

論文内容の要旨

論文題目 物理化学的相互作用解析を基盤とした **Transducer of ErbB2,1 (TOB1)** のキャラクタライゼーション

氏名 渡邊正人

蛋白質のキャラクタライゼーションの手法には、現在、熱分析、分離分析、電磁気分析、電気化学分析などの技術が用いられており、それらはいずれも単離された目的蛋白質のデータから、既に解析された蛋白質の性質と照らし合わせ、性質を決めていく手法である。蛋白質、特に疾患関連蛋白質の性質の理解には、モデル生物を用いた観察や実験、細胞を用いた生理活性の評価が一般的ではあるが、一方で単離した蛋白質を物理化学的な手法で評価する利点について、以下の点が挙げられる。1) 溶質として単離された蛋白質分子は、他の分子の影響を極力排除した状態で分子を評価できる。2) 既に解析がなされた蛋白質分子の情報との比較により、類似した物性や構造の確認ができる。細胞質蛋白質の多くには種々の相互作用する相手分子(リガンド、パートナー分子)が存在し、それらと相互作用することで生命現象の発現に寄与している。相互作用解析で用いられる物理化学的解析技術として、等温滴定型熱量測定(ITC)、表面プラズモン共鳴(SPR)などが挙げられる。相互作用解析によって明らかとなる情報は、結合の親和性、化学量論比、結合/解離の速度定数、エンタルピー変化量、エントロピー変化量などがあるが、これらの数値は相互作用を担う蛋白質そのものの性質を判断できる情報を含んでおり、複合体の結晶構造解析の結果と照らし合わせて相互作用の詳細を議論することが可能になってきている。

本研究では、一部の領域を除いて2次構造、3次構造の情報が乏しく、パートナー分子が明らかにされている蛋白質として、**Transducer of ErbB2,1 (TOB1)** に着目した。TOB1は細胞増殖抑制因子として知られる細胞内蛋白質である。転写制御因子複合体の一因子であるCNOT7と直接的な結合をすることが報告され、CNOT7にはmRNAのポリA鎖を分解する活性を有していることが明らかとなった(Ezzeddine N et al, *Mol. Cell. Biol.*, 2007)。CNOT7と複合体を形成したTOB1は、成熟したmRNAの安定化に寄与しているPolyA-Binding Protein(PABP)とも相互作用し、CNOT7およびその他のデアデニラーゼによるポリA分解を促進させる。ポリAを分解されたmRNAはその後種々の分解酵素により分解される。ポリAの分解はmRNAの品質管理機構に大きく関与し、TOB1による細胞周期制御機構の一端を担っている。TOB1の生物学的役割は解明が進んでいるのに対し、その分子特性に着目し、各蛋白質との相互作用に関する詳細な解析を行った報告は皆無である。

本研究では、TOB1とCNOT7間の相互作用に着目し、物理化学的解析から各種パラメータを求めることによりTOB1の分子特性の解析を試みた。

解析に用いる蛋白質の発現系には大腸菌発現系を用いた。全長のTOB1を発現させたと

ころ、大部分が不溶性画分として発現することが分かり、この性質は単離した蛋白質溶液中においても同様であった。更に、全長 TOB1 のサイズ排除クロマトグラフィーの結果からはこの C 末端領域が凝集することで TOB1 が 4 量体のサイズとして溶出されていることが分かった。複数種の構造予測プログラム、および結晶構造の報告(Nishida K et al, *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.*, 2007)(Horiuchi M et al, *J. Biol. Chem.*, 2007)より、TOB1 の N 末端領域 1-115 位では BTG ファミリーに共通のフォールドを持った領域であり、これより C 末端側の領域では天然変性状態を含む領域であることが示唆された。特に 263-345 位が不溶性化の要因と予測できたことから、欠失変異体を作成し、発現状況を調査した。作成した変異体は、C 末端から 13 残基ずつ 73 残基まで除いた 7 種、BTG ホモロジー領域と、特徴的な配列を有する polyP、polyQ 領域に着目した DM0 (1-112 位)、DM1 (1-236 位)、DM2 (1-262 位)、DM3 (237-345 位)、および DM4 (263-345 位)である。7 種の変異体では、C 末端から除く残基数が多くなるほど可溶性が向上しており、この領域が不溶性化の要因であることが明らかとなった。DM1、DM2 では総発現量、可溶性画分の割合が飛躍的に増大しており、DM3、DM4 では発現量の低下と不溶性画分の割合の増大が起こっていた。

作成した欠失変異体のサイズ排除クロマトグラフィーの結果から、DM1、DM2 について単量体、2 量体および多量体として存在していることが判明した。発現量/可溶性画分に含まれる割合が共に高く、単離精製が容易であると考えられたため、精製し相互作用解析に用いることとした。

単離精製が可能な DM1、DM2 について、円偏光二色性スペクトル (CD)測定を用いて 2 次構造を解析した。DM1、DM2 はいずれも α -ヘリックス、 β -シートを含んでおり、特性バンド強度の比較から DM1 の方がその含量が低いことが示唆された。また、小角 X 線散乱測定法 (SAXS)を用いて 3 次構造の比較を行ったところ、DM1 は慣性半径はほぼ等しいにもかかわらずフォールドしている割合が DM2 より大きいことが分かった。以上から、DM2 のほうが 2 次構造の含量が多いにもかかわらず、3 次構造に含まれるフォールドしている領域の少ない変異体であることが示された。

TOB1 の、他の BTG 蛋白質と相同性を持つ 1-115 位までの領域と全長 CNOT7 の複合体の結晶構造が既に報告されており、1:1 で結合することが明らかとなっている。同じ領域の TOB1 単独の結晶構造も報告されており、構造の比較から CNOT7 との結合に際して TOB1 側の構造変化は起きておらず、この領域のみが結合に関与していると考えられている。DM1、DM2 はこの相同性を持つ領域を含んでおり、かつ単一の分子として溶液中で存在する成分の単離が可能であったため、精製後相互作用解析に用いることが可能であった。そこで、速度論的な結合活性を評価し、熱力学的パラメータを算出できる表面プラズモン共鳴法 (SPR) を応用した装置 BiacoreT-100 を用いて相互作用解析を行った。DM1、DM2 いずれも 1:1 の結合後、遅い解離が見られ、複合体が安定であることを示唆していた。DM2 の方が速く、解離の遅い相互作用であり、CNOT7 との結合において DM2 の方が高親和性で

あることが示された。

次に、結合の遷移状態についての知見を得るため、SPR による熱力学的解析を行った。van't Hoff plot により結合前後におけるエントロピー変化、エンタルピー変化を求めることができ、遷移状態に関しては Eyring plot を行うことで各パラメータを求めることができる。DM1-CNOT7 間、DM2-CNOT7 間の遷移状態は、いずれもエントロピー損な状態であった。結合前後の ΔG 変化量はほぼ等しく、SPR の結果を裏打ちするものであった。特に DM2-CNOT7 間ではより大きくエントロピー損な状態であり、蛋白質構造の誘起あるいは水和を伴う結合である可能性を示唆していた。Eyring plot に着目すると、DM1-CNOT7 間では温度上昇に伴い結合速度が増大していた。これは通常の分子間結合に見られるような分子運動が激しくなることによる衝突確率の増大の結果であると考えられる。一方 DM2-CNOT7 間では逆に温度上昇に伴い結合速度が減少しており、DM1 とは異なる現象が観察された。蛋白質のフォールディング速度は高温領域で減少することが報告されており、高温における傾きの類似性から、DM2-CNOT7 結合は蛋白質のフォールディングを伴っている可能性が強く示唆された。

TOB1 と CNOT7 との結合の際フォールディングが起こり、その前後で蛋白質の 2 次構造の絶対量が変化することが予測されることから、円偏光二色性 (CD) スペクトルにより検出が可能ではないかと考えた。蛋白質主鎖の 2 次構造 (α -ヘリックス、 β -シート、ランダムコイル) は特徴的な CD スペクトルを与えること、また CD スペクトルには加算性があることが知られており、2 次構造成分の割合を決定する方法も開発されている。

そこで、単離した DM1、DM2、および CNOT7 の単独の CD スペクトルを測定し、それぞれの混合物 DM1-CNOT7、DM2-CNOT7 のスペクトルを計算により求めた。各蛋白質を 1:1 の割合で混合、インキュベート後 CD スペクトルを測定し、算出されたスペクトルと比較した。DM1 と CNOT7 との混合溶液について、スペクトルは 190nm-250nm の領域で重なっており、蛋白質の混合の前後で 2 次構造の含量は変化していないことが示唆された。一方、DM2 と CNOT7 との混合溶液については 190nm-200nm の領域でずれが生じており、結合前後に 2 次構造の変化が起こっている可能性が示唆された。

全長 TOB1 について、発現時に大部分が不溶性化していたこと、C 末端を介して 4 量体化していたことから、C 末端領域は TOB1 自身か、他のパートナー分子との複合体を形成するためのドメインである可能性が示唆された。また発現量が少ないこと、C 末端領域を除去すると発現量が著しく向上すること、構造予測プログラムの結果などから、BTG ホモロジー領域より C 末端よりの領域では天然変性状態を含む領域となっており、大腸菌内のプロテアーゼの影響を受けやすくなっていた可能性が示唆された。SPR を用いた DM1、DM2 と CNOT7 との相互作用解析の結果は、DM2 の方が高親和性で結合することを示し、直接結合に関与しないと考えられていた polyQ、polyP 領域の影響があることを示唆していた。熱力学パラメータの算出結果から、DM2 と CNOT7 との結合は構造の誘起あるいはフォールドを伴うものであることが示唆され、これは polyP、polyQ 領域の影響であると考えられ

る。polyP、polyQを含む領域は、ランダムコイル構造に近いヘリックス構造をとると考えられており、polyP、polyQ領域より数十残基上流の領域はこの影響を比較的受けやすいものと考えられる。CNOT7との結合における遷移状態、結合後の状態において2次構造レベルでの変化がみられていることから、直接結合に影響するアミノ酸残基を含まない領域の2次構造が、パートナー分子との結合によって変化するという機構を有している可能性が考えられ、極めて興味深い。TOB1のC末端領域にはpolyA-binding proteinのPABCドメイン、抑制型SMADであるSMAD6/7の結合サイトを有していることが示唆されている(Yoshida Y et al, *Mech. Dev.*, 2003)。CNOT7との結合が引き金となり、結合前には存在しなかった高次構造が現れ、第3のパートナー分子の結合が促されている可能性が考えられる。