

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：22604

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14463

研究課題名(和文)ドメインライゲーションによって再構成したキナーゼ全長の動的構造解析

研究課題名(英文)Dynamical study of multi-domain kinases reconstructed by domain ligation

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：キナーゼの多くは、柔軟なリンカーで連結されたマルチドメインで構成される全長構造をもつ。本研究では、ドメイン間の配置とその変化(活性化)を、全長のキナーゼの分子構造レベルで可視化し、不活性型から活性化に至る制御機構を明らかにすることを目的としている。まずsortaseによるライゲーションによる再構成を試み、Protein Kinase CのキナーゼドメインとC1Bドメインの連結に成功した。また、全長での構造解析に必要な長距離情報を得るためのスピンラベルプローブとして、DOTA-M8を合成し、実際に常磁性効果(PCS)のNMRによる観測に成功した。

研究成果の概要(英文)： It is generally recognized that kinases consist of multiple domain (multi-domain proteins), which have flexible linker(s). This flexibility may hamper crystallization. In this study, our purpose is visualization of structural rearrangements of multi-domain kinases (transition from inhibited inactive states to activated states) using solution techniques at molecular level to understand the regulation mechanism. We have succeeded in domain ligation of C1B domain with kinase domain of protein kinase C using sortase. Further, we synthesized DOTA-M8, a rigid chelator for lanthanide ions, to measure PCS to obtain long-range distance information. It contains maleimide group which is useful to attach to proteins. Using this chelator, we actually measured PCS.

研究分野：構造生物化学

キーワード：プロテインライゲーション NMR マルチドメインタンパク質 キナーゼ

1. 研究開始当初の背景

現在までに X 線結晶構造解析による詳細な研究によって、キナーゼの活性制御の立体構造レベルの理解が進んだ。特にキナーゼドメインの中の activation loop のリン酸化によるアロステリックな制御はキナーゼ全般に普遍的な機構である。しかし、キナーゼドメインに関する研究は進んだものの、一方で、構造解析に基づくキナーゼ全長に関する知見はほとんどない。実際にシグナル伝達経路において、全長のキナーゼがシグナルを受容する場所は、活性を制御する制御ドメインになっている場合がむしろ多く、この制御ドメインのドメイン配置の変化や構造変化が、初段の活性化状態へと導く。即ち、全長では制御ドメインによって自己阻害状態をとっており、シグナルによりそれが解除される。従って、キナーゼの活性制御を構造に基づいて理解するためには、activation loop のリン酸化による制御に加えて、各ドメイン間の相互作用による自己阻害状態の構造や、シグナルを受容し活性化される過程の構造の構造解析が必要である。キナーゼは分子標的薬のターゲットとして重要であり、応用面からも期待が大きい。

通常、全長のキナーゼは、コストの低い大腸菌等の下等な宿主において大量調製が困難である。特にキナーゼドメインは、Sf9 や哺乳類細胞での発現系が有効で、大腸菌の発現系では調製できないことが多い。そこで、本研究ではキナーゼドメインは、コストの低いカイコ個体を用いた発現系により調製を試みる。一方、大腸菌で調製可能なドメインは、大腸菌を用い NMR 観測用に同位体標識をする。この方法では、あるドメインさえ大腸菌で同位体標識すれば、他の大腸菌では発現精製の困難なキナーゼドメイン等は、高等な宿主からノンラベルで調製したものをを用いてよい。ノンラベル側にはスピンラベルを付加させて、そこを起点にした常磁性効果 (PRE や PCS) を、同位体ラベルを施したドメイン側で NMR 観測すれば構造情報が得られる。距離情報取得のためのスピンラベルを行う目的で部位特異的システイン導入体試料を複数、かつそれぞれ大量に調製する必要があるが、コストのかかる培養細胞と異なり、カイコ個体では大腸菌並みのコストで済む。これら別個に調製したドメインをライゲーションし、全長タンパク質を再構成する。この際、Sortase によるタンパク質ライゲーションや、部位特異的アジ化アミノ酸の導入とクリックケミストリーによる連結を用いて、全長タンパク質を再構成する戦略をとる。これにより、一般的に調製が難しいキナーゼ全長の低コストでの調製 (かつ標識されたもの) が可能となる。

2. 研究の目的

キナーゼの多くは、柔軟なリンカーで連結されたマルチドメインで構成される全長構

造をもつ。ドメイン間の相互作用による自己阻害型から、シグナルの入力によってその阻害が外れ、活性型の立体構造 (ドメイン配置) へ変化する。

本研究ではドメイン間の配置とその変化 (活性化) を全長のキナーゼの分子構造レベルで可視化することで、不活性型から活性化に至る制御機構を明らかにする。全長試料を再構成するストラテジーとして、sortase やクリックケミストリーを用いたドメインの連結を行う。さらに、スピンラベルプローブの工夫、常磁性効果 (PRE、PCS) の NMR による観測、構造情報の取得によって、結晶化の容易でない、柔らかな全長 protein kinase B、C の立体構造 (ドメイン配置) を溶液中で解析する手法を確立することを目的とした。

3. 研究の方法

まず、Protein kinase B (PKB, Akt) の全長や、Protein kinase C を構造解析のターゲットに、大腸菌でのタンパク質発現、カイコ個体でのタンパク質発現を行った。大腸菌での各種のキナーゼのドメインは、pET ベクターをはじめとしたベクターに組み込み、発現を行った。大量発現は、いずれも低温下 (16-20 度) で行った。同位体標識は M9 最小培地を用いて、必要に応じて ^{15}N 、 ^{13}C 、 ^2H 標識を行った。カイコ個体での発現では、得たバックミドを直接カイコ幼虫に注射する方法を用いて行った。これら発現試料は GST-tag、His-tag を用いて粗精製し、最終的には tag を切断後、ゲル濾過にて精製を行った。NMR 測定には、600 MHz、900 MHz (理化学研究所) いずれも極低温プローブ付の装置を使用した。タンパク質 (ドメイン) ライゲーションには、黄色ブドウ球菌由来の野生型のもの、高活性型のものを用いた。

4. 研究成果

(1) 各ドメインの調製と、タンパク質ライゲーション

キナーゼの部分 (ドメイン) ごとに発現、精製を行い、ライゲーション反応を用いて再構成を行った。現在までに、ヒト PKB の PH ドメインの NMR スペクトルを取得し、またキナーゼドメインのカイコでの発現系の作成に成功している。また PKC θ の C2-like、タンデム C1A-B、キナーゼのすべてのドメインの大腸菌から調製する系を確立に成功し、すべてのコンストラクトにおいて NMR 測定に成功した。特定のサブタイプの PKC ではキナーゼドメインを含むすべてのドメインが大腸菌からの試料調製が可能な点が特筆に値する。Sortase によるドメインライゲーションに成功し、テストとして用いたタンパク質では、再現性良く約 30% を超える収率で連結できたものが得られている (図 1)。また実際に、PKC の C1B ドメインとキナーゼドメインでのライゲーションにも成功した。

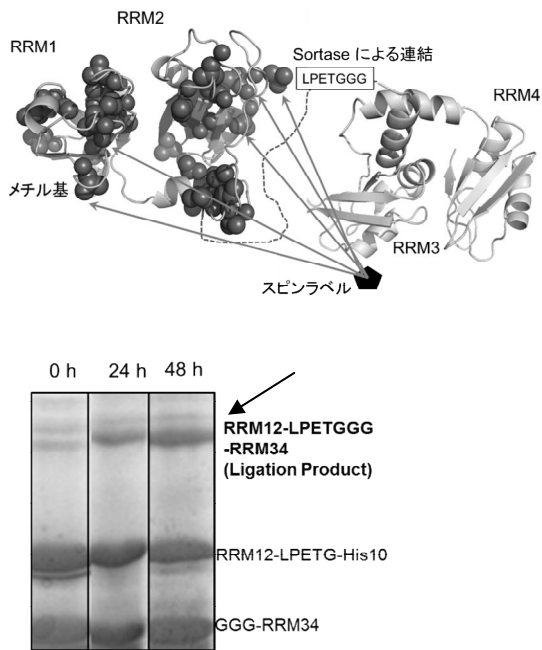


図1 SortaseによるRRM12とRRM34の連結とNMRによる常磁性効果の測定
A.概念図 B. sortaseによる連結反応。生成物を矢印で示す。

(2)ランタノイドタグ

全長のタンパク質を再構成する際、ドメインごとに立体特異的メチル安定同位体標識やスピラベルを行うことで、曖昧さのない帰属が可能である。従来のNMR測定法では、分子量等の問題により解析が困難であるので、タンパク質の重水素化とメチルTROSYを用いて先鋭化させたNMR信号をプローブに、スピラベルからの常磁性観測することで、立体構造情報を取得することが望ましい。そこで、テスト試料を用いて、メチル基の立体特異的帰属を行い、PCSの測定に成功した(図2)。

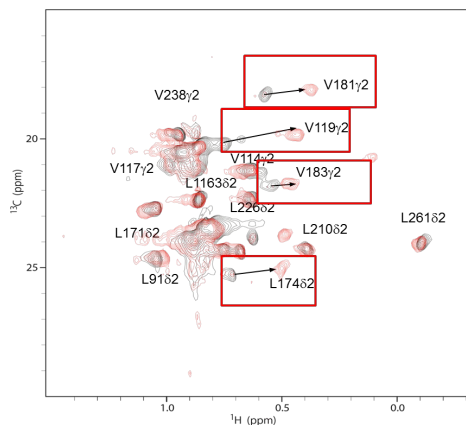


図2 立体特異的メチルラベルによる常磁性効果の測定
(黒)PCSなし(赤)PCSあり。特に影響の大きなものは四角囲みで示す。

また、DOTA-M8はDOTAにメチル基を導入して剛直にしたもので、極めて精度の高いPCSが得られる()。しかしオリジナルのDOTA-M8は開発者らによって配布されていないことから、さらに付加反応として使い易い改良型のDOTA-M8 maleimideを理研の平井・袖岡らと共同で合成した。(図3)。

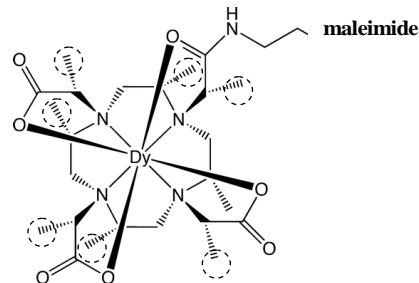


図3 DOTA-M8 maleimide

(3)NMRの高度化

非線形サンプリング法は、多次元NMR法での測定時間を大幅に短縮するが、一般にダイナミックレンジの大きさが必要な(強度差の大きな)スペクトルでは、スペクトルの再構成に問題が起こる。そこで、どの程度データ削減が可能か、テストサンプルを用いて検討を行った。

(4)DGK

PKCやPKBでの発現、精製に加えて、DGKのN末端側領域の発現精製を試みた。大腸菌での発現は、比較的良好であったが、精製後の試料の安定性に問題があり、NMR測定は困難であった。

<引用文献>

Maesaki et. al., Sci. Rep. 2014;4:6016
Häussinger D, et al, J Am Chem Soc. 2009 131, 14761

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 3件)

Kobayashi A, Kanaba T, Satoh R, Ito Y, Sugiura R, and Mishima M,
Chemical shift assignments of the first and second RRM of Nrd1, a fission yeast MAPK-target RNA binding protein.
Biomolecular NMR Assign. in press
doi: 10.1007/s12104-017-9731-1.

Hikone Y, Hirai G, Mishima M, Inomata K, Ikeya T, Arai S, Shirakawa M, Sodeoka M, Ito Y,
A new carbamidemethyl-linked lanthanoid

chelating tag for PCS NMR spectroscopy of proteins in living HeLa cells.”
J Biomol NMR.(2016) 66, 99-110
DOI なし

Shigemitsu Y, Ikeya T, Yamamoto A, Tsuchie Y, Mishima M, Smith BO, Güntert P, Ito Y.
Evaluation of the reliability of the maximum entropy method for reconstructing 3D and 4D NOESY-type NMR spectra of proteins.
Biochem Biophys Res Commun. (2015) 457 200-205.
doi: 10.1016/j.bbrc.2014.12.088.

〔学会発表〕(計 14 件)

永井 敢、小林 彩保、伊藤 隆、三島 正規
Structural analysis of a multi-domain protein using long-range distance information derived by solution NMR 第 54 回日本生物物理学会 平成 28 年 11 月 25 日～27 日 つくば国際会議場 つくば市 茨城県

貴堂晃弘、金場哲平、伊藤 隆、三島 正規
ライゲーション反応を用いたマルチドメインタンパク質 PKC の構造解析 第 55 回 NMR 討論会 平成 28 年 11 月 16 日～18 日 広島国際会議場 広島市 広島県

金場 哲平、上埜 大空、前崎 綾子、伊藤 隆、片岡 正和、三島 正規
放線菌の接合伝達タンパク質 TraB の構造研究 第 55 回 NMR 討論会 平成 28 年 11 月 16 日～18 日 広島国際会議場 広島市 広島県

小林 彩保、永井 敢、佐藤 亮介、伊藤 隆、杉浦 麗子、三島 正規
NMR と SAXS による RNA 結合性マルチドメインタンパク質 Nrd1 の構造解析 第 55 回 NMR 討論会 平成 28 年 11 月 16 日～18 日 広島国際会議場 広島市 広島県

Teppey Kanaba, Hirotaka Ueno, Ryoko Maesaki, Yutaka Ito, Masakazu Kataoka and Masaki Mishima
Structural studies of the DNA translocase of Streptomyces, TraB
ICMRBS2016 平成 28 年 8 月 21 日～26 日 国立京都国際会館 京都市 京都府

Ayaho Kobayashi, Kan Nagai, Ryosuke Satoh, Toshinobu Fujiwara, Yutaka Ito, Reiko Sugiura, Masaki Mishima
Structural study of the an RNA-binding protein Nrd1 by combination approach using NMR and SAXS
ICMRBS2016 平成 28 年 8 月 21 日～26 日 国立京都国際会館 京都市 京都府

Ayaho Kobayashi, Kan Nagai, Akihiro Kido,

Yutaka Ito, Masaki Mishima
Structural Analysis of Flexible Multi-Domain Proteins
ICMRBS2016 平成 28 年 8 月 21 日～26 日 国立京都国際会館 京都市 京都府

貴堂 晃弘、金場 哲平、前崎 綾子、伊藤 隆、三島 正規
溶液 NMR を用いたマルチドメインタンパク質 PKC の構造解析に向けた試み・ポスター
日本蛋白質科学会平成 28 年 6 月 7 日-6 月 9 日 福岡国際会議場 福岡市 福岡県

永井 敢、小林 彩保、伊藤 隆、三島 正規
lncRNA 結合タンパク質 SHARP の構造解析
日本蛋白質科学会平成 28 年 6 月 7 日-6 月 9 日 福岡国際会議場 福岡市 福岡県

鴨志田 一、井上 仁、猪俣 晃介、池谷 鉄兵、三島 正規、伊藤 隆、ヒト培養細胞を用いた異種核多次元 in-cell NMR 測定、第 38 回 日本分子生物学会年会、平成 27 年 12 月 1-4 日 神戸ポートアイランド 神戸市 兵庫県

永井敢、小林彩保、三島 正規、伊藤 隆、
Non-coding RNA 結合タンパク質 SHARP の構造解析、第 54 回 NMR 討論会、平成 27 年 11 月 6-8 日 千葉工業大学 習志野市 千葉県

金場 哲平、宮田 和舞、秋吉 克昂、前崎 綾子、宮崎 健介、伊藤 隆、三島 正規、マルチドメインタンパク質 PKC 全長の構造解析の試み、第 15 回日本蛋白質科学会年会、平成 27 年 6 月 24-26 日 あわぎんホール 徳島市 徳島県

小林 彩保、佐藤 亮介、藤原 俊伸、伊藤 隆、杉浦 麗子、三島 正規、RNA 結合性マルチドメインタンパク質 Nrd1 の溶液状態における構造解析、第 15 回日本蛋白質科学会年会、平成 27 年 6 月 24-26 日 あわぎんホール 徳島市 徳島県

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) 研究分担者

白井 康仁 (SHIRAI, Yasuhito)
神戸大学・農学研究科・教授
研究者番号：60263399

(3) 研究分担者

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