

論文内容の要旨

応用生命工学専攻

平成 12 年度博士課程入学

氏名 池谷鉄兵

指導教官名 清水謙多郎

論文題目

NMR によるコリシン E6-RNase 活性ドメインおよびそのインヒビター複合体の立体構造解析と NOE シグナル帰属法に関する研究

1. はじめに

タンパク質が別のタンパク質を特異的に認識し、機能する過程は、生体内で見られる最も基本的な現象の一つである。このような過程で見られる分子間相互作用の高い特異性は、細胞内シグナル伝達タンパク質、膜受容体、酵素など多くのタンパク質で見ることができる。一般に、タンパク質間の相互作用は、複雑な高次構造と物理・化学的特性によって規定されると言われている。しかしながら、その特異性を立体化学的側面から厳密に解析できた例は少なく、十分に理解されていないのが現状である。

本研究では、RNase 型コリシンを対象として、このような特異的な分子認識機構の解析を試みた。RNase 型コリシンの活性ドメインとそのインヒビターは、その特性、安定性、大きさなどの点から、分子認識機構解明のための非常によいモデルであると考えられる。

コリシンとは、Col プラスミドにより生産され、このプラスミドを持たない大腸菌を殺すタンパク質性毒素である。十数種存在するコリシンの中で、E3、E4、E6 は、16S-rRNA を特異的に切断する RNase 活性を持つ。また、Col プラスミドは、コリシンと同時にインヒビター (Imm) も発現させており、宿主大腸菌の自殺を防いでいる。E3、E4、E6 の活性ドメイン(CRD)とそれぞれに対応する Imm は、互いに高い相同性を持っているが、CRD-Imm による阻害特異性の機構は非常に厳密で、わずか 1-2 残基の相違アミノ酸がこ

れに関与するということが、これまでの解析から示されている。したがって、この特異性の機構を明らかにすることは、一般的なタンパク質間相互作用の解析に何らかの示唆を与えられるものと期待される。

本研究では、このコリシンタンパク質の阻害特異性が、立体構造上どのように決められているか明らかにするため、NMR により、コリシン E6 の活性ドメイン(E6-CRD)と E6CRD-ImmE6 複合体の構造解析を行った。

NMR での構造解析において、コリシン複合体のような異種タンパク質の複合体解析では、タンパク質間で現れる NOE シグナルの帰属が常に問題となってくる。それは、すべての原子が共有結合でつながっている分子内のシグナル帰属に比べて、その自由度の大きさから、候補シグナルを絞り切れないことによる。通常、このような複合体の系の場合、タンパク質間領域の同定には、それぞれのタンパク質で異なった安定同位体ラベルサンプルを調製し、 $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ および $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$ を組み合わせたフィルター測定を行うのが一般的である。しかしながら、このアプローチは、以下のような問題点を抱えており、期待される解析結果が得られるとは限らない。(1) 安定同位体フィルター測定では、新たなパルスを追加するため、感度が大幅に減少する。(2) 完全なフィルター測定を行うことはできない。(3) 完全な安定同位体ラベルサンプルの調製は不可能なため、分子間 NOE の区別には不明瞭さが残る。(4) 安定同位体サンプルを新たに調製し、追加測定を行わなければならないため、その分時間と費用がかかる。

実際、東京大学分子育種学研究室の大野らは、このタンパク質に関して、 $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ および $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$ を組み合わせたフィルター測定を行ったが、分子間の NOE シグナルを特定することはできなかった。

そこで本研究では、相互作用にともなう化学シフト変化の解析や、単量体時の三次元構造情報等を組み合わせることにより、安定同位体フィルター測定に頼らずに結合面を区別する半自動的な手法を開発し、コリシン E6CRD-ImmE6 複合体の構造解析に応用した。また、近年報告されている構造最適化の手法を本研究でも応用することで、より最適な構造を得ることができた。

2. 安定同位体タンパク質の調製と異核種多次元 NMR の測定

測定に用いる E6CRD サンプルは、 $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ を含む M9 培地と ^{13}C -Glucose と $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ を含む M9 培地それぞれで大腸菌を培養し、 ^{15}N 、および $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ 二重標識した安定同位体ラベルサンプルをそれぞれ調製した。

E6CRD/ImmE6 複合体は、分子量 2 万程度の大きさであったため、E6CRD のシグナルに比べて、緩和時間が顕著に短くなり、測定感度の低下が著しかった。したがって、複合体のサンプルは、上記の安定同位体標識に加えて、50%重水下での培養により重水素の 50%ランダム標識サンプルを調製し、これを解析に用いることとした。

解析には、主鎖 $^1\text{H}_\text{N}$, ^{13}C , ^{15}N 核シグナルの帰属のために HNCACB と CBCA(CO)NNH の測定を、側鎖のプロトン核及び ^{13}C 核シグナルの帰属のためには、H(CCCO)NNH、HCCH-TOCSY、CC(CO)NNH 測定を行い、原子間の距離情報を得るために $3\text{D}^{15}\text{N}$ -NOESY-HSQC と $3\text{D}^{13}\text{C}$ -NOESY-HSQC の測定を行った。またデータ処理には、AZARA プログラムを、スペクトルの解析には ANSIG プログラムをそれぞれ使い、構造計算には CNS を用いた。

3. NOE の帰属と構造計算

E6CRD/ImmE6 複合体の構造決定に関しては、前述したように $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ 、 $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$ を組み合わせたフィルター測定からは分子間の NOE を特定することはできなかった。そこで本研究では、コンピューターを用いて、分子間の NOE としてありうる候補を絞り込み、これらの候補に独自の重み因子を適用して構造計算を行うといった方法を採用した。候補の絞り込みの手順は以下の通りである。

1. 分子内 NOE シグナルの帰属を行う。
2. 帰属できなかったシグナルに関して、ambiguous NOE の帰属候補を選択する。
3. 単量体の構造情報から、ありえない帰属候補を取り除く。
4. 化学シフトデータ、経験的 pair potential、および各分子の 3 次元構造を考慮することで帰属候補を絞り込む。
5. 構造計算は、ポテンシャル関数の中で分子間距離拘束を分子内拘束より低い重み因子に設定し実行する。
6. 得られた構造をもとに、4、5 の過程を繰り返し実行し、収束構造を得る。

さらに、近年自動帰属に向けて提案されている以下の手法を多少改良し、本研究における構造の最適化に適用した。(1) 明確な帰属の不可能な ambiguous NOE を構造計算に取り込む。(2) 構造をもとにして距離拘束を再計算する。(3) 2 原子間の距離拘束の信頼度を第 3 の原子との Network を考慮することで決定する (Network Anchoring 法)。

このようにして得られた構造は、その後 X 線結晶構造解析によって明らかになったコリシン E3 複合体の構造および変異体実験の結果と非常によく一致していることから、分子間 NOE の帰属法としての有効性が示された。

また、最適化計算に関しては、E6CRD、および板倉らによってすでに構造決定されている ImmE6、ImmW47C についても適用した。ImmE6 と ImmW47C の再計算は、以前に決定された構造と帰属テーブルをもとに実行した。再計算の結果、ランダムに出力した 50 構造のうち、エネルギー最小上位 10 構造の比較で、ImmE6、ImmW47C のいずれも r.m.s.d で 0.2\AA 程度収束のよい構造が得られた。また、以前に決定された ImmW47C には、ImmE3、ImmE6 とわずかに異なる領域が見られ、この部分の信頼性に疑問が持たれていたが、再計算の結果、ImmE3、ImmE6 とほぼ同様の構造を得ることができ、今回の計算手法によって、構造の正確さ、精密さの両面において向上が得られることが実証された。

4. コリシタンパク質の構造解析

構造解析の結果から、E6CRD-ImmE6 複合体の構造は、X線結晶構造解析によって明らかにされた E3CRD-ImmE3 の構造とほぼ同様な構造であった。Imm との結合面は、変異体実験によって予想されている活性部位とは、離れた位置に位置していることが分かった。E6CRD 側の 1-13 番目のアミノ酸領域は、残基間の NOE シグナルがほとんど観測されなかったため、フレキシブルな構造をとっていることが想定された。E6CRD の構造は、複合体形成時の構造と比較すると、Imm と結合する領域で、比較的大きな構造変化が見られたが、予想活性部位ではほとんど構造の変化は見られなかった。E6CRD 単量体の構造は、複合体の構造と比較して、Imm との結合面において収束が悪くなっている。このことから、E6CRD の結合面は、ダイナミクスが大きいことが予想される。特に 14-23 番目残基の領域は、複合体では安定な構造をとっているにもかかわらず、単量体では残基間の NOE シグナルがほとんど見られなかったため、収束構造は得られなかった。したがって、この領域は Imm と結合することによって、安定な構造をとるものと思われる。

変異体実験により阻害特異性に最も重要と考えられている Trp47 は、結合面の中心に位置していた。CRD 側のこれに対応する残基は Ala55 であり、その周辺は Trp 残基が入り込めるような広いポケットが形成されていた。一方、E3CRD では、Ala55 にあたる残基に Lys が位置しており、E6 のような大きなポケットは存在していなかった。したがって、このような構造的な差異が分子の特異性に大きく関与しているものと推定される。

5. まとめ

本研究では、コリシン E6CRD、E6CRD-ImmE6 複合体の構造決定と ImmE6、ImmW47C の構造最適化を行い、コリシンと Imm との特異性における構造生物学的考察を行った。また、複合体の構造決定の過程で、分子間の NOE シグナルの帰属手法を開発し、構造最適化の過程を提案した。本研究で開発した手法は、今後、NMR においてもますます増えていくと予想される複合体タンパク質の構造解析に有効な手段であり、より汎用的な手法の開発への第一歩となると考えている。また、本研究で解析を行ったコリシタンパク質は、タンパク質間相互作用を考える上で、非常に良いモデルであり、このタンパク質をさらに詳細に解析することで、タンパク質間相互作用の特異性に関する新たな示唆を得ることができると期待される。