

令和元年6月12日現在

機関番号：82626

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15083

研究課題名(和文)機能的構造平衡に基づく刺激に適合したキナーゼシグナル選別機構の解明

研究課題名(英文)Structural basis for the selection mechanism of specific kinase signaling pathways via stimuli-dependent modulations of the functional equilibrium

研究代表者

徳永 裕二 (Tokunaga, Yuji)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・研究員

研究者番号：80713354

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、MAPK p38 が、ストレス下にて細胞応答を担う基質であるATF2を優先的にリン酸化する機構を解明した。先行する独自知見に基づき、ストレスに付随したpH弱酸性化の影響を調べた結果、弱酸性化条件では、他の高親和性基質の共存下においても、p38 によるATF2のリン酸化が高効率となることが明らかとなった。これは、ATF2のアロステリック配列に含まれる4個のヒスチジン残基のプロトン化に依拠していた。また、弱酸性化はp38 にも直接作用し、非特異タンパク質の結合を弱めることで特異的基質の優先的リン酸化に寄与していた。このように、pHが積極的にシグナル伝達の特異性を保障することが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、細胞応答に不可欠である、刺激に適合したシグナル経路の活性化機構を、申請者が独自に発見した分子機構に基づき、刺激に付随した細胞内環境の変化を新たに考慮して解析し、仮説を裏付ける結果を得た。環境依存的なシグナル選別は、p38 のみならず、膜受容体や転写因子など、シグナル伝達ネットワークのハブタンパク質に共通すると考えられ、このような新たな研究分野の開拓を促す重要な成果と言える。また、シグナル選別機構の理解は、標的のシグナル経路のみを遮断する副作用の少ない薬剤等の開発にもつながる基礎的知見を提供することから、研究成果の社会的な意義も大きい。

研究成果の概要(英文)：It remained to be elucidated how MAPK p38 , involved in various cellular responses, phosphorylates a substrate, which is optimal to each type of response, out of a number of its specific substrates. Here, I investigated a mechanism of substrate selection under the stress condition that lead to weak acidification of cytosol. It was shown that the phosphorylation of ATF2, a substrate of p38 under stress stimuli, is enhanced under weakly acidic conditions, irrespective of coexistence of a high-affinity substrate, MK2. This was achieved by the multi-site protonation of the allositeric interaction site of ATF2 that contains four unique histidine residues. In addition, protonation of a histidine residue in the substrate-binding site of p38 weakened the affinity for phosphoacceptor sites, thereby exclude non-specific pseudo-substrates. These findings demonstrate the regulatory role of pH in achieving a high fidelity stress response, by directing p38 toward the optimal substrate.

研究分野：構造生物学

キーワード：タンパク質キナーゼ シグナル伝達 ストレス応答 pH依存性 MAPキナーゼp38 基質特異性 ダイナミクス 溶液NMR法

1. 研究開始当初の背景

刺激に対する適切な細胞応答においては、多様なシグナル経路ネットワークの中から、刺激に適合した特定のシグナル経路が特異的かつ適切に活性化されることが必要である(図1)。マイトジェン活性化タンパク質キナーゼ(MAPK)は、MAPKカスケードを構成するシグナル伝達タンパク質である。MAPKの多くはハブタンパク質としての性質を備える。MAPKの一種であるp38は、多種類の特異的基質を介したシグナル経路を持つことで、炎症、分化誘導因子、ストレス等の外部刺激に対して、サイトカイン産生、分化、増殖、細胞死等の多様な細胞応答を担う。

これまでの知見により、p38の上流・下流のタンパク質に共通したモチーフとして“ドッキング配列”(R/K)2-3-(X)4-6-Xが同定されている。ドッキング配列は、p38のアロステリックサイトに結合し、基質との高親和性を担うと考えられてきた(Tanoue et al, *Nat Cell Biol* (2000), 2, 110など)。一方、代表者は、p38に対するドッキング結合が、単に高親和性を担うだけでなく、p38の機能的構造平衡を制御し、キナーゼ活性を積極的に増大させることを見出した。またそのことにより、非特異タンパク質が高密度に混在する細胞内にて、ドッキング配列を含む特異的基質を選択する新たな機構を見出した(Tokunaga et al, *Nat Struct Mol Biol* (2014), 21, 704)。一方、p38はハブタンパク質として複数の特異的基質を有しており、これらの基質のリン酸化を介した多種類のシグナル経路の中から、刺激の種類に適合した特定の経路を活性化する機構は明らかでない。

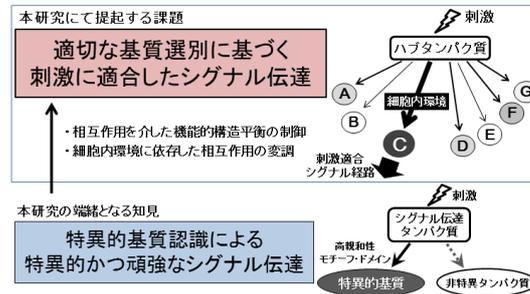


図1. 本課題の概念図 刺激に適合したシグナル伝達機構を理解するためには、細胞内環境の変化を考慮し、分子間相互作用を介したハブタンパク質の機能的構造平衡の制御を解析する必要がある。

2. 研究の目的

本研究では、刺激に適合したシグナル伝達経路の選別機構の解明を目的とした。申請者は、特異・非特異タンパク質の峻別機構として見出した p38 の機能的構造平衡が、特異的基質間の選別においてもその一翼を担うと考えた。ここでは、基質間でのドッキング配列の多様性が p38 の構造平衡調節の多様性を生み出し、相対的な基質特異性(“優先度”)に寄与することを想定した。そこで、p38 とドッキング配列を含む複数の特異的基質間の相互作用を、溶液 NMR法を用いて、機能的平衡の調節の観点から、刺激に付随した細胞内環境の変化を考慮して解析することにより、以下の研究目標を設定した。

研究目標 1: 「p38 の基質に対する親和性およびリン酸化の優先度の細胞内環境依存性」の解明

研究目標 2: 「p38 と基質の相互作用の細胞内環境依存性の動的構造基盤」の解明

3. 研究の方法

p38 の主要な機能のひとつであるストレス応答に着目すると、ストレス刺激時には活性酸素種 ROS の産生に伴う細胞内の酸性化(pH 低下)および ATP 濃度低下を伴うことが報告されている(Lagadic-Gossman et al, *Cell Death Differ* (2004), 11, 953 など)。申請者は予備的検討において、pH 低下に伴い p38 の ATP に対する親和性が増強されること、および ATP 結合に伴い p38 の基質ドッキング配列に対する親和性が増大することを見出している。このことから、ストレス刺激に付随した細胞内環境の変化が、p38 の基質優先度にも強く影響することが想定される。しかしながら、ストレス刺激下での環境変化を想定した p38 と基質の相互作用解析例はなく、細胞内環境の変化がどのように p38 の基質優先度を制御するかは明らかでない。そこで本研究では、p38 の基質リン酸化を介したシグナル伝達を題材として、複数の特異的基質の混在下における pH および ATP 濃度依存的な p38 のキナーゼ活性を測定することにより、基質優先度の細胞内環境に対する依存性を解明することとした。この際、申請者が独自に見出した p38 の ATP および基質に対する結合の動的な相互調節の観点から、基質との親和性および相互作用様式の pH 依存性を解析することで、基質優先度を制御する構造基盤を解明することとした。

4. 研究成果

基質 ATF2 および MK2 混在下における p38 による基質リン酸化アッセイ

環境に応じた基質選別を in vitro にて検証するため、p38 の 2 種類の基質 ATF2 および MK2 を準備した。ATF2 はストレス時に特にリン酸化され、MK2 はストレス以外に免疫細胞の炎症刺激下等でも広くリン酸化される。異なる pH 条件下にてこれらの基質を混在させ、p38 によるリン酸化を調べることにより、pH 依存的な優先度の変化を調べた。この結果、中性の pH 7.5 の条件においては、ATF2 のリン酸化は全く検出されず、MK2 のリン酸化のみが観測されたのに対して、弱酸性 pH 6.7 においては、ATF2 のリン酸化が認められ、相対的に ATF2 の優先度が向

上がることが明らかとなった(図2)。このことは、ストレス刺激に付随して生じる環境変化である弱酸性化が、ストレス下での ATF2 のリン酸化に積極的に寄与することを示唆する。

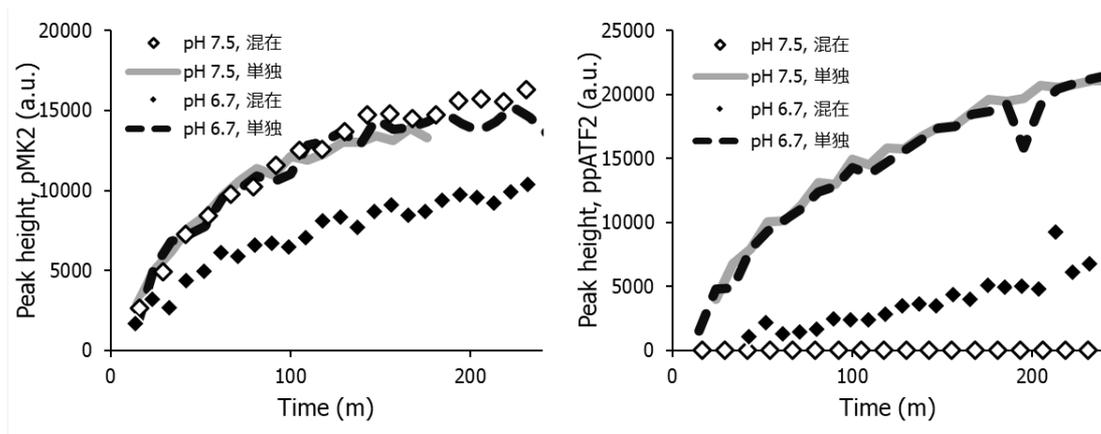


図 2. p38 による 2 種類の基質の競合的リン酸化 左: MK2 のリン酸化。右: ATF2 のリン酸化。いずれも、リン酸化反応中にリアルタイムに測定した基質の NMR スペクトル上に観測される、リン酸化成分由来の NMR シグナルのピーク高をプロットした。MK2, ATF2 混在試料中のリン酸化量を「混在」として菱形(白: pH 7.5, 黒: pH 6.7)にて表示し、比較のため、各基質単独試料中のリン酸化量を「単独」として線(白: pH 7.5, 黒: pH 6.7)にて表示した。

p38 の ATF2 に対する親和性の pH 依存性な解析および ATF2 変異体を用いた検証

実験にて、pH 依存性に基質優先度が変化し、弱酸性 pH 6.7 にて ATF2 の優先度が向上した機構を明らかとするため、p38 の ATF2 に対する親和性を NMR 化学シフト摂動法および等温滴定カロリメトリー (ITC) 法にて決定した。この結果、p38 の立体構造の活性化を担う ATP アナログの有無いずれの条件においても、弱酸性化に伴い親和性が向上した(図3, 左)。この pH 依存性は、ATF2 のドッキング配列に 4 個含まれる固有のヒスチジン残基 H41, H45, H47, および H49 のプロトン化状態の変化に起因することを想定し、ヒスチジン残基の変異体を複数作製して親和性解析を実施した。この結果、ヒスチジンを 3 個 (QKRKT, QKRKK, および KKRKK; 名称はそれぞれ 45 番目から 49 番目までのアミノ酸配列を表す) および 4 個 (H41K-KKRKK) 置換した変異体では、部分的および完全に pH 依存性が失われた(図3, 中央)。三重変異体において、いずれも pH 依存性は部分的に保持されたことは、変異導入されていない His-41 が pH 依存性に比較的大きい寄与を果たすことを示唆する。また、変異導入するアミノ酸 3 個または 4 個の内、正の荷電性アミノ酸であるリジン残基の数が多いほど、親和性が高くなる傾向を示した(図3, 右)。このことから、弱酸性化に伴うヒスチジン残基のプロトン化が、pH 依存性な親和性調節の本態であることが支持される。即ち、ATF2 はヒスチジン残基に富む固有のドッキング配列を保持することにより、pH 依存的に p38 の基質としての優先度を調節していると考察される。

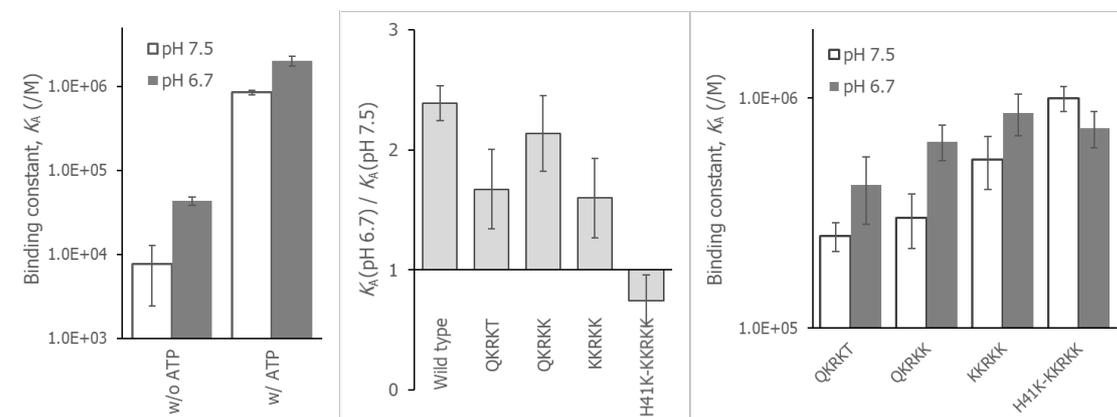


図 3. p38 の ATF2 に対する結合の親和性解析 左: 野生型 ATF2 に対する親和性。ATP アナログとして用いた ADP の無しおよび有りの条件について、それぞれ pH 7.5 および pH 6.7 での解離定数をプロットした。比較的親和性の弱い ATP アナログ無しの条件では溶液 NMR 法による化学シフト摂動法を、親和性の強い ATP アナログ有りの条件では ITC 測定を用いることにより、両方の条件における親和性測定が可能となった。中央: ATF2 のドッキング配列ヒスチジン残基変異体に対する親和性の、pH 6.7 と pH 7.5 の間の比。右: 同 ATF2 変異体に対する親和性の絶対値。

p38 による pH 依存的な非特異タンパク質の排除

p38 の基質は、アロステリック部位においてドッキング相互作用を形成することで特異性を担保する一方、リン酸受容部位である Thr/Ser 残基周辺のコンセンサス配列は、Thr/Ser-Pro のように、ひとつ後ろの残基が Pro と指摘されているのみである。このため、多種類のタンパク質が混在する細胞内では、このようなコンセンサス配列を持つ非特異タンパク質のリン酸化が少なからず生じることが想定される。このようなノイズとしての非特異タンパク質リン酸化に対する制御を調べる目的にて、ドッキング配列を持たずリン酸化コンセンサス配列のみを有する 17 残基のペプチドのリン酸化を pH 依存的に調べた。この結果、特異的基質の場合とは逆に、非特異ペプチドのリン酸化は弱酸性化に伴い低効率となった (図 4, 左)。NMR を用いた親和性解析の結果、弱酸性化に伴うペプチドへの親和性が低下した (図 4, 中央)。この pH 依存性は p38 の活性部位近傍に位置する His-228 のプロトン化に依拠することが、変異体解析より示された (図 4, 右)。これより、p38 はストレス時に活性部位における基質リン酸受容部位への親和性を低下させることで、アロステリック結合配列を有する特異的基質への結合のみを担保し、特異的シグナルを効率よく伝達するものと考察した。

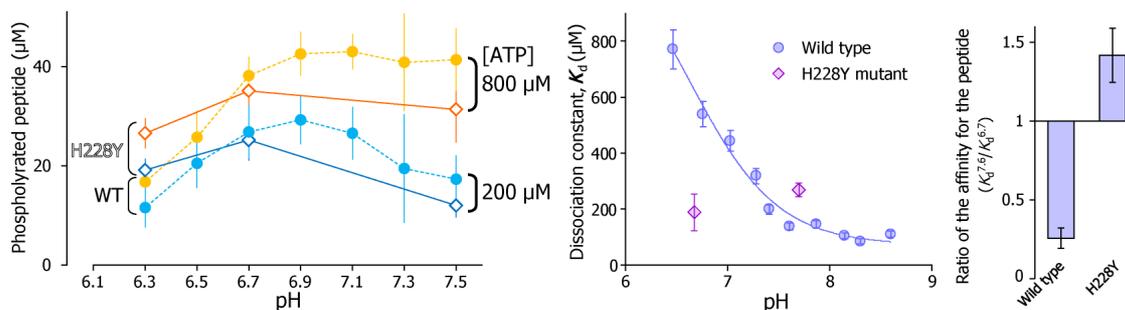


図 4. p38 による非特異タンパク質リン酸化の pH 依存性 左：p38 による非特異ペプチドリン酸化の pH 依存性。中央：pH 依存的に決定した、p38 の非特異ペプチドに対する結合の解離定数。右：p38 の非特異タンパク質に対する親和性の pH 弱酸性化に伴う変化。それぞれ、野生型および H228Y 変異体のデータを示した。

^{19}F 核禁制コヒーレンス遷移 (FCT) 法を用いた高分子の局所運動性定量技術の開発

p38 -ATF2 複合体のように、構造平衡を有し、溶液環境の変化に伴い平衡および分子間親和性が変化するような動的な系において、これらの調節機構を理解するためには分子局所の運動性を定量することが必要である。この際、高分子量タンパク質では個々のシグナルを十分な感度および分解能にて観測することが困難となることに加え、ATF2 のように高次構造の特徴が乏しい場合にはシグナルが狭いスペクトル領域に集中することなどから、部位特異的な高感度検出を可能とする工夫が必要となることが想定される。フッ素 ^{19}F 核は、生体分子には含まれないため、外部から部位特異的に導入することできわめて高分解能・高感度のスペクトルを与えることが知られている。一方で、 ^{19}F -NMR にて分子の局所運動性情報を取得する方法は無かった。そこで、本研究の計画を拡張し、 ^{19}F -NMR による局所運動性解析の技術基盤を整えることとした。

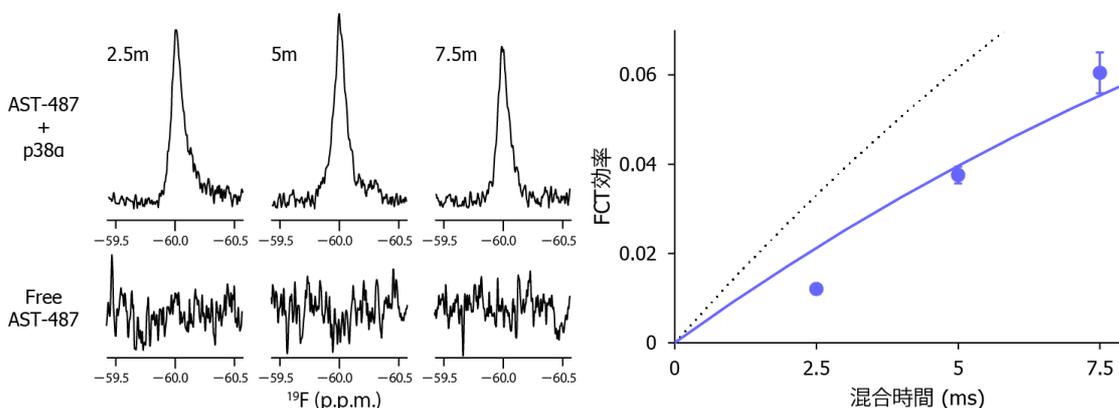


図 5. p38 結合状態における低分子 AST-487 における ^{19}F -FCT プロファイル 左：FCT 混合時間依存的な FCT シグナルの立上がり。禁制コヒーレンス遷移を許容する高分子量条件となる、p38 存在下においてのみ、FCT シグナルの生成を認めた。右：FCT 効率 (FCT シグナルと非禁制遷移のシグナル強度比) の混合時間依存性。理論式によるフィッティング曲線を実線にて、また運動が完全に抑制された状態に対応するオーダーパラメータ 1 の場合の理論曲線を点線にてそれぞれ示した。ここから、AST-487 の ^{19}F 含有官能基のオーダーパラメータは 0.64 ± 0.07 と決定された。

このために、 ^1H -NMRにて実績のある禁制コヒーレンス遷移(FCT)法を ^{19}F -NMRに拡張することとした。 ^{19}F -FCTにおいては、双極子間相互作用および化学シフト異方性の特徴が ^1H 核の場合と異なる点に留意してFCTプロファイルを予想し、運動性情報抽出のための最適な実験条件を設定することが重要となる。本研究では、 ^{19}F を既に分子内に含有し、p38との複合体構造も得られている化合物AST-487に着目し、p38結合状態における ^{19}F -FCT測定を行うことにより、運動性解析の可否を検討した。この結果、AST-487の ^{19}F -FCTシグナルはp38結合に依存して生成され、混合時間依存的なFCTシグナル強度を予め準備した理論曲線にてフィッティングすることにより、当該 ^{19}F 含有官能基の局所運動性を、ナノ～ピコ秒の時間領域における可動域を表すオーダーパラメータとして定量的に決定することに成功した(図5; 雑誌論文)。以上により、複雑な生体分子複合体、および、生体分子に結合した含 ^{19}F 化合物の局所運動性を定量するための技術が確立された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

Yuji Tokunaga, Koh Takeuchi, and Ichio Shimada, Forbidden Coherence Transfer of ^{19}F Nuclei to Quantitatively Measure the Dynamics of a CF_3 -containing Ligand in Receptor-Bound States, *Molecules*, 査読有, Vol. 22, 2017, pp. 1492.
DOI:10.3390/molecules22091492

〔学会発表〕(計4件)

徳永 裕二、竹内 恒、高橋 栄夫、嶋田 一夫、MAPK p38 によるストレス刺激に適合した基質選別機構の解明、第56回NMR討論会、平成29年11月14~16日。

徳永 裕二、竹内 恒、高橋 栄夫、嶋田 一夫、溶液NMR法を用いたMAPK p38 によるストレス刺激に適合した基質選別機構の解明 ConBio2017、平成29年12月6~9日。

徳永 裕二、竹内 恒、高橋 栄夫、嶋田 一夫、Structural Basis for the Optimum Signal Transduction via MAPK p38 under the Stress-associated ATP-depleted, Low pH condition Elucidated by Solution NMR, 第56回日本生物物理学会年会、平成30年9月15~17日。

徳永 裕二、竹内 恒、高橋 栄夫、嶋田 一夫、ATP濃度減少およびpH低下を伴うストレス条件下におけるMAPK p38 のシグナル伝達最適化機構の溶液NMR法による解明、定量生物学の会第九回年会、平成31年1月13, 14日。

〔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〕

6. 研究組織

(1)研究分担者：なし

(2)研究協力者：なし