

安定同位体を用いた生体系NMR研究

東京大学・大学院薬学系研究科
産業技術総合研究所・生物情報解析研究センター 嶋田 一夫

ゲノム情報は直接の産物である蛋白質として具現することにより初めて生体内で目的とする機能を発現することができる。ゲノム情報を役立てるためには、タンパク質がどのような機構で機能を発揮しているかを明らかにすること、すなわちタンパク質及びそれらと相互作用する生体高分子の相互作用を詳細に解明することが重要である。特に、膜蛋白質とリガンドとの相互作用を解明することは、その機能を考える上で、またタンパク質の立体構造をもとに薬物のデザインをする上でも、重要である。

構造生物学的手法の一つである核磁気共鳴法(NMR)は、我々にタンパク質や核酸など生体高分子の立体構造や相互作用様式に関する情報を提供する。しかしながら、NMRで立体構造を求めることができるタンパク質は、対象タンパク質の分子量がおよそ40K以下のものに制限されている。これは、高分子量タンパク質になるとNMRシグナルの線幅が著しく増大し、詳細な解析、特に構造決定プロセスに必要なNOE解析が著しく困難になることに起因する。

上で述べたNMRの制限はタンパク質複合体に対する解析にも当然当てはまる。したがって、高分子量タンパク質の相互作用を研究する場合、立体構造を直接求めることは行われず、その代わり、複合体形成に伴うNMRシグナルの化学シフト変化(化学シフト摂動法)や主鎖アミド水素の水素-重水素交換速度変化(H-D交換法)を指標として、結合部位の同定を行うことが多かった。

しかし、それら指標により決定された界面はX線結晶構造解析により明らかとなったものと必ずしも一致することはなく、あいまいな点があった。したがって、膜蛋白質・リガンド複合体のような高分子量タンパク質の相互作用解析に対して適応可能な新しいNMR測定法が必要である。我々が開発した交差飽和法や転移交差飽和法は、安定同位体標識法とTROSY測定法に基礎を置く、新規NMR測定法である。この測定法は従来用いられてきた化学シフト摂動法やH-D交換法と比較して、巨大タンパク質複合体を取り扱え、精密に界面残基を求めることができることが特徴である。ここでは、転移交差飽和法により解析されたコラーゲン・コラーゲン結合蛋白質相互作用解析などに関して発表する。

細胞外マトリックスの主要な構成成分であるコラーゲンは、Gly-X-Yの反復配列のXおよびY位にプロリン、4-ヒドロキシプロリンがそれぞれ高頻度で出現する一次配列を有する。コラーゲンは翻訳後、3本のポリペプチド鎖がトリプルヘリックス構造へとフォールディングし、さらに生理的条件下においては、自己会合して不溶性の線維を形成する。生体内におけるコラーゲンの役割は多様であり、細胞組織・器官の形成を物理的に支えるだけでなく、細胞表面にあるコラーゲン受容体との相互作用における足場として、細胞接着・遊走・血小板粘着、創傷治癒、形態形成などの生命現象に深く関わっていることが知られている。本研究では、血小板粘着反応の最初のステップである、von Willebrand factor(vWF)と細胞内皮下コラーゲンとの相互作用に着目し、その相互作用様式を構造生物学的に解明することを目指す。しかしながら、不溶性の超分子会合体を形成するコラーゲンの性質は、コラーゲンとその結合タンパク質の相互作用を構造生物学的手法により解析する際の大きな妨げとなっていた。そこで、まずvWF-A3ドメイン上におけるコラーゲン結合部位

を決定するため、NMRによる新規相互作用界面決定法である転移交差飽和(Transferred cross saturation; TCS)法の適用を試みた。TCS法は、複合体形成時に受けた情報を遊離状態で観測するため、原理的に複合体の分子量に依存せず結合界面を決定することが可能である。これを利用すれば、これまで構造生物学的アプローチが困難であったコラーゲンをはじめとする不溶性・不均一性を有する生体物質との相互作用解析が可能となることが期待できる。また本研究では、TCS法により明らかとなったA3ドメインの結合界面の情報などから認識するコラーゲン配列を絞り込み、それに基づいて作製したコラーゲン模倣ペプチドとA3ドメイン複合体の構造解析を行った。

1. 転移交差飽和法を用いたA3ドメインのコラーゲン結合部位の決定

線維形成タイプIIIコラーゲンと非交換性プロトンを重水素化したA3ドメイン複合体を用いてTCS実験を行った。TCS実験においては、A3ドメインのコラーゲン結合界面残基のみがラジオ波照射により飽和されたコラーゲンからの交差飽和の影響を受ける。すなわち、交差飽和の影響を強く受けシグナル強度が減少した残基をA3ドメインの結合界面残基と結論できる。TCS実験の結果をA3ドメインの立体構造上にマッピングすると、顕著なシグナル強度減衰が観測された残基は分子表面において一つの連続した面を形成した(Fig.1a)。またこの領域には、直径約15Åのトリプルヘリックスを収容可能な溝が見出される(Fig.1a)。以上の結果より、A3ドメインはコラーゲントリプルヘリックスを分子前面に形成された溝を使って認識していることが強く示唆される。この結果に基づいて行ったアラニンスキャン変異実験は、TCS実験の結果を完全に支持するものであった(Fig.1b)。以上のことから、TCS法は不溶性の生体分子との相互作用界面を決定するための手法として利用可能であることが明らかとなった。

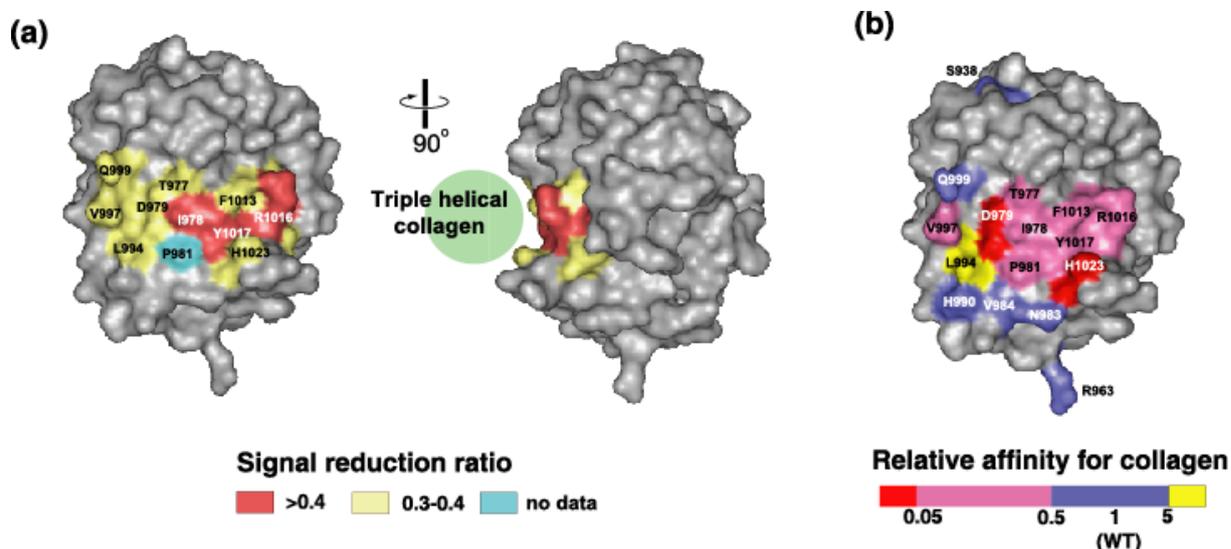


Fig.1 (a)A3ドメインの立体構造上に、TCS実験において顕著にシグナル強度が減衰した残基を示す。Z軸に沿って90°回転した右側の図においては、コラーゲントリプルヘリックスを収容可能な溝が見出される。(b)変異体のコラーゲン結合定数を野生型と比較し構造上にマッピングした。L994Aでは野生型と比較して親和性が約5倍上昇した。

vWF-A3ドメインと相同性の高い配列は数多くのタンパク質中において見出され、VWAドメインファミリーとして分類される。細胞接着因子インテグリンの $\alpha 2$ -Iドメインは、A3ドメインと同じくコラーゲン受容体として機能するVWAドメインであり、これまでにコラーゲンペプチドとの複合体構造が報告された唯一の例である(Fig.2b)。A3ドメインと $\alpha 2$ -Iドメインの構造を比較すると、A3ドメインは分子の前面において、 $\alpha 2$ -Iドメインは分子の上面においてコラーゲンと結合しており、リガンド認識

様式が共通のフォールドを有するドメイン間で全く異なるという点において極めて興味深い。

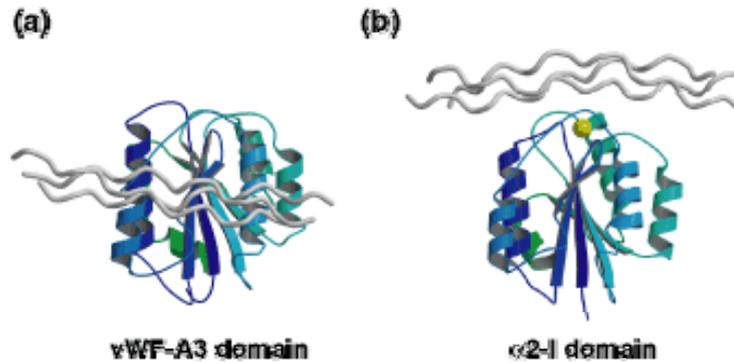


Fig.2 (a) A3ドメインとコラーゲンモデルペプチドとのドッキングモデル構造。(b) $\alpha 2-I$ ドメインとコラーゲンペプチド複合体の結晶構造(PDB entry 1DZI)。リガンド結合部位にある金属イオンを球で示す。

2. A3ドメインが認識するコラーゲン配列の探索および複合体の構造解析

これまでに、タイプ III コラーゲンの CNBr 分解産物である CB4(III)は vWF を介した血小板凝集反応を引き起こすこと、さらにその部分ペプチド(CB4(III)-7)が ^{541}G - ^{558}Q 領域を介して vWF と結合することが報告されていた。TCS 法により明らかとなった A3ドメインのコラーゲン結合部位で特徴的な点は、①溝を形成する A3ドメインの表面残基に I978、Y1017をはじめ疎水性残基が非常に多く含まれること、②結合溝の深さが他のコラーゲン結合タンパク質と比較して浅く、わずか 4 Å 程度しかないという点である。このことは A3ドメインが側鎖の小さい疎水性残基を認識することを示唆しており、CB4(III)-7においてこの条件に合致するのは ^{541}GAA あるいは ^{550}GSA である。さらにコラーゲンの Lys 側鎖アミノ基をアセチル化修飾して SPR 実験を行った結果、固定化した A3ドメインとの相互作用が修飾度依存的に失われた(Fig.3b)。以上を総合すると、 $^{540}KGAA$ 配列が A3ドメイン認識の決定要素となりうると考えた。

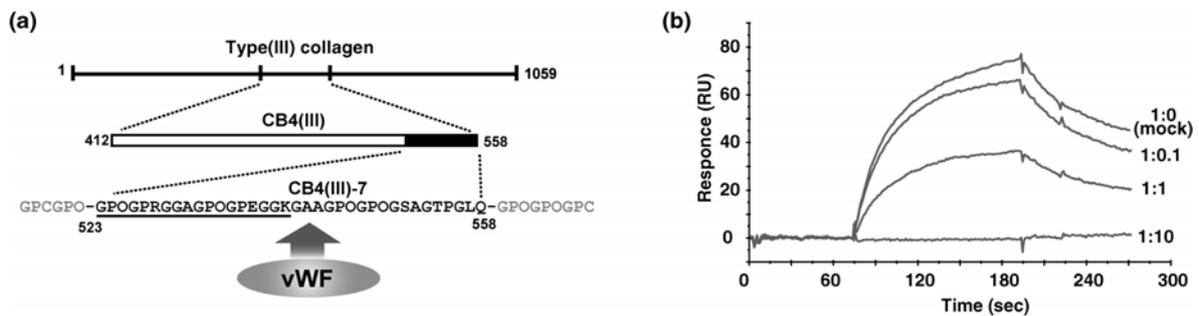


Fig.3 (a) タイプ III コラーゲンの CNBr 分解産物 CB4(III)をさらに断片化した合成ペプチド CB4(III)-7 は vWF と結合することが示される一方、下線で示す 523-540 のみを含むペプチドでは vWF との結合が観測されないことが報告されている。O は Hydroxyproline を示す。(b) A3ドメインを固定化し、アセチル化を施したタイプ III コラーゲンをインジェクトしたときのセンサーグラム。コラーゲンに含まれる Lys 残基と反応に用いたアセチル化試薬 N-acetylsuccinimide のモル比を示す。

以上の結果に基づき、KGAA 配列を含むコラーゲンペプチドを作製し、A3ドメインとの相互作用を解析した。A3ドメインとコラーゲンペプチド複合体の交差飽和実験を行ったところ、交差飽和の影響を強く受けた残基が A3ドメインの分子前面において観測されたことから、コラーゲンペプチド

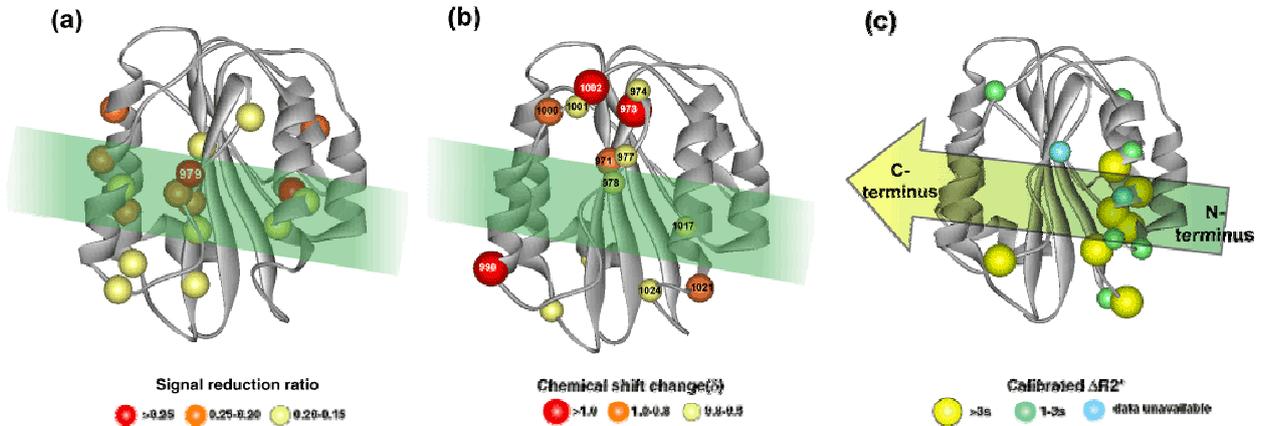


Fig.4 (a)A3ドメインとKGAA配列を含むコラーゲンペプチドに対して交差飽和法を適用した結果を示す。ネイティブコラーゲンを使ったTCS実験の結果より明らかとなっているコラーゲン結合部位を、半透明の帯にて表示している。(b)コラーゲンペプチド存在下において、顕著な化学シフト変化を示した残基を表示した $[\delta = \{(\Delta\text{NH})^2 + (\Delta\text{N}/5)^2\}^{1/2} \times 100]$ 。(c)ラジカル存在下で顕著に緩和速度が増大した残基の位置を示す。この実験では、上段の配列中*で示すCys残基にスピラベル試薬MTSLが導入してある。明らかとなったコラーゲンの結合の方向を半透明の矢印で示した。

がネイティブコラーゲンと同じ様式でA3ドメインと結合していることが明らかとなった(Fig.4a)。また、KGAA配列を含むコラーゲンペプチドと均一¹⁵N標識A3ドメインと混合してHSQCスペクトルを測定した。その結果、コラーゲン結合部位近傍に位置するいくつかの残基が顕著な化学シフト変化が認められ、KGAA配列を含むコラーゲンペプチドがA3ドメインと特異的な相互作用を示すことがさらに確認された(Fig.4b)。興味深いことに、化学シフト変化はコラーゲン結合部位よりもむしろそのやや上部に強く観測されており、コラーゲン結合に伴う構造変化が生じている可能性も示唆される。

次にKGAA配列を含む合成コラーゲンペプチドのCys残基へスピラベル試薬MTSL((1-oxyl-2,2,5,5-tetramethyl-Δ3-pyrroline-3-methyl)methanethiosulfonate)を導入した。スピラベルなどのラジカル分子は近接する核スピンの緩和を強く促進し、周囲およそ20Å以内に位置する原子のNMRシグナル強度を減少させる。本実験においては、A3ドメインとスピラベル試薬の非特異的な相互作用に由来する影響を補正するため、ラジカルによる緩和速度の増大値 ΔR_2 を評価の尺度とした。MTSL化したコラーゲンペプチド存在下において測定したA3ドメインのシグナル強度と、MTSL試薬のみが存在する状態で測定したA3ドメインのシグナル強度比から算出した補正後の ΔR_2 値をA3ドメインの立体構造上にマッピングした。その結果、ラジカルによる緩和速度の増大を示す残基はヘリックス4およびそれに続くループ領域に集中して存在した(Fig.4c)。MTSLは認識配列よりもN末端側に位置していることから、コラーゲンはN末端方向をヘリックス4側にC末端方向をヘリックス3側に向けた配向で結合していることが明らかとなった(Fig.4c)。

【総括】

本研究ではTCS法を利用することにより、A3ドメインにおけるコラーゲン結合部位の同定に成功した。この結果は線維型コラーゲンのように不溶性・不均一性を有する生体物質を含むサンプルを対象とした原子レベルの相互作用解析が可能であることを示した最初の例である。今後NOEなどの距離情報を収集して複合体構造をさらに精密に決定することにより、vWFをターゲットとした抗血栓薬の開発へとつながっていくことを期待する。