

機関番号：12601

研究種目：新学術領域研究(研究領域提案型)

研究期間：2009～2013

課題番号：21121002

研究課題名(和文) 準安定的に形成される受容体・リガンド複合体間の相互作用解析

研究課題名(英文) Structural analyses of the metastable ligand-receptor interactions

研究代表者

嶋田 一夫(Shimada, Ichio)

東京大学・薬学研究科(研究院)・教授

研究者番号：70196476

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 276,400,000円、(間接経費) 82,920,000円

研究成果の概要(和文)：生命現象発動の場においては、不安定で過渡的な複合体の存在およびその重要性が指摘されている。しかし、このような準安定な複合体を *in vitro* で再構成して、従来の構造生物学的手法を適用するのは困難である。本申請課題では、準安定複合体に対する NMR 測定法、ならびに生理的環境を模倣できる NMR 試料調製法を開発して、生命現象発動の場における過渡的準安定複合体に対する方法論を確立した。これらの手法を、ケモカイン・ケモカイン受容体、細胞接着分子 CD44、光合成膜タンパク質などに適用し、これらの分子の機能発現に重要な過渡的複合体の構造情報を得ることに成功した。

研究成果の概要(英文)：It has been considered that the transient molecular complexes play an important role in many biological processes inside the living cells. In this project, we aimed to establish the NMR methodologies, which can observe the NMR signals from such short lived states, and reconstitute such state by mimicking physiological environments. We applied these methods to the actual biologically important systems, including chemokine-chemokine receptors, the cell adhesion molecule CD44, and the photosynthesis complex, and successfully obtained the structural information of the transiently formed complex of those molecules, which are related to their function.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物化学・構造生物化学

キーワード：核磁気共鳴法 膜タンパク質 相互作用 過渡的複合体

### 1. 研究開始当初の背景

タンパク質の立体構造の視点に基づく構造生物学研究は、生物学研究の基盤技術として生命現象の理解に大きく貢献している。しかしながら、従来の構造生物学研究の方法論および技術的制約から、決定された立体構造の多くは、インタクトのタンパク質から機能ドメインを切り出すなどの処置を施した対象に限られ、必ずしも *in situ* の状態を反映しているわけではない。さらに、同様の制約のため、複合体の構造解析も、多くは高親和性のリガンドとその標的タンパク質に限られている。

一方、実際の生命現象発動の場においては、分子、細胞レベルなど様々な階層において、不安定で過渡的な複合体の存在およびその重要性が指摘されている。多くのタンパク質複合体では、最終的な安定複合体が形成される前に、両者が緩く接触した遭遇複合体とよばれる不均一な状態が過渡的に形成される (Nature, 447:1021-5, 2007)。例えば、化学反応や輸送を司る様々なタンパク質間相互作用では、遠距離でも作用できる静電相互作用により、タンパク質同士が引き寄せ合った遭遇複合体が素早く形成し、ついで最終的な複合体を形成することにより、 $10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  を越える高い結合速度を達成し、迅速で効率の高い化学反応や輸送が可能となっている (PNAS, 105: 12855-60, 2008)。また、免疫細胞やがん細胞の生体内における動態においても、細胞上の受容体と血管内皮細胞上のリガンドが親和性の低い過渡的な複合体を形成することにより、細胞のローリングが達成されていると考えられている (Nat Immunol., 7:883-9, 2006)。

上記で述べてきた現象は、生命現象を理解する上で重要であるものの、生体内において過渡的に形成される短寿命かつ不均一な状態が関与しているため、従来の構造生物学的手法を適用することは困難である。その理由は過渡的複合体を *in vitro* で再現することが容易ではないことと、過渡的複合体に適用できる構造生物学的手法がないこと、などのため適切な解析戦略に欠けるからである。したがって、生理的環境を模倣できる試料調製法、ならびに準安定複合体に対する構造生物学的手法の開発が必要である。

### 2. 研究の目的

当研究課題では、準安定複合体に対する NMR 測定法、ならびに生理的環境を模倣できる NMR 試料調製法を開発することにより、生命現象発動の場における過渡的準安定複合体に対する方法論を確立することを目的とする。加えて確立した手法を、生物学的な個別の系に適用することによりその有効性を実証する。具体的には、ケモカイン受容体、細胞接着分子、光合成膜タンパク質の系に適用する。

### 3. 研究の方法

(1) 生理的環境を模倣できる NMR 試料調製法の開発

生理的に重要な過渡的に形成される相互作用の多くは、膜タンパク質を介して行われる。膜タンパク質の構造生物学的解析は、通常膜タンパク質を界面活性剤に可溶化した状態で行われる。しかし、界面活性剤に可溶化した状態では、多くの膜タンパク質は、活性を保持することが困難である。

再構成高密度リポタンパク質 (rHDL) は直径約 10 nm の脂質二重膜の周囲を、両親媒性 helix に富む Apolipoprotein A-I により囲まれた構造を持つ水溶性粒子である (図 1)。そこで、rHDL を用い、脂質組成をコントロールした脂質二重膜に、活性を保持した状態の膜タンパク質を埋め込む手法を確立する。

(2) 準安定複合体に対する NMR 測定法の開発  
短寿命でかつ不均一な状態にある準安定複合体に対しても相互作用様式を解明することが可能な、高感度 NMR 測定法を開発する。タンパク質間相互作用を観測する TCS 法の測定を効率よく行なうための理論を確立する。

### 4. 研究成果

(1) NMR 観測における膜タンパク質の安定性を向上させる試料調製法の確立 (J. Am. Chem. Soc., (2010))

極めて安定性の低いケモカイン受容体 CCR5 について、再構成 HDL を用いた安定化に成功した。リガンドである MIP-1 の CCR5 結合界面を TCS 法により決定し、MIP-1 の SNP が CCR5 を介した HIV-1 の感染に耐性を示す機構を提唱した。

(2) 転移交差飽和法の理論的背景の確立 (J. Magn. Reson., (2010))

転移交差飽和法 (TCS 法) は、膜タンパク質をはじめとする生体高分子とリガンドタンパク質の相互作用部位を同定する溶液 NMR 実験法である。TCS 法の効率は試料の分子量や濃度比、結合・解離速度などのパラメータに依存しており、実験的に最適化することは困難であった。本論文では TCS 法を理論的に定式化してシミュレーションを行うことにより、各パラメータの TCS 法への影響を明らかにするとともに、実験条件最適化の指針を示した。

(3) ケモカイン受容体のリガンド認識における過渡的複合体の役割の解明 (J. Biol. Chem., (2009))

ケモカイン受容体 CXCR4 の NMR 解析条件を確立し、リガンドである SDF-1 の CXCR4 結合界面を転移交差飽和 (TCS) 法により決定した。SDF-1 の N 末端とそれ以外の領域が、独立にはたらくことが、CXCR4 との効率的な結合に重要であることを見出した。

(4) 細胞接着因子 CD44 の構造平衡の制御と

細胞ローリング活性の相関 (Structure, (2010))

CD44 のヒアルロン酸結合ドメイン (HABD) は、リガンドの有無によらず、O-state と PD-state の間の平衡にある。われわれは HABD の構造を PD-state に固定した変異体を作製し、PD-state が HA 高親和性状態であることを示した。また、PD-state に構造を固定した CD44 を発現する細胞のローリング活性解析から、血流中における CD44 依存的な細胞ローリングにおいて、HABD の O-state と PD-state の 2 状態平衡が必要であることを明らかにした。

(5) プラストシアニンと光合成蛋白質の電子輸送機構の解明 (Plant Cell (2012))

植物のプラストシアニンは、光合成膜蛋白質複合体である光化学系 I およびシトクロム b6f と迅速な結合および解離を繰り返すことにより、効率良く電子を輸送する。本研究では、転移交差飽和法により、プラストシアニン上の疎水性に富む領域が光化学系 I およびシトクロム b6f と近接する一方、酸性残基に富む領域は安定な塩橋を形成しないことが明らかになった。これらの結果から、最初に酸性残基に富む領域が緩く近接した上で、疎水性に富む領域が複合体を安定化することにより、結合および解離を迅速に行うことが示された。

上記に加え、当初の計画にないが、以下の 2 つの成果が新たに上がっている。

(6) KcsA カリウムチャネルの不活性化機構の解明 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (2010))

pH 依存性 K<sup>+</sup>チャネル KcsA は、細胞内が中性のときは閉状態を取るが、酸性刺激に応じてピーク電流を示し、数秒でその約 15% の電流を流す開状態に至る (不活性化)。我々はメチル TROSY 法によりその機構を解析した。まず、pH、温度、K<sup>+</sup>濃度の調節によって、閉状態のほか、開状態において平衡にある活性化状態・不活性化状態を選択的に観測することに成功した。次に、K<sup>+</sup>滴定実験と NOE 解析から、K<sup>+</sup>を認識する選択性フィルターの構造が状態により異なること、活性化状態と不活性化状態がそれぞれ K<sup>+</sup>結合・非結合状態に対応し、不活性化状態では水分子が結合していることを見出した。

(7) G による GIRK 活性制御機構の解明 (J Biol Chem (2012))

G タンパク質共役型内向き整流性カリウムチャネル (GIRK) の開閉制御における、G の役割を明らかにするため、G<sub>i3</sub> と GIRK 細胞内ドメインの相互作用様式を TCS 法および PRE 法により解析した。その結果、G は GIRK 上の G 結合部位とは異なる部位を認識していることが明らかとなった。このことは、G と G が遊離した状態においても GIRK と

の結合を介して G と G が近傍に保持され得ることを示し、GPCR 刺激終了に伴う G による G の回収効率を上昇させ、迅速な GIRK チャネルの閉鎖に寄与していると考えた。

(8) 構造平衡による  $\beta_2$  アドレナリン受容体のシグナル伝達制御機構の解明 (Nature Commun (2012))

G タンパク質共役型受容体的一种である  $\beta_2$  アドレナリン受容体 ( $\beta_2$ AR) のメチオニンメチル基を選択的に安定同位体標識し、NMR により解析する方法を確立した。様々なシグナル伝達強度の異なるリガンドを加えた条件での NMR 解析から、 $\beta_2$ AR は 2 種類の不活性化構造と 1 種類の活性化構造の間の平衡にあること、および平衡における活性化構造の割合がシグナル伝達強度を決定していることを明らかにした。

(9) SLO を利用した In-cell NMR 法の開発 (J. Am. Chem. Soc., (2009))

哺乳細胞をターゲットとした新規 in-cell NMR 法として、ポア形成トキシンである SLO により可逆的に細胞膜に穴を形成させることにより、観測タンパク質を細胞質内へ取り込ませる手法を確立した。その結果、細胞内に導入した G-アクチン結合タンパク質 Thymosin 4 の高分解能 NMR スペクトルの取得、および細胞内で生じた N 末端側のアセチル化の観測に成功した。

(10) 生細胞内でタンパク質間相互作用を解析するバイオリアクター装置の開発 (Angew. Chem. Int. Ed. (2013))

細胞を温度可塑性のメビオールゲル内に封入した状態で NMR サンプル管に充填し、サンプル管底部から一定の速度で培地を灌流させることで、細胞を生理的条件下に保持して長時間の in-cell NMR 測定を行うバイオリアクター装置を開発した。確立した手法を用いて、外部から導入した微小管結合ドメイン Cap-Gly domain 1 (CG1) と内在性の微小管との相互作用を転移交差飽和 (TCS) 法により観測し、相互作用部位を同定することに成功した。

## 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 54 件中 10 件のみ表示)

1, Kubo S, Nishida N, Udagawa Y, Takarada O, Ogino S, Shimada I. A Gel-Encapsulated Bioreactor System for NMR Studies of Protein-Protein Interactions in Living

Mammalian Cells., *Angew Chem Int Ed Engl.* 2013 Jan 21;52(4):1208-11. doi: 10.1002/anie.201207243.

2, Mase Y, Yokogawa M, Osawa M, Shimada I. Structural basis for modulation of gating property of G protein-gated inwardly rectifying potassium ion channel (GIRK) by i/o-family G protein subunit (G<sub>i/o</sub>)., *J Biol Chem.* 2012 Jun 1;287(23):19537-49. doi: 10.1074/jbc.M112.353888.

3, Kofuku Y, Ueda T, Okude J, Shiraishi Y, Kondo K, Maeda M, Tsujishita H, Shimada I. Efficacy of the  $\alpha_2$ -adrenergic receptor is determined by conformational equilibrium in the transmembrane region., *Nat Commun.* 2012;3:1045. doi: 10.1038/ncomms2046.

4, Ueda T, Nomoto N, Koga M, Ogasa H, Ogawa Y, Matsumoto M, Stampoulis P, Sode K, Terasawa H, Shimada I. Structural basis of efficient electron transport between photosynthetic membrane proteins and plastocyanin in spinach revealed using nuclear magnetic resonance., *Plant Cell.* 2012 Oct;24(10):4173-86. doi: 10.1105/tpc.112.102517.

5, Imai S, Osawa M, Takeuchi K, Shimada I. Structural basis underlying the dual gate properties of KcsA., *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010 Apr 6;107(14):6216-21. doi: 10.1073/pnas.0911270107.

6, Yoshiura C, Kofuku Y, Ueda T, Mase Y, Yokogawa M, Osawa M, Terashima Y, Matsushima K, Shimada I. NMR analyses of the interaction between CCR5 and its ligand using functional reconstitution of CCR5 in lipid bilayers., *J Am Chem Soc.* 2010 May 19;132(19):6768-77. doi: 10.1021/ja100830f.

7 Matsumoto M, Ueda T, Shimada I. Theoretical analyses of the transferred cross-saturation method., *J Magn Reson.* 2010 Jul;205(1):114-24. doi: 10.1016/j.jmr.2010.04.011. Epub 2010 Apr 18.

8, Ogino S, Nishida N, Umemoto R, Suzuki M, Takeda M, Terasawa H, Kitayama J, Matsumoto M, Hayasaka H, Miyasaka M, Shimada I. Two-state conformations in the hyaluronan-binding domain regulate CD44

adhesiveness under flow condition. *Structure.*, 2010 May 12;18(5):649-56. doi: 10.1016/j.str.2010.02.010.

9, Ogino S, Kubo S, Umemoto R, Huang S, Nishida N, Shimada I. Observation of NMR signals from proteins introduced into living mammalian cells by reversible membrane permeabilization using a pore-forming toxin, Streptolysin O., *J Am Chem Soc.* 2009 Aug 12;131(31):10834-5. doi: 10.1021/ja904407w.

10, Kofuku Y, Yoshiura C, Ueda T, Terasawa H, Hirai T, Tominaga S, Hirose M, Maeda Y, Takahashi H, Terashima Y, Matsushima K, Shimada I. Structural Basis of the Interaction between Chemokine Stromal Cell-derived Factor-1/CXCL12 and Its G-protein-coupled Receptor CXCR4., *J Biol Chem.* 2009 Dec 11;284(50):35240-50. doi: 10.1074/jbc.M109.024851..

〔学会発表〕(計 48 件中 24 件のみ表示)

1. 嶋田一夫

NMR を用いた高分子量タンパク質複合体の相互作用解析法の開発と応用  
ワークショップ「原理まで遡って再確認する核磁気共鳴法の実力」第 36 回日本分子生物学会年会  
2013 年 12 月 3 日、兵庫県神戸市

2. 嶋田一夫

Functional Equilibrium of GPCR  
5<sup>th</sup> Asia-Pacific NMR Symposium in conjunction with ANZNAG2013  
2013 年 10 月 24 日、Brisbane, Australia

3. 嶋田一夫

Functional Equilibrium of GPCR  
Symposium “Perspectives of NMR in drug discovery”  
2013 年 10 月 11 日、Novartis, Basel, Switzerland

4. 嶋田一夫

Functional Equilibrium of Membrane Proteins  
International Conference on Structural Genomics 2013  
2013 年 7 月 24 日、北海道札幌市

5. 嶋田一夫

Functional Equilibrium of Membrane

Proteins  
54<sup>th</sup> Experimental Nuclear Magnetic  
Resonance Conference  
2013年4月15日、Asilomar, California, USA

6. 嶋田一夫  
NMRによる膜タンパク質の機能解明  
よこはま NMR 構造生物学研究会  
2013年3月22日、神奈川県横浜市

7. 嶋田一夫  
Functional Equilibrium of Membrane  
Proteins  
Frontiers of NMR in Biology, Keystone  
Symposia,  
2013年1月17日、Snowbird, Utah, USA

8. 嶋田一夫  
Functional Dynamics of Membrane Proteins  
by NMR  
第85回生化学会年会  
2012年12月11日、福岡県福岡市

9. 嶋田一夫  
NMRによる膜タンパク質の機能解明  
第34回生体膜と薬物の相互作用シンポジウ  
ム  
2012年11月15日、京都大学薬学部 京都市

10. 嶋田一夫  
Functional Equilibrium of Membrane  
Proteins  
The 3rd International Symposium on Drug  
Discovery and Design by NMR  
2012年10月11日 神奈川県横浜市

11. 嶋田一夫  
Functional Dynamics of Membrane Proteins  
ICMRBS  
2012年8月21日  
Lyon, France

12. 嶋田一夫  
NMRを用いた膜タンパク質の機能解明  
第11回日本蛋白質科学会  
2012年6月22日 愛知県名古屋市

13. 嶋田一夫  
Dynamical aspects of membrane proteins  
INPEC2012  
2012年4月6日 台北、台湾

〔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  
過渡的複合体 HP  
[http://ishimada.f.u-tokyo.ac.jp/public\\_](http://ishimada.f.u-tokyo.ac.jp/public_html/tmc/)  
[html/tmc/](http://ishimada.f.u-tokyo.ac.jp/public_html/tmc/)

## 6. 研究組織

(1)研究代表者  
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

(2)研究分担者  
H21/H22年度 池 駿求(Jee, JunGoo)  
首都大学東京戦略研究センター・准教授  
研究者番号：50381554

H23 - H25年度 甲斐荘 正恒(Kainosho,  
Masatsune)  
首都大学東京戦略研究センター・客員教授  
研究者番号：20137029

(3)連携研究者  
大澤 匡範(Osawa, Masanori)  
東京大学大学院薬学系研究科・講師  
研究者番号：60361606  
上田卓見(Ueda, Takumi)・助教  
東京大学大学院薬学系研究科  
研究者番号：20451859

西田紀貴(Nishida, Noritaka)  
東京大学大学院薬学系研究科・助教  
研究者番号：50456183  
H21/H22年度 甲斐荘 正恒(Kainosho,  
Masatsune)  
首都大学東京戦略研究センター・教授  
研究者番号：20137029