

^{15}N 核スピンの緩和測定法によるリゾチーム変異体の動的構造解析

関西学院大学大学院理工学研究科
物理学専攻 瀬川研究室 吉田篤史

野生型のニワトリ卵白リゾチームは4本のS-S結合によって立体構造が安定化されている。このS-S結合をアミノ酸置換することによって欠損させた変異体をタンパク質の折りたたみ過程の中間体として位置づけ、その構造をNMR分光法によって研究してきた。リゾチームS-S結合欠損変異体はS-S結合を欠損させる本数・部位によって、その構造は大きく変化する。本研究対象はCys6-Cys127(SS1)とCys30-Cys115(SS2)を残した2SS(1+2)変異体である。2SS(1+2)変異体は立体構造を保持しているものの、重水素交換反応に対するProtection Factorを測定することによって、ドメインの構造が柔らかくなっているという結果が得られている。この事実をタンパク質の動的構造を直接測定するという観点から明らかにすることが本研究の目的である。

2SS(1+2)変異体の内部運動を調べるために ^{15}N 核スピンの緩和測定法による動的構造解析を行った。 ^{15}N 核スピンの緩和を測定することで、タンパク質の骨格構造の揺らぎを測定することができる。 ^{15}N 核スピンの縦緩和速度(R1)、横緩和速度(R2)、異種核NOE()を測定し、その3つの実験値から、分子の全体運動と内部運動を解析するために、Model freeアプローチという手法を用いて解析した。この解析法のポイントは、回転拡散による自己相関関数 $g(t)$ を分子全体の回転による寄与と、内部運動の寄与の2つの項の和で表すことである。分子全体の回転相関時間 τ_c 、局所的な内部運動の回転相関時間 τ_e とし、分子全体の運動の割合を S^2 、局所的な運動の割合を $(1 - S^2)$ として、 S^2 をオーダーパラメーターと呼ぶ。すなわち、Model freeアプローチでは $g(t)$ を

$g(t) = S^2 \exp(-\frac{t}{\tau_c}) + (1 - S^2) \exp(-\frac{t}{\tau_e})$ と近似する。ここで $\frac{1}{\tau} = \frac{1}{\tau_c} + \frac{1}{\tau_e}$ である。 $g(t)$ をフーリエ変換して得

られるスペクトル密度関数 $j(\omega) = \frac{2S^2\tau_c}{1 + \omega^2\tau_c^2} + \frac{2(1 - S^2)\tau_e}{1 + \omega^2\tau_e^2}$ を用いてR1、R2、 η を次のように表すことができる。

$$R1 = \left(\frac{\mu_0 \gamma_H \gamma_N \hbar}{4\pi r^3} \right)^2 \left[\frac{3}{20} j(\omega_N) + \frac{3}{10} j(\omega_H + \omega_N) + \frac{1}{20} j(\omega_H - \omega_N) \right] + \omega_N^2 (\Delta\sigma)^2 \left[\frac{1}{15} j(\omega_N) \right]$$

$$R2 = \left(\frac{\mu_0 \gamma_H \gamma_N \hbar}{4\pi r^3} \right)^2 \left[\frac{1}{20} j(0) + \frac{3}{20} j(\omega_H) \right] + \frac{1}{2} R1 + \omega_N^2 (\Delta\sigma)^2 \left(\frac{2}{45} j(0) \right) + \pi R_{ex}$$

$$\eta = \frac{I_Z^{sat}}{I_Z^{eq}} = 1 + \left(\frac{\mu_0 \gamma_H \gamma_N \hbar}{4\pi r^3} \right)^2 \frac{\gamma_H}{\gamma_N} \frac{1}{R1} \left[\frac{3}{10} j(\omega_H + \omega_N) - \frac{1}{20} j(\omega_H - \omega_N) \right]$$

以上の結果は2スピン系におけるソロモン方程式を解いて得られる。緩和は ^1H と ^{15}N 核スピン間の双極子相互作用によって起きるため、その大きさを表す係数 $\left(\frac{\mu_0 \gamma_H \gamma_N \hbar}{4\pi r^3} \right)^2$ が掛かっている。 $j(\omega_N)$ が1量子遷移、 $j(\omega_H + \omega_N)$ が2量子遷移、 $j(\omega_H - \omega_N)$ が0量子遷移に対応したスペクトル密度関数である。縦緩和と横緩和には違いがある。局所磁場のXY成分の揺らぎだけが縦緩和を促進させるのに対し、局所磁場のZ成分の揺らぎも横緩和を引き起こす。局所磁場のZ成分の揺らぎによる緩和がR2の第1項である。XY成分の揺らぎによる緩和は第2項に入っている。 $\Delta\sigma$ は化学シフト異方性に対応した項である。しかし、測定値R1、R2、 η から上の式を解いて、直接 τ_c 、 τ_e 、 S^2 を求めることは困難である。そのため、次のような手法を用いた。横緩和速度と縦緩和速度の比R2/R1は τ_c 、 τ_e 、 S^2 にほとんど依存せず、ほぼ η のみに依存しているという特徴がある。R2/R1を η 、 τ_c 、 S^2 をパラメーターとして計算したものが図1である。

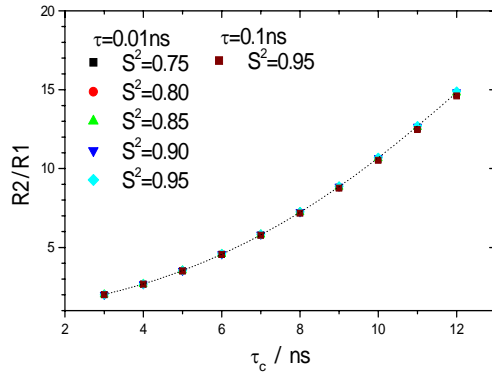


図1 R2/R1 の S^2 依存性

$\tau=0.01\text{ns}$ に固定し、 S^2 を変化させた。
 黒 $S^2=0.75$ 、赤: 0.80 、緑: 0.85 、青: 0.90 、
 水色: 0.95 を示す。
 $S^2=0.95$ 、 $\tau=0.1\text{ns}$ を茶色でプロットした。
 横軸は τ_c 、縦軸は $R2/R1$ の値である。

このグラフから $R2/R1$ は S^2 にほとんど依存していないことが分かる。全残基に対する $R2/R1$ の測定値の平均値から、図1を用いて τ_c を決定した。それを図2に示す。

本研究では比較対象として標準サンプルである4SS体に対しても測定を行った。図2を見ると、温度上昇に伴い τ_c の値は小さくなっていく。これは分子全体の回転運動が活発になっていることを意味している。

また、各温度における2SS(1+2)変異体の τ_c の値は、4SS体のものより0.5ns程度大きくなっている。これは2SS(1+2)変異体の構造が柔らかいため、4SS体に比べて、分子半径が増大しているためだと考えられる。

$R2/R1$ から求められた τ_c を代入し、 S^2 、 τ_c をパラメーターとして、 $R1$ 、 τ_c を計算したものが図3である。このグラフに $R1$ と τ_c の測定値をプロットして、 S^2 、 τ_c を決定した。

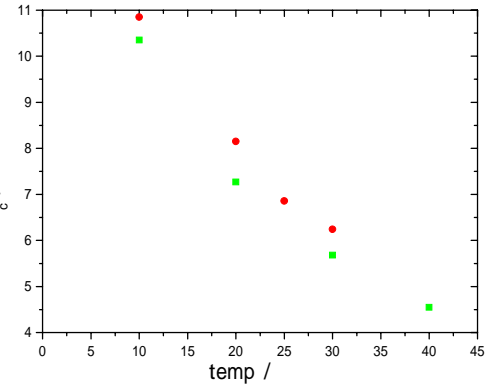
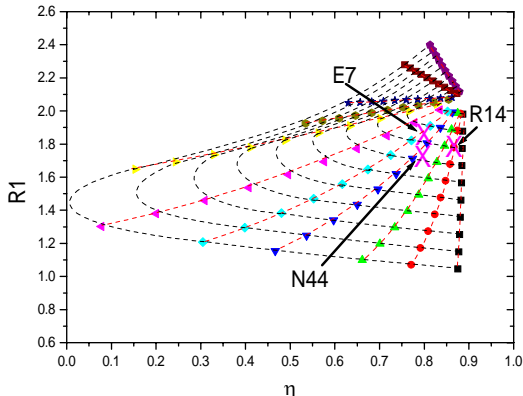


図2 τ_c の温度依存性

4SS体の τ_c の値を緑色、2SS(1+2)変異体の τ_c の値を赤色でプロットした。
 横軸は温度、縦軸は τ_c の値である。



残基N44の場合
 $R1=1.754$ なので
 $\tau_c=0.775$
 $S^2=0.82$ と求まる。
 $\tau_c=0.04\text{ns}$

図3 $\tau_c=5.7\text{ns}$ における $R1$ vs S^2 依存性

$\tau_c=5.7\text{ns}$ を固定し、 S^2 を0.50から0.95まで0.05刻みに変化させた。黒: $\tau=0.001\text{ns}$ 、
 赤: 0.01ns 、緑: 0.02ns 、青: 0.04ns 、
 水色: 0.06ns 、桃: 0.1ns 、黄: 0.4ns 、
 黄土: 0.8ns 、紺: 1.0ns 、茶: 1.5ns 、紫: 2.0ns
 を示す。横軸は τ_c 、縦軸は $R1$ の値である。

2SS(1+2)変異体と4SS体に対し、残基毎の S^2 を比較したものを図4に示す。ドメインの領域(残基番号40-87の領域)において、2SS(1+2)変異体の S^2 は小さくなっていることが分かる。このことから2SS(1+2)変異体のドメインでは、分子全体の運動とは異なる局所運動の寄与が大きいことが分かる。このように動的構造の観点からも2SS(1+2)変異体のドメインの構造は柔らかく、大きく揺らいでいることを示すことができた。また、この結果は分子動力学シミュレーションとも良い一致を示している。

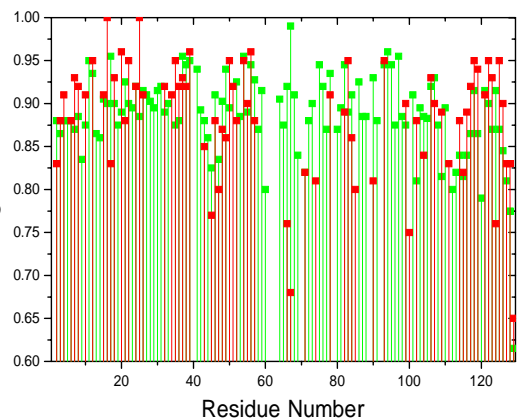


図4 4SS体と2SS(1+2)変異体の S^2 の比較
 緑が4SS体、赤が2SS(1+2)変異体、pH3.8、25°Cにおける S^2 の値を棒グラフで表した。
 横軸は残基番号を表す。