

平成 21 年 4 月 27 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2007 年度～2008 年度

課題番号：19710186

研究課題名 (和文) 受容体型チロシンキナーゼ活性制御機構における膜貫通部位・膜近傍部位の機能解析

研究課題名 (英文) Function of the transmembrane-juxtamembrane region of receptor tyrosine kinase in its activity regulation

研究代表者 佐藤 毅 (SATO TAKESHI)

大阪大学蛋白質研究所・助教

研究者番号：90403013

研究成果の概要：

本研究は細胞の発生や分化に重要な役割を果たしている受容体型チロシンキナーゼ,特に繊維芽細胞成長因子受容体(FGFR3)の活性化メカニズム,活性制御のメカニズムにおける膜貫通(TM)部位,細胞質内膜近傍(juxtamembrane:JM)部位の機能の解明を目的としたものである。FGFR3のTM-JM部位配列の合成化学的調製法を確立し,その方法を用いて調製した試料を用いることにより,当受容体TM-JM配列の構造解析を行った。その結果,野生型の配列,常時活性型変異が導入されたそれら二つの配列ではdimerization interface,さらにはJM部位の構造が異なるという知見を得た。この結果はTM部位での構造変化が, JM部位にも影響を与え,挙動の違いとして現れることを初めて示すものであり,受容体型チロシンキナーゼの機能発現メカニズムの解明に大きく貢献するものと考えている。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,000,000		2,000,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	390,000	3,690,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：生物分子科学・生物分子科学

キーワード：活性発現の分子機構

1. 研究開始当初の背景

膜蛋白質の構造解析に関しては多くの研究がなされている。受容体型チロシンキナーゼのような1回膜貫通型受容体に関しては、膜外部位の部分構造について、比較的多くの報告数があり、それらをもとに機能解析が行われている。一方、膜蛋白質の膜内在部位の構造、構造変化は、その機能発現機構における役割という観点では、当研究開始当初、ブラックボックスの中にあった。また、膜近傍部位は膜内在部位と膜外機能部位を物理的につなぐ役割のほか、様々な機能性分子が存在する生体膜との相互作用、または膜直下での機能に関与するが、構造解析においては「可視化」されていないことが多かった。従って、膜の外側での構造変化がどのようにして膜を介して膜の内側へと伝わって行くのかという問いに答えるべく本研究を開始した。

2. 研究の目的

上記、膜貫通 (TM) -細胞質内膜近傍 (JM) 部位の脂質二重膜中での構造解析を行い、膜の外側での構造変化がどのようにして膜を介して膜の内側へと伝わって行くのかを「可視化」、「モデル化」すること。

3. 研究の方法

構造解析は固体 NMR を中心とした各種分光学的手法により行った。

試料の調製は、各種解析手法に応じた部位特異的修飾に対応すべく合成化学的手法によって行うこととした。実験は研究対象である FGFR3 の TM-JM 配列をネイティブケミカルライゲーション法を用いた手法により調製する、その合成法の確立から行った。

合成法を確立した後、固体 NMR、FT-IR、蛍光測定などの分光学的手法により、ターゲットに関する脂質二重膜中での構造解析を行った。

4. 研究成果

(1) 試料の調製に関しては、TM 部位配列相当ペプチドチオエステル、JM 部位配列相

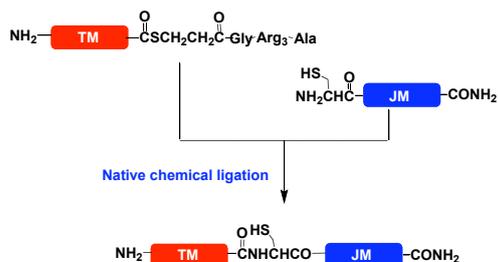


図 ネイティブケミカルライゲーション法による長鎖ペプチド合成

当ペプチドを合成ブロックとしネイティブ

ケミカルライゲーション法を用いた効率的な反応条件を見出すこととした。

ネイティブケミカルライゲーション法は、一般的には水系緩衝液中にて行う反応であり、膜貫通部位を含む合成ブロックは、界面活性剤を用いて可溶化する。各種条件検討の結果、今回の合成に関してはドデシルマルトシドを臨界ミセル濃度以下で用いることにより、最も効率よく反応を進行させることができた。

(2) (1)で得られた知見をもとに、TM-JM 部位配列ペプチドを調製し、脂質二重膜中での構造解析を CPMAS 固体 NMR により行ったところ、TM 部位は α -ヘリカル、JM 部位はランダムな構造を有していることがわかった。

(3) TM 部位ペプチドに関しては重水素固体 NMR により、野生型の配列、常時活性型変異が導入された配列に関して、それらの構造の比較を行ったところ、それら二つの配列では dimerization interface が異なるという結果を得た。

(4) TM-JM 部位配列のペプチドにおいて、JM 部位の脂質二重膜存在下での挙動の解析を行うこととした。TM-JM 配列ペプチドの C 末端に蛍光物質を導入し、脂質二重膜中に予め混入させた蛍光物質との FRET を観察することから、JM 部位と脂質二重膜との相互作用に関する知見を得るべく実験を行った。その結果、JM 部位は酸性脂質二重膜 (POPC/POPS) に対して、静電的に結合していること、そして、その結合は系内にカルシウム/カルモジュリンを導入すると消失することがわかった。この結果は McLaughlin らによって提唱されている EGFR の活性制御機能のモデル「Electrostatic Engine Model」(McLaughlin et al. J. Gen. Physiol. 2005) に矛盾しない。

(5) McLaughlin らによって提唱されている EGFR の活性制御機能のモデル「Electrostatic Engine Model」(McLaughlin et al. J. Gen. Physiol. 2005) では、細胞膜に 1%ほど含まれていると考えられている PIP₂ と EGFR の JM 部位との相互作用についても言及されている。そこで、FGFR3 についても、PIP₂ を混入させた脂質二重膜と JM 部位の相互作用を観察することとした。結果、PIP₂ を脂質二重膜に加えていくと、JM 部位が会合することが判った。さらに、その会合様式は、膜貫通部位における野生型配列と常時活性型変異体配列とで異なることを示唆する結果を得た。

これらの結果は TM 部位での構造変化が、JM 部位にも影響を与え、挙動の違いとして現れることを初めて示すものであり、

受容体型チロシンキナーゼの機能発現メカニズムの解明に大きく貢献するものと考えている。

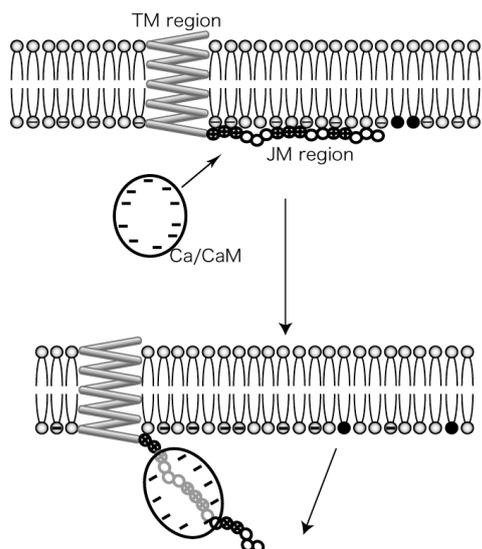


図 脂質二重膜中での TM-JM 部位配列ペプチドの構造と JM 部位とカルシウム/カルモジュリンとの相互作用を示すモデル

5. 主な発表論文等

雑誌論文] (計 9 件)

- 1) Toshiaki Hara, Akira Tainosho, Ken'ichiroh Nakamura, Takeshi Sato, Toru Kawakami and Saburo Aimoto, Peptide purification by affinity chromatography based on α -ketoacyl group chemistry J. Pept. Sci in press 査読あり
- 2) Takeshi Sato, Tzu-chun Tang, Gabriella Reubins, Jeffrey Z. Fei, Taiki Fujimoto, Pascal Kienlen-Campard, Stefan N. Constantinescu, Jean-Noel Octave, Saburo Aimoto and Steven O. Smith. A Helix-to-Coil Transition at the ϵ -Cut Site in the Transmembrane Dimer of the Amyloid Precursor Protein is Required for Proteolysis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 106, 1421-1426 (2009) 査読あり
- 3) Darryl Aucoin, Devin Camenares, Xin Zhao, Jay Jung, Takeshi Sato and Steven O. Smith, High resolution 1H MAS RFDR NMR of biological membranes J. Mag. Reson. in press 査読あり
- 4) Pascal Kienlen-Campard, Bernadette Tasiaux, Joanne Van Hees, Mingli Li, Sandra Huysseune, Takeshi Sato, Jeffrey Z. Fei, Saburo Aimoto, Pierre J. Courtoy, Steven O. Smith, Stefan N. Constantinescu, and Jean-Noel Octave Amyloidogenic processing but not acid production

requires a precisely oriented APP dimer assembled by transmembrane GXXXG motifs J. Biol Chem. 283 7733-7744 (2008) 査読あり

5) Takeshi Sato, Tzu-chun Tang, Gabriella Reubins, Jeffrey Z. Fei, Taiki Fujimoto, Hiroko Tamagaki, Pascal Kienlen-Campard, Stefan N. Constantinescu, Jean-Noel Octave, Steven O. Smith and Saburo Aimoto. Structure of the Transmembrane - Juxtamembrane Region of Amyloid Peptide Science 2008, 89-90. (2009) 査読あり

6) Ken'ichiroh Nakamura, Tomoya Uesugi, Takeshi Sato, Toru Kawakami, Saburo Aimoto; Peptide Thioester Synthesis Based on an N-S Acyl Shift Reaction. Peptide Science 2007, 41-42 (2008) 査読あり

7) Tomoya Uesugi, Ken'ichiroh Nakamura, Takeshi Sato, Toru Kawakami and Saburo Aimoto. Chemical Synthesis of the Extracellular

Juxtamembrane-Transmembrane Region of Thrombopoietin Receptor. Peptide Science 2007, 211-212 (2008), 査読あり

8) Yusuke Furukawa, Takeshi Sato, Chihiro Matsushita, Yuen H. Lam, Xin Zhao, Steven O. Smith and Saburo Aimoto. Structural Analysis of the Transmembrane-

Juxtamembrane Region of FGFR3. Peptide Science 2007, 319-320 (2008) 査読あり

9) Chihiro Matsushita, Takeshi Sato, Yusuke Furukawa, Yuen Han Lam, Xin Zhao, Steven O. Smith and Saburo Aimoto Structure of the Membrane Reconstituted Transmembrane-Juxtamembrane Peptide Neu(647-693) and Its Interaction with Ca²⁺/Calmodulin. Peptide Science 2007, 501-502 (2008) 査読あり

[学会発表] (計 11 件)

- 1) Takeshi Sato, Steven O. Smith and Saburo Aimoto. Structure of the transmembrane-juxtamembrane region of the amyloid precursor protein: Implication for proteolysis at the ϵ -cut site. Life Science against Intractable Diseases, The joint Symposium of the 4th International Symposium of Institutes Network and Osaka University Global COE Symposium, Hotel Hankyu Expo Park, Jan, 31-Feb. 1, 2009
- 2) Takeshi Sato, Steven O. Smith and Saburo Aimoto. Structure of the transmembrane-juxtamembrane region of single transmembrane proteins. The 7th OIB Symposium, 岡崎カンファレンスセンター,

岡崎 2008年11月12-13日

3) Takeshi Sato, Tzu-chun Tang, Gabriella Reubins, Jeffrey Z. Fei, Taiki Fujimoto, Hiroko Tamagaki, Pascal Kienlen-Campard, Stefan N. Constantinescu, Jean-Noel Octave, Steven O. Smith and Saburo Aimoto. Structure of the Transmembrane - Juxtamembrane Region of Amyloid Precursor Protein.; 第45回日本ペプチド討論会 2008 タワーホール船堀. 平成20年10月29-31日

4) Chihiro Matsushita, Takeshi Sato, Yusuke Furukawa, Yuen Han Lam, Xin Zhao, Steven O. Smith and Saburo Aimoto. Structural studies on the membrane reconstituted transmembrane-juxtamembrane region of ErbB2/Neu. 30th European Peptide Symposium, Finlandia Hall, Helsinki, Finland Aug31-Sep5, 2008.

5) 佐藤毅, 古川祐輔, 松下千紘, Steven O. Smith, 相本三郎; FGFR3 膜貫通-細胞質内膜近傍部位の構造解析; 第8回日本蛋白質科学会年会, タワーホール船堀. 平成20年6月10-12日.

6) Takeshi Sato, Yusuke Furukawa, Chihiro Matsushita, Steven O. Smith and Saburo Aimoto. Structure of the transmembrane and juxtamembrane region of Neu and FGFR3; 第30回日本分子生物学会/第80回日本生化学会 合同大会 パシフィコ横浜、ヨコハマ グランドイインターコンチネンタルホテル 横浜 2007年12月11-15日

7) Ken' ichiroh Nakamura, Tomoya Uesugi, Takeshi Sato, Toru Kawakami, Saburo Aimoto; Peptide Thioester Synthesis Based on an N-S Acyl Shift Reaction. 第44回日本ペプチド討論会 2007 富山国際会議場 富山 2007年11月6-9日 0-10

8) Tomoya Uesugi, Ken' ichiroh Nakamura, Takeshi Sato, Toru Kawakami and Saburo Aimoto. Chemical Synthesis of the Extracellular Juxtamembrane-Transmembrane Region of Thrombopoietin Receptor. 第44回日本ペプチド討論会 2007 富山国際会議場 富山 2007年11月6-9日 P139

9) Yusuke Furukawa, Takeshi Sato, Chihiro Matsushita, Yuen H. Lam, Xin Zhao, Steven O. Smith and Saburo Aimoto. Structural Analysis of the Transmembrane-Juxtamembrane Region of FGFR3. 第44回日本ペプチド討論会 2007 富山国際会議場 富山 2007年11月6-9日 P140

10) Chihiro Matsushita, Takeshi Sato,

Yusuke Furukawa, Yuen Han Lam, Xin Zhao, Steven O. Smith and Saburo Aimoto. Structure of the Membrane Reconstituted Transmembrane-Juxtamembrane Peptide Neu(647-693) and Its Interaction with Ca²⁺/Calmodulin 第44回日本ペプチド討論会 2007 富山国際会議場 富山 2007年11月6-9日 P141

11) 古川祐輔, 佐藤毅, Steven O. Smith, 相本三郎; ネイティブケミカルライゲーション法による FGFR3 膜貫通-膜近傍部位ペプチドの化学合成; 第7回日本蛋白質科学会年会; 平成19年5月24-26日 仙台 P133

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 毅 (SATO TAKESHI)
大阪大学・蛋白質研究所・助教
研究者番号: 90403013

(2) 研究分担者

該当なし ()

(3) 連携研究者

該当なし ()