

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 6 日現在

機関番号：24403

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26440035

研究課題名(和文) MAPキナーゼ活性制御機構の構造基盤

研究課題名(英文) Structural basis for the regulation mechanism of MAP kinase activity

研究代表者

多田 俊治 (Tada, Toshiji)

大阪府立大学・理学(系)研究科(研究院)・客員研究員

研究者番号：70275288

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：蛋白質キナーゼには多数のリン酸化部位があり、リン酸化状態の相違により異なった機能を示す。本研究では、MAPキナーゼであるMEK1の機能発現について立体構造を通して解明することを目指し、非リン酸化体、活性変異体、活性抑制変異体の構造を新たに決定した。回折X線測定は大型放射光施設SPring-8にて行った。その結果、活性発現に重要なDFG-motifの構造に2価陽イオンが関与していること、活性化ループ構造のゆらぎの増加が活性化に必要であること、S212のリン酸化が活性発現を抑制する要因はATPとの結合阻害であることなどの知見を得た。これらの知見は新たな分子標的抗ガン剤の創製に有用である。

研究成果の概要(英文)：A protein kinase activity is regulated by phosphorylation in several amino acids. The aim of this work is to elucidate the molecular mechanism of MEK1 by analyzing its crystal structures of non-phosphorylated body, active mutant, S212-inactive mutant. Diffraction data sets were collected at the BL38B1 station of SPring-8. The knowledge obtained from these structures are as follows: divalent cation responsible for the conformation of DFG-motif, the increment of flexibility of active segment leads a change to active conformation, and phosphorylation of S212 disturbs the binding of ATP.

研究分野：構造生物学

キーワード：タンパク質結晶学 MAPキナーゼ MEK 活性制御機構

## 1. 研究開始当初の背景

(1) MAPK カスケードは、酵母から高等植物や哺乳動物に至るまで高度に保存された細胞内シグナル伝達経路であり、細胞増殖、分化、アポトーシス、免疫応答など細胞にとって重要な機能を担っている。ヒトを代表とする哺乳類細胞には複数のカスケードが見出されており、その一つに ERK 経路がある。ERK 経路のシグナル伝達は、低分子 GTP 結合蛋白質である Ras が活性化されることにより開始され、以下、主に Ras Raf(MAP3K) MEK(MAP2K) ERK(MAPK)といった一連のキナーゼの連続したリン酸化反応により進行して行く。複数のキナーゼがリン酸化に関与することが多い中で、興味深いことに、ERK を活性化する上流キナーゼとしては MEK 以外には知られていない。したがって、MEK は ERK 経路の鍵酵素と言え、特に ERK 経路の制御の観点から興味深いキナーゼであるが、その構造生物学的研究は進んでいない。

(2) これまで、MEK、特に MEK1 については様々な阻害剤との複合体を含め 40 件近い構造が報告されている。しかし、どれも非リン酸化体であり、しかも一定のコンフォメーションしか取っていない。MEK には活性制御に関わるリン酸化部位が 6 箇所も見出されているにも関わらず、リン酸化と構造変化に関する研究報告は未だ無い。

(3) 蛋白質キナーゼの活性の亢進は、ガンや糖尿病を含む様々な疾患を誘発していることが知られており、キナーゼの選択的阻害剤の構造基盤創薬研究(Structure-Based Drug Design: SBDD)が盛んに試みられている。しかし、キナーゼの構造に関する基本的な理解が進んでいないことから、構造に基づく論理的な分子設計も進まず、阻害剤の分類にも混乱が見られているように思われる。

## 2. 研究の目的

(1) 他の蛋白質キナーゼと同様に MEK1 はコンフォメーション変化の大きいループと呼ばれる不規則領域を持っており、それが酵素活性に関与した分子スイッチの役割を担っていると考えられている。本研究課題は、MEK1 の 2 箇所の不規則領域、活性化ループと呼ばれ分子スイッチ機能を持ち、ここに活性化に関わるリン酸化部位である S218/S222 や活性抑制に関わる S212 がある D208~Y240、および活性抑制や自己活性化に関与するリン酸化部位 T286/T292/S298 がある G276~P307、の示すコンフォメーション変化と酵素機能の相関を明らかにすることを目的とした。

(2) MEK1 各種リン酸化体の大腸菌を用いた調製は困難であると予測される。そこで、

リン酸化部位の Ser あるいは Thr を Asp に変異した疑似リン酸化体を調製し、それらの X 線回折法による構造決定、および酵素機能の指標として表面プラズモン共鳴法により ATP 類縁体や基質ペプチドとの会合能の評価を目指した。

## 3. 研究の方法

(1) 目的蛋白質の発現、精製、結晶化  
結晶化を容易にするために N 末端から 38 残基を切断し C 末端に His $\times$ 6 タグを付加したヒト型 MEK1 38 および各種変異体の大腸菌 BL21(DE3) による発現系を構築し、各種クロマトグラフィーによる精製法を確立した。結晶化条件の探索は市販の結晶化スクリーニングキットを用いて行った。結晶化の探索はアポ体の他、ATP 類縁化合物や阻害剤との複合体について行った。何れも沈殿剤として PEG3350 を用いることにより結晶化が達成された。蛋白質ドロップの初期条件や温度などにつき最適条件を探索し、高品質なデータを与える結晶の調製を行った。

## (2) 回折 X 線測定、構造決定

回折 X 線測定は、高品質で高分解能なデータ収集が可能な大型放射光施設 SPring-8 にて行った。その際、最近開発された結晶マウント法である HAG 法(ポリマーコーティングと湿度調節を組み合わせた方法)を適用し、結晶の損傷を極力抑えることを試みた。ヒト型 MEK1 38 の非リン酸化体の新規構造、疑似活性変異体 (S218D/S222D)、疑似活性抑制体 (D212D/S218D/S222D) につき、それぞれ 2.2 , 2.5 , 3.2 の分解能でのデータを収集した。初期位相は分子置換法により求め、その後、構造の構築および精密化を繰返し、構造を決定した。

## (3) 各種リガンドの結合能の評価

ATP 類縁体や基質ペプチドとの解離定数  $K_D$  を BIACORE200 を用いた表面プラズモン共鳴 (SPR) の測定により求めた。

## 4. 研究成果

### (1) 非リン酸化体の新規構造の決定

Mg<sup>2+</sup> 非存在下での非リン酸化体 MEK1 と ATP- $\gamma$ S との複合体の構造を決定した ( $\mathcal{C}222_1$ ,  $a=47.9$ ,  $b=96.4$ ,  $c=138.8$  ,  $R=0.198$ )。本結晶構造で見出された活性化ループのコンフォメーションは、これまでに報告されたものとは大きく異なり、溶媒側に大きく張り出していた。さらに、活性に関与する  $\alpha$ C-helix および DFG-motif は共に out 構造をとっており、特に DFG-out 構造は MEK1 では初めての報告となった。賦活残基である S218 は新たに E114 と水素結合を形成しており、本構造では S218 はリン酸化され難いと考えられた。これまで報告された構造と併せて、MEK1 は 3 種類の構造が平衡状態で存在しているというモデルを提唱した。

このモデルでは、不活性体 A(DFG-out, C-out), 不活性体 B(DFG-in, C-out), 活性体(DFG-in, C-in)の3構造が平衡に存在しており,  $Mg^{2+}$ イオンやATP, さらには基質(ERK)との結合によりAからBを経て活性体のCに構造変化すると考えるものである。さらに,  $Mg^{2+}$ イオンを介さないATP- $\gamma$ Sの結合様式は新規なものであり, 本構造に基づいた新たな阻害剤の分子設計に興味深い知見を与えた。また, これまでに  $Mg^{2+}$ イオン非存在下ではATP- $\gamma$ SはMEK1に結合しないと報告されていたが, 我々のSPRによる評価では, 解離定数は5.8  $\mu$ Mとなり, 十分な結合能を持つことが示された。

#### (2)疑似活性変異体の構造決定

疑似活性変異体 MEK1 38(S218D/S222D)の構造を決定した( $R^2_1$ ,  $a=91.2$ ,  $b=132.2$ ,  $c=132.8$ ,  $R=0.239$ )。本結晶の非対称単位内にMEK1が4分子(A, B, C, Dとして識別)存在していた。いずれもAMP-PNPがATP結合部位に結合していたが, AとB分子には $Mg^{2+}$ イオンが結合していたのに対してC, D分子には $Mg^{2+}$ イオンは見出されなかった。この相違に対応するように, A分子(B分子も同一のコンフォメーション)とC分子(D分子も同一のコンフォメーション)のコンフォメーションには幾つかの相違が見出された。特に興味深いのは, 先の構造結果と同様に,  $Mg^{2+}$ イオンが結合していない分子ではDFG-out構造を,  $Mg^{2+}$ イオンの存在する分子ではDFG-in構造を取っていたことである。これらの結果は,  $Mg^{2+}$ イオンがDFG-motifのコンフォメーションに重要な役割を担っていることを強く示唆している。ただし, 本MEK1は活性を持つものであり, それにも関わらず $Mg^{2+}$ イオン非結合構造が見出された要因は不明である。一方, DFG-in構造をもつ分子においては活性化ループの構造の電子密度が不明確になっており, ループ構造の柔軟性が増加したように考えられた。この構造変化は, 基質キナーゼ(ERK)との結合を有利にする効果を生み出し, さらに基質結合によって $\alpha$ C-helixのin構造が安定化する, という活性化機構が存在することを示唆しているものと考えられ, 先の我々のモデルを支持するものである。

#### (3)疑似活性抑制変異体の構造決定

疑似活性抑制変異体 MEK1 38(S212D/S218D/S222D)の構造を決定した( $R^2_1$ ,  $a=60.1$ ,  $b=129.9$ ,  $c=89.8$ ,  $b=101.0^\circ$ ,  $R=0.212$ )。なお, S212のリン酸化は下流のERKからの活性抑制機能によるものであり, その際, MEKの活性化残基はリン酸化されていても良いと考えられている。本結晶では, 同一のコンフォメーションを有する4分子のMEK1が非対称単位内に存在し, それぞれ活性化ループを主な界面としたホモダイマーを形成していた。ただし, ダイマー間の接触面積は大き

くはなく, 結晶構造固有のものであると考えられた。このことは, 本変異体の精製時に用いたゲルろ過クロマトグラフィーからも支持される。ATP結合部位にはADPの存在が見出された。これまでに報告されたDFG-in,  $\alpha$ C-out構造をもつMEK1では $Mg^{2+}$ イオンを介してADPがATP結合部位に入り込んでいたが, 本構造では $Mg^{2+}$ イオンの存在無しで $Mg^{2+}$ イオンを介することなくADPが奥深くに入り込んでいた。S212をDに変異させた本構造でのD212は従来のS212の位置とは大きく異なっていた。それより先の電子密度が不明瞭であり活性化ループのコンフォメーションを決定することが出来なかったが, D212の位置の相違は活性化ループが大きくコンフォメーションを変えていることを示唆しているものであり, その結果, S212のリン酸化はATPの結合を不利にし, 下流キナーゼのリン酸化反応が抑制されるものと考えられた。

#### 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2件)

蒲池沙織, 平林佳, 田茂井政宏, 重岡成, 多田俊治, 和田啓, 「The Crystal structure of isoniazid-bound KatG catalaseperoxidase from *Synechococcus elongates* PCC7942」The FEBS Journal, 査読有り, Vol. 282, No. 1, 2015, pp. 54-64, <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/febs.13102/full>

蒲池沙織, 平林佳, 田茂井政宏, 重岡成, 多田俊治, 和田啓, 「Crystal structure of the catalaseperoxidase KatG W78F mutant from *Synechococcus elongates* PCC7942 in complex with the antitubercular pro-drug isoniazid」FEBS Letters, 査読有り, Vol. 589, No. 1, 2015, pp. 131-137, <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014579314008539>

##### [学会発表](計4件)

中江撰, 白井剛, 桐井康行, 多田俊治, 「疑似リン酸化によるMEK1の構造変化」平成27年度日本結晶学会年会, 2015年10月17日~18日, 堺。

中江撰, 徳弘桃子, 道幸勝也, 桐井康行, 白井剛, 多田俊治, 「MEK1活性抑制体のX線結晶構造解析」平成26年度日本結晶学会年会, 2014年11月1日~3日, 東京。

道幸勝也, 中江撰, 白井剛, 桐井康行, 多田俊治, 「MEK1疑似活性体のX線結晶構造解析」平成26年度日本結晶学会年会, 2014年11月1日~3日, 東京。

中江 撰，藤原大佑，道幸勝也，白井剛，  
多田俊治，「DFG-out コンフォメーションを  
持つ MEK1 構造」第 52 回日本生物物理学会  
年会，2014 年 9 月 25 日～27 日，札幌。

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

多田 俊治 (TADA TOSHIJI)  
大阪府立大学・理学系研究科・  
客員研究員  
研究者番号：70275288

### (2) 連携研究者

中江 撰 (NAKAE SETSU)  
長浜バイオ大学・コンピュータバイオサイ  
エンス学科・助手  
研究者番号：10749352