

機関番号：22701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790046

研究課題名(和文)新規AMPA賦活薬を指向したAMPA制御タンパク質Stargazinの解析

研究課題名(英文)Study of an AMPAR auxiliary transmembrane protein, stargazin

研究代表者

坂倉 正義 (Sakakura, Masayoshi)

横浜市立大学・生命医科学研究科・助教

研究者番号：20334336

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：興奮性神経伝達を司るAMPA型グルタミン酸受容体(AMPA)の制御膜タンパク質であるstargazinについて、AMPAとの相互作用機構を明らかとすることによって、新規抗精神疾患薬をデザインするための基盤情報を得ることを目的とし、研究を行った。核磁気共鳴法(NMR)を用いた構造解析・相互作用解析を行うために、酵母を用いて、安定同位体標識を行った再構成タンパク質を発現させ、精製を行った。この結果、1L培養あたり4mg程度のタンパク質を得る培養・精製プロトコルを確立することに成功した。本プロトコルを基にして、今後NMRを用いた構造解析が可能になると期待される。

研究成果の概要(英文)：Stargazin is an auxiliary transmembrane subunit of the AMPA-type glutamate receptor which is responsible for fast excitatory synaptic transmission. The specific aim of this study is to establish a protocol to obtain recombinant stargazin proteins labeled with stable isotopes to pursue structural and interaction studies using nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy as a principal investigation tool. We used the yeast *Pichia pastoris* for the recombinant expression because it has advantages to express human membrane proteins over prokaryotic cells such as *E. coli*. We optimized experimental conditions, such as cell culture conditions, cell strains, cell disruption conditions, membrane protein extraction conditions from cell membranes, and finally obtained a purified recombinant stargazin with a yield of 4 mg per liter culture. The protocol established in this study will enable the NMR study of stargazin.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・物理系薬学

キーワード：構造生物学

1. 研究開始当初の背景

(1) AMPA 型グルタミン酸受容体 (AMPA) は、哺乳類の中枢における速い興奮性シナプス伝達を担うチャネル内蔵型受容体であり、抑うつ、パーキンソン病など、多様な精神疾患に対する薬物の標的分子である。AMPA は、膜貫通型 AMPAR 制御蛋白質 (TARP) と呼ばれる 4 回膜貫通型タンパク質と複合体を形成し、シナプスへの集積や、チャネル活性の制御を受けている。この TARP による AMPAR 制御機構を原子レベルにおいて理解することができれば、TARP を介して間接的に AMPAR をコントロールする新しいアロステリック AMPAR 制御薬が樹立できると期待される。

(2) 代表的な TARP である stargazin は、小脳に多く発現し、正常な脳機能の発現に重要な働きをしていると考えられている。

Stargazin による AMPAR の制御は 2 種類の機構が知られており、1 個目は、AMPA を細胞表面に輸送し、さらにシナプスへの集積を誘導する活性である。Stargazin の第 1 細胞外ループ (ECL1) と C 末端領域、AMPA のリガンド結合ドメインが、AMPA の細胞膜発現に必須であることが示されている。しかし、これらの相互作用と AMPAR の膜輸送との関連性は、明確に説明されていない。

2 個目の AMPAR 制御機構として、stargazin は、AMPA のチャネル活性を変調する。まず、stargazin は、AMPA のグルタミン酸に対する親和性を増強する。次に、グルタミン酸により惹起されるイオン電流を上昇させる。さらに、stargazin は、AMPA 増強薬のサブユニット特異性を変化させることが示されている。Stargazin による AMPAR の制御は永続的ではなく、AMPA へのグルタミン酸結合に伴い、stargazin は AMPAR から解離し、AMPA の細胞内移行が促進される。

(3) Stargazin による AMPAR の制御機構を詳細に理解するためには、stargazin と AMPAR の原子レベルにおける構造情報・相互作用情報が必要不可欠である。これまでに、AMPA 単体については、全長 AMPAR の結晶構造など、構造情報が蓄積されている。これに対して、stargazin については、電子顕微鏡解析による立体構造 (分解能 20 Å) が報告されているのみであり、原子レベルでの構造情報は得られていない。stargazin は、4 回膜貫通型タンパク質群である PMP22/EMP/MP20/ Claudin スーパーファミリーに分類される。このファミリーに属するタンパク質については、立体構造の報告例が存在せず、stargazin は構造生物学的観点からも新規性が高い研究対象である。

2. 研究の目的

(1) 酵母を用いて stargazin を細胞膜中に発現させ、界面活性剤などの疑似膜環境中に可溶化した状態で単離する。

(2) NMR を用いた stargazin 単体の立体構造解析を行う。

(3) Stargazin と AMPAR のリガンド結合ドメイン (AMPA-LBD) との相互作用解析を行い、stargazin による AMPAR 制御機構について考察する。

3. 研究の方法

(1) ヒト由来の膜タンパク質を大腸菌などの原核細胞により発現させた場合、タンパク質の発現量が十分であったとしても、変性状態で発現することが多く、正しい fold 状態のタンパク質を得ることは概して困難である。そこで、真核生物である酵母を用いて、stargazin を酵母膜内に発現させる。酵母株としては、高発現量が期待できる、メタノール資化酵母 *Pichia pastoris* を用いる。

(2) NMR を用いた stargazin の構造解析、相互作用解析を行うため、安定同位体標識を行った stargazin 試料の調製を行う。安定同位体標識化合物を含む最小培地中で、構造解析を行うために十分な量のリコンビナント stargazin を得るため、培養、精製条件の最適化を行う。

(3) 酵母の膜中に発現した stargazin を、界面活性剤により抽出し、精製する。

(4) stargazin との相互作用解析を行うために、大腸菌を用いてリコンビナント AMPAR-LBD を調製する。

(5) サイズ排除クロマトグラフィーにより、界面活性剤ミセル中における stargazin の性状解析を行う。さらに、stargazin と AMPAR-LBD との相互作用解析を行う。

4. 研究成果

(1) 酵母を用いたヒト膜タンパク質の発現
まず、stargazin と同一のファミリーに属する膜タンパク質であり、発現量が高いことが分かっている PMP22 を用いて、発現条件の最適化を行った。この結果、(a) 遺伝子中のコドンの最適化により、収量の増加が見込めること、(b) *Pichia pastoris* の菌株として KM71H 株を用いることにより、発現量が増加することが明らかとなった。Mut^S フェノタイプを示す KM71H 株は、メタノール代謝活性が低く、目的タンパク質の発現速度が遅いと考えられる。ヒト膜タンパク質のリコンビナント発現においては、発現速度を低下させることにより、活性タンパク質の収量が増加する例が知られており、本結果と矛盾しない。

次に、ファーメンタを用いた KM71H の培養

条件の最適化を行った。通常 *Pichia pastoris* の培養においては、最初にグリセロールを炭素源とした前培養を行い、菌体数が十分に増えた段階で炭素源をメタノールに切り替え、目的タンパク質の発現を誘導する。このとき、グリセロールが培地中に残存していると、誘導の効率が低下するため、培地中の炭素源の残量をモニターする必要がある。本研究においては、酸素計を用いて培地中の酸素濃度を継続的にモニターすることにより、培地中の炭素源量の変化を検出し、適切なタイミングでメタノールを培地に添加することを可能とした。

(2) 安定同位体標識法の検討

PMP22 を用いて検討を行った。

通常 *Pichia pastoris* の培養においては、1 L の培地当たり 10 g の硫酸アンモニウムを加え、窒素源とする。しかし、NMR 解析用の ¹⁵N 標識サンプルを調製する場合には、¹⁵N 塩化アンモニウムを可能な限り少量用いることが望ましい。培地に加える塩化アンモニウム量の最適化を行った結果、3 g / L まで低下させても、菌体量が変化しないことを見出した。

一方、*Pichia pastoris* 発現系により ¹³C 標識サンプルを調製する場合には、高価な ¹³C メタノールを用いる必要がある。これに対して、前述したメタノール代謝活性が低い KM71H を菌株として用いることにより、消費メタノール量を低下させることが可能となった。

(3) 膜タンパク質の抽出

PMP22 を用いて検討を行った。

まず、酵母細胞を、目的タンパク質にダメージを与えることなく破碎する手法について、比較検討を行った。この結果、連続圧力式細胞破碎機を用いることにより、低温状態を維持したまま細胞を破碎することに成功した。また、細胞破碎に際しては、プロテアーゼインヒビターカクテルを常在させ、プロテアーゼによる目的タンパク質の分解を抑えた。

得られた細胞破碎液を低速遠心し、未破碎菌体を除去した後、超遠心分離により、細胞膜画分を得た。

次に、膜画分から目的膜タンパク質を抽出するための界面活性剤の検討を行った。9 種類の界面活性剤 (SDS、empigen、DPC、LDAO、DDM、DM、-OG、Triton X-100、nonidet P-40) を、それぞれ PMP22 を含む膜画分に対して添加し、4 にて 90 分間攪拌した後、可溶化されたタンパク質の量を比較した。この結果、empigen、DPC などのイオン性界面活性剤は可溶化効率が高く、DDM、-OG などの非イオン性界面活性剤は可溶化効率が高いことが明らかとなった。一方、胆汁酸塩であるデオキシコール酸を共存させることにより、DDM による可溶化効率が向上することを見出した。

一般に、非イオン性界面活性剤は、タンパク質に対する変性効果がイオン性界面活性剤と比較して低いというメリットを有するが、可溶化効率が低いというデメリットが存在する。胆汁酸塩との併用により、膜タンパク質の構造解析における非イオン性界面活性剤の適用範囲を拡大できると考えられる。

(4) Stargazin の発現・精製

上記条件検討の結果を踏まえ、コドン最適化を行ったヒト stargazin の遺伝子を pPICZB ベクターに導入した。野生型の stargazin に加えて、細胞内領域に存在する Cys302 を Ser に置換した変異体 (C302S) および細胞内領域 (207-323) を欠損させた変異体 (C) についても発現用ベクターを設計・作製した。さらに、stargazin と同じ TARP family に属する TARP -5 (stargazin と -5 の一次配列相同性は 32%) についても発現用ベクターを構築した。

上記発現ベクターを、それぞれ KM71H に導入し、形質転換株を得た。形質転換株をファーマンタを用いて培養し、メタノールにより目的タンパク質の発現を誘導した。2 日間の発現誘導後、菌体を回収し、連続圧力式細胞破碎機を用いて菌体破碎を行った。菌体破碎液から膜画分を回収し、抽出用界面活性剤の探索を行ったが、得られたタンパク質量が少なく、界面活性剤ごとの可溶化効率の違いを明確にできなかった。そこで、PMP22 を用いた検討において、SDS に続いて可溶化効率の高かった empigen を用いて膜画分の可溶化を行った。可溶化した stargazin は、Ni レジンを用いたアフィニティ クロマトグラフィーにより精製を行った。この精製過程において、empigen をより mild な界面活性剤 (DPC、LDAO、DDM、LMPG) に置換した。DPC に可溶化した stargazin (C コンストラクト) について、最も高い収量 (1 L 培養あたり 4 mg) が得られた。

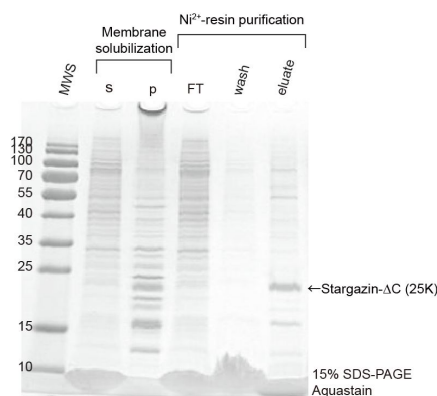


図 1、精製したリコンビナント stargazin (C) の SDS-PAGE 解析結果 (CBB 染色)

(5) AMPAR-LBD の調製

ヒト GluR2 (flip 型) のリガンド結合領域 (LBD) の遺伝子 (以下 GluR2-LBD (flip 型) を AMPAR-LBD と呼ぶ) を導入した大腸菌を培

養し、大腸菌の不溶性画分中に目的タンパク質を得た。不溶性画分中の AMPAR-LBD をグアニジンにより変性して可溶化した後、透析法により巻き戻し、精製を行った。1 L 培養あたり約 10 mg の ^{15}N 標識ヒト AMPAR-LBD を安定的に得る発現・精製プロトコルを確立した。得られた AMPAR-LBD について NMR スペクトルを測定し、これまでに報告されているラット由来 AMPAR-LBD (flop 型) と同様のスペクトルを得ることに成功した。さらに、 ^2H , ^{13}C , ^{15}N により 3 重標識を行った AMPAR-LBD を調製し、一連の 3 重共鳴スペクトルを測定・解析した。この結果、254 個の観測可能な主鎖アミド基由来シグナルのうち、245 個 (96%) の帰属を完了させた。以上により、AMPAR-LBD における stargazin との相互作用部位を、NMR を用いて解析するための準備が整った。

(6) サイズ排除クロマトグラフィーによる stargazin の性状解析、AMPAR-LBD との相互作用解析

界面活性剤 (DPC、LDAO、DDM、LMPG) に可溶化した stargazin (WT/C302S) について、それぞれサイズ排除クロマトグラフィーによりみかけの分子量を解析した。この結果、DDM に可溶化した Stargazin は、分子量約 60K 付近にシングルピークとして溶出した。一方、DPC に可溶化した stargazin は分子量 17K-158K に及ぶブロードな溶出ピークを示したが、ピークトップは、17K 付近に存在した。

DPC に可溶化した stargazin (C302S/ C) を AMPAR-LBD と混合し、サイズ排除クロマトグラフィーによる相互作用解析を行った。しかし、相互作用を示唆する溶出位置のシフトは見られなかった。一方、TARP -5 については、DH₇PC ミセル中において同様の解析を行ったが、相互作用形成を示す溶出位置のシフトは見られなかった。相互作用が検出されなかった要因としては、(a) DPC に可溶化された状態の stargazin が正しい構造を形成していない、(b) DPC ミセル溶液中において AMPAR-LBD が正しい構造を維持していない、(c) stargazin と AMPAR-LBD の親和性が、サイズ排除クロマトグラフィーの検出限界より低い、等の理由が考えられ、今後の研究における条件検討事項とする。

(7) 研究の総括

本研究において、酵母 *Pichia pastoris* を用いて安定同位体標識を行ったヒト膜タンパク質を発現するための培養・精製に関する基盤技術を確立した。また、この過程において、情報が蓄積された。本基盤技術は、stargazin のみならず、他の多くの膜タンパク質の発現においても適用可能であり、汎用性が高いと考えられる。

リコンビナントヒト stargazin を、1 L 培養あたり最大 4 mg の収量で得る培養・精製プロトコルを確立した。本プロトコルで

得られる収量は、NMR を用いた構造解析を行うために必要なタンパク質量の最低限度をクリアしているが、将来的に重水素化を行うことを考慮すると、改善の必要があると考えられる。得られた膜タンパク質の質 (folding 状態、AMPAR-LBD に対する結合活性) については、必ずしもポジティブな結果が得られておらず、今後、界面活性剤の最適化、界面活性剤以外の膜タンパク質可溶化方法の探索が必要と考えられる。

リコンビナントヒト AMPAR-LBD を、1 L 培養あたり 10 mg の収量で得る培養・精製プロトコルを確立した。さらに AMPAR-LBD の NMR 解析を行い、ほとんどの主鎖アミド基について NMR シグナルの帰属を行うことに成功した。本成果を基に、今後 AMPAR-LBD 側を検出対象として、stargazin との相互作用解析を行うことが可能である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 0 件)

[学会発表](計 2 件)

坂倉正義、白石佑太、伏見威俊、小池賢一郎、高橋栄夫、NMR 構造解析を指向したヒト膜タンパク質の酵母発現系の構築、日本薬学会第 134 年会、2014 年 3 月 29 日、熊本市総合体育館
伊東優弘、坂倉正義、高橋栄夫、NMR を用いた AMPA 型グルタミン酸受容体リガンド結合ドメインとそのリガンドの相互作用解析、日本薬学会第 134 年会、2014 年 3 月 29 日、熊本市総合体育館

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://www-mls.tsurumi.yokohama-cu.ac.jp/fsb/takahashi/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

坂倉 正義 (SAKAKURA, Masayoshi)

横浜市立大学・大学院生命医科学研究科・助教

研究者番号：20334336

(2) 研究分担者：なし

(3) 連携研究者：なし