

研究題目 がん関連キナーゼを制御不能とするアダプター蛋白質の機能解明

研究組織

研究代表者：尾瀬 農之（北海道大学大学院教育担当）

共同研究者：齋尾 智英（徳島大学先端酵素学研究所）

研究分担者：武井 梓穂（北海道大学大学院生命科学院）

【1】研究の概要

[1-1]本研究の目的・概要

JAK-STAT 経路をはじめとするシグナル伝達経路は、細胞の分化・発達・増殖を調節し、生体の恒常性を維持する。真核生物においてリン酸化は生存に不可欠な翻訳後修飾であり、細胞内シグナルの変更・増幅をもたらす。このリン酸化を担う酵素がキナーゼであり、シグナル伝達分子を活性化する。キナーゼの活性化制御機構破綻は異常なシグナル伝達をもたらし、がんや免疫疾患の直接的な原因となるため、キナーゼの活性化制御機構への理解が求められている。従来はキナーゼの変異や過剰発現など単独の機能に対する研究が進められてきたが、実際の細胞内でキナーゼはアダプター蛋白質と呼ばれるハブ分子と相互作用することがあり、活性制御が達成されていることが報告されている。アダプター蛋白質による活性制御はキナーゼの基質選択性や酵素活性出力の変更をもたらす疾患との関連性が深いと、医学的・創薬的観点においても注目されている。しかし、キナーゼの酵素活性に対するアダプター蛋白質の作用機序に関する知見は限られており、分子レベルでのメカニズムは不明である。

本研究では、キナーゼおよびアダプター蛋白質を組換え蛋白質として調整し、酵素活性解析、相互作用解析、生化学解析を通して、アダプター蛋白質によるキナーゼの活性制御機構のメカニズムを明らかにすることを目指した。具体的には、乳がん細胞にて特異的発現が認められているチロシンキナーゼとその機能を著しく高めることが報告されているアダプター蛋白質を使用し、機能解析に取り組んだ。

[1-2]研究の方法・経過

現在までに、キナーゼとアダプター蛋白質の全長組換え蛋白質を発現・精製可能な系の構築に成功し、試験管内(溶液中)アッセイ系にてキナーゼの酵素活性亢進を観測した。また、蛋白質間相互作用解析(表面プラズモン共鳴法)の結果、両者の直接相互作用を観測することができている。しかしキナーゼ/アダプター蛋白質複合体を単離するには至っておらず、複合体形成時に多数の分子の集合が示唆された。つまり、アダプター蛋白質存在下でキナーゼの酵素活性が亢進するイベント中で、蛋白質四次元構造を超える分子集合体が形成されている可能性がある。

そこで本共同研究では共焦点顕微鏡を用いてキナーゼ/アダプター蛋白質複合体の振る舞いの特徴づけることを第一の目的とした。次に集合の責任領域特定を第二の目的とし、アダプター蛋白質のドメイン体の作製を行なった。一次配列の特徴から、特定の二次構造を形成しない天然変性領域(IDR)と予想される領域に関して IDR の性状評価のため、NMR 測定および多角度光散乱測定を実施した。

【2】研究成果

[2-1]本共同研究で明らかになった研究成果

キナーゼ/アダプター蛋白質複合体の顕微鏡観察を実施したところ、複合体粒子の観察に成功した。この粒子は酵素反応に伴い観測できるが、未反応時は観測できなかったため、粒子形成にはキナーゼの活性が重要である。複合体粒子の流動性を光褪色後蛍光回復法 (FRAP 法)にて評価を試みたところ蛍光の回復が極めて遅

い様子が観測された。従ってキナーゼ/アダプター蛋白質複合体が形成する粒子は流動性が高くないことが示唆された。

集合責任領域の特定を目指し、アダプター蛋白質のドメイン体コンストラクトの作製を行なった。発現コンストラクトの検討やタグの検討などにより、十分量(数十ミリグラム)の蛋白質を調整することに成功した。この蛋白質を使用して性状評価を行なった。1次元 NMR スペクトルを取得したところ、規則的な水素結合、つまり特定の2次構造形成時に得られるスペクトルを観測することができなかった。この特徴は IDR 蛋白質の特徴である。また多角度光散乱測定(MALS)による絶対分子量解析の結果、ドメイン体は溶液中にてその多くが単量体として存在することを明らかとした(図 1)。一方、サイズ排除クロマトグラフィーによる溶出位置から求められる分子量は二量体相当であった。従ってドメイン体は慣性半径が球形蛋白質に比べて大きく、IDR 領域が多く存在することが示唆された。

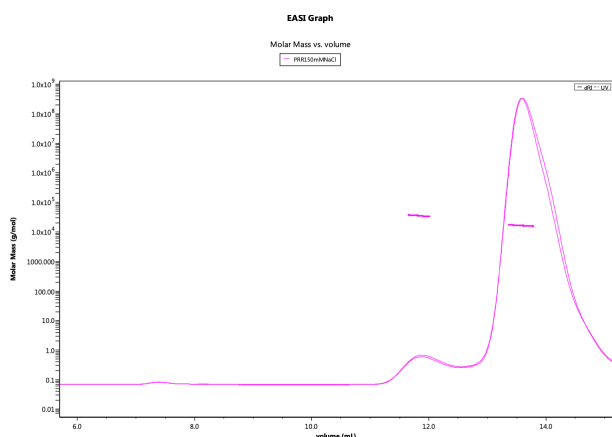


図 1: SEC-MALS による絶対分子量算出の結果。

[2-2]本共同研究による波及効果及び今後の発展性

本共同研究では、キナーゼとアダプター蛋白質の集合と活性の関係性を明らかにするため、顕微鏡による粒子観察や蛋白質の性状評価に取り組んできた。

本年の成果として、キナーゼ/アダプター蛋白質の全長コンストラクトについて、顕微鏡観察が粒子の評価方法として適切であることを明らかにすることができた。ドメイン体については、一次配列から予想された構造的特徴(IDR を

多く持つ)を実験から証明することができた。生体高分子が集合・濃縮し、微小環境を形成する液液相分離現象において、蛋白質 IDR 領域の関与は多く報告されている。本研究において IDR の重要性を精査することで、キナーゼ/アダプター蛋白質集合現象のさらなる理解につながると期待される。

【3】主な発表論文等

[3-1]論文発表

なし。

[3-2]学会発表

○武井梓穂、宇賀神魁、川越聡一郎、齋尾智英、松田正、前仲勝実、姚閔、尾瀬農之;“乳がん特異的キナーゼとアダプター蛋白質が形成する分子集合と酵素活性の相関を検証する” 第 24 回日本蛋白質科学会年会, 札幌, 6 月 11 日, 2024 年

[3-3]成果資料等

なし。

【4】今後の課題等

今後の課題、その他等

キナーゼ/アダプター蛋白質の全長コンストラクトについては、buffer 条件や基質濃度を検討することで、粒子の振る舞いをさらに特徴づける。酵素活性が粒子形成にもたらす影響を精査するため、活性低下変異体を使用する必要がある。集合の責任領域に関しては、その他のドメイン体を作製する必要があり、その振る舞いを生化学的に特徴づけることが目標となる。今回特徴づけることに成功した IDR 領域に関しては、安定同位体標識した蛋白質試料を作製し、NMR 測定を行うことで、残基レベルの情報情報取得を見込んでいる予定している。