

# 生命システム解明を目指したNMRによる生体分子間相互作用解析法の開発

●高橋 栄夫

独立行政法人 産業技術総合研究所 生物情報解析研究センター

## 〈研究の目的と進め方〉

ゲノム解析により明らかとなるタンパク質群は生体内で様々な生体分子と相互作用をしてその機能を発揮する。現在、タンパク質の分子間相互作用を明らかにする目的で、分子レベルでの網羅的な解析が行われているが、分子間相互作用情報を活用した創薬などの応用研究を行うためには、立体構造に基づいた原子レベルでのタンパク質相互作用情報が必須となる。このような観点から、研究代表者らは安定同位体標識法を駆使し、タンパク質複合体の相互作用界面を原子レベルで決定することが可能なNMR手法—交差飽和法—を開発した (Nat. Struct. Biol., 7, 220-223 (2000))。本方法は、基本的にハイスループットで網羅的な解析を行うことが可能な手法ではあるが、その測定感度や適用できる複合体分子量限界など、いくつかの克服すべき制限が存在していた。当該研究では、我々の開発した交差飽和法を基盤とし、高分子量タンパク質複合体に適用可能で、かつ汎用的なNMRによる分子間相互作用解析法の確立を目指す。

## 〈研究開始時の研究計画〉

- 1) 交差飽和法において、感度・飽和移動効率を向上するのに適した側鎖プローブの選定、および作成したシミュレーションプログラムによるプローブ特性の検討を行う。
- 2) 1)を実現するための、安定同位体標識法の検討、およびモデル系となるタンパク質複合体試料の大量調製を行う。
- 3) 1)を実現するためのNMR測定法の開発、および測定条件の至適化を行い、本手法の有効性を検証する。

## 〈研究期間の成果〉

- 1) 測定感度等の観点からメチル基をプローブとする側鎖交差飽和法の検討を行った。交差飽和法において重要なファクターとなるスピン拡散現象についてのシミュレーションを行った結果、メチルプロトンは、その緩和特性から、スピン拡散が効率良く抑制されることが明らかとなった。さらに、タンパク質複合体の構造データベースを探索したところ、メチル基は複合体相互作用界面に比較的高頻度で存在しており、有用な相互作用解析プローブになると考えられた。
- 2) メチル選択的安定同位体標識法については、Kayらのグループによって確立されているILV標識法を用いた。メチル基利用交差飽和法の有効性を検証するためのモデル系として、Protein A抗体結合ドメインFBとマウス抗体(IgG1)の相互作用系(複合体分子量164K)を用いた。ILV標識法を行い、高収量でかつ選択性の高い標識体FB試料の調製が完了した。
- 3) 交差飽和法における選択照射領域の検討を行い、抗体分子の効率良い飽和が行えるようになった。当初の予想通り、メチルプロトン検出の感度は高く、測定時間は従来法に比べ数十分の一に短縮された。側鎖をプローブとしたことで、短い照射時間で効率良い飽和移動が起こることが実験的にも明らかとなり、さらに、メチル基の

T1緩和特性からS/N比をより向上させる改変も可能であることを示した。

また、転移交差飽和実験にも適応できるため、難溶性・不均一系タンパク質複合体解析への応用も可能であり、より汎用性の高い、ハイスループットなタンパク質複合体解析法として利用可能であることが示された。

## 〈国内外での成果の位置づけ〉

交差飽和法は研究代表者らが独自開発したNMR手法であり、近年その有効性から多くの相互作用解析系に利用されてきている。本研究におけるメチル基利用は、さらに本手法の有効性を拡大するものであり、国内外で随一であるといえる。

## 〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

現在のメチル選択的標識は、ILV標識法により行っているが、他のメチル基(AlaやThr等)を用い測定することも原理的に可能である。これを達成するためには、異なる標識法、例えば無細胞発現系などを利用することが考えられるが、この点に関しては検討できなかった。

## 〈今後の課題〉

現在のところ、本手法を他の多くのタンパク質複合体系に効果的に適用するには、対象となる受容体がミリグラム量は必要となる。高分子量の受容体は大腸菌による発現が困難である場合が多いため、動物細胞を利用した受容体の大量発現系・調製法を確立する必要がある。一方で、NMR測定においてもcryogenic probeなどの利用による、さらなる検出感度向上を行うことで、必要となる試料量を抑えることが可能になると考えられる。

## 〈研究期間の全成果公表リスト〉

1. 0305131308  
Nakanishi, T., Miyazawa, M., Sakakura, M., Terasawa, H., Takahashi, H., and Shimada, I., Determination of the interface of a large protein complex by transferred cross-saturation measurements, *J. Mol. Biol.*, 318, 245-249 (2002).
2. 0305131322  
Nishida, N., Sumikawa, H., Sakakura, M., Shimba, N., Takahashi, H., Terasawa, H., Suzuki, E., and Shimada, I., Novel collagen-binding mode of the VWA domain determined by a transferred cross-saturation experiment, *Nat. Struct. Biol.*, 10, 53-58 (2003)
3.  
Takahashi, H., Miyazawa, M., Ina, Y., Fukunishi, Y., Mizukoshi, Y., Nakamura, H., and Shimada, I., Utilization of methyl proton resonances in cross-saturation measurement for determining the interfaces of large protein-protein complexes., *J. Biomol. NMR* in press
4. 0305131254  
特願2002-217938 「蛋白質複合体解析法」、高橋栄夫他