

学 位 論 文 題 名

NMR による高分子量タンパク質の 立体構造解析および分子間相互作用解析

－好中球活性酸素発生系を対象として－

学位論文内容の要旨

1. はじめに

NMR によるタンパク質の構造決定は、分子量が増大するにつれてシグナルの重なりや線幅の増大のため困難になる。一般的に、分子量が2万を超えると、 $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ ダブルラベル体を用いたルーチ的な手法による構造解析は適用できない。タンパク質の重水素化法は、NMR 解析の最初の段階である主鎖由来シグナルの帰属には有効であるが、プロトン間距離情報が減少するという構造決定に極めて不利な面も有する。近年、この重水素化法の利点を残しつつ、部位特異的にプロトンを残存させる様々なラベル化法が提案されてきている。このようなラベル化法が高分子量タンパク質の立体構造決定およびタンパク質間相互作用解析への有用性を検討することが、本研究の主要な目的である。

これらの目的を達成するため、研究対象として、好中球活性酸素発生系に係わるタンパク質に含まれる高分子量の機能ドメインを選んだ。微生物感染時の一次的な生体防御である好中球の食食作用においては、活性酸素が強力な殺菌剤として作用する。活性酸素の生成は食細胞 NADPH オキシダーゼと呼ばれる酵素に依存し、その酵素活性はタンパク質間の相互作用を介した一連のシグナル伝達によって制御される。活性酸素生成までのカスケードの中で重要な役割を担う 24 kDa の TPR(Tetratricopeptide repeat)ドメイン、21 kDa の NB(NADPH binding)ドメインに焦点を当てて研究を進めた。

2. NMR 試料の調製および NMR シグナルの帰属

TPR および NB の両者に関して、最適な発現・精製条件を検討し、Val, Leu, Ile の側鎖メチル基を除いて均一に $^2\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ ラベルした試料(以後、 $\text{Me-}^1\text{H}$, $^2\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ ラベル体と略す)を調製した。各々の試料を利用し、後の全ての解析における基盤となる主鎖由来および側鎖メチル基由来 NMR シグナルの帰属を完了した。

3. TPR ドメインを対象とした効率的なグローバルフォールドの決定に向けての検討

高分子量タンパク質のグローバルフォールドを決定するために開発された様々な方法論は、その有効性が実証されつつあるが、20 kDa 以上のタンパク質に適応した例は限られている。そこで、 $\text{Me-}^1\text{H}$, $^2\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ ラベル化体を利用し、NMR 実験データのみに基づいた TPR のグローバルフォールドが決定ができるかどうか検討を行った。

$\text{Me-}^1\text{H}$, $^2\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ ラベル体の NOESY スペクトルの解析により、計 787 個の NOE を確認できた。他の NMR 実験のデータも利用し、熱力学的手法により構造計算を行った。主鎖 RMSD 約 3.4 Å まで

収束したが、まだ顕著に収束の悪い領域も見られた。得られた中間構造を解析した結果、Tyr 残基からの NOE が構造の精密化に最も効果があることが推測されたので、それらの NOE 情報を追加するため、Tyr を $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ 体で逆ラベルし、側鎖メチル基を $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ ラベルした重水素化試料を新たに調製した。プロトン化した芳香環を Tyr 残基に限定したことで、Tyr 芳香環の帰属が容易に完了し、NOE 総数は 1480 個まで増加した。収束に関しても、主鎖 RMSD は約 2.1 Å、二次構造領域に限定すると約 1.8 Å まで上昇し、十分な質のグローバルフォールドが決定できた。

4. TPR と Rac の相互作用に関する NMR を利用した解析

TPR は、低分子量 G タンパク質 Rac と相互作用することで、酵素の活性に重要な役割を担う。TPR-Rac 複合体および TPR 単体の結晶構造が明らかになったが、両者の局所的な立体構造の相違が生じた原因を明らかにすることで、活性化の機構に新たな知見が得られることが期待されたので、Me- ^1H , $^2\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ ラベル体を応用することに主眼を置き、TPR と Rac のタンパク質間相互作用の NMR 解析を行った。

Me- ^1H , $^2\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ ラベル体のメチル基を観測プローブとして利用し、相互作用界面を正確に反映する交差飽和実験を行った。交差飽和実験では、Rac との距離の近さの指標として、シグナル強度の減少が観測されるが、顕著な強度の減少を示した部位の分布は、結晶構造で示された TPR-Rac 相互作用界面に一致した。局所的な立体構造の相違が生じた領域に関して、Rac の結合による化学シフト変化が見られたが、交差飽和実験からは、Rac の近接が原因ではないことが明らかになった。したがって、Rac が結合することによって、相互作用界面から離れたこの領域に、局所的な構造変化が誘起されると推測された。

5. NB ドメインと NADPH の相互作用に関する NMR を用いた解析

NB はフラビンタンパク質の NADPH 結合ドメインと相溶性が非常に高く、NB と NADPH の相互作用を支持する実験的証拠も示されてきたが、実際に推定される NB の NADPH 結合部位に対して NADPH が直接結合していることを示した報告はない。そこで、NB ドメインの NADPH とのタンパク質—低分子リガンド間相互作用に関する解析を行った。

NADPH 添加による NB の化学シフト変化を観測すると、主に β シートの C 末端側およびその後のループ部位に大きな変化が観測され、他の NB-NADPH 複合体の結晶構造から推測される NADPH 結合領域の傾向と一致することが明らかになった。さらに、NOESY 実験より、NB が NADPH と直接結合していることを示す NOE が観測された。特に、今回用いた Me- ^1H , $^2\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ ラベル体由来の NOE シグナルは、主鎖アミド／側鎖メチル領域に限定されるので、明瞭に NADPH 由来の NOE を識別することが可能であった。

6. まとめ

- ・高分子量タンパク質のグローバルフォールド決定への新たなアプローチ法を示し、実際に、24 kDa の TPR ドメインの立体構造を NMR データをもとに決定した。
- ・メチル部位にプロトンを残存させた重水素化試料を利用し、分子量 45 kDa のタンパク質複合体における相互作用界面を交差飽和実験により決定した。
- ・メチル部位にプロトンを残存させた重水素化タンパク質とリガンドの結合を示す分子間距離情報が、容易に観測および識別できることを示した。
- ・TPR と Rac の相互作用によって、TPR に局所的な構造変化が誘起される可能性を示唆した。
- ・NB が、推測された NADPH 結合部位で、NADPH と直接相互作用することを明らかにした。

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

NMR による高分子量タンパク質の 立体構造解析および分子間相互作用解析

－好中球活性酸素発生系を対象として－

NMR によるタンパク質の構造決定は、分子量が増大するにつれてシグナルの重なりや線幅の増大のため困難になる。一般に、分子量が2万を超えると、 $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ ダブルラベル体を用いたルーチン的な手法による構造解析は適用できない。タンパク質の重水素化法は、NMR 解析の最初の段階である主鎖由来シグナルの帰属には有効であるが、プロトン間距離情報が減少するという構造決定に極めて不利な面も有する。近年、この重水素化法の利点を残しつつ、部位特異的にプロトンを残存させる様々なラベル化法が提案されてきている。このようなラベル化法の高分子量タンパク質の立体構造決定およびタンパク質間相互作用解析への有用性を検討することを、本研究の主要な目的としている。

これらの目的を達成するため、申請者は研究対象として、好中球活性酸素発生系に係わるタンパク質に含まれる高分子量の機能ドメインを選んだ。微生物感染時の一次的な生体防御である好中球の貪食作用においては、活性酸素が強力な殺菌剤として作用する。活性酸素の生成は食細胞 NADPH オキシダーゼと呼ばれる酵素に依存し、その酵素活性はタンパク質間の相互作用を介した一連のシグナル伝達によって制御される。活性酸素生成までのカスケードの中で重要な役割を担う 24 kDa の TPR(Tetratricopeptide repeat)ドメイン、21 kDa の NB(NADPH binding)ドメインに焦点を当てて研究を進めた。

高分子量タンパク質のグローバルフォールドを決定するために開発された様々な方法論は、その有効性が実証されつつあるが、20 kDa 以上のタンパク質に適応した例は限られている。そこで、 $\text{Me-}^1\text{H}$, $^2\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ ラベル化体を利用し、NMR 実験データのみに基づいた TPR のグローバルフォールドが決定ができるかどうか検討を行った。 $\text{Me-}^1\text{H}$, $^2\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ ラベル体の NOESY スペクトルの解析により、計 787 個の NOE を確認できた。他の NMR 実験のデータも利用し、熱力学的手法により構造計算を行った。主鎖 RMSD 約 3.4 Å まで

収束したが、まだ顕著に収束の悪い領域も見られた。得られた中間構造を解析した結果、Tyr 残基からの NOE が構造の精密化に最も効果があることが推測されたので、それらの NOE 情報を追加するため、Tyr を $^1\text{H}/^{12}\text{C}$ 体で逆ラベルし、側鎖メチル基を $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ ラベルした重水素化試料を新たに調製した。プロトン化した芳香環を Tyr 残基に限定したことで、Tyr 芳香環の帰属が容易に完了し、NOE 総数は 1480 個まで増加した。収束に関しても、主鎖 RMSD は約 2.1 Å、二次構造領域に限定すると約 1.8 Å まで上昇し、十分な質のグローバルフォールドが決定できた。なお、申請者が開発した方法により、4 万程度の蛋白質のグローバルフォールドを決定することが可能である。

ついで、申請者は $\text{Me-}^1\text{H}$, $^2\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ ラベル化体を TPR/Rac の複合体の構造解析に適用した。TPR は、低分子量 G タンパク質 Rac と相互作用することで、活性酸素発生に重要な役割を担う。TPR-Rac 複合体および TPR 単体の結晶構造が明らかになったが、両者の局所的な立体構造の相違が生じた原因を明らかにすることで、活性化の機構に新たな知見が得られることが期待されたので、 $\text{Me-}^1\text{H}$, $^2\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ ラベル体を応用することに主眼を置き、TPR と Rac のタンパク質間相互作用の NMR 解析を行った。特筆すべき点は、 $\text{Me-}^1\text{H}$, $^2\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ ラベル体のメチル基を観測プローブとして利用し、相互作用界面を正確に反映する交差飽和実験を行った点である。交差飽和実験では、Rac との距離の近さの指標として、シグナル強度の減少が観測されるが、顕著な強度の減少を示した部位の分布は、結晶構造で示された TPR-Rac 相互作用界面に一致した。局所的な立体構造の相違が生じた領域に関して、Rac の結合による化学シフト変化が見られたが、交差飽和実験からは、Rac の近接が原因ではないことが明らかになった。したがって、Rac 結合により、局所的な構造変化が誘起されることを明らかにした。

申請者は TPR ドメインを対象として、

- ① 高分子量蛋白質のグローバルフォールドを決定するための方法論を開発するとともに、TPR ドメインに適用し十分な精度でグローバルフォールドを決定した。
- ② Rac/TPR 複合体について交差緩和法を適用し、十分な精度で相互作用面を確定するとともに、メチル基が相互作用を調べる上で有効なプローブとなることを示した。
- ③ さらに、gp91phox の細胞質ドメインが NADPH 結合ドメインであることをはじめ NMR 法により明らかにした。

以上の業績は NMR 法による分子量の壁を打破するものであり、NMR 法を用いた高分子量蛋白質のグローバルフォールド決定の新たな方法論を提示した。また、蛋白質結合面を定量的に記述することを可能とした。以上の点で本論分は博士の学位に値する業績と評価する。