

**PRESAT-vector の開発と蛋白質ドメイン研究への
応用**

**Development and application of PRESAT-vector
for protein domain analyses**

天野 名都子

目次

第1章

序論	3
----	---

第2章

構造プロテオミクスにおける可溶性蛋白質ドメインのハイスループットスクリーニングのための非対称性 T-ベクター (PRESAT-vectod)の開発

2-1 序論	7
2-2 実験	8
2-3 結果と考察	12

第3章

PRESAT-vector を用いた研究1 ～細胞への蛋白質導入系への応用～

3-1 生細胞への蛋白質導入と可視化のための LBT/PTD タグ融合蛋白質発現ベクターの開発

3-1-1 序論	21
3-1-2 実験	22
3-1-3 結果と考察	26

3-2 細胞への蛋白質導入活性を持つヒトインシュリン様成長因子結合蛋白質 (Insulin-like growth factor binding protein 3, 5 ; IGFBP-3, 5)由来ペプチドの同定

3-2-1 序論	35
3-2-2 実験	37
3-2-3 結果と考察	42
3-2-4 Supplementary report	51

第4章

PRESAT-vector を用いた研究2 ～蛋白質ドメインの構造・機能解析への応用～

4-1 PRESAT-vector を用いた構造解析に適した蛋白質ドメイン発現系の構築	58
---	----

4-2	Vasoactive internal peptide (VIP)の2種類の膜模倣環境での構造比較	
4-2-1	序論	65
4-2-2	実験	67
4-2-3	結果と考察	69
4-3	核小体局在シグナルを持つ Nuclear valosin-containing protein-like 2 (NVL2)のアミド 末端ヌクレオリン結合ドメインの構造機能解析	
4-3-1	序論	85
4-3-2	実験	88
4-3-3	結果と考察	91
4-4	Zonula occludens-1 (ZO-1) PDZ ドメインの NMR アサイメント	
4-4-1	序論	115
4-4-2	実験	116
4-4-3	結果と考察	117
第5章	総括	121
	略語表	123
	謝辞	125
	付録 これまでに作製した PRESAT-vector	126

第 1 章

序論

2003 年にヒトゲノムの完全解読完了が宣言された(1)。その後も多くの生物ゲノムが解読され、遺伝子配列情報の蓄積が急速に進んでいる。そして、次の段階として、その遺伝子がコードしている蛋白質の機能を調べるため、蛋白質の構造解析、相互作用解析などの網羅的解析が進んでいる(2,3,4)。日本では、タンパク 3000 プロジェクト(2002-2006 年度, <http://mdbpr4.genes.nig.ac.jp/p3k/>)(5)、ターゲットタンパク研究プログラム(2007-2011, <http://www.tanpaku.org/>)(6)と言った、蛋白質の構造解析を目的とした大型プロジェクトにより、蛋白質構造の網羅的解析がすすめられ、多くの蛋白質立体構造が解かれてきた。

蛋白質立体構造解析、または機能解析のためには、大量の蛋白質試料が必要となる。そのため、遺伝子組み換えによる大量発現系を構築する必要がある。大量発現系には、微生物で発現させる系、昆虫、動物細胞を用いる系、細胞抽出物を用いた無細胞系などがあるが、コストの面や扱いやすさなどから微生物、特に大腸菌で発現させる系が第一選択肢である。NMR で蛋白質の立体構造を決定する場合は、安定同位体標識(^{15}N , ^{13}C)した蛋白質を調製することが必要であり、そのためには大腸菌で蛋白質を発現させる系が適している。

しかし、高等生物由来の蛋白質、とくに哺乳類の蛋白質を大腸菌で発現させると、多くの場合は不活性で不溶性の封入体を作る。活性のある蛋白質を得る手段の一つは、蛋白質全長ではなく、活性に重要なドメインに分け、ドメイン単位で組み換え蛋白質として発現させ、構造解析や機能解析に用いる方法である。この場合、研究対象とする蛋白質について、各生物種のオルソログのアミノ酸配列を比較し、自立的にフォールド可能なドメインを推測、そのドメインの発現ベクターを構築する。これを大腸菌で発現させ、生産効率、溶解度、安定性、活性を評価する。配列解析、各種データベースや予測プログラムを利用することで、ある程度のドメ

イン境界を決めることができるが、完璧には難しい。従って、解析に用いることができるドメインを得るには、複数の発現ベクターを構築し、得られた蛋白質試料の比較をする必要がある。

そこで、発現系構築にかかる時間を節約するため、市販の発現ベクターのTベクター化を行った。Tベクターとは、両3'末端にチミン(T)が1塩基突出した直鎖状のベクターである(7)。Taq DNAポリメラーゼでPCRを行うと、ターミナルデオキシヌクレオチドトランスフェラーゼ活性のため、PCR産物の両3'末端にアデニン(A)が付加される。従って、このPCR産物は、直接Tベクターと接続することができる。この方法は、PCR産物の制限酵素処理や、アガロースゲルで泳動、切り出し精製といったステップが必要ないため、多数のサンプルを同時並行で処理することが容易である。しかし、Tベクターの接続部位は対称であるため、理論上、得られたベクターの半分はPCR産物が逆向きに接続されており、発現ベクターとしては適切ではない。そこで、PCR産物が発現方向とは逆向きにつながったベクターを制限酵素処理によって除去する方法を考案し、遺伝子の向きを選択が可能な非対称Tベクター(potential restriction enzyme selectable asymmetric T-vector : PRESAT-vector)を開発した(8, 9)。このベクターの使用で、PCR産物のORFの向きが適切なものを高い確率で得ることができ、そのまま発現させることが可能である。その結果、PCRによる遺伝子の増幅から蛋白質発現の確認までにかかる期間を大幅に短縮することができた。第2章では、このPRESAT-vectorの開発について報告する。

第3章では、PRESAT-vectorの応用として、蛋白質を細胞内へ導入するPTD(protein transduction domain)(10)と細胞内蛋白質の検出に利用できるLBT(Lanthanide binding tag)(11)を融合させる蛋白質発現系について報告する。PTDは、蛋白質を動物細胞の細胞膜を越えて中に導入する活性をもつペプチドで、臨床応用への発展を目標として細胞生物学的研究に使われている。加えて、新規のPTD活性を持つペプチドとして、ヒトインシュリン様成長因子結合蛋白質(IGFBP)由来のペプチドを同定した。それについても合わせて報告する。

第4章では、PRESAT-vectorを用いて構築した蛋白質発現系によって調製した蛋白質ドメインの構造生物学的研究について報告する。PRESAT-vectorの開発から今日まで、約8年の間、PRESAT-vectorを用いて様々な蛋白質ドメインの発現系を構築し、共同研究者らとともに、これらの蛋白質ドメインの構造解析、機能解析を行ってきた。その中から、血管作動性ペプチド(VIP)、AAA-ATPaseの一つである Nuclear Valosin-containing Protein-like 2 (NVL2)のN末端ドメイン、細胞接着因子 Zonula occludens-1 (ZO-1)のPDZドメインに関する研究について報告する。

参考文献

1. Wakeland, E. K., and Wandstrat, A. E., Analyzing genomes: current realities and future possibilities, *Curr Opin Immunol* 14 (2002) 622-626.
2. Yokoyama, S., Hirota, H., Kigawa, T., Yabuki, T., Shirouzu, M., Terada, T., Ito, Y., Matsuo, Y., Kuroda, Y., Nishimura, Y., Kyogoku, Y., Miki, K., Masui, R., and Kuramitsu, S., Structural genomics projects in Japan. *Nat Struct Biol* 7 Suppl (2000) 943-945.
3. Burley, S. K., and Bonanno, J. B., Structural genomics of proteins from conserved biochemical pathways and processes. *Curr Opin Struct Biol* 12 (2002) 383-391.
4. Phizicky, E., Bastiaens, P. I., Zhu, H., Snyder, M., and Fields, S., Protein analysis on a proteomic scale. *Nature* 422 (2003) 208-215.
5. Oshima, T., Nakamura, H., Overview Progress on and trends in the world Protein 3000 Project. *Tanpakushitsu Kakusan Koso*, (2005) 50, 831-835
6. Wakatsuki, S., Yamada, Y., Chavas, L.M., Igarashi N., Kawasaki, M., Kato, R., Hiraki, M., Matsugaki, N., Advancement of synchrotron radiation protein crystallography in the targeted protein research program beamline developments at the photon factory. *Yakugaku Zasshi*, (2010) 130, 631-640
7. Zhou, M.Y., Gomez-Sanches, C.E., Universal TA cloning. *Curr Opin Mol Biol* (2000) 1-7
8. Goda, N., Tenno, T., Takasu, H., Hiroaki H., Shirakawa, M., The PRESAT-vector asymmetric T-vector for high-throughput screening of soluble protein domains for structural proteomics. *Protein Sci.*, (2004) 13, 652-658

9. Tenno, T., Goda, N., Tateishi, H., Tochio, M., Mishima, H., Hayashi, M., Shirakawa, M., Hiroaki, H., High-throughput construction method for expression vector of peptides for NMR study suited for isotopic labeling. *Protein Eng. Des. Sel.* (2004)17, 305–314
10. Langel, U (Ed), Cell-penetrating Peptides: Processes and Applications, *CRC PRESS, Florida*, 2002
11. Franz, K.J., Nits, M., Imperiall, B., Lanthanide-binding tags as versatile protein coexpression probes, *Chem. Bio. Chem.* (2003) 4, 265–271

第 2 章

構造プロテオミクスにおける可溶性蛋白質ドメインのハイスループットスクリーニングのための非対称性 T-ベクター (PRESAT-vector) の開発

2-1 序論

多くの生物のゲノムプロジェクトが完了(1, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) するにつれ、ゲノムワイドな蛋白質の構造・機能相関に研究の焦点が移ってきた(2,3,4)。ゲノムワイドスケールでの蛋白質の研究への挑戦には、蛋白質の発現、精製、生化学的分析、構造決定において、ハイスループットな研究法の発展が必要である。組み換え蛋白質を得る方法として、大腸菌での発現は、手法が簡単であり、生育速度が速く、コストがかからないと言う点で有利である。しかし、大腸菌で発現させた外来蛋白質の多くはインクルージョンボディを形成する傾向があり、それが主な弱点となっている。研究を進めるためには、プラスミドコンストラクトを素早く作製し、可溶性の蛋白質や蛋白質ドメインを発現するクローンを得るためのハイスループットシステムが必要である。

T-ベクタークローニングの技術は、PCR 産物のサブクローニングにおいてもっとも効果的な方法の一つである(5)。蛋白質の構造・機能研究において、PCR を用いて目的の DNA 断片を増幅する方法は、多くのcDNA 増幅断片を同時並行で調製するためのありふれた方法である。しかし、PCR 産物を一般的な突出末端(6)や平滑末端を接続するクローニング法に用いるのは容易ではないことがよく知られている。そのため、多くの研究室では、研究の出発点に T-ベクターをもちいたクローニングが使われることが多い。

しかし、発現ライブラリーを構築するために T-ベクタークローニング法を用いることの不都合な点は、接続に方向性がないことである。T-ベクター法では、ベクターと PCR 産物の接続は、3'-T と 3'-A の突出末端の間の一塩基対の形成からなり両末端が対称であるため、理論

上は得られたベクターの半分は PCR 産物が逆向きに接続されており、発現ベクターとしては不適である。そこで、ベクターの T サイトに部分的に非対称な配列をデザインし、制限酵素を利用して PCR で増幅した断片が不適切な方向につながったものをのぞく選別法を開発した。

ベクターのクローニングサイトに一つの 3'-T 突出末端を作る方法として、二つの異なった方法が報告されている。一つ目は、*EcoRV* のような平滑末端を生じる制限酵素でベクターを切断し、続いて dTTP 過剰の条件で Taq ポリメラーゼを用いて 3'末端にチミン(T)を一つ付加する方法である(7, 8, 9)。もう一つは、*XcmI* (10, 11, 12, 13)や *AsoEI/Ram1105/AhdI* (14, 15, 16) のような制限酵素で切断することにより一組の 3'-T 突出末端をつくる方法である。*AhdI* は、5'-GATNNN/NNATC-3'(N は任意の塩基)という配列を認識、切断し、3' 突出末端を生じる制限酵素である。我々は、T-突出末端サイトの隣に非対称の配列を生じるように設計した *AhdI* サイトを導入したベクターを作製した。

本章では、PCR で増幅した cDNA 断片を GST 発現システム(17)のような蛋白質発現ベクターに方向性を持ってクローニングするための TA-クローニングを基本とした新規の方法について論述する。TA-クローニングサイトには、一組の *AhdI* 認識サイトの上流にある方のみ、潜在的な *NcoI/NdeI* サイトを導入し、非対称の TA-クローニングサイトが生じるように設計した(Figure 2-1A)。この、第二の制限酵素サイトは適切に設計した PCR プライマーと組み合わせることで生じるように作っており、形質転換前に制限酵素処理を行うことによって ORF の向きを選択を行うことができる。本章では、このベクターを用いたクローニング法の選択性の効率、実行可能性、応用性についても併せて議論する。

2-2 実験

実験に用いた試薬

制限酵素は、*NcoI*, *NdeI*, *AhdI* (New England Biolabs)、*BamHI* (TOYOBO)を用いた。ライゲーションには、T4 DNA ligase (Promega)、プラスミド調製には Wizrd *plus* SV Minipreps DNA

Purification System (Promega)、制限酵素処理後のベクターと PCR 産物の精製には Wizard SV DNA gel and PCR Clean-Up system (Promega)を使用した。オリゴヌクレオチドプライマーは、北海道システムサイエンスより購入した。プラスミドは、pGEM-T (promega)、pGEX-4T3 (GE Healthcare)、pET-32a (Novagen)、を使用した。PCR クローニングの鋳型として、QUICK-clone cDNA of mouse spleen, human HeLa cell (Clontech)を用いた。

pGEX-4T3 を基にした非対称 T-ベクターの構築

3'-T 突出末端サイトをつくるためのリンカーを挿入する前に、プラスミドの *AmpR* 遺伝子の中にある *AhdI* 切断サイトにサイレントミューテーションを導入し(18)、*AhdI* 切断サイトを破壊した。

次に、プライマー dGGATCCGACCATTTGGTCCACCTGACTGACGACAGTTTTTGAC[front]、dGGATCCGACATTTGGTCTTATTAGCCCAGCACCGCCG [rear]を用いて pET-32a/PACAP を鋳型として、550bp の DNA 断片を PCR で増幅した。この 550bp は PRESAT-vector のリンカーとなるもので、両末端に *AhdI* サイト、中央にチオレドキシンをコードしているが、チオレドキシン部分は、PRESAT-vector を *AhdI* で切断して直鎖状にした時には除かれるようになっている。また、550 bp という長さは、アガロースゲルで電気泳動を行ったときに、*AhdI* で完全に切断できたプラスミドと、切断できていないプラスミドを分離できる長さである。この PCR 断片は、*AhdI* サイトの外側に *BamHI* サイトを持つように設計した。この PCR 断片を、はじめに pGEM-T にサブクローニングし、増幅した 550 bp の部分の塩基配列を確認した。次に、550 bp のリンカーを *BamHI* で切り出し、*AmpR* に点変異を導入した pGEX-4T3 のスロンビン認識サイト下流の *BamHI* サイトに挿入した。このベクター 2.5 μ g を *AhdI* で処理し、両 3' 末端に一塩基突出した dT を持つ直鎖状にした。アガロースゲルで電気泳動、精製後、およそ 1.5 μ g の直鎖状 pGEX-4T3-PRESAT vector が得られた。調製した pGEX-4T3-PRESAT は、次の実験に用いた。

PRESAT-vector を用いた GST 融合蛋白質ドメイン発現系の並行構築

ヒト、マウスの SNX15a と酵母、マウス、ヒトの Vps4b の MIT ドメインを増幅するための PCR プライマーを設計した。前方のプライマーは、GST に続いてフレームが合うようにアミノ酸のコドンから始まり、末端の塩基が 5'-GG となるのを避けるように設計した。後方のプライマーは、ドメインの C 末端の後ろに終始コドンを含み、5' 末端の塩基が 5'-GG となるように設計した。この 5'-GG は、PCR で増幅した DNA 断片が、pGEX-4T3-PRESAT に逆方向の ORF でつながったときに、第 2 の *NcoI* サイトとなる配列の一部である。この新しく生じる *NcoI* サイトは、ORF の方向の選別の段階で利用した。Taq DNA ポリメラーゼを使った PCR で増幅した DNA を直鎖状 pGEX-4T3-PRESAT と混合し、T4 DNA ligase を加えて 4°C 16 時間、ライゲーション反応を行った。次に、このライゲーション混合物を DH5 α へ導入し、DH5 α はコロニーに単離せずに混合物のままで抗生物質アンピシリンを含む LB 培地で培養し、プラスミドを調製した。調製したプラスミド 200 ng を *NcoI* で処理し、そのうちの 10 ng を用いて発現用大腸菌 BL21(DE3) を形質転換し、LB プレート上でコロニーを形成させた。単離したコロニーを用いて、蛋白質発現実験を行った。

GST 融合蛋白質の発現実験

5 種類の GST-MIT 発現ベクターのクローンをそれぞれ 5 個ずつ LB-グルコース培地で 37°C で培養した。菌体の濁度が OD₆₀₀=0.4 になったところで組み換え蛋白質の発現の誘導を IPTG (1mM) で誘導した。誘導後、3 時間培、集菌し、細胞抽出物の SDS-PAGE を行い蛋白質の発現を確認した。細胞は、緩衝液[0.15 M NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH7.5)]に懸濁、超音波破碎を行い、遠心分離後、SDS-PAGE で分析し、可溶性と不溶性の GST-MIT 蛋白質の量を見積もった。

次に、CDNB 比色分析を用いて、可溶性画分に含まれる GST-MIT 蛋白質の量を見積もった。2 μ L の破碎上清を 1 mL の CDNB 分析緩衝液[1 mM CDNB, 1 mM GSH, 0.1 M リン酸カリウ

ム(pH 7.5)]に加え、室温で、波長 340 nm の吸光度の上昇を測定した。

安定同位体 ^{15}N 標識マウス *Vps4b*-MITドメインの調製

^{15}N 標識融合蛋白質 GST-MIT(mVps4b)を得るために、pGEX-PRESAT-MIT(mVps4b)をもつ BL21(DE3)をまず、LB 培地で培養し、そのうち 0.5 mL を、唯一の窒素源として 0.7 g/L ^{15}N - NH_4Cl を含む M9 培地 100 mL に加えて 30°C で 16 時間培養し、900 mL の ^{15}N M9 培地に加えた。培養を続け、濁度が $\text{OD}_{600}=0.4$ となったところで IPTG (1 mM)を添加し、組み換え蛋白質の発現を誘導後、さらに 6 時間培養した。

集菌した菌体を 50 mL の破碎緩衝液に懸濁し、超音波により破碎、遠心分離により不溶性画分を除いた。可溶性画分より、GST-MIT 融合蛋白質を Glutathione-Sepharose Fast Flow (GE Healthcare)を用いたアフィニティクロマトグラフィーによって精製した。培地 1L の培養から得た融合蛋白質に、150 ユニットのウシスロンビン(GE Healthcare)を加え、25°C で 20 時間切断した。次に、MIT ドメインを陰イオン交換クロマトグラフィーで精製し、SDS-PAGE にほぼシングルバンドであることを確認した。 ^{15}N -M9 培地 1L の培養により MITドメイン 6 mg が得られた。

NMR

NMR 測定は、Bruker Avance DRX 500-MHz NMR spectrometer と Z 軸磁場勾配のクライオ三次元共鳴プローブを用いた。NMR サンプルは、 ^{15}N -MIT(mVps4b) 1.3 mg を 300 mL の NMR 緩衝溶液 [50 mM NaCl、25 mM リン酸ナトリウム (pH 5.5)、2%グリセロール]に溶解した。 ^1H - ^{15}N HSQC (19)は、echo-antiecho method (20, 21)に従って 8 回積算、256 データポイント、25°C で取得し、nmrPipe (22)でデータ処理を行った。

2-3 結果と考察

非対称 T-ベクターの構築

Figure 2-1 に、制限酵素処理を用いて cDNA 断片の挿入の ORF の方向の選別を行う方法について示した。この方法では、目的とする方向の ORF のプラスミドと、逆方向の ORF のプラスミドを区別するために、プラスミドを宿主の大腸菌へ導入する前に制限酵素処理を行うという安価な選別法を用いた。そのために cDNA 増幅の PCR に使用する後方プライマーは、5'-GG または 5'-ATG の配列で始まり、前方のプライマーはそれぞれ 5'-GG、5'-ATG を避けるように設計した。これは、プラスミドの TA-クローニングサイトの上流に潜在的な *NcoI*/*NdeI* サイトを設計してあるため、例えば、後方のプライマーに 5'-GG を持つプライマーを用いて増幅した cDNA が TA-クローニングサイトに逆方向につながった場合にのみ、新しい *NcoI* サイトができるという仕組みである。同様に、後方のプライマーが 5'-ATG から始まるもので増幅した cDNA の場合だと、同じ場所に *NcoI* サイトの代わりに新しい *NdeI* サイトができる。そのため、挿入した DNA が逆方向に接続したものは、*NcoI* または *NdeI* で切断され直鎖状プラスミドとなり、これは大腸菌へ導入した時に排除される (Figure 2-1B)。この新規の方法を、“PRESAT-vector 法” (Potential Restriction Enzyme Selectable Asymmetric T-vector) と名付けた。

PRESAT-vector を用いた GST 融合蛋白質ドメイン発現系の並行構築とその効率の検証

Figure 2-2 は、GST 融合発現ベクターの並行構築における挿入 DNA 断片のアガロースゲル電気泳動と、発現蛋白質の SDS-PAGE の結果である。PRESAT-vector 法の効果を示すために、pGEX-4T3 由来の GST 融合蛋白質発現ベクターを T-ベクター化した、pGEX-4T3-PRESAT を用いて、“MIT” (23) と名付けられた約 70 アミノ酸からなる推定の蛋白質ドメインをコードする 5 つの遺伝子の発現系を構築した。それぞれの遺伝子は、酵母のゲノム DNA、または市販のマウス、ヒト first-strand cDNA から標準的な Taq ポリメラーゼを用いて

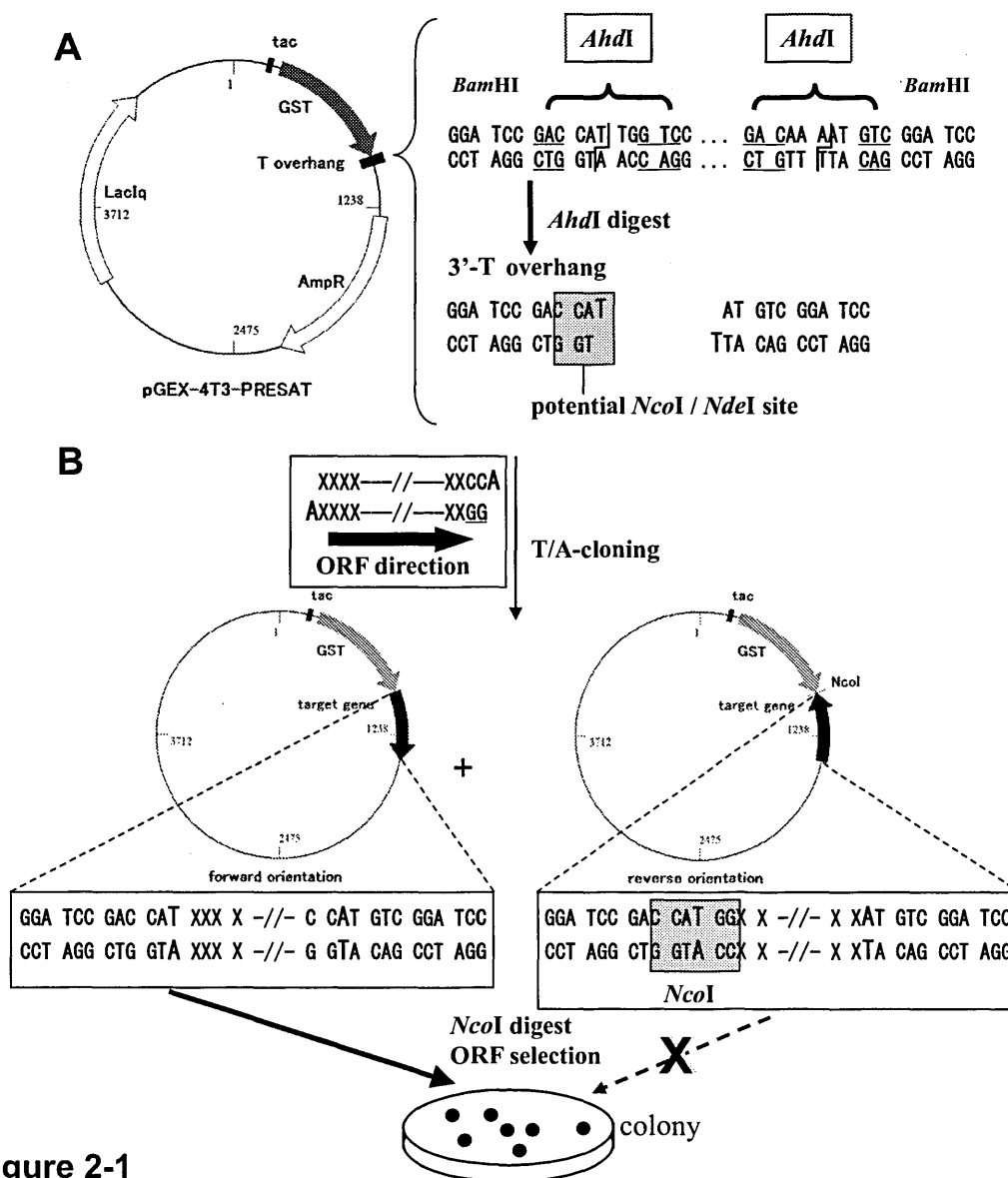


Figure 2-1

Concept of the asymmetric directional T-vector.

(A) Construction of pGEX-4T3-PRESAT and direct cloning of PCR product in pGEX-4T3-PRESAT. (B) The schematic representation of the ORF selection method using potential restriction enzyme site. The figure illustrates the case in which *NcoI* is chosen as the second restriction enzyme for selection. The rear PCR primer is designed with 5'-GG at the 5' end, so that only the ligated plasmid with insert in the reverse orientation will have the *NcoI* site at the TA-cloning position. For *NdeI* selection, the rear primer with 5'-ATG is used instead of the 5'-GG primer.

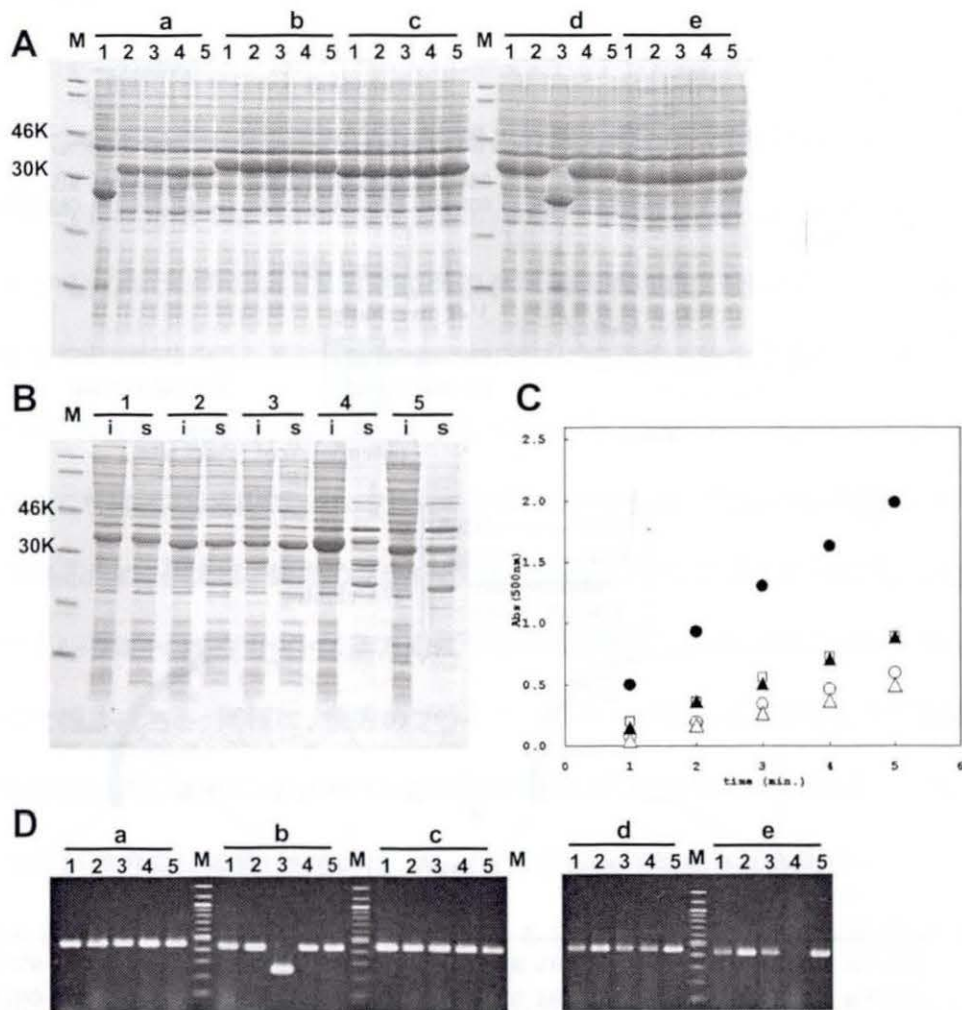


Figure 2-2

Parallel construction of the five putative protein domains as GST-fusion proteins.

(A) Overexpression of GST-fusion proteins. Whole-cell extract of randomly selected *E. coli* BL21(DE3) colonies carrying recombinant plasmid were analyzed on 15% SDS-PAGE. (Lane M) Molecular standard, (lanes a1-a5) yeast Vps4, (lanes b1-b5) human Vps4b, (lanes c1-c5) mouse Vps4b, (lanes d1-d5) human Snx15a, (lanes e1-e5) mouse Snx15a. (B) Analysis of soluble and insoluble fractions of the GST-MIT fusion proteins. s and i represent soluble and insoluble fractions, respectively. (Lane 1) Yeast Vps4, (lane 2) human Vps4b, (lane 3) mouse Vps4b, (lane 4) human Snx15a, (lane 5) mouse Snx15a. (C) colorimetric CDNB assay of soluble fractions of the five GST-MIT fusion proteins. (Open circle) Human Vps4b, (filled circle) mouse Vps4b, (open triangle) yeast Vps4, (open square) human Snx15a, (filled triangle) mouse Snx15a. (D) Colony PCR analysis of the randomly selected colonies carrying GST-MIT fusion vector. (Lanes a1-a5) Human Vps4b, (lane b1-b5) human Snx15a, (lanes c1-c5) yeast Vps4, (lanes d1-d5) mouse Vps4b, (lane e1-e5) mouse Snx15a.

PCR で増幅し、直鎖状にした pGEX-4T3-PRESAT へ挿入、ライゲーション反応を行った。ライゲーション後の混合液で大腸菌 DH5α を形質転換し、正しい方向の ORF のプラスミドと逆方向の ORF のプラスミドを持つ大腸菌が混在した状態で液体培地で培養し、増幅したプラスミドを

調製した。次に、目的の方向に挿入されたDNAを持つプラスミドの選別のために、調製したプラスミドを *NcoI* で切断し、それを BL21(DE3) へ導入した。5 種類のコンストラクトそれぞれから、5 個の大腸菌コロニーを単離し、蛋白質発現実験に用いた。SDS-PAGE で分析したところ、25 コロニーのうち 23 コロニー(すなわち 92%) が期待した分子量の融合蛋白質を発現していた (Figure 2-2A)。次に、期待した分子量の GST 融合蛋白質を発現したそれぞれのコロニーの、発現した蛋白質の溶解度の分析を行った。溶解度の分析は、大腸菌溶解液、超音波破碎後の可溶性画分と不溶性画分に含まれる蛋白質を、それぞれ SDS-PAGE と CDNB assay の両方で行った (Figure 2-2B, C)。これまでの実験とは別に、5 種類のコンストラクトのそれぞれ 5 つのコロニーについて、コロニーPCR 法によってインサートを持たないライゲーション産物の割合を分析した (Figure 2-2D)。25 のコロニーのうち 23 (すなわち 92%) のコロニーが、目的の遺伝子断片に等しい長さのインサートが入ったプラスミドを持つことが分かった。それゆえに、この PRESAT 法を用いることで、期待した融合蛋白質を発現する正しい方向に遺伝子がつながったプラスミドを高効率に得ることができ、不必要な陰性クローンの分析の手間を大きく減少させることができるため、クローニングの費用と時間の節約することができた。

クローニングした *mVps4b* MIT ドメインの NMR サンプルの調製

安定同位体標識 GST-MIT 融合蛋白質を調製するために、pGST-PRESAT-MIT(*mVps4b*)をもつコロニーを唯一の窒素源として $^{15}\text{N-NH}_4\text{Cl}$ を含む M9 最少培地で培養した。発現した融合蛋白質は、GSH アフィニティクロマトグラフィーで精製し、スロンビンで GST と MIT ドメインの間を切断し、陰イオン交換クロマトグラフィーを用いて目的の MIT ドメインを単離した。*mVps4b* の MIT ドメインの標識効率、 ^1H - ^{15}N HSQC スペクトルによって示した (Figure 2-3)。90% 以上の主鎖のアミド由来の良く分離しシャープなシグナルが得られ、MIT ドメインは単量体ドメインの構造であることが示された。その後、ヒト *Vps4b* MIT について構造解析を進め、立体構造決定がなされた (24, PDB ID: 1WE0)。

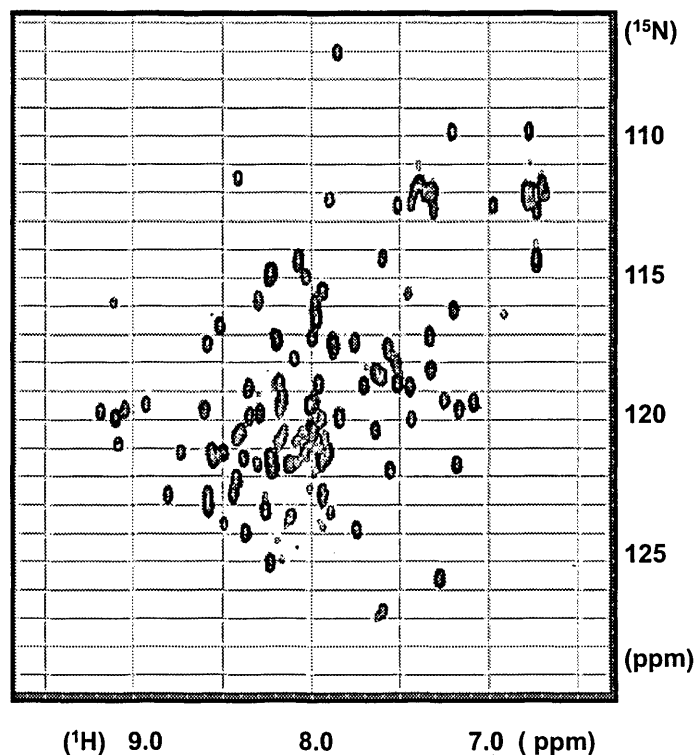


Figure 2-3

An example of ^1H - ^{15}N HSQC spectra of a purified MIT domain of mouse Vps4b obtained by this method.

^1H - ^{15}N HSQC spectra was acquired with eight transients and 256 increments according to echo-antiecho method at 25 °C, nad processed with nmrPipe.

PRESAT-vector の可溶性蛋白質発現系構築のための HTS への応用

二つの *AhdI* サイトを持つリンカーを用いることで、どんな宿主の発現ベクターでも非対称 T-ベクターに変換することができるため、*PRESAT-vector* の選別法は一般的に適用可能である。本研究では、バクテリアの粗抽出物中で組み換え融合蛋白質の検出が容易であることから、大腸菌の GST 融合蛋白質発現系(17)を選んだ。可溶性の細胞抽出物中の GST 融合蛋白質の量は、比色 CDNB assay によって容易に見積もることができる。CDNB assay によって見積もった可溶性画分の GST 融合蛋白質の量は、SDS-PAGE での結果と正確に一致するものではなかったが(Figure2-2B, C)、この比色分析法は、96 ウェルプレートを用いた HTS においてはかなり有益な方法である。GST 融合蛋白質の発現ライブラリーを用いた可溶性融合蛋白

質を選別するための HTS において、伝統的な T-ベクター法を適用した場合は、インサートが逆方向に接続したプラスミドから生じる副産物による偽陽性の結果が多く生じることになる。しかし、PRESAT-vector 法では、目的の方向にインサートが接続し、可溶性の GST 融合蛋白質をコードしたプラスミドをもつコロニーが 90%以上の高効率で単離できた。

TA-クローニングのライゲーション効率は非常に高いことが知られており、興味がある蛋白質の可溶性の領域を得るための HTS に PRESAT-vector 法の使用は非常に有用であると考えられる (Figure 2-3)。本章で述べた方法を応用することで、96 ウェルプレートと溶液を扱うことができる装置を用いて研究室レベルで自動化することが可能である。緑色蛍光蛋白質 (GFP) (25, 26) や、 β ガラクトシダーゼ (27) などを融合相手とした、*in vivo*、*in vitro* での比色法を用いた HTS 法のアイデアは、これまでもいくつか提案されている。しかし、GST 融合蛋白質は、GSH ビーズを用いてアフィニティ精製が簡単に行える、*in vitro* での生化学的なりガンド結合実験に適している、安定同位体標識の NMR サンプル調製のような構造生物学に用いるだけの量の蛋白質を大腸菌で発現させることができるという点で、有益である。

結論

第 2 章では、PRESAT-vector を用いた PCR クローニング法の使用の実行可能性と適応性について述べた。PRESAT-vector を用いた組み換え蛋白質発現系の構築では、高効率の ORF 方向選択が可能であり、ベクター構築における費用と時間の抑制につながることを示した。PRESAT-vector 法は、ハイスループットな構造・機能プロテオミクス研究において、大きな潜在能力を秘めている。

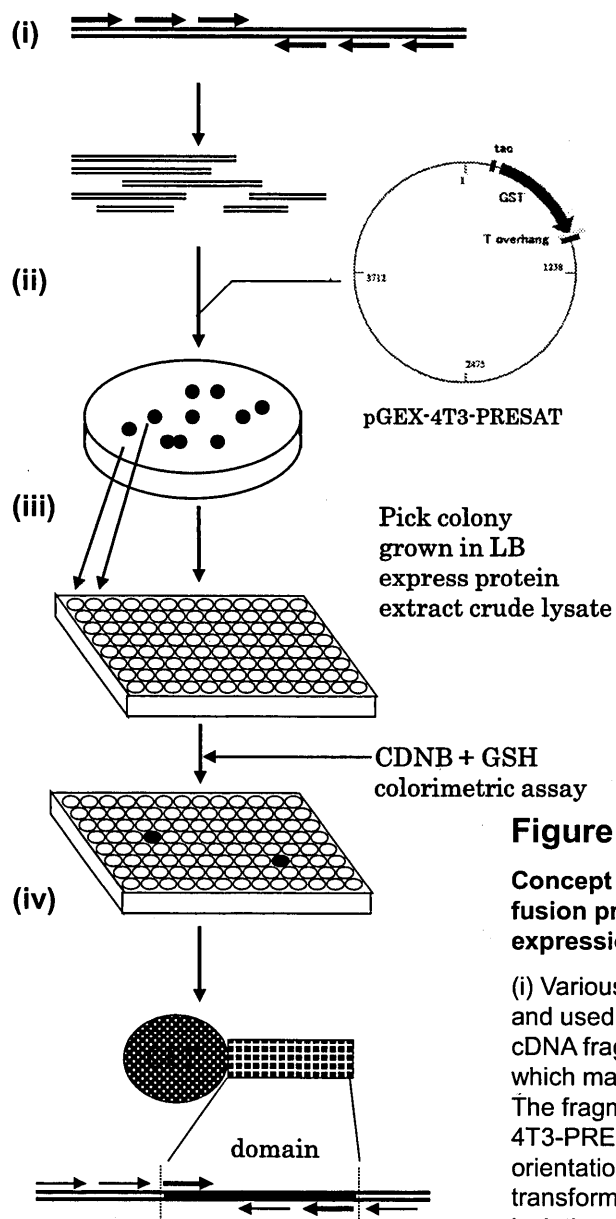


Figure 2-4

Concept of HTS for the soluble GST-fusion proteins from protein expression libraries.

(i) Various PCR primers were designed and used to amplify a series of partial cDNA fragments of the protein of interest, which may contain a putative domain. (ii) The fragments are inserted into pGEX-4T3-PRESAT vector, selected for ORF orientation by restriction cleavage, and transformed into *E. coli* for colony isolation. (iii) Deep 96-well format plates are used to culture individual clones to allow expression of the GST-fusion proteins. (iv) The clone displaying the highest CDNB assay signal will be selected for further analysis.

参考文献

12. Wakeland, E. K., and Wandstrat, A. E., Analyzing genomes: current realities and future possibilities, *Curr Opin Immunol* 14 (2002) 622-626.
13. Yokoyama, S., Hirota, H., Kigawa, T., Yabuki, T., Shirouzu, M., Terada, T., Ito, Y., Matsuo, Y., Kuroda, Y., Nishimura, Y., Kyogoku, Y., Miki, K., Masui, R., and Kuramitsu, S., Structural genomics projects in Japan. *Nat Struct Biol* 7 Suppl (2000) 943-945.
14. Burley, S. K., and Bonanno, J. B., Structural genomics of proteins from conserved biochemical pathways and processes. *Curr Opin Struct Biol* 12 (2002) 383-391.
15. Phizicky, E., Bastiaens, P. I., Zhu, H., Snyder, M., and Fields, S., Protein analysis on a proteomic scale. *Nature* 422 (2003) 208-215.
16. Zhou, M. Y., and Gomez-Sanchez, C. E., Universal TA cloning. *Curr Issues Mol Biol* (2000) 1-7.
17. Kaufman, D. L., and Evans, G. A., Restriction endonuclease cleavage at the termini of PCR products. *Biotechniques* 9 (1990) 304-306.
18. Holton, T. A., and Graham, M. W., A simple and efficient method for direct cloning of PCR products using ddT-tailed vectors. *Nucleic Acids Res* 19 (1991) 1156.
19. Marchuk, D., Drumm, M., Saulino, A., and Collins, F. S., Construction of T-vectors, a rapid and general system for direct cloning of unmodified PCR products. *Nucleic Acids Res* 19 (1991) 1154.
20. Papp, T., Kirchner, S., Diener, U., Jafari, M., Golka, A., and Schiffman, D., Cloning of PCR fragments with a modified M13mp18 T-vector. *Trends Genet* 11 (1995) 169.
21. Cha, J., Bishai, W., and Chandrasegaran, S., New vectors for direct cloning of PCR products. *Gene* 136 (1993) 369-370.
22. Kwak, J. H., and Kim, M. Y., Construction of T-vector for direct cloning and expression of cloned genes in Escherichia coli. *Anal Biochem* 228 (1995) 178-180.
23. Borovkov, A. Y., and Rivkin, M. I., XcmI-containing vector for direct cloning of PCR products. *Biotechniques* 22 (1997) 812-814.
24. de Vries, E., pUCPCR1. A vector for direct cloning of PCR products in a double XcmI restriction site offering compatible single 3'-overhanging T residues. *Mol Biotechnol* 10 (1998) 273-274.
25. Ichihara, Y., and Kurosawa, Y., Construction of new T vectors for direct cloning of PCR products. *Gene* 130 (1993) 153-154.
26. Ido, E., and Hayami, M., Construction of T-tailed vectors derived from a pUC plasmid: a rapid system for direct cloning of unmodified PCR products. *Biosci Biotechnol Biochem* 61 (1997) 1766-1767.
27. Jeung, J. U., Cho, S. K., Shim, K. S., Ok, S. H., Lim, D. S., and Shin, J. S., Construction of two pGEM-7Zf(+) phagemid T-tail vectors using AhdI-restriction endonuclease sites for direct cloning of PCR products. *Plasmid* 48 (2002) 160-163.
28. Smith, D. B., and Johnson, K. S. 1988. Single-step purification of polypeptides expressed

- in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. *Gene* 67 (1998) 31–40.
29. Zoller, M. J., and Smith, M., Oligonucleotide-directed mutagenesis: a simple method using two oligonucleotide primers and a single-stranded DNA template. *Methods Enzymol* 154 (1987) 329–350.
 30. Neri, D., Szyperski, T., Otting, G., Senn, H., and Wuthrich, K., Stereospecific nuclear magnetic resonance assignments of the methyl groups of valine and leucine in the DNA-binding domain of the 434 repressor by biosynthetically directed fractional ¹³C labeling. *Biochemistry* 28 (1989) 7510–7516.
 31. Palmer, A. G., Cavanagh, J., Wright, P. E. , and Rance, M., Sensitivity improvement in proton-detected two-dimensional heteronuclear correlation spectroscopy. *J. Magn. Reson.* 93 (1991) 151–170.
 32. Kay, L. E. , Keifer, P. , and Saarinen, T., Pure absorption gradient enhanced heteronuclear single quantum correlation spectroscopy with improved sensitivity. *J. Am. Chem. Soc.* 114 (1992) 10663–10665.
 33. Delaglio, F., Grzesiek, S., Vuister, G. W., Zhu, G., Pfeifer, J., and Bax, A., NMRPipe: a multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes. *J Biomol NMR* 6 (1995) 277–293.
 34. Ciccarelli, F. D., Proukakis, C., Patel, H., Cross, H., Azam, S., Patton, M. A., Bork, P., and Crosby, A. H., The identification of a conserved domain in both spartin and spastin, mutated in hereditary spastic paraplegia. *Genomics* 81 (2003) 437–441.
 35. Takasu, H., Jee, J.G., Ohno, A., Goda, N., Fuliwara, K., Tochio, H., Shirakawa, M., Hiroaki, H., Structural characterization of the MIT domain from human Vps4b. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 334 (2005) 460–465.
 36. Waldo, G. S., Standish, B. M., Berendzen, J., and Terwilliger, T. C., Rapid protein-folding assay using green fluorescent protein. *Nat Biotechnol* 17 (1999) 691–695.
 37. Kawasaki, M., and Inagaki, F., Random PCR-based screening for soluble domains using green fluorescent protein. *Biochem Biophys Res Commun* 280 (2001) 842–844.
 38. Wigley, W. C., Stidham, R. D., Smith, N. M., Hunt, J. F., and Thomas, P. J., Protein solubility and folding monitored in vivo by structural complementation of a genetic marker protein. *Nat Biotechnol* 19 (2001) 131–136.

第3章

PRESAT-vector を用いた研究 1 ～細胞への蛋白質導入系への応用～

3-1 生細胞への蛋白質導入と可視化のための LBT/PTD タグ融合蛋白質発現ベクターの開発

3-1-1 序論

外来蛋白質を細胞膜を超えて細胞内へ導入する方法は、蛋白質治療における鍵となる技術である(1)。小さな分子やペプチドと異なり、蛋白質は動物細胞の細胞膜の外側から細胞内へ浸透することができるだけである。蛋白質導入ドメイン(protein transduction domain; PTD)として知られている、HIV-TAT(2,3)、Drosophila antennapedia の DNA 結合ヘリックス(4)、合成ポリアルギニンペプチド(5)などのいくつかのアルギニンに富むペプチド配列は、蛋白質導入における運び手としての役割を果たす。最もよく知られている PTD の一つである HIV-TAT(49-57, RKKRRQRRR)は、臨床応用への発展を目標として細胞生物学的研究に広く使用されている。HIV-TAT(49-57)は、120 kDa までの様々な分子量の蛋白質を導入できることが知られており(6)、また蛋白質の N 末端、C 末端どちらに融合した場合でも活性を持つ(7)。この技術の研究における主な難点は、ベクターの構築と融合蛋白質の精製が面倒なことである。

細胞への蛋白質導入実験において、導入した蛋白質を検出する方法が問題である。蛋白質の取り込みの進行をモニターするためには、蛍光標識抗体、化学修飾、緑色蛍光蛋白質などを用いた蛋白質の蛍光の検出が必要である。近年、様々なランタニドに Kd 57 nM から 4 μ M の範囲で結合するようにデザインされた 17 アミノ酸のランタニド結合タグ(Lanthanide binding tag; LBT)が開発された(8, 9)。Tb³⁺の場合、LBT-ランタニド複合体は蛍光シグナル

($\lambda_{\text{ex}}=277 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}}=540 \text{ nm}$)の上昇が生じるため、LBT-融合蛋白質の検出に使用することができる。

本章では、バクテリアで発現させ、動物細胞に導入できる LBT/PTD タグ融合蛋白質について述べる。加えて、ヘパリンアフィニティークロマトグラフィーと、 Ni^{2+} アフィニティークロマトグラフィーを用いた簡単な3ステップ精製法を確立した。また、LBT/PTD タグ融合蛋白質発現ベクターのクローニングサイトは、PRESAT-vector 法(10)を基にした方向性を持ったPCRクローニングが可能ないように設計した。LBT/PTD タグ融合系の発現、精製、細胞への導入、細胞内での可視化の能力は、GST をモデル蛋白質として用いた実験によって示した。

3-1-2 実験

実験に用いた試薬

制限酵素 *AhdI*、*KpnI*、*NdeI*、*XhoI*、*BamHI* は、New England Biolabs のものを使用した。ライゲーションとDNAの精製には、T4 DNA ligase、Wizard plus SV Minipreps DNA purification System、Wizard SV Gel and PCR Clean-up System (すべて Promega)を用いた。オリゴヌクレオチドプライマーは、北海道システムサイエンスに合成を依頼した。発現用プラスミドは、pGEX-4T3 (GE Healthcare)を改変して用いた。PCR クローニングには、*rTaq* (TAKARA)を使用し、PCRの鋳型として、GST は pGEX-4T3 を、Ubiquitin は変異 Ubiquitin 遺伝子を含むプラスミド(11)を用いた。

ベクター構築

N 末端に LBT タグ(MGYIDTNNDGWYEGDELLA)、続いて非対称な二つの *AhdI* サイトを持つ PRESAT リンカーをコードしているプラスミドは、pET-TRX-PRESAT(11)を基にして TRX-His6 の部分を LBT に置き替えた pET-LBT-PRESAT を作製した。

TAT ペプチド(YGRKKRRQRRR-stop)をコードする合成オリゴヌクレオチド二本鎖を、

pGEX-4T3 の GST の C 末端側の *Bam*HI と *Xho*I サイトの間に接続し、GST 遺伝子の 5' 末端の開始コドンのところに、新たな *Nde*I サイトを作った pGEX-GST-PTD^{TAT} を作製した。次に、両末端に *Nde*I サイトを持つ LBT をコードした遺伝子断片を pGEX-GST-PTD の GST 遺伝子の 5' 末端側へ挿入し、pGEX-LBT-GST-PTD^{TAT} を作製した。

次に、*AmpR* 遺伝子中の *Ahd*I サイトを GeneEditor (Promega) を用いた点変異導入によって破壊した。その後、pET-LBT-PRESAT の LBT-PRESAT の部分を *Nde*I-*Bam*HI で切り出し、pGSX-GST-PTD の LBT-GST の部分と入れ替えた pGEX-LBT-PRESAT-PTD^{TAT} を作製した。

pGEX-LBT-PRESAT-PTD^{TAT} は、*Ahd*I で切断することで、非対称 TA クローニングが行える。これを用いて、マウス ubiquitin 変異体 (L8A/I44A/V70A/D77; Ub^M) と、マウス neurotrophin receptor p75 death domain (336-420; NTR^{DD}) のクローニングを行った。

蛋白質調製

それぞれの蛋白質発現用ベクター (pGEX-LBT-GST-PTD^{TAT}、pGEX-GST-PTD^{TAT}、pGEX-LBT-Ub^M-PTD^{TAT}、pGEX-LBT-NTR^{DD}-PTD^{TAT}) を導入した大腸菌 BL21 (*DE3*) を LB-グルコース培地で 30°C で培養した。培養液の細胞密度が OD₆₀₀ がおよそ 0.4 となったところで IPTG (1 mM) を添加し、組み換え蛋白質の発現を誘導した。その後 20°C で約 24 時間培養し、集菌した。菌体は、破碎緩衝液 [50 mM リン酸ナトリウム (pH 7.4)、300 mM NaCl] 中で超音波破碎を行い、遠心分離によって不溶性画分を除去した。LBT/PTD 融合蛋白質は、Heparin-Sepharose Fast Flow (GE Healthcare)、Ni²⁺ アフィニティークロマトグラフィー、Heparin-Sepharose Fast Flow の順に連続したアフィニティークロマトグラフィーによって精製した。まずはじめに、細胞抽出液を Heparin-Sepharose カラムに添加し、[50 mM リン酸ナトリウム (pH 7.4)、300 mM NaCl] でカラムを洗った後、[50 mM リン酸ナトリウム (pH 7.4)、1 M NaCl] でカラムに結合した蛋白質を溶出した。次に、溶出液を Ni²⁺ イオンキレートカラムにアプライし、

同じ緩衝液で洗浄後、[50 mM リン酸ナトリウム(pH 7.4)、0.1 M イミダゾール]でカラムに結合した蛋白質を溶出した。最後に、 Ni^{2+} イオンキレートカラムからの溶出液を、もう一度 Heparin-Sepharose カラムに添加し、はじめと同様に洗浄、溶出した。またこれとは別に、LBT-GST-PTD^{TAT} を、一般的なプロトコールに従って glutathione-sepharose Fast Flow をもちいた GST アフィニティークロマトグラフィーでも精製を行った。 Tb^{3+} キレート LBT-GST-PTDTAT は、精製後の 100 μM の蛋白質溶液に、 Tb^{3+} ストック溶液(10 mM となるように水にとかしたものを)、50 μM となるように加えて調製した。 Tb^{3+} の濃度を蛋白質濃度の半分にしたのは、フリーの Tb^{3+} が細胞に影響を与えるのを防ぐためである。

細胞株

実験には、HeLa と NIH3T3 を用いた。これらの細胞は、10 %(v/v)ウシ胎児血清、100 unit/mL のペニシリンとストレプトマイシンを加えた Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)用いて、37°C、5 % CO_2 の環境下で培養した。

細胞への蛋白質導入

HeLa 又は NIH3T3 を 6 ウェルディッシュ(SUMILON)で 30%コンフルエントになるまで培養し、1-2 μM となるように精製した組み換え蛋白質を加えた DMEM に培地を交換した。その後 5 時間培養を継続し、PBS で 2 回洗浄後、トリプシンを用いて細胞を剥離した。ディッシュから剥離した細胞を一度 PBS に懸濁し、細胞数を数えた後、それぞれの細胞数が 10^6 となるように調整して細胞を回収した。それぞれの細胞を、50 μL の細胞溶解液[0.1 M Tris-HCl (pH 7.5), 1% SDS, 1% 2-メルカプトエタノール]に溶解した。調製した細胞溶解物の SDS-PAGE を行い、PVDF 膜に転写後、細胞内に含まれる GST 融合蛋白質を 20,000 倍希釈の anti GST 抗体 (Nacalai tesque)、続いて HRP 標識 anti mouse IgG 抗体(Promega)で検出し、ECL-plus (GE Healthcare)を用いて可視化した。

また、別に回収した細胞を CellLytic M solution (Sigma)を用いて溶解し、1 mg のイソペプチダーゼ-T (iso-T, UBP5, BIOMOL International, PA)を加えて 37°Cで 2 時間置いた。また、iso-T を加えていない対象サンプルは、氷上で 2 時間置いた。その後、これらのサンプルも、上記と同様にウエスタンブロットにより検出した。

蛍光顕微鏡による観察

35 mm ディッシュにカバーガラス(Matsunami)を入れたものまたは、35 mm のガラスボトムディッシュ(Matsunami)に細胞を 30%コンフルエントになるまで培養した。これに、Tb³⁺フリーまたは Tb³⁺をキレートさせた組み換え蛋白質を終濃度 2 mM となるように加えた DMEM を用いて、上記と同様に細胞への蛋白質導入を行った。5 時間後、細胞を PBS で二回洗浄し、メタノール中に、-20°C、20 分間置き、細胞をガラスに固定した。固定後、0.1% Tween20を含む TBS で 2 回洗浄し、0.1% Tween20、1% ウシ胎児血清を含む TBS で希釈した anti GST 抗体に浸し、4°Cで一晩置いた。洗浄後、同様の TBS で希釈した二次抗体(Cy3TM-conjugate anti mouse IgG antibody, SIGMA)に室温で 1 時間反応させ、TBS で洗浄した後、Prolong Antifade mounting medium (Molecular Probes)を用いて封入した。また、Tb³⁺キレート LBT-GST-PTD^{TAT}を導入したサンプルでは、固定後、DAPI(10 ng/ml)を加えた PBS に 5 分間浸した後、封入した。また、ガラスボトムディッシュで培養した細胞を用いた実験では、細胞を PBS で洗った後、固定せずにそのまま細胞を観察した。

細胞内へ入った蛋白質の観察は、蛍光顕微鏡(IX71, DP70 color CCD camera system; OLIMPUS)を用いて行った。Tb³⁺由来の蛍光の観察には、UV-excited/wide range VIS-emitted mirror unit (U-MWU2, OLYMPUS)を用いた。

3-1-3 結果と考察

LBT/PTD タグ PRESAT ベクターの構築

LBT/PTD タグ PRESAT ベクターのマップと、PCR で増幅した DNA 断片の方向性を持った TA クローニング法の概要を Figure3-1-1 に示した。遺伝子は、PRESAT ベクターを *AhdI* で切断することでできた二つの 3'-T 突出末端部の間に接続する。前方のプライマーはと後方プライマーは、それぞれ LBT と TAT の遺伝子とフレームが合うように、終始コドンなしで設計した。加えて、*KpnI* 処理によって、目的の方向の ORF を選別するために、後方プライマーの 5' 末端に 5'-ACC を付加した(Figure3-1-1b)。PCR 産物が反対方向にベクターとつながった場合、そのベクターは *KpnI* によって切断されるため形質転換後にこのベクターを持つ大腸菌のコロニーは生じない。その他の条件は、第 2 章で作製した pGEX-4T3-PRESAT と同様の条件を適応した(10)。

LBT/PTD 融合蛋白質のアフィニティ精製

LBT/PTD 融合蛋白質全般に広く適用できる精製法を開発するために、TAT などの PTD がヘパリンへ結合し(12, 13)、LBT が Ni^{2+} キレートカラムに結合することに注目した。Franz らの研究では、Hisx6 タグに近接した Tb^{3+} キレート LBT の蛍光が Ni^{2+} イオンにより干渉されることを示しており、これは Ni^{2+} が LBT に直接結合していることを示唆する結果である(9)。実際、大腸菌抽出物から蛋白質を純度良く精製するには十分な結合力ではないものの、LBT-GST、LBT-GST-PTD^{TAT}(Figure3-1-1a, lane 3)が Ni^{2+} キレートカラムに結合することがわかった。そのため、LBT/PTD 融合蛋白質、LBT-GST-PTD^{TAT}、の精製二つのアフィニティクロマトグラフィー法を組み合わせた精製法を採用した。Heparin-Sepharose、次に Ni^{2+} -chelating Sepharose カラムにより精製を行ったところ、SDS-PAGE でメインバンドになる位に純度良く精製することができた(Figure3-1-2a lane 3)。次に、さらなる精製しと、蛋白質溶液に含まれるイミダゾールと Ni^{2+} イオンを除くために、 Ni^{2+} -chelating Sepharose カラムから溶出したサンプルを、

再び Heparin-Sepharose カラムで精製した。その結果、heparin-Ni²⁺-heparin アフィニティカラムにより精製した LBT-GST-PTD^{TAT} は、glutathione-Sepharose カラムで同じ蛋白質を精製した時(Figure3-1-2a lanr 4, 6)と比べて、十分な純度で得られた。

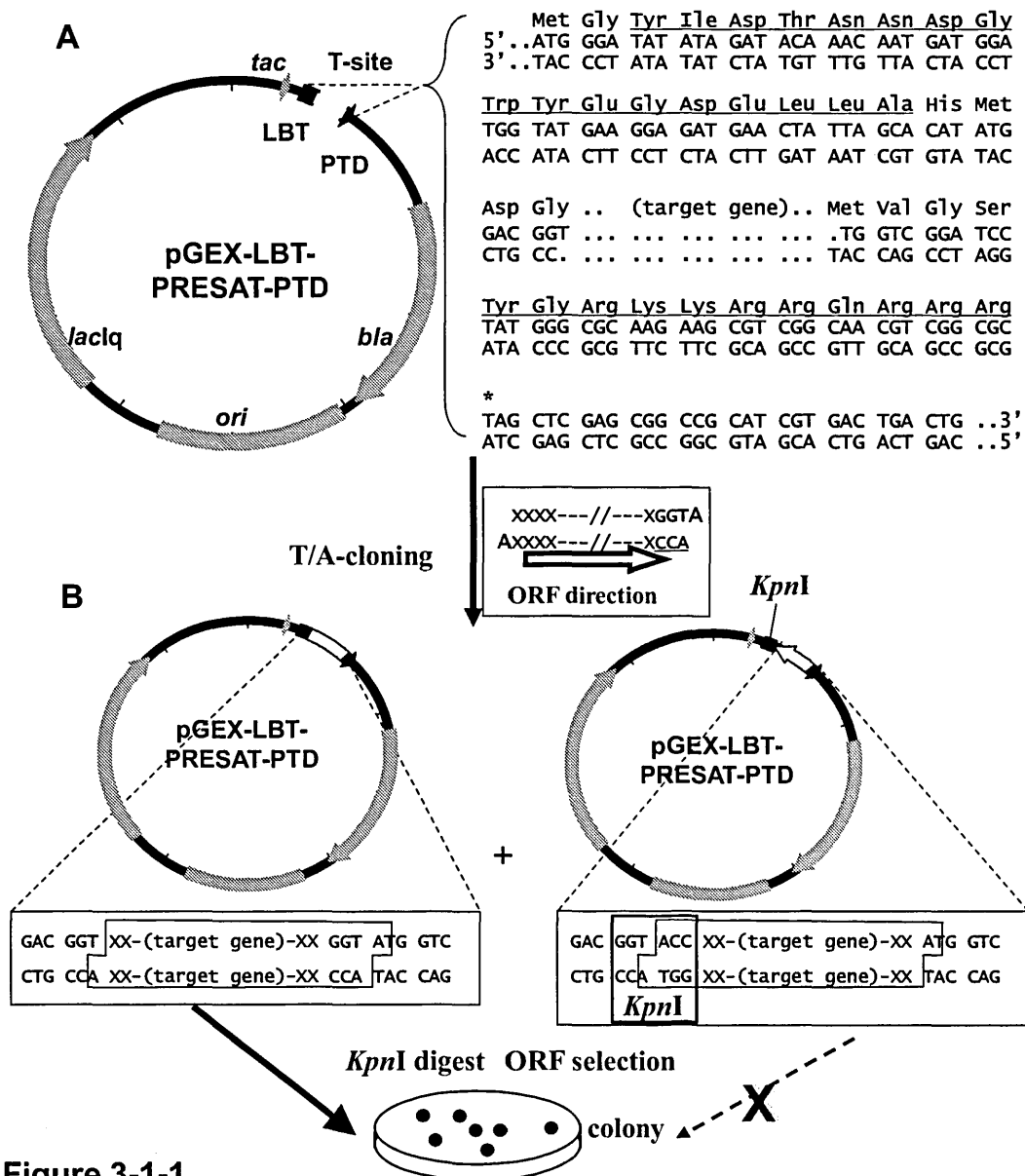


Figure 3-1-1

Construction of the LBT/PTD-dual-tagged PRESAT-vector.

(A) Vector map of pGEX-LBT-PRESAT-PTD after *AhdI* digestion. The amino acid sequences corresponding to LBT and PTD^{Tat} are underlined. (B) Schematic representation of the unidirectional TA-cloning of the PCR fragment into pGEX-LBT-PRESAT-PTD^{Tat}. The gene is cloned and further subjected to ORF selection by *KpnI* treatment. The rear PCR primer is designed with an addition of 5'- ACC at the 5' terminus, so that only the ligated plasmid with the insert in the reverse orientation will have the *KpnI* site at the TA-cloning position.

HeLa 細胞、NIH3T3 細胞への LBT/PTD タグ融合 GST の導入

LBT-GST-PTD^{TAT} の C 末端に融合した HIV-Tat PTD タグは、効果的に細胞内へ蛋白質を導入することがこれまでも示されている。LBT-GST-PTD^{TAT} と GST をそれぞれ HeLa と NIH3T3 の培地に加え、培養した。その後、トリプシン処理によって細胞をディッシュから剥離し、細胞表面に吸着した蛋白質を PBS で洗い、導入した蛋白質の分析に用いた。ウエスタンブロットの結果、HIV-TAT ペプチドを融合した GST のみが細胞内へ取り込まれていることが示された(Figure3-1-2b)。

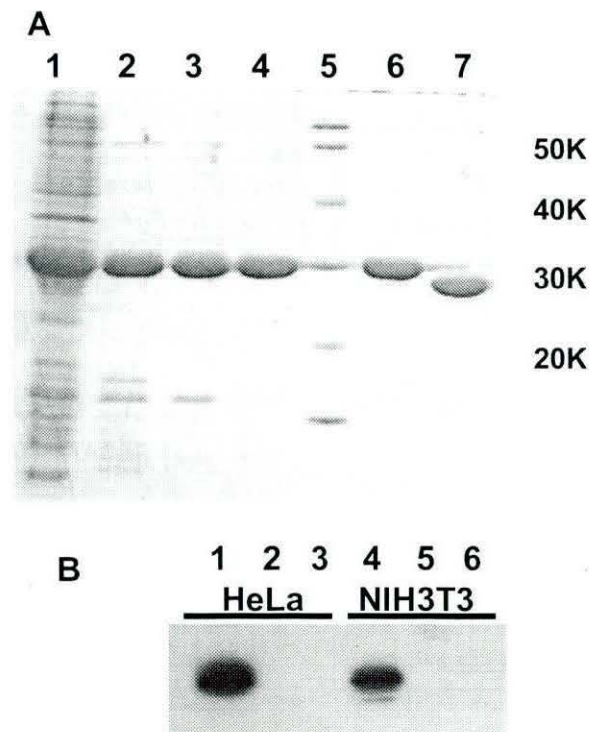


Figure 3-1-2

Purification of LBT-GST-PTD^{Tat} by different affinity chromatography (A) and its delivery to HeLa and NIH3T3 cells (B).

(A) 15 % SDS-PAGE showing the purification step of LBT-GST-PTD^{Tat}. lane 1, crude extract, lane 2, eluent from the first heparin Sepharose, lane 3, eluent from Ni²⁺-chelating Sepharose, lane 4, eluent from the second heparin Sepharose, lane 5, molecular weight marker, lane 6, LBT-GST-PTD^{Tat} purified by glutathione-Sepharose, lane 7, GST purified by glutathione-Sepharose (as a control). (B) Western blotting of LBT-GST-PTD^{Tat} recovered from HeLa and NIH3T3 cells after cellular protein delivery experiments. Approximately 10⁶ cells were collected after incubation with different proteins, disrupted, electrophoresed, blotted and detected by anti GST antibody. lane 1, HeLa with LBT-GST-PTD^{Tat}, lane 2, HeLa with GST, lane 3, HeLa only, lane 4, NIH3T3 with LBT-GST-PTD^{Tat}, lane 5, NIH3T3 with GST, lane 6, NIH3T3 only.

細胞を蛍光顕微鏡で観察すると、LBT-GST-PTD^{TAT} は核の周囲に点状に存在し (Figure3-1-3b)、この結果は、GST-Tat-EGFP を用いた実験で報告された結果とよく似ていた (14)。これは、PTD によって導入した蛋白質のほとんどはエンドサイトーシス小胞内にあり、一部のみが細胞質内まで入ることができるという報告とも一致する結果であった。今回の実験では導入した蛋白質の細胞内での活性は調べなかったけれども、細胞へ導入した蛋白質のウェスタンブロットでは GST 抗体で検出した LBT-GST-PTD^{TAT} 融合蛋白質の一部が高分子量のラダーになっていた (Figure3-1-4a)。この結果は、導入した蛋白質の一部が、導入後、おそらくユビキチン化であると思われる修飾がされていたことを示唆する。細胞抽出物をイソペプチダーゼ T で処理することでこれらの高分子量の蛋白質が減少したことから、この仮説は部分的には証明できた (Figure3-1-4b)。それゆえに、導入した LBT-GST-PTD^{TAT} の一部はユビキチン化などの修飾が起こる細胞質内へ入っていると言える。また、N 末端に LBT を融合した場合でも、HIV-Tat の蛋白質導入活性に影響は見られなかった。

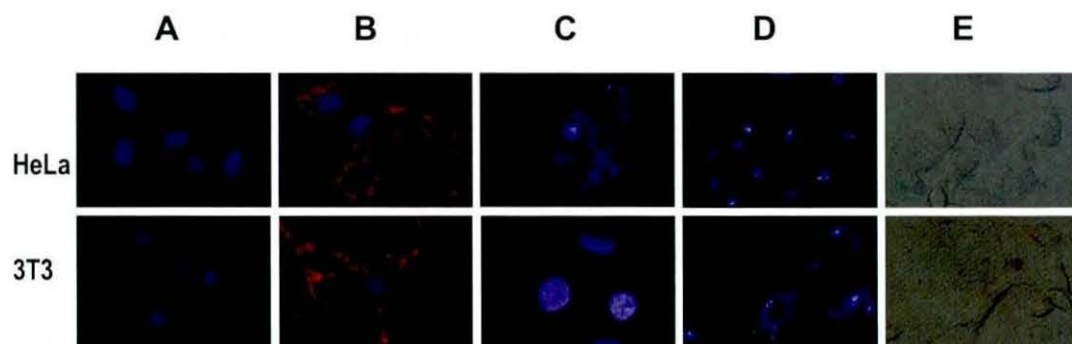


Figure 3-1-3

Protein transduction of Tb³⁺-free and Tb³⁺-chelated LBT-GST-PTD^{Tat} into HeLa (top) and NIH3T3 (bottom) cells.

(A, B) Cells were incubated with 1 mM GST (A) or 1 mM LBT-GST-PTD^{Tat} (Tb³⁺-free) (B). After methanol fixation, the tagged proteins were visualized by anti-GST antibody with Cy3TM-anti mouse IgG antibody, whereas the nuclei were stained by DAPI, and the two images were overlaid. (C-E) Cells were incubated with a mixture of 1 mM Tb³⁺ and 2 mM LBT-GST-PTD^{Tat}, and visualized by Tb³⁺ fluorescence after fixation and DAPI staining (C) or in living cells without fixation (D). Differential interference contrast images of the same region as D (E).

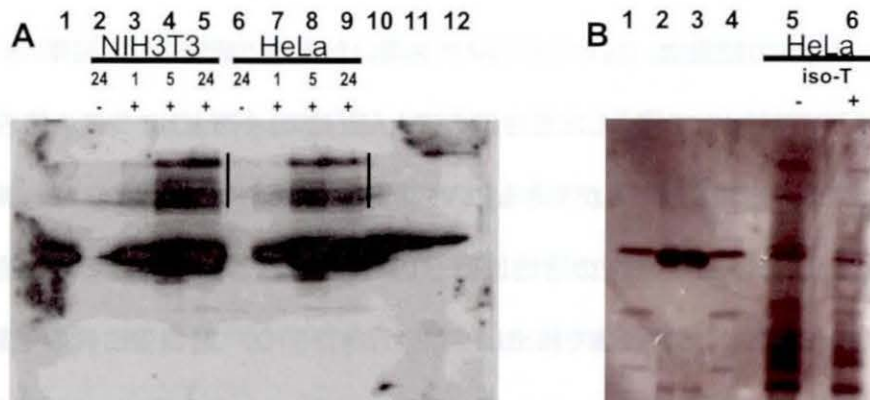


Figure 3-1-4

Western blotting of LBT-GST-PTD^{Tat} recovered from NIH3T3 and HeLa cells after cellular protein delivery experiments.

(A) lane 1, GST alone input (control, 1 pmol), lane 2-5, recovered proteins from NIH3T3, lane 6-9, recovered proteins from HeLa, lane 10-12, LBT-GST-PTD^{Tat} input (control, 1, 0.5, and 0.1 pmol, respectively). lane 2-9, proteins indicated were incubated with the cells for the indicated time (hours). In the lanes 4, 5, 8 and 9, the protein signals of larger molecular weight were marked (black bar). (B) lane 1 and 4, molecular weight marker, lane 2 and 3, GST alone input (control, 5 and 10 ng, respectively), lane 5 and 6, recovered proteins from HeLa without and with isopeptidase-T treatment. In the lane 6, the protein signals of larger molecular weight (black bar) were diminished. In this experiment, endogeneous proteases were not inhibited, resulting the increase of the signals of smaller molecular weight.

Tb³⁺ キレート LBT/PTD タグ蛋白質の HeLa、NIH3T3 細胞への導入と、その蛍光顕微鏡による検出

Tb³⁺ キレート LBT-GST-PTD^{TAT} の蛋白質導入活性と、その蛍光を利用した可視化の実験を行った(Figure3-1-3c)。一般に、ランタニドは毒性があると言われているが、今回の条件では、*Tb³⁺* のみ、または *Tb³⁺* キレート LBT-GST-PTD^{TAT} を加えた培地で HeLa と NIH3T3 を培養しても成長阻害や毒性のようなものは見られなかった。細胞を固定後、核のまわりに点状に *Tb³⁺* キレート蛋白質が存在するがはっきりと観察でき、この局在は、GST 抗体と Cy3TM 標識二次抗体を用いて検出したものと同じであった(Figure3-1-3c)。メタノール固定の後の *Tb³⁺* キレート蛋白質は蛍光顕微鏡で観察すると明るい緑色に見た。これは *Tb³⁺* の蛍光の放射波長(～540 nm)と一致し、DAPI で染色した核の青色と容易に区別できた。また、HeLa と NIH3T3 細胞を固定せずに生きたままで *Tb³⁺* キレート LBT-GST-PTD^{TAT} の蛍光を観察し、その局在パターンは、

固定した細胞とほぼ同じであることが確認できた(Figure 3-1-3d)。蛋白質導入と検出のプロトコルを確立後、GST の代わりに、 Tb^{3+} キレート LBT-Ub^M-PTD^{TAT}、LBT-NTR^{DD}-PTD^{TAT}を用いて同様の実験を行った(Figure 3-1-5)。これらの LBT/PTD 融合蛋白質も、核の周りに点状に見られた。この結果より、PTD 融合蛋白質の局在は、融合する蛋白質による影響は受けていないことが示唆された。また、 Tb^{3+} フリーの LBT-GST-PTD^{TAT} を細胞へ導入、メタノールで細胞を固定後に、 Tb^{3+} 溶液で処理したサンプルでは、蛍光のスポットは見られなかった。

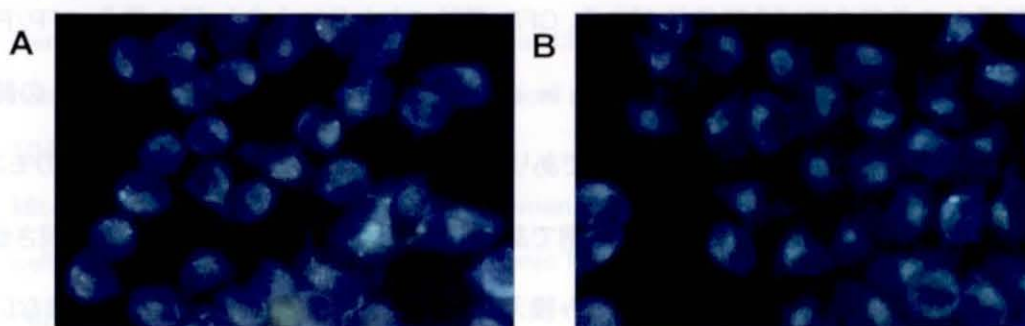


Figure 3-1-5

Protein transduction of Tb^{3+} -chelated LBT-Ub^M-PTD^{Tat} (A) and LBT-NTR^{DD}-PTD^{Tat} (B) into HeLa cells.

Cells were incubated with a mixture of 1 mM Tb^{3+} and 2 mM LBT/PTD dual-tagged proteins, and visualized by Tb^{3+} fluorescence in living cells without fixation similar to Figure 3-3 (D).

既存の方法と比較した場合の、LBT/PTD タグベクターの技術的に有利な点

ここまで、LBT/PTD タグベクターが細胞への蛋白質導入実験において有用であることを示した。LBT タグを開発した研究グループによって示されたように、 Tb^{3+} -LBT の蛍光の使用は、組み込みが容易、蛍光の褪色が起きにくい、サイズが小さいといった他の蛍光試薬に比べて多くの有利な点がある。

フルオレセイン、クマリン、ローダミンのような蛍光試薬を用いた蛋白質の化学標識は、化学反応が非特異的に起こるためにあまり使い勝手が良くない。このような目的のための一般的な手法の一つは、蛍光色素の NHS 誘導体による蛋白質リジン残基の修飾である。HIV-TAT のような複数のアルギニンを持つ PTD ペプチド(5, 15)はリジン残基を含み、このような蛍光色

素による修飾部位となる。加えて、疎水性色素を蛋白質やペプチドへ付加すると、細胞膜への親和性を変化させてしまう可能性がある。また、他の化学的に結合させた蛍光色素に比べて、 Tb^{3+} の蛍光は細胞内で自然褪色が起こりにくいのは特筆すべき点である。

また他に、LBTのサイズが小さい(2 kDa)ことと、 Tb^{3+} フリーLBTのコンフォメーションが固定されていないことは、GFPを基にした技術と比べて以下に述べる点で有利である。まず、GFPとその誘導体は、25 kDaとサイズが大きく、天然では二量体や三量体を取り、これは細胞への蛋白質導入の効率を下げる可能性がある。GFP単独でも十分に大きく、組み換えGFP/PTD融合蛋白質を調製するのは簡単ではない。*in vitro*でのLBT-UbiquitinのHSQCの結果(16)から判断されるように、LBTは単量体であり、導入した蛋白質の細胞内での局在のモニタリングにおいてLBTの使用した方法は有用である。加えて、大腸菌や他の生物で発現させたGFPはそのフォールディングが難しく、組み換えGFP融合蛋白質の調製は簡単ではない場合がある(17)。そして、GFP融合蛋白質をGFPを利用して精製する方法はないが、LBT/PTDタグではそれを利用したアフィニティ精製が可能である。

LBT/PTD タグ融合蛋白質発現ベクターのさらなる応用法

前述したように、LBT/PTD融合蛋白質は細胞内へ入り、エンドソーム様の小胞に補足されているように見えた。 Tb^{3+} -LBTの蛍光が細胞質では拡散しているために観察できなかった可能性があり、そうであれば、導入した蛋白質のうち限られた量だけが細胞質や核のような他の細胞内小器官へ届いているのかもしれない。導入した蛋白質の経路と運命は、まだ明らかにされていない。それにもかかわらず、いくつかの方法では外来蛋白質を核へ届けることに成功している(18)。我々は、導入した蛋白質の運命と最終目的地はその蛋白質のもともとの性質によるのではないかと考えている。LBT/PTD融合タグベクターはハイスループットPCRクローニングに適しており、この手法は細胞への蛋白質導入のメカニズムを確立するための研究にも有用である。

参考文献

1. Langel, U., (Ed.), Cell-Penetrating Peptides: Processes and Applications, *CRC PRESS, Florida*, 2002.
2. Brooks, H., Lebleu, B., Vives, E., Tat peptide-mediated cellular delivery: back to basics, *Adv. Drug Delivery Rev.* (2005) 57, 559–577.
3. Vives, E., Brodin, P., Lebleu, B., A truncated HIV-1 Tat protein basic domain rapidly translocates through the plasma membrane and accumulates in the cell nucleus, *J. Biol. Chem.* (1997) 272, 16010–16017.
4. Derossi, D., Orlowski, A.H., Chassaing, G., Prochiantz, A., The third helix of the Antennapedia homeodomain translocates through biological membranes, *J. Biol. Chem.* (1994) 269, 10444–10450.
5. Mitchell, D.J., Kim, D.T., Steinman, L., Fathman, C.G., Rothbard, J.B., Polyarginine enters cells more efficiently than other polycationic homopolymers, *J. Pept. Res.* (2000) 56, 318–325.
6. Fawell, S., Seery, J., Daikh, Y., Moore, C., Chen, L.L., Pepinsky, B., Barsoum, J., Tat-mediated delivery of heterologous proteins into cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (1994) 91, 664–668.
7. Ryu, J., Han, K., Park, J., Choi, S.Y., Enhanced uptake of a heterologous protein with an HIV-1 Tat protein transduction domains (PTD) at both termini, *Mol. Cells* (2003) 16, 385–391.
8. Nits, M., Franz, K.J., Maglhalin, R.L., Imperiali, B., A powerful combinatorial screen to identify high-affinity terbium(III)-binding peptides, *ChemBioChem* (2003) 4, 272–276.
9. Franz, K.J., Nitz, M., Imperiali, B., Lanthanide-binding tags as versatile protein coexpression probes, *ChemBioChem* 4 (2003) 265–271.
10. Goda, N., Tenno, T., Takashu, H., Hiroaki, H., Shirakawa, M., The PRESATvector: asymmetric T-vector for high-throughput screening of soluble protein domains for structural proteomics, *Protein Sci.* (2004) 13, 652–658.
11. Tenno, T., Goda, N., Tateishi, Y., Tochio, H., Mishima, M., Hayashi, H., Shirakawa, M., Hiroaki, H., High-throughput construction method for expression vector of peptides for NMR study suited for isotopic labeling, *Protein Eng. Des. Sel.* (2004) 17, 305–314.
12. Tyagi, M., Rusnati, M., Presta, M., Giacca, M., Internalization of HIV-1 tat requires cell

- surface heparan sulfate proteoglycans, *J. Biol. Chem.* (2001) 276, 3254–3261.
13. Marty, C., Meylan, C., Schott, H., Ballmer-Hofer, K., Schwechandener, R.A., Enhanced heparan sulfate proteoglycan-mediated uptake of cell-penetrating peptide-modified liposomes, *Cell. Mol. Life Sci.* (2004)61, 1785–1794.
 14. Ferrari, A., Pellegrini, V., Acangeli, C., Fittipaldi, A. Giacca, M., Beltram, F., Caveolae-mediated internalization of extracellular HIV-1 tat fusion proteins visualized in real time, *Mol. Ther.* (2003)8, 284–294.
 15. Futaki, S., Oligoarginine vectors for intracellular delivery: design and cellular-uptake mechanisms, *Biopolymers* (2006) 84, 241–249.
 16. Wohnert, J., Franz, K.J., Nitz, M., Imperiali, B., Schwalbe, H., Protein alignment by a coexpressed lanthanide-binding tag for the measurement of residual dipolar couplings, *J. Am. Chem. Soc.* (2003) 125, 13338–13339.
 17. Siemering, K.R., Golbik, R., Sever, R., Haseloff, J., Mutations that suppress the thermosensitivity of green fluorescent protein, *Curr. Biol.* (1996) 6, 1653–1663.
 18. Wang, W., El-Dery, W.S., Targeting p53 by PTD-mediated transduction, *Trends Biotechnol.* (2004) 22, 431–434.

3-2 細胞への蛋白質導入活性を持つヒトインシュリン様成長因子結合蛋白質 (Insulin-like growth factor binding protein 3, 5 ; IGFBP3, 5)由来ペプチドの同定

3-2-1 序論

インシュリン様成長因子(IGFs)は、細胞増殖、初期発生、代謝の調整、最適成長の達成、アポトーシス阻害において重要な役割を担っている。細胞外環境では、ほとんどの IGFs は特異的で高い親和性の IGF 結合蛋白質(IGFBPs)のファミリーによって調製されている。6 種類の IGFBPs (IGFBP-1 - IGFBP-6)が良く研究されており、IGFs に結合し、IGF の分配、安定性、生物学的活性の調節を行っていることが分かっている (1, 2)。また、IGFs の運び手としての役割の他に、IGFBPsは細胞成長とアポトーシスの唯一の本質的なエフェクターとして、IGF とは独立した活性を持つことが最近の研究で示されている(1)。これらの性質のほとんどは、IGFs と結合する能力とは無関係であると現在のところ信じられており、結果として、これらは IGF レセプターとは独立していると考えられる。これらの IGFBPs の IGF と独立した機能の中で、ガン細胞のアポトーシスと VSM 細胞の移動の生物学的メディエーターが IGFBP-3 と IGFBP-5 であることがいくつかの証拠によって支持されている。これらは、細胞の外から核の中まで膜を超えて移動する(3-9)。

実際、IGFBP-3 は IGFs の生物学的効果を、IGFsを隔離することで直接的に調節し、ヘパリンのような多くの細胞表面の分子に特異的に結合し、続いて条件付き蛋白質分解と IGFBP-3 またはその断片が標的細胞の中へ素早く入るといった独立したメカニズムによって間接的に調節する(1)。細胞内へ入った IGFBP-3 はそれから核内へ輸送され、retinoid X レセプターのような転写因子と結合する(10)。また、培養した骨腫瘍細胞や乳癌細胞へ加えた時、細胞外の IGFBP-5 は細胞内と核へ入る能力があるように見えたと報告されている(11, 12)。細胞成長と分化における IGFBP-5 のリガンドと独立した働きについて、ヒトの骨芽細胞と乳癌で研究されている(13-17)。報告されているところによると、IGFBP-5 は推定上の細胞表面レセプター

に結合すると言われているが、この IGFBP-5 レセプターの分子的な正体は明らかになっていない(18)。どちらの場合でも、IGFBPs の細胞への取り込みの基本的な分子メカニズムの理解は不十分なままである。少数の証拠のみが、IGFBP-3 と IGFBP-5 のレセプター非依存的な導入が caveolae-mediated pathway のようなエンドサイトーシスかもしれないと示唆している。コレステロール、スフィンゴ脂質、カベオリンと呼ばれる構造蛋白質から成るカベオラは、細胞表面上で特殊なフラスコ型の陥入を形成している(19)。トランスフェリンレセプターとカベオリン仲介経路の両方の封鎖は、IGFBP-3 の細胞内への導入を完全に阻害するが、カベオラ組織の特異的な崩壊も同様に、IGFBP-3 のエンドサイトーシスを阻害する(20)。

IGFBP-3 と IGFBP-5 の細胞へエントリーと比べて、それらの核局在はかなりよく説明されており、様々な細胞のモデルで証明されている(10, 21)。事実、IGFBP-3 と IGFBP-5 は二つに分かれたコンセンサス核局在配列を持っており(22)、核への輸送は、importin-factor によって促進される(23)。IGFBP-3 (241-259 残基)、IGFBP-5 (221-238 残基)の核移行シグナル(NLS)に相当するペプチドの配列を EGFP に融合した遺伝子を CHO 細胞に導入した時、EGFP は核へ移行した (23)。これらの領域は、ウイルスや動物の転写因子に見られる二つに分かれた NLS の基準と一致することから、IGFBP-5 は細胞内分泌によって働き、もしかすると、細胞質から核へのリガンドの輸送シャトルの役割を担っていると推測された(24)。興味深いことに、IGFBP-3 と IGFBP-5 の NLS 配列は局所的によく保存されている。加えて、それらは IGFBP-3 と IGFBP-5 のヘパリン結合ドメインと重なった塩基性残基の保存されたクラスターを含んでいる(Figure 3-2-1A) (3, 11, 22, 23)。

HIV-Tat のように、蛋白質の細胞への導入活性と転写のコントロールの両方を行う蛋白質がいくつか知られている。HIV-Tat の 49-57 残基は PTD と呼ばれる強力な蛋白質の細胞への導入活性をもつペプチドとして知られている(25, 26, 27)。HIV-Tat と同様に、*Drosophila antennapedia* の DNA 結合ヘリックス(28)や合成オリゴアルギニンペプチド(29)など、いくつかのアルギニンに富むペプチド配列は蛋白質導入のキャリアーとして働くことができる。実際、

HIV-Tat (49-57 残基)は、分子量 120 kDa までの様々な蛋白質を細胞へ導入することが知られている強力な PTD である(26)。現在、PTD 融合蛋白質の細胞への取り込みの基本的なメカニズムはあまり良くわかっていない。これまでに示された可能性のある経路は、ヘパリン依存的な、一種のマクロピノサイトーシスや、カベオラを介するエンドサイトーシスである。このヘパリン依存的な(またはプロテオグリカン依存的な)経路は、巨大分子の導入経路として広く受け入れられている(30, 31)。蛋白質は、動物細胞へ細胞膜を越えて単に浸透することができるだけである。そのため、蛋白質の細胞への導入技術は、蛋白質治療への応用において大きな可能性を持っている(25)。HIV-Tat PTD を用いた臨床応用の主な欠点は、感染性ウイルス HIV 由来のペプチドだということである。HIV-Tat ペプチドの細胞毒性も報告されており(32, 33)、そのため、生体への利用性が改善された天然由来の PTD が望ましい。新規 PTD の探索のためには、前節で述べた Tb³⁺キレート LBT を用いた PTD タグ融合蛋白質の細胞への取り込みのスクリーニングシステムが利用できる(34)。

ここでは、ヒト IGFBP-3 と IFGBP-5 のヘパリン結合ドメイン(HBs)が十分な PTD 活性を持つことを示す。この実験系は、カーゴ蛋白質として GST にペプチドを融合し、必要に応じて蛍光タグとして N 末端に LBT を融合したものをを用いた(Figure3-2-1B)。また、IGFBP-3/5-PTD タグ融合蛋白質の細胞への基本的なエントリーメカニズムについても議論する。

3-2-2 実験

実験に用いた試薬

制限酵素 *AhdI*, *KpnI*, *NdeI*, *XhoI*, *BamHI* は New England Biolabs Inc. のものを用いた。ライゲーションと DNA の精製には、Promega の T4 DNA ligase、Wizard plus SV Minipreps DNA purification kit、Wizard SV Gel and PCR Clean-up system を使用した。オリゴヌクレオチドプライマーの合成は、北海道システムサイエンスに依頼した。Anti-LBT-polyclonal antiserum (Rabbit)は、医学生物学研究所に作製を依頼した。

ペプチド合成と精製

3 種類のペプチド、PepTat (YGRKKRRQRRR)、Pep3 (KKGfYKKKQCRPSKGRKR)、Pep5 (RKGfYKRKQCKPSRGRKR)は、N 末端フリー、C 末端アミド化の形で、標準的なFmoc 法で手動で合成した。この研究に用いたペプチドの略称とその配列は、Figure3-2-1C にまとめた。側鎖の保護基は、Glu (Ot-Bu)、Lys (Boc)、His (Trt)、Tyr (t-Bu)である。ペプチド伸長の 1 サイクルは、次の通りに行った。Fmoc-アミノ酸派生物 (1 mmol)を、NMP 中で HBTU/HOBt (それぞれ 1 mmol)によって 30 分間活性化した後、レジンへ結合させた。次に、NMP 中で 20%ピペリジンと反応させることで、Fmoc 基を除去した。その後、目的のペプチド配列となるようにアミノ酸の伸長を行った。室温、1.5 時間、2.5%エタンジチオールと 2.5% H₂O (v/v)を含む TFA で処理し、側鎖の脱保護とレジンからの切り離しを行った。ペプチドの精製は、YMC-Pack ODS-AM column (10 mm i.d. 250 mm, 5 ml; YMC Co. Ltd)を用いて、0.1%を含む 30 分間で 25-35 % CH₃CN/H₂O グラジエントの条件の HPLC によって行った。最終産物の確認は、分析 HPLC と MALDI-TOF mass spectrometry によって行った。

ベクター構築

GST の C 末端に HIV-Tat ペプチド(YGRKKRRQRRR)を融合した蛋白質発現用プラスミド pGEX-GST-PTD^{Tat} と、その N 末端に LBT タグ(MGYIDTNNDGWYEGDELLA)を融合した pGEX-LBT-GST-PTD^{Tat} は、前節の実験と同じものを用いた(34)。IGFBP-3-PTD (KKGfYKKKQCRPSKGRKR)と、IGFBP-5-PTD (RKGfYKRKQCKPSRGRKR)に対応する合成オリゴヌクレオチドをアニーリングした遺伝子を、pGEX-4T3 の GST の C 末端側の *BamH*-*XhoI* サイトに挿入した、pGEX-GST-PTD^{I3}、pGEX-GST-PTD^{I5} を新たに構築した。また、pGEX-LBT-GST-PTD^{I3}、pGEX-LBT-GST-PTD^{I5} は、前節の pGEX-LBT-GST-PTD^{Tat} と同じ方法で構築した。

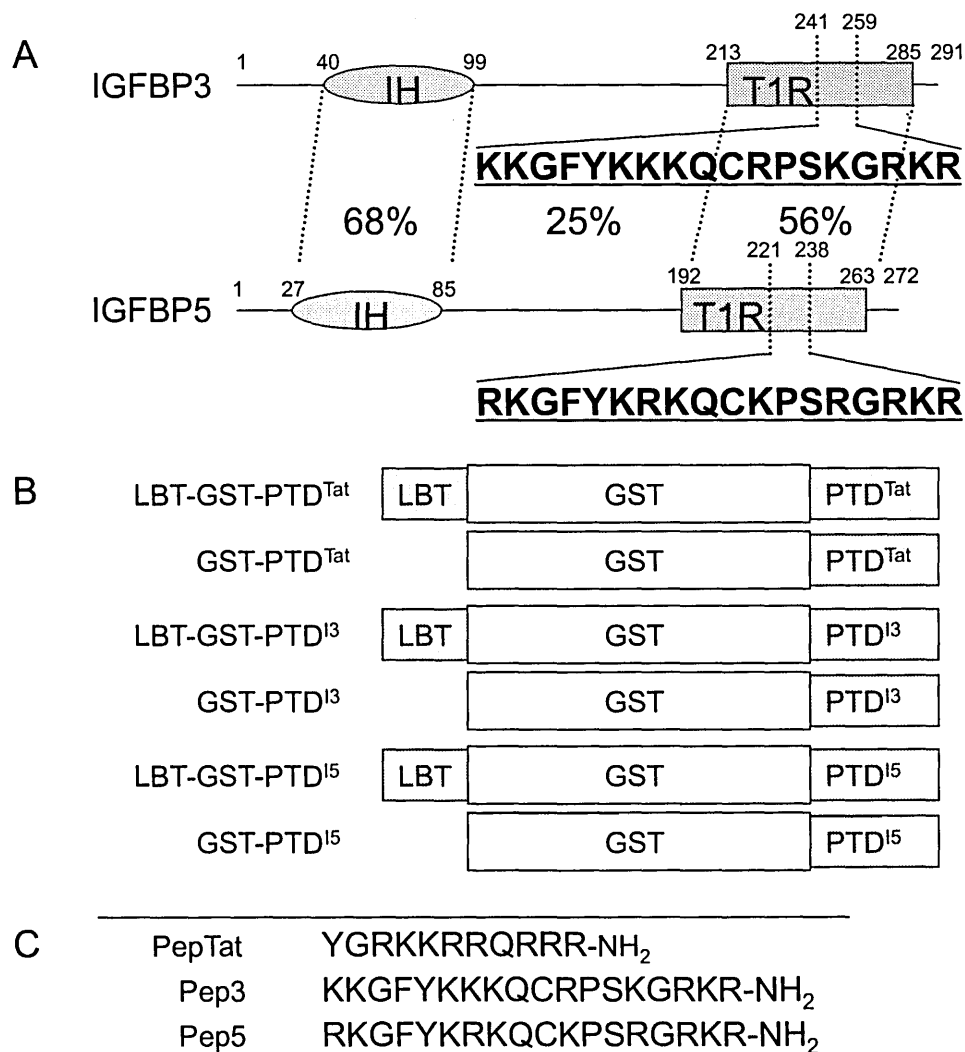


Figure3-2-1

Amino acid sequence of the heparin-binding domain of human IGFBP-3 and IGFBP-5.

(A) Domain architecture of human IGFBP-3 precursor (P17936) and IGFBP-5 precursor (P24593). IH indicates IGFBP-homology domain, whereas T1R represents the thyroglobulin type-1 repeat domain. Amino acid identities between corresponding regions of IGFBP-3 and IGFBP-5 are shown. Heparin-binding domain sequences (underlined), overlapping with nuclear localizing signals (bold typeface), exist at the middle of the T1R domain. (B) Schematic representation of the fusion proteins used in this study. LBT represents the lanthanide-binding tag (MGYIDTNNDGWYEGDELLA). For each fusion protein, both versions, with LBT and without LBT, were prepared. (C) Peptide sequences used in this study. C-termini of all the synthetic peptides are amidated.

蛋白質調製

それぞれの蛋白質発現用ベクター (pGEX-GST-PTD^{Tat}、pGEX-GST-PTD^{I3}、pGEX-GST-PTD^{I5}、pGEX-LBT-GST-PTD^{Tat}、pGEX-LBT-GST-PTD^{I3}、

pGEX-LBT-GST-PTD^{I5})を導入した大腸菌 BL21(DE3)をそれぞれ、LB-グルコース培地で30℃で培養した。培養液の細胞密度が OD₆₀₀ がおよそ 0.4 となったところで IPTG(1 mM)を添加し、組み換え蛋白質の発現を誘導した。その後 20℃で約 24 時間培養し、集菌した。菌体は、破碎緩衝液[50 mM リン酸ナトリウム(pH 6.8)、500 mM NaCl、1 mM DTT]中で超音波破碎を行い、遠心分離によって不溶性画分を除去した。可溶性画分を 4 ml の DEAE-sepharose Fast Flow (GE healthcare)カラムに通し、核酸を除去した後、glutathione-sepharose Fast Flow (GE healthcare)カラムで精製した。必要に応じて、Superdex 200 カラム(GE healthcare)を用いたゲルろ過により、更なる精製を行った。LBT タグを持つ蛋白質への Tb³⁺のキレートは、前節と同様の方法で行った。

ヘパリンへの結合実験

HiTrap-heparin カラム(1 ml; GE healthcare)を AKTA-Prime chromatography system に接続し、0.15 M NaCl、50 mM リン酸ナトリウム (pH 6.8)緩衝液で平衡化を行った。それぞれ、1.2 mg の精製 GST、GST-PTD^{Tat}、GST-PTD^{I3}、GST-PTD^{I5}をカラムにのせ、流速 1 ml/min、NaCl の濃度が 0.15 M から 2.0 M の直線的な濃度勾配で蛋白質を溶出した。溶出した蛋白質の検出は、280 nm での UV 吸収で行った。

細胞株

実験には、HeLa と NIH3T3 を用いた。これらの細胞は、10 %(v/v)ウシ胎児血清、100 unit/mL のペニシリンとストレプトマイシンを加えた Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)用いて、37℃、5 %CO₂ の環境下で培養した。

細胞への蛋白質導入

HeLa 又は NIH3T3 を 6 ウェルディッシュ(SUMILON)で 30%コンフルエントになるまで培養し、

2 μ M となるように精製した組み換え蛋白質を加えた DMEM に培地を交換した。阻害剤 (6 μ M PepTat、Pep3、Pep5、10 mg/ml ヘパリン)を加える場合は、蛋白質と同時に加えた。1 分、5 時間、24 時間培養後、PBS で 2 回洗浄後、トリプシンを用いて細胞を剥離した。ディッシュから剥離した細胞を一度 PBS に懸濁し、細胞数を数えた後、それぞれの細胞数が 10^6 となるように調整して細胞を回収した。それぞれの細胞を、50 μ L の細胞溶解液[0.1 M Tris-HCl (pH 7.5), 1% SDS, 1% 2-メルカプトエタノール]に溶解した。調製した細胞溶解物の SDS-PAGE を行い、PVDF 膜に転写後、細胞内に含まれる GST 融合蛋白質を 20,000 倍希釈の anti GST 抗体 (Nacalai tesque)、続いて HRP 標識 anti mouse IgG 抗体 (Promega) で検出し、ECL-plus (GE healthcare)を用いて可視化した。また、同様に SDS-PAGE、PVDF 膜への転写をもう一セット行い、1,000 倍希釈の anti LBT rabbit polyclonal antibody、続いて HRP 標識 anti rabbit IgG (Promega) で検出し、TMB (Promega)を用いて可視化した。

蛍光顕微鏡による観察

35 mm ディッシュにカバーガラス (Matsunami)を入れたものまたは、35 mm のガラスボトム ディッシュ (Matsunami)に細胞を 30%コンフルエントになるまで培養した。これに、Tb³⁺をキレートさせた組み換え蛋白質を終濃度 2 mM となるように加えた DMEM を用いて、上記と同様に細胞への蛋白質導入を行った。5 時間後、細胞を PBS で二回洗浄し、メタノール中に、-20°C、20 分間置き、細胞をガラスに固定した。固定後、0.1% Tween20 を含む TBS で 2 回洗浄し、0.1% Tween20、1% ウシ胎児血清を含む TBS で希釈した anti GST 抗体に浸し、4°Cで一晩置いた。洗浄後、同様の TBS で希釈した二次抗体 (Cy3TM-conjugate anti mouse IgG antibody, SIGMA)に室温で 1 時間反応させ、TBS で洗浄した後、DAPI 溶液 (10 ng/ml)に 5 分間浸し、洗浄後、Prolong Antifade mounting medium (Molecular Probes)を用いて封入した。また、ガラスボトムディッシュで培養した細胞を用いた実験では、細胞を PBS で洗った後、固定せずにそのまま細胞を観察した。

細胞内へ入った蛋白質の観察は、蛍光顕微鏡(IX71, DP70 color CCD camera system; OLIMPUS)を用いて行った。Tb³⁺由来の蛍光の観察には、UV-excited/wide range VIS-emitted mirror unit (U-MWU2, OLYMPUS)を用いた。

3-2-3 結果と考察

HIV-Tat, IGFBP-3, IGFBP-5 のヘパリン結合活性の比較

HIV-Tat の PTD は細胞表面のヘパリンと強く相互作用することが知られている。このため、ヘパリンは HIV-Tat PTD 融合蛋白質のエンドサイトーシスの潜在的なレセプター分子であると考えられている(35)。そのため、IGFBP-3-PTD 融合蛋白質、IGFBP-5-PTD 融合蛋白質のヘパリン結合活性と HIV-Tat PTD 融合蛋白質のヘパリン結合活性を同じ実験系で比較した。3種類の GST-PTD 融合蛋白質それぞれを Heparin Sepahrose カラムにのせ、NaCl の濃度勾配によって溶出し、その溶出 NaCl 濃度でヘパリン結合活性を比較した(Figure3-2-2)。HIV-Tat ペプチド融合 GST(GST-PTD^{Tat})は、ヘパリンから NaCl 濃度 1.28 M で溶出し(Figure3-2-2B)、IGFBP-3-PTD 融合 GST (GST-PTDI3)は 1.19 M、IGFBP-5-PTD 融合 GST (GST-PTDI5)は 1.23 M で溶出した(Figure3-2-2C, D)。その結果、本研究で用いた GST-PTD 融合蛋白質の *in vitro* でのヘパリン結合活性はすべて同程度であると判断した。またこれらの結果は、それぞれのペプチドのアミノ酸組成 (IGFBP-3-PTD ; 18 アミノ酸、3 Arg、7 Lys、IGFBP-5-PTD ; 18 アミノ酸、5 Arg、5 Lys)と一致していた。ヘパリン結合領域の60%のアミノ酸残基が塩基性アミノ酸である。そのため、塩基性アミノ酸残基の数、割合は、HIV-Tat ペプチド(72%)と同程度である。

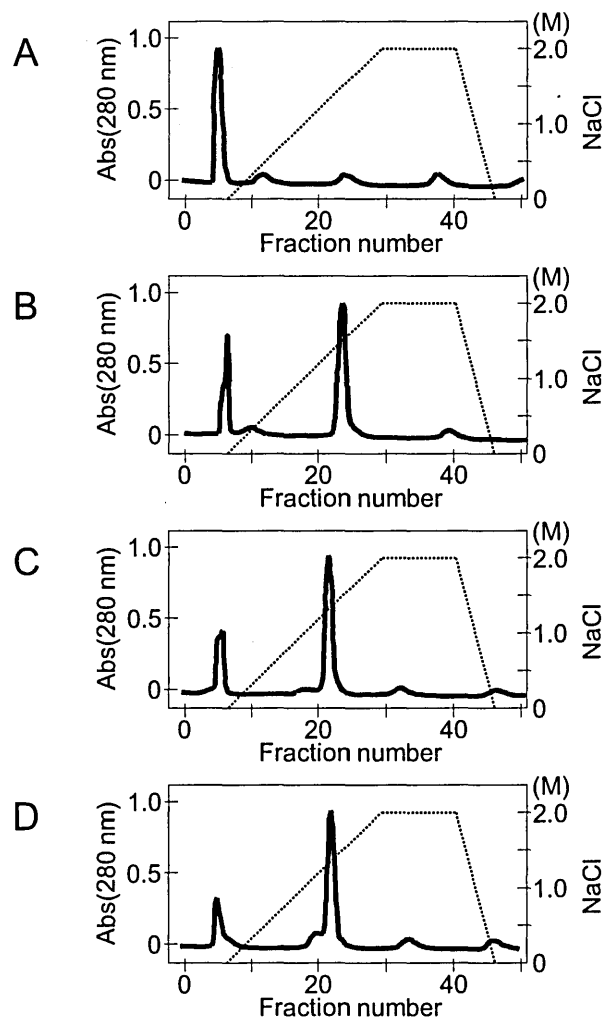


Figure3-2-2

Heparin-binding activities of the peptides derived from IGFBP-3/5-derived peptides compared to HIV-Tat peptide.

Elution profiles of (A) GST only (control), (B) GST-PTD^{Tat}, (C) GST-PTD^{I3}, and (D) GST-PTD^{I5} from heparin affinity chromatography are shown (solid line, left axis). Normalized UV absorption at 280 nm is indicated. The linear NaCl gradient is depicted as a broken line (right axis), with the protein's elution point.

IGFBP 由来ペプチドを融合した GST の NIH3T3 細胞と HeLa 細胞への蛋白質導入

まず、天然に存在するヘパリン結合配列は、PTD 活性を示すのではないかと仮説を立てた。それを検証するために、NIH3T3 と HeLa の培地に GST-PTD^{Tat}、GST-PTD^{I3}、GST-PTD^{I5} をそれぞれ加えた時にそれらの融合蛋白質が細胞内へ入るかどうかを調べた。それぞれ、蛋白質を加えた後 1 分、5 時間、24 時間培養し、細胞を回収、その細胞抽出物を

SDS-PAGE、ウエスタンブロットで分析し、細胞へ導入された蛋白質を検出した(Figure3-2-3)。

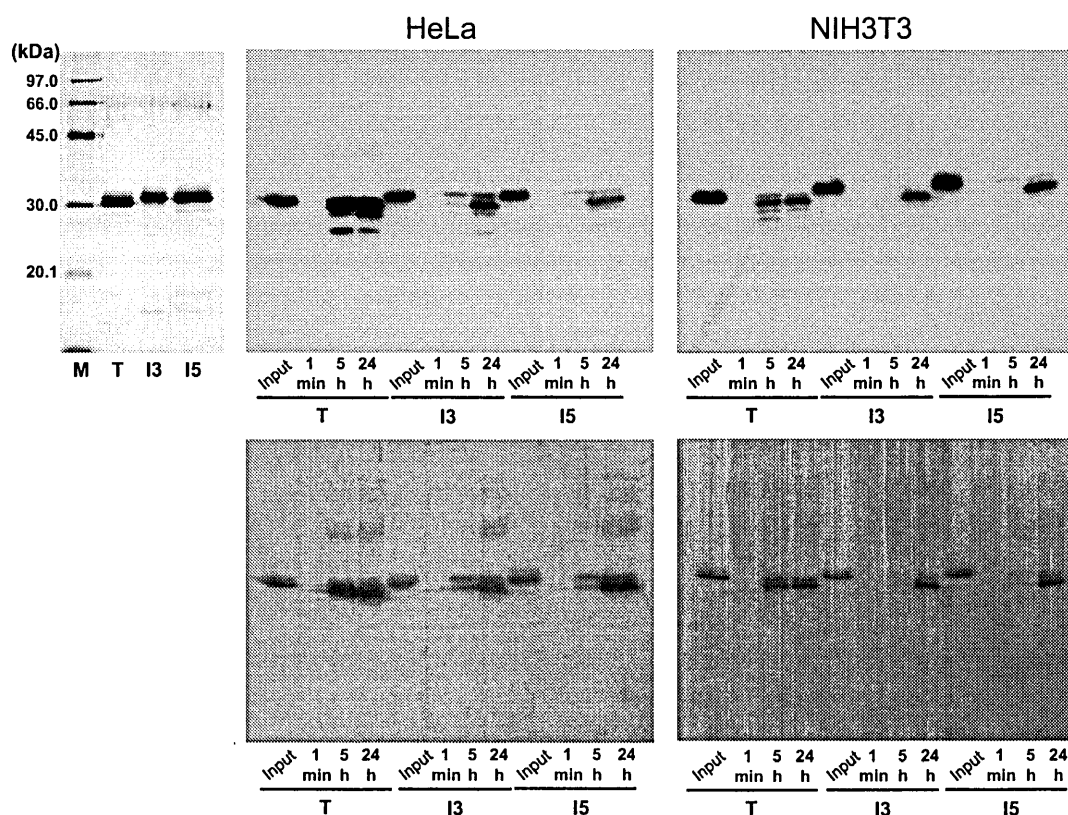


Figure 3-2-3

IGFBP-3/5-derived peptides mediate protein cellular delivery of fusion proteins into mammalian cells.

Western blot analysis of LBT-GST-PTD fusion proteins extracted from HeLa (middle) and NIH3T3 (right) cells after 1 min (negative control), 5 h or 24 h incubation with each protein: lane T, GST-PTD^{Tat}; lane I3, GST-PTD^{I3}; lane I5, GST-PTD^{I5}. Approximately 10⁶ cells were collected after incubation with different proteins, disrupted, electrophoresed, blotted, and detected using anti-GST antibody and visualized by ECL (upper panels), or detected using anti LBT antibody and visualized by TMB (lower panels). The left panel shows the input proteins (T: LBT-GST-PTD^{Tat}, I3: LBT-GST-PTD^{I3} and I5: LBT-GST-PTD^{I5}) with size marker (M).

どちらの細胞でも、24 時間培養した時は導入した蛋白質がはっきりと検出できたが、GST-PTD^{I3}、GST-PTD^{I5} は、5 時間培養した時の導入された蛋白質は少なかった。しかし、蛍光顕微鏡での観察では、5 時間後でも蛋白質は導入されていることが確認できた(Figure3-2-4)。この結果より、HIV-Tat の PTD が最も効果的ではあるが、IGFBP-3、-5 由来の PTD も PTD 活性を示すことが分かった。実際、GST のみでは、HeLa 細胞へ蛋白質の導入はされなかった(Figure3-2-5D)。HeLa 細胞へ入った GST-PTD^{I3}、GST-PTD^{I5} それぞれの量は、

GST-PTD^{Tat} の約 30%と 20%であった(Figure3-2-3)。また、NIH3T3 細胞では、細胞へ入った GST-PTD^{I3}、GST-PTD^{I5} の量は GST-PTD^{Tat} に比べておよそ 80%から 150%であった(Figure3-2-3)。細胞へ導入した全ての蛋白質は、SDS-PAGE で 3 本のバンドとして検出された。これらの分子サイズと異なった抗体を用いたウエスタンブロットの結果より、2 番目、3 番目に小さいサイズのバンドは、それぞれ C 末端、N 末端がそれぞれ部分的に分解された蛋白質であると考えられる。本研究では、PTD ペプチドに含まれるアルギニン残基、リジン残基の数と PTD 活性の間のはっきりとした相関関係は分からなかったが、12 残基のポリアルギニンペプチドは、8 残基のポリアルギニンペプチドに比べて高い PTD 活性を示すことが Nakase らによって報告されている(36)。

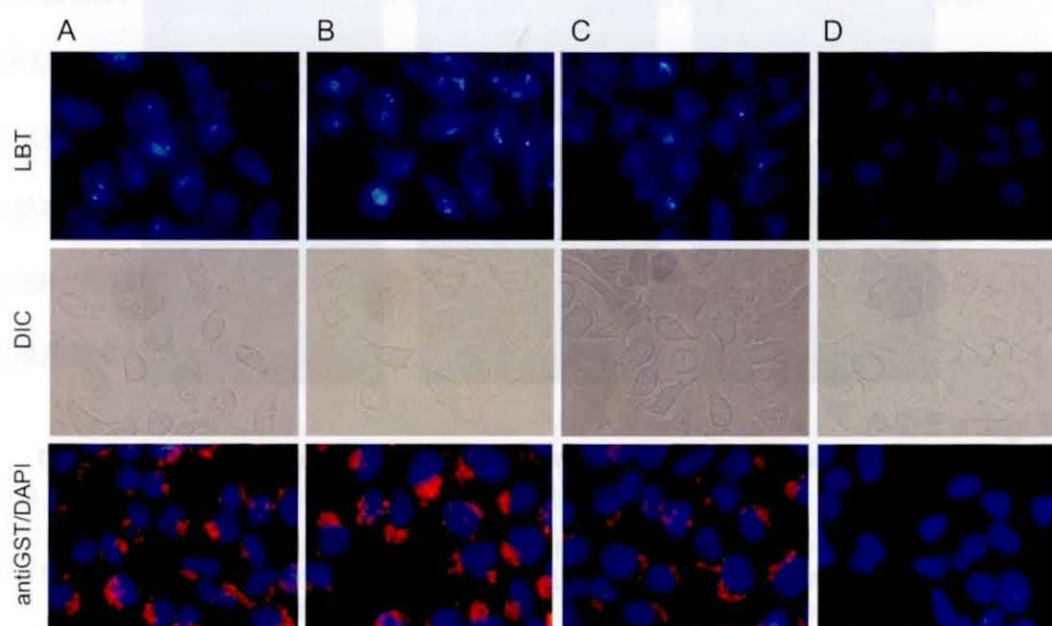


Figure 3-2-4

IGFBP-3/5-derived peptides deliver Tb³⁺-chelated LBT-tagged GST-PTD fusion proteins into peri-nuclear dot-like particles of HeLa cell.

(A–D) Cells were incubated with 1 μM Tb³⁺ and 2 μM of either LBT-GST-PTD^{Tat} (A), LBT-GST-PTD^{I3} (B) or LBT-GST-PTD^{I5} (C), only 1 μM Tb³⁺ without protein (D) and were visualized using Tb³⁺ fluorescence in living cells without fixation (top panel). Differential interference contrast images of the same region are shown (middle panel). Alternatively, the cells were fixed and visualized by anti-GST-antibody followed by Cy3-labeled secondary antibody (red) and DAPI (cyan) (bottom panel).

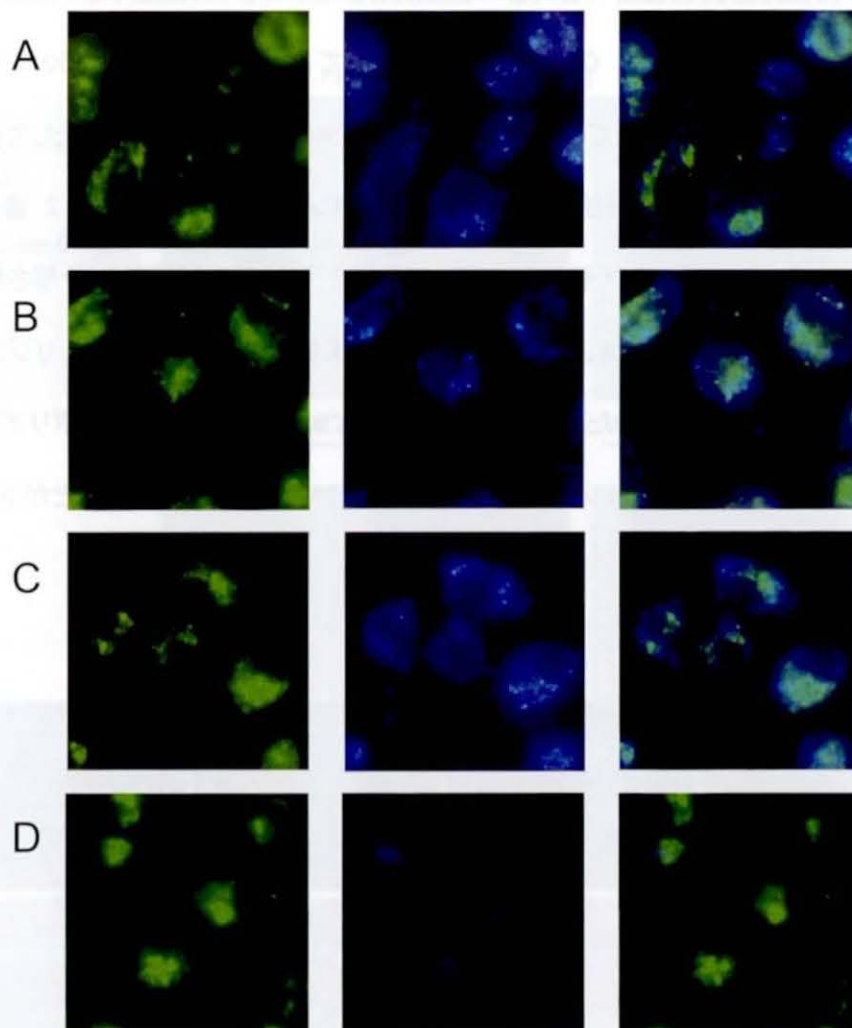


Figure 3-2-5

Co-transduction experiment of fluorescein-conjugated-transferrin and LBT-GST-PTD proteins.

(A–D) Approximately 1×10^5 HeLa cells on glass-bottom dish (Matsunami) were incubated with $10 \mu\text{g} / \text{mL}$ transferrin (human serum, fluorescein conjugate, Molecular Probes), $1 \mu\text{M}$ Tb^{3+} and $2 \mu\text{M}$ of either LBT-GST-PTD^{Tat} (A), LBT-GST-PTD^{I3} (B), LBT-GST-PTD^{I5} (C), or only GST (D) and were visualized using fluorescein (left panels, green) and Tb^{3+} fluorescence (middle panels, cyan) in living cells without fixation. The merged images are also shown (right panels). The bright spots of Tb^{3+} signals were partly, but not fully overlapped with fluorescein signals, which indicate that the three PTD-fused proteins partly use clathrin-dependent endocytotic pathway to enter the cells.

次に、蛍光顕微鏡での観察のための蛍光タグとして Tb^{3+} キレート LBT を融合した IGFBP-3-PTD と IGFBP-5-PTD 融合蛋白質の細胞への導入実験を行った。細胞を固定後、蛍光標識抗体で検出、または Tb^{3+} の蛍光によって生細胞のまま導入した蛋白質を検出した。

蛋白質添加後 5 時間培養した後、蛋白質の蛍光は核の周囲に点状に局在していた (Figure3-2-4)。GST-PTD^{TAT}、GST-PTD^{I3}、GST-PTD^{I5} の細胞内への局在は、蛍光顕微鏡では見分けがつかなかった。加えて、これらの蛋白質の点状の蛍光は、部分的に、FITC ラベルのエンドソームと重なっていた (Figure3-2-5)。この結果は、PTD^{TAT} は、3 つのエンドサイトーシス経路 (マクロピノサイトーシス、クラスリン仲介エンドサイトーシス、カベオラ/脂質ラフト仲介エンドサイトーシス) を同時に使っているという Duchardst らの報告 (37) と矛盾しない。この結果は、少なくとも、導入のはじめのステージでは、GST-PTD^{I3} と GST-PTD^{I5} の蛋白質導入経路は GST-PTD^{Tat} と似ていることを示唆する。加えて、IGFBP-3、IGFBP-5 の PTD の配列は、ヘパリン結合モチーフとして知られ、これらの融合蛋白質の細胞への導入は、おそらくヘパリン依存のエンドサイトーシスまたはマクロピノサイトーシスを経由している考えられる。

本研究では、Tb³⁺キレートLBT-GST-PTD^{I3}またはTb³⁺キレートLBT-GST-PTD^{I5}の核への局在は見られなかった (Figure3-2-4B, C)。これは、細胞の外から中へ入った IGFBP-5 のうち核へ局在する量はとても少ないという Jurgait らの報告 (38) と一致する。HIV-Tat 由来 PTD の場合 (39) と同様に、細胞へ導入された PTD^{I3}、PTD^{I5} 融合蛋白質は、ほとんどが核のまわりの小胞構造の中にあり、ごく一部のみが細胞質へ放出されているのではないかと考えられる。

PTD 融合 GST の細胞への導入はヘパリンによって阻害される

これまでに示した実験結果と、IGFBPs の PTD がヘパリンへ結合する性質から、細胞表面のヘパリンが蛋白質導入経路に関与しているのではないかと考えた。もしそうであれば、可溶性ヘパリンが存在することで、蛋白質の細胞への取り込みが競合的に阻害されるはずである。実際、GST-PTD^{I3}、GST-PTD^{I5} それぞれの細胞への取り込みは、ヘパリンによって阻害された (Figure3-2-6A-C, lane a5, b5, c5)。また、ヘパリンによる同様の阻害効果は、GST-PTD^{Tat} の場合にも見られた。そのため、HIV-Tat の場合と同様に、IGFBP-3、IGFBP-5 の PTD によって起こる蛋白質導入経路の最初の部分は、ヘパリンへの結合を伴うと示唆され

(Figure3-2-7A)、可溶性ヘパリンによる阻害のメカニズムは Figure3-2-7B で図示したとおりである。蛋白質の細胞への導入は、ヘパリンが介するものと、直接中へ入るものの二つの経路があると考えられるが、蛋白質が可溶性ヘパリンへ結合することで、両方の経路が阻害されているようであった。

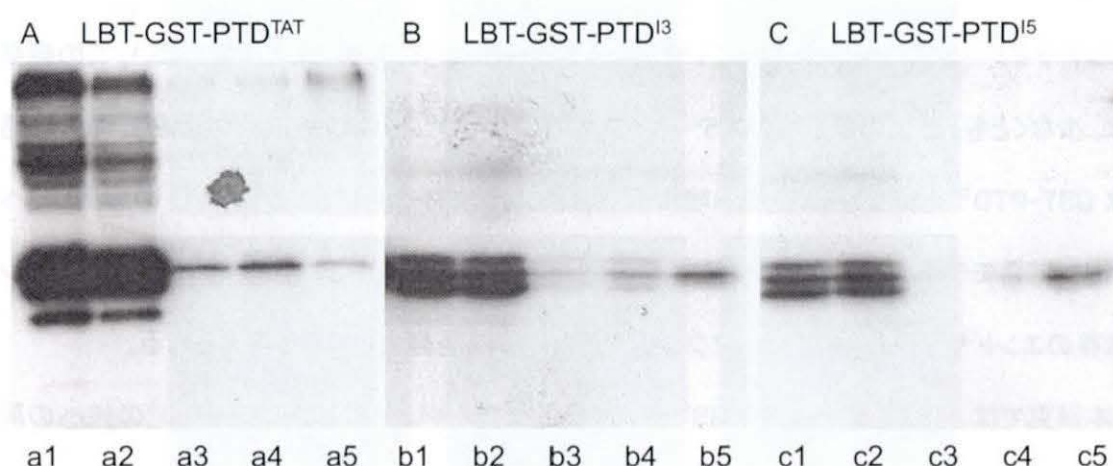


Figure 3-2-6

Inhibition of protein delivery of PTD^{Tat} (A), PTD^{I3} (B) and PTD^{I5} (C) fused GSTs by either the heparin-binding peptides or heparin.

Western blot analysis of LBT-GST-PTDs (Tb³⁺ free) extracted from the HeLa cell, in which PepTat (lane a2, b2, c2), Pep3 (lane a3, b3, c3) or Pep5 (lane a4, b4, c4) or heparin (lane a5, b5, c5) are co-incubated with the LBT-GST-PTDs, as shown at the top of the panels.

PTD 融合 GST の細胞への導入は、ヘパリン結合ペプチドによって交差阻害される

ヘパリンは、IGFBP 由来 PTD の細胞への取り込みの有力なレセプターであると考えられるが、その細胞への取り込みを促進する他の特異的なレセプターが細胞表面に存在する可能性もある。この可能性を検証するために、PTD に相当する合成ペプチド、PepTat、Pep3、Pep5 を加えた阻害実験を行った(Figure3-2-6A-C)。それぞれの PTD 融合と、その 3 倍の量のペプチドを混合し、細胞培養の培地に加えた。Pep3 によって、GST-PTD^{I3}、GST-PTD^{I5}、GST-PTD^{Tat} の細胞への取り込みは等しく阻害された(Figure3-2-6 lane a3, b3, c3)。同様に、Pep5 は、GST-PTD^{I3}、GST-PTD^{I5}、GST-PTD^{Tat} の細胞への取り込みを阻害した(Figure3-2-6 lane a4, b4, c4)。しかし、HIV-Tat ペプチドは、3 つの PTD 融合蛋白質すべての細胞への取り

込みを阻害しなかった(Figure3-2-6 lane a2, b2, c2)。GST-PTDTAT の細胞への取り込みは同じ配列の PepTat によっても阻害されず、一方で、Pep3とPep5は、異なった配列をもつ異なった蛋白質由来の3つのPTDすべての細胞への取り込みを交差阻害することは、特徴的である。これらの結果より、HIV-Tat、IGFBP-3-PTD、IGFBP-5-PTD由来の3つのPTDの蛋白質導入経路は、共通であり、ヘパリン依存であると考えられる。

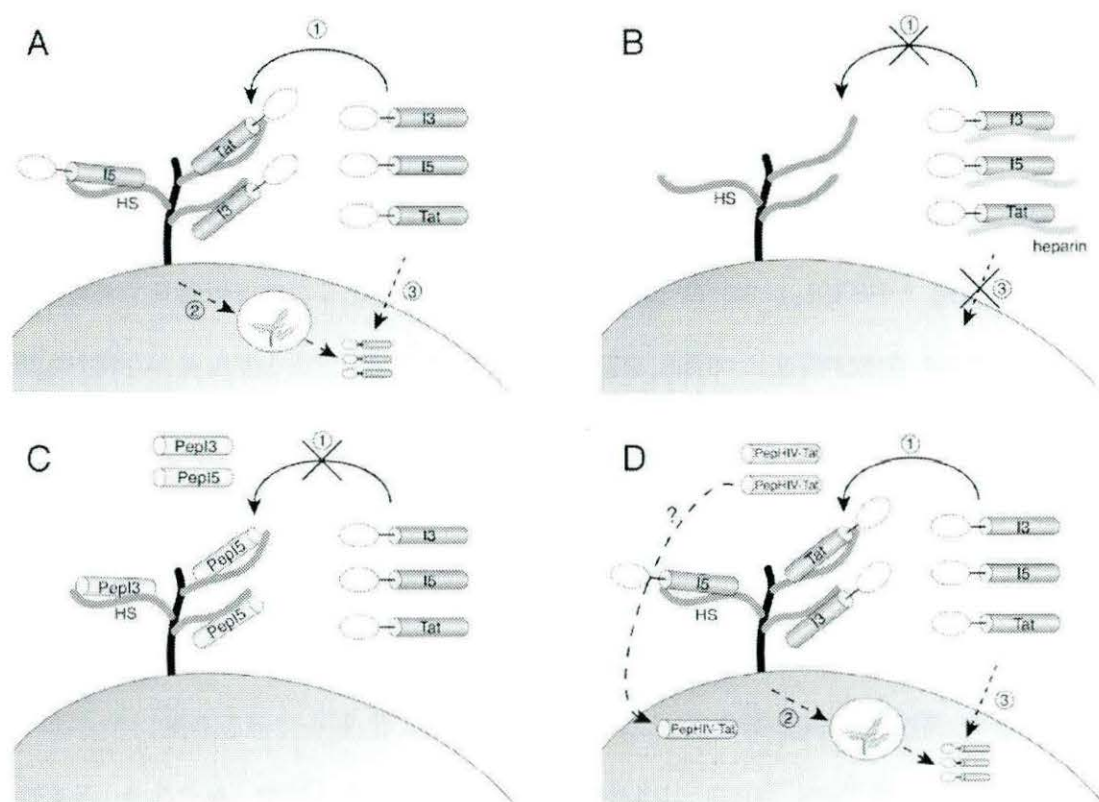


Figure 3-2-7

Schematic model of entry pathway of the PTDs used in this study.

(A) Three PTDs, PTD^{Tat}, PTD^{I3}, and PTD^{I5}, might mediate delivery of cargo proteins into mammalian cells via heparan sulfate proteoglycans (HS) on the cellular surface, which are then trapped into vesicle-like particles (pathway 1, 2). Our data do not rule out another direct penetration of PTD-fused proteins (pathway 3). (B) Soluble heparin binds to three PTD-fused proteins, thereby inhibiting cellular uptake. (C) PTD-derived peptides, Pep3 and Pep5, also inhibit uptake of three PTD-fused proteins, although (D) PepTat did not inhibit.

本研究では、PepTat が IGFBP3、-5 由来 PTD 融合蛋白質の細胞への取り込みを阻害しないだけでなく、HIV-Tat 自身を融合した蛋白質の細胞への取り込みも阻害しないという結果を得た。この奇妙な結果は別として、他のすべての結果は、3つ全ての PTD が同じヘパリン依

存経路で融合パートナーを細胞へ導入するという結果で一致している。従って、PepTat はペプチドのみでは個別の性質と導入経路をもつのではないかと推測できる。Tat ペプチドと Tat 融合蛋白質は異なった性質を持つという報告が存在する(40)。多くの場合、疎水性の色素や短いペプチドを HIV-Tat に結合した時、ATP 非依存、ヘパリン非依存的に素早く直接細胞膜を越えて分子が細胞へ浸透し、PTD^{TAT} 融合蛋白質は細胞膜貫通活性は持たない。そのため、なぜ PepTat が GST-PTDI3、GST-PTDI5 の細胞への取り込みを阻害しないが、Pep3、Pep5 が GST-PTDTat の細胞への取り込みは阻害するのかが部分的に説明できる(Figure3-2-7 C, D)。Pep3、Pep5 とは対照的に、PepTat はヘパリン依存経路またはヘパリン非依存経路で素早く細胞内へ入り、培地からすぐになくなってしまうため、結果として GST-PTDs と競合しないと考えられる。

最後に、IGFBP 由来ペプチド(PTDI3、PTDI5)は、天然に存在するヒト蛋白質から得たものであるため、HIV-Tat ペプチドの代替とすることを提案する。HIV-Tat ペプチドの細胞毒性についてはいくつか報告されているが(32, 33)、本研究で用いた濃度では Pep3 と Pep5 の細胞毒性は見られなかったことは、注目すべき点である。もちろん、IGFBP 由来 PTD の使用は、全長 IGFBP-3、IGFBP-5 の IGF 関連の機能と競合するため、安全性と生体への利用性のためには更なる研究が必要である。

結論

第3章第2節では、IGFBP-3 と IGFBP-5 から得た天然に存在するヘパリン結合ペプチドが蛋白質導入活性をもつことを述べた。この研究は、IGFBP-3-PTD と IGFBP-5-PTD ペプチドが GST のようなほかの蛋白質と融合した時に、自立的に細胞内へ入る活性をもち、この活性は HIV-Tat ペプチドのものと同程度であるということを示した初めての結果である。加えて、IGFBP-3 と IGFBP-5 のレセプター非依存的な細胞への取り込みが、IGFBP-3-PTD、IGFBP-5-PTD によって、HIV-Tat の細胞への取り込みと共通のヘパリン依存的マクロピノサ

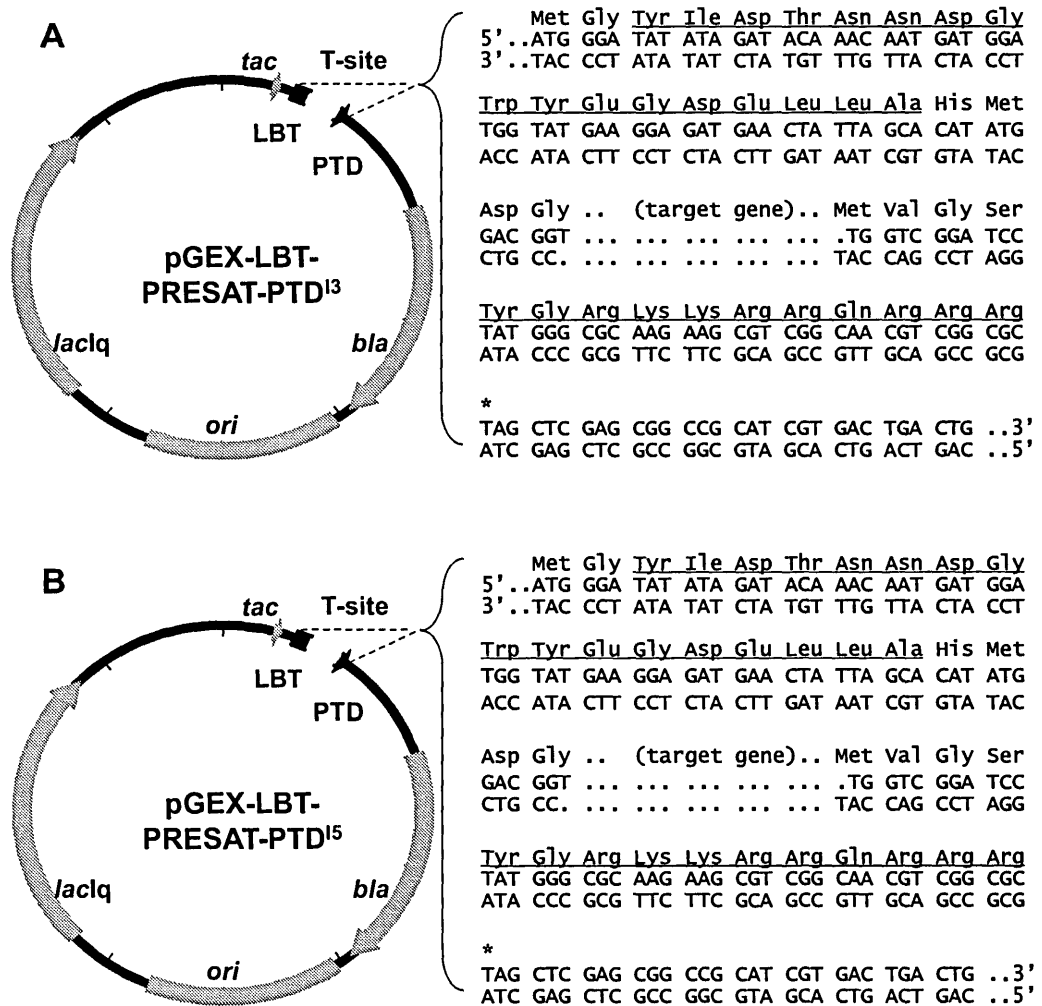
イトーシス経路を経由することで進んでいることを示した(Figure3-2-7)。はじめに、3つのPTD融合蛋白質(LBT-GST-PTDs)は細胞表面のヘパラン硫酸プロテオグリカン(HS)に結合、次に、エンドサイトーシスで細胞内へ入る。可溶性ヘパリンを培地に加えることで、3つのPTDの細胞への導入が阻害されるのは、PTDとヘパリンが結合することで、PTDがHSへ結合することができなくなるためであると考えられる。IGFBP由来ペプチドPep3、Pep5も3つのPTD融合蛋白質の細胞への導入を阻害したが、これは、加えたペプチドによって細胞表面のHSが飽和してしまうためであると考えられる。一方、PepTatは阻害活性がほとんど見られなかった。これは、PepTatが直接膜を貫通するといった別の導入経路を持つからかもしれない。本研究結果は、IGFBP-3、IGFBP-5由来のPTD^{I3}、PTD^{I5}はHIV-Tatに代わって蛋白質治療に利用できる大きな可能性を持つことを示した。そのためには、IGFBP-3、IGFBP-5由来PTDの細胞特異性や*in vivo*での効率を知るための更なる幅広い研究が必要である。

3-2-4 Supplementary report

IGFBP-3、IGFBP-5由来PDT配列をもつLBT-PTRSAT-PTDベクターの構築

IGFBP-3、IGFBP-5から単離したPTDを蛋白質治療に用いるためには、生体への利用性を高めるために更なる研究が必要であり、そのためには、この組み換え蛋白質の調整が不可欠である。そのため、発現系構築段階の効率化のために、PTD^{I3}、PTD^{I5}融合蛋白質を大腸菌で発現させるためのベクターを改良し、PRESAT-vector (pGEX-LBT-PRESAT-PTD^{I3}、pGEX-LBT-PRESAT-PTD^{I5})とした(Supplementary Figure 3-2-1)。このベクターを使用することで、PTD融合蛋白質の発現系構築が短時間で、効率よく行えるため、研究の初期段階が加速できる(41)。

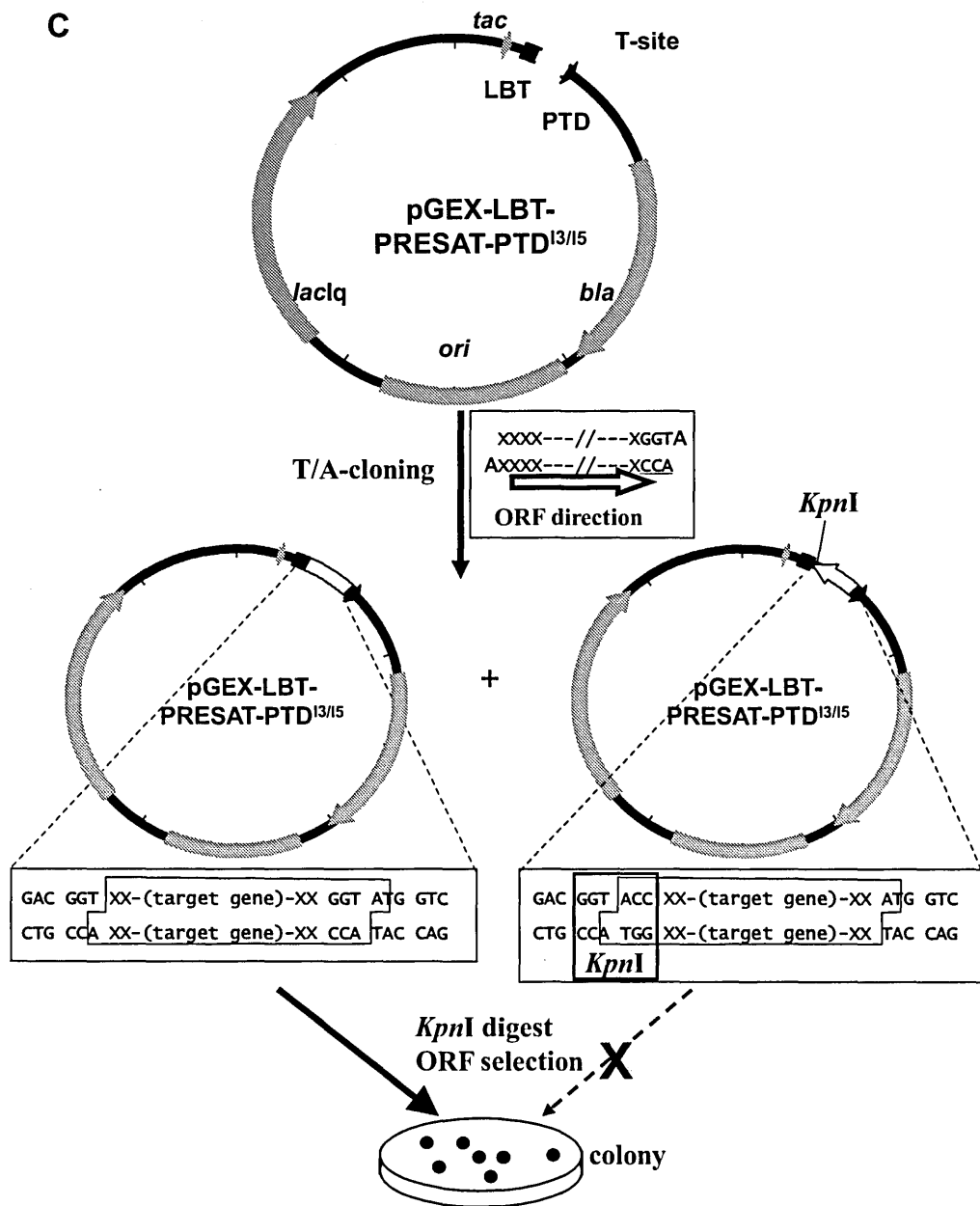
pGEX-LBT-PRESAT-PTD^{I3}、pGEX-LBT-PRESAT-PTD^{I5}の構築は、第3章第1節でpGEX-LBT-GST-PTD^{TAT}を改変してpGEX-LBT-PRESAT-PTD^{TAT}を作製した時と同じ手順で行った(35)。



Supplementary Figure 3-2-1.

Construction of the IGFBP-derived LBT/PTD-dual-tagged PRESAT-vector.

(A) Vector map of pGEX-LBT-PRESAT-PTDI³ after Ahdl digestion. (B) Vector map of pGEX-LBT-PRESAT-PTDI⁵ after Ahdl digestion. The amino acid sequences 3 corresponding to LBT and PTDI³ / I⁵ are underlined.



(C) Schematic representation of the unidirectional TA-cloning of the PCR fragment into pGEX-LBT-PRESAT-PTD I3 / I5. The gene is cloned and further subjected to ORF selection by *KpnI* treatment. The rear PCR primer is designed with an addition of 5'- ACC at the 5' terminus, so that only the ligated plasmid with the insert in the reverse orientation will have the *KpnI* site at the TA-cloning position.

参考文献

1. S.M. Firth, R.C. Baxter, Cellular actions of the insulin-like growth factor binding proteins, *Endocr. Rev.* 23 (2002) 824–854.
2. D.R. Clemmons, Use of mutagenesis to probe IGF-binding protein structure/function relationships, *Endocr. Rev.* 22 (2001) 800–817.
3. K.W. Lee, P. Cohen, Nuclear effects: unexpected intracellular actions of insulin-like growth factor binding protein-3, *J. Endocrinol.* 175 (2002) 33–40.
4. A. Gockerman, T. Prevette, J.I. Jones, D.R. Clemmons, Insulin-like growth factor (IGF)-binding proteins inhibit the smooth muscle cell migration responses to IGF-I and IGF-II, *Endocrinology* 136 (1995) 4168–4173.
5. C. Duan, D.R. Clemmons, Differential expression and biological effects of insulin-like growth factor-binding protein-4 and -5 in vascular smooth muscle cells, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 16836–16842.
6. B. Zheng, C. Duan, D.R. Clemmons, The effect of extracellular matrix proteins on porcine smooth muscle cell insulin-like growth factor (IGF) binding protein-5 synthesis and responsiveness to IGF-I, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 8994–9000.
7. V.A. Patel, Q.J. Zhang, K. Siddle, M.A. Soos, M. Goddard, P.L. Weissberg, M.R. Bennett, Defect in insulin-like growth factor-1 survival mechanism in atherosclerotic plaque-derived vascular smooth muscle cells is mediated by reduced surface binding and signaling, *Circ. Res.* 88 (2001) 895–902.
8. A. Anwar, A.A. Zahid, K.J. Scheidegger, M. Brink, P. Delafontaine, Tumor necrosis factor- α regulates insulin-like growth factor-1 and insulin-like growth factor binding protein-3 expression in vascular smooth muscle, *Circulation*. 105 (2002) 1220–1225.
9. T. Hsieh, R.E. Gordon, D.R. Clemmons, W.H. Busby Jr., C. Duan, Regulation of vascular smooth muscle cell responses to insulin-like growth factor (IGF)-I by local IGF-binding proteins, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 42886–42892.
10. B. Liu, H.Y. Lee, S.A. Weinzimer, D.R. Powell, J.L. Clifford, J.M. Kurie, P. Cohen, Direct functional interactions between insulin-like growth factor-binding protein-3 and retinoid X receptor- α regulate transcriptional signaling and apoptosis, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 33607–33613.
11. L.J. Schedlich, T.F. Young, S.M. Firth, R.C. Baxter, Insulin-like growth factor-binding

- protein (IGFBP)-3 and IGFBP-5 share a common nuclear transport pathway in T47D human breast carcinoma cells, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 18347–18352.
12. Y.G. Amaal, G.R. Thompson, T.A. Linkhart, S.T. Chen, D.J. Baylink, S. Mohan, Insulin-like growth factor-binding protein 5 (IGFBP-5) interacts with a four and a half LIM protein 2(FHL2), *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 12053–12060.
 13. D.L. Andress, Heparin modulates the binding of insulin-like growth factor (IGF) binding protein-5 to a membrane protein in osteoblastic cells, *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 28289–28296.
 14. C.K. Abrass, A.K. Berfield, D.L. Andress, Heparin binding domain of insulin-like growth factor binding protein-5 stimulates mesangial cell migration, *Am. J. Physiol.* 273 (1997) F899–906.
 15. N. Miyakoshi, C. Richman, Y. Kasukawa, T.A. Linkhart, D.J. Baylink, S. Mohan, Evidence that IGF-binding protein-5 functions as a growth factor, *J. Clin. Invest.* 107 (2001) 73–81.
 16. S. Mohan, Y. Nakao, Y. Honda, E. Landale, U. Leser, C. Dony, K. Lang, D.J. Baylink, Studies on the mechanisms by which insulin-like growth factor (IGF) binding protein-4 (IGFBP-4) and IGFBP-5 modulate IGF actions in bone cells, *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 20424–20431.
 17. C. McCaig, C.M. Perks, J.M. Holly, Intrinsic actions of IGFBP-3 and IGFBP-5 on Hs578T breast cancer epithelial cells: inhibition or accentuation of attachment and survival is dependent upon the presence of fibronectin, *J. Cell Sci.* 115 (2002) 4293–4303.
 18. D.L. Andress, Insulin-like growth factor-binding protein-5 (IGFBP-5) stimulates phosphorylation of the IGFBP-5 receptor, *Am. J. Physiol.* 274 (1998) E744–750.
 19. J. Couet, M.M. Belanger, E. Roussel, M.C. Drolet, Cell biology of caveolae and caveolin, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 49 (2001) 223–235.
 20. K.W. Lee, B. Liu, L. Ma, H. Li, P. Bang, H.P. Koeffler, P. Cohen, Cellular internalization of insulin-like growth factor binding protein-3: distinct endocytic pathways facilitate re-uptake and nuclear localization, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 469–476.
 21. W. Li, J. Fawcett, H.R. Widmer, P.J. Fielder, R. Rabkin, G.A. Keller, Nuclear transport of insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor binding protein-3 in opossum kidney cells, *Endocrinology* 138 (1997) 1763–1766.
 22. R.T. Radulescu, Nuclear localization signal in insulin-like growth factor-binding protein type 3, *Trends Biochem. Sci.* 19 (1994) 278.

23. L.J. Schedlich, S.L. LePage, S.M. Firth, L.J. Briggs, D.A. Jans, R.C. Baxter, Nuclear import of insulin-like growth factor-binding protein-3 and -5 is mediated by the importin beta subunit, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 23462–23470.
24. R.T. Radulescu, From insulin, retinoblastoma protein and the insulin receptor to a new model on growth factor specificity: the nucleocrine pathway, *J. Endocrinol.* 146 (1995) 365–368.
25. U. Langel, Cell-penetrating Peptides: Processes and Applications, *CRC Press, Florida*, 2002.
26. S. Fawell, J. Seery, Y. Daikh, C. Moore, L.L. Chen, B. Pepinsky, J. Barsoum, Tat-mediated delivery of heterologous proteins into cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91 (1994) 664–668.
27. E. Vives, P. Brodin, B. Lebleu, A truncated HIV-1 Tat protein basic domain rapidly translocates through the plasma membrane and accumulates in the cell nucleus, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 16010–16017.
28. D. Derossi, A.H. Joliot, G. Chassaing, A. Prochiantz, The third helix of the Antennapedia homeodomain translocates through biological membranes, *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 10444–10450.
29. D.J. Mitchell, D.T. Kim, L. Steinman, C.G. Fathman, J.B. Rothbard, Polyarginine enters cells more efficiently than other polycationic homopolymers, *J. Pept. Res.* 56 (2000) 318–325.
30. M. Belting, Heparan sulfate proteoglycan as a plasma membrane carrier, *Trends Biochem. Sci.* 28 (2003) 145–151.
31. G.M. Poon, J. Gariepy, Cell-surface proteoglycans as molecular portals for cationic peptide and polymer entry into cells, *Biochem. Soc. Trans.* 35 (2007) 788–793.
32. A. Ziegler, P. Nervi, M. Durrenberger, J. Seelig, The cationic cell-penetrating peptide CPP(TAT) derived from the HIV-1 protein TAT is rapidly transported into living fibroblasts: optical, biophysical, and metabolic evidence, *Biochemistry* 44 (2005) 138–148.
33. K. Mani, S. Sandgren, J. Lilja, F. Cheng, K. Svensson, L. Persson, M. Belting, HIV-Tat protein transduction domain specifically attenuates growth of polyamine deprived tumor cells, *Mol. Cancer Ther.* 6 (2007) 782–788.
34. N. Goda, T. Tenno, K. Inomata, N. Iwaya, Y. Sasaki, M. Shirakawa, H. Hiroaki, LBT/PTD

- dual tagged vector for purification, cellular protein delivery and visualization in living cells, *Biochim. Biophys. Acta* 1773 (2007) 141–146.
35. M. Tyagi, M. Rusnati, M. Presta, M. Giacca, Internalization of HIV-1 tat requires cell surface heparan sulfate proteoglycans, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 3254–3261.
 36. I. Nakase, M. Niwa, T. Takeuchi, K. Sonomura, N. Kawabata, Y. Koike, M. Takehashi, S. Tanaka, K. Ueda, J.C. Simpson, A.T. Jones, Y. Sugiura, S. Futaki, Cellular uptake of arginine-rich peptides: roles for macropinocytosis and actin rearrangement, *Mol. Ther.* 10 (2004) 1011–1022.
 37. F. Duchardt, M. Fotin-Mleczek, H. Schwarz, R. Fischer, R. Brock, A comprehensive model for the cellular uptake of cationic cell-penetrating peptides, *Traffic* 8 (2007) 848–866.
 38. A. Jurgeit, C. Berlato, P. Obrist, C. Ploner, P. Massoner, J. Schmolzer, M.C. Haffner, H. Klocker, L.A. Huber, S. Geley, W. Doppler, Insulin-like growth factor-binding protein-5 enters vesicular structures but not the nucleus, *Traffic* 8 (2007) 1815–1828.
 39. J.S. Wadia, R.V. Stan, S.F. Dowdy, Transducible TAT-HA fusogenic peptide enhances escape of TAT-fusion proteins after lipid raft macropinocytosis, *Nat. Med.* 10 (2004) 310–315.
 40. M. Silhol, M. Tyagi, M. Giacca, B. Lebleu, E. Vives, Different mechanisms for cellular internalization of the HIV-1 Tat-derived cell penetrating peptide and recombinant proteins fused to Tat, *Eur. J. Biochem.* 269 (2002) 494–501.
 41. N. Goda, T. Tenno, H. Takasu, H. Hiroaki, M. Shirakawa, The PRESAT-vector: asymmetric T-vector for high-throughput screening of soluble protein domains for structural proteomics, *Protein Sci.* 13 (2004) 652–658

第4章

PRESAT-vector を用いた研究 2 ～蛋白質ドメインの構造・機能解析への応用～

4-1 PRESAT-vector を用いた、構造解析に適した蛋白質ドメイン発現系の構築

PRESAT-vector を用いたクローニングの最大の利点は、多数の蛋白質ドメイン発現系を短時間、同時並行で調製できる点である。この利点を生かし、これまでに、関連する蛋白質ドメインの発現系を多数構築し、構造解析に適した蛋白質ドメインの試料を得てきた。以下に、その一部について報告する。第4章第2節以降では、PRESAT-vector を用いて構築した蛋白質ドメイン発現系によって調製した試料を用いた、蛋白質ドメインの構造と機能解析の研究について述べる。

チオレドキシン融合蛋白質発現系を用いた、組み換えペプチドの調整

大腸菌を用いた蛋白質発現の問題点の一つとして、発現した蛋白質が大腸菌内のプロテアーゼによって分解を受けてしまう点があげられる。それを避けるために、大腸菌で発現後にペリプラズムへ移行するチオレドキシン(TRX)を融合パートナーとして用いる発現系がいくつかの研究グループから提案されている(1, 2)。TRX融合蛋白質の利点は、発現した蛋白質が大腸菌のペリプラズムへ移行するため、結果として得られる蛋白質量が多いことと、内在性プロテアーゼによる分解から保護されることである。この効果は、特に分子量の小さいペプチドの発現系において有用であると考えられるため、TRX融合ペプチド発現系構築のためのPRESAT-vector、pET-TRX-PRESATを構築した(3)。

pET-TRX-PRESATを用いて、Table 4-1-1に示したようなGPCR結合ペプチド、ユビキチン結合ペプチド、PDZドメイン結合ペプチドの発現系を構築した。それぞれ得られたペプチドは、

様々な構造解析や機能解析の研究に役立てた。第4章第2節では、VIPの膜模倣環境での溶液構造の研究について述べる。

Table 4-1-1

Peptides that expression vector constructed by pET-TRX-PRESAT

protein (peptide)	function	reported our study	reference
PACAP 27G	GPCR binding	3, 4	5,6,7
VIP-G	GPCR binding	3,4	7,8
VIP (6-28)G	GPCR binding	3	
VIP (11-28)G	GPCR binding	3	
Hrs-UIM	Ubiquitin binding	3	9,10
STAM2-UIM	Ubiquitin binding	3	9,10
MJD1-UIM	Ubiquitin binding	3	9,10
Claudin3-Cterm	Tight junction, PDZ domain binding		11,12
Claudin7-Cterm	Tight junction, PDZ domain binding		11,12
Claudin15-Cterm	Tight junction, PDZ domain binding		12
MIM1 (CHMP1b)	ESCRT-III, Vps4 binding		13
MIM2 (CHMP6)	ESCRT-III, Vps4 binding		14

AAA-ATPaseのN末端ドメインの構造と機能解析のための発現系構築

AAA-ATPaseは全ての生命に見られる六量体のATP加水分解酵素である。これらは、蛋白質複合体の解離や蛋白質輸送を含む様々な細胞内過程で重要な役割を果たしている(15-18)。AAA-ATPaseは、保存された220-250アミノ酸からなる触媒ATPaseドメインが1コピー(type I)か、2コピー(type II)かで分類されている。一般に、AAA-ATPaseのN末端領域には、アダプターへの結合、基質特異性、局在のような酵素の特異的な働きに必要なドメインが存在すると考えられている。このN末端ドメインの構造、機能解析を行うために、様々なAAA-ATPaseのN末端ドメインの発現系を構築した。発現系構築には、pGEX-4T3-PRESATまたは、pGEX-4T3-PRESATのプロテアーゼによるタグ切断サイトをスロンビンからPreScission proteaseにかえたpGEX-6P3-PRESATを用い、PRESATクローニングの利点を生かして、異なる生物種のオルソログ蛋白質の発現系を並行して構築した。このうち、構造解析に適した蛋白質ドメインについては、すでに共同研究者らにより、構造決定まで完了したものもある

(Table 4-1-2)。第4章第3節では、TypeII AAA-ATPaseであるNVLについて、構造・機能解析を行った結果について述べる。

Table 4-1-2

Construction of AAA-ATPase N-terminal domain by PRESAT cloning

protein	name of N-terminal domain	species	reported our study and structur	reference
Vps4b	MIT	mouse		24
Vps4b	MIT	human	19, PDB code; 1WR0	24
Vps4	MIT	yeast		24
Snx15a	MIT	human		25
Snx15a	MIT	mouse		25
Spastin	MIT	human		26
Spastin	MIT	mouse		26
Katanin p60	NTD	human		27
Katanin p60	NTD	mouse	20, PDB code; 2RPA	27
NSF		human		28
NSF		mouse		28
NVL	UD	human		29
NVL	UD	mouse	21, PDB code; 2RRE	29
smallminded	UD	Drosophila		29
PEX1	ND	human		30
PEX1	ND	mouse	22,23, PDB code; 1WLF	30

タイトジャンクション形成に関与するZonula occludens (ZO)のPDZドメイン発現系の構築

タイトジャンクション、上皮細胞や内皮細胞に見られる細胞間接着複合体であり、細胞の最も頂端側にある。タイトジャンクションは上皮細胞および内皮細胞の主要なバリアー機能を担っていると考えられており、細胞層の頂端側と基底面側の化学物質や生物学的物質の独特な組成を維持している(31,32)。タイトジャンクションの細胞外領域には、claudin(33,34)、occludin(31)、junctional adhesion molecule (JAM)(35)、tricellulin(36)という4種類の膜貫通蛋白質があり、これらは、PDZドメインを含む足場蛋白質でお互いに連携している。

例えば、足場蛋白質ZO-1、ZO-2、ZO-3は、それぞれ3つのPDZを持っている。これらの構造と機能について明らかにするために、ZO-1、ZO-2のPDZドメイン、その他のドメインの発現系をpGEX-6P3-PRESATを用いて構築した(Table 4-1-3)。調製した組み換えPDZドメインと、TRX融合発現系を用いて調製したClaudinを用いての結合実験など、PDZドメインの機能解析

が現在進行中である。また、ZO-1PDZ1の立体構造解析が完了した(PDB code: 2RRM)。その際に行ったNMRデータの帰属(37)について、第4章第4節で述べる。

Table 4-1-2
Construction of domains of ZO-1, ZO-2 by PRESAT cloning

protein	domain	residues
ZO-1	PDZ1	18-110
	PDZ2	162-271
	PDZ3	407-512
	SH3	513-590
	Zu5	1629-1745
ZO-2	PDZ1	3-99
	PDZ2	271-380

参考文献

1. LaVallie, E..R., M.DiBlasio, E.A., Kovacic, S., Grant, K. L., Schendel, P. F., McCoy, J. M., A thioredoxin gene fusion expression system that circumvents inclusion body formation in the E.. coli cytoplasm. *Biorwchnology (NY)* (1993) 11, 187-193
2. Uegaki, K., Nemoto, N., Shimizu, M., Wada, T., Kyogoku, Y., Kobayashi, Y., 15N labeling method of peptides using a thioredoxin gene fusion expression system: an application to ACTH-(1-24) *FEBS Lett.*, (1996) 379, 47-50
3. Tenno, T., Goda, N., Tateishi, Y., Tochio, H., Mishima, M., Hayashi H., Shirakawa, M., Hiroaki, H., High-throughput construction method for expression vector of peptides for NMR study suited for isotopic labeling *Protein Eng. Des. Sel* (2004) 17, 305-314
4. Umetsu, Y., Tenno, T., Goda, N., Shirakawa, M., Ikegami, T., Hiroaki, H., Structural difference of vasoactive intestinal peptide in two distinct membrane-mimicking environment. *Biochem. Biophys. Acta* (2011) 1814, 724-730
5. Vaudry, D., Gonzalez, B. J., Basille, M., Yon, L., Fournier, A., Vaudry, H., Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its receptors : from structure to functions. *Pharmacol Rev.* (2000) 52, 269-324
6. Laburthe, M., Couvineau, A., Molecular pharmacology and structure of VPAC Receptors for VIP and PACAP. *Regul. Pept.* (2002) 108, 165-173

7. Laburthe, M., Couvineau, A., Marie, J.C., VPAC receptors for VIP and PACAP. *Receptors Channels*, (2002) 8, 137–153
8. Gozes, I., Fuman, S., VIP and drug design. *Curr. Pharm. Des.* (2003) 9, 483–494
9. Hofmann, K., Falguet, L., A ubiquitin-interacting motif conserved in components of the proteasomal and lysosomal protein degradation systems. *Trends Biochem. Sci.*, (2001) 26, 347–350
10. Fisher, R.D., Wang, B., Alam, S.L., Higginson, D.S., Robinson, H., Sundquist W.I., Hill, C.P., Structure and ubiquitin binding of the ubiquitin-interacting motif. *J. Biol. Chem.* (2003) 278, 28976–28984
11. Itoh, M., Furuse, M., Morita, K., Kubota, K., Saitou, M., Tsukita, S., Direct Binding of Three Tight Junction-associated MAGULs, ZO-1, ZO-2 and ZO-3, with the COOH Termini of Claudins. *J. Cell Biol.*, (1999) 147, 1351–1363
12. Furuse, M., Tsukita, S., Claudins in occluding junctions of humans and flies. *Trends Cell Biol.* (2006) 16, 181–188
13. Stuchell-Brereton, M.D., Skalicly, J.J., Kieffer, C., Karren, M.A., Ghaffarian, S., Sundquist, W.I., ESCRT-III recognition by VPS4 ATPases. *nature* (2007) 449, 740–744
14. Kieffer, C., Skalicky, J.J., Morita, E., Domenico, I.D., Ward, D.M., Kaplan, J., Sundquist, W.I., Two Distinct Modes of ESCRT-III Recognition Are Required for VPS4 Functions in Lysosomal Protein Targeting and HIV-1 Budding. *Develop. cell* (2008) 15, 62–73
15. Lupas, A. N. and Martin, J., AAA proteins. *Curr Opin Struct Biol* (2002) 12, 746–753
16. Patel, S. and Latterich, M., The AAA team: related ATPases with diverse functions. *Trends Cell Biol* (1998) 8, 65–71
17. Neuwald, A. F., Aravind, L., Spouge, J. L., and Koonin, E. V., AAA+: A class of chaperone-like ATPases associated with the assembly, operation, and disassembly of protein complexes. *Genome Res* (1999) 9, 27–43
18. Ogura, T. and Wilkinson, A. J., AAA+ superfamily ATPases: common structure-diverse function. *Genes Cells* (2001) 6, 575–597
19. Takasu, H., Jee, J.G., Ohno, A., Goda, N., Fujiwara, K., Tochio, H., Shirakawa, M., Hiroaki, H., Structural characterization of the MIT domain from human Vps4b. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, (2005) 334, 460–465
20. Iwaya, N., Kuwahara, Y., Fujiwara, Y., Goda, N., Tenno, T., Akiyama, K., Mase, S., Tochio, H.,

- Ikegami, T., Shirakawa, M., Hiroaki, H., A Common Substrate Recognition Mode Conserved between Katanin p60 and VPS4 Governs Microtubule Severing and Membrane Skeleton Reorganization. *J. Biol. Chem.*, (2010) 285, 16822–16829
21. Fujiwara, Y., Fujiwara, K., Goda, N., Iwaya, N., Tenno, T., Shirakawa, M., Hiroaki, H., Structure and function of the N-terminal nucleolin binding domain of nuclear valosin containing protein-like 2(NVL2) harboring a nucleolar localization signal. *J. Biol. Chem.* (2011) 286, 21732–21741
 22. Shiozawa, K., Maita, N., Tomii, K., Seto, A., Goda, N., Akiyama, Y., Shimizu, T., Shirakawa, M., Hiroaki, H., Structure of the N-terminal domain of PEX1 AAA-ATPase. Characterization of a putative adaptor-binding domain. *J. Biol. Chem.* (2004) 279, 50060–50068
 23. Shiozawa, K., Goda, N., Shimizu, T., Mizuguchi, K., Kondo, N., Shiozawa, N., Shirakawa, M., Hiroaki, H., The common phospholipid-binding activity of the N-terminal domains of PEX1 and VCP/p97. *FEBS J.* (2006) 273, 4959–4971
 24. M., Babst, T.K. Sato, L.M. Banta, S.D. Emr, Endosomal transport function in yeast requires a novel AAA-type ATPase, Vps4p. *EMBO J.* (1997) 16, 1820–1831
 25. Phillips, S.A., Barr, V.A., Haft, D.H., Taylor, S.I., Haft, C.R., Identification and characterization of SNX15, a novel sorting nexin involved in protein trafficking, *J. Biol. Chem.* (2007) 276, 5074–5084
 26. Ciccarelli, F.D., Proukakis, C., Patel, H., Cross, H., Azam, S., Patton, M.A., Bork, P., Crosby, A.H., The identification of a conserved domain in both spartin and spastin, mutated in hereditary spastic paraplegia, *Genomics* (2003) 81, 437–441
 27. McNally F.J., Vale R.D., Identification of katanin, an ATPase that severs and disassembles stable microtubules. *Cell* (1993) 75, 419–29
 28. Rabouille C., Levine T.P., Peters J.M., Warren, G., An NSF-like ATPase, p97, and NSF mediated cisternal regrowth from mitotic Golgi fragments. *Cell* (1995) 82, 905–914
 29. Germain-Lee, E. L., Obie, C., and Valle, D., NVL: a new member of the AAA family of ATPases localized to the nucleus. *Genomics* (1997) 44, 22–34
 30. Geisvrecht, B.T., Collins, C.S., Reuber, B.E., Gould, S.J., Disruption of a PEZ1-PEX6 interaction is the most common cause of the neurologic disorders Zellweger syndrome, neonatal adrenoleukodystrophy, and infantile Refsum disease. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*,

(1998) 95, 8630–8635

31. Furuse, M., Hirase, T., Itoh, M., Nagafuchi, A., Yonemura, S., Tsukita, S., and Tsukita, S., Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *J Cell Biol* 123 (1993) 1777–1788
32. Ikenouchi, J., Umeda, K., Tsukita, S., Furuse, M., and Tsukita, S., Requirement of ZO-1 for the formation of belt-like adherens junctions during epithelial cell polarization. *J Cell Biol* 176 (2007) 779–786
33. Furuse, M., Fujita, K., Hiiragi, T., Fujimoto, K., and Tsukita, S., Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occluding. *J Cell Biol* 141 (1998) 1439–1550
34. Morita, K., Sasaki, H., Furuse, K., Furuse, M., Tsukita, S., and Miyachi, Y., Expression of claudin-5 in dermal vascular endothelia. *Exp Dermatol* 12 (2003) 289–295
35. Martin-Padura, I., Lostaglio, S., Schneemann, M., Williams, L., Romano, M., Fruscella, P., Panzeri, C., Stoppacciaro, A., Ruco, L., Villa, A., Simmons, D., and Dejana, E., Junctional adhesion molecule, a novel member of the immunoglobulin superfamily that distributes at intercellular junctions and modulates monocyte transmigration. *J Cell Biol* 142 (1998) 117–127
36. Ikenouchi, J., Furuse, M., Furuse, K., Sasaki, H., Tsukita, S., and Tsukita, S., Tricellulin constitutes a novel barrier at tricellular contacts of epithelial cells. *J Cell Biol* 171 (2005) 939–945
37. Umetsu, Y., Goda, N., Taniguchi, R., Satomura, K., Ikegami, T., Furuse, M., Hiroaki, H., ¹H, ¹³C and ¹⁵N resonance assignment of the first PDZ domain of mouse ZO-1. *Biomol NMR Assign*, (2011)5, 207–210

4-2 血管作動性ペプチド(VIP)の2種類の膜模倣環境での構造比較

4-2-1 序論

血管作動性ペプチド(VIP)は、グルカゴン・セクレチンスーパーファミリーに属する 28 アミノ酸から成る神経ペプチドである。魚(タラ)やカエルからヒトに至るまで進化的によく保存されており、哺乳類においてはモルモットをのぞいて、少なくとも 85%のアミノ酸が同じ配列である(1)。VIP は中枢神経系および末梢神経系に広く存在しており、発生や生育、神経細胞や内分泌細胞の制御など生理的過程や病理過程に幅広く関与している。また、消化、呼吸、生殖、循環器においても機能しており、さらに、がん、免疫応答、サーカディアンリズムにおいて、重要な役割を果たしている(2)。VIP はクラス II G 蛋白質共役受容体(GPCR)のリガンドであり、2種類の受容体サブタイプ(VPAC1とVPAC2)と相互作用する(3)。VIP は他のセクレチンファミリーのペプチドである脳下垂体アデニル酸シクラーゼ活性化ポリペプチド(PACAP)と近縁であり、68%の相同性をもつ(4,5)。VIP と PACAP は、VPAC1 と VPAC2 へ同等の親和性をもって結合する(6)。VIP が VPAC1 あるいは VPAC2 に結合すると、サイクリックアデノシン 5'-リン酸の量が顕著に増加する(7)、一方、アデニル酸シクラーゼ(8)やホスホリパーゼ C(9)が活性化し、多様な転写因子を介して多岐の生理的過程が起きる。

最近、自然免疫応答において、VPAC1 と VPAC2 の重要な生物学的機能が発見され(10)、VIP 自身同様 VIP アゴニストの治療可能性が有望視されている(11)。VIP の治療可能性を示す研究結果は増えつつあり、例えば、膵炎(12)、ヒトクローン病(TNBS 誘発性大腸炎)(13,14)、細菌性敗血症(生存型モデル)(15)、リウマチ性関節炎(RA:コラーゲン誘発性モデル)(16)などのマウスモデルで示されている。膵炎モデルの最初の例では、VPAC2 と VPAC1 は反対の応答をするので、VIP そのものよりも VPAC1 選択的なアゴニストがよりよい治療効果が得られた。さらに、他の三例(クローン病、敗血症生存型、RA)では、VIP 自身の潜在的な抗炎症効果がよく働いており、この結果は、TNF α や IL-6 のような炎症性サイトカイ

ンをおそらく抑制しているからであろう。

医療における VIP の使用だけでなく、VIP と VIP 受容体との間の特異的な相互作用はいくつかのがんの診断においても有用である(17,18)。乳がんや前立腺がんでは、VPAC1 の発現の増加が観察されており(19)、^{99m}Tc ラベル VIP や ⁶⁴Cu ラベル TP3939 のような放射性ラベル VIP 類似体が蓄積するため、陽電子放射型断層撮影法によりがんを可視化することができる。また、VPAC 受容体は、VIP と結合すると細胞内へエンドサイトーシスし、一時的に脱感作されるため(20)、VIP 類似体はイメージング試薬としても注目されている。

VIP の三次元構造や安定性の研究は、薬剤送達系の開発や VIP とその類似体の治療可能性を向上させるために重要である。生化学的安定性や物理化学的安定性を向上させるいくつかの VIP 剤形が積極的に研究されてきた(21,22,23)。治療に用いる VIP の典型的な工夫は、VIP をリン脂質あるいはリポソームに組み込むことであり、この工夫により VIP の活性は通常倍増する。このような活性上昇は、*in vivo* における酵素的分解から VIP が保護されるためである。また、多くの構造解析から、PACAP (24,25) や他のクラス II GPCR リガンド(26-29) が受容体に結合する際、 α -ヘリックスコンフォメーションをとることが示されている。これらのペプチドリガンドは、脂質あるいはリポソームにペプチドが結合するとランダムコイルから α -ヘリックスへ構造変化することが示されているため、あらかじめ α -ヘリックスコンフォメーションになっていることが、ペプチドの生物学的活性を上昇させると考えられる(30)。これらの構造変化と活性との関係は二段階モデルとよばれ、PACAP と PAC1R との相互作用研究において示唆されている(24)。したがって、受容体非存在下とリン脂質存在下における VIP の溶液構造の解析は、重要な課題である。

今回の研究において、構造活性相関研究により VIP 類似体の開発を行うために、我々は VIP の構造解析に焦点を絞った。過去に、30%トリフルオロエタノール(TFE)溶液中の VIP の構造が、¹H NMR 法により決定された。この構造解析では同位体ラベルを導入したペプチドを使っていないので、溶液構造の収束が限定的であった(31)。さらに、立体構造の座標が公開

されていないので、他のグループによる構造活性相関研究に限りがあった。今回我々は、50%メタノール溶液中とドデシルホスホコリン(DPC)ミセルを含む水溶液中の VIP-G(本来の28 アミノ酸とC末端グリシン残基をもつVIPで、C末端アミド化を受ける前のVIP前駆体ペプチドと同等である)の溶液構造を決定した。同位体ラベルを導入したVIPペプチドを使うことで、多量のDPCミセル存在下におけるNMRスペクトルの解析が可能となった。そして、これら二種類の条件下における構造の違いを詳細に述べる。

4-2-2 実験

¹⁵N-and ¹³C/¹⁵N-labeled VIP-G の調製

今回用いたVIP-Gの大腸菌発現系は、チオレドキシンとの融合蛋白質として発現させる系である。前の論文で示したように、チオレドキシンの後に、His₆タグ、Factor Xa 切断部位が続き、最後にVIP-Gとなっている(TRX_VIP-G)(32)。¹⁵Nラベルと¹³C/¹⁵NダブルラベルのTRX_VIP-G融合蛋白質を発現させるために、唯一の窒素源として0.5 g/Lの¹⁵N塩化アンモニウム、また唯一の炭素源として4 g/Lの¹²C-グルコース、もしくは2 g/Lの¹³C₆-グルコースを含むM9培地を用いた。50 µg/mLのアンピシリンを含む100 mlのM9培地で、pET-TRX_VIP-Gベクターを導入した大腸菌BL21(DE3)を16時間培養した。そして、同じM9培地を0.9 L入れた5 Lバッフル付フラスコに大腸菌培養液を移した。イソプロピル-D-チオガラクトピラノシドを加えて発現誘導を行い、30°Cで6時間培養した後、集菌した。

30 mlの50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.15 M NaCl, 10 mM 2-mercaptoethanol バッファーで大腸菌ペレットを懸濁し、超音波で破碎した。遠心分離で不溶物を除去し、4 mlのDEAE-Sepharose カラムに上清を通した。あらかじめ50 mM NiSO₄を流してNi²⁺イオンをキレートさせ、50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 20 mM imidazole バッファーで平衡化した4 mlのChelating-Sepharose Fast Flow カラムに、DEAE-Sepharose カラムから溶出した蛋白質溶液を通した。また、超音波破碎ではなく、浸透圧ショックにより抽出した蛋白質溶液については、

直接 Chelating-Sepharose Fast Flow カラムに通した。50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 50 mM imidazole バッファーで TRX_VIP-G を吸着させたカラムを洗浄し、そして、50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.2 M imidazole バッファーで融合蛋白質を溶出させた。1 L の 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.5 M NaCl バッファーを使って、カラムから溶出させた融合蛋白質 (2 mL) を 4°C で 16 時間透析した。

NMR

Bruker AvanceDRX (500 MHz)、および極低温三重共鳴プローブを装備した Bruker Avance III (600 MHz) の NMR 装置を用いて、NMR 実験を行った。メタノール中の構造を決定するために、0.25 mL の 20 mM Tris-HCl, pH 7.4 を含む 50% 軽水-50% d_3 メタノールに、 ~ 400 μ g の $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -VIP-G を溶かした。DPC ミセル存在下での構造を決定するために、0.25 mL の 50 mM カリウムリン酸バッファー pH 7.2 を含む 90% 軽水-10% 重水に、 ~ 500 μ g の ^{15}N -VIP-G、もしくは $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -VIP-G を溶かし、50 mM DPC ミセルを含むサンプルと含まないサンプルを用意した。化学シフトのリファレンスとして、sodium 2,2-dimethyl-2-silapentane-5-sulfonate を用いた。HSQC スペクトル (33) は Gradient sensitivity enhancement 法 (34) を組み込んで、8 回積算、256 ポイントで測定を行った。また、データの加工時にゼロフィリングを行った。メタノールサンプルについては 288K で、DPC ミセルサンプルは 298K で測定した。NMRPipe (35) を使ってスペクトルデータを加工し、nmrDraw プログラム (35) で解析した。水素原子間距離情報を得るために、三次元 ^{13}C -edited HSQC NOESY と ^{15}N -edited HSQC NOESY スペクトルを、メタノールサンプルは 200 ms、DPC ミセルサンプルは 150 ms のミキシングタイムで測定した。CYANA 2.0.17 プログラム (36,37) の通常の 7 回反復サイクルプロトコルを使って、構造計算を行った。SPARKY プログラム (38) を使って、すべての NOE 交差ピークを手作業で選択した。主鎖の化学シフトをベースとした TALOS プログラム (39) を使って、二面角拘束情報を計算した。メタノール中の構造座標は 2RRH、DPC ミセル結合型の構造座標は 2RRI で PDB に登録

した。また、メタノール中の帰属情報は 11419、DPC ミセル結合型の帰属情報は 11420 で BMRB に登録した。

4-2-3 結果と考察

50% MeOH 中の VIP-G の構造

VIP-G やその類似体の SAR を決定するためのコンフォメーション研究において、メタノールや TFE のような有機溶媒を使って、CD と NMR の両方、もしくはそのどちらかの解析を行っている。これらの溶媒は単独で、もしくは水と混ぜて使われるが、これらを使うと、細胞膜や VIP 受容体のアミノ末端細胞外ドメイン (N-ted) のような疎水的環境を模倣することができる。野生型の VIP は、カルボキシ末端にアミノ基をもつ 28 アミノ酸のペプチドである。しかしながら、VIP のカルボキシ末端アミノ基は、受容体への結合や受容体の活性化にはそれほど寄与がないことを Fahrenkrug らが明確に示している(40)。したがって、今回の研究では、グリシン残基が余分にある VIP (VIP-G) を NMR 解析に用いた (Figure 4-2-1A)。そして、大腸菌で合成させた $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ で同位体ラベルを導入した VIP-G を用いた。

三重共鳴スペクトルの HNCACB、CBCA(CO)NH、HNCO を通常の方法で解析し、50%メタノール溶液における VIP-G の主鎖 HN、N、C α 、C β 、C γ シグナルの帰属を行った(41)。また、HCC(CO)NH と CC(CO)NH スペクトルから、H α 、側鎖の水素原子、側鎖の炭素原子のシグナルを帰属した。Figure 4-2-1B に、50%メタノール溶液における VIP-G を帰属した ^1H - ^{15}N HSQC スペクトルを示す。His¹ と Ser² を除いた主鎖由来のすべてのシグナルと、側鎖由来の非交換性水素原子シグナルのうち 93%を帰属した。TALOS プログラムを使って、主鎖の二面角拘束情報を決定した(39)。TALOS プログラムで解析した結果、50%メタノール溶液においては、VIP-G の Ala⁴ から Ser²⁵ までが α -ヘリックスであることが示された。

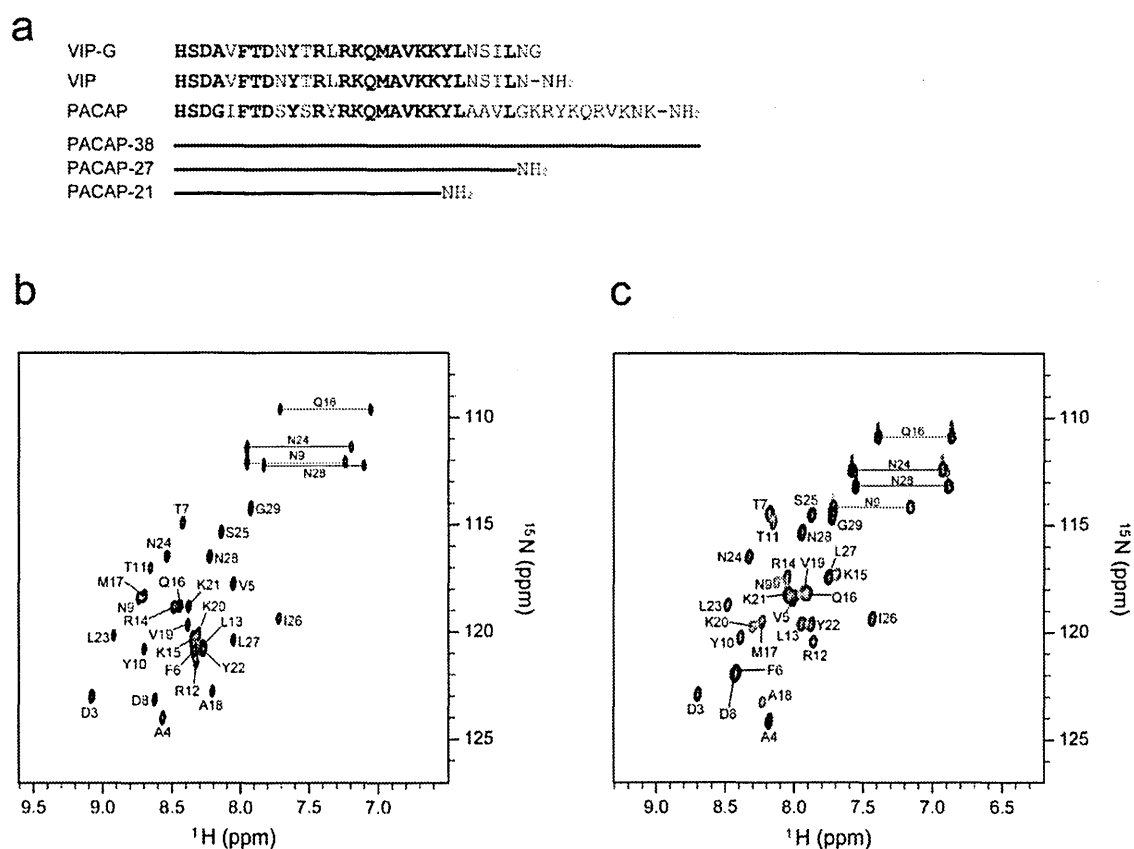


Figure 4-2-1
Amino acid sequence and ¹H-¹⁵N HSQC spectra.

(A) Amino acid sequence of VIP and PACAP. Conserved residues are shown in bold. The filled circles indicate the residues forming a hydrophobic surface facing to DPC micelle. (B) and (C) ¹H-¹⁵N HSQC spectra in 50% MeOH containing 20 mM Tris-HCl (pH 4.4) at 288 K (B) and in the presence of the 50 mM DPC micelle containing 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.2) at 298 K (C). Spectral cross-peaks are labeled by a 1-letter amino acid code and residue number.

NMRによって得られた合計 395 個の実験的な拘束条件から、最終的に、50%メタノール溶液における VIP-G の低エネルギー構造 20 個の組み合わせを得た。ヘリックスで見られる中距離 NOE である $d_{\alpha N}(i, i+3)$ 、 $d_{\alpha\beta}(i, i+3)$ 、 $d_{\alpha N}(i, i+4)$ が Val⁵-Gly²⁹ において多く得られた (Figure4-2-2A)。20 個の構造の Ala⁴-Asn²⁸ における主鎖原子の平均二乗偏差 (RMSD) は 0.35Å であり、すべての窒素原子と炭素原子の RMSD は 0.95Å であった。最適化した VIP-G の 20 個の構造全てから得られた Ramachandran プロットから、得られた構造の主鎖二面角は最も好ましい値、もしくは次に好ましい値の範囲内であることが分かった (Table4-2-1)。50%メ

タノール溶液におけるひずみが少ない 20 個の構造について、主鎖を重ね合わせた図を Figure4-2-3 に示した。メタノール溶液における VIP-G の構造は、4-29 番目のアミノ酸領域では α -ヘリックス図構造であり、アミノ末端領域 (1-3 番目) は構造をもっていなかった (Figure4-2-3B)。

Table 4-2-1

Structural statistics for the final 20 structures of VIP in 50% MeOH and DPC

	MeOH	DPC
Distance restraints		
Total number of NOE restraints	395	376
Intraresidue	Unused	Unused
Sequential restraints ($ i-j =1$)	246	246
Medium-range restraints ($1 < i-j \leq 4$)	149	129
Long-range restraints ($ i-j > 5$)	0	1
Dihedral angle restraints		
$\phi/\psi/\chi$	23/23/0	22/22/0
Hydrogen bond restraints	0	0
Final statistics		
Maximum target function	0.05	0.47
RMSD for experimental structure (Å)		
All backbone atoms (4-28 in MeOH, 6-26 in DPC)	0.35	0.55
All heavy atoms (4-28 in MeOH, 6-26 in DPC)	0.93	0.93
Ramachandran plot statistics (%)		
Most favored region	97.0	89.1
Additionally allowed region	3.0	10.9
Generously allowed region	0.0	0.0
Disallowed region	0.0	0.0

Tanらは、30%TFE 溶液における VIP の構造を以前に報告した(31)。50%メタノール溶液における α -ヘリックスの含量は 30%TFE 溶液における含量と同様であり、CD のデータとも一致している。対照的に、50%メタノール溶液と 30%TFE 溶液では側鎖のコンフォメーションが異なっている。30%TFE 溶液では、複数の側鎖-側鎖間の相互作用 (Asn⁹-Arg¹²、Leu¹³-Met¹⁷、Val¹⁹-Leu²³、Lys²⁰-Asn²⁴) が報告されていた。しかしながら、今回の実験では側鎖構造はよく収束していた (RMSD 値 1.0Å 以下) にもかかわらず、そのような側鎖間の相互作用は見られなかった。

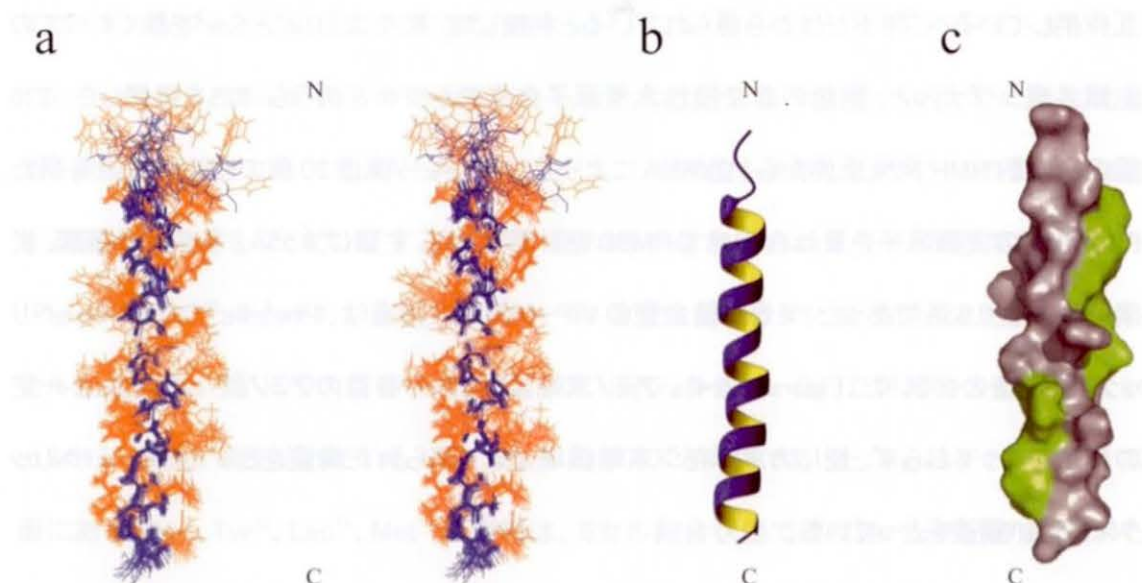


Figure 4-2-3

Three-dimensional structures of VIP-G in 50% MeOH.

(A) Ensemble of the 20 lowest energy structures of VIP-G in 50% MeOH. The backbone atoms of residues 4–28 were used for the superimposition. (B) and (C) Side views of the ribbon diagram (B) and surface model (C) of VIP-G of a representative conformer. The hydrophobic residues (V, I, L, Y, F, M) are colored green.

DPC ミセルに結合した VIP-G の構造

次に我々は、50 mM DPC ミセル存在下で VIP-G の溶液構造を決定した。(ペプチド/DPC の比率 1:84) DPC は膜を模倣する化合物としてよく知られており、ペプチド-膜相互作用の溶液 NMR 研究においてしばしば用いられている。水中では、1 個の DPC ミセルは 60 個の DPC 分子から構成されている。DPC は中性の頭部をもち、脂質膜の異方的環境を模倣する。DPC は安定なミセルを形成するので、溶液 NMR 研究においては妥当な相関時間と許容可能な線幅をもたらす。DPC ミセルと平面的な脂質二重膜との大きな違いは、ミセルが大きく曲がった表面をもつことである。

DPC ミセル存在下の VIP-G の ^1H - ^{15}N HSQC スペクトルを図 1C に示した。DPC ミセルへの相互作用により VIP-G の交差ピークが広幅化していた (DPC ミセルの分子質量は約 20 kDa である)。このサンプル (ペプチド/ミセル比率は 1:3) へさらに DPC を加えても、NMR シグナルに変化はなかった。したがって、この条件下で得られたこれらの NMR シグナルは、ミセルへ相

相互作用しているペプチドだけから得られていると判断した。我々は、His¹とSer²を除くすべての主鎖共鳴シグナルと、側鎖の非交換性水素原子由来のシグナルのうち 93%を帰属した。376個の実験的 NMR 拘束条件から、CYANAにより低エネルギー構造 20 個の組み合わせを得た。Phe⁶-Ile²⁶ の主鎖原子を重ね合わせて RMSD を計算すると、主鎖は 0.55Å、すべての窒素、炭素原子では 0.93Å であった。ミセル結合型の VIP-G の二次構造は、Phe⁶-Ile²⁶ において α -ヘリックス構造をとっていた (Figure 4-2-4)。アミノ末端領域 (1-5 番目のアミノ酸) はほとんど一定の構造をとっておらず、逆にカルボキシ末端領域はより限られた構造をとっており、 α -ヘリックスに近い構造をとっていた。

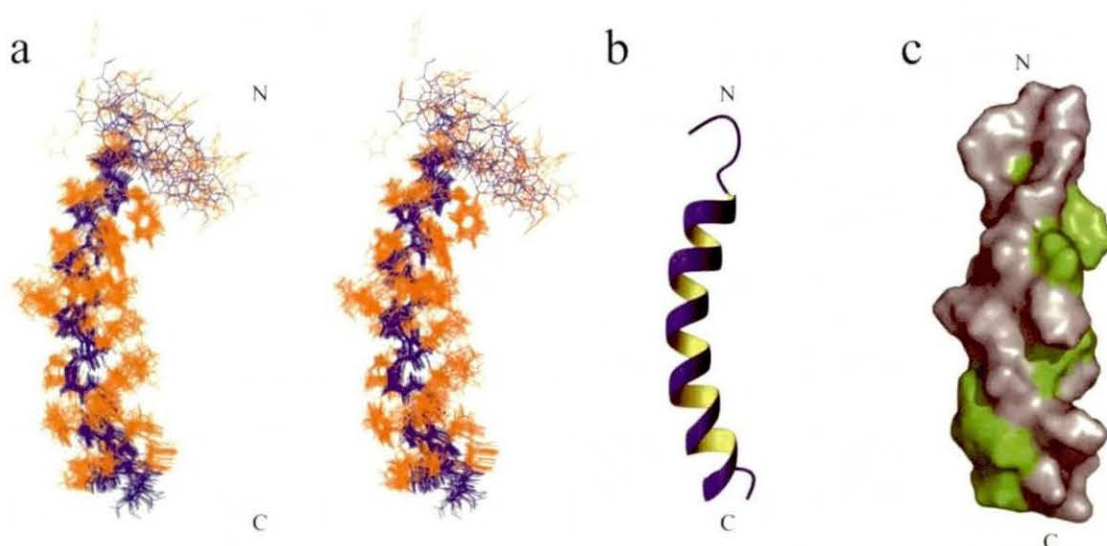


Figure 4-2-4

Three-dimensional structures of VIP-G bound to a DPC micelle.

(A) Ensemble of the 20 lowest energy structures of VIP-G in the DPC micelle. The backbone atoms of residues 6–26 were used for the superimposition. (B) and (C) Side views of the ribbon diagram (B) and surface model (C) of micelle-bound VIP-G of a representative conformer. The hydrophobic residues (V, I, L, Y, F, M) are colored green.

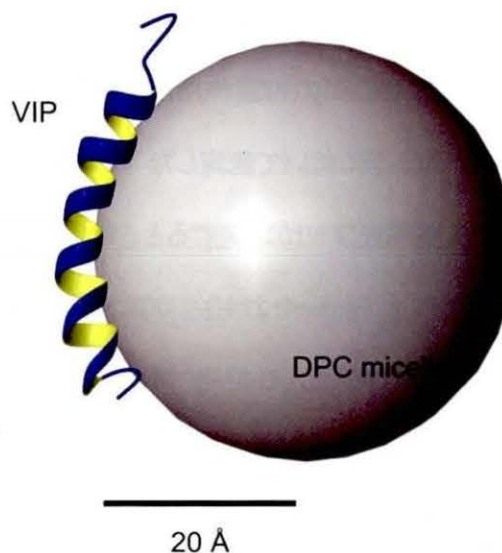
50%メタノール中と、DPC ミセルに結合した VIP-G の構造の比較

ペプチドと膜との間の相互作用面を決定するために、まず、DPC ミセル結合型の VIP-G の化学シフトとメタノール溶液における VIP-G の化学シフトとを比較した。DPC とメタノール溶液

ではいくつかのピークにおいて化学シフトが異なっているものの、化学シフトデータからは VIP-G とミセルとの間の相互作用面を特定することはできなかった。そこで我々は、2 つの異なる膜模倣環境下において決定した VIP-G の三次元構造を比較した。VIP-G の表面に位置する疎水性残基をマッピングすると、背中合わせで疎水性パッチが 2 カ所存在していた (Figure4-2-3C と Figure4-2-4C)。50%メタノール溶液における VIP-G の構造と比較すると、ミセル結合型の α -ヘリックスはやや湾曲していた (Figure4-2-4A, B)。この湾曲の直径は $21.84 \pm 2.01 \text{ \AA}$ であり、報告されている DPC ミセルのサイズと同様であった (Figure4-2-5) (42)。凹面にある Phe⁶、Tyr¹⁰、Leu¹³、Met¹⁷ の側鎖は、ミセル結合状態で疎水性パッチを形成していた。VIP-G はミセルの内部へこれらの側鎖を向けて水とミセルとの境界面に存在していた。したがって、メタノール溶液における構造とミセル結合型構造との間の差は、ミセルの曲面上でペプチドとミセルが相互作用することによって生じていると我々は推測した。注目すべきことに、これら 2 つの疎水性クラスターは VIP と PACAP においてだいたい保存されており、このことはこれらの残基が生物学的に重要であることを示唆している。Ala¹⁸、Val¹⁹、Tyr²²、Leu²³、Ile²⁶、Leu²⁷ から構成される疎水性クラスターは、PACAP-PAC1R 複合体構造においてペプチドとアミノ末端細胞外ドメインとの相互作用面に位置していた (25)。そして、VIP の Ala 置換変異体を使った SAR 研究の結果とも部分的に一致している (43)。スピラベルを導入した DPC 類似体を使って NMR 実験を行うことで、これらの残基がペプチド-脂質相互作用に直接関与している証拠を得ることが、今後必要である。

Figure 4-2-5

Ribbon presentation of the structural model of VIP-G adsorbed to the surface of a spherical DPC micelle of radius 21.7 Å.



VIP-G と PACAP の構造比較

VIPと高い配列相同性をもつPACAPについて、ミセル結合型の構造と受容体結合型の構造が既に報告されている(24)。本節では、我々が決定したメタノール溶液における構造およびミセル結合型の構造を、既に報告されている構造と比較する。Inooka らがミセル結合型のPACAP27の構造を予備的に解析した結果、 α -ヘリックス構造をとっていた(PDB 未登録)。さらに、ミセル結合型のPACAP38の構造(PDB ID 2D2P)はフレキシブルなアミノ末端(1-4番目のアミノ酸)のあとに安定な α -ヘリックス領域(5-38番目のアミノ酸)が続く構造をしているが、この構造は実質的にVIP-Gと同様の構造である(Figure4-2-6B, C)。とりわけ、PACAP38のカルボキシ末端領域は曲がったヘリックスとなっており、ミセルの湾曲を反映している可能性がある。その上、同一の疎水性残基(Phe⁶、Tyr¹⁰、Leu¹³、Met¹⁷)はミセル結合の相互作用面を形成しており、その相互作用面は疎水性環境下であるDPCミセルの内部へ挿入されている(Figure4-2-6D, E)。この結果は、VIP-GとPACAPが同じミセル繫留トポロジーをもっていることを示唆している。

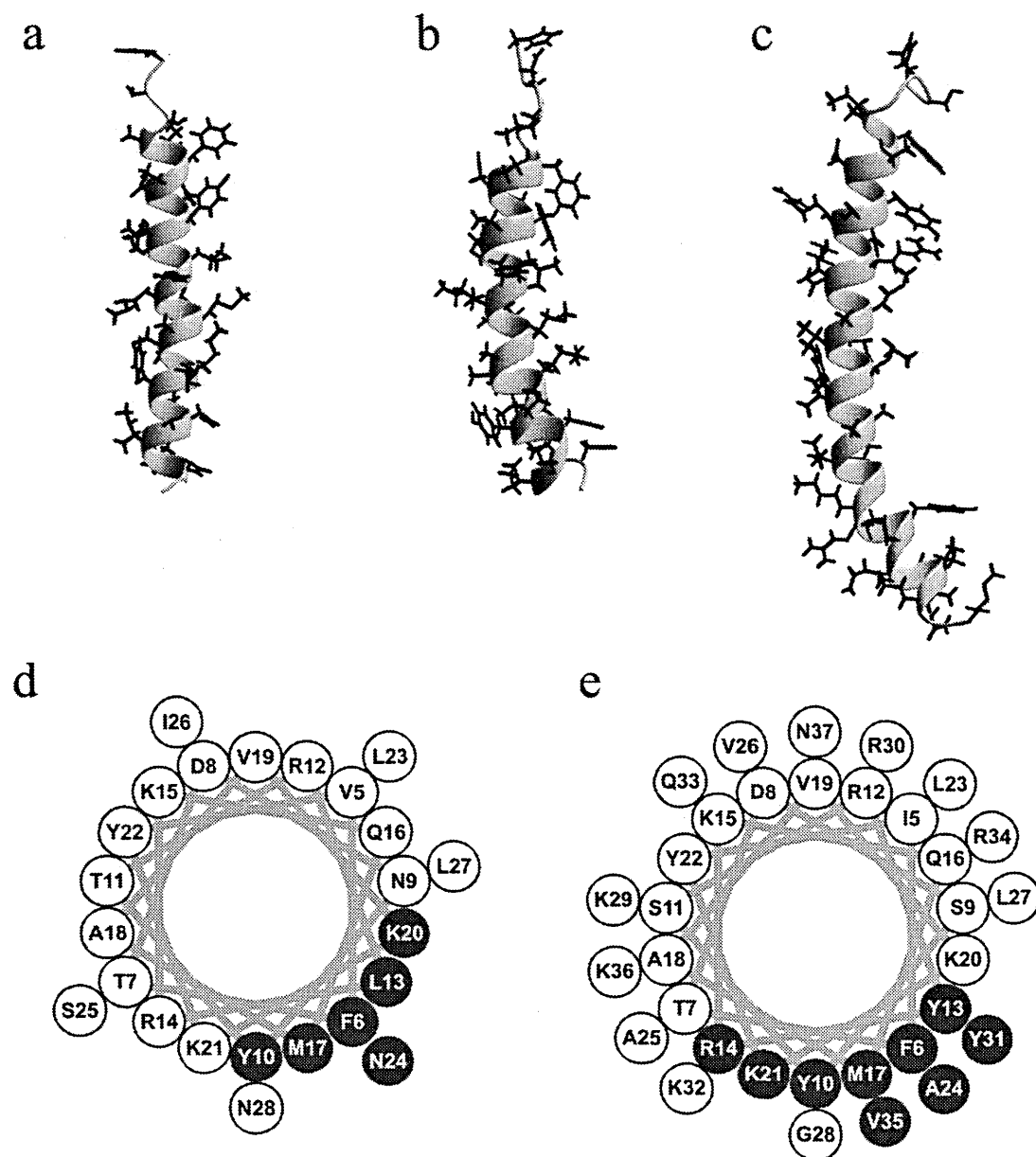


Figure 4-2-6

Comparison of the structure of VIP-G and PACAP-38.

(A–C) Side views of the ribbon diagram of VIP-G (in MeOH (A) and in the DPC micelle (B)) and PACAP-38 bound to the DPC micelle (C). (D and E) A helical wheel projections of the membrane-bound states of VIP (D) and PACAP (E). Amino acid residues located the peptide–membrane interface are shown in black.

脂質二重膜におけるVIPとPACAPのコンフォメーションについても研究されていて、これらの結果は細胞膜を模倣する良いモデルを提供している。ジミリスチルフォスファチジルコリン/ジミリスチルフォスファチジルグリセロールをベースにした脂質二重膜をペプチドの担体

として使った固体 NMR 研究により、PACAP21 と PACAP27 の構造が決定された(44)。興味深いことに、脂質二重膜に結合した状態では、PACAP21 および PACAP27 は伸びきった構造をとっていた。Gololobov らはリポソーム結合状態の VIP のコンフォメーションを CD スペクトルで解析し、陰イオン性のリン脂質ホスファチジルグリセロール存在下では α -ヘリックスを形成するが、中性のリン脂質であるホスファチジルコリン存在下では構造をもたないことを示した(30)。クラス II GPCR のリガンドは、膜模倣環境下では通常 α -ヘリックスをとっているが、VIP と PACAP はその置かれた環境に応じてコンフォメーション変化させており、それが特徴であるかもしれない。陰イオン性脂質二重膜における安定な α -ヘリックス形成を考慮すると、いくつかの保存された正電荷アミノ酸(Arg¹⁴、Lys²⁰、Lys²¹)がペプチドとミセルとの間の相互作用面の近くに位置しており、これらの残基がコンフォメーション変化と α -ヘリックスの安定化に重要な役割を果たしているのかもしれない。

GPCR 活性化における VIP の二段階輸送メカニズム

前に述べたように、クラス II GPCR のリガンドの生物学的作用は、ペプチドと受容体のアミノ末端細胞外ドメインとの結合が原因である。すべての研究結果において、アミノ末端細胞外ドメインに結合しているこれらのリガンドペプチドは α -ヘリックスコンフォメーションをとっている。GPCR 活性化における二段階リガンド輸送モデルが提唱されている(24、25)。これらのモデルでは、受容体への結合の前に、ペプチドが膜へ相互作用することが重要な段階であることを提案している(Figure4-2-7)。ペプチドは膜との相互作用により α -ヘリックスコンフォメーションが誘起され、ほぼ均一な活性型のペプチドとなる。このことが受容体への結合におけるエントロピーのロスを減少させている。

VIP のいくつかの類似体について、それらの生物活性を解析することで、VIP の SAR が研究された。とりわけ、アラニンスキャンによる研究により、VIP 受容体への結合と受容体活性化における重要な残基が明らかとなった(43、46-48)。また、膜模倣環境下あるいは受容体結

合型の VIP の構造をモデル化する試みも行われた(31、49)。残念なことに、既存の薬理学的研究の解釈と矛盾するところがあり、VIP の作用モードを完全には説明仕切れていない。したがって、VIP の構造情報がより必要である。本研究において、我々はミセル結合型の VIP の構造を決定し、DPC ミセルとの疎水性相互作用面を形成する 4 アミノ酸を発見した。これらの残基のいくつかを変異させると、VIP の活性が実質的に下がることが示されており、これはおそらく変異により α -ヘリックスが不安定化されたためであろう。したがって、SAR 研究においては、ペプチドと膜との間の相互作用面を形成する残基とペプチドと受容体との間の相互作用面を形成する残基とを区別して考える必要がある。

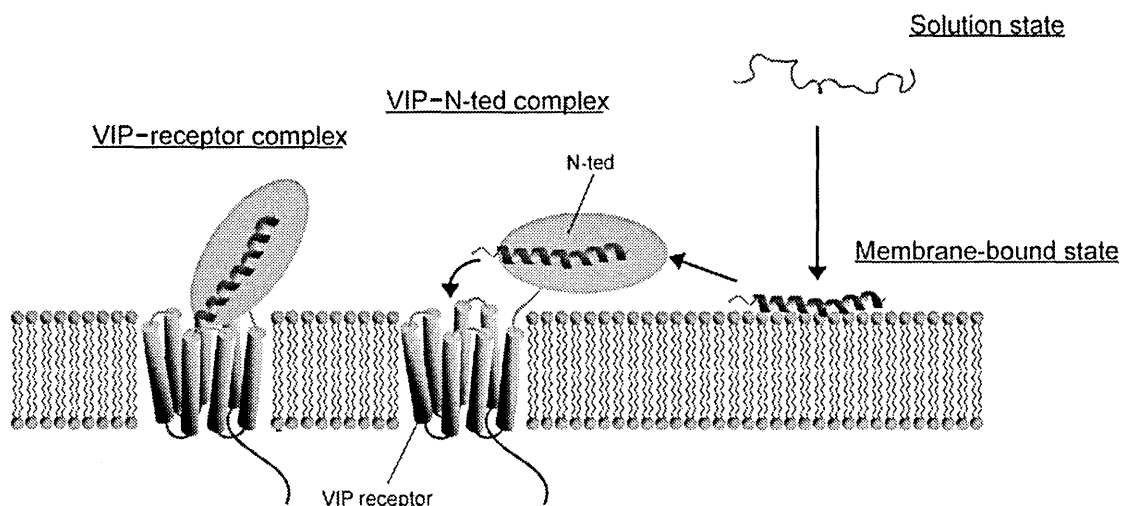


Figure 4-2-7

Schematic diagram of the two-step ligand transportation model for VIP.

The peptide nonspecifically binds to cell membranes and forms an α -helix at the C-terminal region. Then, VIP undergoes 2D diffusion to the receptor and binds to the N-ted of the VIP receptor. Finally, VIP is sandwiched between the N-ted and core of the receptor.

結論として、我々は 2 種類の異なる膜模倣環境下における VIP の溶液構造を決定した。そして、これらの環境は α -ヘリックスを誘起する環境であった。ここで示したデータは VIP 類似体の開発において合理的な基盤を与えるものであり、炎症性疾患の治療とともにがん診断においても有用なデータであろう。

参考文献

1. Du, B. H., Eng, J., Hulmes, J. D., Chang, M., Pan, Y. C., and Yalow, R. S., Guinea pig has a unique mammalian VIP. *Biochem Biophys Res Commun* 128 (1985) 1093–1098
2. Onoue, S., Misaka, S., and Yamada, S., Structure–activity relationship of vasoactive intestinal peptide (VIP): potent agonists and potential clinical applications. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 377 (2008) 579–590
3. Laburthe, M., Couvineau, A., and Tan, V., Class II G protein–coupled receptors for VIP and PACAP: structure, models of activation and pharmacology, *Peptides* 28 (2007) 1631–1639
4. Campbell, R. M. and Scanes, C. G Evolution of the growth hormone–releasing factor (GRF) family of peptides. *Growth Regul* 2 (1992) 175–191
5. Segre, G. V. and Goldring, S. R., Receptors for secretin, calcitonin, parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide, vasoactive intestinal peptide, glucagonlike peptide 1, growth hormone–releasing hormone, and glucagon belong to a newly discovered G–protein–coupled receptor family. *Trends Endocrinol Metab* 4 (1993) 309–314
6. Rawlings, S. R. and Hezareh, M. Pituitary adenylate cyclase–activating polypeptide (PACAP) and PACAP/vasoactive intestinal polypeptide receptors: actions on the anterior pituitary gland. *Endocr Rev* 17 (1996) 4–29
7. Laburthe, M., Rousset, M., Boissard, C., Chevalier, G., Zweibaum, A., and Rosselin, G., Vasoactive intestinal peptide: a potent stimulator of adenosine 3':5'–cyclic monophosphate accumulation in gut carcinoma cell lines in culture. *Proc Natl Acad Sci USA* 75 (1978) 2772–2775
8. Salomon, R., Couvineau, A., Rouyer–Fessard, C., Voisin, T., Lavellee, D., Blais, A., Darmoul, D., and Laburthe, M., Characterization of a common VIP–PACAP receptor in human small intestinal epithelium. *Am J Physiol* 264 (1993) 294–300
9. MacKenzie, C. J., Lutz, E. M., McCulloch, D. A., Mitchell, R., and Harmar, A. J., Phospholipase C activation by VIP1 and VIP2 receptors expressed in COS 7 cells involves a pertussis toxin–sensitive mechanism. *Ann NY Acad Sci* 805 (1996) 579–584
10. Bellinger, D. L., Lorton, D., Brouxhon, S., Felten, S., and Felten, D. L., The significance of vasoactive intestinal polypeptide (VIP) in immunomodulation. *Adv Neuroimmunol* 6 (1996) 5–27

11. Smalley, S. G., Barrow, P. A., and Foster, N., Immunomodulation of innate immune responses by vasoactive intestinal peptide (VIP): its therapeutic potential in inflammatory disease. *Clin Exp Immunol* 157 (2009) 225–234
12. Kojima, M., Ito, T., Oono, T., Hisano, T., Igarashi, H., Arita, Y., Kawabe, K., Coy, D. H., Jensen, R. T., and Nawata, H., VIP attenuation of the severity of experimental pancreatitis is due to VPAC1 receptor-mediated inhibition of cytokine production. *Pancreas* 30 (2005) 62–70
13. Arranz, A., Abad, C., Juarranz, Y., Leceta, J., Martinez, C., and Gomariz, R. P., Vasoactive intestinal peptide as a healing mediator in Crohn's disease. *Neuroimmunomodulation* 15 (2008) 46–53
14. Gonzalez-Rey E. and Delgado, M. Therapeutic treatment of experimental colitis with regulatory dendritic cells generated with vasoactive intestinal peptide. *Gastroenterology* 131 (2006) 1799–1811
15. Delgado, M., Martinez, C., Pozo, D., Calvo, J. R., Leceta, J., Ganea, D., and Gomariz, R. P., Vasoactive intestinal peptide (VIP) and pituitary adenylate cyclase-activation polypeptide (PACAP) protect mice from lethal endotoxemia through the inhibition of TNF- α and IL-6. *J Immunol* 162 (1999) 1200–1205
16. Delgado, M., Abad, C., Martinez, C., Leceta, J., and Gomariz, R. P. Vasoactive intestinal peptide prevents experimental arthritis by downregulating both autoimmune and inflammatory components of the disease. *Nat Med* 7 (2001) 563–568
17. Thakur, M. L., Marcus, C. S., Saeed, S., Pallela, V. Minami, C., Diggles, L. Le Pham, H., Ahdoot, R., and Kalinowski, E. A., ^{99m}Tc -labeled vasoactive intestinal peptide analog for rapid localization of tumors in humans. *J. Nucl Med* 41 (2000) 107–110
18. Thakur, M. L., Aruva, M. R., Garipey, J., Acton, P., Rattan, S., Prasad, S., Wickstrom, E., and Alavi, A., PET imaging of oncogene overexpression using ^{64}Cu -vasoactive intestinal peptide (VIP) analog: comparison with ^{99m}Tc -VIP analog. *J Nucl Med* 45 (2004) 1381–1389
19. Reubi, J. C., In vitro identification of vasoactive intestinal peptide receptors in human tumors: implications for tumor imaging. *J Nucl Med* 36 (1995) 1846–1853
20. Boissard, C., Marie, J. C., Hejblum, G., Gepach, C., and Rosselin, G., Vasoactive intestinal peptide receptor regulation and reversible desensitization in human colonic carcinoma

cells in culture. *Cancer Res* 46 (1986) 4406–4413

21. Rubinstein, I., Human VIP- α : an emerging biologic response modifier to treat primary pulmonary hypertension. *Expert Rev Cardiovasc Ther* 3 (2005) 565–569
22. Sethi, V., Onyuksel, H., and Rubinstein, I., Liposomal vasoactive intestinal peptide. *Meth Enzymol* 391 (2005) 377–395
23. Hajos, F., Stark, B., Hensler, S., Prassl, R., and Mosgoeller, W., Inhalable liposomal formulation for vasoactive intestinal peptide. *Int J Pharm* 357 (2008) 286–294
24. Innooka, H., Ohtaki, O., Kitahara, T., Ikegami, S., Endo, C., Kitada, K., Ogi, H., Onda, M., Fujino, M., and Shirakawa, M., Conformation of a peptide ligand bound to its G-protein coupled receptor. *Nat Struct Biol* 8 (2001) 161–165
25. Sun, C., Song, D., Davis-Taber, R. A., Barrett, L. W., Scott, V. E., Richardson, P. L., Pereda-Lopez, A., Uchic, M. E., Solomon, L. R., Lake, M. R., Walter, K. A., Hajduk, P. J., and Olenjniczak, E. T., Solution structure and mutational analysis of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide binding to the extracellular domain of PAC1-RS. *Proc Natl Acad Sci USA* 104 (2007) 7875–7880
26. Grace, C. R., Perrin, M. H., Gulyas, J., Digruccio, M. R., Cantle, J. P., Rivier, J. E., Vale, W. W., and Riek, R., Structure of the N-terminal domain of a type B1 G protein-coupled receptor in complex with a peptide ligand. *Proc Natl Acad Sci USA* 104 (2007) 4858–4863
27. Runge, S., Thogersen, H., Madsen, K., Lau, J., and Rudolph, R., Crystal structure of the ligand-bound glucagon-like peptide-1 receptor extracellular domain. *J Biol Chem* 283 (2008) 11340–11347
28. Parthier, C., Kleinschmidt, M., Neumann, P., Rudolph, R., Manhart, S., Schlenzig, D., Fanghanel, J., Rahfeld, J. U., Demuth, and Stubbs, M. T., Crystal structure of the incretin-bound extracellular domain of a G protein-coupled receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 104 (2007) 13942–13947
29. Pioszak, A. A. and Xu, H. E., Molecular recognition of parathyroid hormone by its G protein-coupled receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 105 (2008) 5034–5039
30. Gololobov, G., Noda, Y., Sherman, S., Rubinstein, I., Baranowska-Kortylewicz, J., and Paul, S., Stabilization of vasoactive intestinal peptide by lipids. *J Pharmacol Exp Ther* 285 (1998) 753–758

31. Tan, Y. V., Couvineau, A., Murail, S., Ceraudo, E., Neumann, J. M., Lacapere, J. J., and Laburthe, M., Peptide agonist docking in the N-terminal ectodomain of a class II G protein-coupled receptor, the VPAC1 receptor. Photoaffinity, NMR, and molecular modeling. *J Biol Chem* 281 (2006) 12792–12798
32. Tenno, T., Goda, N., Tateishi, Y., Tochio, H., Mishima, M., Hayashi, H., Shirakawa, M., and Hiroaki, H., High-throughput construction method for expression vector of peptides for NMR study suited for isotopic labeling. *Protein Eng Des Sel* 17 (2004) 305–314
33. Neri, D., Szyperski, T., Otting, G., Senn, H., and Wuthrich, K., Stereospecific nuclear magnetic resonance assignments of the methyl groups of valine and leucine in the DNA-binding domain of the 434 repressor by biosynthetically directed fractional ¹³C labeling. *Biochemistry* 28 (1989) 7510–7516
34. Kay, L. E., Keifer, P., and Saarinen, T., Pure absorption gradient enhanced heteronuclear single quantum correlation spectroscopy with improved sensitivity. *J Am Chem Soc* 114 (1992) 10663–10665
35. Delaglio, F., Grzesiek, S., Vuister, G. W., Zhu, G., Pfeifer, J., and Bax, A., NMRPipe: a multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes. *J Biomol NMR* 6 (1995) 277–293
36. Herrmann, T., Guntert, P., Wuthrich, K., Protein NMR structure determination with automated NOE assignment using the new software CANDID and the torsion angle dynamics algorithm DYANA. *J Mol Biol* 319 (2002) 209–227
37. Guntert, P., Automated NMR protein structure calculation. *Prog Nucl Magn Reson Spectrosc* 43 (2003) 105–125
38. Goddard, T. D., and Kneller, D. G., Sparky 3, San Francisco; University of California.
39. Cornilescu, G., Delaglio, F., and Bax, A., Protein backbone angle restraints from searching a database for chemical shift and sequence homology. *J Biomol NMR* 13 (1999) 289–302
40. Fahrenkrug, J., Ottesen, B., and Palle, C., Non-amidated forms of VIP (glycine-extended VIP and VIP-free acid) have full bioactive on smooth muscle. *Regul Pept* 26 (1989) 235–239
41. Cavanagh, J., Fairbrother III, W. J., Palmer, A. G., Rance, M., and Skelton, N. J., Protein NMR Spectroscopy: Principles and Practice, 2nd Ed. Academic Press, San Diego, 2007, pp. 535–673

42. Chevalier, F., Lopez-Prados, J., Groves, P., Perez, S., Martin-Lomas, M., and Nieto, P. M., Structure and dynamics of the conserved protein GPI anchor core inserted into detergent micelles. *Glycobiology* 16 (2006) 969–980
43. Nicole, P., Lins, L., Rouyer-Fessard, C., Drouot, C., Fulcrand, P., Thomas, A., Couvineau, J., Martinez, J., Brasseur, R., and Laburthe, M., Identification of key residues for interaction of vasoactive intestinal peptide with human VPAC1 and VPAC2 receptors and development of a highly selective VPAC1 receptor agonist. Alanine scanning and molecular modeling of the peptide. *J Biol Chem* 275 (2000) 24003–24012
44. Komi, N., Okawa, K., Tateishi, Y., Shiakawa, M., Fujiwara, T., and Aktsu, H., Structural analysis of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptides bound to phospholipid membranes by magic angle spinning solid-state NMR. *Biochim Biophys Acta* 1768 (2007) 3001–3011
45. Hoare, S. R. J., Mechanisms of peptide and nonpeptide ligand binding to Class B G-protein-coupled receptors. *Drug Discov Today* 10 (2005) 417–427
46. O'Donnell, M., Garippa, R. J., O'Neill, N. C., Bolin, D. R., and Cottrell, J. M., Structure-activity studies of vasoactive intestinal polypeptide. *J Biol Chem* 266 (1991) 6389–6392
47. Igarashi, H., Ito, T., Hou, W., Mantey, S. A., Pradhan, T. K., Ulrich, C. D., Hocart, S. J., Coy, D. H., Jensen, R. T., Elucidation of vasoactive intestinal peptide pharmacophore for VPAC(1) receptors in human, rat, and guinea pig. *J Pharmacol Exp Ther* 301 (2002) 37–50
48. Igarashi, H., Ito, T., Mantey, S. A., Pradhan, T. K., Hou, W., Coy, D. H., and Jensen, R. T., Development of simplified vasoactive intestinal peptide analogs with receptor selectivity and stability for human vasoactive intestinal peptide/pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide receptors. *J Pharmacol Exp Ther*, 315 (2005) 370–381
49. Ceraudo, E., Murail, S., Tan, Y. V., Lacapere, J. J., Neumann, J. M., Couvineau, A., Laburthe, M., The vasoactive intestinal peptide (VIP) alpha-helix up to C terminus interacts with the N-terminal ectodomain of the human VIP/Pituitary adenylate cyclase-activating peptide 1 receptor: photoaffinity, molecular modeling, and dynamics. *Mol Endocrinol* 22 (2008) 147–155

4-3 核小体局在シグナルを持つ Nuclear valosin-containing protein-like 2 (NVL2)の アミド末端スクレオリン結合ドメインの構造機能解析

4-3-1 序論

Nuclear valosin-containing protein (VCP) -like protein (NVL)は、AAA-ATPase である VCP/p97 と高いアミノ酸相同性を示す遺伝子産物として同定された。AAA-ATPase は全ての生命に見られる六量体の ATP 加水分解酵素である。これらは、蛋白質複合体の解離や蛋白質輸送を含む様々な細胞内過程で重要な役割を果たしている(1-4)。AAA-ATPase は、保存された 220-250 アミノ酸からなる触媒 ATPase ドメインが 1 コピー(type I)か、2 コピー(type II)かで分類されている。NVL は、二つのつながった AAA ドメインを持ち、type II AAA-ATPase に分類される。NVL には、翻訳開始点が異なる二つの選択的スプライスによるアイソフォーム、NVL1、NVL2 存在する(Figure 4-3-1) (5)。NVL2 は、60S リボソームサブユニットの生合成に関与する核小体に存在する。この経路では、リボソームサブユニット RPL5 と DNA helicase DOB1 が NVL2 結合蛋白質であると報告されている(6, 7)。他の生物の NVL オルソログとして、ショウジョウバエの smallminded(smld) (6, 7)、線虫の CED-4-interacting protein、Mac-1(9)、出芽酵母の Rix7p (10, 11)が良く知られている。これらの無脊椎生物の NVL オルソログの細胞内機能は、それぞれ部分的に一致しているだけである。そのため、この分子の構造生物学的視点からの更なる分析が必要である。

VCP/p97 と NVL は、AAA 領域の配列相同性が高いが、NVL2 の N 末端領域(NVL2^{UD})と VCP/p97 の N 末端領域は異なっている。この二つの蛋白質の細胞内局在も異なっており、VCP/p97 は細胞質、核、小胞体膜に局在しているが、NVL はそのほとんどが核小体に局在している(5, 6)。一般に、AAA-ATPase の N 末端領域には、アダプターへの結合、基質特異性、局在のような酵素の特異的な働きに必要なドメインが存在すると考えられている。NVL2^{UD} には、核小体局在に関与する核小体局在シグナル (NoLS)が存在する。3つの別れた領域が核、

核小体への局在シグナルであるとNagahamaらによって報告されており(6)、そのうちの二つが NVL2^{UD} に存在する。アルギニンやリジンのような塩基性アミノ酸の並びが、蛋白質の核小体への蓄積に寄与すると報告されている(12)。いくつかの蛋白質の核小体局在配列に基づき、モチーフ(R/K)(R/K)X(R/K)が提案され(13)、NVL2 の NoLS (アミノ酸 49-52) は、この典型的な定義に一致している。

核小体は、多くの蛋白質とリボソーム DNA、リボソーム RNA とその前駆体の高密度の複合体で構成されている。核小体の第一の生理学的な働きは、リボソームの生合成である(14)。しかし、最近の研究により、核小体は RNA プロセッシング、特異的な mRNA の安定化、細胞周期の統制、RNA ウイルスの集合のような細胞の生存能力の維持において重要な役割を果たしており、そのために癌やその他の病気に関係していることが明らかにされた(15-20)。核小体は蛋白質-蛋白質、蛋白質-RNA 相互作用のネットワークを使って組織化され、維持されている(21)。核小体の構成因子の間では、二つの蛋白質、ヌクレオリンとヌクレオフォスミンがカギとなる中心分子であると考えられている。これらの蛋白質をノックダウンまたはノックアウトした時、核小体の機能と構造が崩壊する(22-24)。NoLS を通したこれらの中心蛋白質との相互作用は、その蛋白質を核小体へ向かわせる可能性がある。しかし、典型的な NoLS モチーフに合わない多くの配列が報告されており、NoLS の定義はより複雑なものとなっている(21)。NoLS 配列の不一致は核小体への蛋白質の移送に様々な経路が使われているためだと考えられる。NoLS のカギとなる作用は、一つまたは複数の核小体に存在する蛋白質を認識することであると提案されている(21)。従って、この分野では、NoLS のメカニズムに基づいた分類が重要である。

本研究の目的は、NVL2 の N 末端領域の構造解析によって、NVL2 の細胞内局在のメカニズムを明らかにすることである。バイオインフォマティックス的手法とハイスループット蛋白質発現実験を用いて NVL2 の N 末端領域から“NMR による構造決定に適した”ドメイン(NVL2^{UD}, アミノ酸残基 1-74)を単離し(Figure 4-3-1A)(25)、NMR を用いてその 3 次元構造を決定した。

4-3-2 実験

実験に用いた試薬

DNA オリゴヌクレオチドプライマーの合成は、北海道システムサイエンスに依頼した。
Anit-nucleolin 抗体は、Santa Cruz Biotechnology Inc.、Abcom のものを用いた。

蛋白質調製

マウスcDNA を鋳型に PCR で NVL2^{UD} 遺伝子を増幅し、pGEX-4T3 由来の PRESAT-vector を用いて、GST 融合 NVL2^{UD} 発現ベクターの構築を行った(25)。NVL2^{UD} の生化学的な分析は GST 融合蛋白質で行い、構造解析は、GST を除いたものを用いた。蛋白質は、大腸菌 BL21(DE3)を用い、30°Cで培養を行い発現させた。NMR サンプル調製のためには、唯一の窒素源として ¹⁵N-NH₄Cl を含む M9 培地、さらに、¹⁵N-NH₄Cl に加えて唯一の炭素源として ¹³C-グルコースを含む M9 培地を用いて培養を行った。細胞抽出物を DEAE-Sepharose、続いて Glutathione Sepharose を用いて精製を行った。Glutathione Sepharose に GST-NVL2^{UD} を結合させたまま、スロンビンプロテアーゼを添加し、GST と NVL2^{UD} の間を切断、NVL2^{UD} のみをカラムから溶出した。溶出試料に含まれるスロンビンを benzamidine sepharose で除去した後、透析を行った。

動物細胞で GST-NVL2^{UD}(1-74)、GFP-NVL2^{UD}(1-74)AA を発現するプラスミドは、pcDNA-EGFP-PRESAT ベクターを用いて構築した。pcDNA-EGFP-PRESAT ベクターは、PRESAT ベクター構築プロトコルを用いて、pcDNA3.1 を基にし、EGFP 遺伝子と PRESAT ベクタークロニングサイトを挿入して構築した(26)。

同様に、His x6 タグ融合のヒトヌクレオリン断片発現系、R1234G (RRMドメイン 1-4 と GARドメイン; 残基 286-710)、R123 (残基 286-560)、R12 (残基 286-468)、R23 (残基 391-560)、R34 (残基 478-710)、R4G (残基 565-710)、R1 (残基 286-390)を、pET-His x6-PRESAT(27)を用いて構築した。これらすべての蛋白質は、大腸菌 BL21(DE3)で発現させ、Ni²⁺アフィニティークロ

マトグラフィーにより精製を行った。

NMRによる立体構造解析

^{15}N 、 $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ 標識 NVL2UD の NMR による測定は、濃度 0.6–1.2 mM、5% D_2O –95% H_2O 、25 mM リン酸ナトリウム(pH 6.4)の条件で行った。主鎖、側鎖の帰属は ^{15}N -HSQC、 ^{13}C -HSQC、HNCA、HNCO、HNCACB、CBCACONH、H(CCO)NH、C(CO)NH、HCCH-TOCSY スペクトルの組み合わせを用いて行った。データのプロセスは NMRPipe と Sparky software を用いた。プロトン間の距離は、三次元 ^{13}C –、 ^{15}N -edited NOESY から得た。

CYANA (version 2.0.7)を用いて構造計算を行い、次に CNS(version 1.2)を用いて最適化を行った。NOE クロスピークはすべて Sparky をも用いて手動で選択した。得られた最もエネルギーの低い 20 の構造の分析結果を Supplemental Table 4–3–1 に示した。

細胞株

本研究では、HeLa 細胞と HEK293 細胞を用いた。これらの細胞は、10 % (v/v) ウシ胎児血清、100 unit/mL のペニシリンとストレプトマイシンを加えた Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)を用いて、37°C、5 % CO_2 の環境下で培養した。

NVL2^{UD} に結合した蛋白質の質量分析による同定

培養した 10^7 の細胞を回収し、PBS で洗浄後、200 ml の溶解液[17.5 mM Tris-HCl (pH 7.5), 55 mM KCl, 1 mM MgCl_2 , 1 mM EDTA, 0.5 mM EGTA, 1 mM DTT, 0.25 mM PMSF, 0.05% Triton X-100, プロテアーゼ阻害剤(0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ antipain, 0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ aprotinin, 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ leupeptin, 0.08 $\mu\text{g}/\text{ml}$ pepstatin)]に懸濁し、超音波によって破碎した。この細胞抽出液に 180 pmol の GST-NVL2UD(1–93)または GST を加え 4°C でインキュベートした。反応後の GST 蛋白質複合体を Glutathion-Sepharose に結合させ、3 回洗浄後、SDS-PAGE の Loading Dye で結合した

蛋白質を溶出した。溶出した蛋白質複合体を SDS-PAGE で分離し、Coomassie Brilliant Blue で染色した。ゲル中でプロテアーゼ分解後、神戸大学大学院医学研究科質量分析センターで、質量分析装置(Q-TOF2; micromass, Manchester)を用いた electrospray ionization tandem MS (LC-MS/MS)による分析を行った。蛋白質の同定は、Mascot(Matrix Science)を用いて行った。

ウエスタンブロッティング

HeLa 細胞を回収、洗浄後、細胞溶解液[25 mM Tris-HC(pH7.5), 100 mM NaCl, 2 mM EDTA, 0.1% (v/v) Triton X-100, 1 mM DTT, 1 mM PMSF, プロテアーゼ阻害剤]に懸濁した。細胞抽出物を GST-NVL2^{UD} (1-74)、GST と混合しインキュベート、Glutathion Sepharose で回収後、溶出、蛋白質複合体を SDS-PAGE で分離し PVDF 膜へ転写した。次に、anti-nucleolin 抗体、続いて HRP 標識 anti mouse IgG 二次抗体を用いて、ヌクレオリン断片を検出、ECL-Plus を用いて可視化した。

In Vitro 結合アッセイ

NVL2^{UD} とヌクレオリン C 末端断片との蛋白質-蛋白質相互作用の評価をするために、GST プルダウンアッセイを行った。GST または GST-NVL2^{UD}(140 pmol)を、His x6 タグ融合ヌクレオリン断片を発現させた大腸菌の抽出液に添加し、反応液[25 mM Tris-HC(pH7.5), 120 mM KCl, 0.1% (v/v) Triton X-100, 1 mM DTT, 10%グリセロール, プロテアーゼ阻害剤]中で、4℃、2 時間反応させ、その後 Glutathion-Sepharose を添加して 1 時間置き、結合させた。Glutathion-Sepharose を 3 回洗浄後、溶出、溶出した蛋白質を SDS-PAGE で分析した。各シグナル強度は、ImageJ 1.40g program (National Institutes of Health)で定量した。

蛍光顕微鏡による観察

細胞をチャンバースライドで培養し、pcDNA-EGFP-NVL2^{UD}、pcDNA-EGFP-NVL2^{UD}AA を lipofectamin 2000 (Invitrogen)を用いて導入した。24 時間培養後、細胞を PBS で洗浄し、メタノールで-20 度、20 分間処理し、細胞を固定した。次に、anti nucleorin 抗体を用いて、4°Cで一晩反応させた。洗浄後、Cy3TM 標識 anti mouse IgG (SIGMA)に浸し、室温で 60 分反応させた。細胞を洗浄後、DAPI(100 ng/ml)で染色後、Prolong Antifade mounting medium (Molecular probe)を用いて封入した。細胞の観察は、蛍光顕微鏡(IX71, DP70 color CCD camera system; OLIMPUS)を用いて行った。

4-3-3 結果と考察

マウス NVL2^{UD} の構造解析

決定した NVL2^{UD}(1-74)の代表的な構造のイメージを Figure4-3-2B に示した。得られた構造が、実験的制約を満たすものであることは、Supplemental Tabele 4-3-1 に示した。N 末端と C 末端、そして内部のループ(残基 1-10、28、49-51、71-74)のディスオーダー領域を除いて、root mean square deviation (RMSD)値が、主鎖で 0.418 Å、全ての炭素原子、窒素原子で 1.035 Åであった。NVL2^{UD} の精密化した構造に基づいて、2 次構造に基づいた拘束条件を用いて、NVL オルソログのドメインのマルチプルシークエンスアライメントを行った(Figure4-3-1B)。これら NVL ホモログ間のアミノ酸相同性は高くない(19-86%)が、疎水性コア、ヘリックス 2 とヘリックス 3をつなぐ 2 番目のループを構成するアミノ酸はよく保存されている。そのため、NVL2 ホモログの N 末端領域は、よく似たフォールドの新規構造ドメインである。

NVL2^{UD}(1-74)は、ヘリックス 1(11-23)、ヘリックス 2(32-42)、ヘリックス 3(52-70)で構成される直行する 3 本のヘリックス構造をとっている(Figure4-3-2A)。DaliLite sever (28)を用いた NVL2^{UD} の構造比較により、Z スコア 4.5 以上の多くのウイングドヘリックスドメインをもつ蛋白質が同定された。例えば、転写因子 DP2 の DNA 結合ドメイン(PDB code: 1cf7, Z スコア 5.2)、

二本鎖 RNA デアミナーゼ I、ADAR1 の Z α ドメイン(PDB code: 1qgp, Z スコア 4.5)、34L 蛋白質の Z α ドメイン(PDB code: 1sfu, S スコア 4.5)が NVL2^{UD} の構造と似ていた。加えて、cullin-1 (PDB code: 1ldj, Z スコア 4.8)、FurB (PDB code: 2o03, Z スコア 4.7)、replication terminator protein (PDB code: 1f4k, Z スコア 4.7)、NEDD8 (PDB code: 3dqv, Z スコア 4.6)の部分的な構造が NVL2^{UD} と似ている構造として挙げられた。FUGUE(29)、FORTE(30)を含むいくつかの構造予測法では、このフォールドの存在は予測されなかった。NVL2^{UD} は NoLS を含み、このモチーフは溶媒に露出している 2 番目のループに位置している。

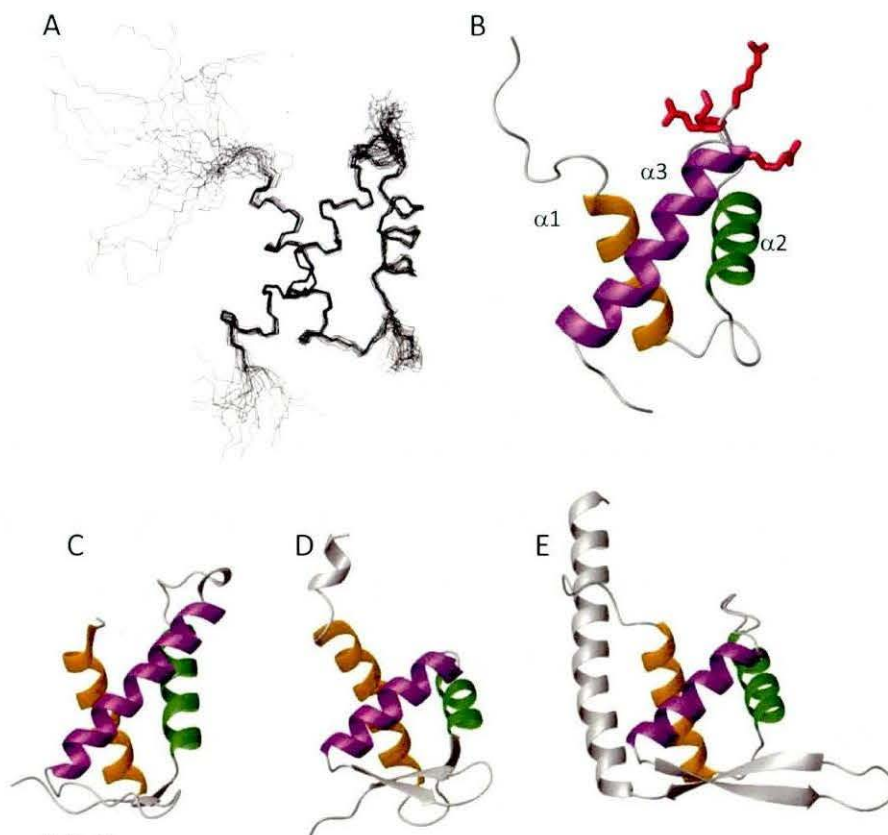


Figure 4-3-2
Structure of NVL2^{UD}

A, a superposition of the backbone atoms of the 20 lowest energy structures. B, ribbon diagram of NVL2^{UD}, with the NoLS residues shown as sticks. C–E, the structural neighbors of NVL2^{UD}. The Dali server was used to identify proteins structurally similar to NVL2^{UD}. The corresponding helices are colored the same (helices 1, 2, and 3 are orange, green, and dark violet, respectively). C, DP2 (PDB code 1cf7). D, ADAR1 (PDB code 1qgp). E, replication terminator protein (PDB code 1f4k). All panels were prepared using MOLMOL (71).

NVL2^{UD} の結合相手としてヌクレオリン C 末端断片を同定

新しい NVL2^{UD} と相互作用する蛋白質を同定するために、in vitro 蛋白質結合実験とエレクトロスプレーイオン化-MS/MS 分析を行った。HeLa 細胞の抽出物を用いて NVL2^{UD} (1-93) と相互作用する相手の同定を行った。相互作用した蛋白質の SDS-PAGE 分析では、Coomassie Brilliant Blue 染色で、GST-NVL2^{UD} と共に特異的に精製されてきたいくつかのポリペプチドが検出できた(Figure4-3-3A)。GST に相互作用した蛋白質の結果と比較して、30kDa の蛋白質のバンドが NVL2^{UD} と特異的に相互作用したものであると判断した。MS 分析の結果示された NVL2^{UD} 結合蛋白質のほとんどが、RNA プロセッシング関連または核小体に関連するものであった(Table 4-3-1)。いくつかの NVL2^{UD} と結合する蛋白質候補が RRM ドメインを持っていることは、非常に興味深く、これまでに、これらの結合蛋白質が NVL2 と相互作用するという報告はない。Table4-3-1 に示したように、ヌクレオリンは、第 2 候補の NVL2^{UD} の結合相手である。

Table 4-3-1

List of protein candidates identified from mass spectrometric analysis

protein	Molecular mass	Score ^a
	<i>KDa</i>	
Ribosomal protein L7	29.7	113
Nucleolin	76.6	86
Leucine-rich repeat-containing 59	34.5	83
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C	33.6	80
Progesterone receptor membrane component 2	23.8	78
Proteasome subunit α type 5	26.4	75
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D	30.4	70
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A	37.0	68
Proteasome subunit α type 7	27.9	63
Prphibitin	23.6	62
Vimentin	20.0	62

^a Score determined as $-10 \log(P)$, where P is the probability that the observed match is random event, calculated by the program MASCOT. A score >54 indicates extensive homology, $P < 0.05$.

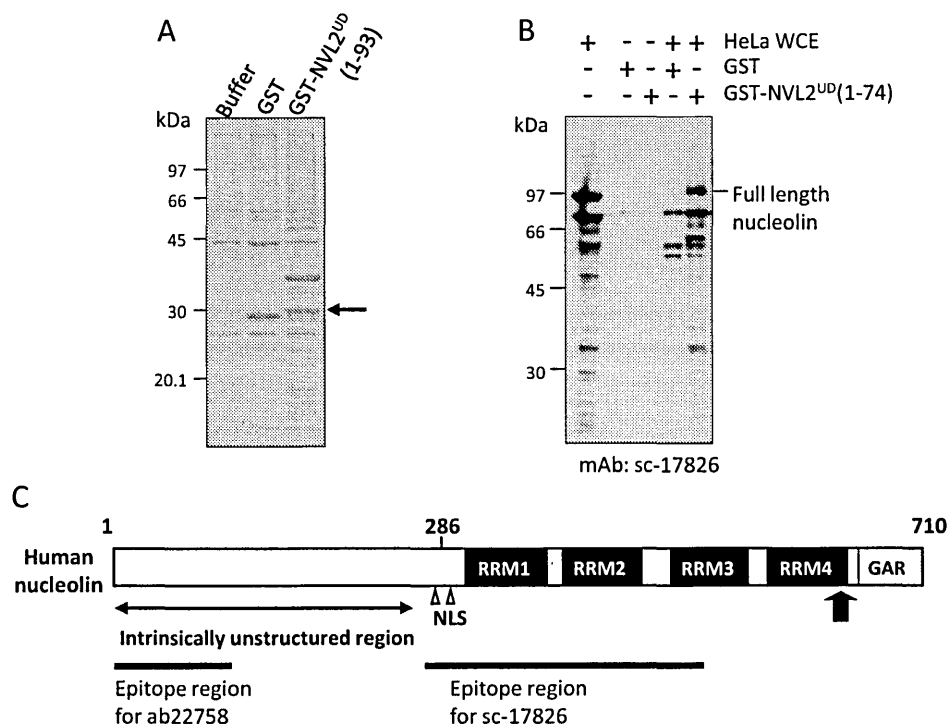


Figure 4-3-3
NVL2UD is a nucleolin binding domain.

A, in vitro binding assay of GST-NVL2UD with a HeLa cell extract. GST-NVL2UD(1-93) associated proteins were separated by SDS-PAGE and stained with Coomassie Brilliant Blue. The band indicated by an arrow was subjected to the MS/MS analysis. B, Western blot of HeLa proteins captured by GST-NVL2UD. GST or GST-NVL2UD(1-74) was incubated with either HeLa whole cell extract (WCE) or buffer, and co-purified proteins were electrophoresed. The proteins were blotted onto a PVDF membrane and then detected by an anti-nucleolin antibody. The epitope for the antibody is residues 271-520 of human nucleolin. C, domain architecture of human nucleolin. The arrow marks the position of the peptide sequence detected by the MS/MS analysis. The RRM domains and the GAR domain are shown as black and gray boxes, respectively, with the domain names.

ヌクレオリンは、核小体に多く存在する蛋白質で、NoLS レセプターであると推定されている。そのため、ヌクレオリンと NVL2 の関係について更なる研究を進めた。全長ヌクレオリンの理論的分子量は 76,614 であり、分析した SDS-PAGE のバンドの大きさ(30kDa)と異なるため、HeLa 細胞抽出物中の NVL2^{UD}(1-74)、NVL2^{UD}(1-93)に結合した蛋白質の中に全長のヌクレオリンの存在を二つの異なった抗体 sc-17826 (epitope271-520)、ab22758 (epitope 1-100)で確認した(Figure4-3-3B, Figure4-3-4)。全長ヌクレオリンのバンドが 95 kDa であるのは、リン酸化のためだと考えられる。Sc-17826 抗体では、いくつかの短いヌクレオリン断片を検出した。これらの短い断片は、サンプル調製の間に、構造を持たない N 末端領域が分解されたもので

あると考えられる。N 末端領域は蛋白質分解サイトを含んでいる(31)。HEK293 細胞を用いた場合も、NVL2^{UD}(1-74)、NVL2^{UD}(1-93)とヌクレオリンの相互作用が確認されたが、細胞抽出物の全長ヌクレオリンの分解は、HeLa 細胞抽出物よりも早く進んでいた(Figure4-3-4)。

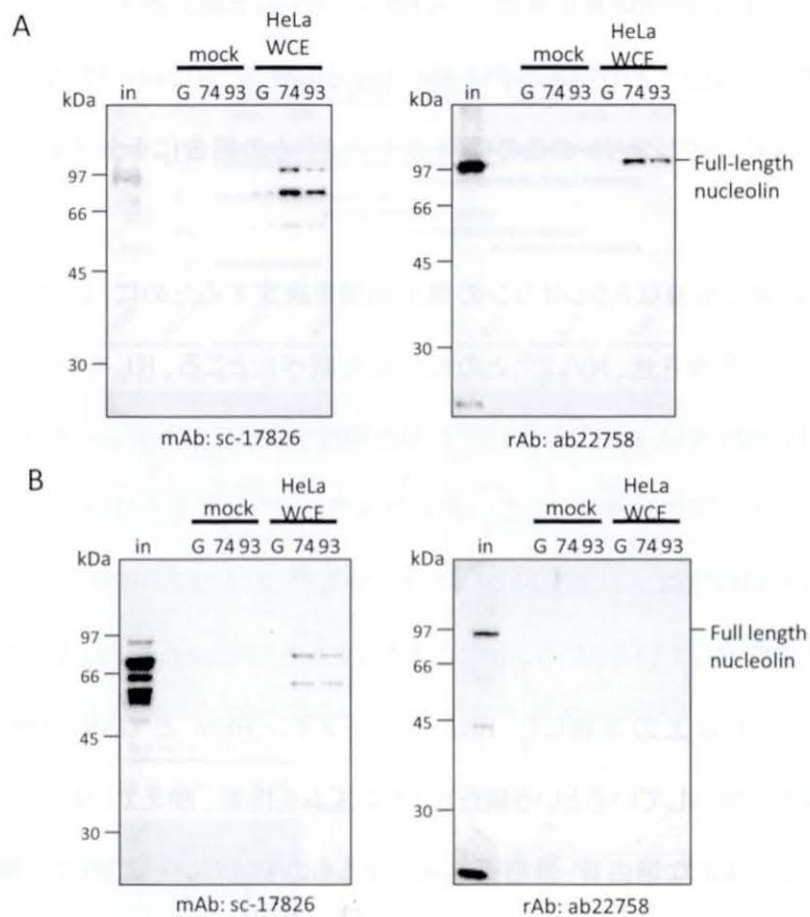


Figure 4-3-4
Association of NVL2UD with nucleolin.

A & B. A HeLa cell extract (A) or a HEK293 cell extract (B) was incubated with either GST (lanes "G"), GST-NVL2^{UD}(1-74) (lanes "74") GST-NVL2^{UD}(1-93) (lanes "93"). The purified proteins were separated by SDS-PAGE and immunoblotted using anti-nucleolin antibodies.

NVL2UD はヌクレオリンの二つまたはそれ以上の連続する RNA 結合ドメインに結合する可能性がある

ヒトヌクレオリンは 710 アミノ酸からなり、N 末端、中央、C 末端の 3 つの領域に分けられる。N 末端ドメインは、酸性アミノ酸が多く、天然変性であると予測される。中央のドメインは、4 つ

の RRMドメインの繰り返しがあり、C 末端の GARドメインは、グリシンとアルギニンが多く存在するドメインであり、RRM ドメインと GAR ドメインはどちらも、RNA 結合ドメインである(32)。MS/MS 分析によって検出されたペプチド配列は、4 番目の RRMドメインの C 末端であったため(Figure4-3-3C)、4 つの RRM と C 末端 GARドメインからなる組み換えヌクレオリン R1234G (286-710)を調製し、NVL2^{UD} との相互作用を調べた。その結果、R1234G は NVL2^{UD} と特異的に相互作用したため、ヌクレオリンのこの領域は NVL2^{UD} との結合に十分であると考えられる(Figure4-3-5A, B)。

NVL2^{UD} との結合に必要なヌクレオリンの最小領域を決定するために、いくつかのヌクレオリン断片を大腸菌で発現させ、NVL2^{UD} との結合能を調べたところ、R1 を除くすべての断片(R123, R34G, R12, R23, R34, R4G)が NVL2^{UD} との親和性を保っていた(Figure4-3-5B, C)。詳細に述べると、R123 と R34G は他よりも高い親和性を示し、R34 は最も低い親和性を示した。4 つの RRM の配列相同性は高くない(20-38%)ため、NVL2^{UD} が 4 つの RRM の特定の共通したモチーフや部位を認識しているということとはなさそうである(Figure4-3-6)。そこで、実験結果より、2つまたはそれ以上の連続した RNA 結合ドメイン(RRM と GAR)が無差別認識で NVL2UD との結合に関与しているという新たなメカニズムを提案、加えて、NVL2^{UD} とヌクレオリンとの相互作用は、単純な蛋白質-蛋白質結合によるものではないと予想した。精製した R12 が NVL2UD と相互作用するかどうか調べるために、R12 と 15N 標識 NVL2^{UD} を用いた NMR 滴定実験を行った(Figure4-3-7)が、意味のある化学シフトの変化は見られず、これらの相互作用には他の因子も関与していることが示唆された。

RNA が NVL2^{UD} とヌクレオリンの相互作用を強化する

これまでに述べたような一般的ではない実験結果から考え、ヌクレオリン-NVL2^{UD} 相互作用における RNA の効果を調べた。核小体は高密度に凝縮された RNA、特にリボソーム RNA 前駆体を含むため、RNA が NVL2^{UD} とヌクレオリンの相互作用に影響を与えることができる。こ

の可能性を調べるために、RNase A を添加してプルダウンアッセイを行ったところ、特異的な相互作用は消失した(Figure4-3-5D)。この結果は、NVL2-ヌクレオリンの相互作用に RNA が必要であることを示す。そのため、二つ以上の連続する RNA 結合ドメインが RNA を保持しているヌクレオリン-RNA 複合体へ NVL2^{UD} が結合している可能性がある。

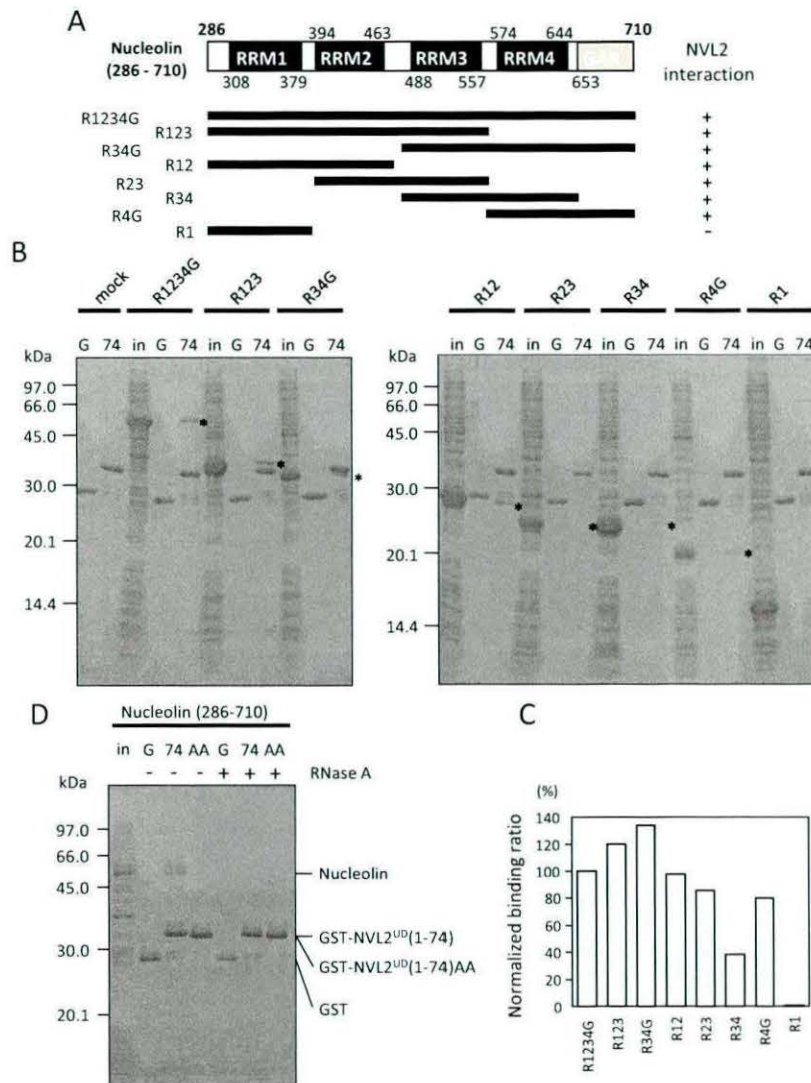


FIGURE 4-3-5

Interaction between NVL2UD and nucleolin.

A, summary of the binding assays between NVL2UD and various nucleolin fragments. B, in vitro binding assay with nucleolin fragments. Either GST (G) or GST-NVL2UD(1-74) (74) was incubated with *E. coli* cell lysates expressing various nucleolin fragments (in). The bound proteins were pulled down and separated using 15% SDS-PAGE. The gel was stained with Coomassie Brilliant Blue. Asterisks denote the nucleolin fragments bound to NVL2UD(1-74). C, quantification of the nucleolin fragments bound to GST-NVL2UD(1-74). The signals corresponding to the nucleolin fragments in B were integrated and normalized by their molecular weights, using ImageJ. D, RNA is involved in the NVL2-nucleolin complex. An in vitro binding assay was conducted with nucleolin (R1234G) and wild-type or mutant NVL2UD(1-74) in the presence or absence of RNase A.

			RNP2																		RNP1																													
RRM1	308	N	I	F	V	G	N	I	N	F	N	K	S	A	P	E	L	K	T	G	I	S	D	V	F	A	K	N	D	L	A	V	D	V	R	I	G	M	T	R	K	F	G	Y	V	D	F	E	S	356
RRM2	394	T	I	L	A	K	N	L	P	Y	K	V	T	Q	D	E	L	K	E	V	F	E	D	--	A	A	E	I	R	L	V	S	K	--	D	G	K	S	K	G	I	A	Y	I	E	F	K	T	438	
RRM3	487	T	I	V	L	S	N	L	S	Y	S	A	T	E	E	T	L	Q	E	V	F	E	K	--	A	T	F	I	K	V	P	Q	N	-	Q	N	G	K	S	K	G	Y	A	F	I	E	F	A	S	532
RRM4	573	T	I	F	V	K	G	L	S	E	D	T	T	E	E	T	L	K	E	S	F	D	G	--	S	V	R	A	R	I	V	T	D	R	E	T	G	S	S	K	G	F	G	F	V	D	E	N	S	619
RRM1	357	A	E	D	L	E	K	A	L	E	L	T	G	-	L	K	V	F	G	N	E	I	K	T	E	-	379																							
RRM2	439	E	A	D	A	E	K	T	F	E	E	K	Q	G	T	E	I	D	G	R	S	I	S	L	Y	Y	463																							
RRM3	533	F	E	D	A	K	E	A	L	N	S	C	N	K	R	E	I	E	G	R	A	I	R	L	E	L	557																							
RRM4	620	E	E	D	A	K	A	A	K	E	A	M	E	D	G	E	I	D	G	N	K	V	T	L	D	W	644																							

Figure 4-3-6
Multiple alignment of human nucleolin RRM domains.

Four sequences were aligned using clustalX and manually adjusted. RNP1 and RNP2 indicate the positions of consensus sequences.

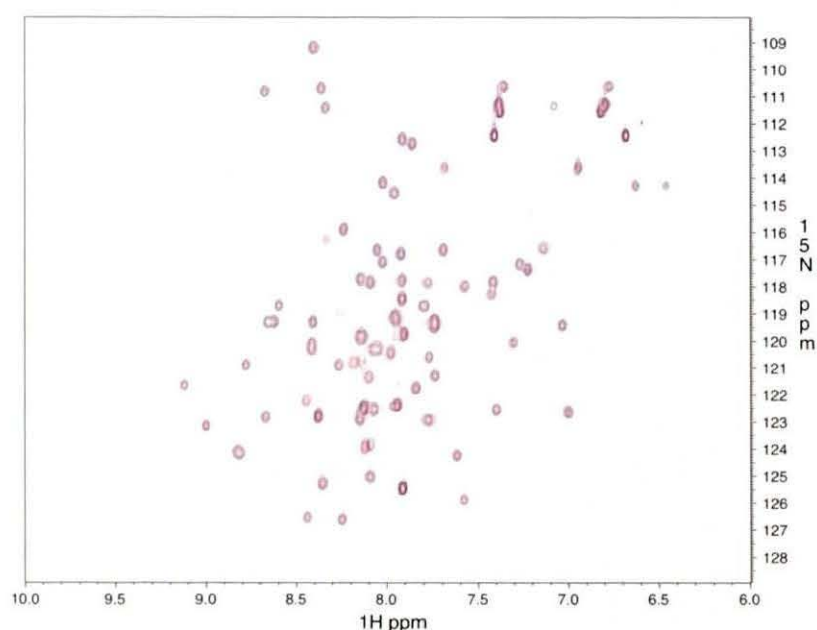


Figure 4-3-7
The nucleolin-RNA complex is required to associate with NVL2UD.

The HSQC spectra of NVL2UD(1-74), collected in the absence (black), or presence of 3 molar equivalents (red) of nucleolin fragment R12, indicate that NVL2UD shows no specific interaction between NVL2UD and purified (RNA-free) nucleolin R12.

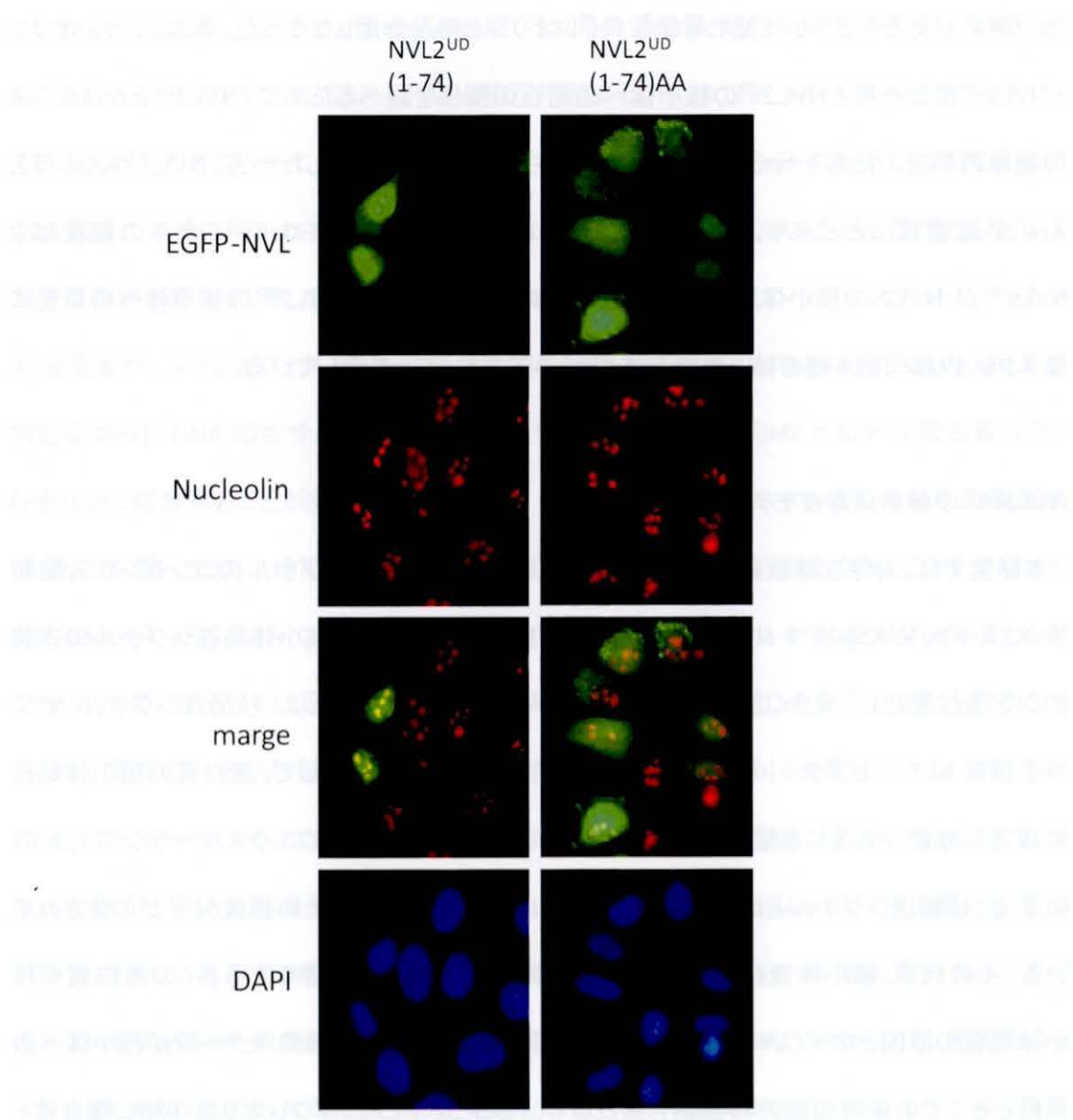


Figure 4-3-8

NVL2UD is a nucleolus localization domain.

HeLa cells were transfected with GFP-NVL2^{UD}(1-74) or GFP-NVL2^{UD}(1-74)AA. After a 24 -h incubation, cells were fixed, stained with anti -nucleolin antibody and DAPI, and then visualized .

NVL2^{UD} の RRKR モチーフが核小体移行のために必要十分である

NVL2^{UD} は、アミノ酸残基 49-52 に典型的な NoLS コンセンサス、(R/K)(R/K)X(R/K)を含んでいる。RRKR モチーフを RRAA に置換した場合、NVL2 の核小体への局在がなくなったという報告がある(6)。これらの残基が、RNA を介した NVL2-ヌクレオリン相互作用に寄与するかどうかを調べるために、NVL2^{UD}RRAA 変異体(NVL2^{UD}AA)を用いた(Figure4-3-5D)。NVL2^{UD}AA

は、RNA があるかどうかに関わりなく、ヌクレオリンと相互作用しなかった。次に、ヌクレオリン - NVL2^{UD} 相互作用と NVL2^{UD} の核小体への局在の関係を調べるために、NVL2^{UD} と NVL2^{UD}AA の細胞内局在の比較を行った。NVL2^{UD} は核と主に核小体に堆積した一方、NVL2^{UD}AA のほとんどが細胞質にとどまり、核小体へは局在しなかった (Figure 4-3-8)。これらの結果は、NVL2^{UD} が NVL2 の核小体局在に十分な単独のドメインであり、NVL2^{UD} の核小体への局在にはヌクレオリン-RNA 複合体との相互作用が必要であることを示している。

NVL2UD の核小体局在モチーフ

本研究では、小さな球状ドメインであり典型的な核小体局在シグナルのコンセンサス配列 (R/K)(R/K)X(R/K)を持つ NVL2^{UD} を同定した。最近の研究では、核小体局在シグナルの古典的な定義は変化し、大きく広がるであろうことが示されている。これは、核局在シグナル(NLS)が主要な NLS レセプター、インポートンの認識配列であるのに対して、蛋白質の核小体局在の複雑な経路から生じる結果である。今日までに、インポートンやエクスポートンのための NLS と、核輸送シグナルとは異なり、一般的ではない NoLS シグナル認識分子が同定されている。その代り、核小体蛋白質-蛋白質相互作用ネットワークに関与する多くの蛋白質が核小体局在の原因となっている(21)。本研究の結果、NVL2^{UD} の RRKR モチーフが核小体への移行とそこでの保持の両方の役割を果たしていることを示した。ヌクレオリン-RNA 複合体との相互作用は、NVL2 の核小体への保持に寄与しているに違いない。このことは、核小体局在のネットワークモデルを支持している。

この観点から、NVL2^{UD} と他の知られている NoLS を含む蛋白質の構造と表面の性質の比較することで、NoLS の構造的な共通性の同定を試みた。比較には、Rmmott と Hiscox による最近の核小体局在についての総説(21)から代表的な NoLS を選んだ。そのなかから、6 つの独立した構造を Protein Data Bank で見つけた。それは、PDB codes; 1k5k (HIV1 Tat)、1etf (HIVa Rev peptide-RNA)、2bxx (IBV-N protein)、2hdp (MDM2)、2fgf (FGF2)、2ang

(angiogenin)である。FGF2 と angiogenin を除くこれらの蛋白質は、多くの主な核小体構成因子、ヌクレオリン、ヌクレオフォスミン、RNA、と相互作用する。HIV1 Tat、HIV1 Rev はヌクレオフォスミンと RNA のどちらかに NoLS を通して直接相互作用し、HIV1 Rev ペプチド-RNA 複合体の溶液構造がすでに解かれている(33-37)。ヌクレオフォスミンは MDM2 との相互作用において重要な役割を果たす(38)。MDM2 に関して、NoLS を含む C 末端リングフィンガードメインと N 末端領域が、ヌクレオフォスミンへの結合に関与している。一方で、IBV-N 蛋白質の NoLS を含む広がった RNA 結合サイトへ RNA が結合する(39)。そして、MDM2 と IBV-N 蛋白質はヌクレオリンに結合することが報告されている(40, 41)。正電荷のクラスターがこの分子の表面のほとんどを覆っており、核小体局在において電荷-電荷相互作用が重要であることを示唆している(Figure4-3-9)。さらに、核小体局在のカギとなる NoLS のアルギニンとリジンのほとんどが分子の端に露出している。NVL2^{UD} の NoLS はドメイン上部の端に正電荷の突起を露出しているが、電荷の分布は独特で、正電荷のクラスターは離れたところに位置している。興味深いことに、HIV1 Tat と Rev は RNA を認識するアルギニンとリジンの側鎖が露出しており、これは構造を持った RNA との相互作用の土台に適している。NVL2^{UD} の NoLS は同様の露出配置に一致しており、これは RNA との親和性を示唆している。MDM2 と IBV-N 蛋白質の NoLS とそのヌクレオリン結合との直接的な寄与は実験されていないが、MDM2 の NoLS は、正電荷クラスターの凸状の表面の上部に目立った突起を形成している。MDM2 のヌクレオリンとの相互作用は、ある意味で NVL2^{UD} と似ていることが推測される。NVL2^{UD} は、ヌクレオリン RRMドメインとの相互作用を通して核小体局在に関与することが分かった初めてのドメインである。

他の TypeII AAA-APases と比較した NVL の分子構造; TypeII AAA-ATPase の分類

Figure4-3-10 は、Type II AAA-ATPase の類似点と相違点をドメイン構造とともにまとめたものである。他の TypeII AAA-ATPases の保存された NTDsは、NSF (42-47)、VCP/p97 (48-55)、PEX1 (56-58)の多くの構造と機能の研究で報告されたものである。NSF とその酵母

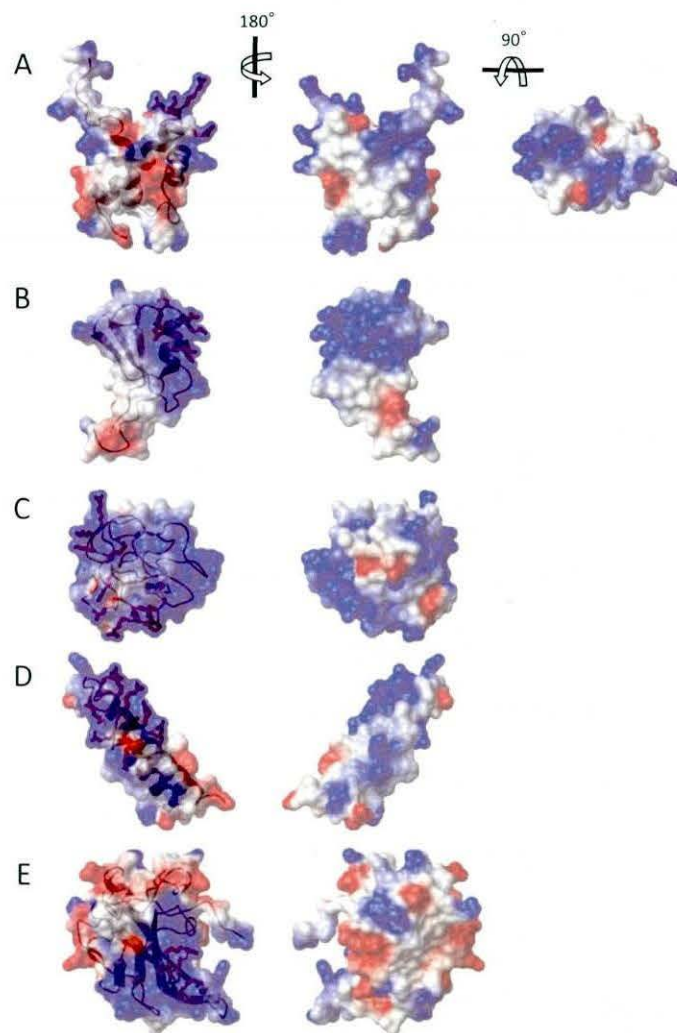


Figure 4-3-9
Comparison of NoLS structures with the NVL2^{UD}.

Shown are NoLS-containing structures selected from the list of Emmott and Hiscox (21). The electrostatic surface representations are superimposed on the *ribbon diagrams*. Positive (blue) and negative (red) electrostatic potentials of each molecule are mapped on the van der Waals surfaces. NoLSs are depicted as *sticks* and are colored red (Arg and Lys) or orange (all residues except Arg and Lys). A, NVL2^{UD} (PDB code 2rre); B, MDM2 ring finger domain (PDB code 2hdp); C, HIV-1 Tat (PDB code 1k5k); D, HIV-1 Rev (PDB code 2x7l); E, IBV-N protein (PDB code 2bxx).

オルソログ Sec18 は、主にエンドサイトーシス経路の異型膜融合に関与している(46-48)。

NSF の最も重要なターゲットは、 α -、 β -、 γ -soluble NSF attachment proteins である(48)。

VCP と酵母 CDC48 は小胞体相互作用蛋白質の分解(49-51)と、ゴルジと核膜の再構成(48, 52)に関与している。VCP と CDC48 のアンフォールダーゼ活性の特異的な標的は明らかにな

っていないが、p37 (59)、p47 (52)、Ufd1/Npl4 (51)、VCIP135 (53)、Derlin-1、VIMP (54)のような多くの異なったアダプター分子やアンカー分子を伴った様々な細胞内機能を持っている。これらの異なったVCPアダプターが、VCPの機能を支配しているに違いない。PEX1は、共通のNTDとは少し違ったドメイン構造と、それに続く~300 アミノ酸の独特の挿入、そしてAAAドメイン(D1,D2)を持つ。PRX6のNTDは決定されていないけれども、FORTE 構造予測サーバーでは、高いZスコアで、PEX1^{NTD}との相同性を示した。

Figure4-3-10は、NVL(とそのオルソログ)は、他のType II AAA-ATPaseと構造的に異なることをはっきりと示している。例えば、NVLだけが核小体で働き、膜性細胞器官の表面では働かない。より小さいNTD(NVL2^{UD})と、ドメイン間の挿入の長さは特徴的である。その上、NVL2^{UD}は、オルタナティブスプライスによって除かれることができる。それにもかかわらず、これらのType II AAA-ATPaseのいくつかの共通の特徴はまだ目立ったものである。一般に、これらの酵素はすべて六量体リングを形成し、蛋白質アンフォールダーゼとして働く。Type II AAA-ATPaseのほとんどが細胞小器官膜に局在し、膜融合(42, 43, 48)や膜を越えた蛋白質輸送(49, 60-62)に関与している。蛋白質-蛋白質または蛋白質-膜相互作用の過程は、自主独立型であり、ATP非依存的である。対照的に、蛋白質-蛋白質/蛋白質-脂質相互作用が解離する逆の過程では、AAA-ATPaseによって作られたATPのエネルギーが必要とされることがある。これらの逆の過程は、膜融合やペルオキシソーム蛋白質輸送のような多くの生物学的イベントのために、次のサイクルの複合体形成を必要とする。従って、知られているType II AAA-ATPaseの共通の特徴は、分子機構の再利用や再生利用である。

核小体での NVL の役割

他の膜に関連するAAA-ATPaseとは異なって、NVL2^{UD}は核小体でヌクレオリン-RNA複合体を通して機能する。ヌクレオリンは、核小体で多くの蛋白質-蛋白質相互作用のネットワークのハブ蛋白質であり、核小体の構造を維持している。ヌクレオリンは、酸性アミノ酸クラスタ

一の長い天然変性領域を保持し、これは多くのヌクレオリン結合蛋白質のための足場として働くと考えられる(21)。最近の研究で、天然変性蛋白質、天然変性領域は、特に多くのインタラクタムのハブ蛋白質では、蛋白質-蛋白質相互作用ネットワークのカギとなる役割を果たしていることが示された(63, 64)。しかし、本研究では、NVL2^{UD}はヌクレオリンの天然変性領域ではなく、RNA 結合領域へ RNA 依存的に結合することを示した。この特徴のは、NVL2 の役割を他のヌクレオリン結合蛋白質、トポイソメラーゼ I やヒストン H1 と区別している。これまでに述べたように、NVL を除く他の Type II AAA-ATPase の保存された NTD は他のアダプター蛋白質や基質への結合に関与する。同様に、ヌクレオリンは NVL2 のアダプターであり、NVL2 は NVL2 の基質とともに働くのかもしれない。

Type II AAA ATPase	Localization	Target	Function
NVL2 	Nucleolus	Nucleolin	Recycling of nucleolin from pre-rRNA
VCP/p97 	Cytosol Nucleoplasm	Ubiquitinated ERAD substrates Syntaxin 5	ERAD Recycling of syntaxin 5 for Golgi/nuclear membrane remodeling
NSF 	Cytosol	SNARE	Recycling of SNARE complex for exocytosis
PEX1 	Cytosol		
PEX6 	Cytosol	PEX5	Recycling of PEX5 from peroxisomal membrane

Figure4-3-10
Summary of the type II AAA-ATPases.

Domain architecture, subcellular localization, target proteins, and functions of type II AAA -ATPases are indicated. Each AAA-ATPase dissociates the target from the protein complex. Because the removed proteins are used again in the following assembly cycle for the respective complex, we propose that the recycling of target proteins is a function of the type II AAA-ATPases.

ヌクレオリンが NVL2 のアダプターである場合、NVL2 の ATP 加水分解エネルギーはヌクレオリンに移転し、ヌクレオリンの天然変性領域とヌクレオリンパートナー蛋白質の間の蛋白質

-蛋白質相互作用の解離を促進する。核小体に存在する蛋白質は、細胞周期や細胞外の刺激に応じて、その構成因子が大幅に変化するが(17)、この活発な核小体再構成のメカニズムは明らかになっていない。本研究の結果により、NVL2 が核小体機能の指導者となる分子の一つの候補であることを提案する。一方、別の可能性として、ヌクレオリンが NVL2 ATPase 活性の直接的な基質であり、NVL2 はヌクレオリンとその標的 RNA との解離を促進することも考えられる。

本研究の結果は、NVL2^{UD} は RNA 存在下で、一つの特定の RRM ドメインではなく、ある組み合わせの連続する RRM ドメイン上で働くことを示唆した。言い換えると、4 つの RRM の異なった分子表面から推測されるように、RRM とそれに続く GAR ドメインは、NVL2^{UD} との結合において重複して働くように見える。例えば、溶液構造(それぞれ PDB code 2rkk, 2fc9, sfc8)の比較によって推定された RRM の保存された表面アミノ酸残基は、20 %以下である(65)。その上、それらの間で、同一のアミノ酸残基の位置は異なっている。この表面のバリエーションが結果的に RNA への異なった特異性を生じさせる。例えば、一番目と二番目の RRM ドメインの組み合わせは、複合体構造の中で特異的なステム-ループ RNA (rGGCCGAAA-UCCCGAAGUAGGCC)に強く結合する(66)。この RNA は三番目、四番目の RRM ドメインと相互作用することはほとんど無い(67)。それにもかかわらず、これら 4 つの RRM は *in vivo* で、特にリボソーム生合成の間の RNA プロセッシングにおいて効率は異なるものの、機能的に重複する(68)。総合すると、NVL2^{UD} は特異的な蛋白質-蛋白質相互作用や、特異的な RNA 配列には依存せず、無差別的なヌクレオリン-RNA 複合体を認識していると考えられる。NVL2^{UD} の標的は、ヌクレオリンの二つの連続した RNA 結合ドメインの間のループアウトした RNA のような、一定の構造要素である可能性が高い。このアイデアは、HIV-Tat ではペプチドでも核小体局在シグナル配列として機能するという、HIV-Tat-RNA 相互作用のメカニズムから得たものである。この場合、塩基性ペプチドの二つのアルギニン残基が Tat の RNA ステムループへの強固な結合、“アルギニンフック”と呼ばれる相互作用を促進している(69)。これらのことを総合し

て、NVL2^{UD}によるヌクレオリンとの相互作用のメカニズムは HIV-Tat のものと似ており、RRKR モチーフの側鎖がヌクレオリン RNA 結合ドメインによって形成された RNA ループをつかんでいると仮定する。本研究では、大腸菌抽出物から混入する配列のわからない RNA の混合物が NVL2^{UD}-ヌクレオリン相互作用を強化することを示した。NVL2^{UD} のヌクレオリン-RNA 複合体認識の分子基盤を明らかにするための、更なる研究が必要である。

RRM ドメインを持つ蛋白質は、それらの特異的な RNA 配列と相互作用すると報告されている。当然、ヌクレオリンは、リボソーム RNA 前駆体に含まれる独自の結合モチーフに結合すると推測される。ヌクレオリンと標的 RNA の親和性は、連続する RNA 結合ドメインに同時に相互作用することにより上昇する。それゆえ、RNA からヌクレオリンを放出する能動的なメカニズムの存在が期待できる。この見解は、ドミナントネガティブ NVL2 変異体が 60 S リボソームサブユニットの生合成を抑制する(6)という研究結果によって支持される。NVL2 によるリボソーム生合成のコントロールについて、考えられるメカニズムを Figure4-3-11 に示した。

結論

本研究では、NVL2 の N 末端ユニークドメインの構造を解き、新しい標的としてヌクレオリンを同定した。また、RNA が NVL2^{UD} とヌクレオリンの相互作用を強化し、NVL2 の NoLS がそれらの相互作用のカギとなる役割を果たすことを明らかにした。実際、NVL2^{UD} はヌクレオリンの連続する二つ以上の RNA 結合ドメインを認識していた。他の type II AAA-ATPase との類似性から、NVL はヌクレオリン-RNA 複合体を解離させ、リボソーム生合成を促進するというメカニズムを提案する。

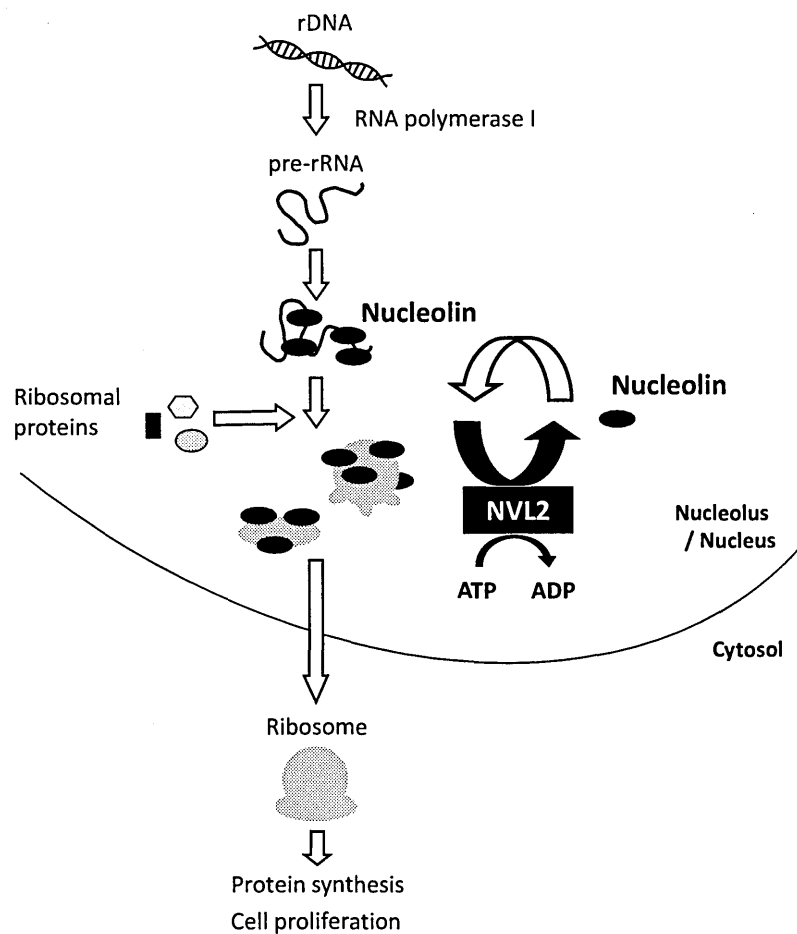


Figure4-3-11

Model for the function of NVL2 in ribosome biogenesis.

In ribosome biogenesis, nucleolin plays a role in rDNA transcription and maturation. Nucleolin binds to rRNA via its RRM domains, and it may regulate ribosome maturation. NVL might dissociate the nucleolin RRM domains from the rRNA with energy derived from ATP hydrolysis to promote some steps, such as protein incorporation or rRNA folding. The released nucleolin interacts with other rRNA molecules as well as rDNA. Consequently, NVL recycles nucleolin at the nucleolus.

Supplementary Tabele 4-3-1

Structural statistics for NVL2^{UD} ^a

Total number of distance constrains	994
long range [$ i-j > 4$]	236
middle range [$1 < i-j \leq 4$]	374
short range [$ i-j \leq 1$]	382
Hydrogen bond constraints	20x2
Dihedral angle restraints	
ϕ, ψ	46, 46
R.m.s. deviation from experimental constraints ^b	
Distance (Å)	$0.002 \pm 5 \times 10^{-4}$
Angle (°)	0.124 ± 0.012
R.m.s. deviation from idealized covalent geometry	
Distance (Å)	$0.001 \pm 5 \times 10^{-5}$
Angle (°)	0.292 ± 0.001
Impropers (°)	0.108 ± 0.004
CNS energy terms (kcal/mol)	
E_{bond}	0.69 ± 0.05
E_{angle}	29.8 ± 0.23
E_{imp}	1.17 ± 0.1
PROCHECK Ramachandran plot (residues 11-70) ^c	
Residues in most favored regions (%)	91.0
Residues in additionally allowed regions (%)	9.0
Residues in generously allowed regions (%)	0.0
Residues in disallowed regions (%)	0.0
R.m.s deviation of mean structure derived from 20 calculated structures	
Back bone (residues 11-70) ^c (Å)	0.418
All heavy (residues 11-70) ^c (Å)	1.035

^aThese statistics comprise an ensemble of the 20 lowest-energy structures obtained from 200 starting structures.

^bNone of these structures exhibited distance violations > 0.5 Å or dihedral angle violations $> 5^\circ$

^cResidues 28 and 49-51 were excluded from analysis

参考文献

1. Lupas, A. N. and Martin, J., AAA proteins. *Curr Opin Struct Biol* (2002) 12, 746-753
2. Patel, S. and Latterich, M., The AAA team: related ATPases with diverse functions. *Trends Cell Biol* (1998) 8, 65-71
3. Neuwald, A. F., Aravind, L., Spouge, J. L., and Koonin, E. V., AAA+: A class of chaperone-like ATPases associated with the assembly, operation, and disassembly of protein complexes. *Genome Res* (1999) 9, 27-43

4. Ogura, T. and Wilkinson, A. J., AAA+ superfamily ATPases: common structure-diverse function. *Genes Cells* (2001) 6, 575-597
5. Germain-Lee, E. L., Obie, C., and Valle, D., NVL: a new member of the AAA family of ATPases localized to the nucleus. *Genomics* (1997) 44, 22-34
6. Nagahama, M., Hara, Y., Seki, A., Yamazoe, T., Kawate, Y., Shinohara, T., Hatsuzawa, K., Tani, K., and Tagaya, M., NVL2 is a nuclear AAA-ATPase that interacts with ribosomal protein L5 through its nuclear localization sequence. *Mol Biol Cell* (2004) 15, 5712-5723
7. Long, A. R., Yang, M., Kaiser, K., and Shepherd, D., Isolation and characterization of smallminded, a *Drosophila* gene encoding a new member of the Cdc48/VCP superfamily of AAA proteins. *Gene* (1998) 208, 191-199
8. Long, A. R., Wilkins, J. C., and Shepherd, D., Dynamic developmental expression of smallminded, a *Drosophila* gene required for cell division. *Mech Dev* (1998) 76, 33-43
9. Wu, D., Chen, P. J., Chen, S., Hu, Y., Nuñez, G., and Ellis, R. E., *C. elegans* MAC-1, an essential member of the AAA family of ATPases, can bind CED-4 and prevent cell death. *Development* (1999) 126, 2021-2031
10. Kressler, D., Roser, D., Pertschy, B., and Hurt, E., The AAA ATPase Rix7 powers progression of ribosome biogenesis by stripping Nsa1 from re-60S particles. *J Cell Biol* (2008) 181, 935-944
11. Gadai, O., Strauss, D., Braspenning, J., Hoepfner, D., Petfalski, E., Philippsen, P., Tollervey, D., and Hurt, E., A nuclear AAA-type ATPase (Rix7p) is required for biogenesis and nuclear export of 60S ribosomal subunits. *EMBO J* (2001) 20, 3695-3704
12. Siomi, H., Shida, H., Nam, S. H., Nosaka, T., Maki, M., and Hatanaka, M., Sequence requirements for nucleolar localization of human T cell leukemia virus type I pX protein, which regulates viral RNA processing. *Cell* (1998) 55, 197-209
13. Weber, J. D., Kuo, M. L., Bothner, B., DiGiammarino, E. L., Kriwacki, R. W., Roussel, M. F., and Sherr, C. J., Cooperative signals governing ARF-mdm2 interaction and nucleolar localization of the complex. *Mol Cell Biol* (2000) 20, 2517-2528
14. Cmarko, D., Smigova, J., Minichova, L., and Popov, A., Nucleolus: the ribosome factory. *Histol Histopathol* (2008) 23, 1291-1298
15. Montanaro, L., Trere', D., and Derenzini, M., Nucleolus, ribosomes, and cancer. *Am J Pathol* (2008) 173, 301-310

16. Greco, A., Involvement of the nucleolus in replication of human viruses. *Rev Med Virol* (2009) 19, 201–214
17. Hernandez-Verdun, D., The nucleolus: a model for the organization of nuclear functions. *Histochem Cell Biol* (2006) 126, 135–148
18. Matthews, D. A. and Olson, M. O., What is new in the nucleolus?: workshop on the nucleolus: new perspectives. *EMBO Rep* (2006) 7, 870–873
19. David, M. J., Martindill, D. M., and Riley, P. R., Cell cycle switch to endocycle: the nucleolus lends a hand. *Cell Cycle* (2008) 7, 17–23
20. Stark, L. A., and Taliansky, M., Old and new faces of the nucleolus. Workshop on the Nucleolus and Disease. *EMBO Rep* (2009) 10, 35–40
21. Emmott, E. and Hiscox, J. A., Nucleolar targeting: the hub of the matter. *EMBO Rep* (2009) 10, 231–238
22. Ugrinova, I., Monier, K., Ivaldi, C., Thiry, M., Storck, S., Mongelard, F., and Bouvet, P., Inactivation of nucleolin leads to nucleolar disruption, cell cycle arrest and defects in centrosome duplication. *BMC Mol Biol* (2007) 8, 66
23. Ma, N., Matsunaga, S., Takata, H., Ono-Maniwa, R., Uchiyama, S., and Fukui, K., Nucleolin functions in nucleolus formation and chromosome congression. *J Cell Sci* (2007) 120, 2091–2105
24. Amin, M. A., Matsunaga, S., Uchiyama, S., and Fukui, K., Depletion of nucleophosmin leads to distortion of nucleolar and nuclear structures in HeLa cells. *Biochem J* (2008) 415, 345–351
25. Iwaya, N., Goda, N., Unzai, S., Fujiwara, K., Tanaka, T., Tomii, K., Tochio, H., Shirakawa, M., and Hiroaki, H., Fine-tuning of protein domain boundary by minimizing potential coiled coil regions. *J Biomol NMR* (2007) 37, 53–63
26. Goda, N., Tenno, T., Takasu, H., Hiroaki, H., and Shirakawa, M., The PRESAT-vector: asymmetric T-vector for high-throughput screening of soluble protein domains for structural proteomics. *Protein Sci* (2004) 13, 652–658
27. Tenno, T., Goda, N., Tateishi, Y., Tochio, H., Mishima, M., Hayashi, H., Shirakawa, M., and Hiroaki, H., High-throughput construction method for expression vector of peptides for NMR study for isotopic labeling. *Protein Eng Des Sel* (2004) 17, 305–314

28. Holm, L. and Rosenström, P., Dali server: conservation mapping in 3D. *Nucleic Acids Res* (2010) 38, W545–W549
29. Shi, J., Blundell, T. L., and Mizuguchi, K., FUGUE: sequence–structure homology recognition using environment–specific substitution tables and structure–dependent gap penalties. *J Mol Biol* (2001) 310, 243–257
30. Tomii, K. and Akiyama, Y., FORTE: a profile–profile comparison tool for protein fold recognition. *Bioinformatics* (2004) 20, 594–595
31. Pasternack, M. S., Bleier, K. J., and McInerney, T. N., Granzyme A binding to target cell proteins. Granzyme A binds to and cleaves nucleolin *in vitro*. *J Biol Chem* (1991) 266, 14703–14708
32. Ghisolfi, L., Kharraz, A., Joseph, G., Amalric, F., and Erard, M., Concerted activities of the RNA recognition and the glycine–rich C–terminal domains of nucleolin are required for efficient complex formation with pre–ribosomal RNA. *Eur J Biochem* (1992) 209, 541–548
33. Weeks, K. M., Ampe, C., Schultz, S. C., Steitz, T. A., and Crothers, D. M., Fragments of the HIV–1 Tat protein specifically bind TAR RNA. *Science* (1990) 249, 1281–1285
34. Li, Y. P., Protein B23 is an important human factor for the nucleolar localization of the human immunodeficiency virus protein Tat. *J Virol* (1997) 71, 4098–4102
35. Tan, R., Chen, L., Buettner, J. A., Hudson, D., and Frankel, A. D., RNA recognition by an isolated alpha helix. *Cell* (1993) 73, 1031–1040
36. Szebeni, A., Herrera, J. E., and Olson, M. O., Interaction of nucleolar protein B23 with peptides related to nuclear localization. *Biochemistry* (1995) 34, 8037–8042
37. Battiste, J. L., Mao, H., Rao, N. S., Tan, R., Muhandiram, D. R., Kay, L. E., Frankel, A. D., and Williamson, J. R., Alpha helix–RNA major groove recognition in an HIV–1 rev peptide–RRE RNA complex. *Science* (1996) 273, 1547–1551
38. Kurki, S., Peltonen, K., Latonen, L., Kiviharju, T. M., Ojala, P. M., Meek, D., and Laiho, M., Nucleolar protein NPM interacts with HDM2 and protects tumor suppressor protein p53 from HDM2–mediated degradation. *Cancer Cell* (2004) 5, 465–475
39. Tan, Y. W., Fang, S., Fan, H., Lescar, J., and Liu, D. X., Amino acid residues critical for RNA–binding in the N–terminal domain of the nucleocapsid protein are essential determinants for the infectivity of coronavirus in cultured cells. *Nucleic Acids Res* (2006) 34, 4816–4825

40. Saxena, A., Rorie, C. J., Dimitrova, D., Daniely, Y., and Borowiec, J. A., Nucleolin inhibits Hdm2 by multiple pathways leading to p53 stabilization. (2006) *Oncogene* 25, 7274–7288
41. Chen, H., Wurm, T., Britton, P., Brooks, G., and Hiscox, J. A., Interaction of the coronavirus nucleoprotein with nucleolar antigens and the host cells. *J Virol* (2002) 76, 5233–5250
42. Clary, D. O., Griff, I. C., and Rothman, J. E., SNAPs, a family of NSF attachment proteins involved in intracellular membrane fusion in animals and yeast. *Cell* (1990) 61, 709–721
43. Dalal, S., Rosser, M. F., Cyr, D. M., and Hanson, P. I., Distinct roles for the AAA ATPases NSF and p97 in the secretory pathways. *Mol Biol Cell* (2004) 15, 637–648
44. Yu, R. C., Jahn, R., and Brunger, A. T., NSF N-terminal domain crystal structure: models of NSF function. *Mol Cell* (1999) 4, 97–107
45. Lenzen, C. U., Steinmann, D., Whiteheart, S. W., and Weis, W. I., Crystal structure of the hexamerization domain of N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein. *Cell* (1998) 94, 525–536
46. Whiteheart, S. W. and Kubalek, E. W., SNAPs and NSF: general members of the fusion apparatus. *Trends Cell Biol* (1995) 5, 64–68
47. Hay, J. C. and Scheller, R. H., SNAREs and NSF in targeted membrane fusion. *Curr Opin Cell Biol* (1997) 9, 505–512
48. Rabouille, C., Levine, T. P., Peters, J. M., and Warren, G., An NSF-like ATPase, p97, and NSF mediate cisternal regrowth from mitotic Golgi fragments. *Cell* (1995) 82, 905–914
49. Rabinovich, E., Kerem, A., Fröhlich, K. U., Diamant, N., and Bar-Nun, S., AAA-ATPase p97/Cdc48p, a cytosolic chaperone required for endoplasmic reticulum-associated protein degradation. *Mol Cell Biol* (2002) 22, 626–634
50. Ye, Y., Meyer, H. H., and Rapoport, T. A., Function of the p97-Ufd1-Npl4 complex in retrotranslocation from the ER to the cytosol: dual recognition of nonubiquitinated polypeptide segments and polyubiquitin chains. *J Cell Biol* (2003) 162, 71–84
51. Meyer, H. H., Shorter, J. G., Seemann, J., Pappin, D., and Warren, G., A complex of mammalian ufd1 and npl4 links the AAA-ATPase, p97, to ubiquitin and nuclear transport pathways. *EMBO J* (2000) 19, 2181–2192
52. Kondo, H., Rabouille, C., Newman, R., Levine, T. P., Pappin, D., Freemont, P., and Warren, G., p47 is a cofactor for p97-mediated membrane fusion. *Nature* (1997) 388, 75–78

53. Uchiyama, K., Jokitalo, E., Kano, F., Murata, M., Zhang, X., Canas, B., Newman, R., Rabouille, C., Pappin, D., Freemont, P., and Kondo, H., VCIP135, a novel essential factor for p97/p47-mediated membrane fusion, is required for Golgi and ER assembly *in vivo*. *J Cell Biol* (2002) 159, 855–866
54. Ye, Y., Shibata, Y., Kikkert, M., van Voorden, S., Wiertz, E., and Rapoport, T. A., Recruitment of the p97 ATPase and ubiquitin ligases to the site of retrotranslocation at the endoplasmic reticulum membrane. *Proc Natl Acad Sci USA* (2005) 102, 14132–14138
55. Zhang, X., Shaw, A., Bates, P. A., Newman, R. H., Gowen, B., Orlova, E., Gorman, M. A., Kondo, H., Dokurno, P., Lally, J., Leonard, G., Meyer, H., van Heel, M., and Freemont, P. S., Structure of the AAA ATPase p97. *Mol Cell* (2000) 6, 1473–1484
56. Weller, S., Gould, S. J., and Valle, D., Peroxisome biogenesis disorders. *Annu Rev Genomics Hum Genet* (2003) 4, 165–211
57. Shiozawa, K., Maita, N., Tomii, K., Seto, A., Goda, N., Akiyama, Y., Shimizu, T., Shirakawa, M., and Hiroaki, H., Structure of the N-terminal domain of PEX1 AAA-ATPase. Characterization of a putative adaptor-binding domain. *J Biol Chem* (2004) 279, 50060–50068
58. Shiozawa, K., Goda, N., Shimizu, T., Mizuguchi, K., Kondo, N., Shiozawa, N., Shirakawa, M., and Hiroaki, H., The common phospholipid-binding activity of the N-terminal domains of PEX1 and VCP/p97. *FEBS J* (2006) 273, 4959–4971
59. Uchiyama, K., Totsukawa, G., Puhka, M., Kaneko, Y., Jokitalo, E., Dreveny, I., Beuron, F., Zhang, X., Freemont, P., and Kondo, H., p37 is a p97 adaptor required for Golgi and ER biogenesis in interphase and at the end of mitosis. *Dev Cell* (2006) 11, 803–816
60. Tamura, S., Shiozawa, N., Suzuki, Y., Tsukamoto, T., Osumi, T., and Fujiki, Y., A cytoplasmic AAA family peroxin, Pex1p, interacts with Pex6p. *Biochem Biophys Res Commun* (1998) 245, 883–886
61. Fujiki, Y., Okumoto, K., Otera, H., and Tamura, S., Peroxisome biogenesis and molecular defects in peroxisome assembly disorders. *Cell Biochem Biophys* (2000) 32, 155–164
62. Fujiki, Y., Miyata, N., Matsumoto, N., and Tamura, S., Dynamic and functional assembly of the AAA peroxins, Pex1p and Pex6p, and their membrane receptor Pex26p involved in shuttling of the PTS1 receptor Pex5p in peroxisome biogenesis. *Biochem Soc Trans* (2008) 36, 109–113

63. Higurashi, M., Ishida, T., and Kinoshita, K., Identification of transient hub proteins and the possible structural basis for their multiple interactions. *Protein Sci* (2008) 17, 72–78
64. Hegyi, H., Schad, E., and Tompa, P., Structural disorder promotes assembly of protein complexes. *BMC Struct Biol* (2007) 7, 65
65. Arumugam, S., Miller, M. C., Maliekal, J., Bates, P. J., Trent, J. O., and Lane, A. N., Solution structure of the RBD1, 2 domains from human ubiquitin. *J Biomol NMR* (2010) 47, 79–83
66. Allain, F. H., Bouvet, P., Dieckmann, T., and Feigon, J., Molecular basis of sequence-specific recognition of pre-ribosomal RNA by nucleolin. *EMBO J* (2000) 19, 6870–6881
67. Serin, G., Joseph, G., Ghisolfi, L., Bauzan, M., Erard, M., Amalric, F., and Bouvet, P., Two RNA-binding domains determine the RNA-binding specificity of nucleolin. *J Biol Chem* (1997) 272, 13109–13116
68. Storck, S., Thiry, M., and Bouvet, P., Conditional knockout of nucleolin in DT40 cells reveals the functional redundancy of its RNA-binding domains. *Biol Cell* (2009) 101, 153–167
69. Tao, J. and Frankel, A. D., Specific binding of arginine to TAR RNA. *Proc Natl Acad Sci USA* (1992) 89, 2723–2726
70. Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., and Higgins, D. G., The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* (1997) 25, 4876–4882
71. Koradi, R., Billeter, M., and Wüthrich, K., MOLMOL: a program for display and analysis of macromolecular structures. *J Mol Graph* (1996) 14, 51–55

4-4 Zonula occludens-1 (ZO-1) PDZ ドメインの NMR アサイメント

4-4-1 序論

タイトジャンクション、あるいはゾヌーラオククルーデンスは、上皮細胞や内皮細胞に見られる細胞間接着複合体であり、細胞の最も頂端側にある。タイトジャンクションは上皮細胞および内皮細胞の主要なバリアー機能を担っていると考えられており、細胞層の頂端側と基底面側の化学物質や生物学的物質の独特な組成を維持している(1,2)。タイトジャンクションはバリアー形成に重要であり、細胞間隙を介した溶質や細胞の通過を制御している。さらに、タイトジャンクションはいくつかのシグナル伝達経路にも関わっている。例えば、タイトジャンクションの会合やバリアー機能の調節、細胞間隙から細胞内部へのシグナルの伝達である。そして、その伝達は様々な分子の移動を調節することで行われ、細胞分化や細胞増殖、細胞極性を制御している(3,4,5)。

タイトジャンクションの細胞外領域には 4 種類の膜貫通蛋白質があり、それらは claudin (6,7)、occludin(1)、junctional adhesion molecule (JAM)(5)、tricellulin(4)である。これらの膜蛋白質は、PDZドメインを含む足場蛋白質でお互いに連携している。PDZドメインはコンパクトな球状蛋白質であり、ヒトゲノムにおいては 259 種類の蛋白質に 440 個存在する(8)、最も豊富にあるペプチド結合モジュールである。タイトジャンクションにおいては、MAGUK 蛋白質である ZO-1、ZO-2 が極性をもつ上皮細胞に著しく局在している(9,10)。

今回我々は、ZO-1 蛋白質の第一 PDZ ドメイン ZO-1(PDZ1)の NMR 帰属を行った。PDZ ドメインを含む他のほとんどの蛋白質と同じく、ZO-1 と ZO-2 蛋白質は複数の PDZ ドメインをもち、さらに他にも蛋白質結合モジュールである SH3ドメイン、ZU5ドメインを含んでおり、これらのモジュールにより足場蛋白質として機能している。接着複合体のうち中心的な相互作用の 1 つは、ZO-1、ZO-2 蛋白質の第一 PDZ ドメインと claudin の細胞内カルボキシ末端 PDZ ドメイン結合モチーフとの間の相互作用である(11)。最近では、約 15%の PDZ ドメインがリン

脂質に直接相互作用していることが示されており(12,13)、ZO-1(PDZ1)と ZO-2(PDZ2)はそれらの良い例である(14)。したがって、ZO-1(PDZ1)の NMR 帰属は、ZO-1(PDZ1)と claudin、あるいは ZO-1(PDZ1)とリン脂質のような他のリガンドとの間の相互作用研究に寄与する。

4-4-2 実験

試料調製

PRESAT-vector 法を用いて(15)、マウス ZO-1(PDZ1)(アミノ酸残基 18-110 番)の組み換え GST 融合蛋白質を発現させるベクターを構築した。構築したベクターを大腸菌 BL21(DE3)に導入し、その大腸菌を唯一の窒素源、炭素源として ^{15}N -塩化アンモニウムおよび ^{13}C -グルコースを含む M9 培地 1L で培養し、NMR 測定用の同位体ラベルを導入した蛋白質を生産した。集めた大腸菌を溶解バッファー(50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl)で懸濁し、超音波で破碎した。上清画分を DEAE-Sepharose (GE Healthcare)カラムにかけて、ついで Glutathione Sepharose 4 Fast Flow (GE Healthcare)カラムで精製した。カラム樹脂上でプレジジョンプロテアーゼにより GST タグを切断した。そして、ZO-1(PDZ1)を HiLoad 26/60 Superdex 75 pg ゲルろ過カラム(GE Healthcare)により精製した。この精製プロトコルを使って、 ^{15}N -ラベル蛋白質および ^{13}C , ^{15}N -ダブルラベル蛋白質を調製した。精製した蛋白質を 0.73 mM まで濃縮し、22 mM MES (pH 5.9)バッファーに透析した。蛋白質溶液(313.5 μl)と 99% D_2O (16.5 μl)とを混合し、95% H_2O -5% D_2O の 20 mM MES (pH 5.9)バッファーに 0.7 mM ZO-1(PDZ1)の蛋白質を含むサンプルを用意した。 ^{14}N アミノ酸を選択的に含む ^{15}N ラベル ZO-1(PDZ1)のサンプルも調製した。(Arg⁻)および(Lys⁻)の ^{15}N ラベル ZO-1(PDZ1)蛋白質を、 ^{14}N -Lys もしくは ^{14}N -Arg をそれぞれ含み、 ^{15}N -塩化アンモニウムを含む M9 培地 0.5 L から調製した。

NMR

Bruker Avance DRX (600 MHz)、および極低温三重共鳴プローブを装着している Bruker

Avance III (600 MHz)NMR スペクトロメーターを用いて、NMR 実験を行った。主鎖の ^1H 、 ^{13}C 、 ^{15}N 共鳴シグナルを帰属するために、HNCA、HN(CO)CA、HNCACB、CBCA(CO)NH、HNCO、HN(CA)CO スペクトルと、三次元 ^{15}N -edited-NOESY-HSQC スペクトルを測定した。側鎖の共鳴シグナルを帰属するために、二次元 constant-time ^1H - ^{13}C HSQC、三次元 ^{13}C -edited-NOESY-HSQC、HCCH-TOCSY、CC(CO)NNH、HCC(CO)NNH スペクトルを測定した。すべての NMR スペクトルを 298K で測定し、NMRPipe (16) でスペクトルデータを加工した。そして、SPARKY プログラム (17) を使って解析を行った。

4-4-3 結果と考察

MARS 自動プログラム (18) を使って、主鎖シグナルの連鎖帰属を開始し、約 60% のシグナルを帰属した。しかしながら、引き続き MARS プログラムを反復して走らせたが、65% を超えることはなかった。次に、三重共鳴のデータセットをもとに、連鎖性を注意深く確認した。さらに、 ^{15}N -edited NOESY スペクトルを用いて、帰属をサポートした。 ^{14}N -Lys もしくは ^{14}N -Arg を含むインバースラベル ZO-1(PDZ1) 蛋白質の ^{15}N -HSQC スペクトルをチェックすることで、主鎖の帰属を確認した。

これらの連鎖帰属により、主鎖アミノ基の $^1\text{H}^N$ 、 ^{15}N 共鳴シグナルのうち 94.7% (プロリン以外の 95 残基中 90 残基) を帰属した。さらに、 H^α は 93.0% (100 残基中 93 残基)、 $^{13}\text{C}^\alpha$ は 94.0% (100 残基中 94 残基)、 $^{13}\text{C}^\beta$ は 94.3% (87 残基中 82 残基) を帰属した。TALOS プログラムを使ってランダムコイルの化学シフト値と比較することで、ZO-1(PDZ1) 蛋白質の二次構造を予測した。この結果と我々の初期段階の構造解析により、ZO-1(PDZ1) 蛋白質は 6 本の β -ストランド (Glu10-Leu16, Ile26-Ser29, Val45-Val49, Arg64-Val68, Val71-Ser72, Ala92-Arg98) と 1 本の α -ヘリックス (Glu77-Lys87) から構成されており、ZO-1(PDZ1) の結晶構造 (PDB: SH3M) の結果 (19) とよく一致した。His36、Phe37、Gln38、Ser39 の主鎖共鳴シグナルの連鎖帰属はできなかった。 ^1H - ^{15}N HSQC スペクトルには、帰属できていない主鎖アミド基シグナルが 1 個だけ

ZO-1(PDZ1)の化学シフト帰属データは、BioMagResBank のアクセス番号 11424 に登録した。

参考文献

1. Furuse, M., Hirase, T., Itoh, M., Nagafuchi, A., Yonemura, S., Tsukita, S., and Tsukita, S., Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *J Cell Biol* 123 (1993) 1777-1788
2. Ikenouchi, J., Umeda, K., Tsukita, S., Furuse, M., and Tsukita, S., Requirement of ZO-1 for the formation of belt-like adherens junctions during epithelial cell polarization. *J Cell Biol* 176 (2007) 779-786
3. Tsukita, S., Furuse, M., and Itoh, M., Multifunctional strands in tight junctions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2 (2001) 285-293
4. Ikenouchi, J., Furuse, M., Furuse, K., Sasaki, H., Tsukita, S., and Tsukita, S., Tricellulin constitutes a novel barrier at tricellular contacts of epithelial cells. *J Cell Biol* 171 (2005) 939-945
5. Martin-Padura, I., Lostaglio, S., Schneemann, M., Williams, L., Romano, M., Fruscella, P., Panzeri, C., Stoppacciaro, A., Ruco, L., Villa, A., Simmons, D., and Dejana, E., Junctional adhesion molecule, a novel member of the immunoglobulin superfamily that distributes at intercellular junctions and modulates monocyte transmigration. *J Cell Biol* 142 (1998) 117-127
6. Furuse, M., Fujita, K., Hiiragi, T., Fujimoto, K., and Tsukita, S., Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occluding. *J Cell Biol* 141 (1998) 1439-1550
7. Morita, K., Sasaki, H., Furuse, K., Furuse, M., Tsukita, S., and Miyachi, Y., Expression of claudin-5 in dermal vascular endothelia. *Exp Dermatol* 12 (2003) 289-295
8. Letunic, I., Copley, R. R., Schmidt, S., Ciccarelli, F. D., Doerks, T., Schultz, J., Ponting, C. P., and Bork, P., SMART 4.0: towards genomic data integration. *Nucleic Acids Res* 32(Database issue) (2004) 142-144
9. Gonzalez-Mariscal, L., Betanzos, A., and Avila-Flores, A., MAGUK proteins: structure and role in the tight junction. *Semin Cell Dev Biol* 11 (2000) 315-324
10. Gonzalez-Mariscal, L., Betanzos, A., Nava, P., and Jaramillo, B. E., Tight junction proteins. *Prog Biophys Mol Biol* 81 (2003) 1-44

11. Itoh, M. Furuse, M., Morita, K., Kubota, K., Saitou, M., and Tsukita, S., Direct binding of three tight junction-associated MAGUKs, ZO-1, ZO-2, and ZO-3, with the COOH termini of claudins. *J Cell Biol* 147 (1999) 1351–1363
12. Wu, H., Feng, W., Chen, J., Chan, L. N., Huang, S., and Zhang, M., PDZ domains of Par-3 as potential phosphoinositide signaling integrators. *Mol Cell* 28 (2007) 886–898
13. Zimmermann, P. The prevalence and significance of PDZ domain-phosphoinositide interactions. *Biochim Biophys Acta* 1761 (2006) 947–956
14. Meerschaert, K., Tun, M. P., Remue, E., De Ganck, A., Boucherie, C., Vanloo, B., Degeest, G., Vandekerckhove, J., Zimmermann, P., Bhardwaj, N., Lu, H., Cho, W., and Gettemans, J., The PDZ2 domain of zonula occludens-1 and -2 is a phosphoinositide binding domain. *Cell Mol Life Sci* 66 (2009) 3951–3966
15. Tenno, T., Goda, N., Tateishi, Y., Tochio, H., Mishima, M., Hayashi, H., Shirakawa, M., and Hiroaki, H., High-throughput construction method of expression vector of peptides for NMR study suited for isotopic labeling. *Protein Eng. Des. Sel.* 17 (2004) 305–314
16. Delaglio, F., Grzesiek, S., Vuister, G. W., Zhu, G., Pfeifer, J., and Bax, A., NMRPipe: a multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes. *J Biomol NMR* 6 (1995) 277–293
17. Goddard, T. D. and Kneller, D. G., Sparky 3. University of California, San Francisco
18. Jung, Y. S. and Zweckstetter, M. Mars-robust automatic backbone assignment of proteins. *J Biomol NMR* 30 (2004) 11–23
19. Appleton, B. A., Zhang, Y., Wu, P., Yin, J. P., Hunziker, W., Skelton, N. J., Sidhu, S. S., and Wiesmann, C., Comparative structural analysis of the Erbin PDZ domain and the first PDZ domain of ZO-1. Insights into determinants of PDZ domain specificity. *J Biol Chem* 281 (2006) 22312–22320

第 5 章

総括

近年、分子生物学的実験において、様々な分析手段が発展し、時間がかからず、操作が簡単であるという売りのキットが多く販売されるようになった。このため、熟練した技術がなくても実験が行えるようになり、研究遂行のスピードは加速している。蛋白質の構造、機能解析においても、この流れは同様である。この、研究のスピードに乗り遅れないためには、いかにして早く解析に適した蛋白質試料を調製するかが重要である。本研究では、組み換え蛋白質試料調製の第一歩である、蛋白質発現用ベクターを高速調製することを目的としたベクターの開発を行った。このベクターは、PCR によって増幅した遺伝子を方向性を持ってクローニングできる T-ベクターであり、PRESAT-Vector (Potential Restriction Enzyme Selectable Asymmetric T-vector) と名付けた。このベクターを用いることで、多サンプルの発現系構築を同時に行うことができ、研究に用いる蛋白質サンプルの調製が容易になった。

次に、PRESAT-vector の応用として、蛋白質を細胞内へ導入する PTD (protein transduction domain) と、細胞内の蛋白質を Tb³⁺ の蛍光を利用して観察するための LBT (lanthanide-binding tag) を融合させる蛋白質発現系を構築した。このベクターを用いて調製した蛋白質は、PTD による細胞への導入活性を持ち、細胞内へ入った蛋白質を Tb³⁺ キレート LBT の蛍光を用いて観察できる。また、ヒトインシュリン様成長因子結合蛋白質(IGFBP)由来のペプチドが PTD 活性を持つことを発見した。これまでに知られていた PTD の多くがウィルス由来であることに対して、IGFBP はヒトの蛋白質である点は、薬物送達システムとしての臨床応用において有利であると考えられる。

その他、PRESAT-vector の高効率かつ高速な蛋白質発現ベクター構築能を生かして、立体構造解析に適した様々な蛋白質ドメインの試料を調製し、その構造と機能の解析を行っ

た。

まず、神経ホルモンの一つである、血管作動性ペプチド(VIP)の二つの膜模倣環境での構造を決定し、これらの環境は、VIP の α -ヘリックスを誘起することを明らかにした。また、この研究によって得られたデータは、VIP 類似体の開発において合理的な基盤を与えるものであり、炎症性疾患の治療や癌診断において有用なデータであると考えられる。

次に、type II AAA-ATPase NVL2 の N 末端ドメインの立体構造を決定し、このドメインが nucleolin の RRM と相互作用し、核小体に局在することを明らかにした。得られた結果と、他の type II AAA-ATPase との類似性から、NVL はヌクレオリン-RNA 複合体を解離させ、リボソーム生合成を促進するというメカニズムを提案した。

最後に、細胞接着因子 ZO-1 とそのリガンド Claudin との結合様式を明らかにするため、その第一歩として ZO-1 の PDZ1ドメインの NMR データの帰属を行った。現在、立体構造解析が完了し、機能解析が進行中である。

このように、PRESAT-vector を利用した方向性を持った PCR クローニングの技術は、研究に適した組換え蛋白質を効率よく得るための簡便かつ強力な手法であり、今後の蛋白質研究においても広汎な応用展開が可能である。

略語一覧

AAA:	ATPase associated with various cellular activities
CDNB:	1-chloro-2,4-dinitrobenzene
DD:	death domain
DMEM:	Dulbecco's modified Eagle's medium
DPC:	dodecylphosphocholine
Fmoc:	9-Fluorenyl-methyloxycarbonyl
GAR:	glycine/arginine-rich
GPCR:	G protein-coupled receptor
GSH:	glutathione
GST:	glutathione-S-transferase
HB:	heparin-binding domain
HBTU:	2-(1H-benzotriazole-1-yl)-1, 1, 3, 3-tetramethyluronium hexa-fluorophosphate
HOBt:	1-hydroxybenzotriazole
HPLC:	high -performance liquid chromatography
HS:	heparan sulfate proteoglycans
HSQC:	heteronuclear single quantum coherence
HTS:	high throughput screening
IGF:	Insulin-like growth factor
IGFBP:	IGF-binding protein
IPTG:	isopropyl-D-thiogalactopyranoside
JAM:	junctional adhesion molecule
LB:	Luria Broth media
LBT:	lanthanide binding tag
MAGUK:	membrane-associated guanylate kinase
MALDI-TOF:	matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight
NLS:	nuclear localizing signals
NMP:	N-methylpyrrolidone
NMR:	nuclear magnetic resonance
NoLS:	nucleolar localization signal

NSF: N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein
NTD: N-Terminal domain
NTR: neurotrophin receptor
NVL: nuclear VCO-like protein
NVL2^{UD}: NVL2 unique domain
OD: optical density
ORF: open reading frame
PACAP: pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide
PCR: polymerase chain reaction
PDB: protein data bank
PDZ: PSD95/Discs large/ZO-1
PRESAT-vector: Potential Restriction Enzyme Selectable Asymmetric T-vector
PTD: protein transduction domain
RA: rheumatoid arthritis
RMSD: root mean square deviation
RRM: RNA recognition motif
SAR: structure-activity relationship
SDS-PAGE: sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
TFA: trifluoroacetic acid
TFE: trifluoroethanol
TRX: thioredoxin
Ub: ubiquitin
VCP: valosin-containing protein
VIP: Vasoactive intestinal peptide

謝辞

まず初めに、本論文作製の機会を与えて下さった、田中俊樹教授(名古屋工業大学)に深く感謝致します。

そして、PRESAT-vector のアイデアが生まれてから今日まで、研究の機会を与え続け、様々なご指導をいただきました廣明秀一先生(名古屋大学教授)に深く感謝致します。

本研究を行うにあたり、本当に多くの先生方のお世話になりました。横浜市立大学大学院総合理学研究科では、白川昌弘先生(京都大学教授)、朽尾豪人先生(京都大学准教授)、そのほか計測科学研究室の研究員だった皆様、神戸大学大学院医学研究科では、濱田大三先生(神戸大学特命助教)、藤原芳江博士(大阪大学)、梅津喜崇博士(北陸先端科学技術大学院大学助教)、そして、構造生物学分野において一緒に研究を行った皆様に感謝致します。

私が研究を始める第一歩となった卒業研究から、修士課程修了まで温かくご指導下さりました林秀則先生(愛媛大学教授)、森田勇人先生(愛媛大学准教授)、そして、一緒に夜遅くまで実験をした若松美紀氏に深く感謝します。この時の経験と習得した技術が、この研究においても非常に役立つものとなりました。

最後に、学生時代は私に実験の基本を指導したところから始まり今日まで私を支え続けてくれた夫、天野剛志(名古屋大学特任助教)に深く感謝します。

ベクター名	元となった プラスミド	タグ	ORF選択の 制限酵素	用途
pGEX-4T3-PRESAT	pGEX-4T3	GST-thrombin cleavage site	Nco I or Nde I	大腸菌・ドメイン発現用
pGEX-3X-PRESAT	pGEX-3X	GST-FactorXa cleavage site	Nco I or Nde I	大腸菌・ドメイン発現用
pGEX-6P3-PRESAT	pGEX-6P3	GST-PreScission protease cleavage site	Nco I or Nde I	大腸菌・ドメイン発現用
pET-Trx-PRESAT	pET-32a	Trx-His x6-Factor Xa cleavage site	Kpn I	大腸菌・ペプチド発現用
pET-His x6-PRESAT	pET-32a	His x6-Factor Xa cleavage site	Kpn I	大腸菌・ドメイン発現用
pET-FLAG-PRESAT	pET-32a	FLAG tag-Enterokinase cleavage site	Afl II	大腸菌・ドメイン発現用、機能解析
pET-LBT-PRESAT	pET-32a	LBT tag	Kpn I	大腸菌・ドメイン発現用、蛍光標識、MRI
pET-EGFP-PRESAT	pET-32a	EGFP-His x6	Kpn I	大腸菌・ドメイン発現用、蛍光標識
pGEX-LBT-PRESAT- PTD	pGEX-4T3	LBT tag, PTD(Protein Transduction Domain)	Kpn I	大腸菌・ドメイン発現用、外来蛋白質の 動物細胞内導入、蛍光標識、MRI
pcDNA-EGFP- PRESAT	pcDNA	EGFP-His x6	Kpn I	動物細胞・細胞内局在解析
pBSII-PRESAT	pBSII			PCR産物のクローニング

【本論文に関わる発表論文】

第2章

The PRESAT-vector: asymmetric T-vector for high-throughput screening of soluble protein domains for structural proteomics.

Goda N, Tenno T, Takasu H, Hiroaki H, Shirakawa M.

Protein Sci. 2004, 13(3):652-8.

第3章

LBT/PTD dual tagged vector for purification, cellular protein delivery and visualization in living cells.

Goda N, Tenno T, Inomata K, Iwaya N, Sasaki Y, Shirakawa M, Hiroaki H.

Biochim Biophys Acta. 2007, 1773(2):141-6.

Intracellular protein delivery activity of peptides derived from insulin-like growth factor binding proteins 3 and 5.

Goda N, Tenno T, Inomata K, Shirakawa M, Tanaka T, Hiroaki H.

Exp Cell Res. 2008, 314(13):2352-61

第4章

Structural difference of vasoactive intestinal peptide in two distinct membrane-mimicking environments.

Umetsu Y, Tenno T, Goda N, Shirakawa M, Ikegami T, Hiroaki H.

Biochim Biophys Acta. 2011, 1814(5):724-30.

Structure and function of the N-terminal nucleolin binding domain of nuclear valosin-containing protein-like 2 (NVL2) harboring a nucleolar localization signal.

Fujiwara Y, Fujiwara K, Goda N, Iwaya N, Tenno T, Shirakawa M, Hiroaki H.

J Biol Chem. 2011, 286(24):21732-41.

¹H, ¹³C, and ¹⁵N resonance assignment of the first PDZ domain of mouse ZO-1.

Umetsu Y, Goda N, Taniguchi R, Satomura K, Ikegami T, Furuse M, Hiroaki H.

Biomol NMR Assign. 2011, 5(2):207-10.

【参考論文】

High-throughput construction method for expression vector of peptides for NMR study suited for isotopic labeling.

Tenno T, Goda N, Tateishi Y, Tochio H, Mishima M, Hayashi H, Shirakawa M, Hiroaki H. *Protein Eng Des Sel*. 2004, 17(4):305-14.

Structure of the N-terminal domain of PEX1 AAA-ATPase. Characterization of a putative adaptor-binding domain.

Shiozawa K, Maita N, Tomii K, Seto A, Goda N, Akiyama Y, Shimizu T, Shirakawa M, Hiroaki H. *J Biol Chem*. 2004, 279(48):50060-8.

Crystallographic characterization of the N-terminal domain of PEX1.

Shiozawa K, Maita N, Tomii K, Seto A, Goda N, Akiyama Y, Shimizu T, Shirakawa M, Hiroaki H. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 2004, 60(Pt 11):2098-9.

Structure of the UBA domain of Dsk2p in complex with ubiquitin molecular determinants for ubiquitin recognition.

Ohno A, Jee J, Fujiwara K, Tenno T, Goda N, Tochio H, Kobayashi H, Hiroaki H, Shirakawa M. *Structure*. 2005, 13(4):521-32.

Structural characterization of the MIT domain from human Vps4b.

Takasu H, Jee JG, Ohno A, Goda N, Fujiwara K, Tochio H, Shirakawa M, Hiroaki H. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005, 334(2):460-5.

The common phospholipid-binding activity of the N-terminal domains of PEX1 and VCP/p97.

Shiozawa K, Goda N, Shimizu T, Mizuguchi K, Kondo N, Shiozawa N, Shirakawa M, Hiroaki H. *FEBS J*. 2006, 273(21):4959-71.

Fine-tuning of protein domain boundary by minimizing potential coiled coil regions.

Iwaya N, Goda N, Unzai S, Fujiwara K, Tanaka T, Tomii K, Tochio H, Shirakawa M, Hiroaki H. *J Biomol NMR*. 2007, 37(1):53-63.

A common substrate recognition mode conserved between katanin p60 and VPS4 governs microtubule severing and membrane skeleton reorganization.

Iwaya N, Kuwahara Y, Fujiwara Y, Goda N, Tenno T, Akiyama K, Mase S, Tochio H, Ikegami T, Shirakawa M, Hiroaki H. *J Biol Chem*. 2010, 285(22):16822-9.

^1H , ^{13}C , and ^{15}N resonance assignment of the SPFH domain of human stomatin.

Tsuruta T, Goda N, Umetsu Y, Iwaya N, Kuwahara Y, Hiroaki H.

Biomol NMR Assign. 2012, 6(1):23-25

(日本語総説)

蛋白質ドメイン研究のための迅速なベクター構築法 (新実験講座)

天野 剛志・合田 名都子・廣明 秀一

蛋白質核酸酵素 2004, 49(12), 2587-2594.

(日本語総説)

クローズアップ実験法・高効率かつ高速な融合蛋白質発現ベクターの構築法

天野剛志・合田名都子・廣明 秀一

実験医学 2006, 24(11), 1675-1680

【特許】

発明の名称： 新規ベクター及びその利用

登録日： 平成 22 年 4 月 9 日

発行日： 平成 22 年 6 月 23 日

特許番号： 特許第 4 4 8 7 0 3 6 号 (P 4 4 8 7 0 3 6)

発明者： 廣明秀一・天野剛志・合田名都子

【特許】

発明の名称： 新規ベクター及びその利用

欧州特許番号： No.EP1669445 (独、仏で成立、ドイツ特許番号 60 2004 17 488.2-08)

成立日： 平成 20 年 10 月 29 日

発明者： 廣明秀一・合田名都子・天野剛志