

## 論文の内容の要旨

論文題目 多ドメインタンパク質におけるドメイン間  
近接残基対同定およびドメイン配向決定を目指した  
NMR 解析法の確立

氏名 五十嵐 俊介

### 【序】

リン酸化や標的分子との結合に伴うタンパク質の立体構造の変化は、酵素活性や標的分子との結合親和性を制御する要因となる。一方、複数のドメインからなるタンパク質の場合、それらの相対配置が変化することで大きな構造変化につながる。したがって、機能発現時にどのような立体構造変化を起こすかを明らかにすることは、そのメカニズムを解明する上で重要である。これまでに様々なタンパク質の立体構造が明らかにされてきたが、個々のタンパク質について、リガンド結合状態など必ずしもすべての状態の立体構造が解明されてはいない。そこで、明らかとされている立体構造をもとに、構造変化後のドメイン間の相対配置を迅速かつ簡便に決定する NMR 手法を開発することとした。

修士課程までに私は、タンパク質複合体における近接残基対を同定する NMR 手法として、当研究室にて開発した cross-saturation(CS)法を応用したアミノ酸選択的 CS 法(ASCS 法)を開発した。この手法は飽和ドナータンパク質に対して特定のアミノ酸以外を  $^2\text{H}$  とする、アミノ酸選択的  $^1\text{H}$  ラベルを行い、それに結合する非標識の飽和アクセプタータンパク質の近接残基への交差飽和を観測する。この手法により、ドナーとアクセプター間で近接するアミノ酸残基対が明らかとし、分子間の相対配置を決定することが可能となった。そこで、ASCS 法を分子内で応用することで、タンパク質のドメイン間における近接残基対が決定可能であると考えた。観測分子を均一  $^2\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ 、アミノ酸選択  $^1\text{H}$  標識体として調製し、構造

未知の状態において ASCS 法を行うことで、ドメイン間で近接した残基対間において交差飽和を観測する。構造既知である立体構造をもとに、実験結果を満たすように各ドメインを剛体として再配置することで、立体構造モデルを構築できると考えた。

本手法を大腸菌由来の histidine permease HisQMP<sub>2</sub>における histidine 結合サブユニット HisJ に適用した。HisJ は、238 アミノ酸残基であり、二つのドメインが hinge により繋がれている。これまでに両ドメインの間に histidine が結合した holoHisJ の結晶構造が明らかとされている

(Fig. 1)。一方で、基質が解離した apoHisJ では、ドメイン間の配置が変化することが予想されているものの、apoHisJ の立体構造は未解明である。そこでまずは、構造既知の holoHisJ を用いて本手法を確立した。さらに、apoHisJ において本手法を適用することで、ドメイン間における残基間の距離情報を明らかとし、両ドメイン間の配向情報を得た。

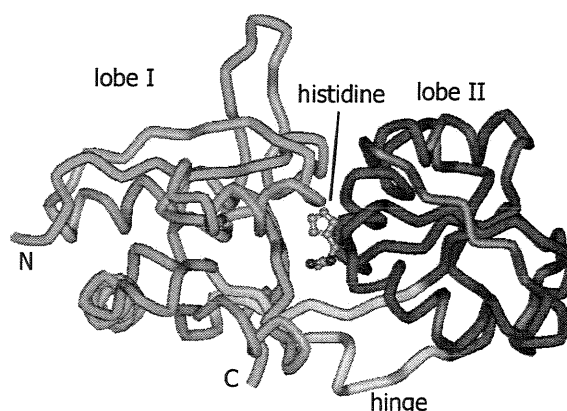


Fig. 1 holoHisJ の結晶構造

holoHisJ は灰色で示した lobe I と黒で示した lobe II が、白で示した hinge によりつながり、二つの lobe の間に histidine が結合する。

## 【結果】

### 1. アミノ酸選択 <sup>1</sup>H 標識が可能なアミノ酸の決定

ASCS 法の拡張を目的として、修士課程において私が調べたアミノ酸に加え、Glu, Asn を除くアミノ酸についてアミノ酸選択 <sup>1</sup>H 標識の選択性と標識率を調べた。その結果、Ala, Arg, Cys, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Trp および Tyr について選択的かつ高い標識率が達成されることが明らかとなった。また、Thr と Val については、自身のアミノ酸および特定のアミノ酸の一部の原子に <sup>1</sup>H 標識が導入されることがわかった。一方で、Asp, Gln および Ser は様々なアミノ酸に代謝されるために、本手法に適していないことが明らかとなった。

### 2. holoHisJ および apoHisJ の性状解析

holoHisJ と apoHisJ について主鎖連鎖帰属を行い、holoHisJ と apoHisJ 間において各アミノ酸残基ごとに化学シフト値の違いを算出した。その結果、histidine 結合部位および hinge 領域にのみ大きな化学シフト変化が観測された。このことは、各ドメインに大きな構造変化は生じていない一方で、hinge 領域に構造変化が生じていることを示唆している。また、holoHisJ および apoHisJ について T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub>, <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N 異核 NOE 解析を行った。その結果、各分子における残基間の運動性のばらつきは少なく、holoHisJ と apoHisJ 間における全体的な運動性の変化も見られなかった。このことは、holoHisJ と同様に apoHisJ における両

ドメインが特定の配向をとっていることを示している。

### 3. holoHisJ を用いたドメイン間 ASCS 法の検証

立体構造が既知である holoHisJ を用いて、交差飽和にともなう強度減少率の大きさが交差飽和源までの距離に相関するかを検証することを目的として、Pro 選択的ドメイン間 ASCS 実験を行った。その結果を Fig. 2 に示す。40%以上の強度減少率を示した残基の中には、ドメイン間にて Pro16 に近接する Gly168 も含まれていた。残基ごとに算出したシグナル強度減少率と、最も近接する Pro のプロトンまでの距離との間の相関を調べた(Fig. 3)。その結果、距離が近接するほど強度減少率が大きくなることが明らかとなった。一方で、5Å以上離れた残基には顕著な強度減少は観測されなかった。このことから、一定値以上の強度減少率を示した残基に着目することで、<sup>1</sup>H ラベルを行ったアミノ酸に近接する残基のみを抽出することが可能であることが示された。

同様に Thr または Gly 選択的ドメイン間 ASCS 実験を行った結果、ドメイン間において、Thr13 から Asp144 および、Gly192 から Ile73 への交差飽和が生じたことを確認した。

一方で、実際に本手法を適用する場合には、ドメイン間の相対配置が不明なため、ドメイン間 ASCS 実験結果のみから近接残基対は明らかとならない。そこで、これまでに行った3種類のドメイン間 ASCS 実験において、Gly168 がいずれかの Pro に、Asp144 がいずれかの Thr に、Ile73 がいずれかの Gly に近接しているという情報と、各ドメインの立体構造情報を用いることで、ドメイン間の近接残基対の同定および、ドメイン間相対配置の決定が可能であるかの検証を行った。その結果、結晶構造と同一の近接残基対の組み合わせに決定でき、それらを満たすように各ドメインを近接させることで、結晶構造に相当するドメイン配向が得られた。

以上のことから、各ドメインの立体構造が明らかである場合、本手法を適用することで、ドメイン間の近接残基対および、ドメイン間相対配置を適切に決定できることが示された。

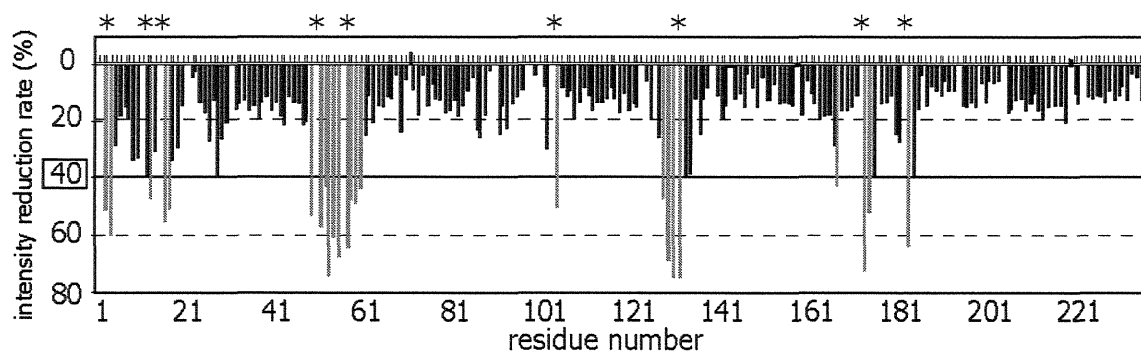


Fig. 2 holoHisJ における Pro 選択的 ASCS 結果

横軸が残基番号、縦軸が holoHisJ に対して Pro 選択的 ASCS 実験を行った際のシグナル強度減少率。Pro を \* にて、アミノ酸配列上 Pro に近接しないが、シグナル強度が 40%以上減少した残基を灰色にて示した。

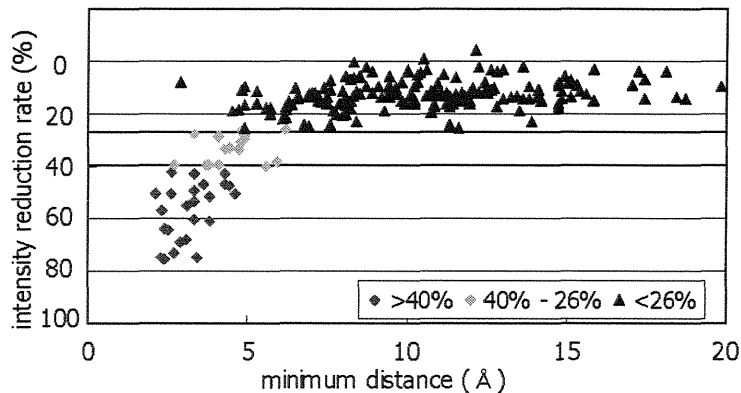


Fig. 3 強度減少率と交差飽和

源までの距離との相関

横軸が最も近い交差飽和源までの距離、縦軸が holoHisJ に対して Pro 選択的 ASCS 実験を行った際のシグナル強度減少率。40%以上強度減少した残基、26%–40%の残基、26%以下の残基に分類した。

4. apoHisJ と holoHisJ のドメイン間近接残基対の変化

holoHisJ と同様に、apoHisJ に対して Thr, Pro, Phe および Gly 選択的 ASCS 実験を行った。これらの結果を holoHisJ における各実験結果と比較した。その結果、hinge 領域に存在する Ala90 がいずれかの Gly に近接するように、hinge 領域に構造変化が生じたことが明らかとなった。また、holoHisJ において近接していた Thr13–Asp144 および Pro16–Gly168 が apoHisJ において離れたことが明らかとなった。一方で、apoHisJ において Gly168 は Phe231 または Phe233 と近接することが明らかとなった (Fig. 4)。このように、apoHisJ において hinge 領域が構造変化し、ドメインの再配置による近接残基対の組み換

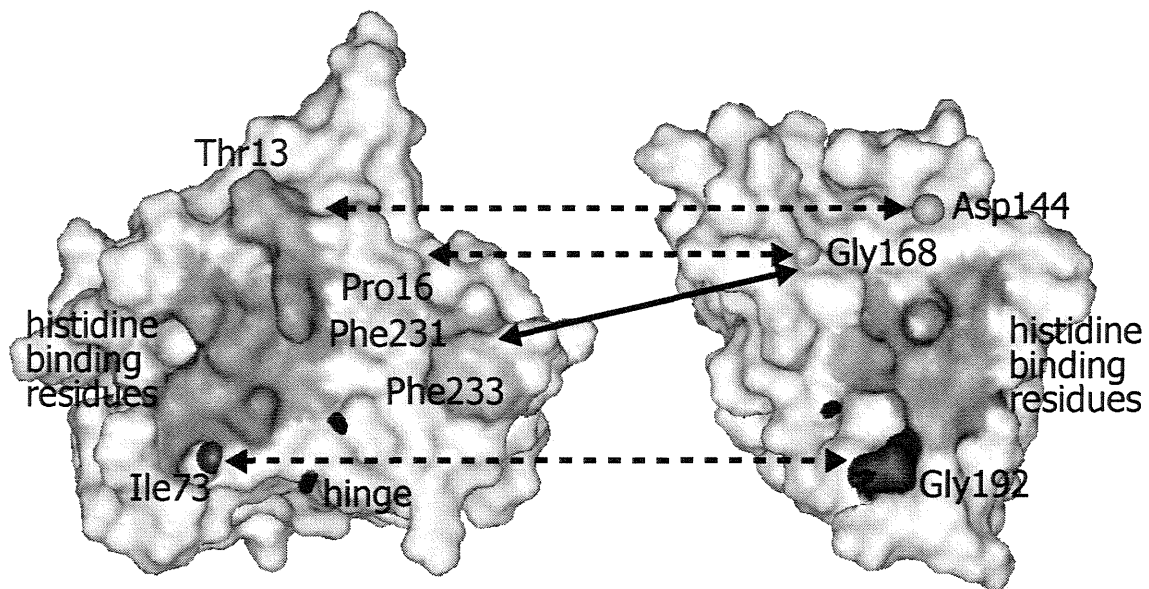


Fig. 4 apoHisJ におけるドメイン間残基対情報

点線は holoHisJ において近接していた残基対が apoHisJ において離れたことを意味する。実線は、holoHisJ において離れていた残基対が apoHisJ において近接したことを意味する。各 lobe において同じ色で示した残基が対応する。histidine 結合に直接関与する残基群を緑で示した。両 lobe が手前の面の画面内側にて近接する場合、histidine 結合に関与する残基群同士は離れ、溶媒に露出することが想定される。

えが生じたことが示された。これらの残基対の距離情報を満たすように両ドメインが相互作用した場合、各ドメインにおける histidine 結合部位は離れる相対配置となり、溶媒に露出する。このことは、このようなドメイン相対配置が、apoHisJ において histidine 取り込みに効率的であることを示している。

このように、各ドメインの立体構造は明らかではあるが、全体構造が未解明であるタンパク質について本手法を適用することで、ドメイン間における残基対間の距離情報を得ることができ、それらをもとに、ドメイン間相対配置に関する情報が得られることを示した。

#### 【考察】

NMR 法を用いたドメイン間の相対配置の決定は、NOE を用いた構造決定が一般的である。しかしながら、この手法においては側鎖プロトンや NOE の帰属の困難さから、分子量 3 万程度を超えるタンパク質における適用が難しい。この問題を解決するために、10 万程度の分子量においても帰属が可能である主鎖アミドプロトンを解析対象とした手法が開発されてきたが、いずれにも制約があった。例えば、PRE を用いた手法においては、本来の構造との違いが問題となる場合があり、RDC を用いた手法においてはサンプル調製に困難が生じる場合がある。一方で、今回提唱したドメイン間 ASCS 法においては、サンプルのラベル法を工夫するのみで適用可能であり、NMR において解析される一般的なタンパク質において、本来の構造を保持したまま解析可能であるため、汎用的なドメイン間相対配置決定法として提唱する。

#### 【参考文献】

Igarashi, S., Osawa, M., Takeuchi, K., Ozawa, S., and Shimada, I. (2008) *J. Am. Chem. Soc.*, 130, 12168-12176.