

研究の背景

ヒトのタンパク質である SHARP (SMRT/HDAC1-associated repressor protein) は、エストロゲン (ステロイドホルモン) による刺激にตอบสนองして発現し、また発生段階においては DNA 結合性タンパク質 RBP-J κ と結合することで遺伝子発現を抑制している転写抑制補助因子です。いずれの場合も、SHARP がヒストン脱アセチル化酵素 HDAC (histone deacetylase) 複合体とさらに結合し、HDAC 複合体がリクルートされることでヒストンが脱アセチル化されて、遺伝子の発現が抑制されます。SHARP は N 末端領域に RNA 結合ドメイン、C 末端に SPOC (Spen paralog and ortholog C-terminal domain of retinoid and thyroid receptors) ドメインを持ちます。現在までに、その SPOC ドメインによって直接 HDAC 複合体の一部である SMRT (silencing mediator of retinoid and thyroid receptors) と結合することが知られていましたが、その結合の分子レベルでの詳細や、転写抑制の制御メカニズムは明らかになっていませんでした。

研究の内容

私たちは、SHARP の SPOC ドメインと SMRT との結合を解析するにあたって、SMRT のアミノ酸配列から、カゼインキナーゼ 2 (CK2) によるリン酸化に着目しました。この SMRT のリン酸化の有無が SPOC ドメインとの結合に及ぼす影響を定量的に調べるために、表面プラズモン共鳴 (SPR) 法^(注 3)を用いた解析を行いました。

その結果、CK2 によるリン酸化によって SPOC ドメインと SMRT の結合が 100 倍強くなることが分かりました。一方で、カゼインキナーゼ 1 (CK1) によってリン酸化される可能性ある 2524 番目のセリンをリン酸化してみても結合に大きな影響を与えませんでした (図 1)。また哺乳類細胞によるレポーター遺伝子を用いた解析からも同様の結果が得られたことから、細胞内で CK2 によるリン酸化が SMRT と SPOC ドメインの結合をスイッチングする、分子スイッチとしての役割を果たすことが示されました。

次に、このリン酸化による結合力の増強、すなわちリン酸化が分子スイッチであることを、分子レベルでの立体構造解析に基づいて理解することを目的に、核磁気共鳴 (NMR) 法を用いて複合体の立体構造決定を行いました。その結果、CK2 によってリン酸化される SMRT の 2522 番目のセリンのリン酸基は SPOC ドメインの 3516 番目のリジンの側鎖や 3552 番目のアルギニンの側鎖と水素結合や静電氣的な相互作用によって結合していました (図 2)。これが、リン酸化が分子スイッチとして働く分子レベルでのメカニズムといえます。

またその他、SMRT のチロシン残基やロイシン残基が SPOC ドメインと疎水的相互作用を形成し、グルタミン酸残基は SPOC ドメインと静電氣的相互作用を形成していました。細胞内でのタンパク質・タンパク質間相互作用の組み合わせや、CK2 によってリン酸化されるタンパク質の種類は非常に多数で

すが、SPOC ドメインと SMRT 間の特異的な（選択的）結合はこれらの相互作用によって説明できました。

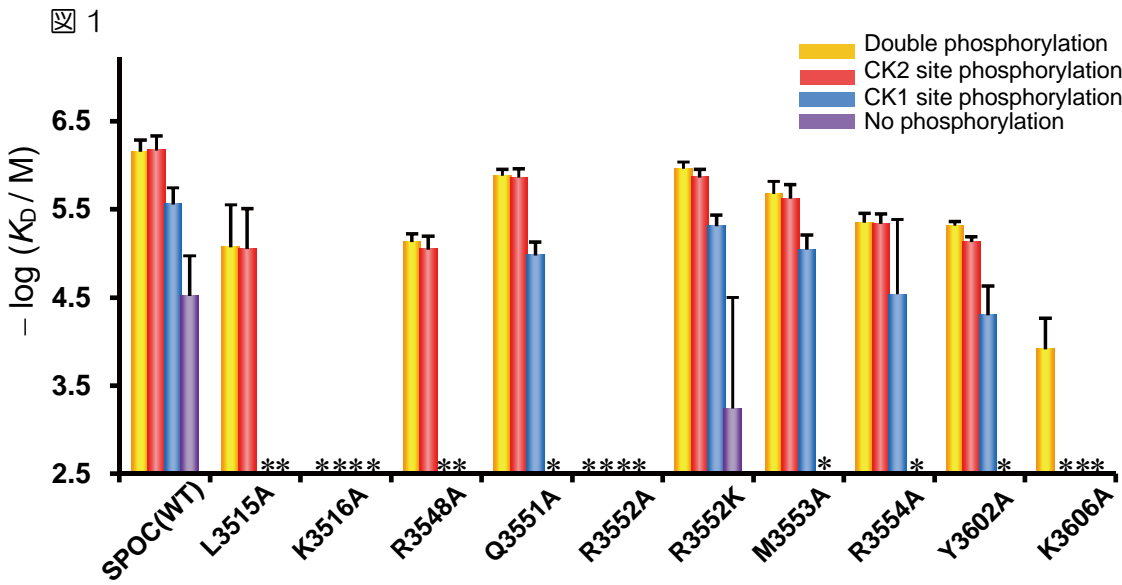


図1 SPOC ドメインと SMRT との結合に関する SPR 測定

化学合成した SMRT と SPOC ドメインとの親和性を解析した（CK2 と CK1 のサイト両方をリン酸化：黄、CK2 サイトのみをリン酸化：赤、CK1 のサイトのみをリン酸化：青、リン酸化なし：紫）。

図2

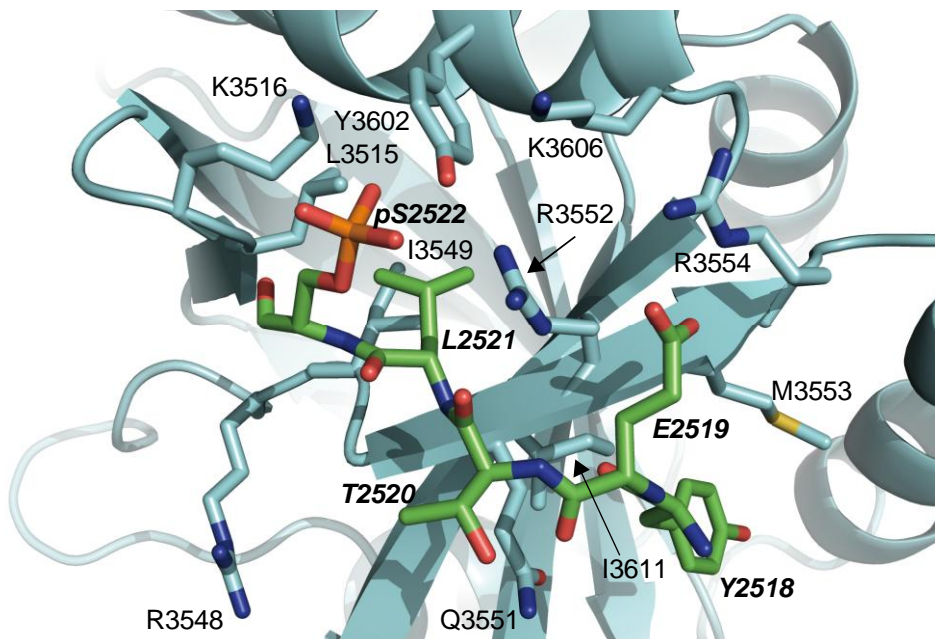


図2 SPOC ドメインと SMRT 複合体の分子構造

SMRT を緑のスティック表示で、SPOC ドメインをシアンで示す。

研究の社会的意義

CK2は細胞内に普遍的に存在し、その活性は常にONの状態にあるとされています。今までの研究からCK2による種々のタンパク質のリン酸化が、細胞内での様々な場面でその制御に寄与していることは報告されてきました。しかしCK2によるリン酸化が、生体内での分子スイッチとして働くということは、ほとんど注目されていませんでした。

今回の研究は、CK2によるリン酸化が分子スイッチとして働いて遺伝子発現が制御されることを分子構造レベルで明らかに示した世界で初めてのものです。CK2による細胞の制御機構、細胞内信号伝達ネットワークの理解のための大切な基礎資料となります。CK2の活性は常にONでも、その活性の細かな変動は、細胞に大きな影響を与えているかもしれません。またこのような研究は、将来、薬剤の合理的な開発に貢献するものと期待されます。

研究成果論文 [英文] について

○論文名

“Structural insights into the recruitment of SMRT by the co-repressor SHARP under phosphorylative regulation”
Structure, (2013)

○著者名

Suzuka Mikami, Teppei Kanaba, Naoki Takizawa, Ayaho Kobayashi, Ryoko Maesaki, Toshinobu Fujiwara, Yutaka Ito¹, and Masaki Mishima*
三神すすか 金場哲平 滝沢直己 小林彩保 前崎綾子 藤原俊伸 伊藤隆 三島正規

研究費について

この研究は、以下の支援を受けました。

- ・文部科学省科学研究費新学術領域研究「細胞シグナリング複合体によるシグナル検知・伝達・応答の構造的基礎」（領域代表者 奈良先端科学技術大学院大学 箱嶋敏雄 教授）
- ・文部科学省科学研究費新学術領域研究「過渡的複合体が関わる生命現象の統合的理解—生理的準安定状態を捉える新技術—」（領域代表者 東京大学 嶋田一夫 教授）
- ・文部科学省科学研究費新学術領域研究「翻訳後修飾によるシグナル伝達制御の分子基盤と疾患発症におけるその破綻」（領域代表者 東京大学 井上純一郎 教授）
- ・日本学術振興会 科学研究費補助金 若手B 「機能性 RNA、ステロイドホルモン RNA アクティベーターを抑制する因子の構造解析」

用語解説

注1) 転写

遺伝子情報（DNA の塩基配列）を元に、相補的な mRNA が合成されることをいう。

遺伝子が機能する（遺伝子発現）のための過程の一つ。

注2) 核磁気共鳴(NMR)法

超伝導磁石などから得られる強力な磁場中で解析したい分子にラジオ波を照射して分子の構造や運動状態などの性質を調べる方法

注3) 表面プラズモン共鳴(SPR)法

金属薄膜に偏光を入射したとき、ある特定の角度でその反射光強度が減少することを利用した分光法。金属薄膜にタンパク質やリガンドを固定化しておき、結合相手が結合したときにおこる薄膜のひずみ等によって生じる反射光強度の変化によって、分子間相互作用を解析する。