

高温での溶液NMR測定における蛋白質のNDSBによる安定化

¹群大工, ²三菱化学生命研

○若松馨¹, 石井毅¹, 向隴¹, 細田和男¹, 神谷歩¹, 金子敬輔¹, 榎本舞弓¹, 井上裕介¹, 窪田健二¹, 河野俊之², 行木信一¹

Stabilization of protein by NDSB during NMR measurements at high temperatures

(¹Graduate School of Engineering, Gunma University, ²MITILS)

Kaori Wakamatsu¹, Takeshi Ishii¹, Long Xiang¹, Kazuo Hosoda¹, Ayumi Kamiya¹, Keisuke Kaneko¹, Mayu Enomoto¹, Yusuke Inoue¹, Kenji Kubota¹, Toshiyuki Kohno², Nobukazu Nameki¹

In solution NMR, better sensitivity and resolution are obtained by raising sample temperature, but proteins aggregate at too high temperatures due to thermal denaturation. Because pharmaceutically important proteins tend to aggregate more easily than housekeeping proteins, prevention of protein aggregation is one of challenging tasks in protein NMR. We previously found that non-detergent sulfobetaines (NDSBs) are useful for high temperature NMR measurements of proteins. Here we report the interaction (sites and strengths) of NDSB-195 with acidic fibroblast growth factor (aFGF), and the effects of NDSB-195 on the static and dynamic structures of aFGF. We also report the structure determination in the presence of NDSBs.

【緒言】

蛋白質の凝集はNMRやX線による構造解析で大きなボトルネックになっている。創薬のターゲットとなりうる蛋白質ほど凝集しやすい傾向があるので、蛋白質の凝集を防止することは基礎科学的にも実用的にも重要である。Non-Detergent SulfoBetaine (NDSB) は蛋白質を安定化し凝集を防止する試薬として知られていたが、我々はNDSBがNMR測定においても有用である事を示してきた。本発表では凝集しやすい事が知られている酸性線維芽細胞増殖因子 (acidic FGF) とNDSB-195との相互作用について報告する。また、NDSB存在下でのNMR測定や構造決定についても報告する。

【結果】

(1) aFGF上のNDSBの相互作用部位と相互作用の強さ：

種々のNDSB-195濃度でaFGFの¹⁵N-HSQCを測定することにより、NDSBとの相互作用部位を決定した。NDSBと相互作用するアミノ酸残基の化学構造に強い傾向は観測されず、酸性・塩基性・中性・疎水性全ての残基が影響された。一方、影響された残基の2/3以上は二次構造 (β-strand, ₃₁₀-helix) とループとの接合部位に存在した (Fig. 1)。また、相互作用の見かけの解離定数 (K_d) は0.04–3 Mの広い範囲にわた

凝集 安定性 NDSB 運動性 構造決定

わかまつかおり いしいたけし こうりゅう ほそだかずお かみやあゆみ
かねこけいすけ えのもとまゆ いのうえゆうすけ くぼたけんじ
こうのとしゆき なめきのぶかず

っていた。この値は通常の酵素・基質の親和性 (K_m) より2桁弱いので、NDSBは酵素・基質相互作用を妨害しないと予想される。

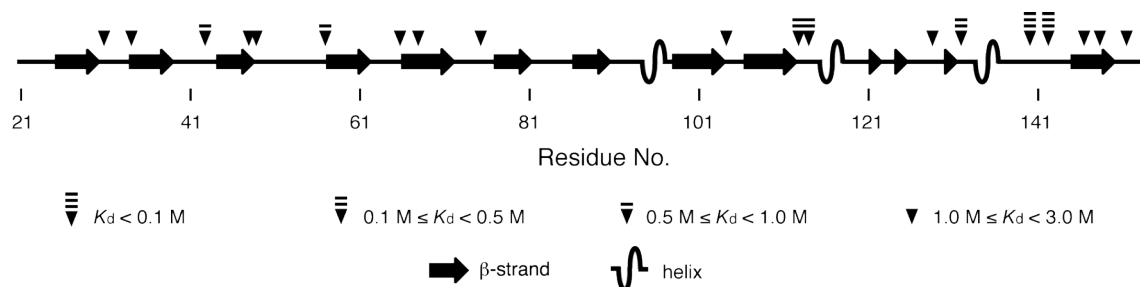


Fig. 1: The residues whose chemical shifts were affected by NDSB-195 with apparent K_d values smaller than 3 M are indicated along the sequence of aFGF. Different affinities of the interaction are indicated by different symbols.

(2) NDSBがaFGFの静的・動的構造に及ぼす効果：

aFGFの遠紫外の円偏光二色性 (CD) スペクトルはNDSB-195を添加しても変化しなかったため、aFGFの二次構造はNDSBにより影響を受けないことがわかった。一方、NDSBの添加により近紫外CDは絶対値が大きくなり、またトリプトファン蛍光も若干強くなった。このことから、NDSBはaFGFの三次構造を安定化していると考えられる。

ps-nsの運動を反映する ^{15}N - ^1H NOEはNDSB-195を添加しても有意に変化しなかった。そこでNDSBはこのタイムスケールの運動に影響しないことがわかった。 μs - ms の運動を反映する ^{15}N の横緩和速度 (R_2) は溶液の粘度にほぼ比例する。0.5 M NDSB-195の添加により溶液の粘度は1.21倍上昇するので、 R_2 も1.21倍上昇する事が期待されたが、実際には1.03倍という小さい上昇が観測された。このことは、aFGFの三次構造が安定化され、コンパクトになった事を反映していると考えられる。

(3) NDSB-195存在下でのNMR測定と立体構造計算：

0.5 M NDSB-195存在下でも主鎖・側鎖のシグナル帰属に必要なNMRスペクトルは問題なく測定でき、帰属も完了した。また、 ^{15}N -edited NOESYも測定できたが、 ^{13}C -edited NOESYにはNDSB-195由来のノイズが強く現れ、多くのNOESYシグナルが観測できなかった。その結果、収束した構造は得られなかった。我々はNDSB-195のアナログ (NDSB-new) とその重水素化物を合成したが、NDSB-newの存在下では ^{13}C -edited NOESYにノイズは現れず、最終的に収束した構造が得られた。そこで、重水素化したNDSB-newは不安定な蛋白質のNMRによる立体構造決定に非常に有用であると期待される。

【参考文献】

L. Xiang, T. Ishii, K. Hosoda, A. Kamiya, M. Enomoto, N. Nameki, Y. Inoue, K. Kubota, T. Kohno, K. Wakamatsu (2008) "Interaction of anti-aggregation agent dimethylethylammonium propane sulfonate with acidic fibroblast growth factor", J. Magn. Reson., 194, 147-151.