

平成 16 年度科学研究費補助金 (基盤研究 (S)) 研究状況報告書

ふりがな		しまだ いちお					
研究代表者氏名		嶋田 一夫		所属研究機関・部局・職		東京大学・大学院薬学系研究科・教授	
研究課題名	和文	膜蛋白質相互作用解析のための構造生物学的戦略の開発とその応用					
	英文	Nobel strategy of structural biology for investigation of membrane proteins-ligands interactions.					
研究経費		平成14年度	平成15年度	平成16年度	平成17年度	平成18年度	総合計
16年度以降は内約額 金額単位：千円		33,600	14,400	14,400	14,400	14,400	91,200
研究組織 (研究代表者及び研究分担者)							
氏名		所属研究機関・部局・職		現在の専門		役割分担 (研究実施計画に対する分担事項)	
嶋田 一夫		東京大学・大学院薬学系研究科・教授		構造生物学		NMR測定法の開発	
寺沢 宏明		東京大学・大学院薬学系研究科・助手		構造生物学 分子生物学		NMR測定・解析および発現系構築	
<p>当初の研究目的 (交付申請書に記載した研究目的を簡潔に記入してください。)</p> <p>細胞外からの刺激は、細胞膜に存在するイオンチャネルおよび受容体などの膜蛋白質で受けとめられる。その結果、これらの膜蛋白質は、細胞膜において電気的あるいは化学的な反応を起こしたり、またはシグナル伝達経路を活性化する。このような膜蛋白質が行うイオンの透過機構やリガンド相互作用を解明することは、生命現象を理解する上で不可欠である。核磁気共鳴法(NMR)は生理的条件下における蛋白質相互作用の解明に対して強力な解析法である。しかしながら、膜蛋白質を対象としたNMRによる相互作用研究は、細胞内球状蛋白質で見られる進展と比較して十分なものではない。この原因として、膜蛋白質・リガンド複合体のような高分子量蛋白質に適応可能なNMR戦略が確立されていないこと、またこれらの膜蛋白質を大量に発現することが困難であることが挙げられる。したがって、もしこれらの問題点を克服することが可能ならば、イオンチャネルや受容体などの機能発現機構の解明が可能になると考える。</p> <p>本研究では、申請者が開発した球状蛋白質の相互作用解析法である交差飽和法や動物細胞を用いた発現系による蛋白質の安定同位体標識法などの研究成果に基づき 1)膜蛋白質に適応可能なNMR戦略法の確立と 2)イオンチャネルとイオンチャネルブロッカーの相互作用解析を行う。</p>							

これまでの研究経過（研究の進捗状況について、必要に応じて図表等を用いながら、具体的に記入してください。）

1) 高分子量蛋白質複合体の相互作用解析法の開発

当研究室で開発された交差飽和法は、従来の NMR 測定法に比較して厳密に高分子量蛋白質の界面残基を決定する測定法である(Nature Struct. Biol.(2000))。しかしながら、交差飽和法では直接複合体の NMR スペクトルを測定しなくてはならないため、100K 以上の巨大蛋白質複合体の場合適応できないという欠点があった。そこで、図 1 に示すような転移交差飽和法 (TCS 法) を考案した。TCS 法では、遊離のリガンド蛋白質由来の交差飽和現象を用いて界面残基を同定するため、複合体の分子量に上限は存在しないことが考えられる。そこで、プロテイン A・B ドメインとインタクト抗体の複合体(164K)を用い、NMR 測定を行った。適切な条件化で測定を行った結果、図 2 に示す結果を得、遊離リガンド分子を用いても界面残基の同定ができることが示された(J. Mol. Biol., (2002))。このことは、従来は不可能であった、膜蛋白質のような高分子量蛋白質や細胞表面に発現している受容体とリガンドとの相互作用解析が、可能になることを示す。

2) 膜蛋白質の効率的発現系の確立および膜への埋め込み条件の検討

電位依存性 K⁺チャネルと高い相同性を示し、かつポアープロッカーに対する感受性を保持した *Streptomyces lividans* 由来の K⁺チャネル: KcsA とポアープロッカー: AgTx2 (AgTx)を研究対象として取り上げ、大量発現系の構築を行ったところ、大腸菌を用いた発現系で KcsA および AgTx と、十分な蛋白量が得られることがわかった。また、得られた KcsA は、いくつかの界面活性剤を用いることで安定に、かつ十分なチャネル機能を有した状態で可溶化されることが判明した。そこで、H16 年度以降行うことを計画していた、KcsA とそのポアープロッカー(AgTx)との相互作用解析に着手した。(高効率発現系および膜への埋め込みに関する他の成果は 特記事項を参照)

3) KcsA およびそのポアープロッカーとの相互作用解析

交差飽和現象の指標となる NMR シグナル強度の減少は、AgTx 分子内において α -Helix の前半および β -strand II に属する残基に顕著であり、それらは分子表面で 1 つの連続した面を形成した (図 3)。よって、AgTx はこの面を用いて KcsA と結合すると結論した。さらに、同定された結合界面に対して部位特異的変異を導入し、結合親和性の変化を測定した結果、結合界面上に存在する残基のほとんどで結合定数が低下し、同定された結合界面が結合親和性に寄与していることが示された。次に、TCS 法におけるシグナル強度変化を満たすように分子動力的計算を行うことで、AgTx-KcsA 複合体の立体構造モデルを構築した。その結果、AgTx 分子は K⁺選択フィルターを中心とした KcsA 上のキャピテリーに収納されるようにして結合することが明らかとなった (図 4)。また、当研究室で発見したポアープロッカー上に存在する構造モチーフとの対応より、KcsA の 64 位および 84 位が、ポアープロッカーの認識に重要な役割を示す残基であることが判明した。実際、他のチャネルのアミノ酸配列の比較から、AgTx 感受性チャネルではこれら残基が保存されていた。よって当該部位の保存性の違いにより K⁺チャネルのポアープロッカーに対する感受性が決定されると結論した(Structure, (2003))。

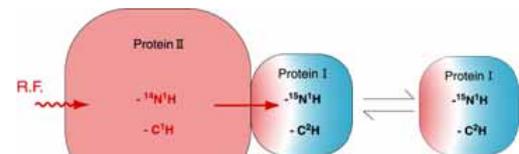


図 1 . 転移交差飽和法概念図

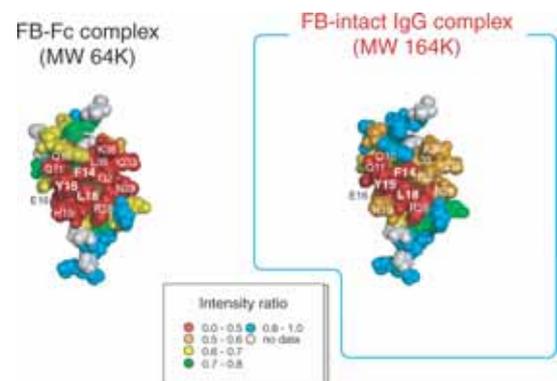


図 2 . 交差飽和法および転移交差飽和法で得られた結合部位の比較

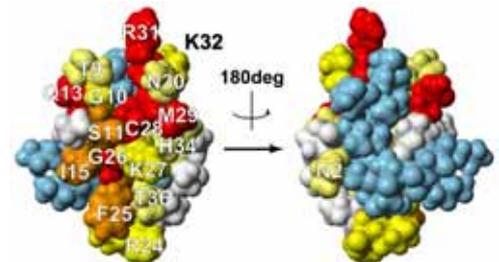


図 3 . 転移交差飽和法で求められた AgTx 上のチャネル結合部位

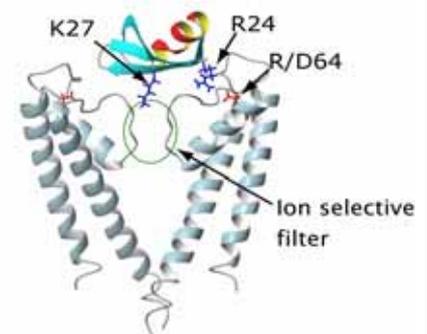


図 4 . KcsA イオンチャネルと AgTx 複合体モデル

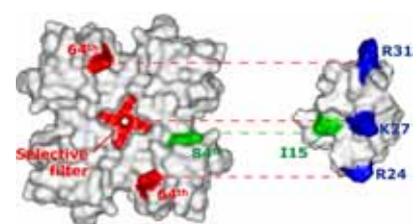


図 5 . KcsA イオンチャネルのポアープロッカー-選択性決定残基

特記事項 (これまでの研究において得られた、独創性・新規性を格段に発展させる結果あるいは可能性、新たな知見、学問的・学術的なインパクト等特記すべき事項があれば記入してください。)

1) 高分子量蛋白質複合体の相互作用解析法の開発

本研究で確立した転移交差飽和法は、従来は解析できない不均一系超分子複合体の解析に適用できる。そこで、繊維状コラーゲンとコラーゲン結合蛋白質の相互作用解析に応用した。von Willebrand factor(vWF)は、血管内皮細胞がダメージを受け、その結果露出したコラーゲンと血小板受容体との橋渡しをする蛋白質で、血小板凝集反応の最初のステップに参与する。vWF のコラーゲン結合能は A3 ドメインが担っている。A3 ドメインとコラーゲンとの相互作用解明は、生化学的にも創薬の観点からも重要な問題であるものの、コラーゲンが生理的条件下で繊維形成し超分子を作るため、X 線結晶構造解析をはじめとした従来の構造生物学的手法では解析できなかった。そこで、TCS 法を用いて、vWF の A3 ドメイン上のコラーゲン結合部位を同定したところ、図 1 のようになった。この結果は、世界で初めて、繊維状コラーゲンとコラーゲン結合蛋白質との相互作用解析に成功した例であり、Nature Struct. Bio.に掲載された。

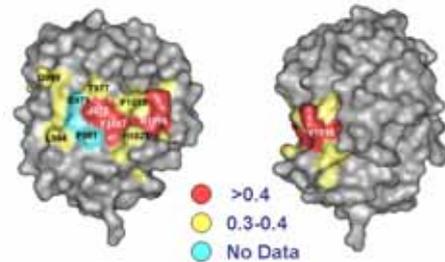


図 1 .vWF・A3 ドメインのコラーゲン結合部位

2) 膜蛋白質・リガンド相互作用および膜蛋白質の膜への埋め込み条件の検討

「これまでの研究経過の項」で述べたようにイオンチャネルとポアブロッカーの相互作用に関し Structure に発表した。本論文は、その号の論文のなかで唯一選出される、Editor's Featured Article となり、また、雑誌のホームページから download される回数でできる Frequent Access Article の 1 位になったことから、当該論文のインパクトは高いと判断できる。この研究では、可溶化したイオンチャネルを用いて実験を行っているが、可溶化膜蛋白質は必ずしも安定であるとは限らない。そこで、より安定な NMR 測定用膜蛋白質を作成するため、脂質 2 重膜に埋め込むことを考えた。その際、膜蛋白質の埋め込みポラリティ (膜の内外) をコントロールすることも考慮した。考案した TCS 測定用再構成膜蛋白質を図 2 に示す。すなわち、膜蛋白質に His タグを付加し、Zn-NTA ビーズに吸着させ、脂質 2 重膜でコートする。埋め込みポラリティは完全にコントロールされ、この場合 KcsA のポアブロッカー結合面は外側を向く。また、KcsA は脂質 2 重膜に埋め込まれているため、界面活性剤中に存在している場合より安定である。このような再構成膜蛋白質ビーズを用いて TCS 実験を行ったところ、AgTX 上の KcsA 結合部位を決定することができ、この再構成法は有効であることが示された。この結果は、特許 (特願 2003—350094) として公表した。論文は作成中である。

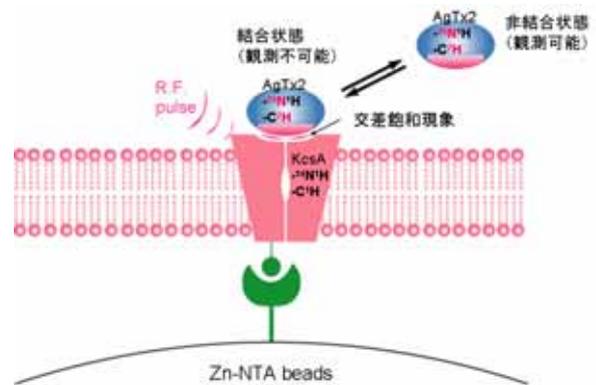


図 2 . ビーズ上に固定したイオンチャネルを用いた TCS 実験の概略

3) 膜蛋白質の効率的発現系の確立

高効率蛋白質発現系の一つに無細胞発現系がある。そこで、無細胞発現系による膜蛋白質の発現を試みた。大腸菌ライゼートに、反転膜小胞(IMV)を加えて、合成を行ったところ、図 3, 4 に示すよう、IMV 添加による発現効率の向上が見られた。さらなる膜への膜蛋白質取り込み効率を上げるため、膜透過を促進する Sec 因子の活用を試みた。Sec 因子を利用して大腸菌ペリプラズムへ輸送されるプロ OmpA のシグナルを付加したところ、顕著な効果が観測された (図 5, 6)。

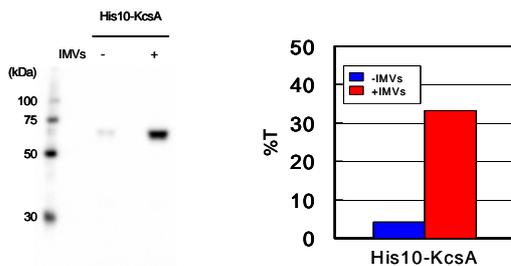


図 3 IMVs を添加した His10-KcsA の無細胞合成

図 4 His10-KcsA ホモ 4 量体形成における IMVs の効果

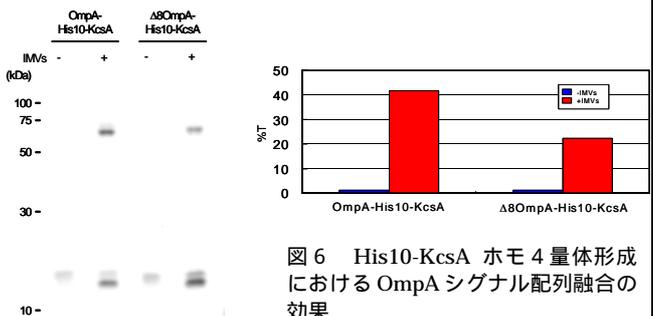


図 6 His10-KcsA ホモ 4 量体形成における OmpA シグナル配列融合の効果

図 5 OmpA もしくは Δ8OmpA シグナル配列を融合した His10-KcsA の無細胞合成

研究成果の発表状況 (この研究費による成果の発表に限り、学術誌等に発表した論文(発表予定のものを記入することも可能。)の全著者名、論文名、学協会誌名、巻(号)、最初と最後のページ、発表年(西暦)、及び国際会議、学会等における発表状況について記入してください。)

- 1) Determination of the Interface of a Large Protein Complex by Transferred Cross-saturation Measurements Tamiji Nakanishi, Mayumi Miyazawa, Masayoshi Sakakura, Hiroaki Terasawa, Hideo Takahashi, and Ichio Shimada, *J. Mol. Biol.* (2002) 318, 245-249.
- 2) Solution Structure of ω -Grammotoxin SIA, a gating modifier of P/Q and N type Ca^{2+} channel Koh Takeuchi¹, Eun Ju Park, Chul Won Lee, Jae Il Kim, Hideo Takahashi¹, Kenton J. Swartz, and Ichio Shimada, *J. Mol. Biol.* (2002) 321, 517-526.
- 3) Backbone 1H , ^{13}C , ^{15}N resonance assignments of the von Willebrand factor A3 domain Noritaka Nishida, Mayumi Miyazawa, Hiromi Sumikawa, Masayoshi Sakakura, Nobuhisa Shimba, Hideo Takahashi, Hiroaki Terasawa, Ei-ichiro Suzuki, Ichio Shimada *J. Biomol. NMR* (2002) 24, 357-358.
- 4) Novel Collagen-Binding Mode of the VWA Domain Determined by a Transferred Cross-Saturation Experiment Noritaka Nishida, Hiromi Sumikawa, Masayoshi Sakakura, Nobuhisa Shimba, Hideo Takahashi, Hiroaki Terasawa, Ei-ichiro Suzuki, Ichio Shimada *Nature Struct. Biol.* (2003) 10, 53-58.
- 5) Structural Genomics of Membrane Proteins Yoshimasa Kyogoku, Yoshinori Fujiyoshi, Ichio Shimada, Haruki Nakamura, Tomitake Tsukihara, Hideo Akutsu, Takayuki Odahara, Tetsuji Okada, and Nobuo Nomura *Accounts. Chem. Res.* (2003) 36, 199-206.
- 6) Structural basis of the KcsA K^+ channel and agitoxin2 pore-blocking toxin interaction by using the transferred cross-saturation method Koh Takeuchi, Mariko Yokogawa, Tomoki Matsuda, Mariko Sugai, Seiko Kawano, Toshiyuki Kohno, Haruki Nakamura, Hideo Takahashi, and Ichio Shimada *Structure* (2003) 11, 1381-1392.
- 7) Channel forming membrane permeabilization by an antibacterial protein: sapecin - Determination of membrane binding and oligomerization surfaces by NMR - Koh Takeuchi¹, Hideo Takahashi, Mariko Sugai, Hideo Iwai, Toshiyuki Kohno, Kazuhisa Sekimizu, Shunji Natori, and Ichio Shimada *J. Biol. Chem.*(2004) 279, 4981-4987.
- 8) Hyaluronan-recognition mode of CD44 revealed by cross-saturation and chemical shift perturbation experiments Mitsuhiro Takeda, Hiroaki Terasawa, Masayoshi Sakakura, Yoshiki Yamaguchi, Masahiro Kajiwara, Hiroto Kawashima, Masayuki Miyasaka, and Ichio Shimada *J. Biol. Chem.*, (2003) 278, 43550-43555.
- 9) 1H , ^{13}C , and ^{15}N backbone resonance assignments of the hyaluronan-binding domain of CD44 Mitsuhiro Takeda, Hiroaki Terasawa, Masayoshi Sakakura, Yoshiki Yamaguchi, Masahiro Kajiwara, Hiroto Kawashima, Masayuki Miyasaka, and Ichio Shimada *J. Biomol. NMR*, (2004) 29, 97-98.
- 10) Molecular basis of the high-affinity activation of type 1 ryanodine receptors by imperatoxin A. Lee CW, Lee EH, Takeuchi K, Takahashi H, Shimada I, Sato K, Shin SY, Kim DH, Kim JI. *Biochem J.* (2003) 377, 385-394.

学会

国際学会招待講演 4
国内学会招待講演 19