

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：10101

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：22121008

研究課題名（和文）シグナル抑制因子CBLの分子複合体構造と病因変異の解析

研究課題名（英文）Structural analysis of CBL protein complexes as a signal suppressor

研究代表者

稲垣 冬彦（Inagaki, Fuyuhiko）

北海道大学・先端生命科学研究科（研究院）・特任教授

研究者番号：70011757

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 63,300,000円

研究成果の概要（和文）：CBLはE3酵素として受容体型、非受容体型チロシンキナーゼの分解に関与する。CBLの機能不全はガン化や重篤な免疫不全を示す。CBLのE3活性はY371のリン酸化により制御されているがその機構は不明である。今回、非リン酸化体、およびリン酸化体CBLについてNMR法を用いて構造を明らかにした。非リン酸化体ではE2酵素との結合部位はマスクされているが、リン酸化にともないマスクが外れ、E2酵素と効率的に結合しユビキチン化を促進する事がわかった。CBLのY371のリン酸化を行うFGFRは秩序だった自己リン酸化過程を経て活性化される。今回活性化ループの自己リン酸化に関与する二量体構造を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：CBL is a RING-type E3 ubiquitin ligase that functions as a negative regulator of T-cell activation and growth factor receptor and nonreceptor-type tyrosine kinase signaling. NMR and small angle X-ray scattering analyses revealed that the unphosphorylated N-terminal region of CBL forms a compact structure by an intramolecular interaction, which masks interaction surface of the RING domain with an E2 ubiquitin-conjugating enzyme. Phosphorylation of Y371 disrupts the interdomain interaction to expose the E2 binding surface of the RING domain for efficient ubiquitination. Ordered phosphorylation is required for receptor tyrosine kinase (RTK) activation; a process mediated by transient dimer formation of the kinase domains. This process is triggered by the tyrosine phosphorylation in the activation-loop. Here, we report structural and biochemical analyses of the tyrosine kinase domain interaction of FGFR required for the initial phosphorylation step.

研究分野：構造生物学、NMR

キーワード：チロシンキナーゼ 過度的複合体 同位体ラベル NMR ナノディスク

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) シグナル抑制因子としての CBL タンパク質複合体の解析

CBL は細胞内シグナル伝達タンパク質である。E3 として様々な受容体型、非受容体型チロシンキナーゼ (PTK: Protein Tyrosine Kinase) のユビキチン化を促進し、シグナル伝達の抑制因子として機能する。CBL の変異は多くの疾患の原因ともなっており、医学的にも CBL の構造と機能解明は重要である。CBL は FGFR が Y371 をリン酸化することにより活性化され E3 として機能する。CBL のユビキチン化の標的には EGFR、c-KIT、PDGFR などの成長因子受容体が挙げられ、ガンとの関係も深い。また、免疫系の Syk、Zap-70、Lck、Fyn なども標的としており、免疫シグナルの抑制因子としても重要である。特に、T 細胞アネルギーの誘導では必須の役割を果たすことが知られており、CBL の 1 種である CBL-B をノックアウトしたマウスでは重篤な自己免疫疾患を発症することが知られている。以上重要な疾患と関連する CBL の Y371 (CBL-B では Y363) リン酸化機構について構造的な見地より解明が待たれている。

CBL をリン酸化する成長因子レセプターの活性化機構は多段階の自己リン酸化過程を経る。特に FGFR1 については、それぞれのリン酸化複合体についてさまざまな酵素・基質複合体が形成され、リン酸化が進むことが結晶構造に見られるクリスタルコンタクトの解析より示唆されているが、より生理的条件下に近い溶液での複合体形成の解明が必須である。

### (2) アダプター分子としての CBL 複合体の解析と糖代謝の亢進

CBL はインスリン受容体 (InsR) の下流においてシグナル伝達のアダプター分子として糖輸送担体 GLUT4 の細胞膜への移行を促進し、細胞内へのグルコースの取り込みを促進する。この過程において CBL の Y371 のリン酸化を契機としてインスリン受容体からラフトへの CBL の局在変化がおきるが、その分子機構はいまだ解明されていない。

## 2. 研究の目的

### (1) シグナル抑制因子としての CBL タンパク質複合体の解析

CBL では N 末端領域にある helix-linker 領域、E2 との結合に関わる RING ドメインのミスセンス変異、helix-linker 領域以降を欠損するナンセンス変異が急性骨髄性白血病で報告されている。CBL-B についても I 型糖尿病変異が TKB ドメイン内に 2 箇所報告されている。RING ドメイン内の変異についてはいずれも E2 との結合サイト、もしくは RING ドメインの構造維持に不可欠な Zn-finger に存在し、E2 との結合性の低下や RING ドメインの構造異常が疾患メカニズムとして推測される。Y371

の変異についてはリン酸化による活性化を受けなくなるためと考えられるし、TKB ドメインの変異は基質認識に関わる SH2 ドメインの残基の変異であり、基質との親和性の低下によるためと推測される。本研究課題では CBL を中心とし、Y371 のリン酸化が制御する複合体形成を構造生物学的に解析し CBL 変異による免疫疾患等のメカニズムを解明することを主たる目的とする。そのために、非リン酸化体における自己阻害機構、リン酸化による活性化機構と E2 との複合体形成機構、成長因子レセプター等の基質タンパク質認識機構を明らかにする。

FGFR1 の活性化ループ上のチロシン Y653 のリン酸化はリン酸化カスケードの最初のリン酸化部位である。この部位のチロシンの自己リン酸化には一方の FGFR1 を酵素、他方の FGFR1 を基質とする酵素 基質複合体の形成が必要となる。本研究では活性化ループのチロシンリン酸化に必要な酵素 基質複合体の構造について NMR 法、cross link 実験に基づいて明らかにする。

### (2) アダプター分子としての CBL 複合体の解析と糖代謝の亢進

CBL はインスリン受容体 (InsR) の下流においてシグナル伝達のアダプター分子としても機能する。InsR→APS→CBL→CAP→CrkII→C3G→TC10 の経路を介して糖輸送担体 GLUT4 の細胞膜への移行を促進し、細胞内へのグルコースの取り込みを促進する。この過程において CBL の Y371 のリン酸化を契機として dynamic にシグナル複合体が切り替わり、InsR 周辺からラフトへとシグナル複合体の局在を変化させる。複合体切り替えのスイッチ機構を明らかにする。

## 3. 研究の方法

### シグナル抑制因子としての CBL タンパク質複合体の解析

CBL は TKB ドメイン Helix-linker-RING ドメインの構成を持つ。E3 酵素として働く場合には、TKB は成長因子レセプター等の基質認識に、Helix-linker 上の Y371 のリン酸化により E2 酵素との親和性が増大し、CBL の E3 活性が顕著に亢進し、基質のユビキチン化がおこなわれる。これまでのところ、非リン酸化体について X 線結晶構造解析が CBL と E2 複合体について行われたが、活性化機構についてはいまだ不明な点が多い。今回リン酸化による E3 活性亢進の機構を明らかにするために、リン酸化前後による CBL の構造変化を X 線小角散乱を用いて調べる。ついで Sortase を用いたタンパク質ライゲーション法により、<sup>15</sup>N 同位体ラベルを行った Helix-linker-RING と TKB のライゲーションを行う。また、Helix-linker-RING の <sup>13</sup>C/<sup>15</sup>N 同位体ラベル体を作製し、リン酸化による構造変化の有無を

検討する。CBL 全体の構造変化をみるため、非リン酸化体、リン酸化体について Met のメチル基のみを  $^{13}\text{C}$  でラベルした CBL を作製し、Met メチル基をプローブとして構造的知見を得る。次いで、Met メチル基の帰属を変異体を作成して確認する。Y371 のリン酸化には FGFR1 を用いる。また、E3 活性の亢進を調べるため、各種変異体を作製し CBL の自己ユビキチン化アッセイを行う。

#### 4. 研究成果

##### (1) シグナル抑制因子としての CBL タンパク質複合体の解析

CBL の非リン酸化体、Y371 リン酸化体について X 線小角散乱を測定した。慣性半径は非リン酸化体で 24 オングストローム、リン酸化体では 27 オングストロームとリン酸化体では大きな慣性半径をとることが分かった。つぎに  $^{15}\text{N}$  同位体ラベルを行った Helix-linker-RING と Sortase 反応を用いて  $^{15}\text{N}$  同位体ラベルを行った Helix-linker-RING と TKB を繋ぎ合せた CBL を作製した。非リン酸化体では Helix-linker-RING はシャープなシグナルを与えるのに対し、CBL と繋ぎあわされた Helix-linker-RING のシグナルはブロードであり、TKB と相互作用を行っていることが分かった。そこで、CBL の  $^{13}\text{C}$  メチル Met 体を作製し、HMQC スペクトルを観測した。なお、Met 変異体を作製し、各 Met の帰属を行った。

NMR スペクトル解析より、TKB の SH2 部分が Helix 部分と相互作用していることが分かった。次いでリン酸化体では CBL の Helix-linker-RING 部位はシャープなシグナルを与えた。これらのシグナルは Helix-linker-RING 単独のシグナルとよく対応することから、リン酸化により、helix を介した TKB との相互作用はきられ、独立した構造ユニットとして存在することがわかった。そこで helix-linker-RING について  $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$  体を作製し、定法に従い構造を解析した。興味深いことに、リン酸基は RING の塩基性残基と相互作用を行うこと、Helix-linker-RING の N 末端部位と C 末端部位が平衡の  $\beta$ -sheet を組み全体としてコンパクトな構造を取ることが分かった。すなわち、Helix-linker-RING はリン酸化により一つの構造体として TKB より離れ、E2 を認識するものと思われた。E2 と Helix-linker-RING はリン酸化により相互作用が強まり、より効率的に E2 が RING にリクルートされ、自己ユビキチン化が行われる。今回得られた結果に基づき、TKB と Helix-linker-RING 相互作用部位および Helix-linker-RING と E2 相互作用部位にそれぞれ変異を加え CBL の自己ユビキチン化活性を測定した。結果は、TKB と Helix-linker-RING との相互作用を弱める変異は非リン酸化体でも自己ユビキチン化能が亢進することが確かめられた。既に報告されている非リン酸化体の結晶構造解析の問題

点は TKB SH2 による基質の認識部位と E2 上のユビキチン化を行う部位が TKB の反対側 50 オングストローム以上離れた場所に位置していることであった。しかし、今回の解析より、Helix-linker-RING はリン酸化に伴い TKB より離れより基質リン酸化ペプチド近傍に位置できること、その結果、基質のユビキチン化が効率よく行われる可能性が示された。

CBL の活性化は FGFR1 によるリン酸化が契機となる。FGFR1 のキナーゼ活性は活性化ループのチロシンのリン酸化を契機として (50 倍のキナーゼ活性亢進)、キナーゼインサート、juxtamembrane region, C-terminal tail そして最後に活性化ループの 2 番目のチロシン残基のリン酸化と多段階かつ秩序立って行われ、キナーゼ活性は 1000 倍亢進する。X 線結晶構造解析より得られたクリスタルコンタクトより自己リン酸化過程で必要となる基質 酵素複合体の構造が示唆されてきた。しかし活性化ループ最初のチロシンのリン酸化に参与する酵素 基質複合体の構造についてはいまだ報告されていない。我々はこの問題の解決に溶液中のタンパク質の相互作用を明らかにすることが必要と考えた。チロシンキナーゼの調製は大腸菌では困難であることが報告されていたが、我々はチロシン脱リン酸化酵素を共発現することにより、非リン酸化体として発現すれば、大腸菌でも大量のチロシンキナーゼを調製できることを見出した。実際この発現方法をもちいることにより、数種のレセプター型チロシンキナーゼ、非レセプター型チロシンキナーゼを発現できることを確かめた。

これまでの結晶構造より、活性部位の近傍に存在する 2 つの塩基性残基が基質のリン酸化部位 1 残基前の酸性残基と相互作用し、活性部位にチロシン残基を提示していることが示されている。そこで、これら二つの塩基性残基の変異を行うとともに、活性化ループ最初のチロシンを除き残りのリン酸化部位のチロシンを欠如した変異体を作製した結果、単量体となる変異体の作製ができた。単量体は HSQC スペクトル上でシグナルはシャープであるのに対し、野生体では多くのシグナルがブロードあるいは消失していた。これは、野生体では一過性の基質 酵素複合体を形成するため、複合体形成に参与する残基は交換過程を反映してブロードあるいは消失したためと考えられた。これらの残基は活性化ループ、触媒ループを含む面に集中しており、特に活性化ループ上の残基はすべて消失していることが分かった。そこでマッピングの結果を受け、二量体形成に参与すると考えられる残基を Cys に変異し、クロスリンク実験を行った。この結果 FGFR の N-ローブ、C-ローブ同士が平行に配置され、それぞれの活性化ループのチロシンを相手の活性部位近傍に提示している可能性が示された。クロ

ス実験より得られた距離制限、および NMR 情報より得た相互作用面の情報を考慮して HADDOCK を用いて活性化ループ1番目のチロシンのリン酸化に必要な二量体モデルを構築した。ついで、このモデルに基づいて相互作用面を破壊する変異体を作製し、自己リン酸化能が落ちることを確認した。

(2) アダプター分子としての CBL 複合体の解析と糖代謝の亢進

CBL が関与する糖の取り込みの機構解明は医学的に重要な課題である。我々は、この問題の解決のために発現系の作製を進めてきたが、十分な発現量が得られなかったこと、むしろ、FGFR1 のキナーゼ活性の亢進機構のほうがより重要な課題となったため、(2)の課題を中止して(1)の課題に集中した。

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 20 件)

(1) Structural basis of starvation-induced assembly of the autophagy initiation complex. Fujioka Y., Suzuki SW., Yamamoto H., Kondo-Kakuta C., Kimura Y., Hirano H., Akada R., Inagaki F., Ohsumi Y., Noda NN. *Nat Struct Mol Biol.* 21(6):513-21 (2014).

doi: 10.1038/nsmb.2822.

査読有

(2) Structures and interface mapping of the TIR domain-containing adaptor molecules involved in interferon signaling. Enokizono Y., Kumeta H., Funami K., Horiuchi M., Sarmiento J., Yamashita K., Standley DM., Matsumoto M., Seya T., Inagaki F. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 110(49):19908-13 (2013).

doi: 10.1073/pnas.1222811110.

査読有

(3) Atg12-Atg5 conjugate enhances E2 activity of Atg3 by rearranging its catalytic site. Sakoh-Nakatogawa M., Matoba K., Asai E., Kirisako H., Ishii J., Noda NN., Inagaki F., Nakatogawa H., Ohsumi Y. *Nat Struct Mol Biol.* 20 (4):433-439 (2013).

doi: 10.1038/nsmb.2527.

査読有

(4) Structure of the Atg12-Atg5 conjugate reveals a platform for stimulating Atg8-PE conjugation. Noda NN., Fujioka Y., Hanada T., Ohsumi Y., Inagaki F. *EMBO Rep.*, 14(2):206-211 (2013).

doi: 10.1038/embor.2012.208.

査読有

(5) Crystallographic and NMR Evidence for Flexibility in Oligosaccharyltransferases and Its Catalytic Significance. Nyirenda J., Matsumoto S., Saitoh T., Maita N., Noda NN., Inagaki F., Kohda D. *Structure.*, 21(1):32-41 (2013)

doi: 10.1016/j.str.2012.10.011.

査読有

(6) Non-canonical recognition and ambiguous Ubl-loading to two distinct E2s by autophagy-essential E1, Atg7. Masaya Yamaguchi., Kazuaki Matoba., Ryoko Sawada., Yuko Fujioka., Hitoshi Nakatogawa., Hayashi Yamamoto., Yoshihiro Kobashigawa., Hisashi Hoshida., Rinji Akada., Yoshinori Ohsumi., Nobuo N. Noda., Inagaki Fuyuhiko. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 19(12):1250-1256 (2012).

doi: 10.1038/nsmb.2451.

査読有

(7) NMR analyses of the interaction between the FYVE domain of early endosome antigen 1 (EEA1) and phosphoinositide embedded in a lipid bilayer. Yokogawa M., Kobashigawa Y., Yoshida N., Ogura K., Harada K., Inagaki F. *J Biol Chem.*, 287(42):34936-34945 (2012).

doi: 10.1074/jbc.M112.398255.

査読有

(8) Structure-based analyses reveal distinct binding sites for Atg2 and phosphoinositides in Atg18. Watanabe Y., Kobayashi T., Yamamoto H., Hoshida H., Akada R., Inagaki F., Ohsumi Y., Noda NN. *J Biol Chem.*, 287(38) : 31681-31690 (2012). doi: 10.1074/jbc.M112.397570.

査読有

(9) Structural insights into Atg10-mediated formation of the autophagy-essential Atg12-Atg5 conjugate. Yamaguchi M., Noda NN., Yamamoto H., Shima T., Kumeta H., Kobashigawa Y., Akada R., Ohsumi Y., Inagaki F., *Structure.*, 20(7):1244-1254 (2012).

doi: 10.1016/j.str.2012.04.018.

査読有

(10) Structure of the novel C-terminal domain of vacuolar protein sorting 30/autophagy-related protein 16 and its specific role in autophagy. Noda NN., Kobayashi T., Adachi W., Fujioka Y., Ohsumi Y., Inagaki F. *J Biol Chem.*, 287(20):16256-16266 (2012).

doi: 10.1074/jbc.M112.348250

査読有

(11) Solution structures of yeast Saccharomyces

cerevisiae calmodulin in calcium- and target peptide-bound states reveal similarities and differences to vertebrate calmodulin. Ogura K, Kumeta H, Takahasi K, Kobashigawa Y, Yoshida R, Itoh H, Yazawa M, Inagaki F., *Genes Cells*. 17, 159-172 (2012).

doi: 10.1111/j.1365-2443.2012.01580.x.

査読有

(12) Autoinhibition and phosphorylation-induced activation mechanisms of human cancer and autoimmune disease-related E3 protein Cbl-b. Kobashigawa Y, Tomitaka A, Kumeta H, Noda NN, Yamaguchi M, Inagaki F., *Proc Natl Acad Sci U S A*. 108, 20579-20584 (2011).

doi: 10.1073/pnas.1110712108

査読有

(13) Structural basis of Atg8 activation by a homodimeric E1, Atg7. Noda NN, Satoo K, Fujioka Y, Kumeta H, Ogura K, Nakatogawa H, Ohsumi Y, Inagaki F., *Mol Cell*. 44, 462-475 (2011). doi: 10.1016/j.molcel.2011.08.035.

査読有

(14) An NMR strategy for fragment-based ligand screening utilizing a paramagnetic lanthanide probe. Saio T, Ogura K, Shimizu K, Yokochi M, Burke TR Jr, Inagaki F., *J Biomol NMR*. 51, 395-408 (2011).

doi: 10.1007/s10858-011-9566-5.

査読有

(15) An evaluation tool for FKBP12-dependent and -independent mTOR inhibitors using a combination of FKBP-mTOR fusion protein, DSC and NMR. Sekiguchi M, Kobashigawa Y, Kawasaki M, Yokochi M, Kiso T, Suzumura KI, Mori K, Teramura T, Inagaki F., *Protein Eng Des Sel*. 24, 811-817 (2011).

doi: 10.1093/protein/gzr045.

査読有

(16) Phosphoinositide-incorporated lipid-protein Nanodiscs: A tool for studying protein-lipid interactions. Kobashigawa Y, Harada K, Yoshida N, Ogura K, Inagaki F., *Anal Biochem*. 410, 77-83 (2011).

doi: 10.1016/j.ab.2010.11.021.

査読有

(17) Ser386 phosphorylation of transcription factor IRF-3 induces dimerization and association with CBP/p300 without overall conformational change. Takahasi K., Horiuchi M., Fujii K., Nakamura S., Noda NN., Yoneyama M., Fujita T., Inagaki F., *Genes Cells*. 15, 901-910 (2010).

doi: 10.1111/j.1365-2443.2010.01427.x.

査読有

(18) Structure determination of proteins in <sup>2</sup>H<sub>2</sub>O solution aided by a deuterium-decoupled 3D HCA(N)CO experiment. Ogura K., Kumeta H., Inagaki F., *J Biomol NMR*. 47, 243-248 (2010).

doi: 10.1007/s10858-010-9431-y.

査読有

(19) Solution structure of a novel Cdc42-binding module of Bem1 and its interaction with Ste20 and Cdc42. Takaku T., Ogura K., Kumeta H., Yoshida N., Inagaki F., *J Biol Chem*. 285, 19346-19353 (2010).

doi: 10.1074/jbc.M110.116749.

査読有

(20) PCS-based structure determination of protein-protein complexes. Saio T., Yokochi M., Kumeta H., Inagaki F., *J Biomol NMR*. 46, 271-280 (2010).

doi: 10.1007/s10858-010-9401-4.

査読有

〔学会発表〕(計 11件)

1) Fuyuhiko Inagaki, Paramagnetic lanthanide probe visualizes change of domain orientation induced by substrate and inhibitor binding and is a useful tool for drug screening. The 5th Japan-Taiwan Bilateral NMR Symposium. 2014.9-29 北海道大学(北海道札幌市)

2) Fuyuhiko Inagaki, Paramagnetic lanthanide probe visualizes change of domain orientation induced by substrate and inhibitor binding and is a useful tool for drug screening. ICMRBS 2014, 2014.8.24-8.29 (ダラス、アメリカ)

- 3) 稲垣 冬彦, 常磁性イオンを利用した長距離情報の取得 /Acquirement of long distance information using paramagnetic ion. 第14回日本蛋白質科学会年会, 2014.6-27 ワークピア横浜 / 横浜産貿易ホール マリネリア(神奈川県横浜市)
- 4) Fuyuhiko Inagaki, Structural Biology of Innate Immunity. Towards Comprehensive Understanding of Immune Dynamism 2012.10.29-11.1 大阪大学銀杏会館(大阪府吹田市)
- 5) Fuyuhiko Inagaki, NMR-based drug discovery utilizing paramagnetic lanthanide probe. 2010 International Conference on Magnetic Resonance in Biological Systems 2012, 2012.8.19-8.24 (リヨン、フランス)
- 6) 稲垣 冬彦, Lanthanide probe method and its application to ligand screening, 平成23年度日本分光学会年次講演会, 2011.11.30-12.2 理化学研究所 横浜研究所(神奈川県横浜市)
- 7) 稲垣 冬彦, Structural and Functional Studies of Proteins by NMR, プロテイン・アイランド・松山 国際シンポジウム 2011, 2011.9.21-9.23 松山全日空ホテル(愛媛県松山市)
- 8) 稲垣 冬彦, 小橋川 敬博, 久米田 博之, リン酸化により誘起されるタンパク質の構造変化と生物学的意義, 第49回日本生物物理学会年会, 2011.9.16-9.18. 兵庫県立大学姫路書写キャンパス(兵庫県姫路市)
- 9) 稲垣 冬彦, 小橋川敬博, 斎尾 智英, 構造細胞生物学研究を行う上で有用な NMR ツールの開発と応用 第11回日本蛋白質科学会年会, 2011.6.7-6-9. ホテル阪急エキスポパーク(大阪府吹田市)
- 10) Fuyuhiko Inagaki, NMR studies of molecular interaction using PCS and nanodisc. 2010 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies,

2010.12.15-12.20 (ホノルル、ハワイ)  
11) 稲垣 冬彦, 小橋川 敬博, 原田 幸祐, 内藤 雅人, 構造細胞生物学研究に有用なツール、BMB2010、2010.12.7-12.10. 神戸国際展示場(兵庫県神戸市)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等  
なし

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

稲垣 冬彦 (INAGAKI, Fuyuhiko)  
北海道大学大学院先端生命科学院  
特任教授  
研究者番号：70011757

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：