

「生命活動のプログラム」
平成9年度採択研究代表者

稲垣 冬彦

(北海道大学大学院薬学研究科 教授)

「構造生物学に基づくシグナル伝達系の解明とその制御」

1. 研究実施の概要

シグナル伝達蛋白質に含まれる機能ドメインおよび機能ドメイン複合体の立体構造を明らかにし、ドメイン相互の認識機構を立体構造に基づいて解明する。ついで、立体構造解析の知見に基づき、ドメインを基盤としたシグナル伝達蛋白質の機能改変技術としてドメイン工学を確立する。ドメイン工学には、ドメインの同定と新規ドメインの構造解析が必要である。平成10年度には、①プロテアーゼ限定分解によるドメインの切り詰め、②ランダムオリゴを用いたドメインの同定について検討した。また③SH3によるシグナル制御機構としてのリガンド交換を構造生物学的に明らかにした。④新規シグナル伝達蛋白質の作製を目的とし、蛋白質スプライシング反応を用いて、ドメインの組継ぎを行う事を検討した。モデル系に適用した結果、スプライシング反応により、新規シグナル伝達蛋白質が作られていることが明らかとなった。以上、ドメイン工学確立のために、基礎的な検討を行った。本研究はシグナル伝達ばかりでなく、工学的な応用を行う上でも興味深い。

2. 研究実施内容

(1) 分子内、分子間における SH3 リガンド交換の検討—Vav nSH3, Grb2 cSH3 を例として—

Vav nSH3 は自分自身の配列にプロリンに富む配列 (PRR) を含み、他の SH3 ドメインと比較してアミノ酸配列の相同性は低い。Vav nSH3 には Grb2 cSH3 が結合することが知られており、SH3 ドメイン同士の相互作用として唯一知られている例である。Vav nSH3 の NMR スペクトルの特徴は約 2 : 1 の存在比で2つのコンホマーが共存している点である。NMR 解析から、2つのコンホマーは PRR よりも4残基ほど C 末端側に位置する Gly32 と Pro33 のあいだのイミド結合のシーストランス異性に関連し、トランス型が主なコンホマーであることがわかった。いずれのコンホマーも Vav nSH3 単独では、PRR をくわえ込んでいる。Grb2 cSH3 を加えていくと、Vav nSH3 のシス、トランスの成分比率はトランス側に大きくシフトした。両者が結合した状態では、Vav nSH3 の Pro33 はトランス型を取るこ

とが NMR 解析より明らかになった。以上の実験は次の 2 点を示唆している点で興味深い。まず第 1 に、PRR が分子内で SH3 に結合していることである。このことはリガンド交換によるシグナル伝達の制御の可能性を示している事、第 2 として、特定の標的蛋白質は特定のコンフォメーションのみに結合することである。これらはシグナル伝達の制御機構として働いている可能性が高い。第 1 の点について Grb2 cSH3 に弱く結合する VPP ペプチドと cSH3 の融合蛋白について検討した。融合した結果、分子内で cSH3 は VPP ペプチドを結合しているが、より強いリガンドの存在下ではリガンド交換によりはずれ強い結合能を持つペプチドが結合する。

cSH3 によるシグナル制御としてこの様な分子内一分子間のリガンド交換機構が使われている可能性は高い。

(2) Grb2 の動的構造と機能

Grb2 の各機能ドメインの構造および、標的配列、標的ドメインの認識機構について明らかにしてきた。Grb2 は Sos 以外にもダイナミン、N-WASP、シナプシン等多くの標的タンパク質と結合するが、Grb2 の持つ生物学的な機能を理解するためにも、インタクトな Grb2 の構造と動的な挙動を明らかにすることは重要である。我々は、水溶液中における Grb2 の動的挙動を明らかにするために、NMR 緩和実験並びに X 線小角散乱の実験を行った。全重水素化 Grb2 を調製し、主鎖の NMR シグナルの帰属を行うと共に、 ^{15}N 核の緩和時間および NOE の解析を行い、Grb2 の運動性について検討した。その結果、リンカー部分の運動性は他の部位と比較して高いことが明らかとなった。最近報告された X 線結晶構造によれば、リンカー部分の温度因子は小さく、結晶中ではリンカー部分の運動性は低いことが報告されている。X 線小角散乱の結果によれば、Grb2 は 80 オングストローム程度までの広い距離分布をとり、Grb2 の結晶構造から計算される距離分布 (60 オングストローム程度) とは全く異なっている。緩和実験および X 線小角散乱の結果は、結晶構造と異なり溶液中では Grb2 の SH2 と SH3 の間のリンカーは運動性に富み、Grb2 分子内で nSH3、cSH3 は種々の相対配置を取りうることを示している。モデル計算によれば X 線小角散乱から求められる距離分布は Grb2 が取りうる構造のアンサンブル平均として説明することができる。Grb2 のフレキシブルな構造は次の点で、標的タンパク質の有利に働くと考えられる。① Grb2 が nSH3、cSH3 の 2 価で標的蛋白質の PRR と結合することにより、タイトな結合が可能となる。② SH2 を介して標的タンパク質に結合した Grb2 の周りに他の標的タンパク質を効率よく集める事ができる。③ SH2 を介して結合した Grb2 の SH3 が SH2 結合部位とは空間的に離れた部位に結合し活性を制御することが可能となる。以上の結果は、Grb2 の結晶構造と溶液構造は異なること、生理機能を理解するためには、溶液構造情報が不可欠であることを示している。

(3) ドメイン工学

Grb2 の構造生物学的研究を行ってきた過程で、我々は、シグナル伝達タンパク質は比較的独立した機能かつ構造ドメインより構成されること、シグナル伝達タンパク質に含まれる機能ドメインの分子内、分子間の相互認識によりその機能は制御されている可能性を見いだしてきた。そこで、シグナル伝達に関わる機能ドメインの構造を明らかにすると共に、これらの機能ドメインと標的配列（標的ドメイン）を組み合わせることで人為的にシグナル伝達を制御する技術を開発することを目的とし、この基盤技術をドメイン工学と名付けた。ドメイン工学では、①構造ドメインを同定するための一般的な戦略、②同定された新規ドメインの構造と標的配列の認識機構の解明、③構造ドメインや標的配列を任意につなぎ合わせる技術、④新規シグナル伝達タンパク質の機能解析が必須技術となる。我々はこれらの課題について以下の検討を行っている。

①従来は配列比較より機能ドメインが同定されてきたが、同定された機能ドメインは必ずしも構造ドメインに対応していない。そこで、インタクトなタンパク質を用い、プロテアーゼによる限定分解と TOF/MS 分析と組み合わせることで構造ドメインの同定を行なう必要がある。我々はこの方法を細胞増殖を抑制するタンパク質 BTG2 に適用した結果、133 残基よりなる構造ドメインを同定した。このドメインは BTG ファミリーに共通する保存配列を含み、BTG2 結合タンパク質である CAF1 とタイトな複合体を形成することを確認した。また、Grb2 の下流にあり、細胞骨格の制御に関わっている N-WASP についてはランダムオリゴライブラリーを利用したドメイン同定の検討を行っている。②好中球の活性酸素発生系に含まれるタンパク質同士の相互作用により、活性酸素発生は厳密に制御されている。我々は、これらのタンパク質に見いだされた新規ドメイン PB1、PC モチーフについて構造解析を行い相互の認識機構を明らかにした。PB1 の保存されたリジン残基はクラスターを形成し、PC の酸性残基と相互作用を行っている。新規ドメインはドメイン工学の機能素子として用いることができる点で、その立体構造解析は重要な意義を持つ。現在、Phox 系に含まれる他のタンパク質のドメインについても構造解析を進めている。③好熱菌のインテインによるタンパク質スプライシング反応を利用して構造ドメインの組継ぎを行うことを試みた。モデル系として、N 末に Sos 由来のペプチドを含む N 端側インテインと C 末に Grb2 cSH3 を含む C 端側インテインを発現し、トランスでスプライシング反応を行った。尿素による可溶化後、巻き戻しを行った結果、50% 程度の収率で目的とする組継ぎタンパク質が得られた。シスのスプライシング反応の場合には、大腸菌内でスプライシング反応を受け、目的タンパク質が作られていた。今後は収率を高める必要がある。

3. 主な研究成果の発表 (論文発表)

- Ichikawa, S., Hatanaka, H., Yuuki, T., Iwamoto, N., Kojima, S., Nishiyama, C., Ogura, K., Okumura, Y. and Inagaki, F. : Solution Structure of Derf 2, the major mite allergen for atopic diseases. *J. Biol. Chem.*, 273, 356-360, 1998
- Abe, Y., Odaka, M., Inagaki, F., Lax, I., Schlessinger, J. and Kohda, D.: Disulfide bond structure of human epidermal growth factor receptor. *J. Biol. Chem.*, 273, 11150-11157, 1998
- Akhter, S., Ichihara-Tanaka, K., Kojima, S., Muramatsu, H., Inui, T., Kimura, T., Kaneda, N., Talukder, H. A., Kadomatsu, K., Inagaki, F. and Muramatsu T. : Clusters of basic amino acids in midkine: Roles in neurite-promoting activity and plasminogen activator-enhancing activity. *J. Biochem.* 123, 1127-1136, 1998
- Ogura, K., Nagata, K., Hatanaka, H., Habuchi, H., Kimata, K., Tate, S., Ravera, W.M., Jaye, M., Schlessinger, J. and Inagaki, F. : Solution structure of human acidic fibroblast growth factor and interaction with heparin-derived hexasaccharide. *J. Biomol. NMR*, 13, 11-24, 1998
- Tsuchiya, S., Ogura, K., Hatanaka, H., Nagata, K., Terasawa, H., Mandiyan, V., Schlessinger, J., Aimoto, S., Ohta, H. and Inagaki, F. : Solution structure of the SH2 domain of Grb2/Ash complexed with EGF receptor-derived phosphotyrosine-containing peptide. *J. Biochem.*, 125, 1151-1159, 1999.
- Ogura, K., Tsuchiya, S., Terasawa, H., Yuzawa, S., Hatanaka, H., Mandiyan, V., Schlessinger, J. and Inagaki, F.: Solution structure of the SH2 domain of Grb2 complexed with the She-derived phosphotyrosine-containing peptide. *J. Mol. Biol.*, 289, 439-445, 1999