

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007-2008
 課題番号：19570129
 研究課題名（和文） カルシウムによる G 蛋白質シグナルの調節機構の構造的基盤
 研究課題名（英文） Structural basis of the calcium-dependent modulation of G protein signaling
 研究代表者
 稲野辺 厚（INANOBE ATSUSHI）
 大阪大学・医学系研究科・准教授
 研究者番号：00270851

研究成果の概要：

G 蛋白質や Ca^{2+} 等の細胞内シグナルはそれぞれ真核生物において必須であるが、これらは互いに制御しあうことによって、シグナルをより一層精緻に形作っている。本研究では、構造生物学的アプローチによって、両者のシグナル変換素子の相互作用を原子レベルで明らかにするために、複合体の単結晶作成を目的とした。その結果、2つのシグナルの変換素子である RGS 蛋白質と CaM の複合体の結晶作成に適した蛋白質の設計に成功した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：薬理学

科研費の分科・細目：生物化学・機能生物化学

キーワード：G 蛋白質シグナル、 Ca^{2+} シグナル、蛋白質結晶化

1. 研究開始当初の背景

細胞質に流入するカルシウムイオン (Ca^{2+}) は、細胞内において種々の生理反応のメディエーターとして存在し、細胞の増殖、遺伝子発現、発生、分化、運動、興奮や細胞死等のあらゆる局面で機能する。細胞質内の Ca^{2+} は主要な Ca^{2+} 結合蛋白質カルモジュリン (CaM) と結合し、生理作用を発現する。近年、CaM の凡そ半数は細胞膜蛋白質と結合しており、イオンチャネル、トランスポーター等の膜輸送蛋白質の機能を修飾することが判ってき

た。申請者らの研究室では、脱分極刺激によって細胞外から流入する Ca^{2+} が CaM と結合し、3量体 G 蛋白質 α サブユニットの GTP 水解活性を促進する RGS (Regulators of G protein signaling) 蛋白質と複合体を形成することにより、G 蛋白質シグナルを調節していることを明らかにしている。以上のように、CaM による膜蛋白質の機能調節機構は多様であり、細胞生理において重要な役割を担っているが、その本質である構造的基盤には不明な点が多く残されている。

2. 研究の目的

細胞内シグナルは分子間の連関による分散 (divergence) と、複数のシグナルが重なり合う集合 (convergence) という 2 つのシステムを内包する。G 蛋白質、 Ca^{2+} といった 2 つの細胞内シグナルは真核生物において必須であるが、これらは互いに制御し合う事で、シグナルをより一層精緻に形作っている。

G 蛋白質共役型受容体刺激によって、G 蛋白質は α サブユニットと $\beta\gamma$ サブユニットに解離する。解離したそれぞれのサブユニットが様々な効果器の活性を調節することによって、生理反応が惹起される。RGS 蛋白質は α サブユニットの内因性 GTP 水解活性を促進し、G 蛋白質サイクルを促進することによって、G 蛋白質シグナルを調節する因子である。一方、CaM は Ca^{2+} の結合状況に応じて構造を変化させ、標的分子の構造平衡を調節し、その機能発現を制御する (Saimi and Kung, *Annu. Rev. Physiol.*, 64, 289-311, 2002)。通常、RGS 蛋白質は細胞内でリン脂質である PIP_3 と結合し、その機能が抑制されている (Ishii et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 99, 4325-4330, 2002)。しかしながら、細胞外から流入してくる Ca^{2+} と結合した CaM は RGS 蛋白質と相互作用することによって、RGS 蛋白質に結合した PIP_3 を排除し、RGS 蛋白質を活性化型にする (Ishii et al., *Circ. Res.*, 89, 1045-1050, 2001, Ishii et al., *Biochem. J.*, 385, 65-73, 2005)。このように両者の相互作用は、細胞内シグナルのプロセス過程において重要な役割を担っている。そのため、構造生物学的アプローチによって、これら 2 つの情報変換素子の相互作用を原子レベルで明らかにすることにより、細胞シグナルをプロセスする機構の一つである convergence 機構について理解可能となることが期待された。

以上のことから、本研究では、 Ca^{2+} 存在下での CaM と RGS 蛋白質の複合体の単結晶作成を目的とした。単結晶から得られる X 線回折情報を解析することによって、複合体の分子立体構造を明らかにし、 Ca^{2+} による膜蛋白質制御機構の一つの側面である Ca^{2+} シグナルと G 蛋白質シグナルの convergence 機構の解明を目指した。

3. 研究の方法

(1) RGS 蛋白質の大量調整

マウス大脳由来の cDNA から RT-PCR 法により増幅した RGS12、RGS14、RGS16、GAIP 遺伝子を調整した。これらの遺伝子に加えて、現有するラット RGS4、RGS3、GRK2 の遺伝子を、蛋白質発現ベクターに組み込んだ。さらに、CaM は RGS 蛋白質の RGS ドメインに結合することから、各 RGS 蛋白質の RGS ドメインを同

様に蛋白質発現ベクターに組み込んだ。これらの蛋白質は GST 融合蛋白質または、His タグを N 末端に結合させた蛋白質として大腸菌に大量に発現させた。

(2) RGS 蛋白質の精製

大腸菌を破碎後、可溶性画分から GST 融合蛋白質はグルタチオン固定化樹脂を用いて、His タグ結合蛋白質は金属イオン固定化樹脂を用いて、それぞれアフィニティー精製を行った。目的蛋白質とそれ以外の領域の間には、蛋白質分解酵素 thrombin または、TEV (Tobacco Etch Virus プロテアーゼで認識されるアミノ酸配列を導入している。そのため、これらの酵素処理を行い、目的蛋白質とそれ以外の領域を切断した。その後、目的蛋白質はイオン交換樹脂により 95% 以上の純度で精製した。

(3) CaM の調整及び精製

CaM の遺伝子はマウス大脳由来の cDNA から RT-PCR 法により増幅した。これを蛋白質発現ベクターに組み込み、大腸菌に発現させた。大腸菌を破碎後、95 度で 5 分処理し、遠心操作を行い、可溶性画分を調整した。同画分には総蛋白質当り約 20% の CaM が含まれていた。CaM は疎水性樹脂と陰イオン交換樹脂を用いて、同画分より 98% 以上の純度で精製した。

(4) 複合体の精製

Ca^{2+} 存在下で RGS 蛋白質は CaM と複合体を形成する。この複合体をゲルろ過カラムによって単一画分に精製し、限外ろ過膜を用いて濃縮した。

(5) 結晶化条件の検討

結晶化条件の検討は、市販の蛋白質結晶化スクリーニングセット (Hampton 社 Crystal Screen I & II, Emerald BioStructures 社 Wizard I, II & III, CyroScreen I & II, Synergy Screen) を用いて、hanging drop 法により結晶化条件をスクリーニングした。結晶の有無は、セット後毎日顕微鏡下で観察し、一週間後からは、週に一度観察を行った。微結晶が産生される条件に基づき、結晶化条件を sitting drop 法によって最適化した。

(6) データ収集

得られた結晶を液体窒素で凍結し、SPring-8 のビームライン BL41XU、NSRRC のビームライン 13B1 で検討した。回折像は、HKL2000 を用いて検討した。

4. 研究成果

(1) RGS4 蛋白質と CaM との複合体の結晶化

RGS 蛋白質は G 蛋白質 α サブユニットの内因性 GTP 水解活性を促進し、G 蛋白質サイク

ルを調節する。RGS 蛋白質は静止膜電位状態で、リン脂質 PIP₃ を結合し、不活性型で存在する。しかし、Ca²⁺ の存在下で CaM は PIP₃ と競合的に結合し、G 蛋白質サイクルを調節できるようになる。そのため、両者を大量に精製し、複合体を調製する必要があった。

RGS4 の全長蛋白質に対して、GST、His タグを N 末端に結合させた遺伝子を作成し、両蛋白質を大腸菌に発現させ、精製を行った。‘方法’に記載した手法に基づき、CaM も精製し、RGS 蛋白質と Ca²⁺ 存在下で混ぜ合わせた。

同条件において、両者は安定した複合体を形成し、図 1 で示すような単一の peak としてゲルろ過カラムから、回収された。

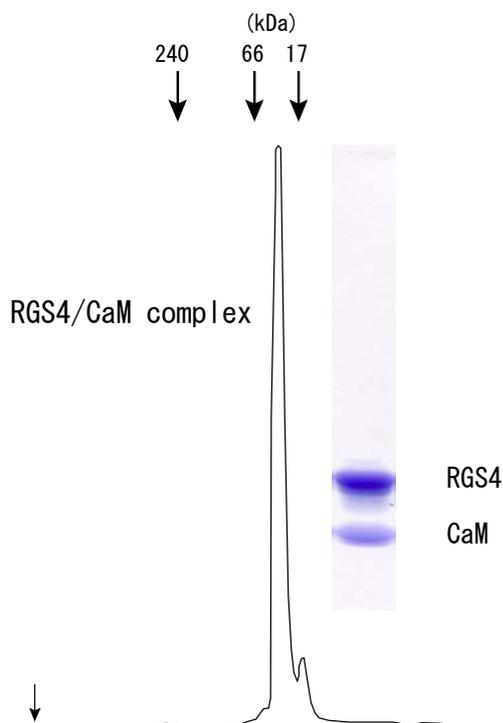


図 1 ゲルろ過カラムによる RGS4 と CaM 複合体の精製 (280 nm の吸光度変化と peak に含まれる蛋白質の電気泳動パターンを示す。図左の矢印は蛋白質をカラムに投与した時間を示し、上部の矢印は基準蛋白質の溶出位置をサイズで示している。)

得られた複合体を濃縮し、複数の結晶化スクリーニングセットを用いて、400 の異なる条件下で結晶産生条件を探索した。しかしながら、全く蛋白質結晶は得られなかった。

複合体の結晶が得られない要因として、1) 不純物の共存、2) 蛋白質の低い安定性、3) 構造的に flexible な領域の存在、4) 複合体の不安定性、5) 未知の蛋白質の翻訳後修飾等が想定された。

1) に関しては、RGS4 と CaM の純度はそれ

ぞれ 95% を超えていた。しかし、さらなる精製過程を経ることによって、結晶化が促進される可能性が考えられた。2)、4) に関して、4 度で一ヶ月保存した蛋白質はそれぞれゲルろ過カラム上、単一 peak に回収された。そのため、水溶液中での両蛋白質は安定であると考えられた。

RGS4 は 205 個のアミノ酸からなる蛋白質である。CaM の結合部位と推定されている領域は 2 箇所推定されていた。一つは、RGS 蛋白質ファミリーに共通した約 120 アミノ酸からなる RGS ドメインと呼ばれる領域であり、もう一つは、N 末端領域に存在する両親媒性の α ヘリックスである。生理的な条件下では、RGS ドメインが CaM と結合すると考えられている。さらに RGS4 の C 末端領域は 2 次元構造予測プログラムでは二次構造を取っていない領域であると推定されていた。さらに、RGS4 と G 蛋白質 α サブユニットとの複合体結晶構造では当該領域が観察されないことから、3) で示したように、C 末端領域は flexible な領域であり、結晶の形成を阻害する可能性が考えられた。そのため、N 末端から 10 残基、35 残基、C 末端から 18 残基を除去したコンストラクトを作成し、大量調整を行った。これら N 末端、C 末端領域を欠損した RGS4 蛋白質と CaM との複合体の結晶化条件を探索したが、いずれも結晶が産生されなかった。そのため、3) に関しては、結論が得られなかった。

一方、RGS4 は電気泳動上、単一のバンドとして観察され、陽イオン交換樹脂からは単一の peak として溶出されたため、5) の可能性は低いと推定された。しかし、MALDI-TOF-MASS によって解析すると、RGS4 の全長蛋白質、N 末端、C 末端の欠損蛋白質は、それぞれ凡そ 75 Da の差異を示す 5-7 つの peak に分離された。修飾されるアミノ酸残基や付加される官能基については未同定であるが、明らかに精製された RGS4 の heterogeneity を示すものであり、結晶化において阻害要因であると推定された。RGS4 は G 蛋白質 α サブユニットと共結晶が作成されている。CaM は α サブユニットと比較して分子量が 3 分の 1 であるため、crystal packing において翻訳後修飾が大きく影響していると考えられた。

(2) CaM に結合能を有する RGS 蛋白質の探索

現時点で 30 種類を超える RGS 蛋白質が真核生物に見出されており、それらは 10 種類のサブファミリーに分類されている。RGS4 はそのうち B/R4 と呼ばれるサブファミリーに分類される。B/R4 の特徴は分子量が小さく、N 末端に保存された両親媒性の α ヘリックスが存在する。一方、C 末端のアミノ酸配列は多様であるが、非常に短いため、蛋白質全体

のアミノ酸配列の相同性が高い。そのため、CaM に対して結合能を有していれば、RGS4 と類似した構造情報を取得可能となると推定された。さらに、RGS 蛋白質の RGS ドメインが CaM と結合することから、RGS16 だけでなく、RGS12、RGS14、RGS3、GAIP、 β GRK2 の RGS ドメインを発現ベクターに組み込み、それらを精製し、CaM との結合能の検討を行った。

その結果、全ての蛋白質は大腸菌で大量に発現され、精製可能であった。しかし、融合蛋白質の切断に使用する蛋白質分解酵素に対して、殆どの RGS 蛋白質は感受性があり、単一の蛋白質として精製されたのは RGS16 だけであった。さらに、RGS16 は、CaM と Ca^{2+} 依存性の結合を示したため、複合体結晶を作成する良い候補であることが推定された。精製 RGS16 蛋白質を MALDI-TOF-MASS によって解析すると、ほぼ単一の分子量を有する分子として精製されており、その分子量は 22448.515 で、予想される分子量と 3 Da のみの差異を示すことが判った。そのため、各種 RGS 蛋白質の中で、RGS16 の RGS ドメインが CaM との共結晶作成において、最適な RGS 蛋白質であることが推定された。

(3) RGS16 蛋白質と CaM との複合体の結晶化

RGS16 の RGS ドメインを含む部分蛋白質を His タグと融合させたままのもの、はずしたものの 2 種類調整し、これらと CaM との複合体を Ca^{2+} 存在下で精製した。そして、400 の異なる条件下でそれぞれの複合体の結晶化反応を行った。その結果、His タグをつけたままの RGS16 と CaM の複合体の結晶が図 2 で示すように産生される条件が同定された。

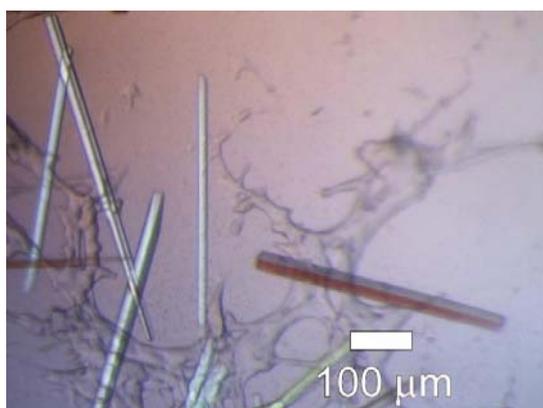


図 2. RGS16 と CaM との複合体の結晶

複合体の結晶化は 2-プロパノール存在下で、低い pH の条件で進行した。そのため、pH、沈殿剤の濃度を変化させ、添加物等を加える最適化作業を行うことによって、再現性の高い結晶化条件を同定することに成功し、最終的に、図 3 で示すような長軸方向で 800 μm を超える結晶の作成に成功した。

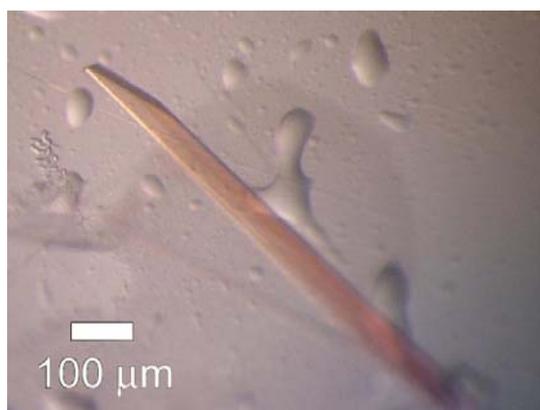


図 3. RGS16 と CaM との複合体の結晶

SPRING-8 のビームライン BL41XU 並びに、NSRRC のビームライン 13B1 等のシンクロトロン放射光を用いると、得られた結晶から 2.0 Å 程度の回折点が観察された。これまで 50 個を超える結晶を検討した。しかし、全ての結晶は複数の結晶が層状に集まったもので、きれいな対象性を示す回折像は得られなかった。それぞれの蛋白質を SeMet 標識し、その複合体由来の結晶も検討したが、結晶の質は同様で、結果は全く同じであった。

以上のことは、複合体を形成した 2 つの蛋白質は結晶化に適した蛋白質であることを示唆すると共に、単結晶の作成に極めて近い結晶化条件が同定されたことを示している。

得られた成果の国内外における位置づけとインパクト

他の研究グループから、RGS16 単独及び、G 蛋白質 α サブユニットとの複合体の結晶構造が発表された。結晶化に使用した RGS16 の領域は、今回結晶化に適していると同定された RGS16 の領域と合致していた。そのため、現在極めて構造情報が得られる状況に近いと推定される。これらの報告は、英国の国家プロジェクトとして構造解析を進めているグループからの報告である。それに対して、本研究従事者の研究背景は構造生物学ではなく、グループを構成していない。そのため、網羅的に解析して行く現在のプロテオミクスの潮流とは異なり、生理学、薬理学を基盤とした蛋白質の機能解析という点で、細胞内シグナルを解析する上で極めて重要な位置にいると考えられる。

今後の展望

今回の研究で、G 蛋白質、 Ca^{2+} の 2 つの細胞内シグナルの convergence 機構を構造生物学的に解析できる基盤が整った。そのため、単結晶の作成と構造情報の取得を目指し、本研究をさらに発展させる予定である。

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 1 件)

1. Inanobe, A., Kamiya, N., Murakami, S., Fukunishi, Y., Nakamura, H., and Kurachi, Y. *In silico* prediction of the chemical block of human *ether-a-go-go*-related gene (hERG) K⁺ current. J. Physiol. Sci., 58, 459-470, 2008. (査読有)

[学会発表] (計 2 件)

1. Inanobe, A., Matsuura, T., Nakamura, H., Nakagawa, A., and Kurachi, Y. Structural alterations in the cytoplasmic region of G protein-gated inward rectifier potassium channel, Kir3.2. Biophysical Society 53rd Annual Meeting, 平成 21 年 3 月 3 日、Boston

2. 稲野辺 厚、古谷 和春、倉智 嘉久、第 III 群抗不整脈薬による hERG 電流の増強作用機構の解析、日本循環薬理学会、平成 20 年 11 月 21 日、千葉

6. 研究組織

(1) 研究代表者

稲野辺 厚 (INANOBE ATSUSHI)

大阪大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：00270851

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者