

実施課題名 マルチドメインタンパク質 CheA-CheY 複合体の動的構造平衡の解析

【背景】
 細胞は、細胞外の多様な環境変化に対して迅速に応答する。微生物の走化性を司る CheA は、P1, P2, P3, P4, P5の5つのドメインがリンカーで連結された、ダイマーで分子量約15万のマルチドメインタンパク質であり、P1ドメインの H48 が ATP と結合したP4ドメインによりリン酸化される自己リン酸化反応と、P2ドメインに結合した CheY の D57 にリン酸を受け渡すリン酸転移反応を50ミリ秒以内に迅速に完了することにより、鞭毛運動を迅速に調節する。我々は、予備的な全長 CheA と CheY の相互作用のNMR解析により、CheA-CheY 複合体において、CheA の P1ドメインと CheY が結合・解離の平衡状態にあることを明らかにした。そこで本課題では、交差飽和法により、P1ドメインと CheY の結合界面を同定することを目的とした。

【実施内容】
 全長 CheA と CheY の結合界面を明らかにするために、安定同位体標識を施した CheA と CheY を混合して、交差飽和実験を行った。その結果、CheA の P1ドメインの H48 を中心とする領域、および CheY の D57 を中心とする領域が結合界面であることが明らかになった。以上の結果と、滴定実験の結果を合わせて、CheA-CheY 複合体は、生理的な濃度では、リン酸転移反応の進行が可能な P1ドメインと CheY の反応部位同士が近接した状態と、自己リン酸化反応の進行が可能な P1ドメインが離れた状態の平衡状態を取ることであり、両反応を迅速に進行することが明らかとなった (Fig.1)。
 また、サンプルを処理する間の空き時間を利用して、アラニン残基およびメチオニン残基のメチル基を選択的に標識した P2X₄ 受容体の ¹H-¹³C HMQC スペクトルを取得した。その結果、アポ状態と化学シフトが同等のシグナルと、アゴニストである ATP が結合した状態と化学シフトが同等のシグナルが両方観測され、シグナル強度比が電気生理実験で観測された電流の大きさと対応していた。したがって、P2X₄ 受容体が閉状態と開状態の平衡状態にあり、開状態の割合が電流の大きさを決定していることが明らかとなった (Fig.2)。

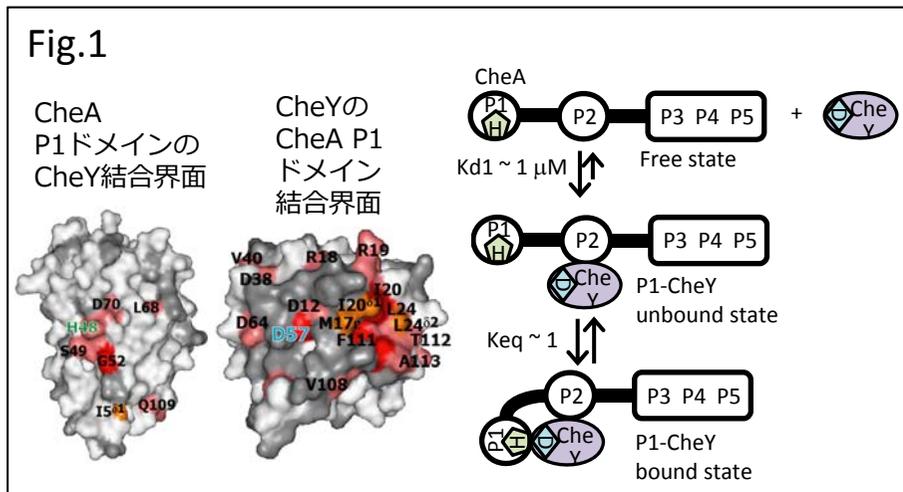


Fig.1説明: CheAのP1ドメインとCheYの結合界面(左) およびCheA-CheY複合体の構造平衡の模式図(右)

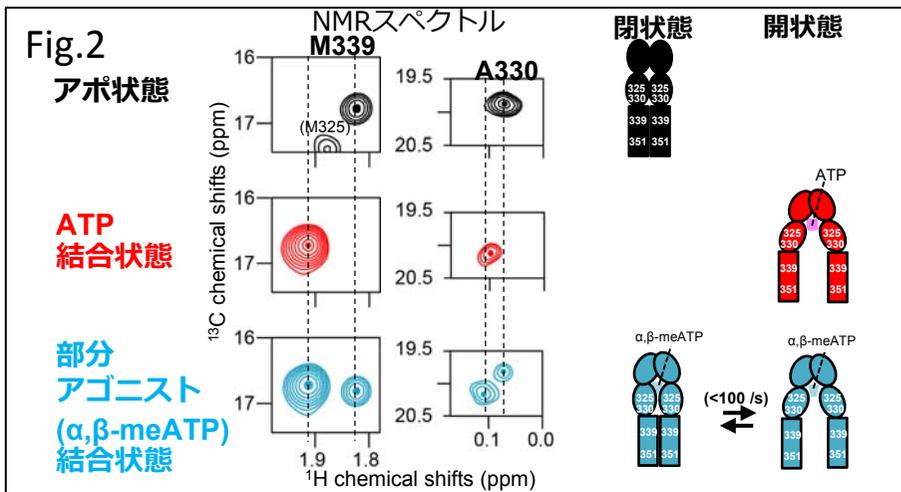


Fig.2説明: 各リガンド結合状態における P2X₄ 受容体の NMR スペクトル (左) および構造平衡の模式図 (右)

NMR 共用プラットフォーム 特定課題利用
利用報告書

申請番号	PF001	課題受付番号	PF13-200-001
実施機関名	東京大学大学院薬学系研究科		
実施部署名	生命物理化学教室		
実施責任者管理職名・氏名	職名	教授	氏名 嶋田 一夫
実施部署所在地	〒113-0033 東京都文京区本郷 7-3-1		
利用課題名	マルチドメインタンパク質 CheA-CheY 複合体の動的構造平衡の解析		
本課題の概要・目的	<p>細胞は、細胞外の多様な環境変化に対して迅速に応答するシステムを備えている。微生物の走化性を司る CheA は、自己リン酸化反応と CheY へのリン酸転移反応を 50 ミリ秒以内に完了することにより、鞭毛運動を迅速に調節する。CheA は P1, P2, P3, P4, P5 の 5 つのドメインがリンカーで連結された、ダイマーで分子量約 15 万のマルチドメインタンパク質であり、P1 ドメインの H48 が ATP と結合した P4 ドメインによりリン酸化された上で、P2 ドメインに結合した CheY の D57 にリン酸を受け渡す。P1 ドメイン上の立体障害のため同時に進行できない自己リン酸化反応とリン酸転移反応の両方を迅速に進行させる機構を解明する上では、P1, P2 ドメインを両方含む全長 CheA と CheY の構造を明らかにすることが必要である。しかし、CheA が巨大かつ運動性に富むマルチドメインタンパク質であるため、全長 CheA と CheY の構造解析は行われていない。我々は、全長 CheA と CheY の相互作用の線形解析により、CheA-CheY 複合体において、CheA の P1 ドメインと CheY が結合・解離の平衡状態にあることを明らかにした。本研究課題では、交差飽和法を CheA-CheY 複合体に適用することにより、P1 ドメインと CheY の結合界面を同定することを目的とした。</p>		
利用実施時期、及び期間	<p>平成 26 年 10 月 01 日～平成 28 年 03 月 31 日</p> <p>総利用日数：35 日</p> <p><u>当初計画どおり</u>・当初計画変更 (変更理由)</p>		
利用施設 横浜市立大学	NMR 装置 (該当部分に ○)	<p>利用装置①</p> <p>・ () 溶液 500MHz、() 溶液 600MHz、() 溶液 700MHz、 () 溶液 800MHz、() 溶液 900MHz、(○) 溶液 950MHz、 () 固体 900MHz、() 固体 950MHz</p> <p>利用期間 1：平成 26 年 10 月 27 日～平成 26 年 10 月 28 日 利用期間 2：平成 26 年 11 月 19 日～平成 26 年 11 月 20 日</p>	

		<p>利用期間3：平成26年12月17日～平成26年12月21日</p> <p>利用期間4：平成27年01月05日～平成27年01月09日</p> <p>利用期間5：平成27年01月19日～平成27年01月22日</p> <p>利用期間6：平成27年03月09日～平成27年09月13日</p> <p>利用期間7：平成27年10月26日～平成27年10月28日</p> <p>利用期間8：平成27年12月14日～平成27年12月16日</p> <p>利用期間9：平成28年02月17日～平成28年02月22日</p>
その他の 利用施設		
成果の 概要	実施内容	<p>全長 CheA と CheY の結合界面を明らかにするために、区分標識法で調製した、P1 ドメイン選択的に ^2H, ^{15}N 標識を施した CheA ($[\text{ }^2\text{H}, \text{ }^{15}\text{N}\text{-P1}]/\text{P2-5}$) と CheY を混合して、交差飽和実験を行った。その結果、強度減少が観測された残基は、P1 ドメインの His48 を中心とする領域に連続した界面を形成していた。さらに、$[\text{ }^2\text{H}, \text{ }^{15}\text{N}]\text{CheY}$ と P2-5 ドメインを重水素化した CheA ($[\text{ }^1\text{H}]\text{P1}/[\text{ }^2\text{H}]\text{P2-5}$) の交差飽和実験を行った。その結果、強度減少が観測された残基は、CheY の Asp57 を中心とする領域に連続した界面を形成していた。メチル基選択標識を施した CheA および CheY を用いた交差飽和実験の結果も、上記の領域が結合界面であることを支持していた。以上の結果と、滴定実験の結果を合わせて、CheA-CheY 複合体は、生理的な濃度では、リン酸転移反応の進行が可能な P1 ドメインと CheY の反応部位同士が近接した状態と、自己リン酸化反応の進行が可能な P1 ドメインが離れた状態の平衡状態を取ることにより、両反応を迅速に進行することが明らかとなった。</p> <p>また、サンプルを処理する間の空き時間を利用して、アラニン残基およびメチオニン残基のメチル基を選択的に標識した P2X_4 受容体の $^1\text{H}\text{-}^{13}\text{C}$ HMQC スペクトルを予備的に取得した結果、当研究室の装置(800MHz)で取得したスペクトルと比較して、目的のシグナルと界面活性剤や脂質のシグナルの間の分離が顕著に向上しており、膜蛋白質の動的構造平衡を解析する上で 950 MHz の NMR 装置が有用であることが示された。そこで、部分アゴニストである $\cdots\text{-methylene ATP}$ が結合した状態における $^1\text{H}\text{-}^{13}\text{C}$ HMQC スペクトルを取得した。その結果、アポ状態と化学シフトが同等のシグナルと、アゴニストである ATP が結合した状態と化学シフトが同等のシグナルが両方観測され、シグナル強度比が電気生理実験で観測された電流の大きさと対応していた。したがって、P2X_4 受容体が閉状態と開状態の平衡状態にあり、開状態の割合が電流の大きさを決定していることが明らかとなった。</p>

<p>本課題により得られた成果と当初目標との比較</p>	<p>本課題では、当初目標通り、交差飽和実験により CheA-CheY 結合界面を同定することに成功した。これにより、CheA-CheY 複合体が、生理的な濃度では、リン酸転移反応の進行が可能な P1 ドメインと CheY の反応部位同士が近接した状態と、自己リン酸化反応の進行が可能な P1 ドメインが離れた状態の平衡状態を取ることであり、両反応を迅速に進行することを明らかにすることができた。</p> <p>また、サンプルを処理する間の空き時間を利用した測定により、P2X₄ 受容体のメチオニン残基およびアラニン残基に由来する NMR シグナルを観測することに成功した。これにより、P2X₄ 受容体が閉状態と開状態の平衡状態にあり、開状態の割合が電流の大きさを決定していることを明らかにすることができた。さらに、得られた成果を投稿論文に発表した (Minato et al., PNAS, 2016)。したがって、当初目標を上回る成果を得たと考える。</p>
<p>成果発表</p>	<p>Minato Y, Suzuki S, Hara T, Kofuku Y, Kasuya G, Fujiwara Y, Igarashi S, Suzuki E, Nureki O, Hattori M, Ueda T, Shimada I, “Conductance of P2X₄ receptor is determined by conformational equilibrium in the transmembrane region”, PNAS (2016) 113, 4741-4746</p>
<p>今後の展開</p>	<p>CheA-CheY のシグナル伝達機構の解明に関して、投稿論文での発表を進める。本研究の NMR 技術は、CheA の P1 ドメインと CheY の相互作用のような、マルチドメインタンパク質における親和性の低い相互作用の機能解明に広く応用されることが期待される。</p> <p>さらに、P2X₄ 受容体の解析で確立した、脂質二重膜環境下における膜タンパク質の動的構造の解析を可能とする NMR 技術を、G タンパク質共役型受容体等の他の創薬標的膜タンパク質に応用する。本研究の NMR 技術では、真核生物由来の膜タンパク質の発現に最も良く利用されている昆虫細胞発現系を用いて調製した安定同位体標識試料を用いているため、多くの創薬標的膜タンパク質に適用することが可能である。</p>
<p>社会・経済への波及効果の見通し</p>	<ul style="list-style-type: none"> ・CheA の P1 ドメインと CheY の相互作用のような、マルチドメインタンパク質複合体の中で重要な生理機能を担う、親和性の低い相互作用は、構造ドメインを切り出して解析する従来の手法では見過ごされていた。本研究で確立した手法は、マルチドメインタンパク質における親和性の低い相互作用の機能解明を可能として、科学の発展に貢献すると共に、新規の薬剤作用点の確立により創薬を加速する。 ・P2X 受容体は、うつ病や神経障害性疼痛の治療薬開発であり、その部分作動薬は、望ましい薬効を持つ薬物となることが期待されている。また、現在市販されている医薬品の半数以上は、膜タンパク質を標的とする。本研究は、単純に親和性を指標として P2X 受容体およびその他創薬標的膜タンパク質のアンタゴニストを開発する従来の戦略から進化した、アンタゴニストから部分アゴニストへとリガンドの質を変えるという、構造平衡の観点からの新規薬物開発につながる。
<p>利用における感想 (改善要望等を含む) 利用周辺環境に関する希望</p>	<p>日程調整から測定のセットアップまで、一連の工程を順調に行うことができた。特に、サンプルの一時冷蔵保管、ならびにリガンドの添加やバッファー置換も施設内で行わせていただいたため、装置を高い稼働率で効率的に使用することができた。</p>

<p>今後の NMR 共用プラットフォームに対する期待</p>	<p>最近、生理的な環境における蛋白質の動的構造平衡が活性を決定していることが明らかになってきている (Kofuku et al., Angew. Chem. Int. Ed., 2014)。これを解明する上では、高磁場 NMR 装置が必要不可欠である。特に 950 MHz の装置は、当研究室の 800 MHz の NMR 装置と比べても、感度が約 1.4 倍高いことに加えて、シグナルの分離が良好である。したがって、NMR 共用プラットフォームで、950MHz の装置をはじめとする高磁場 NMR 装置を使用することにより、濃度や安定性の低い膜蛋白質や細胞内の蛋白質の動的構造平衡の解析が大きく加速することを期待する。</p>
<p>成果公開延期の希望の有無</p>	<p>() あり : (○) なし 「あり」の場合理由 :</p>
<p>その他</p>	