

核磁気共鳴法を用いた高分子量蛋白質複合体における相互作用解析法の開発と応用 NMR Strategy of Interaction Analyses for Larger Protein Complexes

嶋田 一夫

東京大学大学院薬学系研究科

Ichio SHIMADA

Graduate School of Pharmaceutical Sciences, The University of Tokyo

蛋白質複合体における相互作用解析は、蛋白質の機能を考える上で重要なプロセスである。構造生物学的手法の一つである核磁気共鳴法(NMR)は、水溶液中の蛋白質相互作用を解析する強力な分光法である。しかしながら、分子量50Kを超える蛋白質複合体の相互作用部位を同定する際に用いられてきた化学シフト摂動法など従来のNMR手法では、正確な界面残基の同定は困難であった。本発表では、NMRが持つこのような弱点を克服し、蛋白質間相互作用を精密に解析できる新規NMR手法、交差飽和法および転移交差飽和法に関してその概略を述べると同時に、その高分子量蛋白質複合体の応用を紹介する。

1. 新規相互作用解析法である交差飽和法および転移交差飽和法の開発 (*Nature Struct. Biol.* (2000), *J. Mol. Biol.* (2002), *Method. Enzymol.* (2004)): 交差飽和法 (CS法) では、 ^2H および ^{15}N で安定同位体標識したリガンド蛋白質分子を調製し、非標識の標的蛋白質分子に結合させる。ここで、脂肪族水素の周波数を持つラジオ波を複合体に照射すると、複合体中の標的蛋白質由来のNMRシグナルが飽和される。照射によって生じた飽和は、標的分子内に留まらず、双極子-双極子相互作用によりリガンド分子界面に伝播する。したがって、ラジオ波照射の後、 ^1H - ^{15}N シフト相関スペクトルを観測すれば、界面に存在するリガンド分子由来のシグナルのみがその強度が減少し、界面残基が同定できる。しかしながら、CS法では複合体を直接測定しなくてはならないため、100K以上の巨大蛋白質複合体の解析には適用できない。そこでさらにこれを克服するために転移交差飽和法(TCS法)を考案した。リガンド分子が標的分子への結合、解離を適当な速度で交換しているなら、結合状態で生じる交差飽和現象を遊離のリガンド分子を用いて観測できることになる。TCS法では複合体を直接観測することは必要ないため、測定対象の複合体分子量がいかに大きくとも相互作用残基を同定できる。したがって、従来は不可能であった繊維状コラーゲンとコラーゲン結合蛋白質における相互作用解析や、膜蛋白質・リガンド相互作用解析がTCS法により可能となった。

2. CS法およびTCS法の応用 (*Nature Struct. Biol.* (2003)): 血漿タンパク質 von Willebrand factor (vWF)は、血管内皮細胞のコラーゲンと相互作用し血液凝固に関与する。したがってvWFとコラーゲンの相互作用解明は重要であるが、コラーゲンが繊維形成し不均一超分子を形成するため、従来の構造生物学的手法を用いて相互作用解析を行うことができなかった。そこで、TCS法を用いてvWFコラーゲン結合部位の同定を行なったところ、成功裏に相互作用様式を解明できた。これは、世界で初めて生理的条件下における繊維状コラーゲンとコラーゲン結合蛋白質との相互作用解析に成功した例である。

謝辞: 本研究に対し、多くの恩師、先輩の暖かいご指導に厚く御礼申し上げます。また、研究を支えていただいた東京大学大学院薬学系研究科生命物理化学のスタッフ、大学院および学部学生、そして産業技術総合研究所生物情報解析研究センター分子認識チームの研究員に敬意を表するとともに深く心より感謝いたします。