

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月 15日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010 ~ 2012

課題番号：22570118

研究課題名（和文）

立体構造情報を高度に利用した合成生物学によるAAA-ATPaseのメカニズム解明

研究課題名（英文）

Synthetic and Structural Biology Approach for Understanding Mechanism of AAA-ATPase

研究代表者

廣明 秀一 (HIROAKI HIDEKAZU)

名古屋大学・創薬科学研究科・教授

研究者番号：10336589

研究成果の概要（和文）：

立体構造情報を高度に駆使し、I型/II型 AAA-ATPase を N 末端ドメイン部分と AAA 部分に機能分解することで、Katanin p60 の基質(tubulin)結合部位を同定し、Ca²⁺による新規の活性制御メカニズムを発見した。また NVL2 については N 末端ドメインの立体構造決定に成功し、結合標的 (nucleolin) を同定した。得られた情報に基づき、Katanin p60 の微小管切断機構ならびに NVL2 の細胞内機能について仮説を提案した。

研究成果の概要（英文）：

We extensively used the 3D structural information of the N-terminal domains which were isolated from the other part of AAA-ATPases (Class I and II). We succeeded in determining the tubulin binding site on Katanin p60 N-terminal domain. Subsequently we found a novel Ca²⁺-dependent regulatory mechanism of Katanin's ATPase activity. For NVL2, the solution structure as well as binding target of N-terminal domain were determined. We thus proposed two hypothesis, one is for the molecular mechanisms on microtubule severing, and another is for the cellular function of NVL2.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
2011年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
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：分子認識及び相互作用

1. 研究開始当初の背景

近年のゲノム研究から、高等生物の遺伝子産物の7割以上がマルチドメイン蛋白質であることが明らかになった。マルチドメイン蛋白質の物性の統一的な理解は多くの蛋白質の機能発現機構の解明につながり、生命現象の本質的な理解に貢献する。マルチドメイン

蛋白質に対するそれを構成する各ドメインの関係は、文章と単語の関係や機械全体と部品の関係にたとえられる。これまでの研究により単語・部品レベルでの理解は大幅に進んだと考えられる。そのため、単語を組み合わせ文章とする、あるいは部品を組み合わせ機械全体を作りその動作を確認する、という合成生物学(synthetic biology)の導入が必

須である。本申請研究では、分子中央に共通の AAA ドメインを持ち、多彩な細胞機能に係る AAA-ATPase に着目して、機構の解明を進める。

AAA-ATPase は ATP の加水分解エネルギーを利用して分子シャペロンとして機能する酵素である。ペルオキシソーム形成不全症 (PEX1/PEX6)、有糸分裂(katanin)、ウイルス増殖(Vps4)など医学的にも重要な遺伝子産物を多く含み、国内外で研究が盛んである。AAA-ATPase の機能の多様性は、配列の変化に富む N 末端ドメインが担っていると漠然と予想されていたが、実験的検証はまだない。AAA-ATPase の構造生物学は、AAA ドメイン部分の解析と N 末端ドメインの研究に大別され、特に前者が先行している。一方、機能多様性を担うはずの N ドメインの構造解析は遅れていた。代表研究者はこれまでに、4 種の AAA-ATPase の N ドメインの構造を決定し、この分野の研究を国際的にリードしている。更に代表研究者は、これらの構造学的発見を端緒として、PEX1 によるペルオキシソームでの蛋白質輸送受容体のリサイクリングと、VCP による ER からの蛋白質逆行輸送のメカニズムの類似性を発見した (Shiozawa, Hiroaki, (他 7 名), J Biol Chem, 2004)。

2. 研究の目的

本研究の目的は、マルチドメイン蛋白質の機能を統合的に理解するための基盤の確立にある。あたかも単語 (ドメインの機能) を組み合わせて新しい文章 (蛋白質全体の機能) を作文するように、各部分を挿げ替えた分子を合成して検証し、理解を深める。本研究においては、微小管に作用するため新規抗癌剤開発などに応用可能な katanin p60、抗ウイルス薬標的である Vps4、応募者が独自に新規標的分子を同定した核小体 AAA である Nvl2 を中心に、AAA-ATPase の合成生物学研究を行い、動作原理を解明する。

AAA-ATPase は中央の AAA ドメインが駆動力となり、N 末端の基質結合部位と C 末端の制御領域とで、機能多様性を担う。各ドメインが類縁酵素間で交換可能かどうか、合成生物学的手法を用いて解析する。キメラ分子の設計にはこれまでに応募者が蓄積した各ドメインの構造情報・相互作用情報を高度に活用する。

3. 研究の方法

(1) 構造生物学的アプローチ

Katanin p60 の N 末端微小管結合ドメイン、

Katanin p80 の C 末端ドメイン、Nvl2 の N 末端核小体局在ドメインについて、NMR 法を利用して、その立体構造決定を試みた。NMR 構造解析は、まずそれらのドメインの大腸菌発現系を構築し、¹³C/¹⁵N 二重標識試料を得たのち、溶液 NMR 法によって立体構造解析を行った。NMR のスペクトル解析は、定法に基づき NMRPipe、Sparky の各ソフトウェアを用い、立体構造計算は CYANA version 2.1 を用いた。さらに、NMR 試料管中で、相互作用の可能性のある分子と混合して、¹H-¹⁵N 二次元 NMR を測定して比較することで、当該分子との相互作用の有無を検証するとともに、結合部位を決定した。また、Vps4 と Katanin p60 の双方の活性を制御する分子として Ca²⁺イオンを同定した。Vps4b の N 末端 MIT ドメインと Katanin p60 の N 末端ドメインの Ca²⁺結合部位を、Ce³⁺ (Ca²⁺の常磁性プローブ)を用いて決定した。この結合部位の決定には、自作の初期座標発生プログラムを用いて、常磁性シフト解析ソフト FANTASIEN を用いて最適化した。

(2) 細胞生物学的アプローチ

AAA-ATPase の細胞機能を観察するための、細胞生物学的実験系のセットアップを行った。培養細胞 (Hela, NIH3T3, CHO など)を用いて、以下の成分の蛍光顕微鏡による観察実験の環境を整えた。微小管(=katanin, katnal2, spastin, fidgetin の基質)、ESCRT-III 複合体(=Vps4 の基質)、後期エンドソーム膜(=Vps4 により変形をうける)、核小体(=Nvl2 が局在)について検討する系を整備した。また、機能未知 AAA-ATPase である Nvl2 について、結合分子を探索するために、大腸菌で発現させた AAA-ATPase の N ドメインに対する HeLa 細胞抽出物を用いたプルダウン実験を行った。検出されたバンドについて、引き続いて質量分析 (LC-MS/MS 法)によりによるタンパク質同定実験を行った。質量分析に関しては神戸大学医学研究科質量分析センターの支援を受けた。

(3) 生化学的・合成生物学的解析

I 型 AAA-ATPase (katanin, katnal2, spastin, Vps4, fidgetin) とその介助分子 (katanin p80, DISC1/Ndel/Lis1, Alix/Vta1 など)について、N 末端ドメイン・リンカー領域・AAA ドメイン・C 末端テイルについて、本来の組合せとは異なる組合せで再構築したキメラ分子を作成するべくリンカー領域の配列情報解析に注力した。具体的には、名古屋大学太田らの構築している天然変性タンパク質データベース IDEAL の作成に協力することを条件に、Katanin、Vps4 ならびにその基質 ESCRT-III 複合体サブユニットなどについて、天然変性領域の有無の予測など

を行った。

立体構造ならびに得られた相互作用部位をもとに、AAA-ATPaseの活性制御機構を解明するためには、全長の分子を用いた酵素活性の測定系が必要である。そこで、Katanin p60の全長の発現系をまず大腸菌で作成し、N末端ドメインの変異体や、AAA-ATPaseドメインの変異体の微小管結合活性・ATPase活性・微小管切断活性を、試験管内で測定する系を構築した。

Nvl2の標的分子として同定された nucleolin について、どのドメインが Nvl2 との相互作用に必須なのかを、nucleolin のドメイン欠失変異体を用いたプルダウンアッセイにより同定した。

(4) 分子進化的手法による AAA-ATPase の制御分子の探索

上記に並行して、ランダム化されたペプチドを網羅的に発現する Phage display 法を利用して、katanin、Vps4 の N ドメインに結合する網羅的に結合相手の探索を行った。得られたペプチドについて NMR 滴定実験により、結合部位を決定した。

4. 研究成果

(1) Vps4 の基質認識ならびに活性制御機構について

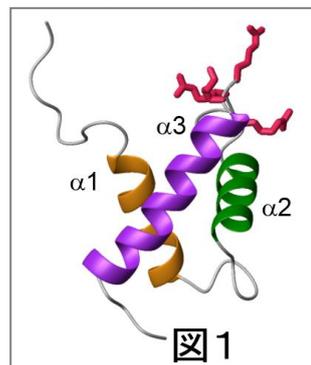
膜骨格 ESCRT-III 複合体を切断する酵素 Vps4 の基質である CHMP1a について研究を行い以下の成果を得た。

- CHMP1a の C 末端は、Vps4b-MIT ドメインに結合していても α ヘリクス構造をとっており、従来予測されていた「天然変性領域」ではなかった。
- Vps4b-MIT に Ca^{2+} イオンが結合した。
- 高い立体構造類似性にもかかわらず Vps4b-MIT への Ca^{2+} イオン結合部位は、Kp60-vMIT のそれとは位置が異なっていることが明らかになった。
さらに、
- CHMP1a と Vps4b-MIT の結合親和性は、MIT ドメインに結合する Ca^{2+} イオンの影響は受けない。
- ヒトに 2 種類ある Vps4 において Vps4a と Vps4b ではペプチドに対する親和性が大きく異なる。
- Vps4b-MIT は Ca^{2+} 依存的に膜成分であるホスファチジルイノシトールリン酸に結合することがわかった。変異体実験により、 Ca^{2+} イオンの認識にかかわる重要な残基の同定に成功した。

(2) Nvl2 の N 末端ドメインの立体構造ならびに分子機能について

核小体に局在し ribosome 生合成を調節するクラス II に属する AAA 酵素 Nvl2 について

- その N 末端のユニークなドメイン (NVL2^{UD} と命名) の立体構造決定に成功した (図 1)。



- NVL2^{UD} の立体構造はヒストンフォールドに類似しており、新規のドメインであった。
- NVL2^{UD} の結合相手が核小体を構成する最多成分である nucleolin であることを解明した。また、他の結合相手候補の中に、RRM ドメインを含むタンパク質が複数見出された (表 1)。

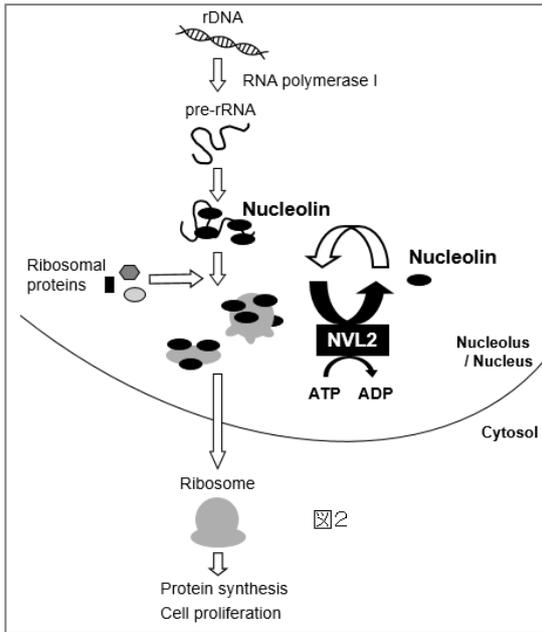
List of protein candidates identified from mass spectrometry

Protein	Molecular weight (kDa)	Score
Ribosomal protein L7	29.7	113
Nucleolin	76.6	86
Leucine rich repeat containing 59	34.5	83
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C	33.6	80
Progesterone receptor membrane component 2	23.8	78
Proteasome subunit α type, 5	26.4	75
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D	30.4	70
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A	37.0	68
Proteasome subunit α type, 7	27.9	63
Prohibitin	23.6	62
Vimentin	20.0	62

[表 1]

- Nucleolin の NVL2^{UD} 結合部位はその分子の C 末側後半の 4 つの RRM ドメインならびに GAR 領域であった。
- 二つ以上の RRM または GAR ドメインが連続した nucleolin のコンストラクトにのみ NVL2^{UD} は結合した。
- Nucleolin と NVL2^{UD} の結合には一本鎖 RNA の関与が必須であることが明らかになった。

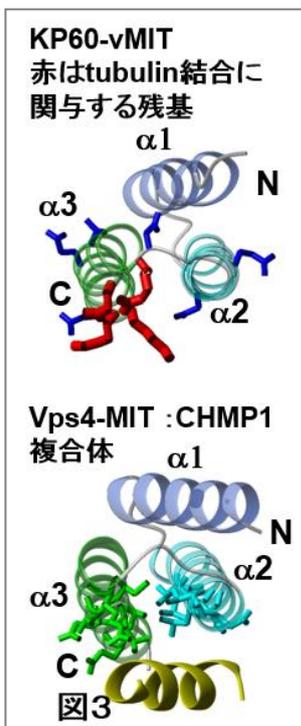
これらの結果より Nvl2 の細胞内での役割について、図 2 に示すような仮説を提案した。



(3) Katanin p60 の微小管切断機構ならびにその活性制御機構

クラス I に属する AAA 酵素である katanin p60 について、以下のことが明らかになった。

- A) 微小管結合部位である新規 N 末端ドメインの NMR による立体構造決定に成功した。その立体構造は、アミノ酸配列相同性が 20%程度と低いものの、Vps4 の MIT ドメインときわめて類似した構造であった。研究代表者らは、このドメインを variant MIT ドメインと命名した。
- B) さらに変異体実験を行い、kp60 の N 末端ドメインと微小管の相互作用部位の決定にも成功した。その相互作用部位は、立体構造が類似している Vps4 の MIT ドメインと、Vps4 基質である膜骨格 ESCRT-III 構成成分である CHMP1 との相互作用機構と、構造的に非常によく似ていた (図 3)。

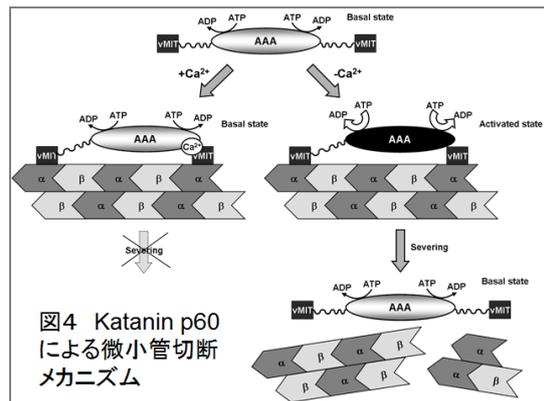


- C) katanin p60 の微小管切断活性が Ca^{2+} イオンにより制御された。
- D) Ca^{2+} 結合部位は微小管結合部位である N 末端ドメインにあった。
- E) kp60 の N 末端ドメインに微小管または kp80 が結合すると、それを感知して、kp60 の ATP 加水分解活性が上昇した。
- F) Ca^{2+} の存在は、その上昇分の活性を抑制すると同時に、微小管切断活性を阻害した。
- G) これまで分子モデリングによる予測結果しかなかった微小管上の kp60 結合部位が α チューブリンの第 12 番目ヘリックスであり、微小管保護タンパク質 Tau の結合と生理的にも拮抗している可能性があることが分かった。
- H) Kp60-vMIT に結合する人工ペプチドの探索にも成功し、新規の人工的ペプチド 4 種を得た (表 2)。このペプチドの結合部位を NMR により検証した。ペプチドのうちの一つは、Kp60 のアダプター分子 katanin-p80 との界面付近に結合することがわかった。

表 2 Phage Display によって得られた KP60 結合ペプチド

ペプチド	配列	分子量	pI
ペプチド 2	Y P Q H K P P R P S M N T	1552.71	9.99
ペプチド 3	Y L G L R P K K P R M S R	1601.90	11.73
ペプチド 5	Y V K K N P G R R G E P R	1556.73	11.00
ペプチド 6	Y R G G P R S R L R F K Q	1620.81	12.01

これらを総括して、Katanin による微小管切断機構のモデルを提案した (図 4)。



5. 主な発表論文等 〔雑誌論文〕 (計 10 件)

- Motono, C., Nakata, J., Koike, R., Shimizu, K., Shirota, M., Amemiya, T., Tomii, K., Nagano, N., Sakaya, N., Misoo, K., Sato, M., Kidera, A., Hiroaki, H., Shirai, T., Kinoshita, K., Noguchi, T., and

Ota, M. 2010. SAHG, a comprehensive database of predicted structures of all human proteins. *Nucleic Acids Res* **39(suppl 1)**: D487-D493. (査読有)

2. Iwaya, N., Kuwahara, Y., Fujiwara, Y., Goda, N., Tenno, T., Akiyama, K., Mase, S., Tochio, H., Ikegami, T., Shirakawa, M., and Hiroaki, H*. 2010. A common substrate recognition mode conserved between katanin p60 and VPS4 governs microtubule severing and membrane skeleton reorganization. *J Biol Chem* **285**: 16822-16829. (査読有)

3. Jee, J., Mizuno, T., Kamada, K., Tochio, H., Chiba, Y., Yanagi, K., Yasuda, G., Hiroaki, H., Hanaoka, F., and Shirakawa, M. 2010. Structure and mutagenesis studies of the C-terminal region of licensing factor Cdt1 enable the identification of key residues for binding to replicative helicase Mcm proteins. *J Biol Chem* **285**: 15931-15940. (査読有)

4. Fukuchi, S*, Sakamoto, S., Nobe, Y., Murakami, D. S., Amemiya, T., Hosoda, K., Koike, R. Hiroaki, H., and Ota, M*, 2012. IDEAL - Intrinsically Disordered proteins with Extensive Annotations and Literature. *Nucleic Acids Research (database issue)*, **40** (1):D507-511. (査読有)

5. Hiroaki, H*, Umetsu, Y., Hoshi, M., Nabeshima, Y. and Kohda, D., 2011. A Simplified Recipe for Assigning Amide NMR Signals Using Combinatorial ¹⁴N Amino Acid Inverse-Labeling. *J Structural Functional Genomics.*, **12** (3): 167-174. (査読有)

6. Fujiwara, Y., Fujiwara, K., Goda, N., Iwaya, N., Tenno, T., Shirakawa, M., Hiroaki, H*. 2011. Structure and function of the N-terminal nucleolin binding domain of nuclear Valocin containing protein like 2 (NVL2) harboring a nucleolar localization signal. 2011. *J Biol Chem* **286** (24):21732-21741. (査読有)

7. Hiroaki, H*, Recent applications of isotopic labeling for protein NMR in drug discovery. Expert Opinion on Drug Discovery, invited review, **8**(5):523-536. (査読有)

8. Iwaya, N., Akiyama, K., Goda, N., Tenno, T., Fujiwara, Y., Hamada, D., Ikura, T., Shirakawa, M., and Hiroaki, H*.

H*. 2012. Effect of Ca²⁺ on microtubule severing enzyme katanin p60: insight into the substrate dependent activation mechanism. *FEBS J.*, **279**:1339-1352. (査読有)

9. Ota, M*, Koike, R., Amemiya, T., Tenno, T., Romero, P.R., Hiroaki, H., Dunker, A.K., and Fukuchi, S. 2013. An assignment of intrinsically disordered regions of proteins based on NMR structures. *J Structural Biol.*, **181**:29-36. (査読有)

10. Iwaya, N., Takasu, H., Goda, N., Shirakawa, M., Tanaka, T., Hamada, D., and Hiroaki, H*. 2013. MIT domain of Vps4 is a Ca²⁺-dependent phosphoinositide-binding domain. *J Biochem.*, **153**(5):473-481. (査読有)

[学会発表] (計 12 件)

1. 藤原芳江, 藤原健一郎, 合田名都子, 岩谷奈央子, 天野剛志, 廣明秀一, NVL2 の N 末端にある新規ヌクレオリン結合ドメインの構造と機能, 第 49 回 NMR 討論会, 2010/11/16, 東京

2. 廣明秀一* Structure and Function of the Two N-Terminal Domains of AAA-ATPases, p60 Katanin and Nuclear Valosin Containing Protein Like 2 (NVL2) 9th International Conference on AAA proteins, 2011/11/6, 熊本市国際交流センター(熊本市)

3. 廣明秀一, 合田(天野)名都子*, 天野剛志, 本野千恵子, 富井健太郎, 清水佳奈, 木下賢吾, 太田元規, Contribution of NMR studies to constructing SAHG, a database of predicted protein structures from human genome. ISNMR2011-第 50 回記念 NMR 討論会国際シンポジウム, 2011/11/15, 横浜大榎橋ホール(横浜市)

4. 藤原芳江, 合田名都子*, 岩谷奈央子*, 天野剛志*, 白川昌宏, 廣明秀一*, 核小体に局在する AAAATPase, NVL2 の N 末端ドメインの解析, 第 34 回日本分子生物学学会年会, 2011/12/13, パシフィコ横浜(横浜市)

5. 廣明秀一*, 創薬標的としての AAA-ATPase と NMR 構造生物学 第一回岐阜構造生物学・医学・論理的創薬研究会シンポジウム:構造生物学・医学・論理的創薬の拠点構築を目指して, 2012/3/23, 岐阜大学医学部 (岐阜市)

6. 雨宮崇之, 坂本盛宇, 野辺由紀子, 村上聖子, 細田和男, 小池亮太郎, 廣明秀一, 太田元規, 福地佐斗志*, 天然変性タンパク質

データベース IDEAL の開発, 第 12 回日本蛋白質科学会年会, 2012/6/22, 名古屋国際会議場

7. 岩谷奈央子、合田名都子、天野剛志、藤原芳江、濱田大三、伊倉貞吉、白川昌宏、廣明秀一、微小管切断酵素 p60-katanin に対する Ca^{2+} の効果, 第 12 回日本蛋白質科学会年会, 2012/6/22, 名古屋国際会議場

8. 雨宮崇之、坂本盛宇、野辺由紀子、村上聖子、嘉戸裕美子、細田和男、小池亮太郎、廣明秀一、太田元規、福地佐斗志, IDEAL: the collection and visualization of knowledge regarding intrinsically disordered proteins verified by experiments, The 2nd International Symposium on Intrinsically Disordered Proteins, 2013/1/23, 理化学研究所横浜研究所

9. 岩谷奈央子、合田名都子、高須博敏、白川昌宏、田中俊樹、濱田大三、廣明秀一, I 型 AAA-ATPase の N 末端ドメインに存在する Ca^{2+} 結合部位の機能比較, 日本薬学会第 133 年会, 2013/3/28, パシフィコ横浜 (横浜市)

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

研究室ホームページ (名古屋大学創薬科学研究科構造分子薬理学分野)

<http://presat-vector.org/hiroaki-lab/?p=54>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

廣明 秀一 (HIROAKI HIDEKAZU)

名古屋大学大学院創薬科学研究科・教授

研究者番号: 10336589

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

天野 剛志 (TENNO TAKESHI)

名古屋大学大学院創薬科学研究科・助教

研究者番号: 70381663

藤原 芳江 (FUJIWARA YOSHIE)

京都大学物質-細胞統合システム拠点・研究員

研究者番号: 90423095