

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 20 日現在

機関番号：22604

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23770124

研究課題名（和文） チューブリンチロシンリガーゼの構造解析と応用

研究課題名（英文） Structural studies on tubulin tyrosine ligase and its application.

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

研究成果の概要（和文）：

全長ヒトチューブリンチロシンリガーゼ 1（TTL1）の大腸菌による発現系を構築し、精製系を確立した。この際、シャペロンの共発現系を用い収量を約 5 倍にすることに成功した。また、凝集が起こらず、NMR 信号の分離のよい観測条件を見つけることができた。並行して、緑色蛍光タンパク質 GFP と TTL1 を融合させることで、コロニーレベルで TTL1 の安定性を検討するシステムの開発に取り組んだ。また α -tubulin の C 末端領域の発現系を構築、標識試料を調製し、NMR チューブ内でチロシン化反応を行い、リアルタイムでの TTL の活性をモニターする系を確立した。

研究成果の概要（英文）：

We have established the *E. coli* expression system for the full-length human tubulin tyrosine ligase 1 (TTL1). By using co-expression technique, molecular chaperone was co-expressed to improve the solubility of TTL1, and we succeeded in improvement of the yield about 5 times. We also found that the optimal buffer condition for NMR measurement. We have also developed the high-throughput monitoring system using GFP fused TTL1. Meanwhile, we have established the real-time monitoring system of TTL1 activity by NMR.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	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：NMR、チューブリンチロシンリガーゼ、微小管

1. 研究開始当初の背景

近年、微小管の伸長端（プラス端）に集積し、その伸長を促進する +TIPs（plus-end tracking proteins）と総称される結合タンパク質の研究が急速に発展し、+TIPs である CLIP-170 等が微小管動態を制御することが明らかになってきた。申請者は、CLIP-170 が

α -tubulin の C 末端のチロシンを分子認識して結合することを、構造レベルで世界に先駆けて明らかにした。この α -tubulin の C 末端チロシンは、脱チロシン化とチロシン化のサイクルを持ち、チロシン化の状態が微小管動態や機能に関与している。このチロシン化のサイクルにおいて特異的に β -tubulin の C 末端にチロシンを付加する酵素、tubulin

tyrosine ligase(TTL)が存在し、最近 TTL の KO マウスが致死であること、神経細胞の機能に重要であることが明らかになり、その分子レベルでの理解が極めて重要な問題となってきた。また TTL は、Tubulin Tyrosine Ligase-Like protein(TTL)と呼ばれる一連の酵素とファミリーを形成する。TTL では tubulin 等へのポリグリシン付加、ポリグルタミン酸付加を行うものがあり、染色体分配等、様々な生命現象への関連が明らかになりつつある。

2. 研究の目的

微小管の化学修飾による種々の制御のメカニズムを分子構造に立脚して理解することを目指している。本申請研究では、チューブリンチロシン化の意義の理解をより深化させるため TTL の立体構造の解析を目標とした。また応用として、TTL を利用したタンパク質修飾技術への展開を目指して研究を行った。また立体構造決定等や応用研究のために、安定な変異体の調製をハイスループットで行うスクリーニング法の構築を行い、その有用性を検討した。

3. 研究の方法

■NMR 測定試料の調製

cDNA mixture(Clonetech)から目的遺伝子を増幅し、pET151/D-TOPO に組み込み TTL 発現プラスミドを作成した。大腸菌 BL21 を用いて発現系を作成し、20°Cで一晩発現誘導をかけ大量発現を行った。この際、シャペロンプラスミド pG-KJE8(TAKARA)との共発現を行った。次いで DEAE sepharose、Ni アフィニティーカラムを通し、ゲル濾過からむクロマトグラフィーによる精製を行った。しかし、単離、精製された TTL は凝集を起こしやすく、測定条件の検討が必要であった。

■測定条件の検討

TTL のリガンドとして知られている、 Mg^{2+} 、AMPPCP、tyrosine を buffer に加え、buffer の pH と塩濃度を変化させ、TTL の安定性のモニタリングを行った。また、タンパク質の安定化の効果があると言われているアルギニンを加えた測定も試みた。

■安定性の高い変異体の作成

TTL の分子表面に露出している、電荷を持った残基が凝集を引き起こす要因の一つだと考え、変異の導入による改善を試みた。TTL

の構造は未知なため、分子表面に露出している残基の特定は出来ず、変異体の有効性の判別には時間がかかる。そこで、GFP の蛍光をもちいた判別法の作成に取り組んだ。

GFP と TTL が同一プラスミド上に存在する発現プラスミドを、In-Fusion Advantage PCR Cloning Kit をもちいて作成し、大腸菌 BL21 に形質転換を行った。発現時の条件を変え、GFP の蛍光の強さを比べ TTL の性質を検討した。

■TTL による α -tubulin C 末端領域へのチロシン付加の観測

pGEX 6P-3 ベクター、大腸菌 BL21 を用いて、 ^{15}N 標識した α -tubulin C 末端領域の大量発現を行い、GSH アフィニティーカラムに通し、ゲル濾過カラムクロマトグラフィーにより精製を行った。得られたサンプルに TTL を加え、NMR によってそのスペクトルの変化を追った。

更に、TTL の活性を調べるために、上記のサンプルに、反応に必要なとされる ATP、Tyr、 Mg^{2+} 、を加えてチロシン化反応を起こし、NMR によって α -tubulin のシグナルの変化を追った。

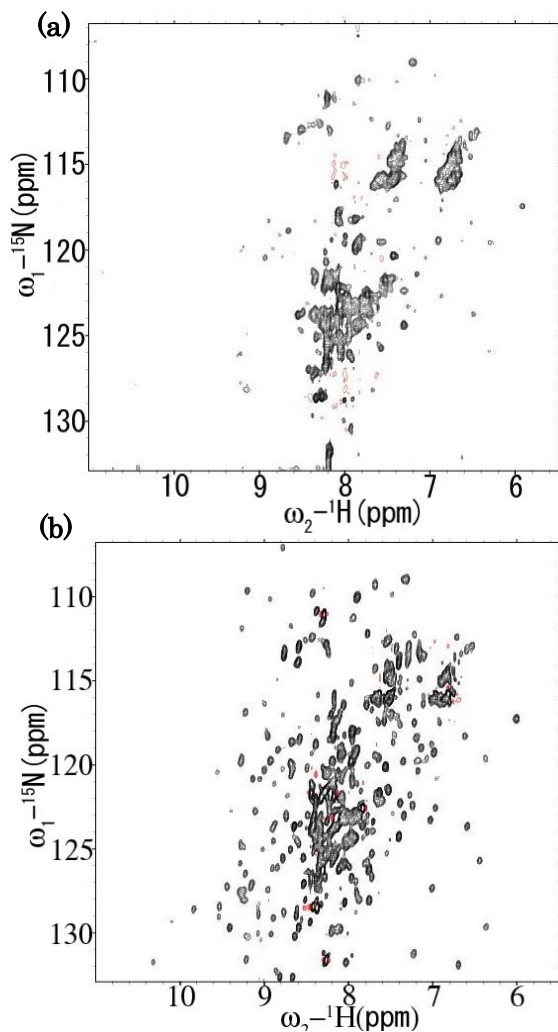
4. 研究成果

■条件の検討

NMR を用いた構造研究には、安定で高濃度な試料が不可欠である。全長ヒト TTL1 の大腸菌による発現系を構築し、精製系を確立した。大腸菌では大量に封入体を形成したことから、シャペロンの共発現系(タカラ)を用いた。これにより最終的な収量を約5倍にすることに成功した。NMR 測定 buffer の条件を検討した結果、高塩濃度、pH 6.0 で比較的安定な試料が得られた。しかし高塩濃度では NMR 測定時の感度が低下するため、塩濃度、蛋白質濃度を最適化し、二次元 NMR 測定が可能な条件が得られた(図1)。しかし立体構造研究を行うには不十分であった。そのため、さらに可溶性の向上を目指し、AMPPCP との複合体の検討等を行ったが、大きな変化は見られなかった。またアルギニンを buffer に加えることで TTL の安定性の改善は顕著ではなかった。

■TTL による α -tubulin C 末端領域へのチロシン付加の観測

NMR 測定の結果、TTL と α -tubulin C 末端領域との結合を確認した。TTL による



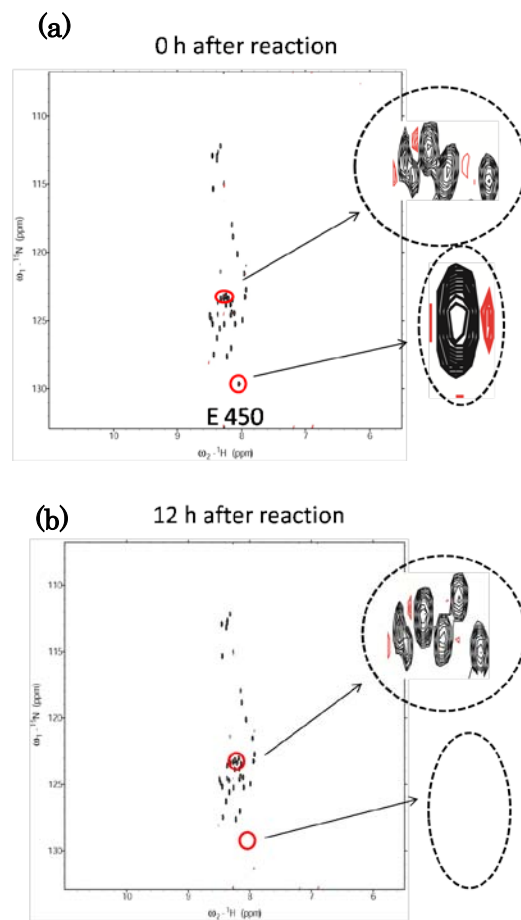
(図 1) ヒト TTL1 の TROSY スペクトル
(a) 条件を最適化する前 (b) 条件を最適化した後。

α -tubulin C 末端への Tyr の付加反応を NMR で測定したところ、時間変化におけるスペクトルの変化を観測し、NMR チューブ内でのチロシン化のリアルタイムでのモニタリングに成功した (図 2)。

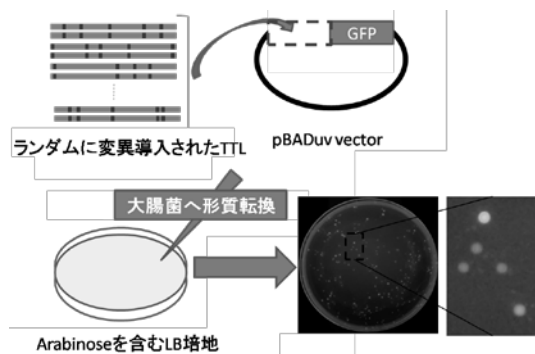
■安定性の高い変異体の作成

最近、Szyk A, et al. Nat Struct Mol Biol. 11 1250-8 (2011) において、TTL の結晶構造が明らかにされたが、依然として、その溶液中の構造や動的性質の研究には溶液 NMR による解析が必要である。そこで、溶解度が高く安定な試料の獲得のため GFP を用いた変異体調製におけるスクリーニング法を構築し、その有用性を検討した。TTL は高塩濃度で高い可溶性を示すことから、分子間での静電的相互作用によって凝集を起こしていると考え

られた。そのため、電荷を持ったアミノ酸を置換することで、静電的相互作用を弱めることができると考えられた。しかし、電荷を持ったアミノ酸の数が 86 個と多いため、変異体の調製、性質の検討を行い可溶性の向上した変異体を得ることは難しい。そこで random mutagenesis を用いて多様な変異体を一度に調製し、その性質の検討法として、GFP を用いた新規スクリーニング法の構築に取り組んだ (図 3)。GFP と TTL を融合蛋白質として大腸菌内で発現させると、TTL の可溶性によって GFP の蛍光に違いが見られた。このことから、可溶性が向上した変異体 TTL の存在を GFP の蛍光の強度によって視覚的に判別できると考えられた。この手法は不溶性蛋白質の構造研究一般に有用なツールとして働くことが期待される。

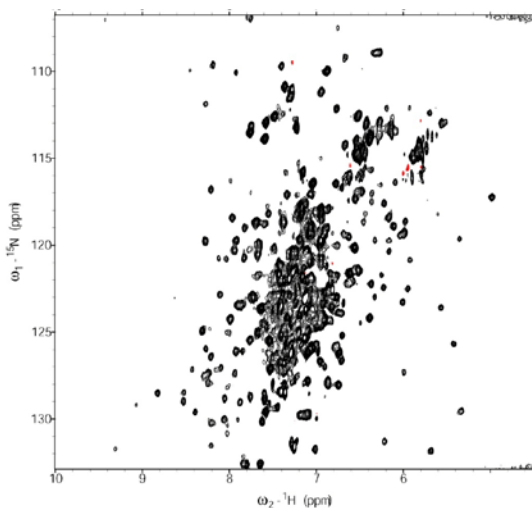


(図 2) α -tubulin C 末端領域の NMR スペクトル
(a) TTL1 によるチロシン化反応前 (b) 反応後 12 時間後。



(図 3). 変異体調製におけるスクリーニング法の簡略図

最終的には、立体構造の発表されたゼノパスの TTL のアミノ酸配列とのアライメントを検討し、電荷に着目して、二重変異体を作成した。この二重変異体では、顕著な溶解度の向上が見られ、構造解析が十分可能な NMR スペクトルを取得することができた。



(図 4) 0.5 mM ヒト TTL1 (可溶性向上型二重変異体) の TROSY スペクトル 50 mM KCl, 0.5 mM DTT, 1 mM MgCl, 298 K

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 2 件)

(1) Microtubule-binding sites of the CH domain of EBI and its autoinhibition revealed by NMR.

Kanaba T, Maesaki R, Mori T, Ito

Y, Hakoshima T, Mishima M.

Biochim. Biophys. Acta. 2013
1834(2):499-507

(2) 「メチル TROSY 法を用いた巨大生体高分子の NMR 解析と構造生物学への応用」
分光研究 2012 年 第 61 巻 194-195
三島正規

[学会発表] (計 2 件)

(1) 「微小管ダイナミクスを制御する蛋白質群についての構造研究」

金場 哲平、佐伯 邦道、森 智行、前崎 綾子、伊藤 隆、箱嶋 敏雄、三島 正規
第 11 回 日本蛋白質科学会年会 吹田
2011 年 6 月 8 日

(2) "Structural studies of tubulin tyrosine ligase 1"

Kunimichi Saeki, Ryoko Maesaki, Yutaka Ito, Toshio Hakoshima, and Masaki Mishima
ISNMR2011 Yokohama 2011 Nov. 16, 18

[その他]

ホームページ

<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・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・理工学研究科・教授
研究者番号：80261147

(3) 連携研究者

箱嶋 敏雄 (HAKOSHIMA TOSHIO)
奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・教授
研究者番号：00164773