

平成 21 年 5 月 28 日現在

研究種目：特定領域研究
 研究期間：2003～ 2008
 課題番号：15083102
 研究課題名（和文）たんぱく質間相互作用を介した膜受容体による情報伝達機構の構造学的研究
 研究課題名（英文）Structural study of signal transduction by membrane receptors through protein-protein interactions
 研究代表者 白川 昌宏 (SHIRAKAWA MASAHIRO)
 京都大学・大学院工学研究科・教授
 研究者番号：00202119

研究成果の概要：

本研究期間中に、チミン DNA グリコシラーゼ (TDG) について SUMO-3 化された TDG の中央領域の立体構造を論文発表し、非共役型の SUMO-1/TDG の中央領域の立体構造、を解析した。また MCAF1 の SUMO 結合領域 (SIM) と SUMO-3 の複合体の立体構造を NMR により決定した。岐阜大学医学研究科の加藤善一郎博士らとの共同研究により、Myd88 の TIR ドメインの立体構造を NMR によって決定し、さらにシグナル伝達に関与する分子表面残基を解析した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2003 年度	7,500,000	0	7,500,000
2004 年度	15,000,000	0	15,000,000
2005 年度	14,600,000	0	14,600,000
2006 年度	14,600,000	0	14,600,000
2007 年度	15,000,000	0	15,000,000
2008 年度	15,000,000	0	15,000,000
総計	81,700,000	0	81,700,000

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：NMR、結晶構造解析、膜たんぱく質

1. 研究開始当初の背景

胞膜上でのインターフェイスにおいて、最も重要な働きをするのは膜受容体である。その役割は細胞外からのシグナルを細胞内シグナル経路へと受け渡すことにあるので、膜受容体の行う最も重要な機能は、細胞外リガ

ドと細胞内シグナル因子との相互作用である。従って、膜インターフェイスの理解には膜受容体—リガンド、膜受容体—細胞内シグナル因子の相互作用を原子レベルで解明することが必須だと考えられた。加えて、膜受容体の分子数調節や細胞内局在機構が、受容

体の発信する細胞内シグナルの制御にきわめて重要であることが判ってきていた。これは膜受容体のエンドサイトーシスにより行われる。アゴニストによって活性化された膜受容体は、多くの場合、エンドサイトーシスによって、細胞膜から細胞内に移行し、初期エンドソーム、後期エンドソームといった小胞輸送を経由して、リソソームにおける分解を受ける。こういった一連の小胞輸送では、細胞内小胞で継続して行われる受容体からの細胞内シグナルの発信や、受容体の細胞膜へのリサイクルといった、より高次の制御が行われる。すなわちエンドサイトーシスは膜受容体の活性をさまざまな側面から調節していることが判っていた。

2. 研究の目的

本研究では、①膜受容体の細胞外リガンドの認識機構、②受容体と細胞内シグナル因子との相互作用、と③エンドサイトーシス機構、の構造生物学的研究を行い、膜インターフェイスの機能解明を目指す。さらに SUMO (Small Ubiquitin-like modifier) によるたんぱく質修飾による細胞内蛋白質の相互作用制御も目的とした。

3. 研究の方法

NMR と X 線結晶解析法により立体構造解析をし、生化学的、分子生物学的手法で機能解析を進めた。

4. 研究成果

SUMO 化を受けるたんぱく質の一つであるチミン DNA グリコシラーゼ (TDG) について SUMO-1 化された TDG の中央領域(残基 112-339)の立体構造 (Baba et al. Nature (2005))、SUMO-3 化を受けた TDG 中央領域の立体構造、非共役型の SUMO-1/TDG の中央領域の立体構造、を解析した。また我々はクロマチン制御因子である MCAF1 の SUMO 結合領域 (SIM) と SUMO-3 の複合体の立体構造を NMR により決定した (Sekiyama et al., JBC (2008))。

また岐阜大学医学研究科の加藤善一郎博士らとの共同研究により、Myd88 の TIR ドメインの立体構造を NMR によって決定した。また構造を基にして、培養細胞によるアッセイ系を使った変異体解析から、Myd88 TIR ドメインの IL-18 経路と自然免疫経路のシグナル伝達に関与する分子表面残基を解析した。さらに変異体を使った in vitro 結合実験により、Myd88 TIR ドメインの、TLR4 経路に関与するアダプター分子 TIRAP(MAL)の TIR ドメインとの結合に関わる残基を解析した。

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 27 件)

1. Ohnishi, H., Tochio, H., Kato, Z., Orii, K., Li, A., Kimura, T., Hiroaki, H., Kondo, N., and Shirakawa, M. Structural basis for the multiple interactions of the MyD88 TIR domain in TLR4 signaling. Proceedings of the National Academy of Science (in press)
2. Mizukami, S., Takikawa, R., Sugihara, F., Shirakawa, M. and Kikuchi, K. Dual-Function Probe to Detect Protease Activity for Fluorescence Measurement and ¹⁹F MRI. Angewandte Chemie International Edition (Published Online: Apr 7 2009)
3. Inomata, K., Ohno, A., Tochio, H., Isogai, S., Tenno, T., Nakase, I., Takeuchi, T., Futaki, S., Ito, Y., Hiroaki, H., and Shirakawa, M. High-resolution multi-dimensional NMR spectroscopy of proteins in human cells. Nature 458, 106-109 (2009)
4. Sakakibara, D., Sasaki, A., Ikeya, T., Hamatsu, J., Hanashima, T., Mishima, M., Yoshimasu, M., Hayashi, N., Mikawa, T., Wälchli, M., Smith, B. O., Shirakawa, M., Güntert, P. and Ito, Y. Protein structure determination in living cells by in-cell NMR spectroscopy. Nature 458, 102-105 (2009)
5. Tateishi, Y., Ariyoshi, M., Igarashi, R., Hara, H., Mizuguchi, K., Seto, A., Nakai, A., Kokubo, T., Tochio, H. and Shirakawa, M. Molecular basis for SUMOylation-dependent regulation of DNA binding activity of Heat Shock Factor 2. Journal of Biological Chemistry 284,

2435-2447(2009)

6. Sekiyama, N., Ikegami, T., Yamane, T., Ikeguchi, M., Uchimura, Y., Baba, D., Ariyoshi, M., Tochio, H., Saitoh, H. and Shirakawa, M. Structure of the SUMO-interacting motif of MBD1-containing chromatin associated factor 1 (MCAF1) bound to SUMO-3. *Journal of Biological Chemistry* 283, 35966-35975 (2008)

7. Arita, K., Ariyoshi, M., Tochio, H., Nakamura, Y. and Shirakawa, M. Hemi-methylated DNA recognition by the SRA protein Np95 via a base flipping mechanism. *Nature* 455, 818-821 (2008)

8. Kuwahara, Y., Ohno, A., Morii, T., Yokoyama, H., Matsui, I., Tochio, H., Shirakawa, M., and Hiroaki, H. The solution structure of the C-terminal domain of NfeD reveals a novel membrane-anchored OB-fold. *Protein Science* 17, 1915-1924 (2008)

9. Kimura, T., Kato, Z., Ohnishi, H., Tochio, H., Shirakawa, M., Kondo, N. Expression, purification, and a structural analysis of human IL-18 binding protein: A potent therapeutic molecule for allergy. *Allergology International* 4, 367-376 (2008)

10. Goda, N., Tenno, T., Inomata, K., Shirakawa, M., Tanaka, T., Hiroaki, H. Intracellular protein delivery activity of peptides derived from insulin-like growth factor binding proteins 3 and 5. *Experimental Cell Research* 314, 2352-2361 (2008)

11. Inomata, K., Ohki, I., Tochio, H., Fujiwara, K., Hiroaki, H., Shirakawa, M.

Kinetic and Thermodynamic evidence for flipping of a methyl-CpG binding domain on methylated DNA. *Biochemistry* 47, 3266-3271 (2008)

12. Mizukami, S., Takikawa, R., Sugihara, F., Hori, Y., Tochio, H., Waelchli, M., Shirakawa, M., Kikuchi, K. Paramagnetic Relaxation-Based ¹⁹F MRI Probe to Detect Protease. *Activity Journal of the American Chemical Society* 130, 794-795 (2008)

13. Komi, N., Okawa, K., Tateishi, Y., Shirakawa, M., Fujiwara, T., Akutsu, H. Structural Analysis of Pituitary Adenylate Cyclase-Activating polypeptides Bound to Phospholipid emembranes by Magic Angle Spinning Solid-State NMR. *Biochimica et Biophysica Acta -Biomembranes* 1768, 3001-3011 (2007)

14. Sakai, T., Tochio, H., Inomata, K., Sasaki, Y., Tenno, T., Tanaka, T., Kokubo, T., Hiroaki, H., Shirakawa, M. Fluoroscopic assessment of protein leakage during Xenopus oocytes in-cell NMR experiment by co-injected EGFP. *Analytical Biochemistry* 371, 247-249. (2007)

15. Maita, N., Aoyagi, H., Osanai, M., Shirakawa, M., Fujiwara, H., Characterization of the sequence specificity of the R1Bm endonuclease domain by structural and biochemical studies. *Nucleic Acid Research* 35, 3918-3927 (2007)

16. Ki, S., Sugihara, F., Kasahara, K., Tochio, H., Shirakawa, M. and Kokubo, T. Magnetic resonance-based visualization of gene expression in mammalian cells using a bacterial polyphosphate kinase reporter gene. *Biotechniques* 42, 209-215 (2007)

17. Goda, N., Tenno, T., Inomata, K., Iwaya, N., Sasaki, Y., Shirakawa, M., Hiroaki, H. LBT/PTD dual tagged vector for purification, cellular protein delivery and visualization in living cells. (2007) *Biochemica et Biophysica Acta* 1773, 141-146.
18. Hara, H., Tenno, T. and Shirakawa, M. Distance determination in human ubiquitin by pulse double electron resonance and double quantum coherence ESR methods. (2007) *Journal of Magnetic Resonance* 184, 78-84.
19. Iwaya, N., Goda, N., Unzai, S., Fujiwara, K., Tanaka, T., Tomii, K., Tochio, H., Shirakawa, M. and Hiroaki, H. (2007)
20. Fine-tuning of protein domain boundary by minimizing potential coiled coil regions. *Journal of biomolecular NMR* 37, 53-63.
- Sakai, T., Tochio, H., Tenno, T., Ito, Y., Kokubo, T., Hiroaki, H. and Shirakawa, M. (2006) In-Cell NMR Spectroscopy of Proteins inside *Xenopus laevis* Oocytes. *Journal of biomolecular NMR* 36, 179-188.
21. Baba, D., Maita; N., Jee, J.-G., Uchimura, Y., Saitoh, H., Sugasawa, K., Hanaoka, F., Tochio, H., Hiroaki, H., Shirakawa, M. (2006) Crystal structure of SUMO-3-modified thymine-DNA glycosylase. *Journal of Molecular Biology*, 359, 137-147.
22. Ki, S., Sugihara, F., Kasahara, K., Tochio, H., Okada-Marubayashi, A., Tomita, S., Morita, M., Ikeguchi, M., Shirakawa, M. and Kokubo, T. (2006) novel magnetic resonance-based method to measure gene expression in living cells. *Nucleic Acid Research*, 34, e51.
23. Ichiyama, S., Oka, Y., Haga, K., Kojima, S., Tateishi, Y., Shirakawa, M., and Haga, T. (2006) The structure of the third intracellular loop of the muscarinic acetylcholine receptor M2 subtype. *FEBS Letter* 580, 23-26.
24. Baba, D., Maita, N., Jee, J.-G., Uchimura, Y., Saitoh, H., Sugasawa, K., Hanaoka, F., Tochio, H., Hiroaki, H., Shirakawa, M. Crystal Structure of thymine DNA glycosylase conjugated to SUMO-1. (2005) *Nature* 435, 979-982.
25. Hara, T., Kamura, T., Kotoshiba, S., Fujiwara, K., Onoyama, I., Shirakawa, M. and Nakayama, K.-I., The UBL-UBA protein KPC2 is required for degradation of p27 at G1 phase. (2005) *Molecular and Cellular Biology* 25, 9292-303.
26. Hashimoto, K., Kato, Z., Nagase, T., Shimosawa, N., Kuwata, K., Omoya, K., Li, A., Matsukuma, E., Yamamoto, Y., Ohnishi, H., Tochio, H., Shirakawa, M., Suzuki, Y., Wanders, R. J. A., Kondo, N. (2005) Molecular mechanism of a temperature-sensitive phenotype in peroxisomal biogenesis disorder. *Pediatric Research*, 58, 263-9
27. Takasu, H., Jee, J. G., Ohno, A., Goda, N., Fujiwara, K., Tochio, H., Shirakawa, M., and Hiroaki, H. (2005) Structural characterization of the MIT domain from human Vps4b. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 334, 460-465.

[学会発表] (計 11 件)

1. 白川昌宏 「In-cell NMR による細胞質内タンパク質の構造、機能解析」
第 31 回日本分子生物学会年会 2008 年
12 月 11 日 (神戸)
2. 白川昌宏 「In-cell NMR による細胞内タンパク質の構造、機能の観察」
第 8 回日本蛋白質科学会 2008 年 6 月 11 日
(東京)
3. 白川昌宏 「NMR と MRI を使った細胞内反応の非侵襲計測」
日本化学会第 87 春季年会 2007 年 3 月 29 日
(大阪)
4. 白川昌宏 「SUMO 化によるチミン DNA グリコシラーゼ機能調整」
第 6 回日本蛋白質科学会年会 2006 年
4 月 26 日 (京都)
5. 白川昌宏 「SUMO コードの謎を解く」
第 28 回分子生物学会年会 2005 年 12 月 10 日
(福岡)
6. 白川昌宏 「蛋白質修飾による蛋白質の構造変化を捉える-ユビキチン化・SUMO 化蛋白質の調製と X 線構造解析」
日本結晶学会 2005 年度年会 2005 年 12 月 7 日
(姫路)
7. 白川昌宏 「SUMO 化による蛋白質の機能・構造変換の構造学的研究」
第 27 回日本分子生物学会年会 2004 年
12 月 8 日 (神戸)
8. 白川昌宏 「NMR structural biology of protein-nucleic acid recognition」

第 43 回 NMR 討論会 2004 年 11 月 11 日
(東京)

9. 白川昌宏 「化学修飾による核内制御 --DNA メチル化とたんぱく質のユビキチン化」
日本薬学会 124 年会 2004 年 3 月 30 日 (大阪)

10. 白川昌宏 「SUMO 化による蛋白質の機能変換の構造学的研究」
第 26 回日本分子生物学会 2003 年 12 月 11 日
(神戸)

11. 白川昌宏 「Quaternary structure of polyubiquitin chains」
第 76 回日本生化学会大会 2003 年 10 月 17 日
(横浜)

〔図書〕(計 1 件)

1. 朽尾豪人、白川昌宏 5.2.1 たんぱく質 “実験化学講座第 5 版 日本化学会編 8 NMR・ESR”丸善株式会社 pp.287-305 (2006).

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 2 件)

1. 出願番号：特願 2007-200776

出願日：平成 19 年 8 月 1 日

発明の名称；変異導入 MyD88 蛋白による Toll 様受容体／インターロイキン 18 シグナルの

特異的制御法

発明者：近藤 直実、加藤 善一郎、大西 秀典、白川 昌宏、朽尾 豪人

2. 出願番号：特願 2007-273956

出願日：平成 19 年 10 月 22 日

発明の名称：MR I 用プローブ

発明者 菊地和也、水上進、滝川利佳、白川
昌宏

特許出願人 財団法人大阪産業振興機構、国
立大学法人大阪大学、国立大学法人京都大学

6. 研究組織

(1) 研究代表者

白川昌宏 (SHIRAKAWA MASAHIRO)
京都大学・大学院工学研究科・教授
研究者番号：00202119