

静的構造のさらに先へ。X線溶液散乱：

MAXSによる非リン酸化型ヒト由来キナーゼ： MAP2K4の調節機構時に起こりうる大胆な動きの解明

松本 崇^{*}、山野 昭人^{**、†}、村川 優花^{***}、深田 はるみ^{***}、
澤 匡明^{****}、木下 誉富^{***}

X線小角散乱 (small angle X-ray scattering: SAXS) は、溶液中の蛋白質のサイズや形状を分析するための手法として知られている。標準的なSAXSでは、 $q=0.25\text{\AA}^{-1}$ 程度以下のデータを使用する。このため、SAXSでは、対象分子のサイズの変化、凝集、およそその分子の外形といった情報しか得ることができない。一方、 $q=0.30\text{--}0.75\text{\AA}^{-1}$ 程の中角領域のX線散乱は、分子内のドメイン間距離や二次構造間距離といった溶液中の分子構造及びコンフォメーション変化を解析するための重要な情報を含んでいる。この中角領域のデータを用いることで、より詳細な分子の挙動やコンフォメーション変化を可視化できると考えられる。この重要な中角領域の情報を含む溶液散乱を“middle angle X-ray scattering: MAXS”と名付けた。本稿では、MAXSを用いた構造アンサンブル解析により明らかとなった、溶液中のヒト由来キナーゼ：MAP2K4の構造の“大胆な動き”について紹介する。

1. はじめに

蛋白質は溶液中で局所的あるいは分子全体を柔軟にコンフォメーション変化させており、この柔軟さが機能の発現と密接に関係している。このコンフォメーション変化を理解することは、蛋白質の機能、ひいては生命現象を理解する上で必須条件といえる。蛋白質の立体構造情報を得る手法として、単結晶構造解析や低温電子顕微鏡を用いた単粒子解析が挙げられる。これらの手法は高分解能での構造情報を得ることができる一方で、結晶のパッキング下であったり、凍結条件下にあったりする分子構造のため、蛋白質が実際に機能している溶液中の動きのある構造とはいえない。一方、X線溶液散乱は、結晶化や凍結を必要とせず、溶液状態の試料にX線を照射し測定・解析を行うため、結晶のパッキングや凍結の影響をうけていない本来の蛋白質の構造を分析できる数少ない手法である。特にX線溶液散乱の中でも、分子内のドメイン間相関や二次構造間距離などの情報を含む中角領域 [$q=0.30\text{--}0.75\text{\AA}^{-1}$] を解析に用いることで、より詳細な分子の挙動やコンフォメーション変化の可視化が可能となる⁽¹⁾。この重要な中角領域の距離情報を含む溶液散

乱：middle angle X-ray scattering (MAXS) を用いることで、蛋白質の溶液中の柔軟なコンフォメーション変化を含めた状態変化を捉えることが可能となる。

それでは、実際にどのようなコンフォメーション変化を可視化できるのだろうか。その溶液中の“動き”の解析結果について、ヒト由来MAP2K4を用いて紹介する。MAP2K4は、分裂促進因子活性化蛋白質キナーゼ (MAPK) の一つであり、環境ストレスに応答して細胞分化、アポトーシス、炎症等の生体機能制御機構に携わるJNKおよびp38 MAPKをリン酸化し活性化する、セリン/スレオニンキナーゼである。MAP2K4は発ガン現象に関与しており、皮膚ガンにおいてガン化を促進することが報告されている⁽²⁾。このため、MAP2K4はガン治療のターゲットとして注目されている。

本稿では、ヒト由来非リン酸化型MAP2K4のキナーゼドメイン (以後MAP2K4と略する。) の3種類の状態 (apo体、ATPの非加水分解性類似体であるAMP-PNPとの2成分複合体：binary複合体、AMP-PNPおよび基質であるp38 α ペプチドとの3成分複合体：ternary複合体) の溶液構造解析を実施し、結晶構造からは想像できないほど柔軟な溶液中の構造を紹介する。この動きを知ること考えられるMAP2K4の機能調節機構、および新しい創薬戦略について紹介する。

^{*}株式会社リガク プロダクト本部 アプリケーションラボ

^{**}株式会社リガク 応用技術センター

[†]現所属 山梨大学 水素・燃料電池ナノ材料研究センター

^{***}大阪公立大学

^{****}カルナバイオサイエンス株式会社

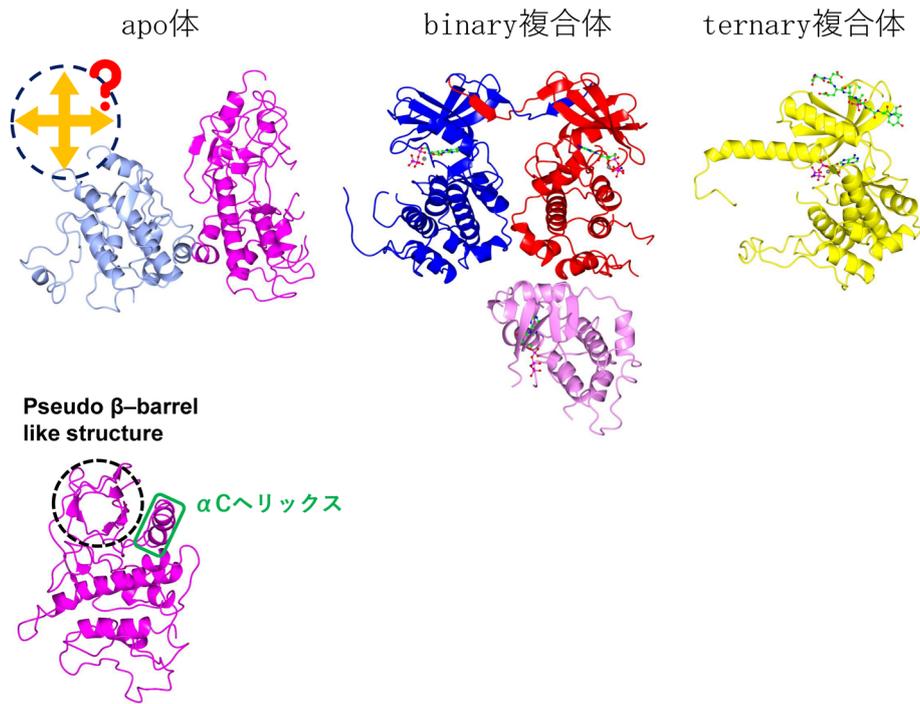


図1. apo体, binary複合体及びternary複合体の結晶構造.

2. 実験方法

2.1. ヒト由来非リン酸化型 MAP2K4

柔軟な蛋白質のコンフォメーション変化解析の検証サンプルとして、大腸菌を用いて発現させたヒト由来MAP2K4を用いた⁽³⁾。Apo体, binary複合体及びternary複合体はMatsumotoらの論文に従い調整を行った⁽³⁾⁻⁽⁵⁾。

2.2. 測定及び溶液解析

本実験でのすべての測定は、X線源に超高輝度X線発生装置FR-X、検出器にフォトンカウンティング型X線検出器を搭載したBioSAXSで実施した。各散乱イメージは、BioSAXS制御及び処理ソフトであるSAXSLabを用いて円周平均し、1次元化した散乱強度を得た。以後のデータ処理及び解析はATSASプログラムパッケージ⁽⁶⁾を使用し、図はPyMol⁽⁷⁾で作成した。

3. MAP2K4の動的構造解析

3.1. 結晶構造

MAP2K4はN末端lobeとC末端lobeの2つのlobeが、hinge領域で繋がれた典型的なキナーゼドメインを持っている。このhinge領域は柔軟性のある1本のループ構造からなるため、MAP2K4を含むキナーゼ全体的に構造柔軟性を持つ原因となっている。MAP2K4のapo体, binary複合体及びternary複合体の結晶構造を図1に、apo体とbinary複合体, あるいはbinaryとternary複合体の重ね合わせを図2に示す^{(3),(4)}。各構造の特徴を下記に記載する。

Apo体 (PDB code 3vut) : 非対称単位に2分子が存在していた。左側の分子(薄い青)は、 α Cヘリックス以外のN-lobeが大きくコンフォメーション変化を持つ

apo体とbinary複合体の重ね合わせ

binaryとternary複合体の重ね合わせ

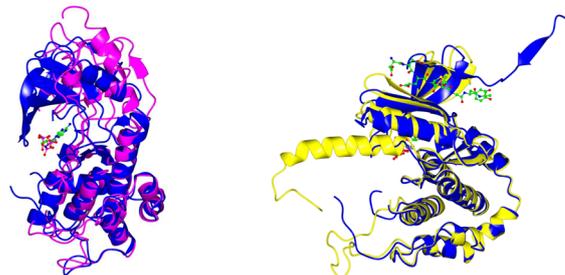


図2. 結晶構造の重ね合わせ図.

構造乱れのため、結晶構造では観測することができなかった。一方、右側の分子(マゼンタ)は結晶パッキングによるN-lobeのコンフォメーション変化が抑えられた結果、N-lobeを含む全体構造を得ることができていた。N-lobeは、他の典型的なキナーゼでは見られない構造モチーフである“pseudo β -barrel like structure”を形成していた。したがって左側の分子では、pseudo β -barrel like structureがコンフォメーション変化をしているということは明らかであるが、そのコンフォメーション変化の方向(左右, 上下, 斜め等)を推測することはできない(図1)。さらに、図2のbinary複合体との重ね合わせより、apo体は細長く伸びATP結合部位を露出させているかのような構造であることが示唆された。

Binary複合体 (PDB code 3aln) : 非対称単位に3分子が存在していた。その内の2分子(青と赤)は、各分子のN末がお互いのN-lobeへ挿入した、ドメインスワップによる2量体を形成していた。図2に示すように、AMP-PNPを抱え込むようなコンパクトな構造を形成

していた。

Ternary 複合体 (PDB code 3alo) : 非対称単位に1分子のみが存在していた。図2のbinary-ternary複合体との重ね合わせより、activation loopがコイルから長い α ヘリックスである、helical activation loopへと形態変化することで、ATP結合ポケットへの基質や阻害剤のアクセスを阻害し、その結果、強固な自己阻害構造を構築していた。

結晶構造から数多くのことが明らかとなった一方で、明らかにできなかった点、あるいは新たな疑問点が出てきた。

- 3種類の状態の結晶構造において、非対称単位中の分子数がすべて異なっているため、MAP2K4の機能単位を明らかにすることはできなかった。
- Apo体は伸長した構造であったが、NとC-lobeが柔軟なhinge領域で繋がれているため、結晶のパッキングにより細長く変形した構造となっている可能性が考えられる。
- Apo体のpseudo β -barrel like structureのコンフォメーション変化の方向はどのようになっているのか。
- Apo体では、ATP結合ポケットの近傍に位置しているactivation loopの大部分はdisorderしていた。このため、実際のATP結合ポケットは、activation loopに覆われ、露出していない可能性が考えられる。
- Binary複合体のドメインスワップによる2量体は溶液中でも形成しているのだろうか。
- 結晶構造は、結晶のパッキングおよび凍結の影響を

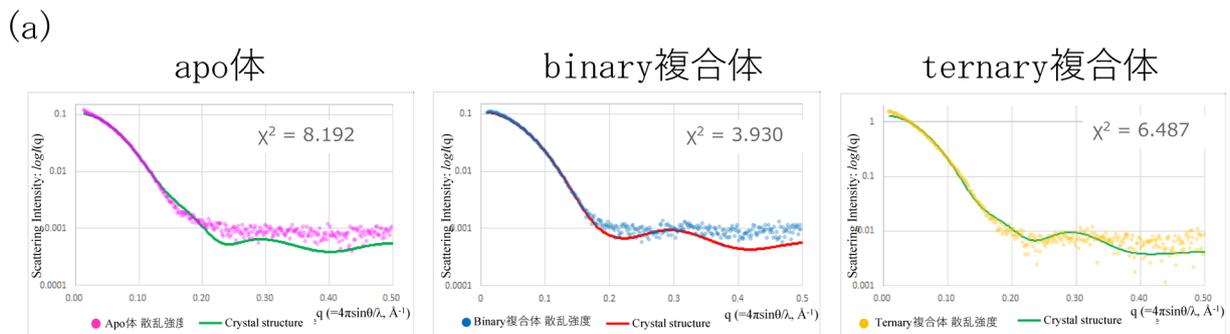
受けていることが多いため、3状態の各構造は、それらの影響を受けた構造となっていないだろうか。

これらの疑問点の答えを見つけるため、MAXSを利用した各状態の溶液構造解析を実施することとした。

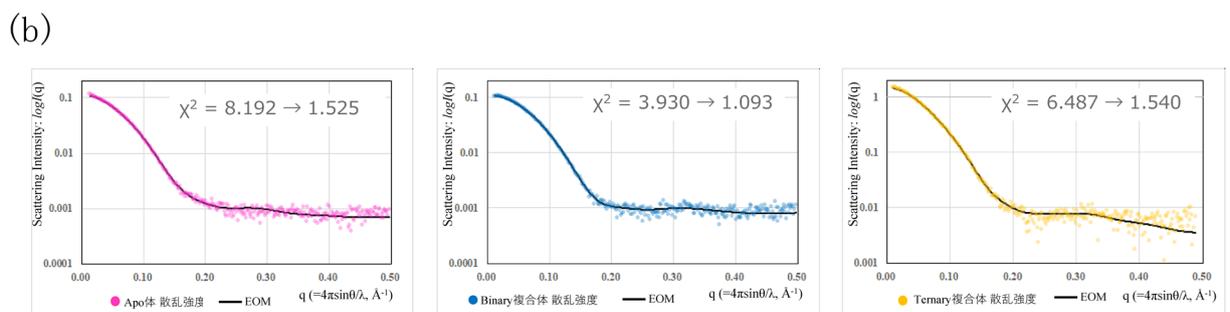
3.2. ビーズモデリング法を用いた溶液構造解析

最初にapo体、binary複合体、およびternary複合体の実測散乱強度を用いたGuinier解析により計算した前方散乱強度 $I(0)$ と蛋白質濃度を用いて分子量の推定を行ったところ、すべての状態において単量体として溶液中で存在していた。結晶の非対称単位中の分子数は、溶液中の状態を反映していないことが示された。

次に、各状態の実測の散乱強度とCRY SOL⁽⁸⁾で計算した結晶構造1分子分の理論散乱強度の重ね合わせを実施した(図3a)。何れの状態においても理論・実測散乱強度グラフの剥離及び χ^2 値より、溶液中と結晶中の構造にははっきりと違いがあることが示された⁽⁵⁾。結晶構造はパッキングに影響を受けた静的な構造であり、溶液中の蛋白質の振る舞いを完全に反映できていないのだ。このことは、MAXSを用いた溶液構造解析の重要性を示している。そこで、ab initioビーズモデリング法であるGASBOR⁽⁹⁾を用いて溶液構造解析を実施した。図4は各状態の散乱強度プロットと計算したビーズモデルへ結晶構造を重ね合わせた図である。この重ね合わせ図より、apo体は溶液中では、結晶構造よりもさらに伸びていることが示唆された。この伸びた溶液構造と結晶構造のディスオーダーとを合わせて考えると、pseudo β -barrel like structureは上下に振動



構造アンサンブル解析：前



構造アンサンブル解析：後

図3. 実測散乱強度と理論散乱強度プロットの重ね合わせ。(a)構造アンサンブル解析前。(b)構造アンサンブル解析後。

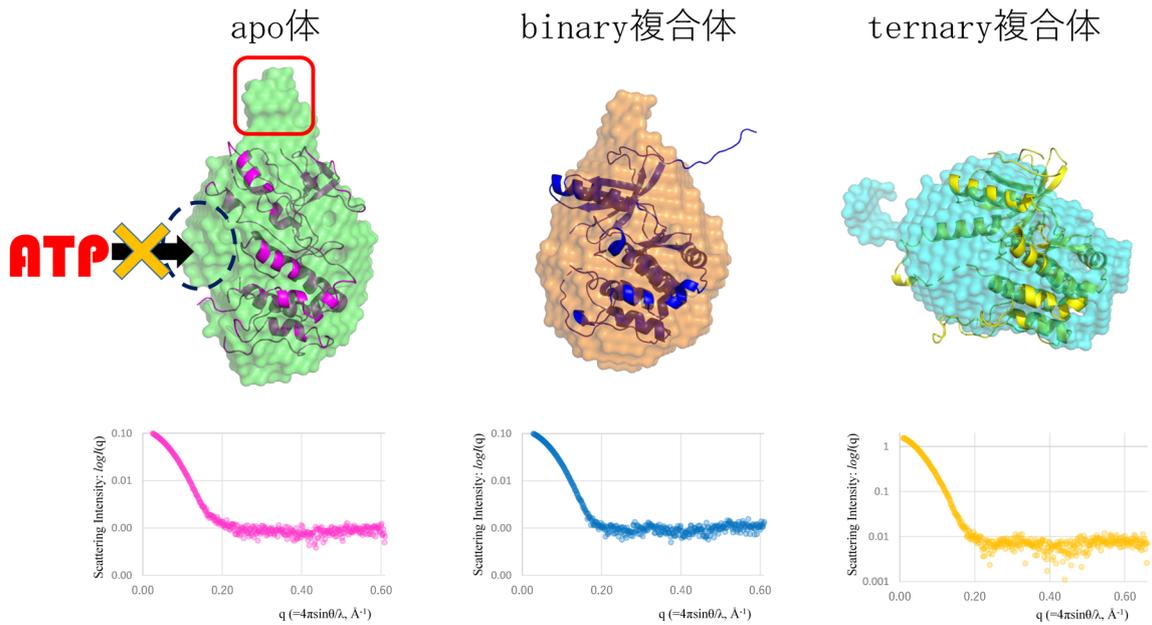


図4. apo体, binary複合体及びternary複合体のビーズモデルと結晶構造の重ね合わせ図。

する可能性が高いと考えられる。また, apo体とbinary複合体のビーズモデルより, MAP2K4はAMP-PNPが結合することでコンパクトな構造へと形態変化することが示された。Ternary複合体では, ビーズモデルが横に広がった形状をしており, 長い α ヘリックスへの形態変化の影響が表れていた。しかし, これらのすべての重ね合わせ図を通して, 溶液構造と結晶構造の一致度は決して高いとは言えないことから, 結晶構造は結晶パッキングの影響を受けた構造であり, 溶液中の機能状態を必ずしも反映していないといえる。

ビーズモデリング法を実施したことで, 結晶パッキングの影響から解放された各状態のMAP2K4の構造を観ることができたといえる。その一方で, 下記の新たな疑問点が出てきた。

- Apo体のビーズモデルでは, 破線枠で示したATP結合ポケットは何かで覆われ溶媒側に露出していないことが示唆されている。このためATPと結合ができない状態のため, どのようにATPと結合するのかを理解することが困難である。
- 3状態共に, 溶液と結晶構造の重ね合わせで一致しない領域が存在しているが, この領域はどのような状態になっているのか。
- 蛋白質は柔軟に動いていることが知られているが, その柔軟な構造を単一のビーズモデルで表現すること自体に無理があるのではないか。

そこで, ビーズモデリング法の手順について考察した。

3.3. ビーズモデリング法の限界

ビーズモデリング法では, ビーズモデルの構築を複数回実施, 複数のビーズモデルを整理後モデルを比較し, 他のモデルから大きく離れたモデルを除いて平均化した構造を最終的な溶液構造とする。図5は実際の

apo体のビーズモデルの計算過程を示している。この計算では, ビーズモデルを8回構築し, そこから各ビーズモデルを比較し, 一致度の高いモデルだけで平均構造を求めた。ここで注目したいのは, 他のモデルから大きく離れたため, 平均構造の計算から外された右端の青枠で囲まれた構造である。この外された構造を注意深く見ると, apo体のMAP2K4はより垂直に伸び, さらにATP bindingポケットを溶媒に向かって露出した構造を持つ可能性を示しているのではないだろうか? 柔軟性が高い蛋白質では, 平均化の過程で除かれてしまう構造にこそ, 蛋白質の機能に大きくかわりのある構造が隠れていると考えられないだろうか。このように構造上の可能性を除去した結果, 溶液中の機能の解釈に不都合が生じると考えられないだろうか。これらの内容をふまえ, 溶液中の蛋白質は異なる複数のステート(状態)を持つことを考慮した解析の必要性に至った。そこで, 溶液中の蛋白質は, 複数のステートを持つ構造アンサンブルとして解析するATSASのensemble optimization method (EOM⁽¹⁰⁾)を試みた。

3.4. EOMを使用した構造アンサンブル解析

EOMは, 初期構造ステートとしてPDB座標情報を基に, 10,000個程の様々なステートモデル集団を生成し, まず各ステートモデルの理論散乱強度を計算する。その後, 実測の散乱強度データと合致するように, 複数のモデル構造を選抜・比較し, 最適化を進める(図6)。

このEOMを使用して3状態のMAP2K4の構造アンサンブル解析を実施した。初期構造ステートは, 各結晶構造の単量体部分を使用した。その結果の散乱曲線の重ね合わせを図3bに示す。いずれの状態でも χ^2 が1

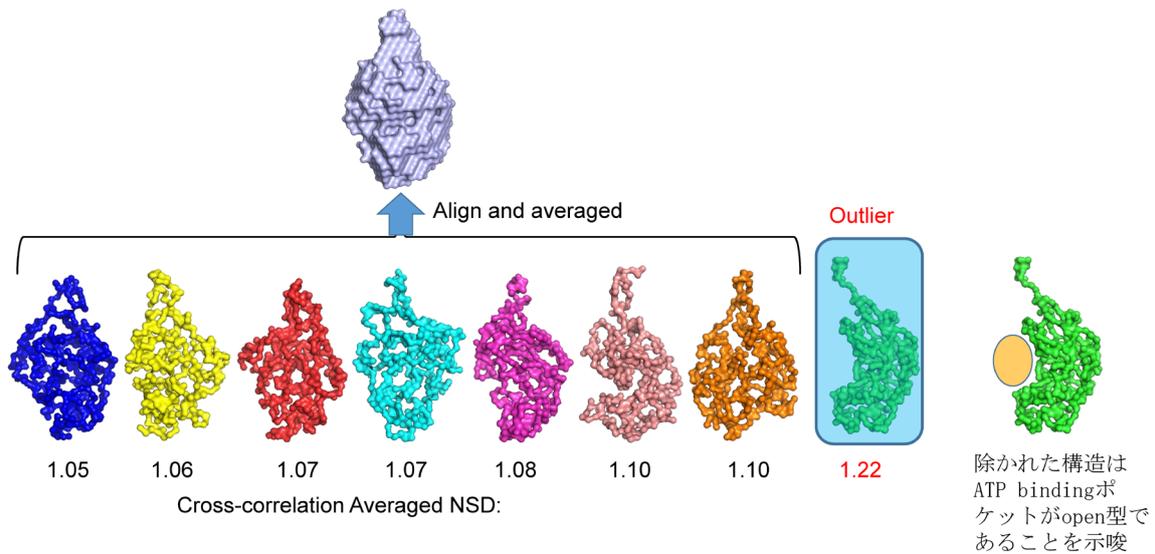


図5. ビーズモデリング法の問題点.

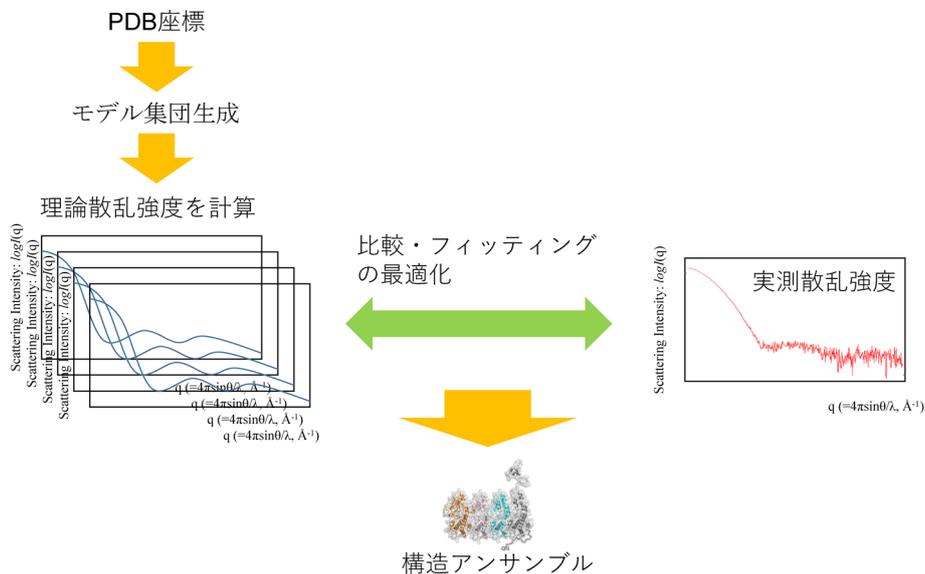


図6. 構造アンサンブル法の概略図.

に近づいたことから、MAP2K4の各状態は溶液中において、EOMで得られた構造アンサンブル間で動いていることが示唆された。その結果、結晶構造およびビーズモデリング法の解析では解決できなかったATP結合の過程への疑問は、MAXS + EOMを用いた解析により新しい知見として対処することができた。この結果より、ほとんどすべての蛋白質はコンフォメーション変化を持つことが考えられるため、MAXSを用いた構造アンサンブル解析を実施する必要があることを示唆している。つぎにapo体、binary複合体、ternary複合体のEOMの解析結果を記載する。

3.4.1. 構造アンサンブルモデル：apo体

まずapo体について紹介する。構造アンサンブル解析の結果、図7に示すように、apo体は4種類の代表構造であった。各代表構造の下の括弧内の数値は相対比率を示している。

Apo-1, 2, 3はコンパクトなコンフォメーションを形成しており、比較的結晶構造と類似した構造であるが、ATP結合ポケットはN-lobeやactivation loopなどで覆われており、apo体であるにもかかわらずATPがアクセスできない構造を形成している。それに対して、Apo-4は相対比率が11%と低いが、pseudo β -barrel like structureが上方に大きく回転した細長く伸長したコンフォメーションを形成している。その結果ATP bindingポケットが、溶媒に向かって大きく露出した構造へと変化し、ATPがスムーズにポケットへアクセスできる構造となっていた。

3.4.2. 構造アンサンブルモデル：binary複合体

次に、binary複合体の構造アンサンブル解析の結果について記載する。Binary複合体も4種類の代表構造であり、binary-1と4は類似していた(図8a)。解析前、binary複合体はATPと結合したコンパクトな構造をと

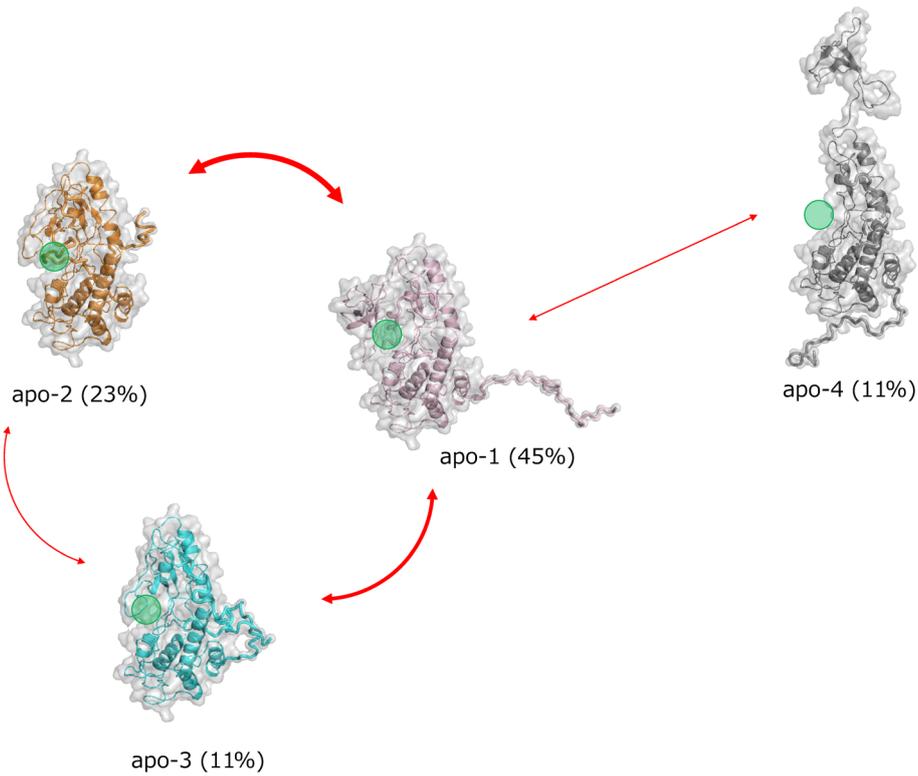


図7. Apo体の構造アンサンブル解析による動きの解析.

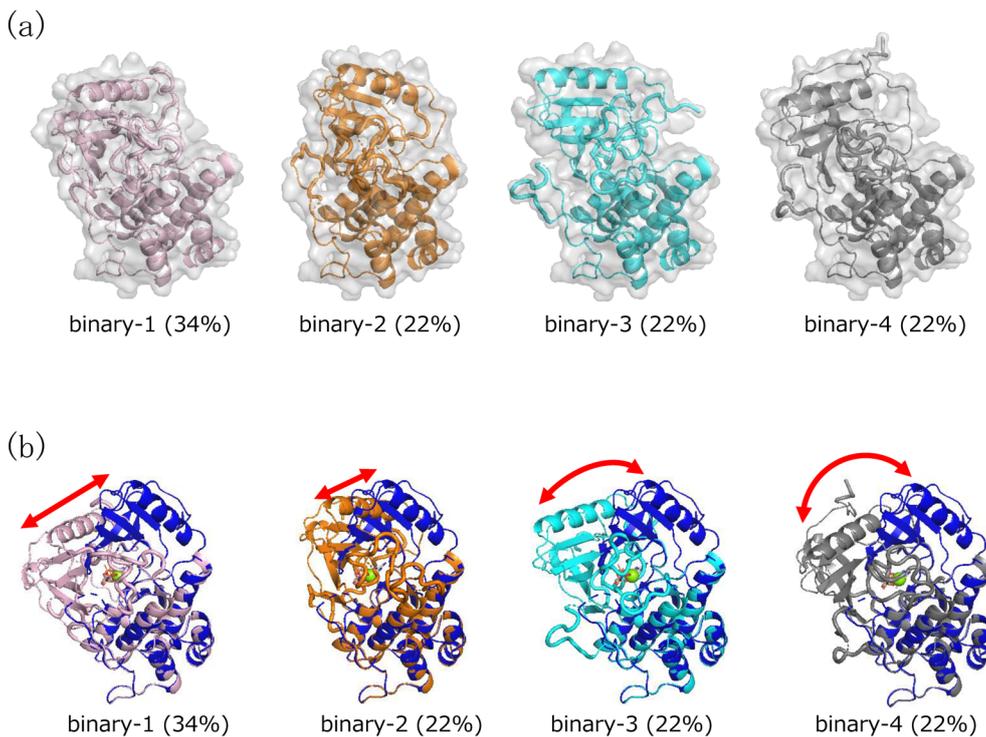


図8. Binary複合体の構造アンサンブル解析による動きの解析.

るため、N末ドメインが多少の揺らぎを持っていたとしても、構造自体は結晶構造と大きく異なっていないだろうと予想していた。しかし、各代表構造と結晶構造を重ね合わせたところ、その予想はくつがえされた(図8b)。溶液中では、binary複合体は結晶構造以上にN-lobeがATP bindingポケットへと傾いており、それ

に応じて、ATPはN-lobeとC-lobeに包まれ、より強固に結合していた。その結果、binary複合体は結晶構造よりさらにコンパクトな構造をとっていた。これは、非リン酸化型のMAP2K4が、誤って下流キナーゼのリン酸化を行わないように制御していると考えられる。このようにして、MAP2K4は生体内において厳密

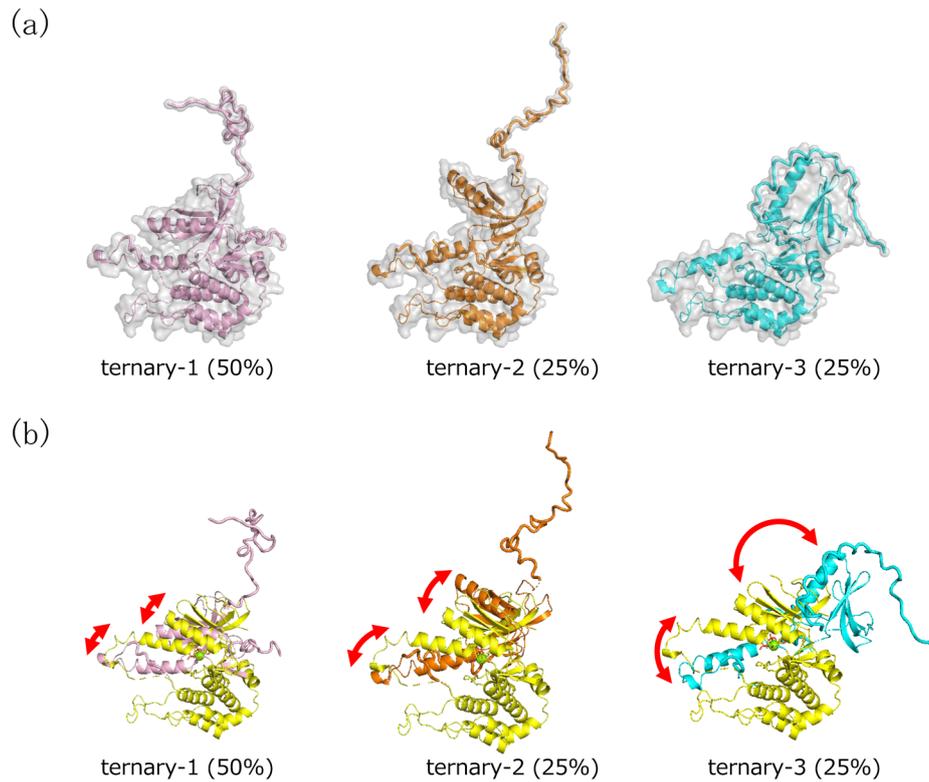


図9. Ternary 複合体の構造アンサンブル解析による動きの解析。

なシグナルの on/off 制御を達成していることが考えられる。

3.4.3. 構造アンサンブルモデル：ternary 複合体

最後に、ternary 複合体の構造アンサンブル解析を実施した。Ternary 複合体は3種類の代表構造であった(図9a)。3種類の代表構造はお互いに大きく異なっており、ternary-1はコンパクトな構造を形成していた一方で、ternary-3はN-lobeがhelical activation loopから遠く離れ、大きく口を開けたかのような構造を形成していた。Ternary-2は、ternary-3ほどではないが、N-lobeがhelical activation loopから離れた構造を形成しており、ちょうどternary-1と3の中間状態を示していると考えられた。

図9bの結晶構造との重ね合わせ図より、ternary-1は最も相対比率が多く、結晶構造とも最も似た構造を形成していたが、N-lobeとhelical activation loopは、結晶構造と比べて約21°ATP binding ポケットに向けて回転し、binary 複合体同様にATPを包むように結合していると考えられる。Ternary-2は、N-lobeとhelical activation loopがお互いに離れるように傾きつつ回転しているのが明らかとなった。その結果、N-lobeとhelical activation loopの間にV型の窪みが現れた。驚いたことに、ternary-3では、さらにN-lobeとhelical activation loopがより遠く離れるように回転し、N-lobeとC-lobeが大きく開いた横に伸びた構造を形成していた。このように結晶構造と比較することで、ternary 複合体は、N-lobeを中心にした、ほかでは見られないような驚く

べき構造変化を起こしていることが明らかとなった。

図9のternary-2, 3では、N-lobeが後方へ回転しているため、一見すると基質キナーゼはATPへとアクセスすることが可能であるように感じる。しかし、実際には、helical activation loopによる立体障害のため、基質キナーゼはATPへと近づくことができない。その結果、自己阻害構造は保たれているといえる。このように、いずれの代表構造においても維持されているactivation loopの長いhelix構造は、非リン酸化型MAP2K4の自己阻害において必須要件であるといえる。

非リン酸化型MAP2K4において、基質キナーゼはN-lobeに存在するアロステリックサイトに結合し、その結果、N-lobeの大きな構造変化を引き起こしたといえる。このN-lobeの柔軟性により、MAP2K4は、凝集化あるいは酵素反応の促進につながる部分的な不安定化が起こる可能性が考えられる。

3.5. 結晶パッキングによる影響

なぜ、このように結晶構造と溶液構造は大きく異なってしまったのであろうか。そこには、結晶のパッキングによる影響が考えられる。結晶のパッキングのため、蛋白質の動きが最小限にとどめられ、その結果、良質の結晶を得ることができ、高分解能構造解析による詳細な解析が可能となる。その反面、結晶構造では、結晶パッキングに閉じ込められた静止した構造となるため、蛋白質の動きというものを見ることができなくなる。時には、結晶パッキングにより、分子の形状が変形してしまうこともある。このように、結晶パッキ

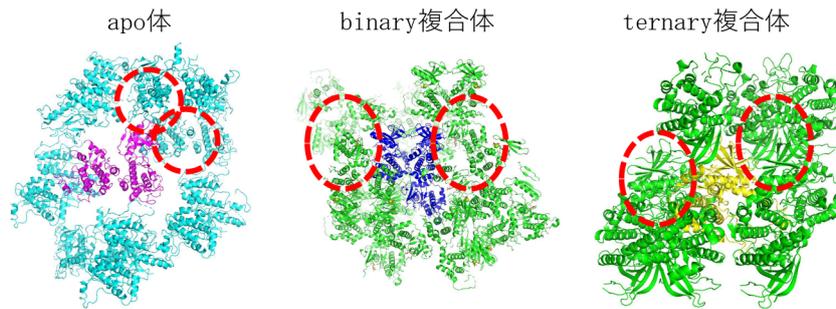


図10. apo体, binary複合体及びternary複合体の結晶パッキングの影響。

ングにはメリットとデメリットが共存している。

本稿で紹介したMAP2K4のパッキングを図10に示す。隣接した分子が、各状態のMAP2K4のN-lobeの揺らぎ、回転、振動を抑制している様子が見て取れる。この図からも、やはり結晶構造は静的な構造であり、動きのあるダイナミックな蛋白質の構造情報を得るためには、MAXSによる溶液構造解析が必要不可欠といえる。また、今回のMAP2K4のように、柔軟で大きなコンフォメーション変化がある場合には、相対比率が低いコンフォメーションの検出は、溶液散乱を用いた解析ならではといえる。

3.6. MAP2K4の安定性及びp38 α ペプチド結合による活性への影響

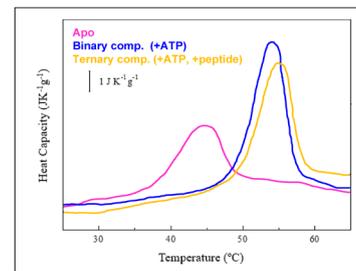
構造アンサンブル解析の結果より、apo体はpseudo β -barrel like structureの上方への回転を伴う構造変化、binary複合体は剛直な構造、ternary複合体はかなり柔軟な構造と、三者三様の構造特性を持つことが示唆された。そこで、MAP2K4の調節機構をより深く理解するために、示差走査熱量測定(Differential Scanning Calorimetry: DSC)を用いた各状態の分子安定性評価、及びカスケードキナーゼ活性測定を実施した。

3.6.1. 示差走査熱量測定(Differential Scanning Calorimetry: DSC)

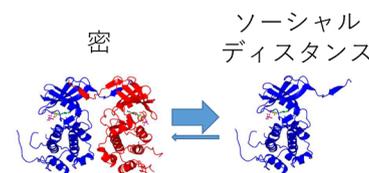
DSCの結果、binary, ternary複合体はapo体と比べてTm値がそれぞれ9°C, 10°Cと大きく上昇していることから、安定性が増していることが明らかとなった(図11a)。このため、ATPの結合がMAP2K4の構造安定化にとって鍵であるということが示唆された。

ternary複合体は基質キナーゼとの結合で、ATPのみの結合状態より安定な状態へ移行していた。一方、binary複合体の結晶構造では、ドメインスワップによる2量体化の可能性が示唆されていた。しかし、MAXSでの測定結果よりbinary複合体は溶液中で単量体であることを示している。この結果より、binary複合体の解離定数は大きいと推定される(図11b)。新型コロナウイルス感染症パンデミック時に、感染症の拡散を抑えるため、お互いに密になることを避けソーシャルディスタンスを保っていたように、MAP2K4も通常の状態ではソーシャルディスタンスを保っている

(a)



(b)



(c)

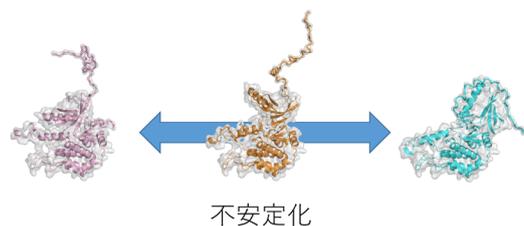


図11. 示差走査熱量測定。

が、結晶のような濃密な状態下では、仲良く肩を組みあう2量体になるということを示していると考えられる。

しかしながら、ternary複合体には、本来の基質キナーゼであるp38 α ペプチドが結合しているにもかかわらずbinary複合体と比較してTm値が1度しか上昇していないのはなぜだろうか。ここで、構造アンサンブル解析の結果で考えると、ternary複合体はN-lobe、特にリン酸化部位周辺が大きく柔軟性を持つ構造であることが明らかとなった。DSCと構造アンサンブル解析の結果を合わせて考えると、p38 α ペプチド結合による安定性向上とN-lobeの柔軟性増大による不安定化が、相殺している可能性が考えられる(図11c)。

3.6.2. カスケードキナーゼ活性測定(ELISA)

次に基質キナーゼであるp38が、MAP2K4の活性に与える影響が、促進、阻害、それとも特に影響を与えないのかを調べるため、カスケードキナーゼ活性測定を実施した。その結果、p38 α ペプチドは濃度依存的

にMAP2K4の活性を阻害することが示された。構造アンサンブル解析の結果と合わせて考えると、p38 α ペプチドがMAP2K4の構造揺らぎを加速させ、MAP2K4を変性しやすくする可能性が考えられる。

3.7. 新しく導かれた非リン酸化型MAP2K4の調節機構

結晶構造解析，溶液散乱解析，構造アンサンブル解析，DSCおよびカスケードキナーゼ活性測定結果から導かれた，新規で詳細な非リン酸化型MAP2K4の調節機構について記述する(図12)。

3.7.1. Apo体

Apo体では，MAP2K4の構造は溶液中で大きく変動することが明らかとなった。この結果より，apo体では以下のような調節機構であると考えられる(図12a)。

- 通常ATP結合ポケットはGly rich loopおよびactivation loopで覆われたコンパクトなapo体close型コンフォメーションで，N-lobeが左右に揺れるコンフォメーション変化がおきている。
- 約1割の相対比率で，pseudo β -barrel like structureを大きく上方へ回転させ，ATP binding ポケットが露出しATPがアクセス可能な，apo体open型の伸びたコンフォメーションを形成する。
- Apo体open型からclose型へ移行する時に近づいたATPをATP結合ポケット内へ抱え込む。
- Binary複合体のコンフォメーションへと移行する。

このように，apo体は溶液中で大きなコンフォメーション変化を伴いながら，ATPが近づいてくるのを待

ち構えているといえる。ATPが豊富に存在している通常の状態下では，相対比率が10%と低いapo-4でも十分にATPと結合できるチャンスはあると考えられる。しかし，細胞にATPが極端に少ない非常事態の状況を考えてみたい。この状況下では，ATPと結合可能なapo-4の相対比率が少ない上に，ATPも僅かなしか存在しない状況では，apo体がATPと結合できるチャンスはかなり低いと予想される。このことは，危機的状況下では，ATPを細胞の維持や輸送といった生命活動の燃料として優先的に使用できるようにするための，一種の防御策として働いている可能性がある。また，apo体では α Cヘリックスの疎水性アミノ酸が溶媒側に露出していることから，凝集しやすい状態であることが想像できる。このため，アポ体の状態が長く保たれると，露出した疎水性アミノ酸を元にした会合体化，その後凝集体化し，排除される機構となっている可能性が考えられる。

3.7.2. Binary複合体

ATPの存在下では，MAP2K4は結晶構造から想像される以上にATPを包み込む様にしっかりと結合し，3つの状態の中で最もコンパクトな構造を形成していた。Binary複合体では，activation loopは常に溶媒側に押し出されているため，activation loopがリン酸化されやすい状態であるといえる(図12b)。その一方で非リン酸化型MAP2K4は，溶媒側に押し出されているactivation loopにより，本来の基質キナーゼ結合部位であるATPの γ リン酸が覆われているため，基質キ

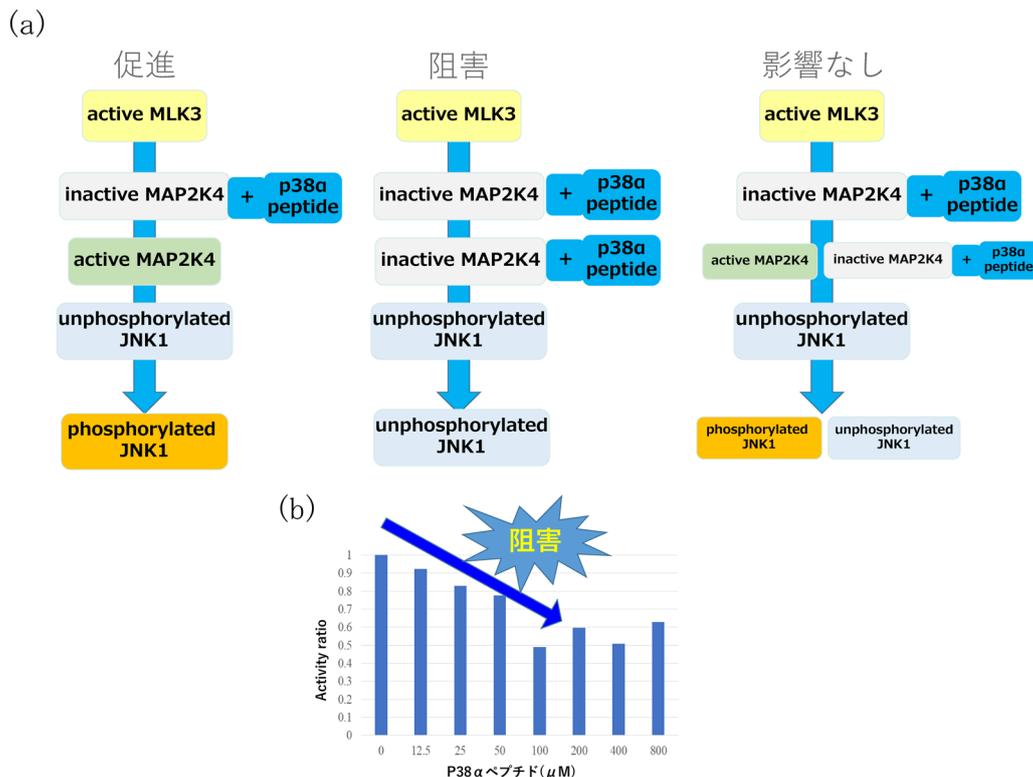


図12. カスケードキナーゼ活性測定.

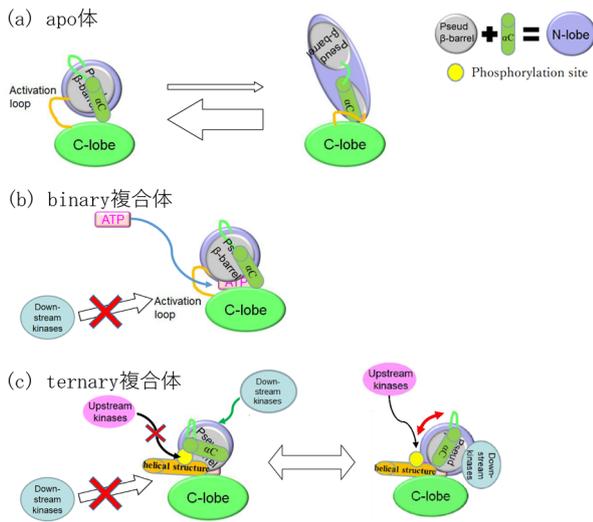


図13. 非リン酸化型MAP2K4の新規の詳細な調節機構。

ナーゼであるJNKやp38はATPに近づくことができない。そのため、誤ったリン酸化による情報伝達ミスをしっかり防いでいる。

3.7.3. Ternary 複合体

非リン酸化型MAP2K4では、基質キナーゼはATPのγリン酸部位ではなく、アロステリック領域で結合していた。基質キナーゼのアロステリック領域への結合により、activation loopがコイルから長いαヘリックスである、helical activation loopへと形態変化し、さらにN-lobeの柔軟性が大きく増加していた。N-lobeが後方へ大きく反ることで、helical activation loop上のリン酸化部位が露出するため、上流のキナーゼによるリン酸化がされやすい状態といえる(図12c)。その一方で、helical activation loopによる立体障害のため、基質キナーゼはATPへと近づくことができず、自己阻害構造を維持し、ここでも情報伝達ミスを防いでいる。

3.8. “蛋白質の動き”を考慮した新しい創薬戦略

このように、MAP2K4の新しい調節機構が推測された。そこで、この新しい調節機構からMAP2K4の“動き”に注目することで、新しい創薬への切り口となるのではないかと考えたので、紹介する。

3.8.1. Apo 体

構造アンサンブル解析より、apo体はpseudo β-barrel like structureが上方へ回転することによりATP binding pocketが露出しATPがアクセスできるようになる。ここで、そもそもpseudo β-barrel like structureが上方へ回転できなければ、MAP2K4はATPと結合できなくなり非リン酸化型MAP2K4が維持され、基質キナーゼのリン酸化は阻害続けられる。そこで、pseudo β-barrel like structureの上方への回転を阻害するように、pseudo β-barrel like structureとαCヘリックスの間にクサビ型の化合物を設計することができれば、ピンポイントでMAP2K4を阻害することができるのではない

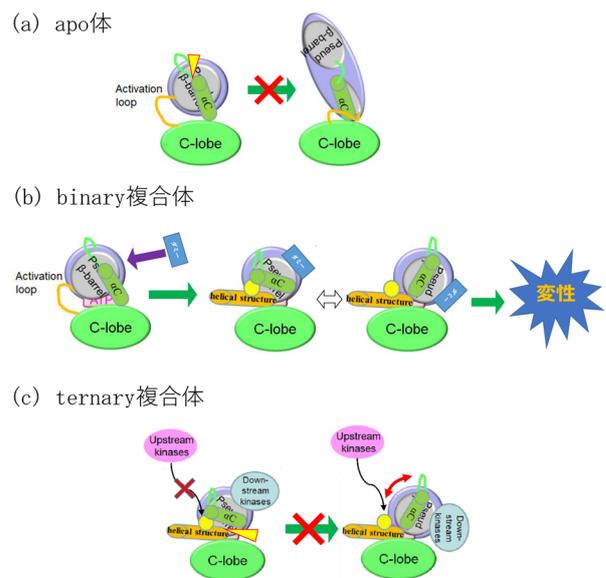


図14. “蛋白質の動き”を考慮した新しい創薬戦略。

ではないだろうか。

3.8.2. Binary 複合体

次にbinary複合体を考えてみる。非リン酸化型MAP2K4では、基質ペプチドがアロステリックサイトへ結合することが結晶構造から明らかになっている。また、構造アンサンブル解析とDSCから、アロステリックサイトへ基質ペプチドが結合することで、N-lobeの柔軟性が増加し、結果としてMAP2K4が不安定化することが示された。そこで、アロステリックサイトへ基質ペプチド様の結合アフィニティーの高いペプチドを結合させればどうなるだろうか。強制的に疑似ternary複合体へ移行し、その結果、構造揺らぎによる不安定化が促進し、最終的にMAP2K4のみが不安定化、さらには変性し、排除されると考えられる。このような、揺らぎ加速型の創薬も考えられる。

3.8.3. Ternary 複合体

最後にternary複合体を考えてみたい。Ternary複合体では、N-lobeの柔軟性が増加し、N-lobeがのけ反るように回転したときに、helical activation loop上のリン酸化部位が露出する。この状態の時に、上流のキナーゼが近づくことで、MAP2K4を活性型へと移行することが可能となると考えられる。しかし、N-lobeの後方から、helical activation loopとαCヘリックスの間にクサビ型の化合物を挟み、大きく反ることができないようにすることで、helical activation loop上のリン酸化部位は露出しなくなるのではないだろうか。その結果、MAP2K4は活性型への移行が不可能となり、MAP2K4のみが不活性型で維持される、結果としてピンポイントでのMAP2K4の阻害剤となるのではないだろうか。先ほどとは反対に、揺らぎ抑制型の創薬も一つの方法と考えられる。

4. おわりに

本稿で紹介した非リン酸化型MAP2K4のように柔軟性の高い蛋白質を、結晶構造のみで複雑な機能制御機構を理解することは困難といえる。それは、結晶構造が結晶パッキングの影響を受けた静的な構造であるため、機能制御にかかわる、ある一面しか捉えられないためである。そのため、複雑な機能制御機構を理解するために、“動き”という構造情報を加えることが肝要である。したがって、今後の蛋白質の構造解析、機能制御機構の解明には、“動き”の情報が得られる分析手法と組み合わせることが必須といえる。MAXS実験は溶液中の蛋白質の全体構造及び特徴のあるコンフォメーション変化という“動き”の構造情報を与えることができる数少ない手法であるため、組み合わせる手法の一つとして活躍することができると考えられる。本稿で紹介したように、MAXSを用いた解析を組み合わせることで、動きのある“生きた状態”の情報を入手できるようになってきた。この情報を用いることで、より詳細な新しい知見に触れることで、これまで理解の妨げになっていた問題を解決し、新しい構造機能相関を明らかにできる可能性が出てきたといえる。

また、最後の章で紹介したように、これまでは着眼していなかった“蛋白質の動き”という切り口を用いることで、これまでとは異なる、ターゲット蛋白質をピンポイントで狙う「新規分子標的薬」の開発も可能となるのではないだろうか？

ところで、本稿で紹介した“動き”の解析には結晶構造を用いている。そのため、敷居が高いと感じる研究者がいることは否めない。しかし、現在では、AlphaFold2⁽¹¹⁾などの予想構造を、構造アンサンブル解析の初期構造ステートとして使用することができる。このため、MAXSを用いた“動き”の解析は、考えているよりも敷居は高くないといえる。今後の蛋白質の触媒作用や調整機構の解明および新創薬戦略に、MAXSを用いた“動き”のある構造を活用し、“止まった”構造を越えた新しい“動き”のある構造の時代の到来を感じていただければ幸いである。

本稿で紹介したapo体、binary複合体およびternary複合体の構造アンサンブルモデルの動画を作成し、下記のHPへ掲載した。これらの動画を視聴し、“動き”の重要性に触れていただければ幸甚である。(構造アンサンブル動画：https://japan.rigaku.com/biomaxs/maxs_content_01.html#section-3)

謝辞

構造アンサンブルモデル動画を作成していただいた安川氏に感謝する。

参考文献

- (1) 松本 崇, 山野 昭人, 佐藤 孝: リガクジャーナル, **53** (2022), No. 2, 16–21.
- (2) K. G. Finegan and C. Tournier: *Cancer Res.*, **70** (2010), 5797–5806. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-3669>
- (3) T. Matsumoto, T. Kinoshita, Y. Kirii, K. Yokota, K. Hamada and T. Tada: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **400** (2010), 369–373. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.08.071>
- (4) T. Matsumoto, T. Kinoshita, Y. Kirii, T. Tada and A. Yamano: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **452** (2012), 195–200. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.07.066>
- (5) T. Matsumoto, A. Yamano, Y. Murakawa, H. Fukada, M. Sawa and T. Kinoshita: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **521** (2020), 106–112. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.10.086>
- (6) M. V. Petoukhov, D. Franke, A. V. Shkumatov, G. Tria, A. G. Kikhney, M. Gajda, C. Gorba, H. D. T. Mertens, P. V. Konarev and D. I. Svergun: *J. Appl. Crystallogr.*, **45** (2012), 342–350. <https://doi.org/10.1107/S0021889812007662>
- (7) The PyMOL Molecular Graphics System: Version 2.3 Schrödinger, LLC.
- (8) D. Svergun, C. Barberato and M. H. J. Koch: *J. Appl. Crystallogr.*, **28** (1995), 768–773. <https://doi.org/10.1107/S0021889895007047>
- (9) D. I. Svergun, M. V. Petoukhov and M. H. Koch: *Biophys. J.*, **80** (2001), 2946–2953. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(01\)76260-1](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(01)76260-1)
- (10) G. Tria, H. D. T. Mertens, M. Kachala and D. I. Svergun: *IUCrJ*, **2** (2015), 207–217. <https://doi.org/10.1107/S205225251500202X>
- (11) J. Jumper, R. Evans, A. Pritzel, T. Green, M. Figurnov, O. Ronneberger, K. Tunyasuvunakool, R. Bates, A. Židek, A. Potapenko, A. Bridgland, C. Meyer, S. A. A. Kohl, A. J. Ballard, A. Cowie, B. Romera-Paredes, S. Nikolov, R. Jain, J. Adler, T. Back, S. Petersen, D. Reiman, E. Clancy, M. Zielinski, M. Steinegger, M. Pacholska, T. Berghammer, S. Bodenstein, D. Silver, O. Vinyals, A. W. Senior, K. Kavukcuoglu, P. Kohli and D. Hassabis: *Nature*, **596** (2021), 583–589. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2>