

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2012～2015

課題番号：24687013

研究課題名(和文) 受容体型チロシンキナーゼの半合成と構造機能解析

研究課題名(英文) Semi-synthesis of receptor tyrosine kinase and its structure and function analysis

研究代表者

佐藤 毅 (Sato, Takeshi)

大阪大学・たんぱく質研究所・講師

研究者番号：90403013

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 20,900,000円

研究成果の概要(和文)：細胞の増殖や分化に関わる受容体型チロシンキナーゼの機能不全はがん等の重篤な疾患の原因となる。本研究では、当該受容体の構造機能解析において困難な部分であった膜貫通 膜近傍部位に関して詳細な解析を行い、さらに細胞を用いて調製したタンパク質断片と合成化学的に調製したタンパク質断片を縮合する半合成という技術の開発を行うこととした。各種分光学的構造解析実験から、受容体の活性化における膜貫通 膜近傍部位の構造変化に関しては新たな知見を得ることに成功し、細胞外領域から膜貫通 細胞質内膜近傍部位に至る受容体断片の半合成にも成功した。

研究成果の概要(英文)：Receptor tyrosine kinase is a transmembrane receptor which initiates a signaling for cell growth and differentiation. Dysfunction of the receptor can be a cause of cancer. In this project, focusing on the transmembrane-juxtamembrane region of the receptor, which has been one of the most difficult portions in the field of structural biology, the structural analysis was performed. Results provided a new concept in the activation mechanism of receptor tyrosine kinase, which is the release of the intracellular juxtamembrane region from the inner leaflet of the plasma membrane. Also, the strategy of its semi-synthesis is developed. Semi-synthesis chemistry to couple expressed protein and chemically synthesized protein fragments. A portion of the receptor, from the extracellular region to the transmembrane-intracellular juxtamembrane region, was successfully synthesized.

研究分野：構造生物化学

キーワード：膜タンパク質 半合成 膜貫通 膜近傍部位

1. 研究開始当初の背景

細胞には様々な膜構造が存在し、そこでは多種多様な生物学的事象が生じている。この生体膜上の生物学的事象を生じさせるキープレーヤーは膜タンパク質である。タンパク質の構造生物学的研究の多くは結晶構造解析や NMR 特に溶液 NMR を用いた手法によってなされてきているが、膜タンパク質の構造解析は困難と言われ続けている。原因は、タンパク質の獲得そのものが困難であること、脂質二重膜中における結晶構造解析は現段階では挑戦的であること、または溶液 NMR を行ううえでの試料の可溶化が困難であること等が挙げられるが、本質的には膜貫通ならびに膜近傍部位の存在そのものが研究を困難とさせていた。従って、多くの膜タンパク質、特に本研究の対象としている 1 回膜貫通型タンパク質の構造生物学的研究では、疎水性膜貫通領域を含まない水溶性領域の解析研究が先行していた。膜貫通-膜近傍部位は膜タンパク質を特徴づける領域であり、当部位の脂質二重膜中における解析は、膜タンパク質の機能を知る上で必要不可欠である。高分解能の解析を可能とする試料の調製法、解析手法におけるブレイクスルーが求められていた。

2. 研究の目的

筆者は、本研究を開始するまで、試料調製に関しては自由度高く各種修飾を可能とするペプチド合成化学、解析に関しては試料の可溶化を必要としない固体 NMR、それぞれの利点を生かしながら、特に膜貫通-膜近傍部位に注目し、当部位の脂質二重膜中における構造、物性解析研究を行っていた。膜タンパク質が生体膜上においてどのように形を変え、多種多様のタンパク質や生体膜を構成する機能性脂質分子等と相互作用することによって機能を発現しているのか、その分子機構の解明を目指した研究である。

本研究では、1 回膜貫通型受容体の構造生物学的研究において語られることが稀であった細胞外領域と細胞質内領域の機能の連動を担う膜貫通-膜近傍部位の機能の分子機構を明らかにすべく研究を行うこととした。

本研究では、がんまたは小人症等の疾患と関連が深い受容体型チロシンキナーゼの一つであるヒトの繊維芽細胞増殖因子受容体 (FGFR3) を研究対象とした。当受容体に関しては、細胞外、細胞質内領域の結晶構造はすでに報告されていた。今回は全長受容体を合成化学的、分子生物学的手法を組み合わせた半合成化学的手法による調製法を確立し、その受容体の脂質二重膜中における構造解析、特に細胞外領域におけるリガンド結合に伴った膜貫通-膜近傍部位の構造変化の解析を当該部位のみに標識を導入した試料を用い、固体 NMR や蛍光測定等の分光学的手法によって行うことから、受容体機能発現機構の分子メカニズムの本質に迫るべく研究を

行うこととした (図 1)。

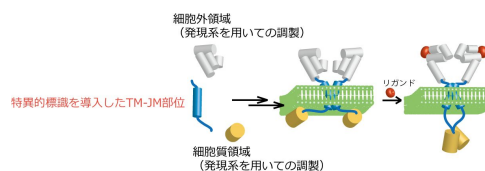


図 1 本研究のコンセプト。半合成を行い、各種分光学的解析により、膜貫通 膜近傍部位の構造と機能の相関を明らかとする。

3. 研究の方法

膜貫通 細胞質内膜近傍部位配列の化学合成

FGFR3 の膜貫通 細胞質内膜近傍部位を半合成における合成ブロックとし、さらには当該部位の構造解析試料とすることとした。当該配列においてもライゲーション法を用いて合成することによって、細胞質内領域 C 末端に自由に蛍光プローブ等を導入することが可能となる。膜貫通部位を含んだペプチドチオエステルは通常の逆相 HPLC 条件による精製は困難であるため、筆者らが見出した大量のギ酸を用いた精製法によって行うこととした。この実験においては、ライゲーション反応における膜貫通部位を有する合成ブロックの可溶化条件の検討も行った。

細胞外領域合成ブロックの発現と調製

この細胞外領域合成ブロックの調製には、生体内における蛋白質のスプライシング反応を利用することで、C 末端にチオエステルを有する合成ブロックを調製することとした。発現に関しては結果的に大腸菌発現系、動物細胞発現系、両方を用いることとなった。

FGFR3 細胞外 膜貫通 細胞質内膜近傍部位の半合成

上記、の実験で得られる膜貫通部位配列の可溶化条件をもとに、で調製した細胞外領域との縮合を行うこととした。

受容体型チロシンキナーゼ膜貫通 膜近傍部位の構造機能解析

半合成受容体を用いた解析研究に向けた前段階として、膜貫通 膜近傍部位の脂質二重膜中における構造解析を、固体 NMR 等の各種分光学的手法によって行った。FGFR3 の他、受容体型チロシンキナーゼ上皮増殖因子受容体ファミリーに属する ErbB2/Neu も研究対象とした。

4. 研究成果

FGFR3 膜貫通 細胞質内膜近傍部位配列の化学合成

膜貫通配列を含んだペプチドチオエステル、細胞質内膜近傍配列、両合成ブロックの縮合を native chemical ligation 法によって行った。本法は水系緩衝液中の反応であるため、膜貫通配列を含んだ合成ブロックの可

溶化には界面活性剤を用いた。条件検討を行ったところ、用いた界面活性剤(オクチルグルコシド)の臨界ミセル濃度以下の濃度での可溶化によって最も効率よくライゲーション反応が進行することがわかった。

細胞外領域合成ブロックの発現と調製

まず、細胞外領域合成ブロックの大量調製には大腸菌発現系を用いることとした。各種条件検討を行ったが、収量の改善に至らなかった。大腸菌によって細胞外領域合成ブロックを調製した場合、目的タンパク質は沈殿画分に存在するため、機能解析実験には当該部位のフォールディングが必要となる。この過程においても、試料のロス避けられない。従って、当該部位の調製ストラテジーを見直し、動物細胞を用いて調製を行うこととした。その結果、HEK293細胞を用い、ライゲーションの合成ブロック、すなわちC末端にチオエステルを有する細胞外領域タンパク質断片の調製を行うこととした。細胞外領域のC末端にインティン配列を導入し、当該部位のフォールディングによってチオエステル構造を有するタンパク質断片の調製を試みた。HEK293細胞においても、所望のタンパク質断片の発現は可能であること、さらにインティン部分のフォールディングによってチオエステルを導入することも可能であることを見出した。

FGFR3 細胞外 膜貫通 細胞質内膜近傍部位の半合成

上記において調製した細胞外領域合成ブロックと膜貫通 膜近傍配列合成ブロックの縮合を native chemical ligation 法によって行うこととした。各種条件検討を行ったところ、本ライゲーション反応は4で行う、また、界面活性剤の使用に関しては臨界ミセル濃度以下で用いることで、目的物であるFGFR3細胞外 膜貫通 細胞質内膜近傍部位を獲得することが可能であることを見出した(図2)。一方で、現時点においても、大量調製の壁を越えることができていない。固体NMRによる解析では、mg単位の試料が必要となるが、そのためには、動物細胞を用いることでの細胞外領域配列を含んだ合成ブロックの大量調製が必須であることがわかった。

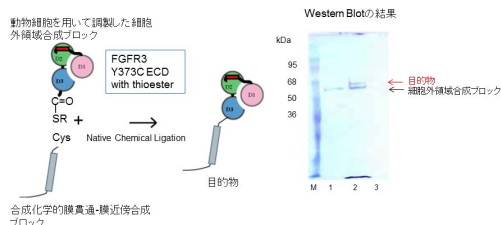


図2 半合成反応の概念とその結果。ライゲーション反応の進行をWestern Blotで示した。

受容体型チロシンキナーゼ膜貫通 膜近傍部位の構造機能解析

ErbB2/NeuとFGFR3には膜貫通部位に常時活性を示す変異(ErbB2/Neu:V664E; FGFR3:G380R, A391E)が見出されている。そこで部位特異的に標識した野生型と常時活性型の膜貫通-細胞質内膜近傍部位配列ペプチドを化学合成し、脂質二重膜に包埋し、固体NMRや蛍光実験、偏光FT-IRなどの分光学的手法を用いてそれぞれの構造解析を行うこととした。

ErbB2/Neuに関して野生型と常時活性型の細胞質内膜近傍部位の挙動を蛍光実験で観察することとした。細胞質内膜近傍部位のC末端に蛍光物質を導入した野生型とV664E変異型の膜貫通-膜近傍部位配列ペプチドを化学合成し、脂質二重膜に包埋したものを試料とし、PI(4,5)P2を系中に加えたときの蛍光強度を測定した。その結果、野生型ではPI(4,5)P2の添加に伴い蛍光強度に変化がみられたが、V664E変異型では蛍光強度に変化はみられなかった。野生型では細胞質内膜近傍部位は膜に結合しているため、膜組成の変化、すなわちPI(4,5)P2の添加によって蛍光強度に変化を与え、一方、V664E常時活性変異型では、IJM部位が膜から解離しているため、膜組成の変化に反応しないという解釈が可能であった。さらに固体NMRによって両配列におけるIJM部位の運動性を比較したところ、V664E変異型の細胞質内膜近傍部位は野生型のもの比べ、大きな運動性を有することが分かった。この結果は上記解釈を支持するものだった。さらに、この当該部位の膜からの解離は二量体を形成する膜貫通ヘリックスの相対的配向に依存することも分かった。本実験結果の最重要ポイントは膜貫通ヘリックスの相対的配向に伴って、細胞質内膜近傍部位の脂質二重膜との相互作用が変化することを見出したところであり、図3に示すErbB活性化機構のモデルの提唱を行った。リガンド結合に伴い、細胞質内膜近傍部位は形質膜から解離し、細胞質内における機能発現が誘導されるというものである。興味深いことに、同時期に米国のKuriyanのグループも同様のモデルの提唱に至っている[Endres et al. Cell 2013]。この結果はPNAS誌に掲載されている(Matsushita et al. 2013)。現時点において、この細胞質内膜近傍部位の膜からの解離は、当該受容体の活性化機構を語る上では必須のコンポーネントとなっている。

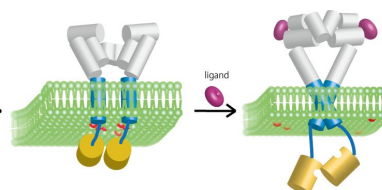


図3 筆者ら提唱のErbB活性化機構

上記モデルの検証を FGFR3 に関して行うこととした。野生型と G380R 変異型, A391E 変異型の膜貫通-膜近傍部位配列ペプチドを用いて同様の蛍光実験を行った。FGFR3 も ErbB2/Neu と同様の結果が得られ、野生型の細胞質内膜近傍部位は脂質二重膜と結合しており、G380R 変異型と A391E 変異型の細胞質内膜近傍部位は脂質二重膜から解離していることがわかった。

さらに、膜近傍部位の挙動の違いの要因となる膜貫通部位の構造解析を行った。偏光 FT-IR を用いて野生型と G380R 変異型, A391E 変異型の膜貫通部位の脂質二重膜に対する配向を調べたところ、G380R 変異型と A391E 変異型の膜貫通ヘリックスは野生型と比較して脂質二重膜に対してより垂直に近い角度で配向していることがわかった。また、野生型の配列に関して、脂質二重膜の厚さと細胞質内膜近傍部位の解離との間に相関を見出した。すなわち、脂質二重膜を厚くすれば、膜貫通ヘリックスと脂質二重膜の法線との角度は小さくなり(偏光 FT-IR で確認済み)、それに伴って細胞質内膜近傍部位が膜から解離することが分かった。これら結果は上記 ErbB2/Neu 結果と一致するものであり、FGFR3 についても細胞質内膜近傍部位の膜からの解離が細胞質内領域における機能発現を誘起する可能性を示唆するものであると考えている。この結果は *Biochemistry* 誌に掲載されている(Tamagaki et al. 2014)

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 12 件)

Emilie Leroy, Jean-Philippe Defour, Takeshi Sato, Sharmila Dass, Vitalina Gryshkova, Shwe Myat Marlar, Judith Staerk, Stefan N. Constantinescu and Steven O. Smith. His499 Regulates Dimerization and Prevents Oncogenic Activation by Asparagine Mutations of the Human Thrombopoietin Receptor. *J.Biol.Chem.* 291, 2974-2987 doi: 10.1074/jbc.M115.696534

Takeshi Sato. Synthetic transmembrane-juxtamembrane peptide for the structure and function of ErbB receptor tyrosine kinase. *Biopolymers Peptide Science*. doi: 10.1002/bip.22775 In press.

Shizuka Takagi-Niidome, Tomoki Sasaki, Satoko Osawa, Takeshi Sato, Kanan Morishima, Tetsuo Cai, Takeshi Iwatsubo, and Taisuke Tomita*. Cooperative roles of hydrophilic loop 1 and the C terminus of presenilin 1 in the substrate-gating mechanism of γ -secretase. *J. Neurosci.* 35, 2646-2656, 2015 doi: 10.1523/JNEUROSCI

Tadamasa Arai, Daisuke Sasaki, Takushi

Araya, Takeshi Sato, Youhei Sohma* and Motomu Kanai*. A Cyclic KLVFF-Derived Peptide Aggregation Inhibitor Induces the Formation of Less Toxic Off-Pathway Amyloid-Oligomers. *ChemBioChem* 17, 2577-83, 2014
doi: 10.1002/cbic.201402430

Hiroko Tamagaki, Yusuke Furukawa, Ritsuko Yamaguchi, Hironobu Hojo, Saburo Aimoto, Steven O. Smith and Takeshi Sato. Coupling of transmembrane helix orientation to membrane release of the juxtamembrane region in FGFR3. *Biochemistry* 53, 5000-5007, 2014 doi: 10.1021/bi500327q

Tadamasa Arai, Takushi Araya, Daisuke Sasaki, Atsuhiko Taniguchi, Takeshi Sato, Youhei Sohma* and Motomu Kanai*. Rational Design and Identification of Non-Peptidic Aggregation Inhibitor of Amyloid- Based on a Pharmacophore Motif Obtained from cyclo[-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-]. *Angew. Chem. Int. Ed.* 53, 8236-8239, 2014 doi: 10.1002/anie.201405109

Hiroko Tamagaki, Ritsuko Yamaguchi and Takeshi Sato. Structural Characterization of the Transmembrane-Intracellular Juxtamembrane Region of FGFR3 and Its Implication in the Activation Mechanism. *Peptide Science* 2013, 59-60, 2014

Abhijit Saha, Goutam Mondal, Takeshi Sato and Surajit Ghosh. In vitro reconstitution of a cellular like environment using liposome for A peptide aggregation, its propagation, peptide-lipid interaction and drug screening. *Peptide Science* 2013, 109-110, 2014

佐藤 毅 ペプチド化学を基礎とした受容体型チロシンキナーゼ膜貫通-膜近傍部位の構造解析. *化学工業* Vol.65, NO.11, 15-21, 2014

佐藤 毅 受容体型チロシンキナーゼにおける膜を介した情報伝達のしくみ. *生物物理* 313号, 5月25日, 2014

Chihiro Matsushita, Hiroko Tamagaki, Yudai Miyazawa, Saburo Aimoto, Steven O. Smith* and Takeshi Sato. Transmembrane helix orientation influences membrane binding of the intracellular juxtamembrane domain in Neu receptor peptides. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 110, 1646-1651, 2013

doi: 10.1073/pnas.1215207110

Jean-Philippe Defour, Miki Itaya, Vitalina Gryshkova, Ian C. Brett, Christian Pecquet, Takeshi Sato, Steven O. Smith and Stefan N. Constantinescu. A Tryptophan at the Transmembrane-Cytosolic Junction Modulates Thrombopoietin Receptor Dimerization and Activation. Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 110, 2540-2545, 2013 doi: 10.1073/pnas.1211560110

〔学会発表〕(計 11 件)

佐藤 毅. 受容体型チロシンキナーゼの膜貫通 膜近傍部位の構造機能解析. 蛋白質研セミナー. 2016 年 3 月 3 日.

Takeshi Sato, Research on structure and function of membrane protein using synthetic transmembrane peptides, 19th Korean Peptide Protein Symposium, Choongchungnam, South Korea, July 7-8, 2015

佐藤 毅、合成ペプチドを用いた 1 回膜貫通型タンパク質の構造機能解析、第 15 回日本蛋白質科学会年会ワークショップ「生体膜上における事象の分子機構解明を目指すペプチド生命科学」、徳島、2015 年 6 月 26 日。

Takeshi Sato, Mechanism for signaling through the membrane in activation of receptor tyrosine kinase; Molecular Targets for Diseases and Structural Life Science, The 9th International Symposium of the Institute Network; Organized by IPR and RIMD, Osaka University; Osaka, Japan, June 19-20, 2014

佐藤 毅、合成ペプチドを用いた膜タンパク質の構造生物学、横浜国立大学工学研究院リサーチフォーラム、横浜、2015 年 1 月 27 日。

佐藤 毅, EGFR 膜貫通-膜近傍部位の構造機能解析, 第 87 回日本生化学会, 京都 2014 年 10 月 15 日; フォーラム「次世代脂質生物学を支える革新的テクノロジー」。

佐藤 毅, ペプチド化学を基盤とした受容体チロシンキナーゼ膜貫通-膜近傍部位の構造機能解析, 生命分子機能研究会セミナー-2014 年 3 月 14 日。

Hiroko Tamagaki, Ritsuko Yamaguchi and Takeshi Sato. Structural Characterization of the Transmembrane-Intracellular Juxtamembrane Region of FGFR3 and Its Implication in the Activation Mechanism.

第 50 回日本ペプチド討論会、大阪、2013 年 11 月 6 日 8 日。

Abhijit Saha, Goutam Mondal, Takeshi Sato and Surajit Ghosh. In vitro reconstitution of a cellular like environment using liposome for A peptide aggregation, its propagation, peptide-lipid interaction and drug screening. 第 50 回日本ペプチド討論会、大阪、2013 年 11 月 6 日 8 日。

Takeshi Sato, Structural change in the transmembrane-juxtamembrane region of receptor tyrosine kinase for its activation; Membrane Protein Folding organized by the Biophysical Society (US) and the Korean Institute for Advanced Study; Seoul, South Korea, May 19-22, 2013

Takeshi Sato, Structural biology on membrane protein using synthetic transmembrane peptides; 4th Indian Peptide Symposium, Kolkata, India, February 22-23, 2013

〔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
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 毅 (SATO, Takeshi)
大阪大学蛋白質研究所・講師
研究者番号: 90403013