

生体マルチソーム研究チーム

Bio-multisome Research Team

チームリーダー 宮澤 淳夫

MIYAZAWA, Atsuo

当研究チームでは、神経シナプスに存在する膜タンパク質複合体（生体マルチソーム）の構造研究に基づいて、構造生物学的に細胞内情報伝達システムを解明することに取り組んでいる。受容体やイオンチャネルなど細胞機能に関わる膜タンパク質の働きを正しく理解するためには、個々の膜タンパク質のみを調べるだけでなく、その膜タンパク質に特異的な結合タンパク質と、さらに膜タンパク質と特異的結合タンパク質の複合体（生体マルチソーム）を1つの機能集団として研究していく必要がある。現在、極低温電子顕微鏡を用いた膜タンパク質の立体構造解析と平行して、X線結晶構造解析法による受容体結合タンパク質の構造解析、ならびに受容体との結合様式の解析を行っている。また共焦点レーザーสキャン顕微鏡を用いて、生体マルチソームの細胞内局在や生理機能の解析を行い、構造解析による高分解能構造情報とあわせて、生体マルチソームの細胞内でのダイナミックな働きを明らかにしていきたいと考えている。

1. 膜タンパク質の構造解析

(1) アセチルコリン受容体の構造解析（西野，宮澤）

ニコチン性アセチルコリン受容体（nAChR）は、神経筋接合部に存在するリガンド開閉型のイオンチャネルである。2003年、チューブ状結晶を用いて分解能4Åでの構造解析がなされ、これにより膜貫通領域のアミノ酸主鎖部分の立体構造が解明された。アミノ酸側鎖や細胞内および細胞外領域の構造解明にはさらなる解析が必要であるが、チューブ状結晶を用いた場合、現在のところ4Åでの解析が限界であるため、さらに高分解能での解析が可能な二次元結晶が必要となる。そこで、2つの方法によりnAChRの二次元結晶化を試みた。1つ目の方法としては、まずシビレイの電気器官のポストシナプス膜からTriton X100を用いてnAChRを可溶化、TDACアフィニティークラムでnAChRを精製した。これにより十分な収量のnAChRが得られたので、様々な脂質、バッファを用いてリポソーム膜への再構成・二次元結晶化を試みたが、いずれの条件でもnAChRを効率よく再構成することはできなかった。しかし、ジミリストイルホスファチジン酸（DMPA）とホスファチジルコリン（PC）を混合したリポソームを用いて再構成を行った場合にのみ、nAChRと脂質二重膜との相互作用が不均一ながら認められた。DMPAは相転移温度が高く、室温でゲル状態として存在するためにPCと均一に混ざり合わないという報告があることから、今後は、室温で液晶状態として存在できる相転移温度の低いホスファチジン酸に変えて再構成の検討を行う予定である。二番目の方法としては、ポストシナプス膜からnAChRを可溶化することなく、膜内で再配列させる方法を検討した。これはチューブ状結晶を作製したときと基本的に同様の手順で行った。すなわち、電気器官より膜画分を調製し、これを適当なバッファでホモジナイズした後、数日～数週間インキュベーションし、二次元結晶を生じる条件を検討した。その結果、チューブ状結晶は数週間のインキュベーション後に生じるが、インキュベーション初期に、nAChRのシート状に並んだ小さな領域を生じることが分かった。この領域は凍結していない

新鮮な電気器官を用いた場合に多く出現し、凍結保存した電気器官を用いた場合にもいくつか生じた。また、この領域の画像を高速フーリエ変換することにより回折点を確認することができた。しかし、このようなシートは非常に不安定で数週間のインキュベーションにより分解してしまうことが分かった。今後はシートを安定に保ちつつ、シート領域を大きくするために膜内のnAChRの流動性を上げる条件を検討する予定である。

(2) バクテリア由来ナトリウムチャネルの構造解析（入江^{*}，宮澤）

神経の情報は神経伝達物質により、樹状突起に存在するチャネル内包型レセプターが活性化されることにより伝達される。その結果、細胞膜が脱分極し神経伝達物質による化学信号が電気信号に変換される。この脱分極という電気信号は細長い神経細胞の膜上を樹状突起、細胞体、そして軸索と伝播し、神経終末から再び神経伝達物質が放出され、次の神経細胞に情報が伝達される。電圧感受性Na⁺チャネル（Nach）は膜電位の変化を感知して活性化されるイオンチャネルであり、膜電位の脱分極の伝播はこのチャネルの働きによるものである。そのため、Nachは細胞の興奮、神経伝達、筋肉収縮などの多くの機能に深く関与しており、このチャネルの異常は様々な疾患の直接原因となる。したがって、Nachのチャネル開閉やイオン透過のメカニズムを分子レベルで明らかにすることは神経情報伝達を理解し、関連する疾患の病因解明に非常に大きな役割を果たす。高等生物のNachは非常に多くの膜貫通部位をもち複雑な糖修飾を受ける巨大タンパク質であることから、X線結晶構造解析を行うのは非常に困難であった。しかし近年、*Bacillus halodurans*などの原核生物においても電圧感受性Na⁺チャネル（NachBac）が存在することが明らかになった。NachBacはホモ四量体からなるイオンチャネルを形成しており、高等生物のNachと比べて構造が単純でありX線結晶構造解析を行うのに適している。そこで、このNachBacの構造解析を行うために発現系の構築と精製条件の検討を開始した。全長とチャネル領域のみのNachBacを、それぞれHis-tag融合もしくはは

GST 融合タンパク質として大腸菌を用いて発現を試みたところ、全長 NachBac では His-tag 融合、チャネル領域のみについては GST 融合タンパク質において発現が確認された。次に、これらの NachBac から標識部分を除去し、サイズ排除クロマトグラフィーにて、溶液中での分子量の分析を行った。その結果、いずれも四量体の分子量に相当する位置に溶出された。このことから、精製した NachBac は溶液中で四量体を形成していると考えられる。現在は、この試料を用いて結晶化条件の検討を行っている。

2. 細胞内タンパク質の構造解析

(1) ラプシンの構造解析 (奥田, 千田, 宮澤)

神経伝達物質受容体には、それぞれ特有の細胞内結合タンパク質が存在し、これらの受容体結合タンパク質は、ポストシナプスでの受容体の局在化および集積機構に関与していると考えられている。ラプシンは nAChR の結合タンパク質として発見され、培養細胞やノックアウトマウスを用いた実験からポストシナプス膜における nAChR の構造安定化とその集積機構に関わっていることが報告されている。ラプシンの三次元構造は未だ解析されていないが、単離された cDNA から推測されるアミノ酸配列より、いくつかのドメイン構造を持つことが示唆されている。ラプシンの持つ受容体の局在・集積機構を分子レベルで明らかにするためには原子構造の解明が必須であることから、ラプシンの大量発現系の確立と、精製・結晶化を試みた。シブレエイのラプシン cDNA を用いて全長および部分配列のコンストラクトを作成し、大腸菌における発現を試みたところ、全長を含む多くのコンストラクトは不溶性画分となってしまった。このうち、ほぼ全長に相当する rapsyn (1-344) について可溶性・巻き戻しを試み、精製タンパク質を得たが、結晶化に十分な量は得られていない。ラプシンの自己重合に必要とされる領域を含む 2 つのコンストラクト rapsyn (1-75) と、rapsyn (1-201) については、可溶性画分として発現することが確認できた。現在これらを精製し、結晶化スクリーニングを試みている。また、nAChR との結合に重要とされる領域を含む rapsyn (237-338) は、ユビキチンタグ融合タンパク質として発現させることによって可溶性画分として得ることができた。しかし、rapsyn (237-338) は、精製過程において沈殿を生ずる傾向にあった。この原因の 1 つとして、nAChR と結合する coiled-coil 領域の疎水性が高く、この領域の疎水性相互作用によって分子が凝集してしまうと考えられる。そこで、この疎水性相互作用を、nAChR と rapsyn との複合体を形成させることにより抑制しようと考えた。しかし、ラプシンが nAChR の 5 つあるサブユニットのいずれと相互作用をしているか分かっていない。そこで、シブレエイの nAChR サブユニットの cDNA を単離し、それぞれ 4 種 (α , β , γ , δ) のサブユニットの細胞内領域のコンストラクトを作製した。これらが大腸菌で発現させ、SDS-PAGE 上でほぼ単一のバンドとして精製できることを確認した。今後、これらと rapsyn (237-338) の相互作用を確認するとともに、共精製、ならびに共結晶化を試みる予定である。

(2) PSD-95 の構造解析 (永井, 岩崎, 福永, 宮澤)

神経のポストシナプスには NMDA 受容体や shaker 型 K⁺ チャネル等が集積することが示され、これらの集積機構に

関与する分子の 1 つとして PSD-95 が注目を集めている。PSD-95 の配列には、N 末端側から順に 3 個の PDZ ドメインと、それに続く SH3-GK ドメインが存在する。細胞生物学的な研究から、PSD-95 の PDZ ドメインには受容体やイオンチャネルなどの膜タンパク質のみならず、神経型一酸化窒素合成酵素 (nNOS) や CaM のような細胞内可溶性分子も結合することが報告されている。これらの知見から、PSD-95 は膜タンパク質と細胞内分子の両方を集積させる、足場タンパク質としての働きを持つ分子であると考えられている。既に、PSD-95 の各ドメインの立体構造は、それぞれ X 線結晶解析や NMR により解明されてきた。しかし、PSD-95 による受容体やイオンチャネルのポストシナプス膜における集積機構、膜タンパク質と細胞内分子との媒介機構を明らかにするためには、各ドメインとリガンドとの結合様式など局所的な構造解析では不十分である。そこで、PSD-95 分子全体の構造と分子内における各ドメインの立体配置、PSD-95 と相互作用する分子との結合様式の解明のため、原子レベルでの構造解析が必須であると考えた。これまでにマウス PSD-95 の cDNA を用いて、全長および 3 つの PDZ 領域 (PSD-95 (1-402)) の、大腸菌における大量発現系を確立し、それぞれを単一タンパク質として精製することに成功した。さらに PSD-95 (1-402) については三次元結晶を得ることに成功し、大型放射光施設 (SPring-8) にてデータ収集を行う予定である。今後は精製法の改良と共に、三次元結晶化における条件の最適化とデータの解析を進める。全長 PSD-95 の構造については、低温電子顕微鏡を用いた単粒子解析を行う。また、全長 PSD-95 がいくつかのコンフォメーションをとる場合には、電子線トモグラフィによる解析とあわせて三次元構造の分類を試みる。これらの構造に、既に報告されている 4 つのドメイン構造のフィッティングを行うことにより、1 つの分子全体としての構造を決定する予定である。

3. 生体マルチソームの細胞生物学的解析

(1) PSD-95 とカルモジュリンの相互作用 (福永, 永井, 宮澤)

神経シナプスに局在する PSD-95 は、NMDA 受容体やシグナル伝達分子と結合し、NMDA 受容体を介するシグナル伝達の足場になると考えられている。NMDA 受容体活性化によって細胞内に流入した Ca²⁺ は、CaM と結合し、Ca²⁺/CaM 依存性プロテインキナーゼの活性化や、nNOS の活性化に代表される多様な細胞内シグナル伝達系を制御する。これまでに、表面プラズモン共鳴技術 (BIAcore3000) を用いて、PSD-95 と CaM が Ca²⁺ 依存的に結合すること、PSD-95 の CaM 結合には SH3-GK ドメインが重要であることを明らかにした。しかし、PSD-95 と CaM の結合親和性は、他の MAGUK ファミリータンパク質に比べると格段に低く、その特異的結合の証明が非常に困難であった。そこで、これまで用いていた PSD-95 のコンストラクトから、N 末側に付加されている S-tag を取り除いたコンストラクトを用いて再実験を行った。その結果、以前のコンストラクトに比べ、約 10 倍親和性が高くなった。また、PSD-95 とセンサーチップに固定化した CaM の結合が、PSD-95 と同時に添加した CaM によって用量依存的に抑制された。さらに、実験のコントロールとして使用した分子量と酸性度が CaM

と似ている大豆 trypsin inhibitor は、PSD-95 と CaM の結合に全く影響を及ぼさなかった。以上により、PSD-95 と CaM の特異的結合を明確に証明できた。また、PDZ ドメインに結合するタンパク質 (APC, CRIPT, Kv1.4, NR2B) の C 末端 9 残基による PSD-95 と CaM の結合への影響を、S-tag のない新しい PSD-95 コンストラクトを用いて検討した。その結果、400 μ M CRIPT ペプチドと 800 μ M NR2B ペプチドは、PSD-95 と CaM の相互作用を示す波形 (センサグラム) を変化させたが、100~800 μ M Kv1.4 ペプチドと 100~400 μ M APC ペプチドは、センサグラムに影響を及ぼさなかった。反応速度解析の結果から、400 μ M CRIPT ペプチドは、PSD-95 と CaM の結合親和性を上昇させることが分かった。現在、800 μ M NR2B ペプチドによる影響を検討中である。以上の結果は、MAP1A の SH3-GK ドメインへの結合が、PDZ ドメインに結合するタンパク質 C 末端ペプチドにより増強されるという報告と一致している。また、PDZ ドメイン結合タンパク質との結合により PSD-95 の構造が変化し、SH3-GK ドメイン結合タンパク質と PSD-95 との結合に影響を及ぼす可能性が示唆された。

(2) NMDA 受容体シグナリングにおける PSD-95 の役割 (福永, 和田, 宮澤)

NMDA 受容体を介する多くの神経細胞シグナル伝達に、NMDA 受容体の足場タンパク質である PSD-95 が関与すると考えられているが、その詳細は明らかになっていない。PSD-95 が、nNOS や、スパイン形態の形成・維持・変化を担う細胞骨格関連タンパク質と結合することから、一酸化窒素 (NO) 産生と樹状突起スパインの形態変化に着目し、PSD-95 の神経シグナル伝達における役割について検討している。PSD-95 の機能を調べるために、特定のタンパク質の発現を抑制することが可能な short interfering RNA (siRNA) を用いた PSD-95 ノックダウンに取り組んでいる。COS7 細胞において、PSD-95 の強制発現を抑制した siRNA を海馬初代培養細胞に導入した。導入後 2~3 日目では、内在性 PSD-95 の安定したノックダウン効果は認められなかったが、4 日目では、内在性 PSD-95 の発現がほとんど抑制されることを確認した。報告されている哺乳類細胞を用いた RNAi (RNA 干渉) の実験では、標的となるタンパク質の減少は、siRNA 導入 3 日目までに認められている。これは PSD-95 が PSD に局在する膜タンパク質に係留されることで、代謝回転が遅くなるためだと考えられる。また PSD-95 がノックダウンされた細胞の多くは、樹状突起のスパインを消失していた。このことは、PSD-95 が細胞骨格関連タンパク質の機能に関与している可能性を示唆している。今後、PSD-95 ノックダウンとスパイン消失との相関を明らかにし、それに関わる分子の同定を行う予定である。また PSD-95 の NO 産生における役割を検討するために、COS7 細胞で、NO の検出が可能であった NO 検出指示薬 Diaminorhodamine-4M (DAR-4M) を用いて、神経細胞の NO 測定を試みた。神経細胞では、観察時のハロゲンランプの光が照射するだけで蛍光を発してしまったため、DAR-4M では、刺激後の NO 産生を検出することができなかった。そこで他の NO 検出指示薬についての検討を進めている。また、これらシグナル伝達に関わるタンパク質は、その多くが PSD に局在している。これらタンパク質の局在に対する PSD-95 ノックダウンの影響を検討する

目的で、nNOS, GKAP, F-actin, CRIPT 等の免疫組織化学的検出法を確立した。

* 研修生

The aim of our research is to elucidate the transmembrane signaling system, by the structural analysis of the complex (bio-multisome) between membrane protein and its associated protein in nerve cells. The structure of ion channels and receptors has been elucidated by cryo-electron microscopy. The crystallization of soluble proteins is investigated to reveal their atomic structure by X-ray crystallography. Then, the confocal laser-scanning microscopy is introduced for the study of intracellular localization and physiological function of the bio-multisome. These experimental attempts coupled with the structural studies will provide critical insights into the dynamic structure and function of the bio-multisome in living cells.

1. Structure analysis of membrane proteins

(1) Nicotinic acetylcholine receptor

The nicotinic acetylcholine receptor (nAChR) is a ligand-gated ion channel at the neuromuscular junction. The nAChR was purified using Triton X100 and the TDAC affinity column chromatography from postsynaptic membranes of *Torpedo* rays. The purified nAChR failed to be reconstituted into liposomal membranes, however it was proved that nAChR had an affinity with the membranes including dimyristoyl phosphatidic acid. The 2-dimensional (2-D) crystallization of nAChR was also tried by rearranging the receptors in postsynaptic membranes. As a result, small 2-D crystals like sheets were found in the rearranged postsynaptic membranes. The images of the small sheets presented some diffraction spots at low resolution by the calculation of Fourier transform.

(2) Voltage-gated sodium channel

A bacterial small ion channel, the *Bacillus halodurans* voltage-gated sodium-selective channel (NachBac) has been also studying the 3-D crystallization for the structure analysis. The His-tagged full length and the GST-tagged channel region of NachBac were expressed in *E. coli* and purified by an affinity column and a size-exclusion column chromatography. The purified NachBac was proved to be a tetramer formation.

2. Structural study of soluble proteins associated with membrane proteins

(1) Rapsyn

Rapsyn, myristoylated peripheral protein, plays critical role in the clustering of nAChR and in the organization of the postsynaptic density (PSD) cytoskeletal complex at the neuromuscular junction. To understand the structure and function, we have investigated large-scale expression and purification of rapsyn as a necessary step for the crystal structure analysis. Rapsyn cDNA isolated from *Torpedo* ray was expressed in *E. coli*. Both rapsyn (1-75) and rapsyn (1-201) were purified from soluble fraction and used for crystallization screening. Rapsyn (1-344) was purified from inclusion body, but the amount of purified protein is still not enough to be used in crystallization screening. The most important part, nAChR associated domain of rapsyn (rapsyn (237-338)) was expressed as ubiquitin fusion protein. To avoid the aggregation during the purification, the rapsyn (237-338) seems to be purified with the cytoplasmic loop of the nAChR subunits expressed in *E. coli*.

(2) PSD-95

A scaffold protein (MW:95k) at PSD, PSD-95, composed of three PDZ domains and a SH3-GK domain. It plays important roles in regulating assembly and function of protein networks involved in PSD. Although the structural features of each domain have been revealed by X-ray crystallography and NMR, it is still necessary to analyze the whole spatial arrangement consisted of all four domains, which is essential to understand the molecular scaffolding mechanism of PSD-95. In addition to the expression in *E. coli* and the purification of mouse PSD-95, we have recently succeeded in crystallization of its N-terminal segment (PSD-95 (1-402)). We are also trying to determine the 3-D structure of the full-length of PSD-95 by single particle analysis.

3. Biochemical and cytochemical study of bio-multisome

(1) Interaction between PSD-95 and calmodulin

We have been evaluating the possible involvement of PSD-95 as a modulator of signal transduction via NMDA receptors. We focus on the interaction of PSD-95 and calmodulin (CaM), which is activated by the increment of intracellular Ca^{2+} concentration following the activation of NMDA receptors. We have been investigating the characteristics of interaction between PSD-95 and CaM by using surface plasmon resonance spectroscopy (BIAcore 3000). In the present term, we prepared a shorter gene construct of PSD-95, in which S-tag was deleted from the previous PSD-95 construct. We have revealed that PSD-95 specifically binds to CaM via SH3-GK domain, also showed that the synthetic C-terminal peptides of proteins, CRIPT and NR2B, which interact with PDZ2 or PDZ3 domain of PSD-95, facilitated the interaction between PSD-95 and CaM, but not the synthetic C-terminal peptides of APC and Kv1.4. These results suggest the possibility that the conformational change of PSD-95 by the binding of proteins to PDZ2 and/or PDZ3 domain would affect the interaction between PSD-95 and CaM.

(2) A role of PSD-95 in NMDA receptor signaling

We also planned to examine the role of PSD-95 on other event via NMDA receptors; nitrogen monoxide (NO) synthesis and the change of synaptic morphology. RNA interference (RNAi) would be a useful tool to study these biological involvements of PSD-95. In the last term, we have succeeded to reduce the expression of PSD-95 in the hippocampal neurons with the synthetic short interfering RNA (siRNA) specific for PSD-95. We are going to investigate the establishment of RNAi of PSD-95 and the measurement of NO production with Diaminorhodamine-4M in the primary cultured neuron by a confocal laser-scanning microscopy.

Staff

Head

Dr. Atsuo MIYAZAWA

Members

Dr. Yuko FUKUNAGA

Dr. Masato HASEGAWA

Dr. Kenji IWASAKI

Dr. Kaoru MITSUOKA

Ms. Rina NAGAI

Ms. Yuri NISHINO

Dr. Takashi NONAKA

Dr. Akiko OKUTA

Dr. Toshiya SENDA

Ms. Natsuko WADA

Trainees

Mr. Katsumasa IRIE (Grad. Sch. Sci., Kyoto Univ.)

誌 上 発 表 Publications

[雑誌]

(総 説)

宮澤淳夫: “アセチルコリン受容体の構造と活性化機構”, 生化学 **76**, 125-130 (2004).

口 頭 発 表 Oral Presentations

(国際会議等)

Miyazawa A.: “Structure and molecular mechanism of nicotinic acetylcholine receptor”, “Whither Structural Genomics?” A Bilateral UK-Japan Symp., Oxford, UK, Mar. (2004).

Miyazawa A.: “Structure determination and activation mechanism of nicotinic acetylcholine receptor”, RIKEN-CCLRC Daresbury Symp.: Structural Biology, Daresbury, UK, May (2004).

Miyazawa A.: “Structure and dynamics of the acetylcholine receptor”, 8th Asia-Pacific Conf. on Electron Microscopy (8APEM) in conjunction with 60th Ann. Meet. of the Japanese Society of Microscopy, Kanazawa, June (2004).

Miyazawa A.: “Structure and function of acetylcholine receptor”, 16th Int. Congr. of the IFAA: Anatomical Science 2004 from Gene to Body, Kyoto, Aug. (2004).

Miyazawa A.: “Structure analysis of membrane proteins by cryo-electron microscopy”, 10th TNS Ann. Conf. 2004, (The Thai Neuroscience Society), Bangkok, Thailand, Dec. (2004).

Miyazawa A.: “Structure and mechanism of acetylcholine receptor by electron crystallography”, 5th IBRO Asia-Pacific Neuroscience School, (The Thai Neuroscience Society), Bangkok, Thailand, Dec. (2004).

(国内会議)

宮澤淳夫: “アセチルコリン受容体の機能構造”, 文科省科研費特定領域研究「膜輸送ナノマシンの構造・作動機構とその制御」公開シンポジウム, 名古屋, 7月 (2004).