

SAIL 法による 蛋白質構造解析技術の多様化

解析
D2

代表機関：名古屋大学大学院理学研究科
代表研究者：甲斐荘正恒

背景

- タンパク質の構造解析 NMR 技術は、分子量が増大するほど適用が困難となる
- 必要十分な原子位置の NMR 情報のみを選択的に入手できる SAIL 法に期待がかかる
- SAIL 法の普及には、NMR 解析の自動化を含め基盤技術開発を達成する必要がある

成果

- 立体構造決定の自動化に必要な純度の SAIL タンパク質合成手順を確立し、従来法では困難だったタンパク質の完全自動構造解析に成功
- 選択的 SAIL 標識法を用いて、アミノ酸側鎖の OH 基や SH 基の新規解析技術を開発
- 従来の NMR 法では解析が難しかった芳香環の回転やジスルフィド結合の異性化等のタンパク質の大きい揺らぎに関する解析に SAIL 法を応用

タンパク質構造解析に用いる核磁気共鳴 (NMR) 法は、分子内の水素原子間の相対的位置関係等を利用し立体構造決定を行う手法です。そのため、分子量が大きくなるほど NMR による信号数が増大し、NMR スペクトルが複雑になって解析が困難になります。そこで、私たちが考案した SAIL 法が力を発揮します。

SAIL 法は、タンパク質試料の NMR で観測される水素数を大幅に“間引く”点に大きな特徴があります。NMR は原子核の種類によって得られる信号位置 (共鳴周波

数) がおおむね決まっており、例えば、水素 (^1H) と重水素 (^2H) は、化学的性質は似ていますが、NMR 共鳴周波数は大きく異なります。そこで、構造決定したいタンパク質中の水素のうちで、必要な構造情報を与えるもの以外をすべて人為的に重水素に置換することにより、NMR スペクトルは構造情報を失わずに簡略化され、その結果、大きなタンパク質でも迅速、かつ高精度に構造決定することができるのです。

SAIL 法の世界標準化という目標に向けての第一の重要課題は、SAIL タンパク質

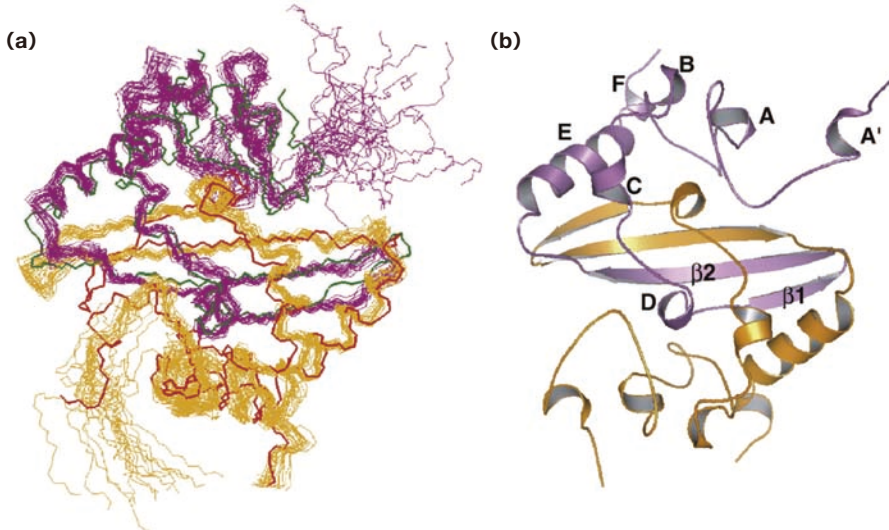
の調製法の改良でした。SAIL タンパク質は、一定の規則に従って特定部位を安定同位体置換したアミノ酸、すなわち SAIL アミノ酸 (立体整列同位体標識アミノ酸) のみから構成されます。このようなタンパク質を大腸菌等を用いて調製すると、貴重な SAIL アミノ酸を菌体の増殖に流用される、代謝により SAIL アミノ酸の同位体希釈が起こる等の深刻な問題が生じます。

そこで、本課題では、無細胞タンパク質合成系を利用し、この合成系のもつ問題点を一つひとつ克服して、高純度 SAIL タンパク質の合成法を確立しました。そして、こうして調製した高純度の SAIL タンパク質を用いて、従来の NMR 手法では困難だった難易度の高いタンパク質の構造解析に成功しました (図参照)。

また、人手を介入させずに NMR データから直接に高精度の構造決定を行う、完全自動 NMR 構造解析技術 (SAIL-FLYA 法) の開発にも成功しました。これも SAIL 法の普及にとって重要です。現在のところ、低分子量タンパク質の構造決定に有効であることを確認していますが、今後はさらに大きなタンパク質への適用が課題です。

本課題では、タンパク質の特定部位の立体構造とその動きを高精度にとらえるさまざまな新規手法の開発にも取り組みました。その結果、芳香環の回転、ジスルフィド (S-S) 結合の立体構造の変化、水酸基 (-OH) やチオール基 (-SH) の水素交換速度などを測定するのに成功しました。このような詳細な局所構造とその揺らぎは、SAIL 法により初めて解明されるもので、その測定技術は、タンパク質複合体の生物機能解析に大きな役割を果たすでしょう。

このように、SAIL 法のもつ大きな可能性を明確に示すことができました。今後は、生物学的により重要なタンパク質を対象に研究成果をあげるとともに、SAIL 法の問題点であるコストの削減にも取り組み、SAIL 法の世界標準化の推進に努力するつもりです。



重症急性呼吸器症候群 (SARS) ウイルスのヌクレオキャプシドタンパク質の C 末端側ドメイン。同ドメインは SARS ウイルス RNA との結合を担う重要な機能領域に相当する。従来法では困難であった同タンパク質の溶液構造決定を、SAIL 法により実現した。決定された構造は結晶構造 (赤、緑) とよく一致する (a)。同ドメインは 28kDa のホモダイマーを形成する (b)。Reprinted from Takeda et al. (2007) *J. Mol. Biol.* **380**, 608-622, Copyright (2010), with permission from Elsevier