

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はなく、膜タンパク質とその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および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ス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. ニコチン性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年のチューブ状結晶を用いた分解能4Åでの構造解析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が、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。しかしながら、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。そこで本年度は、2通りの手法でnAChRの二次元結晶化を検討した。1つ目の方法は、シビレエイの電気器官のポストシナプス膜から界面活性剤を用いてnAChRを可溶化、カラムを用いて大量に精製し、様々な脂質、緩衝液を用いて脂質二重膜への再構成・二次元結晶化を試みる方法である。タンパク質の二次元結晶化は、可溶化されたタンパク質から透析により界面活性剤が取り除かれてリボソーム膜へ再構成される段階が鍵になることから、タンパク質の精製時に用いる界面活性剤を中心に検討を行った。その結果、Triton X-100を用いて可溶化した場合に最もnAChRの可溶性が高く、収量も高いが、タンパク質へのダメージが強く、また限界ミセル濃度が低いために透析で除去されにくく、二次元結晶化には適していないと判断した。そこで、カラム上で他の界面活性剤に交換することを試みたところ、いくつかの非イオン性界面活性剤で精製後も安定にnAChRが単分散して存在することが分かった。2つ目の方法は、電気器官より調製したポストシナプス膜からnAChRを可溶化することなく、適当な緩衝液中でインキュベートし、膜内でnAChRを再配列させる方法である。この方法では、脂質二重膜の流動性を上げる必要があることから、温度条件の検討を中心に行った。一般に温度を上げると脂質の流動性も上昇すると考えられる。nAChRは温度を上昇させるとダメージを受けやすいが、一時的に20~25℃に上昇させた後、4℃に低下させた場合には、比較的安定に存在することが分かった。今後、これまでの結果をふまえて、nAChRの二次元結晶化への検討をさらに継続する。

2. ポストシナプスにおける足場タンパク質の解析

(1) 神経筋接合部におけるラプシンの解析（奥田*1、宮澤）

ポストシナプスには、それぞれの神経伝達物質受容体に対応した足場タンパク質が存在し、受容体をポストシナプス膜上に局在・集積させている。ラプシンはnAChRと結合する43kDaの細胞質内タンパク質として発見された。ノックアウトマウスや培養細胞を用いた実験から、ラプシンは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が、ラプシン全体の三次元構造は未だ明らかにされていない。そこで、ラプシンによる受容体の局在・集積機構を分子レベルで明らかにするために、ラプシンの大量精製法を検討した。シビレエイのラプシンの部分配列Rapsyn(1-201)と、Rapsyn(1-344)は、それぞれ大腸菌を用いて発現、精製することができたことから、現在、それらの三次元結晶化を検討中である。一方、全長のラプシンは、昆虫細胞を用いて膜画分に発現させることができ、アルカリ条件下で精製可能なことを確認できた。また、ラプシンとnAChRの相互作用や結合様式を解明するために、nAChRとラプシンの複合体について構造解析するための検討を行った。まず、ラプシンのnAChR結合領域と、nAChRの4つのサブユニットの細胞内領域をそれぞれユビキチンタグ融合、GSTタグ融合タンパク質として大腸菌で発現させ、精製した。これら精製タンパク質を用いて、免疫沈降法により相互作用解析を行ったが、ラプシンとnAChRの各サブユニットの間に相互作用は確認できなかった。今後、異種発現系で得られたラプシンが正しい立体構造をとっているかの確認が必要であることがわかった。

(2) 神経シナプスにおけるPSD-95の解析（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、カルモデュリン(CaM)と結合し、Ca²⁺/CaM依存性プロテインキナーゼの活性化や、神経型一酸化窒素合成酵素(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⁺依存的に特異的に結合すること、PSD-95 のCa²⁺/CaM結合にはSH3-GKドメインが重要であることを証明してきた。また、PDZドメインに結合するタンパク質群 (APC, CRIPT, Kv_{1.4}, NR2B) のC末端9残基によるPSD-95 とCa²⁺/CaM の結合への影響を、PSD-95 コンストラクトを用いて検討してきた。本年度は、反応速度解析の結果から、400μM CRIPTペプチドと 800μM NR2Bペプチドは、PSD-95 とCa²⁺/CaM の結合親和性を上昇させるが、100-800μM Kv_{1.4}ペプチドと 100-400μM APCペプチドは影響しないことを明らかにした。以上の結果より、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。

3. 電子顕微鏡法のための細胞内分子標識法の開発 (西野、福永、和田、宮澤)

現在、光学顕微鏡の分野では、GFP: Green Fluorescent protein を始めとする蛍光タンパク質を目的タンパク質に融合して発現させることにより、生きた細胞内でのタンパク質の局在や動きを観察する研究が飛躍的に発展している。一方、電子顕微鏡の分野では、イムノゴールド法がタンパク質の主な標識法であるが、組織の固定操作による抗原性の変化や、抗原抗体反応の非特異的な結合など、多くの問題が残されている。そこで、電子顕微鏡で観察可能な標識を標的タンパク質に組み込んで融合タンパク質として、標的タンパク質自身の構造と機能に影響を与えずに、細胞中で発現できるように標識法の開発を試みた。

*1 客員研究員 (JBIC)

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 proteins 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. Structural analysis of Nicotinic acetylcholine receptor

The nicotinic acetylcholine receptor (nAChR) is a ligand-gated ion channel at the neuromuscular junction. To elucidate the structure of nAChR at high resolution, two-dimensional crystals are indispensable to the analysis by electron microscopy. For two-dimensional crystallization, various detergents were tried during solubilization and purification of nAChR from the postsynaptic membranes of *Torpedo* ray. As a result, Triton X-100 could solubilize nAChR most efficiently; however it proved to be unsuitable for the two-dimensional crystallization by dialysis method. Two-dimensional crystallization of nAChR was also tried by rearranging the receptors in postsynaptic membranes by

incubation without solubilizing them. Although nAChR is sensitive to the high temperature, transient incubation at 20-25°C might be effective in fluidity of lipid on the postsynaptic membrane for two-dimensional crystallization.

2. Study of the scaffolding proteins at postsynapse

(1) Rapsyn at neuromuscular junction

Rapsyn, the 43kDa receptor associated protein, is myristoylated peripheral protein that plays critical roles in the clustering of nAChR and in the organization of the postsynaptic cytoskeletal complex at the neuromuscular junction. The entire structure of rapsyn has not been known yet. And for the three-dimensional crystallization of rapsyn, two truncated rapsyns; rapsyn (1-201) and (1-344) was over expressed in *E. coli* and purified successfully. The full-length of rapsyn could be also expressed in insect cells. Furthermore, to clarify the interaction between rapsyn and nAChR, it was analyzed by immunoprecipitation assay with the purified rapsyn and intracellular domains of each subunit of nAChR.

(2) PSD-95 at neuronal postsynapse

We found the interaction of PSD-95 and Ca²⁺/calmodulin (Ca²⁺/CaM) and have investigated the characteristics of interaction between PSD-95 and Ca²⁺/CaM by using surface plasmon resonance spectroscopy (BIAcore 3000). In the present term, a kinetic analysis revealed 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 Ca²⁺/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 Ca²⁺/CaM.

3. Molecular labeling of intracellular proteins for electron microscopy

The observation of biological materials by transmission electron microscopy (TEM) frequently requires the use of immuno-gold labeling to identify the specimen, but this technique is limited. In contrast, genetic labeling with green fluorescent protein and its homologs allow for the visualization of dynamic processes in live cells by light microscopy without the use of secondary reagents. Then, we tried to develop an artificial fusion protein that allows for efficient protein detection by TEM without additional staining steps.

Staff

Head

Dr. Atsuo MIYAZAWA

Members

Dr. Yuko FUKUNAGA

Ms. Rina NAGAI

Ms. Yuri NISHINO

Ms. Natsuko WADA

Visiting Members

Dr. Masato HASEGAWA (Tokyo Inst. Psychiatry)

Dr. Kenji IWASAKI (Inst. Protein Res., Osaka Univ.)

Dr. Kaoru MITSUOKA (BIRC, AIST)
Dr. Takashi NONAKA (Tokyo Inst. Psychiatry)
Dr. Mika OKAMOTO (Grad. Med. Dent., Kagoshima Univ.)
Dr. Akiko OKUTA (JBIC)
Dr. Toshiya SENDA (BIRC, AIST)

誌 上 発 表 Publications

[雑誌]

(原著論文) *印は査読制度がある論文誌

Fukunaga Y., Matsubara M., Nagai R., and Miyazawa A.: "The Interaction between PSD-95 and Ca^{2+} /Calmodulin Is Enhanced by PDZ-Binding Proteins", J. Biochem. 138, No. 2, pp.177-182 (2005). *

Iwasaki K., Mitsuoka K., Fujiyoshi Y., Fujisawa Y., Maswakazu K., Kiyotoshi S., and Takao M.: "Electron tomography reveals diverse conformations of integrin α IIb3 in the active state", J. Struct. Biol. 150, 259-267 (2005). *

(総説)

宮澤 淳夫, 西野 有里, 藤吉 好則: "極低温電子顕微鏡で解析されたアセチルコリン受動体の構造と機能", 構造生物 11, No. 1, pp.31--50 (2005).

口 頭 発 表 Oral Presentations

(国際会議等)

Miyazawa A.: "Structure and Function of Nicotine Acetylcholine Receptor", 2nd Bilateral Japan-UK Symposium on Structural Genomics and Proteomics, (The 2nd Bilateral Japan-UK Symposium on Structural Genomics and Proteomics Steering Committee), Yokohama, May (2005).

Miyazawa A.: "Structure and Mechanism of Nicotinic Acetylcholine Receptor", Asia-Pacific Advanced Microscopy Symposium/25th Annual Meeting of the Taiwan Microscopy Society, (The Taiwan Microscopy Society), Hualien, Taiwan, Nov. (2005).

(国内会議)

福永 優子, 松崎 英樹, 松原 守, 永井 里奈, 奥田 明子, 宮澤 淳夫, 藤吉 好則: "表面プラズモン共鳴技術による PSD-95のカルモジュリン結合解析", 第26回日本神経科学大会, 名古屋, 7月 (2003).

入江 克雅, 中津 亨, 光岡 薫, 宮澤 淳夫, 祖父江 賢治, 廣明 洋子, 土井 知子, 藤吉 好則, 加藤 博章: "シナプス後膜における Homer1ファミリーによるタンパク質集積制御機構の構造生物学", 第10回放射光医学研究会講演会, (放射光医学研究会), 吹田, 1月 (2005).

宮澤 淳夫: "Structure and activation mechanism of nicotinic acetylcholine receptor", 第82回日本生理学会大会, 仙台, 5月 (2005).

宮澤 淳夫: "低温電子顕微鏡法によるイオンチャネルの機能構造の解析", 日本顕微鏡学会第61回学術講演会, つくば, 6月 (2005).

福永 優子: "高圧凍結固定法の動物培養細胞への応用", 日本顕微鏡学会生体構造解析分科会2005年度研究討論会, 飯塚, 9月 (2005).

福永 優子: "Role of PDZ ligands in PSD-95 interaction with calmodulin", 第78回日本生化学会大会, 神戸, 10月 (2005).

宮澤 淳夫: "低温電子顕微鏡法による膜タンパク質の高分解能構造解析", 日本顕微鏡学会第50回シンポジウム, 福岡, 11月 (2005).