

す平成21年 5月 29日現在

研究種目：特定領域研究

研究期間：2003～2008

課題番号：15083202

研究課題名（和文） NMR を用いたソフトなタンパク質相互作用解析法の開拓

研究課題名（英文） Development of NMR methodology for soft interaction of proteins

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

研究成果の概要：

本研究では生体機能の発現に重要かつ創薬開発における標的タンパク質である膜タンパク質を研究対象とし、その機能解明を行うことが可能な核磁気共鳴法の測定法開発を行い、複数の系において機能解明を行った。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2003年度	8,500,000	0	8,500,000
2004年度	17,000,000	0	17,000,000
2005年度	16,500,000	0	16,500,000
2006年度	66,000,000	0	66,000,000
2007年度	17,000,000	0	17,000,000
2008年度	17,000,000	0	17,000,000
総計	142,000,000	0	142,000,000

研究分野：構造生物学

科研費の分科・細目：薬学・物理系薬学

キーワード：膜タンパク質、相互作用、核磁気共鳴法

## 1. 研究開始当初の背景

細胞外からの刺激は、細胞膜に存在する受容体およびチャネルなどの膜蛋白質で受けとめられる。その結果、これらの膜蛋白質は、高分子量の蛋白質複合体を形成し、その後、シグナル伝達経路を活性化する、または、細胞膜において電気的あるいは化学的な反応を起こす。すなわち、細胞膜は細胞と外部を結ぶインターフェイスとして機能している。したがって、膜中における蛋白質の機能発現機構や膜蛋白質が行うリガンド相互作用、イオンの透過機構を解明することは、生命現象を理解する上で不可欠である。

核磁気共鳴法（NMR）は生理的条件下にお

ける蛋白質の構造解析・相互作用解析に対して強力な解析法である。溶液NMRによる蛋白質の立体構造解析は、TROSY法など新規測定法の開発により、適応可能な分子量の上限が拡張し、分子量3万程度の蛋白質および複合体の解析が可能になった。しかしながら、細胞膜系蛋白質に対するNMR研究は、細胞内球状蛋白質で見られる進展と比較して十分なものとはいえないのが当時の現状であった。

## 2. 研究の目的

上記の現状を考慮して、本研究では、我々が開発した蛋白質相互作用解析法である「交差

飽和法」を用いて、膜結合性蛋白質やイオンチャンネルを研究対象とし、細胞膜における蛋白質相互作用解明に対して有効なNMR解析法の開発を行うことを目的とした。

### 3. 研究の方法

NMR解析法の開発では、安定同位体標識法を工夫することで測定法の高感度化を行い、また、精密なタンパク質間相互作用様式を解明するため、交差飽和法をベースとした残基間の距離情報獲得を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) メチルシグナルを活用した高感度測定法

交差飽和(Cross-saturation experiment)法は、高分子量蛋白質複合体 ( $M_w > 50K$ ) の相互作用界面に存在するアミノ酸残基を、従来法(化学シフト摂動法やH-D交換法など)に比較し高精度に決定する方法として開発された。さらに、より高分子量の蛋白質複合体 ( $M_w > 150K$ ) に対し適用するために、交換系を利用した転移交差飽和(Transferred Cross-saturation)法へと拡張されている。本法は高分子量蛋白質複合体におけるスピン拡散を抑制するために、リガンド蛋白質を高度に重水素化することがポイントとなる。そのためには、蛋白質の完全重水素化のみならず、溶媒の軽水/重水比を小さくすることが有効であることが明らかとなっている。しかしながら、これはアミドプロトン検出における、測定感度の低下を引き起こすことにもなる。また、高い重水率の溶媒条件ではアミドプロトンのT1がより長くなり、繰り返し遅延時間を長くとる必要が出てくることから、測定時間は長くなる傾向がある。

一方、一般に蛋白質複合体においてその相互作用に直接寄与するのは、側鎖原子であることが多い。この場合、主鎖アミドプロトンは相互作用の界面からはやや離れた(4-7 Å)距離に存在することになる。このため、アミドプロトン検出による交差飽和法の場合、標的蛋白質からの飽和移動の効率はそれほど高いとはいえない。

本研究では、側鎖メチルプロトンを利用することで、交差飽和法におけるこれらの問題点を克服することを試みた。メチルシグナルはプロトン3個分のシグナル強度を有するうえ、その速い回転運動のため先鋭化しており、高分子量蛋白質の場合でもスペクトルにおける分離は比較的良好ことが知られている。そこで、側鎖メチルプロトンを利用した交差飽和法の有効性について検証した。

試料としては、リガンド蛋白質：プロテインAのBドメイン(FB)と標的蛋白質：マウスモノクローナル抗体の相互作用系を用いた。メチルプロトンのみを残し、他の部位を

重水素化したFBを調製するために、Kayのグループにより提案されている方法を利用した。250ミリ秒の照射時間を用いた交差飽和実験を行ったところ相互作用界面に存在するメチルプロトンに交差飽和による顕著な強度減少が見られた。さらに、メチルプロトンのT1は平均して400ミリ秒程度であることから、短い繰り返し時間で測定を行えることもあり、アミドプロトン検出(90%重水条件)の場合に比べ、圧倒的に検出感度は高い。

#### (2) 複合体モデル作成を目指した残基間距離情報取得のためのNMR測定法の開発

タンパク質の分子認識機構を立体構造の見地から解明することにより、生体内の多様なシステムである細胞認識や免疫機構、シグナル伝達などの重要な知見を得ることが出来る。タンパク質の結合界面を決定するNMR手法として、化学シフト摂動法やH-D交換法などが用いられるが、当研究室ではこれらの手法よりも正確な結合界面決定法として、交差飽和法(CS法)の開発を行っている。CS法は目的分子(アクセプター)に結合している標的分子を交差飽和源(ドナー)とし、空間的に近接するアクセプター上の結合部位へと磁化飽和の移動を行う手法である。CS法により、アクセプター上の結合界面を明らかとすることが可能であるが、ドナー全体を交差飽和源とするため、ドナー上のアクセプター結合部位に関する情報は得られない。そこで、より詳細な相互作用様式を明らかとするために、両分子間の結合残基対の決定を可能とする測定法の開発を行った。すなわち、ドナーに対して特定のアミノ酸以外を2Hとするアミノ酸選択的1Hラベルを行い、交差飽和源を1種類のアミノ酸に限定したアミノ酸選択的CS法を考案した。本手法により、ドナー上においてアクセプターへ近接するアミノ酸残基に関する情報が得られ、近接残基対の同定が可能となる。

本手法を検証する相互作用系として、76アミノ酸残基であるyeast ubiquitin(Ub)と、その加水分解酵素であり、234アミノ酸残基であるyeast ubiquitin hydrolase C90S変異体(YUH1)を選択した。両者の解離定数は43nMであり、複合体の結晶構造は報告されている(PDB code: 1CMX)。Ubをアクセプターに、YUH1をドナーとして本手法に適用した。

選択標識可能な7種類のアミノ酸についてアミノ酸選択的CS実験を行ったところ、結晶構造において、YUH1のアミノ酸から5以内存在するUbのアミノ酸に、交差飽和が観測された。次に、交差飽和を受けたUb残基のジオメトリーと一致する、YUH1上で交差飽和源となったアミノ酸残基の組み合

わせの検索により、交差飽和源の同定が可能であるかの検証を行った。  
まず、交差飽和源の種類と数を反映させて YUH1 から任意に延べ7残基を組み合わせた。これを最小二乗法により、交差飽和を受けた残基群と空間的に重ね合わせた。そして、対応する残基間の平均 RMSD をジオメトリーの一貫性の指標とした。最小の RMSD を示す組み合わせにおいて、各 YUH1 残基と、それぞれにジオメトリーが近接する Ub 残基を7個の近接残基対とした結果、両者は実際に結晶構造中において5以内に近接していた。よって、本手法によりタンパク質複合体の近接残基対の決定が可能であることが示された。

### (3) 細胞間接着因子の認識機構の解明

細胞接着分子 CD44 は、細胞外マトリックスの主成分であるヒアルロン酸 (Hyaluronic acid; HA) と相互作用することにより、細胞接着、細胞遊走に關与する膜タンパク質である。CD44 は、細胞外領域の N 末端に HA との結合を担う HA 結合ドメイン (HA-binding domain; HABD) を有する。CD44 HABD は、158 アミノ酸残基からなる構造ドメインであり、リンクモジュールと呼ばれる HA 結合性相同領域とその両端の付加配列より構成されている。CD44 においては、リンクモジュールに加えて両端の付加配列も HA 結合活性に必要であることが報告されている。HA は細胞外マトリックスの主成分であり、グルクロン酸と N-アセチルグルコサミンの繰り返し構造を持つグリコサミノグリカンである。近年、CD44 に HA が結合すると、MMP や ADAM 等のメタロプロテアーゼによる CD44 細胞外領域の cleavage が促進され、さらに、細胞外領域の cleavage が細胞内のシグナル伝達経路の活性化や細胞の遊走を亢進することが明らかになりつつある。CD44 のリガンド認識およびシグナル伝達のメカニズムに関する基礎的な知見は、CD44 を標的とした創薬を促すことが期待されるが、両者とも得られた知見は限られている。そこで、CD44 の HA 認識機構の解明および HA との結合が CD44 のプロテアーゼによる切断を促進する機構の解明を目的として、NMR を用いた構造生物学的研究を行った。

#### A. CD44 HABD の 3 次構造の解明

まず、<sup>13</sup>C、<sup>15</sup>N により安定同位体標識を施した CD44 HABD 試料を調製して、定法に従い、構造計算を行った。その結果、CD44 はリンクモジュールに付加配列領域内の3本の  $\alpha$ -ストランドが付加した新規のフォールドを形成することが明らかとなった。

B. 交差飽和実験と化学シフト摂動実験による CD44-HA 間相互作用様式の解析

CD44 HABD の HA 結合界面を同定するため交差飽和実験を行った。その結果、HA との界面残基は分子片側の面に分布し、リンクモジュール領域に加えて付加配列領域の L24、N25、N149、D151、G152 も HA とコンタクトすることが明らかとなった。また、C 末端付加配列領域は HA 非存在下と異なり、disordered form をとることが明らかになった。

#### C. HA 結合に伴う構造変化による CD44 HABD のプロテアーゼ切断効率の増大

HA 非存在下、存在下で CD44 HABD のトリプシンによる限定分解実験を行った。MALDI-TOF/MS により切断産物の解析を行なった結果、切断効率を比較すると、リガンド非結合時に比べて HA 結合時の方が高い結果が得られた以上の結果から、CD44 HABD は HA 結合に伴い C 末端付加配列領域の運動性が増加して、トリプシンによる切断効率が上昇すると結論した。以上の切断促進機構は、MMP や ADAM 等 CD44 の切断を担うメタロプロテアーゼについても用いられている可能性が考えられた。

### 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41件)

Structural Basis of the Collagen-binding Mode of Discoidin Domain Receptor 2

Osamu Ichikawa, Masanori Osawa, Noritaka Nishida, Naoki Goshima, Nobuo Nomura, and Ichio Shimada

EMBO J. (2007) 26, 4168-4176. 査読あり

Ligand-induced structural change of the CD44 hyaluronan-binding domain revealed by NMR

Mitsuhiro Takeda, Shinji Ogino, Ryo Umemoto, Masayoshi Sakakura, Masahiro Kajiwara, Kazuki Sugahara, Hiroto Kawashima, Masayuki Miyasaka, Hiroaki Terasawa, and Ichio Shimada

J Biol Chem. (2006) 281, 40089-40095. 査読あり

Bead-linked proteoliposomes: a reconstitution method for NMR analyses of membrane protein-ligand interactions

Mariko Yokogawa, Koh Takeuchi, and Ichio Shimada

J. Am. Chem. Soc. (2005), 127, 12021-12027. 査読あり

Novel Collagen-Binding Mode of the WWA

Domain Determined by a Transferred  
Cross-Saturation Experiment  
Noritaka Nishida, Hiromi Sumikawa,  
Masayoshi Sakakura, Nobuhisa Shimba,  
Hideo Takahashi, Hiroaki Terasawa,  
Ei-ichiro Suzuki, Ichio Shimada  
Nature Struct. Biol. (2003) 10, 53-58. 査  
読あり

〔学会発表〕(計 36 件)

嶋田一夫、NMR study on protein-protein  
interactions using paramagnetic probe,  
International Workshop on Perspectives on  
Stable Isotope Aided NMR Methods for  
Protein Structural Analysis, 2007/3/30-31,  
Osaka, Japan

嶋田一夫、NMR Study on Membrane  
proteins-ligands  
Interactions Application of Transferred  
Cross Saturation - AIMECS 07,  
the 6th International Medicinal Chemistry  
Symposium, July 08-11, 2007, Istanbul,  
Turkey

〔図書〕(計 8 件)

Cross-saturation and transferred  
cross-saturation experiments  
Ichio Shimada, Takumi Ueda, Masahiko  
Matsumoto, Masayoshi Sakakura, Masanori  
Osawa, Koh Takeuchi, Noritaka Nishida,  
Hideo Takahashi  
Prog. Nuc. Magn. Reson. Spect. (2009) 54,  
123-140. 査読あり

NMR techniques for identifying the  
interface of a larger protein-protein  
complex: cross-saturation and transferred  
cross-saturation experiments.  
Ichio Shimada  
Method. Enzymol. (2004) 394, 483-506. 査  
読あり

## 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

寺沢 宏明 (TERASAWA HIROAKI)  
東京大学・大学院薬学系研究科・助手  
研究者番号 10300956

### (3) 連携研究者

なし