

## NMR によるタンパク質の動的構造解析

楯 真 一

タンパク質構造は、極めてわずかな自由エネルギーにより立体構造を保持している。このため、体温程度の溶液中でも明らかな構造揺らぎを持つ。タンパク質構造に内在する揺らぎは様々な形でタンパク質の機能制御に関わる。安定な立体構造を持つタンパク質構造に内在する低存在率の構造、また、安定な立体構造を持たない (intrinsically disordered: ID) 領域に過渡的に形成される低存在率構造の存在とその役割について考察する。さらに、タンパク質構造揺らぎを対象とする研究が、構造ゲノムプロジェクトにより集積された膨大なタンパク質構造情報に基づいた知識ベースの構造解析技術により支えられていることにも言及する。従来の静的なタンパク質立体構造に基づく構造-機能相関の概念から、タンパク質の構造揺らぎと機能制御、機能変調の相関を解明する新しいタンパク質構造研究が進みつつある。

## 1. はじめに

タンパク質の立体構造が、その機能と密接に関連するという「タンパク質構造-機能相関」という概念は、構造生物学のドグマである。国際的な構造ゲノムプロジェクトの推進により、膨大なタンパク質立体構造情報が蓄積された現在、このドグマが検証される時がある。

タンパク質の立体構造が機能と密接に関連することは、疑う余地のない事実である。特定の機能を担うタンパク質間では、アミノ酸配列相同性が低い場合にも非常に良く似た立体構造が共有される。しかし、立体構造から機能を予測することができても、アミノ酸変異（特に活性部位から離れた位置にある残基に対する変異）による機能変調の予測、あるいは活性部位から離れた部位に結合してアロステリックエフェクターとして働く化合物により誘導されるタンパク質の機能変化を予測することは極めて難しい。多く

の場合、上記の摂動はタンパク質の立体構造には大きな変化を与えない場合が多いためである。タンパク質の構造-機能相関という概念は、タンパク質の立体構造に基づいた機能分類、あるいは類似の立体構造を持つタンパク質間で共有される特徴（例えば、基質認識に関わる保存された相互作用）を明らかにするための基盤となるが、大きな立体構造変化を伴わない外部からの構造摂動により誘導される機能変調を予測するものではない。タンパク質立体構造情報の網羅的集積が、タンパク質立体構造予測など、知識ベースのタンパク質科学を飛躍的に発展させた一方で、「出口」として目指した創薬への貢献という点では十分に期待に届いていないという問題は、タンパク質立体構造データベースから抽出できる情報だけでは、タンパク質個別の機能変調機構を議論するには限界があることを示唆する。では、どのような情報が欠けているのか。

タンパク質分子は、水素結合数個分の結合エネルギーにしかならない、わずかな自由エネルギーで立体構造を保っている<sup>1)</sup>。このため、体温程度の水溶液中でも明らかな構造の揺らぎを持つ。結晶構造として得られる高分解能のタンパク質構造に基づく、個々の水素結合にまで言及する議論は、最安定構造中で起こる現象を説明するが、溶液中で揺動するタンパク質構造で起こる現象とは同じではない。タンパク質の立体構造がもつ揺らぎの実態を明らかにしな

広島大学大学院理学研究科数理分子生命理学専攻  
(〒739-8526 東広島市鏡山 1-3-1)

Dynamical aspects of protein structures revealed by newly established NMR approaches

Shin-ichi Tate (Department of Mathematical and Life Sciences, Graduate School of Science, Hiroshima University, 1-3-1 Kagamiyama, Higashi-Hiroshima 739-8526, Japan)

くは、様々な外部からの摂動にตอบสนองするタンパク質の機能変調機構を知ることはできない。逆に、タンパク質の溶液中における存在状態を正確に知ることができれば、タンパク質の機能を人為的に調節する術を得ることができ、タンパク質構造情報から「創薬」への応用が促進されるはずである。

本稿では、新たなNMR（核磁気共鳴法）技術を導入することで可能となったタンパク質の構造揺らぎと機能調節機構の相関研究の現状を概観する。また、この新たなNMR研究の流れが、どのように構造ゲノムプロジェクトの成果と関わるかについても解説する。

## 2. タンパク質構造における「バタフライ効果」

バタフライ効果とは、カオス力学系において小さな摂動が大きな変化につながる現象を指す。「ブラジルでの蝶の羽ばたきはテキサスでトルネードを引き起こす」という例えで語られる現象である。極めて小さな自由エネルギーで立体構造を保つタンパク質は、外部からの小さな構造摂動（化学修飾あるいはアミノ酸変異）によって明らかな機能上の変調を示すことがある。例えば、酵素活性部位から離れた位置にあるアミノ酸変異が、変異したアミノ酸タイプ依存的に活性変化を示すという例もその一つである<sup>2,3</sup>。酵素活性部位から立体構造上離れた位置に導入したアミノ酸変異が、予測しなかった活性変化を与えることはしばしば経験することである。このような現象は、タンパク質構造における「バタフライ効果」と呼べる。

ユビキチン結合酵素（ubiquitin-conjugating enzyme）E2とユビキチンリガーゼ（ubiquitin ligase）E3の相互作用研究における「バタフライ効果」が最近報告されている。E2上のE3結合部から離れた位置にあるアスパラギン酸をグルタミン酸に置換する表面電荷を変えない小さな構造上の摂動が、E2-E3の相互作用に変調を与えることが示された<sup>4</sup>。この例では、E2における変異が塩結合を介してE3結合部位構造の動的な構造平衡状態を変化させることが原因であると分子動力学計算などから結論づけている<sup>4</sup>。タンパク質構造を維持するわずかな自由エネルギーバランスの乱れが、タンパク質構造全体の「揺らぎ」を変化させ、変異点とは離れた位置にある相互作用部位の状態に変化を与える「バタフライ効果」が現れると考えられる。多くの場合、このような小さな摂動は、タンパク質の結晶構造中では変異点周辺に限定される構造変化としてしか観測されないため、立体構造からは活性変化を明瞭に説明できないことが多い。変異によって誘導される動的構造の変化を観測する必要がある。

タンパク質構造の「バタフライ効果」をNMRにより観測した私たちの研究を例として示す。核スピン緩和分散（relaxation dispersion）解析からは、タンパク質の構造揺ら

ぎの大きさ、速さに加えて、揺らぎの結果生じる「低存在率構造」の存在が明らかになる<sup>5</sup>。低存在率構造は、タンパク質構造安定化の自由エネルギーが最安定構造よりもわずかに高い構造に対応するため、「励起構造」とも呼ばれる<sup>6</sup>。米国スクリプス研究所のWrightらは、緩和分散法によりジヒドロ葉酸還元酵素（DHFR）のMichaelis複合体構造中の活性ループに揺らぎの結果誘導される励起構造が存在することを示した<sup>7</sup>。また、その励起構造はDHFRがヒドリド（hydride）転移反応を終えた後の生成物複合体構造中の構造に対応することも報告した<sup>7</sup>。私たちは、DHFRの活性部位から離れた位置にある柔軟なループ部にある67位のグリシン（G67）に対する変異が、DHFRの活性をアミノ酸タイプ依存的に変化させることを見だしていた<sup>2</sup>。Wrightらの結果から、G67変異の活性ループの揺らぎを変化させる「バタフライ効果」を予想し、緩和分散法を用いてDHFRのG67位変異体の構造揺らぎの解析を行った。

DHFRは、溶液中ではMichaelis複合体がclose型（基質複合体）とocclude型（生成物複合体）と呼ばれる二つの構造間の平衡状態にあることが上記のWrightらのNMR解析から示されている（図1）<sup>7</sup>。G67をValに変異したG67V変異体DHFRは、野生型に比べてMichaelis定数 $K_m$ を変えないが、代謝回転数 $k_{cat}$ が約半分になるという特徴的な活性変調を示す変異体である<sup>2</sup>。DHFRの還元反応は、補因子NADPH（ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸）から基質ジヒドロ葉酸へのヒドリド転移による。図1の左側に示すMichaelis複合体の結晶構造中ではヒドリド転移のドナーとアクセプターの原子間距離が離れてお

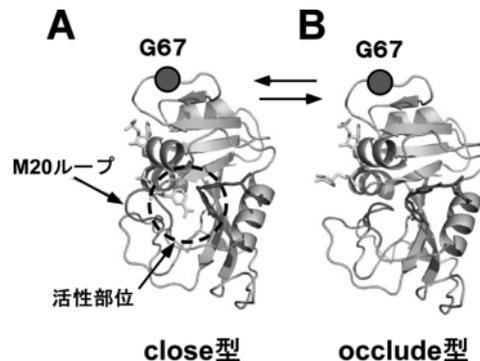


図1 ジヒドロ葉酸還元酵素（DHFR）のMichaelis複合体構造に内在する構造揺らぎ

(A) Michaelis複合体に対応する結晶構造（PDB：1RX2）。（B）生成物複合体に相当する結晶構造（PDB：1RX6）。NMRによる解析からMichaelis複合体構造は、溶液中で2%程度の割合で生成物複合体構造をとる構造平衡状態にある。（A）の構造では補因子NADPHが活性部位（点線丸印）に存在しているが、（B）の構造では、活性ループ（M20ループ）が活性部位に入り込み、補因子をはじき出している。このため、（B）の構造では、酵素活性を持たない。補因子の存在状態により、（A）をclose型、（B）をocclude型と呼ぶ。G67変異点を●で示す。

り、活性ループ (M20 ループ) の揺動に伴う NADPH の基質側への押し込みが還元反応を進める上には必要であることが分子動力学計算から示唆されている<sup>8)</sup>。すなわち、DHFR のヒドリド転移反応は、活性ループの構造揺動と密接に連動していると考えられる<sup>8)</sup>。

G67V 変異による立体構造変化は変異点近傍に限られることが、野生体結晶構造をもとに構築した G67V 変異体モデル構造、および NMR スペクトル変化から確認された。つまり、G67V 変異は活性部位の立体構造には影響を与えない。DHFR が担う還元反応は五つの反応ステップを持つ<sup>9)</sup>。したがって、観測されていた  $k_{cat}$  の低下はヒドリド転移の変調を反映するものではない。このため、私たちはヒドリド転移に対する変異の影響を直接観測するために、ストップフローを用いたヒドリド転移速度解析を行った。その結果、G67V 変異体は野生型に比べてヒドリド転移速度が約 30% 低下していることが確認された。一方、NMR 緩和分散解析の結果からは、図 1 に示す close 型から occlude 型への構造変化速度は約 3 倍に上昇していることが示された。307K において、野生型では  $13 \text{ s}^{-1}$  であるが、G67V 変異体では  $46 \text{ s}^{-1}$  であった。また、このとき溶液中における Michaelis 複合体が持つ活性ループの励起構造 (occlude 構造) の存在率は 2% であることもわかった。以上の解析から、G67V 変異体では野生型に比べて close 型  $\rightarrow$  occlude 型構造転移の頻度が明らかに上昇するが、逆にヒドリド転移速度は低下するという結果になった。このことは、close 型  $\rightarrow$  occlude 型構造転移は、ヒドリド転移を促進するドナー・アクセプター原子間距離を縮める運動とは関係がなく、機能上は阻害的に働く運動であることを示す。

上記の結果からは、次のことがいえる。1) DHFR においては、活性部位から離れた位置にあるアミノ酸変異が、活性ループの揺らぎに変調を与える「バタフライ効果」があること、2) DHFR の活性ループにはナノ秒 (ns) 時間域での Michaelis 複合体構造内における揺らぎと、close 型  $\rightarrow$  occlude 型構造転移の二つの階層にわたる機能上異なる影響を持つ揺らぎが存在すること。前者の速い揺らぎは、活性促進的であるが、後者のゆっくりとした振幅の大きい揺らぎは、不活性型の occlude 型構造への構造転移頻度を上げることで活性に対して阻害的に働く (occlude 型構造は、NADPH を活性部位から飛び出た構造を持つために酵素活性を持たない)。

二つの異なる機能を持つ構造揺らぎについてさらに考察する。DHFR のヒドリド転移速度は約  $200 \text{ s}^{-1}$  である<sup>9)</sup>。化学反応としてのヒドリド転移は、ドナー・アクセプター間距離が近づけば瞬時に起こるため、DHFR のヒドリド転移は、NADPH-ジヒドロ葉酸が近接した状態を形成する過程が律速になると考えられる。つまり、Michaelis 複合体構造中で生じる、振幅の小さな ns 時間域の活性ループの速

い揺らぎによって「確率的」に生じるドナー・アクセプターが近接する頻度が DHFR のヒドリド転移速度を規定すると考えられる<sup>10)</sup>。つまり、ヒドリド転移反応は、ns 時間域で、Michaelis 構造内での局所的な揺らぎにより支配される。

G67V 変異体の構造安定性は、野生型よりも低下する (尿素による構造変性自由エネルギー変化量で  $1 \text{ kcal/mol}$  低い)<sup>2)</sup>。G67V 変異によるタンパク質構造安定性の低下が、遠隔位にある活性部位の構造揺らぎにも影響を与え、活性ループの close 型  $\rightarrow$  occlude 型構造転移頻度を促進する「バタフライ効果」を誘導すると考えることができる。

DHFR の活性ループが持つ二つの異なる時間域における揺らぎと活性との関係を図示すると図 2 のようになる。酵素反応軸方向は、活性ループの ns 時間域での揺らぎに対応する。Michaelis 複合体構造中で、ドナー・アクセプター原子間距離が確率的に近づくことでヒドリド転移が生じる反応過程を表す。一方、構造転移の軸は、ミリ秒 (ms) 時間域での活性ループの close 型  $\rightarrow$  occlude 型構造転移を表す。野生型においては、1 秒間に 13 回の頻度で occlude 型構造 (酵素不活性構造) に転移するのに対して、G67V 変異体ではその約 3 倍の頻度で occlude 型構造に変化する。

ヒドリド転移は、close 型構造にある活性ループの速い揺らぎにより支配される。close 型すなわち Michaelis 複合体構造中の活性ループの速い揺らぎは、確率的に NADPH のドナー原子をジヒドロ葉酸のアクセプター原子に近づけ、ヒドリド転移を可能にする (図 2, 酵素反応軸)。一方、この活性ループは、ヒドリド転移を誘導できない酵素不活性構造である occlude 型構造へ変化する運動も持つ (図 2, 構造転移の軸)。G67V 変異により活性ループの occlude 型への構造転移速度 (転移頻度) が上がると、close 型中においてヒドリド転移を誘導する活性ループの構造揺らぎが、occlude 型への構造転移により頻繁に中断されるために、G67V 変異体の酵素活性は低下すると考えられる。DHFR の酵素反応においては、異なる時間域の活性ループの構造揺らぎが重層的に関わっている (図 2)。

この研究から、活性部位より遠く離れた位置にある柔軟なループ部のアミノ酸変異が、構造揺らぎに対する摂動を通して活性変調を誘導する「バタフライ効果」があることが示された。このことは、一般に活性部位から離れた位置にある残基に対するリン酸化、糖鎖修飾などの翻訳後修飾も単に化学的標識として機能するだけでなく、「バタフライ効果」による機能変調を与える可能性も示唆する。タンパク質の静的な立体構造に基づいた構造-機能相関という概念だけでは捉えきれないタンパク質の活性変調機構があることが、この DHFR の研究例から示される。

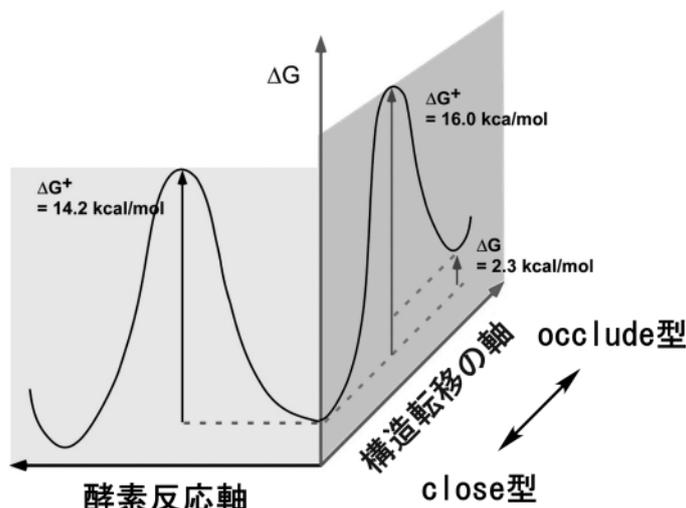


図2 DHFRの活性ループ構造の二つの時間域での揺らぎと酵素反応制御

DHFRの酵素反応は、Michaelis複合体中の補因子NADPHと基質であるジヒドロ葉酸の距離が、活性ループのns時間域における揺動により確率的に近くなるときに生じる(酵素反応軸)。一方で、NMRで観測されたms時間域で生じる活性ループの構造転移は、活性を持つclose型から不活性なocclude型への構造変化を誘導する(構造転移の軸)。この構造転移の頻度が高くなると、酵素反応軸側の反応が中断されるために、酵素反応は阻害される。

### 3. 天然変性タンパク質の構造の‘ランダム’さ

全ゲノム配列解析の結果、多くのタンパク質には特定の立体構造を持たない天然変性(intrinsically disordered: ID)領域が多く含まれることが示された<sup>11,12)</sup>。この発見を契機として、タンパク質中で構造を持たない領域の機能上の役割が着目され、これまでに多くの研究が報告されてきた<sup>13,14)</sup>。最近ではID領域に対するリン酸化などの翻訳後修飾が、特定の構造を持たないという構造特性を利用してどのように機能制御に関わるかなど、安定した構造がないことの機能上の利得を明らかにする研究も進められている<sup>14~17)</sup>。

特定の安定構造を保たない部分を、タンパク質化学では‘ランダムコイル’と分類する<sup>1)</sup>。このため、構造を持たないID領域は、多様な構造を‘ランダム’にとると考えられる。しかし、様々な計測技術を用いた構造解析により、ID領域が溶液中においては必ずしも完全なランダムコイルではないことが示されてきている。X線小角散乱(SAXS)による解析からは、ポリグリシンが、ランダムコイルではなく、伸びきった構造を好む性質があることが示された<sup>18)</sup>。この例から、ID領域は安定な立体構造は持たないが、完全なランダム構造でもなく、動的に揺動する中で優先的にとる構造があることが示されている。また、ID領域ではないが、変性条件下においてもタンパク質は完全なランダムコイル状態にはなく、残余構造を持つこと

が真空紫外円偏光二色性(VUVCD)を用いた解析から示されている<sup>19,20)</sup>。このような研究から、ポリペプチド鎖は安定な構造をとり得ない状態であっても、定義どおりのランダムコイル<sup>21)</sup>状態にあるわけではなく、動的な構造揺動の中で、アミノ酸配列によって規定される優先的にとる構造を保持しようとする性質があると考えられる。ID領域が持つこの性質は、複数のドメインが、柔軟なリンカーによりつながれた「モジュラー型」構造を持つタンパク質の全体構造を規定する役割を持つことがある。私たちの研究から、ID領域によってモジュラー型タンパク質の全体構造が規定される例を示す。

HMGB1タンパク質は、二つのHMGドメインがID配列をもつリンカー部でつながれた構造をもつ典型的なモジュラー型タンパク質である<sup>22)</sup>。その全長(正確にはC末端部の酸性テールを除いたフラグメントの全長)のNMR構造は、図3に示すような構造アンサンブルになる。柔軟なリンカー部が溶液中では多様な構造をとるために、リンカー部にはNMR構造制約を与えるNOE(核オーバーハウザー効果)が十分に観測されない。このため、通常のNMR構造解析では、二つのドメインは完全にランダムな配向をもつ全体構造が得られる(PDB:2YRQ)。しかし、このドメイン配向のランダムさは、構造計算のための初期構造として発生させたランダム構造を反映するものであり、溶液中での実際の存在状態を反映しない。ところが、一般的には特定の構造制約が観測されない柔軟な領域は、



図3 ドメインが構造柔軟なリンカーでつながったモジュラータンパク質 HMGB1 の NMR 構造

溶液中で一定の構造を保持しないリンカー部では十分な数の NOE が観測できないため、従来の NMR 構造解析法では二つのドメイン配向がランダムに分布した全体構造となる (PDB: 2YRQ)。

特定の偏りのないランダムな構造をとると考えるため、図3の全体構造が普通はイメージされるであろう。私たちは、ID 配列の特徴を持つリンカー部を介してつながった二つの HMG ドメインの溶液中での配向状態を正確に解析するために、NMR と SAXS を用いた構造解析を行った<sup>23)</sup>。その結果、対象とした HMGB2 (HMGB1 と高い相同性を持つタンパク質) では二つのドメインが 27 度以内の相対配向角にとどまる比較的伸びきった構造を保つことを示した (図4)<sup>23)</sup>。

HMGB2 のドメイン間リンカーの N 末端領域は N 末端側に位置する HMG box と相互作用する。HMG box と相互作用するリンカー部に変異を入れることで、ドメイン間相対配向の振れ幅が 53 度にまで広がった<sup>23)</sup>。このドメイン間相対配向角変化は、SAXS の分子内原子間距離分布の変化としても確認された<sup>23)</sup>。つまり、リンカーと N 末端ドメインの相互作用を弱めることにより、リンカー領域の構造の自由度を上げたことが二つのドメイン間相対配向の揺らぎ幅を増幅した。このことから逆に、野生型では ID 領域であるドメイン間リンカーが完全なランダム構造をとらず、動的揺動状態にありながらも特定の構造を保持しようとする性質があることがわかる。ID 領域は、定義通りの‘ランダムコイル’<sup>21)</sup>ではなく、揺動しながらも特定の構造を優先的にとろうとする性質を持つと考えるべきである。

#### 4. ID 領域が優先的にとる構造の検出

構造ゲノムプロジェクトによるタンパク質構造と、その構造に対応する化学シフト情報の膨大な蓄積は、タンパク質構造中のアミノ酸主鎖原子の NMR 化学シフト ( $^1\text{HN}$ ,  $^1\text{H}\alpha$ ,  $^{13}\text{C}\alpha$ ,  $^{13}\text{C}\beta$ ,  $^{13}\text{C}$ ) と、その残基を含む周辺の局所構造との間に高い相関関係があることを見いだした<sup>24)</sup>。この相関を用いた化学シフトによる局所構造情報

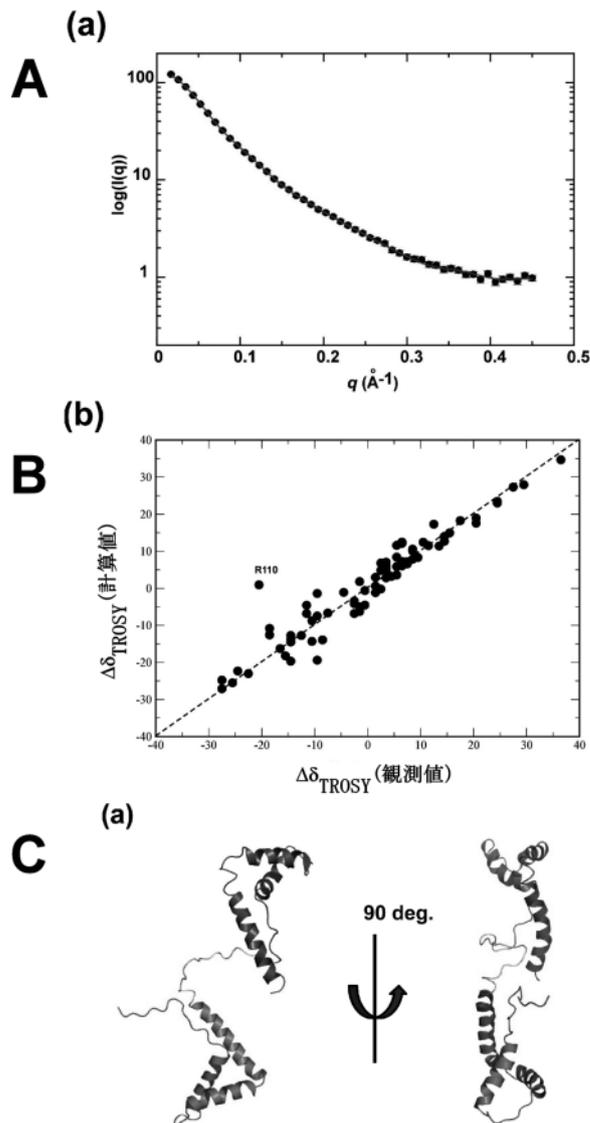


図4 NMR および SAXS 由来の構造制約により決定したモジュラータンパク質 HMGB2 の全体構造

(A) SAXS の散乱データ (●) と、(C) に示す最終構造から逆計算した散乱曲線 (実線) (B) HMGB2 を弱く磁場配向させることで誘導される TROSY シフト ( $\Delta\delta_{\text{TROSY}}$ ) を構造制約 [擬化学シフト異方性テンソル, pseudo chemical shift anisotropy (pCSA) tensor] として決定した (C) の構造から逆計算した  $\Delta\delta_{\text{TROSY}}$  値と観測値との相関。(C) SAXS 散乱曲線と pCSA を同時に構造制約として得た HMGB2 の全体構造の一つ。 $\Delta\delta_{\text{TROSY}}$  から計算される個々のドメインの磁場配向強度から、二つのドメイン相対配向角は 27 度以内で分布することがわかった。

と、アミノ酸配列から立体構造を予測する技術により、タンパク質立体構造を化学シフトのみから決定することが可能となった<sup>25,26)</sup>。アミノ酸配列からタンパク質構造を予測する技術は、低分子量のタンパク質においては、かなり正確に立体構造を予測できるようになっている<sup>27)</sup>。そこで、タンパク質を立体構造予測可能な小さなフラグメントに区切り (隣り合うフラグメントどうしは、配列上重なった部分を含む)、個々のフラグメントに対して配列から予測さ

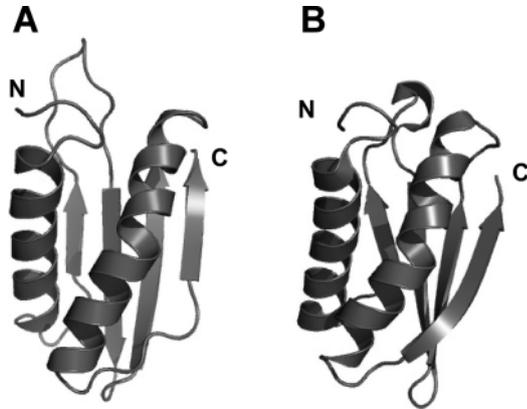


図5 主鎖の化学シフトのみから決定したFliKのC末端ドメインの立体構造

(A) CS-ROSETTAを用いて、主鎖の化学シフトのみから決定したFliK C末端ドメインの立体構造。(B) 通常のNMR構造解析法に従って得たFliK C末端ドメインの立体構造。

れる複数の立体構造を発生させる。予測されたフラグメント構造の中から、実験で得られた主鎖化学シフトデータセットに最も合致するフラグメント構造を選び出す。つぎに、得られた個々の最適なフラグメント構造をつなげる作業を繰り返すことで、観測された全てのNMR化学シフトデータセットを再現するタンパク質の全体構造が決定できる(分子フラグメント置換法, molecular fragment replacement: MFR)<sup>25)</sup>。図5には、細菌のモータータンパク質FliKに対してアミノ酸配列と化学シフト情報を用いて構造予測した例を示す(プログラムCS-ROSETTAを利用)<sup>25)</sup>。FliKは新しいフォールディングモチーフを持つが、上記の計算は、NMRで決定した立体構造と良く一致する立体構造を予測した(図5)<sup>28)</sup>。

NMR化学シフトが、タンパク質の立体構造決定を可能とするに十分な構造情報を持つことを上記で示した。この情報を利用することで溶液中におけるタンパク質構造の存在率を予測することができる<sup>29,30)</sup>。NMR化学シフトは、溶液中におけるタンパク質分子のアンサンブル平均値を与える。したがって、タンパク質が、構造を持つ状態と、変性状態の二状態間の平衡として存在する場合、観測される化学シフトの変性状態の化学シフトからのずれは、溶液中での構造の存在率に依存した値を示す(図6)。化学シフトのもつこの性質を利用することにより、変性状態の化学シフト( $\delta_D$ )と構造を持つ状態での化学シフト( $\delta_F$ )に基づいて、観測されたNMR化学シフト値( $\delta_{obs}$ )から溶液中に存在するタンパク質構造の存在率を決定することができる(図6)<sup>31)</sup>。特定の安定な立体構造が存在しないID領域を対象とする場合には、個々のアミノ酸残基を含む部位がヘリックス、シート構造をとると仮定した場合の化学シフト値 $\delta_F$ を計算により求めることで、観測値 $\delta_{obs}$ から対象とする残基を含む部位の二次構造の存在率を予測することがで

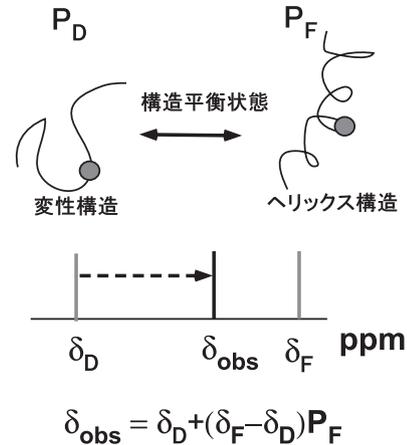


図6 NMR化学シフトを用いる二次構造存在率の計算法

ここでは、タンパク質が変性構造とヘリックス構造の二状態構造間での構造平衡にあると仮定して説明する。 $P_D$ ,  $P_F$ はそれぞれの状態の存在率を表す。 $P_D + P_F = 1.0$ とする。一つのアミノ酸残基(図では●で示す)の主鎖の化学シフトの観測値 $\delta_{obs}$ は、変性状態の化学シフト $\delta_D$ とヘリックス構造をとった時の化学シフト $\delta_F$ の間で、ヘリックス構造の存在率に比例した値をとる。変性状態の主鎖化学シフト $\delta_D$ は、アミノ酸タイプごとに値がわかっている。ヘリックス構造中での主鎖化学シフト値 $\delta_F$ は、ヘリックスの骨格構造を仮定し、前後の配列も考慮することでデータベースから逆計算できる。同様の解析は、シート構造を仮定した場合にも適用できるため、各二次構造の存在率を個別に予測できる。

きる<sup>31)</sup>。

前述のようにID領域は、完全なランダムコイル状態ではなく、動的揺動にありながらも特定の構造を保持しようとする性質を持つ場合がある。また、ID領域がそのような性質を持つ場合、過渡的に形成される低存在率の構造が機能上は重要な役割を持つことが期待される。

私たちは、上記の主鎖の化学シフトを用いた二次構造存在率の解析をコアクチベータータンパク質SRC1(steroid receptor coactivator 1)の長いID領域に適用した。SRC1の当該領域に含まれる二つの核内受容体結合配列(LxxLL配列)のうちのLxxLL-2のN末端側に約15%の存在率のヘリックス構造があることを見いだした(図7)。LxxLL-2は、フルアゴニスト結合型PPAR $\gamma$ (peroxisome proliferator activated receptor gamma)が選択的に結合するモチーフである<sup>32)</sup>。一方でLxxLL-1領域には、10%程度の低存在率のヘリックス構造がC末端領域側に観測された(図7)。この結果から、過渡的に形成されるヘリックス構造の違いにより、LxxLL-2が優先的にフルアゴニスト結合型PPAR $\gamma$ と相互作用する可能性を見いだした(図7)。興味深いことにインドメタシンを基質とするPPAR $\gamma$ はLxxLL-1に優先的に結合することがわかっており<sup>32)</sup>、PPAR $\gamma$ が基質依存的に低存在率の構造を認識して結合すべきモチーフ部を選択する可能性が考えられる。この例から示唆されるように、ID領域が動的揺動の中で形成する低存在率構造の重

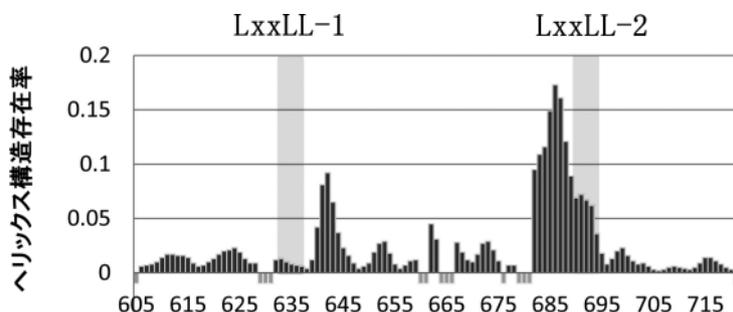


図7 コアクチベーター SRC1 の核内受容体認識領域に誘導される過渡的構造

SRC1 の核内受容体認識配列 (LxxLL モチーフ配列) を 2 箇所含む領域に対して、主鎖化学シフトから、ヘリックス構造の存在率を計算した。LxxLL-2 近傍では N 末端領域に 15% 程度のヘリックス構造形成が予測される。一方、LxxLL-1 領域では、逆に C 末端領域に約 10% のヘリックス構造が形成されることが予測された。二つの LxxLL モチーフ領域には明らかな過渡的構造形成能の違いがある。フルアゴニスト結合型 PPAR $\gamma$  は、LxxLL-2 と優先的に相互作用するが、インドメタシンと結合した PPAR $\gamma$  は LxxLL-1 と強く相互作用する。基質依存的に変化する PPAR $\gamma$  の構造により、SRC1 の過渡的構造が識別されると考えられる。

要性は今後注意深く検証されるべき課題であると考えられる。

残余双極子効果 (residual dipolar coupling : RDC) も、化学シフト同様に溶液中に存在する多様な構造のアンサンブル平均値を与える。このため、溶液中で形成される過渡的構造の存在率を予測する目的に利用できる<sup>33)</sup>。RDC を利用する構造アンサンブル計算では、磁場配向した液晶中でのタンパク質分子の配向を予測するシミュレーションを併用するなど特殊な計算過程を必要とする。しかし、化学シフトを用いる解析と異なり、二次構造の存在率だけではなく、二次構造を持つセグメント間の相対配向まで決定できるという大きな利点がある<sup>34)</sup>。RDC のみではセグメント間の相対配向角情報しか与えないので、全体構造を決定するには情報が不足する。上記 HMG タンパク質の構造解析で示したように (図 4)、RDC から得られるセグメント間配向角度情報に加えて、SAXS から得られる分子回転半径・分子形態情報を用いることで、より精密な ID 領域の溶液中での存在状態を明らかにできる<sup>35)</sup>。ID 領域の動的な構造特性を明らかにするために、様々な構造解析技術を併用した新たなタンパク質構造研究が進められつつある<sup>23, 36, 37)</sup>。

## 5. おわりに

静的なタンパク質構造に基づいたタンパク質の構造-機能相関の概念は、タンパク質の機能制御機構の解明という目的においては、その一面しか捉えていない。構造ゲノムプロジェクトにより、膨大なタンパク質立体構造情報を蓄積したおかげで、従来のタンパク質構造-機能相関という概念の限界も明らかになった。しかし、一方で膨大に蓄積されたタンパク質構造情報は、知識ベースのタンパク質構

造解析技術を格段に進めることに寄与し、NMR を用いた溶液中におけるタンパク質の構造存在率の予測を可能とするなど、新しい構造研究を可能とした。ID 領域に生じる過渡的な構造の実像を捉え、その機能上の役割を明らかにするためには、この新たな研究手法は非常に重要な役割を持つはずである。

安定な立体構造を保持するタンパク質に内在する揺らぎと機能の相関は、活性部位から離れた位置における翻訳後修飾が、機能変調を誘導する「バタフライ効果」を与える可能性を示唆する。タンパク質の機能制御機構を考える上では、従来のように静的な最安定構造のみに着目した議論では限界があり、揺らぎにより誘導される低存在率のタンパク質構造 (励起構造) が持つ役割をも考慮することが必要になるだろう。

タンパク質の揺らぎと機能の相関の解明を目指した研究を進めるためには、様々な計測技術を組み合わせることに加えて、知識ベースの構造解析法を併用することが必ず求められる。タンパク質の構造-機能相関という概念に導かれて進められた構造ゲノムプロジェクトの成果の上に、タンパク質の構造揺らぎと機能制御機構の関係をつなぐ概念構築に向けた新しいタンパク質構造研究が進められつつある。

## 謝辞

本稿で紹介した私たちの研究は、科学技術振興機構 (JST) ・さきがけ、および先端計測事業の支援を受けて行った。また、文部科学新学術領域「揺らぎと生体機能」(領域代表・寺島正秀) では、研究費支援のみならず様々な有益な議論を頂いた。ストップドフロー実験は、分子

研・桑島邦博教授との共同研究として行った。記して感謝申し上げる。DHFRの研究は、当研究室・大前英司博士と月向邦彦名誉教授との共同研究である。SRC1の構造解析研究は本研究室 JST 研究員・橋本愛美さんと進めた研究成果である。CS-ROSETTAによる構造予測は阪大・蛋白質研 小林直宏博士との共同研究として行った。

## 文 献

- 1) Hamaguchi, K. (1992) *The Protein Molecule*, pp. 115–160, Springer-Verlag, New York.
- 2) Ohmae, E., Iriyama, K., Ichihara, S., & Gekko, K. (1996) *J. Biochem.*, **119**, 703–710.
- 3) Horiuchi, Y., Ohmae, E., Tate, S., & Gekko, K. (2010) *Biochim. Biophys. Acta*, **1804**, 846–855.
- 4) van Wijk, S.J.L., Melquiond, A.S.J., de Vries, S.J., Timmers, H.T.M., & Bonvin, A.M.J.J. (2012) *PLoS Comput. Biol.*, **8**, e1002754.
- 5) Kay, L.E. (2005) *J. Magn. Reson.*, **173**, 193–207.
- 6) Neudecker, P., Lundström, P., & Kay, L.E. (2009) *Biophys. J.*, **96**, 2045–2054.
- 7) McElheny, D., Schnell, J.R., Lansing, J.C., Dyson, H.J., & Wright, P.E. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 5032–5037.
- 8) Agarwal, P.K., Billeter, S.R., Rajagopalan, P.T., Benkovic, S.J., & Hammes-Schiffer, S. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 2794–2799.
- 9) Andrews, J., Fierke, C.A., Birdsall, B., Ostler, G., Feeney, J., Roberts, G.C.K., & Benkovic, S.J. (1989) *Biochemistry*, **28**, 5743–5750.
- 10) Hammes, G.G., Benkovic, S.J., & Hammes-Schiffer, S. (2011) *Biochemistry*, **50**, 10422–10430.
- 11) Dunker, A.K., Brown, C.J., Lawson, J.D., Iakoucheva, L.M., & Obradović, Z. (2002) *Biochemistry*, **41**, 6573–6582.
- 12) Dunker, A.K.O., Z., Romero, P., Garner, E.C., & Brown, C.J. (2000) *Genome Informatics*, **11**, 161–171.
- 13) Dyson, H.J. & Wright, P.E. (2005) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **6**, 197–208.
- 14) Mittag, T., Kay, L.E., & Forman-Kay, J.D. (2010) *J. Mol. Biol.*, **23**, 105–116.
- 15) Borg, M., Mittag, T., Pawson, T., Tyers, M., Forman-Kay, J.D., & Chan, H.S. (2007) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 9650–9655.
- 16) Tsunaka, Y., Toga, J., Yamaguchi, H., Tate, S., Hirose, S., & Morikawa, K. (2009) *J. Biol. Chem.*, **284**, 24610–24621.
- 17) Hashimoto, M., Koder, N., Tsunaka, Y., Oda, M., Tanimoto, M., Ando, T., Morikawa, K., & Tate, S. (2013) *Biophys. J.*, **104**, 2222–2234.
- 18) Ohnishi, S., Kamikubo, H., Onitsuka, M., Kataoka, M., & Shortle, D. (2006) *J. Am. Chem. Soc.*, **128**, 16338–16344.
- 19) Basharov, M.A. (2012) *Indian J. Biochem. Biophys.*, **49**, 7–17.
- 20) Matsuo, K., Watanabe, H., Tate, S., Tachibana, H., & Gekko, K. (2009) *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, **77**, 191–201.
- 21) Flory, D.J. (1953) *Principles of Polymer Chemistry*, Cornell University Press, Ithaca, New York.
- 22) Thomas, J.O. (2001) *Biochem. Soc. Trans.*, **29**, 395–401.
- 23) Uewaki, J.-i., Kamikubo, H., Kurita, J.-i., Hiroguchi, N., Moriuchi, H., Yoshida, M., Kataoka, M., Utsunomiya-Tate, N., & Tate, S. (2013) *Chem. Phys.*, **419**, 212–223.
- 24) Wishart, D.S. & Case, D.A. (2002) in *Methods in Enzymology* (Thomas, L. James, V.D.U.S., eds.), Vol. 338, pp. 3–34, Academic Press, New York.
- 25) Shen, Y., Lange, O., Delaglio, F., Rossi, P., Aramini, J.M., Liu, G., Eletsky, A., Wu, Y., Singarapu, K.K., Lemak, A., Ignatchenko, A., Arrowsmith, C.H., Szyperski, T., Montelione, G.T., Baker, D., & Bax, A. (2008) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 4685–4690.
- 26) Shen, Y. & Bax, A. (2010) *J. Biomol. NMR*, **48**, 13–22.
- 27) Bradley, P., Misura, K.M.S., & Baker, D. (2005) *Science*, **309**, 1868–1871.
- 28) Mizuno, S., Amida, H., Kobayashi, N., Aizawa, S.-I., & Tate, S. (2011) *J. Mol. Biol.*, **409**, 558–573.
- 29) Kohlhoff, K.J., Robustelli, P., Cavalli, A., Salvatella, X., & Vendruscolo, M. (2009) *J. Am. Chem. Soc.*, **131**, 13894–13895.
- 30) Cavalli, A., Salvatella, X., Dobson, C.M., & Vendruscolo, M. (2007) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **104**, 9615–9620.
- 31) Camilloni, C., De Simone, A., Vranken, W.F., & Vendruscolo, M. (2012) *Biochemistry*, **51**, 2224–2231.
- 32) Leo, C. & Chen, J.D. (2000) *Gene*, **245**, 1–11.
- 33) Jensen, M.R., Salmon, L., Nodet, G., & Blackledge, M. (2010) *J. Am. Chem. Soc.*, **132**, 1270–1272.
- 34) Zweckstetter, M. (2008) *Nat. Protocols*, **3**, 679–690.
- 35) Putnam, C.D., Hammel, M., Hura, G.L., & Tainer, J.A. (2007) *Q. Rev. Biophys.*, **40**, 191–285.
- 36) Tate, S., Imada, A., & Hiroguchi, N. (2011) in *Current Trends in X-ray Crystallography* (Chandrasekaran, A. ed), pp. 409–436, InTech, Rijeka, Croatia.
- 37) Tate, S. (2008) *Anal. Sci.*, **24**, 39–50.