

論文の内容の要旨

論文題目 計算科学を用いた転移交差飽和法に関する理論的研究

氏 名 松本 昌彦

<序論>

タンパク質とリガンドの相互作用部位の解明は、生物学的に重要であるだけでなく、創薬にも重要な知見を与える。近年開発された溶液 NMR 実験法である交差飽和法は、 ^1H - ^1H 間の距離を反映する双極子相互作用を利用した高分子量タンパク質複合体の相互作用部位を決定する手法であり、従来用いられてきた化学シフト摂動法や水素・重水素交換法に比較して、より正確に相互作用部位を決定できることが示されている。

転移交差飽和法 (TCS 法) は、交差飽和法を相互作用の弱い巨大タンパク質複合体に適用できるように拡張した手法である。しかし実際の適用にあたっては、実験条件を適切に設定しなければ、相互作用部位を求められないか、または、誤った結果が得られることが分かっている。本研究では、TCS 法の適用可能範囲を明らかにし、合理的な実験条件の設定を可能とすることを目的とした。そのために、(1)TCS 法の理論的記述を確立し、(2)シミュレーションにより各パラメータの影響を明らかにし、(3)理論による結果を実験的に検証することとした。

<結果と考察>

1. TCS 法の理論的記述の確立

TCS 法では、リガンド分子内のプロトン密度を下げる目的で、10% H_2O /90% D_2O の混合溶媒を用いる。このため、サンプルはタンパク質の交換性プロトンが H または D で置換された異性体である isotopomer の混合物になる。異なる isotopomer では分子内のプロトンの空間的分布が異な

るため、磁化の挙動も異なる。このため、磁化の理論的記述は isotopomer ごとに行う必要があり、観測される磁化は全ての isotopomer に由来する磁化のアンサンブル平均になる。

TCS 法におけるリガンドおよびレセプターのプロトンの磁化の時間変化は、自己緩和、交差緩和、化学交換、飽和伝播を表す項で記述される。リガンドの任意の k 番目の isotopomer のプロトンについての方程式、解離状態のレセプターのプロトンについての方程式、複合体のリガンドおよびレセプターのプロトンについての方程式は連立方程式になり、行列を用いて表すことができる。ここで、TCS 法では、レセプター分子は高分子量、高プロトン密度であるので、全てのレセプタープロトンが速やかに飽和されると仮定すると、レセプタープロトンの式が消える。さらに、リガンドの結合飽和度を p_b とすると、結合速度は p_b と解離速度定数 k_{off} のみで表され、TCS 法の化学交換速度は p_b と k_{off} のみで表される。ラジオ波照射開始時に全てのリガンドプロトンの磁化が平衡磁化であると仮定して方程式を解くことにより、リガンドの k 番目の isotopomer のプロトン i の磁化の時間変化を表す式が得られる。任意のプロトン i について観測されるアンサンブル平均の磁化は、リガンドの k 番目の isotopomer のプロトン i の磁化と、 k 番目の isotopomer の存在比率の積の総和で表される。以上の理論に基づいて、TCS 法をシミュレーションするソフトウェアを開発した。

2. シミュレーションによる各パラメータの TCS 法への影響の検討

TCS 法の各パラメータの影響は、モデルスピン系を用いたシミュレーションにより調べることとした。モデルスピン系は、直線上に 3 Å 間隔でならんだ 3 個の L1, L2, L3 プロトンでリガンドを構成し、レセプターは巨大分子を模倣するために一辺に 13 個のプロトンを配置した立方体とした。分子間距離は 5 Å とした。

(1) 溶媒のプロトン濃度の影響

プロトン濃度 100% ではリガンド分子内のプロトン密度が高いため、双極子相互作用により飽和は高い効率で L1 プロトンから L2, L3 プロトンへも伝播し、全てのプロトンが同程度のシグナル強度減少を示した。溶媒のプロトン濃度を低下させていくと、リガンド分子内の双極子相互作用が抑制され、レセプターとの相互作用界面に存在する L1 プロトンが L2, L3 プロトンに比べて顕著なシグナル強度減少を示すようになった。仮想的に双極子相互作用がない条件でシミュレーションした結果とプロトン濃度 10% の結果がほぼ同等であることから、プロトン濃度 10% は双極子相互作用が十分抑制された条件であることが分かった。実際には、プロトン濃度を低くするとシグナルの観測感度も低くなるため、10% から 30% のプロトン濃度を用いるのが良いと考えられる。

(2) リガンド結合飽和度 p_b と解離速度定数 k_{off} の影響

1000 s^{-1} から 0.1 s^{-1} のいずれの k_{off} でも、 $p_b = 0.01$ ではわずかなシグナル強度減少しか見られなかった。 p_b が増加すると飽和効率は上昇し、 $p_b = 0.5$ では k_{off} が 1 s^{-1} 以上の条件で L1 プロトン

が L2, L3 プロトンに比べて顕著なシグナル強度減少を示した。 k_{off} が 1 s^{-1} より小さくなると飽和効率は減少し、 k_{off} が 0.1 s^{-1} では $p_b = 0.5$ でも十分な飽和効率は得られないことが分かった。 p_b と k_{off} が TCS 法に及ぼす影響の理解を深めるために、個々のリガンド分子が経験する結合時間を考え、これを Effective saturation time (EST) を呼ぶことにした。10000 個の擬似リガンド分子を用いて、確率的に結合・解離を発生させることにより、EST の分布を算出した。その結果、 $p_b = 0.5$ の飽和効率が良い条件では、EST は p_b とラジオ波照射時間の積を中心に分布した。 $p_b = 0.1$ の場合でも同様の結果が得られた。飽和効率が低い $p_b = 0.01$ では、ラジオ波照射時間 1 秒では 38% のリガンドの EST が 0 秒になっており、これらのリガンドが 1 秒の間に 1 度も結合しなかったことが分かった。同様に、ラジオ波照射時間 3 秒でも 5.6% のリガンドが 1 度も結合していないことを示しており、これが $p_b = 0.01$ では飽和効率が低い原因であることが分かった。

(3) レセプターの回転相関時間の影響

双極子相互作用は、分子量が増大すると強くなるため、飽和効率は上昇する。レセプターの回転相関時間が 10 ns、分子量~25 kDa では分子量が小さいため飽和効率は低く、 $p_b = 0.5$ でなければ L1 プロトンを分離して観測できなかった。レセプターの回転相関時間が 100 ns、分子量~250 kDa では飽和効率が上昇し、 $p_b = 0.1$ でも L1 プロトンを分離して観測することができた。レセプターの回転相関時間が 1 μs 、分子量~2.5 MDa では、 $p_b = 0.5$ では飽和効率が非常に高いため、L1 プロトンを分離して観測するためには短いラジオ波照射時間を用いるか、または、これまで適用が難しかった $p_b = 0.01$ を用いる必要があることが分かった。

3. 実験による検証

以上の理論的考察に基づいて実験を行い、シミュレーションとの比較を行った。実験には、Ubiquitin と Yeast ubiquitin hydrolase (YUH) の相互作用の系を用いた。Ubiquitin-YUH の複合体は結晶構造が明らかにされており、また、ubiquitin と野生型 YUH との結合は $K_d = 18 \mu\text{M}$, $k_{\text{off}} \sim 100 \text{ s}^{-1}$ であり、ubiquitin と YUH(C90S) との結合は $K_d = 37 \text{ nM}$, $k_{\text{off}} \sim 0.2 \text{ s}^{-1}$ である。シミュレーションに用いたモデルスピン系は、L1 プロトンの分子間 ^1H - ^1H 間距離の-6 乗の総和が Gly47 のアミドプロトンと一致するように、分子間距離を 5 Å から 3.75 Å に変更して用いた。Ubiquitin と野生型 YUH を 4:1 の量比で加えて行った TCS 実験の結果と、その実験条件を反映した k_{off} と p_b で行ったシミュレーションの結果を比較した結果、結合界面にある Gly47 のアミドプロトンと L1 プロトンはほぼ同等のシグナル強度減少を示し、結合界面から離れた Ser20 と L2, L3 プロトンはほぼ同等のシグナル強度減少を示した。同様に、ubiquitin と野生型 YUH を 10:1 の量比で加えた実験結果とその条件を反映したシミュレーション結果の比較、また、ubiquitin と YUH(C90S) を 4:1 で加えた実験結果とその条件を反映したシミュレーション結果を比較した結果、いずれの条件でも実験結果とシミュレーションはよく一致した。以上の結果より、シミュレーションに基づいて実験条件を設定することが有効であることが示された。

<総括>

本研究では、TCS法の理論的記述を確立し、シミュレーションにより各パラメータの影響を明らかにした。その結果、TCS法の交換速度がリガンド結合飽和度 p_b と解離速度定数 k_{off} のみで記述できることを示した。また、TCS法の飽和効率、 p_b が大きいほど高くなることを示した。また、TCS法の適用可能範囲は、 k_{off} が 0.1 s^{-1} より大きい範囲であることを明らかにし、 k_{off} が 10 s^{-1} 以上では、 p_b が 0.1 以上が望ましく、 k_{off} が 1 s^{-1} 以上では、 p_b が 0.5 以上が望ましいことを明らかにした。また、回転相関時間が $1 \mu\text{s}$ 、分子量~2.5 MDa の系では、 $p_b = 0.01$ でも適用可能であることを明らかにした。さらに、シミュレーションに基づいて合理的に実験条件を設定することが可能であることを示した。本研究の成果に基づいて、TCS法がこれまで解析が困難であったタンパク質複合体に適用され、生物学的研究および創薬研究において新たな知見をもたらすことが期待される。