

細胞情報伝達系に関する蛋白質の構造生物学

Structural Biology of Proteins Involved in Cellular Signal Transduction

(研究プロジェクト番号 : JSPS-RFTF 96L00501)



プロジェクトリーダー

田中 俊之 筑波大学応用生物化学系・助教授

1. 研究目的

本研究プロジェクトでは、主に核磁気共鳴 (NMR)法を駆使して、カルシウム情報伝達、His-Asp リン酸リレー情報伝達あるいは転写調節といった細胞情報伝達系に関する蛋白質の高次構造を三次元的に解明し、その情報伝達機構の詳細に迫ることを目的とする。

2. 研究成果概要

2.1 カルシウム情報伝達に関する蛋白質：リカバリン

リカバリン (202 残基) は、網膜の光情報伝達系のカルシウムセンサーであり、N 末端に共有結合している脂肪酸 (主にミリストイル酸) を利用して、カルシウム依存的に細胞膜と相互作用する。我々は、この機構を解明するために、リカバリンのカルシウム非結合型及び結合型の二種類の三次元溶液構造を決定した (図 1)。

リカバリンは、主に ヘリックスから構成され、EF ハンド (1 個のカルシウムを結合することが可能な構造モチーフ) が 4 つ存在する。EF-1 と EF-2 が N 末端ドメインを、そして EF-3 と EF-4 が C 末端ドメインを形成するが、ドメイン間のインターフェースを形作る EF-2 と EF-3 だけがカルシウムを結合出来る。カルシウム非存在下では、ミリストイル基は N 末端ドメインにある深い疎水性ポケットに格納され、ほんの一部しか蛋白質表面に出していない。一方、カルシウム結合状態では、ミリストイル基は蛋白質表面に露出しており、細胞膜と相互作用出来る。両者の構造では、N 末端ドメインと C 末端ドメインの相対配置が大きく異なり、約 45° 回転している。EF-2 と EF-3 にだけカルシウムが結合することによって生じたこのようなドメイン間のねじれが、ミリストイル基露出の引き金と考えられる。

2.2 His-Asp リン酸リレー情報伝達に関する蛋白質：EnvZ

大腸菌の細胞膜にあるセンサー蛋白質 EnvZ (450 残基) は、周囲の浸透圧変化を感知して His243 を自己リン酸化し、更にレギュレーター蛋白質 OmpR の Asp55 へリン酸を転移することで、細胞の外から内へ情報を伝達する。我々は、このシステムの解明をめざし、

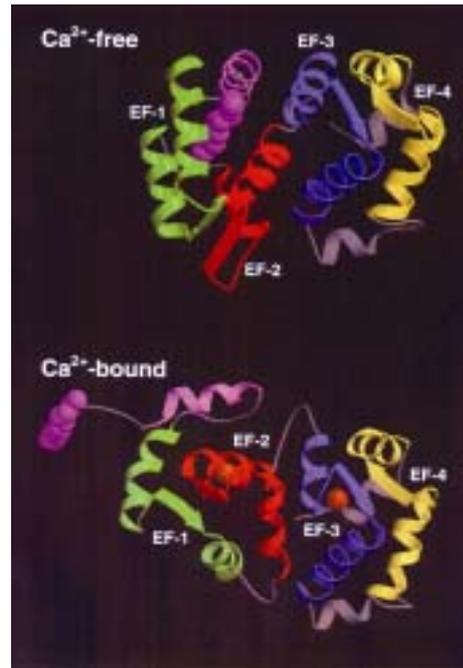


図 1 : カルシウム非存在下のリカバリン (上) とカルシウムイオンを 2 個結合したリカバリン (下) の構造 EF-1、EF-2、EF-3、EF-4、ミリストイル基及びカルシウムは、それぞれ緑、赤、青、黄、紫及びオレンジで示す。

細胞質内の自己リン酸化領域 (223-289、ドメイン A) とヒスチジンキナーゼ領域 (290-450、ドメイン B) の三次元溶液構造を決定した (図 2)。

ドメイン A は、ヘリックス-ループ-ヘリックス構造からなり、対称な二量体を形成して存在する。内側には疎水性残基が配向し、これらの間の相互作用により構造が安定化されている。1 の中央に存在する His243 は蛋白質表面に露出し、自己リン酸化にとって有利な配置を取っている。また、His243 付近の蛋白質表面には、Asp244、Asp273 及び Glu277 からなる酸性残基のパッチと、疎水性残基からなるベルトが存在する。これらは、二量体の形成により生成する蛋白質表面上にある。したがって、二量化は、安定した構造を作り出す疎水性コアの形成だけではなく、他分子の認識に関する領域を蛋白質表面に提示する役割も果たしていると考えられる。

活性中心であるドメイン B は、5つの ス
 トランドで形成される シートの層が、3つ
 の ヘリックスによる層で裏打ちされた /
 サンドイッチ構造からなる。ATP アナログ
 の AMP-PNP は、リン酸基を蛋白質表面に向
 け、3 の脇に結合している。ヒスチジンキ
 ナーゼファミリーに保存されている残基
 (Asn347 や Phe387) は、アデニン環の近く
 に存在し、活性に重要な役割を果たしている
 と考えられる。

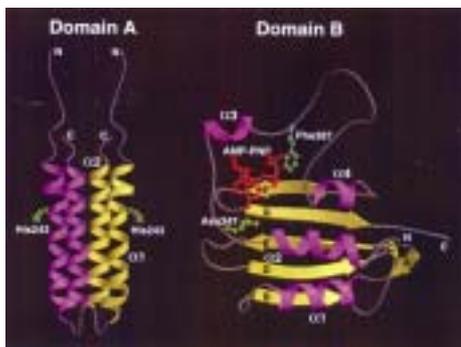


図 2 : EnvZ の構造

2.3 転写調節に関与する蛋白質 : MafG

Maf 群蛋白質は、塩基性ロイシンジッパー
 (b-ZIP) を持つ DNA 結合蛋白質であるが、
 固有の DNA 結合配列 (EHR) を b-ZIP の直前
 に持っている。Maf 群蛋白質は、EHR と b-ZIP
 塩基性領域で、13 ~ 14 塩基対のパリンドロミ
 ックな DNA 配列を特異的に認識する。我々
 は、この DNA 結合様式を解明するために、
 DNA 認識結合部位を持つ MafG(1-76) の三次
 元溶液構造を決定した (図 3)。

MafG(1-76) は、3つの ヘリックスを持ち、
 EHR は 1 から 3 の前半を、b-ZIP 塩基性領
 域は 3 の後半とそれ以降を形成している。
 蛋白質表面には、Arg35 (EHR) Lys53、Arg56、
 Arg57 及び Lys60 (以上塩基性領域) から成る
 塩基性パッチが存在する。変異体の DNA 結
 合実験から、1) この塩基性パッチが DNA
 との結合に重要であること、また 2) EHR の
 Val34 と Arg35 が Maf 群蛋白質固有の DNA 認
 識に関与している可能性が高いことが明らか
 になった。

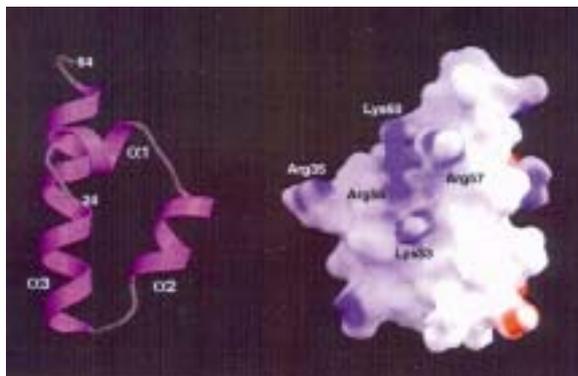


図 3 : MafG(1-76) の構造とその蛋白質表面

3 . 結論

カルシウム情報伝達、His-Asp リン酸リレー
 情報伝達あるいは転写調節に関与する蛋白質
 カルモデュリン、リカバリン、ニューロカル
 シン、EnvZ、MafG の三次元溶液構造を決定
 し、これらの情報伝達蛋白質が機能を発現す
 るメカニズムの理解を深めた。

主な発表論文

- (1) J. B. Ames, R. Ishima, T. Tanaka, J. I. Gordon, L. Stryer and M. Ikura: "Molecular mechanics of calcium-myristoyl switches," *Nature*, 389 (1997) 198-202.
- (2) M. Osawa, M. B. Swindells, J. Tanikawa, T. Tanaka, T. Mase, T. Furuya and M. Ikura: "Solution structure of calmodulin-W-7 complex: the basis of diversity in molecular recognition," *J. Mol. Biol.*, 276 (1998) 165-176.
- (3) T. Tanaka, S. K. Saha, C. Tomomori, R. Ishima, D. Liu, K. I. Tong, H. Park, R. Dutta, L. Qin, M. B. Swindells, T. Yamazaki, A. M. Ono, M. Kainosho, M. Inouye and M. Ikura: "NMR structure of the histidine kinase domain of the *E. coli* osmosensor EnvZ," *Nature*, 396 (1998) 88-92.
- (4) C. Tomomori, T. Tanaka, R. Dutta, H. Park, S. K. Saha, Y. Zhu, R. Ishima, D. Liu, K. I. Tong, H. Kurokawa, H. Qian, M. Inouye and M. Ikura: "Solution structure of the homodimeric core domain of *Escherichia coli* histidine kinase EnvZ," *Nature Struct. Biol.*, 6 (1999) 729-734.
- (5) H. Kusunoki, H. Motohashi, F. Katsuoka, A. Morohashi, M. Yamamoto and T. Tanaka: "Solution structure of the DNA-binding domain of MafG," *Nature Struct. Biol.*, 9 (2002) 252-256.