

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 6月 3日現在

機関番号：16101
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23770121
 研究課題名（和文）筋萎縮関連ユビキチンリガーゼ Cbl-b のリン酸化による構造変化と機能調節
 研究課題名（英文）Phosphorylation-induced conformational changes and functional regulation of the muscle-atrophy-associated ubiquitin ligase Cbl-b.
 研究代表者
 真板 綾子 (MAITA AYAKO)
 徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・助教
 研究者番号：60415106

研究成果の概要（和文）：

リン酸化による Cbl-b のユビキチンリガーゼ活性の調節機構の構造的基盤を解明するために、まず、リン酸化状態を模倣した Cbl-b³⁹⁻⁴⁶⁵ Y363E 変異体の大量調製系を確立し、結晶化に適した高純度の蛋白質試料を得た。さらに、この試料を用いて結晶化条件の探索を行った。しかし、2012年1月に Huang らのグループから同じファミリー蛋白質である c-Cbl のリン酸化状態の結晶構造が報告されてしまった。そこで、当初の研究計画を変更し、Cbl-b と基質であるリン酸化状態の IRS-1 との結合に着目した研究を行った。リン酸化状態の IRS-1 を模倣したペプチドと Cbl-b の基質認識ドメインである TKB ドメインとの複合体結晶構造解析を行い、その結合様式の詳細を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

To elucidate the structural basis for enhancement of Cbl-b's ubiquitin ligase activity through the phosphorylation, we initially constructed a protein expression system for Cbl-b³⁹⁻⁴⁶⁵ Y363E mutant that mimics the phosphorylated state of Cbl-b. We succeeded in the development of a protein purification protocol in order to generate pure protein in sufficient quantities for X-ray crystallographic studies. We carried out crystal screening of a Cbl-b³⁹⁻⁴⁶⁵ Y363E purified by this protocol. However, Huang's group reported the crystal structure of the phosphorylated c-Cbl, a homolog of Cbl-b, in January 2012. Thus, we changed the originally planned research project for the study focused on the interaction between the Cbl-b³⁹⁻³⁴¹ (hereafter called "Cbl-b TKB") and the phosphorylated IRS-1. We succeeded in the crystal structure determination of the Cbl-b TKB in complex with the short phosphopeptide mimetic of phosphorylated IRS-1. It revealed the details of the binding mode of Cbl-b TKB to the phosphopeptide.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,600,000	1,080,000	4,680,000

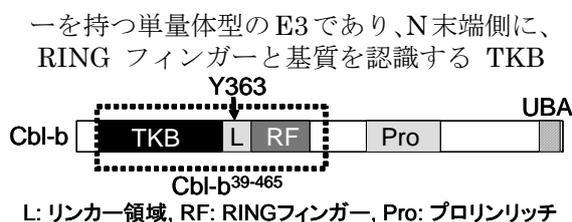
研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物化学

キーワード：分子認識及び相互作用

1. 研究開始当初の背景

Cbl-b は、ユビキチン-プロテアソーム依存性の蛋白質分解経路において、ユビキチンを基質に付加する反応を触媒するユビキチンリガーゼ(E3)として働く。Cbl-b は RING フィンガー



ドメインを有する。これまでの研究で、ユビキチンリガーゼ Cbl-b が筋芽細胞の重要な増殖シグナル分子である IRS-1 をユビキチン化し、その分解を促進することが筋萎縮を引き起こす原因の一つであることを明らかとした。一方、Cbl-b 及び Cbl-b と配列相同性が高い類縁蛋白質 c-Cbl の E3 活性には、TKB ドメインと RING フィンガーの間にあるリンカーヘリックス上にあるチロシンのリン酸化が必須であることが知られている。非リン酸化状態の c-Cbl と UbcH7(E2) と基質類似ペプチドとの複合体結晶構造は既に報告されており、基質が結合する TKB ドメインと E2 の活性中心との距離が 60 Å 以上も離れていることが明らかにされている。この構造から、非リン酸化状態の c-Cbl はユビキチンの基質への転移が不可能であり、c-Cbl の E3 活性を発揮させるには、リン酸化に伴う E3 自身の大きな構造変化が必要であると考えられる。しかしながら、リン酸化に伴う Cbl 蛋白質の構造変化は未だ捉えられていなかった。

2. 研究の目的

Cbl-b の E3 活性に必須である自身の Y363 のリン酸化に伴う構造変化は、E3 の活性の発現に重要な役割を果たすことが期待されるが、その詳細なメカニズムは明らかになっていない。本研究では、構造生物学的手法を用いて、Cbl-b の Y363 のリン酸化による立体構造変化・ユビキチン結合酵素 (E2) との相互作用に与える影響を調べることで、リン酸化による Cbl-b のユビキチンリガーゼ活性の調節機構の構造的基盤を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) Cbl-b³⁹⁻⁴⁶⁵ Y363E 変異体の大量調製系の確立

リン酸化及び非リン酸化状態の Cbl-b の立体構造決定を行い、リン酸化に伴う構造変化を明らかにすることを目指した。Cbl-b は、分子量 120kDa の巨大な蛋白質であるため、本研究では、基質認識に関与する TKB ドメイン、リン酸化サイトを含むリンカー領域、E3 の活性中心である RING フィンガーを含む領域(以後 Cbl-b³⁹⁻⁴⁶⁵ と略す)を解析の対象とした (図 1 参照)。リン酸化状態の解析には、リン酸化状態を模倣した Cbl-b³⁹⁻⁴⁶⁵ Y363E 変異体を用いた。

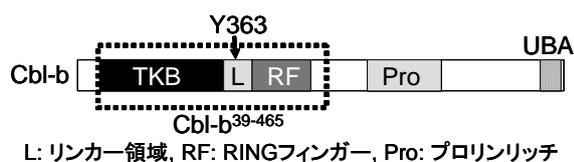


図 1. Cbl-b のドメイン構造模式図

まず、Cbl-b³⁹⁻⁴⁶⁵ Y363E 変異体の発現系構

築・大量調製系の確立を行った。Cbl-b³⁹⁻⁴⁶⁵ Y363E 変異体と GST 及び SUMO との融合蛋白質として大腸菌に発現させ、この融合タンパク質をグルタチオンアフィニティークロマトグラフィーで単離した。SUMO の C 末を認識して切断する酵素 SENP を用いることにより、GST-SUMO タグを切り離した。その後、陽イオン交換クロマトグラフィーにより、Cbl-b³⁹⁻⁴⁶⁵ Y363E のみ単離した。

(2) Cbl-b³⁹⁻⁴⁶⁵ Y363E 変異体の結晶化条件の探索と X 線回折実験

精製した試料を限外ろ過によって約 5mg/ml の濃度にまで濃縮した後、96 穴プレートを用い sitting drop 蒸気拡散法にて、結晶化条件の初期スクリーニングを行った。初期スクリーニングには Hampton research 社の Index1,2(98 条件)を用いた。PEG が含まれる沈殿剤で微結晶が得られたため、Hampton research 社の PEG/Ion(48 条件)でも結晶化を行った。さらに、解析に最適な結晶を得るために、次の条件で結晶化を行った。①蛋白質と沈殿剤の割合を変えた。(蛋白質:沈殿剤=1:1⇒1.2:0.8, 1.4:0.6) ②濃度の高い試料(約 8mg/ml)を用いた。得られた結晶を共同利用放射光施設 (Photon Factory) にて測定を行った。

(3) Cbl-b³⁹⁻³⁴¹ の大量調製系の確立

(2)の研究項目を行っている過程で、海外のグループから同じファミリー蛋白質である c-Cbl のリン酸化状態の結晶構造が報告され、リン酸化に伴う構造変化及び活性発現機構が明らかにされた。Cbl-b と c-Cbl のアミノ酸配列上の相同性から、Cbl-b も c-Cbl と同様の現象が起こっていることが予想された。そこで、当初の研究計画を変更し、Cbl-b の基質であるチロシンリン酸化状態の IRS-1 との結合に着目し、基質認識機構を明らかにすることを試みた。

まず、基質認識に関わる Cbl-b の TKB ドメイン(Cbl-b³⁹⁻³⁴¹)の発現系構築・大量調製系の確立を行った。Cbl-b³⁹⁻⁴⁶⁵ Y363E 変異体と同様に GST 及び SUMO との融合蛋白質として大腸菌に発現させた。その後の精製方法に関しても、Cbl-b³⁹⁻⁴⁶⁵ Y363E 変異体と同様の方法で行った。

(4) Cbl-b³⁹⁻³⁴¹ とリン酸化 IRS-1 ミミックペプチドの NMR 滴定実験

結晶構造解析では、基質側は IRS-1 の Y608 のリン酸化を模倣した合成ペプチドを用いる。まず、このペプチドが確かに Cbl-b³⁹⁻³⁴¹ と結合するか否かを NMR 法により調べた。¹⁵N 標識した Cbl-b³⁹⁻³⁴¹ に対し、ペプチドを滴定し、¹H-¹⁵N 二次元相関スペ

クトルを測定した。

(5) Cbl-b³⁹⁻³⁴¹ とリン酸化 IRS-1 ミミックペプチドとの X 線結晶解析

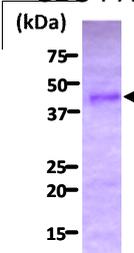
精製した試料を限外ろ過によって約 5mg/ml の濃度にまで濃縮した後、ペプチドを混合 (モル比; 蛋白質: ペプチド=1:1.6) した。sitting drop 蒸気拡散法にて、共結晶化条件の初期スクリーニングを行った。初期スクリーニングには Hampton research 社の Index1,2(98 条件)を用いた。Index#78 の条件で良好な結晶が得られた。得られた結晶を共同利用放射光施設 (Photon Factory) にて測定を行い、データ収集した。c-Cbl TKB ドメインと EGFR ペプチドの複合体構造 (PDB コード: 3OB2) を用いて分子置換法により構造決定した。

4. 研究成果

(1) Cbl-b³⁹⁻⁴⁶⁵ Y363E 変異体の大量調製系の確立

結晶化するのに十分な純度の試料調製に成功した (図 2 参照)。1L の LB 培地を用いた培養では、最終的に Cbl-b³⁹⁻⁴⁶⁵ Y363E 変異体を約 1mg (蛋白質濃度 5.24mg/ml、約 180 μl) 得た。

図2. 精製終了後の SDS-PAGE



(2) Cbl-b³⁹⁻⁴⁶⁵ Y363E 変異体の結晶化条件の探索と X 線回折実験

結晶化スクリーニングを行った結果、Hampton research 社の PEG/Ion の #44 (0.2M Ammonium phosphate dibasic, 20% w/v Polyethylene glycol 3,350) で、小さな結晶が得られた。さらに、この条件に関して、蛋白質と沈殿剤の混合比及び蛋白質の濃度を変えた。その結果、次の条件で良い結晶が得られた (図 3 参照; ①蛋白質濃度が約 5mg/ml で蛋白質と沈殿剤の割合が 1.4 : 0.6 の条件および②蛋白質濃度が約 8mg/ml で蛋白質と沈殿剤の割合が 1 : 1。) 共同利用放射光施設で、これらの結晶の X 線回折実験を行った。しかし、反射が得られなかった。

図3. Cbl-b³⁹⁻⁴⁶⁵Y363Eの結晶



(3) Cbl-b³⁹⁻³⁴¹ の大量調製系の確立

結晶化するのに十分な純度の試料調製に成功した。1L の LB 培地を用いた培養では、

最終的に Cbl-b³⁹⁻³⁴¹ を約 1mg 得た。

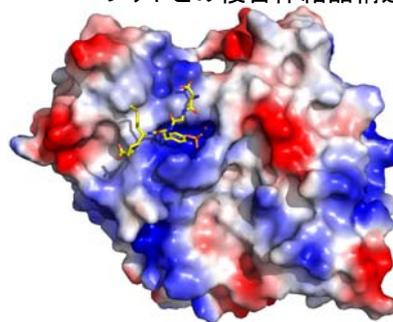
(4) Cbl-b³⁹⁻³⁴¹ とリン酸化 IRS-1 ミミックペプチドの NMR 滴定実験

ペプチド添加に伴い、シグナル消失や化学シフト変化が見られたことから、IRS-1 ミミックペプチドは確かに Cbl-b³⁹⁻³⁴¹ と結合することが分かった。

(5) Cbl-b³⁹⁻³⁴¹ とリン酸化 IRS-1 ミミックペプチドとの X 線結晶解析

決定した複合体構造から、ペプチドはリン酸化チロシンを中心に、TKB ドメインの塩基性に富むポケットと結合していることがわかった。(図 4)

図4. TKBドメインとIRS-1ミミックペプチドとの複合体結晶構造



TKB: 表面電荷 (青色: 正、赤色: 負。)

ペプチド: スティック表示。

さらに、現在までに報告がされている Cbl 蛋白質とリン酸化チロシン含有ペプチドの複合体構造と比較した結果、この複合体のみにみられる、IRS-1 ミミックペプチド N 末端側の Asp と Cbl-b TKB ドメインの Lys270 間の特異的な相互作用を見出した。

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 1 件)

① 安倍 知紀 (他 14 名、7 番目)、Soy Glycinin Contains a Functional Inhibitory Sequence against Muscle-Atrophy-Associated Ubiquitin Ligase Cbl-b, International Journal of Endocrinology、査読有、vol. 2013, 2013, pp1-11、DOI:907565

[学会発表] (計 4 件)

① 真板-大野綾子、ユビキチンリガーゼ Cbl-b の TKB ドメインと阻害ペプチドの複合体結晶構造解析、第 12 回日本蛋白質科学会年会、2012. 6. 22、名古屋国際会議場 (名古屋市)

②上地達也、Crystal structure of Cbl-b TKB domain in complex with Cblin (Cbl-b inhibitor)、2011.8.23、第22回国際結晶会議 IUCr2011, マドリッド市会議場 (スペインマドリッド)

③上地達也、Cbl-b TKB ドメインと筋萎縮阻害ペプチド Cblin(Cbl-b inhibitor)の相互作用解析、2011.5.15、第65回日本栄養・食糧学会大会、お茶の水女子大学 (東京都文京区)

④上地達也、IRS-1 のユビキチン化阻害ペプチドと Cbl-b の相互作用解析、第33回日本分子生物学会年会、2010.12.8、神戸ポートアイランド (神戸市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

真板 綾子 (MAITA AYAKO)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・助教

研究者番号：60415106

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

上地達也 (UEJI TATSUYA)

徳島大学・大学院栄養生命科学教育部博士前期過程・大学院生