

センターを中心に展開される研究



創薬を志向したマルチドメインタンパク質のNMR構造生物学

研究成果:

サブテーマ1, AAA-ATPaseの標的認識ドメインの構造解析:

我々は、創薬を志向したマルチドメインタンパク質のNMR構造生物学研究を推進する目的で、モデルとなるマルチドメインタンパク質の一つにAAA-ATPaseを選択した。AAA-ATPaseはATPの加水分解エネルギーを利用して分子シャペロンとして機能する酵素である。ペルオキシソーム形成不全症(PEX1/PEX6)、有糸分裂(katanin)、ウイルス増殖(Vps4)など医学的にも重要な遺伝子産物を多く含み、国内外で研究が盛んである。AAA-ATPaseの機能の多様性は、配列の変化に富むN末端ドメインが担っていると漠然と予想されていたが、これまで実験的検証はまだなされていなかった。また、AAA-ATPaseの構造生物学は、AAAドメイン部分の解析とN末端ドメインの研究に大別され、前者の結晶構造解析が先行している一方で、機能多様性を担うはずのNドメインの構造解析は遅れていた。廣明らはこれまでに、2種のAAA-ATPaseのNドメインの構造(PEX1-ND、hVps4-MIT)をそれぞれ世界に先駆けて決定し、この分野の研究を国際的にリードしていた。特にPEX1のNドメインの構造学的発見を端緒として、PEX1によるペルオキシソームでの蛋白質輸送受容体のリサイクリングと、VCPによるERからの蛋白質逆行輸送のメカニズムの類似性を発見した(Shiozawa, Hiroaki, (他7), J Biol Chem, 2004)。



教授
廣明 秀一

2007年から2013年までにかけて、廣明らは、さらに1種のAAA-ATPaseのNドメイン(NVL2^{NP})の新規構造をNMRにより決定することに成功した。NVL2は核小体に局在しribosome生合成を調節するクラスIIに属するAAA酵素であるが、特に他のクラスII-AAA酵素との配列類似性が低い。実際に決定されたN末端のユニークなドメイン(NVL2^{NP}と命名)の立体構造はヒストンフォールドに類似しており、新規のドメインであった(図1)。またHeLa細胞抽出物を用いたプロテオミクス研究を行い、このNVL2^{NP}の細胞内の結合相手が核小体を構成する最多成分であるnucleolinであることを解明した。また、他の結合相手候補の中に、RRMドメインを含むタンパク質が複数見出された。一方、nucleolinのNVL2^{NP}に対する相互作用部位の決定にも成功した。NVL2^{NP}はnucleolinのC末側後半の4つのRRMドメインおよびGAR領域に統合した。興味深いことに、その結合は、二つ以上のRRMまたはGARドメインが連続したnucleolinのコンストラクトに見られ、かつ、試料中に混在する一本鎖RNAの関与が必須であることが明らかになった。これらの結果よりNVL2の細胞内での役割について、図2に示すような仮説を提案した。

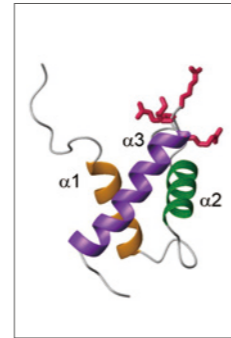


図1

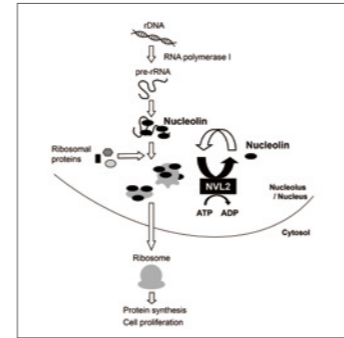


図2

一方、クラスIIに属するAAA酵素であるKatanin p60(KP60)の微小管切断機構ならびにその活性制御機構についても、構造生物学的手法を用いて解析し、微小管結合部位である新規N末端ドメインのNMRによる立体構造決定に成功した。その立体構造は、アミノ酸配列相同性が20%程度と低いものの、Vps4のMITドメインときわめて類似した構造であった。そこで我々は、このドメインをvariant MITドメインと命名した。さらに変異体実験を行い、KP60のN末端ドメインと微小管の相互作用部位の決定にも成功した。その相互作用部位は、立体構造が類似しているVps4のMITドメインと、Vps4基質である膜骨格ESCRT-III構成成分であるCHMP1との相互作用機構と、構造的に非常によく似ていた(図3)。微小管上のチューブリンのカタニン結合部位についても調査したところ、その結合部位がαチューブリンの第12番目ヘリックスであることが明らかになった。この部位は微小管保護タンパク質Tauの結合部位に他ならず、カタニンとTauが生理的に拮抗しているという仮説を奇しくも構造生物学的に証明することとなった。一方、我々は、KP60の微小管切断活性がCa²⁺イオンにより制御されることを新たに見出し、その結合部位は微小管結合部位であるN末端ドメインにあることも常磁性イオンを用いたNMR実験により決定した。しかし、Ca²⁺イオンの添加は、KP60とチューブリンの結合にも、微小管切断を伴わないKP60のATPase活性にも影響を与えなかった。このことは、Ca²⁺イオンによるユニークな活性制御のメカニズムが存在することを意味している。

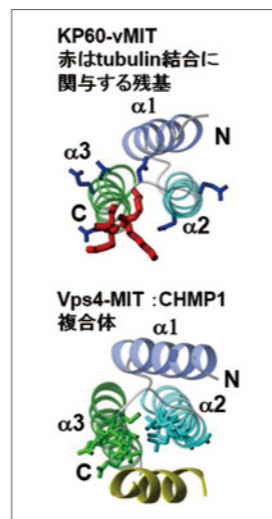


図3

サブテーマ2, 細胞間接着装置の裏打ちタンパク質の構造生物学:

細胞接着は、組織や臓器の形成に必須であり、その異常はがんや他の多くの疾患の原因になっている。細胞接着を行う接着装置は、上皮細胞でよく発達しており、タイトジャンクション(TJ)とアドヘレンスジャンクション(AJ)と呼ばれている。AJではカドヘリンとネクチンが、TJではクローディングがそれぞれ主要な接着分子であり、それぞれにおいて、直接接着に関与する接着分子、その分子の機能を制御する分子、接着分子によって制御されているシグナル分子など数多くのタンパク質を含み、巨大な複合体を形成し、その複合体がさらに集合して細胞膜ドメインを形成し、最終的に細胞を接着させている。我々は、文部科学省・JSTのプロジェクト「ターゲットタンパクプログラム」の課題の一、「細胞接着装置構成タンパク質の構造生物学的研究」(代表・匂坂敏朗神戸大学教授)の研究分担者として、上皮細胞の接着装置に焦点を絞り、これらの装置を構成する分子、その複合体および膜ドメインの構造をNMRとX線結晶構造解析法を併用して解析した。特に、TJの生合成を促進するZO-1、AJの生合成と複合体形成を支配する因子AF-6、TJの分解抑制を司るLNK1の3つのタンパク質より、鍵となるPDZドメインを単離し、その立体構造決定に成功した(図4)。

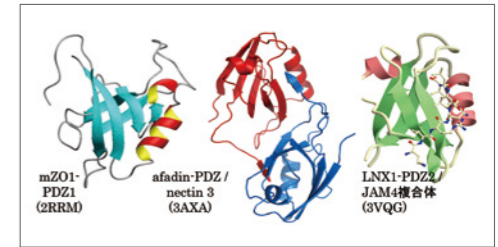


図4

得意とする手法, マルチドメインタンパク質のNMR解析に特化したタンパク質発現系の高速構築法~PRESAT-vector法:

溶液NMR法、X線構造解析法ともに、柔軟性の高いリンカーでつながれたマルチドメインタンパク質について、分子全長での構造解析に限界があるために、ドメインごとに切り出した試料を調製しなければならない局面が少なくない。その際、ドメインの境界を正確に予測して、組換え発現系のコンストラクトを構築する必要がある。当研究グループでは、これまでに、前述のような目的に適した「方向性をもった遺伝子のPCRクローニングベクター」PRESAT-vectorを開発してきた(Goda, N. et al., 2004, Protein Sci; Tenno, T. et al., 2004, PEDS他)。通常のT突出末端を有するPCRクローニングベクター(T-vector)では、順方向と逆方向のクローニング産物が生成する。我々の技術は、クローニングサイトの塩基配列を非対称とし、PCR断片とベクター断片のライゲーション反応後、一度増幅したプラスミドを、第二の制限酵素で処理することで、反応混合物のうち逆方向に連結されたベクターのみを分解消化するという方法である。これにより融合タンパク質発現ベクター等が、PCR反応から始めて、サブクローニングを経ずに少ないステップで調製できる。これは、構造生物学に適したタンパク質試料の簡易的なスクリーニングに応用することができ、構造生物学のプロジェクトそのものの成功率向上に貢献できる。表1には、現在、我々のグループが保有しているPRESAT-vectorのリストを示す。学内の研究グループには、適切な手続きのもと、無償で提供可能である。

表1. PRESAT-vectorの一覧:

ベクター名	もとのプラスミド	融合タンパク質 / 融合タグ	選抜用制限酵素	用途
pGEX-4T3-PRESAT	pGEX-4T3	GST-thrombin cleavage site	<i>Nco</i> I or <i>Nde</i> I	大腸菌を用いたGST融合タンパク質発現
pGEX-3X-PRESAT	pGEX-3X	GST-FactorXa cleavage site	<i>Nco</i> I or <i>Nde</i> I	大腸菌を用いたGST融合タンパク質発現
pGEX-6P3-PRESAT	pGEX-6P3	GST-PreScission protease cleavage site	<i>Nco</i> I or <i>Nde</i> I	大腸菌を用いたGST融合タンパク質発現
pET-Trx-PRESAT	pET-32a	Trx-His x 6-Factor Xa cleavage site	<i>Kpn</i> I	大腸菌を用いたHis×6タグ融合タンパク質発現
pET-His x 6-PRESAT	pET-32a	His x 6-Factor Xa cleavage site	<i>Kpn</i> I	大腸菌を用いたHis×6タグ融合タンパク質発現
pET-His×6-HRV3C-PRESAT	pET-32a	His×6-HRV3C(PreScission) cleavage site	<i>Kpn</i> I	大腸菌を用いたHis×6タグ融合タンパク質発現
pET-His x 6-TEV-PRESAT	pET-32a	His x 6-TEV cleavage site	<i>Kpn</i> I	大腸菌を用いたHis×6タグ融合タンパク質発現
pET-FLAG-PRESAT	pET-32a	FLAG tag-Enterokinase cleavage site	<i>Afl</i> II	大腸菌を用いたFLAGタグ融合タンパク質発現
pET-LBT-PRESAT	pET-32a	LBT tag	<i>Kpn</i> I	大腸菌を用いた蛍光タグ融合タンパク質発現 磁気共鳴イメージング
pET-EGFP-PRESAT	pET-32a	EGFP-His x6	<i>Kpn</i> I	大腸菌を用いたGFP融合タンパク質発現
MBP-HRV3C-PRESAT	pET-21b	MBP-HRV3C(PreScission) cleavage site	<i>Nco</i> I or <i>Nde</i> I	大腸菌を用いたMBPタグ融合タンパク質発現
pGEX-LBT-PRESAT-PTD	pGEX-4T3	LBT tag, PTD(Protein Transduction Domain)	<i>Kpn</i> I	大腸菌を用いた蛍光タグ融合タンパク質発現 磁気共鳴イメージング タンパク質の細胞導入
pcDNA-EGFP-PRESAT	pcDNA	EGFP-His x6	<i>Kpn</i> I	培養細胞を用いたGFP融合タンパク質発現
pBSII-PRESAT	pBSII			一般的なPCR cloning

センターを中心に展開される研究



論文発表 2007-2013:

1. Fukuchi, S*, Amemiya, T., Sakamoto, S., Nobe, Y., Hosoda, K., Kado, Y., Murakami, D. S., Koike, R., [Hiroaki, H.](#), and Ota M*. 2014., IDEAL in 2014 illustrates interaction network composed of intrinsically disordered proteins and their binding partners. *Nucleic Acids Res.*, **42**:D320-325. doi: 10.1093/nar/gkt1010.
2. Tenno, T., Goda, N., Umetsu, Y., Furuse, M., Ota, M., Kinoshita, K., and [Hiroaki, H.*](#). 2013. Accidental interaction between PDZ domains and diclofenac revealed by NMR-guided virtual screening. *Molecules*, **18**:9567-9581. doi:10.3390/molecules18089567
3. [廣明秀一*](#). 2013. 特集「タンパク質構造機能相関再考」- NMRで見るタンパク質-低分子相互作用. 生化学, **85**(8), 679-686.
4. Iwaya, N., Takasu, H., Goda, N., Shirakawa, M., Tanaka, T., Hamada, D., and [Hiroaki, H.*](#). 2013. MIT domain of Vps4 is a Ca²⁺-dependent phosphoinositide-binding domain. *J. Biochem.*, **153**(5):473-481.
5. Ota, M*, Koike, R., Amemiya, T., Tenno, T., Romero, P.R., [Hiroaki, H.](#), Dunker, A.K., and Fukuchi, S. 2013. An assignment of intrinsically disordered regions of proteins based on NMR structures. *J Structural Biol.*, **181**:29-36.
6. 天野剛志・[廣明秀一*](#) 2013. 立体構造が明らかにしたGタンパク質共役型受容体の刺激受容のしくみ. 融合領域レビュー, **2**, e003, doi: 10.7875/leading.author.2.e003)
7. Iwaya, N., Akiyama, K., Goda, N., Tenno, T., Fujiwara, Y., Hamada, D., Ikura, T., Shirakawa, M., and [Hiroaki, H.*](#). 2012. Effect of Ca²⁺ on microtubule severing enzyme katanin p60; insight into the substrate dependent activation mechanism. *FEBS J.*, **279**:1339-1352.
8. Fukuchi, S*, Sakamoto, S., Nobe, Y., Murakami, D. S., Amemiya, T., Hosoda, K., Koike, R. [Hiroaki, H.](#), and Ota, M*. 2012. IDEAL - Intrinsically Disordered proteins with Extensive Annotations and Literature. *Nucleic Acids Research (database issue)*, **40** (1):D507-511. (Epub 2011 Nov 8.)
9. [Hiroaki, H.*](#), Umetsu, Y., Hoshi, M., Nabeshima, Y. and Kohda, D., 2011. A Simplified Recipe for Assigning Amide NMR Signals Using Combinatorial ¹⁴N Amino Acid Inverse-Labeling. *J Structural Functional Genomics.*, **12** (3): 167-174.
10. Hasegawa, J., Tokuda, E., Tenno, T., Tsujita, K., Sawai, H., [Hiroaki, H.](#), Takenawa, T. Itoh, T*. 2011. SH3YL1 regulates dorsal ruffle formation by a novel phosphoinositide-binding domain. *J Cell Biol* **193** (5):901-916.
11. Fujiwara, Y., Fujiwara, K., Goda, N., Iwaya, N., Tenno, T., Shirakawa, M., [Hiroaki, H.*](#). 2011. Structure and function of the N-terminal nucleolin binding domain of nuclear Valocin containing protein like 2 (NVL2) harboring a nucleolar localization signal. 2011. *J Biol Chem* **286** (24):21732-21741.
12. Umetsu, Y, Tenno, T., Goda, N., Shirakawa, M., Ikegami, T., and [Hiroaki, H.*](#). 2011. Structural difference of vasoactive intestinal peptide (VIP) in two distinct membrane mimicking conditions. *BBA-Proteins Proteomics*. **1814**:724-730.
13. Motono, C., Nakata, J., Koike, R., Shimizu, K., Shiota, M., Amemiya, T., Tomii, K., Nagano, N., Sakaya, N., Misoo, K., Sato, M., Kidera, A., [Hiroaki, H.](#), Shirai, T., Kinoshita, K., Noguchi, T., and Ota, M. 2010. SAHG, a comprehensive database of predicted structures of all human proteins. *Nucleic Acids Res* **39**(suppl 1): D487-D493.
14. Ohnishi, H., Tochio, H., Kato, Z., Kimura, T., [Hiroaki, H.](#), Kondo, N., and Shirakawa, M. 2010. ¹H, ¹³C, and ¹⁵N resonance assignment of the TIR domain of human MyD88. *Biomol NMR Assign* **4**: 123-125.
15. Iwaya, N., Kuwahara, Y., Fujiwara, Y., Goda, N., Tenno, T., Akiyama, K., Mase, S., Tochio, H., Ikegami, T., Shirakawa, M., and [Hiroaki, H.*](#). 2010. A common substrate recognition mode conserved between katanin p60 and VPS4 governs microtubule severing and membrane skeleton reorganization. *J Biol Chem* **285**: 16822-16829.
16. 藤原芳江・[廣明秀一*](#)・白川昌宏, 2010 蛋白質立体構造解析の創薬への展開, 呼吸 (Respiration Research), **29**(6), 571-578
17. Kuwahara, Y., Unzai, S., Nagata, T., Hiroaki, Y., Yokoyama, H., Matsui, I., Ikegami, T., Fujiyoshi, Y., and [Hiroaki, H.*](#). 2009. Unusual thermal disassembly of the SPFH domain oligomer from *Pyrococcus horikoshii*. *Biophys J* **97**: 2034-2043.
18. Inomata, K., Ohno, A., Tochio, H., Isogai, S., Tenno, T., Nakase, I., Takeuchi, T., Futaki, S., Ito, Y., [Hiroaki, H.](#), and Shirakawa, M. 2009. High-resolution multi-dimensional NMR spectroscopy of proteins in human cells. *Nature* **458**: 106-109.
19. Ohnishi, H., Tochio, H., Kato, Z., Orii, K. E., Li, A., Kimura, T., [Hiroaki, H.](#), Kondo, N., and Shirakawa, M. 2009. Structural basis for the multiple interactions of the MyD88 TIR domain in TLR4 signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* **106**: 10260-10265.

20. 桑原陽太, [廣明秀一*](#), 2009, 探索発見型構造生物学におけるバイオインフォマティクスとウェット実験の融合, JSBi 日本バイオインフォマティクス学会ニュースレター, **19**, 5-6
21. Kuwahara, Y., Ohno, A., Morii, T., Yokoyama, H., Matsui, I., Tochio, H., Shirakawa, M., and Hiroaki, H*. 2008. The solution structure of the C-terminal domain of NfeD reveals a novel membrane-anchored OB-fold. *Protein Sci* **17**: 1915-1924.
22. Goda, N., Tenno, T., Inomata, K., Shirakawa, M., Tanaka, T., and [Hiroaki, H.*](#). 2008. Intracellular protein delivery activity of peptides derived from insulin-like growth factor binding proteins 3 and 5. *Exp Cell Res* **314**: 2352-2361.
23. Iwaya, N., Goda, N., Unzai, S., Fujiwara, K., Tanaka, T., Tomii, K., Tochio, H., Shirakawa, M., and [Hiroaki, H.*](#). 2007. Fine-tuning of protein domain boundary by minimizing potential coiled coil regions. *J Biomol NMR* **37**: 53-63.
24. Goda, N., Tenno, T., Inomata, K., Iwaya, N., Sasaki, Y., Shirakawa, M., and [Hiroaki, H.*](#). 2007. LBT/PTD dual tagged vector for purification, cellular protein delivery and visualization in living cells. *Biochim Biophys Acta-Mol Cell Res* **1773**: 141-146.
25. Sakai, T., Tochio, H., Inomata, K., Sasaki, Y., Tenno, T., Tanaka, T., Kokubo, T., [Hiroaki, H.*](#), and Shirakawa, M. 2007. Fluoroscopic assessment of protein leakage during Xenopus oocytes in-cell NMR experiment by co-injected EGFP. *Anal Biochem* **371**: 247-249.

招待講演 2007-2013:

1. 2007年12月 蛋白質立体構造決定の現場においてなぜバイオインフォマティクスが必要か? 第73神戸バイオサイエンス研究会 (神戸大学)・神戸
2. 2007年9月 疾病に関連する細胞膜結合タンパク質の構造生物学、第3回血液免疫ネットワークin金沢(金沢医科大学大学院医学研究科血液免疫制御学)・金沢
3. 2008年2月 Computational and experimental approaches to protein interactions and complexes JST-BIRD国際ワークショップ 蛋白研セミナー "Experimental Aspects of protein-lipid interaction by NMR."(大阪大学蛋白質研究所)・大阪
4. 2009年10月 *P. horikoshii*のStomatin PH0470のSPFHドメインオリゴマーの特異な熱解離 JST-CNRS合同「マリネゲノム・バイオ分野」セミナー 新規ウイルス様膜小胞体の発見と超好熱性古細菌での機能解明に向けて(産業技術総合研究所 脳神経情報研究部門)・筑波
5. 2009年11月 基礎から理解する溶液NMRの最新技術、第48回NMR討論会(日本核磁気共鳴学会)・福岡
6. 2010年3月 ドメイン構造から理解するAAA-ATPaseの機能分担 京都大学低温物質科学研究センター 第8回講演会・研究交流会「構造生物学の現状と未来」(京都大学)・京都
7. 2010年9月 SOFAST-HMQC/BEST-HNCAの理解と蛋白質NMRのケミカルバイオロジーへの応用、平成22年度分光学会NMR分光部会シンポジウム(日本分光学会)・東京
8. 2011年4月 揺らいだ試料/IDP測定に特化したNMR講座1 ~スペクトルの見方、考え方~ 新学術領域研究「天然変性タンパク質の分子認識と機能発現」第二回若手育成講習会(文部科学省新学術領域「天然変性タンパク質」)・大阪
9. 2011年6月 タンパク質¹H-¹⁵N二次元NMRの徹底理解(理想的でない試料のスペクトルを中心に) 第12回若手NMR研究会(若手NMR研究会)・滋賀・守山
10. 2011年7月 NMRの原理 1D/2D-NMR 2011年 日本分光学会NMR講習会(日本分光学会)・東京
11. 2011年9月 NMR Analysis of the Toxic Aβ-High Molecular Weight Oligomer,先端医療センターアルツハイマー病ミニワークショップ (IBRI(先端医療センター))・神戸
12. 2011年12月 A hypothesis of membrane skeleton : Are SPFH-domain proteins membrane scaffolding proteins ?, Kobe University-University of Washington Joint Symposium on Integrative Membrane Biology and Signal Transduction Medicine, (神戸大学グローバルCOEプログラム膜生物学)・神戸
13. 2012年1月 遺伝子修復因子Hefと核小体タンパク質ヌクレオリンに含まれる天然変性領域の解析、新学術領域研究「天然変性タンパク質の分子認識機構と機能発現」第二回公開シンポジウム(新学術領域研究「天然変性タンパク質の分子認識機構と機能発現」)・大阪
14. 2012年3月 創薬標的としてのAAA-ATPaseとNMR構造生物学、第一回岐阜構造生物学・医学・論理的創薬研究会シンポジウム:構造生物学・医学・論理的創薬の拠点構築を目指して(岐阜構造生物学・医学・論理的創薬研究会)・岐阜