

「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すると共に、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。この目的に沿って、平成11年度には、新規ドメインであるPB1とPCモチーフとの相互作用様式について検討した。Vav nSH3の構造およびGrb2 cSH3との認識についてNMRおよびX線結晶構造解析を用いて決定した。新しい標的配列の認識機構を提案した。平成10年度までに、アダプター蛋白質であるGrb2の柔軟な構造について明らかにしてきた。平成11年度は、柔軟性がGrb2の生物学的機能に不可欠であることを二価で結合するモデルペプチドとの相互作用を解析することにより明らかにした。構造ドメインの同定を目的として、ランダムオリゴを用いた方法およびインタクトな蛋白質からの限定分解について検討した。ランダムオリゴ法をVavに適用した結果、可溶性画分に発現するいくつかの構造ドメインを同定することができた。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。好中球酸素発生系に含まれる蛋白質に適用した結果、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 新規ドメインPB1とPCモチーフの相互作用様式

PB1ドメインとPCモチーフは種々の蛋白質に見いだされた新しい相互作用モチーフであり、相互作用の特異性は高い。今回、出芽酵母のBem1pに含まれるPB1ドメインとCdc24に含まれるPCモチーフとの相互作用について解析した。PB1ドメインはユビキチンスーパーファミリーに属し、RafのRas結合ドメインとよく似た構造をとる。PB1は塩基性残基のクラスターからなる表面を持ち、PCモチーフ

でよく保存された酸性残基と相互作用している。更にPCモチーフで保存された酸性残基を挟む疎水性残基からなるクラスターはPB1表面上の疎水性残基と相互作用をし、結合の特異性を与えていることが明らかにされた。PB1とPCモチーフとの認識は、一般的な認識と特異的な認識を使いわけることにより、より特異性の高い結合を実現していると考えられる。

② Vav nSH3とGrb2 cSH3の新規な相互作用様式

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、二つのコンホマーは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を自分自身のPRR結合領域にくわえ込んでいる。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。更にGrb2 cSH3とVav nSH3との相互作用を X 線結晶構造解析を用いて明らかにした。興味深いことに、Vav nSH3のPRR領域は自己のPRR結合領域に結合したまま、Grb2 cSH3のPRR結合領域に認識されていた。PRRはポリプロリンタイプIIヘリックスを取っていること、結合に伴い、PRR領域の C 末側のグリシンがポリプロリンタイプIIヘリックスの構造を取りGrb2 cSH3と強く相互作用していることがわかった。以上、PRR 領域が二つのSH3により認識されているという新しい認識方法を明らかにした。

③ Grb2 のPRR認識

平成10年度までに、Grb2主鎖のNMRシグナルの帰属を行うとともに、¹⁵N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、Grb2は水溶液中では柔軟な構造を取ることを明らかにした。柔軟な構造が標的配列との結合を有利にするか否か検討するために、Grb2のnSH3, cSH3 それぞれに結合するペプチドをリンカーの長さを変えてつなげた二価ペプチドを合成し、Grb2との結合を解析した。Grb2はリンカーの長さによらず一価で結合する場合に比較して100- 1,000倍以上の親和性を持って結合した。既に報告された X 線結晶構造を参照すると、二つのSH3は相対配置を変えることにより、リンカーの長さの異なるペプチドに対して親和性を高めていることが明らかとなった。

④ 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新規シグナル伝達蛋白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平成10年度に引き続き、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事を確かめた。現在、この複合体について結晶化を進めて、3オングストロームの反射が得られている。限定分解は結晶生成に邪魔となるテール部分を切りつめることができる点で、単結晶の作製にきわめて有用である。
- (2) ランダムオリゴを含むPCRプライマーをデザインした。このプライマーを用いることにより、すべての組み合わせで、ドメインの切り出しを行うことを試みた。Vavに適用した結果、Dbl, CRD, cSH3 の各ドメインが可溶性画分として切り出された。今後、この方法をドメイン構造が未知の蛋白質に適用していく予定である。

酵母のVMA1によるタンパク質スプライシング反応を利用して構造 / 機能ドメインの組継ぎを行うことを試みた。モデル系として、好中球酸素発生系に関与しているp67phoxTPRモチーフとp47phoxに含まれるタンデムSH3ドメインをVMA1の両端に接続した蛋白質を発現した。20度Cの培養では、大腸菌内で蛋白質スプライシング反応が起き、両方が結合した融合蛋白質を得ることができた。融合蛋白質をRac2 および好中球膜画分（gp91phoxおよびp22phoxを含む）とインキュベートすると、活性酸素の発生が観測された。以上より、今回作製した融合蛋白質はフルの活性を有することがわかった。ドメイン工学的発想により得た最初の蛋白質である。

3 . 主な研究成果の発表（論文発表）

- 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 Shc-derived Phosphotyrosine-containing Peptide. *J. Mol. Biol.*, 289, 439-445, 1999.
- Koga, H., Terasawa, H., Nunoi, H., Takeshige, K., Inagaki, F., Sumimoto, H.: Tetratricopeptide repeat (TPR) motifs of p67 (phox) participate in interaction with the small GTPase Rac and activation of the phagocyte NADPH oxidase. *J. Biol. Chem.*, 274, 35, 25051-60, 1999.
- Sugita, M., Miwa, S., Aoki, K., Dulaney, J. T., Ichikawa, S., Inagaki, F. and Suzuki, M.: Acidic Glycosphingolipids in Brackish Water Annelida: Structural Analysis of Two Novel Glycoinositolphospholipids from the Lugworm, *Tylorrhynchus heterochetus*. *J. Jpn. Oil Chem. Soc.*, 49, 1, 33-43, 2000 .