

体が細胞や組織へ及ぼす影響も *in vitro* と *in vivo* の両面から研究され、アミロイド線維になる前の未成熟な線維や球状凝集体が神経細胞死を起こしていることがわかった。しかし、近年の研究で提案されている未成熟な線維や球状凝集体の詳細について、例えば、これらの凝集体の中でのTTRの立体構造については詳細な情報がほとんど得られていない。TTRアミロイドーシスに関する研究が今後さらに進展し、予防薬や治療薬の開発に結びつくことを期待したい。

- 1) Ando, Y., Nakamura, M., & Araki, S. (2005) *Arch. Neurol.*, 62, 1057–1062.
- 2) Hamilton, J.A. & Benson, M.D. (2001) *Cell. Mol. Life Sci.*, 58, 1491–1521.
- 3) Hörnberg, A., Eneqvist, T., Olofsson, A., Lundgren, E., & Sauer-Eriksson, A.E. (2000) *J. Mol. Biol.*, 302, 649–669.
- 4) Kelly, J.W. (1998) *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 8, 101–106.
- 5) Takeuchi, M., Mizuguchi, M., Kouno, T., Shinohara, Y., Aizawa, T., Demura, M., Mori, Y., Shinoda H., & Kawano, K. (2007) *PROTEINS*, 66, 716–725.
- 6) Matsubara, K., Mizuguchi, M., Igarashi, K., Shinohara, Y., Takeuchi, M., Matsuura, A., Saitoh, T., Mori, Y., Shinoda, H., & Kawano, K. (2005) *Biochemistry*, 44, 3280–3288.
- 7) Hoshi, M., Sato, M., Matsumoto, S., Noguchi, A., Yasutake, K., Yoshida, N., & Sato, K. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100, 6370–6375.
- 8) Andersson, K., Olofsson, A., Nielsen, E.H., Svehag, S.E., & Lundgren, E. (2002) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 294, 309–314.
- 9) Macedo, B., Batista, A.R., do Amaral, J.B., & Saraiva, M.J. (2007) *Mol. Med.*, 13, 584–591.
- 10) Hou, X., Aguilar, M.I., & Small, D.H. (2007) *FEBS J.*, 274, 1637–1650.
- 11) Mattson, M.P. (2004) *Nature*, 430, 631–639.
- 12) Sousa, M. M., Cardoso, I., Fernandes, R., Guimarães, A., & Saraiva, M.J. (2001) *Am. J. Pathol.*, 159, 1993–2000.

水口 峰之

(富山大学大学院医学薬学研究部 (薬学))

Structural changes of transthyretin and cytotoxicity
Mineyuki Mizuguchi (Graduate School of Medicine and
Pharmaceutical Sciences, University of Toyama, 2630 Sugitani,
Toyama 930-0194, Japan)

Relaxation Dispersion 法の生化学への応用

はじめに

Protein Data Bank (PDB) に登録されているタンパク質の立体構造を眺めると、それらがあたかも静止しているかのような印象を受けるときがある。しかし、実際のタンパク質は、機能を発揮する際に柔軟に構造を変化させる。例えば、酵素では、触媒反応において基質結合部位を大きく変化させる。また天然変性タンパク質では、遊離状態はランダムコイルであるが、ターゲットと結合すると特定の構造に折りたたまれる。タンパク質の機能を解明するためには、構造変化に対する理解が不可欠と言える。しかし、先述したようにPDBに登録された立体構造は、静止した絵であるため、それから構造変化の速度や大きさは求められない。さらに構造変化における中間状態は、往々にして存在比が低すぎるため、従来の手法では感知することすらできない。

このような状況の中、緩和分散法 (relaxation dispersion spectroscopy) と呼ばれるNMR緩和解析法が開発され¹⁾、いくつかのタンパク質の動的な構造情報と機能との相関が明らかにされ始めた。緩和分散法を用いると、マイクロ秒—ミリ秒オーダーの構造変化を解析できるが、この時間領域には生体分子の機能と関連した重要な過程が多く含まれるため、その手法と得られた結果は広い分野から注目を浴びている。緩和分散法の優れた点は、存在比が1%ほどの状態でも、その状態の化学シフトを決定できることである。化学シフトは立体構造に敏感であるため、緩和分散法により大まかな立体構造まで明らかにできる。すなわち、従来法では観測できない低存在比の状態でも、緩和分散法を用いれば、その化学シフトが得られ、そこから構造情報まで得られるというわけである。本稿では、緩和分散法の原理の本質である「化学交換」を概説し、次いで、応用例として「酵素反応」と「天然変性タンパク質の共役した折りたたみと結合」について述べる。

1. 化学交換

緩和分散法は化学交換と呼ばれる現象を定量化するための測定法である。測定の詳細は文献2, 3に譲ることにして、本稿では原理の本質となる化学交換について概説す

る。化学交換とは、分子が化学シフトの異なる状態間を行き来することを言う。立体構造が異なれば化学シフトも異なるため、構造変化も化学交換の一種と言える。今、エネルギー安定状態 A と励起状態 B の間での構造変化を考える (A↔B)。構造変化がない場合 (構造変化速度が NMR 測定時間に対して非常に遅い場合)、各状態に対応した 2 本の NMR シグナルが観測される (図 1A 左)。しかし、構造変化がある場合、状態 B のシグナルは、元々の存在比が低いこともあって、もはや観測できなくなる (図 1A 右)。これと同時に状態 A の線幅も、化学交換の影響で広がる。ポイントは、この線幅の変化が構造変化速度と化学シフト差により決定されるということである。逆に言うと、状態 A のシグナル減少量を定量化できれば、構造変化速度だけでなく、見えない状態 B の化学シフト (状態 A の化学シフトとの差) も決定できるわけである。化学交

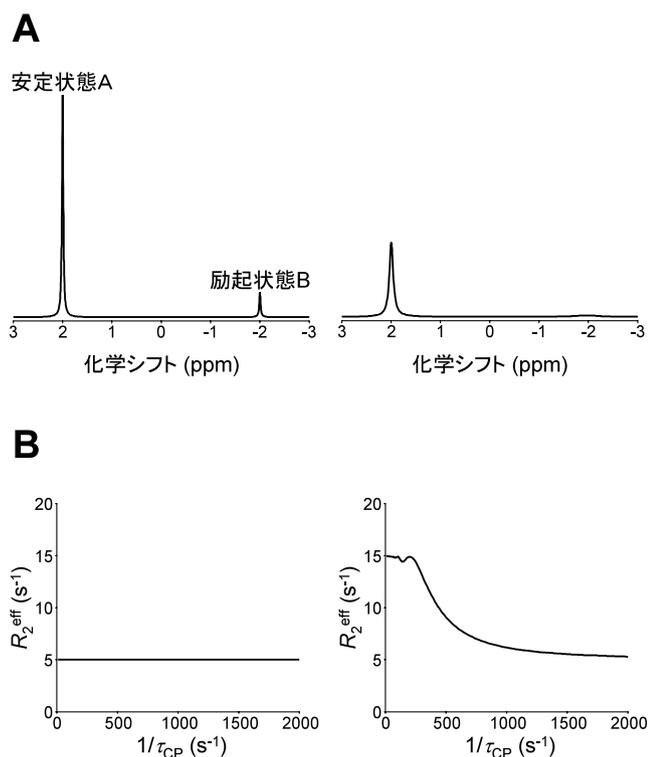


図 1 化学交換と緩和分散

(A) エネルギー安定状態 A と励起状態 B との間の構造変化を示す NMR スペクトル。構造変化速度が 0.001 s^{-1} (NMR 測定時間と比較して非常に遅い) の場合を左に、 100 s^{-1} の場合を右に示す。A と B の存在比を $0.9:0.1$ とし、化学シフト差を 4 ppm ($1,273 \text{ rad} \cdot \text{s}^{-1}$ とする)。(B) エネルギー安定状態 A に対してシミュレーションした緩和分散曲線。構造変化速度が 0.001 s^{-1} の場合を左に、 100 s^{-1} の場合を右に示す。全ての条件は (A) と等しい。

換がある場合は、図 1B 右のような緩和分散曲線が得られるが、ない場合は図 1B 左に示すフラットな直線になる。

2. 酵素反応

Palmer らによって、緩和分散法がタンパク質のダイナミクス解析に有効であることが示されて以来、同グループや Kay グループらによって精力的に方法論の開発が続けられてきた¹⁻³⁾。当初は、モデルタンパク質の局所的な動きの解析に終始したが、得られた情報がユニークであったため、当時からその測定法に注目が寄せられていた。このような状況の中、Wright らがジヒドロ葉酸還元酵素 (DHFR) に緩和分散法を適用して事態が大きく変わった⁴⁾。この報告により生化学的に意義のある過程も緩和分散法により解析できることが示されたからである。Wright らは、DHFR の酵素反応サイクルに存在する五つの中間状態を基質アナログで安定化し、それぞれの状態を緩和分散法により解析した^{4,5)}。その結果、全ての状態には従来法では観測できない励起状態が存在することが示された。緩和分散実験で最も重要なことは、感知された励起状態がどのような状態で

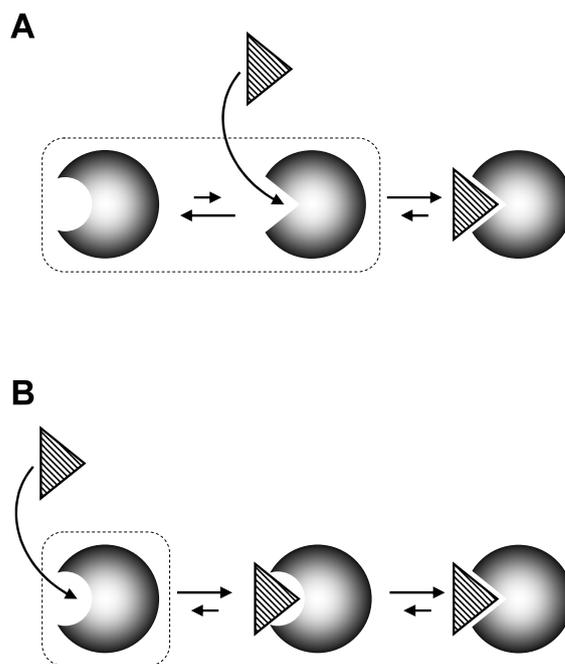


図 2 酵素の基質結合メカニズム

三角は基質を表し、点線で囲まれた部分はタンパク質の遊離状態を示す。(A) conformational selection モデル。酵素は遊離状態で僅かながら基質結合型構造をとっている。この基質結合型構造に基質が結合する。(B) induced fit モデル。まず基質が酵素に結合し、それに誘導されて酵素側の構造が変化する。

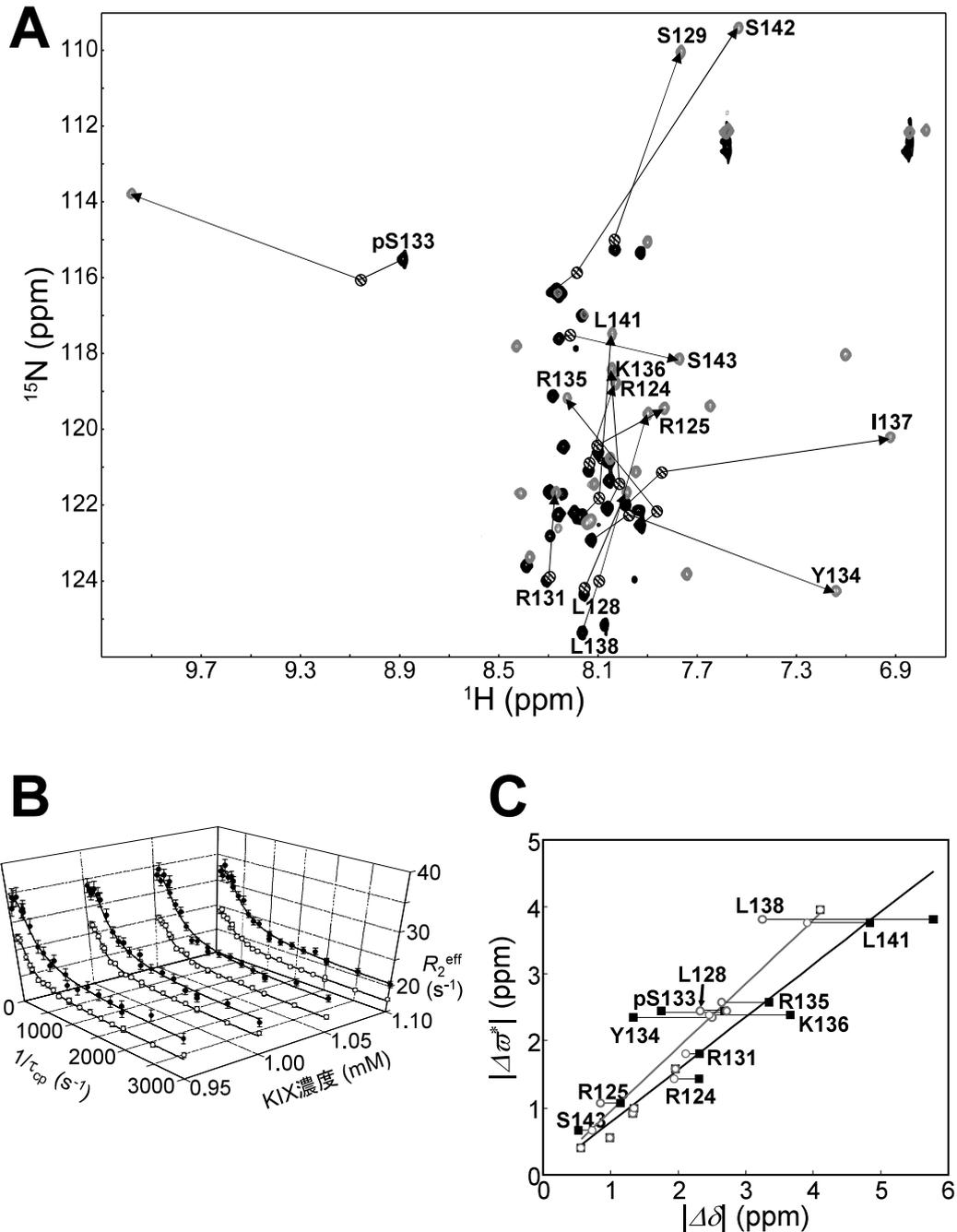


図3 pKIDの共役した結合と折りたたみ

(A) NMRを用いた ^{15}N -pKIDと非標識KIXの滴定実験。遊離状態と結合状態のpKIDのNMRスペクトルをそれぞれ黒色と灰色で示す。滴定の過程で同定された遭遇複体のNMRシグナルの位置を⊙で表す。化学シフト変化が大きいものに関しては、その帰属を表示すると共に、変化の過程を矢印で示す。(B) pSer133の緩和分散曲線。 ^{15}N -pKIDの濃度を1mMに固定し、非標識KIXの濃度を0.95, 1, 1.05, 1.1mMとした四つのサンプルに対して、500MHz(○)と800MHz(●)のNMRで緩和分散を測定した。(C) 緩和分散で求めた化学シフト差($\Delta\omega^*$)と滴定実験で求めた化学シフト差($\Delta\delta$)の比較。遊離状態と結合状態の化学シフト差 $\Delta\delta$ ($\delta_{\text{遊離状態}} - \delta_{\text{結合状態}}$)と $\Delta\omega^*$ の相関を■で示し、遭遇複体と結合状態の化学シフト差 $\Delta\delta$ ($\delta_{\text{遭遇複体}} - \delta_{\text{結合状態}}$)と $\Delta\omega^*$ の相関を○で示す。後者のほうにより良い相関が見られる。

あるのかを同定することである。この研究においては、まず基質アナログで安定化した五つの中間状態のNMRシグナルを全て帰属し、それぞれの状態間の化学シフト差を求めた。そして、ここで求めた化学シフト差と、緩和分散の解析から得られた化学シフト差が一致するかどうかを調べることによって、それぞれの励起状態を同定した。それによると、各励起状態は、酵素反応サイクルにおいて、緩和分散を測定した状態の一つ前か一つ後ろの状態に対応するという。例えば、基質が結合してなくても、DHFRはわずかに基質結合型構造をとっているということである。

DHFR以外にも、プロリルシストランス異性化酵素やアデニル酸キナーゼが同様なメカニズムで基質を認識していることがKernらによって示された^{6,7)}。この基質結合のメカニズムは、conformational selectionと呼ばれ(図2A)、induced fit(図2B)と対比して繰り返し議論されてきたが、ここに来て前者のメカニズムをサポートする強力な実験結果が出始めたと言える。また、アデニル酸キナーゼの研究では、緩和分散法により同定されたマイクロ秒—ミリ秒の時間領域だけでなく、NMRによるピコ秒—ナノ秒の揺らぎ解析、分子動力学計算、1分子測定など、多様な時間領域の動きを解析することによって、それぞれの動きが階層的に酵素活性に影響を及ぼしていることも明らかにしている⁸⁾。

3. 天然変性タンパク質の共役した折りたたみと結合

真核生物の場合、天然変性タンパク質の割合は実に全体の約3割を占め、多くがシグナル伝達やがんに関係する。天然変性タンパク質は、生化学的に非常に重要な研究対象と言える。天然変性タンパク質は、核酸やタンパク質と結合し、それに伴い折りたたまれる(共役した折りたたみと結合)ことによって機能が発現される。この共役した折りたたみと結合の現象は、古くから認められていたにもかかわらず、その詳細なメカニズムは不明であった⁹⁾。筆者はWrightの指導の元、天然変性タンパク質である転写因子cAMP response element-binding protein (CREB)のリン酸化されたkinase inducible domain (pKID)の共役した折りたたみと結合の解析に着手した¹⁰⁾。pKIDは、遊離状態ではランダムコイルであるが、CREB-binding protein (CBP)のKIXドメインと結合すると2本の α ヘリックスを巻く。pKIDの共役した折りたたみと結合の過程には、低存在比の中間状態の存在が示唆されていたが、従来の手法ではそのような状態を捉えるに至らなかった。この低存在比の状態が存在するであろうということと、結合に伴う構造変化

(化学シフト差)が大きいということから、緩和分散法がこの系の解析に適していると考えられた。

そこで筆者らは、四つの濃度比の ^{15}N -pKID/KIXサンプルを調製して緩和分散実験を行った(図3B)。この実験の詳細は、既に文献11においてレビューしているため、ここではそのエッセンスだけを述べることにする。まず緩和分散実験に先立って、 ^{15}N -pKIDに非標識KIXを滴下する滴定実験を行い、遊離状態と結合状態のpKIDの化学シフトを決定した(図3A)。この際にpKIDの多くの残基に奇妙な化学シフト変化が観測されたが、それらは続く緩和分散実験から遭遇複合体の形成を反映していると結論づけることができた。遭遇複合体とは、(非)特異的相互作用により繰り返し形成される過渡的な複合体のことで、この過程で正しい複合体構造が探索される。先述のDHFRと同様な化学シフト差の比較を行うことによって、緩和分散法により感知された低存在比の状態は、遭遇複合体であることが判明した(図3C)。このことは、pKIDは、KIX存在下では完全な遊離状態にならず、KIXの近くにとどまり遭遇複合体を形成することを証明したことになる。また解析の過程において、遭遇複合体とは異なる折りたたみ中間状態の存在も明らかにした。まとめると、pKIDは構造を持たないままKIXと遭遇複合体を形成し、KIXの表面上で折りたたまれることが分かった。また筆者らは、タンパク質—タンパク質相互作用に緩和分散実験を適用するにおいて、濃度比を最適化することが非常に重要であることも示した¹²⁾。

おわりに

構造生物学には、立体構造が分かればその機能までも理解できるという、構造と機能のパラダイムが存在するが、緩和分散法により明らかにされた動的な構造情報と機能の相関を鑑みると、このパラダイムが完全であるとは言い切れない。例えば、天然変性タンパク質では、遊離状態の構造が定まっていないため、立体構造に基づく機能予測は無力である。欧米においては、今回紹介した研究例などに刺激を受けて、構造と機能のパラダイムの見直しや、動的構造解析の研究が盛んになってきている。しかし、日本においてはこの分野は欧米から遅れていると言わざるを得ない。この状況を打破するためには、そのような研究、および教育の体制を整える必要があると考えられる。

1) Loria, J.P., Rance, M., & Palmer, A.G. 3rd (1999) *J. Am. Chem. Soc.*, 121, 2331-2332.

- 2) Palmer, A.G. 3rd, Kroenke, C.D., & Loria, J.P. (2001) *Method Enzymol.*, 339, 204–238.
- 3) Mittermaier, A. & Kay, L.E. (2006) *Science*, 312, 224–228.
- 4) McElheny, D., Schnell, J.R., Lansing, J.C., Dyson, H.J., & Wright, P.E. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102, 5032–5037.
- 5) Boehr, D.D., McElheny, D., Dyson, H.J., & Wright, P.E. (2006) *Science*, 313, 1638–1642.
- 6) Eisenmesser, E.Z., Millet, O., Labeikovsky, W., Korzhnev, D. M., Wolf-Watz, M., Bosco, D.A., Skalicky, J.J., Kay, L.E., & Kern, D. (2005) *Nature*, 438, 117–121.
- 7) Henzler-Wildman, K.A., Thai, V., Lei, M., Ott, M., Wolf-Watz, M., Fenn, T., Pozharski, E., Wilson, M.A., Petsko, G.A., Karplus, M., Hübner, C.G., & Kern, D. (2007) *Nature*, 450, 838–844.
- 8) Henzler-Wildman, K.A., Lei, M., Thai, V., Kerns, S.J., Karplus, M., & Kern, D. (2007) *Nature*, 450, 913–916.
- 9) Dyson, H.J. & Wright, P.E. (2005) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 6, 197–208.
- 10) Sugase, K., Dyson, H.J., & Wright, P.E. (2007) *Nature*, 447, 1021–1025.
- 11) 菅瀬謙治 (2007) 蛋白質核酸酵素, 52, 945–951.
- 12) Sugase, K., Lansing, J.C., Dyson, H.J., & Wright, P.E. (2007) *J. Am. Chem. Soc.*, 129, 13406–13407.

菅瀬 謙治

(財団法人サントリー生物有機科学研究所・第1研究部)

Applications of relaxation dispersion spectroscopy

Kenji Sugase (Division of Spectroscopic and Structural Research, Suntory Institute for Bioorganic Research, 1-1-1 Wakayamadai, Shimamoto-cho, Mishima-gun, Osaka 618-8503, Japan)

核タンパク質 IκB-ζ を介した炎症性遺伝子の発現調節

1. はじめに

内外のストレスに対する多くの細胞応答は、巧妙に制御された遺伝子発現に依存している。ストレス刺激に伴う一過的な遺伝子発現は、「必要な時」に「必要な分子」を「必要な量」だけ産生する極めて合理的な機構であり、遺伝子産物の速やかな合成と分解によって実現される。微生物感染等に起因する炎症時には、炎症性サイトカインをはじめ、各種ケモカインや抗菌タンパク質など多くの遺伝子の発現が誘導される。NF-κB は、これら炎症性遺伝子の発現誘導において中心的な役割を果たす転写因子であり、転写調節領域に存在する結合配列を介してその誘導を制御し

ている。また、ストレス応答遺伝子の mRNA 内には自身を不安定化するヌクレオチド配列が存在し、役割を終えた転写産物の速やかな分解に寄与している。

さまざまな機能を持つ非常に多くの炎症性遺伝子が NF-κB を介して誘導されるが、最近の詳細な発現解析を通じて、これらの遺伝子の発現パターンも多彩であることが明らかになってきている。発現様式の違いに基づいた遺伝子のクラス分けが行われ、各クラスを特徴づける分子機構が示されている。筆者らが同定した核内タンパク質 IκB-ζ が、一群の炎症性遺伝子の発現パターンを決定する上で鍵となる役割を果たしていることが明らかになりつつある。

2. NF-κB による炎症性遺伝子の転写誘導

NF-κB は、1986 年に B 細胞の免疫グロブリン κ 軽鎖エンハンサーに結合する転写因子として同定されたが、現在では、炎症等の免疫応答ばかりでなく細胞の増殖や分化などの多様な生命現象に関与していることが知られている¹⁾。哺乳類には、Rel ホモロジドメインと呼ばれる領域を持つ五つの NF-κB タンパク質 (p65, c-Rel, RelB, p105/p50, p100/p52) が存在し、これらは様々な組み合わせでホモあるいはヘテロ二量体を形成する。この中で、主に p65 サブユニットと、p105 前駆体から産生される p50 サブユニットが炎症性遺伝子の転写誘導に関わっている。炎症反応の主要な担当細胞であるマクロファージを TLR (Toll-like receptor; 微生物に特有の分子を認識する受容体) のリガンドで刺激した場合などに、NF-κB を介した多数の炎症性遺伝子の発現が誘導される²⁾。刺激を受けた細胞では、細胞質に存在する阻害タンパク質である IκB-α/β/ε がリン酸化を引き金として分解される結果、NF-κB が核へ移行し標的遺伝子の転写を活性化する。細胞質から核への NF-κB の局在変化はタンパク質の新規合成を伴わないため、短時間のうちに標的遺伝子の発現を誘導することができる。

3. 発現プロファイルに基づいた NF-κB 標的遺伝子のクラス分け

従래の方法に加え、最近のマイクロアレイ技術などを用いた包括的な遺伝子発現解析を通じて、NF-κB によって誘導される一連の炎症性遺伝子が、それぞれに固有の発現プロファイル (特定の刺激に対する発現の特異性、発現量の経時的变化など) を持つことが明らかになった。このことは、炎症性遺伝子の発現が NF-κB の核移行のステップだけでなく、転写および転写後レベルで遺伝子ごとに異な