

熱力解析、分光解析、小角 X 線散乱解析を活用したヒト Y-box binding protein YB-1 の機能・構造解析

Functional and structural analysis of human Y-box binding protein YB-1 using calorimetric, spectroscopic and small angle X-ray scattering

長門石 暁¹, 田邊裕美子², 郷田秀一郎³, 津本 浩平^{1,*}

¹ 東京大学大学院工学系研究科, 〒108-8639 東京都港区白金台 4-6-1

² 東京大学大学院新領域創成科学研究科, 〒108-8639 東京都港区白金台 4-6-1

³ 長崎大学大学院工学研究科, 〒852-8521 長崎市文教町 1-14

Satoru Nagatoishi¹, Yumiko Tanabe², Shuichiro Goda³ and Kouhei Tsumoto^{1,*}

¹ School of Engineering, The University of Tokyo, 4-6-1 Shirokanedai, Minato-ku, Tokyo 108-8639, Japan

² Graduate School of Frontier Sciences, The University of Tokyo, 4-6-1 Shirokanedai, Minato-ku, Tokyo 108-8639, Japan

³ Graduate School of Engineering, Nagasaki University, 1-14 Bunkyo-machi, Nagasaki, 852-8521, Japan

1 はじめに

近年、明確な二次構造をもたない多くの天然変性タンパク質 (IDP) の相互作用システムが、重要な細胞プロセスに関与していることが明らかになりつつある。特に核酸結合型 IDP は、構造をもたない一本鎖 DNA や RNA と相互作用し機能を果たしている。しかし核酸結合型 IDP の結合特異性を創出している相互作用機構は未知である。従って細胞内における生体分子間の相互作用による秩序化の本質を捉えるためには、新しい分子認識の概念が必要不可欠である。

細胞システムにおいて、環境変化は重要な因子である。進化の過程で、生命システムはその生育環境 (温度、pH、塩濃度) に適応してきた。また細胞分裂や細胞病変においても、細胞内の分子局在化による電荷分布や水和状態などがダイナミックに変化している。これらの環境変化は、分子の結合特異性に大きく関与しており、また細胞システムに依存して分子の相互作用要素や溶媒和状態もダイナミックに変化していると考えられる。したがって IDP の核酸に対する分子認識は、周辺環境に依存して多様な相互作用を創出すると考えられる。我々はヒト由来の Y-box 結合タンパク質 (YB-1) をモデルタンパク質として選択し、その解明を試みた。

YB-1 は核内で Y-box と呼ばれるゲノム配列 DNA と特異的に結合し、転写を制御している転写因子の 1 つと知られている。さらに、細胞質内において mRNA と結合し、翻訳制御にも関与している。YB-1 はその核酸結合部位が構造を形成しないアミノ酸配列になっていることが既に知られているが、ある塩基配列を特異的に認識するメカニズムは不明である。また mRNA と複合体を形成し高次な組織構造体を形成し、ダイナミックな構造体変化によ

て翻訳制御を行なっていることも示唆されている (図 1)。さらに近年では、細胞発生や細胞がん化において YB-1 の発現が深く関与していることも明らかになりつつある。このように YB-1 は細胞システムの制御因子として、また創薬開発のターゲット分子として注目すべき核酸結合型 IDP の一つである。本研究では、熱力解析、分光解析、小角 X 線散乱 (SAXS) 解析を活用して、YB-1 の核酸結合様式の解明を試みた。

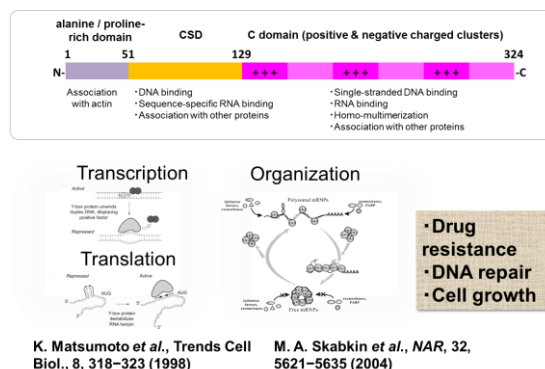


図 1 : YB-1 の概要

2 実験

YB-1 の構造は三つの領域から成っており、N 末端と C 末端が disorder な領域である。N 末端には、アラニンとプロリンが豊富なアラニンプロリンリッチドメイン (A/P)、C 末端には塩基性と酸性のアミノ酸残基クラスターが交互に並んだ C-term 領域、そして間には唯一 β -バレルと呼ばれる立体構造をとる cold shock domain (CSD) が存在する。CSD は他の生物種において DNA 結合ドメインとして知られている。C-term は Gly219-Glu220 間で 20S プロテアソームによって切断され、核移行することが報告されている。本研究では、YB-1 の欠損体と共に、熱力

学的及び分光学的手法を用いて、YB-1 の核酸結合メカニズムを物理化学的に解析することを目的とした。

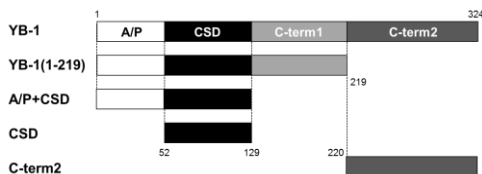


図 2 : YB-1 欠損体コンストラクト

YB-1 の核酸結合部位を同定するために YB-1 の欠損体を作製し、四種の欠損体(A/P+CSD, CSD, YB-1(1-219), C-term2) と YB-1 全長で核酸との結合を調べた(図 2)。核酸結合は、熱力学的パラメータを導出でき、かつ YB-1 の相互作用に強い影響を与える溶媒条件を考慮できる等温滴定型熱量計 (ITC) を用いて行った。同時に、円偏光二色性スペクトル (CD スペクトル) を用いた二次構造解析を行った。さらに SAXS 測定より、YB-1 のフォールディングに関する環境応答性について議論した。

3 結果および考察

3-1 DNA, RNA との熱力学的結合解析

熱量解析の結果より、YB-1 は C-term1 を DNA 結合部位として機能させていることが示された。その駆動力は、核酸の塩基とアミノ酸残基の疎水的な相互作用であることが示唆された。一方、YB-1 の CSD 領域は RNA と水素結合を主とした特異的な相互作用をする部位であることが分った。

一般的に、塩濃度を下げると塩イオンによる静電遮蔽効果が弱まり、静電的な相互作用が強まる。よって塩濃度を下げると結合が強まった YB-1(1-219) と RNA、CSD と DNA/RNA との相互作用は、静電的な特徴を示すことが明らかとなった。一方、YB-1(1-219) と DNA との相互作用は塩濃度を下げると弱まったことから、非静電的な特徴を持つことが示唆された。

3-2 CD 測定による YB-1 の構造変化解析

ITC 測定のエントルピー変化の温度依存性から求められる ΔC_p において、YB-1(1-219) と CSD では極めて大きな値を示し、タンパク質の構造変化の可能性が示された。そこで CD スペクトルを用いて、核酸を添加した時のタンパク質の二次構造変化を調べた。

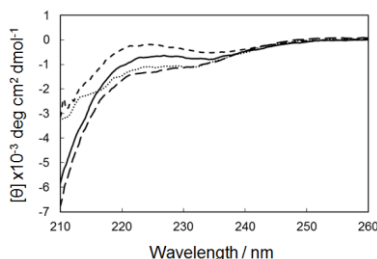


図 3 : YB-1 の CD スペクトル

(実線 : YB-1 のみ、短い点線 : YB-1(1-219) のみ、点線 : CSD のみ、長い点線 : C-term2 のみ)

その結果、YB-1, YB-1(1-219), CSD, A/P+CSD には明瞭な二次構造は観察されなかった。さらに ssDNA

や ssRNA を添加しても CD スペクトルに有意な差は観察されず、YB-1 は核酸との結合による二次構造の変化も起こらなかった(図 3)。このことから、YB-1 は二次構造以外に構造が変化している可能性が示唆された。

3-3 SAXS 解析による YB-1 の構造特性

YB-1 の構造変化に関する知見を得るために、溶媒環境変化における YB-1 の分子サイズ解析を SAXS 測定により実施し、クラツキープロットを行った(図 4、すべての YB-1 濃度は 30-50 μM)。HEPES バッファー、pH 7.5 の条件においては、明確なピークが観察されずアンフォールド状態であることが示唆された(図 4 A)。一方で MES バッファー、pH 6.0 ではフォールドした状態が観察された(図 4 B)。また同じ HEPES バッファー条件でも、L-アルギニン存在下においてはフォールド状態が観察された(図 4 C)。しかしながら、クラツキープロットには大きな違いが見られ、L-アルギニン存在下の HEPES バッファーではピークがより高角側にシフトしていることから分子のサイズが小さくなっており、YB-1 は溶媒環境に依存してフォールドの安定性が変化することが示唆された。

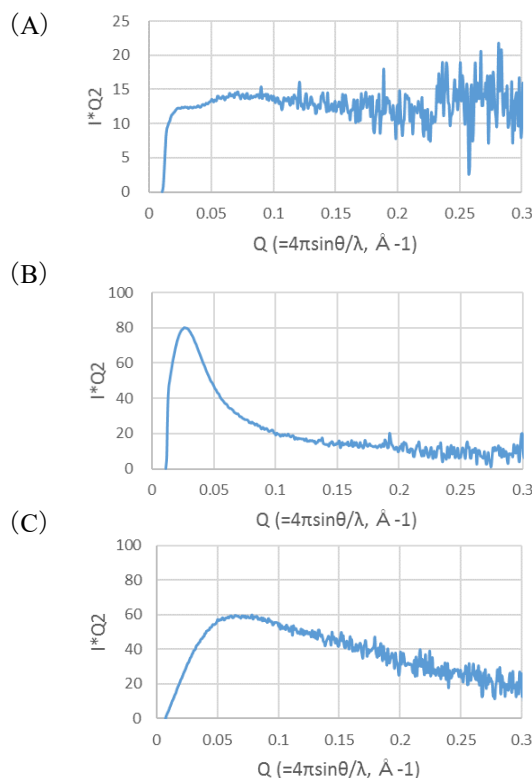


図 4 : YB-1 の SAXS 測定

4 まとめ

本研究における熱量解析の結果より、YB-1 は C-term1 を DNA 結合部位として機能させていることが示された。その駆動力は、核酸の塩基とアミノ酸残基の疎水的な相互作用であることが示唆された。一

方、YB-1 の CSD 領域は RNA と水素結合を主とした特異的な相互作用をする部位であることが分った。これらの結論は、YB-1 を欠損体から評価できたこと、さらに分子環境変化に基づく物理化学的解析によって明らかになったこと、などがポイントとして挙げられる。さらに CD スペクトル測定の結果より、YB-1 は明確な二次構造は形成しないものの、核酸結合にともない二次構造変化は観察されなかったが立体構造変化を引き起こすことが示唆された。また SAXS 測定により、YB-1 には溶媒環境に依存してフォールディングが起こる性質があることも示唆された。このように、本研究課題に掲げた分子環境と分子認識との深い関連性を示唆する研究成果が得られたと考える。

謝辞

SAXS 測定のビームタイムをいただき深く感謝申し上げます。また、測定の際には PF スタッフの方々に大変お世話になりました。心より御礼申し上げます。

成果

1. Y. Tanabe, S. Nagatoishi, K. Tsumoto
Thermodynamic characterization of the interaction between human Y-box binding protein YB-1 and nucleic acids
Mol. Biosyst., 11, 2441-2448. (2015)
DOI: 10.1039/C5MB00184F
2. Satoru Nagatoishi, Yumiko Tanabe, Kouhei Tsumoto
Physicochemical studies of YB-1 functions and structures
Biophysical Society 58th Annual Meeting, Moscone Center (San Francisco, CA), Feb. 18, 2014
3. 長門石 暁・田邊 裕美子・西方 敬人・杉本 直己・津本 浩平
天然変性型蛋白質の機能制御へ向けた核酸結合蛋白質 YB-1 の物理化学的解析
第7回バイオ関連化学シンポジウム
名古屋大学東山キャンパス(愛知県名古屋市), 2013, 9/28
4. 田邊裕美子・長門石 暁、西方敬人、杉本直己、津本 浩平
癌関連蛋白質 Y-box binding protein 1 の物理化学的手法を用いた機能解析
第13回 日本蛋白質科学会年会
とりぎん文化会館(鳥取市), 2013, 6/12
5. 田邊裕美子・長門石 暁・西方敬人・杉本直己・津本浩平
Y-box binding protein 1(YB-1)の物性と DNA 結合メカニズムの解析
日本化学会第93春季年会
立命館大学びわこ・くさつキャンパス(草津市)2013, 3/22