

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23570145

研究課題名(和文) 記憶・学習の形成に必須な神経細胞タンパク質複合体の構造生物学

研究課題名(英文) Structural Study on neuron protein complex essential for memory and learning

研究代表者

雲財 悟 (Unzai, Satoru)

横浜市立大学・生命医科学研究科・助教

研究者番号：60336592

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：「記憶」や「学習」に重要な役割を果たすタンパク質複合体の形成機構を構造生物学の手法(X線結晶構造解析、超遠心分析など)を用いて理解する。シナプスに存在するNMDA型受容体の機能をコントロールしているNR2B分子と、関連する細胞内シグナル伝達タンパク質の相互作用、そして複合体の立体構造を調べる。シグナル伝達タンパク質Rap1分子の調製、および結晶化に成功した。Rap1分子がGTP analog分子との複合体を形成することをESI-massスペクトルを用いることによって確認した。GDP結合型、およびGTP analog分子結合型Rap1分子の高分解能結晶構造解析に成功した。

研究成果の概要(英文)：In the vertebrate brain, nerve cells are managing memory and learning. The nerve cells are connected via synapses, which are real nature of the memory and learning. NMDA receptor and related proteins at the synapse are essential for the regulation of synaptic strength. The proteins form quite large complex and they communicate each other via interaction or chemical modification. Using structural biology technics, we try to understand how they communicate, how they form complexes, and how they work for the synaptic strength regulation. Rap1 molecule is a GTPase, a kind of molecular switch belongs to Ras super family. This molecule works as a signal transduction factor in a nerve cell and related with the NMDA receptor protein complex. We succeeded solving high-resolution crystal structure of the Rap1 molecule, GTP analogue bound form and GDP bound form.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物科学

キーワード：タンパク質

1. 研究開始当初の背景

哺乳類の「記憶」や「学習」とは、外界からの刺激が脳に取り込まれ蓄えられることであるが、それは脳の神経細胞間の結合部「シナプス」の長期的な機能の変化という形で行われる。分子レベルでは、シナプス後膜の NMDA 型受容体と呼ばれるイオンチャネルタンパク質が特に重要である。NMDA 型受容体は、グルタミン酸などの神経伝達物質が結合するなど特定の条件が満たされた際にチャネルを開き、カルシウムイオン等の陽イオンを流入させ、細胞内セカンドメッセンジャーを活性化するという基本機能を持ち、脳の発育やシナプスの機能変化、記憶・学習の形成に中心的な役割を果たしている。

本研究課題のメインターゲットは NMDA 型受容体の NR2B サブユニットと呼ばれる分子で(図1)、その細胞質側領域が受容体の機能制御にとって決定的に重要である。NR2B 分子の細胞質側領域は、細胞内シグナル伝達タンパク質群とともに1~2メガダルトンにおよぶ巨大で組織化された分子複合体を形成し、細胞内シグナルを集約して情報処理する装置として働く。この分子複合体は結合・解離・化学修飾を伴ってダイナミックに変化しつつ、NMDA 型受容体の機能特性を決定し、脳の発育、記憶や学習など高次の脳機能で中心的な役割を果たす。

最近の研究から、統合失調症、精神遅滞、自閉症などヒトの精神疾患になるリスクの高い遺伝子異常の非常に多くのが、この分子複合体と関係があることがわかってきた。これら精神疾患リスク遺伝子産物は、実は NR2B 分子の細胞質側領域に結合するシグナル伝達に参与するタンパク質で、ここで生じた異常が NMDA 型レセプターおよび脳の正常な活動を阻害していると考えられている。NR2B 分子を軸としたタンパク質複合体の形成機構、およびその正確な構造情報やダイナミックな調節機構を理解することは、生物学的にはもちろん、医学的にも重要である。しかし、現在 NR2B 分子の細胞質領域の構造はほとんど情報が無い。

2. 研究の目的

NR2B 分子の細胞質側領域は、そのほとんどの部分が天然変性状態だと予測されている。しかし遺伝子改変マウスを用いた実験から、NR2B の細胞質側領域は完全にランダムな状態ではなく、他のパートナータンパク質と結合することによってはっきりした立体構造を持つことを強く示唆するデータが得られている。本研究グループは、NR2B 分子について以下の仮説を立てた。“NR2B の細胞質側領域はいわゆる「ハブタンパク質」、つまりそれ単独では天然変性状態だが他のパートナータンパク質と結合することで特定

の立体構造を形成する”。我々はこの NR2B 分子のやわらかい構造が、細胞質領域タンパク質複合体を動的にコントロールするために本質的に重要であると考えている。

3. 研究の方法

(1) NR2B 細胞質側領域と相互作用するいろいろなパートナータンパク質もしくはその断片を作り、それが NR2B 分子の構造形成(もしくは変化)に与える影響を、超遠心分析や円偏光二色性(CD)スペクトル、NMR などの手法を用いて調べる。これは、結晶化に適したタンパク質複合体を探すためのスクリーニングも兼ねている。

(2) 上記の実験で得られた情報をもとにして、NR2B 分子とパートナータンパク質の複合体の結晶構造解析を目指す。特に、PSD-95、SynGAP、Rap1 と呼ばれる分子との複合体構造解析を目指す。

4. 研究成果

大腸菌発現系を用いた NR2B 細胞質領域の調製は、単独では非常に困難であった。可溶性 NR2B 分子は調製できるが、比較的短期間で分解した。これは NR2B 分子が単独では天然変性状態であるという予測と一致する。トリミングした NR2B と PSD-95 を共発現することによって、安定な複合体の調製に成功したが、結晶化スクリーニングを試みるも結晶化には至らなかった。

NR2B 分子の細胞質側領域の巨大複合体を構成する分子、Rap1 の結晶構造解析に成功した。この分子は、シナプス後部においてシグナル伝達の役割を果たす。GTP 結合型で ON、GDP 結合型で OFF となり、シグナル伝達経路の調節を行っている。SynGAP によって Rap1 の GTP 加水分解活性が数十倍上昇するのを確認した。Rap1 の結晶構造解析は、GTP 結合型、GDP 結合型のいずれにも高分解能で成功したため、シグナル ON/OFF スイッチ機構の詳細なメカニズムを解明することに成功した。現在、ミュータント解析や NMR 測定等の追加実験を行っており、成果をまとめて論文発表する予定である。

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 8 件)

- (1) Cho, K. J., Lee, J.-H., Hong, K. W., Kim, S.-H., Park, Y., Lee, J. Y., Kang, S., Kim, S., Yang, J. H., Kim, E.-K., Seok, J. H., Unzai, S., Park, S.-Y., Saelens, X., Kim, C.-J., Lee, J.-Y., Kang, C., Oh, H.-B., Chung, M. S.,

- and Kim, K. H. (2013) Insight into structural diversity of influenza virus haemagglutinin. *J. Gen. Virol.* 94, 1712–1722.
- (2) Noguchi, H., Campbell, K. L., Ho, C., Unzai, S., Park, S.-Y., and Tame, J. R. H. (2012) Structures of haemoglobin from woolly mammoth in liganded and unliganded states. *Acta Cryst (2012)*. D68, 1441-1449 [doi:10.1107/S0907444912029459] 68, 1441–1449.
- (3) Kokabu, Y., Murayama, Y., Kuwabara, N., Oroguchi, T., Hashimoto, H., Tsutsui, Y., Nozaki, N., Akashi, S., Unzai, S., Shimizu, T., Iwasaki, H., Sato, M., and Ikeguchi, M. (2011) Fission Yeast Swi5-Sfr1 Protein Complex, an Activator of Rad51 Recombinase, Forms an Extremely Elongated Dogleg-shaped Structure. *Journal of Biological Chemistry* 286, 43569–43576.
- (4) Isogai, S., Morimoto, D., Arita, K., Unzai, S., Tenno, T., Hasegawa, J., Sou, Y.-S., Komatsu, M., Tanaka, K., Shirakawa, M., and Tochio, H. (2011) Crystal Structure of the Ubiquitin-associated (UBA) Domain of p62 and Its Interaction with Ubiquitin. *Journal of Biological Chemistry* 286, 31864–31874.
- (5) Yoshizawa, T., Shimizu, T., Yamabe, M., Taichi, M., Nishiuchi, Y., Shichijo, N., Unzai, S., Hirano, H., Sato, M., and Hashimoto, H. (2011) Crystal structure of basic 7S globulin, a xyloglucan-specific endo- β -1,4-glucanase inhibitor protein-like protein from soybean lacking inhibitory activity against endo- β -glucanase. *FEBS J.* 278, 1944–1954.
- (6) Ohnishi, K., Nakahira, K., Unzai, S., Mayanagi, K., Hashimoto, H., Shiraki, K., Honda, T., and Yanagihara, I. (2011) Relationship between heat-induced fibrillogenicity and hemolytic activity of thermostable direct hemolysin and a related hemolysin of *Vibrio parahaemolyticus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 318, 10–17.
- (7) Yoshizawa, T., Shimizu, T., Yamabe, M., Taichi, M., Nishiuchi, Y., Shichijo, N., Unzai, S., Hirano, H., Sato, M., and Hashimoto, H. (2011) Crystal structure of basic 7S globulin, a xyloglucan-specific endo- β -1,4-glucanase inhibitor protein-like protein from soybean lacking inhibitory activity against endo- β -glucanase. *FEBS Journal* 278, 1944–1954.
- (8) Tsuda, K., Someya, T., Kuwasako, K., Takahashi, M., He, F., Unzai, S., Inoue, M., Harada, T., Watanabe, S., Terada, T., Kobayashi, N., Shirouzu, M., Kigawa, T., Tanaka, A., Sugano, S., Güntert, P., Yokoyama, S., and Muto, Y. (2011) Structural basis for the dual RNA-recognition modes of human Tra2- β RRM. *Nucleic Acids Res* 39, 1538–1553.
- 〔学会発表〕(計 2 件)
- (1) 第35回日本分子生物学会年会バイオテクノロジーセミナー招待講演「構造生物学に役立つ超遠心分析」(2012年12月11日、福岡国際会議場)
- (2) 第50回日本生物物理学会年会ポスター発表 Hiroki Noguchi, Satoru Unzai, Kevin L. Campbell, Chien Ho, Sam-Yong Park, and Jeremy R.H. Tame 「リガンド結合状態および非結合状態のケナガマンモスヘモグロビンの結晶構造」
- 〔図書〕(計 1 件)
- (1) Progresso 2013 春号 (Beckman-Coulter) 「構造生物学に役立つ超遠心分析」
- 〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)
- 名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：
- 取得状況(計 0 件)
- 名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：
- 〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

雲財 悟 (UNZAI, Satoru)
横浜市立大学生命医科学研究科・助教
研究者番号：60336592

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

朴 三用 (PARK, Sam-Yong)
横浜市立大学生命医科学研究科・教授
研究者番号：20291932