

「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

(1)シグナル伝達蛋白質の機能ドメインの構造決定、(2)シグナル伝達蛋白質の制御機構の解明、(3)ドメイン工学に基づく人為的シグナル制御について研究を行った。対象としては、Grb2、N-WASP、Bem1p、Cdc24p、好中球活性酸素発生系を取り上げ、制御機構を明らかにするとともに、(4)機能ドメインを素子とした機能蛋白質の設計を行った。また、(5)X線結晶構造解析法を当研究室に導入し、Tob-Caf 複合体、IRF-3 の活性化ドメイン、精子形成関連タンパク質 DJ-1 の立体構造を決定した。

2. 研究実施内容

I. シグナル伝達系の解明とその制御

シグナル伝達蛋白質の特徴は多くの機能ドメインより構成されていること、分子内あるいは分子間の制御によりシグナル伝達のスイッチのオン、オフが行われている点である。我々は、機能ドメインの立体構造を NMR 法、X線結晶構造解析法で明らかにするとともに、制御機構を解明し、シグナルを人為的に制御する技術を開発する事を目的として以下の研究を行った。

(1) 新規 PB1ドメインとPCモチーフの構造と相互認識

シグナル伝達蛋白質に多く見いだされる PC モチーフの結合相手として、新規ドメイン PB1 を新たに同定した。PB1ドメインは酵母の極性決定に含まれる Bem1p や好中球活性酸素発生系に見られる p67^{phox}、動物細胞の極性を決定する PAR に、PC モチーフは Cdc24、p40^{phox}、aPKC 等の蛋白質に含まれており、これらのドメイン間の相互作用の特異性は高い。平成12年度に Bem1p に含まれる PB1ドメインの立体構造を NMR により決定し、ユビキチンフォールドを持つことを明らかにした。平成 13 年度は、PC モチーフを含む領域(PCCR)の立体構造をNMR法により決定した。PCCR はユビキチン様の構造をとること、PC モチーフは β ヘアピンと α ヘリックス構造よりなり、ユビキチン骨格の上に提示されていた。当初、N末端部分を欠いたコンストラクトを用いて構造解析を行っていたが、短いものでも、PB1 ドメインに高親和性を持って結合すること、長いコンストラクト同様に PC-モチーフを提示していることが明らかとなった。ユビキチン骨格は安定な骨格構造をとりうるフォールドであること、ユビキチン骨格の挿入配列は特異的な立体構造を形成して提示されていること、このような特異的な構造をたんぱく質相互の認識に利用していることが示唆された。実際、PC モチ

ーフは変異実験の結果より、PB1ドメインとの相互作用部位であることが証明された。以上より、PB1ドメイン、PCCR はともにユビキチンフォールドを持ち、PC モチーフの有無により二つのタイプに分類分けされることがわかった。二つのドメインを統合して、PB1ファミリーとして分類した。また、aPKCとPAR-6相互のPB1-PCモチーフ間の相互認識について検討している。PB1-PCモチーフの相互作用は特異性が高く、この原因を相互認識の立場より明らかにする。

(2) 好中球活性酸素発生系の制御機構の解明

好中球活性酸素発生系では膜蛋白質である gp91^{phox}、p22^{phox} に細胞質因子である p47^{phox}、p67^{phox}、p40^{phox} 複合体及び Rac が結合することにより活性酸素が発生される。このような好中球の活性酸素発生は、殺菌作用に不可欠である。細胞質因子は SH3、PB1、PB2、TPR、PB1、PC のドメインから構成されており、これらのドメイン間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。好中球活性酸素発生系はドメイン間の相互作用による制御システムのパラダイムとみなすことができる。稲垣グループは住本グループとの共同により、細胞質因子に含まれるドメイン間の相互作用および制御機構を解明し、ドメインにもとづいた新しい機能蛋白質を設計することを目的として研究を展開している。

活性酸素発生には、p67^{phox}TPRモチーフとRacの結合、p47^{phox}のタンデムSH3がマスクされた状態から刺激に応じてリン酸化されアンマスクの状態になること、アンマスク状態のSH3にp22^{phox}のPRRが結合することが必要であることが示されている。従って、好中球活性酸素発生系の活性化プロセスを明らかにするには、マスクーアンマスクの過程、およびp47^{phox}のSH3とp22^{phox}のPRRとの結合の過程を明らかにすることが必要である。そのために、以下の項目について研究を行った。

① p47^{phox}のマスク、アンマスク機構の解明

p47^{phox}は休止状態では(SH3)₂は分子内でSH3-PRRに結合した状態となっており、p22^{phox}のPRRに結合できない。貪食刺激により、PLaseA2によるアラキドン酸の生成やPKCによるリン酸化により分子内のSH3-PRR結合がはがれ、p22^{phox}のPRRと結合することが示唆されている。そこで、マスク状態を取れる最小単位(151-340)について検討を行った。現在、主鎖帰属が終了し、側鎖帰属に進んでいる。マスク状態をとれないコンストラクト(152-286)と比較すると、化学シフトは大きく異なり、マスク状態を取っていることを示している。並行してX線小角散乱の測定を行い、(151-340)がコンパクトな形状を取ることを明らかにした。今後、NMR法により立体構造を決定し、マスク状態について明らかにする。

② p47^{phox}タンデムSH3(151-286)とp22^{phox}PRRとの結合様式

(151-286)についてNMRの測定を行い、立体構造を検討した。SH3はp22^{phox}PRRの存在しない状態ではタンデムSH3相互を結びつけるリンカーはフレキシブルであることが明らかとなった。PRRについては当初、PRR領域を含む10残基程度のペプチドを用いて滴定実験を行ったが、(151-286)は会合しやすくNMR測定は出来なかった。そこで、C末端側に10残基程度伸ばし、RRk配列を含めたペプチドで滴定を行った結果、会合は生じず、良好なスペクトルを得た。複合体系性により、リンカー部分の柔軟性はなくなり、二つのSH3が協調的にPRRを認識してい

ることが明らかとなった。複合体の構造決定を行い、好中球活性酸素発生系の最も重要な認識過程を明らかにする。

③ TPR と Rac の結合様式

TPR は p67^{phox} の N 端部分に存在する。活性化 Rac との結合が好中球活性酸素発生系の活性化に不可欠である。我々は、TPR(1-203) の構造を X 線結晶構造解析を用いて決定すると共に、Rac との相互作用を NMR を用いて検討した。TPR(1-203) は TPR モチーフが 4 回繰り返されたヘリックスに富む構造を取り、挿入配列部分は β ヘアピン構造を取り、C 末端テールは TPR の裏打ちとして、強く結合すると共に、186-193 部分は α ヘリックスを取っていた。活性化 Rac との結合を調べた結果、 β ヘアピン、N 末端ループ部分、C 末端ヘリックスを中心として大きな化学シフト変化が観測された。TPR-Rac 複合体については X 線結晶構造解析により解かれているが、結晶化条件が pH10.5 と高く、必ずしも、今回得られた化学シフト変化とは対応していない。高 pH 条件による結晶化のアーチファクトの可能性も高く、現在検討中である。

④ p67^{phox} PB1 ドメインと p40^{phox} PC モチーフの構造と相互認識

PB1 ドメインと PC モチーフは好中球活性酸素発生系においても重要な分子間相互作用を担っている。現在、発現系および精製系の構築が終了し、ラベル体の作成を行った。主鎖帰属を進めており、今後、これらのドメイン間の相互認識の特異性を明らかにする予定である。

II. ドメインを利用した新規タンパク質の設計

p67^{phox} TPR モチーフと p47^{phox} タンデム SH3 ドメインを融合させた新規蛋白質を設計し、活性酸素発生能を測定した。Rac 存在下で融合蛋白質は、アラキドン酸刺激無しに活性な構造を取り、フルの活性酸素を発生した。ドメインの融合により新しい蛋白質が作られたといえる。この系を用い、シグナル制御機構を含んだ新しい蛋白質のデザインを行っている。また、活性測定のために、豚好中球より cyt b558 を精製し、無細胞系を用いた活性酸素発生能測定システムを作った。

(1) 好中球活性酸素発生系最小単位の作成とドメイン工学的研究

好中球活性酸素発生には p47^{phox} のタンデム SH3 が p22^{phox} の PRR と結合すること、p67^{phox} の TPR と Rac が結合することが必須である。そこで、TPR とタンデム SH3 を融合したタンパク質を新規に設計した。この融合タンパク質はアラキドン酸やリン酸化制御を受けずにフルの活性を有することが明らかとなった。更に活性化機構を明らかにするために、TPR と SH3 を結ぶリンカーの長さを変えて活性を測定し、活性化に必要な複合体における TPR-SH3 ドメイン間の距離を測定した。

(2) chemical ligation を用いた蛋白質の組継ぎ反応

翻訳後修飾を受けている蛋白質の調製は、大腸菌を用いた発現系では困難である。我々は相本博士(蛋白質研)との共同で、リン酸化蛋白質の一般的な調製方法として chemical ligation を用いた。Dixon 反応を用い、N 末端を活性化した大腸菌による発現蛋白質を、化学合成により調製したリン酸化ペプチドの C 末端に Ag-チオエステル法を用いて組継ぎを行った。¹⁵N ラベルを行った MAX の LZ を大腸菌を用いて発現し、N 末端部位をリン酸化したペプチドを組み継ぎ反応を用いて融合した。フィルター実験により、組み継ぎしたリン酸化ペプチドのシグナルの帰属を行った。この

方法が、リン酸化タンパク質の一般的な作製方法になることが期待される。

III. X線結晶構造解析による蛋白質の機能、構造研究

CREST 研究として、あらたにX線結晶構造解析を当研究室に立ち上げた。NMRとX線結晶構造解析を共に行うことにより、シグナル伝達タンパク質の構造についてより深い理解を得ることが期待されるからである。特に試料調製について検討を行い、単結晶の作製を行ってきた。特に、平成13年度にコンフォーカルミラーを導入したことにより、これまで測定できなかった100ミクロン以下の単結晶についても良好な反射を得ることが出来、放射光施設を用いなくとも、構造解析を行えるようになったことは大きな収穫であった。コンフォーカルミラーを用いた測定を行うことにより、実験室の開設系がフル稼働となり、当研究室の実験技術面での改善を大幅に行うことが出来た。以下、現在得られているX線結晶構造解析の結果を列挙する。

(1) Tob-Caf 複合体の立体構造解析

BTG ファミリーは新規な細胞増殖抑制蛋白質であり、ほ乳類では BTG1、BTG2/Tis21/PC3、BTG3/Tob5、Tob、Tob2 及び Ana の存在が確認されている。BTG ファミリーによる細胞増殖抑制シグナルの伝達経路はまだ完全に解明されていないが、現時点において CCR4-associated factor 1 (Caf1)、HoxB9 及び Smad1 の 3 種類の蛋白質との特異的な相互作用が報告されている。いずれの蛋白質も核内転写因子であることから、BTG ファミリーは転写因子群と相互作用することで、細胞増殖を抑制していることが予想されている。稲垣グループは Tob 及び BTG2 を複数のプロテアーゼにより分解し、プロテアーゼ耐性をもつ構造ドメイン領域の探索を行った。その結果、約 130 アミノ酸残基からなる BTG ファミリーのホモロジー領域をプロテアーゼ耐性領域として分離することに成功した。得られた Tob または BTG2 の構造ドメイン領域を Caf1 とともに大腸菌内で共発現させたところ、いずれも複合体を形成していた。平成13年度には、これらの詳細な相互作用様式を X 線結晶構造解析により検討した。Tob-Caf1 複合体に関しては、結晶化条件の検討を進めた結果、良好な回折像を得ることが出来た。又、重原子をソークして、重原子同型置換体の作成を進めた。Hg、Nd を始めいくつかの重原子がソークされた結晶を得た。SPring-8 および高エネルギー研究センターの放射光施設の結晶回折系を用いて測定を行った結果、位相を決定する事が出来た。現在、2.5 オングストロームの電子密度が得られており、Tob-Caf 複合体の構造の精密化が進んでいる。Caf は polyA テールの分解酵素である事が示唆されていたが、実際、正電荷に富むクレフトを有すること、このクレフトには、4個の酸性残基が2個の Mg を配位していることが明らかとなった。これらは、Caf がこれまでに報告されている RNase H 等の分解酵素と良く似た活性部位を形成していることを示している。興味ぶかい事に、Tob はこのクレフトの一部を形成しており、Tob との複合体系性は、polyA テールの認識および Caf の酵素活性に寄与している可能性が示唆された。

(2) IRF-3 活性化ドメインの立体構造

IRF-3 はインターフェロン刺激による細胞の抗ウイルス作用発現のために必須なタンパク質である。IRFRE に結合する DNA 結合ドメインと転写活性を高めるための活性化ドメインに分けることが出来る。我々は IRF-3 について、トリプシンによる限定分解を行った結果、活性化ドメイン

(IRF-C175)が切り出されることを明らかにした。そこで、IRF-C175 について大腸菌による発現系の作製を試みたが、不溶性画分しか得られなかった。そこで、GroEL を共発現させたところ、可溶性画分にIRF-C175を発現することが出来、大量発現、精製法を確立した。平成13年度はIRF-C175 について、結晶化を行い、良好な単結晶を得た。重原子同型置換体、Se-Met 体等を作製した。又、native 体については、SPring-8 の放射光施設を用い、2.3 オングストロームの良好な回折像を得た。重原子同型置換法により位相を決定し、電子密度を得た。現在、精密化を行っているが、驚くべきことに、IRF-3 の活性化ドメインは SMAD と配列の相同性はないものの、同じ構造をとっていることが分かった。IRF-3 による活性化機構を知る手がかりが得られたと考えている。今後、変異体作製を行い、機能面での役割を解明する予定である。

(3) 精子形成関連タンパク質 DJ-1 の立体構造決定

DJ-1 は精子の熟成に伴い、精子頭部に濃縮されること、DJ-1 抗体は受精を阻害することが知られている。又、アンドロゲンレセプターの負の制御因子である PIASX と結合することにより、アンドロゲンレセプターの抑制を解除する。平成12年度には、DJ-1 の結晶化を行った。限定分解を行った結果、N端側9残基はフレキシブルな構造をとることがわかった。そこで、トリプシンによる限定分解を行い、これらの余分の残基を取り除き、結晶化を行った結果、良好な結晶を得ることが出来、1.8 オングストロームまでの反射を得、構造解析を行った。興味深いことに、DJ-1 は二量体を形成していること、二量体形成に必要な残基に変異を加えると、構造をとり得ないことが分かった。DJ-1 は二量体として存在し、二量体が活性な構造をとることが示唆された。興味ぶかい事に、DJ-1は原核生物のシステインプロテアーゼと配列的にも、構造的にもよく似ていることが分かった。受精時における DJ-1 の役割について今後解明する。

IV.新規 NMR 技術の開発

NMR により、タンパク質の立体構造解析を行う場合には、シグナル帰属を行うことが必須である。しかし、シグナル帰属の過程は、多くのスペクトルより必要な情報を出すことが必要であり、熟練を要する過程である。また、ほかの人間が行った帰属過程をシェアすることは通常不可能であり、帰属の精度は個人の能力に依存するが多かった。これらの難点を克服すること、初心者でも熟練者同様に精度の高い帰属を行えるシステムを開発する必要があった。今回、この目的のために Olivia を開発した。Olivia では、帰属過程をログとして残しているため、後から帰属過程を追うことができること、他人の帰属を再現することができる点で画期的なプログラムである。現在、卒業研究生を対象として Olivia によるシグナル帰属を行っているが、短期間で精度の高い帰属が得られていることを確認している。Olivia は北大を通して平成13年度に特許出願を行った。

3. 研究実施体制

(1) 構造解析グループ

グループ長: 稲垣冬彦(北海道大学大学院薬学研究科 教授)

研究項目: シグナル伝達蛋白質の機能ドメインの構造解析と制御機構の解析

ドメイン化を目的とした T-PCR 法の確立
機能ドメイン間の相互作用解析
ドメイン工学に基づく新規シグナル伝達蛋白質の創製

(2) 機能解析グループ

グループ長: 山本雅 (東京大学医科学研究所 教授)

住本英樹 (九州大学生体防御医学研究所 教授)

研究項目: N-WASP の機能解析と機能ドメインの探索

Tob ファミリー蛋白質の機能解析

Cbl の機能解析とドメイン化

好中球活性酸素発生機構の解明

ドメイン工学による新規シグナル蛋白質のアッセイ測定

4. 研究成果の発表

(1) 論文発表

- Ponting, C. P., Ito, T., Moscat, J., Diaz-Mew, M., Inagaki, F., Sumimoto, H. : OPR, PC and AID: all in the PB1 family. **TIBS**, **27**, 10, 2002.
- Ogura, K., Nagata, K., Horiuchi, M., Ebisui, E., Hasuda, T., Yuzawa, S., Nishida, M., Hatanaka, H., Inagaki, F. : Solution structure of N-terminal SH3 domain of Vav and the recognition site for Grb2 C-terminal SH3 domain. **J. Biomol. NMR**, **22**, 37-46, 2002.
- Takai, T., Hatanaka, H., Ichikawa, S., Yokota, T., Inagaki, F., Okumura, Y. : Effects of Double Mutation at Two Distant IgE-binding Sites in the Three-dimensional Structure of the Major House Dust Mite Allergen Der f 2 on IgE-binding and Histamine-releasing Activity. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, **65**, 7, 1601-1609, 2001.
- Terasawa, H., Noda, Y., Ito, T., Hatanaka, H., Ichikawa, S., Ogura, K., Sumimoto, H., Inagaki, F. : Structure and ligand recognition of the PB1 domain: A novel protein module binding to the PC motif. **The EMBO J.**, **20**, 15, 3947-3956, 2001.

(2) 特許出願

H13 年度特許出願件数 1件 (CREST 研究期間累積件数1件)