

情報伝達タンパク質のリガンド依存的な高次構造変化 - そのシグナル発生過程における意義 -

Structural Change of Signal-transducing Proteins Induced by Ligand Binding - Its Significance in Signal Generation -

(研究プロジェクト番号: JSPS-RFTF 96L00505)

プロジェクトリーダー

堅田 利明 東京大学 大学院薬学系研究科・教授

コアメンバー

佐藤 能雅 東京大学 大学院薬学系研究科・教授

嶋田 一夫 東京大学 大学院薬学系研究科・教授

新井 洋由 東京大学 大学院薬学系研究科・教授



1. 研究の目的

細胞に生理応答を引き起こすホルモンなどは、細胞表面に存在する特異的な受容体蛋白質によって識別され、そのシグナルを細胞内へと伝達している。細胞内での生理応答の発現には、シグナルを受け取った個々の情報変換蛋白質に、高次構造の変化が起こることが必要で、これを引き金として蛋白質の会合・解離、あるいは酵素の活性化などが生じる。本研究プロジェクトでは、細胞のシグナル伝達に関わる種々の GTP 結合蛋白質(翻訳終結と mRNA 動態の制御に関わる新規の G 蛋白質ファミリーなど; 堅田) 各種の酵素及び抗体とその受容体(ジペプチダーゼ、リソソーム酵素群、Fc 受容体など; 佐藤・嶋田)、さらに本グループが同定した G 蛋白質に構造類似の酵素(PAF アセチルヒドロラーゼ; 新井)を対象として、それらの構造と機能に関わる研究を推進した。

2. 研究成果概要

2.1 翻訳終結と mRNA 動態に介在する新しい G 蛋白質ファミリーの構造と機能の解析

真核細胞の翻訳最終段階であるポリペプチド鎖の解離反応には、2 種の解離因子 eRF1 と eRF3 が介在する。eRF1 は、リボソームの A 部位に終止コドンが現われた時にそれを認識して結合するが、この eRF1 をリボソームに運搬する G 蛋白質 eRF3/GSPT を同定した。eRF3/GSPT は、その C 末端側に翻訳伸長因子 EF1 と類似した構造を有し、この領域を介して eRF1 と結合するが、さらに N 末端側にはユニークな別の機能ドメインがあり、この領域は mRNA のポリ A 尾部を覆うポリ A 結合蛋白質と結合して、mRNA を不安定化させた^{1,2)}(図 1)。

eRF3/GSPT と類似の構造をもつ G 蛋白質は他にも存在し、それらは共通に、翻訳過程と共役して mRNA の動態を制御する可能性が示された³⁾(図 2)。

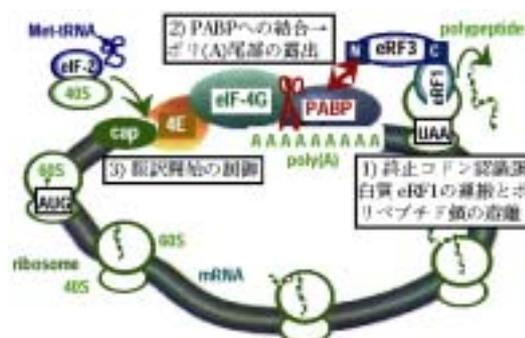


図 1 蛋白質合成において推定される eRF3/GSPT の機能

eRF3/GSPT は、1) その C 末端側領域を介して、終止コドンに結合する eRF1 と結合し、ポリペプチド鎖の遊離反応を仲介するが、2) その一方で、N 末端側領域を介して、3'-poly(A)尾部を覆う PABP と結合し、PABP の多量体化を阻害して mRNA の不安定化へと導く。これらの相互作用は、3) 開始因子複合体の 5'-cap 構造への結合にも影響を与えて、リボソーム 40S サブユニットの雇用を促進し、翻訳開始をも制御する可能性が生まれている。すなわち、翻訳終結は mRNA の寿命と翻訳開始をも制御する機構が推定される。



図 2 G 蛋白質 eRF3/GSPT ファミリーの一次構造上の特徴

- 1) N(アミノ末端)、G(GTP/GDP 結合部位)と C(カルボキシ末端)の 3 つの領域から成る。
- 2) G C 領域は、ポリペプチド鎖伸長因子 EF1 と相溶性が高い。
- 3) N 領域は、各メンバー間で相溶性がない。

2.2 X線による種々の蛋白質の三次元構造解析

X線結晶解析による種々の蛋白質三次元構造の解明研究として、グルタチオン S-トランスフェラーゼと基質類似体との複合体、抗体の抗原結合部位フラグメントの Fab と Fv との抗原リガンドとの複合体⁴⁾、ヒト腎臓ジペプチダーゼの薬物との複合体(図3)、リソソーム病酵素のヒト β -ガラクトシダーゼの基質類似体との複合体の各構造を明らかにし、構造知見の応用に向けて創薬への重要な方法論を構築した。

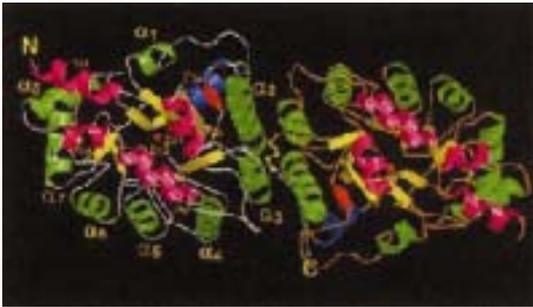


図3 ヒト腎臓ジペプチダーゼの三次元構造

2.3 NMR による免疫グロブリンとその受容体の相互作用の解析

免疫グロブリン G (IgG)の Fc 領域と結合する Fc 受容体は、貪食作用や抗体産生を調節し、アレルギーの発症にも関与する糖蛋白質であるが、Fc 受容体と Fc フラグメントの相互作用を沈降平衡法により解析し、両者の結合モル比が 1 : 1であることを明らかにした。また NMR 解析から、IgG 上における Fc 受容体結合部位は、ヒンジ領域下流とその空間的近傍であることを見出し(図4) さらに Fc 受容体との相互作用に関する調節機構を解明した⁵⁾。

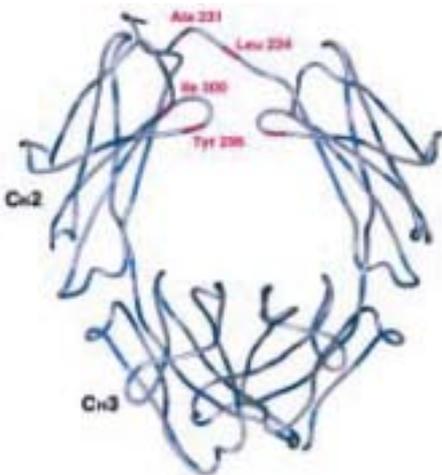


図4 Fc 受容体との結合に伴って化学シフトが変化する免疫グロブリン Fc フラグメント上のアミノ酸残基の分布

2.4 I 型 PAF アセチルヒドロラーゼの構造と機能の解析

血小板活性化因子 PAF を加水分解する酵素として同定された I 型 PAF アセチルヒドロラーゼは、60 %の相同性をもつ 1、2 と、調節サブユニットである の3つのサブユニットよりなるが、サブユニットは脳形態形成期の神経細胞移動異常により生じる Miller-Dieker 症候群の原因遺伝子産物 LIS1 と同一である。この PAF アセチルヒドロラーゼは、3量体 G 蛋白質と類似の構造をもつ酵素であり⁶⁾(図5) 細胞内微小管系の制御を介して、脳の神経細胞移動の他、精巣における精子形成に重要な役割を果たすことを解明した。

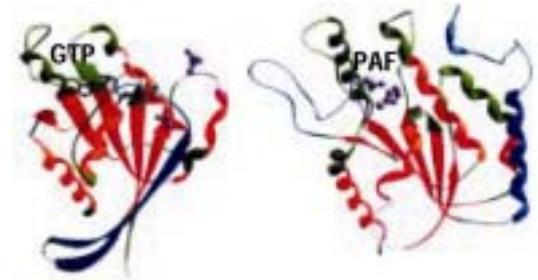


図5 I 型 PAF アセチルヒドロラーゼ 1 サブユニット (右) と p21 Ras (左) の高次構造の比較

3 . 主な発表論文

- 1) S. Hoshino, M. Imai, T. Kobayashi, N. Uchida, & T. Katada: The eukaryotic polypeptide chain releasing factor (eRF3/GSPT) carrying the translation termination signal to the 3'-Poly(A) tail of mRNA: Direct association of erf3/GSPT with polyadenylate-binding protein. *J. Biol. Chem.* **274**: 16677-16680(1999).
- 2) S. Hoshino, N. Hosoda, Y. Araki, T. Kobayashi, N. Uchida, & T. Katada: Novel function of the eukaryotic polypeptide-chain releasing factor 3 (eRF3/GSPT) in the mechanism of mRNA degradation. [Review] *Biochemistry (Moscow)* **64**: 1367-1372 (1999).
- 3) Y. Araki, S. Takahashi, T. Kobayashi, H. Kajihara, S. Hoshino, & T. Katada: Ski7p G protein interacts with the exosome and the Ski complex for 3'-to-5' mRNA decay in yeast. *EMBO J.* **20**: 4684-4693 (2001).
- 4) H. Yokoyama, R. Mizutani, Y. Satow, Y. Komatsu, E. Ohtsuka, & O. Nikaïdo: Crystal structure of the 64M-2antibody Fab fragment complexed with a DNA dT(6-4) T photoproduct formed by ultraviolet radiation. *J.Mol. Biol.* **299**: 711-723 (2000).
- 5) K. Kato, C. Sautès-Fridman, W. Yamada, J.Enokizono, Y. Kobayashi, Y. Arata, and I. Shimada: Structural basis of the interaction between IgG and Fc receptors. *J. Mol. Biol.* **295**: 213-224 (2000).
- 6) Y.S. Ho, L. Swenson, U. Derewenda, L. Serre, Y. Wei, Z. Dauter, M. Hattori, T. Adachi, J. Aoki, H. Arai, K. Inoue & Z.S. Derewenda: Brain acetylhydrolase that inactivates platelet-activating factor is a G-protein-like trimer. *Nature* **385**: 89-93 (1997).