

## タンパク質相互作用を見る

東京大学・大学院総合文化研究科

栗栖源耐\*

### 1. はじめに

タンパク質の構造と機能の相関を研究する上でタンパク質の立体構造は、“分子がどのようにして機能しているか?”という疑問に対して多くの情報を与えてくれる。筆者がこの分野で研究を開始した17年前と比較してX線結晶構造解析法の技術的な進歩は目覚しく、現在データベース上に登録されているタンパク質の立体構造は50,000件を優に超える。結晶化・構造解析した情報を基に、部位特異的変異の導入や化学修飾を施して、タンパク質分子の相互作用部位を同定することは非常に一般化したと言えよう。このような研究の延長線上で、タンパク質が機能している複合体状態で構造解析し、もっと直接的に「タンパク質の相互作用を見よう」という試みがなされている。X線結晶構造解析法は複数の構成成分を含む複合体状態でも、単結晶にすることさえできれば構造解析することが可能であり、実際に複合体結晶構造からは複合体形成により誘発される構造変化やタンパク質分子間の相対配置など、単体タンパク質の立体構造からは計り知れない新たな構造情報を得ることができる。データベースに登録されている実際の複合体構造解析例は少ないものの、今後の構造生物学研究の目指す方向性の一つであることは間違いない。本稿では、これまでに研究対象とされたタンパク質-タンパク質複合体を例に複合体結晶の調製方法の概略と得られる具体的な構造情報について紹介する。

### 2. 複合体状態でのタンパク質結晶化の特徴

タンパク質複合体には、相互作用が非常に強く、特定の相手とだけ強く相互作用する場合と、相互作用は弱いのだが解離会合を繰り返しながら複数の相手と複合体を形成する場合とが存在する。試料調整の方法で見ると、片方のタンパク質にだけタグを導入するだけで、複合体試料として調製できる場合と、それぞれ別に精製したサンプルをモル比で等量混合し、複合

体試料とする場合とがある。勿論、十分なタンパク質量を確保する必要があるため、調整法と精製度に制限がかかるケースも多い。結晶化実験は沢山の条件検索を行う為、十分量のタンパク質を用意することが第一条件となろう。

結晶構造解析を専門としない研究者の中には、時折「タンパク質の結晶化条件はタンパク質と一対一で対応している」と勘違いされている方がおられる。実際には、あるタンパク質が硫酸アンモニウムで結晶化するからと言って、そのタンパク質を含むタンパク質複合体が硫酸アンモニウムで結晶化するとは限らない。複合体の結晶化実験には一からの条件検索が必須なのである。タンパク質複合体を形成する主な相互作用として、「疎水性相互作用」「静電相互作用」「ファンデアワールス相互作用」などが挙げられる。結晶化実験を始める前に実験対象とするタンパク質複合体が主にどのような相互作用により形成されているかを生化学的に確認しておくことは、結晶構造解析を進める上で大変重要である。タンパク質複合体の結晶化実験も通常タンパク質の結晶化実験と同じように、硫酸アンモニウムやポリエチレングリコール (PEG) 等の結晶化用試薬を使う。その為、複合体の形成様式によっては使用する結晶化試薬に制約が生じるからである。個々の結晶化条件は非常に個別的で、タンパク質複合体の結晶化に特別な傾向は見出せないが、一般に静電的な相互作用により複合体が安定化される場合は、硫酸アンモニウムなどの塩を使わずにPEGを沈殿剤して複合体結晶が調製される事が多い。一方、分子間相互作用の大部分が疎水的相互作用の場合は、リン酸塩や硫酸塩などの塩類が沈殿剤として用いられている。

それでは、次に、実際のタンパク質複合体の結晶化例を見ていきたいと思う。本稿では、特定の相手とだけ強く結合するタイプの複合体として、1) ビタミンB<sub>12</sub>輸送体と細胞毒素のレセプター結合ドメインの構造について、そして解離会合を繰り返しながら複数の

\* 連絡先 E-mail: gkurisu@xtal.c.u-tokyo.ac.jp

相手と複合体を形成するタイプの代表として、2) 電子伝達タンパク質フェレドキシン (Fd) と Fd 依存性酵素との複合体形成について構造研究の概要をご紹介します。

### 3. 特定の相手とだけ強く結合するタイプの複合体

コリシンE3はバクテリオシンと呼ばれる551残基からなる抗菌性タンパク質で、大腸菌の2つの膜レセプターを利用することにより菌内に入り込み、rRNAを特異的に加水分解し大腸菌を殺す活性を持っている。その構造は膜透過の為のT-ドメインとレセプター結合の為のR-ドメイン、そして RNAase 活性を持つC-ドメインの3ドメインから構成されている。遺伝学実験により、大腸菌外膜に存在するビタミンB<sub>12</sub>レセプター (BtuB: 594残基) とチャンネルタンパク質OmpF (340残基) を介して膜内に入り込むことは判っていたが、レセプターはそれぞれ分子量1,300および600程度の小分子を輸送するタンパク質であり、分子量6万を超えるコリシンE3がどのようにして大腸菌の外膜を通り抜けていくかは不明のままであった。そこで、筆者は米国 Purdue 大学の W. A. Cramer 教授グループにおいて、135残基からなるコリシンE3のレセプター結合ドメインとBtuBの複合体を 2.75 Å 分解能で構造解析した<sup>2)</sup>。

**結晶化と構造解析** 実験に用いたコリシンE3のレセプター結合ドメイン (R135) とBtuBは、それぞれ別は大腸菌により大量発現させてHisタグにより精製した。BtuBは膜タンパク質であるため、結晶化用のサンプルはすべて界面活性剤の存在下で調製した。結晶化用の複合体はタンパク質を一定の割合

(R135:BtuB=1.25:1) で混合した後に、サンプルを濃縮することにより得た。結晶化には異なった界面活性剤を用いることにより異なった結晶系の結晶が得られたが、最終的に構造解析可能であったのはLDAOを界面活性剤に用いた結晶であった。構造解析は単体のBtuBの構造をサーチモデルにした分子置換法で行い、解析の初期段階の差フーリエ上にR135に対応する電子密度が得られた。最終的にR135と分子BtuBが1対1で結合した複合体を 2.75 Å 分解能で精密化した。

**構造と機能** 得られた複合体の構造は予想以上に興味深いものであった。BtuBは22本のβストランドからなるβバレル構造の中に130残基からなる“コルク”様ドメインが存在している。R135は、このコルクの構造を変えることなく先端のわずかなアミノ酸だけでBtuBと結合していた。結合は主にBtuBのループを介して行われ、R135のαヘリックスは膜面に対して、約40°斜めに傾いて結合していた。コリシンE3の全体構造を重ね合わせると、膜透過に必須のT-ドメインが膜側に配置しており、R135はT-ドメインを運ぶクレーンの役目を担っていることが推察された (図1)。コリシンE3のT-ドメインがOmpFチャンネルを塞ぐという電気生理データから、レセプター結合ドメインのBtuBへの傾いた結合がコリシンのT-ドメインを2番目のレセプターであるOmpFへと運ぶクレーンの役割を果たし、さらに複合体形成に誘発される形でT-ドメインのUnfoldingを引き起こして膜を通過する2レセプターメカニズムを提唱することができた。

### 3. 解離会合を繰り返しながら複数の相手と複合体を形成するタイプの複合体

フェレドキシン (Fd) は光化学系I複合体から電子を受け取り、解離会合を繰り返しながら炭素、窒素、硫黄の各代謝系へ光還元力を分配する電子伝達タンパク質である。改変体を用いた相互作用解析から、電子を受け取る側の Fd 依存性酵素群は、各々 Fd の異なったアミノ酸残基を認識していることが判っている。電子伝達複合体の形成が光還元力の分配機構と密接に係わっていると考えており、筆者は大阪大学の長谷俊治教授の研究グループと共同で電子伝達複合体の構造研究を進めてきた。Fdと相手タンパク質はソフトな相互作用を基に複合体を形成するが、我々はX線結晶解析の手法を用いて複数の複合体を構造解析し、Fdの持つ複合体形成様式の詳細を明らかにした<sup>3,4)</sup>。

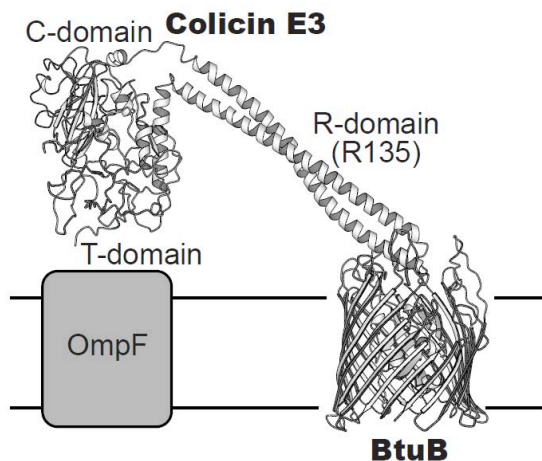


図1. R135とBtuBの複合体結晶構造を基に作図したコリシンE3とBtuBの結合状態

**結晶化と構造解析** 実験に用いたトウモロコシFdとFNRの試料は大腸菌による大量発現系により得られた<sup>5)</sup>。結晶化に用いたFdとFNRとの複合体は3種類の方法により調製した。まず、ゲルろ過クロマトグラフィーにより複合体を精製する方法。次にFdを過剰に加えた混合溶液を分画分子量30 Kの膜を用いて濃縮、希釈を繰り返す事により、過剰量加えた分子量12 KのFdを素通りさせる方法(複合体の分子量は約47 K)、そして最後に等モルになるよう濃度計算し単純に混合させる方法である。結果的にどの方法で調製した複合体でも同じような結晶を得ることが出来た。Fdを中心とした電子伝達反応系では全ての Fd 依存性酵素で静電的な相互作用によりタンパク質・タンパク質複合体を形成する。このことは分子表面の電荷をもった残基を中性の残基に置換した改変体が電子伝達複合体を形成しないことによって確認されている<sup>6)</sup>。したがって、色々な平均分子量のPEG溶液を沈殿剤に選択し、結晶化条件の検索を進めたところ、100 mM NaClを含む20%(w/v) PEG4000を沈殿剤とした時に薄茶色の結晶を得た。Fdは[2Fe-2S]クラスターを有する濃い赤色を、一方のFNRはフラビン酵素であるため鮮やかな黄色をした酵素である。得られた結晶は薄茶色を呈しており、2種類のタンパク質の混合物であることは明白であった。分子置換法による構造解析を進めたところ、解析の初期段階で差フーリエ上にFdに対応する電子密度を確認できた。最終的にFdとFNRの両方の座標を精密化していき、2.59 Å分解能での立体構造を決定した。

2.59 Å分解能で得られた電子伝達タンパク質複合体の立体構造を図2に示す。この複合体構造中ではFNRの酸化還元中心であるFADと、Fdの酸化還元中心である[2Fe-2S]クラスターの最短距離は4.1 Åであった。さらに酸化還元中心近傍に疎水的な状況を作り出して、補欠分子族間での直接電子伝達に適した環境となっていた。この疎水的な領域を取り囲む形で、21残基の電荷を持ったアミノ酸が存在していた。このうち5対のアミノ酸が分子間に塩橋を形成して複合体を安定化し、FdとFNRの相対的立体配置決定の主要因になっていた。FdとFNR間の静電的相互作用に関して、生化学実験からその重要性が指摘されていたアミノ酸残基は、すべて複合体構造中の会合領域に位置していた。しかしながら、今回新しく見出されたFdのArg 40とFNRのGlu 154による塩橋の形成は、全く予想され

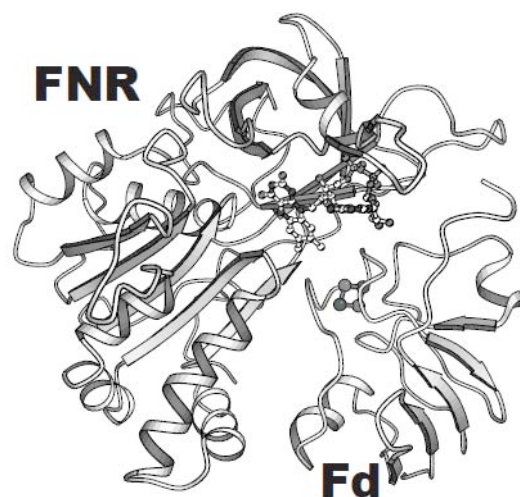


図2. FdとFNRの複合体構造

ていないものであった。複合体を形成していない単体状態のFdではArg 40の側鎖がGlu 29の側鎖と分子内に塩橋を形成し、[2Fe-2S]クラスターを取り囲んでいるループ構造を安定化している。今回の複合体構造中ではArg 40とGlu 29の分子内塩橋が開裂し、FNRのGlu 29およびLys 304と新たに分子間に塩橋を形成していた。現在のところ、FNRとの複合体形成に伴う塩橋の架け替えが、Fdの持つ[2Fe-2S]クラスターの酸化還元電位をさらに約90 mV低下させるという従来の報告に対応する構造変化であると考えている<sup>7)</sup>。次にFdが結合していない単体FNRの立体構造と複合体FNRの立体構造を比較したところ、興味深い構造変化を確認することが出来た。FNRのGlu 312はFAD近傍に存在する保存残基で活性中心に位置している。また、このGlu 312の側鎖はFNR内部にあるSer 96と共にNADP(H)のニコチン環と水素結合することが報告されている<sup>8)</sup>。フリー状態のFNRではGlu 312はSer 96と離れているが、複合体になることによりSer 96の方へ約2 Å近づいて水素結合可能な距離に移動していた。Glu 312側鎖は、結合したFdと立体障害を起こすことにより分子内部へと押し込まれた形になっていたのである。これは複合体形成によりFNRの活性残基がNADP(H)と特定の相互作用をする為に必要な配置へと構造変化したと考えられる。

#### 4. 今後の課題と展開

具体例として紹介させていただいた複合体状態のビタミンB<sub>12</sub>輸送体と電子伝達複合体の両構造とも、X線構造解析以外の物理化学的手法による相補的な複合体解析が行われている。前者のビタミンB<sub>12</sub>輸送体の場合、CDスペクトルを測定して、複合体形成によりR135の $\alpha$ ヘリックス含量が約14%減少し、コリシンE3

にUnfoldingを伴う構造変化が起きている事を示唆するデータが得られている<sup>2)</sup>。また、後者の電子伝達複合体の場合、<sup>15</sup>NでラベルしたFdの化学シフトを同定し、FNRを滴定した時の化学シフトの変化からNMRでもX線でもほぼ同じアミノ酸を使って複合体を形成していることを確認している<sup>4)</sup>。このように、タンパク質複合体の構造解析と、種々の物理化学的手法を相補的に併用することにより、より信頼度の高い情報を得る努力が必要であろう。今後、光合成研究をはじめ特定のテーマ毎に的を絞ったタンパク質複合体のデータが蓄積し、高次の生命現象を複合体分子構造ベースで議論される事を希望してやまない。

### 参考文献

1. Soelaiman, S., Jakes, K., Wu, N., Li, C. and Shoham, M. (2001) Crystal structure of colicin E3: implications for cell entry and ribosome inactivation, *Mol. Cell* 8, 1053-1062.
2. Kurisu, G., Zakharov, S.D., Zhahnina, M.V., Bano, S., Eroukova, V.Y., Rokitskaya, T.I., Antonenko, Y.N., Wiener, M.C. and Cramer, W.A. (2003) The structure of BtuB with bound colicin E3 R-domain implies a translocon, *Nat. Struct. Biol.* 10, 948-954.
3. Kurisu, G., Kusunoki, M., Katoh, E., Yamazaki, T., Teshima, K., Onda, Y., Kimata-Arigo, Y. and Hase, T. (2001) Structure of the electron transfer complex between ferredoxin and ferredoxin-NADP(+) reductase, *Nat. Struct. Biol.* 8, 117-121.
4. Hanke, G. T., Kurisu, G., Kusunoki, M., and Hase, T. (2004) Fd:FNR electron transfer complexes: Evolutionary refinement of structural interactions, *Photosyn. Res.* 81, 317-327.
5. Hase, T., Kimata, Y., Yonekura, K., Matsumura, T. and Sakakibara, H. (1991) Molecular cloning and differential expression of the Maize ferredoxin gene family, *Plant Physiol.* 96, 77-83.
6. Akashi, T., Matsumura, T., Ideguchi, T., Iwakiri, K., Kawakatsu, T., Taniguchi, I. and Hase, T. (1999) Comparison of the electrostatic binding sites on the surface of ferredoxin for two ferredoxin-dependent enzymes, ferredoxin-NADP(+) reductase and sulfite reductase, *J. Biol. Chem.* 274, 29399-29405.
7. Batic, C.J. and Kamin, H. (1981) The relation of pH and oxidation-reduction potential to the association state of the ferredoxin . ferredoxin:NADP+ reductase complex, *J. Biol. Chem.* 256, 7756-7763.
8. Deng, Z., Aliverti, A., Zanetti, G., Arakaki, A.K., Ottado, J., Orellano, E.G., Calcaterra, N.B., Ceccarelli, E.A., Carrillo, N. and Karplus, P.A. (1999) A productive NADP+ binding mode of ferredoxin-NADP + reductase revealed by protein engineering and crystallographic studies, *Nat. Struct. Biol.* 6, 847-853.