

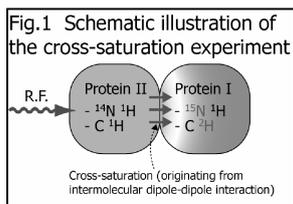
原子レベルでの病態解明に向けたハイスループットな分子間相互作用解析法の開発

● 嶋田 一夫 ◆ 寺沢 宏明 ◆ 坂倉 正義

東京大学大学院薬学系研究科

〈研究の目的と進め方〉

(目的) ゲノム解析において同定された遺伝子を有効に活用するためには、個々の遺伝子の機能解析、特に分子間相互作用の解明が重要である。特にSNPs (一塩基多形) の探索・同定と特定疾患・薬剤応答性との関連付けは、ゲノム創薬を推し進める上での最優先課題と考えられているが、SNPs 変異のような微細な変化に伴う分子間相互作用の変化を理解するためには、分子間相互作用を原子レベルにおいて明らかにする構造生物学的手法が必要不可欠である。構造生物学的手法のうち、NMR法は、サンプル調製・データ測定および解析に要する時間が短いという点において、X線結晶構造解析に対する優位性を有しており、多数の生体高分子複合体に対する網羅的な相互作用解析に適している。しかし、従来までに汎用されてきたリガンド結合に伴う化学シフト変化を指標として相互作用部位を決定する手法(化学シフト摂動法)の場合、化学シフト変化を誘起する要因がリガンド分子との接触に限定されないため、相互作用部位を正確に決定することは困難であった。



これに対して、研究代表者は、核スピン間の双極子-双極子相互作用が、核スピン間の距離に依存することを利用して、リガンド分子から近距離に存在する原子を相互作用部位として同定する新規相互作用解析法(交差飽和法; Fig.1)を開発した(Nat.Struct.Biol., 7:220-223(2000))。本手法は、従来のNMR解析が有する利点に加え、X線結晶構造解析と同等の精度を有している。しかし、交差飽和法の適用対象となる相互作用系は、分子量が約5万程度の可溶性タンパク質複合体に限られており、多様な生体高分子複合体の全てに対して直ちに適用することはできない。そこで、本研究においては、原子レベルにおけるハイスループット相互作用解析を実現するための基盤技術の確立を目的として、交差飽和法を多様な生体高分子複合体に対して網羅的に適用するための手法の開発を行った。

(進め方) まず、解析対象となる複合体の分子量の制限を取り除くための検討を行う。次に、交差飽和法以外では相互作用解析を行うことが困難な、生体高分子複合体(タンパク質-脂質二重膜複合体、タンパク質-膜タンパク質複合体など)について交差飽和法を適用し、手法の適用範囲を拡張する。

〈研究開始時の研究計画〉

- 1) リガンド非結合状態と結合状態の間の化学交換を利用し、複合体の相互作用界面情報を、非結合状態のタンパク質分子に“写し取る”ことにより、相互作用界面情報を抽出する手法(転移交差飽和法)を開発する。
- 2) 転移交差飽和法を用いることにより、タンパク質と繊維状タンパク質との相互作用界面を同定する。

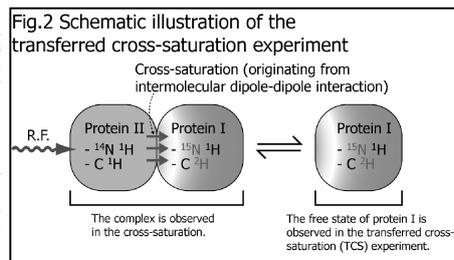
3) タンパク質-脂質二重膜相互作用系に対して、転移交差飽和法を適用し、蛋白質の脂質結合部位を同定する手法を開発する。

4) タンパク質-糖鎖、およびタンパク質-核酸相互作用系に対して、転移交差飽和法を適用し、相互作用部位を同定する手法を開発する。

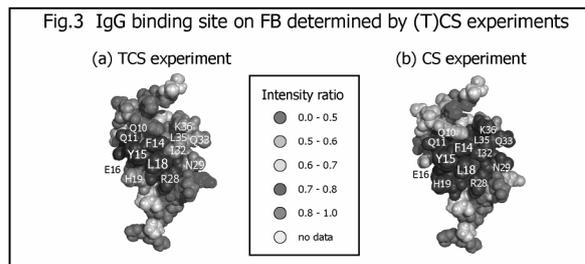
5) 膜タンパク質-ペプチドリガンドの相互作用系に対して転移交差飽和法を適用し、ペプチド上の膜タンパク質結合部位を同定する手法を開発する。

〈研究期間の成果〉

【転移交差飽和法の開発(ref.1)】 Fig.2に示すように、タンパク質Iとタンパク質IIの間に適当な速度での結合・解離が起きている場合、結合状態におけるタンパク質IIからタンパク質Iへの交差飽和は、解離状態のタンパク質Iにおいても保持される。即ち、複合体の相互作用界面情報を

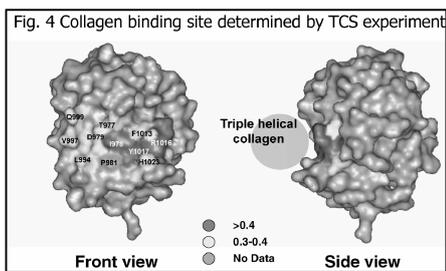


非結合状態のタンパク質I上に“写し取って”検出することが可能であると考えられる。以上の手法を検証するため、黄色ブドウ球菌由来プロテインAのBドメイン(以下FB)と、マウス抗体の相互作用系(結合定数は、 $3.8 \times 10^4 [M^{-1}]$)を用いて、解析を行った。2Hと15Nにより安定同位体標識を行ったFBとマウス抗体のモル比が1:0.1となるようにサンプルを調製し、転移交差飽和実験を行った。マウス抗体分子に対する分子特異的照射に伴い、FB上の特定の残基に由来するシグナルにおいて強度減少が観測された。シグナル強度が減少した残基をFBの立体構造上にマッピングした結果をFig.3に示す。本解析により検出された残基は、交差飽和法によりすでに明らかにされている、FBとヒト抗体のFcフラグメントとの相互作用界面残基とほぼ一致した。以上より、転移交差飽和法により、タンパク質複合体の相互作用界面を決定することが可能であると結論した。



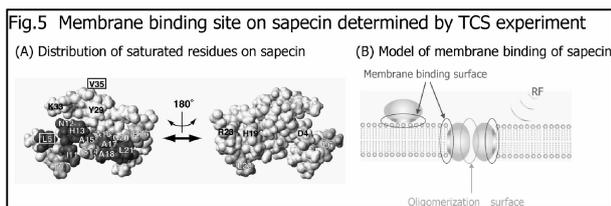
【タンパク質-繊維状タンパク質相互作用系に対する転移交差飽和法の適用(ref.2,3)】 コラーゲンは細胞外マトリックスを構成する不溶性の繊維状タンパク質であり、X線結晶構造解析や、従来までのNMR解析法の解析対象とす

ることは困難である。本研究においては、転移交差飽和法を用いて、血小板粘着反応に与する von Willebrand

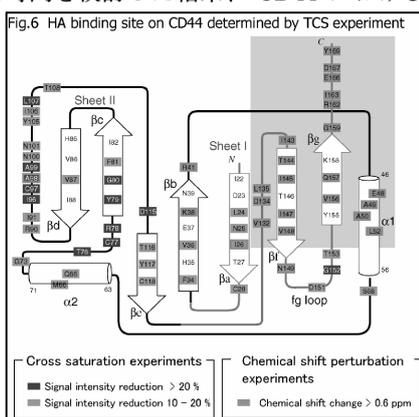


factor A3ドメインとコラーゲンの相互作用解析を行い、A3ドメイン上のコラーゲン結合部位を同定することに成功した(Fig.4)。本研究により、転移交差飽和法が、巨大かつ不均一な分子との相互作用解析に対して適用可能であることが示された。

【タンパク質-脂質二重膜相互作用系に対する転移交差飽和法の適用(ref.4)】 抗菌活性ペプチド sapecin を題材として、転移交差飽和法をタンパク質-脂質二重膜相互作用系に対して適用した。この結果、sapecin上の脂質二重膜との相互作用部位を同定することに成功した。さらに、交差飽和法により得られた相互作用界面情報と、水素重水素交換実験により得られた相互作用界面情報を組み合わせることにより、sapecinの多量体形成面を同定した。以上の相互作用情報から、sapecinが単量体として膜に結合後、多量体化し、3量体以上となったときにチャンネルを形成し、膜障害を發揮するという膜障害活性発現メカニズムを提唱した (Fig.5)。

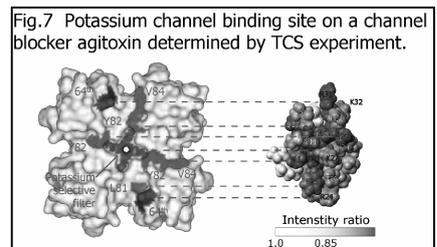


【タンパク質-糖鎖相互作用系に対する転移交差飽和法の適用(ref.5,6)】 CD44 とヒアルロン酸の相互作用系を題材として、交差飽和法をタンパク質-糖鎖相互作用系に対して適用するための条件検討を行った。ヒアルロン酸の鎖長、スピン飽和時間を検討した結果、CD44 におけるヒアルロン酸結合界面を同定することに成功した。また、交差飽和法により得られた相互作用界面情報と、化学シフト摂動法により得られた相互作用界面情報を比較することにより、ヒアルロン酸結合に伴う、CD44上の構造変化部位を同定することができた(Fig.6)。

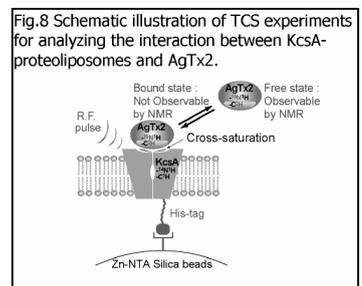


【膜タンパク質-ペプチドリガンド相互作用系に対する転移交差飽和法の適用(ref.7,8)】 まず、界面活性剤に可溶化したカリウムチャンネルKcsAと阻害ペプチドAgitoxin2を題材として、転移交差飽和法を膜タンパク質-ペプチドリガンド間の相互作用系に対して適用するための条件検討を行った。KcsA と Agitoxin2 のモル比、化学交換速度、スピン飽和時間等を最適化した結果、Agitoxin2 の KcsA 結合界面を同定することに成功した。得られた相互作用

界面情報を基に、KcsA - Agitoxin2 の相互作用モデルを構築し、Agitoxin2 のカリウムチャンネル阻害活性を原子



レベルにおいて説明することができた(Fig.7)。さらに、より生理的条件に近い条件において、相互作用解析を行うことを目的として、ビーズ上において KcsA を脂質二重膜中に再構成する手法を開発した(Fig.8)。脂質二重膜に可溶化された KcsA と Agitoxin2 の相互作用系に対して、転移交差飽和法を適用した結果、界面活性剤に可溶化した場合と同様に、Agitoxin2 の KcsA 結合界面を同定することに成功した。



〈国内外での成果の位置づけ〉

本研究においては、分子量の制限を受けずに生体高分子複体の相互作用界面を同定する転移交差飽和法を開発し、多様な生体分子の相互作用系に対して幅広く適用可能であることを示した。本手法は、国内外において発表された多数の論文に引用されている (Current Opinion in Structural Biology 16, 1 (2005)など)。さらに、本手法は、他の研究グループの相互作用解析においても、既に用いられており、有効性が広く認知されていると考える。

〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

タンパク質-核酸相互作用系に対する交差飽和法の適用に関する検討を行うことができなかった。これは、解析対象として用いる予定であった、DNA結合タンパク質(インテイン)の性状が予想外に悪く、良質のNMRスペクトルを得ることができなかったためである。

〈今後の課題〉

本研究により、膜タンパク質を含む多様な生体高分子複体の相互作用界面情報を、分子量による制限を受けずに決定することが可能となった。次の研究課題としては、双極子-双極子相互作用が小さい低分子化合物(薬物のシード化合物など)と、その標的タンパク質との相互作用界面情報を抽出する手法の開発を計画している。

〈研究期間の全成果公表リスト〉

- 1) T.Nakanishi, M.Miyazawa, M.Sakakura, H.Terasawa, H.Takahashi, and I.Shimada, J.Biol.Chem., 278, 43550 (2003) (0207161642)
- 2) N.Nishida, M.Sumikawa, M.Sakakura, N.Shimba, H.Takahashi, H.Terasawa, E.Suzuki, and I.Shimada, Nat.Struct.Biol., 10, 53 (2003).(0310291358)
- 3) N.Nishida, M.Miyazawa, M.Sumikawa, M.Sakakura, N.Shimba, H.Takahashi, H.Terasawa, E.Suzuki, and I.Shimada, J.Biomol.NMR, 24, 357 (2002)
- 4) K.Takeuchi, H.Takahashi, M.Sugai, H.Iwai, T.Kohno, K.Sekimizu, S.Natori, and I.Shimada, J.Biol.Chem., 279, 4981 (2004)
- 5) M.Takeda, H.Terasawa, M.Sakakura, Y.Yamagushi,

- M.Kajiwara, H.Kawashima, M.Miyasaka, and I.Shimada,
J.Biol.Chem., 278, 43550 (2003) (310291426)
- 6) M.Takeda, H.Terasawa, M.Sakakura, Y.Yamagushi,
M.Kajiwara, H.Kawashima, M.Miyasaka, and I.Shimada,
J.Biomol.NMR, 29, 97 (2004) (310291431)
- 7) K.Takeuchi, M.Yokogawa, T.Matsuda, M.Sugai,
S.Kawano, T.Kohno, H.Nakamura, H.Takahashi, and
I.Shimada, Structure, 11, 1381 (2003) (310292200)
- 8) M.Yokogawa, K.Takeuchi, and I.Shimada,
J.Am.Chem.Soc., 127, 12021 (2005)