

特集：無細胞生命科学の創成

無細胞タンパク質合成系を用いた効率的なタンパク質 NMR 解析

河野俊之

NMR (核磁気共鳴) 法によるタンパク質の立体構造が最初に報告されてから 20 年ほどがすぎた, その間に, 装置, 試料調製技術, 測定技術等が急速に進歩し, タンパク質の NMR は, さまざまな分野で利用されている. しかし, タンパク質 NMR の技術はまだまだ発展・改善の余地がある. 我々は, これからのタンパク質 NMR 技術の発展・改善のためには無細胞タンパク質合成系が大きな役割を果たすと考えている. そこで, 本稿では, まず, タンパク質の NMR 解析の現状について概説する. そして, 現状におけるタンパク質 NMR 解析における問題点を解決するために我々が開発してきた, 無細胞タンパク質合成系を用いた新しいタンパク質 NMR 解析技術 (無精製測定法, 完全選択的アミノ酸標識法, 新規の NMR シグナル帰属方法) について述べる.

はじめに

NMR (核磁気共鳴) 法は, 1940~1950 年代にかけて核スピンや電子スピンと NMR 現象が発見されて以来, 50 年以上の歴史を持っている. しかし, タンパク質の NMR 解析に関しては, 1980 年代に, Wüthrich (2002 年ノーベル化学賞受賞) 等によって世界で初めて NMR によるタンパク質の立体構造の決定が報告¹⁾されてから立体構造レベルでの議論が可能になってきた. その後, タンパク質の NMR 解析はめざましい発展をとげた. 特に, 1990 年代になって¹³C/¹⁵N の安定同位体標識導入と三次元 NMR による解析の開発²⁾により, 解析可能なタンパク質の分子量が数万までの範囲に広がり, タンパク質の NMR 解析に新たな視点を与えた. また, 1997 年に発表された TROSY (transverse relaxation optimized spectroscopy) 法³⁾により, 解析可能なタンパク質の分子量がさらに増大した. また, 残余双極子相互作用を用いて立体構造情報を得る方法^{4~6)}, 立

体的に安定同位体標識されたアミノ酸を用いることにより分子量 5 万程度のタンパク質でも立体構造を正確に決定できる SAIL (stereo-array isotope labeling) 法^{7,8)}など, 現在でも様々な方法が開発されている. NMR 装置自体についてもこの間の進歩は著しいものがあり, 磁場勾配法による選択的なシグナル検出の実用化⁹⁾, 900MHz を超える超高磁場マグネットの実用化, シグナル検出コイルと増幅器を極低温にすることにより感度を 3 倍以上向上させた cryogenic probe^{10,11)}など, タンパク質 NMR 研究を支える様々な新技術が導入されている. また, タンパク質の NMR 解析には安定同位体標識の導入が必須であり, 近年の NMR の進歩はタンパク質の大量発現・精製技術とも密接に関連している. 本稿では, タンパク質の NMR 解析の概略について述べるとともに, 無細胞タンパク質合成系を用いた効率の良いタンパク質 NMR 解析方法に関する我々の研究について紹介する.

1. タンパク質の NMR 解析から得られる情報

NMR には様々な測定法があり, それぞれの測定によってタンパク質の立体構造に関する様々な情報が得られる. まず, タンパク質の NMR 解析を行うにあたり, ほぼ必ず測定を行う¹H-¹⁵N HSQC 法^{12~15)}について説明する. ¹H-¹⁵N HSQC (hetero-nuclear single quantum coherence) 法とは共有結合した水素原子と窒素原子の相関シグナルを検出する

三菱化学生命科学研究所 (〒194-8511 東京都町田市南大谷 11 号)

Efficient protein NMR analyses by using cell-free protein synthesis system

Toshiyuki Kohno (Mitsubishi Kagaku Institute of Life Sciences (MITILS), 11 Minamiooya, Machida, Tokyo 194-8511, Japan)

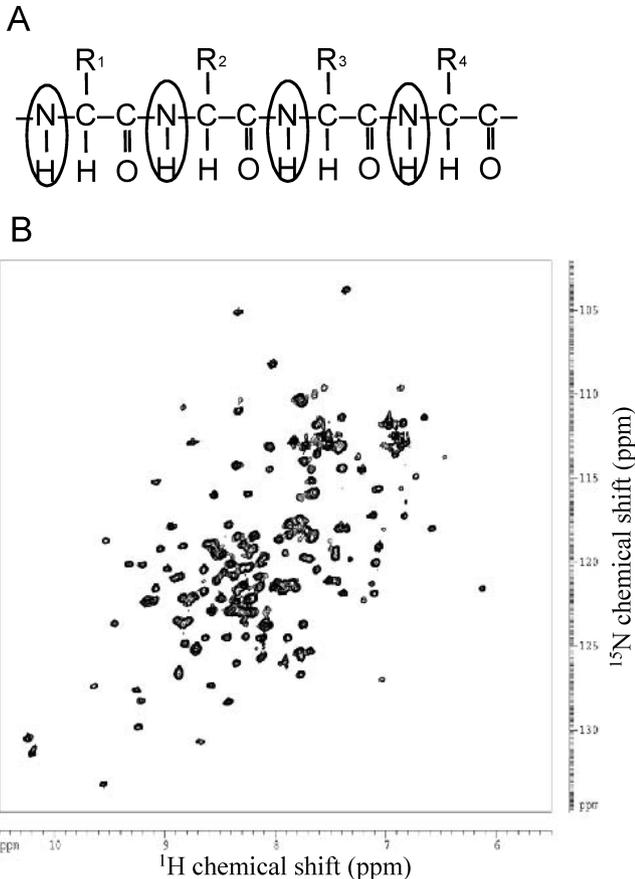


図1 A. タンパク質の構造式. B. タンパク質の ^1H - ^{15}N HSQC スペクトル

Aで○で囲んだHとNの組み合わせ一つにつきBのスペクトルで一つのシグナルが得られる。

方法である。タンパク質の主鎖にはおおよそのアミノ酸残基にアミド基が存在し、共有結合している水素原子と窒素原子の組み合わせが存在する（プロリンを除く）。 ^1H - ^{15}N HSQCを測定することによりそれらの水素原子と窒素原子の組み合わせ一つにつき一つのシグナルが得られる（図1）。 ^1H - ^{15}N HSQC測定法をタンパク質に適用するためには通常 ^{14}N である窒素原子を観測可能な核磁気を持つ ^{15}N に置換しなくてはならない。通常、 ^1H - ^{15}N HSQCスペクトルを測定して目的タンパク質がきちんとした立体構造を持つことを確認した後、問題が無ければ次のNMRシグナルの帰属のステップに進む。以下に、それらの方法の概略を述べる。

(1) タンパク質 NMR シグナルの帰属

タンパク質のNMR解析においては、NMR測定に有効な原子核である水素 (^1H)、炭素 (^{13}C)、窒素原子 (^{15}N) の情報を最大限に利用するために、目的タンパク質を安定同位体元素 (^{13}C や ^{15}N) で標識する。安定同位体標識した目的タンパク質を精製し、通常は1mM程度まで濃縮し、室温以上の測定温度でさまざまな三次元NMRの測定を行

い、それぞれのシグナルがどのアミノ酸残基のどの原子由来のものであるかを帰属する。この帰属の作業は従来数カ月から数年かかるような大変な作業であったが、コンピュータ上で自動的に行うプログラムが近年開発され¹⁶⁾、100残基程度のタンパク質であれば1日で帰属を完了することも可能となった。また、タンパク質中の側鎖の水素原子を重水素に置換することによってシグナルの感度が大幅に増大する¹⁷⁾ので、上記の方法と併用されている。しかし、200-300残基を超えるようなタンパク質に関しては、シグナルの帰属はまだ大変な作業で、数カ月以上かかることも珍しくない。

(2) NMRによるタンパク質の立体構造決定

NMRを用いてタンパク質の立体構造を決定する場合には、上述したNMRシグナルの測定及び帰属を行ったのち、立体構造情報を得るためのNMRスペクトルの測定及び解析を行う。立体構造情報としては主に、NOE (nuclear Overhauser effect) と呼ばれる各水素原子間の距離情報 (5 Å以内) と、分子内の各二面角の角度情報を用いる。そして、数百から数千の水素原子間距離情報、二面角角度情報を抽出し、コンピュータでそれらの測定値を満たすような立体構造を計算する。このNOE情報の帰属についても、現在では、あいまいな帰属情報をもとに仮の立体構造を計算し、そこから測定データへのフィードバックをすることで自動的に解析を進めていくプログラムが進歩し^{18,19)}、200残基程度までのタンパク質については自動的に計算可能な状況になっている。最近、目的タンパク質を弱く配向させることで、タンパク質の中のそれぞれのN-Hの静磁場に対する角度を得ることができる残余双極子法が開発され⁴⁻⁶⁾、NOEを用いる従来の立体構造決定法と併用されている。また、立体選択的に安定同位体標識されたアミノ酸を用いることにより分子量5万程度のタンパク質でも立体構造を正確に決定できるSAIL法が開発されている^{7,8)}。

(3) NMRによる相互作用解析

NMRの化学シフト (chemical shift) が周囲の環境に応じて鋭敏に変化することを利用して、 ^1H - ^{15}N HSQCスペクトルを用いた、タンパク質-タンパク質相互作用、タンパク質-核酸相互作用、タンパク質-低分子相互作用の解析が広く行われている。タンパク質-低分子相互作用を例にあげると、まず目的タンパク質単独での ^1H - ^{15}N HSQCスペクトルを測定し、次に結合する低分子を混合した状態で ^1H - ^{15}N HSQCスペクトルを測定する。低分子 (図2A) が特異的に結合した場合、結合部位の近傍にある目的タンパク質のアミド基N-Hに対応したシグナルだけが移動する (図2B)。移動したシグナルがどのアミノ酸残基由来のものが分かれば、低分子の結合に関与する残基が特定できる。目的タンパク質の立体構造が分かれば、立体構造上での低分子の結合部位が特定できる (図2C)。この

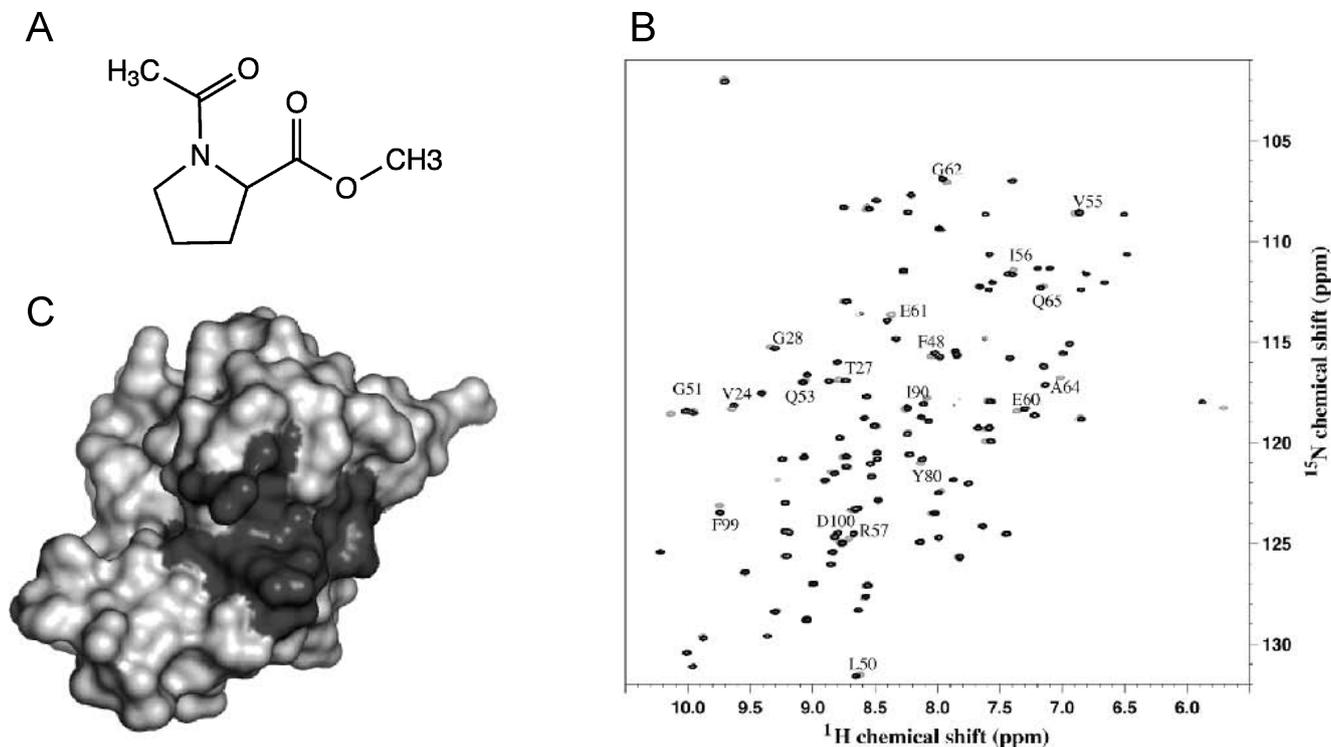


図2 ^1H - ^{15}N HSQC スペクトルを用いた低分子のタンパク質結合部位の同定

A. 1-アセチルピロリジンメチルエステル (ACPM) の構造式. B. ヒト FKBP (FK506 binding protein) タンパク質の ^1H - ^{15}N HSQC スペクトル及びそれに ACPM を結合させた時の ^1H - ^{15}N HSQC スペクトルの重ね合わせ. ACPM を結合させた時に移動したシグナルのみ残基番号を記した. C. B で得られたシグナルが移動した残基をヒト FKBP タンパク質の立体構造上で表示したもの. 影をつけた部分の残基のシグナルが移動しており, その部分が ACPM の結合部位であることが分かる.

方法を応用して, 病因タンパク質に結合する薬のリード化合物のスクリーニングやデザインにも NMR が用いられている^{20,21)}. また, タンパク質-タンパク質やタンパク質-膜相互作用の解析にはより高精度の結果が得られる saturation transfer 法が提案され^{22,23)} 利用されている. ^1H - ^{15}N HSQC 法は, タンパク質の NMR 測定において最も感度の高い方法の一つであり, 1 回の測定が数分から数十分程度で終了するので, 立体構造情報を含む相互作用解析法としては最もパワフルなものの一つである. しかし, 移動したシグナルのアミノ酸残基を特定するためには, 前述したシグナルの帰属が必要であり, 上述のように 200-300 残基以上のタンパク質については, シグナルの帰属に数カ月以上かかることが多い.

(4) 運動性やフォールディングの解析

NMR を用いれば, ^1H - ^{15}N NOE, 緩和速度の解析などを行うことによって, 目的タンパク質の残基ごとに詳細な運動性の解析ができる^{24,25)}. X 線結晶解析では電子密度が見えないような運動性の高い部分でも NMR ではシグナルとして観測できるので解析が可能である. また, 変性巻き戻しとアミド水素の重水素置換反応を組み合わせることにより, タンパク質のフォールディングの過程をモニターすることが可能である²⁶⁾.

2. NMR 解析のためのタンパク質調製方法

前項でタンパク質の NMR 解析について概説したが, それらの解析方法は安定同位体標識の導入の上に成り立っている以上, 目的タンパク質をいかに調製するかが, 最も重要な課題である. 高純度の目的タンパク質をミリグラム単位で安定同位体標識を行うためには, コストの都合上, 組換え大腸菌を用いた大量発現系が最も多く用いられている. 大腸菌の場合には, 炭素源としてグルコース, 窒素源として塩化アンモニウムなどの安定同位体源を用いる. 大腸菌以外では, 酵母の *Pichia pastoris* を用いた発現系²⁷⁾ や昆虫細胞を用いた発現系²⁸⁾ などが報告されているが例は少ない.

これらの, 生細胞を用いたタンパク質調製法と比較して様々な優れた特徴を持つ無細胞タンパク質合成系が次第に使われ始めている. 一般的に無細胞タンパク質合成系は大腸菌, コムギ胚芽, ウサギ網状赤血球由来であり^{29,30)}, 最近では昆虫細胞由来の無細胞タンパク質合成系も使われ始めている^{31,32)}. しかし, コストの問題等から, 現実的にタンパク質の NMR 解析に利用できる無細胞タンパク質合成系は現在のところ大腸菌由来のものと同様にコムギ胚芽由来のものだけである. 大腸菌の無細胞タンパク質合成系について

は、1988年ロシアのSpirinらが発表した連続系無細胞タンパク質合成システム³³⁾以来、ミリグラム単位のタンパク質合成系としてNMR測定に必要な量を合成することが可能になり^{34,35)}、近年ではリボソーム以外の全てのタンパク質因子を再構成したPURESYSTEMも報告されている³⁶⁾。また、コムギ胚芽無細胞タンパク質合成系については、40年ほど前から報告されている³⁷⁾ものの、近年までラジオアイソトープで標識したタンパク質が検出できる程度の合成量が低いものであった。しかし、2000年になってタンパク質合成量が飛躍的に向上する改良が行われ^{38~40)}、タンパク質NMR解析に用いられ始めている^{41~43)}。大腸菌無細胞タンパク質合成系はロシュ・アプライド・サイエンス社やポストゲノム研究所から入手できる。また、コムギ胚芽無細胞タンパク質合成系は、東洋紡、セルフリースサイエンス社、ゾイゼン社などから入手できる。

3. コムギ胚芽無細胞タンパク質合成系とタンパク質NMR

我々は、コムギ胚芽無細胞タンパク質合成系を用い、NMR解析用のタンパク質試料を調製するとともに様々な技術開発を行っている。このタンパク質合成系の特徴の一つに、プロテアーゼやヌクレアーゼなどの分解酵素の混入が非常に少ないことがあげられる。また、コムギ胚芽無細胞合成系は、大腸菌と違って真核細胞由来であるので、真核生物であるヒトやマウスなどのタンパク質を合成する場合において有利であることも特徴の一つである。実際に筆者らの研究室でも、大腸菌では発現時に凝集してしまうようなヒト由来のタンパク質でコムギ胚芽無細胞合成系では可溶性として得られるものも多い。また、昆虫細胞を用いてもマイクログラム程度しか得られないヒト由来のタンパク質がコムギ胚芽無細胞系ではミリグラム単位で得られた例もある。

(1) コムギ胚芽無細胞タンパク質合成系と無精製NMR解析

我々は、プロテアーゼの混入が非常に少ないコムギ胚芽無細胞タンパク質合成系を用いれば、目的タンパク質を精製せずにNMRスペクトルが観測できるのではないかと考えた。基質のアミノ酸に安定同位体標識されたものを用いて目的のタンパク質を合成すれば、合成後に安定同位体標識されているのは目的タンパク質だけであるので、多核NMR測定法を用いることで目的タンパク質のシグナルだけを選択的に観測できるはずである。

我々は、酵母ユビキチンを目的タンパク質の例として、大腸菌の生合成系で¹⁵N安定同位体標識したのち高度に精製したもの、コムギ胚芽無細胞合成系で¹⁵N標識されたアミノ酸を基質として合成し、無精製のまま測定バッファーに置換したものを、市販の大腸菌無細胞合成系で同じく¹⁵N

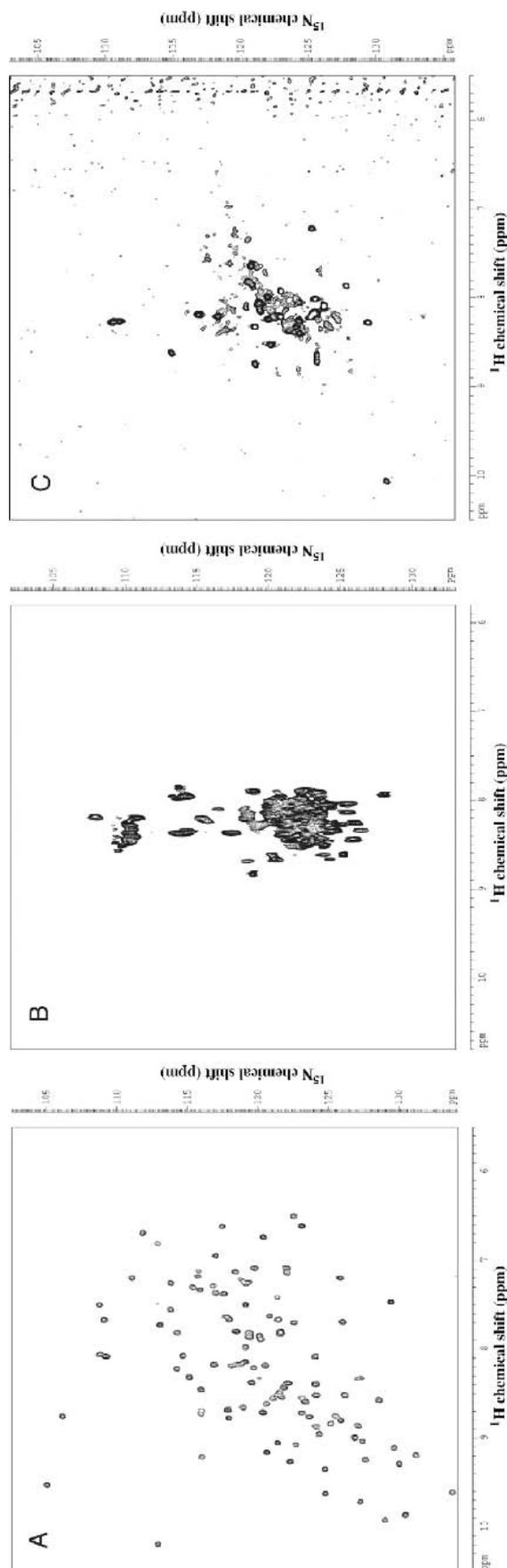


図3 ¹H-¹⁵N HSQC スペクトルを用いたさまざまなタンパク質の立体構造の判定例
A. 正しい立体構造を持つタンパク質、B. 特定の立体構造を持たないタンパク質、C. 部分的に凝集を起こしているタンパク質。

標識されたアミノ酸を基質として合成し、無精製のまま測定バッファーに置換したものの3種類を調製した。それぞれについて ^1H - ^{15}N HSQC スペクトルを測定し比較したところ、高度に精製したユビキチンのスペクトルとコムギ胚芽無細胞系で合成後、無精製のまま測定したユビキチンのスペクトルは全く同一であった。しかし、大腸菌無細胞タンパク質合成系で合成し、無精製のまま測定したスペクトルにおいては、ユビキチンタンパク質のものではないNMRシグナルが観測された。これらの結果より、大腸菌無細胞タンパク質合成系で安定同位体標識したタンパク質は精製しなければ多次元NMR測定が可能ではないが、コムギ胚芽無細胞タンパク質合成系を用いた安定同位体標識したタンパク質は、精製しなくても数カ月安定であり、長時間にわたる各種多次元NMR測定にも耐えられることがわかった^{41,42}。そこで我々は、この系を目的タンパク質がきちんとした立体構造を持っているかどうかの判定にも用いている。前述のように、 ^1H - ^{15}N HSQC スペクトルにおけるシグナルの分散の仕方はそのタンパク質の立体構造を反映しており、特定の立体構造を持つタンパク質の ^1H - ^{15}N HSQC

ペクトルではシグナルが良く分散する(図3A)。しかし、特定の二次構造を持たないタンパク質の ^1H - ^{15}N HSQC スペクトルはシグナルが中心に集まる(図3B)。また、部分的にあるいは完全に凝集しているタンパク質の場合には ^1H - ^{15}N HSQC のシグナルはほとんど見えないか、見えても非常に線幅の太いシグナルとなる(図3C)。このようにして、目的タンパク質が解析に適しているかどうかを迅速に判定することが可能である。

(2) コムギ胚芽無細胞タンパク質合成系を用いた完全選択的アミノ酸標識法

^1H - ^{15}N HSQC スペクトルのシグナルの帰属を行うためには、通常 $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ で均一標識されたタンパク質を用いて、三次元NMR等の測定を行った後に複雑なスペクトル解析を行う必要がある。しかし、それぞれのシグナルがどのアミノ酸に属するものかが分かれば、複雑なシグナル帰属を単純化することが可能である。そのために、シグナルを観測したいアミノ酸残基だけに選択的に安定同位体標識を行うアミノ酸選択的標識法が行われてきた。その例を図4に示す。従来のアミノ酸選択的標識法は、目的タンパク質を

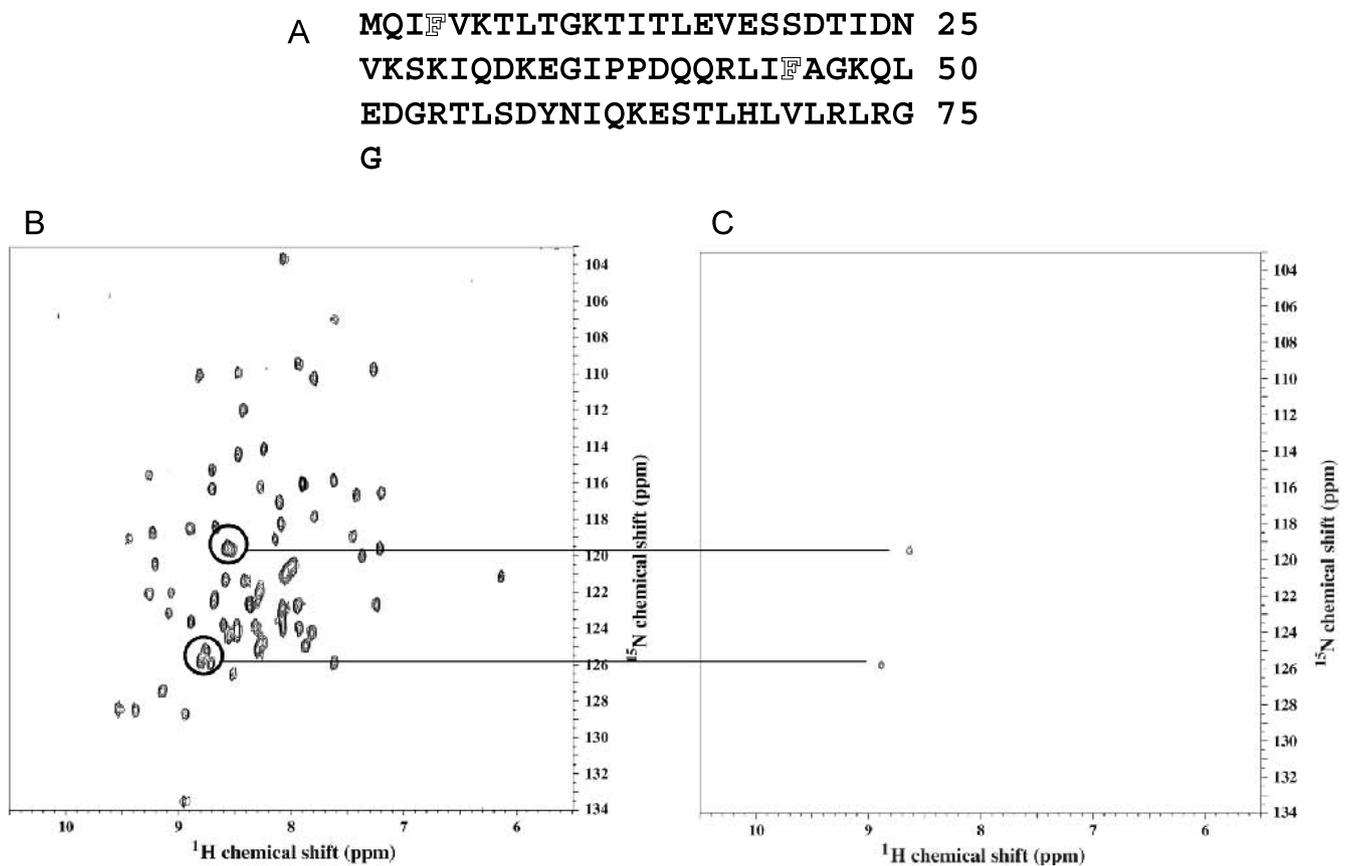


図4 アミノ酸選択的標識法

A. 酵母ユビキチンのアミノ酸配列。フェニルアラニン残基(2カ所)を白抜きで示した。B. ^{15}N 全標識した酵母ユビキチンの ^1H - ^{15}N HSQC スペクトル。C. フェニルアラニン残基だけを ^{15}N 標識した酵母ユビキチンの ^1H - ^{15}N HSQC スペクトル。Cでは2残基に対応した二つのシグナルが観測され、Bの ^1H - ^{15}N HSQC スペクトルと対応させることによりフェニルアラニン残基由来のHNシグナルが同定できる。

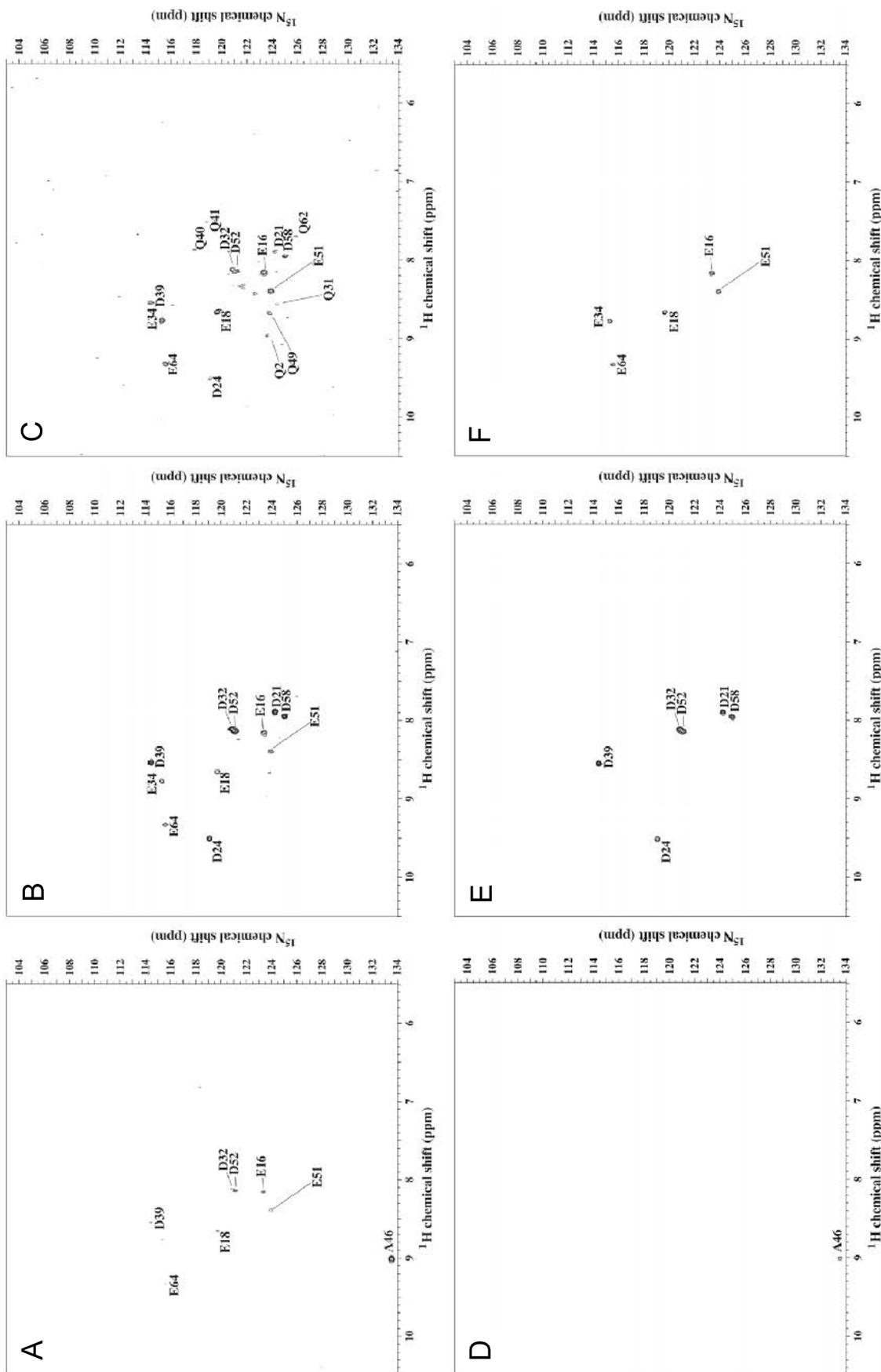


図5 コムギ胚芽無細胞タンパク質合成系によるアミノ酸完全選択的標識

A, D. アラニンだけを ^{15}N 標識した酵母ユビキチンの ^1H - ^{15}N HSQC スペクトル。 B, E. アスパラギン酸だけを ^{15}N 標識した酵母ユビキチンの ^1H - ^{15}N HSQC スペクトル。 C, F. グルタミン酸だけを ^{15}N 標識した酵母ユビキチンの ^1H - ^{15}N HSQC スペクトル。

A, B, Cは、アミノ酸代謝酵素の阻害剤を加えずにタンパク質合成したもの、D, Eはアミノ酸代謝酵素を1mM加えてタンパク質合成したもの、Fはアミノ酸代謝酵素を1mM及びL-メチオニン0.1mM加えてタンパク質合成したもの。

組換え体として大腸菌で発現させる時に、培地に標識したいアミノ酸を加えておくものであった。しかし、生きている大腸菌を用いるので、取り込まれた標識アミノ酸は、アミノ酸の代謝経路に入り、目的のアミノ酸以外のアミノ酸に安定同位体標識が拡散してしまうという問題があり、その用途が限られていた⁴⁴⁾。これを防ぐために、アミノ酸要求株などアミノ酸のスクランブルが少ない特殊な大腸菌株を用いるなどの方法がとられていたが、生きている細胞を用いる以上、完全に拡散を止めることは不可能であり、実際に使える用途はかなり限られていた。それに対して、コムギ胚芽無細胞タンパク質合成系は、アミノ酸代謝系酵素が含まれていないか、含まれていても適切な方法を使ってその働きを抑えることが可能であると期待される。

そこで筆者らは、コムギ胚芽無細胞タンパク質合成系を用い、酵母ユビキチンをモデルタンパク質として、20種類のアミノ酸のそれぞれが選択的に安定同位体標識可能かどうかを調べた。すると17種類のアミノ酸については、特に手を加えることなく完全選択的な安定同位体標識が可能であることがわかった。しかし、アラニン、アスパラギン酸、グルタミン酸の3種類については、コムギ胚芽に含まれているアミノ酸代謝酵素により安定同位体標識が拡散してしまうことがわかった。具体的には、アラニンだけを¹⁵N安定同位体標識し、他のアミノ酸を標識しないものを基質として酵母ユビキチンを合成し、¹H-¹⁵N HSQCの測定を行ったところ、アラニン残基由来のシグナルに加えて、グルタミン酸残基やアスパラギン酸残基のシグナルも観測された(図5A)。同様にアスパラギン酸だけを¹⁵N安定同位体標識したものを基質にした場合は、アスパラギン酸残基由来のシグナルに加えて、グルタミン酸残基由来のシグナルも観測された(図5B)。また、グルタミン酸だけを¹⁵N安定同位体標識したものを基質にした場合は、グルタミン酸残基由来のシグナルに加えて、アスパラギン酸残基とグルタミン残基由来のシグナルが観測された(図5C)。これらのアミノ酸の変換は、コムギ胚芽抽出液に残存するトランスアミナーゼ及びグルタミンシンターゼによるものと考えられた。そこで、トランスアミナーゼ阻害剤であるアミノオキシ酢酸を、タンパク質合成反応液に添加して選択的標識を行ったところ、アラニン→グルタミン酸、アスパラギン酸→グルタミン酸、グルタミン酸→アスパラギン酸の転移を完全に抑えることができた(図5DE)。また、アミノオキシ酢酸では、グルタミン酸→グルタミンの転移を抑えることができなかったが、グルタミンシンターゼの阻害剤であるL-メチオニンスルフォキシミンをタンパク質合成反応液に添加しておくことにより転移を抑制することがわかった(図5F)。最終的には、これら2種類のアミノ酸代謝酵素阻害剤をタンパク質合成液に添加しておくことで、20種類どのアミノ酸でも完全選択的に安定同位

体標識を行うことが可能になった⁴⁵⁾。

(3) 完全選択的アミノ酸標識法をベースにした新規NMRシグナル帰属方法

従来の三次元NMRを用いたNMRシグナルの帰属方法は、タンパク質のNMRシグナルを全て帰属可能なパワフルな方法であるが、適用可能なタンパク質は、低分子量でかつ高濃度(300 μ M–1mM以上)で溶解し、しかも室温以上での長時間の測定(数週間)に耐える安定なものである必要がある。また、高分子量タンパク質になるとTROSYなどの方法をもってしても感度の低下が避けられず、さらに高濃度の試料が必要となり、適用可能なタンパク質が非常に限られているのが現状であった。また、100残基程度の小さなタンパク質については、解析にかかる時間も数週間程度であるが、300残基を超えるようなタンパク質の場合、測定から解析が終わるまで1年以上かかることも珍しくなく、汎用的な解析手法とは言い難い面もあった。一方、感度の高い帰属方法として、一つのアミノ酸のカルボニル基を¹³C標識し、別の一つのアミノ酸を¹⁵N標識し、CとNの相関スペクトルを測定することで帰属を行うダブルラベル法が報告されている⁴⁶⁾が、この方法では全てのシグナルの帰属をするのは困難であった。筆者らは、これらの問題点を解決するために、上述のアミノ酸完全選択的標識法を基に、三次元NMR法とダブルラベル法の長所を合わせた新規方法(MAGICAL(method for assignment with intelligent combinatorial amino acid labeling)法)を考案した。その方法では、目的タンパク質をアミノ酸の種類ごとに¹³C/¹⁵N標識アミノ酸と¹⁵N標識アミノ酸を系統的に組み合わせる。このような標識タンパク質を用いることにより、30–200 μ M程度の低濃度で1日程度安定に保てるタンパク質であれば、300残基以上のタンパク質であっても二次元NMR測定のみを用いて数週間程度でシグナルの完全帰属が可能になった。以下にその方法の概略を説明する。

1種類のアミノ酸残基のみを選択的に¹³C/¹⁵N二重標識し、その他の19種類のアミノ酸残基を¹⁵Nのみで標識した目的タンパク質を20種類調製する。そして、それらの標識タンパク質それぞれについて二次元HN(CA)及び二次元HN(CO)を測定する。HN(CA)スペクトルでは、¹³C/¹⁵N標識されたアミノ酸残基とその後ろのアミノ酸残基のHNシグナルが得られる。またHN(CO)スペクトルでは、¹³C/¹⁵N標識したアミノ酸残基の後ろの残基のHNシグナルだけが得られる。図6に具体例を示す。図6A、Bは、それぞれフェニルアラニン残基を¹³C/¹⁵N標識し、その他19種類のアミノ酸残基を¹⁵Nのみで標識した大腸菌チオレドキシントタンパク質のHN(CA)及びHN(CO)スペクトルである。図6AのHN(CA)で観測されているHNシグナルのうち、図6BのHN(CO)で観測されているHN

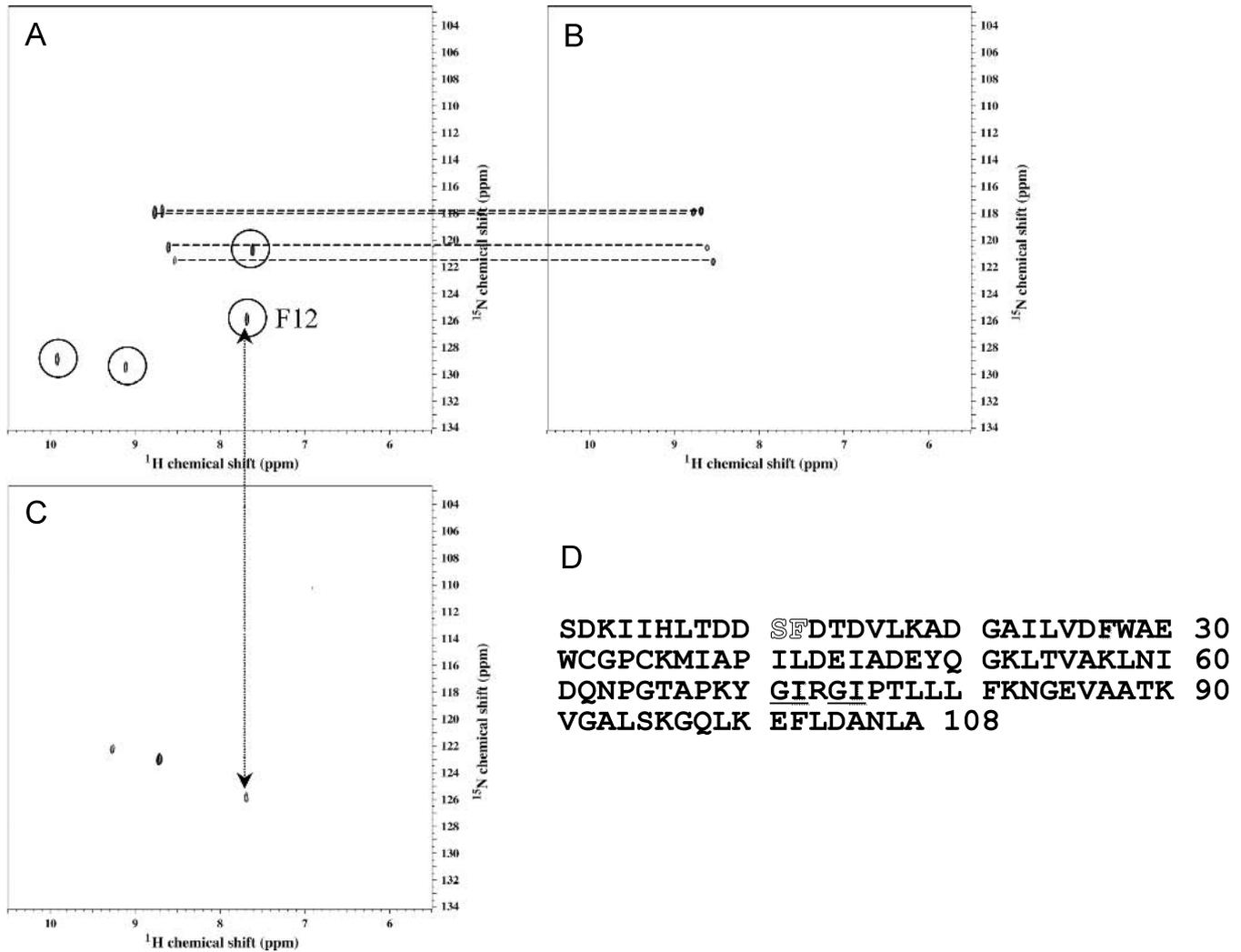


図6 MAGICAL法によるNMRシグナルの帰属

A, B. フェニルアラニン残基を $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ 標識し, その他19種類のアミノ酸残基を ^{15}N のみで標識した大腸菌チオレドキシントンパク質のHN (CA) (A) 及びHN (CO) スペクトル (B). C. セリン残基を $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ 標識し, その他19種類のアミノ酸残基を ^{15}N のみで標識した大腸菌チオレドキシントンパク質のHN (CO) スペクトル. D. 大腸菌チオレドキシントンパク質のアミノ酸配列.

AB両方のスペクトルに観測されるHNシグナルを波線で結び, Aで観測されBで観測されないHNシグナル(フェニルアラニン残基由来のHNシグナル)を○で囲んで示した. Aにおいて○で囲んだHNシグナルのうちCにおいても観測されるものを点線矢印で結んで示した. このシグナルはDの配列中白抜きで示したセリン-フェニルアラニンの配列に相当するので, Phe12のシグナルであると帰属できる(A中に残基番号で表示した).

シグナルと重ならないものがフェニルアラニン残基のHNシグナルである. また, 図6Cはセリン残基を $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ 標識し, その他19種類のアミノ酸残基を ^{15}N のみで標識した大腸菌チオレドキシントンパク質のHN (CO) スペクトルであり, セリン残基の後ろの残基のHNシグナルが測定される. そこで, 図6Aと図6Bの比較から得られたフェニルアラニン残基のHNシグナルのうち図6Cで得られたセリン残基の後ろの残基のHNシグナルと一致するものは一つだけ存在することがわかる. これは, セリン残基の後ろにあるフェニルアラニン残基のHNシグナルであるので, アミノ酸配列上で, セリン-フェニルアラニンと続く配列を探すと, Ser11-Phe12という配列のみが見つかる. よっ

て, 該当するHNシグナルはPhe12のものであると帰属される. このようにして, アミノ酸配列の前後関係を用いることにより, かなりの部分のHNシグナルのアミノ酸残基番号が一意的に特定できる. また, 大腸菌チオレドキシニンにおいてグリシン-イソロイシンのようにアミノ酸配列中に2カ所現れる(Gly71-Ile72, Gly74-Ile75, 図6Dに下線で表示)ものについても, 同様の標識タンパク質を用いて別の二次元スペクトルを2種類測定することにより, 帰属が確定できるので, 全てのHNシグナルについてアミノ酸残基番号の帰属が可能である. この方法は, 目的タンパク質を20種類の異なる標識方法で調製する必要があるが, 従来法とは異なって合成されたタンパク質を精製する必要

がないのでサンプル調製時間もさほどかからない。そして、感度の良い二次元 NMR 測定のみを用い、得られるスペクトルも非常に簡略化されているので、測定試料の濃度を下げても必要な情報が短時間に得られ、解析自体も短時間で行うことができる。

この方法により、分子量 4 万以上のタンパク質においても、低濃度のサンプルを用い、簡便にシグナルの帰属を行うことが可能になり、難溶性の高分子量タンパク質の立体構造決定、タンパク質-タンパク質相互作用、タンパク質-薬相互作用などに広く利用可能であると考えている。

おわりに

NMR によるタンパク質の解析技術はまだまだ向上の余地がある。タンパク質の NMR 解析は、単にその立体構造を決定するだけでなく、相互作用解析など様々な用途に利用できることで X 線結晶解析とは異なった可能性を秘めている。無細胞タンパク質合成技術を積極的に活用し、さらに新しい安定同位体標識技術を開発することで、タンパク質の NMR 解析がより広く使われるようになることを期待している。

文 献

- Williamson, M.P., Havel, T.F., & Wüthrich, K. (1985) *J. Mol. Biol.*, **182**, 295-315.
- Kay, L.E., Ikura, M., Tschudin, R., & Bax, A. (1990) *J. Magn. Reson.*, **89**, 496-514.
- Pervushin, K., Riek, R., Wider, G., & Wüthrich, K. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 12366-12371.
- Tolman, J.R., Flanagan, J.M., Kennedy, M.A., & Prestegard, J. H. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 9279-9283.
- Tjandra, N. & Bax, A. (1997) *Science*, **278**, 1111-1114.
- Tate, S., Shimahara, H., & Utsunomiya-Tate, N. (2004) *J. Magn. Reson.*, **171**, 284-292.
- Kainosho, M., Torizawa, T., Iwashita, Y., Terauchi, T., Mei Ono, A., & Güntert, P. (2006) *Nature*, **440**, 52-57.
- Ikeya, T., Terauchi, T., Güntert, P., & Kainosho, M. (2006) *Magn. Reson. Chem.*, **44**, S152-157.
- Kay, L.E., Keifer, P., & Saarinen, T. (1992) *J. Am. Chem. Soc.*, **114**, 10663-10665.
- Styles, P., Soffe, N.F., Scott, C.A., Cragg, D.A., Row, F., White, D.J., & White, P.C.J. (1984) *J. Magn. Reson.*, **60**, 397-404.
- Black, R.D., Early, T.A., Roemer, P.B., Mueller, O.M., Mogro-Campero, A., Turner, L.G., & Johnson, G.A. (1993) *Science*, **259**, 793-795.
- Norwood, T.J., Boyd, J., Heritage, J.E., Soffe, N., & Campbell, I.D. (1990) *J. Magn. Reson.*, **87**, 488-501.
- Müller, L. (1979) *J. Am. Chem. Soc.*, **101**, 4481-4484.
- Bodenhausen, G. & Ruben, D.J. (1980) *Chem. Phys. Lett.*, **69**, 185-189.
- Bax, A., Ikura, M., Kay, L.E., Torchia, D.A., & Tschudin, R. (1990) *J. Magn. Reson.*, **86**, 304-318.
- Zimmerman, D.E., Kulikowski, C.A., Huang, Y., Feng, W., Tashiro, M., Shimotakahara, S., Chien, C., Powers, R., & Montelione, G.T. (1997) *J. Mol. Biol.*, **269**, 592-610.
- Gardner, K.H. & Kay, L.E. (1998) *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **27**, 357-406.
- Nilges, M., Macias, M.J., O'Donoghue, S.I., & Oschkinat, H. (1997) *J. Mol. Biol.*, **269**, 408-422.
- Güntert, P. (2003) *Prog. NMR Spectrosc.*, **43**, 105-125.
- Shuker, S.B., Hajduk, P.J., Meadows, R.P., & Fesik, S.W. (1996) *Science*, **274**, 1531-1534.
- Hajduk, P.J., Dinges, J., Miknis, G.F., Merlock, M., Middleton, T., Kempf, D.J., Egan, D.A., Walter, K.A., Robins, T.S., Shuker, S.B., Holzman, T.F., & Fesik, S.W. (1997) *J. Med. Chem.*, **40**, 3144-3150.
- Takahashi, H., Nakanishi, T., Kami, K., Arata, Y., & Shimada, I. (2000) *Nat. Struct. Biol.*, **7**, 220-223.
- Nakamura, T., Takahashi, H., Takeuchi, K., Kohno, T., Wakamatsu, K., & Shimada, I. (2005) *Biophys. J.*, **89**, 4051-4055.
- Palmer, A.G., 3rd (2001) *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **30**, 129-155.
- Boehr, D.D., McElheny, D., Dyson, H.J., & Wright, P.E. (2006) *Science*, **313**, 1638-1642.
- Englander, S.W. (2000) *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **29**, 213-238.
- Rodriguez, E. & Krishna, N.R. (2001) *J. Biochem.*, **130**, 19-22.
- Bruggert, M., Rehm, T., Shanker, S., Georgescu, J., & Holak, T.A. (2003) *J. Biomol. NMR*, **25**, 335-348.
- Zucker, W.V. & Schulman, H.M. (1967) *Biochim. Biophys. Acta*, **138**, 400-410.
- Adamson, S.D., Herbert, E., & Godchaux, W. (1968) *Arch. Biochem. Biophys.*, **125**, 671-683.
- Suzuki, T., Ito, M., Ezure, T., Kobayashi, S., Shikata, M., Tanimizu, K., & Nishimura, O. (2006) *J. Biosci. Bioeng.*, **102**, 69-71.
- Suzuki, T., Ito, M., Ezure, T., Shikata, M., Ando, E., Utsumi, T., Tsunasawa, S., & Nishimura, O. (2006) *Proteomics*, **6**, 4486-4495.
- Spirin, A.S., Baranov, V.I., Ryabova, L.A., Ovodov, S.Y., & Alakhov, Y.B. (1988) *Science*, **242**, 1162-1164.
- Kigawa, T., Yabuki, T., Yoshida, Y., Tsutsui, M., Ito, Y., Shibata, T., & Yokoyama, S. (1999) *FEBS Lett.*, **442**, 15-19.
- Shi, J., Pelton, J.G., Cho, H.S., & Wemmer, D.E. (2004) *J. Biomol. NMR*, **28**, 235-247.
- Shimizu, Y., Inoue, A., Tomari, Y., Suzuki, T., Yokogawa, T., Nishikawa, K., & Ueda, T. (2001) *Nat. Biotechnol.*, **19**, 751-755.
- Marcus, A., Luginbill, B., & Feeley, J. (1968) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **59**, 1243-1250.
- Madin, K., Sawasaki, T., Ogasawara, T., & Endo, Y. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 559-564.
- Sawasaki, T., Ogasawara, T., Morishita, R., & Endo, Y. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 14652-14657.
- Endo, Y. & Sawasaki, T. (2005) *Methods Mol. Biol.*, **310**, 145-167.
- Kohno, T. (2005) *Methods Mol. Biol.*, **310**, 169-185.
- Morita, E.H., Sawasaki, T., Tanaka, R., Endo, Y., & Kohno, T. (2003) *Protein Sci.*, **12**, 1216-1221.
- Vinarov, D.A., Lytle, B.L., Peterson, F.C., Tyler, E.M., Volkman, B.F., & Markley, J.L. (2004) *Nat. Methods*, **1**, 149-153.
- Waugh, D.S. (1996) *J. Biomol. NMR*, **8**, 184-192.
- Morita, E.H., Shimizu, M., Ogasawara, T., Endo, Y., Tanaka, R., & Kohno, T. (2004) *J. Biomol. NMR*, **30**, 37-45.
- Kainosho, M. & Tsuji, T. (1982) *Biochemistry*, **21**, 6273-6279.