

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 22 日現在

機関番号	10101
研究種目	挑戦的萌芽研究
研究期間	2011～2012
課題番号	23657070
研究課題名（和文）	セグメントラベルと先端的NMR手法を駆使した高分子量蛋白質複合体の相互作用解析
研究課題名（英文）	Analysis of Interactions in High Molecular Weight Protein Complexes by Using Segment Label and Cutting-edge NMR Technologies
研究代表者	
	石森 浩一郎 (ISHIMORI KOICHIRO)
	北海道大学・大学院理学研究院・教授
	研究者番号：20192487

研究成果の概要（和文）：生体内で重要な機能を果たしている高分子量蛋白質複合体の新たな構造解析手法として、セグメント安定同位体化ラベル法と先端的 NMR 手法としての転移交差飽和（TCS）法や残余双極子結合（RDC）法の応用を検討した。呼吸鎖末端の電子伝達反応であるシトクロム *c* (Cyt *c*) とシトクロム *c* 酸化酵素 (CcO) の相互作用部位について TCS 法を応用し、CcO と直接相互作用している Cyt *c* のアミノ酸残基を決定することに成功した。

研究成果の概要（英文）：To develop new methodologies for structural analysis of biologically important high-molecular-weight protein complexes, applications of the segment label and new NMR techniques such as the transfer cross-saturation (TCS) and residual dipole coupling (RDC) were examined. By using TCS for the final electron transfer complex in the respiratory chain, the complex between cytochrome *c* and cytochrome *c* oxidase, we successfully determined the amino acid residues of cytochrome *c* directly interacting with cytochrome *c* oxidase.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：生物無機化学

科研費の分科・細目：構造生物化学

キーワード：セグメントラベル，多次元NMR，蛋白質複合体，蛋白質間相互作用，安定同位体ラベル

1. 研究開始当初の背景

生体内の多くの蛋白質は互いに相互作用しながら機能しており、その蛋白質複合体は多くの場合、巨大な分子量となり、従来の分光学的手法では、その詳細な構造解析は困難である。近年の安定同位体ラベルの技術と最先端の NMR 測定法の応用により、この分子量の壁は克服されると期待されているものの、まだ十分な成果が挙げられていない。特に、これまで本研究者が研究を進めてきた金属蛋

白質の分野では、それぞれの蛋白質の構造機能解析については詳細な研究が進んでいるものの、その蛋白質間の相互作用や蛋白質複合体については、その巨大な分子量や膜結合蛋白質の関与などにより、構造化学的解析はほとんど進んではいない。本研究課題では以下の3種類の蛋白質複合体の構造と蛋白質間相互作用に注目した。

(1) 細胞内鉄代謝制御複合体 Iron Regulatory Protein (IRP) - F-box 蛋白質

(FBXL5) - ユビキチンリガーゼ (E3) 複合体 この複合体は、細胞内鉄濃度が上昇し、鉄過剰による細胞への障害を防ぐために形成され、細胞内鉄代謝制御蛋白質である IRP が、FBXL5 と結合することでユビキチンリガーゼに認識され、ユビキチン化されることでこの複合体は最終的に分解へと導かれる。この場合の細胞内鉄濃度の上昇は、ヘムがそのシグナル伝達分子として考えられており、ヘムを介した複合体形成が想定されているが、その詳細は蛋白質複合体の構造や蛋白質間に働く相互作用が不明であるため、検討されてはいない。

(2) 呼吸鎖末端電子伝達複合体 シトクロム *c* (Cyt *c*) - シトクロム *c* 酸化酵素 (Cc0) 複合体 呼吸鎖末端の酸化酵素である Cc0 は、Cyt *c* から電子を受け取り、分子状酸素に与えることにより、分子状酸素を水に還元し、呼吸鎖における電子伝達系を終結させるとともに、その電子伝達に伴いミトコンドリア内膜間で能動的プロトン輸送を行い、ATP 合成を駆動する。この Cc0 と Cyt *c* との間の電子伝達複合体については、本研究者らにより、NMR を用いて、その相互作用部位が決定され、この相互作用部位は、電子伝達により構造変化することで、電子伝達反応をプロトン輸送と共役させることを提唱している (Sakamoto et al., *PNAS*, 2011, 108, 12271)。しかし、その相互作用部位の範囲が当初想定された部位よりも広範囲にわたっていること、また、複合体形成によるそれぞれの蛋白質の構造変化が検討できていないことなどから、その電子伝達制御機構についてはまだ解決すべき点が多く、それに必要な構造化学的な情報が不足している。

(3) ヘム生合成制御複合体 Iron Response Regulator (Irr) - Ferrochelatase (FC) 複合体 ヘム生合成制御蛋白質である Irr はヘム依存性転写因子で、ヘム生合成酵素である δ -アミノレブリン酸脱水酵素の転写を抑制的に制御している。この Irr に細胞内の鉄イオン濃度のシグナル伝達分子であるヘムが結合すると、その抑制的制御が解消すると考えられているが、そのヘムがどのようにして Irr に受け渡されるのかについては十分な情報が得られてはいない。本研究者らは、細胞毒でもあるヘムが遊離した形で Irr に結合することは考えにくく、ヘムを生合成する FC から直接ヘムが Irr に受け渡されると想定しており、実際、免疫沈降の実験から Irr と FC とが複合体を形成することが報告されている。しかし、その複合体形成の構造化学的情報や蛋白質間相互作用については情報がなく、十分な検討を行える状態ではない。

2. 研究の目的

本研究課題では、巨大蛋白質の一部のみを安

定同位体ラベルすることが可能なセグメント安定同位体ラベル法と、先端的で多様な NMR 測定手法を多面的に組み合わせることで、分子量が 30 万を超える巨大分子量蛋白質複合体における蛋白質間の相互作用部位の同定とその相互作用様式、最終的には原子レベルの構造に基づく構造機能相関を明らかにすることを旨とする。

(1) 細胞内鉄代謝制御複合体 (IRP-FBXL5-ユビキチンリガーゼ複合体) この蛋白質複合体は、細胞内の鉄イオン濃度に関するシグナル伝達分子として考えられるヘムの結合により、形成されると想定されていることから、ヘム添加による複合体形成の過程を追跡し、その構造変化やその蛋白質間の相互作用形成機構を検討する。ここで得られた構造化学的情報から、細胞内鉄代謝機構における制御蛋白質複合体の機能発現の分子機構を明らかにする。

(2) 呼吸鎖末端電子伝達複合体 (Cyt *c* - Cc0 複合体) 本研究者らによって、その相互作用部位が明らかになった呼吸鎖電子伝達系の最後の電子伝達過程であるシトクロム *c* (Cyt *c*) からシトクロム *c* 酸化酵素 (Cc0) との電子伝達複合体 (Sakamoto et al., *PNAS*, 2011, 108, 12271) についても、Cc0 が分子量 410 万の巨大な膜結合蛋白質であることから、その相互作用部位についてはまだ議論の余地があり、特に、これまでの相互作用部位決定の主な手法である NMR の化学シフト摂動法による相互作用部位決定は、複合体形成による間接的な影響を受けやすく、本来の相互作用部位とは異なった結果を与えることが指摘されている。また、複合体形成によるそれぞれの蛋白質の構造変化についても十分検討されてはいない。そこで本研究課題では、より直接的な相互作用部位を決定することを試みるとともに、複合体形成による蛋白質の構造変化を追跡する手法の確立も試みる。

(3) ヘム生合成制御複合体 (Irr-FC 複合体) 本申請者等によりその構造解析が報告されたヘム生合成系の制御因子 Irr (Ishikawa, et al., *Biochemistry*, 50, 1016) についても、その制御複合体である Irr - FC 複合体について、本研究課題で得られた高分子量蛋白質複合体における相互作用解析手法を用いることでさらに詳細な解析を進め、その相互作用部位の同定とともに、複合体形成に伴う構造変化についても検討を行う。

3. 研究の方法

(1) 研究対象とする高分子量蛋白質複合体として、細胞内鉄代謝制御系の IRP-FBXL5-ユビキチンリガーゼ複合体、呼吸鎖電子伝達系の Cyt*c*-Cc0 電子伝達複合体について、ヘム生合成制御系の Irr-FC 複合体、それぞれについて、その蛋白質複合体の構造解析、

および蛋白質間に働く相互作用およびその相互作用様式を検討する。それぞれの蛋白質の単離、精製については、安定同位体を導入するため、すべて大腸菌の発現系を用いてその単離、精製法を確立する。

(2) セグメント化安定同位体ラベルについては以下に示す2種類の発現ベクターを用いた菌体内セグメントラベル手法を応用する(図1)。ドメイン1のみに ^{15}N あるいは ^{13}C を導入する場合、ドメイン1の遺伝子の後ろにInteinのN末端部分を融合し、この融合遺伝子をアラビノースで蛋白質の発現が可能なる *araBAD* ベクターに組み込み、一方、ドメイン1以外の部分は、そのN末端側にInteinのC末端部分を融合した遺伝子としてIPTGで蛋白質発現を誘導する *T7lac* ベクターに組み込んで、これら2種の発現ベクターを大腸菌内に導入する。まず、 ^{15}N あるいは ^{13}C を含む培地でアラビノースを添加してドメイン1のみを発現させ(図1左)、培養液を除去したうえで次はIPTGを含み、 ^{15}N 、 ^{13}C などを含まない培地で再度培養する(図1中)と、ラベルされていないドメイン1以外の部分が発現する。菌体内では、Inteinによるペプチド結合反応がおこり(図1右)、最終的には細胞外での結合反応をすることなしに効率的に特定のドメインのみに安定同位体が導入された蛋白質を得ることができる。

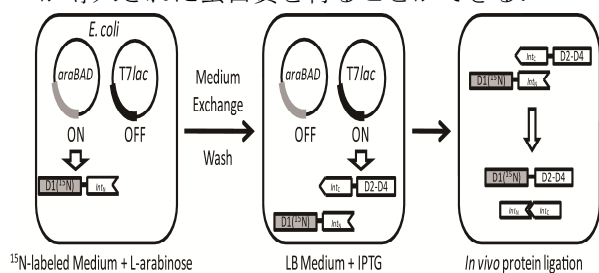


図1 菌体内セグメントラベル法

(3) 構造解析には主にNMRを用い、測定法としては、TCS測定や残余双極子結合測定、 ^{15}N -edit NOE法、Distance Geometry法を利用する。

4. 研究成果

本研究課題では平成23、24年度の二年間にわたり、ラベル法の確立と蛋白質複合体への応用の可能性、および先端的NMR測定手法の測定条件の最適化について検討を行った。主な研究成果は以下のとおりである。

(1) セグメント安定同位体ラベル法の確立 セグメントラベルを試みる蛋白質のうち、鉄代謝制御蛋白質のIRP2については、セグメント安定同位体ラベル可能にするため、大腸菌での発現系の構築を試みたが、蛋白質の不溶化や失活化でプロモーター培養条件の再検討が必要となり、いくつかの発現系を構築したものの、活性のある状態で再現性良く得られる条件を見出すことはできなかった。

今後さらに詳細な検討が必要である。一方、転写因子IrrとFCについては、大腸菌による再現性の良い発現、精製方法を確立することができ、セグメント化、安定同位体化についてもその予備的な実験において問題ないことが確認された。しかし、大腸菌で発現したIrrの機能解析の結果から、標的DNAへの親和性が低いことが示され、蛋白質精製過程における酸化修飾が示唆された。精製過程におけるMnイオンの添加により、酸化修飾が抑制され、親和性が向上することが明らかになったので、このような精製方法によるIrrを用いてセグメント化、安定同位体化が進行中である。酸化酵素Cc0については、高等動物のCyt cとも相互作用することができ、サブユニット数も少なく、サブユニットの再構成も可能で、これまでに構造的、機能的情報が多く報告されている光合成細菌由来のCc0の発現、精製系を構築した。

(2) 先端的NMR測定手法の測定条件の最適化 蛋白質相互作用を解明するための先端的NMR測定手法について、使用予定にクライオプローブ装着の600MHz NMR装置を用いてその測定条件の最適化を行った。緩和測定については、本研究者の既報(Sakamoto et al., *BBRC*, 2010, 398, 231)に従い、交換、平衡系でも解析可能なように解析方法を検討した。また、TCS測定や残余双極子結合測定、Distance Geometry法においては、予備的な測定を行い、測定パラメータの絞り込みを行った。実際の蛋白質複合体への応用では、重水素化したCyt cと非ラベルのウシ由来Cc0(二量体としての分子質量420 KDa)に対して、TCS法を用いた高分子蛋白質複合体における相互作用部位の決定を行った。その結果、Cyt cにおいて、Cc0と直接相互作用する領域を決定することに成功した。今回決定できた直接的な相互作用部位は、以前に本研究者が化学シフト摂動法により決定した領域よりもはるかに狭く、Cyt c-Cc0電子伝達複合体では、ごく少数の相互作用によりその複合体構造が維持されることが明らかになった。また、Cc0と複合体を形成することによるCyt cの構造変化を追跡するため、 ^{15}N でラベルしたCyt cを用いて ^{15}N -edit NOESYを用いて検討したところ、相互作用部位周辺のアミノ酸残基に有意な構造変化が検出され、複合体形成による相互作用部位の構造変化が確認できた。今後、さらにCc0側の相互作用部位を決定するため、光合成細菌由来のCc0をセグメント化安定同位ラベルして検討を進めている。

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)

[学会発表] (計3件)

- ① 石森浩一郎, 「Key Interactions and Regulation Mechanism for Electron Transfer from Cytochrome *c* to Cytochrome *c* Oxidase」, Fifth Korea-Japan Seminars on Biomolecular Sciences-Experiments and Simulations (招待講演), 2013年02月24日～2013年02月26日, High 1 Resort (韓国)
- ② 石森浩一郎, 「Interactions in Electron Transfer Complex between Cytochrome *c* and Cytochrome *c* Oxidase」, International Conference on Porphyrin and Phthalocyanines-7 (招待講演), 2012年07月01日～2012年07月07日, International Conference Center, Jeju (韓国)
- ③ 石森浩一郎, 「Key Interactions and Regulation Mechanism for Electron Transfer from Cytochrome *c* to Cytochrome *c* Oxidase」, ECS Meeting (招待講演), 2013年05月12日～2013年05月16日, Sheraton Center Toronto (カナダ)

[その他]

ホームページ等

<http://wwwchem.sci.hokudai.ac.jp/~stchem/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石森 浩一郎 (ISHIMORI KOICHIRO)
北海道大学・大学院理学研究院・教授
研究者番号：20192487

(2) 研究分担者

内田 毅 (UCHIDA TAKESHI)
北海道大学・大学院理学研究院・助教
研究者番号：30343742

(3) 連携研究者

なし