

《農芸化学奨励賞》



発生・分化に関わるペプチド・タンパク質の立体構造解析と構造・機能相関

東京大学大学院農学生命科学研究科応用生命化学専攻 助教授 永田 宏次

はじめに

アミノ酸配列が類似しているのに機能が異なるタンパク質の例は枚挙に暇がない。筆者は、細胞外および細胞内で情報伝達分子として機能しているタンパク質の立体構造を核磁気共鳴(NMR)法やX線回折法により決定し、同じファミリーに属しながら異なる機能を有するタンパク質の「アイデンティティ決定因子(特有な機能の発現に必須な構造要素)の特定」を行ってきた。本稿では、昆虫のインスリン様ペプチドボンビキシン(bombyxin)の構造・機能研究の成果を中心に述べる。

ボンビキシンは、昆虫の脱皮・変態を統御している前胸腺刺激ホルモン(PTTH)精製の過程で単離されたカイコ(*Bombyx mori*)の脳神経ペプチドで、無脊椎動物で見いだされた最初のインスリン様ペプチドである^{1),2)}。石崎・鈴木らは、カイコのPTTH精製の際、生物検定にカイコより飼育の容易な近縁種のエリサン(*Samia cynthia ricini*)を用いた。エリサンの除脳蛹にカイコの脳を移植したり、カイコの脳抽出液を注射したりすると、カイコと同様に成虫化が誘導されることから、カイコの脳ホルモンはエリサンに対しても有効であると判断されたためである。1982年に単離された活性物質ボンビキシンは、しかし予想に反し、カイコ脳由来であるにもかかわらず、エリサンに対してのみ活性を示し、カイコには効果がなかった³⁾。その後、石崎・鈴木らは、生物検定にカイコ除脳蛹を用いて、1987年にカイコPTTHの単離に成功した^{4),5)}。一次構造解析から、ボンビキシンは20残基のA鎖と28残基のB鎖、3対のジスルフィド結合により構成され、インスリン様の一次構造(ヒトインスリンとのアミノ酸相同性はA鎖50%、B鎖32%)を有することが明らかになり、無脊椎動物で初めて見いだされたインスリン様ペプチドとして脚光を浴びることとなった^{1),2)}。その後、海綿、貝、バッタやカイコ以外の蛾でも、インスリン様分子の存在が示されている。一方、カイコPTTHは、109アミノ酸残基のペプチド鎖のホモダイマーであり、シスチン・ノット成長因子族(NGF, TGF- β , PDGF-BBといった成長因子やhCG, LH, FSH, TSHといったホルモンを含む)に属することが明らかになった^{4),5)}。ボンビキシンとカイコPTTHは、それぞれエリサンとカイコの前胸腺における脱皮ホルモン(エクジステロイド)の生合成を促進するが、一次構造上の類似点がない点が興味深い。

ボンビキシンの化学合成

ボンビキシン-II(ボンビキシンの代表分子種)は、カイコの近縁種であるエリサンの除脳蛹1匹当たり0.5 ngを注射すること(血中濃度50 pM)で成虫化を誘導し、培養液中に取り出したエリサンの前胸腺に対しても10 pMで有意な前胸腺ホルモン放出促進を示す^{1)~3)}。ボンビキシン-IIとヒトインスリンは、40%のアミノ酸配列相同性と同一のジスルフィド架橋様式を有するが、両者間には交差活性が見られない。筆者は、ボン

ビキシンとインスリンの活性の違いを決定している構造要因を特定するため、立体構造未知であったボンビキシンの立体構造を決定し、両分子の構造を比較することを目的とした。

立体構造解析のためには、ミリグラム単位の精製試料が必要となる。カイコガの頭部100万個から約50マイクログラムしか得られないボンビキシンの大量調製を可能にするため、筆者は化学合成法を用いた。2本のポリペプチド鎖を固相法により伸長した後、複数種類のCys側鎖保護基の段階的除去により分子内の3本のジスルフィド結合を位置特異的に形成させる戦略である。筆者は最終段階のジスルフィド結合形成反応であるヨウ素酸化においてTrpの酸化的分解を抑える反応条件を見い出して本合成法を完成させ^{6),7)}、天然物と同等の活性を有する合成ボンビキシン-IIを92ミリグラム得ることに成功した。この合成法を利用すれば理論的にはいかなるアミノ酸配列を有するインスリン様ペプチドの合成も可能である。実際に20種類以上のボンビキシン類縁体の合成に成功した。例として、エリサン由来のボンビキシン様ペプチド(SBRP)のcDNA塩基配列情報をもとに化学合成したSBRP-A1, -B1は、エリサン除脳蛹1匹当たり50 ng, 10 ngの注射(血中濃度5 nM, 1 nM)により成虫化を誘導した⁸⁾。一方で、エリサンのカイコPTTH相同体は血中濃度5 pMの極低濃度で活性を示したため、SBRPがエリサン体内でPTTHとして機能している可能性は低い。

ボンビキシンのNMRによる立体構造解析

試料の大量調製により、ボンビキシンの立体構造解析が可能になった。NMRによる構造解析を成功するためには、ミリモル濃度(mM)単位の高濃度の試料溶液を調製する必要があった。ボンビキシン-IIは中性pHにおいて水や緩衝液に対する溶解性が低く、1 mM以上の溶液を調製することは困難であった。塩酸を添加しpHを2.0すると白濁が消え、溶液になったが、ボンビキシン-II分子が会合してNMRシグナルが広幅化しており、立体構造解析を行うに十分な質のNMRスペクトルではなかった。しかし、酢酸添加により会合が抑えられ、水(70%)/酢酸(30%)(pH 2.0)の溶媒条件下、4 mMボンビキシン-II溶液が質の高いNMRスペクトルを与え、かつ、1カ月以上安定であった。pH 6.8とpH 2.0とでボンビキシン-IIの円二色性スペクトル(200~250 nm)がほぼ一致したこと、および、pH 2.0で酢酸濃度を0, 10, 20, 30%と変化させても1次元プロトンNMRに顕著な変化が見られなかったことから、この溶媒条件のもとでボンビキシン-IIの本来の立体構造が保たれていると見なした。なお、ヒトインスリンの場合も、水(80%)/酢酸(20%)(pH 1.9)の溶媒条件下でのNMR構造解析から、結晶中のT状態とよく似た構造が得られていた⁹⁾。筆者は、ボンビキシン-IIの2次元プロトンNMRスペクトル(DQF-COSY, TOCSY, NOESY)を測定し、連鎖帰属法により観測可能な水素

原子のシグナルをすべて帰属した。核 Overhauser 効果 (NOE) 強度から得られた水素原子間距離制限 535 個とスピン-スピン結合定数から得られた二面角制限 (ϕ 22 個, χ 6 個) を用いて、制限分子動力学計算を行い、ボンビキシン-II の立体構造を決定した。ペプチド鎖末端部を除いて、10 個の構造の収束の割合を示す RMSD は、主鎖 3 原子 (N, C α , C') において 0.58 Å, 水素原子以外の全原子において 1.03 Å と、精密な立体構造を決定できた¹⁰⁾。ボンビキシン-II は脊椎動物のインスリン族ペプチドと同様に三つの α ヘリックスからなるコア構造を有しており、このコア構造は保存されている疎水性側鎖のクラスターにより安定化されていた (図 1)。興味深いことに、インスリンの活性発現に必須な B 鎖 C 末端領域に見られるターンおよび β ストランドが、ボンビキシンには見られず、代わりにリラキシン (精子の運動, 子宮筋弛緩, 恥骨結合部弛緩に関わるホルモン)¹¹⁾ と同様 B 鎖中央部のヘリックスが C 末端近くまで続いていた。本研究が無脊椎動物のインスリン族ペプチドの立体構造決定に関する最初の報告である。インスリンの X 線結晶構造解析の権威である Blundell らにより以前に提唱されていたボンビキシン-II の立体構造モデルでは、インスリン様 B 鎖 C 末端のターンおよび β ストランドをとるとされていたが¹²⁾、少なくとも溶液中ではそうではなかった。

ボンビキシンの活性部位の特定

筆者は、ボンビキシン-II とヒトインスリンのキメラ分子やボンビキシン-II の点変異体を多種類調製してその活性を評価した。その結果、A 鎖よりも B 鎖のアミノ酸残基の違いがボンビキシンとインスリンの活性の違いを決定すること、およびボンビキシンの活性発現に重要なアミノ酸残基群が B 鎖中央部および A 鎖末端部に存在することを明らかにした¹³⁾。こうして特定したボンビキシンの活性残基群は、立体構造上、ボンビキシン-II 分子表面の二つの領域に局在していた (図 2)。興味深いことに、この局在性は、インスリンの受容体認識に関わるアミノ酸残基群と分子表面分布^{14), 15)} と同様であり、両分子が立体構造のみならず機能部位の位置においても類似性を有することが明らかになった。ただし、B 鎖 C 末端部は例外で、インスリン

では受容体認識に必須で β ターン・ β ストランド構造をとるが、ボンビキシンの活性発現には必要なく α ヘリックス構造をとっており、構造的にも機能的にも極めて対照的であった。

おわりに

本稿では、筆者の主要な研究成果であるボンビキシンの構造と機能研究について記載した。最近、ボンビキシンが鱗翅目昆虫の翅成虫原基の成長因子として働くという報告がなされ¹⁶⁾、ボンビキシンの生理機能の一端が明らかになった。また線虫ではインスリン様ペプチドが寿命・休眠・脂質代謝・学習を制御していることが明らかにされており^{17)~20)}、無脊椎動物で見いだされたインスリン様ペプチドが脊椎動物のインスリン族ペプチドとは異なるさまざまな生理機能をもっていて興味深い。

生理活性物質の作用機構の解析は農芸化学の重要な分野の一つである。筆者は、ボンビキシン以外にもヘレグリン- α の EGF 様ドメイン²¹⁾、IGF-II²²⁾、ミッドカイン²³⁾、酸性 FGF (FGF-1)²⁴⁾、甲殻類脱皮抑制ホルモン (MIH)^{25), 26)} などの細胞外情報伝達物質、また Grb2 の SH3 ドメイン²⁷⁾、SH2 ドメイン²⁸⁾、Grb2 の SH3 ドメインと Vav SH3 ドメイン複合体^{29), 30)}、WW ド

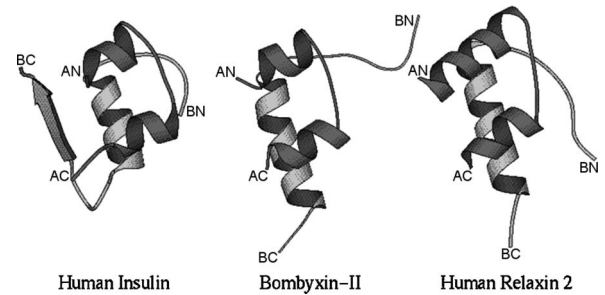


図 1 ボンビキシンの立体構造とヒトインスリンヒトリラキシンの立体構造との比較。濃灰色が A 鎖、薄灰色が B 鎖を示す。AN, AC は A 鎖の N 末端, C 末端。BN, BC は B 鎖の N 末端, C 末端。A 鎖はいずれの場合も逆並行の 2 本の α ヘリックスからなっていたが、B 鎖はインスリンのみ C 末端部にターンと β ストランドが見られ、ボンビキシンとリラキシンでは中央部ヘリックスが C 末端まで伸びていた。

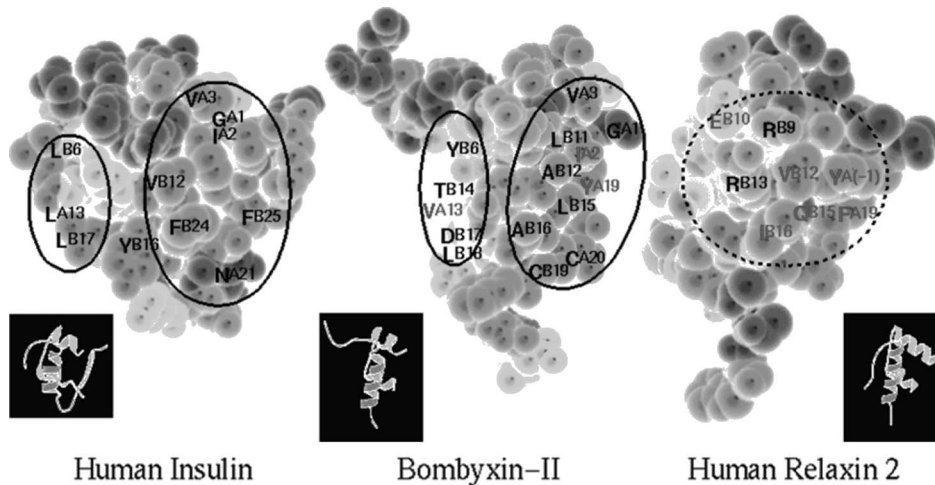


図 2 ボンビキシンの活性部位とインスリンの推定受容体結合部位の比較。ボンビキシンにおいて、楕円で囲われラベルされたアミノ酸残基が活性に重要であると示された。二つの活性部位の間にある 2 個の Arg 残基は活性に重要でなかった。ボンビキシンの活性部位は、インスリンの推定受容体認識部位と同様の分布をすることが明らかになった。ただし、インスリンでは、この図の右側の推定受容体結合部位を B 鎖 C 末端部の β ストランドが覆っており、ボンビキシンとは異なる性質の分子表面を形成していた。

メイン^{31)~33)}などの細胞内情報伝達物質についても構造と機能の解析に直接・間接的に取り組んできた。今後も積極的に生理活性タンパク質・ペプチドの立体構造に基づいた機能解析を進めていく。

しかし、上記のようにリガンド側だけをいくら詳細に解析しても、その作用機構の解明には限界がある。このような反省に立ち、筆者は、リガンドとその受容体膜タンパク質の複合体の立体構造決定を目的として、結晶化およびX線回折実験を開始した。ボンピキシン受容体候補タンパク質のcDNAも得られている³⁴⁾ので、機能が確定し次第、ボンピキシンと受容体の複合体の構造解析にも取り組んでいく所存である。リガンド-受容体複合体の立体構造を見ながら、生理活性タンパク質・ペプチドの活性発現に重要な構造要因を直接決定する—このことを何としても実現したいと考えている。

上記の研究は、東京大学大学院農学生命科学研究科応用生命化学専攻生物有機化学研究室(鈴木昭憲教授)、東京都臨床医学総合研究所生理活性物質研究部門(稲垣冬彦博士)、東京大学生物生産工学研究センター生物構造工学研究室(田之倉 優教授、山根久和教授)、東京大学大学院農学生命科学研究科応用生命化学専攻食品工学研究室(田之倉 優教授)にて行った。また、膜タンパク質の結晶化とX線結晶構造解析はUppsala UniversityとImperial College London(ともに岩田 想教授)にて習得させていただいた。ご指導・ご鞭撻いただきました鈴木昭憲先生、石崎宏矩先生、磯貝 彰先生、長澤寛道先生、片岡宏誌先生、作田庄平先生、中山二郎先生、稲垣冬彦先生、神田大輔先生、楯 真一先生、畠中秀樹先生、小椋賢治先生、田之倉 優先生、西山 真先生、山根久和先生、岩田 想先生、岩田茂美先生、Dr. Bernadette Byrneに心より御礼申し上げます。また多くの共同研究者の皆様にも深く感謝いたします。最後になりましたが、本奨励賞にご推薦いただきました日本農芸化学会関東支部長の太田明德先生に心より御礼申し上げます。

文 献

- 1) H. Nagasawa, H. Kataoka, A. Isogai, S. Tamura, A. Suzuki, H. Ishizaki, A. Mizoguchi, Y. Fujiwara, and A. Suzuki: *Science*, **226**, 1344-1345 (1984).
- 2) H. Nagasawa, H. Kataoka, Y. Hori, A. Isogai, S. Tamura, A. Suzuki, F. Guo, X. Zhong, A. Mizoguchi, M. Fujishita, S.Y. Takahashi, E. Ohnishi, and A. Suzuki: *Gen. Comp. Endocrinol.*, **53**, 143-152 (1984).
- 3) H. Nagasawa, H. Kataoka, A. Isogai, S. Tamura, A. Suzuki, A. Mizoguchi, Y. Fujiwara, A. Suzuki, S.Y. Takahashi, and H. Ishizaki: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **83**, 5840-5843 (1986).
- 4) H. Kataoka, H. Nagasawa, A. Isogai, S. Tamura, A. Mizoguchi, Y. Fujiwara, C. Suzuki, H. Ishizaki, and A. Suzuki: *Agric. Biol. Chem.*, **51**, 1067-1076 (1987).
- 5) A. Kawakami, M. Iwami, H. Nagasawa, A. Suzuki, and A. Suzuki: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **86**, 6843-6847 (1989).
- 6) K. Maruyama, K. Nagata, M. Tanaka, H. Nagasawa, A. Isogai, H. Ishizaki, and A. Suzuki: *J. Protein Chem.*, **11**, 1-12 (1992).
- 7) K. Nagata, K. Maruyama, H. Nagasawa, I. Urushibata, A. Isogai, H. Ishizaki, and A. Suzuki: *Peptides*, **13**, 653-662 (1992).
- 8) K. Nagata, K. Maruyama, K. Kojima, M. Yamamoto, M. Tanaka, H. Kataoka, H. Nagasawa, A. Isogai, H. Ishizaki, and A. Suzuki: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **266**, 575-578

- (1999).
- 9) Q. X. Hua, S. E. Shoelson, M. Kochoyan, and M. A. Weiss: *Nature*, **354**, 238-241 (1991).
- 10) K. Nagata, H. Hatanaka, D. Kohda, H. Kataoka, H. Nagasawa, A. Isogai, H. Ishizaki, A. Suzuki, and F. Inagaki: *J. Mol. Biol.*, **253**, 749-758 (1995).
- 11) C. Eigenbrot, M. Randal, C. Quan, J. Burnier, L. O'Connell, E. Rinderknecht, and A.A. Kossiakoff: *J. Mol. Biol.*, **221**, 15-21 (1991).
- 12) H. Jhoti, A. N. McLeod, T. L. Blundell, H. Ishizaki, H. Nagasawa, and A. Suzuki: *FEBS Lett.*, **219**, 419-425 (1987).
- 13) K. Nagata, H. Hatanaka, D. Kohda, H. Kataoka, H. Nagasawa, A. Isogai, H. Ishizaki, A. Suzuki, and F. Inagaki: *J. Mol. Biol.*, **253**, 759-770 (1995).
- 14) J. Murray-Rust, A. N. McLeod, T. L. Blundell, and S. P. Wood: *BioEssays*, **14**, 325-331 (1992).
- 15) L. Schäffer: *Eur. J. Biochem.*, **221**, 1127-1132 (1994).
- 16) H. F. Nijhout and L. W. Grunert: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **99**, 15446-15450 (2002).
- 17) K. D. Kimura, H. A. Tissenbaum, Y. Liu, and G. Ruvkun: *Science*, **277**, 942-946 (1997).
- 18) T. Kawano, R. Nagatomo, Y. Kimura, K. Gengyo-Ando, and S. Mitani: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **70**, 3084-3087 (2006).
- 19) S. Paradis, M. Ailion, A. Toker, J.H. Thomas, and G. Ruvkun: *Genes Dev.*, **13**, 1438-1452 (1999).
- 20) M. Tomioka, T. Adachi, H. Suzuki, H. Kunitomo, W. R. Schafer, and Y. Iino: *Neuron*, **51**, 613-625 (2006).
- 21) K. Nagata, D. Kohda, H. Hatanaka, S. Ichikawa, S. Matsuda, T. Yamamoto, A. Suzuki, and F. Inagaki: *EMBO J.*, **13**, 3517-3523 (1994).
- 22) H. Terasawa, D. Kohda, H. Hatanaka, K. Nagata, N. Higashihashi, H. Fujiwara, K. Sakano, and F. Inagaki: *EMBO J.*, **13**, 5590-5597 (1994).
- 23) W. Iwasaki, K. Nagata, H. Hatanaka, T. Inui, T. Kimura, T. Muramatsu, K. Yoshida, M. Tasumi, and F. Inagaki: *EMBO J.*, **16**, 6936-6946 (1997).
- 24) K. Ogura, K. Nagata, H. Hatanaka, H. Habuchi, K. Kimata, S. Tate, M. W. Ravera, M. Jaye, J. Schlessinger, and F. Inagaki: *J. Biomol. NMR*, **13**, 11-24 (1999).
- 25) H. Katayama, T. Ohira, K. Nagata, and H. Nagasawa: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **65**, 1832-1839 (2001).
- 26) H. Katayama, K. Nagata, T. Ohira, F. Yumoto, M. Tanokura, and H. Nagasawa: *J. Biol. Chem.*, **278**, 9620-9623 (2003).
- 27) H. Terasawa, D. Kohda, H. Hatanaka, S. Tsuchiya, K. Ogura, K. Nagata, S. Ishii, V. Mandiyan, A. Ullrich, J. Schlessinger, and F. Inagaki: *Nature Struct. Biol.*, **1**, 891-897 (1994).
- 28) S. Tsuchiya, K. Ogura, H. Hatanaka, K. Nagata, H. Terasawa, V. Mandiyan, J. Schlessinger, S. Aimoto, H. Ohta, and F. Inagaki: *J. Biochem.*, **125**, 1151-1159 (1999).
- 29) M. Nishida, K. Nagata, Y. Hachimori, M. Horiuchi, K. Ogura, V. Mandiyan, J. Schlessinger, and F. Inagaki: *EMBO J.*, **20**, 2995-3007 (2001).
- 30) K. Ogura, K. Nagata, M. Horiuchi, E. Ebisui, T. Hasuda, S. Yuzawa, M. Nishida, H. Hatanaka, and F. Inagaki: *J. Biomol. NMR*, **22**, 37-46 (2002).
- 31) Y. Kato, M. Ito, K. Kawai, K. Nagata, and M. Tanokura: *J. Biol. Chem.*, **277**, 10173-10177 (2002).
- 32) Y. Kato, K. Nagata, M. Takahashi, L. Lian, J. J. Herrero, M. Sudol, and M. Tanokura: *J. Biol. Chem.*, **279**, 31833-31841 (2004).
- 33) Y. Kato, Y. Hino, K. Nagata, and M. Tanokura: *Proteins*, **63**, 227-234 (2006).
- 34) M. Tanaka, H. Kataoka, Nagata, K., Nagasawa, H. and A. Suzuki: *Regul. Pept.*, **57**, 311-318 (1995).