

「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の機能ドメインの構造決定、シグナル伝達蛋白質の制御機構の解明、ドメイン工学に基づく人為的シグナル制御の可能性について研究を行った。対象としては、Grb2, N-WASP, 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、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、これらの研究を行う上で必要となる技術開発についても併せて検討を行った。

2. 研究実施内容

・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) Grb2の構造の柔軟性

Grb2はSH3-SH2-SH3よりなるアダプター蛋白質であり、成長因子レセプターよりRasへのシグナルを仲介する。我々はGrb2をモデルとして、SH2, SH3による標的認識機構について検討を行ってきたが、本研究ではNMR、X線小角散乱実験より、Grb2は結晶状態と異なり溶液中では柔軟な構造を取りうることを示した。ついで、C端、N端のSH3に結合するプロリンに富む標的配列を長さの異なるリンカーで結びつけたペプチドを合成した。リンカーの長さによらず、いずれのペプチドもnMオーダで結合した。このことは、Grb2の二つのSH3が互いの相対配置を変えることにより二価で結合することを示している。より強い結合親和性を持つために柔軟な構造は必要と考えられる。

(2) Grb2-SH2の標的認識の特異性と薬剤設計

シグナル伝達系の解明の目的の一つは、シグナル伝達蛋白質を対象とした薬剤設計である。我々はGrb2-SH2ドメインがターン構造を取る標的ペプチドを特異的に認識することを見いだした。NIH Terrence Burk博士との共同で、

Grb2-SH2の阻害剤の設計を行った。この阻害剤はnMオーダーの阻害活性を持つ。非水解性のC-P結合を持つリン酸化チロシンと疎水性相互作用を行うナフトレン環とSH2との相互作用がキーとなっている。

(3) Vav-nSH3の立体構造とGrb2-cSH3との相互認識

Vavは多くの機能ドメインよりなるシグナル伝達蛋白質である。GEF活性を持ち、血球系幹細胞の増殖、分化に重要な役割を果たしている。このような生理作用にVav-nSH3とGrb2-cSH3との相互認識が重要であることが知られている。我々はVav-nSH3の構造をNMR法を用いて明らかにした。PPPPG配列をRT-ループに持つこと、プロリンのシストランス転移を反映した二つのコンフォメーション平衡にあること、Grb2-cSH3との結合によりトランス型に平衡が片寄ることを明らかにした。ついで、X線結晶構造解析により複合体の構造を明らかにした。Vav-nSH3 : Grb2-cSH3=1 : 2の複合体を作ること、一方はVav-nSH3のPPPPG配列がカノニカルな様式でGrb2-cSH3により認識されている。もう一方はPPPPGとは反対側に位置する部位にGrb2-cSH3が結合している。変異体の結合実験の結果、後者の部位にGrb2-cSH3が結合することが明らかとなった。この結合は新規な様式であり、NMRによる滴定実験の結果からもこの結合様式が支持された。Vav-nSH3はPPPPG配列を自分のPRR結合領域に結合する事により、他の標的蛋白質が結合できないようにブロックすると同時に、反対側の領域をGrb2 cSH3との結合に用いている。Vav-nSH3はGrb2-cSH3の結合のために特化したSH3ドメインであると考えられる。

(4) PB1ドメインの構造とPCモチーフとの結合

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}等に、PC1モチーフはCdc24、p40^{phox}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。Bem1pに含まれるPB1ドメインの立体構造をNMRにより決定するとともに、Cdc24に含まれるPCモチーフとの相互作用を明らかにした。PCモチーフに特徴的に含まれる酸性残基はPB1ドメイン上の塩基性クラスターと相互作用するとともに、PCモチーフに含まれるβ-hairpin上の疎水性残基がPB1との結合の特異性を決定していることを明らかにした。

(5) 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}のタンデムなSH3がp22^{phox}のプロリンに富む配列に結合することが必要である。そこで、p67^{phox}TPRモチーフとp47^{phox}のタンデムなSH3ドメインを融合させた新規蛋白質をインテン反応を用いて調製した。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。今後は活性酸素発生系を用い、シグナル制御系を含んだ新しい蛋白質をデザインする。

- (6) シグナル伝達蛋白質のドメインを中心とした立体構造解析及びドメインを素子とするドメイン工学の展開に必要な効率的な構造ドメインの同定および構造ドメインの組継ぎによる新しい蛋白質の創製等のテクニカルな検討を行った。

ランダムオリゴを用いた可溶性ドメインの探索

我々はドメインの同定を目的として、ランダムオリゴを用い、すべての塩基配列に対応するDNA断片をPCRを用いて増幅した。このDNA断片の下流にGFP蛋白質を融合、大腸菌に発現させた。構造ドメインに対応する場合には、発現蛋白質は可溶性になること、可溶性の構造ドメインをとる場合には、下流のGFPも正しく巻き戻る事が知られており、GFPの蛍光を目印に可溶性の構造ドメインを選ぶことができる。Vavにこの方法を適用した結果、Dbl homology, Cystein rich domain, cSH3に対応する可溶性ドメインを得た。Dbl homologyについてCDを測定した結果、 α helixに富む構造を取ることがわかった。

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末を活性化させ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末にAg - チオエステル法を用いて組継ぎを行った。現在収率の向上を図っているが、リン酸化蛋白質の一般的な調製法となりうると考えている。

・ N-WASP、WAVEによるアクチン骨格系の制御

細胞外刺激によって引き起こされる非常に速いアクチン骨格系の再編と細胞移

動にはWASPファミリー蛋白質やWAVEファミリー蛋白質が関わっている。N-WASPはCdc42によって活性化され、糸状仮足を引き起こすことを、WAVEはRacによって活性化されて、葉状仮足形成を引き起こすことを明らかにした。この際の機序として、N-WASP、WAVEともC末にVCA領域を持ち、V領域にアクチンを結合し、CA領域にアクチン重合のマシナリーであるArp2/3複合体を結合してアクチンの重合を促進することで糸状仮足や葉状仮足形成を促すことを示した。N-WASPは通常、分子内で折れ曲がった構造を取り、VCA領域がマスクされている。Cdc42やPIP2が結合すると、折れ曲がり構造が解けてVCA領域が露出して、Arp2/3複合体を結合して、アクチン重合を促進することを明らかにした。一方、WAVEはRacによって活性化されるものの、直接結合せず、RacとWAVEの間にシグナルを橋渡ししている分子があることを示唆した。そこでRacの下流にあってWAVEにシグナルを渡し、Arp2/3複合体の活性化を生じて、葉状仮足形成を促す分子を特定した。その分子はIRSp53という全く機能が分かっていない蛋白質であった。IRSp53は活性型のRacに特異的に結合し、さらにSH3ドメインでWAVEのプロリンに富む配列に結合して、WAVEを活性化し、膜ヘリクルートする蛋白質であった。これらの結果より、今まで分からなかった糸状仮足や葉状仮足形成のシグナリングを明らかにすることができた。

・ BTGファミリー蛋白質の機能、構造研究

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。次に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することにした。Tob-Caf1複合体に関してはすでに結晶が得られ、放射光施設での回折実験により3.5オングストローム分解能の回折斑点を確認することができた。現在、さらなる分解能の向上のため、結晶化条件の検討を進めている。

3. 主な研究成果の発表（論文発表）

Acidic Glycosphingolipids in Brackish Water Annelida : Structural Analysis of Two Novel Glycoinositolphospholipids from the Lugworm, Sugita, M., Miwa, S., Aoki, K., Dulaney, J. T., Ichikawa, S., Inagaki, F. and Suzuki, *Tylorrhynchus heterochetus*. *J.Jpn. Oil Chem.Soc.*, 49, 33-43(2000)

Polypeptide Synthesis Using an Expressed Peptide as a Building Block via the Thioester Method. Toru Kawakami, Koki Hasegawa, Kenta Teruya, Kenichi Akaji, Masataka Horiuchi, Fuyuhiko Inagaki, Yasuyuki Kurihara, Seiichi Uesugi, Saburo Aimoto,. *Tetrahedron Letters*, 41, 2625-2628(2000)

Solution structure of Grb2 reveals extensive flexibility for target recognition. Satoru Yuzawa, Masashi Yokochi, Hideki Hatanaka, Kenji Ogura, Mikio Kataoka, Kin-ichiro Miura, Valsan Mandiyan, Joseph Schlessinger and Fuyuhiko Inagaki, *J. Mol. Biol.*, 306, 527-537(2001)

Random PCR-based screening for soluble domains using green fluorescent protein. Masato Kawasaki and Fuyuhiko Inagaki, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 280, 842-844(2001)

IRSp53 is an essential intermediate in the regulation of membrane ruffling by Rac and Wave. Miki, H., Yamaguchi, H., Suetsugu, S., and Takenawa, T., *Nature* 408, 732-735(2000)

Cbl suppresses B cell receptor-mediated phospholipase c-gamma2 activation by regulating BLNK-PLC-gamma2 binding. Tomoharu Yasuda, Akito Maeda, Mari Kurosaki, Tohru Tezuka, Katsunori Hironaka,, Tadashi Yamamoto and Tomohiro Kurosaki. *J. Exp. Med.* 191 , 641-650(2000)