

論文の内容の要旨

論文題目 SH3 ドメインによる基質認識機構の構造生物学的解明

氏 名 寺 沢 宏 明

SH3 は、PLC- γ や v-Crk の c-DNA クローニングの結果、Src ファミリーキナーゼと相同性のある領域として発見された。SH3 は、SH2 とともに多くの細胞内シグナル伝達に重要なタンパク質に存在することがわかり、細胞内シグナル伝達のカギを握るドメインとして大きな注目を集めるに至った。後に、細胞膜と相互作用するタンパク質や、細胞骨格の形成に關与するタンパク質などにも次々と見出された。

SH3 は約 60 残基のアミノ酸からなり、異なる SH3 間の相同性は約 30% と低いものの、コンセンサスの芳香族アミノ酸はよく保存されている。発見当初、SH3 の機能は不明であった。しかし、SH3 をプローブに用いた結合タンパク質の検索と結合部位の同定から、SH3 は Pro に富む配列に結合するという概念が定着するに至った。さらに、ペプチドライブラリーなどを用いた検討により、各々の SH3 が異なる配列を特異的に認識することが示された。

SH3 結合タンパク質で見つかった配列とライブラリーで得られた配列を比較すると、いくつかの規則性が存在することがわかる。

- (i) -PXXP- のモチーフが存在する。
- (ii) $RX\phi PX\phi P$ と $\phi PX\phi PXR$ の 2 つのコンセンサスが存在する。
- (iii) コンセンサスの ϕ の位置には、疎水性分岐鎖アミノ酸が選択される傾向がある。

本研究は、NMR を用いて

- 1 . SH3-プロリンリッチペプチド (以下 PRP と記す) 複合体の立体構造を決定する、
 - 2 . 両者の相互作用機構を構造生物学的に明らかにする、
 - 3 . 上記の 3 つの規則性が生ずるメカニズムを解明する、
- を目的とした。

1. Grb2 N 末端側 SH3·Sos 由来 PRP 複合体の構造

Ash/Grb2 は SH3·SH2·SH3 の構造をもつアダプタータンパク質であり、SH2 を介して上皮成長因子受容体、または Shc などのリン酸化チロシンを含む配列と結合する。リガンドの結合により、受容体細胞内領域のチロシンがリン酸化されると、Ash/Grb2·Sos 複合体は細胞膜近傍に局在化し、Sos は GDP 型の Ras を GTP 型に変換し、活性化する。このように、Ash/Grb2·Sos 間の相互作用は生理的意義が明確である。また、Ash/Grb2 の N 末端側 SH3 (Grb2-N) と Sos 由来ペプチド VPPPVPPIRRR (1Sos) との解離定数は約 5 μ M と、他の系と比較して親和性が高い。これらより、Grb2-N·1Sos の結合特異性は高いと考えられる。よって、私は Grb2-N·1Sos 複合体を立体構造解析の対象とした。

Grb2-N は、大腸菌を用いて発現し、陰イオン交換クロマトグラフィー、さらに逆相クロマトグラフィーにより精製して取得した。1Sos は、固相合成品を逆相クロマトグラフィーにより精製した。Grb2-N : 1Sos = 1 : 1 のモル比で混合して試料を調製した。多核多次元 NMR と連鎖帰属法を適用して、ほぼ全ての ^1H , ^{13}C , ^{15}N 核と NOE の帰属を完了した。以上により、主鎖の RMSD が $0.48 \pm 0.04 \text{ \AA}$ の高分解能立体構造決定に成功した。

得られた複合体における SH3 側の構造は、他の SH3 単独の構造に比較して基質結合に伴う大きな構造変化はみられなかった。1Sos は Pro2'·Pro7' まで左巻きポリプロリン II 型ヘリックス構造 (3 回らせん軸をもち、i 番目と i+3 番目の残基が同じ方向を向く。以下 PP-II) をとっていた。Grb2-N と 1Sos の相互作用は 3 つに大別される。第一に、疎水相互作用については、1Sos の Pro2', Pro3' が Grb2-N の Tyr7 と Tyr52 の側鎖の間 (S1, S2 と定義する) にパッキングしている。また Val5', Pro6' が Phe9, Trp36, Pro49, Tyr52 の側鎖によって形成される疎水性ポケット (S3, S4) に収まる。さらに、Arg8' の側鎖が Trp36 の側鎖に沿って Phe47 との間 (S5) に位置している。Tyr52 と Trp36 の芳香環は平行な位置関係にあり、その間隔は約 9 \AA であるが、これは PP-II の i 番目と i+3 番目の側鎖間距離とほぼ一致しており、特に Pro3' と Pro6' の側鎖とスタックする形になっている。また Phe47 を除いて芳香族残基は多くの SH3 において保存されており、このような相互作用が普遍的であることを示唆している。第二に、静電相互作用が、Arg8' 側鎖とループ部分に位置する Asp15, Glu16, Asp33 のいずれか、もしくは複数との間に存在すると思われる。Glu16 は保存性が高く、特に有力と思われる。第三に、水素結合について、Pro3' のカルボニル酸素原子と Tyr52 の水酸基酸素原子との距離は 2.8 \AA であり、また Pro4' のカルボニル酸素原子と Asn51 の側鎖窒素原子との距離は 3.4 \AA である。これらの間には水素結合が存在すると思われる。

2. SH3 による PRP の双方向認識機構

PI3K の SH3 と RKLPPRPSK との複合体 (PI3K·RLP1) の立体構造が、NMR により決定された。さらに、Abl の SH3 と APTMPPPLPP (Abl·3BP1) \ Fyn の SH3 と PPAYPPPPVP (Fyn·3BP2) の複合体が、X 線結晶構造解析により決定された。これらに対して Grb2-N·1Sos を比較したところ、興味深いことに、Grb2-N·1Sos は、PRP の結合方向が逆であった。PI3K·RLP1 の方向をプラス、Grb2-N·1Sos の方向をマイナスとすると、Abl·3BP1、Fyn·3BP2 はプラス、Crk-N·C3G はマイナスというように、各々の方向に複数の複合体が存在する。

比較的短いペプチドに結合するタンパク質は、抗体、MHC、ペプチダーゼなどが知ら

れているが、双方向に認識する例は知られていなかった。PP-II の擬 C2 対称性により、疎水相互作用がプラス方向でもマイナス方向でも同じ様なモードで結合が存在する。すなわち 1Sos の Pro2', Pro3', Val5', Pro6', Arg8' と RLP1 の Pro7', Arg6', Pro4', Leu3', Arg1' がそれぞれ同じ位置を占める。また、カルボニル酸素原子の位置も、方向によらずほぼ一定であることから、水素結合も双方向で可能である。静電相互作用は Arg1' と Arg8' で共通と思われる。よって結合方向を決定するのは PP-II における Arg の位置と考えられる。-PXXP- のモチーフの N 末側に Arg があればプラス方向に限定され、C 末端側にあればマイナス方向である。規則性の一つである、PRP に 2 つのコンセンサスが存在する理由が明らかにされた。

3. SH3-PRP の結合特異性

SH3-PRP の結合様式はほぼ明らかになったため、引き続き結合特異性が生じるメカニズムについて考察を行った。3BP1 や 3BP2 は、配列比較だけではどちらの方向に結合するか判断できないが、実際に構造決定が行われてみると、プラス方向であった。3BP1、3BP2 とも Arg のかわりに 2 残基目の Pro が S5 に収まり、3、4 残基目がやや溶媒方向に突き出てから折れ曲がり、6・10 残基目は他の複合体に同じである。2 残基目の Pro は S5 のループ部分の Thr などと疎水結合している。また、c-Crk の N 末端側 SH3 と PPPALPPKKR (Crk-N·C3G) の複合体は S5 において Arg でなく 8 番目の Lys が選択されている。Crk-N·C3G の結合定数は 1.9 μ M であるが、Lys を Arg に変えると 17.2 μ M に低下する。これらの例から、S5 における結合を、特異性を生じる要因の一つと考えた。

結合方向に関して、プラス方向では S1, S3 にコンセンサスの Pro が、S2, S4 に非 Pro 残基が選択されている。ところが、マイナス方向では逆に S2, S4 にコンセンサスの Pro が選択されている。この選択性の理由については、疎水性パッキングの有効性が示唆される。非 Pro 残基が結合面において望ましい 1 角 ($\theta = 60^\circ$ または 180°) を取った場合、側鎖は結合面に近接する場合と遠ざかる場合の 2 つがあり、Pro が選択される位置が 3 残基毎に生ずる。このことは、PRP に見られる 3 つの規則性のうちの 2 つ、-PXXP- のモチーフが存在することと、コンセンサスの ϕ の位置に疎水性分岐鎖アミノ酸が選択される傾向があることをよく説明している。ここで、PRP の非 Pro 残基と SH3 の疎水性ポケットのパッキングが特異性に効いていることが推測される。

以上の考察から、プラス方向においては S2, S4, S5、マイナス方向においては S1, S3, S5 における結合によって特異性が生じていると考えられる。このことは、双方向の結合が存在することによってはじめて S1-S5 の全てが特異的認識に寄与し得ることを示している。すなわち、双方向認識機構の存在は、SH3 と PRP の特異的認識に有利と考えた。

SH3 は酵母やバクテリアにも存在し、進化的にその起源は古いものと考えられる。単純な生物から高等生物に進化し、シグナル伝達等が多様化するに伴って SH3 と基質ペプチドは双方向認識機構を獲得していったのかもしれない。

本研究により得られた知見は、SH3-PRP という生体において普遍的に存在する相互作用について、立体構造に基づいた理解を可能にするものである。得られた構造的基盤は、生体に存在する多数の SH3 をターゲットとする創薬への道標になると同時に、複雑なシグナル伝達経路を解明するためのツールを開発する足掛かりになるものと期待される。