

膜タンパク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

Nobel strategy of structural biology
for investigation of membrane proteins-ligands interactions

嶋田 一夫 (Ichio Shimada)
東京大学・大学院薬学系研究科・教授



研究の概要

膜タンパク質の機能解明を目指して、膜タンパク質・リガンド相互作用解析を可能とする、NMR 相互作用解析戦略を確立した。またその戦略を、イオンチャネルとポアブロッカーの相互作用解析を行い、イオンチャネルの阻害剤特異性発現機構を明らかにした。

研究分野／科研費の分科・細目／キーワード
構造生物学／薬学、物理系薬学／核磁気共鳴法、膜蛋白質、相互作用

1. 研究開始当初の背景・動機

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タンパク質で受けとめられ、さまざまな生物学的現象を引き起こす。このような膜タンパク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、膜タンパク質を対象とした 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、膜タンパク質・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、またこれらの膜タンパク質を大量に発現しかつ安定に測定試料と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た。

2. 研究の目的

本研究では、1) 膜タンパク質に適応可能な 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。

3. 研究の方法

分子生物学および構造生物学的手法 (NMR) を用いる。

4. 研究の主な成果

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

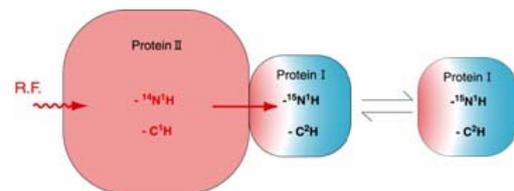


図 1. 転移交差飽和法の概念図

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、膜タンパク質のような高分子量蛋白質

[4. 研究の主な成果 (続き)]

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。K⁺イオンチャネルであるKcsAとそのポアーブロッカー (AgTx) との相互作用解析をTCS法により行った。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。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の変異を導入し、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上のキャビティ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2)。また、当研究室で発見したポアーブ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位だが、ポアーブ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⁺チャネルのポアーブロッカーに対する感受性が決定されると結論した (Structure, (2003))。

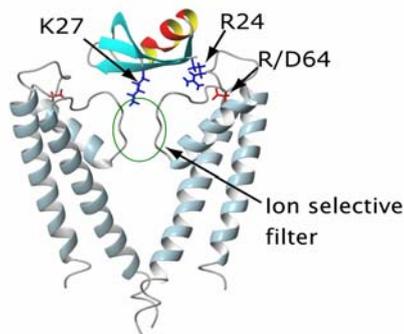


図2. KcsA イオンチャネルと AgTx

5. 得られた成果の世界・日本における位置づけとインパクト

転移交差飽和法を開発し、従来のNMRの測定限界を打破した。NMRの研究領域において、欧米発の測定法が多い中、極めてユニークな手法を日本から発信できた。本手法は国内外で使用されてきて、蛋白質・蛋白質相互作用法としての地位を確立しつつある。

また、本手法を応用し、繊維状コラーゲン・コラーゲン結合蛋白質 (Nature Struct. Biol.)、イオンチャネル・ポアーブロッカー (Structure)、脂質 2 重膜・抗菌活性ペプチド間相互作用解析 (J. Biol. Chem.) などに成功し、生物学的に重要な知見を得ることができた。さらに、膜タンパク質をアフィニティビーズに固定し、可溶化剤を用いることのない新規膜タンパク質試料調製法も開発できた (J. Am. Chem. Soc.)。

6. 主な発表論文

(研究代表者は太字、研究分担者には下線)
K. Takeuchi, H. Takahashi, S. Kawano, and **I. Shimada**, Structure basis for the gating of a pH-gated K⁺ channel, KcsA, *J Biol Chem.* in press.

M. Yokogawa, K. Takeuchi, and **I. Shimada**, Bead-linked proteoliposomes: a reconstitution method for NMR analyses of membrane protein-ligand interactions, *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 12021-12027 (2005)

K. Takeuchi, H. Takahashi, M. Sugai, H. Iwai, T. Kohno, K. Sekimizu, S. Natori and **I. Shimada**, Channel-forming membrane permeabilization by an antibacterial protein, sapecin: determination of membrane-buried and oligomerization surfaces by NMR, *J. Biol. Chem.*, **279**, 4981-4987 (2004)

K. Takeuchi, M. Yokogawa, T. Matsuda, M. Sugai, S. Kawano, T. Kohno, H. Nakamura, H. Takahashi and **I. Shimada**, Structural basis of the KcsA K⁺ channel and agitoxin2 pore-blocking toxin interaction by using the transferred cross-saturation method, *Structure*, **11**, 1381-1392 (2003)

N. Nishida, H. Sumikawa, M. Sakakura, N. Shimba, H. Takahashi, H. Terasawa, E. Suzuki and **I. Shimada**, Novel collagen-binding mode of the VWA domain determined by a transferred cross-saturation experiment, *Nat. Struct. Biol.*, **10**, 53-58 (2003)

ホームページ

http://ishimada.f.u-tokyo.ac.jp/public_html/