

(大阪大学蛋白質研究所)・京極 好正

NMRによって立体構造を決める手順:

蛋白質の立体構造と言えば、これまではX線結晶解析によるデータしか無かった。しかし、これは結晶ができないことには対象とならないし、結晶中の構造であるから、果して生物的に活性のある構造なのかと疑問がある。そのために溶液中での立体構造を決める手法の開発が待たれていた。近年、ある条件を満たしていれば、NMRによって小さな蛋白質や生物活性ペプチドの構造を決めることが可能となった。その手順は以下の通りである。

(1) シグナルの帰属: 数100個から1000個近いプロトンシグナルの各々を、蛋白質中のどのアミノ酸のどのプロトンに由来するかを決めることを行なう。測定には2次元NMRの各方法を駆使する。

(2) 空間的な距離の情報の収集: NOESYの交叉頂ピークの強度は、対応する2つのプロトン間の空間的な距離の6乗に逆比例する量である。同時にまた各局所の運動性をも反映しているが、それは一定または、主鎖と側鎖とで違うと言った程度の区別のみ考える。

(1)の段階でシグナルの帰属がついていれば、どのプロトンとどのプロトンとが何オングストローム位現われていると言ったことがわかる。

(3) ディスタンスジオメトリーによる構造の決定: (2)で得られたプロトン間の距離の情報をもとにして分子モデルで構造を組み立てることもできる。それを定量的に行なうには、距離の情報を与えて、各原子の座標を決めることであり、その方法をディスタンスジオメトリーと言う。計算する場合、最初に任意の構造の座標を与え実測の距離の情報を満足させるように、その差を縮めるように座標を変えて行く。別の初期値を与え何回か計算を行って集計して得た構造を重ね合わせて表示する。

立体構造決定に要求される要件:

この方法で構造の決められたものの中で最も分子量の大きいのはアミノ酸数74のラーゼインヒビターのランダムスタットであるが、現在進行中のものではアミノ酸数100位のものもある。単に分子量だけでなく、2量体になっていないとか、構造が堅く、pH4位でも安定(NHの交換の遅いpH4位で測定する場合が多い)といったことが要求され、どんな蛋白質にでも適用できるというわけには行かない。ハード的にはできるだけ高分離、高感度の装置、水の吸収線のないきれいな磁場、容量の大きいディスク、ディスタンスジオメトリーの計算のできる高速の電算機を利用できること等が要求される。

蛋白質の構造研究におけるNMRの問題点と今後:

NMRで立体構造が決められる限界は現在分子量1万程度である。この壁を破る努力が今後も続くであろう。装置的には磁場をさらに上げて行く試みがされるだろうが、何か画期的な工夫が無い限りこれ以上磁場の高い装置が簡単に現われるとも思えない。次の工夫は、各種パルステクニックの創意創設であろう。最近では3次元NMRと言われるようなものも現われて来て有望であるが、えてして複雑なパルス法は、試料が少ない生体系の測定にとっては感度等の問題で実用的でない場合も多い。もう一つの活用はデータ処理による分離や帰属の簡素化である。この進展は最近眼を見張るものがあり、今後蛋白質のNMRには測定装置本体はもとより、付属のデータ処理設備の充実が必須になるであろう。試料の面からの挑戦は、安定同位体標識の活用である。それと各種のパルステクニックが関連して徐々に分子量の枠を拡げて行くのが今後の展開の方向であろう。