

サイエンス・プラザ

第13回化学・バイオつくば賞受賞

NMRによる超高分子量系の生体分子間相互作用解析法の開発

味の素ライフサイエンス研究所主任研究員

尾上 弘美

産業技術総合研究所生物情報解析研究センター主任研究員

高橋 栄夫

昨年6月、私達5人は、第13回化学・バイオつくば賞を受賞いたしました。化学・バイオつくば賞とは、財団法人化学・バイオつくば財団が、「産業の発展に寄与したもの」「将来の産業の発展に寄与する可能性の高い業績をあげたもの」「産業技術総合研究所を含む複数の機関で共同研究を行う等顕著な研究業績をあげたもの」に対して供与される賞です。私達の行っているような基礎的な研究が評価され、大変うれしく思っております。

ノムの中にDNA情報として書き込まれています。体内にあるさまざまな蛋白質は、それ単独で機能するものもありますが、多くはその他のタンパク質や核酸、脂質、多糖類などの体内にある他の分子と相互作用して、生物が機能して（生きて）います。私達の専門分野（構造生物学）では、タンパク質が体内に入って来る異物をどのようにして認識するのか（プロテオミクス研究：機能）をその形（構造ゲノミクス研究：構造）を使って、解き明かそうとする学問です（図1）。

はじめに

私達の体を構成している「タンパク質」は、ゲ

現在、私達が研究の対象としている「タンパク質」の立体構造を調べる方法として、X線結晶構

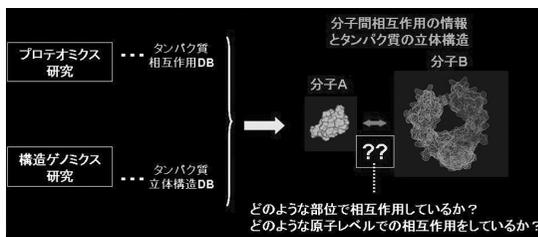


図1 プロテオミクス研究とゲノミクス研究

◆ も く じ ◆

サイエンス・プラザ

NMRによる超高分子量系の生体分子間

相互作用解析法の開発…………… 1

トピックス

アスベスト…………… 7

今までのトランスクリプトーム観を覆した

「RNA新大陸」の発見…………… 9

授業実践

音響分野に関する演示実験装置の開発 …… 13

高校生へ私が選んだ1冊の本

化学・意表を突かれる身近な疑問 …… 16

- ※水溶液中での立体構造決定が可能（結晶化不要）
- ※分子の局所的運動性の情報が得られる
- ※ pH, 温度, 塩濃度などの変化や, 結合する分子の添加実験に伴う, 原子レベルでのミクロ環境変化を迅速に検出可能

図2 NMRの特徴

造解析や核磁気共鳴（NMR）などがあります。X線結晶構造解析は、タンパク質の結晶を作り、それにX線を当てて構造を調べる方法。一方NMRはタンパク質を溶媒に溶かし溶液状態のサンプルを高磁場の中で調べる方法です。NMRでは、構造のどこが硬くてどこが柔らかい部位かという、局所的な運動性の情報がわかります（図2）。また、pHや塩濃度といった溶媒の性質を変えることで起こる微妙な構造変化や分子Aに結合する分子Bを少しずつ添加することで引き起こされる分子Aの構造変化をみるができます。この変化の大きい部分が、2つの分子の結合に関与していることがわかりますが、今回の研究は、このNMRの特徴を利用して水溶液中の構造を観測しています。

分子Aと分子Bがどの部位で相互作用しているかという「相互作用界面情報」があると、今までできなかった「分子間相互作用をコントロールする分子（薬物）のデザインが自由にできる可能性」が高まります。このようなタンパク質の相互作用をタンパク質の構造レベルから解明することは、製薬会社など新たな医薬品の開発現場で強く求められています。体内には研究対象として興味深いタンパク質がたくさんありますが、特に、細胞表面上に存在する受容体などの膜タンパク質、あるいはプリオン等の不溶性・沈着性フィブリルなどの巨大タンパク質を舞台とする相互作用系は創薬ターゲットとして重要なものが多く、これらが多様でかつ複雑なタンパク質複合体に対して、水溶液中での状態を解析できるNMRは強力な解析手法になると期待されています。しかし、NMRの場合、解析対象の分子量が大きな障害と

なっており、現在のところタンパク質の高精度な立体構造決定が可能な分子量は4万程度が限界であると考えられています。

このような背景のもと、私達は、まず独立に、2つの開発を行いました。1つは、味の素㈱で行われた、「研究対象のタンパク質に対して、NMRの構造データを得られやすくするためタンパク質を安定同位体で標識する方法」です。もう1つは、東大で行われた、「研究対象のタンパク質の分子量が大きくても、生体分子が結合している状態の分子認識機構を立体構造レベルで明らかにできる新しいNMR測定技術の開発」です。これらの技術開発をベースとして、実用性のある超高分子量複合体系への適用が可能であることを実証できましたのでご紹介します。

NMR解析のための新しいタンパク質安定同位体標識法

NMRは、タンパク質中の¹H, ¹³C, ¹⁵Nといった同位体元素を観測する手法なので、NMRの研究で使用するタンパク質は、これらの安定同位体で標識されたものを使います。研究者の間では、簡便で効率のよい同位体標識法が切望されてきました。構造解析では数ミリグラム単位の試料量が必要なので、大量発現系の構築が重要ですが、発現しにくくそれが困難なタンパク質も多く存在します。図3にいろいろなタンパク質の発現系とその特徴を示します。大腸菌は、培養時間が短く、コストも安いのでよく使われる方法です。構造解析に用いる蛋白質は、通常、大量発現系を構築し、あらかじめ培地に同位体標識化合物（¹⁵N塩化アンモニウムや¹³Cグルコース）を加えて培養することで標識体を得ます。

	大腸菌	無細胞系	酵母	昆虫細胞	動物細胞
発現量(ml)	<100 μg	<10mg	<10mg	<100 μg	<1 μg
培養時間	短い	短い	中	長い	長い
コスト	安価	高価	高価	高価	高価
重水素標識	○	○	△	×	×

図3 タンパク質の発現系と特徴

一方、味の素(株)ではこれまで、様々なタンパク質の培養法を研究してきました。その中でコリネホルム菌というグルタミン酸を発酵生産する微生物を利用すると、大腸菌で発現させるよりも、はるかに少ない培養量で多量の試料を得ることができることがわかりました。標識体を作るのには、安定同位体化された高価な原料を培地に添加するため、少量でたくさん生産できるコリネホルム菌を使うと大腸菌に比べてコストが安く済むメリットがあります。

さて、図3で示された動物細胞や昆虫細胞は、培養時間も長く、発現量も少ないですが、生物特有の糖がついたタンパク質を作ることが出来ます。糖がついていないと機能しないタンパク質を研究対象とする時、これらの細胞でなければ得ることができませんが、安定同位体標識には高いコストを要します。

ここでご紹介する試料調製方法は、あらかじめ培養する時に安定同位体の原料を加えるのではなく、タンパク質が精製された後に安定同位体標識する方法です。培養で得られたタンパク質に ^{15}N 塩化アンモニウムを加え、トランスグルタミナーゼ(TGase)という酵素を作用させると、タンパク質の表面にある1級アミンやグルタミン残基のカルボキシアミド窒素の ^{14}N が特異的に反応し ^{15}N に置き換わります。タンパク質内部に存在するグルタミン残基に作用させることは出来ませんが、グルタミン残基は、多くのタンパク質の表面に豊富に存在するアミノ酸なので効果的に標識することが出来ます。同位体置換なので、本来の立体構造を崩すことなく、NMRに適したタンパク質試料に調製することが出来ます(図4)。

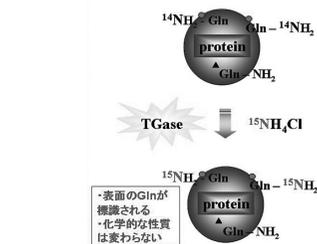


図4 TGaseにより ^{15}N 標識されたタンパク質(構造は変化しない)

また、動物細胞や昆虫細胞から得られたタンパク質に対しても後から安価に標識することができます。これは、「酵素によるタンパク質の同位体標識法」として特許を申請しました(味の素(株)出願 2001-139827; 公開 2002-332295)。

NMR による相互作用界面同定法の開発

NMRの生体高分子(例えばタンパク質)への応用は、NMRの装置が高磁場化され性能を上げていく中で実現されています。現在一般的に売られている装置では920MHzが最高ですが、NMR装置(磁石)の開発レベルでは1GHzにも達する勢いです。NMR装置の性能が上がると、短時間での測定や少量(低濃度)のサンプルの測定が可能になります。また、新しい測定手法も1991年R. R. Ernstが「高分解能NMRの開発」、2002年K. Wüthrichが「生体高分子の同定および構造解析のための手法の開発」でノーベル化学賞を受賞したように装置と共に発達してきました。

東大嶋田研究室では、1999年に交差飽和現象(Cross saturation phenomena)を利用しタンパク質複合体の界面残基を特定することで、他の解析法に比べ、高精度に相互作用界面残基を決定することが可能なNMR交差飽和法を開発しました。これは、「生体分子複合体の界面残基を同定する方法」として特許申請しました(味の素(株)出願)。

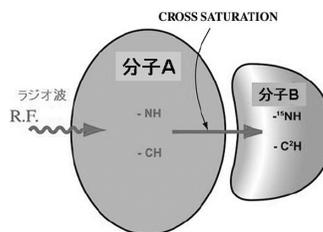


図5 通常の交差飽和実験(分子量の限界あり)

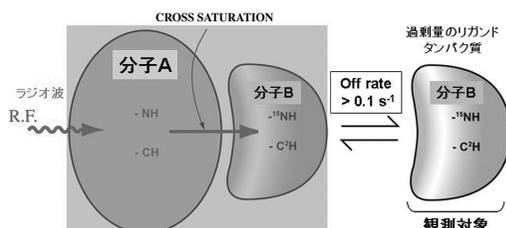


図6 転移交差飽和法(分子量限界なし)

2000-214997；公開 2002-31610)。しかしながら、この方法は分子 A と分子 B の複合体にラジオ波 (R.F.) を照射し、その変化を複合体のまま直接観察する方法なので、観測できる複合体の分子量に 10 万程度という上限がありました (図 5)。

この限界を克服するため、結合状態の相互作用を解離状態で観測する「転移交差飽和法」(Transferred cross saturation; TCS 法) を開発しました (図 6)。これは、交差飽和法を改良したもので、分子 A に照射したラジオ波がその界面を通して分子 B の界面へと影響を与えるところまでは同じですが、分子 A・B の結合定数が適切な範囲にある場合、結合・解離の交換現象により単体になった分子 B を観察します。複合体そのものを観測対象としないので、片方が巨大タンパク質でも対応でき、交差飽和法に適用できる分子量の限界は事実上なくなったといえます。更に、分子 B の分岐鎖アミノ酸のメチル基を選択的に標識するという工夫で、タンパク質複合体の検出感度や飽和移動効率を著しく向上させることができました。これらは、相互作用界面を高感度かつ高効率に決定できる方法 (側鎖法)「蛋白質複合体解析法」として特許申請しました (産総研・味の素(株)共願；2002-217938；公開 2004-61216)。

以上、タンパク質相互作用界面同定手法としての交差飽和・転移交差飽和法の特長をまとめます。

- (1) 従来法に比べ、高精度の相互作用界面の同定が可能。更に高精度の理論計算 (ドッキングシミュレーション) に寄与。
- (2) NMR 法であるため、適用範囲が広い。膜タンパク質複合体などの不均一な相互作用系にも適用可能。
- (3) 転移交差飽和法に拡張することで、適応複合体分子量に制限無し。

実用超高分子量複合体系での実証研究

以上の技術を、疾患に関与するタンパク質の系へ産業応用した例をご紹介します。

エコノミークラス症候群 (ロングフライト血栓症) は、乾燥した飛行機内などで長時間体を動か

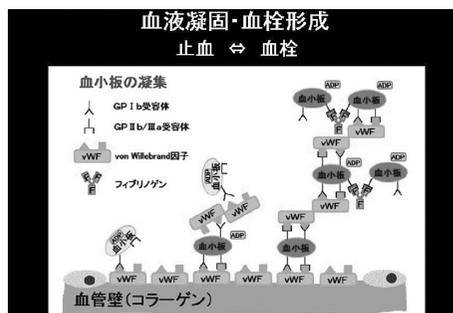


図 7 血栓形成のメカニズム [脂質と血栓の医学] より <http://hobab.fc2web.com/sub2-kesshoubangyoushu.htm>

さないでいると、血管内で作られた血栓のため最悪の場合死に到るという怖い病気です。その原因である血栓は、血管の内側が損傷し線維状コラーゲンが露出したところに、血液中に存在するフォン・ウィルブランド因子 (vWF) が接着することで形成し始めます。血液が流れる力の作用で、血管中に固定化された vWF に血小板が接着し、更に vWF を介して多くの血小板が重なるというメカニズムで血栓が形成されていきます。(図 7)。血栓形成の初期段階であるコラーゲンと vWF の結合に、vWF 上の A3 ドメインと呼ばれるタンパク質が関わっていることはわかっていましたが、その相互作用機構は不明でした。そこで、本研究では、抗血栓薬開発に役立つ構造情報として、血栓形成の初期段階に関与する A3 ドメインと血管の内側を形成している線維状コラーゲンとの相互作用様式の解明を目指しました。図 8 に示すように、線維状コラーゲンが不均一・不溶性であることから、構造生物学的な解析手法が適用し難い系です。

この相互作用は血栓症などの創薬ターゲットに

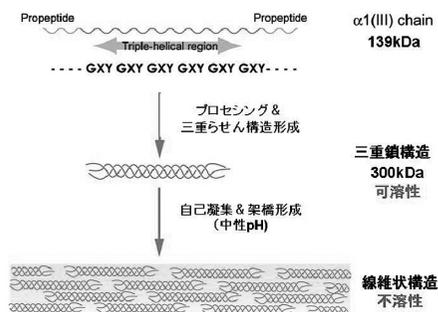


図 8 線維状コラーゲンの構造

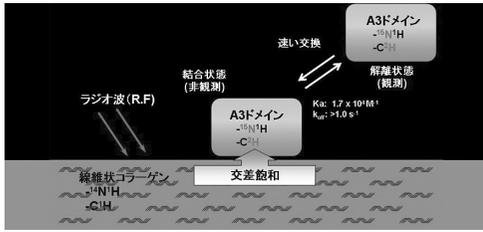


図9 A3ドメインとコラーゲンの交差飽和実験

なり得るものですが、コラーゲンは通常の球状タンパク質とは異なり、不溶性・不均一性を有した巨大で複雑な線維構造を形成するため、これまでこれを対象とした原子レベルでの相互作用解析を行うことが困難でした。しかし、本研究では、NMRの転移交差飽和法を利用することで、不溶性のコラーゲンに結合する可溶性のA3ドメインの結合部位を調べることが可能でした。不溶性線維状コラーゲンに²H, ¹⁵N標識を施したA3ドメインをモル比で10倍添加した極めて粘性の高い試料を測定対象としました。結合定数が適切な範囲にある場合、図9に示すように、不溶性のコラーゲンにラジオ波(R.F.)を照射すると、結合しているA3ドメインへ交差飽和の影響を与えます。飽和の影響が残っている状態で解離したA3ドメインをNMRで観測します。図10に、ラジオ波を照射した状態と非照射状態のシグナルを示します。不溶性のコラーゲンに特異的に照射したラジオ波は、A3ドメインの界面に存在する残基(I978やY1017)に影響を与え、シグナル強度は落ちています。一方、界面に存在していないA1047は変化していません。このようにして、A3ドメインのすべてのシグナル変化を観察し、三重鎖らせん構造のコラーゲンがどの部位に結合しているかを決定しました。

その結果、A3ドメインの溝状部位(半径15Å

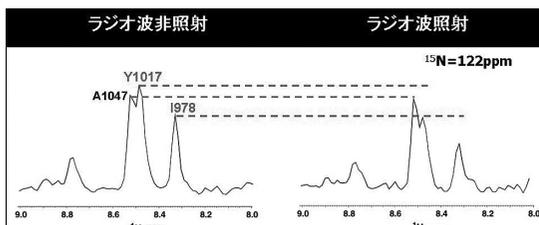


図10 ラジオ波照射状態と非照射状態の違い(界面にある残基のシグナルは強度が落ちる)

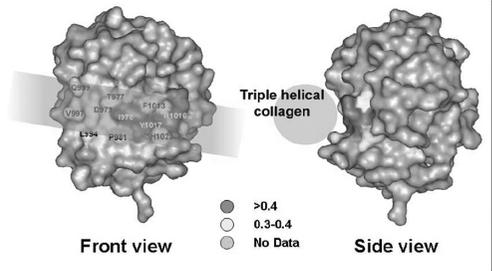


図11 コラーゲンが結合したA3ドメイン
コラーゲン三重らせん構造に適合した浅い溝状構造

程度で疎水性が高い)がコラーゲンとの結合界面であることが明らかとなりました(図11)。

さて、インテグリンα2-Iドメインというタンパク質は、コラーゲン様ペプチドに結合する事が知られています。インテグリンのアミノ酸配列は、A3のそれと約20%しか一致しておらず、進化的に遠い事がわかりますが、これらの立体構造の骨格は非常によく似ています(図12)。ところが、類似の立体構造を持ち、コラーゲンと結合するという機能も同じでありながら、その結合部位は大きく異なっています。

通常、構造ゲノミクス研究では、基本的に「立体構造の骨格が似ているタンパク質は、機能も似ている」「機能が同じ(同じ分子と結合する)場合は、同じ部位に結合する」と考え、機能と立体構造の両方がわかっているタンパク質の情報を利用して、その片方だけわかっているタンパク質の情報を推定します。しかし、このような例をみると、予測にとどまらず、相互作用する部位を確認する実験を行うことは重要です。

実験で得られた界面情報は、目的のタンパク質間の接着を阻害する化合物の研究に使われます。例えば、たくさんの化合物の中から結合を阻害するものを探索する仮想スクリーニング実験や結合

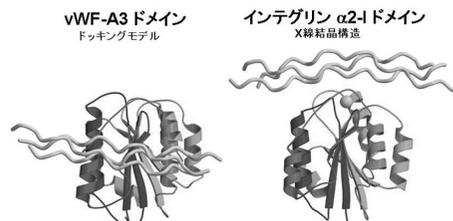


図12 コラーゲン様ペプチドと結合する他のタンパク質(インテグリンα2-I)結合部位は異なる

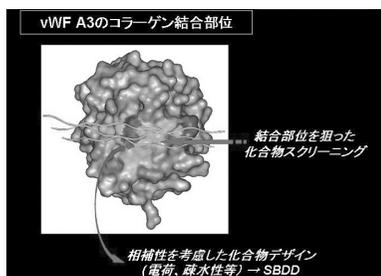


図 13 得られた界面情報の利用

を阻害する化合物のデザインに利用されます。特に、構造情報からわかる界面の電荷や疎水性などの性質を基本に、相補する化合物の構造をデザインする手法は、SBDD (Structure Based Drug Design) と呼ばれています (図 13)。

更に予測や実験で見つかった低分子化合物を、つなぎ合わせることで、より高い結合力、高い阻害力をもった化合物をデザインする SAR by NMR (Structure Activity Relationships by NMR) という考え方も登場しています (図 14)。

本研究は、血栓形成に関与する A3・コラーゲン複合体の界面情報を出し、血栓形成を阻害する新規薬物設計のための構造情報を与えた点で世界的にも注目度の高い研究です。系全体が巨大・超高分子量であるが故にこれまで扱い難かった分子の相互作用ネットワークの解明が可能になったことを意味しています。生体内の様々な生体分子間の相互作用部位を明らかにすることができれば、生命現象を分子レベルで解明するだけでなく、相互作用部位を標的とした新規薬物の設計にとって重要な情報を与え、新たな疾患の治療方法開発につながる可能性を秘めていると考えております。これは、「タンパク質間の相互作用界面情報を用いた疾患関連アミノ酸残基の特定方法およびそれ

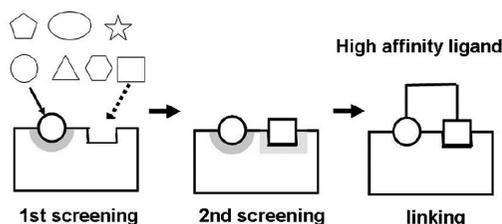


図 14 高い活性を持つ化合物をデザインする方法
Fesik, S. W. et al., Science, 274, 1531-4 (1996)



図 15 生物情報解析研究センター (BIRC, JBIRC)

を用いた薬物スクリーニング法」として特許申請しました (味の素(株)出願 2002-242295; 公開 2004-85206)。

最後に

本研究は、平成 12 年から実施されたいわゆる小渕ミレニアム計画の一環です。産学官連携の研究所「生物情報解析研究センター」がお台場に設立され (図 15)、経済産業省・NEDO による「生体高分子立体構造情報解析」プロジェクト、嶋田一夫チームリーダー (東大院薬教授) を中心に行われました。本研究を行うにあたりまして、産業技術総合研究所及び NEDO、嶋田一夫チームリーダー、味の素株式会社に感謝いたします。

参考文献

- ・嶋田一夫, Short Review “NMR による蛋白質複合体界面の検出法” 蛋白質・核酸・酵素, 47, 1285-91 (2002).
- ・嶋田一夫, 特集 第一部 3 年以内にも実用化できる収穫目前の研究 “たんぱく質の結合部の構造解析”, 日経バイオビジネス, 6 月号, 58 (2003).



図 16 受賞者 左から尾上弘美, 鈴木榮一郎, 高橋栄夫, 榛葉信久 (西田紀貴は米国勤務のため表彰式を欠席)