



研究ノート

## タンパク質分子表面構造と機能の系統的解析

金澤 浩\*

A new approach in analyses of protein-protein interactions

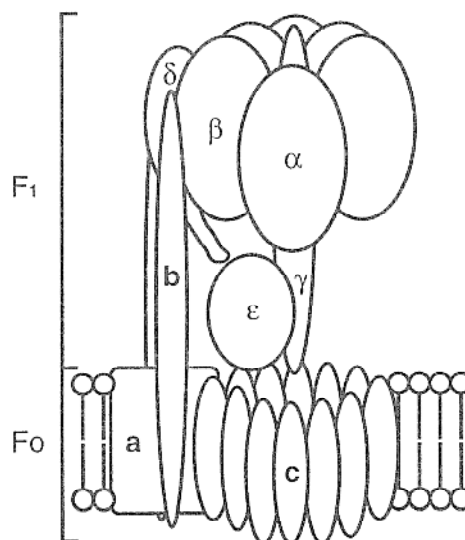
Key Words : protein surface, monoclonal antibody, two-hybrid assay

## はじめに

生命現象の根底を支配するものは、分子-分子の相互作用、特に生体高分子どうしの相互作用である。生体高分子のうち、とりわけタンパク質間相互作用の重要性が、細胞内情報伝達のネットワークの解明という現在の生命科学の最大の課題の登場とともに、再認識されている。

タンパク質相互の結合に関わる一次構造(モチーフ)の発見やX線構造解析の普及により、タンパク質相互作用の実体について急速な知見の集積が起こっている。しかし、すべてのモチーフが明らかになっているわけではなく、また、3次元構造解析も緒についたところである。そのため、相互作用解析の手法としては、生化学的な方法は依然として重要と考えられる。

相互作用の実体の把握は、情報伝達やオリゴメリック酵素の機能制御の解明には必須なことである。こうした実体の解明の成果は、人工酵素の作成(タンパク質工学)や医学(病気)上の問題の解明にも重要な寄与をするものと考えられる。筆者等は生体内のエネルギー通貨として重要なATPを合成する酵素(ATP合成酵素, H<sup>+</sup>輸送性ATPase)の構造と機能の相関を解明する研究をこれまで進めてきた<sup>1,2)</sup>。この酵素は細胞膜やミトコンドリア膜の脂質2重層の中および表面に組み込まれた酵素(図1)であり、

図1 大腸菌F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP合成酵素の構造モデル

細胞膜表在性部分をF<sub>1</sub>、膜内在性部分をF<sub>0</sub>と呼んでいる。ここでは、F<sub>1</sub>のδとF<sub>0</sub>のbサブユニットが相互作用することを示すモデル図を示した。F<sub>0</sub>は、a, b, cの3つのサブユニットからなる。

細菌では、8つのサブユニットが複雑に相互作用し、機能を果たしている。これらのサブユニットの相互作用の実体の解明を筆者等は研究の一つの目標としてきた。その中で様々な解析方法を試みた。ここでは相互作用構造を生化学的、遺伝学的方法を組み合わせる系統的に明らかにする道筋について筆者等の成果を記し、相互作用解析一般にこのアプローチが寄与するものと考えて紹介したい。

## 1. ATP合成酵素の分子構築と機能

細胞内でATPは、ATP合成酵素においてADPとPiから合成される。図1に示したようにこの酵素は、細胞膜やミトコンドリア膜表面に突出した部分と、細胞膜内の疎水環境にある部分から成り立っている。膜表在性部分はα, β, γ, δ, εの5つのサブユニット

\*Hiroshi KANAZAWA

1947年7月18日生

1976年東京大学大学院・薬学系博士課程修了

現在、大阪大学大学院・理学研究科・生物科学専攻・相関生物学講座、教授、薬学博士、分子生物学

TEL 06-6850-5812

FAX 06-6850-5817

E-Mail kanazawa@bio.sci.osaka-u.ac.jp



からなる。αとβは1対となり3対からなるヘキサマー構造をとっている。この構造の中心部を貫いてγが軸のような構造をとっている。この部分の原子レベルの3次元構造の解明は1995年になされた<sup>3)</sup>。また、1997年にはγサブユニットが酵素の定常的な触媒活性を示す状態で、αβからなるヘキサマー構造の中心で回転し、βサブユニットの中に存在する基質結合部位の構造を動的に変化させることが明らかになった<sup>4)</sup>。膜中には大腸菌ではa, b, cの3つのサブユニットが存在し、H<sup>+</sup>の輸送路を形成している。

このように酵素の触媒機構のなかにダイナミックな回転という構造変化が内包されていることが明らかになった。さらに触媒機構を解明するうえで、これらサブユニットの動的な分子レベルでの相互作用の実体についてまず明らかにする必要がある。静的な情報である結晶構造解析や、マクロな1分子の可視化では、捉えることのできない多くの問題が動的な触媒機構の解明の上で存在する。ATP合成酵素の触媒部位を形成するαβγ以外の部分については原子配置レベルの構造決定はもとより、どのサブユニットが相互作用しているかという点について問題が残されている。そこで、筆者らはサブユニット相互作用部位を系統的に明らかにすることを目的に、以下に記すような一連の生化学的、分子生物学的アプローチを行った。

## 2. モノクローナル抗体による分子表面残基の系統的解析

触媒部位を形成するβサブユニットに注目して、この分子の表面構造を明らかにするため、精製した大腸菌のβサブユニットを抗原に一連のモノクローナル抗体を作成し、未変性状態のβサブユニットを認識する抗体を定法に従って分離した。これらの抗体はβサブユニット分子表面残基に結合するはずであり、抗原決定基をなすアミノ酸残基は分子表面に存在するはずである。図2に示すような手順で、抗原決定残基を見いだした。まず、βサブユニットの部分ペプチドを大腸菌の発現系を用いて作成し、決定基のマップをペプチドレベルで行う<sup>5)</sup>。次に、エピトープ部位を含むと推定したペプチド内にランダムなアミノ酸残基の変異による置換をおこした発現ベクターのバンクを作成した。大腸菌内で発現したこのようなペプチドバンク内には、抗体と結合できなくなったものが存在する。このような遺伝子発現

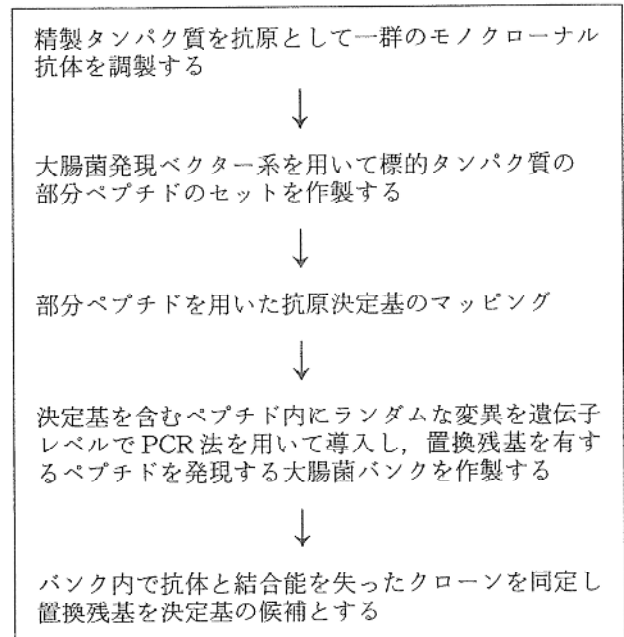


図2 分子表面残基の抗体による系統的同定の手順

ベクターを分離してペプチド内の変異を塩基レベルで決定した。変異した残基が抗原決定残基であり、βサブユニットの分子表面に存在すると考えた<sup>6)</sup>。

こうしたアプローチによりモノクローナル抗体12と31を含むいくつかの抗体を調製し、それぞれの認識残基を明らかにした。たとえば、抗体12と31はβのアミノ末端近傍(40残基目付近)を認識する事が明らかになった<sup>6)</sup>。さらに、βサブユニットをαとγと一緒にし、試験管内でATPase活性をもつαβγ複合体に再構成すると、これらの抗体はもはや結合する事ができなくなり、これらの残基が複合体内部に位置することが示唆された<sup>5)</sup>。こうした残基の分子内での位置を結晶解析から得られた牛の酵素のそれと比較すると、確かにβの分子表面に存在すること、また複合体内部にあることが確認された。

## 3. 蛋白質間相互作用の遺伝学的解析

表面残基の系統的確認が、図2に示したような手順によってモノクローナル抗体を用いて行えることが明らかになった。次に表面残基の機能的役割について、遺伝学的解析を組み合わせる。まず抗体との結合能を失った変異株中でATPase活性を失ったものを同定し解析した。抗体との結合能が失われたβサブユニット内の2残基(40と41残基)の変異によってATPase活性が失われた<sup>6)</sup>。さらに解析すると、これらの変異ではαβγ複合体の形成に異常が

おこることが明らかとなった。また一方で、この変異によって失われた複合体形成能を回復する機能復帰変異を解析したところ、 $\alpha$ サブユニットの111番目また $\beta$ サブユニットの218番目の残基の変異が見いだされた<sup>7,8)</sup>。これらの一連の解析から $\beta$ サブユニットの40と41残基は、 $\alpha$ サブユニットのアミノ末端に近くに、一方 $\beta$ の分子内では218残基に近く存在し機能的に連関することが推定できた。牛の原子構造解析の結果<sup>3)</sup>と比べると、 $\beta$ サブユニット内部の位置関係は一致したが、 $\alpha$ サブユニットの111残基とは離れた関係であることが明らかになった。この離れた位置関係が構造形成時における $\beta$ と $\alpha$ の正しい立体構造形成に関与するものと推定された。

#### 4. モノクローナル抗体によるタンパク表面の人為的操作

モノクローナル抗体を用いたタンパク質分子表面残基のタンパク質相互作用における役割を解析する一連の結果を紹介し、その有効性について述べたが、モノクローナル抗体は分子表面構造の人為的操作にも役立つ。触媒部位形成に重要な $\alpha$ サブユニットの抗体を分離して解析したところ、このサブユニットのC末端近傍の440から456残基にまたがる小さな $\alpha$ -ヘリックス構造に結合することが明らかになった。さらに、これらの抗体存在下では、ATPase活性が2倍近く増大することが、明らかになった<sup>9)</sup>。また、抗体が結合しなくなったこれら2つの残基の変異でも、活性が増大することが明らかになった。これらのことから、このヘリックス構造が抗体によって変化するか、もしくはアミノ酸残基置換によって変化するかにより、同じように酵素活性の増大が起こるものと考えられた。したがって、このヘリックス近傍は未知の酵素活性調節機構に関与するのではないかと考えられた。また、分子表面の抗体結合がヘリックス構造を変化させ、活性を変化させることから、このヘリックスに酵素内で動的に接触する他のサブユニットの存在などが推定されたが、今のところその実体は明らかではない。このような発見から、表面残基を認識する抗体は、分子表面に結合し、確実に結合した蛋白質の構造変化を起こすことが、この場合明らかになった。

#### 5. two-hybrid系による解析

相互作用する蛋白質の遺伝子を新規に取り出す方

表1 酵母two-hybrid法を用いた大腸菌ATP合成酵素のサブユニット間相互作用

##### A. $F_1$ -ATPase サブユニット間の相互作用

試験対象となるサブユニットの組み合わせ	相互作用の指標となる酵素発現量の値
$\alpha + \beta$	4.0
$\alpha + \gamma$	0
$\alpha + \delta$	1.7
$\alpha + \epsilon$	0
$\beta + \gamma$	0.1
$\beta + \delta$	1.7
$\beta + \epsilon$	0.1
$\gamma + \delta$	1.8
$\gamma + \epsilon$	6.9
$\delta + \epsilon$	1.1

##### B. 細胞膜中に存在するbサブユニットの膜表在性部分と $F_1$ サブユニットとの相互作用

相互作用検出対象 $F_1$ サブユニット	相互作用の指標となる酵素発現量の値
$\alpha$	0.1
$\beta$	0.1
$\gamma$	0.1
$\delta$	15.0
$\epsilon$	0.1

酵母のtwo-hybrid法については文献11)を参照。AおよびBの結果はそれぞれ文献12)と13)から改変して転載した。

法として酵母を用いたtwo-hybrid法<sup>11)</sup>が広く用いられている。筆者等は、この手法がオリゴメリックな酵素のサブユニット相互作用の解析に有効であり、半定量的に結合力に関する情報を得る手段になりうることを、ATP合成酵素を用いて明らかにした。

先に述べたように、 $\alpha\beta\gamma$ からなる触媒部位の構造は明らかになっていたが、その他のサブユニットの相互作用は不明な点が多く残されていた。two-hybrid系をこの問題に適用すると、表1に示すような結果が得られた<sup>12,13)</sup>。予測された $\alpha$ と $\beta$ の相互作用の他に $\gamma$ と $\epsilon$ の強い相互作用が検出された。また、膜表在性部分をなす $\delta$ サブユニットが膜内在性部分の構成サブユニットであるbサブユニットの膜外に突出した部分と相互作用することが、新たに明らかにされた。これらのサブユニットタンパク質を用いた試験管内タンパク質結合実験やATPaseの再構成実験もこれを支持するものであった。この事実に基づいて、図1のようなサブユニットの配置を新たに提案した<sup>13)</sup>。

two-hybrid法は、遺伝学的な方法であり、タンパク質の結合力の定量的判断はこの方法のみでは、難しいと考えられている。ATP合成酵素を用いて各サブユニット間の結合について、精製蛋白質をもとにした試験管内タンパク相互作用の結果と、two-hybrid法における結果とを比較することができた。この結果、two-hybrid法による結果は半定量的にタンパク質間の結合力について取り扱いができるものと考えられた。また、この方法により $\gamma$ と $\epsilon$ の相互作用を失った $\gamma$ の突然変異体を分離することに成功し<sup>14)</sup>、相互作用部位のアミノ酸残基レベルの解析にも、この方法が役立つことを示した。

### お わ り に

タンパク質の表面の構造や相互作用の解析は、化学修飾試薬を用いてタンパク質分子表面残基を特定したり、相互作用残基を架橋試薬を用いて解析することが、従来行われてきた。ここで述べた筆者等のアプローチは、モノクローナル抗体を道具として、遺伝子工学手法をこれに加えた新たなものといえる。タンパク質相互作用の動的機構を明らかにするには、結晶解析のみでは明らかにできない多くの問題が残されている。ここに記したアプローチはその点で、今後もオリゴメリックな酵素のサブユニットや情報伝達タンパク質の相互作用の動的解析に役立つものと考えられる。

### 参 考 文 献

- 1) 金澤 浩 生化学(1984) 56, 81-106
- 2) Futai, M., Noumi, T., and Maeda, M. (1989) *Ann. Rev. Biochem.* 58, 111-136.
- 3) Abrahams, J. P., Leslie, A. G. W., Lutter R., and Walker, J. (1994) *Nature* 370, 621-628.
- 4) Noji, H., Yasuda, R., Yoshida, M., and Kinoshita, K. Jr. (1997) *Nature* 386, 299-302.
- 5) Miki, J., Matsuda, T., Kariya, H., Ohmori, H., Tsuchiya, T., Futai, M., and Kanazawa, H. (1992) *Arch. Biochem. Biophys.* 294, 373-381.
- 6) Miki, J., Kusuki, H., Tsugumi, S., and Kanazawa, H. (1994) *J. Biol. Chem.*, 269, 4227-4232.
- 7) Miki, J., Tsugumi, S., Ikeda, H., and Kanazawa, H. *FEBS LETT.* (1994) 344, 187-190.
- 8) Miki, J., Tsugumi, S., and Kanazawa, H. *Arch. Biochem. Biophys.* (1994) 312, 317-325.
- 9) Kanazawa, H. Yabuki, M., Miki, J., Fudemoto, T., Ikeda, H., Noumi T., and Shin, Y. *Arch. Biochem. Biophys.* (1995) 317, 348-356.
- 10) Yabuki, M., Nagakura, T., Moritani, C., Kanazawa, H. *Arch. Biochem. Biophys.* (1997) 338, 104-110.
- 11) Fields, S. and Song, O. (1989) *Nature*, 340, 245-246.
- 12) Moritani, C., Sawada, K., Takemoto, K., Shin, Y., Nemoto, S., Noumi, T., and Kanazawa, H. *Biochem. Biophys. Act.*, (1996) 1274, 67-72.
- 13) Sawada, K., Kuroda, N., Watanabe, H., Moritani-Otsuka, C., Kanazawa, H. *J. Biol. Chem.*, (1997) 272, 30047-30053.
- 14) Sawada, K., Watanabe, H., Moritani-Ohtsuka, C., and Kanazawa, H. *Arch. Biochem. Biophys.* (1997) 348, 183-189.

