

## 科学研究費補助金研究成果報告書

平成 21年 5月 26日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19590037

研究課題名（和文） 脂質二重膜中の膜蛋白質複合体における分子認識機構を解明する NMR 戦略の開発

研究課題名（英文） Development of an NMR strategy for the structural analysis of the molecular recognition in the membrane protein complex in lipid bilayers

研究代表者

大澤 匡範（OSAWA MASANORI）  
 東京大学・大学院薬学系研究科・助教  
 研究者番号：60361606

研究成果の概要：

脂質二重膜中の膜蛋白質はビーズに固定化することにより、安定性が劇的に向上するが、不溶性成分の共存により NMR シグナルの広幅化・感度の低下が問題となっていた。そこで、マジック角回転(MAS)による高感度化・高分解能化を目指した。

本研究では、高速 MAS に耐えることができ、広い固・液界面が確保可能な固定化担体を幅広く比較検討した結果、CM-シリカビーズを見出した。

次に、ユビキチン(Ub)と酵母 Ub 水酸化酵素(YUH)の相互作用系において、YUH を CM シリカビーズに固定化し、不均一系超分子を模倣した系を作成した。この YUH 固定化 Zn-NTA シリカビーズを均一 2H15N 標識した Ub の溶液に懸濁し、MAS 条件下で転移交差飽和法の測定を試みたところ、従来法では解析が困難であった固体と液体が共存した超分子系において、Ub 上の YUH 結合界面残基の同定に成功した。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：膜蛋白質、分子認識、NMR、構造生物学

## 1. 研究開始当初の背景

膜蛋白質は、従来、界面活性剤で可溶化して構造生物学的解析が行われてきたが、界面活性剤による可溶化はしばしば膜蛋白質の失活につながる。そこで、我々の研究室では膜蛋白質をアフィニティービーズに固定化した状態で脂質二重膜中に再構成する Bead-linked proteoliposome (BPL) を開発した。BPL として調製した膜蛋白質複合体における相互作用界面残基は、当研究室で開発した転移交差飽和法により解析可能である。BPL を用いた NMR による分子間相互作用解析には固体の共存によるスペクトルの低感度化・低分解能化が問題となっていた。

## 2. 研究の目的

(1) NMR スペクトルの高感度化・高分解能化を目指した、試料のマジック角回転 (MAS) による局所磁場不均一性の解消、(2) 巨大分子との相互作用系における双極子 - 双極子相互作用の MAS 条件下における性状解析、および MAS の特性を利用した新規相互作用解析法の開発

## 3. 研究の方法

(1) 固・液界面相互作用を解析する NMR 試料の作成

各種実験条件検討を効率よく行うために、超分子系における相互作用を mimic したモデル系を作成する。モデル系としては、酵母ユビキチン水酸化酵素(YUH)をビーズに固定化することにより、蛋白質の運動性を低下させ、それを YUH と結合する蛋白質である指キチン溶液中に懸濁することにより、双極子 - 双極子相互作用が亢進した分子間相互作用系を作り出す。

(2) 固液界面における双極子 - 双極子相互作用の性状解析

(1) で作成した相互作用系を用いて、MAS 条件下での TCS 法により、固・液界面における相互作用界面解析法を確立する。

## 4. 研究成果

固定化担体として用いていた Zn-NTA シリカビーズに対する蛋白質の非特異的吸着のため、固定化した蛋白質の活性低下や、液相に

存在する蛋白質の NMR シグナルの広幅化・低感度化が問題となるだけでなく、結合界面以外にも交差飽和現象が観測されるという問題が生じた。そこで、固定化担体を幅広く比較検討した結果、アミンカップリング反応により担体に固定化する CM 基を表面にもつ CM-シリカビーズを適用することにより、非特異吸着を軽減することに成功し、理論上最大の感度での測定が可能となった。次に、ユビキチン(Ub)と酵母 Ub 水酸化酵素 (YUH) の相互作用系において、YUH を CM シリカビーズに固定化し、不均一系超分子を模倣した系を作成した。固定化した YUH は 200  $\mu$ M であった。この YUH 固定化 Zn-NTA シリカビーズを均一  $^2\text{H}15\text{N}$  標識した Ub の溶液に懸濁し、MAS 条件下で転移交差飽和法の測定を試みたところ、従来法では解析が困難であった固体と液体が共存した超分子系において、Ub 上の YUH 結合界面残基の同定に成功した。本手法は、膜蛋白質複合体における分子間相互作用解析に適用可能であり、今後、実際に膜蛋白質複合体に適用していく。

## 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 13 件)

Sugiki T., Shimada I., Takahashi H. (2008) Stable isotope labeling of protein by *Kluyveromyces lactis* for NMR study. *J Biomol NMR*. 42, 159-162. 査読有

Sakakura M., Oo-Puthinan S., Moriyama C., Kimura T., Moriya J., Irimura T., Shimada I. (2008) Carbohydrate binding mechanism of the macrophage galactose-type C-type lectin 1 revealed by saturation transfer experiments. *J Biol Chem*. 283, 33665-33673. 査読有

Sugahara K.N., Hirata T., Tanaka T., Ogino S., Takeda M., Terasawa H., Shimada I., Tamura J, ten Dam GB, van Kuppevelt TH, Miyasaka M. (2008) Chondroitin sulfate E fragments enhance CD44 cleavage and CD44-dependent motility in tumor cells. *Cancer Res*. 68, 7191-7199. 査読有

Igarashi S., Osawa M., Takeuchi K., Ozawa S., Shimada I. (2008) Amino acid selective cross-saturation method for identification of proximal residue pairs in a protein-protein complex. (2008) J Am Chem Soc. 130, 12168-12176. 査読有

Strahl T, Huttner IG, Lusin JD, Osawa M., King D, Thorner J, Ames JB. Structural insights into activation of phosphatidylinositol 4-kinase (Pik1) by yeast frq1. J Biol Chem. 282(42):30949-59 (2007). 査読有

Ichikawa O, Osawa M., Nishida N, Goshima N, and Shimada I. Structural basis of the collagen-binding mode of discoidin domain receptor 2, EMBO J. 26:4168-4176 (2007) 査読有

Funakoshi Y, Doi Y, Hosoda N, Uchida N, Osawa M., Shimada I., Tsujimoto M, Suzuki T, Katada T, Hoshino S. Mechanism of mRNA deadenylation: evidence for a molecular interplay between translation termination factor eRF3 and mRNA deadenylases. Genes Dev. 21(23):3135-48 (2007). 査読有

Addy C, Ohara M, Kawai F, Kidera A, Ikeguchi M, Fuchigami S, Osawa M., Shimada I., Park SY, Tame JR and Heddle JG, Nickel binding to Nika: an additional binding site reconciles spectroscopy, calorimetry and crystallography, Acta Crystallogr D Biol Crystallogr. 63:221-229 (2007) 査読有

Oo-puthinan S, Maenuma K, Sakakura M, Denda-Nagai K, Tsuiji M, Shimada I., Nakamura-Tsuruta S, Hirabayashi S, Bovin NV and Irimura T. The amino acids involved in the distinct carbohydrate specificities between macrophage galactose-type C-type lectins 1 and 2 (CD301a and b) of mice. Biochim Biophys Acta. 1780(2):89-100.(2007). 査読有

Sakakura M, Takahashi H, Shimba N, Fujii I, and Shimada I. Structural basis of the transition-state stabilization in antibody-catalyzed hydrolysis. J Mol Biol. 367: 133-147 (2007) 査読有

Takahashi H and Shimada I. Pairwise NMR Experiments for the

Determination of Protein Backbone Dihedral Angle Based on Cross-Correlated Spin Relaxation. J Biomol NMR. 37:179-185 (2007) 査読有

Nakada S, Sakakura M, Takahashi H, Tokuda H and Shimada I. Backbone resonance assignment for the outer membrane lipoprotein receptor LolB from Escherichia coli. Biomolecular NMR Assignments. 1:121-123 (2007) 査読有

Nakada S, Takahashi H, Sakakura M, Kurono M and Shimada I. Backbone resonance assignments for the periplasmic chaperone LolA from Escherichia coli. Biomolecular NMR Assignments. 1:125-127 (2007) 査読有

[学会発表](計 4 件)

Osawa M. et al. Structural studies on the interaction of spermine with inwardly rectifying potassium channel, XXIIIrd International Conference on Magnetic Resonance in Biological Systems, 2008.8.24. San Diego, CA, USA

Yokogawa M. et al. Structural basis of the gating of G protein activated inwardly rectifying potassium channel by Gbg, XXIIIrd International Conference on Magnetic Resonance in Biological Systems, 2008.8.24. San Diego, CA, USA

豊永 翔, 生体超分子における分子認識機構解明に向けた HR-MAS の適用, 第 47 回 NMR 討論会, 平成 20 年 11 月 13 日, 茨城県つくば市

小澤新一郎, 巨大タンパク質複合体のモデル構築を目的とした残基選択的交差飽和法の開発, 第 47 回 NMR 討論会, 平成 20 年 11 月 13 日, 茨城県つくば市

[図書](計 4 件)

松本昌彦、上田卓見、嶋田一夫 (2008) NMR によるソフトな分子間相互作用解析法の開発, 生化学, 80(10),959-971.

西田紀貴、嶋田一夫 (2008) コラーゲン結合タンパク質を介した生命プロセスの活性化機構, 生化学, 80(6),483-492.

大澤匡範、嶋田一夫. 「等温滴定型カロリメトリー(ITC) ~ 熱量測定による相互作用の定量的解析 ~」実験医学別冊「生命科学のための機器分析実験ハンドブック」羊土社, 249-253 (2007).

高橋栄夫、嶋田一夫. 「交換系利用 NMR によるリガンド分子の標的分子結合状態の構造解析 高橋栄夫・嶋田一夫」蛋白質・核酸・酵素 52(9):959-965 (2007).

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

大澤 匡範 (OOSAWA MASANORI)  
東京大学・大学院薬学系研究科・助教  
研究者番号：60361606

### (2) 研究分担者

嶋田 一夫 (SHIMADA ICHIO)  
東京大学・大学院薬学系研究科・教授  
研究者番号：70196476

### (3) 連携研究者

なし