

令和元年11月13日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07268

研究課題名(和文) 発がんに寄与する非受容体型チロシンキナーゼFerの活性化メカニズムの構造基盤

研究課題名(英文) Structural basis for activation of the oncogenic nonreceptor tyrosine kinase Fer

研究代表者

松浦 能行 (Matsuura, Yoshiyuki)

名古屋大学・理学研究科・准教授

研究者番号：10402413

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：FerはFerと類似のFesとともに、非受容体型チロシンキナーゼ群の中ではユニークなマルチドメイン構造をもつ。Ferはさまざまな組織・細胞でユビキタスに発現しており、上皮成長因子受容体(EGFR)や血小板由来増殖因子受容体(PDGFR)など増殖因子受容体からのシグナル伝達によって活性化され、細胞のがん化やがん悪性化に深く関わる。本研究では、Ferの活性化機構の構造基盤を解き明かすことを目的とした構造生物学研究に取り組み、Ferの一部のドメインとリガンド分子の複合体について高分解能構造解析に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がんの増殖には、基質タンパク質のチロシンをリン酸化するチロシンキナーゼが深く関わっている。一般にチロシンキナーゼは、細胞の増殖・分化、細胞運動、免疫応答など、多様な生理機能を制御する複雑なシグナル伝達系の鍵を握る酵素である。本研究では、抗がん剤開発の標的タンパク質として注目されている非受容体型チロシンキナーゼFerに関する構造解析を行った。本研究はチロシンキナーゼの作用機序を解き明かすための基礎研究としての意義をもつ。

研究成果の概要(英文)：Fer and Fes proteins constitute a distinct subfamily of nonreceptor tyrosine kinases characterized by a unique multidomain structure. Fer is ubiquitously expressed, and can be activated as a response to stimulation of growth factor receptors including epidermal growth factor receptor (EGFR) and platelet-derived growth factor receptor (PDGFR). Upregulation of Fer has been implicated in tumorigenesis and malignant progression of various human cancers. This study was undertaken to understand the activation mechanism of Fer, and a structure of one of the domains of Fer bound to a ligand molecule was determined at high resolution.

研究分野：構造生物学

キーワード：シグナル伝達 X線結晶解析

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) がんの増殖には、基質タンパク質のチロシンをリン酸化するチロシンキナーゼが深く関わっている。一般にチロシンキナーゼは、細胞の増殖・分化、細胞運動、免疫応答など、多様な生理機能を制御する複雑なシグナル伝達系の鍵を握る酵素であり、この酵素には多くの種類がある。ヒトでは 90 種類のチロシンキナーゼが同定されており、そのうち細胞の表面にあって外からの増殖シグナルを受け取って細胞内に伝える役割を果たす受容体型チロシンキナーゼが 58 種類、細胞の中で増殖シグナルを伝達する非受容体型チロシンキナーゼが 32 種類ある。チロシンキナーゼの活性制御機構の破綻は、細胞のがん化や、がん悪性化に深く関与する。したがって、チロシンキナーゼは抗がん剤ターゲットとして重要である。

(2) Fer は細胞の増殖や生存、細胞骨格、細胞接着を制御する機能をもつ非受容体型チロシンキナーゼである。Fer は上皮成長因子受容体 (EGFR) や血小板由来増殖因子受容体 (PDGFR) など増殖因子受容体からのシグナル伝達によって活性化される。Fer の発現量は乳がんや前立腺がんなどのがんにおいて高くなっている。Fer は Src がん化シグナリングに必須の鍵分子であり、Fer の活性亢進ががんの悪性化に関与することが示唆されている。

(3) Fer は Fer と類似の Fes とともに、非受容体型チロシンキナーゼ群の中ではユニークなマルチドメイン構造をもつ。Fer は C 末端にチロシンキナーゼドメインをもち、N 末端側に、Fer の活性化のために重要な Fer 多量体化に関わる F-BAR ドメインや、リガンド結合に伴う Fer 活性化に寄与する可能性が示唆されている SH2 ドメインをもつ。しかし、Fer が活性化されるメカニズムの詳細はまだ明らかにされていない。

2. 研究の目的

上記の背景のもとに、本研究では、Fer の活性化に寄与するドメイン構造や分子間相互作用の構造基盤を原子レベルで明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 結晶化のために、Fer を大腸菌でリコンビナントタンパク質として大量発現した。N 末端に GST タグあるいは His タグを融合した融合タンパク質として発現し、大腸菌体を超音波破碎し、まず大腸菌抽出液から融合タンパク質をアフィニティークロマトグラフィーで精製した。次に TEV プロテアーゼによりアフィニティータグを除去し、最後にゲルろ過クロマトグラフィーで Fer を精製した。本研究で作製したコンストラクトの塩基配列は全て DNA シークエンシングにより確認した。

(2) ハンギングドロップ蒸気拡散法により Fer および Fer とリガンド分子 (合成ペプチド) の複合体を結晶化した。結晶をクライオループですくって液体窒素で急速凍結した。Native 結晶の X 線回折データを高エネルギー加速器研究機構 Photon Factory のビームライン BL-17A で収集し、iMOSFLM と CCP4 のプログラムでデータをプロセスした。構造解析は CCP4 のプログラムと PHENIX および COOT を用いて行い、MolProbity で結晶構造のクオリティーを評価した。

4. 研究成果

(1) Fer の多量体形成機構を理解するために、Fer 多量体化に関わる F-BAR ドメインを大腸菌で大量発現、精製し、結晶化した。大型の単結晶が得られたが、X 線回折能が弱く、シンクロトロン放射光を用いても、8 オングストローム分解能までしか回折データがとれなかった (図 1)。また、この結晶は単位格子が非常に大きく、非対称単位にかなり多数の Fer 分子が入りうるものでもあり、構造解析には不向きな結晶であった。発現コンストラクトの変更や結晶化条件のさらなるスクリーニング、結晶凍結条件の検討などによる結晶の改良を試みたが、結晶の質を大きく向上させることができず、構造決定には至らなかった。

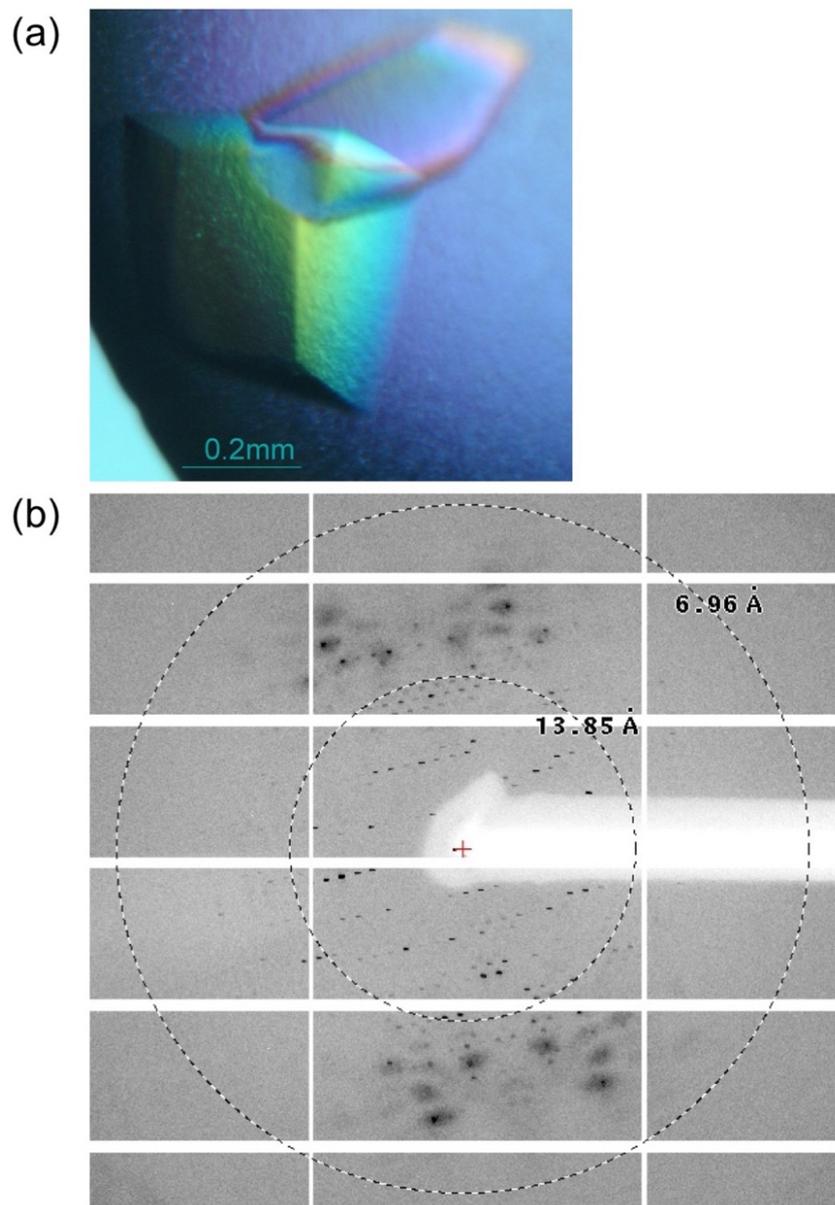


図 1 Fer F-BAR ドメインの(a)結晶と(b)X線回折パターン。

(2) ヒト Fer の SH2 ドメインを大腸菌で大量発現し、精製した。これに、このドメインに特異的に結合するリガンド分子 (チロシンリン酸化ペプチド: D-E-pY-E-N-V-D) を加え、複合体の結晶化に成功した。シンクロトロン放射光を用いて良質の X 線回折データを収集した (図 2)。NMR によって解かれた Fer SH2 ドメイン単独の構造 (PDB code, 2KK6) をサーチモデルとして分子置換法で結晶構造を解いた。1.37 オングストローム分解能で、free R-factor 18.55% (R-factor 16.46%) まで構造精密化した。

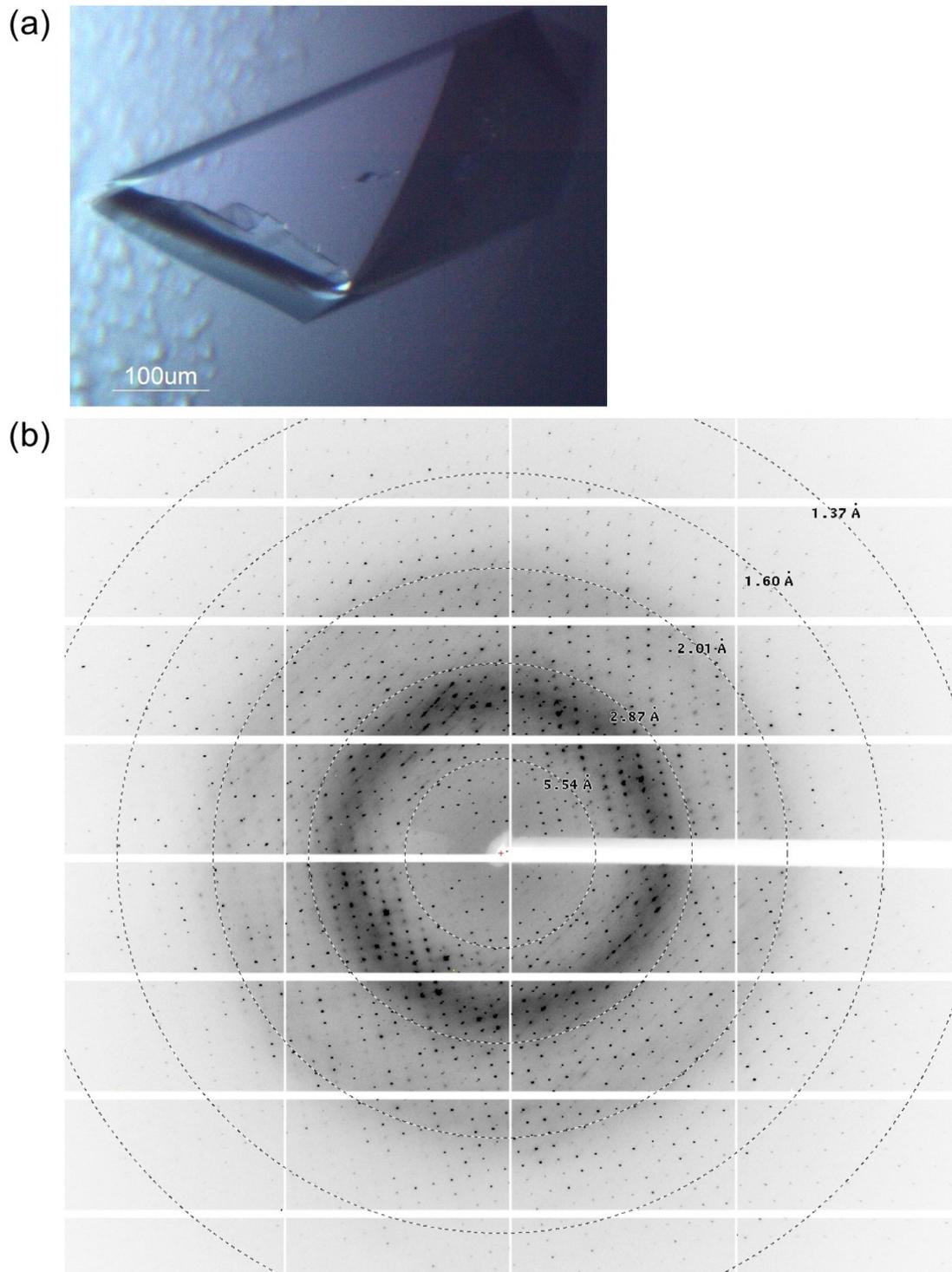
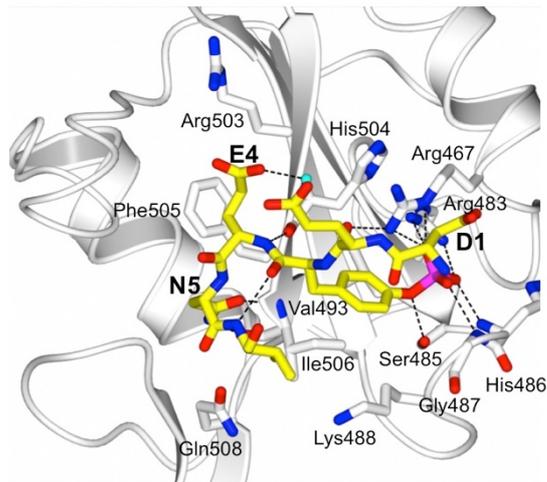


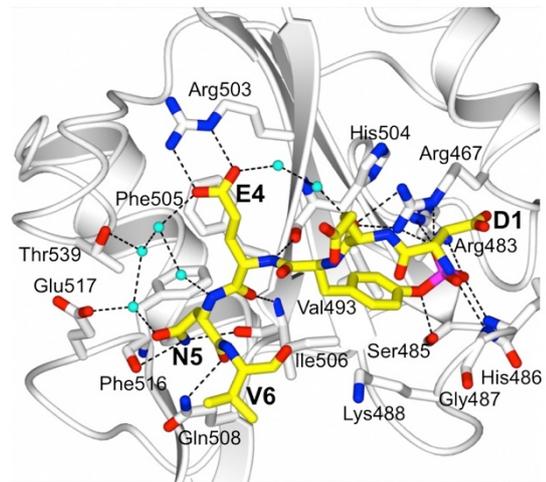
図2 Fer SH2 ドメインとチロシンリン酸化ペプチドの(a) 共結晶と(b) X線回折パターン。

(3) 今回解いた Fer SH2 ドメインとチロシンリン酸化ペプチド (D-E-pY-E-N-V-D) の共結晶構造では、結晶の非対称単位に 6 つの Fer-ペプチド複合体が含まれていた。このうち 4 つの複合体においてはペプチドが本質的に同じ様式で結合していたが (binding mode 1)、残りの二つではペプチドの結合様式が異なっており (binding mode 2 および binding mode 3)、合計 3 つのペプチド結合モードが観測された (図 3)。リン酸化チロシンの認識機構は 3 つの結合モードで共通しているが、リン酸化チロシンから C 末端側の 4 つのアミノ酸残基が SH2 ドメインに認識される機構の詳細は 3 つの結合モードごとに全く異なっていた。これら 3 つの結合モードのうち、binding mode 1 が最もエネルギー的に安定であることが、結晶中の分子のパッキングの解析から示唆された。

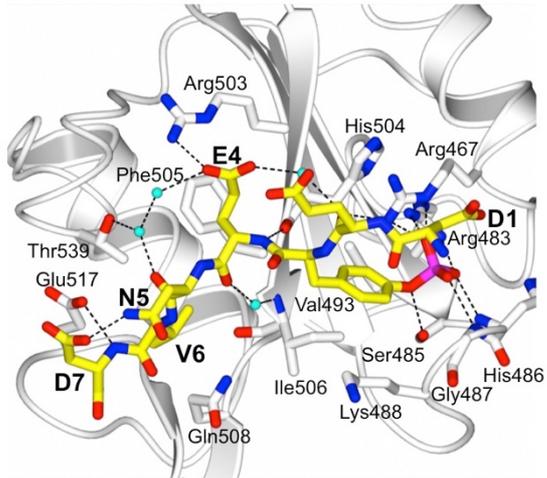
(a) binding mode 1



(b) binding mode 2



(c) binding mode 3



(d) overlay

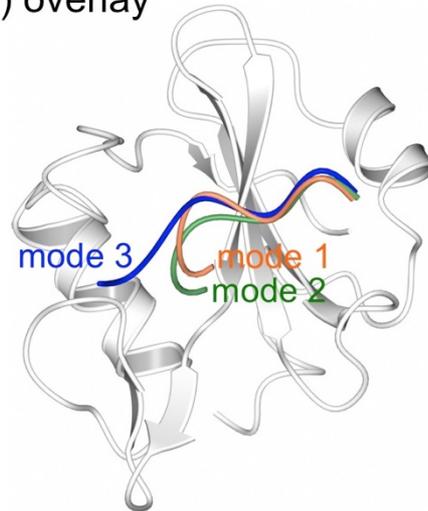


図3 Fer SH2 ドメインによるチロシンリン酸化ペプチド認識機構

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

- ① Matsuura, Y. High-resolution structural analysis shows how different crystallographic environments can induce alternative modes of binding of a phosphotyrosine peptide to the SH2 domain of Fer tyrosine kinase. *Protein Science*, 28: 2011-2019 (2019).
DOI: 10.1002/pro.3713

[学会発表] (計 0 件)

[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

<http://www.bio.nagoya-u.ac.jp/laboratory/sms.html>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

該当なし

(2) 研究協力者

該当なし

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。