

1-1-2 研究成果

中テーマ名：タンパク質回収フロー型自動NMR測定装置の開発	
サブテーマ名：DNA結合タンパク質の構造解析を通じたNMR新技術の検証	
中テーマリーダー（所属、役職、氏名）	
横浜市立大学大学院国際総合科学研究科 教授	西村善文
研究従事者（所属、役職、氏名）	
(財) 木原記念横浜生命科学振興財団	奥田昌彦 岡村英保 野村 充 大野綾子
研究の概要、新規性及び目標	
①研究の概要	
(1) NRSF/RESTのN末端転写抑制ドメインとコリプレッサーmSin3Bの相互作用を調べる。更に原子レベルでの転写制御に関する知見を得るため、多核種多次元NMR法によりNRSF/RESTのN末端転写抑制ドメインとmSin3BのPAH1ドメインの複合体の構造解析を行う。	
(2) DNA結合タンパク質同定装置に用いられている二重鎖DNAチップを蛍光で観測する技術の延長線上にタンパク質チップによるタンパク質-タンパク質相互作用の同定装置の開発も含まれる。そこで、DNA-タンパク質複合体の解析に持ちられるNMR技術がタンパク質複合体の解析にも応用可能であることを検証する必要がある。そのためタンパク質-タンパク質複合体を迅速にNMRで構造解析を行い、その方法論を確立する。	
(3) クロマチンリモデリング因子の機能未知なドメインの立体構造をNMRを用いて決定する。	
②研究の独自性・新規性	
(1) NRSF/RESTとmSin3の相互作用部位および複合体の立体構造は、本研究以前には明らかにされていない。また、NRSF/RESTは様々な神経疾患と関係があるため、本研究結果を神経疾患に対する治療薬の開発に応用し、社会に貢献することができる。	
(2) 独自性はタンパク質-タンパク質複合体の構造解析研究そのものよりも、その解析標的としてDsk2 (UBA)とユビキチン複合体を選んだ点にある。ユビキチンは細胞内の蛋白質の翻訳後修飾因子として重要な役割を果たしている。それを認識するドメインのうち細胞内で最も種類が多いのがUBAドメインであるにもかかわらず、その認識機構は長らく未知であった。	
(3) クロマチンリモデリング因子のタンパク質ファミリーで最初となるドメインの立体構造を決定することになる。決定された構造や他の実験から機能を推定し同定する。	
③研究の目標	
フェーズⅠではタンパク質-タンパク質複合体のサーベイとその複合体の構造を解析する。	
フェーズⅡではタンパク質-タンパク質複合体の構造解析を通じてNMR新技術を検証する。	
フェーズⅢでは複合体の立体構造の応用法も含めた特許出願と更なるタンパク質-タンパク質複合体の探索を行う。	
研究の進め方及び進捗状況	
(1) 神経選択的サイレンサー結合因子NRSF/RESTの転写抑制ドメインとコリプレッサーmSin3BのPAH1ドメインの複合体構造をNMRによって決定した。	
(2) Dsk2 (UBA) -ユビキチン複合体のNMR構造を世界で初めて決定に成功した。これはUBAドメインとユビキチンの複合体構造としても世界初である。今回、ユビキチンとの結合能が試験管内で最も強い分子として酵母Dsk2を選択したが、この分子のヒトホモログhPLIC1は肝炎ウイルスの主要タンパク質NS5Aの細胞内での分解にも関与する重要な因子でありその立体構造情報は非常にインパクトが大きい。そこでDsk2・ユビキチン複合体の立体構造に基づいて設計されたUBAドメイン変異体について特許出願を行った。これにより目標はほぼ達成された。しかし、更なるタンパク質複合体の構造決定を目指したが、後述するSTAM2-ユビキチン複合体の構造決定には至らなかった。	
(3) ドメインをコードする遺伝子は共同研究者から提供されたもの、あるいは自分自身でサブクローニングした。大腸菌での発現方法及び精製方法を確立後、 ¹⁵ N標識試料を調製し溶解度、構造保持してい	

るか等を調べた。構造解析が可能なものに対しては、 ^{13}C 、 ^{15}N 標識試料および非標識試料を調製し、多次元NMR測定を行った。スペクトルを解析し水素間距離や二面角度制限情報等を収集し、構造計算を行った。初期構造が得られたら、精度を満たす最終立体構造が得られるまで精密化を繰り返した。立体構造決定後、構造を詳細に解析し機能に結びつく知見を収集した。推定された機能について、それを証明するための種々の実験を行った。

主な成果

具体的な成果内容：

- (1) 神経選択的サイレンサー結合因子NRSF/RESTの転写抑制ドメインとコリプレッサーmSin3BのPAH1ドメインの複合体の構造をNMRによって決定した。mSin3BのPAH1ドメインは4本ヘリックスバンドルとC末端の秩序立ったループ領域からなり、NRSF/RESTの転写抑制ドメインは1本の短い疎水性ヘリックスから構成されていた。この4本ヘリックスバンドルによって形成される疎水的なクレフトに、NRSF/RESTのヘリックスが収まっていた。本研究結果が「Journal of Molecular Biology」に掲載されることが決定した。
- (2) Dsk2(UBA) -ユビキチン複合体の立体構造を決定し特許出願を行った。
- (3) 基本転写因子TFIIIEについて2つのドメインの立体構造を決定した。クロマチンリモデリングタンパク質、CHD1の2つのドメインの立体構造を決定した。立体構造からそれぞれのドメインの機能的役割を示した。

特許件数：3 論文数：11 口頭発表件数：36

研究成果に関する評価

1 国内外における水準との対比

- (1) NRSF/RESTは神経細胞特異的な転写制御の中核を担っているタンパク質であるため非常に注目を集めており、関連論文が世界のトップジャーナルに相次いで掲載されていることから、世界で初めてNRSF/RESTの構造解析に成功した本研究結果の意義は大きいと考えられる。
- (2) Dsk2(UBA) -ユビキチン複合体の立体構造を詳細に検討することで、UIMによるユビキチン認識とUBAによるユビキチン認識がタンパク質の基本構造が大きく異なる（即ち、UIMはヘリックス1本のみなのに対し、UBAは3本のヘリックスのうち2本が認識する）にも関わらず、きわめてよく似た相互作用様式を用いて分子認識していることを明らかにした。このことはDsk2(UBA) -ユビキチン複合体が世界初であることと相まって、国内外で高い評価を受けている。
- (3) 国際雑誌に論文が受理され相応の水準を満たしている。

2 実用化に向けた波及効果

- (1) 得られた立体構造情報の産業への応用及び神経疾患に対する治療薬の開発に利用が考えられる。
- (2) ユビキチン経路によるタンパク質分解は生物学ならびに臨床医学の分野で非常に注目されている。例えば2004年のノーベル化学賞がubiquitin-mediated protein degradationに対して与えられた。またユビキチン・プロテアソーム系の阻害剤VALCADEはミエローマなどの癌に対する治療薬として2005年第一四半期で54億円を売り上げる商品となるなど創薬ターゲットとしての価値も高い。

残された課題と対応方針について

- (1) 変異体を用いた詳細な認識機構の解明及びタンパク質回収フロー型自動NMR測定装置を用いた神経疾患に対する薬物候補化合物のスクリーニングを行う。
- (2) EGF受容体などの膜受容体のエンドサイトーシスと活性制御(down regulation)に関連する重要なタンパク質因子であるSTAM2のN末端に存在するVHSドメインの主鎖シグナルのNMR帰属を完了した。その結果、VHSドメイン表面上に新規のユビキチン結合サイトがあることを原子レベルで明らかにした。これまでエンドサイトーシスに関連するユビキチン認識はほとんどUIMのみによって行われると信じられてきており、一方STAM2においてはそのVHSドメインの分子機能は未知であるため、この発見は当該領域の研究に大きなインパクトを及ぼす可能性が高い。この研究成果については、横浜市大・朽尾助手が中心となり、文部科学省特定領域研究「タンパク質の一生」の課題の一つとして継続研究が行われている。

	JST負担分 (千円)							地域負担分 (千円)							合 計
	H 12	H 13	H 14	H 15	H 16	H 17	小計	H 12	H 13	H 14	H 15	H 16	H 17	小計	
人件費	335	5,630	5,779	9,553	14,670	5,374	41,341	0	0	0	0	0	0	0	41,341
設備費	31,805	28,747	25,299	20,995	21,057	15,357	143,260	139,833	22,400	0	0	0	0	162,233	305,493
その他研究費 (消耗品費、 材料費等)	1,426	6,929	14,761	4,687	7,735	4,148	39,686	0	1,560	2,004	1,862	2,401	1,544	9,371	49,057
旅費	21	34	267	130	498	19	969	0	0	0	0	0	0	0	969
その他	0	19	58	23	224	4	328	0	0	0	0	0	0	0	328
小 計	33,587	41,359	46,164	35,388	44,184	24,902	225,584	139,833	23,960	2,004	1,862	2,401	1,544	171,604	397,188
代表的な設備名と仕様 [既存 (事業開始前) の設備含む] JST負担による設備：フロー型NMRデータ解析システム 地域負担による設備：															

※複数の研究課題に共通した経費については按分する