

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 24 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26440016

研究課題名(和文)アダプタータンパク質が担う、乳がん細胞における転写因子STATの活性化基盤の解明

研究課題名(英文) Molecular mechanism analysis of STAT activation in breast tumor cells regulated by adaptor protein

研究代表者

尾瀬 農之(OSE, Toyoyuki)

北海道大学・薬学研究院・准教授

研究者番号：80380525

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：Brk (Breast tumor kinase) は細胞内に存在する非受容体型チロシンキナーゼであるが、多くの乳がん細胞や卵巣がん細胞に発現が見られる。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STAT5が活性化され、細胞増殖が誘導される。そこで、この分子メカニズムを明らかにするため、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。Brkによる自身のリン酸化部位特定やSTAP-2, Brk間の相互作用解析、溶液構造解析をおこない、調節メカニズムに対する考察をおこなった。

研究成果の概要(英文)：The non-receptor tyrosine kinase breast tumor kinase (Brk), has been identified as a highly expressed Protein-tyrosine kinases in human melanocyte. Brk was reported to play key roles for cancer progression via overactivation of Signal Transducers and Activator of Transcription (STAT), especially STAT3 and STAT5. This activation is mediated by an adaptor protein STAP-2, which expresses ubiquitously and harbors many important functions for cell signal regulation. We successfully expressed recombinant Brk and STAP-2 including their mutants, checked kinase activity, monitored interactions, and structurally analyzed using small angle x-ray scattering (SAXS). The C-terminal phosphorylation site of Brk is, on the contrary to our expectation, didn't produce open/close conformational change.

研究分野：構造生物化学

キーワード：蛋白質

1. 研究開始当初の背景

Brk (Breast tumor kinase) は細胞内に存在する非受容体型チロシンキナーゼである。Brk は多くの乳がん細胞や卵巣がん細胞に発現が見られ、浸潤性乳管がん細胞においては 86% の割合で過剰発現しているという報告もある。ヒト Brk を人為的に導入したトランスジェニックマウス乳がんモデルでは、Brk の効果により STAT3 経路の活性化がみられる。対照的に正常な細胞にはほとんど、あるいは全く発現していないことから、乳がん治療薬の標的分子としての可能性も指摘されてきた。Brk は Src ファミリーに類似したドメイン構造をもっており、N 末端から SH3, SH2, kinase ドメインが並ぶが、Src とは異なり N 末端側にパルミトイル化修飾配列をもたない。signal-transducing adaptor protein-2 は多機能のアダプタータンパク質であり、その機能の一つは Brk の活性化であることが発見された。ヒト乳がん培養細胞において STAP-2 と Brk が共存すると、STAT3 や STAT5b は活性化され、細胞増殖の亢進との相関が見られる。これまでに昆虫細胞 Sf9 を用いた Brk および STAP-2 の調製系を確立している。しかし Brk に対する修飾等や収量から、相互作用や酵素反応の定量化および原子レベルでの構造解析には至っておらず、より良質のサンプル調製系が求められた。

2. 研究の目的

上記の通り、STAP-2 と Brk との間の相互作用はがんの発生等に直接関与することが予測され、分子レベルでの緻密な解析が必要であると考えた。ここでは構造学的な知見を得て、このメカニズムを分子レベルで説明することが目的である。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) 蛋白質調製;

Sf9細胞および大腸菌発現系を組合せ、非リン酸化Brk, リン酸化Brkおよび各種変異体, またSTAP-2 および各種変異体を発現し, 多段階のクロマトグラフィで精製した。精製度はCBB染色によるSDS-PAGEや各種抗体を使用したウエスタンブロットング法によりチェックした。

(2) リン酸化反応;

自己および基質のリン酸化反応を検出した。ATP および Mg(II)イオンの存在下で、検出は抗リン酸化チロシン抗体 pY20 を利用したウエスタンブロットによりおこなった。

(3) 相互作用解析;

Biacore T200 (GE healthcare)による SPR 法をおこない、Brk と STAP-2 間の相互作用解析を行った

(4) 構造評価;

多角度光散乱検出器 (Multi Angle Light Scattering, MALS) は、静的光散乱法により蛋白質の絶対分子量や分子サイズを測定することができる。ゲル濾過クロマトグラフィ (Size Exclusion Chromatography, SEC) と接続し、単分散状態での測定が可能となる。また、X 線小角散乱法 (Small Angle X-ray Scattering, SAXS) を用いると、結晶化せずとも溶液中での分子の概形を解析することができるため、しばしば結晶構造解析と相補的に利用される。

4. 研究成果

(1) リン酸化反応

Mg(II)イオンの存在下でのみ Brk がチロシンリン酸化されることを確認した。検出は抗リン酸化チロシン抗体 pY20 を利用したウエスタンブロットによりおこなった。また、STAT3 より容易に調製できるため、疑似基質として STAT1 を与えると、STAT1 のリン酸化が検出できた。変異体においては、自身のリン酸化能が上昇するもの、および低下するものが存在したが、基質として使用した STAT1 に対してするリン酸化能にも相関が見られた。

リン酸化反応を定量化する試みは、リン酸化に伴って生じる ADP を検出する系でおこなった。

(2) 相互作用解析

Brk と STAP-2 間の相互作用解析を行った。Brk (非リン酸化およびリン酸化; u-Brk および pY-Brk) をアミンカップリングによりビオチン化し、Sensor Chip CAP 上に固定化した。コントロールとしては、ピ

オチン化 2 microglobulin (2m)を使用した。アナライトとして、5 段階の希釈系列の非リン酸化およびリン酸化 STAP-2 (それぞれ u-STAP2, pY-STAP2)を添加した。u-Brk と u-STAP2 との反応は二状態モデルを標的関数にしたときに良く一致し、その K_D 値は pY-Brk と u-STAP2 の K_D 値との一致が見られ、また、Brk のリン酸化は u-STAP-2 との結合に影響しないことがわかった。しかし、u-Brk と pY-STAP2 との反応では、 K_D 値は低く算出され、STAP-2 がリン酸化されることにより、より強固に Brk と結合することが判明した。

(3) 構造解析

u-Brk および pY-Brk に関し、Photon Factory の BL10C を用いて SEC-MALS および SEC-SAXS 測定をおこない、プログラム DAMMIN により *ab initio* モデル構築した。予想に反し、野生型 Brk は u-Brk、pY-Brk とともに慣性半径 26Å 程度のコンパクトな構造をとっており、構築されたモデルもよく似ていた。Y324F および F447F 変異体をリン酸化したのものに関しても、同様のモデルが得られた。

(4) リン酸化サイトの解析

Brk は自己リン酸化をおこなうため、質量分析法によるチロシンリン酸化の評価をおこなった。LC-MS/MS によって野生型や各変異体のリン酸化能を調べたところ、野生型にかんしては 5 残基、変異体に関しては 7 残基のリン酸化をおこなうものも確認した。とくに、C 末端のチロシンに対してはリン酸化の有無が活性調節をおこなっていると考えられるため、リン酸化サイトは理にかなっている。

(5) まとめ

これまで、標品の不均一な性質により構造学的な研究が妨げられてきたが、今回 Brk、STAP2 両者ともに純度の高い調製系を確立することができた。そのため、Brk の wild および Y324F、Y447F 変異体の溶液構造を、非リン酸化とリン酸化状態において解析することが可能となった。Brk は非リン酸化型においてもコンパクトな構造を取っており、自己阻害・活性化メカニズムを持っているかは不明である。酵素反応の解析実験からは、STAP-2 存在下において Brk の顕著な活性増強が見られた。また、Brk と STAP-2 間の相互作用を、非リン酸化状態およびリン酸化状態において定量化することができた。リン酸化型の STAP-2 と Brk の相互作用はより強いいため、STAP-2 は Brk の基質としてリン酸化されることにより、より強力に Brk と複合体を形成することができる。

すなわち、基質としての選択性およびリン酸化リガンドとしての特異的認識という二重の制御機構下で、STAP-2 が Brk を活性化していることを示した。活性評価のひとつとして行った whole-cell lysate kinase assay 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ようだ。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、Sam68¹⁴ または Paxillin であることが予想されるが、STAP-2 存在条件下でのみみられる新規の 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 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)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

Breast tumor kinase 活性化機構の解明
松尾友樹, 神田諒, 西條慎也, 清水伸隆,
前仲勝実, 尾瀬農之
2015 年度量子ビームサイエンスフェスタ
2017 年 3 月 14- 15 日つくば国際会議場 (茨城県つくば市)

〔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 (OSE, Toyoyuki)
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

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()