

実施課題名 19F標識NMR法によるKeap1構造変化の解析のための技術開発

【背景】

ストレスセンサーKeap1は転写因子Nrf2のユビキチン化反応を制御し酸化ストレス防御機構の中心的役割を担う鍵因子である。Nrf2は酸化ストレス・異物代謝に関わる遺伝子群を統一的に制御し生体防御に働くため、様々な疾患の予防・治療への応用を目指して多くのNrf2誘導剤の開発が進んでいる。Nrf2活性化に重要なKeap1分子のセンサーシステイン残基は同定されているものの、その構造解析は蛋白質結晶化が困難なため滞っている。Keap1分子の働きが高次構造レベルで明らかになれば、創薬研究に非常に有益な情報を与える。そこで、本申請課題では、NMRを用いた構造機能解析により基質結合に伴うKeap1の構造変化を解析し、ストレス感知の分子機構を明らかにすることを目的とする。

【実施内容】

理化学研究所の無細胞蛋白質合成系を用いてKeap1タンパク質の各領域の発現条件を検討し、基質が結合するN末端領域の安定な発現系を作成した。つぎに構築した発現系を用いて、19F標識アミノ酸のKeap1蛋白質への導入・測定条件を検討した。その結果トリフルオロメチルフェニルアラニンによるKeap1タンパク質の選択標識に成功した。発現領域内に存在する各フェニルアラニンを選択標識した際の発現量を確認し、最も効率が良いF174を選択的に標識することにした。この位置の近傍には、センサーとなるシステイン残基が存在する。基質結合に伴う構造変化を観測するため、Keap1のF174選択19F標識体を大量合成し、十分な量の標識試料を得ることができた。得られた試料を用いて19F-NMR測定を行った結果19Fのシグナルの観測に成功し、かつ選択的に標識されていることが確認できた。さらに各種の基質化合物の添加に伴う19Fスペクトルの変化を観測したところシグナルの変化の観測に成功した。また各化合物によってシグナルの変化に違いがあり、化合物毎に異なる結合様式を持つことが判明した。以上の結果はストレス感知に伴うKeap1の機能メカニズムの解明にとって非常に重要な成果である。

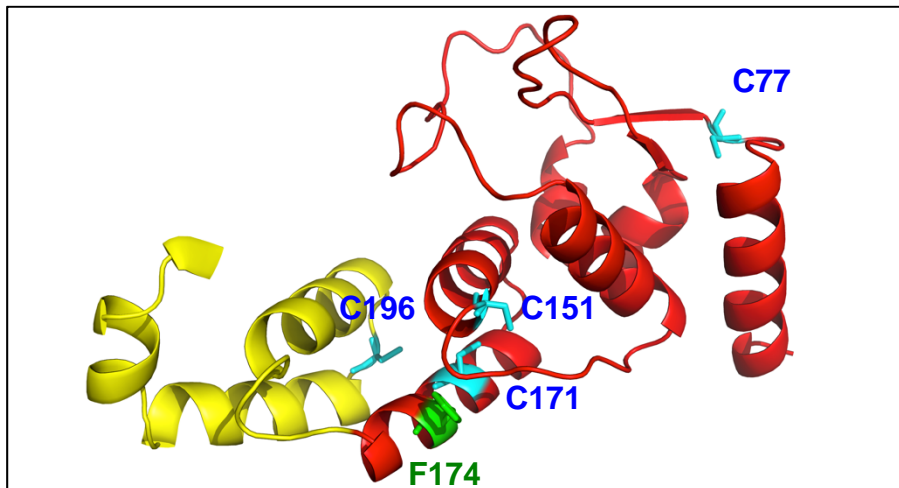


Fig.1 ヒトKeap1の発現領域のモデル構造

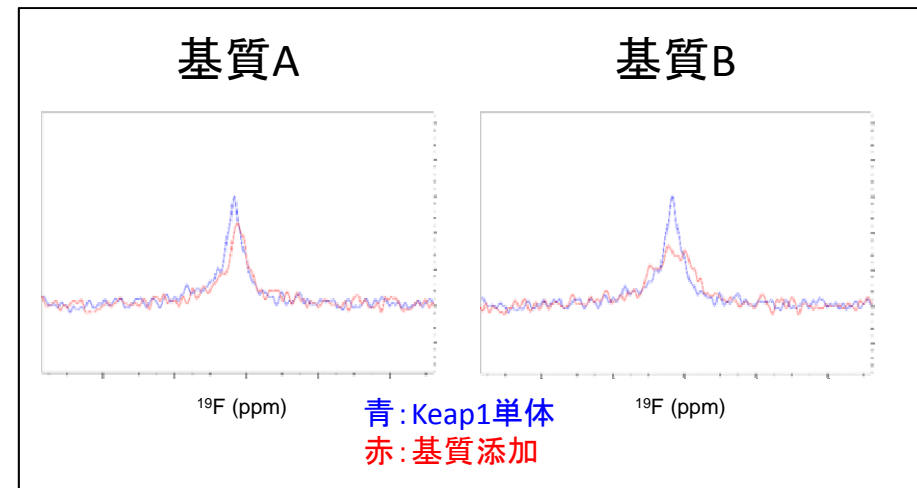


Fig.2 Keap1タンパク質の1次元19Fスペクトル。基質結合に伴いトリフルオロメチル基の19Fシグナルが変化する

NMR 共用プラットフォーム 特定課題利用
利用報告書

申請番号	PF028	課題受付番号	PF15-100-011
実施機関名	東北大学大学院		
実施部署名	医学系研究科		
実施責任者管理職名・氏名	職名	助教	氏名 鈴木 隆史
実施部署所在地	宮城県仙台市青葉区星陵町2-1		
利用課題名	19F 標識 NMR 法による Keap1 構造変化の解析のための技術開発		
本課題の概要・目的	<p>ストレスセンサーKeap1 は転写因子 Nrf2 のユビキチン化反応を制御し酸化ストレス防御機構の中心的役割を担う鍵因子である。Nrf2 は酸化ストレス・異物代謝に関わる遺伝子群を統一的に制御し生体防御に働くため、様々な疾患の予防・治療への応用を目指して多くの Nrf2 誘導剤の開発が進んでいる。Nrf2 活性化に重要な Keap1 分子のセンサーシステイン残基は同定されているものの、その構造解析は蛋白質結晶化が困難なため滞っている。Keap1 分子の構造が明らかになれば、創薬研究に非常に有益な情報を与える。そこで、本申請課題では、NMR を用いた構造解析により Keap1 の構造解析を行い、ストレス感知の分子機構を明らかにすることを目的とする。特に、高分子の蛋白質の構造機能解析のための新しい技術の開発のため、各種標識技術、特に各種 19F 標識アミノ酸を Keap1 に導入し最適な標識条件を検討する。そして Keap1/Nrf2 複合体のような高分子量タンパク質の動的変化や天然変性領域の構造変化を確立した技術を用いて解析することを目指す。</p>		
利用実施時期、及び期間	<p>平成27年12月 1日～平成28年 3月31日</p> <p>総利用日数：30日</p> <p>当初計画どおり・当初計画変更 (変更理由)</p>		
利用施設 理化学研究所	NMR装置 (該当部分に ○)	<p>利用装置①</p> <p>・(○)溶液 600MHz、()溶液 700MHz、()溶液 800MHz、()溶液 900MHz ()固体 700MHz、()固体 900MHz</p> <p>利用期間1：平成28年 3月30日～平成28年 3月31日 利用期間2：平成 年 月 日～平成 年 月 日 利用期間3：平成 年 月 日～平成 年 月 日</p>	
	立体構造解析 パイプライン	<p>・発現確認 : 利用回数 2回</p> <hr style="border-top: 1px dashed black;"/> <p>・フォールド判定 : 利用回数 0回</p> <hr style="border-top: 1px dashed black;"/> <p>・大量調製 : 利用回数 2回</p> <hr style="border-top: 1px dashed black;"/> <p>・構造決定 : 利用回数 回</p>	

その他の 利用施設		なし
成果の 概要	実施内容	<p>本研究課題では、NMR を用いた解析によって Keap1 がどのようにストレスを感知するのか高次構造変化の観点から明らかにすることを目的とする。まず基質結合に伴う Keap1 蛋白質の構造変化の解析を行うために、理化学研究所の無細胞蛋白質合成系を用いて発現条件を検討し、基質が結合する N 末端領域の BTB-3box ドメインが解析に適していることを確認した。つぎに構築した発現系を用いて、19F 標識アミノ酸の Keap1 蛋白質への導入・測定条件を検討した。その結果トリフルオロメチルフェニルアラニンによる Keap1 タンパク質の選択標識に成功した。発現領域内に存在する各フェニルアラニンを選択標識した際の発現量を確認した結果、F174 の位置に選択標識した試料が最も効率が良いことが確認できた。Keap1 の基質はシステイン残基に結合することが報告されているが、この位置の近傍には、システイン残基 C151 と C171 が存在する。基質結合に伴う構造変化を観測するため、Keap1 の F174 選択 19F 標識体と、C151 をセリンに置換した F174 選択 19F 標識体の 2 種類を大量合成おこない、十分な量の標識試料をそれぞれ得ることができた。得られた試料を用いて 19F-NMR 測定を行った結果 19F のシグナルの観測に成功し、かつ選択的に標識されていることが確認できた。さらに各種の基質化合物の添加に伴う 19F スペクトルの変化を観測したところシグナルの変化の観測に成功した。また各化合物によってシグナルの変化に違いがあり、化合物毎に異なる結合様式を持つことが判明した。</p>
	本課題により得られた成果と当初目標との比較	<p>従来の研究では、ストレス感知によって Keap1 の構造変化が起こることが示唆されているが、どのような構造変化が起こるのかよくわかっていなかった。このため本研究では NMR を用いた解析によって Keap1 がどのようにストレスを感知するのか高次構造変化の観点から明らかにすることを最終的な目標としている。今回の課題では、理化学研究所の無細胞タンパク質合成系を用いて Keap1 タンパク質の部位特異的 19F 標識技術の開発し、標識部位を 19F-NMR 法により高感度に測定することに成功した。これにより、各種基質の Keap1 への結合を位置選択的に高感度に観測することが初めて可能となった。さらに、この系を用いて基質が Keap1 に結合する様式を複数の基質に関して 19F-NMR 法により観測した結果、Keap1 が基質結合により構造変化すること、また基質の種類により結合する部位や構造変化が異なることが示唆された。本研究成果はストレスに伴う Keap1 の構造変化を観測した重要な成果であり、本研究の目標に大きく前進した。</p>
	成果発表	特に無し。
	今後の展開	<p>本研究で得られ技術を用いて Keap1 に結合する他の基質についても同様に結合部位を解析する。また 19F 標識の位置を変えることにより、他の部位に結合する基質についても解析をおこなう。また他のアミノ酸の 19F 標識技術などを組み合わせることで、Keap1 による基質認識の全容を構造レベルで明らかにする。本研究成果は Keap1 のみならず、他のタンパク質と基質の相互作用の解析にも非常に有効と考えられる。</p>

<p>社会・経済への波及効果の見 通し</p>	<p>Keap1 の基質認識機構の解明は、生体におけるストレス応答の研究に非常に重要であり、創薬など他分野への応用が期待できる。例えば、2017年3月より欧米に加えて日本でも多発性硬化症治療薬として認可された Tecfidera(ジメチルフマル酸)は Keap1 の C151 によって認識されることがわかっているが、その特異性や親和性などの改善が求められている。本研究の成果はより良い Nrf2 誘導剤の開発において有益な情報を与えるものであり、Keap1 センサーシステムの役割を解明することは大きな波及効果がある。</p>
<p>利用における感想 (改善要望等を含む) 利用周辺環境に関する希望</p>	<p>Keap1 蛋白質の 19F 標識タンパク質を合成できたことは、Keap1 の構造機能解析を進める上で、非常に役に立ったと考えております。</p>
<p>今後の NMR 共用プラットフォームに対する期待</p>	<p>このようなハードルの高い技術開発の課題を引き続き募集していただけると助かります。</p>
<p>成果公開延期の希望の有無</p>	<p>(○) あり : () なし 「あり」の場合理由：特許取得および論文執筆のために現在追加の実験を行っている。出願公開に合わせて公表予定。 <u>⇒公開延期期間済み</u></p>
<p>その他</p>	