

# 膜タンパク質の膜貫通領域におけるタンパク質-タンパク質相互作用の検出

●阿部 義人

九州大学大学院・医学研究院

## ＜研究の目的と進め方＞

これまでタンパク質-タンパク質間の相互作用に関して、水溶性、すなわち細胞質、および細胞外のタンパク質においては解析方法は確立されつつある。しかし、ゲノム解析の結果はポリトピック型膜タンパク質が最大の遺伝子ファミリーの一つであることを明らかにしており、細胞の約30%を占める膜タンパク質において、特に疎水性の膜貫通領域に関してはタンパク質-タンパク質間の相互作用に関する解析方法はこれまで非常に少ない。最近の膜タンパク質の研究では、疎水性の膜貫通領域に関してもタンパク質-タンパク質間の相互作用が存在し、これらの相互作用がタンパク質の立体構造形成、機能に深くかかわっているといったことが報告されている。本研究はそのようなタンパク質の疎水性の膜貫通領域の相互作用をどう評価するかを主眼として、系統的に膜タンパク質の機能、構造を見ていくことを目的とする。

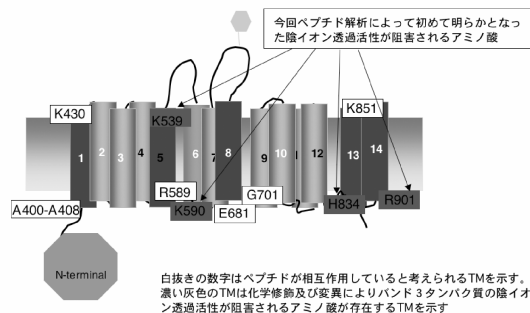
## ＜研究開始時の研究計画＞

本研究期間での具体的な研究目的は膜タンパク質の相互作用の検出方法の構築であった。化学修飾試薬DTBPA(4,4'-Dithiobis(1-azidobenzene))は疎水的な性質を持つ膜内領域への化学修飾試薬であり、クロスリンカーでもある。これを使用し、膜内領域において近接しているタンパク質を検出する方法の開発を行った。またTOXCAT assay法という転写因子(ToxR)の性質を利用した膜貫通領域のポリペプチド間の相互作用を検出できる系を応用し、膜貫通領域のペプチド間相互作用の検出をおこない、膜貫通領域のペプチドの存在状態を解析しようとした。

## ＜研究期間の成果＞

当研究室では赤血球膜の膜内ペプチドの一部を検出できる系を確立しており(成果5)。さらに本研究ではMALDI-TOF MASSとHPLCとの併用により赤血球膜タンパク質であり相互作用すると考えられているBand 3とGlycophorinの膜内ドメインのすべてのトリプシン分解ペプチドを検出できる方法を開発した(成果2)。この時点においては、膜タンパク質の全膜貫通領域のペプチド解析は、ロドプシンを除いて行われていないため、価値のある成果であったと考えられる。このペプチド解析法とDTBPAを併用し、現在膜貫通部分における近接部位の同定を行ったがDTBPAは非特異的な化学修飾剤であり、その同定が困難であった。今回の膜内ドメインペプチドをすべて同定できたことで、Band3の陰イオン交換活性に必須なアミノ酸の同定ができた(成果2,3)。すなわちBand3の陰イオン交換活性にはLys、Glu、His、Argが必須であり、このうち、His、Argに関しては全く明らかになっていなかったが、これらが、His834、Arg901であることを同定ができた(成果3)。また、この同定部位はこれまで、Band3の各膜内のペプチドセグメントが分子内でペプチド-ペプチド相互作用を形成していると考えられている領域に位置していた(成果1、図)。

化学修飾及び変異によりバンド3タンパク質の陰イオン透過活性が阻害されるアミノ酸の位置



すなわち、ペプチド-ペプチド間の相互作用がバンド3陰イオン交換活性においても重要な役割をしていることの裏付けとなった。一方でTOXCAT assayによる相互作用部位の同定法はhomo dimerの膜貫通部位の相互作用にしか利用できないため様々なタンパク質間の相互作用にこの系を利用することは難しいことが明らかになった。さらには酵母におけるBand3発現系を構築し、陰イオン活性の速度論的パラメータ(Km、Vmax)を算出できるシステムを開発した(論文投稿中)。この時Glycophorin膜貫通部位を共発現させることでBand3の陰イオン透過活性が上昇することから、GlycophorinとBand3が膜貫通部位において、何らかの相互作用をしていることが明らかになった。

## ＜国内外での成果の位置づけ＞

今回、相互作用の解析方法の開発は困難であったが、Band 3とGlycophorinの膜内ドメインのすべてのトリプシン分解ペプチドを検出できる方法を開発した。また、解析法から、Band3の陰イオン交換活性に必須なアミノ酸の同定ができた。今回の報告は、単に赤血球膜タンパク質の構造解析に限らず、その他の膜タンパク質にも応用できるものと考えられるため、膜タンパク質のプロテオーム解析という面においても、価値のある研究成果である。これらの結果は、国際誌に報告し、種々の国際誌にその後引用され続けている。また、今回の結果は国内学会において講演を行い、高評価を得た。また、2006年のアジア薬学フォーラムにおいても講演を行った。

## ＜達成できなかったこと、予想外の困難、その理由＞

今回、疎水的な性質を持つDTBPAを併用し、現在膜貫通部分のペプチド-ペプチド間の近接部位の同定を行ったがDTBPAは非特異的な化学修飾剤であり、その結合部位の同定が困難であった。また、DTBPA自体が膜へ取り込まれる割合が予想以上に低く、膜貫通部位まで修飾剤が行き届かないため、修飾率が非常に低いことも、明らかとなった。TOXCAT assayによる相互作用部位の同定法はhomo dimerの膜貫通部位の相互作用にしか利用できないため様々な膜タンパクの膜貫通ペプチド間すなわち、hetero dimerにおいての相互作用にこの系を利用するこ

とは難しいことが明らかになった。

#### 〈今後の課題〉

今回、膜タンパク質の構造解析においては非常に有用な研究となったが、膜タンパク質間の相互作用研究においてはほとんど結果を得ることができていない。しかしながら、酵母におけるBand3発現系を構築し、Glycophorin膜貫通部位を共発現させることでBand3の陰イオン透過活性が上昇することから、明らかにGlycophorinとBand3が膜貫通部位において、何らかの相互作用をしていることが明らかになった。今後、この相互作用がどの部位で起こるのかを変異体解析により明らかとしたい。一方で、Band3自体の膜貫通部位のペプチド間相互作用が陰イオン交換活性に重要であることも、明らかとなってきてきた。今後、Band3のX線結晶構造解析等をすすめ、そのような相互作用が陰イオン交換活性とどのような相関があるのかを具体的に明らかにしていく予定である。

#### 〈研究期間の全成果公表リスト〉

- 1) 論文／プロシーディング（査読付きのものに限る）
  1. 阿部義人、濱崎直孝「複数回膜貫通型膜タンパク質の立体構造形成機構—バンド3タンパク質研究の成果より—」生物物理 2006 263 in press.
  2. Abe Y, Chaen T, Jin XR, Hamasaki T, Hamasaki N. Massspectrometric analyses of transmembrane proteins in human erythrocyte membrane. J Biochem (Tokyo). 2004 ;136(1):97-106.
  3. Jin X R, Abe Y, Li C Y, Hamasaki N. Histidine-834 of Human Erythrocyte Band 3 Has an Essential Role in the Conformational Changes That Occur during the Band 3-Mediated Anion Exchange. Biochemistry 2003 ;42(44):12927-32.
  4. Kuma H, Abe Y, Askin D, Bruce LJ, Hamasaki T, Tanner MJ, Hamasaki N. Molecular basis and functional consequences of the dominant effects of the mutant band 3 on the structure of normal band 3 in Southeast Asian ovalocytosis. Biochemistry. 2002;41:3311-3320.
  5. Hamasaki N, Abe Y, Tanner MJ. Flexible regions within the membrane-embedded portions of polytopic membrane proteins. Biochemistry. 2002;41:3852-3854.
- 2) データベース／ソフトウェア  
なし
- 3) 特許など  
なし
- 4) その他顕著なもの  
なし