

業績紹介：常磁性プローブを用いた糖鎖立体構造の NMR 解析法の開発

加藤晃一

(自然科学研究機構・A01 計画研究代表者)

論文題目："Paramagnetic lanthanide tagging for NMR conformational analyses of N-linked oligosaccharides"

著者：Sayoko Yamamoto, Takumi Yamaguchi, Máté Erdélyi, Christian Griesinger, and Koichi Kato

雑誌巻号：Chem. Euro. J. 17, 9280–9282 (2011)

糖鎖は内部運動の自由度に富み、水溶液中では一定のコンフォメーションをとっていない。そのため糖鎖の生物機能の分子科学的基盤に関する理解を深めるためには、その動的な 3 次元構造について精密な情報を収集することが不可欠である。しかしながら、水溶液中で揺らいでいる糖鎖に対して分子科学的なアプローチを行うことは、これまで困難であった。私たちはこの問題の解決に向け、溶液 NMR による糖鎖の立体構造およびダイナミクス解析のための新規手法の開発に取り組んでいる。タンパク質の構造学的研究においては、核オーバーハウザー効果 (NOE) を利用した NMR による立体構造解析法が確立されている。一方、糖鎖は一般にプロトン密度が低いため、近距離にあるプロトン間の距離情報を反映する NOE を観測し、これに基づいて構造解析を行うことは容易ではない。そこで本研究では、新たにランタノイドイオンを利用した常磁性プローブを活用し、常磁性 NMR による解析を行った。

ランタノイドイオンの導入により、溶液 NMR において擬コンタクトシフト (PCS) をはじめとする常磁性効果の観測が可能となる。PCS は、固定化した常磁性イオンと各原子の間の距離と角度に依存した化学シフトの変化として観測され、NOE とは異なるロングレンジの構造情報を与えることが知られている。この手法を応用した糖鎖の NMR 解析法を確立するため、タンパク質を修飾する N 型糖鎖に共通なコア構造であるジアセチルキトビオース (GlcNAc β 1-4GlcNAc) を用い、その還元末端へ新規に合成した EDTA 誘導体を連結した。得られた試料に対して 1 当量のランタノイドイオンを添加することで常磁性プローブを所定の位置へ導入することに成功し、安定な 1:1 複合体の形成に

伴って NMR スペクトル変化が確認された。そこで、 ^1H - ^{13}C HSQC 測定により、糖鎖の各水素および炭素原子の化学シフト変化を求めた。その結果、期待通り、常磁性プローブに近接する還元末端側において最も大きな PCS 値が観測された (図)。さらに詳細な解析を行うために、分子動力学計算により求めたジアセチルキトビオースの安定構造をもとに PCS の実験値と計算値を比較したところ、両者は非常に良い一致を示した。このことから、ランタノイドの導入による糖鎖構造への影響はみとめられず、本方法を用いることで、水溶液中の糖鎖の立体構造情報を新たに取得できることが明らかとなった。

常磁性プローブの導入により、PCS に加え、常磁性緩和増強、残余双極子相互作用などを利用した NMR 測定が可能となる。これらの各種常磁性効果を系統的に解析することで、水溶液中における糖鎖の動的な構造情報が得られるものと期待される。現在、より巨大で複雑な糖鎖について本手法を応用し、その立体構造と揺らぎを明らかにすることに取り組んでいる。

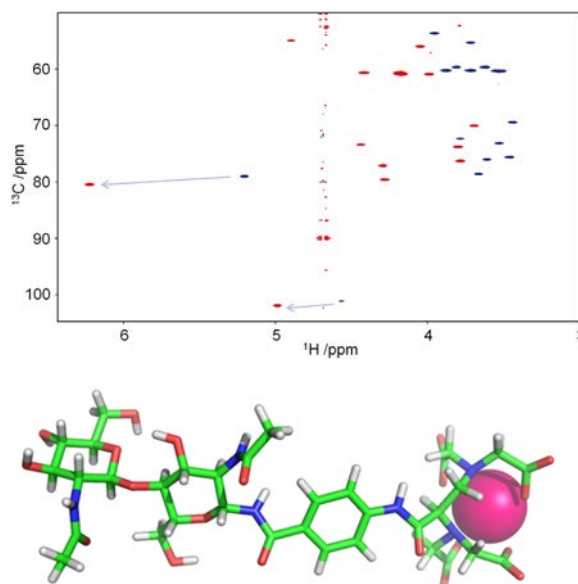


図 常磁性プローブの導入による ^1H - ^{13}C HSQC スペクトルの変化 (上) およびジアセチルキトビオースのモデル構造 (下)。青色は La^{3+} 添加時、赤色は常磁性ランタノイドである Tm^{3+} 添加時のスペクトル。アノマー位のピークの変化を矢印で示した。

業績紹介：均一な糖鎖を発現する遺伝子改変酵母を利用した安定同位体標識法

加藤晃一

(岡崎統合バイオ・A01 計画研究代表者)

論文題目："Overexpression of a homogeneous oligosaccharide with ^{13}C labeling by genetically engineered yeast strain"

著者：Yukiko Kamiya, Sayoko Yamamoto, Yasunori Chiba, Toshihiko Kitajima, Yoshifumi Jigami, and Koichi Kato
雑誌巻号：J. Biomol. NMR 50, 397-401 (2011)

タンパク質を修飾する糖鎖は、分子の安定性を向上させるのみならず、糖鎖を認識するタンパク質との相互作用を通じて、細胞間接着等の生体機能を担っている。近年、細胞内の糖タンパク質の輸送経路において、高マンノース型糖鎖がそれを担うタンパク質の“品質”を表示するタグとしての役割を果たしていることが明らかとなってきた。この機構において、糖鎖は分子シャペロン、積荷輸送体としての機能を持つ一連のレクチンによって認識されることにより、糖タンパク質のフォールディング・輸送・分解といった運命の決定に関わっている [1]。糖鎖が担うこうした生物学的メッセージはその3次元構造を通じて表現されているに相違ないが、糖鎖は内部運動が自由度に富んでいるため、X線結晶構造解析をはじめとする一般的手法を用いて構造生物学研究を行うことが難しい。こうした状況のもと、我々は糖鎖の立体構造をその動的な性質も含めて解明するために、超高磁場NMRを用いた解析手法を開発することを目指している。本論文では、NMRによる糖鎖構造の精密解析を行うための第一歩として、酵母変異体を用いて安定同位体標識を施した高マンノース型糖鎖を均一かつ大量に調製する方法を発表した。

糖転移酵素および糖分解酵素をコードする3つの遺伝子(*Och1*, *Mnn1*, *Mns1*等)を欠損させた*Saccharomyces cerevisiae*の変異株を用いることにより、酵母糖タンパク質上に均一に高マンノース型糖鎖M8Bを発現させることを試みた。さらに、本変異酵母を $^{13}\text{C}_6$ グルコースを炭素源として含む培地で培養することによって、M8B糖鎖を ^{13}C で均一に標識した。得られた酵母糖タンパク質から調製したM8Bについて920MHzのNMR装置

を用いた測定を行ったところ、本糖鎖を構成する全ての炭素についてC-H相関ピークを高分解能で観測することができた(図)。さらに糖残基中の特定の部位を選択的に ^{13}C で代謝標識した一連の試料を用いて超高磁場計測を行うことにより、得られたNMR信号の帰属を行うことに成功した(図)。

本方法の成功により糖鎖の立体構造とそのダイナミクスについて精密解析を行う道が拓けた。

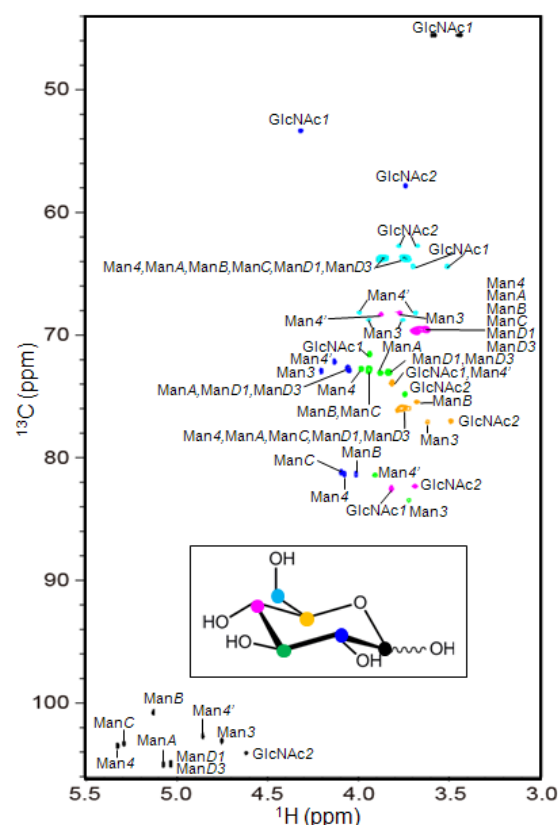


図 酵母の代謝系を利用して調製したピリジルアミノ化高マンノース型糖鎖 M8B の ^1H - ^{13}C HSQC スペクトル。部位選択的に ^{13}C 標識した M8B のスペクトルを重ね合わせた。標識部位は炭素源であるグルコース上にスペクトルに対応する色で示した。

参考文献

[1] Y. Kamiya et al., *Glycobiology Research Trends*, 27, 27-40 (2009)

業績紹介：スクリュー運動が T4 ファージタンパク質 gp5 の多機能性を制御する

北尾彰朗

(東京大学分生研・A01 公募研究代表者)

論文題目: "Screw motion regulates multiple functions of T4 phage protein gene product 5 during cell puncturing"

著者: Wataru Nishima, Shuji Kanamaru, Fumio Arisaka and Akio Kitao

雑誌巻号: *J. Am. Chem. Soc.*, **133**(34), 13571-13576 (2011).

T4 ファージは、大腸菌に感染し増殖するウィルスの 1 つである。T4 ファージの感染は、T4 ファージが細胞膜に到達した後に、先端にある蛋白質 gp5 (gene product 5) が DNA 注入の為に穴を開けるところから開始される。尾鞘と呼ばれる部位が収縮することによって gp5 が回転しながら押し出され、細胞膜を貫通する。gp5 は、3 量体を形成する蛋白質で、 β -ヘリックスドメインと呼ばれる構造ユニットが細胞の外膜に穴を開けるドリルの役割を果たし、リゾチームドメインが内部のペプチドグリカン層を破壊すると考えられている。

この過程を観察するために行った約 90 万原子からなる巨大システムの大規模分子動力学シミュレーションによって、我々は gp5 が一定のスクリュー運動をするにも関わらず、異なる複数の機能を順番に発揮することを示した。 β -ヘリックスは細胞膜穴をあけるだけでなく、電荷アミノ酸残基を利用してドリルの溝のように脂質を上運んでいく役割を果たしていることが見出された。リゾチームドメインはペプチドグリカン層を破壊するだけでなく、穴を更に大きくし、穴が開いた後で β -ヘリックスを解離するように制御していることが分かった。リゾチームドメインの活性部位は、貫通が終わるまで脂質が結合しないようにタンパク質のリンカー部位によって覆われていることも明らかになった。

タンパク質 gp5 が持つ複数の機能は、分子間相互作用が次第に変化していくことによって生み出される。これが 1 種類のタンパク質が一定のスクリュー運動によって、順序良く複数の機能を発揮し感染を容易にするという役割を果たすメカニズムである。リゾチームドメインの機能は、1 つの酵素機能をもつタンパク質

がマルチドメインタンパク質の中で、複数の機能を獲得した興味深いケースだと考えられる。

この論文は、[Virus uses "Swiss Army Knife" protein to cause infection](#) として ACS News Service Weekly PressPac: August 17, 2011 でも紹介されました。

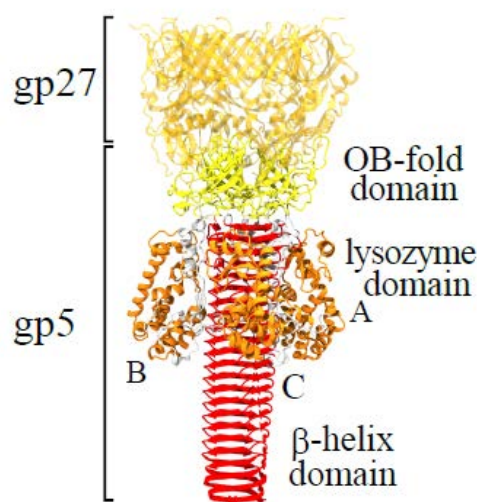


図 タンパク質 gp5 と結合する gp27 の立体構造

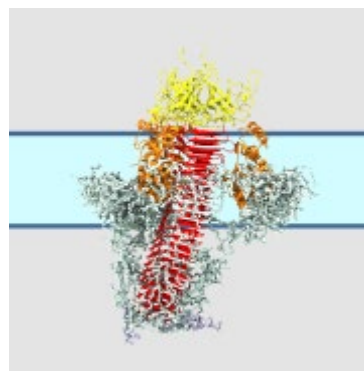


図 膜貫通途中のスナップショット

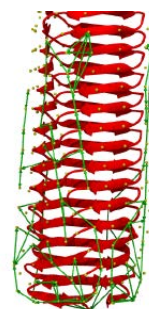


図 β -ヘリックス上での脂質の移動経路

業績紹介：回転子のない F_1 -ATPase が“回転”することを 1 分子観察で証明

飯野亮太（東大院工・A03 公募研究代表者）

論文題目："High-speed atomic force microscopy reveals rotary catalysis of rotorless F_1 -ATPase"

著者：Takayuki Uchihashi, Ryota Iino, Toshio Ando, Hiroyuki Noji

雑誌巻号：Science 333, 755-758 (2011)

F_1 -ATPase (F_1) は ATP 合成酵素の一部であり ATP を加水分解しながら回転する。 F_1 が回転モーターとして機能する最小単位は $\alpha_3\beta_3\gamma$ 複合体で α , β サブユニットが 3 つずつ交互に並んで作る $\alpha_3\beta_3$ 固定子リングに回転子の γ サブユニットが突き刺さっている。ATP 加水分解反応の触媒部位は α - β 界面 (図 1A の矢印) に存在し, ATP 結合に寄与するアミノ酸残基のほとんどは β サブユニットに存在する。結晶構造中の 3 つの β は結合しているヌクレオチド状態が異なり, ATP または ADP を結合した 2 つの β は“閉じた構造”、ヌクレオチドを結合していない 1 つの β は“開いた構造”をとっている。このため β は開いた状態と閉じた状態に大きく構造が変化し, この構造変化が γ の回転を駆動すると考えられている。それぞれの β は回転子 γ が反時計回りに 360° 回転すると 1 回の ATP 加水分解反応を完了してリセットされる。3 つの β の化学反応と構造変化のタイミングは巧みに制御されており, 位相がお互いに 120° ずれている。 γ が一方方向に回転するためには, このタイミングの制御が重要だと考えられる。

F_1 の結晶構造をみると, 閉じた β は γ を押しているように見え, 開いた β は γ に押されているように見える。この“押し引き”がタイミングの制御に重要である、というのがこれまで最も有力な説であった。このモデルでは一方方向への回転の実現には γ と β の相互作用が必須となり, 非対称な形をした γ の回転角度が決まれば 3 つの β の状態は自動的に規定される。いわば γ が 3 つの β の化学反応と構造変化のタイミングを支配する, “独裁者”としての役割を果たす。しかしながら最近, γ を削って β との接触点を減らしても一方方向に回転するという報告がなされた。そこで我々は高速原子間力顕微鏡を用い, 回転子のない F_1 の $\alpha_3\beta_3$ 固定子リングが一方方向に“回転”できるのかを直接検証した。

$\alpha_3\beta_3$ 固定子リングの N 末端側をマイカ基板表面に共有結合で固定し, 大きく構造変化する C 末端側を 80 ミリ秒の時間分解能で観察した。ATP 存在下では 3 つの β のうち 1 つのみが開いた非対称な構造をみせ, β の開閉のダイナミックな構造変化が観察された。特筆すべきは, 開いた β が閉じると反時計回り方向にある閉じた β が同時に開くという協同的な構造変化が見られた点で, 時間経過とともに β の開閉が反時計回りに遷移していく様子が明確に観察された (図 1B)。

これまでの説とは異なり, F_1 の一方方向性回転を支える構造的基盤は $\alpha_3\beta_3$ 固定子リングに内蔵されていることが証明された。一方で γ なしの $\alpha_3\beta_3$ リングの一方方向回転の効率や速度は, γ ありに比べ低下していることも確かであった。正確で速い回転触媒反応の実現には $\alpha_3\beta_3$ リング間の相互作用だけでなく回転子 γ と固定子の相互作用も“同等に”重要であると考えられた。

また今回の結果は, F_1 に似た 6 量体リング構造を持つが回転子を持たない RecA ファミリーおよび AAA+ ファミリータンパク質もリングを形成するサブユニット同士が協同的に働くことを強く示唆する。今後はこれらのタンパク質ナノマシンを高速 AFM で観察し F_1 との共通点や相違点を明らかにしたい。

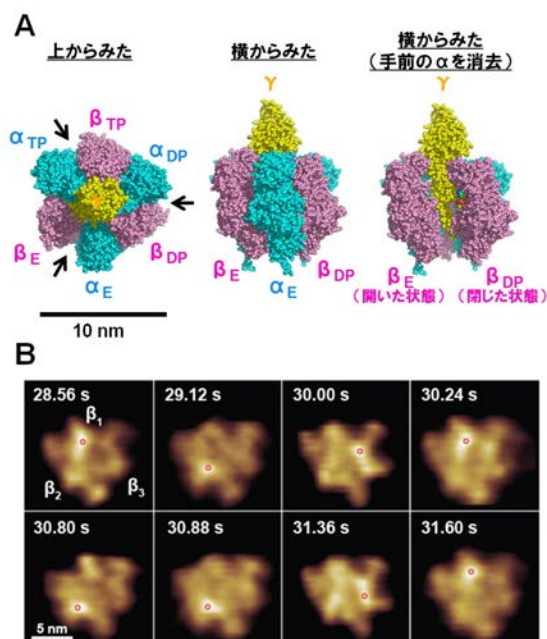


図 1. F_1 の結晶構造 (A) と回転子 γ のない $\alpha_3\beta_3$ 固定子リングの“回転”の高速 AFM 像 (B)。