

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24780092

研究課題名(和文)リン酸化タンパク質の構造と機能の変化の可視化

研究課題名(英文)Visualization of structure and function change of phosphorylated protein.

研究代表者

日高 将文(Hidaka, Masafumi)

東北大学・(連合)農学研究科(研究院)・助教

研究者番号：00584848

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：タンパク質はリン酸化されることで構造が変化し、それによって機能が変化するとされているが、構造と機能変化の関連性は未だ不明な点が多い。構造変化と機能変化の相関を解明することは、リン酸化に関わる癌などを含む多くの疾患発症のメカニズム解明につながると期待される。本研究は、リン酸化タンパク質の構造変化を可視化する手法として、リン酸化タンパク質に特異的に結合するタンパク質・Pin1を用いた、リン酸化タンパク質構造変化検出するセンサータンパク質の開発を試みた。解析の結果、このセンサータンパク質は、ある特定のリン酸化配列によるPin1の構造変化を検出することが可能であることを示すことができた。

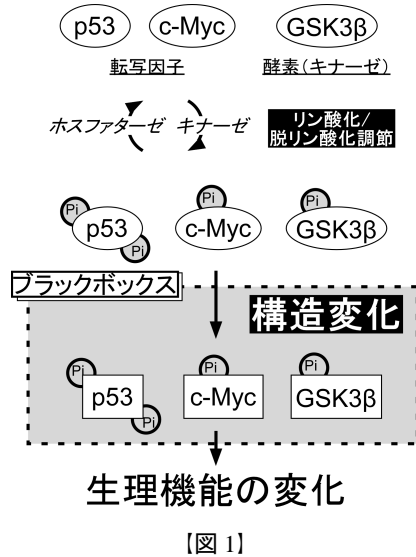
研究成果の概要(英文)：Proteins are altered their structure by phosphorylation, and their functions are changed. Thus, the phosphorylation is key mechanism that involved in regulation of physiological functions. However, relationships between structural-switch and functional-switch by phosphorylation are still unclear. Elucidations of these relationships are expected to facilitate to elucidate mechanisms of phosphorylation-related diseases including cancer. We employed the structural switch of Pin1, that binds to phosphorylated proteins, to develop a novel detection system of phosphorylation-induced structural switch. Characterizations of the Pin1-derived sensor protein indicated that this sensor protein can detect structural switch of Pin1 induced by phosphorylated sequence.

研究分野：タンパク質工学

キーワード：タンパク質工学

1. 研究開始当初の背景

タンパク質の『リン酸化』による『機能変化』について、一般的にはリン酸化によってタンパク質が『構造変化』し、その結果として機能が変化すると説明される。しかし、具体的にどのような構造変化が起こり機能変化へと至るのか、という点はブラックボックスとなっている【図1】。

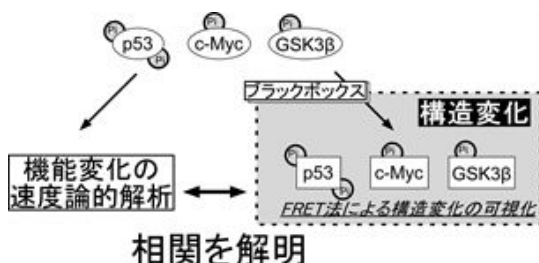


タンパク質の立体構造を解明することは可能となったが、構造の変化を捉えることは難しく、構造生物学の課題とされる。生理現象の調節を担うタンパク質の『リン酸化』においても、

- 1.リン酸化した時点からどのように構造が変化するのか
 - 2.どのような構造変化がタンパク質の機能を変化させているのか
- という点は未解明である。

これらの疑問に対する研究アプローチとして、リン酸化タンパク質に特異的に作用する酵素『Pin1』を用い、リン酸化を引き金とするタンパク質の『機能変化』と『構造変化』をリアルタイムに観測するシステムを構築し、構造変化の可視化によるリン酸化調節機構の解明を目指す。

2. 研究の目的



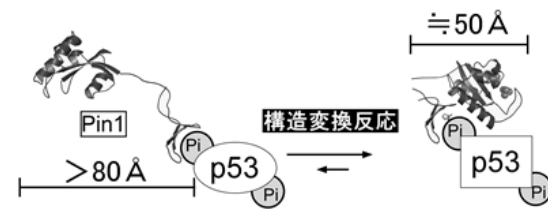
リン酸化タンパク質に対して、Pin1 を利用して

- 構造変化 FRET 法による測定
 - 機能変化 速度論的解析
- というアプローチで研究を実施する。
本研究は、リン酸化による『構造変化』と『機能変化』のブラックボックスを解明し、リン酸化による生理活性調節機構の新知見の獲得を目指す。

- タンパク質のダイナミックなコンフォメーションの変化については、既存の方法では観測が困難である。タンパク質の立体構造が判明しても、生物体内で起きている反応の素過程は未解明であり、静的な立体構造からより動的なタンパク質の挙動を測定することが求められつつある。本研究は、リン酸化という生物の根幹をなす生理現象を対象とし、構造生物学の課題とされている『細胞内における動的な構造機能変化』を直接的に観測する独創性がある。

- Pin1 は癌抑制タンパク質 p53、iPS 細胞作製にも用いられる c-Myc タンパク質などに結合し、機能の発現・制御、タンパク質の安定化・分解促進など多様な機能を示す。そのため、Pin1 は薬剤の対象タンパク質として注目されており、Pin1 の立体構造に基づいた薬剤分子設計に世界中の研究機関・製薬会社が鎬を削っている。本研究の成果として、Pin1 の細胞中における機能を可視化することが可能となり、Pin1 の作用機序の解明、新たな基盤からの薬剤の探索・開発に大きく貢献することが見込まれる。

3. 研究の方法



Pin1 はリン酸化タンパク質と強固な複合体を形成 (K_d 10 μ M) し、触媒反応の前後で構造が約 40% 変化する[1]。

Pin1 の構造変化 リン酸化タンパク質の構造変化と捉える事が可能である。
タンパク質の立体構造変化を可視化する方法として FRET (Fluorescence resonance energy transfer) 法がある。Ca²⁺や ATP の濃度依存的に構造変化するタンパク質をセンサーとして、細胞内における各分子の濃度変化をリアルタイムに測定することが可能となっている[1]。このような技術背景から、Pin1 の立体構造変化を FRET 法で可視化することができ

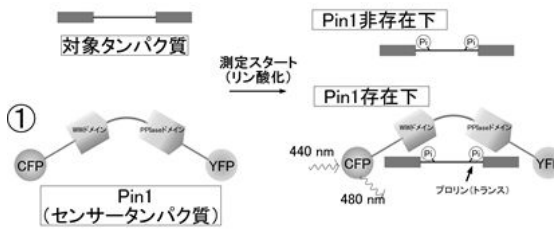
れば、細胞中のリン酸化タンパク質の状態変化もリアルタイムに捉える事が出来るのではないか、という発想に至った。

[1] Jacobs DM et al., J. Biol. Chem., 278, 26174-26182 (2003)

[2] Imamura H et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 106, 15651-15656 (2009)

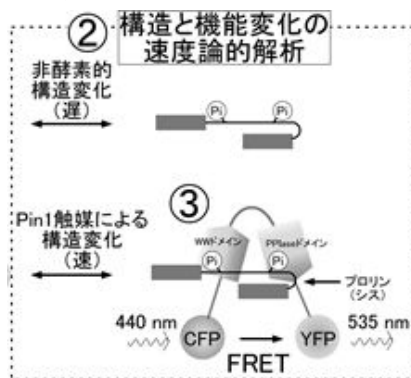
4. 研究成果

Pin1 の構造は WW ドメインと PPIase ドメインから成っており、2つのドメインは触媒反応時にドメイン同士が接触しコンパクトな構造をとる。この Pin1 構造の変化を利用して、リン酸化タンパク質の構造変化を検出する FRET 測定系の開発を試みた。



WW ドメインの N 末端側に Cyan Fluorescent Protein (CFP)、PPIase ドメインの C 末端側に Yellow Fluorescent Protein (YFP) を付加する。このタンパク質に対し 440 nm の光を照射すると、

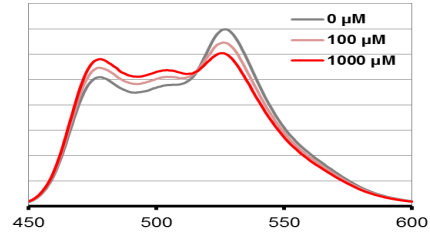
- 構造が未変化の場合：CFP の励起光である 480 nm
- 構造変化した場合：FRET により 535 nm が検出され、その蛍光強度比により標的タンパク質の立体構造を見積もることが可能となる。



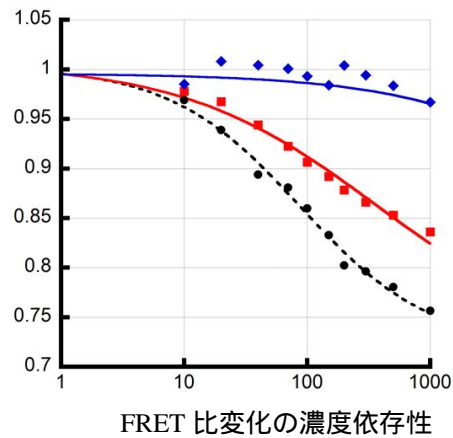
センサータンパク質の評価は、リン酸化ペプチド、非リン酸化ペプチドに対する Binding Assay を行い、FRET 比の変化を測定した。

初期のセンサータンパク質の FRET 比は 1 mM 以上のリン酸化ペプチド特異的に変化した。この程度の感度では、リン酸化タンパク質の構造変化を検出するには不十分である。

そこで、FRET を用いたセンサータンパク質の改良法として広く用いられる、恵子タンパク質のセンサータンパク質間のリンカー配列の検討、蛍光タンパク質の種類の検討を行った。高効率化を検討した結果、最終的にリン酸化ペプチドに対し、 $K_d = 100 \mu\text{M}$ を示す高感度センサーの開発に成功した。



リン酸化ペプチド添加によるスペクトル変化



センサータンパク質の性状を解析するため、様々なペプチドによる滴定を試みた。それぞれ Pin1 と作用するタンパク質のリン酸化部位をミミックした配列を有するペプチドである。親和性は、リン酸化部位の数によって異なり、リン酸化部位を 2 か所持つペプチドに対する特異性が最も高かった。これまで、リン酸化タンパク質と Pin1 の相互作用について、リン酸化タンパク質側の配列に対する特異性は全く不明であったが、本研究のセンサータンパク質を用いることで、Pin1 の作用部位にはアミノ酸配列に対する特異性があることが示唆された。

本研究で開発した Pin1 の構造変化検出技術は、リン酸化タンパク質の検出技術としても有望であるのみならず、新たな着眼点に基づく Pin1 の研究ツールとなると考えている。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 4 件)

岡部恵美子、日高將文、内田隆史

Improvement of FRET based indicator for structural change of Pin1

日本分子生物学会、2014 年 11 月 25~27 日、
パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

岡部恵美子、日高將文、内田隆史

FRET 法を用いた Pin1 構造変化の可視化

日本農芸化学会、2014 年 3 月 27~30 日、明治
大学 (神奈川県川崎市)

岡部恵美子、日高將文、内田隆史

Visualization of Pin1 binding with c-Myc peptide
by FRET-based indicators.

日本農芸化学会、2013 年 3 月 24~28 日、東北
大学 (宮城県仙台市)

岡部恵美子、日高將文、内田隆史

Visualization of Pin-phosphopeptide association
with FRET-based indicators.

日本分子生物学会、2012 年 12 月 11~14 日、
マリンメッセ福岡

〔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) 研究代表者

日高 將文 (HIDAKA, Masafumi)

東北大学・農学研究科・助教

研究者番号: 00584848