

多次元NMRによる水素結合の直接測定

三島 正規

水素結合は、その特徴的な性質から、生体高分子が機能を発現するために重要な役割を果たしており、生体高分子の機能を理解する上で水素結合を知ることは大切である。近年、水素結合を介したスカラースピ結合 (J) の存在が明らかになり、NMR法を用いて水素結合の存在を直接観測できるようになった。水素結合を介した J について紹介し、筆者らによるタンパク質・リン酸間の水素結合の直接観測について述べる。

構造生物学という分野の内容を端的に説明するとすれば、“生物現象を担う生体高分子（タンパク質や核酸）の立体構造を決定し、その立体構造に基づいて機能の説明を試みる”研究といえるであろう。

では、立体構造に基づく分子機能の説明とは、どのような作業か？もちろんさまざまな作業の集積であるが、そのなかで最も大切な作業は、“生体高分子による分子認識メカニズムを調べる”ことであろう。たとえば酵素の基質認識や、タンパク質・タンパク質複合体、タンパク質・核酸複合体における分子認識を立体構造に基づいて詳細に調べ、結合や活性を担う原子を同定、検討するといった作業である。反応機構などを推察する過程も、もちろん重要だが、そのためにはまず分子認識を明らかにすることが前提となる。

生体高分子における分子認識とは具体的にはどのようなものか？分子認識は、非共有結合である各種相互作用によって担われている特異的な結合によってなされる。分子認識を担う相互作用には、大きく分類すると、ファンデルワールス相互作用、静電的相互作用、水素結合がある。

この中でも特に水素結合は、生体高分子の特異的な立体構造形成や、分子認識による機能を発現する上で重要な役割を果たす。それは水素結合が(1)結合に方向性がある、(2)解離と再結合を行い得るという、その他の相互作用にはない特徴をもっているからである。タンパク質における α -ヘリックスなどの特徴的な立体構造形成や、二本鎖DNAの解離と再結合、酵素による基質の認識などは、特異性を決定する相互作用として水素結合が重要な貢献をしている。

構造生物学に限らず、化学の分野でも水素結合を調べ

ることは重要である。低分子化合物では赤外分光法 (IR) が有力な方法であるが、水素結合が多数存在する生体高分子の水素結合の同定には困難が多い。

生体高分子中の水素結合の同定には、NMRの化学シフト変化、重水素交換実験などから水素結合のドナーを検出する方法がある。しかし、これらの結果から水素結合の存在が示されても、どの原子が水素結合のアクセプターとして関与しているかを同定することは不可能である。水素結合のドナー原子、アクセプター原子対を同定するにはX線結晶構造解析やNMR法などによって決定された原子座標をもとに、どのような原子が水素結合になり得る配置と距離に存在しているかを調べることで判断する。近年は、分解能が1 Åを超える超高分解能のX線結晶解析や中性子回折によって水素の座標も与えられるようになり、より精密に水素結合の存在について議論できるようになりつつある。^{1,2)}

しかしながら、ここで注意したいのは、あくまでも水素結合の同定とは、座標をもとに、ドナー原子、アクセプター原子対を同定していく作業であって、結合の存在そのものが実体として直接観測されているわけではないという点である。

ところが1998年、Grzesiekらによって水素結合を介したスカラースピ結合 (J) が存在することが発見され、多次元NMRによって直接的に水素結合の結合の存在と、信号の帰属をもとにドナーとアクセプターを同定し得るという、驚くべき報告がなされた。³⁾

水素結合を介したスカラースピ相互作用 (J) の発見

NMRによる解析において、スカラースピ結合 (J) はさまざまな目的で利用されている。水素核の一次元NMR測定でなじみ深い $n+1$ ルールによる信号の分裂は、水素原子間の J によるものである。 J は、電子を介した核スピンの相互作用で、通常、共有結合を介した原子間に存在する。現在の多次元NMR法では ^{15}N , ^{13}C 安定同位体ラベルしたタンパク質の異種核間の大きな値をもつ J を利用して効率よく磁化の分極移動を行い、多次元スペクトルを効率よく測定できるようになっている。⁴⁾

1998年、Grzesiekらは ^{15}N , ^{13}C 標識されたRNA中の水素結合を介した J の存在を示した論文を発表した。この

論文で、ワトソン・クリック型塩基対を形成したRNAオリゴマーの水素結合を介した J , $^hJ_{NN}$ が約7 Hzであることが示され,³⁾ 同年WüthrichらによりB型DNAのワトソン・クリック型塩基対中の水素結合においても $^hJ_{NN}$, $^hJ_{NH}$ の存在が報告された。⁵⁾ 水素結合を介した J は核酸だけでなくタンパク質においても観測された。1999年にGrzesiekやBaxらによってタンパク質主鎖のN-H...O=Cタイプの水素結合において, $^hJ_{NC}$, $^hJ_{HC}$ が観測され,⁶⁻⁸⁾ また後にアミド水素と α 炭素間の $^hJ_{HC}$ も報告されている (Fig. 1).⁹⁾ ここで, $^hJ_{AB}$ という表記は水素結合を介してn結合だけ離れた核間A, Bに存在する J であることを表している。

水素結合を介した J の存在は低分子化合物のNMR測定においてもはっきりとは認められておらず, 稀に観測されても“through-space coupling”と片付けられ, それまで本格的に調べられてこなかった。水素結合を介した J の存在が生体高分子の測定から明らかにされたのである。多次元NMR法では J を使って信号間(核間)の相関をとる測定ができるので, 水素結合を介した J が存在することは, 水素結合の存在を実体として示すことのみならず, その水素結合に関与するドナー原子とアクセプター原子をスペクトルから直接的に決定できるということである。

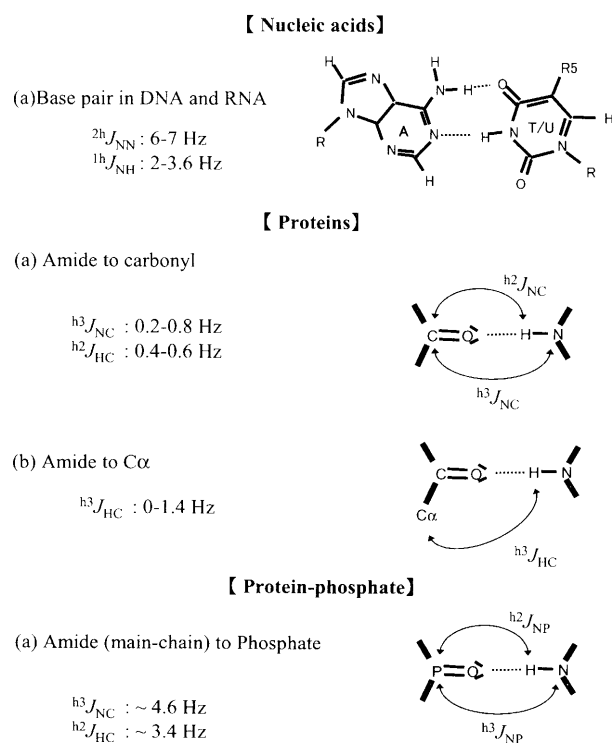


Fig. 1. Summary of the scalar couplings across hydrogen bonds.

Fig. 2に筆者らが構造解析を行った酵素で観測された水素結合に由来する信号を示した。 $^hJ_{NC}$ を用いて水素結合の存在が直接示され, ドナーとアクセプターも曖昧さを含まずに同定できている。しかしながら, このような水素結合の直接測定の問題点として, タンパク質においては特に問題なのであるが, J の値が非常に小さいので, 測定感度が悪い点があげられる。

タンパク質・リン酸基間の水素結合を介した J

筆者らは, 遺伝子修復系酵素の構造解析をNMRによって進める過程で, 直接的にリン酸とタンパク質の間の相互作用をとらえる方法の必要性を痛感していた。この酵素は酸化損傷を受けたプリンヌクレオチドを特異的に加水分解する活性をもち, 構造生物学的な議論をするためには, 酵素による酸化損傷部位の認識機構と加水分解部位であるリン酸基の認識機構を明らかにする必要があった。一般に, NMRを用いたタンパク質・核酸複合体の構造解析において, DNA, RNAやヌクレオチドに含まれるリン酸とタンパク質との間にはNOEが観測されないといった理由から, 直接的な距離情報は得ることができなかった。

筆者らは, 1999年にGrzesiekらによって報告されたタンパク質内部の水素結合の直接観測に触発され,⁷⁾ タンパク質とリガンドのリン酸基の水素結合の直接測定を試みた。タンパク質によるリン酸基の認識は, 主に水素結合によって行われるので, 水素結合が存在することを直接的に示すことができれば, たとえNOEが観測されなくても, 有力な構造情報として活用できるはずである。

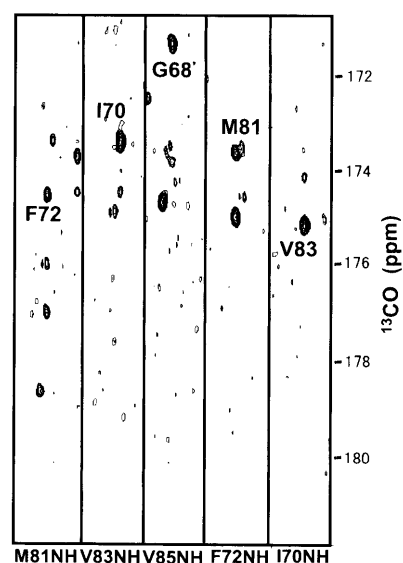


Fig. 2. Observed signals across $^hJ_{NC}$.

しかしながら、それまでに報告されていたタンパク質の水素結合を介した J は、その大きさが非常に小さなものであったので、⁷⁻¹⁰ タンパク質とリン酸の間の分子間の水素結合にいたってはおそらく観測は不可能であろうと思われた。測定試料には、まず高濃度で安定な複合体が得られる Ras (Q61L)・GDP 複合体を用いた。最初に、 J による相関 NMR 測定としては最も単純な二次元一量子相関法を用い Ras と GDP のリン酸基とのスペクトルを測定したところ、予想に反して、リン・タンパク質間の一本の水素結合を介した相関シグナルが観測された。

さらに予備的な実験によって J による信号の強度変動を調べ、 h^2J_{HP} の大きさを見積もったところ、驚くべきことに約 3 Hz 以上の大きな J の存在が示唆された。 h^2J_{HC} の約 0.4-0.6 Hz⁶⁾ という値に比して非常に大きなものであった。 J の大きさを正確に決めるため、より定量的な実験を行ったところ h^2J_{HP} が 3.4 Hz であることを確認し、さらに 4.6 Hz の h^3J_{NP} の存在も明らかにした (Fig. 1).¹¹⁾

この h^2J_{HP} , h^3J_{NP} の発見は (1) 新しい J の発見, (2) NMR による構造解析において今まで実質的に距離情報を得ることができなかったタンパク質・リン酸の間で直接的に水素結合の存在を示すことにより精密な解析ができるようになったという重要な意味をもつ。

興味深いことに、X線結晶構造解析の結果からは GDP のリン酸基と Ras の主鎖の間に 5 本の水素結合の存在が示されており、^{12,13)} NMR で観測されたものは 1 本の相関のみであった (Fig. 3, 4)。正確には、他の 4 本の水素結合間には実験誤差よりも有意に大きな J は観測されなかった。¹¹⁾

なぜ他の 4 本では J が観測されない、あるいは非常に小さいのか？その理由を探るため、5 本の水素結合の幾何学的特長を調べた (Fig. 3)。水素結合による有意な J が観測されたのは Ala18・リン酸の間の水素結合である。この結合のみ直線的で角度 αPOH が 173 度であるのに対し、その他の J が観測されなかった 4 本の水素結合では 120 度以下であった (Fig. 3)。すでにタンパク質の主鎖の水素結合では、水素結合長と J の大きさに相関が認められていたが、さらに今回の解析では J の大きさの水素結合が形成する角度に対する依存性が示された。筆者らの知る限りでは J の大きさと水素結合に関する実験的なデータの最初の提出である。

HNPO

次に水素結合を介したタンパク質・リン酸間の J を介

donors	acceptors	d(N-O) / Å	αPOH / deg	αOHN / deg	$^3hJ_{NP}$ / Hz	$^2hJ_{HP}$ / Hz
Gly13	O2 β	2.76	107.5	167.5	< 0.27	< 0.52
Gly15	O1 β	2.74	107.6	163.0	< 0.35	< 0.92
Lys16	O1 β	2.77	115.9	162.5	< 0.35	< 0.98
Ser17	O3 β	3.05	120.1	156.6	< 0.29	< 0.66
Ala18	O2 α	2.85	173.4	143.5	4.62 ± 0.01	3.36 ± 0.09

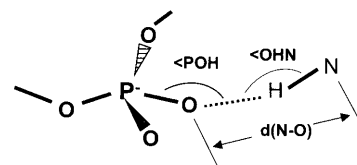


Fig. 3. Hydrogen bond lengths and angles, and the observed h^3J_{NP} and h^2J_{HP} .

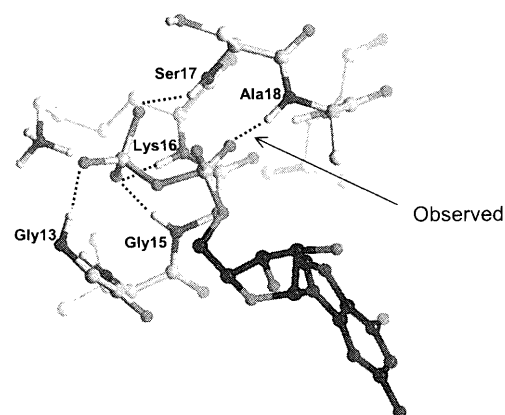


Fig. 4. Hydrogen bond network between Ras・GDP.

して、感度よく相関スペクトルを得るための測定法 HNPO をデザインした (Fig. 5).¹¹⁾ 1997 年に Wüthrich らのグループによって TROSY 法が発表され、TROSY をパルスシーケンス中に組み込めば 1H - ^{15}N 測定に関して緩和の長い項だけを選択的に測定できることが分かっていたので、¹⁴⁾ HNPO には TROSY シーケンスを組み込んだ。¹¹⁾ このことにより、 h^3J_{NP} を介した ^{15}N から ^{31}P への分極移動のための磁化発展時間における、緩和による磁化の損失が最も小さな項を選択的に観測することによって高感度を達成できた。¹¹⁾

この測定法では $^1H \rightarrow ^{15}N \rightarrow ^{31}P \rightarrow ^{15}N \rightarrow ^1H$ という経路で分極移動させ、三次元測定として、 1H , ^{15}N , ^{31}P 各原子の化学シフトを得ることができる。Fig. 6 に HNPO を二次元に展開したスペクトルを示す。HNPO で観測された信号が Ala18 と α 位のリン酸基の相関を示し、この間に水素結合が存在することがわかる。

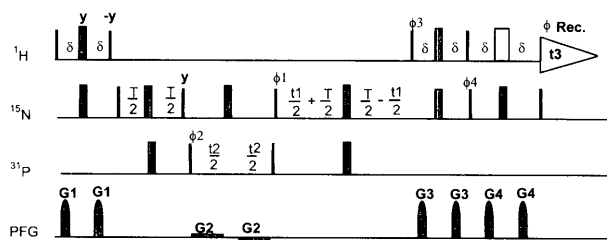


Fig. 5. Pulse scheme of the $^3\text{hJ}_{\text{NP}}$ HNPO experiment. Narrow and wide black bars indicate nonselective 90° and 180° pulses, respectively. An open bar indicates the selective 3-9-19 ^1H 180° pulse for WATERGATE gradient-tailored water suppression. All pulse phases are x, unless indicated otherwise. Delay durations: $\delta = 2.7$ ms; $T = 108$ ms ($= 1/2 \text{ } ^3\text{hJ}_{\text{NP}}$). Phase cycling: $\phi_1 = \{y, -y, x, -x\}$; $\phi_2 = \{4x, 4(-x)\}$; $\phi_3 = \{-y\}$; $\phi_4 = \{-y\}$; $\phi_{\text{rec}} = \{y, -y, -x, x, -y, y, x, -x\}$. In order to obtain Rance-Kay style quadrature data in the $^{15}\text{N}(t_1)$ dimension, a second FID for each t_1 value is recorded with $\phi_1 = \{y, -y, -x, x\}$; $\phi_3 = \{y\}$ and $\phi_4 = \{y\}$.

DFT 計算

筆者らの観測した $^2\text{hJ}_{\text{HP}}$, $^3\text{hJ}_{\text{NP}}$ と同様の観測結果が、筆者らによる報告の直後に Rüterjans のグループによっても報告された.¹⁵⁾ 筆者らが観測に用いた測定方法から考えて、観測された信号が水素結合を介した J であるのはほぼ間違いないことであったが、裏付けとなる報告である。

さらに2001年、density function theory (DFT) 法による量子化学計算の結果が報告された.¹⁶⁾ この計算からフェルミ接触項に基づく相互作用として、すなわち J として、筆者らの報告した $^2\text{hJ}_{\text{HP}}$, $^3\text{hJ}_{\text{NP}}$ が再現できること、さらにその大きさが水素結合の角度に依存すること示され、われわれの実験結果がシミュレーションによっても確認された。またごく最近、他のグループから同様の量子化学計算の報告がなされた.¹⁷⁾

今 後

現在のところ、NMR による J を利用した水素結合の直接測定はその測定感度の低さから、必ずしも標準的、ルーチンな測定にはなっていない。しかしながら NMR の測定感度が今後さらに向上することは間違いなく、水素結合の直接測定は多用されていくであろう。

過去 15 年間に NMR 法は、高磁場化、分光器の改良、測定法の開発、試料調製法の工夫などによって進歩し、構造解析法として発展してきた。現在、各地の NMR にクライオプローブの導入が進められており、従来と同じ磁場のマグネットを用いても数倍の感度上昇が得られるようになりつつある。¹⁸⁾ また水素結合の直接測定には測

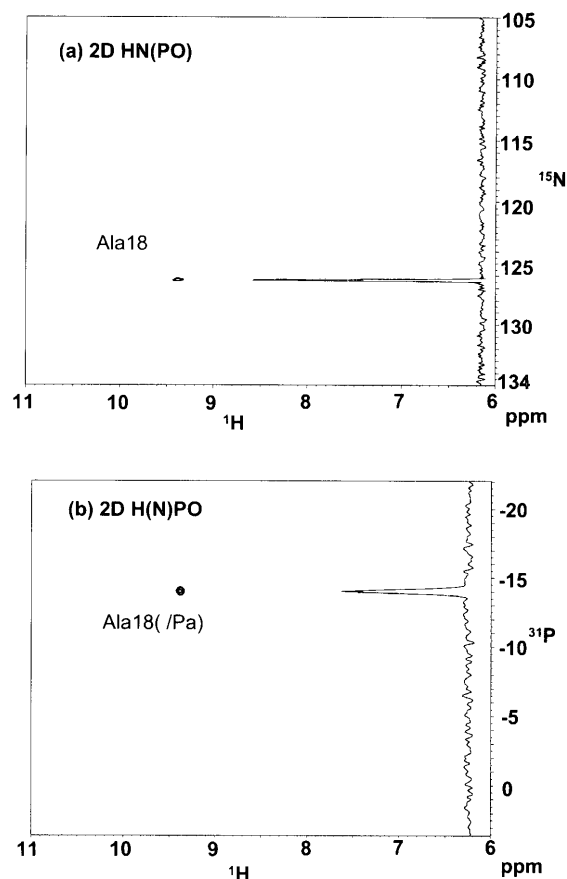


Fig. 6. (a) 2D $^3\text{hJ}_{\text{NP}}$ HN(PO), (b) 2D $^3\text{hJ}_{\text{NP}}$ H(N)PO. (a) 2D $^3\text{hJ}_{\text{NP}}$ HN(PO) and (b) $^3\text{hJ}_{\text{NP}}$ H(N)PO spectra are shown, in which $[\omega_1 (^{15}\text{N}), \omega_3 (^1\text{H})]$ and $[\omega_2 (^{31}\text{P}), \omega_3 (^1\text{H})]$ frequencies were recorded, respectively.

定感度を稼ぐために TROSY 法を導入することが望ましいが、¹⁹⁾ TROSY 効果を効率よく得るためには測定試料の水素原子を重水素に置換した重水素化体を用意することが必要である。試料調製の重要性はつい見落とされがちであるが、2003 年にはグルノーブルにおいて EMBO ワークショップ「生体高分子 NMR、中性子回折のための重水素化」が開催されたことからわかるように試料調製法の進展も重点的に進められている。

以上、NMR による J を利用した水素結合の直接観測についてまとめ、筆者らによる研究を紹介した。本稿では、現在までに報告されている水素結合の J に関して代表的なごく一部のものしかとりあげていない。また J の符号の問題や水素結合の性質などの物理化学的問題にも触れていないが、水素結合の物性といった基礎問題に対しても、水素結合の J の研究は貴重な資料を与える。水素結合の J に関する研究の詳細はパイオニアである Grzesiek によってまとめられているので参考にされたい。²⁰⁾ 応用面では、今後 NMR 法の進歩にともない水素

結合の直接測定はルーチン化され、得られる水素結合の情報は、分子認識に基づく構造生物学研究に貢献するであろう。

文 献

- 1) Niimura, N.: *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **9**, 602 (1999).
- 2) Longhi, S. *et al*: *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **8**, 730 (1998).
- 3) Dingley, A. J. and Grzesiek, S.: *J. Am. Chem. Soc.*, **120**, 8293 (1998).
- 4) Cavanagh, J. *et al*: *Protein NMR Spectroscopy*, Academic Press, San Diego (1996).
- 5) Pervushin, K. *et al*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 14147 (1998).
- 6) Cordier, F. and Grzesiek, S.: *J. Am. Chem. Soc.*, **121**, 1601 (1999).
- 7) Cornilescu, G. *et al*: *J. Am. Chem. Soc.*, **121**, 2949 (1999).
- 8) Cordier, F. *et al*: *J. Magn. Reson.*, **140**, 510 (1999).
- 9) Meissner, A. and Sørensen, O.: *J. Magn. Reson.*, **143**, 431 (2000).
- 10) Cornilescu, G. *et al*: *J. Am. Chem. Soc.*, **121**, 6275 (1999).
- 11) Mishima, M. *et al*: *J. Am. Chem. Soc.*, **122**, 5883 (2000).
- 12) Tong, L. *et al*: *J. Mol. Biol.*, **217**, 503 (1991).
- 13) Milburn, M. V. *et al*: *Science*, **247**, 939 (1990).
- 14) Pervushin, K. *et al*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 12366 (1997).
- 15) Lohr, F. *et al*: *J. Am. Chem. Soc.*, **122**, 9289 (2000).
- 16) Czernek, J. and Bruschweiler, R.: *J. Am. Chem. Soc.*, **123**, 11079 (2001).
- 17) Del Bene, J.E. *et al*: *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 6393 (2002).
- 18) Medek, A. *et al*: *J. Biomol. NMR*, **18**, 229 (2000).
- 19) Wang, Y. *et al*: *J. Biomol. NMR*, **14**, 181 (1999).
- 20) Grzesiek, G. *et al*: *Methods in Enzymology*, **338**, 111 (2001).

低温電子顕微鏡法によるタンパク質の構造解析

米倉 功治

タンパク質の立体構造の解析にはX線結晶回折法や核磁気共鳴 (NMR) 法が広く用いられている。前者は小さくともサブミリメートル以上の大きさの良質な結晶が必要であり、後者は解析できるタンパク質の分子量が通常数万以下に限られる。一方、電子顕微鏡法ではタンパク質一分子の解像をすることができ、試料の形態、分子量による制限は緩い。生体には非常に大きなタンパク質複合体を形成し機能しているものや、膜タンパク質のように良質な結晶作成の困難なものが多い。細菌の遊泳のための回転モーターであるべん毛は、約25種類のタンパク質からなる超分子複合体である。それは、細胞の外膜と内膜を貫く基部体、トルク生成に関わるイオンチャネルや、細胞外には10 μm 以上に達するべん毛繊維、べん毛繊維先端のキャップタンパク質などから構成される。^{1,2)} このような超分子複合体の構造の解明には電子顕微鏡法が適しており、また必須でもある。本稿ではバクテリアべん毛を例として、低温電子顕微鏡法によるタンパク質の構造解析について概説する。

特 徴

電子顕微鏡によるタンパク質の観察に従来から行われてきた負染色法では、試料をウランやタングステンなどの重金属塩で染色し乾燥させるので、染色むらや試料の変性は避けられなかった (図 1b)。一方、低温電子顕微鏡法では、試料溶液を試料グリッドに乗せ余分な溶液を

吸いとり、液体エタンや液体プロパン中で急速凍結した後 (氷包埋法)、そのまま低温に保ち電子顕微鏡内に移すことで、非染色の水和した状態という生理的な環境で試料を観察することができる (図 1c)。^{3,4)} 低温にすることによって電子線による試料損傷を大幅に低減できるが (室温での観察に比べ液体窒素温度で 1/10, 液体ヘリウム温度で 1/20), それでもまだ試料損傷は深刻な問題で、分解能を制限する主因である。電子線照射により試料は質量欠損を起こすと共に、ラジカルを生成する。生成し

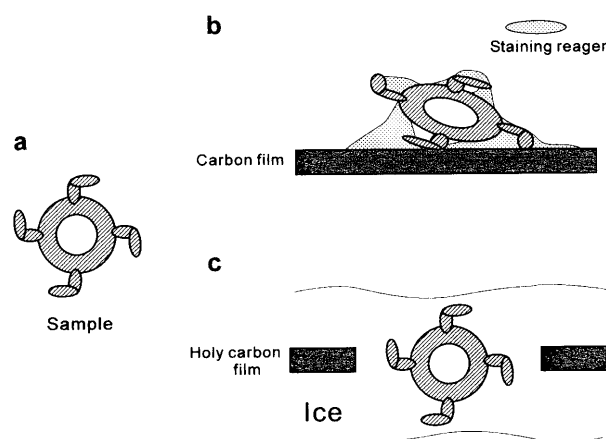


図1. 負染色法と氷包埋法での試料の状態の比較. a: 生理的環境下でのタンパク質試料. b: 負染色法. c: 氷包埋法. 負染色法では、試料を重金属塩で染色し乾燥させるので、染色むらや変性が起こる。一方、氷包埋法では水溶液中の生理的な環境下で試料を観察することができる。

著者紹介 大阪大学大学院生命機能研究科 (助手), 科学技術振興事業団 ICORP 超分子ナノマシンプログジェクト
〒619-0237 京都府相楽郡精華町光台3-4 松下電器産業㈱先端技術研究所内
TEL. 0774-98-2543 FAX. 0774-98-2575 E-mail: yone@fbs.osaka-u.ac.jp