

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24770087

研究課題名(和文)多様なシグナル伝達を調節するアダプター分子の制御機構解明

研究課題名(英文)Molecular basis regulating multiple signals by an adaptor protein

研究代表者

尾瀬 農之(OSE, TOYOYUKI)

北海道大学・薬学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：80380525

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円、(間接経費) 1,080,000円

研究成果の概要(和文)：乳がん特異的チロシンキナーゼ(Brk)は、正常乳腺組織において発現していない一方、乳がん細胞の60%以上という高頻度で発現がみられる。特にtriple negative(エストロゲン受容体・プロゲステロン受容体・HER2の3つのマーカーが確認されない)の乳がんは予後不良であるが、ヒトTNBC由来の培養細胞および腫瘍組織でBrkの発現が確認されている。ヒト乳がん培養細胞において、STAP-2とBrkの存在によりSTAT3およびSTAT5bが活性化された結果、細胞増殖が誘導されるため、それぞれのタンパク質を高純度調製し、生化学的・構造生物学的な手法により評価した。

研究成果の概要(英文)：The non-receptor tyrosine kinase breast tumor kinase (Brk), also known as PTK6, has been identified as a highly expressed Protein-tyrosine kinases in human melanocyte. STAP-2 is also known as breast tumor kinase (Brk) substrate (BKS). It is important to better understand the contribution of Brk kinase activity and protein interactions to the STAT3-mediated signal transduction pathways in breast cancer. Brk phosphorylates STAP-2 and phosphorylated STAP-2 is believed to play an important role in Brk-mediated STAT3 activation. We purified Brk, STAP-2, and STAT3 and checked the kinase activity in vitro. Using purified proteins, we also checked the binding affinity between Brk and STAP-2. The information obtained by small angle x-ray scattering (SAXS) experiments was also useful to judge whether the conformational change of Brk is included (open/closed).

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物化学

キーワード：シグナル伝達

## 1 . 研究開始当初の背景

乳がん特異的チロシンキナーゼ breast tumor kinase (Brk) は protein tyrosine kinase 6 (PTK6) と呼ばれ、正常乳腺組織において発現していない一方で乳がん細胞の 60%以上という高頻度で発現がみられるため、がんの発生と深く関わると考えられている。特に triple negative (エストロゲン受容体、プロゲステロン受容体および HER2 すべての発現が確認されない) の乳がん (TNBC) は予後不良であるが、ヒト TNBC 由来培養細胞および腫瘍組織においても Brk の発現が高頻度に確認されている。Brk は Src に類似したドメイン構成を有する一方で、N 末端側にパルミトイル化修飾配列をもたない。しかしがん細胞においては Brk の細胞内局在の変化が報告されている。

すでに同定されていたアダプタータンパク質 signal transducing adaptor protein (STAP) -2 は種々の疾患における機能に着目し研究が行われている。アダプタータンパク質 STAP-2 は、マクロファージにおける細胞骨格の再構成や破骨細胞の分化シグナルを伝える colony-stimulating factor-1 (CSF-1) の受容体 c-fms の細胞内ドメインをベイトとした yeast two-hybrid スクリーニング法により、マウス胎児肝臓 cDNA ライブラリーより同定された。さらに乳がん特異的キナーゼ Brk の基質として同定された Brk substrate (BKS) のマウスホモログであることも明らかになっていた。

## 2 . 研究の目的

STAP-2 の多くの機能がどのように生じるのか。Brk の活性調節はどのように生じるのか。STAP-2 による Brk の局在・活性調節メカニズムはどのように生じるのか。いくつかのドメインを含むチロシンキナーゼやアダプタータンパク質の立体構造は既にいくつか報告されているが、最初に報告された Src の自己阻害構造をはじめ、自己阻害した閉状態が主であり、ほとんどが 1 タンパク質のみあるいは短いペプチド等を含む構造である。それに対し本研究は、マルチドメインのタンパク質同士の活性化機構解析、特に複合体構造から直接明らかにすることを目指して行った。

## 3 . 研究の方法

### ( 1 )

昆虫細胞を用いた組換え Brk の精製

組換えタンパク質を発現させた Sf9 細胞を、平衡化バッファーで懸濁させ、超音波破碎した。遠心後上清を回収し、Ni-NTA または HisTrap FF 1ml を用いてアフィニティークロマトグラフィーにより精製を行った。TEV protease により 6xHis tag を除去し Ni-NTA または HisTrap 1ml FF を用いてアフィニテ

ィー精製を行った。HiLoad 16/60 Superdex 200 pg カラムを用いてゲルろ過クロマトグラフィーにより精製を行った。

### ( 2 )

昆虫細胞を用いた組換え STAP-2 の精製

Brk 同様、昆虫細胞 Sf9 細胞で大量発現をさせ、超音波破碎・遠心後に上清を回収し、Ni-NTA または HisTrap FF 1ml を用いてアフィニティークロマトグラフィーにより精製を行った。その後、ゲルろ過クロマトグラフィーにより最終標品を得た。

### ( 3 )

組換え STAT5b の大腸菌発現系構築

構築した STAT5b を含む発現プラスミドを用い、大腸菌 Rosetta 2 (DE3) を形質転換した。0.5 % sucrose を含む平衡化バッファーに菌体を懸濁させ、超音波破碎した。遠心して不溶画分を除き、上清をフィルターに通した後、HisTrap HP 5ml を用いてアフィニティークロマトグラフィーにより精製を行った。50 mM の imidazole を含むバッファーで洗浄した後、溶出バッファーを通すことで溶出させた。

### ( 4 )

Surface plasmon resonance (SPR) を用いた結合実験

調製した組換え Brk または bovine serum albumin (BSA) をセンサーチップ CM5 にアミンカップリング法で固定化した。固定化時には Brk を 10 mM Acetate pH5.0 バッファーで 10 倍に希釈した。各種パラメータ算出時に行った測定では、Biacore 2000 または 3000 を用いた際には流速  $50 \mu\text{g min}^{-1}$  で 30 秒間アナライトとして STAP-2 を流した。また Biacore T200 を用いた際には流速  $30 \mu\text{g min}^{-1}$  でアナライトとして STAP-2 を流し、連続で打ち込んだ (kinetic titration)。ランニングバッファー (10 mM Na-HEPES pH7.4 , 150 mM NaCl , 0.05% Tween20) を用い、25 °C で測定を行った。測定機器として Biacore 3000 , 2000 および T200 を使用した。

### ( 5 )

Small angle X-ray scattering (SAXS) による構造解析

濃縮したサンプルをフィルターに通した後、石英セルを用いて測定を行った。データ収集は高エネルギー加速器研究機構 (つくば) PF-AR 内のビームライン BL-10C で行った。データ収集にはハイブリッドピクセル検出器 PILATUS 100K を用いた。測定は 20 °C で 30 秒間 X 線を照射し行った。サンプルの濃度はチロシン非リン酸化型 Brk は 5 段階、その他は 3 段階にふって行った。

測定した二次元データをプログラム FIT2D により一次元化した。プログラム PRIMUS を用いて 4-5 回行った測定を平均化、ゼロ濃度

外挿した散乱曲線を算出, Guinier プロット解析 ( $\log I(q)$  versus  $q^2$ ,  $q$ は散乱ベクトル ( $|q| = 4 \pi \sin \theta / \lambda$ ),  $I(q)$ は  $q$ での散乱強度, Guinier プロットでは分子の大きさである慣性半径  $R_g$  および会合状態がわかる) および Kratky プロット解析 ( $I(q) \times q^2$  versus  $q$ , Kratky プロットではフォールディングの状態がわかる) をした. プログラム GNOM により距離分布関数  $P(r)$  ( $P(r)$ は  $I(q)$ の Fourier 変換,  $P(r)$ 関数は分子の概形を表しており, 分子内最大長  $D_{max}$  および Guinier プロットと独立に慣性半径  $R_g$ がわかる) を算出した. プログラム GASBOR またはプログラム DAMMIN を用いて散乱強度に対して *ab initio* モデルを構築した. 独立に得られた 10 個の *ab initio* モデルをプログラム DAMSEL で重ね合わせた後, プログラム DAMAVER で平均化した. さらにプログラム DAMFILT で平均化したモデルを残基数にフィッティングさせた. 結晶構造とビーズモデルの重ね合わせおよびビーズモデル同士の重ね合わせにはプログラム SUPCOMB を用いた.

#### 4. 研究成果

(1) STAP-2 が Brk のチロシンリン酸化活性に対しどのような影響を与えるのか解析した. まず HEK293T 細胞抽出物に組換え Brk および STAP-2 を加えることで細胞抽出物をチロシンキナーゼの基質とする whole-cell lysate キナーゼアッセイを行った. Brk 単独ではチロシンリン酸化されないが, STAP-2 と Brk の両方存在するときのみチロシンリン酸化されるタンパク質が存在する. この結果から, およそ 65 および 70kDa の移動度をもつタンパク質に対するチロシンキナーゼの活性は, STAP-2 により何らかの機序で亢進されることが確認され, その活性本体は STAP-2 により活性化された Brk であることが示唆された. 以後の実験では組換えタンパク質を用いて活性化機構の解析を行うことにした.

#### (2)

Brk と STAP-2 との SPR を用いた相互作用解析

SPR による結合実験には Brk をセンサーチップ CM5 にアミンカップリングで固定化し, ネガティブコントロールとして BSA を用いた. リガンドとして流したチロシン非リン酸化型の STAP-2 は, Brk との有意な結合がみられた.

#### (3)

X 線小角散乱解析から, STAP-2 はチロシンリン酸化の有無によらず, 部分的に unfold な構造をとることがわかった. これは STAP-2 のドメイン間の柔軟性および Pro 残基に富んだ C 末端側の存在によるものだと考えられる.

Brk と類似したドメイン構造をとるものと比較すると, 他のサブファミリーである Src は SH2 ドメインと C 末端のチロシンリン酸化サイトの相互作用が自己阻害に重要である<sup>16,17</sup>. Src や Abl<sup>18,19</sup> においては自己阻害構造の状態がチロシンキナーゼドメインの N ロープと C ロープの開閉を妨げることにより ATP の結合・解離を妨げているらしい<sup>17</sup>. キナーゼドメインのみについてのこれまでの構造解析によると活性化型はキナーゼドメインが閉状態になった状態であるが, Src や Abl のような自己阻害構造はこの閉状態をとることができない.

#### (4)

今回 Brk および STAP-2 全長の組換えタンパク質を大量調製することに成功した. 特にチロシンホスファターゼと共発現させることで組換え Brk を大腸菌で大量調製できるようになり, 様々な変異体解析を比較的容易に行うことができるようになった. さらに STAT5b についても全長の組換えタンパク質を大量調製することに成功した. 精製タンパク質の系を用いて, これらの活性化機構を詳細に解析できる構築することができるようになった.

昆虫細胞と大腸菌いずれを用いて調製した Brk も直接 STAP-2 をチロシンリン酸化することがわかった. また昆虫細胞と大腸菌それぞれから調製した Brk は, 翻訳後修飾が異なっている. 大腸菌から調製した Brk はチロシンリン酸化が検出されず自己リン酸化がすみやかに進んだが, 昆虫細胞より調製したものでは既にチロシンリン酸化されている状態で精製された.

活性評価のひとつとして行った whole-cell lysate キナーゼアッセイでは, STAP-2 存在下でのみ Brk により, 移動度から 65 および 70kDa と見積もられるタンパク質に対するチロシンリン酸化が亢進した. このことから STAP-2 は何らかの作用によりこれらのタンパク質に対する Brk の活性を向上させることがわかった. それは少なくとも局在変化の結果生じたものではない. またこれらのチロシンリン酸化タンパク質はその移動度から Akt, Sam68 または Paxillin であることが予想されるが, STAP-2 存在条件下での新規の Brk 基質である可能性も否定できず, その同定がひとつの課題であるだろう.

さらに *in vitro* kinase assay により STAT5a および STAT5b に対する Brk の活性が STAP-2 により亢進することがわかった. つまり STAP-2 は直接 Brk と相互作用し, 活性を亢進させていると考えられる.

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)

研究者番号:

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

神田諒, 関根雄一, 前仲勝実, 松田正, 尾瀬農之

結晶構造解析に向けた, 乳がん特異的キナーゼBrkとアダプタータンパク質STAP-2の機能解析

第36回日本分子生物学会年会

2013年12月3日-2013年12月6日

神戸国際会議場・神戸国際展示場・神戸ポートピアホテル(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:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

尾瀬 農之 (Toyoyuki Ose)

北海道大学・大学院薬学研究院・准教授

研究者番号: 80380525

(2) 研究分担者

( )

研究者番号:

(3) 連携研究者

( )