## タンパク質の NMR 構造生物学

基礎・シグナル帰属・分子間相互作用

名古屋大学大学院 創薬科学研究科 廣明 秀一 目次

本論:核磁気共鳴法の基礎とタンパク質への応用	3
NMR 発展の歴史とノーベル賞	3
NMR の原理	4
磁荷移動とコヒーレンス	13
よく使われる2次元 NMR 法の紹介の原理	15
HMQC / HSQC / HMBC	17
交差緩和と NOE・NOESY · ROESY	17
蛋白質の NMR の帰属法	18
主鎖の帰属	22
側鎖の帰属	25
NMR 解析に便利なソフトウェア	31
溶液 NMR を用いたインシリコスクリーニングの検証	33
生物物理 トピックス NMR から見たアミロイド β ペプチドの線維化機構解析	45
医学のあゆみ 天然変性タンパク質と創薬	49
付録1 生物工学よもやま話 (生物工学会誌より抜粋)	59
姿を変えるタンパク質	
大腸菌を宿主とした異種タンパク質高発現のイロハ	
付録2 (図表)	69

名古屋大学 理学部生命理学科専門講義 生物物理学 I 名古屋大学 大学院 創薬科学研究科 先端構造学特論 東京医科歯科大学 修士課程「分子構造学特論」

廣明秀一担当分 統合テキスト 2023 年度版 非売品・禁複製

## 本論:核磁気共鳴法の基礎とタンパク質への応用

名古屋大学・創薬科学研究科 (理学部附属構造生物学研究センター)

## 廣明 秀一

hiroaki.hidekazu@f.mbox.nagoya-u.ac.jp

本テキストは、日本分光学会編「分光測定入門 シリーズ8 核磁気共鳴分光法」の第一章むけ に書かれた内容をもとに、本講義のテキストの ために改変したものである。諸事情により一部 の図を割愛した。ご容赦いただきたい。

## はじめに NMR 発展の歴史とノーベル賞

いくつかの原子核は強い磁場中に置かれると, 特定のエネルギーの電磁波を吸収するような性 質をもつようになる.核磁気共鳴法(Nuclear Magnetic Resonance: NMR)はこの性質を利 用した分光法である<sup>1,2)</sup>.近年,分光分析法にお ける NMR の重要性は,ますます増加しつつあ るが,にもかかわらず初心者(とくに化学系や 生物系の学生で物理や数学が苦手な人たち)が 学ぶには敷居が高いことは否めない.ひとつに は NMR の発見の歴史からみて明らかなように, 1940~1950年代にかけて,核スピンや電子スピ ンと NMR 現象が発見された当初,NMR の話 題の中心は物理学と量子力学であった.その後, 半世紀以上にわたる技術革新と装置の高度化が 続けられてきた結果,高分解能 NMR 技術は 20 世紀後半に爆発的に発展した.こうした経緯は, 「化学の時代」を経て「医学・生物学の時代」 へと遷移しながら,発展を続けていることが, NMR 現象に関連のある成果に対して授与され たノーベル賞のリスト(表 1)からも見て取れる.

NMR 現象は、強い磁場中に置かれた原子核と 電磁波の相互作用を利用した分光法であり、核 スピンの量子力学的な振る舞いについて、理論 と実験が極めてよく一致する方法論である.例 えば,測定中に各核スピンにおける量子力学的 重ね合わせ状態を人工的に実現でき、しかもそ れを任意に操作することができるので量子コン ピューティングの装置として注目されている. しかしそれ以上に、今日、NMR は溶液中の分 子構造決定をはじめとして, 固体物性研究のた めの固体 NMR や、生体分子を解析する構造生 物学、代謝産物の混合物を網羅的に解析するメ タボロミクス,分子間相互作用を利用した創薬 スクリーニング, 画像診断を通じた医療への応 用へと幅広い広がりをみせており、分光法の中 でも特別な地位を占めている.本稿では、むず かしい量子力学や数学の話は成書 3-5)に譲るこ ととして、最低限 NMR を使う上での注意など

表1 ノーベル賞から見た NMR 新	き展の歴史	
   物理の時代 : 原子核・量子力学・量	量子化学	
核スピン・電子スピンの発見	W.パウリ	ノーベル物理学賞(1945)
	P.クッシュ	ノーベル物理学賞(1955)
NMR 現象の発見	I.I.ラービ	ノーベル物理学賞(1944)
	E.M.パーセル	ノーベル物理学賞(1952)
	F.ブロッホ	ノーベル物理学賞(1952)
超伝導現象の発見	H.K.オンネス	ノーベル物理学賞(1913)
	J.バーディーンら	ノーベル物理学賞(1972)
化学の時代:		
2 次元 NMR	R.R.エルンスト	ノーベル化学賞(1991)
生物学、医学の時代		
タンパク質の立体構造決定	K.ビュートリッヒ	ノーベル化学賞(2002)
MRIによる画像解析法	P.マンスフィールド	
	P.ラウターバー	ノーベル医学生理学賞(2003)

を中心に説明することにする.実際,筆者の実 感としては,後述する分極移動の項以外は,量 子力学をほとんど知らなくても(古典的なモデ ルのみで)NMR 現象の概要が理解できる.

## 1.2. NMR の原理

## 1.2.1. 核スピンとは

NMR とは核スピンの状態を観測する計測手法 である. 核スピンとは, 原子や電子の状態を記 述する波動方程式に出てくる量子数のうち, 主 量子数n, 方位量子数1, 磁気量子数mのあと に見出された第4の量子数(スピン量子数 s) に由来する物理量のことであり、記号Iで表わ す. スピンを古典力学的にイメージしようとす るならば、荷電粒子が、それ自体で「自転」す るときに生じる磁気モーメントに対応し, 原子 核だけでなく電子にも存在する.電子のスピン は1/2 であり、外部の静磁場により+1/2 と-1/2 の二つのエネルギー順位に分裂する(Zeeman 分裂). 二つのエネルギー差に相当する周波数の 電磁波を照射されると,電子スピンは共鳴して, 安定状態から励起状態に遷移する(図1).この 原理を利用した測定法が電子スピン共鳴法

(ESR) であり,遷移金属化合物やラジカル 分子の電子的性質を調べるのに用いられている. 同様に,核スピンは1/2,1,3/2,2…のように 半整数または整数のとびとびの値を持ち,エネ ルギー順位の分裂が起き,エネルギー差に相当 する電磁波を吸収して核のスピン状態が変化す る.これが核磁気共鳴法(NMR)である.装置 開発の歴史的な経緯から,ESRでは照射する電 磁波の周波数を固定して外部の磁場の強さを変 えていくのに対し,NMRでは磁場の強さを一 定にしておいて,周波数を変化させる方法がと られ,その後,一度吸収された電磁波が再放出



される過程を計測するパルス FT-NMR 法へと 変化した(後述).

## 1.2.2. NMR で観測可能な核種

さて, 核スピンはそれぞれの原子核の原子番号 と質量数に応じて、固有の値を持っている.一 般的には、質量数が奇数の原子は1/2、3/2、5/2 などの半整数の値をとる. 質量数が偶数かつ原 子番号が奇数の原子は、1,2,3などの整数 の値をとる. 質量数が偶数かつ原子番号が偶数 の原子ではスピンは0となる.NMR 現象は、 この核スピンが0でない全ての原子において可 能である.しかし、I≧1の核ではNMRの吸収 線の線幅の広幅化が起こるため高分解能 NMR に適さない. 一方, 特に I=1/2 の核種では線幅 のシャープな信号が得られるため、理論的取扱 いが容易なことも相まって、よく利用されるよ うになった. 化学・生物学分野でよく利用され る原子核の例を表2に示す.核によっては、特 定の同位体(放射能を持たない同位体=安定同 位体)のみが NMR で観測可能である. 例えば <sup>13</sup>C と <sup>15</sup>N は天然存在比が小さいが(約1%と 0.4%), 十分量の試料を準備するか安定同位体 で標識すれば、NMR が観測可能である.

# 1.2.3. NMR の原理の古典的モデルによる説明・・・ *巨視的磁荷は小さな自転する棒 磁石*

前述のように原子核がもっている電荷が、原子 核のある軸にそって回転運動をすることで、あ たかも微小な磁気双極子を生じているようにふ るまい、いわば自転している小さな磁石と看做 すことができる(古典的モデル).それぞれのス ピンのもつ磁石の大きさを電荷になぞらえて磁 荷(magnetization:磁化とも表記する)と呼ぶ.



この小さな磁石は外部磁場がないときには、その回転軸はランダムな方向を向いているが、外 部磁場(静磁場) Bo が与えられると、静磁場に 平行な軸のまわりに歳差運動する(図2).この 運動を Larmor の歳差運動とよび、その周波数

(Larmor 周波数)ωと外部磁場の強さには以下の式で与えられる比例関係がある.

 $ω = \gamma B/(2π)$ 

この比例定数のことを磁気回転比  $\gamma$  とよび, 個々の原子核は固有の磁気回転比 $\gamma$ を持ってい る(表2).この周波数に等しい電磁波が更に外 部から照射されると,核スピンは磁気共鳴し, 電磁波を吸収する.たとえば 11.7 T (テスラ) の磁場中で<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N, はそれぞれおよ そ 500 MHz, 125 MHz, 50 MHz で共鳴する.

スピン量子数 I をもつ原子核の核運動量 *p* と磁 気モーメントµの間には,前述の磁気回転比に 関連して以下の関係が成り立っている.

p=I (h/2 $\pi$ )

 $\mu = \gamma p$ 

(hはプランク定数)

つまりスピン量子数 I をもつ原子核の静磁場 B<sub>0</sub> 中でのエネルギー順位は量子化されており, 2I+1 個に分裂する.エネルギー順位 E<sub>m</sub>は量子 状態m(-I,-I+1/2,…0, I-1/2,I)の値に従い,

## $E_m = -\gamma (h/2\pi) m B_0$

である. I=1/2の核(1H, 1<sup>3</sup>C, 1<sup>5</sup>N など)では m=1/2 と-1/2の二つの状態のみが存在し,それ ぞれを $\alpha$ 状態と $\beta$ 状態とよぶ. 図 2 に示したよう に,個々のスピンは $\alpha$ 状態または $\beta$ 状態の二つの 状態の量子力学的重ね合わせである.それぞれ の状態は,いずれもそれぞれの状態に対応する コーン上で歳差運動をしている.

## **1.2.4. NMR** 測定の感度が悪いのはなぜか・・・ スピン数

現実に NMR 装置が観測するのは、多くのスピンのアンサンブルを平均したものである.これ

表2 NMR で観測可能ないくつかの核の性質					
核	原子番号	質量数	スピン	天然存在比 [%]	磁気回転比 [10 <sup>7</sup> rad s <sup>-1</sup> T <sup>-1</sup> ]
中性子(n)	0	1	1/2	0	-18.325
$^{1}\mathrm{H}$	1	1	1/2	99.9	26.752
<sup>2</sup> H (D)	1	2	1	0.01	4.107
<sup>13</sup> C	6	13	1/2	1.07	6.728
<sup>15</sup> N	7	15	1/2	0.368	-2.712
<sup>19</sup> F	9	19	1/2	100	25.162
<sup>23</sup> Na	11	23	3/2	100	7.081
<sup>31</sup> P	15	31	1/2	100	10.839
<sup>51</sup> V	23	51	7/2	99.8	7.046
<sup>111</sup> Cd	48	111	1/2	12.8	-5.698
<sup>113</sup> Cd	48	113	1/2	12.2	-5.961
<sup>129</sup> Xe	54	129	1/2	26.4	-7.452



2 巨税的な磁荷(熱平衡磁荷)という. 巨税的 な磁荷は静磁場方向 (z 軸)の成分  $M_z$ を持ち, 一方 xy 平面方向成分  $M_x$ ,  $M_y$ はそれぞれ平均 化されて零になっている. この巨視的な z 磁荷 は $\alpha$ ,  $\beta$ の二つの状態の占有率の差とスピン一つ あたりの磁気モーメントの z 成分  $m_z$ について

 $M_z{=}~(N_\alpha{-}N_\beta)~m_z$ 

(ただし $N_{\alpha}$ ,  $N_{\beta}$ はそれぞれのスピンの占有率で  $N_{\alpha}$ + $N_{\beta}$ =1)である(図3). 熱平衡状態におけ る占有率の差を Boltzmann 分布の式から計算 してみると,

 $N_{\beta}/N_{\alpha} = \exp(-\Delta E/kT) = 1 - \Delta E/kT$ 

(ただし∆E/kT≪1)

 $(N_{\alpha} - N_{\beta}) = \Delta E/2kT$ 

<sup>1</sup>H の共鳴周波数が 500 MHz (外部磁場 11.7 T) のときの両状態のエネルギー差はわずか 2.0 x 10<sup>-4</sup> kJ/mol に過ぎないので室温での kT (2.5 kJ/mol)を代入するとおよそ 10<sup>-5</sup>である.言い かえれば,巨視的な磁荷として観測されている ものは 10 万個のプロトンのわずか一個分であ ることを意味している.他の分光法に比較して NMR の感度が低い理由はここにある.その反 面,物質に吸収されるエネルギーが非常に少な いということは,NMR や MRI の持つ低い侵襲 性につながっているともいえる.

一方巨視的な磁荷 Mz の大きさは

となる.磁気回転比が大きく外部磁場強度が強 ければ強いほど、磁荷が強くなり(=感度がよ くなり),また温度が低ければ低いほど感度が上 がることが予測される.

#### 1.3. パルス FT-NMR 装置

### 1.3.1. 原理

さて、こうして得られた巨視的な磁荷  $M=M_z$ が z 軸に平行な静磁場  $B_0$ 中で、更に z 軸に垂直に 振動磁場  $B_1$ をかけたときの時間変化を解析す る.一般に核磁気モーメントの運動方程式は、 核磁気に作用する磁場 B (ベクトル量であるこ とに注意) について

#### $d\boldsymbol{M}/dt = \gamma \boldsymbol{M} \times \boldsymbol{B}$

で記述できる.この式を x,y,z の三成分に分け て書き,それぞれに x y 平面での巨視的磁荷の 減衰を表す項  $T_2$  (横緩和) z = 軸上での磁荷の回復を表す項  $T_1$  (縦緩和)を含めた運動方程式 のことを Bloch 方程式という.

 $dM_z/dt = \gamma(\boldsymbol{M} \ge \boldsymbol{B})_z - (M_z - M_z^0)/T_1$  $dM_x/dt = \gamma(\boldsymbol{M} \ge \boldsymbol{B})_x - M_x/T_2$  $dM_y/dt = \gamma(\boldsymbol{M} \ge \boldsymbol{B})_y - M_y/T_2$ 

さて,周波数 $\omega_1$ で振動する磁場  $B_1$ は xy 平面上 を時計回りに角速度 $\omega_1$ で回転する成分と反時 計回りに( $-\omega_1$ で)回転する成分のベクトル和で あると考えられる.いま,振動磁場は実験室固 定の座標系で見ているが,それとは別に z 軸に 沿って振動磁場と同じ角速度で回転する座標系 (回転座標系) x', y', z を導入すると,上記の 回転磁場は例えば回転座標系における x'に沿っ て掛けられた磁場として記述できる(図 4).この 回転座標系内での磁荷 Mの運動方程式は

> $(\partial \boldsymbol{M} \partial t)_{rot} = \gamma \boldsymbol{M} \mathbf{x} (\boldsymbol{B} + 2\pi\omega_1/\gamma \cdot \mathbf{z})$ =  $\gamma \boldsymbol{M} \mathbf{x} (B_0 \cdot \mathbf{z} + B_1 \cdot \mathbf{x} + 2\pi\omega_1/\gamma \cdot \mathbf{z})$ =  $\gamma \boldsymbol{M} \mathbf{x} (2\pi (\omega_1 - \omega)/\gamma \cdot \mathbf{z} + B_1 \cdot \mathbf{x})$ (ただし $\mathbf{x}, \mathbf{z}$ は $\mathbf{x}'$ 軸と $\mathbf{z}$ 軸の単位ベク トル)

つまり,周波数が $\omega_1=\omega$ となるように振動磁場を 与えると,回転座標系では磁荷 M はあたかも静 磁場  $B_0$ を感じていないかのように振舞い,そ の運動は振動磁場の強度  $B_1$ によって回転運動 することがわかる. すなわち $\omega_1=\omega$ が共鳴条件 である.  $B_1/\gamma=\theta$ と置くと

## $(\partial \boldsymbol{M} \partial \mathbf{t})_{\rm rot} = \theta(\boldsymbol{M}_{\rm X} \mathbf{x})$

となり,回転座標における y'z 平面上での角速 度 $\theta$ での回転運動であることがわかる.つまり パルス B<sub>1</sub>をかけている時間 t<sub>p</sub>に応じて,磁荷 M の向きは z→y'→-z→-y'と変化していく.磁 荷の回転角(= $\theta$ t<sub>p</sub>)をパルスのフリップ角(flip angle)といい,磁荷の向きを 90°(= $\pi$ /2)だけ変 化させるパルスを 90°( $\pi$ /2)パルス,180°(= $\pi$ ) 変化させるパルスを 180°( $\pi$ )パルスと呼ぶ.と ころで,このパルスを与えるための振動磁場は y'軸に平行な方向からもかけられる.(あるいは x'y'平面上の任意のどの方向でもかけることが できる.これは単にプローブコイルに流す RF パルスの正弦波の位相で制御できる.)x,y など のパルスを与える方向をパルスの位相と呼ぶ.

このようにして、パルスをかけた後に生じてく る磁荷 Mの x'成分 M<sub>x</sub>, y'成分 M<sub>y</sub>をそれぞれ x 磁荷, y 磁荷と呼び、横磁荷と総称する. 横磁 荷はパルスを切った後, Larmor 周波数で z 軸 の周りに歳差運動を続けるので、観測コイルに 誘導電流を発生する. パルス FT-NMR とは、 熱平衡磁荷にパルスを与えて横磁荷を生じさせ、 それを振動電流として観測し、Fourier 変換し てその周波数成分を解析する NMR の方式であ る.

#### 1.3.2. ハードウェアの構成<sup>2)</sup>

NMR の装置には粉末や固体試料を対象とする 固体 NMR 専用の装置と溶液試料を対象とする 溶液 NMR の二種類がある.現在用いられてい る高分解能の装置のほとんどは、パルス Fourier 変換 NMR (FT-NMR)の装置である. つ まり、静磁場中の試料に電磁場のパルスを当て て吸収させてスピンを励起した後,そのスピン が熱平衡状態に戻る過程で放出する電磁波を観 測し、Fourier 変換してスペクトルを得る.装 置構成は、静磁場を発生させる**超伝導磁石**、電 磁波(パルス)の照射と、信号電流の観測を担当 するアンテナに相当するプローブコイル, 試料 に磁場勾配をかけるためのグラジェント装置, パルスを発生させるトランスミッター,アンプ, AD コンバータおよびそれらをコントロールし データを蓄積するコンピュータからなる (図5). 発信と受信を同じコイルで行い、また発生して いるキャリア周波数が数十~数百MHzであり, そのキャリア周波数によって運ばれる情報がち ょうど数十 kHz までのオーディオ信号と同程 度の周波数帯であることを考えると、NMR 装 置に最も原理的に似ているものは FM トランシ ーバであろう.

## 1.3.3. 超伝導磁石

高磁場の NMR 装置でまず目につくのが巨大な 磁石である.強力・均一で時間変動の少ない外 部磁場を発生する磁石として,超伝導磁石の普 及が進んだ.NiTi や Ni<sub>3</sub>Sn などの線材からな るコイルを液体ヘリウムで冷却し,永久電流を 蓄えることで磁石とする.磁石は二重の魔法瓶 の内部に設置されており,外側に液体窒素,内 側に液体ヘリウムが入れてある.超高磁場(800 MHz~)を達成するためには,その液体ヘリウ ムを特殊なバルブとポンプでを減圧しながら, 4.4 K よりも更に低温にする必要がある.磁石 の中央には空洞(ボア)があり,プローブコイ ルが設置される.また主磁場を発生する超電導 磁石の内部に,磁場を均一にするための小型の 磁石群(シムコイル)が装備されている.

## 1.3.4. プローブ

NMR の装置では電磁波 (RF: radio frequency) パルスの照射と,信号観測の双方を同一のプロ

ーブコイルで行う (MRI 装置では異なるコイル を使うことも可能である). コイルは一般的にソ レノイド型またはサドル型の形状のコイルが用 いられる.実験の目的により、多重共鳴の実験 など複数の周波数を照射励起する必要があるが, 装置のスペースの関係上、プローブ中に設置で きるコイルの数は限られている. そのため通常 プローブ内に設置できる RF コイルは2個まで であり、そのためそれぞれのコイルが二種類の 共鳴周波数に共鳴するようにチューニングして ある. 例えば三重共鳴実験に用いられるプロー ブは、試料に近い側の内側のコイルを<sup>1</sup>Hと<sup>2</sup>H に、外側のコイルを13Cと15Nにそれぞれダブ ルチューニングしている. それぞれのコイルに は共鳴周波数チューニング用の可変コンデンサ とインピーダンスマッチング用の可変コンデン サが付いていることが多く, 試料ごとに最適な ところに調整する(しばしば、この可変コンデ ンサのネジを限界以上に廻して壊す事故がある ので、 取扱いには注意が必要である). 試料に近 い側のコイルのほうがパルス励起時のロスも少 なく検出感度も高い.従って<sup>13</sup>C用や多核用の プローブでは<sup>1</sup>Hを照射するためのコイルが外 側に巻いてある.一方,三重共鳴実験用のプロ ーブでは、13C/15Nの磁荷を磁荷移動により1H に移して観測を行うので,<sup>1</sup>H 用コイルが内側に 巻いてある.こうしたプローブのことをインバ ースプローブとよぶ.

溶液 NMR 用の測定には,通常は直径 5 mm の ガラス試料管に適した内径を持つプローブ(5 mm プローブ)が使われる.しかし,希薄試料(溶 解度が限られているため濃度が上がらないが試 料量は十分ある試料)のために 10 mm プローブ や 8 mm プローブが,微量試料の測定のために 1 mm や 3 mm のプローブがそれぞれ作られて いる.また,液体クロマトグラフィーに直結し て,分離分析を行うことのできるようなフロー セルプローブも入手可能である.

NMR の観測感度を向上させる方法の一つとして、コイルの抵抗を小さくすることが考えられる. コイル線材を超伝導体にすると同時にプロ ーブの内側のコイルとプリアンプ部分を極低温 に冷却することにより、プローブ感度を一桁程 度向上させる技術が実用化された (cryogenic probe).

## 1.3.5. 分光計

NMR 装置の磁石のそばに設置してある中型の キャビネットの中に納めてあるのが, NMR の

分光計である.分光計は,装置制御系,パルス 系,磁場勾配系,観測系のそれぞれのユニット 群からなる.装置制御系は、分解能調整、ロッ ク信号の検出、試料の回転制御、温度コントロ ールなどを行う. パルス系ユニットには RF パ ルスを発生させるための発振器、周波数シンセ サイザー,波形ジェネレータ、位相コントロー ラ,パワーアンプなどが含まれる.これらのユ ニットは、励起する核種の数だけ(=発生させ る周波数帯域のチャネルの数だけ)必要である. 例えば、重水素デカップリングを行いながら <sup>1</sup>H/<sup>13</sup>C/<sup>15</sup>Nの三重共鳴実験を行う時には、4チ ャネルのユニットが必要となる. それとは別に 磁場勾配を制御するための発振器とパワーアン プが必要である. 観測系にはレシーバー, 信号 増幅用のプリアンプ,周波数変換機,中間周波 数増幅用のアンプ,最終周波数用のアンプと AD コンバータが含まれる.

#### 1.4. 溶液 NMR の測定の流れ

#### 1.4.1. サンプルの調製

NMR 測定を行う試料は、低分子の場合は重水 素化された有機溶媒、たとえば重クロロホルム や d<sub>6</sub>-DMSO などに溶解する. 生体分子(蛋白 質・核酸・ペプチド・<br />
糖)などの場合は<br />
重水に 溶解するが,特に NH 基などの交換性のプロト ンの観測が重要な意味を持つ場合には, 90 %-H<sub>2</sub>O / 10 %-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>O などに溶解させる.水 系の溶媒では、pH が NMR 信号の位置(=化 学シフト)に影響を与えることがあるので, NaODやDClを用いてあらかじめpHを調整し ておくか、リン酸緩衝液などプロトンを含まな い緩衝液を用いるとよい. 試料調製中に生じた 不溶物はフィルタなどで除く.また、試料に遷 移金属イオンや金属粉が混入すると, NMR 信 号が広幅化したり化学シフトの位置が変化する ので、イオン交換樹脂などで前処理する. 試料 には, 0.1~1 mM 程度の化学シフト標準物質 (TMS など)を入れて, 化学シフトの校正に用い る. 試料溶液をガラス管に入れて封をする. 5 mmの試料管で0.5~0.6 mL 用いるのが一般的 である.後述する NOE の測定の場合には、溶 媒中の溶存酸素の常磁性効果がデータに影響を 与えることがあるので、減圧状態で超音波をか けるなど脱気操作も必要である.

### 1.4.2. サンプルを装置に導入する

このようにして試料溶液が入った NMR 試料管 を, サンプルホルダー(スピナー)にセットする.

試料管は、圧縮空気によってプローブの上部に わずかに浮いた状態でセットされ、15 Hz 程度 の回転状態で測定される.スピナーにセットす る際に、試料管ゲージを利用して、試料管の底 がプローブの底に当たらないよう、また試料が プローブコイルの中心になるように注意する. NMR 装置の試料導入のスイッチを排出側にす ると圧縮空気が送られるので、試料をスピナー ごと磁石上部の穴に浮かせるように起き、導入 スイッチを導入側にすると試料がプローブ内部 にゆっくりと下りていく.

#### 1.4.3. 装置のパラメータの設定と調整

#### 1.4.3.1. 溶媒ロック

試料が装置に導入されたら,まず溶媒ロックを 行う. 溶媒ロックとは、測定中の温度や磁場の 変動を検知して発振器・受信器の周波数を補正 するために、目的とする NMR 信号よりもはる かに低い周波数で共鳴する重水素の NMR 信号 に着目して, その周波数を同時に観測し, 基準 とする技術のことである.この目的のために, 1H 観測用のコイルがしばしば 2H にダブルチュ ーニングされている.通常,低分子化合物の NMR 試料は、重水素化溶媒に溶解するので、 その溶媒の<sup>2</sup>H シグナルをロックに用いる.生 体系試料(水溶液)の場合には 5~10 %の <sup>2</sup>H<sub>2</sub>O を溶媒に添加する. コンピュータ画面より適切 なロック溶媒を選んで、ロックを ON にすると、 画面またはインジケーターにロック信号の強さ が表示される.まれに,装置の分解能調整値が 大幅に狂っているとロックがかからないことが ある. その場合には後述の分解能調整操作を行 ってからもう一度ロックをかけることを試みる.

## 1.4.3.2. プローブのチューニング・マッチング と分解能調製

NMR の共鳴条件は、試料により(より正確には試料溶液の磁化率・誘電率の違いにより),異なる.それを補正して高感度に測定するために、 多核測定用のプローブのみならず、いわゆる専用プローブにも共鳴周波数を微調整するための 可変コンデンサが装備されているので、それを 調整する.この操作をチューニング・マッチン グと呼ぶ.例えば<sup>1</sup>H/<sup>13</sup>C/<sup>15</sup>Nの三重共鳴実験用 プローブには、ロック用の重水信号の分まで含 めると、最大で8個の可変ノブがあるので、そ れぞれの核ごとに調整する必要がある.そのの ち,分解能調整を行う.分解能とは,具体的に は試料が感じる磁場を試料の全領域でなるべく 均一にすることである.具体的には,シムコイ ルに流す電流を外部から調整することで試料を とりまく磁場の均一性を上げる.その結果,試 料全域での共鳴信号の周波数も均一となり,ス ペクトル線幅が狭く高分解能の測定が可能とな る.一方,分解能調整がおろそかだと,NMR の信号線の線幅が広かったり,線形が左右対称 でなかったり,ベースラインがうねったりして, 解析に支障がでる.分解能調整は試料を交換す るごとに毎回行う必要がある.

## 1.4.3.3. パルス・delay・その他のパラメータの 適切な設定

その後、これからどのような測定を行うのかに よって、必要なパルス・プログラムとパラメー タファイルを読み込み, 値を設定する. 測定時 に特に重要なパラメータ(通常はパラメータフ ァイルにあらかじめ設定してある)として、ス ペクトルの中心周波数,1H/13C/15Nの基準パル ス長とパルス強度、測定を行うためのパルス・ プログラム、パルス・プログラムごとに設定を 要する各変数(各パルスのパルス長とパワーの 設定, delav 長さ, ループの繰り返し回数など) の設定がある.このうち、測定ごと・試料ごと に毎回確認すべきは、<sup>1</sup>H核の90°パルスのパ ルス長とパワーである.更に、測定を行う繰り 返し回数,ダミースキャンの数,繰り返し実験 の間の待ち時間に相当する delay などの値は, 試料濃度と利用可能な測定時間の兼ね合いによ り適切に設定する.また、測定データの取り込 み時に信号のオーバーフローを避けるために, 適切なゲイン値を設定する. それらの設定がす べて完了したら,いざ測定スタートである.

## 1.4.4. 測定スタート

測定をスタートさせるコマンドを打ち込む.こ れで、測定が終了するまでは何も触れる必要が ない.しかし、複雑なパルスを用いた測定を行 うときには、測定直後にプローブを破壊する過 電流が流れていないか、試料に温度上昇が起こ っていないかなどを確認しなければならない. 測定直後に、素早く装置のエラー表示画面など に眼を配り、異常を発見した場合には速やかに 測定停止をする.なお、多くの装置では、測定 中に別のコンピュータのディスク領域を利用し て、データの処理や別の測定のためのパラメー タ設定などができる.

## 1.4.5. データの保存と管理

測定が終了したら,データを保存する.その際, データのみならず,測定時に用いたパラメータ のファイルも保存しておく.よく起きやすいの は,測定済みのデータが格納されている記憶領 域に,新規に測定したデータを上書きして以前 のデータが消えるという事故である.NMR 装 置を制御するコンピュータのシステムのデータ 構造や delay クトリ階層の構成を正確に理解し ていることが望ましい.

#### 1.5. FID の観測およびデータ処理方法 4,5)

## 1.5.1. デジタルサンプリング

パルス FT-NMR 法において, NMR データはす べて AD コンバータを通じてデジタルデータと してコンピュータに記録される. パルスにより 誘起されたxv平面上の磁荷は、プローブコイ ルに電流を誘導し, Larmor 周波数ωにスペク トルの情報 ( $\Delta \omega$ )を上積みした周波数で( $\omega + \Delta \omega$ ), 一定の時間(通常1秒以内)で自由減衰する微 弱な振動電流となる.この減衰していく信号の ことを FID (Free Induction Decay)とよぶ.数 百 MHz の周波数の信号は、一度数十 MH z 程 度の中間周波数の信号(ωIF+Δω)に変換されて更 に増幅され、最終的にスペクトル情報の周波数 成分 (Δω)のみが取り出される. スペクトル情 報の周波数帯域は核種にもよるが、せいぜい数 10KHz 程度, オーディオ信号程度の信号である. 高感度に信号を検出する目的で、中間周波数を オーディオ波に変換する過程において位相敏感 検波(PSD; Phase Sensitive Detection)が行わ れる. これは, 一般的な double-balanced mixer 回路に観測信号と,中間周波数の基準となる信 号を入れ,両者の積に相当する信号をとりだし, 中間周波数を中心とするバンドパスフィルター を通すことでノイズ成分をカットする方式であ る. 更に, 位相を 90° だけずらせた基準信号に ついても同じことを行って取得したデータも取 り込む. この二つのデータのことを FID データ の実部(real)と虚部(imaginary)と呼び、線幅の 狭い純吸収型のスペクトルを得るためには両方 が必要である.最終的に中間周波数成分を取り 除かれたスペクトルデータは更に増幅され、適 当な時間間隔をあけてデジタルサンプリングさ れ, AD コンバータを介してデジタルデータに 変換される. この FID データ(縦軸が電流強度・ 横軸が時間)を解析して,横軸が周波数(化学シ フト),縦軸が各周波数成分の強度の,いわゆる

スペクトルデータを得るために, Fourier 変換 (Fourier Transformation; FT)の操作が用いら れるのである.

## 1.5.2. ゼロフィリング処理とウィンドウ関数

FID 信号のデータを FT する際に, 主に解析を しやすくする目的で、いくつかのデジタル信号 解析技術が用いられる. 例えば, FID 信号のサ ンプリング時にオーバーサンプリングを行って, デジタルフィルターによって目的帯域のみを切 出すことで、単なる S/N の改善のみならず、不 要な溶媒由来の信号の除去などを行う、また、 FID から適当なベースライン関数を差し引くこ とでも, 溶媒由来信号を低減させることが可能 である. さらに FID に適当なウィンドウ関数を 掛けることで, FT 後のスペクトルの線形を見 かけ上変化させ、線幅をシャープにして解析を 容易にすることができる.また FID データの時 間軸の後ろの部分は信号が減衰しきっていてノ イズ成分のみが含まれていることも多い. その 場合,その部分のデータをウィンドウ関数によ って切捨てて,空の0データを付加する(zero filling)することで,FT後のスペクトルのS/N とデジタル分解能の両方を改善させることも可 能である (図 6).

#### 1.5.3. 位相補正とベースライン補正

ゼロフィリングやウィンドウなどの FID 信号 に対する前処理が終わったら, FT を行う. FT を行った後に,まず行わなければならない処理 が,位相補正である.位相に関する補正値は0 次と1次の補正値(単位は度)があり,それら を適当に変化させながら,すべてのシグナルが 上を向くように設定する.そののち,シグナル のない領域の信号強度が0になるように,ベー スラインを補正する.

#### 1.5.4. 化学シフトの補正

NMR から得られる情報のなかで最も重要なも のは共鳴周波数であり,通常は後述する化学シ フトの形で表記して,単位は無名数である ppm である. 試料調製時に化学シフトが既知の基準 物質を入れておき,その化学シフトが 0 ppm に なるようにデータ処理を行う時に校正するのが 一般的である(内部標準という).



## 図6 FT-NMRのデータ処理の流れ

## 1.5.5. シグナルの積分による定量

(通常の1次元の)NMR スペクトルにおいて,シ グナルの強度は,通常,そのシグナルを与える 原子核の個数に比例する.例えば,エタノール (CH<sub>3</sub>·CH<sub>2</sub>·OH)のプロトンスペクトルにおいて, メチル基のシグナル強度とメチレン基と水酸基 のシグナル強度比は,3:2:1になる.t-ブタノー ル((CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>·C·OH)ではメチル基と水酸基の比は 9:1となる.こうした情報は,スペクトルの帰 属や化学構造の決定に役立つので,測定後のス ペクトルのそれぞれのピーク強度の積分を行う.

## NMR で何がわかるか・・・NMR が与える情報 5<sup>-8)</sup>

溶液中の FT-NMR の測定で得られる情報のうち,最もよく解析に用いられるものは,共鳴周 波数(化学シフト)とカップリング定数であり, ほかに緩和時間,核オーバーハウザー効果,残 余双極子相互作用などがある.

## 1.5.6. 化学シフト

## 1.5.6.1. 原理と定義

核スピンの共鳴周波数は、核に働いている(核 スピンが感じている)磁場の強さに比例してい ることは既に述べた.実際の化学物質中の<sup>1</sup>H や13Cなどの原子核は、原子核をとりまく電子 雲に覆われているが、その電子が軌道上で運動 することにより生じる局所的な磁場が外部磁場 を打ち消すように作用したり(遮蔽),場合によ っては強めたり(反遮蔽)するため、実際に原 子核が感じている磁場と外部磁場との間にずれ が生じる. そのためそれぞれの原子核の共鳴周 波数は、核のおかれた化学的環境、たとえばそ の原子核がどのような化学結合をしているかを 反映する. 共鳴周波数と基準となる周波数との ずれを基準周波数で割った値を化学シフトδと 呼び,単位を ppm で表す(符号は基準周波数 より共鳴周波数が低い場合を+にとる).基準物 質としては<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C ではテトラメチルシラン (TMS)のメチル基の信号を0ppmとするのが一 般的である、このようにして定められた化学シ フトの値は、測定する他の条件が同じであるな らば、個々の化合物の原子団についてほぼ一定 の値を示し、その値は外部磁場の強度によらな い. そのためそれぞれの原子核の化学シフトの 情報に基づき、その共鳴線が化合物のどの原子 団に属するのかを帰属でき, 化学構造の決定が 可能となる. 図7に1D-NMR スペクトルの一 例を示した.

## 1.5.6.2. 磁気的等価性

さて、化学物質において、単結合はその結合を 挟んだ原子の二面角が可動である、ということ を覚えているであろうか?温度にもよるが、溶 媒に溶けた化学物質のメチル基は、メチル基の 根元の単結合の周りで高速に回転していると考 えて良い.すると、メチル基についているそれ ぞれの<sup>1</sup>H は、回転がゆっくりならば区別する ことに意味があるが、NMR 現象を観測する時 間(数 10 ms から数秒)の間で高速に入れ替わ っているような場合には区別できない.区別で きないので、同じ化学シフトに1本のシグナル が観測される.(もし、何らかの理由があって、

もしメチル基の回転が止まっていたとしたら、 特定の位置における3つのプロトンの化学シフ トが異なるとする. 例えば, 0.9 ppm, 1.0 ppm, 1.1 ppm だとする. しかし, その3つのプロト ンは、高速回転によって、つねにそれぞれが場 所を入れ替わっているとすると、観測されるシ グナルは3つのプロトンの化学シフトの平均値 が観測される). このような現象を磁気的等価 **性**という. 磁気的等価性は, 化学シフトを解析 してシグナルを帰属するときの重要な概念の一 つであり、 $^{1}$ H NMR だけではなく、 $^{13}$ C NMR や15N NMR においても普遍的に成立する概念 である. 例えば, 前述の t-ブタノールについて 考えてみると、各メチル基を構成するプロトン 同士は磁気的等価である、しかし、更にその3 つのメチル基同士もまた,磁気的に等価である. メチル基のように立体化学的に回転対称な官能 基の磁気的等価性は割りと理解しやすい. では 回転軸をもたないメチレンや、フェニル基のよ うな芳香環についてはどうであろうか?これら についても,単結合まわりの回転運動が十分早 い運動であれば、個々のプロトンが感じる磁場 は、やはり時間平均される.従って、メチレン 基の二つのプロトンや、フェニル基の二つのオ ルト位プロトン同士,メタ位プロトン同士も磁 気的に等価である.また、このとき磁気的に等 価な核どうしでは後述するスカラー(スピン)カ ップリングが出ないので要注意である.

#### 1.5.6.3. <sup>1</sup>H の化学シフト

化合物の種類によって化学シフトの拡がりが広 い核種ほど、情報量が豊富であり、研究が盛ん に行われている. 最も汎用される <sup>1</sup>H では化学 シフトはおよそ-2~15 ppm までの拡がりを持 つ. <sup>1</sup>H は軌道電子を一つしか持たないため, それに直接結合した原子団の電子密度や電気陰 性度の影響をもっともよく受ける.具体的には 電子の豊富な一級炭素に結合している<sup>1</sup>H,とり わけメチル基が最も高磁場側に観測され、飽和 炭素においてはメチル→メチレン→メチンの順 に低磁場に移動する.また飽和炭素→不飽和炭 素→芳香族炭素の順に低磁場に移動する,酸素, 窒素, 硫黄, リンなどに結合した<sup>1</sup>H は, それ ぞれ結合した原子の電気陰性度により、電子が 少なければ少ないほど低磁場に、移動する. 直 近の炭素や窒素に置換基がある場合にも、その 影響を受ける. 生体分子の NMR において, 溶 媒である水の化学シフトが約4.7 ppm というの は覚えておいて損のない値である。 飽和炭素に 結合している <sup>1</sup>H であれば,水よりも低磁場側

に観測されることは滅多にない.一方,不飽和 炭素に結合した<sup>1</sup>H や芳香環に結合した<sup>1</sup>H は6 ppm よりも低磁場側に観測されることが多い.

化学シフトに影響を及ぼす効果がいくつかある. そのうち最も効果が大きく劇的なものは,化合物または測定試料中に含まれる不対電子の影響であろう.不対電子,特に常磁性の遷移金属イオンが持つ不対電子は,常磁性シフトと呼ばれる化学シフトの大きな移動を生み出す.常磁性シフトには,1)核磁気モーメントと結合を通じて不対電子が核の中心に電子密度を持つことにより核を直接遮蔽するコンタクトシフトと, 2)核スピンと電子スピンの双極子-双極子相互作用や核スピンと電子の軌道角運動量をもつ磁気モーメントの相互作用により,空間を通じて遮蔽する海コンタクトシフトの二種類がある.

化合物の結合に含まれる非局在性の電子もまた, 磁場と相互作用してその運動を変え,環電流を 発生し外部磁場を打ち消すような局所磁場が生 じる.そのため芳香環や長い共役結合に対し立 体的に近い位置にある核スピンは,遮蔽を受け たり,位置によっては反遮蔽を受けて化学シフ トが大きく変化する.この効果を環電流効果と 呼ぶ.

### 1.5.6.4. <sup>13</sup>C の化学シフト

<sup>13</sup>C の化学シフトの拡がりは同様に-10~220 ppm 程度である. <sup>13</sup>C と,後述する <sup>15</sup>N の場合 にはそれぞれの核が持つ電子の混成軌道の状態 により  $sp^{3} \rightarrow sp^{2} \rightarrow sp$  の順に低磁場側へと推移 していき,更に結合核の歪みなどの影響も受け る.また, $sp^{3}$ 軌道を持つ炭素(飽和炭素)の場合 には,一級炭素→二級炭素→三級炭素→四級炭 素の順に低磁場側へと推移する.具体的には, メチル基炭素は通常 0~40 ppm,メチレン・メ チンで 30~70 ppm,四級炭素では 40~90 ppm で観測されることが多い.この化学シフトが, アルケンや芳香環となると 110~140 ppm,カ ルボニル基などでは 150~220 ppm と,化学構 造に応じて非常に大きく変化する.

#### 1.5.6.5. <sup>15</sup>N の化学シフト

<sup>15</sup>N は<sup>1</sup>H にくらべて,磁気回転比が小さく共 鳴周波数がおよそ 1/10 で,また天然存在比も 0.4%と低いことから,これまで低分子の構造 解析の NMR ツールとしては注目を浴びてこな かった.しかし一方で,化学シフトの拡がりは 前二者よりもさらに広く, 0~500 ppm である. 生体分子,特にタンパク質と核酸の NMR 解析 において、15N 安定同位体標識が普及するにい たって、15Nに対応するプローブなどの普及も 進みつつある. とくに窒素は水素結合のドナー であったりアクセプターであったり、電子供与 や電子吸引基として働くなど、化学的に非常に 特徴のある官能基に含まれているため、その情 報は有用である.一般に脂肪族アミンやアンモ ニウムイオンなどで高磁場(0~80 ppm)で観 測される化学シフトは,アミドで 100 ppm 前後, イミドでは180 ppm 前後, 含窒素芳香環では 200~400 ppm と大きく変化する. ニトロ基や ニトロソ基に至っては, 500 ppm を超える低磁 場にまで及ぶこともある.

## 1.5.6.6. <sup>31</sup>P の化学シフト

<sup>31</sup>P は天然存在比が 100%近く, 化学シフトの 拡がりが-300~300 ppm と極めて広いことも あり, NMR の対象としてよく研究されている. 化学的には3価と5価のリンがあるが、むしろ リンに直接結合している他の原子の原子種と個 数によって、その化学シフトのバリエーション が生まれているようである.たとえば PMe3の 化学シフトは-62 ppm であるが, PMeF2は245 ppm, PF5やPCl5でおよそ-80 ppm, [PCl6]-1 では-295 ppm である. 生体分子の解析におい ては、核酸(DNA, RNA)の糖リン酸骨格の<sup>31</sup>P NMR の研究が詳細になされている.また, ATP やクレアチンリン酸などの細胞内での高エネル ギーリン酸結合化合物の研究にも多用されてお り, *in vivo* NMR や fMRI といった生体機能イ メージングへと幅広い応用を見せている.

## 1.6. 結合定数とスピン結合(スカラーカップ リング)

孤立した核スピンが与える NMR 信号は1重線 であるが、1~3結合距離以内に別の核スピン が存在する場合、核間の磁気的相互作用によっ て共鳴線が分裂する.これは、いま着目してい る核スピンの $\alpha$ , $\beta$ の状態のエネルギー順位と、そ れに影響を与える核スピンの $\alpha$ , $\beta$ の状態がそれ ぞれ相互作用することで新しいエネルギー順位 が生じるからである.(図8).この二つの核ス ピンの相互作用であるスピン結合(spin coupling)は前述の化学シフトとはことなり、主 磁場 B<sub>0</sub>には依存しない一定の値であり、しか も化学的(磁気的)非等価の核スピンの間での み観測される.その結果,スピンIの核とスピ ン結合した信号は2I+1本に分裂する.また磁 気的に等価なn個のスピン1/2の核とカップリ ングした信号は,n+1本に分裂する.分裂した 信号の間隔をカップリング定数(J)とよび,単位 はHzで表す.2個の核スピンが相互作用する 経路としては,

#### 核スピン→電子の軌道核運動量→核スピン

#### 核スピン→電子スピン→核スピン

の二つがある.スピン結合の相互作用が強けれ ば強いほど,エネルギー差が大きくなり,カッ プリング定数も大きくなる.また、<sup>13</sup>Cや<sup>15</sup>N と<sup>1</sup>Hのカップリング定数の大きさは、結合に 関与している原子の混成軌道の s 性に直線的に 依存している. 例えば sp<sup>3</sup> 軌道をもつ <sup>13</sup>C と <sup>1</sup>H の単結合におけるカップリング定数 <sup>1</sup>J<sub>HC</sub>は 100~120 Hz に対し, sp 軌道におけるそれは 210~250 Hz である. sp2 軌道を持つ 15N と 1H の間の単結合を介したカップリング定数 <sup>1</sup>J<sub>HN</sub> は80~100 Hz であり, それぞれ比較的大きな値 を持っている. 複数の結合で隔てられるにつれ カップリング定数は小さくなっていく.3つの 単結合で隔てられた核スピン間で観測されるカ づけることができる.このことを最初に定式化 した Karplus の名前をとって、二面角依存性を 表す関係式

#### $^{3}J_{HH} = A + B\cos\phi + C\cos^{2}\phi$

のことを Karplus 式とよぶ.

スピン結合が見られる核スピンの間では,後述 する化学相関スペクトルなどで見られるように, 分極移動によってある核スピンの磁荷を結合相 手の核スピンの磁荷に「移す」ことができる. カップリング定数が大きいということは,エネ ルギー準位の差が大きく,従って平衡状態にお ける占有率の差も大きいということにつながる. 従って分極移動の効率もよい.

#### 1.7. 磁荷移動とコヒーレンス

いま核スピンIとSがスピン結合により相互作 用しているとすると、それぞれの波動関数|I> 及び|S>は外部磁場やパルスによるハミルトニ アンの他に、スピン-スピン相互作用由来のハ ミルトニアンの影響を受ける.スピンIにパル スを与えてコヒーレントな状態を作り出したと すると、ハミルトニアン **H**sを通じてその状態 はスピンSの状態にも影響を与える.二つ核の スピン相互作用のハミルトニアンを解析して, 適切なパルスを組合わせて与えてやることで. スピンIのコヒーレンスをスピンSのコヒーレ ンスに反映させることが可能である. このこと をコヒーレンス移動(coherence transfer)と 呼ぶ. 巨視的な磁荷に着目して NMR における シグナル観測の現象論として捉えると、あたか もスピンIの磁荷がスピンSに移ったように見 えるので、磁荷移動(magnetization transfer) や分極移動(polarization transfer)と呼ぶこと もある (図 9).



図9 分極移動の古典的モデルによる説明の例(INEPT)



図10 INEPTのパルス・シーケンス(refocus type)

再び前述の直接結合している<sup>1</sup>H と<sup>13</sup>C のスピン結合を通じた分極移動の例を説明する.図9 及び図 10 のパルス・シーケンスは、いずれも およそ4倍の感度向上につながるので INEPT (Insensitive Nuclei Enhancement

Polarization Transfer)と呼ばれる. 図 9 のパル スでは観測される磁荷は反位相なので,それを リフォーカスさせたものが図 10 である.

図 10 の①~⑥の各時点での密度行列 $\sigma_1 ~ \sigma_6$ (ただし時点⑥ではスキャンごとにパルスの位相をy/-yと変化させたときの差をとることとして $\sigma_6$ について)を直積演算子を用いて計算すると

- $\sigma_1 = I_z$
- $\sigma_2 \!=\! -\! I_y$
- $\sigma_3 = -I_y \cos \pi J t + 2 I_x S_z \sin \pi J t$
- $\sigma_4 = -I_y \cos \pi J t \mp 2 I_z S_z \sin \pi J t$
- $\sigma_5 = -I_y \cos \pi Jt \pm 2 I_z S_y \sin \pi Jt$
- $\sigma_6 = 2S_x \sin \pi J t \sin \pi J \Delta$

(CH グループについて)

 $\sigma_{6} = 2S_x$ 

(ただし t=∆=1/(2J)の時).

今回の講義では省略するが、NMR で観測可能 な磁荷は、パルスの前後における時間発展の挙 動も含めて、「直積演算子」という簡単な計算ル ールですべて計算可能である。このルールを覚 えると、論文で発表されている NMR のパルス プログラムから、実際にどのような物理量が観 測されるのかが予測される。また、新たなパル スプログラムを設計することもできる。上の展 開で得られた Sx は Lz 由来の分極の占有率の差 から派生しているので、結果として磁気回転比 が小さく, 占有率の差が小さいため感度が悪い <sup>13</sup>C 核に対して, 占有率の差の大きい<sup>1</sup>H の分極 が移動することで、13C核由来のSzをそのまま 観測する時に比べてyH/ycだけ大きい.更に, INEPTは設定した delay(Δ)の長さと<sup>13</sup>Cに直接 結合している 1H の数によって、その 13C のシ グナル強度が異なる.これを利用して,有機化 合物の構造決定に用いられる. また, 異種核間

での磁荷(1量子コヒーレンス)を別の核に移 動するためのパルスユニットとして,3D-NMR 実験のパルス・シーケンス内に多く用いられて いる

## 1.8. NMR のパルス・シーケンス・・・パルス・ シーケンスの読み方

前述のような、スピン結合を介した二つの核ス ピンの間で、磁荷(またはコヒーレンス)移動 や,NOEのように空間を介した交差緩和現象 を用いて、二つの核スピンの信号強度に変調を 加えることが可能である.これを実現するため には、適切なタイミングで適切なフリップ角を 持つパルスを各核種に順番に系統的に与えてい く操作が必要である.このパルスを与えるタイ ミングをすべて記述したもの(または概念図) がパルス・シーケンスである(図9,10).パ ルス・シーケンスには, 各 RF パルスのフリッ プ角,それを照射するチャネル,パルスの位相, パルスとパルスの間隔(delay)が記述されてい る. さらに磁場勾配パルスの相対強度、レシー バーで信号を観測する際の位相情報なども重要 な情報である.これは、複数のパートに分かれ た音楽の楽譜、たとえば弦楽四重奏の楽譜のよ うに考えればよい. 各パートが 1H や 15N など の励起チャネルに対応する. パルス・シーケン スは、横軸が時間軸であり、音符に対応するパ ルスと休符に対応する delay が記載されている のである.こうした概念的な NMR 実験を実際 に実行するために、NMR 装置に理解させるた めのプログラムがパルス・プログラムである. 特別な場合を除いて、パルス・シーケンスに現 れる殆どのパルスはπパルスとπ/2 パルスであ り、図中ではそれぞれ細い矩形と太い矩形で示 される. (そのため、細い矩形がπ/2 パルスで太 い矩形がπ/4 パルスを示すという但し書きがし ばしば省略されていることすらある). 複数の段 のパルスが縦のラインで揃っている場合には, 異なるチャネルから同時に異なる周波数のパル スが照射されることを意味する. パルスとパル スの間隙が, delay に対応する. delay のほとん どは下記のいずれかに分類できる. すなわち

(i) 磁化や装置の平衡化を行うためにユーザー が任意に設定できるもの

(ii) 磁化の交換や磁化(コヒーレンス)移動を 行うためにユーザーが任意に設定できるもの



## 図11 スピンエコー(上)とHMQC(下)のパルス ・シーケンスの比較

(iii) 磁化(コヒーレンス) 移動を行うために J の逆数の整数分の一を設定するもの

(iv) それらの delay やパルスの時間差を調製す るための差分

である.実際のパルス・プログラムにおいては, その他に各チャネルの出力や位相を切り替える ために設定されている delay も記述されている が,これらは装置ごとにほぼ決まった値であり, パルス・シーケンス図上では省略されている. 図9と図10は感度の悪い核スピン(例えば <sup>13</sup>C)の磁荷を感度よく観測するためのパルス・ シーケンス INEPT の例である.

実際に測定を行う際には、これらのパルス・シ ーケンスの各パルスならびに delay に適当な値 を設定してやらなければならない.こうしたパ ラメータは、測定対象の試料や溶媒条件、個々 の装置によって異なるので、それらは実験ごと に設定しなければならない.

## **1.9.** よく使われる 2 次元 NMR 法の紹介の原 理<sup>11)</sup>

#### 1.9.1.2 次元 NMR とは

2 次元 NMR の原理の説明は本書第2章(伊藤 の項)にゆずるとして,ここでは2次元 NMR が NMR データ解析の現場でどのように用いら れるのかについて述べる.前述の INEPT など の方法を用いれば,スピン結合または双極子に よる相互作用があるスピンIとSについて,複 数の適当なパルスを組合わせて,スピンIの磁 荷の分極の変化をもう一つのスピンSの磁荷の 分極に移動することができる. そこで、スピン Iに与えるパルスを系統的に変化させることで、 スピンIの励起状態をスピンIの共鳴周波数を 反映するようにしておき(このことを「周波数 でラベル」する,という),スピンSのNMR 信号に対してスピンIの周波数に応じた強度ま たは位相の変調を加えることが可能である.こ うして得たスペクトルを相関スペクトルとよぶ. このことを利用してある原子と別の原子の間の 相関を調べるのが2次元(3次元・4次元)NMR である.相関スペクトルを測定したデータは, だから, 複数(数十本から数千本)の1次元 NMR の FID の一連のシリーズのデータとなっ ている. 実際に FID を観測する核 (この場合は スピンS)のことを直接次元,間接的に周波数 の変調をかける次元(スピンI)を間接次元と 呼ぶ.最も簡単なパルス・シーケンスの例とし て、多核のスピンエコー実験のパルスと、それ を2次元に展開したものに相当する HMQC (Heteronuclear Multiquantum Coherence

spacrtoscopy)のパルスの比較を掲げておく(図 11). 直感的に、<sup>13</sup>C核に対するπパルスを展 開時間 t1 (実験中に可変な delay)を間に挟んだ 2つのπ/2パルスに置換えたことで,特定の13C 核が周波数により標識されることが見て取れる と思う.実際、この例に限らず、多次元 NMR のほとんどのパルス・シーケンスは、特定のス ピン結合や NOE などを通じたコヒーレンス移 動の観測を目的とした1次元 NMR のパルス・ シーケンスの一部を,「展開期」と呼ばれるスピ ン」に周波数ラベルを与えるパルスのユニット に置換えたものであると考えると理解しやすい. このように整理すると、複雑なパルス・シーケ ンスは全て準備期ー展開期ー混合期ー検出期の 4つの部分からなっており、しかも準備期や混 合期の大部分は磁荷移動の効率を最適化するた めの delay であったり, delay 中に展開してし まった化学シフトをπパルスを与えることでリ フォーカスするためのものであることが多い. 図11を参考に2D-NMRのパルス・プログラ ムの成り立ちを見ると,

(i) 準備期:相関を測定したい第1の核を励起 するための準備を行い,不要な磁荷を消去した りする時期

(ii) 展開期:第1の核が励起された状態で,実
 験ごとにことなる可変の delay(t<sub>1</sub>)を含み,この
 間に第1の核の共鳴周波数で標識が行われる.

(iii) 混合期:第1の核と相互作用のある第2の 核ヘエネルギーを移動させる期間で,ほとんど の測定は以下の3タイプで分類可能である.す なわち,交差緩和(NOESY,ROESY),交差分極 移動(cross polarization : CP または Hartmann-Hahn 遷移),分極移動
(INEPT,DEPT,TROSY または CRINEPT)であ る.

 (iv) 検出期:第2の核(直接観測核)からのFID を測定する期間であり,1D-NMRと同じように 観測し、t1を変化させるごとに別々の記憶領域 にデータを蓄える.

の4つに別れていることがわかる.

展開期に含まれる可変の delay の長さを変えて いくと、第1の核に照射されたπ/2パルスによ って生じた横磁荷は一定時間後に再びπ/2パル スが与えられるため、その周波数によりあると きには完全に励起され、またある時は全く励起 されないといった具合に、その磁荷の位相また は磁荷のZ成分に変調をうける. そうして変調 を受けた磁荷が展開期を通じて観測核(第2の 核)に移動された後、今度はその観測核の FID の強度(または位相)に第1の核の変調が乗って いる状態のデータが取得可能である. つまり直 接観測核の FID をまず Fourier 変換した後の データを t1の時系列に沿って並べてみると, t1 軸に対して第2の核のシグナル強度(または位 相)が第1の核の周波数で振動していることが わかる. このデータを t1 軸に沿ったデータとし て並べなおして更に Fourier 変換することで, 相互作用しているもう一つの核の共鳴周波数を 得ることができる.具体的には2次元 Fourier 変換をした後に、両方の核の周波数(=化学シフ ト)に対応する交点に交差ピークが現れる.

以上のように,個々の信号の化学シフトや微細構造,スピン結合などの「一次元」の情報に加 えて,2次元化学シフト相関スペクトルから得 られる情報は,その信号の帰属の正確さを増す とともに化合物の構造決定に役立つ.

## 1.9.2. COSY / TOCSY

低分子化合物の解析において,互いにスカラ ー・カップリングしている隣りあった<sup>1</sup>H シグ ナル同士の組合せを決定することで,信号の帰 属と解析が進む.この情報を一回の2次元NMR 実験ですべての<sup>1</sup>H のシグナルの組について調 べることができるのが, COSY (Correlation spectroscopy)である.最も簡単な COSY のパル ス・シーケンスは、2つの $\pi/2$ パルスと展開時 間の delay のみで構成される. COSY では、一 部の例外を除いて、隣あった<sup>1</sup>H 同士、つまり 2-bond (vicinal)か 3-bond (geminal)の<sup>1</sup>H 間の 相関のみが観測される. COSY には、対角ピー クの反位相成分由来のスペクトルのうねりを消 すための工夫 (Double-quantum filtered

COSY)や、遠位のカップリングによる相関を 観測するための工夫 (delayed COSY)など多く の変法が開発されている.一方,最初の π/2パ ルスによって生じた横磁化に、スピンロックパ ルスをかけることで横磁化同士の交差磁化移動 を行わせることによっても、 スカラー・カップ リングのある核間の相関スペクトルを得ること ができる. この場合, ある<sup>1</sup>Hの磁化はスピン ロックが与えられている時間中に,その隣の<sup>1</sup>H に移動し, 更にその <sup>1</sup>H とカップリングのある 隣の<sup>1</sup>Hへと, 5-bond を超えるような遠くの核 にまで移動していく. そのため, 磁化移動にス ピンロックを使用した2次元相関スペクトルで は、ある一つの<sup>1</sup>Hの周波数に対して、その<sup>1</sup>H が属しているスピン系のすべての1Hの周波数 との間で相関ピークが観測される. そのためこ の実験法は TOCSY (Totally correlated

spectroscopy)と呼ばれる.スピンロックによる 磁化移動は発見者の名前にちなんで

Hartmann-Hahn 遷移と呼ばれており, 同種核 (homonuclear) の頭文字と合わせてHOHAHA 実験と称されることもある.

COSY も TOCSY も,<sup>1</sup>H 核同士の相関なので, 同種核シフト相関実験に分類される.



## 1.9.3. HMQC / HSQC / HMBC

前述の同種核シフト相関実験と対になっている のが、ここで紹介する異種核シフト相関実験で ある.先に紹介した HMQC は磁化移動に多量

子遷移現象を利用していた.一方,これも先に 紹介した INEPT とほぼ同じパルス・スキーム を利用して,1量子遷移を使って磁化移動して 相関スペクトルを得ることもできる。それが HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence spectroscopy)である. HMQC と HSQC はいずれも1ないし2-bond を隔てた異 種核間の相関を測定する方法である. HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Connectivity Spectroscopy)はHMQCの変法であり, delay を長くとることで微小なカップリングを持つ <sup>1</sup>H と <sup>13</sup>C の相関(しばしば 2 ないし 3-bond を 隔てる)を測定する方法であり、低分子化合物 の構造解析に使われる. なお, これらすべての 方法は、まず磁気回転比の大きい<sup>1</sup>Hの磁化を 他核に移して、化学シフトで展開した後、磁化 を<sup>1</sup>Hに戻して観測する手法であり、プローブ の項で紹介したインバース測定の実験というこ とになる.

近年、特に巨大タンパク質分子を観測するのに 特化した HSQC/HMQC 測定法の変法の進歩が 著しい。具体的には,磁化移動の過程で生じて くるプロダクトオペレータのうち二量子の項に 着目すると、緩和速度が異なる。分子量の大き なタンパク質では、分子の回転拡散が遅くなり、 残余双極子作用・化学シフト異方性の両方が強 まる傾向があるが、その二者がお互いに打ち消 しあうことで、でカップリングを行わないで測 定した HMQC において、4 つに分裂したシグ ナル成分の一本だけが、他の成分に比べて先鋭 化して感度よく観測できるようになる。この原 理を利用して、TROSY という測定法が開発さ れ、溶液 NMR の限界を大きく広げた。また、 パルス発生装置のデジタル回路の精度向上に伴 い、様々な励起周波数特性を持つ選択励起パル スが安定して利用できるようになったことを利 用して、各回のスキャンとスキャンの間の待ち 時間のディレーを従来の1/5までに短くし、か つ磁化の飽和によるシグナル減弱を回避すると いう測定法、SOFAST-HMQC が開発された。 それにより、特に15N標識されたタンパク質の HMQC スペクトルが、従来の 1/3 程度の短時間 で測定できるようになった。

## 1.9.4. 交差緩和と NOE · NOESY · ROESY

これまでは、スカラー・カップリングを介して、 言いかえれば化学結合を介して相互作用してい る核スピン同士の相関スペクトルを測定する方 法を紹介してきた.一方、化学結合を介さなく ても、空間的に近接した核スピンどうしは、そのスピン状態により互いの緩和時間に影響を及 ぼす(図12).二つの核スピンの緩和現象がお 互いに影響を及びあうことを交差緩和といい、 また発見者の名前にちなんで核オーバーハウザ 一効果 (nuclear Overhauser effect : NOE)と よぶ. NOE の強度は理想的な条件下では核間 の距離の6乗に反比例するため、NOE を正確 に測定することで5 Å以下の1H間の距離情報 を得ることができる.



#### 2. 蛋白質の NMR シグナルの帰属法

#### 2.1. 標識試料調製の strategy

蛋白質を NMR で帰属・構造解析するためには、安 定同位体標識が必須である。標的とする試料のアミノ 酸残基数と、帰属に必要なラベル化体の目安を表1に 記した。

通常、同位体標識は大腸菌による発現系を用いて、 M9 培地(最少培地)に<sup>15</sup>N NH<sub>4</sub>Cl / <sup>13</sup>C<sub>6</sub>-glucose をそれ ぞれ窒素源・炭素源として培養し、蛋白質を精製する。 M9 培地の配合には数種類のレシピがあるが、表2にそ の一例を示した。経験的に、条件が至適化された発現 系では、M9 培地を用いた時と LB 培地を用いたときの 培地1リッターあたりの蛋白質の収量比は約 1:3~1:5 である。従って、発現系構築時の目安としては、LB 培 地1L あたり収量が最低でも10mg は必要である。この レベルに達しない試料の場合は別の発現系を試したり、 別のホモログを試すなどの方針転換が必要である。 M9 培地に鉄およびビタミンを添加することで、菌の 生育が改善したり、蛋白質の収量が上がることがある。 また、大量発現する蛋白質が亜鉛結合蛋白質の場合に は、培地中に亜鉛を補うことで、可溶性蛋白質収量が 顕著に改善することがある。また、藻類加水分解物を 主成分とした、ほぼ M9 に相当する大腸菌用標識培地 が Martek(国際金属薬品) / CIL(CIL ジャパンまたは和 光純薬) / Silantes (ナカライ) / 昭光通商など数社から 販売されている。これらは同容量の M9 培地と同等の 単価で、M9 よりリッチなため、大腸菌の生育が良いこ とが多い。

100 残基を超える蛋白質を帰属するときには、更に重 水素標識が必要である。上記 M9 培地を調製するとき に、水の替わりに重水(99%)を使用すると、75-80%の 重水素化率の蛋白質試料が得られる。70%D<sub>2</sub>O -30%H<sub>2</sub>Oを用いるとほぼ 50%の重水素化率の試料とな る。150 残基以下の性質のよい試料であれば重水素化率 は 50%で十分であり、150 残基以上でも 80%の重水素 化率で十分なことが多い。glucose を炭素源とした場合、 アミノ酸代謝中にα位水素はほぼ完全に重水に置換さ れるが、一方側鎖プロトンの重水素化率は低い。経験 的には、培地に 99%D<sub>2</sub>O を用いた M9 で培養すると、 通常の M9 に較べて大腸菌の生育速度が 3~5 倍に遅く なるものの、最終的な蛋白収量はあまり低下しない。 なお、200 残基以上の場合には、主鎖 Hαが 90%以上の 重水素化率の試料が望ましい。なぜなら、200残基以上 の試料では、従来の HSQC / HMQC-type の 3D-NMR パルスシーケンスに替わって、TROSY-type の 3D-NMR 実験を用いた高感度の測定が必須となるから である。 この場合でも、99% D2O を用いた M9 培地を 使えばよく、重水素化 glucose は必要ない。

なお、フィルター実験などのために更に高い重水素 化率の試料を調製するためには、(1)炭素源に<sup>2</sup>H glucose を用いた重水 M9 培地を用いるか、または (2)AcONa を炭素源とした重水培地を用いる必要があ る。前者は重水素化 glucose、特に<sup>13</sup>C/<sup>2</sup>H glucose が高 価である。一方後者は、酢酸ナトリウム培地中での大 腸菌の生育が D<sub>2</sub>O-M9 培地を使ったときよりも更に悪 くなるため、事前にホスト大腸菌を酢酸ナトリウム培 地中で adapt させる必要がある。

表1 安定同位	体標識の目安。	熟練者は5割増しの残基数でも可能かもしれない。
アミノ酸残基数	同位体	備考
20 残基以下	<sup>1</sup> Hのみ	ペプチド合成
20 残基-40 残基	$^{15}N$	融合蛋白質* (gene10 / GST / Thioredoxin)
100 残基以内	<sup>15</sup> N/ <sup>13</sup> C	
100 残基以上	$^{15}N/^{13}C/^{2}H * *$	(重水素化率 50-80%)
150 残基以上	<sup>15</sup> N/ <sup>13</sup> C/ <sup>2</sup> H	(重水素化率 80%以上)

注1) 特に 40 残基以内のペプチドを大腸菌で発現精製する場合には、内在性のプロテアーゼにより発現したペプチド が分解されてしまう可能性や、精製時の簡便さを考慮して発現系を設計するとよい。gene10 融合蛋白は inclusion body を形成するため、また Thioredoxin 融合蛋白は peri-plasm に移行するためプロテアーゼによる消化には耐 性があると考えられる。

## 表2 M9 培地レシピの例 (1L あたり)

	recipe A	recipe B
$\mathrm{Na_{2}HPO_{4}}\left(\mathrm{12H_{2}O} ight)$	15g	14g
KH2PO4 (anhydrous)	3g	Зg
NaCl	0.5g	$0.5 \mathbf{g}$
NH <sub>4</sub> Cl( <sup>15</sup> N)	0.7 <b>-1</b> .0g	$0.5\mathbf{g}$
MgSO <sub>4</sub>	240 mg	$(1M MgSO_4 1mL)$
$CaCl_2$	14.7 mg	$(50 \mathrm{mM}~\mathrm{CaCl_2}~\mathrm{2mL})$
${ m FeCl}_3$	-	(10mM FeCl <sub>3</sub> 330uL)
$MnCl_2$	-	$(50 \mathrm{mM} \mathrm{MnCl}_2 1 \mathrm{mL})$
Glucose(non-label)	4.5g	$4\mathbf{g}$
Thiamine	10 mg	$20 \mathrm{mg}$
Base	-	each 20mg
Biotin	-	$20 \mathrm{mg}$

#### \*\*Base : adenosine / guanosine / cytidine / thymine

重水素化は、標的蛋白質の残基数の増大に伴い必要 とされる技術ではあるが、単にコスト高にとどまらず、 いくつかの技術的なデメリットを伴う。まず重水素化 した NMR 試料は、3D-NMR の感度良い測定を行うた めに、巻き戻し操作により H<sub>2</sub>O 中で D に交換したアミ ドプロトンを H に戻してやるという手間が必要である。 このことは、巻き戻しが困難であったり、アグリゲー ションしやすい蛋白質の場合には問題となる。また、 最終的に立体構造解析に必要となる <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H 間の距離は NOESY によってのみもたらされるため、いずれにせよ 重水素化された試料と重水素化されていない試料の 2 種類の試料を用意して、側鎖の帰属や NOESY 測定を 行わなければならない。また、重水素による同位体シ フトのため、重水素化試料と非重水素化試料の <sup>13</sup>C の 化学シフトの整合性をとる必要性が出てくる。

理化学研究所の木川博士らにより、<u>大腸菌の無細胞</u> 蛋白質合成系による NMR 試料の調製が可能となって きた。同様の無細胞蛋白質合成系や小麦胚芽・昆虫細胞の無細胞タンパク質合成系が、各社から市販されている。NMR 試料スケールで実用化されたものも少なくない。また、東京大学発ベンチャー企業である(株) ポストゲノム研究所は、PureSystem と呼ばれる、無細胞蛋白質合成系の主要コンポーネントに全て His タグ を導入することで、合成された目的蛋白質のみが IMAC カラムの pass through 画分から回収されるという、画 期的なシステムを売り出している。

なお、無細胞系で NMR の <sup>13</sup>C/<sup>15</sup>N 標識試料を調製す る場合のコストは、大腸菌で培養する場合とほぼ同程 度かせいぜい数倍程度といわれている。需要増にとも なう大量生産により、標識アミノ酸の価格が年々安価 になっていることも、無細胞系を利用することの追い 風につながる。この系は、アミノ酸の代謝系や大腸菌 の生育速度の影響を受けないので、特殊な標識試料や 重水素化試料を調製する場合には更にメリットが大き いことが期待される。たとえば、本稿では詳細な説明 は省くが、甲斐荘研究室によって開発された、立体選 択的重水素化アミノ酸を用いた蛋白質のラベル化法 (SAILS 法)は、緩和時間の伸長による NMR スペク トルの質の改善に大きく寄与しつつ、後述するプロキ ラルなメチレン水素やメチル水素の立体特異的帰属情 報も与えるため、巨大な分子量の蛋白質の立体構造の 精密決定を可能にするブレークスルーとなる。

#### 2.2. 測定条件の至適化

幸運にも安定な試料にあたった場合を除いては、大 抵の蛋白質の NMR 試料は測定条件の至適化が必要で ある。まず、非常に恵まれた研究環境でない限り、NMR 測定のマシンタイム時間が限られていることが多い。 そのため、最低でも 1mM の蛋白質溶液を用意しなけれ ばならないが、蛋白質は溶液の条件により溶解度や安 定性が著しく変化するため、NMR 測定に適した条件を あらかじめ決定してやる必要がある (表 3)。

運良く安定で溶解度の高くなる条件を見つけたとし ても、濃厚溶液中での蛋白質の非特異的自己会合の問 題がある。1mMということは、分子量10Kの蛋白質 で10mg/mlの濃厚溶液を意味する。こうした条件では、 生理的条件下で十分無視できるような非特異的相互作 用が物理的に意味を持ち、とりわけ「みかけの分子量」 の増大が3D-NMRにおいて予想外の感度低下をもたら すことがあるので要注意である。(例えば、<sup>15</sup>N/<sup>13</sup>C標 識だけで十分解析できると予測して調製した試料が、 溶液中でトリマーを形成したために<sup>15</sup>N/<sup>13</sup>C/<sup>2</sup>H標識試 料を再度調製してデータの取り直しを行う羽目になっ た場合の、労力とコストを想像して欲しい。)その意味 では、前項の標識試料調製のstrategyを決定する段階 よりも前に、測定条件を決定するためのある程度の予 備実験がなされているべきである。

通常 NMR を測定するためには至適化しなければな

らないパラメータとしては

- (1) 試料条件:pH、緩衝液の種類、イオン強度、 イオンの種類、添加剤(SH剤、有機溶媒、 detergent、糖、リガンドなど)
- (2) 測定条件:温度、パルス幅、スペクトルの観 測幅、蛋白濃度と積算回数とデータポイント数

特に最後にあげた測定条件である蛋白濃度と積算回 数と3次元・4次元 NMR におけるデータポイントは、 試料の残基数・溶解度・性質と見かけの分子量に密接 な関係がある。通常は

「同じ S/N のスペクトルを得るためには、積算
 回数は濃度の2乗に反比例」

している。つまり試料濃度が半分になれば、積算回数 (すなわち測定時間) は4倍を見込まなければならな い。ところが前述のように「弱いアグリゲーション(非 特異的自己会合)」が存在する系では、高濃度試料にお いて平衡が会合側に偏ると、特に<sup>13</sup>C の T<sub>2</sub>緩和時間が 見られるため、いくつかの 3D 測定の感度が顕著に低下 する。そのため、高濃度試料を調製可能にする条件の 探索が最優先であるが、同時に蛋白質分子の見かけの 分子量にも留意しなければならない。

条件検討の際に利用可能な見かけの分子量の測定法 としては

- a) ゲルろ過
- b) 分析超遠心
- c) 動的光散乱 · 静的光散乱
- d) X線小角散乱
- e) NMR による T<sub>2</sub> 緩和時間測定(回転運動の拡散係数)
- f) NMR による並進運動の拡散係数の測定 (diffusion ordered spectroscopy)
- g) Constant-time での <sup>1</sup>H/<sup>15</sup>N-HSQC, <sup>1</sup>H/<sup>13</sup>C-HSQC 測定
- h) 蛍光偏光度解消実験による分子の回転拡散係数測 定
- i) 蛍光相関スペクトルによる分子の並進運動の拡散

#### 表3 蛋白質の NMR 試料溶液(推奨条件)

溶媒	95%H2O-5%D2O または 99.9%D2O
濃度	$0.5{\sim}2.0\mathrm{mM}$
容量	$300 \mathrm{uL}(シゲミチューブ使用時、5\mathrm{mm}\phi)$
	500uL(通常チューブ、5mm φ)
$_{\rm pH}$	2~8 (低いほうが良い)
温度	0℃~50℃(低温:凍結注意、高温注意)
塩濃度	500mM 以下(低いほうが良い**:クライオプローブ利用時は 200mM 以下
緩衝液	プロトンを含まない緩衝液(リン酸 B、カコジル酸)
	D 化バッファー(酢酸 B,グリシン B,イミダゾール B,Tris,MES)

#### 係数の測定

などがある。目的はスペクトルの質の改善なので、 必ずしも正確な分子量や拡散係数を算出する必要はな く、いくつかの条件の中で傾向がつかめればよい。本 稿では詳細は省略するが、それぞれの方法や測定装置 には、試料量が少なくてすむもの、希薄濃度での測定 に有利なもの、濃厚溶液の測定に有利なものなどの特 徴があるので、実験の進み具合にあわせて適宜使い分 けて欲しい。ほぼ決定した測定条件の適否を判断する のに比較的簡便な方法は、上記 g)の 2D-NMR 測定であ る。つまり、コンスタントタイムになっている HSQC のパルスに、実際の 3D-NMR 測定のパルスシーケンス 中で使われるのと同じ長さの待ち時間を入れて、当該 条件の試料を測定した場合に、最終的に観測される十 分な S/N があるかどうかを判断するのに役立つ。

#### 2.3. 測定と minimal data set

minimal data set とは、蛋白質の NMR の帰属・解 析を完遂するための必要十分な NMR 実験のデータセ ットのことである。この考え方は、例えば NMR 解析 ソフトウェアパッケージの開発や、分光系メーカーが 事前にパルスプログラムを装置にインストールする場 合などに、重視されてきた。また、ある種のスペクト ル解析ソフトウェアで自動解析を行うための必要条件 として規定されていることもある。最近では構造ゲノ ム学におけるハイスループット構造決定プロジェクト において、試料調製、測定、帰属、解析と構造決定を 迅速に行うために、重要視されている。ハイスループ ットに高速に構造決定を行う場合はもちろんであるが、 研究室レベルで人力でスペクトル解析を行う場合でも、 測定するデータセットの数が増えることにはメリット ばかりではないのは明らかである。

同一ロットの試料を複数個、同じ条件で一斉に調製 して、多数の装置で並行に測定するという理研大規模 NMR 施設の戦略は、後者のリスクの低減に効果が見込 める。逆にいうと、通常の大学や企業の一研究室レベ ルで研究を行う場合こそ、ミニマルな測定について十 分に吟味すべきである。その際、パルスプログラムに よって感度のよいものと悪いものがあり、また artifact が出やすいものとそうでないものがある。貴重なマシ ンタイムを無駄にしないためにも、各測定法の原理や、 測定時に設定する諸パラメータの意味の理解 を怠るべ きではない。同時に、各測定法の相対的感度について も、経験や予備実験などによってある程度の見積もり が取れると実験の効率が上がる。

本稿でとりあげる帰属の手順で用いる minimal data set を表4に示した。ただし、ここで minimal と記し ていても、HNCA や HNCACB などの残基内相関の取 得を目的とした測定法で残基間相関も明瞭に観測され る場合には、対応する残基間の実験は不要となる。

#### 2.4. 測定上の注意点

以下で説明するように、これらのスペクトルの解析 は、基準となる 2D スペクトル上のピークから 3D-data を短冊状に切り出した stripを用いて行うのが効率的で ある。これらの strip はそれぞれが 1 アミノ酸に対応す る。蛋白試料の性質によっては、測定温度や pH や試料 の経時変化により peak の位置がずれることがあり、そ うすると解析が困難になる。そのため、測定そのもの を短期間に終わらせるように計画を立てるのはもちろ んであるが、更に

(1)基準となる 2D スペクトルと 3D スペクトルの <sup>1</sup>H/<sup>15</sup>N の観測幅を統一する。

(2)対応している残基間・残基内相関の 3D スペク トルの間では <sup>13</sup>C の観測幅も統一する。

(3) <sup>15</sup>N-edited-NOESY / TOCSY と HBHA(CO)NH で間接次元の<sup>1</sup>H の観測幅も統一する。

(4) 基準となる 2D スペクトルを必ず 3D と同時に(連続して)測定する。

実験の種類が増える	帰属の正確さが増す(データ間の相互チェック)
ことのメリット	一意的な情報の抽出により帰属がラクになる
実験の種類が増える ことのデメリット	測定に時間がかかる 解析に時間と手間がかかる 実験を失敗する確率があがる 試料調製の手間がかかる(時間による劣化、異なった組合せの 標識試料) データ間の整合性(試料条件の差や劣化→解析の手間の増大)

	残基内相関	残基間相関	得られる情報
主鎖の帰属			
基本となるスペクトル	<sup>1</sup> H/ <sup>15</sup> N-HSQC		
	HN(CA)CO	HNCO	℃ 化学シフト
	HNCA	HN(CO)CA	Ca 化学シフト
	HNCACB	CBCA(CO)NH	Ca/Cβ 化学シフト
主鎖プロトンの帰属			
	HN(CA)HA	HBHA(CO)NH	Hα (Ηβ) 化学シフト
	<sup>15</sup> N-edited-TOCSY		Ha/側鎖プロトン
 側鎖の帰属			-
基準となるスペクトル	<sup>1</sup> H/ <sup>15</sup> N-HSQC		
	-920046 - 196280-9978066-101870 <b>-</b> 964646	CC(CO)NH / HC	C(CO)NH
基準となるスペクトル	<sup>1</sup> H/ <sup>13</sup> C-HSQC ( <sup>1</sup>	H/13C-CT-HSQC)	
	CCH-COSY / CCH-	TOCSY	13C 化学シフト
	HCCH-COSY / HC	CH-TOCSY	1日化学シフト



(5)対応している残基間・残基内相関の 3D は同時 に測定する。

これらは努力目標であるが、ちょっとした工夫や配 慮の有無が、後の解析などのステップに大きな影響を 及ぼすこともあるため、特に付記したものである。

#### 2.5. 主鎖の帰属

ここでは筆者が今まで専ら用いてきた"strip-based approach"を紹介する。すなわち、まず<sup>1</sup>H/<sup>15</sup>N-HSQC スペクトル上の NH peak を基準として、3次元スペク トルから対応する短冊(strip)を抽出する。それを各ピー クの数だけ作成して、並べ替えて行うことで連鎖帰属 を進めるという手法である。この方法は実際には 3 次 元のデータを、ストリップの列として擬似 2 次元デー タのように扱うので、直感的に理解しやすいという利 点がある。

帰属作業自体は(1)コンピュータ上の解析ソフトウェ アを用いて、画面上で行うか、または(2)帰属に必要な スペクトルのstripをあらかじめ紙に打ち出して紙上で 行う、のどちらでもよい。それぞれ一長一短があるが、 作業効率全体ではさほど違いがない。前者は、慣れて くれば作業が迅速である点や、使用しているソフトウ ェアに備わっているさまざまな帰属・解析支援の機能 が使えるといった利点がある。しかし、それぞれのソ フトウェアの使用法、ファイルフォーマット、コマン ド体系を理解するのに時間がかかるという点で、初学 者には負担が大きいかもしれない(大抵の NMR 解析 ソフトウェアのマニュアルが整備されていなかったり 難解であったりすることも、大きな要因である)。更に 通常解析には数日かかり、その間の作業記録を適切に とっておかないと、どこまで進めたのかが良くわから ない状況になりやすい。その点、紙上で行う後者のア プローチは『プリントアウトさえ作ってしまえば』、後 は紙上で行えるという気安さがある。また作業記録を 随時書き込むことができるので、複雑なスペクトルや S/Nの悪いスペクトルを誤りなく帰属するときによい。

前者に特化したソフトウェアとしては XEASY、Pipp、 NMRView があり、後者に特化したソウトウェアとし て P-ROI system (with NMRDraw / NMRWish)がある。 また最近、NMRDraw は NMRPrime という主鎖の自 動アサインメントモジュールをも盛り込んだ帰属支援 パッケージの実装をはじめた。

## プロトコル

## <u>『アセンブリング』</u>

- 表3の主鎖の帰属に必要なスペクトルを全て測 定し、フーリエ変換を行う。必要があれば、化学シ フトの校正を行っておく。
- <sup>1</sup>H/<sup>15</sup>N·HSQC スペクトル上で peak pick を行 い、peak file を作成する。各 peak には ID 番号が 必要である。
- HSQC peak をよく見ながら、NH peak と側鎖 NH2 peak をおよそ分別する。怪しいものは NH と してカウントしておくこと。
- 4. まず HNCO スペクトルの strip を作成する。 ここでは、『すべての NH peak に対応する C'の相 関が一つだけ見えているか?』を確認する。もし二 つ以上相関 peak が見えている場合は、NH peak が重なっていると考え、2 で作成した peak ファイ ルを修正する。

peak pick を行い、HNCO (残基間 C')の peak file として保存する。

- 同様の要領で HN(CA)CO スペクトルを解析す
   る。peak pick を行い、HN(CA)CO (残基内 C)
   の peak file として保存する。
- 次に HNCA と HN(CO)CA の strip を作成する。 HNCA では観測している NH(i)に対して、残基内 Cα(i)との強い相関と、残基間 Cα(i-1)との弱い相関 の二つが観測されているはずである。しかし相関の 強度から残基間か残基内かを判断するのは危険な ので、必ず HN(CO)CA の該当する strip と比較し て、決定すること。

**peak pick** を行い、残基間 Caと残基内 Caが strip 上で区別がつくようにする(例えば色を変えて表示 するようにする)。

それぞれの peak ファイルを保存する。

- 7. 5で、NH peak が重なっているとき。HNCA では一つの strip に残基内相関二つ、残基間相関二つが観測されるため、複雑になる。スペクトルを拡大して、線幅や線形を参考に、どの残基内・残基間相関が対になっているか(同一アミノ酸に属するか)可能な限り確定する。不確かな場合は、とりあえず片方の可能性として peak file を作成するものの、必ずコメントを残しておくこと。
- 次に HNCACB と CBCA(CO)NH のスペクトル を 6 と同様に処理する。すでに残基内/残基間の Cαの位置は6で作成した peak file をスペクトル上 に表示してやるとわかりやすい。ここでは Cβ由来 の相関 peak のみを pick する。

HNCACB では残基間と残基内の相関の位相を逆 転して測定するので、シグナルの正負の符号を参考 に、残基内/残基間の Cβをそれぞれ分類し、strip 上で区別がつくようにする。peak file を保存する。 NH peak が重なっている場合も、前述のようにど ちらかに確定したうえで、コメントを残しておく。

 6,8で作成した peak file を元に、それぞれの NH peak について、残基内 Ca/Cβと残基間(一残 基前)Ca/Cβ相関を対にして整理しておく。表や数 値の形で打ち出しても構わないし、あるいは図上・ 画面上で色分けして表示しておくだけでも構わな い。

## 『リンキング』

- 10. 任意のi番目のNHのHNCACBのストリップに 注目する。その残基間 Ca/Cβ相関と同じ化学シフトを残基内 Ca/Cβ相関として持つストリップを探 す。よく似た化学シフトをもつ他のストリップ全て と比較して、もっともよく残基内・残基間の Ca/Cβ の化学シフトが一致しているものを見つける。その ストリップは、i-1番目のアミノ酸残基のストリッ プであるから、i番目とi-1番目を対にする。
- 11. i-1 番目のストリップに対して10と同じ作業を して、i-2 番目のストリップをみつける。これは C 末端側から N 末端側にストリップ列を延ばしてい く作業に相当する。この作業を繰り返して、(1) もう遡ってつなげるストリップがみつからなくな るか、(2)よく似た化学シフトをもつストリップ 候補が複数出てきてつなげられなくなるまで、スト リップ列を伸ばしていく。
- 12. 10→11の作業をまだストリップ列に入れら れていない NH peak 由来のストリップにも行う。

このストリップ列の伸長作業は、プロリン残基にあ たったところで停止するはずである。全残基数が少 ない場合には全てのストリップがいずれかのスト リップ列に含まれるまで行う。残基数が多い場合は 全体の8割程度でいったんこの作業を終了する。

- 13. NH peakのオーバーラップがあるため、7,8 のステップで残基内・残基間相関の確定が不確かな ものがストリップ列のN末端に来ている場合は、 残基内相関と残基間相関の別の組み合わせを試し て、更にストリップ列が伸びないかどうか探してみ る。
- 14. 10-13のリンキングの作業は、作業効率を優 先して HNCACB/CBCA(CO)NH のストリップ列 を用いて行った。そこで作成したストリップ列が正 しいかどうかを確認するために、 HNCO/HN(CA)CO 由来のストリップを同じ順番 に並べて各ストリップ間の連続性が正しいことを 確認する。また HNCA/HN(CO)CA のストリップ でも確認する。(通常、HNCACBよりも HNCA の 方が<sup>13</sup>C の分解能が高く測定しているので、紛らわ しい連続性の判定には有用である)。

#### <u>『マッピング』</u>

 各ストリップの残基内の Cα/Cβ相関の Cαや Cβ の化学シフトの値より、そのストリップがどのアミ ノ酸タイプに属するかを推定する。アミノ酸タイプ の分類については、文献や教科書(例えば Cavanagh, "Protein NMR Spectroscopy" Academic Press, Figure 8.2/8.7)などが参考にな る。また BMRBS データベース上の統計の値をウ ェブ上から入手してもよい。12で得られている全 てのストリップ列をアミノ酸タイプに分類して、 「アミノ酸タイプ」のコード列に翻訳する。

- 16. 上記で得られたアミノ酸タイプのコード列を、実際の蛋白質の一次配列上に当てはめていく。
- 17. 小さな蛋白質や化学シフトの分離のよい試料では、この時点で全てのストリップ列が、矛盾や重複なく一意的に蛋白質の一次配列にマップされるはずである。
  その時点で配列特異的帰属は完了である。
- 18. もし重複がある場合には、アセンブリングまたは リンキングの過程で帰属の誤りが生じている可能 性が高い。peak が重なってるところや S/N が悪い ところを重点的に見直して、すべてのストリップ を、重複や矛盾なく一次配列上にマップする。スト リップ列の間のギャップは、一度も使われていない NH peakのストリップに当該するアミノ酸タイプ のものがあればそれで埋めたのち、前後の接続性を 確認する。
- 19. <u>完了</u>

それぞれの相関 peak に該当する残基の番号を振 り、NH, N, Cα, Cβ, C'の化学シフトを確定する。 主鎖に NH のないプロリン残基についても残基間 の相関を使ってこの時点で確定しておくこと。

#### <u>『主鎖プロトンの帰属』</u>

20. <sup>15</sup>N-edited-TOCSY または HN(CA)HA を用い て、残基内 HA の相関を探し、HA の化学シフトを 帰属・確定する。

これで主鎖のプロトン・カーボンの帰属が完了した。



ひき続き側鎖の帰属に入る前に、Cα/Cβの化学シフ トを用いて、random coil との値を比較することで化学 シフトインデックスを作成することができる。詳細は 省くが、化学シフトインデックスは、蛋白質の2次構 造を反映しており、ヘリックスとシートのおよその存 在を示す。試料蛋白質が構造既知のファミリーに属す る場合には、帰属が正しいかどうかの確認になる。ま た、構造未知の新規蛋白質でも、CD スペクトルや赤 外ラマンなどから予測されている α/β含量と得られた 化学シフトインデックスに極端な差がないかどうか確 認しておくとよい。

また、<sup>15</sup>N-edited-NOESY から各 NH peak 由来のス トリップを並べて、NH 間と NH/Ha間の NOE 相関の 解析と確認を是非試みるべきである。まず、HA(i-1)→ NH(i)のシーケンシャル NOE が矛盾なく観測されてい るかどうかを確認する。また、シーケンシャル NOE の 強度が、bシートの部分では強く、ヘリックス部分で は弱いことも確認のポイントである。ヘリックス領域 では更に、NH(i-1)→NH(i)の NOE 相関や Ha(i-3)→ NH(i)の NOE 相関も確認できるはずである。

#### 2.6. 側鎖の帰属

側鎖の帰属は、主鎖とは異なりアミノ酸のタイプに よってバラエティに富み、また同じアミノ酸どうしで peak が重なりがちであるため、主鎖よりも困難な作業 となる。あるアミノ酸の主鎖を専門に測定するための 測定法が発表されているものもあるが、本稿ではそれ らについては触れない。

#### 化学シフトの管理

側鎖の帰属の基準となるスペクトルは  $^{1}$ H/ $^{13}$ C-HSQC である。このスペクトルは  $H_2$ O 中でも適切な溶媒消去 を行えば測定可能であるが、通常  $D_2$ O 中で測定される。 これは、後の側鎖や NOE 帰属に用いる  $^{13}$ C-edited NOESY や HCCH-TOCSY などもまた  $D_2$ O 中で測定さ れるからである。ここでしばしば問題になるのは、帰 属の基準(根拠)になる化学シフトの一部は  $H_2$ O 中で 測定された HN 観測タイプの 3D-NMR スペクトル由来 であることから、 $H_2$ O 中で得た化学シフトと  $D_2$ O 中で 得たそれとの間に僅かなずれが生じることである。特 にプロトンの化学シフトのずれの原因としては、結合 している炭素の  $^{12}$ C/ $^{13}$ C の違いによる同位体効果と、  $H_2$ O/D<sub>2</sub>O の溶媒の pH/pD の差などに起因する。

通常は、両者(場合によっては三者)に対応する化 学シフトファイルを別々に作成し、解析するスペクト ルに応じて参照する化学シフトファイルを使い分ける。 そのため、HN 観測によって得られた H2O 試料中での 化学シフトは、必ず D2O 中で測定した<sup>1</sup>H/<sup>13</sup>C-HSQC スペクトルの peak の上に投影して、異なる溶媒中での 化学シフトのずれをこまめに補正することが、解析の 効率化につながる。使用している解析ソフトウェアに よっては、複数の化学シフトデータベースを取り扱え ないなどの制限があることもあるので、各自工夫して

#### 欲しい。

#### <u>プロトコル</u>

## <u>『Hα/Cα, Hβ/Cβ の帰属』</u>

- 残基内、残基間の Hαの化学シフトは前述のように <sup>15</sup>N-edited-TOCSY または HN(CA)HA を用いて帰属 する。
- HBの化学シフトは、比較的感度の良い測定である HBHA(CBCACO)NHを用いて帰属する。
- プロリンの直前の残基の HB についてはこの方法 では帰属できないので、<sup>15</sup>N-edited- TOCSY を用い る。

(注) HNHA、HNHB および HN(CO)HB という測定 法があるが、これらは構造解析に必要な H $\beta$ の立体特異 的帰属と二面角情報である $\Phi$ および $\chi 1$ を測定するた めのものである。残基によって相関が出ないことがあ るので、化学シフトの帰属に用いるのには不適当であ る。

#### <u>『Hγ/Cγ、Hδ/Cδ、Hε/Cεの帰属』</u>

以下の帰属は、アミノ酸の側鎖の種類ごとに分けたほ うが考えやすい。

ここでは **Glu/Gln/Lys/Arg/Me**t について述べる。方法 としては、

- まず CC-(CO)NH の測定によって、Cγ/Cδ/Cεの化 学シフトを残基間相関として得る。
- 5. 次に HCC-(CO)NH の解析から、Hγ/Hδ/Hεの化学 シフトを得る。
- L記をそれぞれ結合させて、Hγ/Cγ、Hδ/Cδ、Hε/Cε
   の peak として <sup>1</sup>H/<sup>13</sup>C-HSQC 上にマップして確認する。
- それらの peak に注目して CCH-COSY / HCCH-COSY / HCCH-TOCSY のスペクトルを解析 し、更に帰属に矛盾がないかを確認する。
- Ηγ/Hδのプロトン化学シフトは環境により順序が 逆転することもあるので、7、8による確認作業が必 須である。特に隣り合った CH 間でしか相関を与え ない CCH-COSY / HCCH-COSY の確認が有用であ る。

## <u>『メチル基のある残基の帰属』・・・Ala / Thr / Val / Leu</u> <u>/ Ile / Met</u>

- 9. **Ala** Ala はβ位がメチル基なので HBHA(CBCACO)NH と CBCA(CO)NH で帰属可能。
- $1 \ 0$ . Thr / Val

Thr および Val はγ位がメチル基であり、 CC-(CO)NH / HCC-(CO)NH で良好に観測できる ことが多いので、帰属しやすい。β位の帰属は既述 した。

11. **Ile** 

Ile の $\gamma$ 位のメチル基も同様に CC-(CO)NH / HCC-(CO)NH から帰属するほうが容易である。 $\gamma$ 位 のメチレンと $\delta$ 位のメチルは、ここで帰属した $\gamma$ -CH<sub>3</sub> からの HCCH-TOCSY の相関を解析すると見 つけやすい。

 12. ここで一度、上記で帰属されたメチル基全てを <sup>1</sup>H/<sup>13</sup>C-HSQC 上の peak として確認し、化学シフト のずれの補正を行う。残っているメチル基が Leu と Met のメチル基である。課化学シフトと <sup>1</sup>H の線形よ り、Met のメチル基は判別可能である。

13. **Leu** 

シグナルの分離がよく相関がきれいに観測できれ ば、Leu の  $\delta$  位 メ チ ル 基 も CC-(CO)NH / HCC-(CO)NH の組み合わせで問題なく帰属できる が、ここでは HCCH-TOCSY の解析を主とした方法 について説明しておく。

1 3のステップから Leu のメチル基の peak の位置 が <sup>1</sup>H/<sup>13</sup>C-HSQC 上で明らかになった。その peak 位 置を基準に、各メチル基に対応する F3 方向への strip を作成する。

この strip には対応するもう一つの $\delta$ メチル基の強い相関や、 $\alpha$ ・ $\beta$ ・ $\gamma$ 位の各プロトンの相関が出ているので、それらが同じ位置に出ているメチル基同士を対にする。

別にすでに配列特異的帰属のついている Leu の HA/CA peak 由来の strip を作成して、上で作成した メチル基対と比較して、各メチル基対がどの残基由 来かが帰属できる。

最後に同様に Leu の HB/CB peak 由来 HCCH-TOCSY の strip と比較して、γ位のプロト ンの帰属と、全体の帰属の確認を行う。

14. **Met** 

Met の  $\epsilon$  位メチル基は  $\delta$  位硫黄によりスピン系がと ぎれるため、H $\beta$ や H $\gamma$ との残基内 NOE を利用して、 既知の H $\beta$ /H $\gamma$ の化学シフトに関連付けて帰属する。

#### 『交換性側鎖プロトンの帰属』

#### 15. **Asn / Gln**

Asn / Gln の NH<sub>2</sub> プロトンを帰属する簡易な方法は、 <sup>15</sup>N-edited-NOESY からの残基内 NOE を見つけて H $\beta$ / H $\gamma$ と関連付けて帰属することである。 またパラメータを適切に調節すれば HN(CO)CA と 同じパルスシーケンスで C $\beta$ →(CO)→NH<sub>2</sub> [Asn] / C $\gamma$   $\rightarrow$ (CO) $\rightarrow$ NH<sub>2</sub> [Gln]の相関が観測できるので、それを 利用して帰属する。

#### 16. **Arg**

Arg の NH  $\varepsilon$  は、<sup>15</sup>N の化学シフトから判別できる。 残基特異的帰属は、通常は <sup>15</sup>N-edited- TOCSY を解 析して、既知の H $\delta$  / H $\gamma$  / (H $\beta$ )の化学シフトと関連付 けて帰属する。

原理的には HNCA または HNCACB のパルスシーケ ンスでほぼ同じパラメータで残基内の HN と Cδまた は Cγ/Cδの相関を得ることができるので、そこから 解析も可能である。Arg の NH η は交換が早くめっ たに観測されないので詳細は他書にゆずる。

#### 17. **Trp**

**Trp**のNH  $\varepsilon$  は主鎖のNHのもっとも低磁場領域に 観測され、HNCAなどの主鎖の解析を進めるうちに 消去法により容易に明らかになる。残基特異的帰属 は、特に問題のない限り、<sup>15</sup>N-edited NOESY を解 析してH $\delta$ との相関を見つける。H $\delta$ は後述のように 残基内のHBとのNOEから帰属する。

#### <u>『芳香環プロトン』</u>

芳香環プロトンの残基特異的帰属は、側鎖のなかで はもっとも困難な部類に属する。一つには環の flip に よって二つずつある Phe / Tyr のδプロトン、εプロト ンの化学シフトが縮重したり分離したりするからであ る。もう一つは芳香環内の <sup>1</sup>JCH が 170-220Hz、<sup>1</sup>Jccの 値が 50-80Hz と大きく、かつアミノ酸ごと、部位ごと によるばらつきが大きいため、<sup>13</sup>C 標識された芳香環炭 素の緩和が速くまた磁荷移動の効率も悪くなり、有効 な測定法がなかなかないためである。。

#### 18. **Tyr / Phe**

最も確実な方法とは言い難いが、non-label(<sup>1</sup>H のみ) 試料の重水中での2D-TOCSYおよびNOESYを解析 して、<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H 同士でまず環内の相関ネットワークを 同定する。次にNOESY (2D または<sup>13</sup>C-edited)で 既知のHBとの相関から残基特異的に帰属する。と くに、実際的な解決策として、13-15%の fractional な<sup>13</sup>C 標識試料を用意して、<sup>13</sup>C-edited 3D NOESY を利用して帰属をつけるという方法が提案されてい る。

別の方法として、(aromatic) CCH-TOCSY を用いて、 C $\gamma$  / C $\delta$  / (C $\epsilon$ )と HB/CB の相関を観測する方法が考案 されている。

#### 19. **Trp**

CH  $\epsilon$  2、CH  $\delta$  1 と他のプロトンは Tyr / Phe 同様 <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H 相関から環内のネットワークを同定する。そ れらを残基内 NOE を用いて Hβ / Cβと関連させて残 基特異的帰属を得る。

### 20. **His**

His の Hδ2 は、<sup>13</sup>C-edited-NOESY の解析から、HB との残基内 NOE を利用して帰属する。Hε1 の帰属 が同様の方法によってつかない場合の方法として、 <sup>15</sup>N の観測幅を広くとった<sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HMQC または HMBC 測定を行い、Nδ1 / Nε2 との 2-bond coupling の相関を観測して帰属する方法が考案されている。

#### 2.7. NOE の帰属

NOEの正確な帰属は、立体構造決定のための最も重要なプロセスである。特に新規の立体構造を決定する 過程では、誤帰属を避けるためにも最新の注意が必要 である。球状の蛋白質の立体構造を決定するのに必要 なNOEの数は、最低でも1残基あたり10、通常は15-20 の範囲であるから、100残基程度の蛋白質で2000個の NOEを帰属しなければならない。

NOE は便宜的に、相関を与える二つのプロトンが属 する残基番号から『残基内 NOE』と『残基間 NOE』 に分類できる。更に『残基間』NOE のうち(i) – (i+1) 間の NOE を連鎖 NOE (sequencial NOE) 、(i)-(i+2) / (i)-(i+3) / (i)-(i+4) の NOE を中位(medium range) NOE、それ以上の残基間での NOE を遠位(long range) NOE と呼ぶ。このうち、帰属の誤りが構造決定の誤り に密接に結びつくという点から最も注意すべきは遠位 NOE である。

NOESY を帰属解析する場合には、 $^{15}N$  または  $^{13}C$ -edited の 3D-NOESY を解析して行う方法と  $^{15}N/^{13}C$  または  $^{13}C/^{13}C$ -4D-NOESY を解析して行う方 法の二つが基本である。通常 4D-NOESY は測定時間の 制限より  $^{13}C/^{15}N$  軸を含め各軸のデジタル分解能をあ げることができない。そのため 4D-NOESY は、専ら上 記で述べた遠位 NOE の帰属とその確認に用いるのが よく、3D-NOESY と併用するのが確実である。また 3D-NOE でも、測定時に間接次元プロトンのポイント 数・分解能を十分多く取るように設定したほうがよい。

本稿では NOE の帰属と立体構造計算を並行してす すめながら構造精密化を行う"structure based NOE assignment"の手順に沿って、説明する。すなわち

- 初めは化学シフトの情報のみにより NOE を帰 属する。
- (2) 2次構造情報も参考にしつつ、基本的には unique な NOE のみを帰属する。

- (3) 集まった情報をもとに立体構造計算を行い、『中間構造』の構造アンサンブルを得る。
   (この場合、unique な NOE のみで初期の構造計算を行う場合には、十分収束しないために次のステップに進めない可能性がある。それを補う目的で、主鎖の NH から得られる他の構造情報を用いるとよい。こうした目的のために、NOE 帰属に先立って解析される情報としては、主鎖の二面角、側鎖χ1、水素結合情報、分子配向による結合の方向、化学シフトインデクスから得られた2次構造に基づく主鎖二面角制限などがある。)
- (4) 『中間構造アンサンブル』を検討しながら化学シ フトが重なっている NOE を解釈して帰属して いく。
- (5) 帰属が進むことによって増えた構造情報をもと に、再び構造計算を行う。
- (6) (3-5)のステップを繰り返す。

実際には、化学シフトの重なりなどに考慮しながら、 残基内 NOE→sequential NOE→残基間 NOE の順に帰 属を進めていくのが、効率が良い。

#### 2.8. ambiguous NOE の取り扱い

近年、化学シフトが重なっているため一意的には帰属 できない"ambiguous NOE"を立体構造計算中に取り扱 うことで、上記(3-5)のステップを自動で行うア プローチが提案され、いくつかのソフトウェアで実現 されている。この方法論は積極的に改良されており、 ARIA および CYANA などの方法では上記の(1-5) 全てのステップが自動化されつつある。今後の計算化 学の進展に期待したい。しかしこれらの自動化法の導 入を進めるためにも、最低限の「手動での帰属の原理」 は理解しておいて損はないばかりか、新しい手法を開 発・導入するときにありがちな致命的なエラーを避け るためにも、以下に手動でのNOE 帰属の基準となる根 拠について述べる。

NOE の帰属のクリテリアはおよそ以下のとおりである。

(1) プロトンの化学シフトが十分分離していて、当該化学シフトに対応するプロトンがそれぞれ一つずつしかない場合には一意的に帰属できる(unique NOE または unambiguous NOE)

(2) プロトンの化学シフトは重なっているが、それ
 に結合している <sup>13</sup>C または <sup>15</sup>N の周波数で展開すること
 により分離することができ、一意的に帰属できる場合が
 多い(これも同上のように unique NOE または

unambiguous NOE として扱う)。3D-NOESY の場合に は、一方のプロトンが重なっていても、それに対応する 対称 peak が分離していれば一意的に帰属できる。

(3) 原始的な方法ではあるが、化学シフトが重なっ ていても NOE peak の線型(line shape)により、帰属を一 意的に行うことができる場合がある。そのため、特に間 接次元のプロトンのポイント数を増やしてデジタル分解 能のよいスペクトルを得ることは重要である。

(4) 同様に、同位体標識法を工夫したり、<sup>13</sup>C の場 合は constant time 測定を行うことで、<sup>13</sup>C-edited NOESY の相関ピークの符号の情報を付与することがで きる。これにより、隣接している<sup>13</sup>C の数から原子団その ものが区別して観測できるため、一意的に帰属できる場 合がある。

(5) NOE を与える一方の軸の化学シフトに複数の候補がある場合でも帰属が確定可能な場合。

(ア) 化学構造的に距離が固定されている(近位の)プロトン同士の NOE。

(イ) (ア)同様、残基内プロトン同士の NOE、特に隣り合ったプロトン同士(vicinal, geminal)の NOE。

(ウ) CSI など他の解析から得られた 2 次構造情報 と兼ねあわせて、立体的に近い距離にあると考えられ る典型的なプロトン(例えば H $\alpha$ (i-3)→HN など)同 士の NOE として解釈が可能なもの。

(エ) 帰属しようとしている NOE 自身は ambiguous であるが、既に帰属済みの NOE の近傍(化 学構造、または NOE) であると解釈が可能なも の。"network anchored NOE" と呼ぶ。例えば、ある 残基 i の Hαと現在着目しているプロトン X の NOE が既に帰属されていたとすると、残基 i の Hβの化学 シフトの位置にプロトン X との NOE が観測される可 能性が高い。こうした化学構造や、既に「unique な」 NOE として帰属されている NOE ネットワークの情 報を参考にして、帰属を進めることができる。遠位の 残基間の NOE などでは、この方法による確認は特に 有効である。

上記(ア)(イ)(ウ)(エ)の順に NOE の帰属の信頼 度は高いと考えられる。信頼度の低い NOE については、 仮に帰属はしておくが、初期の構造計算には用いで精 密化の段階で計算された立体構造に基づき帰属の再検 討を行うなどの、きめ細やかな管理が必要である。

 (6) 既に中間的な立体構造が構造計算が行われて おり、信頼できる構造のアンサンブルが得られた場合は、 それを基準に ambiguous な NOE の帰属を行う。あるい は、X 線構造を参考に NOE の帰属を行う。 帰属する際の判断基準はいくつかあるが、代表的な考え 方を以下に示す。

(ア) 中間構造のアクセプトされたアンサンブル のなかで、ある NOE を与えうる化学シフトの組合せ 距離をすべて調べる。そのうち、ただ一つの組合せの みが近距離(例えば 4A 以下)で、残りの可能性は全 て遠距離(例えば 4A 以上)の場合、その NOE はそ の組合せのプロトン由来のものであると帰属でき、他 の可能性を無視できる。

(イ) 中間構造のアクセプトされたアンサンブルのなかで、ある NOE を与えうる化学シフトの組合せ距離をすべて調べる。そのうち、近距離となるプロトンの組合せが複数あるが、そのうちある一組は他の組合せよりも常に近距離となる場合。この場合、観測されている NOE の強度にたいする各組合せの寄与"contribution"を調べて、その最近距離を与えるプロトン対の寄与で 90%以上が説明できてしまう場合には、その組合せの帰属を確定し、他の組合せの寄与(10%以下)を考慮しない。

(ウ) 中間構造のアクセプトされたアンサンブル のなかで、一つの NOE に対し常に複数の特定のプロ トン対が、その帰属候補として NOE を与えうる距離 に場合。この場合はアンサンブル中での帰属候補とな るプロトン対の距離から、観測されるべき NOE 強度 への寄与を計算し、一つの NOE peak が複数の peak が重複しているものと解釈して、それぞれを帰属し、 その強度の寄与をそれぞれに見積もる。(イ)と同様 に、確定した NOE 強度の寄与の和を距離の近い順に 計算し、観測値の 90%以上となったら、その peak 強 度は解釈がついたものとみなす。NOE 強度の残り 10%以下に相当する、それ以上の帰属と距離制限情報 の作成は行わない。

(エ) 中間構造のアクセプトされたアンサンブルのなかで、一部(たとえばほぼ半数)においては唯一のプロトン対のみが近距離となり、それ以外のアンサンブルでは近距離になるプロトンの組合せが一つもない場合。この場合は近距離となったプロトン対を仮に帰属して次のステップの構造計算を行い、その構造計算の収束や NOE バイオレーションの結果より帰属の妥当性を評価することになる。つまり、その帰属を採用したことにより、他の既存の構造情報に矛盾を生じさせない(標的関数の値の増大を招かない)ことと、結果の構造がよりよく収束すること、の2点により判断する。

## 2.9. <u>誤った NOE の帰属の発見と修正</u>

ここでいう誤った NOE とは、誤った距離情報の起源 となるために、立体構造計算の結果を誤らせるかもし れない NOE のことをさす。具体的には

- 各 proton の立体特異的帰属が誤っている、また
   は立体特異的帰属に応じた適正な NOE の強度
   の評価がなされていない NOE
- (2) 化学シフトが近接しているために、別のプロトン 対由来の NOE として帰属されてしまった NOE
- (3) NOE の帰属そのものは正しいが、NOE の強度 の評価を誤っているもの。特に、測定時に由来す るシステマティックなノイズや、spin diffusion などに由来する系統的なもの
- (4) 同じく NOE の強度評価を誤っているもので、例 えば重なっている NOE peak のうち、一方のみ が帰属されており、NOE 強度をそのプロトン対 からの寄与のみと評価している場合など
- (5) (4)とは逆に、既存の NOE に重なっているために、見落とされて帰属されていないため、有効な距離制限情報になっていないもの

(6) noise を peak と誤って、帰属してしまった場合 中間構造を生成させて、それを基準に ambiguous NOE の帰属を進めて構造を精密化する場合には、NOE を誤って帰属するリスクが無視できない。特に構造計 算の初期の段階で起きる帰属の誤りが入り込むと、誤 った中間構造が更に次の段階での誤った NOE の帰属 を引き起こし、最終的に間違った立体構造を出すこと になる。現在、ambiguous NOE の自動帰属を行いなが ら立体構造の精密化を行うことのできるいくつかのソ フトウェアが報告されているが、いずれもいかに NOE の誤帰属を避け、誤った構造に収束しないようにする か、という点に労力を割いている。

また、これに関連して、NMRによって決定した蛋白 質の構造の『品質管理』(QC)をいかにすべきか、ど のような指標を用いるべきかという議論も盛んである。

筆者の経験では、ある程度収束し始めてしまった構造 計算の中間結果の中から、本質的に誤ってい解釈され た NOE を客観的に見つけ出す方法は、ないように思わ れる。従って、最初の構造計算を始める段階で、少な くとも中間構造の foldingが正しい状態まで収束しない 場合には、本法による構造決定・構造精密化には危険 が伴う。これを避ける工夫としては、(1)中間構造の 計算を始める前に十分な数の NOE (特に遠位の残基間 NOE)を帰属することと、(2)NOE 以外の構造情報(後 述)を中間構造計算の際になるべく多く取り入れること、 をあげておく。これらを念頭において、新規の立体構 造を決定する場合には、十分注意して NOE の帰属を行 って欲しい。

例えば、中間構造を計算する上で、上記(2)や(6) は致命的である。(3)は計算中に系統的な violation を報告することが多いので、構造計算のログを解析す ることと spectra を良く見ることで発見しやすい。実際 に起きやすく、最後まで厄介なのが(4)(5)である。 これらの誤って帰属されている NOE を探す際の注目 するべき点としては

- (1) 構造計算中に系統的にエラー(バイオレーション)を出す NOE。
- (2) 構造計算中に系統的にエラーを出す制限情報の 近傍にある NOE。
- (3) 原子の結合長・結合角・芳香環の平面性などが異常な値を示しているところの近傍にある NOE。
- (4) van der Waals コンタクトの値が大きい原子の 近傍にある NOE。
- (5) RamacHAndran's plot の異常な残基の近傍に ある NOE。
- (6) <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N の NOE の値が小さくないにもかかわら
   ず、local に構造の収束が悪い箇所がある場合、
   その近傍の NOE。
- (7) 構造計算結果のアンサンブルを重ね合わせた場合に、local に2系の構造が現れた場合、その近傍の NOE。
- (8) それ以外でも歪んだ α-helix やねじれた β-sheet、典型的な分類に該当しないβ-turn など、
   図示したときに違和感を感じる構造の近傍の NOE。

構造解析に用いるソフトウェアによって、エラーが (1)に出やすいものと、(2)に出やすいものの傾向が異な る。計算に用いているソフトウェア導入時に、デモデ ータセットなどを加工して、ある程度の挙動を調べて おくと、後々役に立つ。特に精密化の最終段階となっ てくると、新たな NOE の帰属を加えるたびに、既存の NOE のどれかに violation が転化される、という現象 もみられるので、こうした『くせ』を知っておくとよ い。また、(8)などは普段よりいろいろな蛋白質の構造 を、分子表示ソフトで表示して眺めることで、『眼を養 う』ということも必要である。

誤った NOE を修正したら、再び構造計算を行ってその結果を評価する。

#### 2.10. その他の構造情報の取得

ここでは NOE によるプロトン間距離情報とは、別

の原理に基づいた実験から得られる構造情報(立体構 造計算の際に構造制限情報として用いることが可能な もの)について簡単に例示する。それぞれの方法の詳 細については、他の参考書や原著を参考にして欲しい。

#### <u>主鎖二面角φ</u>

二面角 $\phi$ は 3D-HNHA または 2D-HMQC-J を利用して、H $\alpha$ と HN の  $^{3}$ J を解析することにより、得ることができる。

#### <u>主鎖二面角φ</u>

二面角 $\phi$ を直接測定する方法は通常はあまりとられない。原理的には後述する HNHB により、 ${}^{3}J_{HA-N}$ より見積もることができるが一般的とは言えない。

#### <u>二次構造からのφ,φの制限</u>

上記の方法に加えて、Cα/Cβ/C'の化学シフトインデ ックスから 2 次構造を決定し、それに準じた φ/φの角 度制限情報を構造計算に用いる方法が知られている。

#### <u>Hβの立体特異的帰属と側鎖二面角χ1</u>

HNHBとHN(CO)HBの二組の3D-NMRを測定して、 相関 peakの有無からアミノ酸の側鎖の3種類の配座の 場合分けを行う。HNHBでは<sup>3</sup>J<sub>HB-N</sub>を通じた相関を、 HN(CO)HBでは<sup>3</sup>J<sub>HB-C</sub>を通じた相関をそれぞれ観測す る。配座とともに立体特異的帰属も得られる。

#### <u>Leu/Val メチル基の立体特異的帰属</u>

Leu/Val の二つあるメチル基の立体特異的帰属は、 Senn らが開発した fractioal 標識法を用いて行う方法 が簡便である。これは、M9 培地中の非標識 glucose に 13-17%の <sup>13</sup>Ce-glucose を混合して使うことで、proS と proR のメチル基 をその炭素原子の coupling pattern から区別する方法である。大腸菌のアミノ酸 代謝経路の特徴を利用して、<sup>13</sup>C-HSQC を 1 枚測定す るだけの非常に効果的な方法である。

#### <u> 残基間水素結合</u>

アミノ酸主鎖の残基間の水素結合は、立体構造計算 中に2次構造を補強するように働く重要な構造情報で ある。通常はNH-QC間、N-C間の二組の距離制限情 報と、結合角NHOの制限情報として構造計算中に盛り 込まれる。水素結合の有無の測定は、従来はNHのHD 交換実験から、長時間残存するプロトンに水素結合を 仮定していた。近年、HNCO-TROSY typeの実験から、 <sup>h2</sup>J<sub>NH-C</sub> / <sup>H3</sup>J<sub>NC</sub>が直接観測されることが明らかになっ た。

#### <u>分子配向と残余双極子相互作用</u>

希薄液晶溶液が NMR 試料管内で主磁場に対して配 向することを利用して、蛋白質の回転緩和に異方性を 生じさせ、蛋白質の主鎖の結合に於ける残余双極子相 互作用を観測する手法が開発された。この方法で主に 観測されるのは主鎖の N-H 間、N-C'間、N-Cα間およ び Cα-C'間であり、最終的にそれぞれの結合ベクトルと 主軸成分との角度が求まる。これによって得られた角 度制限情報は、NMRによる立体構造計算中では遠距離 の距離制限情報と同等ないしより強力に、立体構造を 既定する(よりよく収束させる)効果をもつ。

## <u>常磁性シフト・常磁性緩和を利用した遠距離の距離制</u> 限情報

もともと常磁性金属やスピンラベルのもたらすシフト・緩和は、他の NMR 現象に比較して遠い距離でも 相互作用が観測されることが知られていたため、金属 蛋白質の構造解析には重用されていた。近年、蛋白質 に常磁性のラベルを導入して、そこからの常磁性効果 を(半)定量的に測定し、長距離の距離情報として構造解 析に積極的に導入する試みが報告されている。

ここで紹介した NOE 以外の構造情報のうち、特に後 半の2つは、現時点で制限情報として取り扱うことの できる構造計算ソフトウェアが限られていたり、NMR 構造の評価にのみ用いられるものである。これらは、 主に構造決定の精密化の最終段階で用いられたり、精 密化された構造の品質管理に用いるものとして注目さ れている。筆者はこれらの情報が、ambiguous NOE の 半自動的帰属法においても、特に初期の段階で役立つ のではないかと期待している。なぜなら、前述のよう に、構造精密化の中間構造(初期構造)発生時に誤っ た構造が得られる危険性が無視できない。従って、 仮に構造の評価にしか使えない情報であっても、構造 計算の初期の段階で誤った初期構造をふるい落とすの に使えるのではないかと考えている。

#### 3. NMR解析に便利なソフトウェア短評

本稿で紹介した蛋白質の NMR の帰属法は、strip(短冊)を画面に表示・または用紙にプリントアウトする ことで効率的に行うことができる。そこで、これらの strip 作成機能に優れたソフトウェアのうち入手可能な ものをいくつか紹介する。

なおソフトの入手はライセンス条項を遵守して自己責 任で行って欲しい。

#### <u>NMRDraw / NMRWish / NMRPipe (NIH, 日本では</u> LA システムズ、有償)

3 次元・4 次元の NMR のプロセシングソフトが nmrPipe であり、こちらは多次元 NMR スペクトルの 数値解析を行うときの事実上の標準ソフトである。 NMRDraw はそれに付随するスペクトルの viewer で ある。画面の表示が美しい、peak pick が強力、隣接 plane での peak top 表示などの利点が多い。一方、表 示動作が重い、単体で複数のウィンドウ表示ができな いなどの欠点があった。その欠点は NMRWish により マクロ・プログラムを書くことで解消できる。このマ クロ言語は UNIX 上のスクリプト言語 Tcl/Tk を利用し て書かれているため、非常に拡張性に富む。NMRWish のパッケージ内には非常に便利なマクロ(スクリプト) が多数(3D-NMR 解析に必要十分な種類)含まれてい るらしい。らしい、と書いたのは、それらのマクロの マニュアルが貧弱なため実際の script を解読する必要 があるからである。

#### ANSIG / ANSIG on Linux (Per Kraulis)/ AZARA

筆者は使用したことがないが、首都大学東京(伊藤隆 教授グループ)が積極的に使用しており、相当の実績 のあるソフトウェアである。Linuxへの移植が完了し たため、更に使いやすくなった。また次期バージョン に向けての改良も進んでいる。英国の科学技術ソフト ウェア開発の公的プロジェクト CCP-N のサポートを 受けて開発されていて、現在でもサポートコミュニテ ィーが存続している。

#### SPARKY (UCSF

#### http://www.cgl.ucsf.edu/home/sparky/ 無償)

筆者の研究室で、大学院生をはじめ多くのスタッフが 実際に利用している思っているソフトウェアである。 CYANAに対応している。マクロに UNIX 上のプログ ラム言語 Python を利用している。Linux、Windows、 Mac 上で動く。

#### <u>P-ROI システム (九州大学,神田大輔教授より入手可</u> 能だがサポート終了)

P-ROI (paper region of interest)もまた、 NMRDraw / NMRWish で動作する Tcl/Tk のマクロ集 である。その機能は strip を作成することと、作成した strip を残基ごとに集めて一残基あたり一枚のプリント アウトを作成することに特化している。主鎖と側鎖を 帰属するために必要なツールは全て揃っている。複数 の種類のスペクトルを総合的に解釈しながら帰属作業 を進めることを主眼に開発されていて、性質の悪い試 料(S/N が必ずしもよくないスペクトル)を解析する ときに威力を発揮する。

#### <u>NMRView (Merck, http://www.nmrview.com</u> 無償)

NMRView はマルチウインドウタイプの解析ソフトウ ェアである。現在も開発は継続している。Tcl/Tk を用 いてマクロならびに GUI が容易に作成でき、拡張性に 富んでいる。Strip 作成やその並べ替えなどを行う標準 的なマクロ集は、WWW より一部入手可能であるが、 3D-NMR に必要十分なマクロがそろっているわけでは ないため、Tcl/Tk 言語で自らカスタマイズする必要が ある。サポートは終了している。

## 4. 参考文献

- 1. 阿久津秀雄,嶋田一夫,鈴木榮一郎,西村善文: NMR 分光法・原理から応用まで(日本分光学会測 定シリーズ41)(学会出版センター,東京,2003)
- 2. 荒田洋治: NMR の書 (丸善, 東京, 2000)
- 北丸竜三:核磁気共鳴の基礎と原理(共立出版, 東京, 1987)
- R. Freeman 著,坂口潮・嶋田一夫・荒田洋治訳: NMR ハンドブック(共立出版,東京, 1992)
- 5. 荒田洋治: タンパク質の NMR・構造データの解釈 と評価(共立出版,東京, 1996)
- R.M. Silverstein, F.X. Webster 著, 荒木 峻, 山本 修, 益子洋一郎, 鎌田利紘訳: 有機化合物のスペク トルによる同定法—MS, IR, NMRの併用(東京 化学同人, 東京, 1999)
- D.W. Timothy 著,竹内敬人,西川実希訳:有機化 学のための高分解能 NMR テクニック (KS 化学 専門書)(講談社,東京, 2004)
- 8. H. Kessler, M. Gehrke and C. Griesinger: Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 27, 490 (1988).
- 9. J. Keeler: Understanding NMR Spectroscopy (Wiler-VCH, Weinheim, 2005)
- 10. 黒田義弘: NMR 実験法・基礎と応用—化学と生物 実験ライン16 (廣川書店,東京, 1992)
- 11. R.R. Ernst, G. Bodenhausen, A. Wokaun 著, 永山 国昭,藤原敏道,内藤 晶,赤坂一之訳: エルンス ト2次元 NMR・原理と測定法[POD 版],(吉岡書 店,東京, 2000)

## In silico 創薬におけるスクリーニングの高速化・効率化技術

## (技術情報協会 2017 発刊予定)

## 第1章 In-silico による生体分子の相互作用解析とスクリーニングの実施

第8節 NMR による in-silico スクリーニング計算結果の検証

名古屋大学·創薬科学研究科·構造分子薬理学分野

## 廣明秀一

#### はじめに

本節では、核磁気共鳴 (Nuclear Magnetic Resonance, NMR) 法を用いた in-silico スクリーニング計算結果の検証実験について、その原理と方法を実験例とともに紹介する.in-silico スクリーニングから得られる多くの情報のうち、どの情報を検証するのか、検証によりどのようなベネフィットが得られるのかについても、考えていきたい.というのは、NMR 検証実験が必要とするコストが、検証手段として NMR を選択することの妥当性と不可分であるからである.

本稿が想定している in-silico スクリーニングは,主 として標的タンパク質の立体構造(モデルを含む)が得 られている場合の, 高速ドッキング実験である. 従って 計算結果は、ドッキングスコア順に並び替えてある化 合物のリストである. スコアはリガンドのポーズ (標的 タンパク質に結合している際のリガンド分子のコンフ オメーション)毎に異なり、タンパク質側の座標と併せ ることで複合体のモデルが得られるものと仮定する. 周知のようにこのような高速ドッキング実験は、計算 の精度とスクリーニングのスループット(単位時間当 たりの化合物処理数)がトレードオフの関係にある. 個々の分子間相互作用の計算をどこまで精密に計算す るのかと、ドッキング位置、ドッキングポーズをどれほ ど多数サンプリングするのかにより,計算にかかるコ スト・時間は爆発的に増大する.計算時間と計算精度を 両立させるために, 高速スクリーニングと精密ドッキ ングを組み合わせて, 第一次スクリーニングを通過し た上位化合物のみ精密計算を行うという方法も日常的 に採用されている. そのため, in-silico スクリーニング に期待されている成果として,新規のシーズ化合物の 基本骨格の発見のみならず、発見されたシーズに含ま れるファーマコフォアの同定や、標的タンパク質との 相互作用における鍵残基の同定などが含まれているの が実情である.

in-silico スクリーニングの複数のアルゴリズムやソフトウェアの性能を比較するために通常用いられる性能指標として、「ヒット率」と「濃縮係数」が挙げられ

る. このうち, ヒット率の検証については, スコアが高 かった化合物が実際に標的に結合するかどうかを実験 的に試せばよいので, 創薬探索プロジェクトの中で一 般的に行われる.一方で,濃縮係数の検証は,一定の閾 値を下回る多数の化合物が標的タンパク質に結合しな いことを示す実験を多数集めなければならず、アルゴ リズム開発者以外の研究者は通常は行わない.同様に, in-silico スクリーニングにおける化合物のスコアが, そ の化合物の活性(たとえば結合定数 KD)とよい相関関 係にあることが望ましいが、その種の検証実験を行う ことは稀である.また、ドッキング実験の精密さを評価 する指標として、PDB 中より選ばれたリガンド・標的 複合体から両者を引き離して再ドッキングして、出発 構造との差異を評価する「再結合実験」が一般的である. 多くのドッキングプログラムでは、標的タンパク質に 結合した状態のリガンドのコンフォメーションがあら かじめ正解構造に固定されていたときに、正解構造に 近いドッキングが実現できることが知られている. そ こで、予測された複合体構造が正しいかどうかを実験 的に検証することが困難な場合に、結合状態のリガン ドのコンフォメーションを溶液 NMR 法で解析するこ とで、間接的に in-silico スクリーニングの性能評価が 可能である.

表1に、本稿で紹介する、いくつかの溶液 NMR の実 験手法を、in-silico スクリーニング実験結果の何を検証 するのに有用かという目的別の観点でまとめた. なお、 本稿では、分子量 1000 程度までのペプチドを含む低分 子〜中分子化合物を、単に「リガンド」と呼ぶことにす る.

#### 1 溶液 NMR 法の基礎

#### 1.1 NMR の原理 <sup>1,2)</sup>

原子核を強い磁場中に置くと、特定の周波数の電磁 波を吸収する性質をもつようになる.NMR法は、化合 物中の原子核(主に1H,13C,15N,19F,31Pなど)の核ス ピン、が磁場中でそれぞれ固有の周波数の電磁波に共 鳴することを利用して、化学構造の決定を行うため

表1.	in-silico スクリーニン	グ実験の検証に利用可能な溶液 NMF	実験法の原理と特徴

実験名	実験の分類	原理など	特徴
【結合活性の有無の格	食証, ヒット <u>率の検証</u> 】		
STD	リガンドベース	交差緩和の効率は分子量が大き いほどよいので、タンパク質の <sup>1</sup> H スピンの磁化が先に飽和し、 その後、結合したリガンドに移 動する.励起パルスの有無で、リ ガンドのシグナルの強度変化を 観察する.	最も一般的な結合活性の有無の検証法. STD 自体には定量性がないが,定量性を持たせるための工夫をほどこすなど,多くの 変法が提案されている.安定同位体試料を 必要としない.
waterLOGSY	リガンドベース	同上.ただし、タンパク質の <sup>1</sup> H を直接励起するのではなく、水 分子の磁化を励起して、それを 化学交換によりタンパク質に移 す.	安定同位体試料を必要としない.STDより も感度がよいという報告がある.標的タン パク質を入れていない比較用試料のスペ クトルをリガンドの本数分測定する必要 がある.
DOSY	リガンドベース	分子のブラウン運動による並進 拡散は,分子量が小さいほど早 い.磁場グラジエントを利用し た NMR 測定により,横軸を <sup>1</sup> H 化学シフト,縦軸を拡散係数と した 2D-NMR を測定し, <sup>1</sup> H ス ペクトルを拡散係数の違いで二 次元に展開する.	磁場勾配パルスを出すことのできるプロ ーブが必要.2次元 NMR の実験だが,縦 軸は自己相関係数となる.複数のリガンド の混合物に適用可能.安定同位体試料を必 要としない.
【ファーマコフォア汐	央定・ドッキングポーズ6	D検証】	
DIRECTION	リガンドベース	交差緩和を利用している点で STDと同様. リガンド由来プロ トンシグナルの T1 緩和時間を 測定し, タンパク質側磁化飽和 のありなしで差を取ることで判 別する.	定量性がある(分子間のプロトン間距離と DIRECTION で得られる緩和時間の差の 結果に,ある程度の定量的な相関が認めら れる). 多数のデータ点を測定するため実 験時間が長い. 安定同位体試料を必要とし ない.
INPHARMA	リガンドベース	交差緩和を利用している点で STD と同様. ただし, タンパク 質の <sup>1</sup> H を直接励起するのでは なく, 既知のリガンドから飽和 移動させ, さらに未知リガンド へと移動させる.	一つの標的タンパク質試料に二つのリガ ンドを共存させる.片方のリガンドの結合 モードが既知である必要がある.安定同位 体試料を必要としない.
【結合活性の有無の権	<b>貧証, ヒット率の検証】</b> 【	結合ポケット決定】	
NMR 滴定実験(化 学シフト摂動法)	<i>タンパク質ベース</i>	リガンド結合時の標的タンパク 質のシグナルの化学シフトの変 化を観察する.	<ul> <li>簡便, 高感度. 自動測定に向く. 化学シフトの移動の大きさは必ずしも相互作用の強さを示すわけではない. アロステリックな変化と直接結合の変化は区別しづらい.</li> <li><sup>15</sup>Nまたは<sup>13</sup>C 標識の試料が必要. 飽和曲線を作成することで K<sub>D</sub>決定が可能.</li> </ul>
【結合ホケット次足】	カンシャカ所ショ	日おいた社会性の無効ない。	1511 よいトッド 911 の 一子 (西部) のき4かしょう ソ エ
父走跑和移動法	タンハク質ペース	リガンド結合時の標的タンパク 質のシグナルの、リガンド分子 のプロトンからの磁化移動によ るシグナル強度の変化を観察す る.	<sup>19</sup> N およい <sup>2</sup> H の一重標識の試料が必要. 得られたシグナル強度減少と相互作用部 位間の近さには一定の定量的相関が期待 できる.低感度.

の分析手法である.原子核は、その電荷のため、原子核 の中心を通る軸にそって回転運動をしているとみなす ことができて、あたかも自転する小さな棒磁石のよう な性質を示す.この小さな棒磁石(核スピン)を静磁場 中に置くと、外部磁場の影響で、磁場に平行または逆平 行な向きの才差運動を行うようになる. この時, 磁場に 平行な核スピンと逆平行な核スピンのエネルギー準位 が分裂し, そのエネルギー差に相当する電磁波を吸収 するようになる. こうした NMR 現象はそれぞれの原 子核がもつスピン量子数が 1/2 の時に, とくに良好に観 測される.

このうち<sup>1</sup>H は天然存在比がほぼ 100%で,しかも最 も同一磁場下で共鳴周波数が高く,感度もよい.そのた め,観測が容易な一方で,溶媒などのシグナルの影響を 受けやすい.<sup>1</sup>H の安定同位体の<sup>2</sup>H (D または重水素)は 共鳴周波数も異なり高感度の NMR シグナルを与えな いので,通常は重水素化した溶媒や緩衝液成分を用い て,不要なシグナルを低減させる.おなじく天然存在比 が 100%の原子に<sup>19</sup>F があり,<sup>19</sup>F を含んだフラグメン トライブラリを利用して標的タンパク質との相互作用 を検出するなど,NMR の利用が進んでいる<sup>3)</sup>.一方, <sup>13</sup>C と <sup>15</sup>N は天然存在比が 1%,0.35%しかない安定同 位体である.後述するように,標的タンパク質への安定 同位体標識の導入が容易かどうかにより,in-silico スク リーニング結果の検証実験の方針(ないし実験のデザ イン)に大きく影響を与える.

1.2 NMR スペクトルが与える情報

NMR 法が与える情報は、①共鳴周波数(化学シフト)、 ②カップリング定数(J), ③シグナルの強度, ④シグナ ルの線幅, ⑤緩和時間, ⑥核オーバーハウザー効果 (nuclear Overhauser effect, NOE)などがある. このう ち、タンパク質の立体構造を決定する際に用いられる のは, 化学シフト, カップリング定数, NOE である. NOE とは、およそ 5 Å以内の距離にあるプロトン同士 は、そのスピン状態によりお互いの緩和時間に影響を 及ぼし、シグナル強度を変化させる現象のことである. NOE は核間の距離が近いほど強くなる. NOE を中心 とした NMR 信号が与える情報を、プロトン間距離や 単結合間の二面角といった構造制限情報に翻訳し、そ れらをすべて満たす立体構造を計算することで、タン パク質の立体構造を決定することができる. この技術 そのものは, in-silico スクリーニングの検証よりもむし ろ, in-silico スクリーニングに用いる標的タンパク質 の立体構造決定に用いられている.

NMR シグナルの化学シフト,強度や線幅は,分子の 局所的な環境変化に鋭敏である.そのため,標的タンパ ク質とリガンド候補物質の混合物の NMR スペクトル から,相互作用の有無のみならず,相互作用の強弱およ び部位を判別できる.タンパク質とリガンドの相互作 用を観察する方法は、リガンドの NMR 信号の変化に 着目して解析する方法(「リガンドベース」相互作用解 析法)と,タンパク質側の NMR 信号の変化を観測する 方法(「タンパク質ベース」相互作用解析法),に大別で きる.以下,それぞれの方法論を単にリガンドベース法, タンパク質ベース法と記す(表1). 
 1.3
 タンパク質の NMR 解析に固有の問題~主鎖

 シグナルの帰属

溶液 NMR 法でタンパク質とリガンド間の単なる相 互作用の有無よりも詳細な情報、例えば相互作用ポケ ットの情報などの情報が得られる.ただしそのために は標的タンパク質に注目して、その NMR シグナルが 標的のどの残基のどの原子由来のシグナルか、あらか じめ帰属されている必要がある.そのための最初の作 業は, 主鎖アミドグループ(NH)の信号の帰属である. 先行研究のある標的タンパク質ならば,その主鎖NHの 帰属情報が文献やデータベース(BioMagResBank (BMRB) http://www.bmrb.wisc.edu/)から入手できる ことがある. ただし BMRB には, 原稿執筆時(2017年 7月)で約11,700件のエントリーしかない.この数は, PDB に登録されている立体構造のエントリー数(同 135,000件)に較べて極めて少ない. その上, X線結晶 解析における分子置換法とは異なり、アミノ酸配列が わずかに異なるだけで、類似のタンパク質の NMR シ グナル帰属データが、そのまま利用できないことがあ る. 著者の経験上, アミノ酸配列相同性が 90%に満た ない場合は、定法に従い主鎖シグナルの連鎖帰属を行 うこととなる.この作業には、数週間に及ぶ追加の NMR 測定とシグナル解析が必要となるため, NMR 法 の弱点の一つである.

1.4 タンパク質の NMR 解析に固有の問題~相互 作用解析に必要なタンパク質試料

タンパク質ベースの実験において、タンパク質(ドメ インを含む)の<sup>1</sup>H NMR スペクトルは、同じ共鳴周波 数の<sup>1</sup>H シグナルが多数重複するため通常は解析(シグ ナル帰属)が不可能である.そこでタンパク質を安定同 位体で標識して、多次元 NMR 法により解析する.従っ て NMR 法でタンパク質・リガンド間相互作用を観察 する際は、安定同位体標識試料の入手可能性がボトル ネックとなる.標識された標的タンパク質が入手でき ない場合は必然的にリガンドベースの相互作用実験の みに頼らざるを得ない.他方、入手可能な場合は、リガ ンドベース実験・タンパク質ベース実験のいずれの実 験手法も適用することができ、研究の幅が拡がる.

タンパク質に <sup>15</sup>N または <sup>13</sup>C の標識を導入するとき に最も一般的かつ低コストな方法は, <sup>15</sup>N-NH<sub>4</sub>Cl/<sup>13</sup>C<sub>6</sub>glucose をそれぞれ唯一の窒素源・炭素源とする最少培 地で大腸菌を培養し,目的タンパク質を組換え生産す る方法である.第二の選択肢として,大腸菌または小麦 胚芽の無細胞系を用いた,タンパク質生産がある [reference].この場合はタンパク質合成反応試薬に安定 同位体標識されたアミノ酸を用いる.標識アミノ酸の

価格が近年かなり下がったため、無細胞系による標識 タンパク質の生産コストは、大腸菌で培養する場合の せいぜい数倍程度である.他方,大腸菌以外のホスト・ ベクター系を用いたタンパク質組換え生産による安定 同位体標識法も長足の進歩を見せた.例として,真正細 菌では Brevibacillus choshinensis <sup>4)</sup>, 酵母では *Kluyveromyces lactis*<sup>5)</sup>,昆虫細胞ではショウジョウバ エ S2 細胞 <sup>6)</sup>, 植物ではタバコ培養細胞 BY-2 <sup>7)</sup>などで 安定同位体標識の条件が確立されている. 創薬標的と して重要なヒト由来タンパク質,特にタンパク質キナ ーゼや抗体などの試料は、しばしば大腸菌で正しいフ オールディングがおこりにくいことを考えると、選択 肢が増えること自体が極めて重要なブレークスルーで ある.しかし,注意しなければならないのは,プロジェ クトの進行速度や予算規模、試料のもつそもそもの物 性などにより,常に安定同位体標識された標的タンパ ク質の試料が得られるとは限らないこと、である.また、 仮に安定同位体標識試料が得られたとしても, NH シグ ナルの分離のよい二次元 NMR スペクトルが測定でき る試料条件が定まるとは限らないこと、にも留意すべ きであろう.

1.5 溶液 NMR 法を特徴づけるもう一つの重要な
 特徴~化学交換

NMR 法では、原子核の核スピンが発する微弱な NMR 信号を, 試料近傍に設置したプローブとよばれる コイルにより、0.1~数秒の間に減衰する振動電流 (Free Induction Decay (FID)信号) として記録し, そ れをフーリエ変換(FT)することによって NMR シグナ ルの共鳴周波数を決定する.そのため、この信号を記録 している時間中に試料内で起こる物理現象の影響も, すべて包含されて検出されてしまう. 例えば, ある化合 物が二系の異性体間の平衡状態にあり、その化合物の 二つの状態 A と B で, 化合物に含まれるある <sup>1</sup>H 原子 核が常態ごとに異なる共鳴周波数を持つとする.この 場合,状態Aと状態Bの化学交換の速度により,シグ ナルの見た目が大きく変化することが知られている. 交換速度が NMR の観測時間軸に比べて十分遅い場合 は、AとBの2本の独立したシグナルω(A)とω(B)が観 測される [ω(A)とω(B)はそれぞれ化合物中のとあるプ ロトンの状態AとBに相当するNMR シグナルの共鳴 周波数とする].一方,状態Aと状態Bの交換が極めて 早い(たとえばミリ秒以下)場合で,状態Aと状態B の存在比率が等しい場合は、本来観測されるべき A 由 来シグナルと B 由来シグナルの中点の位置, [ω(A)+ω(B)]/2 に相当する周波数に1本の信号が観測 される. タンパク質・リガンドの相互作用を NMR で検 出する実験において,この化学交換 (chemical exchange)の取り扱いが極めて重要である.先の例は同 一分子内での化学交換の例であるが,同じ現象が分子 間の結合・解離反応でも起こるからである.

リガンド由来の NMR 信号に着目すると,タンパク 質に結合していない状態のリガンドと,結合状態のリ ガンドは,原理的に異なる NMR 信号を与えるはずで ある.例えば,リガンドの分子量を仮に 500,標的タン パク質の分子量を仮に 20,000 と仮定すると,結合状態 と非結合状態では,リガンドの見かけの分子量が 40 倍 も異なる.そのため,リガンド由来の NMR 信号は,化 学シフト,T<sub>1</sub>/T<sub>2</sub>緩和時間,リガンド内プロトンの交差 緩和の効率,並進拡散係数などのパラメータのいずれ か,あるいは複数が,相互作用の有無により大きく変化 する.仮に化学シフトがたまたま同一であったとして も,シグナル強度や緩和,磁化移動に関わるパラメータ が必ず異なる.それらのパラメータの見かけ上の変化 についても,交換速度が速ければ,観測時間軸内での 「平均化」が起こる.

リガンドベース NMR 法は,全ての方法が,結合状 態とフリー状態の間の化学交換を利用している.その ため,*kon*/*kott*それぞれが速いリガンド結合平衡系で なければ測定できない(熱力学的な厳密さを敢えて簡 略化すれば,弱い結合リガンドしか観測できない)と いう欠点がある.更に,タンパク質の表面に非特異的 に吸着するような化合物と,特定のポケットに結合す る化合物を,区別できないなどの欠点がある.その一 方で,標的となるタンパク質に同位体標識を必要とし ない,タンパク質量が比較的少量で済む,標的タンパ ク質の分子量に上限がない,などの利点を併せ持つ. これらの特徴は,in-silicoスクリーニングで得られた 結果の検証実験に用いるのに最適である,と言える.

NMR によるタンパク質・リガンド相互作用検
 出法の実際

2.1 タンパク質・リガンド相互作用検出におけるNMR 法の長所

前述のように溶液 NMR 法は,分子間相互作用研究に 極めて適しており,他の相互作用検出法にはないユニ ークな強みを持つ.

まず(1)かなり弱い相互作用でも検出が可能であること(高感度),(2)中程度以上の大きさの分子において は相互作用に伴う NMR 信号の変化が局所的であり, 特定の原子団やアミノ酸残基の情報が特異的に得られ ること(局所性),(3)それを利用して相互作用が弱く ても特異的な相互作用と非特異的な相互作用を区別で きること(特異性),(4) NMR 試料管内で滴定実験を 行うことで,飽和曲線から *K*<sub>D</sub>が算出可能なこと(定量 性),(5)他の相互作用検出法と比較して,標的タンパ ク質の固相への固定化が必要ない,などがあげられる. これらの特徴は,NMR 法が,試料管内に含まれる非常 に多数の核スピン(の外部磁場による影響の結果)を, 平均として観測しているという,その原理に由来して いる.更に NMR 法は,タンパク質+低分子化合物の混 合物(あえて複合体とは呼ばない)を試料とし,その動 的平衡状態を計測することができる.それゆえ試料に 平衡状態や化学交換が存在する場合は,観測している 時間内での時間平均が観測されてしまう測定法なので ある.

2.2 NMR によるタンパク質・リガンド相互作用観測実験の限界と注意点

一方で、NMR 法は、タンパク質の立体構造を実験的 に決定することのできる手法ではあるが, タンパク質・ リガンド化合物複合体の構造決定そのものはやや苦手 である.国際タンパク質立体構造データベース(protein data bank: PDB, http://www.pdb.org/)に登録されてい るエントリーでも、NMR で決定された複合体は多くな い. これは, NMR 法では X 線における分子置換法のよ うな、同一タンパク質や類似タンパク質の既知情報(構 造情報及び化学シフト情報)を参考にしてシグナルを 帰属したり, 立体構造を決定・精密化する計算科学的手 法が,確立されていないことに起因している.特に NMR 信号の帰属について, 既知情報を計算科学的に再 利用して解析を進める技術の開発は急務である.NMR は各原子核の共鳴周波数を検出するスペクトロスコピ ーであるため,信号の位置が分子間相互作用の結果大 きく変化すると,仮にリガンド非結合状態の標的タン パク質構造が NMR によって決定されていたとしても, シグナルの帰属の作業を新たにやり直すことになる.

また,NMR を用いてタンパク質・リガンド混合物を 取り扱う実験で,注意しなければならないのは,しばし ば医薬品スクリーニングの原料となる有機低分子化合 物の水への溶解度が低いことである.タンパク質の変 性のリスクを考えると,程度の補助溶媒のジメチルス ルホキシド(DMSO)の終濃度を10%以下に抑えること が望ましい.併せてリガンドフリーのスペクトルも, DMSO 存在下で測定して比較対象とするなどの工夫が 必須である.

3 リガンドの NMR シグナルに着目した手法 "リガンドベース NMR 法"の実際

多くのリガンドベース NMR 法では,興味の対象と するリガンドを 0.1~0.5mM の NMR 試料として,そ れに結合する標的タンパク質を 1/100~1/10 程度添加 した混合試料を用意し測定する.その際,モル比とし てはリガンドがタンパク質に対して大過剰となるが, タンパク質に結合していないリガンド由来の一次元 NMR 信号を観測し,スペクトルのさまざまなパラメ ータの差を観測する.したがって,タンパク質ベース 法とは異なり,タンパク質のシグナルやタンパク質・リ ガンド複合体のシグナルの帰属は必要ない.そのかわ り,対照実験としてタンパク質が無添加の状態(リガ ンド単独の試料)のスペクトルが必要なのはいうまで もない.

表1で紹介した測定法のうち、タンパク質とリガン ド間の相互作用の有無を迅速簡便に判別する実験手法 として, 飽和移動差分法 (saturation transfer difference: STD 法)<sup>®</sup>, WaterLOGSY 法<sup>®</sup>, および Diffusion ordered spectroscopy (DOSY)法<sup>100</sup>がよく用 いられている(図1). これらの方法は、in-silico スク リーニング法とは独立に、NMR 装置をあたかもハイス ループットスクリーニングの検出装置として利用した、 いわゆる NMR スクリーニングの手法である. しかし NMR 測定のコストや単位時間当たりの処理量から、そ のスループットは決して高くない. そのため、実際の創 薬(シーズ探索)プロセスにおいて、in-silico スクリ ーニング法や他の一次スクリーニング法と組み合わせ て用いられるのが現実的である.

## 3.2 STD 法(飽和移動差分法: saturation transfer difference)<sup>8)</sup>

STD 法は、<sup>1</sup>H のスピン間の磁化移動の効率が、その 1H が属する分子の回転運動の拡散係数(ざっくりいう と溶液中の見かけの分子量)に依存することを利用し た測定法である 5). 二つの水素原子が空間的に近接して いるときに、一方の <sup>1</sup>H スピンを選択的に励起すると、 隣のプロトンに磁化が伝播してそのシグナル強度が変 化することが知られている. 飽和移動の効率は, リガン ド結合解離平衡が起こっている系では、フリーのリガ ンドよりも標的に結合したリガンドのほうが高い.こ の原理を利用して、 タンパク質と複数のリガンドの混 合物の試料から、タンパク質に結合する活性のある化 合物だけを NMR 法で同定できる.まず,混合物試料を 用意し、タンパク質由来の<sup>1</sup>H シグナルのみを、選択パ ルスで励起・飽和する. するとその<sup>1</sup>Hの磁化は, 飽和 移動により,タンパク質内の全ての<sup>1</sup>Hスピンに広がり, 分子全体の<sup>1</sup>H 磁化が飽和される. その状態の標的タン パク質に、リガンドの一つが接触したとすると、それ

3.1 実験の準備

#### 図1. いくつかのリガンドベースの NMR 相互作用検出法の原理模式図

A, STD 法の原理.まず選択励起パルスを用いて,標的タンパク質の,リガンド由来シグナルのない化学シフト領域,例えば Oppm より右に現れるタンパク質のメチルシグナルを励起する.分子量の大きいタンパク質はスピン 拡散の効率が良いため分子全体の <sup>1</sup>H 磁化が短時間で飽和される.その飽和した磁化が過渡的複合体形成を通じて リガンドの <sup>1</sup>H に移動するため,相互作用があるリガンドのシグナルのみが強度変化を示す. B, waterLOGSY の 原理. この場合は軽水中の試料において,溶媒である水の <sup>1</sup>H を飽和する.この磁化はタンパク質表面の NH 基と 化学交換を通じて,あるいは分子間 NOE を通じてタンパク質表面の <sup>1</sup>H 磁化に移動する.その磁化が更に,リガ ンドの <sup>1</sup>H に移動するので,そのシグナルの強度変化を観測する. C, DOSY の模式図. DOSY は横軸を <sup>1</sup>H の化学 シフト,縦軸を並進拡散運動の拡散係数とした二次元 NMR である.標的タンパク質と相互作用しているリガンド は、本来の分子量よりも遅く拡散する.D, INPHARMA.標的タンパク質の同じポケットで競合する二種類のリ ガンド分子間で,標的タンパク質のポケット周辺の <sup>1</sup>H の磁化の飽和を経由して,見かけ上の分子間の磁化移動が 起こるのでそれを観測する.





が短時間の過渡的な複合体形成であったとしても,近 傍にあったタンパク質のプロトンから化合物プロトン に磁化が移動する(飽和).そこで,選択励起パルスの 照射ありなしによる二つのスペクトルの差をとれば, 結合活性のあるリガンドを特定できる.

#### 3.3 WaterLOGSY 法<sup>9)</sup>

WaterLOGSY 法は, NMR 溶媒である水分子と, リガ ンドの間の磁化の交差緩和を利用する方法である 6. も ともとタンパク質表面にある多くの NH 基において, そのプロトンは、非常に速い交換速度で溶媒である水 分子のプロトンと常時化学交換していることを念頭に 置いていただきたい. そこで溶媒である水分子の <sup>1</sup>H ス ピンを選択的に励起すると、その励起されたプロトン はタンパク質の(主に表面にある)NH 基と化学交換し, タンパク質に結合したリガンドの<sup>1</sup>H に交差緩和を通 じて磁化に変調を与える. その結果, タンパク質と結合 したリガンドにのみ、スペクトルに変化が現れるので、 それにより結合の有無が判定できる. <sup>1</sup>H 間の交差緩和 の効率(NOE)および正負の符号は、分子量1,000~2,000 のあたりを境にして反転する. そのため, リガンド単独 では正の NOE,標的に結合しているリガンドでは、負 のNOEが観察される.したがって、この実験で、溶媒 (水分子)とリガンドの間にもし負の NOE が観測され たとしたら、それは標的タンパク質との間で結合が起 こったことを強く示唆する.

3.4 **DOSY** またはアフィニティー**NMR** 法<sup>10</sup>

近年の NMR 装置に装備されているプローブには, コヒーレンス選択などを行い多次元 NMR におけるス ペクトルの S/N を改善するため, 試料に磁場グラジエ ントを印加することのできるグラジエントコイルを備 えたプローブが, 普及しつつある. この磁場グラジエン トをパルスで与えるパルスフィールドグラジエント技 術を用いたスピンエコーの NMR 測定により,溶液中 の分子のブラウン運動による併進運動の拡散係数 D を 測定する方法が,古くから知られている (PGSE-NMR 法)<sup>11)</sup>.併進運動の拡散係数は自己拡散係数とも呼ばれ, その分子量に大きく依存する.結合・解離の2状態間の 平衡にある系で,標的タンパク質に結合する活性のあ るリガンドは,その拡散係数がリガンド単独の拡散係 数よりも小さくなる.

DOSY は、PGSE-NMR を応用して、こうした分子の 拡散現象を観察する 2 次元 NMR 法である.ただし通 常の 2 次元 NMR とは異なり、複数の測定の間に変化 させるのはパルス間隔ではなく磁場グラジエントの強 度である.この強度に応じて、エクスポネンシャルにリ ガンド由来の NMR シグナルが減少するように設定し て、一連の NMR 測定を行い、データシリーズを 2 次 元 NMR データとして格納する.そのデータに対して、 2 次元目データを逆ラプラス変換により処理すること で、複数リガンドを含むスペクトルが、その自己拡散係 数を縦軸とし化学シフトを横軸とした 2D-NMR スペク トルとして表現できる.この測定方法は DOSY (Diffusion Ordered SpectroscopY) と呼ばれ、タンパク 質・リガンド相互作用の有無の検出に利用可能である.

4 タンパク質側のシグナルに着目した手法 "タンパク質ベース NMR 法"

4.1 NMR 滴定実験 (NMR titration experiment) または化学シフト摂動実験 (chemical shift perturbation experiment)

タンパク質ベース法では、安定同位体標識した標的 タンパク質にリガンドを順次添加しながら<sup>15</sup>N-<sup>1</sup>H また は<sup>13</sup>C-<sup>1</sup>H 二次元 NMR を測定する. リガンド濃度に応 じたタンパク質由来の NMR 信号の変化(化学シフト および強度)から、リガンドとの相互作用の有無、アフ ィニティ、相互作用に関わるアミノ酸残基の特定、およ

びリガンドの標的への結合様式の推定などが可能であ る. 化学シフトの変化を追う実験であることから、古典 的には化学シフト摂動実験と呼ばれていたが,近年は, 単純に NMR 滴定実験と呼ぶことも多い. このうち, 最 も簡便な実験が、全アミノ酸を <sup>15</sup>N で標識した試料を 用いての, ペプチド主鎖 NH 基の <sup>15</sup>N-<sup>1</sup>H 化学シフト相 関スペクトルを解析する実験である.この実験の特徴 の一つは、理想的な試料ではプロリン残基とN末端を 除くすべてのアミノ酸が独立した鎖 NH 基のシグナル を与えるので、標的タンパク質の全体にわたって、残基 ごとの情報が得られることである. そのため, リガンド との相互作用の有無を判別するだけの目的ならば、必 ずしもタンパク質由来 NMR シグナルの配列特異的帰 属は必要ない. しかし, あらかじめ NH シグナルの帰 属の情報とその立体構造情報がともに揃っている場合 には、結合の有無のみならず、タンパク質のポケットの どの部位にリガンドが結合したかについても情報が得 られる.標準的な実験の流れは以下の通りである.

- 0.05~0.1mMの<sup>15</sup>N標識タンパク質試料を用意し、 リガンド非存在下で<sup>15</sup>N<sup>-1</sup>H 二次元スペクトルを 測定する.次に、タンパク質に対し、1~10等量の リガンドを添加し、同様の測定を行う.両者のスペ クトルを比較し変化の見られた残基を確認する.
- 2. 特に大きな変化が見られたシグナルに着目して, 添加するリガンド濃度を変化させて複数の測定を 行う.
- リガンド濃度に対しシグナル移動度をプロットし、
   リガンド結合の飽和曲線を作成する.
- 4. 飽和曲線より KDを算出する.
- 5. 各シグナルのアミノ酸残基特異的帰属が得られて いる場合には、一定の閾値を定め、閾値以上の移動 度を示したアミノ酸残基を、標的タンパク質の立 体構造上に色付けする.

この実験のメリットは、安定同位体標識試料を使用 するため NMR 測定の実用的な S/N 比が高く、また、 添加するリガンド由来の夾雑物(補助溶媒や界面活性 剤などを含む)の影響を受けにくいことである.測定に 必要なパラメータ設定も比較的簡単で、試料ごとのパ ラメータのばらつきも小さく測定の失敗が少ない.そ のため、この方法は、自動測定と組み合わせることが可 能で、スクリーニングのスループットを挙げることが できる.具体的には、一度に 80 本以上の NMR 試料を あらかじめセットして、測定開始時まで試料温度を低 温に保ちつつ、目的温度まで昇温して一連の測定を連 続で行うサンプルチェンジャーが開発されている.

## 4.2 磁化交差飽和実験 (cross saturation experiment)

前述の NMR 滴定実験は, 実施が容易である反面, 化学 シフト変化の大きさとリガンド・標的タンパク質間の 分子間距離の近さが, 必ずしも正確に相関しないとい う欠点がある. 化学シフトの値は複数の要因で決まり, リガンドの化学構造に応じて変化量や変化の符号が異 なることが原因である. 例えば, 偶然に2つの要因がキ ャンセルして, 化学シフトの変化が見かけ上ゼロとい うこともあり得る. また, リガンド結合に伴う亜アロス テリックなタンパク質の立体構造変化をも反映してし まう. 化学シフト変化を標的タンパク質表面上にマッ ピングしたリガンド結合部位の精度は, 必ずしも高く ない.

以上の欠点を克服する方法として,交差飽和法 (cross-saturation method)がある<sup>12,13)</sup>. 交差飽和法に は、<sup>15</sup>N に加えて,交換性・非交換性のプロトンのすべ てを<sup>2</sup>H で標識した標的タンパク質の試料が必要であ る. この試料を 90% D<sub>2</sub>O / 10% H<sub>2</sub>O の測定溶液中で, アミド基の重水素をプロトンに戻して,そこに飽和濃 度のリガンドを加える. そののち,選択励起パルスを用 いてリガンドの<sup>1</sup>H スピンを飽和した場合としない場 合のそれぞれの<sup>15</sup>N<sup>-1</sup>H の二次元相関スペクトルを測定 し、飽和時のタンパク質側 NH 基シグナルの減弱を調 べる. この方法はリガンドの<sup>1</sup>H スピンからタンパク質 の<sup>1</sup>H スピンへの磁化移動 (空間を伝わる双極子相互作 用)に基づいているため,化学シフト摂動実験よりも, より正確にリガンド結合部位のマッピングを行うこと ができる.

5 タンパク質・リガンド相互作用研究における NMRの更に進んだ活用法~タンパク質・リガンド相互 作用の結合モードやファーマコフォアの決定

#### 5.1 DIRECTION<sup>14)</sup>

さて,これまでに紹介した溶液 NMR の実験法では, 標的タンパク質との相互作用のあり/なしを判定する のには有効であるが,化合物のどの原子団が標的タン パク質と接触しているのかという,分子認識に重要な 情報を得ることができないという欠点がある.in-silico スクリーニングにより標的タンパク質に結合しうるシ ーズ分子を発見したならば,医薬品合成化学の手法に より化合物展開を行って,よりアフィニティーの高い 化合物を創出するのが次のステップである.化合物展 開を行うためには,シーズ分子を鍵部分構造(=ファー マコフォア)と可変部に暫定的に分類しなければなら ない.NMR 法を用いて,このファーマコフォアを推定 する方法論が,いくつか提案されている.DIRECTION 法は,水越らが開発した,単純かつ定量性の高い方法で ある<sup>14)</sup>.具体的には,標的タンパク質の<sup>1</sup>H スピン磁化 をあらかじめ励起により飽和したときと飽和していな い時で,リガンド分子の<sup>1</sup>H スピンの T<sub>1</sub>緩和時間(縦 緩和時間)を比較する方法である.これによりリガンド 分子の特定部分のみが標的タンパク質のポケットに結 合している場合の判別や,ドッキングにより得られた 複合体構造の評価が可能である.

#### 5.2 INPHARMA<sup>15)</sup>

Carlomagno らが開発した INPHARMA の方法論も また、リガンドの化学構造からファーマコフォアを推 定するのに役立つ<sup>15)</sup>. この方法は, タンパク質の<sup>1</sup>H 磁 化を飽和移動によりタンパク質に結合したリガンドに 移して観測するという点では、waterLOGSY と原理が 共通している.しかし,最初にタンパク質の磁化を飽和 する際に,溶媒の水ではなく,標的タンパク質に対する 既知のリガンドの<sup>1</sup>Hを励起して,標的タンパク質の結 合ポケット周辺にのみ磁化のラベリングを行うところ が、他法と大きく違う点である(図1D). INPHARMA 法の最大の特徴は、一つの標的タンパク質に対して、同 じポケットを競合する二種類のリガンドを加えて、そ のリガンド間の見かけ上の分子間 NOE を観測するこ とである. Carlomagno らは, tubulin 阻害剤の系に対 し, 既知リガンドである baccatin III からの磁化移動を 利用して,新規天然物リガンド Epothilone A のファー マコフォアを決定した 15). INPHARMA の利用は,特 に複合体の立体構造が既に知られている既知リガンド が存在する場合に, in-silico スクリーニングやドッキン グ実験で予測された結果の検証に用いることができる.

6 実験例~筆者の研究室での取組み

6.1 バイオインフォマティクスの検証法としてのNMR 法の利用

前述のように、NMR 法は特に in-silico スクリーニン グで候補化合物が絞り込まれた後のタンパク質・リガ ンド相互作用の検証法として優れている.これまでに 筆者は、以前所属していた研究室で、東北大学木下賢吾 教授と共同研究を行い、新規に開発されたタンパク質・ リガンド相互作用予測法について、その予測結果の半 網羅的検証を溶液NMR法にて行った.その時の経験 を紹介する.

まず,名古屋大学の太田が主導して,ヒトゲノム中の

全遺伝子産物について、網羅的に立体構造モデルを構 築し、相互作用と酵素活性についてアノテーションを 施したデータベース SAHG (Structural Atlas of Human Genome)を構築した<sup>16)</sup>. その際,実験的に決定 された立体構造のみならず、一定の確度でモデリング された構造に対して、機能予測の一環として結合する 低分子の半網羅的予測を実施した.アルゴリズムには、 木下らが開発した eF-seek を用いた 17). これはタンパ ク質表面を比較することで、既知のリガンドに結合し ている類似表面を探すことで、新規の分子間相互作用 を予測する. 最後に, 筆者らが, その解析結果の一部に ついて、NMRにより検証した.詳細は割愛するが、筆 者らは、eF-Seek が予測したタンパク質・リガンド相互 作用のうち、PDZ ドメインに着目して検証実験を進め た. PDZ ドメインは、主に膜タンパク質の C 末端を認 識してタンパク質ータンパク質相互作用に関わる 100 アミノ酸程度からなる球状ドメインである(図2).検 証対象となった14個のヒトのPDZドメインについて, 大腸菌発現系を構築して安定同位体標識試料とした. 筆者の研究室が既に保有していた 2 個のマウス由来の PDZ ドメイン発現系と合わせ、16 個の PDZ ドメイン について、予測された 23 種のリガンドのうち入手可能 でかつ十分な溶解度があるリガンド3種を除外し、10 種を検証するリガンドとした(図2b).これらを掛け 合わせ,160 個の相互作用を総当たりで NMR 測定によ り検証した. 10種のリガンドを,水溶性のもの(カク テル1) とそれ以外(カクテル2) に分けて, 2 セッ トの NMR 実験を行った. 当初、相互作用の検出は, WaterLOGSY を試したが、相互作用の有無が判別しに くいケースが多かった. そこでタンパク質ベースの実 験に切り替えたところ、カクテル1または2を添加し たときに、 計 8 種類の PDZ ドメインで <sup>15</sup>N-<sup>1</sup>H 二次 元 NMR スペクトルに変化が見られた. さらに個別の 化合物との相互作用の有無を精査することで、PDZ ド メイン相互作用する化合物として 3 種類の化合物を同 定することができた.結合したリガンドには非ステロ イド性抗炎症薬であるジクロフェナクが含まれており (図2c)、本結果は、当該化合物のの副作用、たとえ ば粘膜障害について、その機構を解明する新たな知見 を与えた 18).

**6.2** NMR 滴定実験から求めた in-silico スクリー ニングの性能評価指標の導入とその応用

医薬品候補化合物の in-silico スクリーニングにおい て、標的タンパク質の構造の選択、ドッキングアルゴリ ズムの選択、および VS 時のパラメータの選択が、その 性能に大きく影響を与えることが知られている. ほと んどの in-silico スクリーニングにおいて、得られた化

合物のドッキングスコアと、実際の KDの相関は、必ず しも高くない. しかしそこに全く相関がないというわ けでもないはずである. そこで筆者らは、測定が容易な、 化合物添加時のタンパク質の NMR 化学シフトの変化 量を化合物の Kd に代わる指標として用いることとし て、異なるパラメータで実施された in-silico スクリー ニングのドッキングスコアとの相関を見ることとした. 今回定義したドッキング性能指標とは、in-silico スクリ ーニングを行った際のヒット化合物のランキングと、 実際の化合物の Kd ないし試験管内活性のランキング との一致度の指標である. ソフトウェア GOLD はあら かじめ備わっているドッキングの評価関数の組合せが 計 16 種類ある. 今回は、そのうちの 9 種類について、 NMR ドッキング性能指標を算出した.標的タンパク質 にはヒト dishevelled-1 (Dvl1)の PDZ ドメインを用い た.

細胞内タンパク質 Dvl1 は、DIX-PDZ-DEP の 3 つの ドメインを有し、Wnt シグナル伝達系の下流で働く鍵 分子の一つである. Wnt シグナル伝達系は細胞増殖を 正に制御し、細胞の分化を抑制するシグナル伝達系で、 多くのがん細胞において活性化している.特に、既存の 制がん剤の効きにくいトリプルネガティブ乳がんや大 腸がんなどで、抗がん剤開発の標的シグナル伝達系と して注目を集めている.筆者らは、先行研究である、米・ セントジュード小児病院の Zhang らが報告した Dvl の PDZ ドメインの阻害剤である Calbiochem 322338<sup>19)</sup> とその類似化合物 17 個について、ソフトウェア GOLD 20)によるドッキングを行い、別途 18 化合物の NMR 滴 定実験から求めた正規化された化学シフト移動度を最 もよく再現した GOLD ドッキング実験の評価関数を定 めた. 指標が最も良かった GOLD ドッキング評価関数 を選び、共通のファーマコフォアを有する約5400種類 の化合物を含むフォーカストライブラリから、新たに バーチャルスクリーニングを行ったところ、基準化合 物である Calbiochem 322338 よりも高いスコアを示す 化合物が更に1700個ちかくあることがわかった.その うち、ほぼトップスコアを示す化合物を実際に NMR 滴 定実験で検証し、Calbiochem 322338 や既に我々が取 得していた化合物よりも明らかに強く Dvl-PDZ に結合 すると考えられる3種の新規化合物を、少ない試行回 数で得ることができた(特許出願準備中).

このように、GOLD は最近の他社製ドッキングソフト ウェア、Glide や OpenEye 社 FRED、Autodock-VINA などに比べて、必ずしも高いベンチマーク成績を出し ているわけではない.しかし、ドッキング時に調整可能 なパラメータや評価関数の種別を適切に選択すること で、更に高いヒットレートを実現することができた.

#### おわりに

以上のように NMR 法は, in-silico スクリーニングと組 み合わせることで,多数の化合物を用いたハイスルー プットスクリーニングを代替しうる,ヒット率の高い 医薬品探索法として,また,医薬品化学における化合物 展開の基盤情報を与えるツールとして,幅広く活用が 可能である.一つの問題点は,こうしたタンパク質・リ ガンド混合物の測定に向いた NMR 装置を維持し管理 するインフラの整備である.研究開発資金が潤沢な企 業でもない限り,タンパク質・リガンド相互作用解析専 用の NMR 装置を維持しつづけることは困難であるこ とを考えると,文部科学省の先端研究基盤共用促進事 業のような,アカデミアを中心としたオープンイノベ ーション拠点の一層の整備が望まれる.

#### 文献

- 1. 竹腰清乃理 「新物質科学ライブラリ16 磁気共鳴-NMR-核スピンの分光学」(サイエンス社: 2012).
- 2. 佐藤一,他,日本分光学会編 「分光測定入門シリ ーズ8 核磁気共鳴分光法」(講談社サイエンティフ ィク:2009).
- Dalvit, C. Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc. 51, 243–271 (2007).
- Tanio, M., Tanaka, T. & Kohno, T. *Anal. Biochem.* 373, 164–166 (2008).
- Sugiki, T., Shimada, I. & Takahashi, H. J. Biomol. NMR 42, 159–162 (2008).
- 6. Meola, A. et al. J. Struct. Biol. 188, 71–78 (2014).
- Ohki, S., Dohi, K., Tamai, A., Takeuchi, M. & Mori, M. J. Biomol. NMR 42, 271–277 (2008).
- Viegas, A., Manso, J., Nobrega, F.L. & Cabrita, E.J. *J. Chem. Educ.* 88, 990–994 (2011).
- Dalvit, C., Fogliatto, G., Stewart, a, Veronesi, M. & Stockman, B. J. Biomol. NMR 21, 349–59 (2001).
- Chen, A. & Shapiro, M.J. Anal. Chem. 71, 669A– 675A (1999).
- 11. 早水紀久子 「PGSE-NMRによる拡散測定手引き書-第三版」(2015).at <http://diffusion-nmr.jp/>
- 12. Shimada, I. *Methods Enzymol.* **394**, 483–506 (2005).
- 13. Shimada, I. et al. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **54**, 123–140 (2009).
- Mizukoshi, Y. et al. Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 51, 1362–5 (2012).
- Sánchez-Pedregal, V.M. et al. Angew. Chemie -Int. Ed. 44, 4172–4175 (2005).
- Motono, C. et al. Nucleic Acids Res. 39, D487-493 (2011).
- 17. Kinoshita, K., Murakami, Y. & Nakamura, H. *Nucleic Acids Res.* **35**, W398-402 (2007).
- 18. Tenno, T. et al. *Molecules* 18, 9567–81 (2013).
- Grandy, D. et al. J. Biol. Chem. 284, 16256–16263 (2009).
- Verdonk, M.L., Cole, J.C., Hartshorn, M.J., Murray, C.W. & Taylor, R.D. *Proteins* 52, 609–623 (2003).







ドッキングによる新規Dvl 阻害剤探索 NMR-derived DPIの導入と利用

タンパク質ーリガンド・ドッキングソフトウェアGOLD Suite 5.2に よるドッキング

GOLDで使用した評価関数 ChemPLP Goldscoore · Chemscore

Consensus Scoring: 1つのドッキングに2つ の評価関数でドッキング結果を評価し、各 スコアを標準化した後、高い方のスコアを 採用する方法

**DPI**: Docking Performance Index を用いて評価関数を数値化

各化合物について、ドッキングの結果を「d」、NMR 滴定実験の結果を「n」とし、この差を二乗した値の 総和を平方する





f(Goldscore, Chemscore)

DPI=0.84



Ó

2 - 2

 $\Theta_2 - {}^1H$  (ppm

ò

4 8

ω<sub>2</sub> - <sup>1</sup>Η (ppm

## NMR から見たアミロイド $\beta$ ペプチドの線維 化機構解析

#### **唐明秀一**<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> 東海国立大学機構名古屋大学·大学院創薬科学研究科·構造分子薬理学分野 <sup>2</sup> 合同会社 BeCellBar

#### 1. アミロイド仮説と修正アミロイド仮説

2021年6月に、アミロイド $\beta$ ペプチド(A $\beta$ )の可溶性 オリゴマーに結合する組換え型ヒト IgG 抗体医薬品ア デュカヌマブが、米国食品医薬品局 (FDA)によりアル ツハイマー型認知症 (Alzheimer's dementia, AD) 治療薬 として認可された.これまで多くの抗 A $\beta$  抗体の医薬 品開発が失敗したなか、1:10,000 の特異性で A $\beta$  単量 体よりも可溶性オリゴマーに結合するアデュカヌマブ の承認は快挙と言える [1].その結果、AD 発症原因 としての創薬標的としての A $\beta$  オリゴマーならびにア ミロイド線維の構造多型性が改めて注目されつつあ る.

AD はアロイス・アルツハイマーが1906年にドイツ で報告した進行性の認知症で,大脳皮質における神経 細胞の減少、大脳の萎縮と老人斑とよばれるシミ様の 沈着斑,神経細胞内の神経原線維の蓄積,などの所見 を特徴としている.このうち老人班からはアミロイド 線維と呼ばれる Aβ の不溶性凝集体が発見された. Aβ は40または42アミノ酸(それぞれ Aβ(1-40), Aβ(1-42) と記載する)の凝集性の高いペプチドであ る.シナプス形成・修復に関わるアミロイド前駆体タ ンパク質 APP からプロセシングにより切り出されてく る. なお AB(1-40) が形成する溶解度の低い凝集体は, 脳アミロイドアンギオパチー (cerebral amyloid angiopathy, CAA) という脳内毛細血管の出血, 脳梗塞や 白質脳症を伴う疾病の原因分子でもある. AD と CAA のいずれにおいても,アミロイド線維と呼ばれる繊維 状の凝集体を含む Aβ の多量体の形成が,病気の発 症,進行や重篤性に関わっているとされていた.これ が初期のアミロイド仮説である.いくつかの家族性

AD の家系から APP 遺伝子の変異が発見されたことも あり,この仮説には一定の説得力があった.

しかし試験管内の Aβ 研究が進むにつれ,形成され たアミロイド線維の溶解度が低く血流中に拡散しにく いため,初期のアミロイド仮説では, AD の神経細胞 死を完全には説明できなかった.その後 globulomer

[2], ADDL [3], ASPD [4] といった分子量が小さく可 溶性,拡散性かつ高毒性を持つオリゴマーが多数発見 されるに至り,毒性オリゴマー仮説ないし修正アミロ イド仮説として認知されつつある(図1)[5,6].

アミロイド仮説ならびに修正アミロイド仮説の研究 を進めるにあたり、NMR法の果たしてきた役割は大き い.近年のクライオ電子顕微鏡による単粒子解析の高 分解能化が達成されるまで,凝集性が高く単結晶が得 られにくい Aβ 線維の精密原子モデル構築は固体NMR 法の独壇場であった.一方で水溶液中では高い構造揺 らぎを有していると考えられている AB モノマーや, 界面活性剤存在下などの特殊な条件でのみ観測される 安定な AB の2量体・3量体などの構造解析には,安 定同位体標識を用いた溶液NMR法が大きく貢献した. ただし、修正アミロイド仮説の登場により分子病態解 明の本命と目されている毒性オリゴマーについては, 低分解能の電子顕微鏡像が知られているのみで、精密 な構造情報は未だ得られていない.現在多くの研究者 が、これら毒性オリゴマーはアミロイド線維が伸長す るための凝集核とは別の構造体であり、凝集のための 中間体ではないと考えられている.そのため,毒性オ リゴマーの形成阻害や排出が,新たな AD 治療薬の創 薬戦略として注目されている.

#### 2. 固体NMRが明らかにしたアミロイド線維の構造

これまで,試験管内の凝集実験からは, Aβ 線維の 形成最初期に,数分子からなる凝集核が形成され,そ こに単量体 Aβ が付加して伸長していく核依存的凝集 過程であることが提案されていた.固体NMR研究者 は,由来の異なる Aβ 線維試料のスペクトルの違いか ら, Aβ 線維の構造多型の存在を予見していた.更 に,一度形成させた線維を超音波などで破断し,そこ に新規にモノマーを添加して重合させるという破断と



図1 修正アミロイド仮説に関連した NMR で観察可能な Aβ ペプチドのオ リゴマーと線維形成の過程.溶液中では速い交換(①)のもと Aβ モノマ ーは複数の局所構造エレメント(模式図中の矢印はβストランドを、シリ ンダーはαヘリックスを表す)をとる.それは異なる経路で線維形成の凝 集核または線維伸長には関係しないオリゴマーをゆっくりと形成すると考 えられており(②),凝集核から線維伸長が起こる(④).オリゴマーの 中に高毒性の分子種があり,それが神経細胞死を誘導する,というのが最 新の修正アミロイド仮説である.

成長のプロセスを複数回繰り返し,多型性の少ない試料調製の方法も確立された.この手法を AD 患者の脳 由来試料に適用することで,臨床検体由来の線維に 特徴的な多型が明らかになった [7].図2はこれまで PDB に登録されている Aβ 線維と単量体の固体・溶液 NMRおよび電子顕微鏡構造から,特徴的なパッキング を有する構造を抜粋した.また,図 2D のみは,2回 対称軸のあるモノマー分子内と分子間での複雑なパッ キングがわかるように側鎖を図解した.

構造中では A $\beta$ の主鎖が形成する長い1本の $\beta$ スト ランドが上下方向に大きく湾曲し,分子内では側鎖間 の密な疎水的相互作用が,その特徴的な分子構造を固 定している.こうして構成された A $\beta$ の2分子ないし 3分子からなる層が,繰り返して積層し,アミロイド 線維の特徴であるクロス $\beta$ 構造として分子層間で平行  $\beta$ シートを形成している点が共通している.しかし興 味深いことに多型間で共通する側鎖間相互作用はな い.このような構造の形成過程は,線維の第1~3層 からなる凝集核を鋳型として,線維構造が伸長してい くというモデルによってのみ説明可能である.また, これらの結果から, A $\beta$ の二量体を基本構造とするも のと三量体を基本構造とするものの少なくとも二系統 が存在することが明らかになった.

#### 3. 溶液NMRから見た Aβ モノマーの構造

それではこうした Aβ 線維を作る「原料」であるモ

ノマーの溶液構造はどのように なっているであろうか?この疑 間に適した手法が溶液NMR法で ある.溶液NMR法は,解析可能 な分子量の上限があるという点 で,Aβ線維やオリゴマーの解 析には向かないものの,安定同 位体標識と組み合わせること で,水溶液中のみならず有機溶 媒や界面活性剤中での分子の立 体構造や平衡状態を捉えること が可能である.2021年6月の時 点で,PDBには15を超える Aβ モノマー(Aβ(1-40),Aβ(1-42) お

よびそれらの部分ペプチドを含む)のNMR構造のエントリーがあり,その9割以上は分子全体ないし分子中央部分にαヘリックス構造を含むバラエティに富んだ構造群をなしている(図2E

~G).ただし単にリボン図を眺めるだけではなくそ れぞれの測定条件を精査すると、 ヘキサフルオロイソ プロパノール (HFIP) を含む溶媒やドデシル硫酸ナトリ ウムなどのミセル中の溶液構造が多い一方で、中性・ 生理的条件に近い構造の決定例は少ない.なお HFIP は ペプチド化学で良く用いられる α ヘリックスの強力な 誘起剤である.また生理的条件に近い中性付近の水系 緩衝液中で AB の CD スペクトルを測定すると,  $\alpha \sim$ リックスを含まないランダムコイル様スペクトルが再 現よく観察されるため, αヘリックスを主体とした多 くのNMR構造との整合性は低い.数少ない水系溶媒で の溶液構造の PDB エントリーは, 1HZ3 (図2E)と **2LFM** (図 **2G**) だけであり,後者は分子中央に短い ヘリックスを含むもののNとC両末端は大きくディス オーダーしている.水溶液中の Aβ(1-42) のアミド基の 1HNMR 化学シフトが天然変性タンパク質に典型的な 領域 (7.5 ~ 8.5ppm) に観測されることと併せても, Aβ は分子全体で安定なコンパクトな立体構造はとっ ていないと考えるのが妥当である.

なお DPC ミセル中の溶液NMRによる構造解析では, Aβ が形成する  $\beta$  ヘアピン 2 分子と, Aβ 分子の半分 で形成された 1 本の  $\beta$  ストランド 2 分子が組み合わさ れた 4 量体構造が観察されている(図 2H).他の知 見とも合わせると,以下のような線維化の初期過程が 予想される.すなわち (1) ランダムコイルまたは一部



図 2 固体 NMR • クライオ電子顕微鏡 • 溶液 NMR で決定されたアミロイド線維及びは Aβ 単量体の構造. A, PDB code: 2LMN, Aβ (1-40), 固体 NMR, B, PDB: 2LMQ, Aβ (1-40), 固体 NMR, 3 回対称軸を持つ珍しい構造, C, PDB: 60C9, Ser8 がリン酸化された Aβ (1-40), 固体 NMR, D, PDB: 6SHS, アルツハイマー病患者脳から抽出された線維 を核として再形成された Aβ (1-42), クライオ電子顕微鏡による単粒子解析. E, PDB: 1HZ3, Aβ (10-35), 中性水 溶液, F, PDB: 1IYT, Aβ (1-42), 80% HFIP 中, よくMD計算に用いられる, G, PDB: 2LFM, Aβ (1-40), 中性リン酸緩衝 液中, H, PDB: 6rhy, DPC ミセル中の 4 量体構造.

ヘリックスを含む Aβ が脂質膜上などで集積し,(2)β ヘアピンへと構造転移を起こし,(3) それがさらに分 子間のクロスβストランド構造へと変化する.それが (4) 凝集核となりアミロイド線維が伸長するのではな いか,という機構であり,その検証が待たれている.

#### 4.Aβ 阻害剤探索,その現状と展望

以上のように、 Aβ 単量体は生理的条件の水溶液中 で天然変性タンパク質であり、毒性オリゴマー形成や 線維伸長の核形成の形成に先立ち特定のコンフォメー ションに固定される必要がある.そのため、この構造 転移を阻害する低分子化合物の探索が古くから試みら れてきた.しかし明確な薬剤結合ポケットを持たない Aβ は、鍵と鍵穴を想定した従来の創薬スキームが適 用しにくく、現時点でも高活性の阻害剤は見出されて いない.

筆者らは <sup>15</sup>N 標識した Aβ(1-42) の二次元NMRスペク トルの変化を指標に,凝集阻害活性が報告されている ポリフェノール類とオスモライト(糖類)の評価を行 った.トレハロース・スクロースなどの糖類を高濃度 に添加した溶液中と,生理条件の緩衝液中とでは Aβ(1-42)の取りうる構造アンサンブルがごくわずか変 化する.高濃度オスモライトは実際に核形成を阻害 し,最終的に線維形成を阻害すると考えられている. 他方, クルクミンや EGCG といったフェノール性の食 品成分は、トレハロースやスクロースと異なり、はる かに低い濃度で Aβ(1-42) の線維化を抑制する. ほぼ同 等の条件で, Aβ(1-42)のアミド基の化学シフトが変化 するが、その変化は高濃度オスモライトが与えるそれ とは異なっていた. また, NMR測定濃度・条件の Aβ(1-42) は 5 ℃では長時間にわたり単量体状態を保っ ているが,37℃に昇温すると速やかに白濁を始めると ともにアミド基の化学シフトにも変化が現れ、その構 造アンサンブルが変化したと推測された.そこでNMR で観測されたこれらのわずかな化学シフト変化を可視 化すべく,2次元NMRシグナルの化学シフトそのもの を主成分分析することで,アミロイド形成阻害の機構 の分類を試みた(図3)[8].通常の創薬標的と候補 薬剤によるNMR滴定実験は化学シフト変化の大きさを 色別に立体構造上にマップする表示法が一般的である (図3破線より上).しかしこの方法は化合物の結合 に伴い標的タンパク質の構造が変化しないことが大前 提であり, 天然変性タンパク質である AB の系には利 用できない.一方で,標的が天然変性タンパク質であ る場合は、化合物や溶媒成分が、標的分子の複数の過 渡的な局所構造間の平衡状態に影響を与えることにな る(図3破線より下).主成分分析は,化学シフトマ ッピングにかわる方法であると期待している.

#### 5.おわりに

世界的な高齢化 社会の進行に伴 い,我が国のみな らず中国,欧州, 米国でも、認知症 の治療と予防は喫 緊の社会的課題と なりつつある.し かし AD の発症機 序については修正 アミロイド仮説の 他にも, Tau 仮 説,歯周病菌原因 説など、多くの仮 説が乱立し,創薬 戦略が確定しづら い.アデュカヌマ ブの承認は朗報だ が、抗体療法が高 価であることを考



図3 rigid な標的タンパク質に対する NMR 医薬品スクリーニング [破線より上]と天 然変性タンパク質を標的とした NMR スクリーニング [破線より下]の違い. 化合物の結 合に伴い rigid な創薬標的はその立体構造をほとんど変化しない. 化合物の添加により 例えば<sup>1</sup>H-1<sup>5</sup>N 2次元 NMR スペクトルのアミド基シグナルは変化するが, その変化は化合 物の接近による影響のみと解釈可能なため,変化量を立体構造上にマッピングすること で結合部位が可視化できる(右上). 標的が天然変性タンパク質の場合は, 化合物の直 接結合のみならず化合物による液性条件のわずかな変化でも, 異なる局所構造間の平衡 状態が変化しやすい, そのような平衡状態の変化も NMR スペクトルに顕れるが, それを 単一の立体構造上にマッピングするのは適切とは言えない.

えると、低分子治療薬の開発は急務である.しかし溶 解度の低さ・凝集性の高さから Aβ(1-42) やそのオリゴ マー試料の取り扱いは困難であり、前述のように Aβ 毒性オリゴマーの立体構造は未だ解明されていない. クライオ電子顕微鏡法の長足の進歩,1.2GHzを超える 超高磁場高感度NMRの実用化など、新規技術が今後の Aβ 研究に積極的に活用されることを期待したい.

文 献

- J. Sevigny. *et el.* Nature. 537 (2016) 50–6. DOI: 10.1038/nature19323.
- [2] S. Barghorn, et el. J. Neurochem. 95 (2005) 834–847. DOI: 10.1111/j.1471-4159.2005.03407.x.
- M.P. Lambert. *et el.* Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 95 (1998) 6448–53. DOI: 10.1073/pnas.95.11.6448.
- M. Hoshi. *et el.* Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 100 (2003) 6370–6375. DOI: 10.1073/pnas.1237107100.
- Y. Shigemitsu, H. Hiroaki, J. Biochem. 163 (2018) 11–18. DOI: 10.1093/jb/mvx056.
- [6] P.H. Nguyen. *et el.* Chem. Rev. 121 (2021) 2545–2647. DOI: 10.1021/acs.chemrev.0c01122.
- [7] M. Kollmer. *et el.* Nat. Commun. 10 (2019) 4760. DOI: 10.1038/s41467-019-12683-8.
- [8] N. Iwaya. et el. Arch. Biochem. Biophys. 690 (2020) 108446. DOI: 10.1016/j.abb.2020.108446.



hiroaki.hidekazu@f.mbox.nagoya-u.ac.jp http://presat-vector.org/hiroaki-lab/ 天然変性タンパク質と創薬

Strategy of drug discovery targeting intrinsically disordered proteins



**廣明秀一** Hidekazu HIROAKI 東海国立大学機構名古屋大学創薬科学研究科構造分子薬理学分野

天然変性タンパク質(●IDP)を積極的に創薬標的とした、いわゆる IDP 創薬という創薬上の概念を耳にす る機会が増えた.これは、世界的に画期的な新薬を創出するためのコストが上がり、ハイスループットスク リーニングなどの古典的創薬手法が有効な新薬の標的が枯渇しつつあることが背景にある.生理的条件下で コンパクトな立体構造を持たない● IDP は、低分子薬剤が強固に結合するポケットを持たないため、長らく 創薬標的として適さないと考えられてきた.しかし、● IDP の細胞内機能を理解することで、徐々に新しい 医薬品探索の成功例がでてきた.

Keywords

液-液相分離(●LLPS),構造アンサンブル,毒性オリゴマー,●フォールディングと共役した結合(coupled folding and binding)

生物のゲノム中には、生体内で特定のコンパク トな立体構造をとらない天然変性タンパク質 (intrinsically disordered proteins: IDP)が多数 コードされていることが知られている. IDPの "立体構造を●●持たない"という性質には、"配 列→フォールディング→分子認識→特異的機能" という構造生物学のセントラルドグマに反してい るように見える.本稿では、ゲノムにコードされ ているタンパク質のうち、全長が天然変性状態で ある遺伝子産物を IDP とよび、一方、ポリペプチ ド鎖の一部が天然変性状態である場合はその領域 を天然変性領域(intrinsically disordered region: IDR)とよぶことにする.

IDP を標的とした創薬,通称 IDP 創薬という概 念の重要性が創薬関係者の意識に上がりはじめた 経緯としては,Eroom の法則でも知られるよう に,古典的創薬手法が有効な新薬の標的が枯渇し つつあることが背景にある<sup>1)</sup>.すなわち,創薬の トレンドは酵素や受容体,チャネルなどの典型的 な創薬標的から離れつつあるように見える.ポス トゲノム時代におけるバイオインフォマティクス は進歩により,パスウェイ解析や相互作用ネット ワーク解析から,新規の創薬標的を見つける試み がなされた.後述するように,IDP は相互作用 ネットワークのハブに表れやすいため、新たに提 案された創薬標的候補に IDR が含まれる可能性 は必然的に高くなる.他方、とくにアルツハイ マー型認知症(● Alzheimer's dementia : AD)や パーキンソン病(● Parkinson's disease : PD)な ど治療満足度の低い神経変性疾患では、タンパク 質異常凝集体に対する分子標的薬の研究開発が以 前より粛々と続けられてきた.そのため、これら 2つの流れを統合して、IDR を含む標的に対する 汎用性の高い創薬理論が確立できれば、創薬戦略 の自由度はますます高まる.そこで、創薬戦略を 考えるうえで基本となる IDP/IDR の固有の物性 に基づいた分子機能について整理してみたい(図 1)<sup>23)</sup>.

## タンパク質間相互作用(●PPI),短いリニ アモチーフ(SLiM)とプロテアンセグメン ト(ProS)

IDR の多くは、それが含まれるポリペプチド鎖 のなかで、構造内部に埋もれることなく表面に露 出していることが多い。そのため、ほかのタンパ ク質間での相互作用(protein-protein interaction: PPI)のインタフェースの機能を担うことが 多く、鍵となる特定のアミノ酸配列は遺伝的に保

医学のあゆみ Vol. 278 No. 6 2021. 8.7 22129



図 1 天然変性タンパク質(IDP)/●天然変性領域(IDR)が果たす細胞内での分子機 能<sup>23)</sup>

多くのタンパク質はそのポリペプチド鎖内に構造を有するドメインと、ドメイン間をつなぐ IDR からなる. IDR には SLiM や ProS が含まれる (本文参照). それらはパートナータンパク質 に結合することで局所構造が誘起される. IDR の柔軟性により 2 つのドメインは自由に運動で き、近傍の別の分子を捕捉する効率があがる (●● fly casting).

存される傾向が高い.その結果,生理機能に重要 な翻訳後修飾(リン酸化,ユビキチン化,プロテ アーゼによる加水分解)などの標的配列が IDR に 含まれている.こうしたモチーフを短いリニアモ チーフ(short linear motif:SLiM)とよぶ<sup>4)</sup>.また, 単体では構造をとらない IDR の配列の一部が構 造を有するほかのタンパク質ドメインに結合する と,結合に伴い IDR 側にも新規の構造が誘起され る.こうした disorder-order 転移を伴う短い領域 のことを●プロテアンセグメント(protean segment: ProS)と名づけ,その配列と相互作用ネッ トワークの情報を集積したデータベースが IDEAL(● Intrinsically Disordered proteins with Extensive Annotations and Literature)である<sup>5)</sup>.

## フォールディングと共役した結合(coupled folding and binding)と構造アン サンブル

PPIに関わる IDR は、パートナー分子と接触すると結合の進行に伴い立体構造形成が誘起され

る. この現象は coupled folding and binding とよ ばれ, IDP を特徴づける最重要の物理化学的現象 と考えられている。IDPの研究が進むにつれ、 IDP にもまったく二次構造の存在しないランダム コイル状の配列と,長いポリペプチド鎖に短い二 次構造やターンのような局所構造が散在している ものがあることがわかってきた。さらに、IDR に 含まれる局所構造も決して長時間安定なわけでは なく過渡的に形成・消失を繰り返している●もの が多い。IDPの概念が登場する以前は、研究者た ちは PPI を硬く折り畳まれたタンパク質どうしが 形状相補的に結合するという、古典的な"鍵と鍵 穴"モデルで理解しようとしていた。現在, IDP が関与するほとんどの PPI は、●「サイドメモ」 および図2に示すような coupled folding and binding プロセスに従っている<sup>6)</sup>.

## Promiscuousな相互作用・足場タンパク 質とハブ

IDR の特徴のひとつは、同一の作用部位あるい

22130 医学のあゆみ Vol. 278 No. 6 2021. 8. 7



図 2 Coupled folding and bindingを実現する2つの経路

は近接した SLiM が、異なる標的タンパク質と、 異なる親和性・異なる選択性・異なる立体構造で 結合する例が多いということである。単一の SLiM/ProS が、曖昧な分子特異性とあまり強くな い相互作用で複数のパートナーと入れ替わり相互 作用をする例が多数知られている。この相互作用 様式を promiscuous な相互作用とよぶ<sup>3)</sup>. また、 長い IDR のなかに複数の SLiM/ProS が連続して いるケースがあり、立体障害が起こらなければ、 ひとつのタンパク質に複数のタンパク質が同時に 結合することができ、しばしば足場として機能す

## サイドメモ

## Induced fit & conformational selection

IDPがパートナー分子と出会い, 複合体を形成した後に 構造変化が起こる場合, そのメカニズムは "induced fit" とよばれる(図2の●①のプロセス).一方, 結合前に順安 定な局所構造要素が複数存在している場合は, その過程 は "conformational selection" とよばれる(図2の●②の プロセス).分子動力学計算または実験により, この両方 のメカニズムがあることが示された. IDR側の構造誘起が 完了し induced fit が成立するまでには, 弱い相互作用で 互いに接触している過渡的な状態の存在もしばしば観察 される. この過渡的な複合体を遭遇複合体 (encounter complex) とよぶ<sup>71</sup>. る.いずれのケースでも、●タンパク質相互作用 のネットワーク図のなかでは多数の相互作用が集 中するハブとして可視化される.そのため、バイ オインフォマティクス手法により創薬標的を探 索・決定する際に、標的分子の候補として IDP/ IDR が着目されることにつながったのかもしれな い.IDP 創薬の典型的な分子標的である●がん抑 制因子 p53 も、N 末端、C 末端の IDR できわめて 多くのパートナー分子と相互作用をしている.福 地らは、疾患に関与するヒト IDP の多くがハブタ ンパク質として機能し、そうでない IDP に比べ て、結合パートナー数が有意に多いことを示し た<sup>8)</sup>.とくにがん、先天性疾患、生殖器系疾患お よび皮膚●疾患に疾病関連 IDP が多いことがわ かった.

## ●天然変性タンパク質(IDP)が形成する多量体と凝集物(図3)

近年, IDP 同士の多型性のある会合状態(polyphasic linkage)が注目を集めつつある.これまで は, IDR を含むタンパク質の立体構造のゆらぎや 均一性に関して,モノマー状態のポリペプチド鎖 のフォールディング過程を模したそれぞれの状態 の議論が主体であった(図3の最上段に並んだ各 要素).しかし近年,モノマー状態では緻密な構造

医学のあゆみ Vol. 278 No. 6 2021. 8. 7 22131



図 3 IDPが関与する、オリゴマー形成や多量体形成も含めたタンパク質の相図<sup>9)</sup> FD: fully disordered, PD: partially disordered, MG: molten globule, FS: fully structured, TO: toxic oligomer, NTO: non-toxic oligomer, BMC: biomolecular condensate, HG: hydrogel, AP: amorphous precipitate, AF: amyloid fibrils.

のパッキングをしていない分子が、オリゴマーや 多量体を形成したり、"生体分子の凝縮体(biomolecular condensate:BMC)"とよばれる、ほかの 溶液層とは混じりあいにくい液滴を形成すること が明らかになりつつある.図3は、重合している 分子数と、集合体の内部における各分子の局所構 造や相互作用に着目して、これまでの議論を拡張 した"IDPの相図"ともいえる.IDP 創薬では、 それぞれの標的分子の状態遷移の可能性を幅広く 考慮しながら、薬剤探索の戦略を立てる必要があ る<sup>9</sup>.以下に、疾病関連 IDP の分子病態を理解す るうえで重要な凝集状態について解説する.

### **】アミロイド線維(●AF)**

 $A\beta(1-40/1-42, \bullet AD, 脳アミロイドアンギオ$  $パチー), tau(AD およびタウオパチー), <math>\alpha$ -シヌ クレイン( $\bullet$  PD, レビー小体型認知症, 多系統萎 縮症), p53(がん)など, いくつかの IDP は疾患と 強い関連がある.こうした疾患関連 IDP は細胞内 外で毒性●オリゴマー(toxic oligomer:TO), 無 毒性オリゴマー(non-toxic oligomer:NTO), ア ミロイド線維(● amyloid fibrils: AF), アモル ファス状沈殿(amorphous precipitate: AP)●な どの異常な凝集体を形成することが多い. このう ち古くから研究が進んできたのが● AF である. チオフラビンTやコンゴレッドなどの蛍光色素 で染色することで病理学的に観察が容易で, 試験 管内でも形成反応が追跡できる. ● AF を形成す るタンパク質はかならずしも IDP ではなく, 構造 を持ったタンパク質が部分変性し, その箇所が強 力に線維形成を進める例も知られている(免疫グ ロブリン軽鎖がアミロイドを形成する●●漸新世 AL アミロイドーシスなどがある).

アミロイドの特徴は、その構成成分のペプチド 主鎖が分子間でクロスβシート構造を形成して規 則的に線維が伸長することである。その形成初期 には、2分子以上のモノマー種が規則的に配置さ れた"凝集核(seed)"とよばれるオリゴマーが必 須である。その核にモノマーあるいはダイマー分 子種が順次付加していく。この現象は、核形成依 存的プロセスとよばれている。近年、アミロイド 凝集核形成の場として後述する液-液相分離(liq-

22132 医学のあゆみ Vol. 278 No. 6 2021. 8. 7

52



図 4 IDP創薬における化合物による介入の戦略<sup>22)</sup>

uid-loquid phase separation:LLPS)により生じた BMC が注目されている(●●図3の中下段部分)<sup>9,10)</sup>.

創薬標的としてのアミロイドについて注意しな ければならない点は、● AF そのものの溶解度が 低いこと、アミロイド形成が疾病そのものの原因 なのか、それとも疾病が進行したことによる結果 なのかの判別が難しいことである.

## ■ 毒性オリゴマー(●TO)

タンパク質,とくに疾患関連 IDP が形成する異 常凝集体のうち,凝集する分子数が比較的小さ く,凝集体の溶解度が高い分子種で,とくに毒性 が高いオリゴマーが形成されることが知られてい る.このうち最もよく研究されている● TO は,  $A\beta(1-42)$ がおよそ 30 分子集合した球状オリゴ マーであるアミロスフェロイド (amylospheroid : ASPD)であろう.ASPD は,神経細胞あるいはグ リア細胞のゴルジ体で形成されて細胞外に分泌さ れ,近傍の神経細胞をきわめて低い濃度で殺傷す る<sup>11)</sup>.そのメカニズムは●● Na/K-ATPase a3 サブユニットを ASPD が活性化することで神経 細胞内外のナトリウムイオン勾配を乱し,細胞内  $Ca^{2+}$ イオン濃度の異常上昇を経て最終的に神経 細胞死をもたらす<sup>12)</sup>.A $\beta(1-42)$ は凝集する分子 数が異なる別の種類のオリゴマーをすくなくとも 4 種類〔amyloid  $\beta$ -derived diffusible ligands (ADDLs), globulomers, A $\beta$ \*56, A $\beta$ O〕形成 することが知られており, それぞれ毒性発揮のメ カニズムが異なる<sup>13)</sup>.

一方,同じ AD に関連している tau についても, ● TO 形成の報告がある<sup>14)</sup>. さらに興味深いこと に, PD における  $\alpha$ -シヌクレインについても,可 溶性の● TO が Na/K-ATPase  $\alpha$ 3 を介して細胞 死を誘導することが報告された<sup>15)</sup>.

#### ▲液-液相分離(●LLPS)

近年,高濃度のタンパク質水溶液が液相間で相 分離(●LLPS)することで,細胞内でほかの細胞 質部分と区別可能な液滴を形成する現象の研究が 急速に進展しつつある.もともと生体分子●が自 己集合して形成する,ほかとは混じりあわない凝 集物は脂質二重膜のない細胞内小器官(membrane-less organelle)として,たとえば核小体や P-body,●レビー小体など,古くから知られてい た.しかし,特定のタンパク質(単独・複数)やそ れらと RNA の混合物が試験管内でも再現性よく 凝集物を形成することが再確認された 2015 年以 降,細胞研究のひとつの主要ジャンルとなって現 在に至る<sup>16,17)</sup>.LLPS とは生体分子の高濃度凝集

医学のあゆみ Vol. 278 No. 6 2021. 8. 7 22133

標的	対象疾患	化合物名	化学構造式	発見の経緯	作用機序など	文献
p53	がん	RG7388		RD	p53とその分解因子MDM2の相互 作用を阻害することで,核内の活性 型p53濃度を確保すると,がん細胞 はアボトーシスにより死滅する.当初 HTSにより化合物nutlinが発見され, その後,分子デザインによる最適化 が進んだ	25)
		R08994		RD		26)
с-Мус	がん	10058-F4		HTS	IDPであるc-Mycに結合してMAX との複合体形成を阻害する化合物 である.これらの化合物はHTSに	27)
		10074-G5		HTS	よって得られたが,化合物とc-Mys 複合体のNMR構造からVSに発展 した研究も報告されている	28)
EWS/FLI1	がん	YK-4-279		HTS	RNA結合タンパク質EWS (Ewing sarcoma breakpoint region 1)は 別のRNA結合タンパク質FUSおよ びTAF15と類似性があり、細胞内 でプリオン様線維を形成するFET ドメインを有している. 転座により融合したEWS/FLI1も IDPの転写因子であり、がんを誘導 する	29)
		ТК216		RD		30)
Αβ(1-42)	AD	SEN1576		RD	Aβ(1-42)モノマーに対するHTS 結合アッセイで同定されたRS-0406 をもとにデザインされ最適化された. アミロイド形成のみならず毒性オリ	31)
72	C.	NQTrp		RD	ゴマー形成も阻害している可能性がある	32)
a-Syn	PD	ELN484228     VS     シヌクレイン分子動力: を徹底的に行い, MD: 局所構造のポケットを に対するVSで発見され El N484228である。	PD ELN484228 VS シヌクレイン分子動力学計算( を徹底的に行い, MD中に観測 同所構造のポケットを同定して に対するVSで発見された化合 ELN484228である、化学構測	シヌクレイン分子動力学計算(MD) を徹底的に行い,MD中に観測された 局所構造のポケットを同定して,それ に対するVSで発見された化合物が ELN484228である.化学構造類似	33)	
		Fasudil		DRep	性からリポジショニングによりfasudil が発見された	34)

表 1 IDP創業における創業標的と阻害薬の例とその探索方法<sup>9,24)</sup>

HTS:ハイスループットスクリーニング,VS:バーチャルスクリーニング,RD:論理的分子設計,DRep:ドラッグリポジショニング.

物が,溶媒や細胞質のほかの部分から分離する現 象のことである.一方,この過程で分離してきた 凝集物は,BMCや液滴(liquid droplet),コアセ ルベートなどとよばれる.その形成機能として は,鎖状の分子が複数の接触点で隣の分子と分子 の自由度(多型性)を保ったまま相互作用をする (polyphasic linkage)ことであり, IDP が BMC を

22134 医学のあゆみ Vol. 278 No. 6 2021. 8. 7

形成する場合と、IDR を持つマルチドメインタン パク質が形成する場合と、より大きな● AF が BMC 形成に関与する場合などが知られている.

### ■ 分子シールド効果<sup>18)</sup>

これまで紹介してきた IDP の機能は、すべてそ こに含まれる特定の配列モチーフが鍵となる分子

.



#### 図5 IDPを標的とした計算機創薬の流れ

図の上側はすべてを計算機内で行う手法であり、フラグメントベースドマッピング法とよばれている.まず IDP の MD 計算を行い、そのトラジェクトリ解析から、クラスタリングにより代表構造を抽出し、さらにポケット構造を計算機的手法により同定し、最終的にインシリコスクリーニングに利用する. 一方、下側のアプローチは、最初期のシーズ化合物と IDP の混合物の NMR スペクトルに基づいて複合体モデルの構造を得るところが特徴である.

認識に関わるものであった。しかし、いくつかの IDP はタンパク質凝集を抑制したり、変性タンパ ク質のリフォールディングを助けたりする分子 シャペロン様機能を持つ、植物で低温ストレスに 応答して誘導される LEA(● late embryogenesis abundant)タンパク質は、それを発現している植 物の組織や細胞を乾燥や凍結から保護する. LEA タンパク質のひとつであるデヒドリンに含まれる 凍結保護作用に重要なコア配列領域は IDP で あった<sup>19)</sup>. 筆者はヒトゲノム由来 IDP で同様の実 験を行い、デヒドリンとは無関係なヒト IDP にも 同様の凍結保護活性を認めた20). 泊らは、ヒトゲ ノム中からそれ自体は熱に安定で熱水に可溶な IDP であり、ほかのタンパク質の熱変性を防御す る HERO タンパク質という一群のタンパク質を 見出した<sup>21)</sup>. IDP は同じアミノ酸長の球状タンパ ク質に比較して溶液中で衝突断面積が大きいた め、物理的に標的タンパク質同士が接触する際の 隙間に入り込んだ時の効果が大きい. そのため, IDP のアミノ酸配列に依存せず,見かけ上標的分 子どうしが弱く反発しているかのような効果をも たらす、筆者は、この効果こそが分子シールド効

果の機構であると考えている.

#### ■低分子化合物によるIDPへの介入の戦略

●冒頭でも述べたように, IDP を標的とする汎 用性の高い創薬理論の確立が期待されている.し かし, IDP はモノマーから● AF まで, さまざま な形態や異なるサイズの凝集体として存在するた め,単一のアプローチですべての問題点を解決す るのは難しい. Esteban-Martin らは, IDP の状 態に応じて分類された4つの戦略を示した<sup>22)</sup>.図 4 はその4つの戦略に, さらに毒性オリゴマーを 含む系に関する創薬戦略も統合したものである.

●●第1の介入点は, IDP や● TO が, 立体構 造を有する作用標的に結合する際に, その● PPI を阻害することである. この場合,構造を有する 創薬標的の結合部位に対して行うスクリーニング 手法や計算手法が, これまでどおりほぼ利用可能 である. ●●第2の介入ポイントは, IDP に直接 結合する分子を探索することである. ただし, IDP はそもそも特定の立体構造をとらず, 溶液中 で複数の準安定・過渡的な構造のアンサンブルで ある. そのため, IDP 結合薬剤の主目的はアンサ ンブル分布を変化させることになる. ●●第3の 戦略は, アミロイドや● TO の形成を阻害する薬 剤を探索することである. もし標的の IDP が関わ る分子病態のなかに, IDP が● NTO や低毒性の アモルファスの沈殿を形成する経路があるのなら ば, 薬剤によりそちらに積極的に誘導する戦略も ここに含まれる. 第4の戦略は, IDP とそれが作 用する標的分子の複合体が形成された後に起こる 生理学的イベントの下流に介入する医薬品を, 細 胞ベースのアッセイにより探索する方法である.

●●第1の場合と同じく,細胞ベースの創薬スク リーニングで培った従来のノウハウが利用可能で ある.いずれの戦略においても,薬剤は IDP が持 つ構造多型間の平衡状態を移動させ偏らせる.こ うした薬理効果発現のメカニズムが,これまでの "鍵と鍵穴"理論による創薬とは大きく異なる点で あろう.

#### IDP創薬の実例(表 1)

ここで,いくつかの IDP 創薬の実例(表 1),な らびにそれぞれにおける創薬戦略のポイントを解 説して, IDP 創薬の現状と限界について理解を深 めていきたい.

#### ■ p53/MDM2阻害薬

p53 は 393 アミノ酸からなる転写因子であり, がん抑制因子として知られている. DICHOT によ る解析では約 160 残基が IDR である. とくにN末 端の長い IDR がハブとして機能している. p53 は 細胞周期の制御, アポトーシス, DNA 修復, 細 胞ストレス応答に関与する 150 以上の遺伝子発現 をすると同時に, 50 以上のタンパク質と物理的に 相互作用する. p53 は多くの腫瘍で不活性化され ており, ユビキチン化因子 MDM2 が p53 を細胞 内で分解することも p53 不活性化の主要な機構で ある. そのため, p53 のN 末端 IDR と MDM2 の 相互作用を阻害する, ● PPI 阻害薬の開発が盛ん である(表 1).

p53 のもうひとつの特徴は、アミロイド性の凝 集体の形成である.本来、構造を持つ分子中央の DNA 結合ドメイン(コアドメイン)には潜在的に 凝集しやすいセグメントが含まれ、部分変性した p53 コアドメインからそのセグメントが表面に露 出すると自己凝集が開始される.この凝集体には アミロイド染色試薬チオフラビン T 陽性の線維 が含まれる<sup>23)</sup>.がんの原因となる p53 の変異は顕 性の変異であり、変異体 p53 は正常型 p53 も巻き 込んで凝集する.そのため、前述の●● MDM 相 互作用のほかに、コアドメインのアミロイド形成 阻害薬の探索も進められている.

#### ■ c-Myc阻害薬

c-Myc は 439 残基からなる強力ながんドライ バー遺伝子であり、アポトーシス、細胞増殖、分 化、代謝、タンパク質の生合成など、いくつかの 生理的プロセスの中心的な制御因子である。C末 端 90 残基を除いてすべてが IDR であり、そのC 末端も MAX との二量体形成時のみ構造を持ち、 単量体では IDR である。c-Myc はわずか 2 倍の 活性上昇であっても細胞をがん化させることがで き、ヒトのがんのほぼ半分で c-Myc の何らかの 異常な活性上昇がみられる。そのため、c-Myc 単 体、Myc/MAX 複合体いずれもが抗がん剤の標的 となる。天然変性状態の c-Myc に結合して MAX 複合体形成を阻害する化合物が開発されている (表 1).

#### ■ シヌクレイン阻害薬

α-シヌクレインは 140 アミノ酸の小さなタン パク質であり、微小管や細胞膜に結合し、神経細 胞が正常に機能するのに必要なタンパク質であ る.140 残基のうち 102 残基が ProS であるという 特異なタンパク質である。神経細胞やグリアの細 胞質内に α-シヌクレインの線維性凝集体が形成 されることで、多くの神経変性疾患が引き起こさ れる。それらはシヌクレオパチーとよばれてい て、ほかにレビー小体型認知症、多系統萎縮症な どが含まれる。前述のように、ほかの神経細胞を 傷害する● TO を形成するという報告がある<sup>15)</sup>.

#### ■ IDPを標的とした計算機創薬

近年,タンパク質の立体構造に指南された医薬 品設計(structure-guided drug discov-ery/ design:SBDD)の技術進歩が著しい. クライオ電

22136 医学のあゆみ Vol. 278 No. 6 2021. 8. 7

56

子顕微鏡を利用したタンパク質構造の高速決定技 術の進歩と相まって、とくにプロジェクト初期の シード化合物探索と、中期での試験管内活性を指 標にした化合物最適化では、標的タンパク質ポ ケット周辺の精密な座標は、創薬には欠かせない ものとなった. にもかかわらず, IDP を標的とし た創薬における計算科学的手法の利用には大きな 制約があり、これまで、ごく限られたグループし か取り組んでこなかった. その最大の理由は, IDP が生理的条件下では多様な立体構造のサンサ ンブル状態で存在するため、薬剤が結合する可能 性のある"druggable"なポケットがドッキング シミュレーションに適した形では得られないから である.この問題に対して、大きく分けて2つの アプローチが提案されており、一定の成果が得ら れているので以下に紹介する(図5)。

#### ■フラグメントベースドマッピング法

この方法ではまず水を顕わに取り扱い創薬標的 となる IDPの MD 計算を丁寧に行うところからは じまる、得られた構造アンサンブルをクラスター 解析し、場合によっては自由エネルギー地形の解 析も行ったうえで、代表構造(典型的構造)を複数 選択した後、それぞれの代表構造から、ポケット 検出アルゴリズムなどで低分子薬剤が結合可能な ポケットを検出する. ポケットが検出された代表 構造については、従来と同様のインシリコスク リーニングにより、結合する化合物を探索すると いう手法である。この方法そのものの歴史は比較 的古く, 2013 年に Cambridge 大学の Zhu らが, この方法で Aβ(1-42)に結合する物質としてクル クミンとコンゴレッドを同定している<sup>35)</sup>. また前 述のように 2014 年には Tóth らが α-シヌクレイ ンの凝集阻害薬を探索した際にも同様のアプロー チが試された<sup>33)</sup>.これらの先行研究を踏まえて、 北京大学の Lai らはこれまで標的とされていな かった p53の転写活性化ドメインに結合してこれ を直接活性化する低分子化合物の同定に成功して いる36)

フラグメントベースドマッピング法において は,溶媒中での IDP 単量体の MD 計算の精度と構 造探索範囲の広さが鍵となる.こうした要請を反 映して、IDP の MD 計算に特化した力場の改良が 数多く報告されている<sup>37)</sup>.たとえば上海交通大学 の Yang らの改良した OPLS-AA/L 力場の拡張版 である OPLSIDPSFF は多くのモデル IDP のシ ミュレーションで良好な成績を収めている<sup>38)</sup>.

### ■NMR構造解析との併用

"druggable"なポケットの座標を実験的に決定 する有力な手法として注目されているのが溶液 NMRの方法である.前項でも紹介した c-Myc 阻 害薬である 10058-F4 などの化合物は,はじめタ ンパク質問相互作用を指標にした HTS により発 見された後,それを用いて NMR 解析により,複 合体の構造決定がなされ,得られたポケットの座 標に基づき更にインシリコ探索により新規阻害薬 の発見へとつながった<sup>28)</sup>.この方法の欠点は,候 補化合物がまったく見つかっていない新規の創薬 標的 IDP には使えないことである.また, IDP に 結合する化合物の分子数はかならずしも一つでは なく,結合部位も1カ所とは限らないので,実験 系のデザインや NMR データの解釈時にはとくに 注意が必要である.

#### ■ おわりに

表1に例示したように, IDP 創薬は● PPI 阻害 薬の特殊なケースであるといえる。ほかの● PPI 阴害薬と同様に、芳香族環とアミド結合が多く含 まれ、平面性の高い化合物も多い。 IDP 創薬の戦 略1のケースを除けば、IDP には立体構造がない ことが仇となり、バーチャルスクリーニングによ る効率的なシード探索が難しい.他方,もともと 特定の薬剤結合ポケットがないことから、Pan-Assay INterference compoundS(PAINS)とよば れる、どんなスクリーニングにも毎回でてくる非 特異的にタンパク質に結合する化合物群に惑わさ れる可能性が高い、それらを見極める有力な実験 手法として、溶液 NMR を用いて、化合物の添加 に伴う立体構造のアンサンブルの変化を観測する などの計測と組み合わせることで、活路が開ける 可能性がある。今後、LLPS の生物学的研究の進 展とあわせて、ここ数年で新たな IDP 創薬の理論 の確立がなされ、大きく発展する分野となること

医学のあゆみ Vol. 278 No. 6 2021. 8. 7 22137

#### が期待されている.



- 1) Scannell JW et al. Nat Rev Drug Discov 2012;11:191-200.
- 2) 廣明秀一. 再生医療 2015:14:60-1.
- 3) 太田元規·他. 生物物理 2017:57:085-9.
- 4) Dinkel H et al. Nucleic Acids Res 2016;44:D294-300.
- 5) Fukuchi S et al. Nucleic Acids Res 2014;42:D320-5.
- 6) Dyson HJ et al. Curr Opin Struct Biol 2002;12:54-60.
- 7) Sugase K et al. Nature 2007;447:1021-5.
- 8) Anbo H et al. Biomolecules 2019;● 9:88.
- 9) Biesaga M et al. Curr Opin Chem Biol 2021;62:90-100.
- 10) Aguzzi A et al. Trends Cell Biol 2016;26:547-58.
- 11) Noguchi A et al. J Biol Chem 2009;284:32895-905.
- 12) Ohnishi T et al. Proc Natl Acad Sci 2015;112:E4465-74.
- 13) Hoshi M. Br J Pharmacol 2021;178:770-83.
- 14) Lasagna-Reeves CA et al. Mol Neurodegener 2011;6:39.
- 15) Shrivastava AN et al. EMBO J 2015;34:2408-23.
- 16) 白木賢太郎. 相分離生物学. 東京化学同人: 2019.
- 17) 白木賢太郎編. 相分離生物学の全貌. 東京化学同人: 2020.
- 18) Chakrabortee S et al. Mol Biosyst 2012;8:210-9.
- 19) Hughes S et al. Protein Sci 2011;20:42-50.

- 20) Matsuo N et al. Int J Mol Sci 2018;19:401.
- 21) Tsuboyama K et al. PLoS Biol 2020;18:e3000632.
- 22) Fuertes G et al. Perspectives on drug discovery strategies based on IDPs. Intrinsically Disordered Proteins (Nicola Salvi ed). Academic Press;2019, p.275-327.
- 23) Lasagna-Reeves CA et al. Biochem Biophys Res Commun 2013;430:963-8.
- 24) Ruan H et al. Drug Discov Today 2019;● 24(1):217-27.
- 25) Ding Q et al. J Med Chem 2013;56:5979-83.
- 26) Zhang Z et al. Bioorg Med Chem 2014;22:4001-9.
- 27) Huang MJ et al. Exp Hematol 2006;34:1480-9.
- 28) Follis AV et al. Chem Biol 2008;15:1149-55.
- 29) Barber-Rotenberg JS et al. Oncotarget 2012;3:172-82.
- 30) Spriano F et al. Clin Cancer Res 2019;25:5167-76.
- 31) O'Hare E et al. Int J Neuropsychopharmacol 2014;17:117-
- 26.
- 32) Scherzer-Attali R et al. PLoS One 2010;5:e11101.
  33) Tóth GJ et al. PLoS One 2014;9:e87133.
- 33) Ioth GJ et al. PLoS One 2014;9:e87133.
- 34) Tatenhorst L et al. Acta Neuropathol Commun 2016;4:39.
- 35) Zhu M et al. J Chem Phys 2013;139:035101.
- 36) Ruan H et al. Chem Sci 2021;12:3004-16.
- 37) Argudo PG et al. Nanoscale Adv 2021;3:1789-812.
- 38) Yang S et al. J Chem Inf Model 2019;59:4793-805.

\* \* \*

58

## 付録1

## 生物工学基礎講座 バイオよもやま話

## 姿をかえるタンパク質

大腸菌を宿主とした異種タンパク質高発現のイロハ



姿をかえるタンパク質

## 「卵は加熱すると茹で卵になる.これが熱変性だ」高 校生が研究室の見学に来ると、このように説明すること がある.タンパク質変性は生活のいたるところに見いだ される身近な物理現象なのである.興味深い点は、さま ざまな条件のもとで、タンパク質の姿が大きく変化する ところにある.茹で卵は熱変性させた凝集体であるし、 ピータンは卵をpH変性(ここではアルカリ変性)させ た凝集体であるし、メレンゲは卵白を表面変性(もしく は界面変性)させたものである.本稿では、このように さまざまに姿をかえるタンパク質の変性の原理を熱力学 的安定性という視点から紹介したい.取り上げるタンパ ク質変性は熱変性、圧力変性、溶質添加による変性、

#### ギリギリの安定性

pH変性, 界面での変性である. 最後にタンパク質の凝

集にも触れたい.

タンパク質の変性の原理を理解するためには、まずタ ンパク質分子そのものの安定性を理解する必要がある. 熱力学の分野では安定性という言葉は状態間の自由エネ ルギーの差を意味する.つまり、タンパク質の安定性と は立体構造を有した天然状態と立体構造を失った変性状 態の間の自由エネルギーの差である.したがって、熱力 学的には、タンパク質の変性とはすなわち変性状態の自 由エネルギーが天然状態の自由エネルギーを下回ること を意味する.仮に、天然状態の自由エネルギーが増加し たとしても、変性状態の自由エネルギーも同じだけ増加 すれば、結果的にタンパク質は変性しない.このように タンパク質変性の原理を理解するためには状態間の自由 エネルギーの差(ΔG)を正しく理解する必要がある.

タンパク質は分子内の非共有結合によって固有の立体 構造を形成する.タンパク質はこれらの非共有結合に よって、わずか数kcal/mol~数+kcal/molというギリ ギリの安定性(marginal stability)を有している点が興 味深い.

タンパク質の安定性は、水中で疎水性相互作用をする ことで獲得しているといわれることがある. では、水が 存在しない真空中ではタンパク質は不安定なのであろう か? 実は、タンパク質は真空中の方が安定である. 水

## 平野 篤\*・白木 賢太郎

中でのタンパク質のギリギリの安定性は、真空中での大 きな安定性が水和によって失われた結果なのである. そ の証拠として、タンパク質の化学構造の多くの領域が (芳香族側鎖でさえ)水和によって安定化される事実が ある<sup>1)</sup>. 極性基は主として水との水素結合やイオン結合 によって安定化され、芳香族側鎖は主として水とのファ ンデルワールス相互作用によって安定化される.変性状 態は天然状態に比べて溶媒に露出する表面積が広いため に、水和によってより大きく安定化される. その結果, 変性状態と天然状態の安定性の差は縮まり、タンパク質 にはギリギリの安定性が残るのである(図1).言い換え れば、水溶液中でのタンパク質の安定性は疎水性相互作 用によって獲得されたものではなく、分子内の水素結合 やファンデルワールス相互作用に支えられていると考え るべきである. このようなギリギリの安定性が以下で見 るようにさまざまな条件下でのタンパク質の変性をもた らすわけである、それでは、各種のタンパク質変性の仕 組みについてタンパク質の安定性という視点から見てい こう.



図1. 真空中と水中でのタンパク質の熱力学的安定性.  $\Delta G_c \geq \Delta G_w$ はそれぞれ真空中(灰色)と水中(黒色)でのタンパク質の安定性を示している.  $\Delta G_h^N \geq \Delta G_h^D$ はそれぞれ天然状態と変性状態の水和による自由エネルギー変化を示している. 水中のタンパク質の安定性( $\Delta G_w$ )は真空中の安定性( $\Delta G_c$ )に比べて著しく小さい.

\*著者紹介 筑波大学大学院数理物質科学研究科((独)日本学術振興会特別研究員) E-mail: bk200412349@s.bk.tsukuba.ac.jp

#### 熱変性

タンパク質は高温にさらされると変性する.これが熱 変性である.好熱菌に由来するタンパク質などの特殊な タンパク質を除くと、多くのタンパク質は100℃以下で 変性する.タンパク質の安定性の指標である天然状態と 変性状態の自由エネルギー差(ΔG)は、定圧条件下で 次のように記述される<sup>2)</sup>.

$$\Delta G(T) = \Delta H_{\rm m} - \Delta C_{\rm p} \left(T_{\rm m} - T\right) - T \left[\Delta S_{\rm m} + \Delta C_{\rm p} \ln\left(\frac{T}{T_{\rm m}}\right)\right]$$
$$= \Delta H_{\rm m} \left(1 - \frac{T}{T_{\rm m}}\right) - \Delta C_{\rm p} \left[\left(T_{\rm m} - T\right) + T \ln\left(\frac{T}{T_{\rm m}}\right)\right]$$
(1)

ここで、 $\Delta H_{\rm m}$ と $\Delta S_{\rm m}$ はそれぞれ変性温度( $T_{\rm m}$ )にお ける変性のエンタルピー変化とエントロピー変化であ る.  $\Delta C_{\rm p}$ は状態間の定圧熱容量差であり、Tは絶対温度 である.ただし簡単のため、 $\Delta C_{\rm p}$ は温度に依存せずに一 定であると考えた. $\Delta C_{\rm p}$ は常に正なので、 $\Delta G$ には極大 値が存在する(図2).仮に同じ変性温度をもつ2種類の タンパク質を考えた場合、 $\Delta H$ が大きなタンパク質は $\Delta G$ が高くなり(つまり安定化され)、 $\Delta C_{\rm p}$ が大きなタンパク 質は $\Delta G$ が低くなる(つまり不安定化される).

△Gは次のようにも記述される<sup>2)</sup>.

$$\Delta G(T) = \Delta H(T_x) - \Delta C_p (T_x - T) - T \left( \Delta S(T_x) + \Delta C_p \ln \frac{T}{T_x} \right)$$
$$\approx \Delta H(T_x) - T \Delta S(T_x) - \Delta C_p \frac{(T - T_x)^2}{2T}$$
(2)



図2.  $\Delta G$ の温度依存性.  $\Delta H$ の増加によって曲線はaからbへ移る. 一方,  $\Delta C_p$ の増加によって曲線はaからcへ移る.  $\Delta G$ は高温 ( $T_m$ 以上) だけでなく低温でも負になる.

ここで、 $\Delta H$ ,  $\Delta S$ ,  $\Delta C_p$ , Tはそれぞれ状態間のエンタ ルピー差,エントロピー差,定圧熱容量差,絶対温度を あらわす.  $T_x$ は非極性基の水和の寄与が無視できる温 度(110~140°C)である.右辺の第1項は分子内相互 作用のエンタルピー,第2項は構造のエントロピー,そ して第3項は非極性基の水和エネルギーを示しており、 これらのバランスがタンパク質の安定性を支配してい る.第2項が温度に対して線形であることから、高温条 件下でのタンパク質の変性はタンパク質の構造のエント ロピーの増加に起因すると考えられる.

さて、タンパク質は高温で変性するが、低温でも変性 することが知られている(図2).いわゆる低温変性であ る.低温変性はタンパク質の非極性基の水和に起因する と考えられる.確かに式(2)の第3項は温度の低下に従っ て負に大きくなる.つまり、低温では非極性基が水和に よって安定化されるのである.このように、安定化因子 と不安定化因子の寄与のバランスによって、タンパク質 は高温でも低温でも変性する.以上がタンパク質の熱変 性の原理である.

蛇足であるが、タンパク質は真空中では100℃以上で も容易には変性しないし、低温変性はあり得ない.なぜ なら、先に述べたようにタンパク質のギリギリの安定性 は水和によってもたらされるからである(図1).真空中 では水和しえないために、タンパク質の天然構造は広い 温度領域で安定である.

#### 圧力変性

タンパク質は静水圧が加わることでも変性する.しか し、人類が現れるまで、タンパク質は圧力変性を経験し たことがなかっただろう.タンパク質を変性させるために は、マリアナ海溝の海底の1100気圧よりも高い数千気 圧もの静水圧を加えなければならないからである.現在 ではタンパク質の圧力変性が実験的に確かめられている.

等温条件下でのタンパク質の安定性(ΔG)は圧力の 関数として次のように記述される<sup>3</sup>.

$$\Delta G(p) = \Delta G^0 + \Delta V^0 \left( p - p^0 \right) - \frac{\Delta \kappa}{2} \left( p - p^0 \right)^2 \tag{3}$$

ここで、ΔV, Δκ, pはそれぞれ状態間の部分モル体 積差,等温圧縮率差,圧力である.変数の添え字の0は 常温・常圧を意味する.

第3項の等温圧縮率差を含む項は、数千気圧の圧力領 域では、第2項の部分モル体積差の項に比べて十分に小 さいために無視できる.したがって、圧力によるタンパ ク質の変性のおもな原因は天然状態と変性状態の間の部 分モル体積の差(ΔV<sup>0</sup>)にある.多くの球状タンパク質 の天然状態は立体構造の内部に空隙を持ち、変性状態は 天然状態よりも大きな水和体積を持つ.これらの2つの 寄与によって、通常、変性状態は天然状態よりも小さい 部分モル体積を有する.つまり、天然状態と変性状態の 間の負の部分モル体積差が、加圧による変性状態の安定 化に関与するのである.こうして、圧力変性の原理は体 積や圧縮率という「サイズ」に関する物理量で説明され た.圧力変性は大がかりな装置が必要であるために実験 が困難であるが、原理は熱変性よりむしろイメージしや すいのが興味深い.

#### 溶質添加による変性

温度や圧力を変えなくても、溶質を添加することでタ ンパク質の安定性は変化する.なかでもグアニジン塩や 尿素はタンパク質を変性させる性質を持っており、「変 性剤」と呼ばれる.一般に、溶質を添加した溶液中のタ ンパク質の安定性(ΔG)は、タンパク質の構成要素で あるペプチド結合の主鎖とアミノ酸側鎖の安定性を用い て、次のように関係付けられる<sup>4</sup>.

$$\Delta G(c) = \Delta G^0 + \sum \alpha_i n_i \Delta g_{\operatorname{tr},i}(c) \tag{4}$$

ここで、 $\Delta G^0$ は水中でのタンパク質の安定性を示して いる. iはタンパク質の主鎖および各アミノ酸側鎖の種 類を意味している.  $a_i$ は天然状態と変性状態の間のiの 溶媒露出度の差であり、通常は正の値をとる.  $n_i$ はタン パク質に存在するiの残基数であり、 $\Delta g_{t,i}(c)$ は水中から 溶質濃度cの溶液へのiの自由エネルギーの変化量(移 相エネルギー)である. グアニジン塩や尿素などの変性 剤は、主鎖と疎水性アミノ酸側鎖に対する安定化効果 ( $\Delta g_{tr} < 0$ )を有している. つまり、変性剤は天然状態と 変性状態の両者の自由エネルギーを低下させる. いずれ も安定化させるのである.

結局のところ,変性剤によるタンパク質の変性は,天 然状態と変性状態の溶媒露出度の違いに起因する.これ とは対照的に,硫酸アンモニウムなどのいわゆるタンパ ク質結晶化剤の多くは,疎水性基に対する不安定化効果 (Δg<sub>t</sub>>0)を有しており,タンパク質の安定化に寄与する. このように中性塩は種類によってタンパク質を不安定化 させるものから安定化させるものまであり,その一部の 塩はホフマイスター塩として知られている<sup>5</sup>.

アルコールもタンパク質を変性させる働きがある.し かしアルコールがもつタンパク質の変性効果は他の溶液 添加剤と比べて特殊である.アルコール溶液中では、タ ンパク質はα-ヘリックスに富んだ変性構造を作る. 誘 電率の低いアルコールは,容易に推測されるように,疎 水性アミノ酸の側鎖を安定化させる.一方で,アルコー ル溶液中では主鎖は不安定化する<sup>4)</sup>.したがって,アル コール溶液中では,いわゆるランダムコイル状の変性状 態が天然状態よりも不安定になる.こうして,溶媒への 主鎖の露出が少ないα-ヘリックス構造が,アルコール 溶液中でのタンパク質の安定な変性状態になる.

#### pH変性

タンパク質の溶液に塩酸や水酸化ナトリウムなどの酸 や塩基を滴下するとタンパク質は変性する.これがpH 変性である.pH変性のおもな原因として、タンパク質 の荷電アミノ酸側鎖の解離定数が天然状態と変性状態と で大きく異なることが挙げられる.変性状態のタンパク 質の解離基の解離定数は、遊離アミノ酸のそれと同程度 であるが、一方で、天然状態の内部に存在する解離基の 解離定数は他の解離基とイオン結合を形成するために異 常な値を示すことが知られている.天然状態と変性状態 の解離定数の差が結果としてタンパク質の天然状態と変 性状態の自由エネルギーの差( $\Delta G$ )のpH依存性を生み だすのである. $\Delta G$ のpH依存性は次の式で与えられる<sup>4</sup>.

$$\Delta G(\text{pH}) = \Delta G^0 - RT \sum_i \ln \frac{(1+10^{\text{pH}-\text{pK}_a^0})}{(1+10^{\text{pH}-\text{pK}_a^N})}$$
(5)

ここで、 $\Delta G^0$ は解離基が十分にプロトン化された低い pHでのタンパク質の安定性を示している.  $R \ge T$ はそ れぞれ気体定数と絶対温度である.  $pK_{a,i}^{D} \ge pK_{a,i}^{N}$ はそれ ぞれ変性状態と天然状態のタンパク質の解離基iの解離 定数である. タンパク質工学では、天然状態の安定化の ために解離定数の異なる解離基を導入した変異型を作製 することが多い.

#### 界面での変性

気液界面や固液界面でもタンパク質は変性する.タン パク質は疎水性と親水性のアミノ酸残基を有しており, 一種の界面活性剤と見なすことができるだろう.溶液中 のタンパク質が気体や固体の表面に吸着すると,親水性 残基が表面に多く存在する天然状態のタンパク質は水素 結合やイオン結合を形成することができず,自由エネル ギーが増大する.したがって,疎水性領域の界面への露 出がタンパク質の安定化につながる.つまり,界面での タンパク質の変性は,疎水部を露出させた変性状態の自 由エネルギーが天然状態の自由エネルギーを下回ること に起因する. タンパク質は容器などの曲率が小さい固液界面だけで なくナノ粒子の表面にも吸着して変性する.ナノ粒子の 表面へのタンパク質の吸着は毒性と関わると考えられて いる<sup>の</sup>.筆者らも最近,カーボンナノチューブなどのナ ノ粒子の表面へのタンパク質の吸着や,吸着にともなう 変性に注目している<sup>7)</sup>. このように界面でのタンパク質 の変性は界面の性質に強く依存する.ナノ粒子を用いた 材料研究やドラッグ・デリバリー技術の発展にともない, 界面での変性に関する研究はますます重要になっていく だろう.

#### 変性の先にあるもの一凝集

以上でタンパク質のさまざまな変性を見てきた.タン パク質の変性は、変性状態の自由エネルギーが天然状態 の自由エネルギーよりも低くなることに起因するが、変 性状態の自由エネルギーがタンパク質の構造空間の中で いつも最小値になるわけではない.極小値は必ずしも最 小値ではないのである.変性状態よりも低い自由エネル ギーをもつ可能性を有しているのがタンパク質の凝集状 態である.

凝集状態とは変性状態の複数のタンパク質分子が不可 逆に会合した状態をいう.このタンパク質の凝集状態に ついて最後に簡単に触れたい.タンパク質の凝集状態に ついて最後に簡単に触れたい.タンパク質はさまざまな 条件下で変性して凝集する.高温にさらされるとタンパ ク質は熱凝集するし,特殊な条件下ではアミロイド線維 と呼ばれる一次元状の凝集体を形成する.また,界面に 吸着して変性したタンパク質は会合して単分子膜や二分 子膜だけでなく多層膜を形成することもある<sup>8)</sup>.このよ うに,タンパク質の凝集状態は変性状態から続く過程に 存在する安定状態のひとつだといえる.このようにギリ ギリの安定性を持つタンパク質は変性しやすく同時に凝 集しやすいのである.抗体などの不安定なタンパク質を 扱う分野では,今でもタンパク質の凝集の抑制が難しい 課題として残されている.

タンパク質凝集は変性状態が天然状態よりも安定な条件下で観察される会合反応であるが,天然状態が変性状態よりも安定な条件下ではどうだろうか.実際,このような条件下で形成される構造は,タンパク質の結晶や非

晶質沈殿体である.結晶や非晶質沈殿体は,いわば天然 状態を保持した一種の凝集状態である.ただし,天然状 態の会合反応は一般に可逆的であることが多い.ちなみ に,圧力はタンパク質の会合を抑制する場合もあれば, 促進する場合もある<sup>9,10</sup>.

#### おわりに

タンパク質を構成する20種類の天然アミノ酸は、親 疎水性や電荷などさまざまな性質を持つ.このようなア ミノ酸残基の物性が、本稿で述べてきたタンパク質の多 様な構造変化を生み出す.この構造の多様性こそがタン パク質の特徴である.自然の中に見いだされるすべての 分子の中でタンパク質ほど表情豊かで楽しませてくれる ものはないだろう.

本稿では、熱変性、圧力変性、添加剤による変性、 pH変性、界面での変性の原理を熱力学に立脚して述べた.その他に、化学反応によるタンパク質の変性もある が、興味のある方は下記の総説を参照されたい<sup>11)</sup>.こう して、タンパク質の変性や凝集の原理を正しく理解すれ ば、日々実験室で扱っている不安定なタンパク質の取り 扱い方も改善できるかもしれない.たとえそうでなくて も、メレンゲを作るときには、キレイなボウルを忘れず に済むだろう.

#### 文 献

- 1) 永山國昭:生命と物質—生物物理学入門,東京大学出版会 (1999).
- Privalov, P. L. and Gill, S. J.: Adv. Protein Chem., 39, 191 (1988).
- 3) 谷口吉弘:蛋白質核酸酵素, 34, 98 (1989).
- 4) Tanford, C.: Adv. Protein Chem., 24, 1 (1970).
- 5) Pegram, L. M. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 7716 (2010).
- 6) Lynch, I. and Dawson, K. A.: Nano Today, **3**, 40 (2008).
- 7) Hirano, A. et al.: Chem. Eur. J., 16, 12221 (2010).
- 8) 矢野陽子ら: Bunseki kagaku, **59**, 437 (2010).
- 9) 鎌足雄司: 生物物理, 47, 12 (2007)
- 10) Niraula T. N. et al.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 101, 4089 (2004).
- 11) 冨田峻介, 白木賢太郎: J. Jpn. Soc. Extremophiles, 9, 81 (2010).



## 大腸菌を宿主とした異種タンパク質高発現のイロハ

## 東端 啓貴

タンパク質は、リボソームで合成されたポリペプチド が折りたたまれ、その機能を発揮する。タンパク質の折 りたたみには、DnaK系やGroEL系といった分子シャ ペロンの"介添え"を必要とするものもある。また、こ れらの分子シャペロンが変性途中のタンパク質を捕捉し 元の折りたたみ構造へ戻すことでその凝集や不完全な構 造によるプロテアーゼ消化を防いでいる。発現させるタ ンパク質によっては、その特性・宿主への毒性などから 宿主細胞内で封入体を形成したり、あるいはまったく発 現しなかったり、細胞が溶菌してしまうなどの問題が起 こることがある。発現させるタンパク質の用途により封入 体でもよい場合があるが、本稿では、酵素活性などの機 能を保持した状態で発現させることを目的とし、大腸菌 を宿主として異種タンパク質を発現させた場合に、しば しば経験する問題とそれを克服するヒントを紹介したい.

#### pET システムの基本原理

タンパク質の高発現のためによく用いられるのは, T7 RNAポリメラーゼとT7プロモーターを用いたpET システムであろう.このシステムでは,L8-UV5 *lac*プ ロモーターの支配下にT7 RNAポリメラーゼ遺伝子が 組み込まれたバクテリオファージλDE3の溶原菌を宿主 として用いる必要がある.pETシステムが使用可能な菌 名には,たとえばBL21 (DE3)にように,λDE3溶原 菌を意味する (DE3)の表記が必ずある.したがって, BL21とBL21 (DE3)の遺伝子型は同一ではない<sup>1)</sup>.

誘導剤である IPTG の添加により Lac リプレッサーが L8-UV5 lac プロモーター下流の lac オペレーターから 解離し,大腸菌由来 RNA ポリメラーゼによる T7 RNA ポリメラーゼ遺伝子の転写が開始される.L8-UV5 lac プロモーターとは, lac プロモーターへL8と UV5の変 異が導入されたものである.L8は培地中のグルコース 量減少への応答(転写の活性化)が著しく低下した変異 であり,誘導時のlac プロモーター活性はきわめて低い<sup>2)</sup>. UV5は,L8変異のサプレッサーとして単離された変異 であり,-10領域がコンセンサス配列(5'-TATAAT-3') となっているため,誘導時のプロモーター活性が回復す る.すなわち,このL8UV5変異により IPTG 添加時の lac プロモーターからの転写が強く促進され,T7 RNA ポリメラーゼが生成する.大腸菌内で生成した T7 RNA ポリメラーゼの特異性は非常に高く T7 プロモーターの みにしか作用しない.したがって,pET プラスミド上に ある T7 プロモーター支配下の異種遺伝子のみを集中的 に転写することが可能となり,異種タンパク質を大量に 発現・取得することができる<sup>3)</sup>(図1).このpET システ ムを使用したときにしばしば遭遇する問題点を中心に話 を進めたい.

#### トラブルーその1

異種タンパク質が大腸菌に対して毒性を保持している ことなどの理由により,形質転換体が得られない,誘導 前に菌が溶菌する,十分な菌密度を得られない場合があ る.このような時には,誘導剤を添加しない状態の異種 タンパク質の基底レベルの発現を抑えることでこの問題 を克服できる可能性がある.そのためには,T7プロモー ターからの異種遺伝子の転写を抑制する方法と,T7 RNAポリメラーゼの基底レベルの発現を減らす,ある いはその活性を阻害するなどの方法がある.

プロモーター転写量制御 pETプラスミドにある T7プロモーターの下流に*lac*オペレーターを配し(T7*lac* プロモーター), さらに*lac*リプレッサー遺伝子(*lacI*) を載せたpETプラスミドを使用することで、異種遺伝 子の転写を抑制する方法がある.この方法では、lacl遺 伝子から発現されたLacリプレッサーはT7lacプロモー ター下流に結合するだけでなく、宿主染色体にあるL8-UV5 lac プロモーター下流の lac オペレーターへも結合 しT7 RNAポリメラーゼ遺伝子の転写も抑制する. そ の他にも、T7 RNAポリメラーゼに結合しその活性を阻 害するリゾチーム遺伝子を,発現用プラスミドと和合性 のあるプラスミドに別途保持させたもの (pLysS または pLvsE)を使用する方法(図1網掛け部分),あるいは、 培地に終濃度0.5~1%のグルコースを加えてL8-UV5 lacプロモーターからのT7 RNAポリメラーゼの発現を 押さえ込む方法が挙げられる. 培地中のグルコースに対 するL8-UV5 lacプロモーターの感度はきわめて低いが. グルコースによるカタボライト抑制を起こさせることは 可能である<sup>4)</sup>.

pET システムではIPTGを誘導剤として用いるが、よ

著者紹介 東洋大学 生命科学部 応用生物科学科(准教授) E-mail: higashibata@toyo.jp



図1. pETシステムの基本原理. 網掛けの部分は、pLysSあるいはpLysEを保持する大腸菌で起こる抑制を示している.

り厳密に制御するためL-アラビノースで誘導可能なプロ モーター(*araBAD*プロモーター)の支配下にT7 RNA ポリメラーゼ遺伝子を配したシステム(BL21-AI)があ る<sup>5)</sup>. 誘導剤を加えない場合, *araBAD*プロモーターか らのT7 RNAポリメラーゼの基底レベルの発現は低く 保たれ, グルコースの添加によりさらに抑制される.

プラスミドのコピー数を制御 上述のプロモーター からの転写量を制御する他にプラスミドのコピー数を減 らすことでこの問題に対処する方法もある. コピー数を コントロールできるpETcoco発現ベクターには2種の複 製起点 (oriVとoriS) と複製を開始するために必要な遺 伝子が組み込まれている<sup>の</sup>. アラビノースを添加した場 合には, oriVからの複製を開始するタンパク質が誘導 され, pETcoco発現ベクターを大腸菌1細胞当たり20~ 50コピーに保持させることができる. 一方, アラビノー スを添加しない場合には, oriSからの複製により1細胞 当たり1コピーに保つことができるため, 目的とする異 種タンパク質の発現量を低下させることができる.

#### トラブル―その2

タンパク質の過剰発現によく用いられるBL21株とその誘導体は、*lon*プロテアーゼと*ompT*プロテアーゼを 欠損しているため、誘導されたタンパク質は分解されに くい.しかし、pETシステムにおいて、その強力な転写 活性にもかかわらず、タンパク質の発現量がそれほど多 くない場合がある.このような原因として、mRNAの 不安定性による異種タンパク質の転写・翻訳効率の悪さ や、生成した異種タンパク質の分解などが挙げられる.

mRNAの安定化 大腸菌のほとんどのmRNAは不 安定であり、その半減期は数分である.RNA分解酵素 RNaseE遺伝子に変異を与えた大腸菌を使うことで、こ の問題を解決できる可能性がある.RNaseEは、9S rRNA (5S rRNA前駆体)のプロセシング、tRNAの3' 末端プロセシング、tmRNA (後述)のプロセシングな どに機能する他にも、デグラドソームを形成しmRNA を分解する.RNaseEのC末端ドメインを欠いた変異 rne131によってmRNAの安定性が向上することが報告 されており<sup>7)</sup>, rne131変異が導入された大腸菌は、 BL21 Star (DE3) としてインビトロジェンから市販され ている.

レアコドンの補充 異種タンパク質を発現させる際 に、宿主のコドンの使用頻度を考慮に入れなければなら ない場合がある.使用頻度が極端に低いレアコドンが mRNAに散見される場合は、アミノ酸の取り込みの誤 り、翻訳フレームのずれやリボソームの停滞・停止など の原因となる.アミノ酸の取り込みの誤り、翻訳フレー ムのずれは、酵素活性の測定や機能解析には致命的であ る.リボソームの停滞・停止は、目的タンパク質の発現 量の低下や、tmRNAによるトランスートランスレーショ ンの機構による分解をうけることが予想される<sup>8)</sup>. tmRNAはtRNAとmRNAのハイブリッドであり、 mRNAに相当する領域にはタンパク質分解酵素の標的 となるタグがコードされている.停滞したリボソームに tmRNAが入ることにより合成途中のペプチドにタグが 付加され, 停滞していたリボソームが再び機能できるようになる.

大腸菌では、アルギニン、イソロイシン、グリシン、 ロイシン、プロリンに対応するコドンに使用頻度の低い ものがみられるため、これらのコドン(tRNA)を補充 すれば、リボソームの停滞などの問題を解決することが できる.このようなレアコドン補充株は、Rosettaシリー ズ(Novagen社)、BL21-CodonPlusシリーズ(アジレ ント・テクノロジー社)として市販されている。

異種タンパク質の安定化 SDS-PAGEで異種タン パク質の発現を確認した際、異種タンパク質の分解産物 に由来するバンドが多く見られることがある.この場合、 異種タンパク質の安定性を向上させることでこの問題を 解決できる可能性がある.開始メチオニンの次のアミノ 酸が、タンパク質の安定性を決定している. これをNエ ンドルールという.タンパク質のN末端はホルミルメチ オニンであるが、デホルミラーゼによりホルミル基が除 去され、次いでメチオニンアミノペプチダーゼ (MAP) により開始メチオニンが除かれる. MAP活性は、開始 メチオニンの次のアミノ酸に依存しておりHis, Gln, Glu, Phe, Met, Lys, Tyr, Trp, Argの場合は, 分解 をほとんど受けないことが報告されている<sup>9</sup>. MAPの 働きにより露出した2番目のアミノ酸がロイシンの場 合、タンパク質の半減期がわずか2分と著しく短いこと が報告されており<sup>10)</sup>、N末端がML……のタンパク質を 大腸菌内で発現させるときは注意が必要である.

#### トラブルーその3

目的とする異種タンパク質が大腸菌内で封入体を形成 してしまい可溶性画分への発現がきわめて低いかまった く発現しない場合には以下の方法が有効な場合が多い.

低温での発現 発現時の培養温度を低温にシフトす ることで、タンパク質の折りたたみを緩やかに進行さ せ<sup>11)</sup>, さらには、低温誘導されるシャペロンの働きによ り、可溶性画分への発現の向上が期待できる.また、低 温で培養することにより宿主細胞内の夾雑タンパク質の 発現が抑えられ、その後のタンパク質の精製効率が向上 する.内在性プロテアーゼ活性も低く抑えることができ るので、目的タンパク質の残存率も高い.

添加剤によるストレス応答の利用 低温での発現以 外に、添加剤を用いる対処法が考えられる. エタノール を培養液に3% (v/v)となるように添加することで、熱 ショック応答(DnaK系やGroEL系といった分子シャ ペロンの発現)を誘導することができ、異種タンパク質 の可溶性画分への発現を増加させることができる<sup>12-14</sup>. また、タンパク質合成を阻害する抗生物質のなかには、 熱ショックやコールドショック応答を起こさせるものが ある.カナマイシン、ピューロマイシン、ストレプトマ イシンはエタノールの場合と同様に熱ショック応答を誘 導し、クロラムフェニコール、エリスロマイシン、スピ ラマイシン、テトラサイクリン、フシジン酸はコールド ショック応答を誘導することが報告されている<sup>15,16)</sup>.こ れらの薬剤を添加(終濃度1µg/ml程度)することによっ て低温あるいは高温環境に暴露させた状態に細胞内環境 を似せることができ、誘導された熱ショックやコールド ショック応答により異種タンパク質の可溶性画分への発 現を増加させることができる.

**分子シャペロンとの共発現** 異種タンパク質と分子 シャペロンを共発現させることで、可溶性画分への発現 の向上が期待できる.熱ショック応答などにより誘導さ れるシャペロン遺伝子を、pETプラスミドと和合性のあ る別のプラスミドに載せたシステムが市販されている. たとえば、groES、groEL、dnaK、dnaJなどのシャペ ロン遺伝子を挿入したプラスミドとの共存により、タン パク質の可溶性画分への発現を向上させるシステムがあ る (タカラバイオ社)<sup>17)</sup>.

大腸菌の生育下限温度は約7.5°Cであるが<sup>18)</sup>,好冷菌 Oleispira antarctica由来のシャペロニンCpn60と Cpn10を発現させた大腸菌は0°C付近でも増殖が可能と なる<sup>19)</sup>. これらのシャペロニンは, in vitroにおいて4~ 12°Cで高いリフォールディング活性を示す. 低温環境 下でこれらのシャペロニンを共発現させ、タンパク質の 溶解性を改善させるシステム ArcticExpress(アジレン ト・テクノロジー社)が市販されている<sup>20)</sup>.

**タグの付加**目的とする異種タンパク質が前述の方法でも可溶化しない場合,溶解性の高いタグを付加することによって、タンパク質全体の溶解性を高める戦略を用いるとよい場合がある.SET (solubility enhancement tags)と呼ばれるグルタミン酸残基に由来する負の電荷を持ったタグをタンパク質のN末端またはC末端側に付加することによって、タンパク質の溶解性を向上させ凝集を抑えることができる (VariFlex protein expression system)<sup>21,22)</sup>.他のこのようなタグとして、GST (gluta-thione-<u>S</u>-transferase) タグ<sup>23)</sup>,MBP (maltose-binding protein) タグ<sup>24,25)</sup>, Trx (thioredoxin) タグ<sup>26)</sup>, Nus (NusA) タグ<sup>27)</sup>, SUMO (small ubiquitin-like modifier) タグ<sup>28)</sup> などを挙げることができる.

一方、ヒスチジンタグ(6×His)は、固定化金属イ オンカラムによる簡便なアフィニティー精製を行うため 頻繁に用いられるが、この強い塩基性を示すタグが付加 されたことにより、目的とする異種タンパク質が封入体 を形成してしまう場合がある。HAT(<u>histidine</u> <u>affinity</u> tag) タグは、ニワトリの乳酸デヒドロゲナーゼ由来で あり19残基のアミノ酸からなる<sup>29)</sup>. HATタグは、ヒス チジンタグ(6×His)と同様、固定化金属イオンカラ ムによるアフィニティー精製に使用できるが、ヒスチジ ンタグ(6×His)より長いため高分子量タンパク質に 付加した場合に構造内部に潜り込む可能性を低く抑える ことができる.また、タグを通して均一に電荷が分布し ているため溶解性が高く、ヒスチジンタグ(6×His) よりも封入体を形成しにくいという長所がある.

異種の膜タンパク質の高発現を試みた場合、膜中に正 しく発現させることの難しさに加え, 宿主にとって重要 な膜タンパク質の発現を競争的に排除してしまい毒性を 示すなどの問題が生じる.このために、低コピープラス ミドで、弱い発現用プロモーターを使用することによっ てタンパク質の発現レベルを低く保ち、大量に培養す ることが要求される. その一方, 目的とする異種タンパ ク質を細胞膜に高レベルに発現・提示できるタグが発見 された. MISTIC (membrane integrating sequence for translation of integral membrane protein constructs) は, Bacillus subtilis 由来の110アミノ酸からなる高い親水性 を示す膜結合タンパク質である<sup>30)</sup>. このタンパク質を付 加して大腸菌内で発現させると、シグナル配列を必要と せずに細胞膜に強固に結合する. 大腸菌で発現させるこ とが困難な膜タンパク質でも、このMISTICタンパク質 をタグとして付加することで、細胞膜内に効率よく高発 現させることができる. MISTIC タグを付加して細胞膜 へ提示させたタンパク質のフォールドは野生型と同じと いわれている.しかし、MISTICタンパク質に関する報 告例はいまだ少なく、どういう機構で細胞膜内へ標的タ ンパク質を提示しているのか不明である.

ジスルフィド結合の制御 大腸菌の細胞内環境は. チオレドキシンおよびグルタチオン/グルタレドキシン に依存したレドックス制御機構により比較的高い還元状 態が保たれている、そのため、目的とする異種タンパク 質へ安定なジスルフィド結合が導入されず分解されるか 封入体を形成してしまうことがある.チオレドキシン, グルタチオンの再活性化に関与するチオレドキシン還元 酵素遺伝子 trxB やグルタチオン還元酵素遺伝子 gor を破 壊し、細胞内をより酸化状態にすることで、 ジスルフィ ド結合の適切な形成・タンパク質の正常な折りたたみを 促し、タンパク質の生産を高めることができる<sup>3)</sup>. ジス ルフィド結合の掛け違いを修正する酵素(DsbC)は本 来ペリプラズムに局在している. DsbCを細胞質へ発現 させた大腸菌は、複数のジスルフィド結合を有する可溶 性タンパク質の発現にも効果的であるが、DsbC はシャ ペロン活性も持つのでジスルフィド結合を持たない異種 タンパク質の発現にも有効である<sup>31)</sup>.ペリプラズムは, ジスルフィド結合の形成やタンパク質の折りたたみに適 した環境にあるので,ペリプラズムへの発現も有効だと 思われる.その際に,ペリプラズムで発現・機能してい る DsbC などと融合させることで,溶解性の増大,タン パク質の折りたたみの促進が期待できる<sup>3)</sup>.

#### 大腸菌を宿主とするその他の発現系

大腸菌を宿主として用いた異種タンパク質の発現には pETシステムを用いるのが現在の主流である. pETシス テムが開発されるまでは、lac, tac, trcプロモーターな どを利用した高コピープラスミド(pUC系)による異 種タンパク質発現が一般的であった. tac プロモーター は, trpプロモーターの-35領域とL8-UV5 lacプロモー ターの-10領域を連結したハイブリッドプロモーターで あり、L8-UV5 lacプロモーターやtrpプロモーターより も強力に転写を促す<sup>32)</sup>. trcプロモーターは, tacプロモー ターの-35領域と-10領域の間にシトシンを1塩基挿入 することによって制限酵素 Hpall 認識サイトをデザイン したもので、大腸菌内での転写活性は、tacプロモーター の9割程度である<sup>33)</sup>. lac, tacおよびtrcプロモーター からの転写は大腸菌由来RNAポリメラーゼを必要とす るため、大腸菌ゲノム中のさまざまなプロモーターと競 合関係にある.しかし、プラスミドの圧倒的なコピー数 により、それらのプロモーターからの転写量は多くなる. その結果. これらのプロモーターの支配下にある異種遺 伝子を効率よく発現させることができる.

これらの発現プラスミドを使用して異種遺伝子を発現 させた場合にも、IPTGを添加しない基底レベルの発現 が問題となるケースがある. すなわち, 宿主細胞にとっ て悪影響を示すタンパク質を発現させる場合、形質転換 体が得られないことがある. 上記のプロモーターの下流 には*lac*オペレーターが配されているので、Lacリプレッ サーが結合できる. そこで、Lacリプレッサーを過剰に 発現するよう変異を施した*lacI<sup>9</sup>*遺伝子(qはquantityの 意味)を載せた発現用プラスミドを使用したり, lacl<sup>9</sup> 遺伝子を載せたF'プラスミド保持株を宿主に用いるこ とで、高コピーの発現用プラスミドであろうとも*lac*、 tac およびtrc プロモーターからの転写を抑制することが できる. lac プロモーターに関しては, 前述したように グルコースを培地に添加することで、このプロモーター からの転写を抑制することができる. tac および trc プロ モーターからの転写はグルコース濃度に左右されない.

プロモーターからの異種タンパク質の基底レベルの発 現を抑える他にもプラスミドのコピー数を減らすことで 対処できる.大腸菌C株誘導体であるABLE C. ABLE Kは、ColE1系プラスミドのコピー数をそれぞれ1/4、 1/10にできる<sup>34)</sup>. 大腸菌の染色体DNAを複製するのは PolIIIでありこの遺伝子は必須である. ColE1系のプラ スミドはPollにより複製されるが、Pollをコードする遺 伝子polAは宿主大腸菌にとっては必須でない. ABLE CおよびABLE K株の染色体DNAには, polAの機能を 相補する、K-12株とは異なる大腸菌由来のDNA断片が 組み込まれている<sup>35)</sup>. これらの株を宿主とすれば, 異種 タンパク質の基底レベルの発現量を低下させることがで きるため、プラスミドの安定性や細胞生存率の向上が期 待できる. また, pUC系のプラスミドをタンパク質発 現に用いる場合、培養温度を下げることでそのコピー数 を減少させることができる.pUC系発現用プラスミド をpACYC系プラスミド(細胞当たり18~22コピー), あるいはpSC101系プラスミド(細胞当たり~5コピー) に変更する方法も考えられるが、上記の宿主を変える方 法を利用すればpUC系プラスミドのままコピー数を減 少させることが可能である.本誌89巻10号で橋本義輝 先生が執筆の "pUC プラスミドにまつわるエトセトラ" にて詳解されているので参照されたい<sup>36)</sup>.

大腸菌由来コールドショック遺伝子*cspA*のプロモー ターを利用したコールドショック発現システムがpCold ベクターシリーズ(タカラバイオ社)として市販されて いる<sup>37)</sup>.このプロモーターは大腸菌由来であるため、ほ とんどの大腸菌内で機能する.培養温度を15°Cの低温 にシフトすることで、*cspA*プロモーター支配下の異種 遺伝子の発現を誘導させることができる.*cspA*プロモー ターの下流に*lac*オペレーターを配しているので、異種 タンパク質の発現には、低温への温度シフトとIPTGの 添加が必要である.「低温での発現」で述べたように、 宿主細胞内の夾雑タンパク質の発現や内在性プロテアー ゼ活性を低く抑えることができる.

#### おわりに

異種タンパク質の高発現を実現させるさまざまな「イ ロハ」を簡単に紹介した.本稿で触れた内容はほんの一 端であり,他にも「イロハ」を駆使し高発現に成功した 報告を見つけることができるだろう.また,本稿で紹介 した方法を単独で用いるのではなくて適宜組み合わせる ことで問題を克服できるかもしれない.これらを駆使し ても発現に成功しない場合には,大腸菌以外の宿主の利 用や, *in vitro*翻訳系を用いることも選択肢の一つと思 われる.本稿を執筆するにあたりいろいろ調べてみて, 「これは,使えるかも」と思えるものが多々あった.本 稿が,研究進展の一助となれば幸いである.

## 文 献

- 1) Studier, F. W. and Moffatt, B. A.: *J. Mol. Biol.*, **189**, 113 (1986).
- 2) Novy, R. and Morris, B.: inNovations, 13, 8 (2001).
- Novagen: *pET System Manual* タンパク質発現システム 第11版日本語版, MERCK社 (2009).
- Pan, S. and Malcolm, B. A.: *BioTechniques*, 29, 1234 (2000).
- http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/ oneshot\_bl21ai\_man.pdf
- 6) https://www.merckmillipore.com/japan/life-scienceresearch/petcoco-1-system/EMD\_BIO-71131/japanese/ p\_lkub.s1OCB0AAAEj8Bt9.zLX
- 7) Lopez, P. J. et al.: Mol. Microbiol., 33, 188 (1999).
- Roche, E. D. and Sauer, R. T.: J. Biol. Chem., 276, 28509 (2001).
- Hirel, P.-H. et al.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 8247 (1989).
- 10) Tobias, J. W. et al.: Science, 254, 1374 (1991).
- 11) Song, J. M. et al.: Protein Expr. Purif., 82, 297 (2012).
- 12) Sahu, S. K. et al.: Biotechnol. Lett., 31, 1745 (2009).
- 13) Thomas, J. G. and Baneyx, F.: J. Biol. Chem., 271, 11141 (1996).
- Thomas, J. G. and Baneyx, F.: Protein Expr. Purif., 11, 289 (1997).
- 15) VanBogelen, R. A. and Neidhardt, F. C.: Proc. Natl. Acad. Sci., 87, 5589 (1990).
- 16) Kusano, K. et al.: Arch. Biochem. Biophys., 367, 129 (1999).
- 17) http://catalog.takara-bio.co.jp/product/basic\_info. asp?unitid=U100004131
- 18) Shaw, M. K. et al.: J. Bacteriol., 105, 683 (1971).
- 19) Ferrer, M. et al.: Nature Biotechnol., 21, 1266 (2003).
- 20) http://www.chem-agilent.com/contents.php?id=300796
- 21) http://www.chem-agilent.com/contents.php?id=300639
- 22) Zhang, Y-B. et al.: Protein Expr. Purif., 36, 207 (2004).
- 23) Smith, D. B. and Johnson, K. S.: Gene, 67, 31 (1988).
- 24) di Guan, C. et al.: Gene, 67, 21 (1988).
- 25) Maria, C. V. et al.: Gene, 74, 365–373 (1988).
- 26) LaVallie, E. R. et al.: Biotechnology (NY), 11, 187 (1993).
- 27) Davis, G. D. et al.: Biotechnol. Bioeng., 65, 382 (1999).
- 28) Marblestone, J. G. et al.: Protein Sci., 15, 182 (2006).
- 29) http://catalog.takara-bio.co.jp/clontech/product/basic\_ info.asp?unitid=U100004411
- 30) Tarmo, P. R. et al.: Science, 307, 1317 (2005).
- 31) Qiu, J. et al.: Appl. Environ. Microbiol., 64, 4891 (1998).
- 32) Boer, H. A. et al.: Proc. Natl. Acad. Sci., 50, 21 (1983).
- 33) Brosius, J. et al.: J. Biol. Chem., 260, 3539 (1985).
- 34) http://www.chem-agilent.com/contents.php?id=300297
- 35) Greener, A.: Strategies, 6, 7 (1993).
- 36) 橋本義輝: 生物工学, 89, 609 (2011).
- 37) http://catalog.takara-bio.co.jp/product/basic\_info. asp?unitid=U100004327

