

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 24 日現在

機関番号：22604

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25650025

研究課題名(和文) プロテインキナーゼC全長の再構成と構造解析による活性制御機構の解明

研究課題名(英文) Structural study of reconstituted full length PKC

研究代表者

三島 正規 (Mishima, Masaki)

首都大学東京・理工学研究科・准教授

研究者番号：70346310

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：Protein kinase C (PKC) ファミリーはシグナル伝達を担う代表的なセリン・スレオニンキナーゼであり、N末端の制御ドメイン(C1、C2ドメイン)とC末端のキナーゼドメインから構成されるマルチドメインタンパク質である。最近PKCβ全長の結晶構造が報告されたが、その構造中では、C1Aドメインは観測されず、C2ドメインはパッキングの影響により突出していた。よってPKCの活性制御機構を議論するためには十分な構造とは言い難い。本研究では、タンパク質ライゲーション反応や常磁性緩和効果(PRE)を駆使することにより、各ドメインが正しい配置にある溶液中での構造決定を目的に研究を行った。

研究成果の概要(英文)：Protein kinase C (PKC) family is a multi-domain protein consists of N-terminal regulatory domains (C1 and C2 domain) and C-terminal kinase domain, and regulates a wide range of biological processes. In cytoplasm, PKC is thought to be autoinhibited by the interaction between regulatory domains and the kinase domain. Recently, the full-length crystal structure of PKCβII was reported. However, in this crystal structure, the C1A domain was not observed and the C2 domain was influenced by the crystal packing interaction. Therefore, the domain orientation and the interactions between the domains of PKC are still elusive. In this study, we are trying to determine the structures of full-length PKC proteins, PKCα and PKCθ, and investigate the regulation mechanism using long-range distance information derived from PRE detected by solution hetero-nuclear NMR.

研究分野：構造生物化学

キーワード：NMR マルチドメインタンパク質 sortase プロテインライゲーション PKC

1. 研究開始当初の背景

Protein kinase C (PKC) の構造解析は、1977 年の西塚らによる PKC α の発見以来、多くの構造研究者が取り組んだものの、全長の構造解析は難航した。PKC α は偽基質領域、連続した 2 つの C1 ドメインである C1A および C1B ドメイン (DAG 結合ドメイン) と、C2 ドメイン (Ca²⁺、IP₃ 結合ドメイン)、キナーゼドメインからなる。1995 年に Hurley らによる C1B ドメイン (PKC δ) の構造解析に始まり、各ドメイン単位ではその構造決定が報告され、部分的な構造情報は集積された。最近、2011 年 2 月に Hurley らによって PKC β II (α と同様のサブファミリー) の全長の結晶構造が報告されたが、この全長の結晶構造においても C1A ドメインは、動的な性質のため観測されず、また C2 ドメインは結晶中のパッキングにより不自然に飛び出していた。そのため不活性な自己阻害状態でもなく、活性化状態でもない状態での構造解析となっており、活性制御を議論するために十分な情報は得られていなかった。

2. 研究の目的

PKC の機能や活性化を理解するためには、全長のタンパク質を用いて、各ドメインが本来の相互作用をしている自己阻害状態の構造的知見が、まず必要である。さらにセカンドメッセンジャー等により活性型となり、膜と相互作用した活性化型の構造も重要である。ごく最近、脂質結合タンパク質 Apo-AI で脂質二重膜を封入したナノディスクを効率よく作成する技術が開発され、溶液状態で、脂質二重膜とタンパク質との相互作用が解析できるようになりつつある。本研究では、タンパク質ライゲーション、常磁性緩和効果 (PRE) の多次元 NMR による観測、X 線小角散乱 (SAXS) を用いて、自己阻害状態の全長構造の解析と、ナノディスク (脂質二重膜) 上に PKC α を再構成した、PKC α が機能する現場での立体構造を解析する。

3. 研究の方法

(1) 各ドメインの調製とドメイン間相互作用の検証

従来、PKC α の C1A ドメインは、大腸菌の発現系では可溶化せず、大量調製が困難であったため、構造解析は未だ報告されていない。

申請者は、C1A のシステイン残基と疎水性残基の二重変異体を作製することで大腸菌からの C1A ドメインの大量調製が可能な系を構築しており、これを用いて同位体標識を行って、NMR 信号の帰属を行う。まず NMR を用いて C1A の立体構造を決定する。また C1B、C2 ドメインの調製は容易かつ構造既知で、C1B-C2 タンデムの領域の NMR の測定、帰属もすでに存在している。C1A、C1B-C2 ドメインは、ライゲーションによって全長に再構成後の NMR 測定のため、重水素化とメチル選択的標識を施す。キナーゼドメインに関しては、カイコ個体の発現系を構築済みである。スピンラベルのためのシステイン変異体用のバックミドを調製し、カイコから変異体を調製する。

(2) タンパク質ライゲーションによる全長の再構成

調製した各ドメインをライゲーションする。連結によく利用される sortase のほか、2 種類のスプリットインテインを用いて、2 カ所の連結を行う。

(3) 再構成した PKC の機能の検証

再構成した PKC α が、実際、native の PKC と同等の自己阻害能と活性を有しているのか、検証する必要がある。連携研究者の理化学研究所の袖岡有機合成化学研究室の平井、袖岡らは、ヒト培養細胞を用いて、少量であるが、定常的に PKC α を調製する系を有している。そこで、再構成された PKC α を用いたアッセイを行う。

(4) PRE による構造情報の取得と溶液構造決定

全長のタンパク質を再構成する際、ドメインごとに安定同位体標識やスピンラベルを行うことで、曖昧さのない帰属が可能である。従来の NMR 測定法では、分子量等の問題により解析が困難であるので、タンパク質の重水素化とメチル TROSY を用いて先鋭化させた NMR 信号をプローブに、スピンラベルからの PRE を観測することで、立体構造情報を取得する。構造計算ではドメイン単体の構造を rigid body として扱う。また SAXS を併用することで、SAXS からドメイン間の相対配置に関する情報を取得する。これらの情報を統合して、自己阻害型の PKC α の立体構造と、PKC の足場としてナノディスクにセカンドメッセンジャーを埋め込んだものを用いて、活性型の構造 (ドメイン配置) を同様に決定する。

4. 研究成果

まずヒト PKC α において、全長蛋白質再構成のための数種のコンストラクトをデザインし、発現系の作製を行った。

(1) PKC α の C1A ドメイン

C1A ドメインの発現系を作製し、その発現を確認した結果、目的蛋白質の発現は確認できたが不溶性画分となった。これを改善するためシャペロンとの共発現、Trigger Factor との融合蛋白質としての発現、リフォールディングを行ったが、構造解析に適する目的蛋白質は得られなかった。PKC のアライメントに基づいた C1A ドメイン発現系のリコンストラクトを行う事により NMR サンプルを調製する事に成功し、C1A ドメインの良好な NMR スペクトルを得ることが出来た(図 1A)。また作成した C1A 変異体についてはフォスファチジルセリン、ジアシルグリセロールといったリガンドとの結合実験を行い、活性を保持している事を確認した。この変異体について多次元 NMR 法を用いて立体構造を決定した(図 2)。

(2) PKC α の C1B ドメイン

C1B ドメインの発現系を作製し、構造解析に適する目的蛋白質を得られた。このサンプルを用いて各種 NMR 測定を行い、96% (Pro を除く)の主鎖の化学シフトの帰属を完了した。図 1B)

(3) PKC α の C1B/C2 タンデムドメイン

C1B ドメイン、C2 ドメイン共に安定な NMR サンプルが得られる事を確認しており、それぞれの主鎖シグナルの帰属を完成させた(図 1C)。さらに ^1H - ^{13}C HSQC を測定し、どちらのサンプルについてもメチル領域においてシグナルの分離が良いスペクトルを得ることが出来た。C1B ドメインについては側鎖シグナルの帰属を行い、側鎖メチル基の帰属が完了している。

(4) PKC α の kinase ドメイン

kinase ドメインの発現系を作製し発現を確認した結果、目的蛋白質の発現は確認したが不溶性画分となった。これを改善するためシャペロンとの共発現を行ったが、構造解析に適する目的蛋白質は得られなかった。そこでカイコ個体の発現系用いて、カイコからキナーゼドメインの調製を行った。構造解析には十分な量ではないが、調製に成功した。またこの系で、PKB のキナーゼドメインの活性型での調製に成功した。

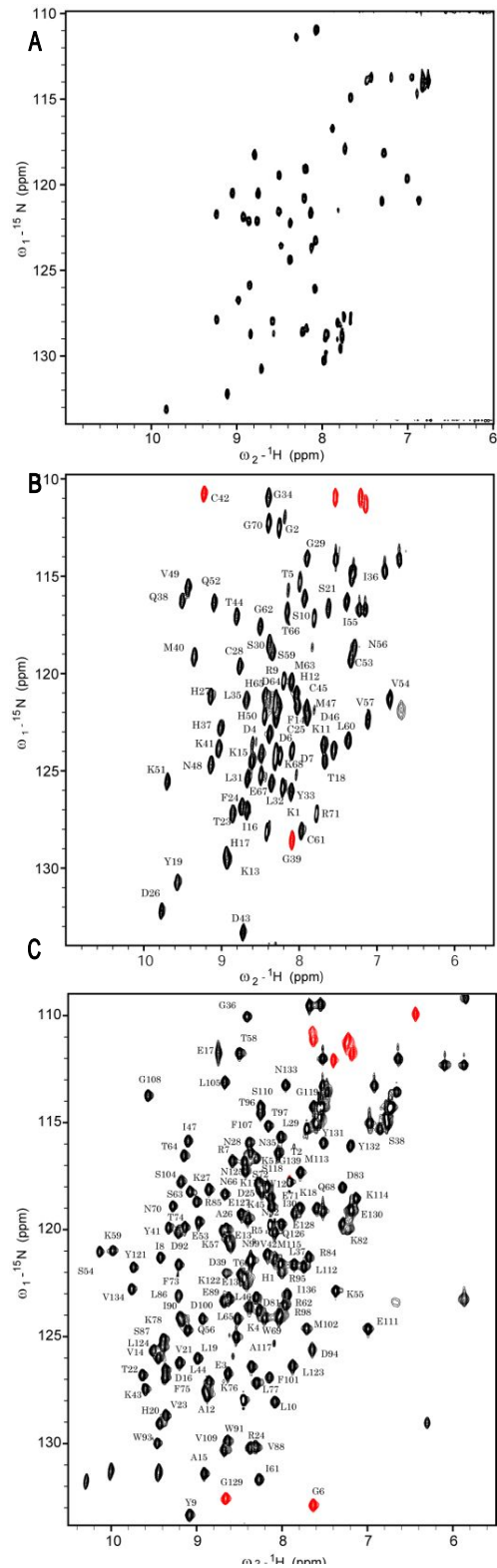


図 1 PKC α の各ドメインの ^1H - ^{15}N HSQC スペクトル

(A) C1A ドメイン (B) C1B ドメイン (C) C2 ドメイン



図2 PKCαのC1Aドメインの立体構造

(5) ナノディスク

ナノディスク形成に必要な Apo-A1 の発現系を作成し、大量培養、精製を行った Apo-A1 とリン脂質 DOPC を用いてナノディスクサンプルの作成を行った。作成したサンプルに関してゲルろ過を用いた分子量の検定と 31P NMR 測定を行い、実際にナノディスクが形成されている事を確認した。

(6) 他の PKC

次に PKCθ において、全長蛋白質再構成のための数種のコンストラクトをデザインし、発現系の作製を行った。

PKCθ においては、C2like ドメイン、C1A ドメイン、C1B ドメイン、kinase ドメイン、すべてのドメインの大腸菌の発現系を用いた調製に成功した。

(7) タンパク質ライゲーションによる全長の再構成

Sortase A を用いた結合実験において C2like ドメインと C1A-C1B ドメインの結合を確認できた (図3)。最適条件は氷上での反応開始から 48 時間後で濃度比 SortaseA : C2like : C1A-C1B = 1 : 1 : 1 であった。

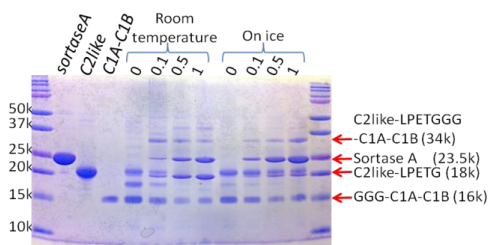


図3 sortase によるライゲーション

(8) PRE による構造情報の取得と構造解析
全長のタンパク質を再構成、ドメインごとに安定同位体標識やスピンラベルを行うことで、曖昧さのない帰属が可能である。また従来の NMR 測定法では、分子量等の問題により解析が困難であるので、タンパク質の重水素化とメチル TROSY を用いて先鋭化させた NMR 信号をプローブに、スピンラベルからの PRE を観測することで、立体構造情報を取得が有効である。このための選択的メチル化を PKCθ の C1B ドメインに対してを行い、NMR 測定に成功した。

< 引用文献 >

Leonard TA, Rózycki B, Saidi LF, Hummer G, Hurley JH. “Crystal structure and allosteric activation of protein kinase C βII.” *Cell*. 144, 2011, 55-66.

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4 件)

“Efficient and cost effective production of active-form human PKB using silkworm larvae”
Maesaki R, Satoh R, Taoka M, Kanaba T, Fujita C, Fujiwara T, Ito Y, Isobe T, Hakoshima T, Maenaka K and Mishima M

Scientific Reports 査読有4 2014 6016.

doi: 10.1038/srep06016

“Structural insights into the recruitment of SMRT by the co-repressor SHARP under phosphorylative regulation”

Mikami S, Kanaba T, Takizawa N, Kobayashi A, Maesaki R, Fujiwara T, Ito Y, Mishima M

Structure 査読有22 2014 35-46

doi: 10.1016/j.str.2013.10.007

“An in-cell NMR study of monitoring stress-induced increase of cytosolic Ca²⁺ concentration in HeLa cells”

Hembram DS, Haremaki T, Hamatsu J, Inoue J, Kamoshida H, Ikeya T, Mishima M, Mikawa T, Hayashi N, Shirakawa M, Ito Y

Biochem. Biophys. Res. Commun. 査読有 438 2013 653-659

doi: 10.1016/j.bbrc.2013.07.127.

“High-resolution heteronuclear multidimensional NMR of proteins in living insect cells using a baculovirus protein expression system.”

Hamatsu J, O'Donovan D, Tanaka T, Shirai T,

Hourai Y, Mikawa T, Ikeya T, Mishima M,

Boucher W, Smith BO, Laue ED, Shirakawa M,

Ito Y.

Journal of the American Chemical Society 査読有
135 2013 1688-91.
doi: 10.1021/ja310928u

〔学会発表〕(計 7 件)

三島正規 「NMR を用いた flexible multi-module タンパク質の構造解析」第5回 神経科学と構造生物学の融合研究会
2014年12月4日(木)・5日(金) 大阪大学 蛋白質研究所・大阪・吹田

金場 哲平、宮田 和舞、前崎 綾子、伊藤 隆、三島 正規「NMR を用いた溶液中のマルチドメインタンパク質 Protein Kinase C の構造解析」日本分子生物学会 2014年11月25日 27日 パシフィコ横浜・神奈川・横浜

三島 正規 「NMR と SAXS によるマルチドメインタンパク質の構造解析」
第53回 NMR 討論会(2014) 2014年11月14-16日 大阪大学コンベンションセンター・大阪・吹田

彦根 佑哉, 平井 剛, 袖岡 幹子, 三島 正規, 伊藤 隆「In-cell NMR を志向した DOTA-M8 リガンドの合成研究」
第53回 NMR 討論会 2014年11月14-16日 大阪大学コンベンションセンター・大阪・吹田

飯沼 純弥, 金場 哲平, 小林 彩保, 伊藤 隆, 三島 正規 「擬コンタクトシフト情報収集のための、種々のランタノイド結合タグの検討」2014年11月14-16日 第53回 NMR 討論会 大阪大学コンベンションセンター・大阪・吹田

Masaki Mishima “Structural studies of the RNA-binding protein Nrd1, a MAPK-target multi-domain protein using NMR and SAXS” The 5th Japan-Taiwan Bilateral NMR Symposium September 29 - 30, 2014, 北海道大学・百年記念会館 北海道・札幌

Ayaho Kobayashi, Ryosuke Satoh, Yutaka Ito, Reiko Sugiura Masaki Mishima
“NMR and SAXS analyses of the RNA-binding protein Nrd1, a MAPK-target multi-domain protein.” ICMRBS 2014 Dallas(USA) 8/24-29

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.comp.tmu.ac.jp/osbc2/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三島 正規 (MISHIMA Masaki)
首都大学東京・大学院・理工学研究科・准教授
研究者番号: 70346310

(2) 連携研究者

伊藤 隆 (ITO Yutaka)
首都大学東京・大学院・理工学研究科・教授
研究者番号: 80261147

平井 剛 (HIRAI Go)
独立行政法人理化学研究所・専任研究員
研究者番号: 50359551

袖岡 幹子 (SODEOKA Mikiko)
独立行政法人理化学研究所・主任研究員
研究者番号: 60192142