

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 27 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23570146

研究課題名(和文) TAM受容体チロシンキナーゼのリガンド認識機構の解明と創薬に向けた分子基盤

研究課題名(英文) Towards the molecular basis of the ligand-binding mechanism and drug-discovery of TAM receptor tyrosine kinases

研究代表者

永田 崇 (NAGATA, Takashi)

京都大学・エネルギー理工学研究所・准教授

研究者番号：10415250

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：TAM受容体チロシンキナーゼは多様な細胞機能と疾患に関わっている。そのうちTyro3とMerについて、糖鎖修飾が施される酵母*K. lactis*を用いた各種試料調製方法、安定同位体標識化方法、糖鎖修飾の分析方法、相互作用解析法、各種NMR法の整備を行った。さらに、これらの方法を用いてTyro3とMerについて糖鎖修飾が構造と機能に与える影響を調べた。また、標的タンパク質に対して強く結合する分子の取得及び評価を行うための手段も得た。本研究成果をもとに、今後はTAM受容体の機能発現について立体構造ベースの知見と、TAM受容体とリガンドまたは薬候補分子の分子認識機構の解明に向けた研究を展開させていく。

研究成果の概要(英文)：TAM receptor tyrosine kinases have causal relationships with diseases. We have set up the methods to obtain Tyro3 and Mer of the family using yeast *K. lactis*, which can potentially glycosylate the proteins; to introduce stable isotope into proteins in both uniform and selective manner; to analyze glycosylation modifications; to analyze molecular interactions; and to run and analyze several NMR methods. We have then applied these methods to Tyro3 and Mer, and evaluated the influences of glycosylation on their structures and functions. We have also obtained the methods to develop peptides and nucleic acids that bind to the target proteins, and the methods to evaluate the structure and function of the obtained molecules. On the basis of current efforts, we are going to collect structural information of TAM receptors in action, and are intending to bring the project further to elucidate the molecular mechanisms underlying the recognition of ligands or drug candidates by TAM receptors.

研究分野：構造生命科学

キーワード：TAM受容体 NMR 糖鎖修飾

1. 研究開始当初の背景

TAM 受容体ファミリーは受容体チロシンキナーゼファミリーの一つであり、Tyr3、Mer、Axl の3つの受容体から構成される。生物学的な役割は多様で、細胞の生存、増殖、接着、遊走や血小板凝集、精子形成、自然免疫応答等に関わっている。しかし TAM 受容体について、シグナルの生成や伝達経路等、機能発現の理解は進んでいない。この理由としては、リガンドが一つしか見つかっていないことが大きい。唯一見つかっているのは、血液凝固障害因子に相溶性が高い Gas6 のみである。近年、TAM 受容体と Gas6 の異常が血液凝固障害やがんの原因となることがわかり、創薬ターゲットとして注目されてきた。TAM 受容体が真の創薬標的となるためには、さらなるリガンドの発見のみならず、各受容体についてリガンド認識様式に関する立体構造の情報が不可欠であると考えた。

2. 研究の目的

本研究では、TAM 受容体の作用機序を理解するための分子基盤を確立するため、糖鎖修飾された TAM 受容体とリガンドの調製方法及び解析方法を整備し、これらのタンパク質について物性と相互作用を解析することを目的とした。また、標的タンパク質に結合するペプチドやアプタマーを獲得し、相互作用解析するための方法を整備することも目的とした。本研究は、TAM 受容体によるシグナル生成の分子機構の理解へつなぐとともに、機能解析のツール開発へ発展すると考えられる。

3. 研究の方法

(1) TAM 受容体及びリガンドの調製方法の確立

Tyr3 については、大腸菌を用いて糖鎖修飾のないタンパク質(野生型、糖鎖修飾部位の変異体、Asn→Arg 及び Asn→Cys)を、また酵母 *K.lactis* を用いて糖鎖修飾されたタンパク質を得た。Mer については、大腸菌による調製が困難であったため、*K.lactis* によりマルトース結合タンパク質との融合タンパク質として得た。得られたタンパク質については、糖鎖切断酵素と質量分析、NMR 法により糖鎖の分析を行った。Gas6 は動物細胞 HEK293 を用いて大量発現及び調製を行った。

(2) 構造情報及び結合情報の取得

Tyr3 及び Mer の構造形成、変異導入または糖鎖付加によるタンパク質構造への影響は NMR 法の 15N-HSQC スペクトルにより検証した。また、主鎖及び側鎖に関する 15N, 13C, 1H シグナルの帰属は、各種他核多次元 NMR 法を用い、常法にしたがって行った。Tyr3 と Mer 各々と Gas6 との結合部位の同定にはケミカルシフトパーターベーション法、転移交差飽和法により行った。また、結合の親和性を求める解析には、表面プラズモン法、

ゲルろ過を用いた。

4. 研究成果

(1) 糖鎖修飾が Tyr3 の構造と機能に与える影響

当初、糖鎖修飾されていない Tyr3 の結晶構造が海外のグループにより決定されていた。しかしこの構造においては、2つの Tyr3 が各々の推定糖鎖修飾部位及び推定 Gas6 結合部位を互いに向かい合わせる様にしてホモダイマーを形成していた。我々はまず、Tyr3 のホモダイマー形成について検証を行った。Tyr3 について、野生型(WT)と推定糖鎖修飾部位に変異を導入した2つの変異体、Asn→Arg(NR)及び Asn→Cys(NC)を得た。大腸菌を用いることで、これらはいずれも糖鎖修飾は受けていない。WT、NR 及び NC の 15N-HSQC スペクトルは互いに良く似ており、いずれも構造を有することを示した。ゲルろ過により、NR はモノマー、NC はダイマー、WT はモノマー/ダイマーが混在することを明らかにした。次にゲルろ過を行い、これら各々について、Gas6 との複合体形成能を調べた。その結果 WT と NR は Gas6 と 1:1 複合体を形成するが、NC は結合能を持たないことがわかった。

また、糖鎖修飾された Tyr3(glycoTyr3)を *K.lactis* により得た。glycoTyr3 と、その糖鎖を切断して得た GlucNAc 修飾 Tyr3 について 15N-HSQC スペクトルを比較した結果、タンパク質本体はほぼ同じ構造であることがわかった。ゲルろ過の結果は GlycoTyr3 がモノマーであることを示した。さらに、GlycoTyr3、WT、NR、NC 各々について Gas6 との結合能を表面プラズモン共鳴(SPR)により調べた。その結果、GlycoTyr3、WT、NR は同程度の親和性で Gas6 と結合するとともに、いずれの結合も 1:1 の化学量論比であることがわかった。

次に NR について NMR シグナルの主鎖帰属を行ない、85% 強完了した。これにより、NR、WT、NC、GlycoTyr3 の間のスペクトルパターンの違いは糖鎖修飾部位近傍に帰属された。引き続き転移交差飽和法(TCS)により NR 上の Gas6 結合部位を同定した。その結果、Gas6 結合部位と糖鎖修飾部位とは異なっていることが明らかとなった。また、Axl:Gas6 複合体の構造は既に海外のグループにより明らかにされているが、Axl の Gas6 結合部位と、Tyr3 のそれとは異なることが明らかとなった。以上より、Tyr3 は糖鎖修飾されることによりモノマー状態が維持されること、そしてそのことが Gas6 との結合に重要であることが示された。

(2) 糖鎖修飾が Mer の構造と機能に与える影響

K.lactis を用いて Mer の各種発現方法を検討し、マルトース結合タンパク質との融合タンパク質として Mer を得ることが出来た。さら

に、K.lactis の各種変異株について培地組成、培養方法を検討することにより、Mer について効率の良い各種安定同位体標識化方法を整備した。15N-HSQC スペクトルのシグナルパターンより、Mer のマイナー成分を同定した。メジャー成分とマイナー成分を精製、単離し、各々について糖鎖修飾分析を行った結果、糖鎖がメジャーには1つ、マイナーには2つ付加されていることがわかった。これにより、糖鎖付加の数に関わらず、Mer は立体構造を形成していることが明らかとなった。

Mer のメジャー成分について各種他核多次元 NMR 法を適用し、主鎖の帰属を行った。50%程度の帰属が完了したが、それ以上解析を進めることが困難であったため、K.lactis による選択的安定同位体標識化方法を検討し、特定のアミノ酸残基について側鎖の帰属を行う方法の整備を行った。将来的にはこの方法を用いて Mer の分子表面上に露出したアミノ酸残基の安定同位体標識化を行う。既に、側鎖のシグナルを用いる TCS 法を開発及び整備しているので、これにより、ピンポイントで Gas6 との結合情報を得ることが可能となる。また、Mer の構造については既に分子モデリングを行っているので、複合体の構造情報は実験情報に基づいた分子モデリングで得ることを計画している。

一方、糖鎖がゼロ、1つ、2つ付加された Mer を調製し、Gas6 との相互作用について SPR により解析した。その結果、糖鎖付加がゼロ>1つ>2つの順番で、Gas6 との結合が弱くなることが示された。また、糖鎖付加のない Mer と Tyro3 について、Gas6 との結合を比較した。種々の温度条件、溶液条件で解析を進めているところであるが、Gas6 との結合は、概ね Tyr3 の方が Mer よりも強いことがわかった。

(3)その他

酵母 K.lactis による安定同位体標識体調製方法の確立：酵母は糖鎖修飾などの翻訳修飾されたタンパク質の研究に有用である。広く普及されている酵母 P.pastoris は発現誘導と炭素栄養源にメタノールを必要とするため、コストと毒性の問題がある。本研究では酵母 K.lactis を活用することで、培地組成、培養方法などを詳細に検討し、P.pastoris の上記デメリットを克服した安定同位体標識試料調製を行った。これによりタンパク質の重水素化及び選択的アミノ酸標識化が可能となった。

mRNA ディスプレイ法により得た標的タンパク質結合ペプチドの構造解析：別のタンパク質(発癌タンパク質 MDM2)に関して mRNA ディスプレイ法により強結合ペプチド(MIP)を取得し、NMR 立体構造解析を行った。MIP と MDM2 をキメラタンパク質として調製することで簡便に安定同位体標識化した。これにより、MIP と MDM2 の結合界面を原子レベルで明らかにした。この方法は、TAM 受容体の系にも将来的は適用すること

が出来る。

SELEX 法により得た標的タンパク質結合アプタマーの構造解析：別のタンパク質(プリオンタンパク質 PrP)に関して SELEX 法により RNA アプタマー(R12)を取得し、PrP:R12 複合体の NMR 立体構造解析を行った。さらに得られた構造情報を元に統計熱力学的解析を行い、分子認識のドライビングフォースを明らかにした。この方法は、TAM 受容体の系にも将来的は適用することが出来る。

本研究では、がん等の疾患標的分子でもある TAM 受容体チロシンキナーゼ Tyro3 及び Mer、標的分子 Gas6 について、糖鎖修飾を含む試料調製方法及び NMR 法、SPR 法などの構造・機能解析方法を整備することに成功した。今後は、これらの方法を活用して、TAM 受容体によるシグナル生成の分子機構の理解に向けてさらに解析を進めていく。また、TAM 受容体に対する阻害分子を取得し、分子マーカーや創薬開発に向けた研究を展開することを計画している。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者には下線)

[雑誌論文](計11件)

全て査読有り。

(1)*Nagata, T.(co-corresponding author), *Katahira, M.他(3人中2番目) (2015) *PLoS One*, 10: e0124142, "Catalytic Analysis of APOBEC3G Involving Real-Time NMR Spectroscopy Reveals Nucleic Acid Determinants for Deamination" DOI: 10.1371/journal.pone.0124142

(2)*Nagata, T.(co-corresponding author), *Katahira, M.他(4人中3番目) (2015) *Chem. Commun.*, 51: 5898-5901, "Boosting of activity enhancement of K(+)-responsive quadruplex hammerhead ribozyme" DOI: 10.1039/c5cc00961h

(3)*Nagata, T.(co-corresponding author), *Yanagawa, H.他(10人中1番目) (2014) *PLoS One*, 9: e109163, "Structural basis for inhibition of the MDM2:p53 interaction by an optimized MDM2-binding peptide selected with mRNA display" DOI:10.1371/journal.pone.0109163

(4)Hayashi, T., Nagata, T., *Kinoshita, M.他(6人中4番目) (2014) *Nucleic Acids Res.*, 42: 6861-6875, "Binding of an RNA aptamer and a partial peptide of a prion protein: crucial importance of water entropy in molecular recognition" DOI: 10.1093/nar/gku382

(5)Furukawa, A., Nagata, T., *Katahira, M.他(8人中4番目) (2014) *Angew Chem Int Ed Engl.*, 53: 2349-2352, "Quantitative analysis of location- and sequence-dependent deamination by APOBEC3G using real-time NMR spectroscopy" DOI: 10.1002/anie.201309940

(6)Mashima, T., Nagata, T., *Katahira, M.他(10

人中 6 番目) (2013) *Nucleic Acids Res.*, 41: 1355-1362, "Anti-prion activity of an RNA aptamer and its structural basis" DOI:10.1093/nar/gks1132

(7)Furukawa, A., Takaori, A., Nagata, T. (co-corresponding author), *Katahira, M.他(11人中 10 番目) (2012) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 425: 284-289 "NMR study of xenotropic murine leukemia virus-related virus protease in a complex with amprenavir" DOI:10.1016/j.bbrc.2012.07.083

(8)Nagata, T., *Katahira, M.他(6人中 1 番目) (2012) *FEBS J.*, 279: 1456-1463 "'Intelligent' ribozyme whose activity is altered in response to K(+) as a result of quadruplex formation" DOI:10.1111/j.1742-4658.2012.08538.x.

(9)Nagata, T., *Muto, Y.他(6人中 1 番目) (2012) *Biomol. NMR Assign.*, 7: 69-72 "(1)H, (13)C, and (15)N resonance assignments of the dsRBDs of mouse RNA helicase A." DOI:10.1007/s12104-012-9380-3

(10)Nagata, T., *Muto, Y.他(8人中 1 番目) (2012) *Proteins*, 80: 1699-1706 "Solution structures of the double-stranded RNA-binding domains from rna helicase A." DOI:10.1002/prot.24059

(11)Ohyama, T., Nagata, T. (co-corresponding author), *Katahira, M.他(8人中 2 番目) (2012) *Nucleic Acids Res.*, 40: 3218-3231 "Structure of Musashi1 in a complex with target RNA: the role of aromatic stacking interactions" DOI:10.1093/nar/gkr1139

〔学会発表〕(計 72 件)

国内学会 43 件、国際学会 29 件(以下、国外で開催された 11 件のみ記載)

(1)Nagata, T., Yanagawa, H.他(10人中 1 番目) (2014) *Biophysical Society Thematic Meeting Disordered Motifs and Domains in Cell Control*, "NMR study of the Interaction between MDM2 and a Peptide Selected by mRNA Display" Dublin (Ireland), 2014 年 10 月 11 日-15 日.

(2)Kanba, K., Nagata, T., Katahira, M.他(6人中 5 番目) (2014) *XXVIth International Conference on Magnetic Resonance in Biological Systems*, "Functional mechanism of an anti-HIV protein, APOBEC3G, as revealed by real-time NMR monitoring of its enzymatic reaction" Dallas (USA), 2014 年 8 月 24 日-29 日.

(3)Amano, R., Nagata, T., Sakamoto, T.他(12人中 3 番目) (2014) *XXI Round Table on Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*, "Properties of RNA aptamer binding to AML1 Runt domain" POZNAŃ, POLAND, 2014 年 8 月 24 日-28 日.

(4)Hayashi, T., Nagata, T., Katahira, M.他(6人中 4 番目) (2014) *58th Annual Meeting of the Biophysical Society of USA*, "Statistical Thermodynamics for Binding of an RNA Aptamer and a Partial Peptide of a Prion Protein"

San Francisco (USA), 2014年2月15日-19日.

(5)Nagata, T., Yanagawa, H.他(8人中 1 番目) (2013) "Structural description for the strong binding of the peptide selected by mRNA display to MDM2" Brisbane (Australia), 2013 年 10 月 27 日-30 日.

(6)Mashima, T., Nagata, T., Katahira, M.他(10人中 6 番目) (2013) *The 10th Korea-Japan Bilateral Symposium on Biological NMR*, "Mechanism of high affinity and anti-prion activity of anti-prion aptamer" Seoul (Korea), 2013 年 7 月 4 日.

(7)Furukawa, A., Nagata, T., Katahira, M.他(12人中 4 番目) (2013) *The 10th Korea-Japan Bilateral Symposium on Biological NMR*, "The deamination of APOBEC3G is controlled by the sliding-direction-dependent catalytic activity, and anti-prion activity of an RNA aptamer and its structural basis" Seoul (Korea), 2013 年 7 月 4 日.

(8)Ohyama, T., Nagata, T., Katahira, M.他(8人中 2 番目) (2012) *XXV International Conference on Magnetic Resonance in Biological Systems*, "Sequence-specific RNA-recognition mechanism of Musashi1, neural and oncogenic RNA-binding Protein" Lyon (France), 2012 年 8 月 19 日-14 日.

(9)Amano, R., Nagata, T., Sakamoto, T.他(9人中 3 番目) (2012) *XXV International Conference on Magnetic Resonance in Biological Systems*, "NMR analysis of the interaction between AML1 (RUNX1) Runt domain and RNA aptamer" Lyon (France), 2012 年 8 月 19 日-14 日.

(10)Mashima, T., Nagata, T., Katahira, M.他(12人中 9 番目) (2012) *XXV International Conference on Magnetic Resonance in Biological Systems*, "Anti-prion activity and its structural basis of RNA aptamer, and sliding-direction-dependent deaminase activity of anti-HIV enzyme" Lyon (France), 2012 年 8 月 19 日-14 日.

(11)Furukawa, A., Nagata, T., Katahira, M.他(7人中 6 番目) (2012) *XXV International Conference on Magnetic Resonance in Biological Systems*, "Elucidation of the location-dependent deamination reaction mechanism of an anti-HIV factor, APOBEC3G" Lyon (France), 2012 年 8 月 19 日-14 日.

〔図書〕(計 1 件)

(1)高橋栄夫、生体有機化学、東京化学同人、発行年 2012 年、総ページ数 220

〔産業財産権〕
該当なし

〔その他〕
該当なし

6 . 研究組織

(1)研究代表者

永田 崇 (NAGATA, Takashi)
京都大学・エネルギー理工学研究所・准教授
研究者番号：10415250

(2)研究分担者

高橋 栄夫 (TAKAHASHI, Hideo)
横浜市立大学・その他の研究科・教授
研究者番号：60265717

(3)連携研究者

該当なし