

# $^1\text{H-NMR}$ スペクトル法による中枢機能の解析

人間総合等教育研究支援室 須藤伝悦、秋山佳代

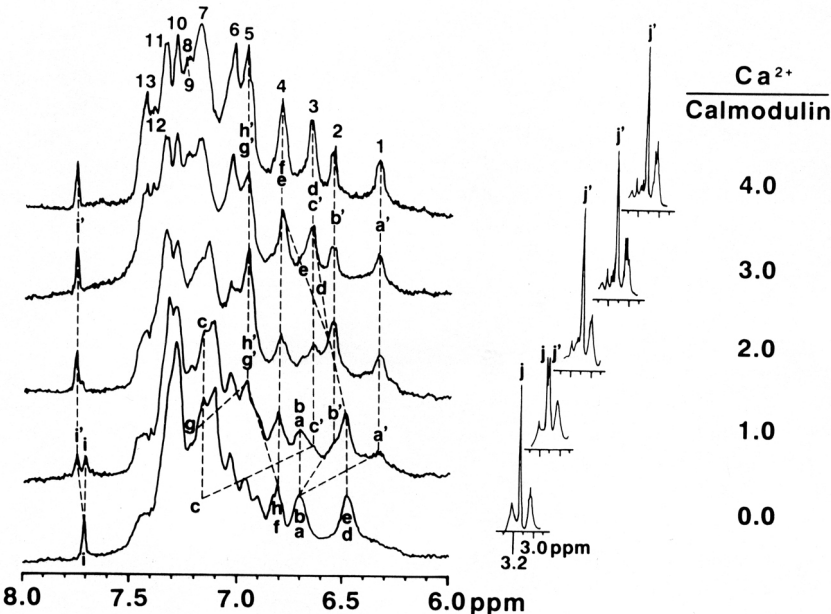
新しい技術の開発や応用は、新たな学問の扉を開くと信じている。昨年は、私共が開発した装置に関して報告したが、今回は以前から有機化学の領域で構造決定などに用いられてきた、Proton Nuclear Magnetic Resonance ( $^1\text{H-NMR}$ ) スペクトル法を中枢機能の解析に応用した例について報告する。

プロトン ( $^1\text{H}$ ; 水素原子核陽子) を取り巻く分子環境の僅かな変化は、 $^1\text{H-NMR}$  スペクトル上にピークの位置と形の変化になって反映される。そのため、低分子化合物の構造を決定する時には、質量分析法や赤外吸収スペクトル法などと合わせて、常に  $^1\text{H-NMR}$  スペクトル法が使用されてきた。しかし、高分子は多くのプロトンを含んでおり、スペクトル上でそれらのピークが重なり合うため、各ピークを同定することが困難で、蛋白質のような物質の解析には不適當であった。巨大な磁石を使用した高磁場の装置は、高分子の蛋白質であっても各アミノ酸から由来するプロトンのピークを分離して同定できるはずである。日本電子では 20 年前から高磁場の装置を開発してきたが、私共はその段階から同社の技術者と共同で蛋白質の高次構造の解析法を研究してきた<sup>1)</sup>。

先に、カルシウムがカルモジュリン (CaM) 依存系を介して脳内ドーパミン (神経伝達物質) の合成を賦活化し、中枢機能を調節する事を世界に先駆けて明らかにした<sup>2, 3)</sup>。この時の CaM の高次構造の変化を 400MHz の  $^1\text{H-NMR}$  で解析し、CaM の高次構造と活性調節の関係を明らかにしたいと考えてきた。CaM は進化的に下等な生物にも存在することから、生命維持活動の上で普遍的な必須物質であると推察される。この蛋白質は 148 残基のアミノ酸から構成されるが、各領域のアミノ酸配列の相同性から、ほぼ 4 等分する 4 つのドメインに区別することができる。ドメイン I と III、(N 末端から数えて) 或いは II と IV は、それぞれ約 45% 共通するアミノ酸配列を持ち、各ドメインに "EF-hand" モデルと名づけられたカルシウム結合部位を持っている。この部位にカルシウムが結合することによって CaM が活性化され、次々と生体内の様々な機能を調節していくことが知られている。はじめに、CaM がカルシウムによって活性化される様子を明らかにし、次に活性化された CaM が様々な機能を調節する機序を明らかにした。

## カルシウムによって誘導されるカルモジュリンの高次構造

牛脳から抽出した CaM をカルシウムキレート剤溶液中で透析して完全にカルシウムを取り除き、凍結乾燥後、重水 ( $\text{D}_2\text{O}$ ) に溶解して分析に使用した。この操作で水 ( $\text{H}_2\text{O}$ ) を用いないのは、水のプロトンと CaM のプロトンが重なり合い解析できなくなることを防ぐためである。この CaM にカルシウム溶液を細かく滴定していき、カルシウムによって活性化される時の CaM の高次構造の変化を  $^1\text{H-NMR}$  で解析した<sup>4, 5)</sup> (図 1)。1 モルの CaM に 4 モルまで  $\text{Ca}^{2+}$  が結合するが、その過程で大きな 2 段階の変化を引き起こす。はじめの 2 モルの  $\text{Ca}^{2+}$  がドメイン III と IV に結合し、1 段階目の変化を引き起こし、次の 2 モルの  $\text{Ca}^{2+}$  がドメイン I と II に結合し、2 段階目の変化を引き起こす。1 段階目の反応に伴って、ドメイン III と IV に属する Phe-89、Tyr-99、Tyr-138 と、Trimethyllysine-115 -メチル及び His-107 H2 と H4 のプロトンのピークが変化した。2 段階目の反応では、フェニルアラニンの幾つかのピーク (6.9-7.5 ppm) が変化した。さらに、Phe-16 と Phe-65 プロトンのピークは両段階にまたがって連続的に変化した。こうしたプロトンのピークの変化は、CaM の高次構造の変化を反映したものであるが、この変化には 3 つ



Ca<sup>2+</sup>  
Calmodulin

4.0

3.0

2.0

1.0

0.0

精製したカルモジュリン(CaM)にカルシウム溶液を細かく滴定していき、それに伴って変化する高次構造を調べる事により、CaM が活性化される様子を観察できる(図1)。

活性化されたCaMが標的酵素を活性化する様子は、CaMと標的酵素の2つの物質を同時に分析する事により観察されるはずである。しかし、実際には、ピークが複雑に重なり合い、解析する事が無理なので、標的酵素と同じ活性部位を持つ拮抗剤とCaMの関係を分析し、その結果を通して2つの蛋白質の関係を推測した(図2)。

図1. 0-4モルのカルシウム存在下での牛脳カルモジュリンの400MHz <sup>1</sup>H-NMRのスペクトル

— 芳香族領域 (6.0-8.0 ppm) と Trimethyllysine methyl 領域 (3.1 ppm 付近) —

各ピークを以下の様に同定した: (a & a') Tyr-138, (b & b') Tyr-138, (c & c') Phe-89, (d) Phe-16, (e) Phe-65, (f) Tyr-99, (g & g') Tyr-99, (h & h') His-107 H4, (i & i') His-107 H2, (j & j') Tml-115 -methyl. これらのプロトンが、カルシウムの滴定によって規則正しくシフトしている。

カルモジュリン(CaM=0.3mM)をD<sub>2</sub>O (pH 8.0, 24 °C)下で、JEOL GX-400を用いて測定した。標準物質は(トリメチルシリル)プロピオン酸を使用し、ケミカルシフト値を求めた。(Sutoo et al. (1989) *Japan. J. Pharmacol.* 50, 217-227)

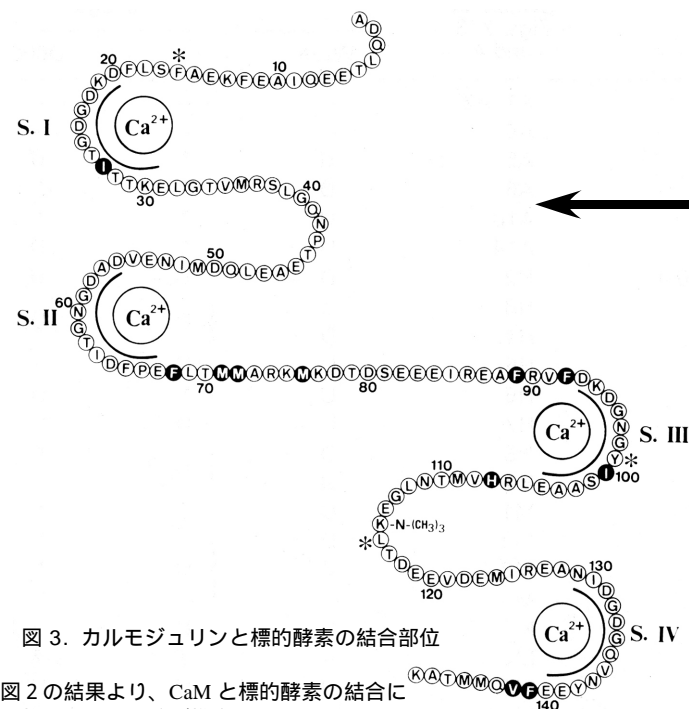


図3. カルモジュリンと標的酵素の結合部位

図2の結果より、CaMと標的酵素の結合に関与するアミノ酸が推定された。それらの部位と、カルシウム結合部位をCaMのアミノ酸配列上に記載した。

S.I, S.II, S.III と S.IV: カルシウム結合部位

黒印のアミノ酸残基: 強い標的酵素との結合部位

\*印のアミノ酸残基: 弱い標的酵素との結合部位

(Akiyama & Sutoo (1988) *Japan. J. Pharmacol.* 48, 157-164)

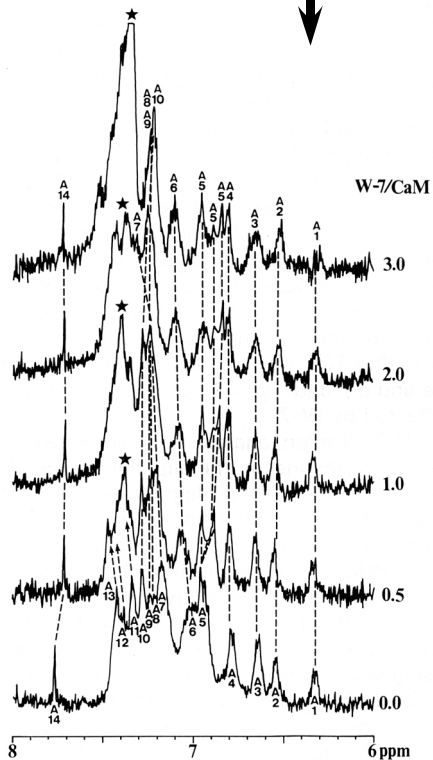
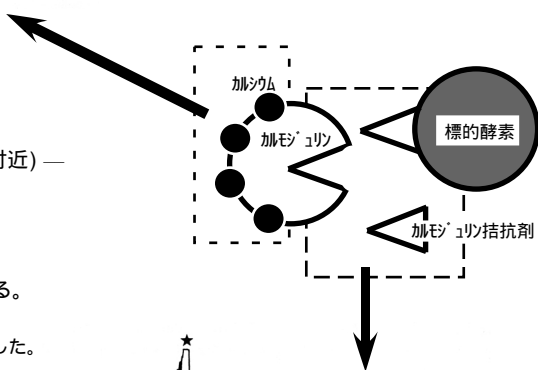


図2. 4モルのカルシウムが結合したカルモジュリンに対するカルモジュリン拮抗剤の効果

— 芳香族領域 —

拮抗剤(W-7)の滴定によってシフトするプロトンを持つアミノ酸の近くに標的酵素との結合部位が存在すると考えられる。星印は、W-7由来のピーク。

(Akiyama & Sutoo (1988) *Japan. J. Pharmacol.* 48, 157-164)

の異なった現象によって導かれたものが入り混じっている。それらは、カルシウム結合部位にカルシウムが結合したことによる直接的な変化、次の結合部位にカルシウムを結合させる準備のための変化、さらに標的酵素と結合する準備のための変化である。これらを区別するため、以下の節に述べるような CaM 拮抗剤などの薬物を用いて詳細に分析した。

## 標的酵素との結合部位の同定

高次構造が変化した CaM が標的酵素を活性化する機序を調べるには、CaM と標的酵素を混合し、両者の結合に伴って生ずる CaM のプロトンの変化を追跡する必要がある。しかし、分子量の大きい二つの蛋白質を同時に分析すると、ピークが重なり合い解析する事ができない。そこで、標的酵素と同じ活性部位を持ち、分子量の小さい CaM 拮抗剤と CaM との関係进行分析し、その結果より二つの蛋白質の結合部位の動きを推測した<sup>6,7)</sup>(図2)。W-7 は、親和性の高い優れた CaM 拮抗剤である。その結果、Phe-16、Ile-27、Phe-68、Met-71、Met-72、Met-76、Phe-89、Phe-92、Tyr-99、Ile-100、His-107、H2、H4、Leu-116、Phe-141、Val-142 のプロトンのピークが W-7 の影響を受けており、これらのピーク、あるいはその近くに標的酵素との結合部位が存在すると推察される。この結果を基に、図3のCaMのアミノ酸配列上に結合候補部位を記載した<sup>7)</sup>。これらのほとんどが、ドメインII、III、IVのカルシウム結合部位の近くに存在する疎水性のアミノ酸である。

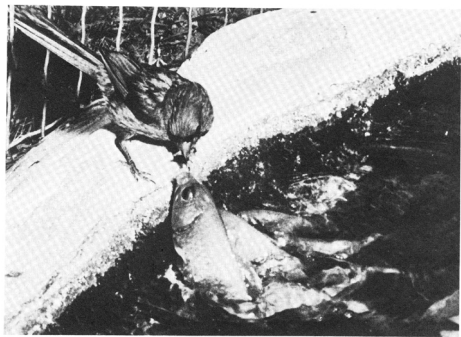
CaM がカルシウムによって活性化される過程での高次構造の変化と、活性化された CaM が標的酵素を活性化する過程での高次構造の変化を <sup>1</sup>H-NMR のスペクトル上で確認することができた。これらの結果から次のことが推察される。カルシウムを含まない CaM において、ドメイン III と IV のカルシウム結合部位は表面に露出しており、ドメイン I と II のカルシウム結合部位は内部に隠されている。はじめの2モルの Ca<sup>2+</sup> は、表面に露出した部位に直接結合することができるが、内部に隠された部位には結合できない。この段階で、標的酵素との結合部位は閉じている。最初の1モル目のカルシウムが CaM の2番目に親和性の高いカルシウム結合部位に結合すると、標的酵素との結合部位が僅かに開き、ここに I 型の酵素が結合し活性化される。次に2モル目のカルシウムが低親和結合部位に結合すると、標的酵素との結合部位がさらに開き、ここに II 型の酵素が結合し活性化される。この時、CaM の高次構造が大きく変化し、内部に隠されていたドメイン I と II のカルシウム結合部位が表面に露出してくる。露出した最も高親和なカルシウム結合部位に3モル目のカルシウムが結合する。それに伴い標的酵素との結合部位がさらに開き、III 型の酵素が結合し活性化される。最後に4モル目のカルシウムが低親和結合部位に結合し、標的酵素との結合部位が最終的な形になる。ここに IV 型の酵素が結合し活性化される<sup>5)</sup>。結合するカルシウムの量に依存した CaM の構造変化とその時に活性化される標的酵素の様子を模式化し、以下に述べる重金属中毒のメカニズムと共に図7に示した。CaM が次々と生体の様々な機能を調節して行くメカニズムは、カルシウムの濃度によって高次構造が規則的に少しずつ変化することに伴い、標的酵素との結合部位の型が変わり、様々な酵素が選択的に活性化されることによって成されていると考えられる。この結果を金属中毒症の発症機序解明に応用した。

## 重金属による中枢機能の攪乱

動物の社会行動学の世界では、"ことば"を持たない魚や鳥は、色や形、匂いなどの単純な信号によってコミュニケーションを交わし、秩序ある生活を営んでいるが、しばしばサインの取違いで異常な行動を導く事が、N. Tinbergen によって報告された(図4)。私共は、生体内での極めて重要な情報伝達系も単純な化

図4. 動物の社会行動に見られるサインの取り違い

親鳥は、雛の口元の黄色の "サイン" を受け取って餌を与える。同じサインを持つ魚がいたら、間違った行動を引き起こす。"ことば"を持たない動物は、単純な物理的刺激或いは化学物質を信号として情報を取り合っているため、一見似た信号があると、行動するのにふさわしくない場合でも、その信号が引き金になって行動を起こす事がある。N.Tinbergen の、こうした研究の構築がノーベル賞の受賞となった。中枢機能をはじめとした、生体内でのあらゆる機能は、化学物質を介した情報を下に調節されているため、体内でもこうしたサインの取違いによる異常な現象が存在すると考えられる。



Sutoo, D. (1994) *In: The Vulnerable Brain and Environmental Risks.*

Photo: © Frank Lane Picture Agency, UK.

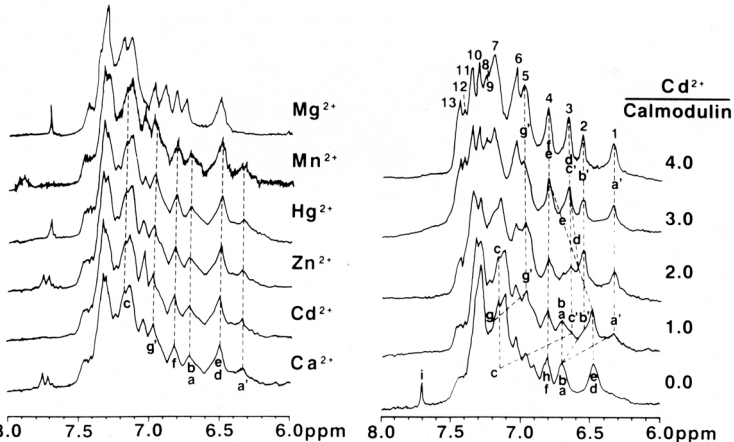
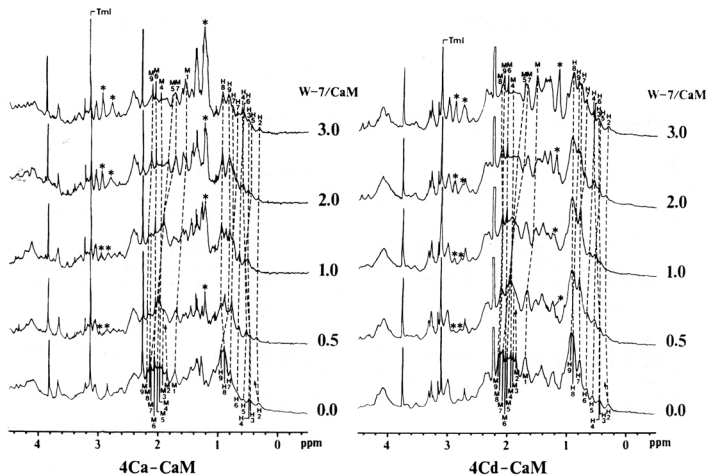


図5. 様々な二価金属イオンによって誘導されるカルモジュリンの高次構造の変化  
—芳香族領域のスペクトル—

左: 1モルのカドミウム ( $Cd^{2+}$ )、亜鉛 ( $Zn^{2+}$ )、水銀 ( $Hg^{2+}$ )、マンガン ( $Mn^{2+}$ ) によって誘導される構造は、カルシウム ( $Ca^{2+}$ ) によって誘導されるものと同じで、これらの金属でもカルモジュリン (CaM) は活性化される。マグネシウム ( $Mg^{2+}$ ) だけは濃度を高めても有意な変化を引き起こさない。  
(Sutoo et al. (1986) *Japan. J. Pharmacol.* **40**, 169-173)

右:  $Cd^{2+}$  だけは、全ての濃度 (0-4 モル) において、 $Ca^{2+}$  が誘導するもの (図1) と同じ構造を引き起こす。  
(Sutoo et al. (1988) *Kitasato Arch. Exp. Med.* **61**, 149-160)

図6. カルシウムとカドミウムによって誘導されるカルモジュリンの高次構造に対するカルモジュリン拮抗剤の効果  
—脂肪族領域のスペクトル—

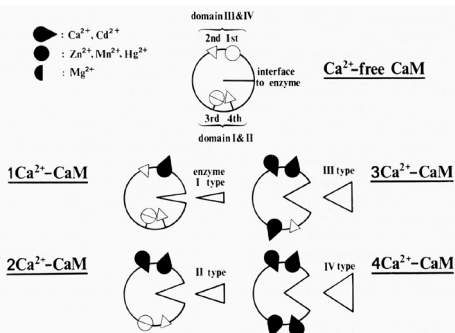


4個の全ての  $Ca^{2+}$  結合部位に  $Ca^{2+}$  が結合したCaM (左) と  $Cd^{2+}$  が結合したもの (右) に CaM 拮抗剤 (W-7) を細かく滴し誘導される構造を比較した。両スペクトル間に有意な差は見られない。 $Cd^{2+}$  は、 $Ca^{2+}$  と置き変わりCaM を活性化するが、 $Cd^{2+}$  によって活性化されたCaMは、W-7によって阻害される。カドミウム中毒のメカニズムの一端と有効な治療薬の可能性を示唆するデータである。

星印は、W-7由来のピーク。

(Akiyama et al. (1990) *Japan. J. Pharmacol.* **53**, 393-401)

図7. カルシウムによって活性化されるカルモジュリンの模式図



CaMには、2つの高親和  $Ca^{2+}$  結合部位 (図中 ) と2つの低親和結合部位 (図中 ) がある。  $Ca^{2+}$  が結合しない時、CaM と標的酵素の結合部位は閉じている。最初の1モルの  $Ca^{2+}$  が2番目に強い高親和  $Ca^{2+}$  結合部位に結合すると、標的酵素の結合部位が少し開き、そこにI型の酵素が結合し、活性化される。次に2モル目の  $Ca^{2+}$  が低親和  $Ca^{2+}$  結合部位に結合し、標的酵素の結合部位がさらに開き、II型の酵素が活性化される。同時にこの時、CaMの構造が大きく変化し、内部に隠れていた3つ目の  $Ca^{2+}$  結合部位 (最も高親和) と4つ目の  $Ca^{2+}$  結合部位 (低親和) が表面に露出してくる。そこに3モル目と4モル目の  $Ca^{2+}$  が結合し、III型とIV型の酵素が活性化される。 $Cd^{2+}$  は全ての結合部位に結合し、全てのタイプの酵素を活性化する。 $Zn^{2+}$ 、 $Hg^{2+}$ 、 $Mn^{2+}$  は、高親和  $Ca^{2+}$  結合部位にだけ結合し一部のタイプの酵素を活性化する。 $Mg^{2+}$  は、イオン半径が小さいので、CaMの内部に浸透し、内部に隠れている最も親和性の高い3つ目の  $Ca^{2+}$  結合部位に僅かに結合するが、標的酵素の結合部位を変化させる反応ではない。このように、 $Cd^{2+}$ 、 $Zn^{2+}$ 、 $Hg^{2+}$ 、 $Mn^{2+}$  は、CaMに  $Ca^{2+}$  と同じ信号を与えるが、 $Mg^{2+}$  は異なっている。

(Sutoo et al. (1989) *Japan. J. Pharmacol.* **50**, 217-227)

学物質を介していることより、同様なサインの取違いに由来した異常な現象が生体内にも存在すると考えてきた。この問題をCaM系を通して証明してみた。

カルシウムによって誘導されるCaMの高次構造の変化に関する研究を基に、様々な金属とCaMの関係を系統立て分析する事によって確認した<sup>4, 5, 8, 9)</sup>。その結果、1モルのカドミウム、亜鉛、水銀、マンガンによって誘導されるCaMの高次構造は、カルシウムによって誘導されるものと同じであるが、マグネシウムだけは濃度を高めても異なった構造変化を示した(図5)。特にカドミウムは、全ての濃度(0-4モル)においてカルシウムが誘導するものと同じ構造を引き起こし(図5)、しかもカドミウムによって誘導されたCaMの高次構造は、カルシウムによって誘導されたものと同じように、W-7によって影響を受けている(図6)。こうしたデータを基に、種々の二価金属とCaMとの結合の仕方や、それらの金属によって活性化されたCaMが標的酵素を活性化させる機序を図7にまとめてみた。カドミウムは、カルシウムと同じように全てのカルシウム結合部位に結合し、生体内のあらゆるCaM依存系を攪乱する。さらに、カドミウムによって活性化されたCaM依存性の機能は、W-7などのCaM拮抗剤によって抑制される。一方、亜鉛、水銀、マンガンは、CaMの高親和カルシウム結合部位にだけ結合し、ある種のCaM依存性の機能だけを攪乱する。マグネシウムは、表面に露出しているカルシウム結合部位には結合できないため、CaMを活性化できない。しかし、イオン半径が小さいため、蛋白質の内部に隠された最も親和性の高いカルシウム結合部位まで進入し、僅かに結合することができる。しかしこの場合でも、蛋白質の内部では標的酵素を活性化させるための構造を導くことができないので、CaM依存系に有意な効果を与えない。こうした結論は、神経科学的及び薬理学的にも確認されたが<sup>10-14)</sup>、その一部を以下に述べる。

### 中枢カルシウム依存性のドーパミン合成調節に対するカドミウムの効果

マウスの脳室内に塩化カルシウムを投与すると、CaM、CaM依存性プロテインキナーゼII及びタイロシン水酸化酵素が共に多く分布している線条体や側坐核で、ドーパミンの合成が有意に高められる(別演題参照)。これは以下の機序による。カルシウムによってCaMが活性化され、引き続き標的酵素の一つであるプロテインキナーゼが活性化される。このプロテインキナーゼは、タイロシン水酸化酵素(ドーパミンの合成を調節しているカテコラミンの律速酵素)をリン酸化することによって賦活化する。上の研究から、カドミウムがCaM依存系を攪乱すると考えた時、線条体や側坐核でドーパミンの合成が高められるはずである。そこで、マウスの脳内ドーパミン分布に対するカドミウムの効果を分析してみた。その結果、カルシウムの投与と同じようにカドミウムによっても、線条体や側坐核でドーパミンの合成が有意に高められており、このカドミウムの効果はCaM拮抗剤によって阻止されている。このことから、カドミウムによって、ドーパミンを介した様々な中枢機能が秩序なく攪乱されることが考えられる。しかも、CaMは全身に分布していることから、中枢以外の機能も攪乱されると示唆される。

私共の研究結果から金属中毒症のメカニズムを考察すると、以下のように結論づけられる。カルシウムとマグネシウムは生体にとって必須な金属イオンであり、高濃度で存在しているため、二つのイオンはCaMによって明確に区別されている。しかし、カドミウムなどは、一部の鉱山だけに存在するものであり生態系には存在しなかったと推察される。そのため、生体はカルシウムとこれらの重金属を区別する能力を準備していなかった。ところが、産業の発達に伴って身近になった重金属は、突発事故などによって生体に取り込まれることがある。生体に取り込まれた重金属は、極めて重要な役割を演じているカルシウムに置き換わって、秩序なくCaMを活性化し、中枢をはじめ様々な機能を攪乱すると考えられる。

参考文献

1. 須藤伝悦、秋山佳代、藤井直之、松下和弘 (1985) *日本電子ニュース* 25: 94-96.
2. Sutoo, D., Akiyama, K. and Geffard, M. (1989) *Brain Res. Bull.* 22: 565-569.
3. Sutoo, D. and Akiyama, K. (1997) *Brain Res. Rev.* 25: 1-26.
4. Sutoo, D., Akiyama, K., Fujii, N. and Matsushita, K. (1988) *Kitasato Arch. Exp. Med.* 61: 149-160.
5. Sutoo, D., Akiyama, K., Fujii, N. and Matsushita, K. (1989) *Japan. J. Pharmacol.* 50: 217-227.
6. Sutoo, D., Akiyama, K., Fujii, N. and Matsushita, K. (1986) *Biochim. Biophys. Acta* 873: 156-160.
7. Akiyama, K. and Sutoo, D. (1988) *Japan. J. Pharmacol.* 48: 157-164.
8. Sutoo, D., Akiyama, K., Fujii, N. and Matsushita, K. (1986) *Japan. J. Pharmacol.* 40: 169-173.
9. Akiyama, K., Sutoo, D. and Reid, D. G. (1990) *Japan. J. Pharmacol.* 53: 393-401.
10. Sutoo, D., Akiyama, K. and Imura, K. (1986) *Alcohol* 3: 69-72.
11. Sutoo, D., Akiyama, K. and Imamiya, S. (1990) *Arch. Toxicol.* 64: 161-164.
12. Sutoo, D. and Akiyama, K. (2000) *Neurosci. Lett.* 294: 5-8.
13. Sutoo, D. and Akiyama, K. (2000) *Arch. Toxicol.* 74: 1-4.
14. Sutoo, D. and Akiyama, K. (2001) *Japan. J. Pharmacol.* 86: 366-368.
15. Isaacson, R. L. and Jensen, K. F. (Eds.), *The Vulnerable Brain and Environmental Risks*, Plenum, New York, 1994.

昭和59年(1984年)7月2日(月曜日)

**重金屬中毒を解明する 須藤 伝悦さん(三)**

神経伝達物質の解明は生命科の大きなテーマ。須藤さんは、神経伝達物質の一つである生体アミンの合成メカニズムを研究して、さうき、意外なところから「WT」という物質が有害な重金屬の作用を抑えることを見つけた。これが水銀やカドミウム中毒の治療に役立つのでは、期待されている。

**研究第一線**

ホルモンに似た化学物質で、神経や筋肉情報を伝える働きを担っている。ホルモンに似た化学物質で、神経や筋肉情報を伝える働きを担っている。ホルモンに似た化学物質で、神経や筋肉情報を伝える働きを担っている。

ホルモンに似た化学物質で、神経や筋肉情報を伝える働きを担っている。ホルモンに似た化学物質で、神経や筋肉情報を伝える働きを担っている。

「WT」という物質が有害な重金屬の作用を抑えることを見つけた。これが水銀やカドミウム中毒の治療に役立つのでは、期待されている。

「WT」という物質が有害な重金屬の作用を抑えることを見つけた。これが水銀やカドミウム中毒の治療に役立つのでは、期待されている。



**抑制する物質発見**

「WT」が、重金屬中毒の治療づくりに役立つ立ちはたか。

「WT」が、重金屬中毒の治療づくりに役立つ立ちはたか。

「WT」が、重金屬中毒の治療づくりに役立つ立ちはたか。

「WT」が、重金屬中毒の治療づくりに役立つ立ちはたか。

ここでの詳しい内容は、Isaacson 教授(ニューヨーク州立大学)らと共同執筆した専門書<sup>15)</sup>(医学図書館所蔵)に記載されている。私共は、カドミウムの事を"中枢機能を攪乱する物質"と呼んできた。その後、内分泌系においても、幾つかの機能攪乱物質が見つけれられている。現在、こうした生体内の攪乱物質は"環境ホルモン"と呼ばれている。

本研究は、トヨタ財団及び読売新聞社などの援助を受けて遂行した。