の非等方性回転に基づく緩和効果、および液晶による残余双極子効果より得られる遠距離構造情報を利用して、フィブロネクチンのコラーゲン結合部位に含まれる $^1\text{F1}^1\text{F2}$ の二つのドメインの相対配置を精度良く決定することを試みた。まず、蛋白質の非等方性回転より得られる構造情報について簡単に説明し、ついで申請者の創意点について述べる。

(1)蛋白質は回転楕円体で近似され、長軸、短軸周りの回転拡散の速度は異なる。従って、長軸方向に沿ったNHベクトル(NからHへの結合ベクトル)と短軸方向に沿ったNHベクトルでは双極子緩和の効果は異なる。すなわち、緩和時間の解析より、回転拡散テンソルの主軸に対するNHベクトルの配向を明らかにすることが可能である。(2)磁場方向に配向した希薄な液晶(ディスク状の形状を持つ)中に蛋白質を置くと、蛋白質は形状に応じて配向する。この結

果、通常の NMR 測定では平均化されゼロになる双極子結合が観測される。この残余双極子結合の大きさは、配向テンソルの主軸と NH ベクトルとの配向に依存する。NOE が近距離情報しか与えないのに対し、テンソルの主軸と NH ベクトル間の配向情報は遠距離的な構造情報でもあり、ドメイン間の相対配置を決定するために有効な構造情報となる。

これらの方法論を $^1\text{F}1^1\text{F}2$ の構造解析に適用する過程で、申請者は種々の解析方法について検討を加えた。申請者の創意点を以下の 4 点にまとめる。(1) (1,2,-O-ditridecanyl-sn-glycero-3-phosphocholine) と DHOPC(1,2,-O-dihexyl-sn-glycero-3-phosphocholine) 3:1 の混合物は 30-35 度 C でディスク状の液晶を形成し磁場方向に整列することが知られているが、申請者は少量の正電荷をもつ CTAB (cetyltrimethylammonium bromide) を液晶中に加えると、CTAB の正電荷と蛋白質との静電相互作用により、蛋白質の配向が変わることを見出した。すなわち、CTAB の有無により配向テンソルの主軸方向を変えうることを示した。その結果、残余双極子結合の大きさが変化することを示した。(2) 緩和情報の解析より回転拡散テンソルの主軸を決定し、主軸にたいする NH ベクトルの配向を決定した。興味深いことに、拡散テンソルの主軸と配向テンソルの主軸は一致しない。CTAB 非存在下では液晶は負に荷電しており、静電相互作用のもとで蛋白質は安定な配向を取る可能性を示した。(3) 緩和情報、CTAB 有無による残余双極子情報はそれぞれ異なるテンソル主軸の配向をとる。したがって NH ベクトルの配向を決定する際には、これらは独立なデータとして扱えることを実験的に示した。そして、(4) NOE 情報、緩和効果、CTAB 有無の残余双極子効果を併せて用いることにより、 $^1\text{F}1^1\text{F}2$ のドメイン間の配向を精度良く決定することに成功した。

以上、申請者は、非等方性回転より得られる構造情報と NOE 情報を併用することにより、従来決定が困難であった二つのドメイン間の相対配置を精度良く決定するとともに、新しい実験方法を提出した。

申請者は上記の業績の他に、固体 NMR を用い、二重膜に結合した状態における、ウナギカルシトニンおよび糖鎖結合型ウナギカルシトニンの構造について検討した。いずれもヘリックス構造を取ることを、ヘリックス軸を膜面に平行にして結合していることを明らかにした。糖鎖結合型カルシトニンの高い生物活性は、糖鎖結合により構造が安定化されるためと結論した。

上記の研究成果は、マルチドメインより構成される蛋白質について、ドメイン間の配向を決定する新しい方法論を確立した点で重要な知見を与えた。博士(薬学)の学位を受けるに値する業績と評価した。