

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 22 日現在

機関番号：12601

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究期間：2010～2014

課題番号：22117007

研究課題名（和文）蛋白質の翻訳後修飾と細胞内シグナル伝達に関連した因子の構造基盤

研究課題名（英文）Structural basis for protein posttranscriptional modifications and cellular signaling

研究代表者

石谷 隆一郎 (Ishitani, Ryuichiro)

東京大学・理学（系）研究科（研究院）・准教授

研究者番号：90361568

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 96,500,000 円

研究成果の概要（和文）：蛋白質の翻訳後修飾は、細胞内シグナル伝達や細胞機能の制御において重要な役割を果たしている。本研究では、まず、炎症反応にかかわるシグナル伝達因子cGAMPの産生酵素cGASの構造解析を行い、そのDNA結合特異的な活性化の構造的メカニズムを解明した。また、われわれはNF- κ B経路におけるシグナル伝達の制御にかかわる因子A20の亜鉛フィンガーモチーフと直鎖状ユビキチンとの複合体の構造を解明し、その制御メカニズムを明らかにした。そして、TBF-シグナル経路にかかわるdnHLH蛋白質HHMの結晶構造解析を行い、その自己阻害型構造を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Post-translational modifications play critical roles in the regulation of signal transduction and cellular functions. Structural biology methods, including X-ray crystallography, are powerful tools for dissecting the molecular interaction mechanisms between the factors involved in these signaling pathways. Therefore, synergetic approaches by structural, molecular and cellular biology are important to understand both the mechanisms of signal transduction by post-translational modifications and their pathogenic dysregulation. Our results of the structural analyses of cGAS, A20-ZF7-linear ubiquitin complex, and HHM highlight the importance of synergetic approaches by collaborations between different biological fields.

研究分野：構造生物学

キーワード：X線結晶構造解析 タンパク質翻訳後修飾 細胞内シグナル伝達 NF- κ Bシグナル伝達経路

1. 研究開始当初の背景

細胞内シグナル伝達ネットワークは、蛋白質のさまざまな翻訳後修飾によって制御されている。そして近年の研究により、これら様々な翻訳後修飾は、癌、心血管疾患、神経変性疾患、自己免疫疾患から感染症に至るまでの、多くの病因・病態に関与していることが分かってきた。特に、これらのシグナル伝達ネットワークを理解するためには、その構築基盤となっている因子の相互作用を立体構造情報に基づいて解明することが必須であった。申請者らは、シグナル伝達に関わる蛋白質を含め生体高分子の構造解析を精力的に行ってきたが、翻訳後修飾によるシグナル伝達に関する新たな知見は年々蓄積されており、更なる構造的知見が必要とされていた。

2. 研究の目的

本研究では上記に示した分野の中から、特に重要であると考えられるターゲット、転写抑制因子 HHM (human homologue of murine maternal Id-like molecule)、脱ユビキチン化酵素 A20 環状 GMP-AMP 合成酵素 cGAS、DncV の構造解析を実施する。さらにそれらに関わる因子との複合体の構造解析を実施する。特に、A20、cGAS に関しては計画班間との共同研究により遂行する。一方、他計画・公募班で新規に同定された因子に関しても構造解析を行うことで、計画・公募班研究者と緊密な連携をはかり領域全体の推進に貢献する。最終的に、「構造生物学分野から分子生物学分野へのアプローチ」として、解明した構造情報を A01 班研究者による細胞生物学的実験へとフィードバックし、構造・機能の両面から翻訳後修飾による細胞情報ネットワークの解明にアプローチする。本計画により得られる高次構造情報は、相互作用ネットワークと生体の高次機能や疾患との関連をより明確にし、疾患の治療等への応用に結びつくと期待される。

3. 研究の方法

各々の構造解析ターゲットについて、大腸菌・昆虫細胞・HEK293 細胞の発現系を中心に、発現条件とコンストラクトの最適化を試みた。最適化は、ディスオーダー予測やプロテアーゼによる限定分解に基づいて行った。精製には His タグだけでなくエピトプタグと抗体カラムを用いた系等も試みた。さらに、得られた構造解析ターゲット蛋白質を用いて、他のシグナル伝達因子との相互作用を検討した。例えば A20 は直鎖ユビキチンと相互作用するが、どの程度の鎖長のユビキチンと安定な複合体を作るか探索を行った。ゲル濾過クロマトグラフィー、動的光散乱等の手法を用いて、安定な複合体を形成する条件を検討し、調製系を確立した。Invitro での複合体形成が困難な場合は共発現系も試みた。そして、高純度のサンプルを調製し、結晶化

スクリーニングを行い、最終的には構造解析に十分な品質の結晶を得ることに成功した。そしてセレノメチオニン置換体結晶を調製し、多波長異常分散法にて構造決定をおこなった。さらに、各ターゲットについて得られた構造からシグナル伝達メカニズムの原子レベルの仮説を構築した。そして、構造情報に基づき変異体をデザインし、作業仮説を細胞レベルでの機能解析により実証した。

4. 研究成果

転写抑制因子 HHM の構造機能解析

転写抑制因子 HHM の結晶構造を解明した(図 1)。構造に基づいた生化学的・物理化学的解析を行った結果、HHM は溶液中で、自己阻害型の V 字型構造と、他の転写因子と相互作用することが可能な、ほどけた活性型との平衡状態であることを解明した(図 2)。結晶構造に基づいて V 字型構造を壊すような変異体をデザインし、細胞内で機能解析を行ったところ、変異体は筋細胞の分化を著しく促進することが判明した。以上から、今回明らかになった HHM 単独の構造は HHM と転写因子の非特異的な会合を防ぐ自己阻害状態であり、本来の基質が存在するときのみ HLH 領域が露出して活性型となるというモデルを提唱した(研究業績 18)。

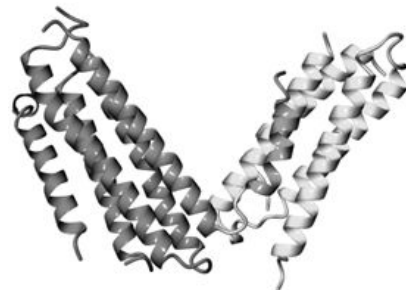


図1. HHM の結晶構造

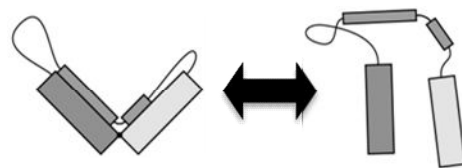


図2. HHM の自己阻害型と活性型の平衡状態

A20/直鎖型ユビキチン複合体の構造機能解析

生化学的な解析、および、細胞生物学的な解析により、脱ユビキチン化酵素 A20 が C 末端の zinc finger 7 (ZF7) を介して直鎖状ポリユビキチンに結合することで NF- κ B 活性化を抑制することを明らかにした。A20 ZF7-直鎖状ユビキチン複合体の X 線結晶構造を決定し、その直鎖状ユビキチン認識機構を明らかにした(図 3)。構造情報に基づいて機能解析を行い、A20 が ZF7 を介して直鎖状ポリユビキチンと結合し TNF 受容体へと集積することで NF- κ B 経路を制御するという新たな分子機構を明らかにした。さらに、本研究の結

果から、A20 ZF7 と直鎖状ポリユビキチンとのあいだの結合の不全はB細胞リンパ腫惹起と関連することが示された(研究業績 25)。

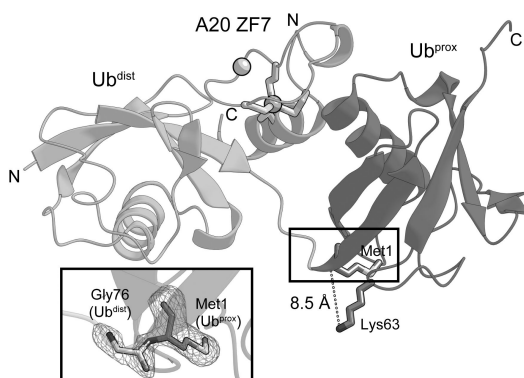


図3. A20 ZF7・ジユビキチン複合体の結晶構造

cGAS/DncV の構造機能解析

cGAS はウイルス由来の DNA を認識することで活性化し、ATP と GTP から cyclic GMP-AMP を産生する酵素である。cyclic GMP-AMP は STING に結合し、下流へとシグナルを伝えることで I 型インターフェロンの産生を促す。このように cGAS はウイルス感染の初期にตอบสนองして、宿主の免疫系を活性化する重要な酵素であるにも関わらず、どのように cGAS がウイルス DNA を認識しているかについては不明であった。そこで本研究では X 線結晶構造解析の手法を用いて cGAS の立体構造を決定し、cGAS による DNA 認識機構を原子分解能レベルで解明した(図 4)。さらに、解明した構造に基づいた生化学的、細胞生物学的解析を行うことで、cGAS はジンクフィンガー、および、正電荷の溝を介してウイルス DNA を認識し、cyclic GMP-AMP を産生することで免疫を活性化することが明らかとなった(研究業績 12)。他に病原菌が有する cyclic GMP-AMP 産生酵素 DncV の立体構造解析も行い(図 4)、ヒト cGAS との構造比較を行うことで、DncV と cGAS の基質・産物特性のメカニズムを解明した(研究業績 1)。



図4. cGAS(左)と DncV(右)の結晶構造

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

(雑誌論文)(計 29 件)

1. Kato, K., Ishii, R., Hirano, S., Ishitani, R., *Nureki, O. Structural Basis for the Catalytic Mechanism of DncV, Bacterial Homolog of Cyclic GMP-AMP Synthase. *Structure* **23**, 843-850 (2015)
2. Kumazaki K, Kishimoto T, Furukawa A, Mori H, Tanaka Y, Dohmae N, Ishitani R., *Tsukazaki T, *Nureki O. Crystal structure of Escherichia coli YidC, a membrane protein chaperone and insertase. *Sci Rep* **4**, 7299 (2014). 査読有
3. Takeda H, Hattori M, Nishizawa T, Yamashita K, Shah STA, Caffrey M, Maturana AD, *Ishitani R., Nureki O*. Structural basis for ion selectivity revealed by high-resolution crystal structure of Mg²⁺ channel MgtE. *Nat. Commun.* **5**, 5374 (2014) 査読有
4. Kobayashi K, Katz A, Rajkovic A, Ishii R, Branson OE, Freitas MA, Ishitani R., Ibba M, *Nureki O. The non-canonical hydroxylase structure of YfcM reveals a metal ion-coordination motif required for EF-P hydroxylation. *Nucleic Acids Res* **42**, 12295-12305 (2014) 査読有
5. Kobayashi K, Suzuki T, Dohmae N, Ishitani R., *Nureki O. Crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of YfcM: an important factor for EF-P hydroxylation. *Acta Crystallogr* **F70**, 1236-1239 (2014) 査読有
6. Kumazaki K, Tsukazaki T, Nishizawa T, Tanaka Y, Kato HE, Nakada-Nakura Y, Hirata K, Mori Y, Suga H, Dohmae N, Ishitani R., *Nureki O. Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of YidC, a membrane-protein chaperone and insertase from *Bacillus halodurans*. *Acta Crystallogr.* **F70** 1056-1060 (2014). 査読有
7. Tominaga T, Kobayashi K, Ishii R, Ishitani R., *Nureki O. Structure of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondrial Qri7 in complex with AMP. *Acta Crystallogr* **F70**, 1009-1014 (2014) 査読有
8. Morita J, Kato K, Mihara E, Ishitani R., Takagi J, Nishimasu H, Aoki J, *Nureki O. Expression, purification, crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of Enpp6. *Acta Crystallogr* **F70**, 794-799 (2014). 査読有
9. Suzuki H, Nishizawa T, Tani K, Yamazaki Y, Tamura A, Ishitani R., Dohmae N, Tsukita S, *Nureki O, *Fujiyoshi Y. Crystal structure of a claudin provides insight into the

- architecture of tight junctions. *Science* **344**, 304-307 (2014). 査読有
10. Kumazaki K, Chiba S, Takemoto M, Furukawa A, Nishiyama K, Sugano Y, Mori T, Dohmae N, Hirata K, Nakada-Nakura Y, Maturana AD, Tanaka Y, Mori H, Sugita Y, Arisaka F, Ito K, Ishitani R, Tsukazaki T*, Nureki O*. Structural basis for Sec-independent membrane protein insertion by YidC. *Nature* **509**, 516-520 (2014). 査読有
 11. Yamagata K, Goto Y, Nishimasu H, Morimoto J, Ishitani R, Dohmae N, Takeda N, Nagai R, Komuro I, Suga H*, Nureki O*. Structural Basis for Potent Inhibition of SIRT2 Deacetylase by a Macrocyclic Peptide Inducing Dynamic Structural Change. *Structure*, **22** 345-352 (2014). 査読有
 12. Kato K, Ishii R, Goto E, Ishitani R, *Tokunaga F, *Nureki O. Structural and functional analyses of DNA-sensing and immune activation by human cGAS. *PLoS One*, **8** e76983 (2013). 査読有
 13. Doki S, Kato HE, Solcan N, Iwaki M, Koyama M, Hattori M, Iwase N, Tsukazaki T, Sugita Y, Kandori H, *Newstead S, *Ishitani R, *Nureki O. Structural basis for dynamic mechanism of proton-coupled symport by the peptide transporter POT. *Proc. Natl Acad. Sci. U. S. A.*, **110** 11343-11348 (2013). 査読有
 14. Nishizawa T, Kita S, Maturana AD, Furuya N, Hirata K, Kasuya G, Ogasawara S, Dohmae N, Iwamoto T, *Ishitani R, *Nureki O, Structural basis for the counter-transport mechanism of a H⁺/Ca²⁺ exchanger. *Science*, **341** 168-172 (2013). 査読有
 15. Kawaguchi M, Okabe T, Okudaira S, Nishimasu H, Ishitani R, Kojima H, Nureki O, Aoki J, *Nagano T, Screening and X-ray crystal structure-based optimization of autotaxin (ENPP2) inhibitors, using a newly developed fluorescence probe. *ACS Chem Biol.*, **8** 1713-1721 (2013). 査読有
 16. Tanaka Y, Hipolito CJ, Maturana AD, Ito K, Kuroda T, Higuchi T, Katoh T, Kato HE, Hattori M, Kumazaki K, Tsukazaki T, Ishitani R, *Suga H, *Nureki O, Structural basis for the drug extrusion mechanism by a MATE multidrug transporter. *Nature*, **496** 247-251 (2013). 査読有
 17. Nozawa K, Ishitani R, Yoshihisa T, Sato M, Arisaka F, Kanamaru S, Dohmae N, Mangroo D, Senger B, Becker HD, *Nureki O, Crystal structure of Cex1p reveals the mechanism of tRNA trafficking between nucleus and cytoplasm. *Nucleic Acids Res.*, **41** 3901-3914 (2013). 査読有
 18. Ishii R, Isogaya K, Seto A, Koinuma D, Watanabe Y, Arisaka F, Yaguchi SI, Ikushima H, Dohmae N, Miyazono K, Miyazawa K, *Ishitani R, *Nureki O. Structure of a dominant-negative helix-loop-helix transcriptional regulator suggests mechanisms of autoinhibition. *EMBO J.* **31**, 2541-2552 (2012). 査読有
 19. Nishimasu H, Ishitani R, Aoki J, *Nureki O. A 3D view of autotaxin. *Trends Pharmacol Sci.*, **33** 138-145 (2012). 査読有
 20. Kato HE, Zhang F, Yizhar O, Ramakrishnan C, Nishizawa T, Hirata K, Ito J, Aita Y, Tsukazaki T, Hayashi S, Hegemann P, Maturana AD, Ishitani R, *Deisseroth K, *Nureki O. Crystal structure of the channelrhodopsin light-gated cation channel. *Nature* **482**, 369-374 (2012). 査読有
 21. Fukuhara S, Nishimasu H, Bonfond L, Matsumoto N, Ishitani R, *Nureki O, Expression, purification, crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of Zucchini from *Drosophila melanogaster*. *Acta Crystallogr.*, **F68** 1346-1350 (2012). 査読有
 22. Nishimasu H, Ishizu H, Saito K, Fukuhara S, Kamatani MK, Bonfond L, Matsumoto N, Nishizawa T, Nakanaga K, Aoki J, Ishitani R, Siomi H, *Siomi MC, *Nureki O, Structure and function of Zucchini endoribonuclease in piRNA biogenesis. *Nature*, **491** 284-287 (2012). 査読有
 23. Kato K, Nishimasu H, Okudaira S, Mihara E, Ishitani R, *Takagi J, *Aoki J, *Nureki O, Crystal structure of Enpp1, an extracellular glycoprotein involved in bone mineralization and insulin signaling. *Proc. Natl Acad. Sci. U. S. A.*, **109** 16876-16881 (2012). 査読有
 24. Koyama M, Nishimasu H, *Ishitani R, *Nureki O, Molecular Dynamics Simulation of Autotaxin: Roles of the Nuclease-like Domain and the Glycan Modification. *J. Phys. Chem. B*, **116** 11798-11808 (2012). 査読有
 25. *Tokunaga F, Nishimasu H, Ishitani R, Goto E, Noguchi T, Mio K, Kamei K, Ma A, Iwai K, *Nureki O, Specific recognition of linear polyubiquitin by A20 zinc finger 7 is involved in NF- κ B regulation. *EMBO J.*, **31** 3856-3870 (2012). 査読有
 26. Kobayashi K, Saito K, *Ishitani R, Ito K, *Nureki O, Structural basis for translation termination by archaeal RF1 and GTP-bound EF1 α complex. *Nucleic Acids Res.*, **40** 9319-9328 (2012). 査読有
 27. Kato K, Nishimasu H, Mihara E, Ishitani R, Takagi J, Aoki J, *Nureki O, Expression, purification, crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of Enpp1.

Acta Crystallogr **F68** 778-782 (2012). 査読有

28. Echizen Y, Tsukazaki T, Dohmae N, Ishitani R, *Nureki O. Crystallization and preliminary X-ray diffraction of the first periplasmic domain of SecDF, a translocon-associated membrane protein, from *Thermus thermophilus*. *Acta Crystallogr*. **F67**, 1367-1370 (2011). 査読有
29. Tsukazaki T, Mori H, Echizen Y, Ishitani R, Fukai S, Tanaka T, Perederina A, Vassylyev DG, Kohno T, Maturana AD, *Ito K, *Nureki O. Structure and function of a membrane component SecDF that enhances protein export. *Nature* **474**, 235-238 (2011). 査読有

〔学会発表〕(計8件)

1. 石谷隆一郎, 先端放射光を用いたチャネル・トランスポーターの高分解能構造解析と分子機構の解明, 日本放射光学会, 立命館大学びわこくさつキャンパス, 2015年01月11日~2015年01月11日
2. 石谷隆一郎, 炎症応答に関わる因子とその機能をモデレートする化合物の構造生物学 — Cyclic GMP-AMP 合成酵素の結晶構造 —, 第37回日本分子生物学会年会, パシフィコ横浜会議センター, 2014年11月25日~2014年11月25日
3. 石谷隆一郎, 炎症応答に関わる因子の構造生物学 Cyclic GMP-AMP 合成酵素の結晶構造, 第87回日本生化学会大会, 国立京都国際会館, 2014年10月16日~2014年10月16日
4. Ryuichiro Ishitani, Crystal structure of channelrhodopsin — a light-gated cation channel —, 16th International Congress on Photobiology, Universidad Nacional de Cordoba, Cordoba, Argentina, 2014年09月08日~2014年09月08日
5. 石谷隆一郎, シグナル伝達にかかわる因子 Autotaxin の構造ベース創薬, 日本薬学会, 熊本, 2014年03月30日~2014年03月30日
6. Ryuichiro Ishitani, Crystal structure of YidC reveals a membrane protein insertion mechanism, Gordon Research Conference on Ligand recognition & molecular gating, Ventura CA, USA, 2014年03月23日~2014年03月28日
7. Ryuichiro Ishitani, Structural basis for mRNA surveillance by archaeal Pelota and GTP-bound EF1 α complex, EMBO Conference "Eukaryotic RNA Turnover: From Structural Insights to Diseases", Strasbourg, France, 2013年04月21日~2013年04月25日
8. 石谷隆一郎, 最先端のマイクロビームラインと計算機シミュレーションを用いた膜輸送

体の構造生物学, 蛋白質科学会, とりぎん文化会館, 鳥取市, 2013年06月12日~2013年06月14日

〔図書〕(計1件)

石谷隆一郎, 西増弘志, 高木淳一, 青木淳賢, 濡木理, 脂質メディエーター産生酵素オートタキシンの構造機能解析, 実験医学増刊 Vol.30 No.5 42-48 (2012)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)
取得状況(計0件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石谷 隆一郎 (ISHITANI, Ryuichiro)
東京大学・大学院理学系研究科・准教授
研究者番号: 90361568

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者