

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19570118

研究課題名 (和文) キナーゼの動的構造解析のための基盤構築

研究課題名 (英文) CONSTRUCTION OF BASIS FOR DYNAMIC STRUCTURE ANALYSES OF KINASES

研究代表者

河野 俊之 (KOHNO TOSHIYUKI)

株式会社三菱化学生命科学研究所・研究部門・蛋白質立体構造研究グループ 主任研究員

研究者番号：40416657

研究成果の概要：

キナーゼ Cdk2 をコムギ胚芽無細胞タンパク質合成系を用いて大量調製する系を確立し、20種類の安定同位体標識を作成後、各種2次元NMRの測定を行ってHNシグナルの帰属を完了した。次に、Cdk2に基質アナログや阻害剤を作用させて、HNシグナルの変化や動的構造の違いを調べたところ、これらの物質の作用によりX線結晶解析の結果からは得られていなかった立体構造変化や運動性の変化が現れることがわかった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：生物物理、NMR、キナーゼ、シグナル帰属、無細胞タンパク合成

## 1. 研究開始当初の背景

タンパク質のリン酸化は、タンパク質の構造や機能を動的に変化させ、様々な生命現象を制御している。タンパク質のリン酸化を行う酵素であるキナーゼは、細胞内情報伝達、細胞分裂・細胞周期、細胞の正と死の制御、細胞極性制御、体内時計などの多岐にわたる生命現象をコントロールしていることが明らかになってきている。各種キナーゼは、他のキナーゼや他の活性化タンパク質の結合により自分自身が活性化されることによりリン酸化され、立体構造や機能を動的に変化させてシグナルを伝えていくと考えられて

いる。これまでに各種キナーゼの単独あるいは複合体での立体構造が主にX線結晶解析によって解析されてきており、非活性化型の及び活性化型のキナーゼの立体構造の相違など様々な知見が得られてきている。しかし、X線結晶解析において得られる情報は、非活性化型や活性化型それぞれの立体構造すなわちスナップショットの情報であり、さまざまな調節タンパク質が結合したり、他のキナーゼによってリン酸化されることによって引き起こされるキナーゼの動的な立体構造変化に関する情報はほとんど得られていない。我々の予備的な実験結果によると、X線

結晶解析においてほぼ同一の立体構造が得られている基質結合型と非結合型のキナーゼが、NMR測定においてはかなり違うスペクトルを与えていることがわかっている。よって、溶液中のキナーゼの真の立体構造は、結晶中における立体構造とは異なり、基質結合や調節タンパク質の結合によって大きく変化していることが予想されるが、そのような立体構造変化を詳細に調べた例は報告されていない。NMRによってキナーゼの主鎖由来のシグナルを帰属を行うことで、キナーゼ分子内部の詳細な動的構造を解析したり、調節タンパク質や基質の結合に伴う動的な立体構造変化をモニターすることができる。しかし、現在までにNMRを用いて哺乳動物のキナーゼのNMRシグナルを完全に帰属した例は報告されていない。唯一、プロテインキナーゼA (PKA) について50%程度の残基の $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ シグナルの帰属例が報告されているだけである。一般的にキナーゼは活性サブユニットだけで300残基以上の大きさを持っており、従来のNMR解析方法では解析が困難であった。また、タンパク質をNMR解析するためには、高価な安定同位体標識を行う必要があり、組換え大腸菌で調製できるタンパク質に解析対象が限られていた。しかし、一般的に哺乳動物由来のキナーゼは、大腸菌で発現させると活性を持たないものが多く、活性を持つとしても収量が著しく低いことが多い。以上の理由から、現在まで哺乳動物由来のキナーゼがNMR解析の対象とされていなかったと考えられる。

代表者らは、コムギ胚芽無細胞タンパク質合成系を使い、NMR解析が可能な安定同位体標識タンパク質を合成し、実際にNMR解析することに世界に先駆けて成功している。また、20種類のアミノ酸を完全選択的に安定同位体標識しNMRシグナルを簡略化する方法や、その方法をさらに発展させ、従来法より低濃度の目的タンパク質を用いて、より高分子量で不安定なタンパク質のNMRシグナルを簡便に帰属する方法 (MAGICAL法 (Method for Assignment with Intelligent Combinatorial Amino acid Labeling)) をすでに開発している。申請者は、これらの技術を用いて、未知の部分の多いキナーゼの動的構造を明らかにするための研究基盤を構築することを計画した。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、今まで困難であった各種キナーゼのNMRシグナルの帰属を解析可能にする基盤を確立すること、及び帰属されたNMRシグナルをもとに、活性化や各種調節タンパク質の結合にともなうキナーゼの動的立体構造およびその変化、阻害剤などの低分子リガンドの結合様式を迅速に解明す

るための技術基盤を構築することである。以下に、具体的な目的を述べる。

(1) Cyclin-dependent Kinase 2 (Cdk2) をキナーゼのモデルとし、コムギ胚芽無細胞タンパク質合成系を駆使し、選択的に安定同位体標識されたアミノ酸を系統的に組み合わせた標識方法を用いて、 $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$  で標識されたキナーゼの多核多次元NMRシグナルの帰属を可能とする技術基盤を確立する。

(2) Cdk2のNMRシグナルが帰属されたら、その情報を元に、動的構造情報が抽出可能なNMR測定を行い、リン酸化による活性化型および非活性化型のキナーゼの動的構造を調べて比較し、その変化を明らかにする。X線結晶解析から得られた静的な立体構造とも比較することにより、キナーゼの機能発現機構のより詳細な理解を目指す。

(3) Cdk2のNMRシグナル帰属情報を元に、動的構造情報が抽出可能なNMR測定を行い、調節タンパク質の非結合状態および結合状態でのCdk2の動的構造を調べて比較し、その変化を明らかにする系を確立する。X線結晶解析から得られた静的な立体構造とも比較することにより、キナーゼの機能発現機構のより詳細な理解を目指す。

(4) Cdk2のNMRシグナル帰属情報を元に、阻害剤などの低分子リガンドの存在の有無においてNMRシグナルの変化を解析することで低分子リガンドの結合部位を同定し、さらに低分子リガンド結合によるCdk2自身の立体構造変化の有無を明らかにする。

## 3. 研究の方法

(1) コムギ胚芽無細胞タンパク質合成系によるCdk2の発現系の確立

Cdk2についてはすでに大腸菌による発現系を確立し、 $^{15}\text{N}$  による安定同位体標識体の調製する系まではすでに確立している。そこでCdk2をコムギ胚芽無細胞タンパク質合成系を用いて大量調製の系を確立する。まず、mRNA調製のための鋳型DNAを作成する。コムギ胚芽無細胞タンパク質合成系において、グルタチオンSトランスフェラーゼ、マルトース結合タンパク質、ポリヒスチジンタグなど各種融合タンパク質として発現させる鋳型DNAを用い、まず少量のスケールにおいて、コムギ胚芽無細胞タンパク質合成系を用いて、実際にCdk2を合成してみて、合成量および可溶性画分に来るかどうかや活性の有無をチェックする。そして、Cdk2の合成量が最大となるようなmRNAの量や、反応pH、反応温度を選び出し、NMRスケールでの大量合成が可能な条件を確立する。

(2) Cdk2の物性評価

(1)において決定した合成条件を基に、コム

ギ胚芽無細胞タンパク質合成系を用いて、Cdk2のmgスケールでの発現および精製を行う。精製したCdk2について、動的光散乱装置を用いて物性の評価を行う。良いNMRスペクトルを得ることが期待できる単分散になるような条件を選び出す。物性に問題があった場合には、領域を少しずつ変えた活性ドメインを順次作成し、発現、精製を行い、繰り返し動的光散乱による物性評価を行い、単分散性が向上しているものを選び出す。

#### (3) 安定同位体標識したCdk2の作成

Cdk2について安定同位体標識を行う。Cdk2について、コムギ胚芽無細胞タンパク質合成系を用い、 $^{15}\text{N}/\text{D}$  二重標識された20種類のアミノ酸を基質のアミノ酸として使用することにより $^{15}\text{N}/\text{D}$ での均一標識を行う。コムギ胚芽無細胞タンパク質合成系を用いて作成した $^{15}\text{N}/\text{D}$ 二重標識Cdk2については、融合タンパク質タグのアフィニティ精製、イオン交換樹脂による精製、ゲル濾過樹脂による精製等を経て純粋な標品を作成する。

#### (4) Cdk2のNMR測定条件の確立

(3)において作成した $^{15}\text{N}/\text{D}$ 二重標識キナーゼ活性ドメインについて $^1\text{H}-^{15}\text{N}$  TROSY-HSQCの測定を行い、 $^1\text{H}-^{15}\text{N}$ のシグナルが期待される残基数分現れるかどうかを指標にして、NMR測定条件の検討を行う。バッファーの種類、pH、塩の有無とその種類、界面活性剤の有無とその種類を検討することにより、良い $^1\text{H}-^{15}\text{N}$  TROSY-HSQCスペクトルが得られるような溶液条件を決定する。

#### (5) 系統的な選択的アミノ酸標識を行ったキナーゼ活性ドメインの調製

Cdk2について、コムギ胚芽無細胞タンパク質合成系を用い、1種類のアミノ酸だけが $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}/\text{D}$ で三重標識され、他のアミノ酸が $^{15}\text{N}/\text{D}$ で二重標識されたものを合計20種類作成する。必要に応じて、1種類のアミノ酸だけが $^{15}\text{N}/\text{D}$ で標識され、他のアミノ酸がDで標識されたものも作成する。

#### (6) シグナル帰属のための各種NMR測定および帰属

(5)において標識を行ったCdk2(20種類)について、HN(CA)、HN(CO)、H(N)CA、H(NCO)CAなどの各種2次元NMRの測定を行う。各種測定で得られたシグナルをもとに、アミノ酸配列と組み合わせることによってCdk2の主鎖由来のNMRシグナルの帰属を行う。

#### (7) Cdk2の動的立体構造解析

NMRシグナルの帰属を行ったCdk2について、 $^{15}\text{N}/\text{D}$ 均一二重標識タンパク質を調製し、縦緩和速度(T1)、横緩和速度(T2)、 $^1\text{H}-^{15}\text{N}$  NOE等の測定を行い、キナーゼの動的立体構造について調べる。また、TROSY測定をベースとした、残余双極子効果の測定

を行い、溶液中でのCdk2の立体構造ドメイン間の相対配置を決定し、溶液中でのCdk2の立体構造ドメイン配置とX線で決定されている結晶中でのCdk2の立体構造ドメイン配置を比較する。

#### (8) 非リン酸化型とリン酸化型におけるCdk2の動的構造の比較

NMRシグナルの帰属を行ったCdk2について、リン酸化型のタンパク質を作成し、同様の方法を用いてNMRシグナルの帰属を行う。帰属ができれば、上記(2)と同様の測定を行い、リン酸化型Cdk2の動的な立体構造を調べ非リン酸化型Cdk2との比較を行う。

#### (9) キナーゼの調節タンパク質結合部位の同定と動的立体構造変化の解析

$^{15}\text{N}/\text{D}$ 均一二重標識キナーゼを調製し、 $^1\text{H}-^{15}\text{N}$  TROSY-HSQCの測定を行う。さらに調節タンパク質存在下での二重標識キナーゼの $^1\text{H}-^{15}\text{N}$  TROSY-HSQCを測定し、帰属した残基番号情報をもとにどの部位に相当するシグナルが変化したかを調べることににより、調節タンパク質の結合部位を同定する。さらに、調節タンパク質存在下で、T1、T2、 $^1\text{H}-^{15}\text{N}$  NOE等の測定を行い、動的立体構造変化を解析する。

#### (10) 低分子リガンドの結合部位の同定と動的立体構造変化の解析

$^{15}\text{N}/\text{D}$ 均一二重標識キナーゼを調製し、 $^1\text{H}-^{15}\text{N}$  TROSY-HSQCの測定を行う。さらに低分子リガンド存在下で二重標識キナーゼの $^1\text{H}-^{15}\text{N}$  TROSY-HSQCを測定し、上記と同様の方法により、低分子リガンドの結合部位を同定、および低分子リガンドの結合による動的立体構造の変化を解析する。

## 4. 研究成果

キナーゼCdk2をコムギ胚芽無細胞タンパク質合成系を用いて大量調製する系を確立した。mRNAの量や、反応のpH、反応の温度を最適化することにより、NMR測定に必要な十分量のCdk2を合成する条件を確立できた。次に、得られたCdk2を、様々なバッファーに溶解したのち、室温で数日間放置し、沈殿が生じるかどうかを確認することで、Cdk2を安定に保つことができる測定に最適なバッファー条件を絞り込んだ。そして、 $^{15}\text{N}/\text{D}$ 二重標識された20種類のアミノ酸を基質のアミノ酸として使用することにより $^{15}\text{N}/\text{D}$ での均一標識体を作成し、上記で決定したバッファー条件において良好な $^1\text{H}-^{15}\text{N}$  TROSY-HSQCスペクトルが観測できることを確認した。このバッファー条件において、Cdk2の主鎖のアミド基由来のシグナルについて、プロリンを除く残基数の7割以上を観測することができた。さらに、Cdk2について、コムギ胚芽無細胞タンパク質合成系を用い、

1 種類のアミノ酸だけが  $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}/\text{D}$  で三重標識され、他のアミノ酸が  $^{15}\text{N}/\text{D}$  で二重標識されたものを合計 20 種類作成した。この 20 種類の標識体について、HN(CA), HN(CO), H(N)CA, H(NCO)CA, H(N)CO, H(NCA)CO などの各種 2 次元 NMR の測定を行った。この測定データをもとに HN シグナルの帰属を行い、観測可能であった 194 個の HN シグナルのうち 176 残基分 (91%) の HN シグナルを帰属できた。次に、Cdk2 に基質アナログである AMPPNP や阻害剤である Roscovitine を作用させて、HN シグナルの変化を調べた。HN シグナルの変化を解析した結果、X 線結晶解析では、Apo 体と複合体でほとんど立体構造変化が見られなかったにもかかわらず、NMR 解析の結果では、Apo 体と複合体でヒンジ領域周辺の立体構造が変化していることがわかった。これは従来の常識とは異なり、キナーゼは生体中においては基質や阻害剤の結合により立体構造変化を起こすことを示唆している。さらに、NMR の CPMG 法を用い、Apo 体と Roscovitine 複合体とでの動的構造の違いを調べた。すると、Roscovitine 複合体においては C-terminal lobe において運動性の変化が見られ、阻害剤の結合により結合部位のみならずキナーゼ全体の運動性が変化することが示唆された。

#### 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)

無し

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

河野 俊之 (KOHNO TOSHIYUKI)

株式会社三菱化学生命科学研究所・研究部門・蛋白質立体構造研究グループ・主任研究員

研究者番号：40416657

##### (2) 研究分担者

無し

##### (3) 連携研究者

無し