

MAPEG ファミリータンパク質の電子線結晶構造解析

Structural Analysis of MAPEG Family Proteins by Electron Crystallography

刑部 伸彦^a, 光岡 薫^b

Nobuhiko Gyobu and Kaoru Mitsuoka

^a社団法人バイオ産業情報化コンソーシアム^b独立行政法人産業技術総合研究所バイオメディシナル情報研究センター

要旨 電子線結晶構造解析により原子モデルが決定された、MAPEG スーパーファミリーに属する2つの膜タンパク質（マイクロソーム型グルタチオン転移酵素1とマイクロソーム型プロスタグランジンE合成酵素1）について、立体構造の特徴を述べ、さらにその酵素機能との関係について議論する。この二種類の酵素は、多様な基質をもつ前者と基質特異性が高い後者という異なる特徴を持つが、両者の構造上の違いからどのように上記の機能の違いが現れるか、現状のモデルを紹介する。また、これらの構造解析を例として、膜タンパク質の発現から、二次元結晶の作製、データ収集や解析までの電子線結晶学の現状を紹介する。X線結晶構造解析に比べると、研究開発が必要な部分はまだ多いが、膜中の構造が得られるなど利点も多く、電子顕微鏡を日常利用している研究者にとっては、簡単に試みることができる方法となってきた。

キーワード：MAPEG スーパーファミリー、二次元結晶、膜タンパク質、立体構造、クライオ電子顕微鏡法

1. はじめに

膜タンパク質の原子分解能での構造解析には、現状ではX線結晶構造解析が最も利用されている。しかし、この方法では一般的に、界面活性剤で取り囲まれた状態の膜タンパク質の構造を解くことになり、天然の状態とは異なるアーティファクトを見ているということが起こりうる。一方、膜タンパク質は脂質二重層中で二次元結晶と言われる規則正しい配列を取る場合があり、電子顕微鏡を用いれば、そのような二次元結晶から原子モデルが得られるような構造解析を行うことができる。これを電子線結晶構造解析と呼ぶ。二次元結晶を用いることで、実際に脂質二重層中での膜タンパク質の構造が得られ、分解能が十分良い場合には、膜タンパク質と脂質の相互作用も観察することができる¹⁾。また、通常脂質二重層の両表面は水溶液に面しているため、そこに他の相互作用分子が存在することが可能であり、例えば細胞接着に関与している分子では、実際に分子が接着した構造なども得ることができる。

本講座では、筆者らが最近関わったMAPEGファミリーの膜タンパク質を例として取りあげて、電子線結晶構造解析の現状を紹介するとともに、この方法を用いるとどのような生物学的知見が得られるかを述べたいと思う。

2. MAPEG スーパーファミリー

MAPEG (membrane-associated proteins in eicosanoid and glutathione metabolism) スーパーファミリーは解毒やアラキドン酸を用いた生合成経路などに関与する酵素を含むスーパーファミリーである²⁾。そのメンバーは哺乳類や植物、菌類や細菌に存在し、ヒトでは、MGST (microsomal glutathione transferase) 1, 2, 3, FLAP (5-lipoxygenase activating protein), LTC₄S (leukotriene C₄ synthase), MPGES (microsomal prostaglandin E synthase) 1 の6つが知られている。

我々は電子線結晶構造解析により、比較的近縁と考えられるMGST1とMPGES1について、その原子モデルを決定した。この2つのメンバーの生体での役割はかなり異なっている。MGST1は体内に取り込まれた毒性物質を水溶性にして体外に排出できるようにする。一方MPGES1は炎症に関連してプロスタグランジンH₂からプロスタグランジンE₂の合成を行う。しかし、両者はグルタチオンを用いて、それぞれの機能を実現する酵素であるという点では共通している。酵素であるにも関わらず水溶性タンパク質ではなく膜タンパク質であることの利点として、その基質の疎水性が高く生体膜に吸着する性質を持っているため、生体膜の近傍で酵素反応を行った方が、効率が良いということが挙げられる。

MGST1は、解毒を行うので、多様な基質に対して酵素反応を行うことができるが、MPGES1は、特異的にプロスタグランジンH₂からプロスタグランジンE₂を合成する。プロスタグランジンH₂はCOX (cyclooxygenase)により合成され、定常的に発現しているCOX-1と炎症時に発現が誘導される

^b 〒135-0064 東京都江東区青海2-41-6
TEL: 03-3599-8264; FAX: 03-3599-8099
E-mail: kaorum@ni.aist.go.jp
2009年1月8日受付

COX-2 の二種類がある。非ステロイド性抗炎症薬の多くが、COX-1 と COX-2 両方のシクロオキシゲナーゼ活性を可逆的に競合阻害することが知られている。プロスタグランジンには、炎症・発熱作用があるため、その阻害薬には、抗炎症作用や解熱作用がある。COX-2 は炎症時に誘導されるので、抗炎症作用は主に COX-2 阻害に基づくと考えられており、その特異的な阻害剤が開発されたが、血栓傾向が高まるリスクがあり、COX-2 をターゲットとした薬剤はその後自主回収されている。そこで、その下流にある MPGES1 が、創薬ターゲットとして最近注目されている³⁾。

3. 二次元結晶と電子顕微鏡用試料作製

膜タンパク質は天然で二次元結晶を作っている場合もあるが、一般的には、膜タンパク質を大量に含む脂質二重層を適当な条件下に置いたり、界面活性剤で可溶化した後、再構成したりすることにより二次元結晶を作製できる。MGST1 の場合には、天然にラットの肝臓に大量に存在するので、界面活性剤により可溶化・精製した試料を用いた。その試料に、同じく可溶化した脂質を混ぜた後、透析により界面活性剤を除去することで MGST1 が脂質二重層に再構成され、二次元結晶を作製することができた。二次元結晶の大きさは数百 nm から大きくても数 μm 程度なので、光学顕微鏡では見えず、結晶条件の探索には、負染色した試料を電子顕微鏡で観察する必要がある。

MPGES1 の場合には、天然には MGST1 ほど大量に存在する部位はないので、ヒト由来 MPGES1 を大腸菌発現系により大量発現した。一般に哺乳類由来の膜タンパク質は、濃縮により凝集体を作りやすい傾向があるので、三次元結晶化が困難な場合が多い。しかし、二次元結晶化では、脂質二重層への再構成の際に濃縮されるのと同じ効果が期待できるので、三次元結晶化より膜タンパク質の濃度が一桁低い条件で結晶が得られる場合が多く、凝集しやすい膜タンパク質を取り扱うことができる。もちろん、最終的に得られる構造は脂質二重層中のものなので、天然に近い状態の構造を得ることができる。

MGST1, MPGES1 ともに界面活性剤として、Triton X-100 を用いた。Triton X-100 は臨界ミセル濃度 (CMC) が 0.02% と低く、透析で除去するのが難しい。そこで、透析カセットを用いて、透析膜の面積が透析液の体積に対して大きくなるようにした。オクチルグルコシドなどの CMC が比較的高い界面活性剤を用いることができる場合には、通常、三次元結晶化に用いているような透析ポタンを用いる。また、透析外液を定常的に流せるような透析装置を用いている研究室も多い。このように、二次元結晶の場合には、結晶化に用いる器具も現在いろいろなものが用いられているが、結晶化条件の効率的なスクリーニングのためにはより一層の研究開発が必要である。

次に、二次元結晶ができた場合、低温電子顕微鏡に入れて電子顕微鏡像や電子回折を得る必要があるが、そのための電

子顕微鏡試料の作製は非常に重要で条件検討が必要である。最も一般的な方法は、二糖であるトレハロースを包埋剤として用いる手法である。トレハロース溶液中においた二次元結晶が、グリッドに貼り付けた原子レベルで平坦なカーボン膜に吸着するのを待ってから、余分の液をろ紙で吸い取った後、水分が完全には乾かないうちに液体窒素で急速凍結する方法である⁴⁾。その後、我々は、傾斜した試料から良い電子顕微鏡像を効率的に撮ることができる方法として、カーボンサンドイッチ法 (図 1) を提案した⁵⁾。この方法は、結晶が乾燥により壊れるのを防ぐ上でも効果があることがいくつかの例で最近確認されており、特に親水性部分が比較的大きい膜タンパク質の場合は非常に効果的である。我々は通常、この方法を用いて試料作製を行っている。

4. MGST1 と MPGES1 の構造と機能

まず、以前に 3.2 Å 分解能で構造が得られた MGST1 について、その全体構造の特徴とグルタチオンの結合部位に関して説明する⁶⁾。MGST1 の単量体は、4 本の膜貫通ヘリックスを持ち、その N 末端、C 末端が膜の同じ方向に配向していた (図 2)。トリプシン切断実験の結果から、N 末端側にある Lys4 が内腔側にあり、1 番目の膜貫通ヘリックスの C 末端側にある Lys41 が細胞質側にあることがわかっているので、図に示すように N 末端、C 末端ともに内腔側にあることになる。また、二次元結晶中では三量体を形成していたが、活性測定からこれが機能ユニットと考えられている。

MGST1 の構造では、1 番目と 2 番目の膜貫通ヘリックスの間の長いループについて、その原子モデルを決定することができなかった。しかし、細胞質側でそれらのヘリックスにつながる密度を明瞭に観察することができた (図 3)。この密度は、三量体内の隣りの分子の 3 番目と 4 番目の膜貫通ヘリックスを結ぶループに接触するように存在しており、三量体内の分子間相互作用に関係していると考えられる。また、長いループ上にある Lys41 のトリプシン切断により、酵素が活性化されることが知られており、三量体内の分子間相互作用と酵素の活性化機構との関連が示唆される。

この細胞質側の密度以外に、膜貫通部分の細胞質側付近に、

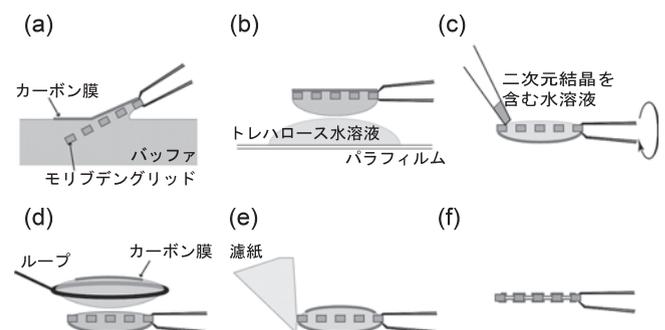


図 1 カーボンサンドイッチ法による電子顕微鏡試料作製の模式図
作製の手順を (a) から (f) までのパネルで示した。

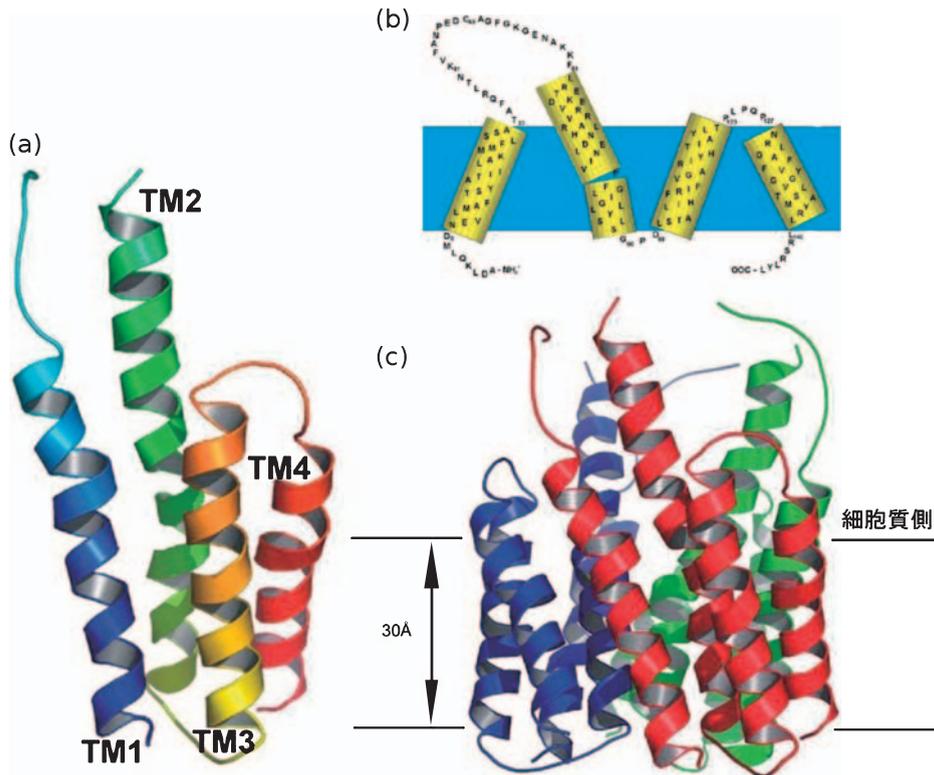


図2 MGST1の全体構造

MGST1の単量体の全体構造をリボンモデルで(a)に示す。そのアミノ酸情報を(b)に、(c)に三量体の構造を分子の色を変えて、表示した。また、(c)に細胞質側を示し、以降の膜と並行方向の図では、同じく細胞質側を上側にした。

タンパク質分子と異なる密度を観測することができた。二次元結晶はグルタチオン存在下で作製したので、我々はこの密度をグルタチオンであると考えている。このグルタチオンの結合部位は、三量体中の分子間にあり、1番目の膜貫通ヘリックスと隣の分子の2番目の膜貫通ヘリックスがグルタチオンの結合に関与していた(図3)。このグルタチオンの結合位置は、三量体内の分子間相互作用が酵素の活性化機構と関連していることを上記の結果同様に示唆している。

MGST1はグルタチオン以外に、このグルタチオンを用いて水溶性に変換される毒性物質を基質とする。その第二の基質の結合部位を得られた構造から検討した(図4)。まず、三量体の真ん中に細胞質側へ大きく開いた凹みを観察することができた。大きさが異なる様々な毒性物質が結合する部位としては適していると考えられる。一方、グルタチオン結合部位からタンパク質を囲む脂質二重層の脂質頭部へアクセスできる開口もあることがわかった。MGST1は脂質を酸化から保護するペルオキシダーゼ活性も有しているため、その酵素反応に上記の開口が利用されていると予想される。また、非常に疎水的な毒性物質は膜内に存在すると考えられるので、その反応にもこちらの開口が利用されている可能性が高い。

MGST1では以上のような全体構造と基質結合部位が明らかになったが、MPGES1では、これらはどのようになっているか、得られた3.5 Å分解能の構造を用いて比較した⁷⁾。まず、全体構造については、同じファミリーのタンパク質なの

で予想されるように、同じく4本の膜貫通ヘリックスを持ち、三量体を形成していた。また、ほぼ同じ位置にグルタチオンも観察でき、酵素活性部位も似た位置にあることが明らかになった。ただし、グルタチオンの構造に関しては、MGST1では縦に伸びたように配向していたのに対し、MPGES1ではU字型となっているという違いがあった。MGST1の構造解析は、結晶の問題上、縦方向の分解能が4 Åとあまり高分解能ではなかったため、縦方向に伸びたように見えた可能性がある。現在、より高い分解能での構造解析を行って確認しようとしているところである。

我々がMGST1の原子モデルを発表した翌年、同じMAPEGファミリーのメンバーである、ロイコトリエンC₄合成酵素(LTC₄S)の三次元結晶からの立体構造が2つのグループから報告された^{8,9)}。その構造では、MPGES1と同様にU字型のグルタチオンが観察されている。また、このLTC₄Sの構造では、可溶化に用いた界面活性剤がグルタチオンの近くに結合しており、その分子構造の類似性から、基質であるロイコトリエンA₄の結合部位と予想されている。

一方、我々は、LTC₄Sのホモロジーモデルと得られたMPGES1の原子モデルを比較し、MPGES1では基質結合部位が膜貫通ヘリックスの折れ曲がりからの傾きの違いで閉じていることを見出した。つまり、MPGES1やLTC₄Sでは、MGST1と異なる特異的な基質結合を実現するため、ヘリックスの折れ曲がりの変化によるinduced fit機構により、特定

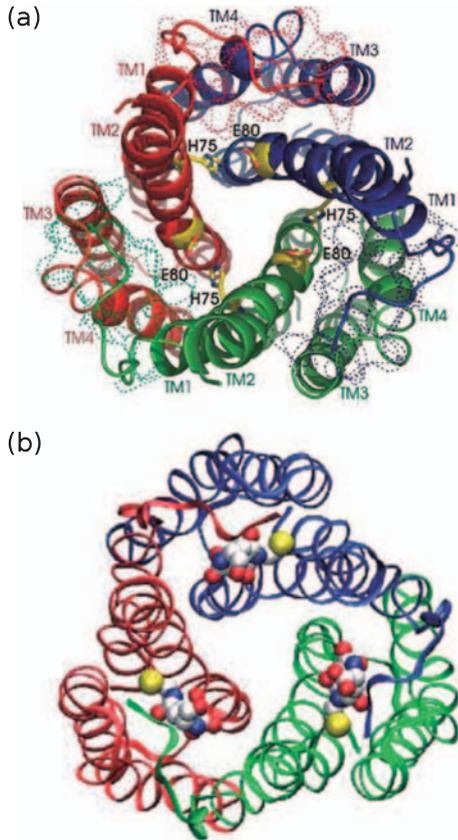


図3 MGST1の電子顕微鏡マップとグルタチオン結合位置
MGST1の密度マップと原子モデルを示す。(a)は、モデルを作製できなかった細胞質側の密度を点線で、対応すると考えられる分子の色で表示した。(b)は、同じ向きからの原子モデルで、グルタチオン分子を空間充填モデルで示している。

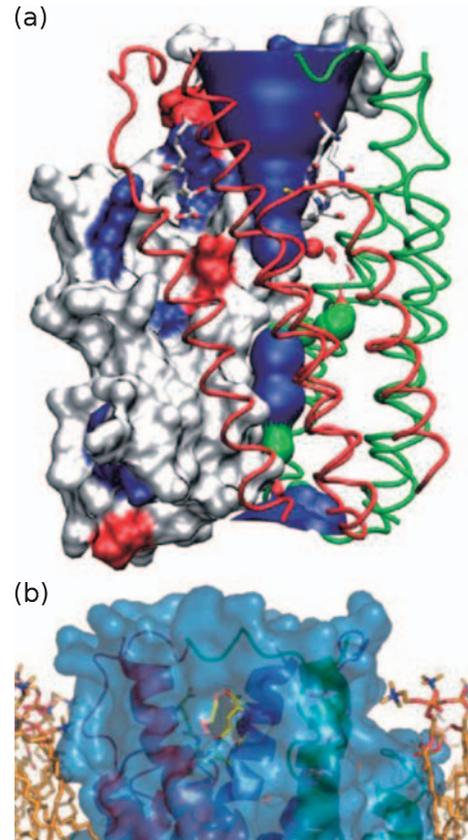


図4 MGST1の毒物結合部位
MGST1の予想される基質結合部位を示す。(a)は三量体の中央に存在する凹みを青い面で示している。基質結合部位をわかりやすくするため、三量体のうち二分子を主鎖のみのワイヤースケッチモデルで表示した。(b)は、グルタチオン結合部位から脂質頭部への開口を示している。

の基質が結合部位に来たときのみグルタチオンと反応できるように開くと考えられる。このように、二次元結晶を用いることで、天然に近い状態での構造を得ることができるので、その構造を容易に機能と関係づけることができたと思っている。

5. おわりに

膜タンパク質の構造を天然の機能と関係づける上で利点も多いと考えられる二次元結晶からの電子線結晶構造解析であるが、その方法が現状では膜タンパク質の構造解析において十分活用されているとは言えない。その主な理由は、上述した二次元結晶を用いるメリットが十分に知られていないこともあるが、それ以上に、結晶の確認のために、電子顕微鏡を用いて観察する必要があることが大きいと思う。しかし、電子顕微鏡を通常利用している研究者には、その制約は非常に小さく、また、最近では2 dx など解析のソフトウェアの整備も進められており¹⁰⁾、決して敷居の高い方法ではない。本講座を読んだ読者が、電子線結晶構造解析に興味を持って、機会があったら試してもらえれば、大変ありがたいと思う。

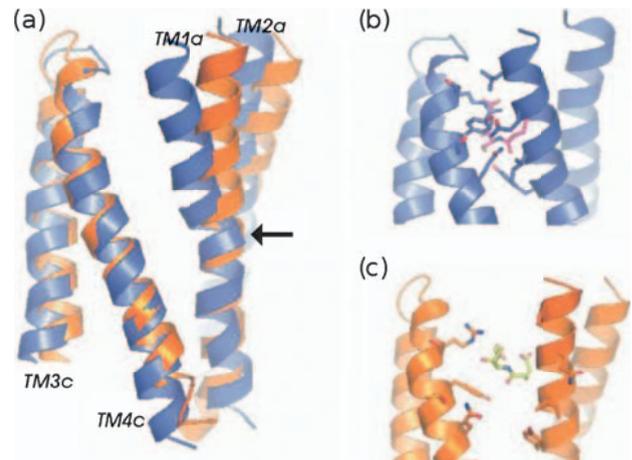


図5 MPGES1の基質結合部位
MPGES1の想定される基質結合部位を示す。青いモデルが今回得られたMPGES1の構造で、界面活性剤を結合したLTC₄Sの構造からのホモロジーモデルは赤で表示してある。(a)にその2つのリボンモデルの比較を、(b)に基質結合部位の閉じた構造の基質結合部分の拡大図を、(c)に予想される対応する部分の開いた構造を示した。

文 献

- 1) Engel, A., Fujiyoshi, Y., Gonen, T. and Walz, T.: *Curr Opin. Struct. Biol.*, Apr; **18**(2), 229–235 (2008)
- 2) Bresell, A., Weinander, R., Lundqvist, G., Raza, H., Shimoji, M., Sun, T.H., Balk, L., Wiklund, R., Eriksson, J., Jansson, C., Persson, B., Jakobsson, P.J. and Morgenstern, R.: *FEBS J.*, **272**, 1688–1703 (2005)
- 3) Samuelsson, B., Morgenstern, R. and Jakobsson, P.J.: *Pharmacol. Rev.*, **59**, 207–224 (2007)
- 4) Hirai, T., Murata, K., Mitsuoka, K., Kimura, Y. and Fujiyoshi, Y.: *J. Electron Microsc.*, **48**, 653–658 (1999)
- 5) Gyobu, N., Tani, K., Hiroaki, Y., Kamegawa, A., Mitsuoka, K. and Fujiyoshi, Y.: *J. Struct. Biol.*, **146**, 325–333 (2004)
- 6) Holm, P.J., Bhakat, P., Jegerschöld, C., Gyobu, N., Mitsuoka, K., Fujiyoshi, Y., Morgenstern, R. and Hebert, H.: *J. Mol. Biol.*, **360**, 934–945 (2006)
- 7) Jegerschöld, C., Pawelzik, S.C., Purhonen, P., Bhakat, P., Gheorghe, K.R., Gyobu, N., Mitsuoka, K., Morgenstern, R., Jakobsson, P.J. and Hebert, H.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 11110–11115 (2008)
- 8) Ago, H., Kanaoka, Y., Irikura, D., Lam, B.K., Shimamura, T., Austen, K.F. and Miyano, M.: *Nature*, **448**, 609–612 (2007)
- 9) Martinez-Molina, D., Wetterholm, A., Kohl, A., McCarthy, A.A., Niegowski, D., Ohlson, E., Hammarberg, T., Eshaghi, S., Haeggström, J.Z. and Nordlund, P.: *Nature*, **448**, 613–616 (2007)
- 10) Gipson, B., Zeng, X., Zhang, Z.Y. and Stahlberg, H.: *J. Struct. Biol.*, **157**, 64–72 (2007)