

タンパク質複合体の溶液中解析を活かす測定試料前処理系の改良

小川覚之¹, 西條慎也², 清水伸隆², 蔣緒光¹, 廣川信隆¹

¹ 東京大学・大学院医学系研究科・細胞生物学解剖学／分子構造動態病態学講座

² 高エネルギー加速器研究機構 物質構造科学研究所

Improvement of Sample Preparation of Protein Complex for Analysis in Solution

Tadayuki OGAWA¹, Shinya SAIJO², Nobutaka SHIMIZU², Xuguang JIANG¹, and Nobutaka HIROKAWA¹

¹ Department of Cell Biology and Anatomy, University of Tokyo, Graduate School of Medicine,

² Photon Factory, Institute of Materials Structure Science, High Energy Accelerator Research Organization

Abstract

細胞の骨格である微小管は伸び縮み（重合・脱重合）が制御されており、この要となるタンパク質が KIF2 である。我々は KIF2 による微小管の脱重合がどのような秩序立った機構により駆動されているのか明らかにするため、脱重合反応の溶液中解析を行なった。我々はサイズ排除クロマトグラフィーの改良に加え、分子量を正確に求めるために多種測定法によるクロスチェックを行ない、効果的に X線小角散乱解析を行なうことができた。

1. はじめに

生命機能を支えるタンパク質は、その機能を細胞質中すなわち溶液中において発揮する。よってタンパク質が働く溶液環境においてその振る舞いを解析することは、基礎研究のみならず抗体医薬をはじめとする臨床研究においても極めて重要なことである。そこで本稿では、我々の研究室が対象とするタンパク質複合体試料を用いて、どのように溶液解析を進めたのか、測定に適した試料調整、測定法の選択や多種の測定法によるクロスチェックの重要性などについて PF ユーザー目線からレポートする。

2. 背景

我々の研究室では、細胞の骨格である微小管とそれに作用する分子モーターであるキネシンの機能や作動機構を研究対象とし、細胞内の物質輸送や細胞骨格制御の視点から神経細胞の機能メカニズムに迫る研究を進めてきた。微小

管はチューブリンという約 103kDa のヘテロ 2 量体が重合した管状の構造で (Fig. 1), 細胞内で細胞の骨格として、またキネシンなど物質輸送モーター分子のレールとして機能する。多くのキネシンは微小管に沿って荷物を運ぶ「運び屋モーター」である [1] が、KIF2 というキネシンはその微小管を端から脱重合する特異な活性をもつ「解体屋モーター」である [2]。微小管の重合・脱重合は神経細胞の突起伸長・退縮や細胞分裂における紡錘糸の短縮など生命の根幹となる反応であり、その制御機構の破綻は神経変性疾患や細胞分裂異常による癌の形成など多くの疾患の原因となる。しかし KIF2 による微小管の脱重合反応がどのような秩序立った機構により駆動されているのかについてはこれまで不明であった (Fig. 1)。そこで我々はこの機構を明らかにするために、脱重合反応溶液中の KIF2 とチューブリンの動態を詳細に解析した。

3. 測定試料の準備

微小管が正しく短くなる（脱重合）ためには管の途中ではなく「先端から」短くなる必要があり、しかもその反応は微小管に比べて「少数の」KIF2 によって「効率良く」進められる必要がある (Fig. 1)。我々はこれまで、KIF2 がチューブリンと結合しやすい表面構造を持っていること [2], 細胞内で KIF2 の微小管脱重合活性は各種キナーゼによる特異的な KIF2 の部位がリン酸化により活性が制御されチューブリンとのアフィニティーが変化すること [3] などを明らかにしてきた。そこで我々はまず、KIF2 とチューブリンのアフィニティー・複合体形成能について、サイズ排除クロマトグラフィー法 (SEC: Size Exclusion Chromatography) による解析を試みた。微小管の脱重合反

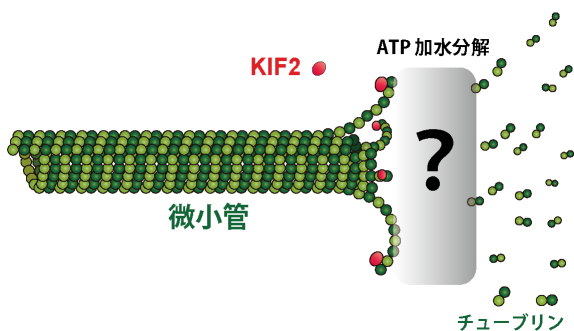


Figure 1 Microtubules (MTs) are dynamic polymer cytoskeletons that are composed of α - and β -tubulin dimers. KIF2 Catalytically Depolymerizes MTs from the peeled end.

応は KIF2 による ATP の加水分解を伴うことから、ATP 加水分解の各段階を模した ATP アナログを使用して脱重合途中の KIF2 とチューブリンの複合体をつくり、KIF2-チューブリン複合体のサイズ変化を調べた。はじめに広範囲の分画能を持つ汎用的な SEC カラム、Superdex 200 10/300 (GE healthcare) を用いた。SEC 上では分子サイズが大きくなると、ピークが左に（早い保持時間側に）シフトしてゆくが、カラム 1 本ではシフトしたピークが近接しており、分離が十分ではなかった (Fig. 2)。我々がこの実験に用いた KIF2 のモノドメインが 51 KDa、チューブリン 2 量体が 103 KDa であり、理論上その 1:1 複合体は 154 KDa、1:2 であれば 257 KDa、2:2 であれば 308 KDa の分子量をもつ計算になり、多様な分子種が近い領域に近接して分布する可能性がある。特に遷移状態で出現する大きな複合体のピーク (Fig. 2 中の赤色矢頭) には他のピークが重なってしまうため、カラム 1 本の分離能ではこれらを単分散試料として分取することができないことがわかった。一般に溶液散乱法によって分子サイズを決定するためには、その試料が単分散であることが必要であり、この分離条件ではその要求を満たす溶液試料を調整できないため、正確な測定ができないことになる。

そこで我々は Superdex 200 カラムを二本連結してカラムを長くし、分離能を高めることにした。一般にカラムを長くすると分離は良くなるのであるが、その反面カラム圧も高くなり、結果として分離に要する時間が長くなってしまふ。特にタンパク質複合体など不安定な構造や平衡関係にある試料の測定において、分離時間が長いことは分離自体や分離後の試料および測定に悪影響を及ぼす。しかし時を同じくして Superdex 200 Increase カラムの限界圧が 3.0 MPa まで向上したこともあり、カラムを 2 本連結しても通常のバッファーであれば 0.4 ml/min 程度の流速で分離ができる高分離 SEC システム (HiRes SEC) をつくることができた (Fig. 3, ピーク間が広がり、赤色矢頭のピークへの重なりが減った)。これによってカラムを 2 本連結した SEC のもとで試料の分離分解能は向上し、測定試料を現実的な時間内に単分散の集団に分離できるようになった。これは SEC による詳細な分析のみならず、試料の単分散性を要求する多角度光散乱 (MALS) 測定や X 線小角散乱

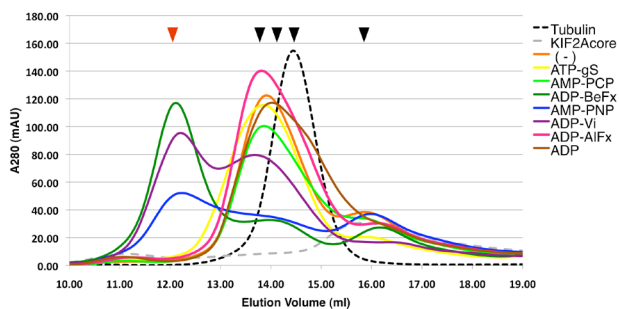


Figure 2 Size distribution of the KIF2-tubulin complex and its components in various nucleotide states, separated on a single Superdex 200 10/300 column.

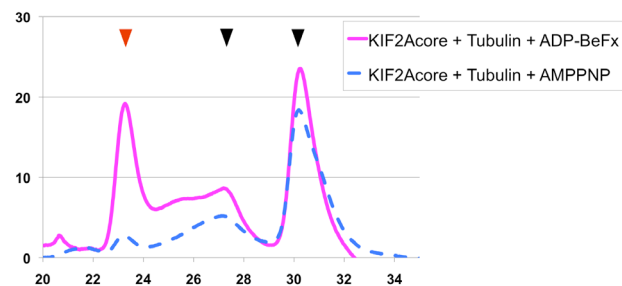


Figure 3 Size distribution of the KIF2-tubulin complex in transitional states, separated on tandem twin Superdex 200 Increase 10/300 columns (HiRes SEC).

(SAXS) 測定を続けて行なうことが可能になったことを意味する [4][10]。

4. X線小角散乱 (SAXS) 実験

X 線小角散乱 (SAXS) は慣性半径 (Rg) のみならず、正確な分子量情報と合わせることで溶液中での分子の概形を描出できるという強力な方法である。我々は当初、測定前日に分離・濃縮した試料を PF のビームラインに持ち込み、試料セル中で静的な X 線散乱を測定していた。しかし、我々の測定対象とする KIF2-チューブリン複合体は X 線による損傷を受けやすく、試料の溶液条件等の検討によっては大幅な改善は見られなかった。また、高い S/N データを取得するためには試料が高濃度である必要があるが、上述の通りチューブリンは重合能を持つ試料であり、過度な濃縮には耐えられないという問題もあった。そこで X 線による損傷を低減し、SEC で分離した単分散試料をそのまま X 線小角散乱測定に持ち込みたいという事情から、高分離 SEC (HiRes SEC) と SAXS 測定を直接つなぐ HiRes SEC-SAXS 測定に踏み切った。幸いなことに、ちょうど同時期に PF に新たに建設されたビームライン BL-15A2 において SEC-SAXS 測定が可能となり [5-6]、上述のカラム 2 本をビームラインに持ち込み、KIF2-チューブリン複合体の反応溶液をその場で HiRes SEC 分離しながら SAXS 測定することになった (Fig. 4) [4]。

ATP 加水分解の遷移状態アナログ ADP-BeFx の存在下で KIF2 とチューブリンの複合体を含む反応溶液 450 μ l を



Figure 4 HiRes SEC-SAXS system conducted at BL-15A2 beamline of Photon Factory.

KIF2- チューブリン複合体の構造

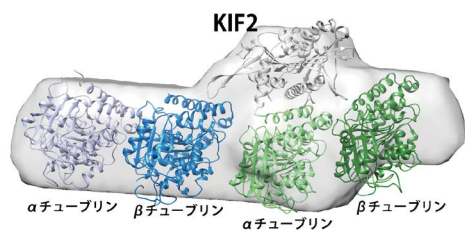


Figure 5 The transitional KIF2-tubulin complex in its pre-hydrolysis state.

カラムに添加し、流速 0.38 ml/min. で HiRes SEC 分離を始め、KIF2- チューブリン複合体の大きなピークが出るところで流速を 0.1 ml/min. へ下げ、1 枚 10 秒露光で X 線散乱データを連続的に取得した。測定波長は 1.213Å, ビームサイズ V 0.25 × H 0.35 mm, カメラ長 2567 mm, 温度 293 K の条件で測定した。ピーク後半はとりの小さなピークの裾を含む可能性があるため、ピーク前半のみを採用した。測定した散乱データは、ピーク付近を平均化したのち SAnGler[7] により処理した。慣性半径 (Rg) は 53.3 ± 0.7, Dmax は 203Å, 推定分子量 Mr (from Porod Vol.) は 214 KDa ± 20% と求められた [10]。距離分布関数 P(r) は GNOM[8] により求め、さらにダミーアトムモデル [9] を計算することにより複合体の概形を描出した。

SAXS 解析を進める上でのもうひとつ重要なポイントが「正しい分子量の決定」である。蛋白質の濃度・分子量を求める簡便な手法は様々であるが、目的溶液試料の単分散性を保証しつつ正確にその分子量を求めることは簡単なことではない。特に試料中に特定の波長を吸収する物質を含む場合や測定を妨げる添加物を含む場合などは正確な測定が一層困難になる。そこで、より確からしい分子量の値を得るために、原理的に異なる複数の手法による解のクロスチェックが有効となる。我々は高分離サイズ排除クロマトグラフィー (HiRes SEC) と接続した多角度静的光散乱法 (HiRes SEC-MALS) および X 線小角散乱法 (HiRes SEC-SAXS) に加えて、超遠心分析 (AUC) やクロスリンク質量分析法 (X-link MS) も併用することにより、分子量をより正確に求めることができた。これら多種法によりクロスチェックして決定した KIF2- チューブリン複合体の分子量は 257 KDa であり、これは KIF2 分子 1 個がチューブリン 2 量体 2 セットと結合していることを示している [10]。我々はこれらの正確な分子量情報に基づき、X 線小角散乱データの解析により KIF2- チューブリンの複合体の概形を描出することができた (Fig. 5) [10]。

5. X線結晶解析との融合

X 線小角散乱法により描出した KIF2- チューブリンの概形に、さらに別途 X 線結晶解析により決定した KIF2 の分子モデルを当てはめると、チューブリン 2 量体が 2 セット縦に連なった先のチューブリン上に KIF2 が配置すること

【微小管の脱重合の仕組み】

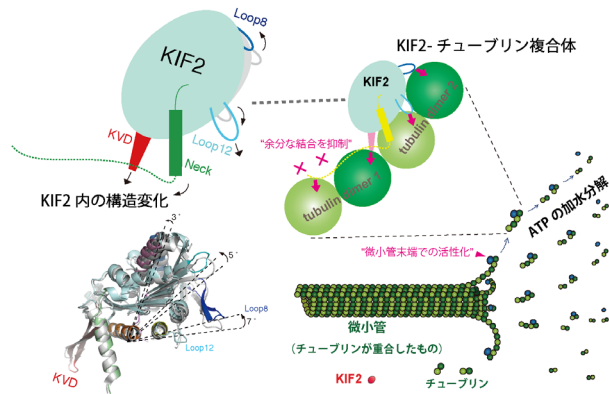


Figure 6 Model of catalytic microtubule depolymerization via KIF2. (This figure was modified from the previous paper by Ogawa et al. [10])

がわかった (Fig. 5) [10]。それではどのようにしてこのような 1:2 の複合体を効率良く作ることができるのか？我々は X 線結晶解析と X-link MS 解析をこの状態 (ADP-BeFx) の KIF2 に適用することにより、溶液中の 1:2 複合体を支える KIF2 の分子構造変化を調べた。微小管末端はチューブリンが縦に連なったプロトフィラメントが反り返った構造をとり、重合/脱重合の動的な平衡関係にあるが、KIF2 はその反り返った構造にフィットするような表面構造を持っており、微小管末端のプロトフィラメントとの結合により ATP の加水分解が始まり、KIF2 の表面は更に屈曲し、チューブリン表面と強く結合できる構造を示していた (Fig. 6)。さらに KIF2 の結合面のヘリックス末端がほどけてループ構造をとり、チューブリンとさらに強く結合できるようになっていた。また、KIF2 に特異的な Neck と呼ばれる構造が、とりのチューブリン 2 量体の表面に結合し、追加の KIF2 分子が結合することを阻害する配置をしていた。これらの構造が KIF2 ドメイン 1 個とチューブリン 2 量体 2 セットとの複合体形成を支えていることが示唆される (Fig. 6) [10]。

6. 生物学的意味

上述のように、KIF2 が微小管を脱重合する際に ATP を加水分解する遷移状態において KIF2 の機能ドメイン 1 つがチューブリン 2 量体を 2 セット捉えた 257 KDa の大きな複合体を形成することが溶液中解析によって明らかとなった。微小管が正しく脱重合するためには、それを構成する 13 本のプロトフィラメントが端から同時に脱重合しなければいけないが、これまでの研究から 1 本のプロトフィラメントの先端に 1 個の KIF2 分子しか結合しないという可能性が示されてきた。しかしその根拠となる構造はこれまで不明であり、今回明らかになった 1:2 複合体では、チューブリン 2 量体 2 セット上に KIF2 の結合部位が 2 カ所あるにも関わらず、先端の 1 カ所にしか KIF2 が結合できない。これは先に結合した KIF2 が、後から結合しようとする KIF2 をブロックして効率のよい配置をとっている為

だろう。また、これまで KIF2 は (KIF2: チューブリン 2 量体 =) 1:1 で結合すると考えられてきたが、興味深いことに実際は 1:2 で結合するため、従来考えられていたよりも働く KIF2 分子は半分で済み、消費する ATP も半分で済むことになる。以上のことから、KIF2 は少ない分子数で ATP を効率良く利用して働く、「省エネ解体モーター」であったといえる。

7. おわりに

X線小角散乱法は溶液中でのタンパク質の振る舞いを解析する重要な手法である。一方で上述のように、X線小角散乱法を効果的に利用した解析を進めるためには、対象分子の溶液中での基本的性質の理解に加え、正しい分子量の決定、試料の単分散性の保証が必須である。X線小角散乱ビームラインはこれからも高度化が進められ、より強い S/N データを取得できることが期待されるが、試料の前処理系の重要性は変わるものではない。測定系の高度化とともにより一層の試料調整技術の向上・高度化が求められる。

8. 謝辞

本研究は文部科学省科研費 (JP18002013, JP23000013, JP16H06372)、および 2017 年 3 月まで実施された創薬等支援技術基盤プラットフォーム事業 PDIS (現: 国立研究開発法人日本医療研究開発機構 (AMED) 創薬等ライフサイエンス研究支援基盤事業 BINDS) の支援を受けたものである。X線小角散乱解析は PDIS 課題 No.2048 のもと PF BL-15A2, BL-10C, BL-6A において測定実験を行い、X線結晶解析は PF 共同利用実験課題 No.2014G026, 2016G095 のもと PF BL-1A, BL-5A, BL-17A, AR-NW12A にて測定実験を行なった。関係各位に感謝申し上げます。

引用文献

- [1] N. Hirokawa, *Science* **279**, 519 (1998).
- [2] T. Ogawa, R. Nitta, Y. Okada, and N. Hirokawa, *Cell* **116**, 591 (2004).
- [3] T. Ogawa, and N. Hirokawa, *Cell Rep.* **12**, 1774 (2015).
- [4] T. Ogawa, and N. Hirokawa, *Biophys Rev.* (2018).
[Epub ahead of print] PMID: 29204883
- [5] N. Igarashi, N. Shimizu, A. Koyama, T. Mori, H. Ohta, Y. Niwa, H. Nitani, H. Abe, M. Nomura, T. Shioya, K. Tsuchiya and K. Ito, *J. Phys. Conf. Ser.* **425**, 072016 (2013)
- [6] P. Bernadó, N. Shimizu, G. Zaccari, H. Kamikubo, and M. Sugiyama, *Biochim Biophys Acta.* **1862**, 253 (2018).
- [7] N. Shimizu, K. Yatabe, Y. Nagatani, S. Saijyo, T. Kosuge, and N. Igarashi, *AIP Conf. Proc.* **1741**, 050017 (2016).
- [8] D.I. Svergun, *J Appl Crystallogr.* **25**, 495 (1992).
- [9] D.I. Svergun, *Biophys J.* **76**, 2879 (1999).
- [10] T. Ogawa, S. Saijo, N. Shimizu, X. Jiang, and N. Hirokawa, *Cell Rep.* **12**, 2626 (2017).

(原稿受付日: 2017 年 12 月 27 日)

著者紹介

小川覚之 Tadayuki OGAWA



東京大学大学院医学系研究科 助教
〒 113-0033 東京都文京区本郷 7-3-1 医学部教育研究棟 302
TEL: 03(5841)3336
FAX: 03(5689)4856
e-mail: tdyk@m.u-tokyo.ac.jp

略歴: 2001 年 3 月 ICU 教養学部卒, 東京大学大学院医学系研究科博士課程を経て, 2006 年 4 月より同医学系研究科細胞生物学解剖学教室助教。博士 (医学)。

最近の研究: タンパク質複合体解析・生体分子のシグナル伝達修飾解析。

西條慎也 Shinya SAIJO

物質構造科学研究所 特任助教 (研究当時)

〒 305-0801 茨城県つくば市大穂

TEL: 029-864-5635

FAX: 029-864-2801

清水伸隆 Nobutaka SHIMIZU

物質構造科学研究所 准教授

TEL: 029-864-5595

FAX: 029-864-2801

e-mail: nobutaka.shimizu@kek.jp

蔣緒光 Xuguang JIANG

東京大学大学院医学系研究科 博士課程 1 年

〒 113-0033 東京都文京区本郷 7-3-1 医学部教育研究棟 302

TEL: 03(5841)3336

FAX: 03(5689)4856

廣川信隆 Nobutaka HIROKAWA

東京大学大学院医学系研究科 特任教授

〒 113-0033 東京都文京区本郷 7-3-1 医学部教育研究棟 302

TEL: 03(5841)3336

FAX: 03(5689)4856