

**ZZ exchange** 法による“見えない”分子間  
相互作用のダイナミクス解析  
サントリー生有研・第1研究部 ○菅瀬謙治

Probing “invisible” molecular interactions by ZZ-exchange spectroscopy  
*Div. of Spectrosc. Struct. Res., Suntory Inst. for Bioorg. Res., Kenji Sugase*

We have developed a new method to analyze dynamics of molecular interactions utilizing ZZ-exchange spectroscopy and applied it to binding of the B1 domain of protein G (GB1) to immunoglobulin G (IgG). A prerequisite for ZZ-exchange experiments is that both free and bound resonances are observable at the same time, but no NMR signal was observed for the bound state of GB1 due to its high molecular weight in complex with IgG, meaning that GB1-IgG interaction is “invisible” to NMR. However, we could determine the association and dissociation rates by analyzing ZZ-exchange profiles of free GB1 resonances collected with samples containing no IgG or sub-stoichiometric amounts of IgG. This method is potentially applicable to a wide range of biomolecular interactions, especially in the rather common case where bound signals are unobservable due to high molecular weights or intermediate exchange.

### 緒言

近年、生体分子の機能を詳細に理解するためには、ダイナミクス解析が不可欠と認知されつつある。そして現在のところ、そのための手法として緩和分散法が最もパワフルなダイナミクス解析法として名声を得ている<sup>1,2)</sup>。しかしながら、緩和分散法は、大きな化学シフト変化(構造変化)を伴う反応を解析するための手法であるため測定対象を限定する。たとえば分子間相互作用の場合、結合に伴う化学シフト変化が非常に小さい球状タンパク質や交換速度が非常に遅い(結合が非常に強い)系を苦手とする。そこで、本研究では、緩和分散法よりも遅い時間領域を扱うことができ、かつ化学シフト変化を必要としない ZZ-exchange 法<sup>3)</sup>を利用して、分子間相互作用のダイナミクスを解析するための新規方法論を開発した。従来の ZZ-exchange 実験では、遊離状態と結合状態の NMR シグナルが同時に観測されることを前提条件とするが、今回開発した手法では、ZZ-exchange カーブの濃度比依存性を解析することにより、結合状態の NMR シグナルなしでも解析を可能とした。この手法を免疫グロブリン G (IgG) に結合するプロテイン G の B1 ドメイン (GB1) に適用し、結合速度定数  $k_{on}$  と解離速度定数  $k_{off}$  の決定に成功した。なお GB1 の結合状態の NMR シグナルは、見かけの分子量が非常に大きいため観測できなかった。さらに緩和分散法では、GB1 の構造変化が小さく、かつ結合-解離速度が遅すぎるため、GB1-IgG 相互作用を解析できなかった。

ZZ-exchange 法、緩和分散法、分子間相互作用、ダイナミクス

すがせけんじ

## 理論

ZZ-exchange 法は縦緩和速度実験であるため、化学シフトの影響を受けない。さらに生体高分子の場合、縦緩和速度は横緩和速度よりも遅いため、ZZ-exchange 法では、緩和分散法(横緩和速度実験)よりも遅い時間領域のダイナミクスを解析できる。すなわち、ZZ-exchange 法を用いると、緩和分散法が苦手とする球状タンパク質の結合イベントや非常に結合の強い系を解析できる。ただし、従来の ZZ-exchange 実験では、カーブフィッティングにより得られる解を1つに絞るため、遊離状態と結合状態の NMR シグナルに加えて2つの交換シグナル(遊離→結合、結合→遊離)から得られる4つ(少なくとも3つ)の ZZ-exchange プロファイルが必要とする<sup>3)</sup>。ゆえに、分子量の制限などの理由から結合状態のシグナルが観測不可能な場合、交換シグナルも観測不可能なため、ZZ-exchange 法を用いることができない。しかし、遊離シグナルの ZZ-exchange プロファイル  $I_F(t)$  は、2状態モデル(A + B ↔ A:B)の場合、以下の式で示すようにタンパク質の濃度[A]<sub>0</sub>と[B]<sub>0</sub>に依存する。さらに[B]<sub>0</sub>を0に設定すると、 $I_F(t)$ は遊離状態の縦緩和速度  $R_{IF}^0$  だけにより決定される ( $I_F(t) = I_F(0)\exp(-R_{IF}^0 t)$ )。

$$I_F(t) = \frac{1}{\lambda_+ - \lambda_-} \left[ (\lambda_+ - R_{IF}^0 - [B]k_{on}) \exp(-\lambda_+ t) - (\lambda_- - R_{IF}^0 - [B]k_{on}) \exp(-\lambda_- t) \right] I_F(0)$$

$$\lambda_{\pm} = \frac{1}{2} \left[ R_{IF}^0 + R_{IB}^0 + [B]k_{on} + k_{off} \pm \sqrt{(R_{IF}^0 - R_{IB}^0 + [B]k_{on} - k_{off})^2 + 4[B]k_{on}k_{off}} \right] \quad (1)$$

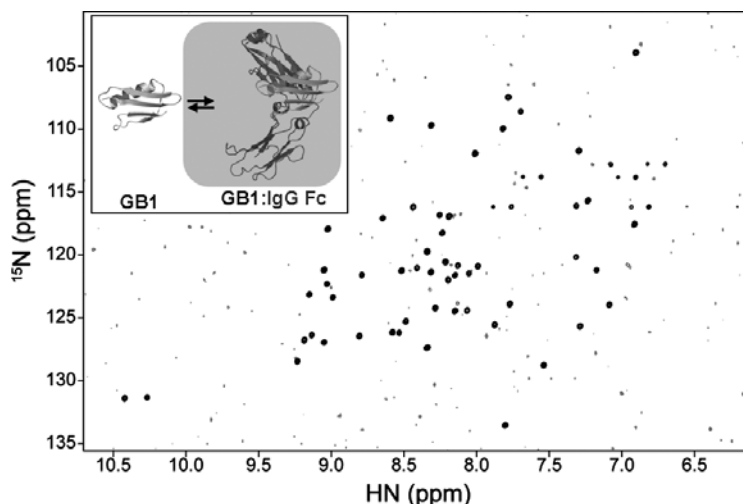
$$[B] = \frac{1}{2} \left[ -K_D - [A]_0 + [B]_0 + \sqrt{(K_D + [A]_0 - [B]_0)^2 + 4[B]_0 K_D} \right]$$

したがって、ターゲット分子を含まない完全な遊離状態のサンプルと、ターゲット分子をわずかに加えたサンプルを複数調整して ZZ-exchange 実験を行い、得られた遊離シグナルの ZZ-exchange プロファイルを式(1)で解析することによって、結合速度定数  $k_{on}$  と解離速度定数  $k_{off}$ 、延いては解離定数  $K_D (= k_{off}/k_{on})$  を決定することができる。

## 実験

GB1(56 残基)は IgG 中に2つ存在する Fc 領域それぞれに1分子ずつ結合する。遊離状態では、上質な NMR スペクトルを得ることができたが、IgG 結合状態では、見かけの分子量(~160 kDa)が非常に大きくなることもさることながら、IgG 過剰時に生じる非特異的な相互作用のために粘性が高くなり、結合状態の NMR シグナルはほぼ何も観測されなかった(Fig. 1)。

上述した原理に基づいて、



**Fig. 1 TROSY spectra of GB1.** The free form is shown in black and the bound form in gray. They were collected with Bruker Avance 750 with a cryo-probe at 298 K. The inset represents a schematic model of GB1-IgG interaction, in which only the Fc fragment of IgG is shown. The gray background depicts that this interaction is “invisible” to NMR since GB1 bound resonances are unobservable.

200  $\mu\text{M}$  の $[\text{}^2\text{H}, \text{}^{15}\text{N}]$ -GB1 に対して、0, 0.1, 0.2, 0.3 等量の非標識 IgG を加えたサンプルを調整し、ZZ-exchange 実験を行った。Fig. 2 に GB1 遊離シグナルの ZZ-exchange プロファイルを示す。開始 Met1 を除く全ての残基に対して、濃度比依存的に変化する ZZ-exchange カーブを得ることができた。一方で、結合状態のシグナルと2つの交換シグナルは、何も観測されなかった。

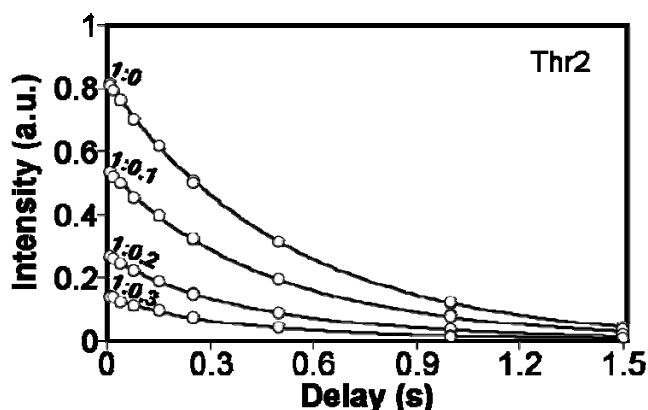


Fig. 2 ZZ-exchange profiles of free GB1 resonances. The annotation for each ZZ-exchange curve represents GB1:IgG concentration ratio.

1:0(=GB1:IgG)のサンプルは、GB1の完全な遊離状態であるため、そのZZ-exchange プロファイルは縦緩和速度  $R_{IF}^0$  だけにより決定される。それ以外のサンプルでは、 $R_{IF}^0$  に結合-解離の速度が加わったため、見かけの縦緩和速度が速くなっている。

なお、同じサンプルで緩和分散実験も行ったが、得られた緩和分散カーブは全てフラットな直線で、GB1-IgG 相互作用のダイナミクスを解析するに至らなかった。

## 結果

Peter E. Wright 教授(The Scripps Research Institute, San Diego)から提供していただいた緩和分散カーブフィッティング用プログラム GLOVE<sup>1,2)</sup>に式(1)を組み込み、GB1 のZZ-exchange カーブの解析を行った。この際に、GB1 と IgG の濃度および  $k_{on}$  と  $k_{off}$  を全ての残基に共通なグローバルパラメータとしてフィッティングを行った。結果、 $k_{on} = 1.55 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ ,  $k_{off} = 2.20 \text{ s}^{-1}$ ,  $K_D = 142.3 \text{ nM}$  と決定することができた。 $K_D$  は等温滴定カロリーメリーにより決定されたものと良い一致を得た。また、この結果から GB1-IgG 相互作用の結合-解離速度は、本実験の条件では、高々  $3.2 \text{ s}^{-1}$  であることが分かった。ゆえに、この相互作用のダイナミクスは、結合に伴う化学シフト変化が小さいだけでなく、交換速度が遅すぎるため緩和分散法では解析できないことが分かった。

次に比較のために、それぞれの ZZ-exchange カーブを個別に  $R_1$  実験の式  $I(t) = I(0)\exp(-R_1 t)$  でフィッティングを行ったが、赤池の情報量基準から、式(1)の方が  $5.30 \times 10^{477}$  倍もっともらしいという結果になった。

## 考察

NMR で分子間相互作用を解析する際に、結合状態のシグナルが観測できないという状況に頻繁に遭遇する。その原因としては、(1)片方の分子を大量に調整できないため結合状態の存在比を上げられない (2)片方(または両方)の分子を過剰に加えると凝集を起こす (3)結合状態の分子量が大きすぎるためシグナルが広幅化する (4)結合-遊離の化学交換により結合状態のシグナルが広幅化する、と言ったことが挙げられる。このような場合でも、わずかにターゲット分子を加えたサンプルであれば、遊離状態のシグナルを観測で

きる場合がある。このようなサンプルでは、たとえ結合状態のシグナルが観測不可能でも、観測可能な遊離状態のシグナルの緩和には、結合-解離の情報も含むため、緩和実験からその相互作用のダイナミクスを解析することができる。本研究では、この考えに基づき、さらに ZZ-exchange 法の特性を活かして、緩和分散法が苦手とする系でも解析できる新規方法論を開発した。緩和分散法だけであれば、解析できる分子間相互作用はペプチドや天然変性タンパク質などの結合に伴う構造(化学シフト)変化が大きいものだけに限られてしまうが、今回開発した手法が加わることにより、広範な分子間相互作用を解析することが可能になったと言える。

#### 参考文献

1. Sugase, K., Dyson, H. J., & Wright, P. E. (2007) *Nature* **447**, 1021-1025.
2. Sugase, K., Lansing, J. C., Dyson, H. J., & Wright, P. E. (2007) *J. Am. Chem. Soc.* **129**, 13406-13407.
3. Farrow, N. A., Zhang, O., Forman-Kay, J. D., & Kay, L. E. (1994) *J. Biomol. NMR* **4**, 727-734.