

学位論文題名

Crystallization and preliminary crystallographic analysis of the Tob-hCaf1 complex

(Tob-hCaf1タンパク質複合体の結晶化及び立体構造解析)

学位論文内容の要旨

【introduction】

The Tob/BTG family is a group of antiproliferative proteins. This family consists of Tob, Tob2, BTG1, BTG2/Tis21/PC3, PC3B and ANA/BTG3 in mammalian cells. These proteins have been reported to inhibit cell proliferation when expressed exogenously in a variety of cultured cells, such as T lymphocytes, osteoblasts, fibroblasts, epithelial cells, neuronal cells, and germ cells. The antiproliferative activities of the Tob/BTG family proteins are due to their association with target proteins in cells. Much evidence has been accumulated that CCR4-associated factor 1 (Caf1), also known as Cnot7, is a common binding partner for Tob/BTG family proteins. Caf1 is a component of the CCR4-NOT deadenylase complex, and involved in deadenylation of the poly(A) tail of mRNA which is the first major step in mRNA degradation in eukaryotes. Tob interacts with Caf1 and enhances mRNA degradation through recruiting the CCR4-NOT complex to stimulate deadenylation.

The recognition between Tob and Caf1 is critical for deadenylation and antiproliferative activities. We describe the expression, purification, crystallization and preliminary crystallographic analysis of Tob-hCaf1 complex.

【Expression and purification】

In order to elucidate the antiproliferative activity of Tob, the antiproliferative region of human Tob comprising the amino-terminal 138 residues (which we refer to as TobN138) and intact hCaf1 were co-expressed in *E. coli*. The genes of TobN138 (with a 6His-tag) and hCaf1 were subcloned into the plasmids separately, and these plasmids were co-transformed in *E. coli*. Cells were cultured at 30 °C, and then induced with 1 mM isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside for 18h. After cell lysis, the protein was applied to Ni-NTA agarose resin and eluted with a gradient of 0 to 250 mM imidazole. The 6HisTobN138-Caf1 complex was separated from 6HisTobN138 monomer using a Superdex 75pg 26/60 gel filtration column. The heterodimer fraction was loaded onto a Mono Q HR10/10 anion exchange column and eluted using a 160-ml linear gradient of 0 to 1 M NaCl.

Fractions containing the heterodimer were dialyzed and then stored at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ prior to crystallization. Protein sequences determined by a PPSQ-21 protein sequencer indicated that N-terminal methionine was removed from both proteins. The molecular masses were confirmed using a Voyager DE-PRO MALDI-TOF mass spectrometer. The purified protein complex was concentrated to 20 mg/ml, and used for crystallization.

【Crystallization】

Initial crystallization conditions of native and SeMet-labelled protein complexes were obtained by sparse matrix screening (Hampton). In the sitting drop vapor diffusion method, 6HisTobN138-hCaf1 complex was incubated at $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ and small crystals ($< 0.02\text{ mm}$) were obtained after 24 h. To prepare the seed-stock, $1\text{ }\mu\text{L}$ of drop containing small crystals was diluted and vortexed with a Teflon ball (Hampton) in a micro tube. $1\text{ }\mu\text{L}$ of the serial dilutions (10^{-1} to 10^{-8} fold) of seed-stock were mixed with $1\text{ }\mu\text{L}$ of 20 mg/ml protein solution and were incubated at $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ with 100 μL of reservoir. After 48 h at $20\text{ }^{\circ}\text{C}$, microseeding generated crystals of $0.3 \times 0.3 \times 0.1\text{ mm}$. To prepare heavy-atom derivatives, crystals were soaked at $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ in reservoir solutions without DTT and EDTA and containing either 1 mM neodymium chloride (for 20 h), or 0.1 mM methyl mercuric acetate (for 1 h).

【Preliminary X-ray analysis】

All diffraction data for the 6HisTobN138-hCaf1 complex were collected using synchrotron radiation with a PX210 CCD detector (Oxford) at the Osaka university Beam line BL44XU in Spring-8 at 100 K. Prior to data collection, crystal was cryoprotected by incubation for 5 min in reservoir solution containing 15% PEG4000 and 30% glycerol. After soaking, the crystals were mounted in cryoloops (Hampton) and frozen in liquid nitrogen. Diffraction data were processed using the program MOSFLM, and intensities were scaled using SCALA in the CCP4 program suite and HKL2000. The crystal belonged to the tetragonal space group $I422$ with unit-cell parameters $a = b = 150.9\text{ }\text{\AA}$ and $c = 113.9\text{ }\text{\AA}$. The acceptable range of the volume-to-weight ratio (V_M) value indicates that the crystal contains one heterodimer molecule per asymmetric unit (the V_M value is $3.16\text{ }\text{\AA}^3\text{ Da}^{-1}$). The solvent content of the crystal was estimated to 61%. The phases were determined by multiple isomorphous replacement method using crystals of heavy atom derivatives and SeMet-labelled protein.

【Conclusion】

The antiproliferative region of human Tob (1-138) and intact hCaf1 were co-expressed in *E. coli*, purified and successfully co-crystallized. The crystal belongs to the tetragonal space group $I422$ with unit-cell parameters $a = b = 150.9\text{ }\text{\AA}$ and $c = 113.9\text{ }\text{\AA}$, and is estimated to contain one heterodimer molecule per asymmetric unit. The crystal diffracted to around $2.6\text{ }\text{\AA}$ resolution.

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 安 田 和 則

副 査 教 授 山 本 有 平

副 査 教 授 三 浪 明 男

学 位 論 文 題 名

Crystallization and preliminary crystallographic analysis of the Tob-hCaf1 complex

(Tob-hCaf1タンパク質複合体の結晶化及び立体構造解析)

本研究では、細胞増殖抑制機能を持つタンパク質である Tob と Caf1 の相互認識機構について、タンパク質の立体構造という面より解明することを目的とし、その手順として Tob-Caf1 タンパク質複合体を発現・精製・結晶化しその立体構造を解析した。

Tob は、ANA や BTG1、BTG2、PC3 などと細胞増殖抑制機能を有する Tob/BTG ファミリーを形成するタンパク質であり、骨芽細胞をはじめ様々な細胞に強制発現させるとその増殖が抑制されるとの報告や、各種の癌において tob 遺伝子の発現は低下しているとの報告がある。Tob はその増殖抑制機能を、細胞質内や核内において様々なターゲットタンパク質と相互作用することによって発現するが、そのタンパク質の中で最も報告の多いのが Caf1 である。

Caf1 は、RNA 分解の重要な律速段階であるポリ(A)の短縮化(デアデニレーション)を行う CCR4-NOT 複合体の構成因子である。Tob は、Caf1 と相互作用することにより、CCR4-NOT 複合体を RNA ヘリクルートすることで RNA の分解を促進している。すなわち Tob と Caf1 の相互作用は、RNA を分解するための重要な段階である RNA のデアデニレーション活性を発揮するため重要な役割を持っているといえる。

タンパク質の発現・精製・結晶化は以下のように行った。大腸菌による組換えタンパク質として Tob、Caf1 の 2 つのタンパク質を共発現した後、各種クロマトグラフィーを組み合わせることで精製し、99%以上の純度を持つタンパク質溶液を数 10 mg 取得した。精製の段階においても、Tob-Caf1 の複合体は非常に安定していた。結晶化には蒸気拡散法という方法を用い、数多くの条件検討の後 Tob-Caf1 タンパク質複合体の結晶化に成功した。この結晶に X 線を当ててデータを取得し、得られた空間群・格子定数を元に立体構造の精密化を行った。

Tob において、Tob/BTG ファミリーで高度に保存されている Box A 及び Box B は Caf1 との結合面に並び、Caf1 の Loop15、Loop13、Helix14 を包み込むようにして結合していた。すなわち Tob におけるこれらふたつのドメインは Caf1 を認識するために重要な役割を持つことがわかった。構造的相同性を検索したところ、Tob には相同性のあるタンパク質は見つからず、全く新規の構造を有していた。Caf1 に関してはエクソヌクレアーゼ I が最も高い相同性を示し、静電ポテンシャルマップより予想される活性部位の位置が一致し

ていた。しかしエクソヌクレアーゼ I における一本鎖 DNA の分解部位に相当する部分が Tob-Caf1 複合体にはなく、Tob-Caf1 複合体による RNA の分解にはエクソヌクレアーゼ I とは異なるメカニズム、すなわちさらなる別の活性物質が関与することが示唆された。

本報告により Tob-Caf1 の相互作用形態が明らかになった。Tob は Caf1 の結合と同時に Pabp (poly(A) binding protein) とも結合し複合体を形成することで機能を発揮しているといわれる。今後の展望として、この三者複合体について詳細を詰めることで RNA 分解のメカニズムの一端の解明が期待される。一方で *in vitro*、*in vivo* での機能を詳細に調べることが必要である。これらの結果を元に再生医療、創薬、診断マーカーの探索等の臨床応用につながっていくと考えられる。

審査に当り、山本有平教授から、タンパク質結晶化の再現性はどの程度のものか、立体構造を平面図で解析する際に注意する点や苦労する点はどのようなものか、タンパク質の立体構造解析は以前より整形外科学教室で体系的に行われているのかについて質問があった。安田和則教授からは、Tob の機能はどの程度まで解明されているのか、複合体を構成するタンパク質それぞれは単独では存在しにくいのか、ノックアウトマウスからアプローチする実験系や各タンパク質を動物へ投与する実験系等はどうかについての質問があった。三浪明男教授からは、Tob との結合タンパク質として知られる Smad1 の研究の発展性はどうか、今後どのような臨床応用が考えられるのかについて質問があった。いずれの質問に対しても、今回行った実験結果と過去の文献を引用し、適切に回答した。

この論文は RNA 分解の第 1 段階であるデアデニレーションに関与する Tob-Caf1 タンパク質複合体の相互認識機構を立体構造の面より明らかにしたものである。タンパク質の構造生物学分野において高く評価され、更なる機能解析や臨床応用への発展性が期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。