

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24750166

研究課題名(和文)天然変性タンパク質の相互作用解析による新規分子認識モデルの創成

研究課題名(英文)Physicochemical studies of YB-1 functions and structures

研究代表者

長門石 暁(NAGATOISHI, Satoru)

東京大学・工学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：30550248

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、IDPと核酸間の相互作用のメカニズムの解明を目指し、ヒト由来のY-box binding protein 1 (YB-1) をモデル蛋白質として取り上げた。本研究における熱量解析の結果より、YB-1はC-term1をDNA結合部位として機能させていることが示された。一方、YB-1のCSD領域はRNAと特異的な相互作用をする部位であることが分かった。これらの結論は、YB-1を欠損体から評価できたこと、さらに分子環境変化に基づく物理化学的解析によって明らかになったことがポイントとして挙げられる。このように、本研究課題に掲げた分子環境と分子認識との深い関連性を示唆する研究成果が得られた。

研究成果の概要(英文)：Y-box binding protein 1(YB-1) is a nucleic acid-binding protein that regulates transcription and translation, and is overexpressed in cancer cells. It has been reported that the bindings of YB-1 to specific genomic DNAs or mRNAs are involved in tumorigenesis. Therefore, it is plausible to suppose that YB-1 is a new target to regulate the cellular systems due to treatment of human diseases and elucidation of new cellular functions. However, the binding mechanism of YB-1 to nucleic acids is still unclear. Here, we carried out physicochemical analyses of the structural and binding properties of YB-1 using spectrometry and calorimetry. The recombinant YB-1 had thermodynamically unique bindings to the single-stranded DNA with Y-box sequence and to the single-strand DNA with Y-box mRNA sequence. The DNA and RNA binding sites of YB-1 were identified by using a full length and deletion mutants of YB-1. We further studied the effects of salt and temperature on the binding to DNA or RNA.

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・生体関連化学

キーワード：天然変性型蛋白質 熱力学 相互作用 核酸

1. 研究開始当初の背景

近年、構造をもたない多くの天然変性タンパク質 (IDP) の相互作用システムが、重要な細胞プロセスに関与していることが明らかになりつつある。特に核酸結合型 IDP は、構造をもたない一本鎖 DNA や RNA と相互作用し機能を果たしている。従って核酸結合型 IDP の分子認識は、互いに構造を有しないもの同士が特異性をもって相互作用している。しかし、従来の分子認識モデルである“鍵と鍵穴”原理では、IDP の結合特異性を創出している相互作用機構を説明することができない。従って細胞内における生体分子間の相互作用による秩序化の本質を捉えるためには、新しい分子認識の概念が必要不可欠である。

細胞システムにおいて、環境変化は重要な因子である。進化の過程で、生命システムはその生育環境 (温度、pH、塩濃度) に適応してきた。また細胞分裂や細胞病変においても、細胞内の分子局在化による電荷分布や水和状態などがダイナミックに変化している。これらの環境変化は、分子の結合特異性に大きく関与しており、また細胞システムに依存して分子の相互作用要素や溶媒和状態もダイナミックに変化していると考えられる。申請者はこれまでに、核酸とタンパク質間の物理化学的な相互作用解析から、溶媒和変化の重要性を見出ししてきた。したがって IDP の核酸に対する分子認識は、周辺環境に依存して多様な相互作用を創出すると考えられる。多くの核酸結合型 IDP が報告されている中、その第一歩として申請者はヒト由来の Y-box 結合タンパク質 (YB-1) をモデルタンパク質として選択する。

YB-1 は核内で Y-box と呼ばれるゲノム配列 DNA と特異的に結合し、転写を制御している転写因子の 1 つと知られている。さらに、細胞質内において mRNA とも結合し、翻訳制御にも関与している。YB-1 はその核酸結合部位が構造を形成しないアミノ酸配列になっていることが既に知られているが、ある塩基配列を特異的に認識するメカニズムは不明である。また mRNA と複合体を形成し高次な組織構造体を形成し、ダイナミックな構造体変化によって翻訳制御を行なっていることも示唆されている。さらに近年では、細胞発生や細胞がん化において YB-1 の発現が深く関与していることも明らかになりつつある。このように YB-1 は細胞システムの制御因子として、また創薬開発のターゲット分子として注目すべき核酸結合型 IDP の一つである。本研究では YB-1 の核酸結合様式に関する環境因子における依存性・法則性を明らかにする。

2. 研究の目的

YB-1 の構造は三つの領域から成っており、N 末端と C 末端が disorder な領域である。N 末端には、アラニンとプロリンが豊富なアラ

ニンプロリンリッチドメイン (A/P)、C 末端には塩基性と酸性のアミノ酸残基クラスターが交互に並んだ C-term 領域、そして間には唯一 β -バレルと呼ばれる立体構造をとる cold shock domain (CSD) が存在する。CSD は他の生物種において DNA 結合ドメインとして知られている。C-term は Gly219-Glu220 間で 20S プロテアソームによって切断され、核移行することが報告されている。本研究では、YB-1 の欠損体と共に、熱力学的及び分光学的手法を用いて、YB-1 の核酸結合メカニズムを物理化学的に解析することを目的とした。

3. 研究の方法

YB-1 の核酸結合部位を同定するために YB-1 の欠損体を作製し、四種の欠損体 (A/P+CSD, CSD, YB-1(1-219), C-term2) と YB-1 全長で核酸との結合を調べた。核酸結合は、熱力学的パラメーターを導出でき、かつ YB-1 の相互作用に強い影響を与える溶媒条件を考慮できる等温滴定型熱量計 (ITC) を用いて行った。同時に、円偏光二色性スペクトル (CD スペクトル) を用いた二次構造解析を行った。

4. 研究成果

[結果]

ssDNA との結合解析

YB-1 と四種類の変異体の ssDNA との結合解析を行った。YB-1(full) と YB-1(1-219) の結合は ΔH と ΔS が共に負の値を示し、ssDNA とエンタルピー駆動の相互作用であることが明らかとなった。一方、CSD, A/P+CSD, C-term2 は吸熱反応を示した。しかしその吸熱量は熱力学的パラメーターが算出できないほど微小であった。つまり、A/P, CSD, C-term2 と DNA との相互作用は非常に弱いことが示された。A/P+CSD と CSD の吸熱量に大きな差がなかったことから、A/P は DNA との結合に関与しないと考えられる。また、YB-1(1-219)の方が YB-1 よりも ΔH が $4.6 \text{ kcal mol}^{-1}$ 大きな値を示したのは、C-term2 が吸熱反応を示したからである。以上の結果から、YB-1 の DNA 結合には C-term1 が重要であることが分かった。

ITC 測定で得られた N 値は YB-1 が 0.63、YB-1(1-219) が 0.34 と 1 よりも小さな値となった。この結果は、YB-1 : DNA = 2 : 1、YB-1(1-219) : DNA = 3 : 1 程度で結合していることを示している。分析 SEC より、YB-1 は二量体で存在することが示唆されたことから、YB-1 は二量体の YB-1 と 1 つの DNA が結合している可能性が示唆された。YB-1(1-219) は分析 SEC と FFF-MALS 測定から 400 kDa 会合体、つまり 16 量体ぐらいで存在している可能性が示されていたことから、YB-1(1-219) は DNA との結合で、16 量体がはぐれて三量体ほどの大きさとなって 1 つの ssDNA と結合しているのかもしれない。

ssRNA との結合解析

次に、ssRNA との ITC 測定を行った。C-term2 は吸熱反応を示したが、その吸熱量は熱力学的パラメーターが算出できないほど微小であった。よって、C-term2 は DNA だけでなく RNA との相互作用においても非常に弱いことが分かった。他の四種類の YB-1 欠損体はどれも水素結合を駆動力とした相互作用を示した。興味深いことは、DNA との結合では弱い吸熱反応を示した CSD は、RNA との結合で発熱反応を示したことである。このことから、CSD は RNA との結合に重要であることが示された。

ssRNA との結合においても、 N は 1 よりも小さな値が得られた。YB-1 と YB-1(1-219) と ssRNA との結合は ssDNA の場合と同様に、YB-1 : RNA = 2 : 1、YB-1(1-219) : RNA = 3 : 1 で結合していると考えられる。CSD と ssRNA は CSD : RNA = 2 : 1 で結合しており、CSD の分析 SEC から CSD は単量体か二量体で存在しているため、二量体 CSD : RNA = 1 : 1 で結合している可能性も考えられる。

塩濃度変化解析

次に、溶媒条件を変えて ITC 測定を行うことで得られた熱力学的パラメーターから、YB-1 の核酸結合メカニズムを解析した。先述のように、C-term1 が DNA 結合、CSD が RNA の結合に重要であることが示されたため、YB-1(1-219) と CSD の二つの欠損体に絞って実験を進めていくことにした。

塩濃度変化における核酸の結合親和性変化について議論する。YB-1(1-219)では、塩濃度を 500 mM NaCl から 150 mM NaCl へ下げると、ssDNA との結合親和性は 3.93×10^5 から 1.14×10^5 と僅かに減少した。一方で ssRNA との結合親和性は 7.17×10^6 から 4.92×10^7 へ増大した。CSD においては、塩濃度を下げると ssDNA との結合による吸熱量は増大し、RNA との結合親和性は 6.19×10^4 から 1.69×10^5 へ増大した。

ここで、YB-1(1-219)の核酸間の相互作用で得られた ΔH は、150 mM NaCl において、DNA とは -46.1 kcal/mol、RNA とは -33.5 kcal/mol であった。核酸-タンパク質の相互作用で観測される ΔH の多くは 0-20 kcal/mol の範囲であることが知られている。今回得られた ΔH はこの範囲よりも大きな値を示していることから、YB-1 と核酸間の相互作用だけでなく、構造変化による ΔH も生じた可能性が高いことが示唆された。よって、YB-1 の結合による構造変化を調べるために、温度変化による ITC 測定から、 ΔC_p の値を導出することにした。

非熱容量変化解析

YB-1(1-219)、CSD と ssDNA、ssRNA の 15-37 °C における ITC 測定を実行した。YB-1(1-219)と ssDNA は、500 mM NaCl の 15 °C における ITC 測定以外は 15-37 °C でエンタル

ピー駆動の相互作用を示し、得られた ΔC_p は塩濃度に関係なく -2.1 kcal mol⁻¹ K⁻¹と大きな負の値を示した。ssRNA もエンタルピー駆動の相互作用を示し、得られた ΔC_p は -0.61 kcal mol⁻¹ K⁻¹であった。CSD と ssDNA 間の相互作用は、温度を変化させても熱力学的パラメーターを算出できるほど強い結合ではなかったが、温度上昇と共に吸熱量が増加したため、 ΔC_p は正の値を示すことが分かった。CSD と ssRNA は ΔC_p が負となり、その値は -0.66 kcal mol⁻¹ K⁻¹であった。CSD と DNA との結合では親水面から脱水が起こっていることが分かり、先述の塩濃度変化に関する結果と合わせて、CSD と DNA は静電相互作用によって弱く結合していることが示された。一方、静電的な性質を示しながらも $\Delta C_p < 0$ となった CSD と ssRNA の結合では、疎水面からの脱水和や、タンパク質の構造変化による親水基への水和が起こることによる、結合特異的な相互作用を形成したと考えられる。 ΔC_p には静電相互作用の正の寄与よりも、結合特異性の非常に大きな負の寄与の方が上回り、 $\Delta C_p < 0$ となったと考えられる。

YB-1 の構造変化解析

YB-1(1-219)と CSD の ΔC_p は極めて大きな値を示し、タンパク質の構造変化の可能性が示された。そこで CD スペクトルを用いて、核酸を添加した時のタンパク質の二次構造変化を調べた。その結果、YB-1、YB-1(1-219)、CSD、A/P+CSD は ssDNA と ssRNA を添加しても CD スペクトルに大きな変化は観察されず、YB-1 は核酸との結合による二次構造の変化は起こらなかった。

[考察]

一般的に、塩濃度を下げると塩イオンによる静電遮蔽効果が弱まり、静電的な相互作用が強まる。よって塩濃度を下げると結合が強まった YB-1(1-219)と RNA、CSD と DNA/RNA との相互作用は、静電的な特徴を示すことが明らかとなった。一方、YB-1(1-219)と DNA との相互作用は塩濃度を下げると弱まったことから、非静電的な特徴を持つことが示唆された。

A/P+CSD は CSD と同様に塩濃度を下げると吸熱反応は強まった。増加した吸熱量に大きな差はなく、やはり A/P は DNA との結合に関与しないと考えられる。C-term2 は 500 mM NaCl では吸熱反応であったが、150 mM NaCl では弱いながらも発熱反応へシフトした。発熱反応には主に水素結合と静電相互作用が関わっているが、水素結合は塩濃度の変化で影響を受けない。よって、C-term2 の主な相互作用は静電的な相互作用であり、 N 値が 1 であることから、C-term2 と DNA は 1 : 1 で結合することが示された。

塩濃度変化解析より、YB-1(1-219)は DNA と非静電的な相互作用をすることが明らかとなったことから、大きな負の ΔC_p 値は疎水

面から脱水和が関与していることが示唆された。これより、YB-1(1-219)は DNA の塩基と主に相互作用していると考えられる。さらに、その ΔC_p 値は一般的な核酸-タンパク質間相互作用で得られる $\Delta C_p = 0.25-0.55 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ よりも非常に大きな値を示し、YB-1(1-219)と DNA との相互作用では、結合だけでなく構造変化も生じている可能性が示された。しかしながら、CD スペクトル測定の結果より YB-1 は二次構造変化に違いが観察されなかった。このことから、YB-1 は二次構造以外に構造が変化している可能性が示唆された。

本研究における熱量解析の結果より、YB-1 は C-term1 を DNA 結合部位として機能させていることが示された。その駆動力は、核酸の塩基とアミノ酸残基の疎水的な相互作用であることが示唆された。一方、YB-1 の CSD 領域は RNA と水素結合を主とした特異的な相互作用をする部位であることが分った。これらの結論は、YB-1 を欠損体から評価できたこと、さらに分子環境変化に基づく物理化学的解析によって明らかになったこと、などがポイントとして挙げられる。このように、本研究課題に掲げた分子環境と分子認識との深い関連性を示唆する研究成果が得られたと考える。

YB-1 は転写因子としてゲノム DNA 上の Y-box 配列と結合することが知られている。そこでは、dsDNA を ssDNA に解離させることによって転写を制御していることが報告されている。本研究における C-term1 の塩基に対する相互作用は、その ssDNA 解離と関連するメカニズムであることが考えられる。YB-1 の異常発現は、核内への集積と癌化と密接に関連していることが明らかにされつつある。したがって、C-term1 の核酸塩基に対する作用機序は、YB-1 の機能制御を目指した創薬デザインにおいて、C-term1 が重要な標的部位となると考えられる。一方、YB-1 の CSD 領域は RNA と特異的な相互作用をする部位であることが分ったが、この結果は、いくつかのゲルシフトアッセイや欠損体による細胞アッセイの結果からも示唆されている。ヒト細胞において、CSD を有するタンパク質がいくつか報告されている。Lin-28a/b はその中でも CSD 領域の機能が同定されている。Lin-28a/b の CSD は、miRNA のヘアピン構造部位と特異的に結合することが知られており、細胞分化において重要な機能を果たしている。CSD はアミノ酸配列相同性が非常に高いことから、今後、塩基配列選択性に関する詳細な解析により、CSD の機能制御による細胞システムの理解が深まると考えられる。このように、本研究における分子環境変化に基づく物理化学的解析から明らかとなった DNA 結合特性と RNA 結合特性は、バイオロジカルにおいても重要な意義がある。

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 6 件)

- 1) S. Kudo, J. M. M. Caaveiro, S. Goda, S. Nagatoishi, K. Ishii, T. Matsuura, Y. Sudou, T. Kodama, T. Hamakubo and K. Tsumoto
Identification and characterization of the X-dimer of human P-cadherin: Implications for homophilic cell adhesion
Biochemistry, **53**, 1742–1752, (2014).
DOI: 10.1021/bi401341g (査読有り)
- 2) M. Kiyoshi, J. M. M. Caaveiro, E. Miura, S. Nagatoishi, M. Nakakido, S. Soga, H. Shirai, S. Kawabata and K. Tsumoto
Affinity Improvement of a Therapeutic Antibody by Structure-Based Computational Design: Generation of Electrostatic Interactions in the Transition State Stabilizes the Antibody-Antigen Complex.
PLoS One, **9**, e87099, (2014).
DOI: 10.1371/journal.pone.0087099 (査読有り)
- 3) A. Pica, I. Russo Krauss, A. Merlino, S. Nagatoishi, N. Sugimoto and F. Sica
Dissecting the contribution of thrombin exosite I in the recognition of thrombin binding aptamer.
FEBS J., **280**, 6581–6588, (2013).
DOI: 10.1111/febs.12561 (査読有り)
- 4) R. Matsunaga, S. Yanaka, S. Nagatoishi and K. Tsumoto
Hyperthin nanochains composed of self-polymerizing protein shackles.
Nat. Commun., **4**, 2211, (2013).
DOI: 10.1038/ncomms3211 (査読有り)
- 5) S. Nagatoishi and N. Sugimoto
Interaction of water with G-quadruplex loop contributes to the binding energy of G-quadruplex to protein
Mol. BioSyst., **8**, 2766–2770, (2012).
DOI: 10.1039/C2MB25234A (査読有り)
- 6) S. Saxena, S. Nagatoishi, D. Miyoshi and N. Sugimoto
Structural and functional characterization of RecG helicase under dilute and molecular crowding conditions
J. Nucleic acids, **2012**, 392039, (2012).
DOI: 10.1155/2012/392039 (査読有り)

[学会発表](計 8 件)

[国際学会](ポスター発表)

- 1) Satoru Nagatoishi, Yumiko Tanabe, Kouhei Tsumoto

- Physicochemical studies of YB-1 functions and structures
Biophysical Society 58th Annual Meeting, Moscone Center (San Francisco, CA), Feb. 18, 2014
- 2) Irene Russo Krauss, Andrea Pica, Antonello Merlino, Satoru Nagatoishi, Naoki Sugimoto, Lelio Mazzarella and Filomena Sica
Effects of a thymine residue deletion in TT loops on thrombin- TBA recognition interactions: a crystallographic study
CONFORMATIONAL DIVERSITY AND APPLICATIONS OF G-QUADRUPLEXES, Spain, Oct 6-8, 2012.
- 3) Satoru Nagatoishi, Naoki Sugimoto
Thermodynamics and hydration effects on the interaction between DNA G-quadruplex and thrombin
The Second Asian Chemical Biology Conference, ACBC2012 Okinawa, July 4-6, 2012
- [国内学会] (口頭発表)
- 4) 長門石 暁・津本 浩平
生命分子相互作用解析: ITC と SPR
日本薬学会第 134 年会
くまもと県民交流会館パレアホール(熊本県熊本市), 2014, 3/30
- 5) 長門石 暁・津本 浩平
分子間相互作用をミクロに捕らえる 表面プラズモン共鳴法と熱測定を活用
第 17 回コロイド・界面フォーラム
KKR 江の島ニュー向洋(神奈川県藤沢市), 2013, 7/18
- 6) 長門石 暁・田邊 裕美子・西方 敬人・杉本 直己・津本 浩平
天然変性型蛋白質の機能制御へ向けた核酸結合蛋白質 YB-1 の物理化学的解析
第 7 回バイオ関連化学シンポジウム
名古屋大学東山キャンパス(愛知県名古屋市), 2013, 9/28
- [国内学会] (ポスター発表)
- 7) 田邊裕美子・長門石 暁、西方敬人、杉本直己、津本 浩平
癌関連蛋白質 Y-box binding protein 1 の物理化学的手法を用いた機能解析
第 13 回 日本蛋白質科学会年会
とりぎん文化会館(鳥取市), 2013, 6/12
- 8) 田邊裕美子・長門石 暁・西方敬人・杉本直己・津本浩平
Y-box binding protein 1(YB-1)の物性と DNA 結合メカニズムの解析
日本化学会第 93 春季年会
立命館大学びわこ・くさつキャンパス(草

津市)2013, 3/22

[図書](計 1 件)

- 1) 長門石 暁・津本 浩平
「等温滴定型カロリメトリー」
ぶんせき (日本分析化学会)(2012 年 11 号)

[産業財産権]

該当なし

[その他]

ホームページ等

<http://park.itc.u-tokyo.ac.jp/phys-biochem/>

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

長門石 暁 (NAGATOISHI SATORU)
東京大学・大学院工学系研究科・助教
研究者番号: 30550248

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし

