

学位論文題名

# NMR analyses of protein structure and interaction using the paramagnetic lanthanide tag

(常磁性ランタニドタグを用いた NMR による  
タンパク質の立体構造・相互作用の解析)

## 学位論文内容の要旨

タンパク質の立体構造解析手法として、X 線結晶解析法と NMR 法が広く用いられている。X 線結晶解析法は分子量の制約なく高精度での立体構造決定が可能であるが、結晶パッキングなどによるアーティファクトの影響を受ける可能性がある。一方 NMR 法は、より生体内に近い溶液状態での解析が可能であることや、弱い相互作用が解析可能であること、動的情報が得られることなどの利点が存在する。しかし NMR 法は、解析対象の分子量に対する制約があること、解析に長期間を要すること、などが難点となっている。このような問題点を解決する上で常磁性ランタニドプローブ法が有効である。常磁性ランタニドイオン (以下 Ln) をタンパク質に対して固定することで、擬接触シフト (PCS) や残余双極子カップリング (RDC)、常磁性緩和促進 (PRE) などの常磁性効果が観測され、そこからタンパク質の構造情報を得ることができる。PCS は Ln から約 40 Å 以内における距離・角度の情報、PRE は約 40 Å 以内における距離情報、RDC は距離の制限なく角度の情報を与える。このようにランタニドプローブ法は広範囲における定量的な立体構造情報を与えるため、高分子量タンパク質の構造解析において強力な手法となり得る。しかし、ランタニドプローブ法の応用のためには Ln をタンパク質に対して強固に固定する必要があるが、これまで有効な Ln 固定手法がなかったためにランタニドプローブ法はほとんど応用が進んでいなかった。

本研究では、ランタニド結合ペプチドを対象タンパク質に対して 2 点で強固に固定する新規ランタニド結合タグ (lanthanide binding tag: LBT) の開発を行った。次いでそのタグを用いて p62 PB1 ドメインの二量体構造決定を行い、手法の有用性の実証を試みた。さらに本研究ではランタニドプローブ法を応用し、新規 NMR リガンドスクリーニング手法の開発を行った。

### 1. ランタニド結合タグの開発

ランタニド結合ペプチドをタンパク質に 2 点で固定する新規 LBT を設計した。ペプチドタグをタンパク質の 2 点で固定する場合、タグが対象タンパク質に結合する方向をコントロールし、単一の生成物が得られるようにする必要がある。そこで、ジスルフィド結合とペプチド結合という 2 種の異なる結合によって LBT を目的タンパク質に付加する、以下の手法を考案した。(i)タンパク質表面にシステイン変異を導入し、LBT 配列を N 末端に融合したコンストラクトを作成する。

(ii) TEV protease 消化により LBT の N 末端システインを露出させる。 (iii) DTNB 酸化により LBT N 末端とタンパク質表面のシステインを分子内ジスルフィド結合によって架橋する。

本研究ではモデルタンパク質 GB1 を用い、LBT を 2 点で固定した L2GB を作成した。また、従来法に従って LBT をジスルフィド結合 1 点のみで固定した L1GB を作成した。L1GB と L2GB に対して Ln を結合させて RDC を観測した結果、L2GB では L1GB の 2 倍以上大きな RDC が得られた。タグの運動性が高く Ln の運動性が高い場合、PCS や RDC などの常磁性効果は平均化され減弱してしまうが、この結果は LBT の 2 点固定化によって Ln がより強固に固定されていることを示している。次に L2GB に対して PCS を観測し、磁化率テンソルを決定したところ、その主値の大きさは金属結合タンパク質の場合と同等であった。以上より、ペプチドタグを対象タンパク質に対して 2 点で固定することによって、従来の 1 点固定タグと比較してランタニドがより強固に固定され、金属結合タンパク質の場合に匹敵するほどの強い常磁性効果が得られることが示された。

## 2. タグを用いたランタニドプローブ法によるタンパク質複合体構造解析

2 点固定 LBT によって Ln が強固に固定されることが確認されたため、次にタグを用いたランタニドプローブ法を実際のタンパク質複合体の立体構造解析へと応用し、p62 PB1 ドメイン二量体の立体構造決定を行った。p62 PB1 には OPCA モチーフから構成される酸性面と、保存されたりジン残基から構成される塩基性面が存在し、野生型 p62 PB1 は酸性面-塩基性面を介した head-to-tail の自己多量体を形成する。NMR 解析に適した試料を調製するため、それぞれの相互作用面にアミノ酸変異を導入した 2 種の変異体 DR, KE を作成した。DR 変異体については NOE に基づいた一般的な NMR 法により単体での立体構造を決定した。DR の立体構造に基づいて LBT 固定点を設計し、DR に対して LBT を 2 点固定した。DR に対してランタニドイオンを導入し、複合体の主鎖アミド信号における PCS を観測した。さらに複合体形成に伴う主鎖アミド信号の化学シフト摂動分布より KE の結合界面を決定した。PCS と結合面の情報に基づいてドッキング計算を行ったところ、RMSD 0.3 Å と良好な収束が得られた。一般的に、NMR によるタンパク質の立体構造解析のためには主鎖・側鎖シグナルの帰属や NOE 解析が必要となり、解析に時間を要する。本研究では、2 点固定 LBT を用いてランタニドイオンを対象タンパク質に対して導入し、主鎖アミドから観測される PCS と化学シフト摂動に基づいて複合体の構造決定を迅速に行うことができることを示した。

## 3. ランタニドプローブを用いた薬剤探索手法の開発

薬剤探索手法の一つである FBDD (Fragment Based Drug Discovery) は、比較的小さな化合物に対するスクリーニングを行い、それらを連結または拡張することでより高活性な化合物を作り出す手法である。NMR は FBDD 初期のフラグメントスクリーニングで用いられることが多いが、NMR を用いたスクリーニング手法には、タンパク質側の NMR 信号を観測するものとリガンド側の信号を観測するものの 2 種がある。タンパク質信号を観測する場合、 $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC スペクトルなどを用いてリガンド結合に伴うタンパク質信号の化学シフト摂動を評価する。この手法はリガンドの結合部位に関する立体構造情報を取得できるという利点があるが、スループット性が低いという欠点が存在する。リガンドベースの手法では、主にリガンドの  $^1\text{H}$  1 次元 NMR 測定を主体とするため比較的高スループットであるが、リガンド結合部位の情報を得るのが困難であるという短所が存在する。そこで本研究では、常磁性ランタニドプローブ法を応用し、スループット性が高く、かつリガンド-タンパク質間の立体構造情報が取得可能なスクリーニング手法の開発を行い、

次のようなりガンド探索手法を考案した。(A) 対象タンパク質にLBTを導入し、ランタニドイオンを固定する。タンパク質のNMR信号からPCSを観測し、磁化率テンソルを決定する。(B)  $Gd^{3+}$ を固定したタンパク質を化合物溶液に加え、PREを観測し、結合したリガンドを同定する。(C) リガンドのPCSを観測し、リガンド-タンパク質複合体構造を決定する。

本研究では複合体の立体構造が既知であるGrb2 SH2ドメインとその阻害剤をモデルとし、手法の開発と検証を行った。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 前 仲 勝 実

副 査 教 授 木 原 章 雄

副 査 講 師 野 田 展 生

学 位 論 文 題 名

## NMR analyses of protein structure and interaction using the paramagnetic lanthanide tag

(常磁性ランタニドタグを用いた NMR による  
タンパク質の立体構造・相互作用の解析)

タンパク質の立体構造解析手法として、X線結晶解析法と NMR 法が広く用いられている。NMR 法は生体内に近い溶液状態での解析が可能であることや、弱い相互作用が解析可能であること、動的情報が得られることなどの利点がある一方、解析対象の分子量に対する制約があること、解析に長期間を要すること、などが難点となっている。このような問題点を解決する上で常磁性ランタニドプローブ法が有効である。常磁性ランタニドイオン (以下 Ln) をタンパク質に対して固定することで、擬接触シフト (PCS) や残余双極子カップリング (RDC)、常磁性緩和促進 (PRE) などの常磁性効果が観測され、そこからタンパク質を形成する各原子の原子核の距離・角度に関する長距離間での立体構造情報を得ることができる。ランタニドプローブ法から得られる長距離情報は高分子量タンパク質の構造解析において有効であるが、これまで Ln を固定する有効な手法がなかったためにランタニドプローブ法はほとんど応用されていなかった。

ランタニドプローブ法を一般的なタンパク質に対して広く応用するために、本研究ではまず、ランタニド結合ペプチドを対象タンパク質に対して 2 点で強固に固定する新規ランタニド結合ペプチドタグ (LBT) の開発を行った。この手法では、ジスルフィド結合とペプチド結合の 2 点によって Ln を強固に固定することで、より強い常磁性効果を得ることに成功した。

さらに、開発した 2 点固定 LBT を実際のタンパク質立体構造解析へと応用し、PCS に基づいた p62 PB1-PB1 二量体の立体構造決定を行うことで、2 点固定 LBT の有用性を実証した。従来の NMR 法によるタンパク質の立体構造解析のためには主鎖・側鎖シグナルの帰属や核オーバーハウザー効果 (NOE) 解析が必要となり、解析に時間を要する。本研究では、ランタニドプローブ法を用いることによって主鎖アミドシグナルから観測される PCS と化学シフト摂動に基づいて複合体の構造決定を迅速に行うことができることを示した。

上記のように、ランタニドプローブ法の長距離情報を用いることによって迅速な構造解析が可能になる。この迅速性は薬剤探索における NMR 研究にとっても有用であるので、実際にランタニドプローブ法を用いた新規薬剤スクリーニング手法の開発を行った。比較的小さなりガンドを連結または拡張することでより高活性なりガンドを作り出す FBDD (Fragment Based Drug Discovery) においては、タンパク質-リガンド複合体の立体構造情報を得ることが重要である。FBDD において対象となる、結合の弱いリガンドに対して迅速に立体構造情報を得ることはこれまで困難とされてきた

が、本研究では常磁性ランタニドプローブ法を応用し、スループット性が高く、かつリガンド-タンパク質間の立体構造情報が取得可能な次のようなスクリーニング手法の開発を行った。(A) 対象タンパク質にLBTを導入し、ランタニドイオンを固定する。タンパク質のNMR信号からPCSを観測し、磁化率テンソルを決定する。(B)  $Gd^{3+}$ を固定したタンパク質を化合物溶液に加え、PREを観測し、結合したリガンドを同定する。(C)  $Tm^{3+}$ などのLnを用いてリガンドのPCSを観測し、リガンド-タンパク質複合体構造を決定する。本研究では複合体の立体構造が既知であるGrb2 SH2ドメインとその阻害剤をモデルとし、手法の開発と検証を行った結果、常磁性ランタニドプローブ法による化合物スクリーニングはとて有効であることがわかった。

NOEに基づいた従来のNMR法やX線結晶解析法によって、これまで数多くのタンパク質の立体構造が明らかにされてきた。しかし、立体構造が決定されても、その分子メカニズムが未解明のままである場合は多い。分子メカニズムの理解のためには、他の分子との相互作用や、構造変化を伴う一連の変化を解析することが重要であるが、これまでそのような解析を行う有効な手法が存在しなかった。ランタニドプローブ法を用いたNMR法は、このようなタンパク質の動的な解析、相互作用解析においても強力な手法となる。NMR法は溶液状態でのタンパク質を観測するため、他の分子との相互作用やそれに伴う構造変化を、連続的に観測することが可能である。さらにランタニドプローブ法から得られる長距離情報を活用することによって、タンパク質の連続的な変化を、3次元立体構造の変化として観察することができる。このように本研究で開発されたタグを用いたランタニドプローブ法は、構造解析手法としての応用ばかりではなく、動的なタンパク質機構の理解へ向けた研究への発展も期待される。

以上のように、著者は、汎用性の高い常磁性ランタニドプローブタグを開発し、蛋白質複合体の構造解析、化合物スクリーニング、動的な構造情報の取得に応用できることを示し、NMR解析法の開発に対して多大なる貢献があった。

よって著者は、北海道大学博士(生命科学)の学位を授与される資格あるものと認める。