

研究課題別事後評価結果

1. 研究課題名： タンパク質の動的複合体形成による機能制御の構造的基盤

2. 研究代表者名及び主たる研究参加者名(研究機関名・職名は研究参加期間終了時点)

研究代表者

箱嶋 敏雄 (奈良先端科学技術大学院大学情報科学研究科 教授)

3. 研究内容及び成果:

細胞内シグナル伝達ネットワークには情報の分岐点がある。そこでは、複数の分子と相互作用できる鍵タンパク質が、「動的」複合体を形成して、個々の分子の機能を正や負に制御する。これによる情報の分配や統合を介して、細胞機能の動的な制御を実現している。本研究では、低分子量 G タンパク質 Rho の制御下にあるシグナル伝達系を軸に、最終的に、以下の3つのテーマ、

1)細胞接着やアクチン細胞骨格の制御系における足場形成

2)微小管伸張の動的制御

3)ゲノム維持における基本タンパク質の動的複合体形成

において、動的複合体の三次元構造決定を通して、特異的相互作用により達成される分子認識と、その結果起こる構造変化を通じた分子機能制御の構造的基盤を明らかにするとともに、創薬の糸口を探ることを目的とした。

5年の期間内で、X線結晶解析で25件、NMRで1件の合計26個の構造を決定した。この中で、17件が複合体であり、タンパク質-タンパク質あるいはタンパク質-ペプチド複合体(13件)、がタンパク質-DNA(1件)、ならびにタンパク質-リガンド複合体(4件)を含む。以下に得られた成果を要約する。

1)細胞接着やアクチン細胞骨格の制御系における足場形成

ERM(ezrin/radixin/moesin)タンパク質と接着分子(ICAM-2、PSGL-1、CD43、CD44)、膜貫通型プロテアーゼ(NEP、MT1-MMP)、シグナル伝達制御タンパク質(RhoGDI、NHERF-1、NHERF-2)との複合体構造を決定して、多様な分子認識機構を解明した。この多様性は、少なくとも、異なる結合部位を用いた3つの結合モチーフ(Motif-1、Motif-2、Motif-3)の認識に集約できることを示した。更に、II型膜タンパク質であるNEPの認識も、ヘヤピン構造を誘導することによって膜貫通領域と繋がるように、I型膜タンパク質の Motif-1 認識部位を用いながら巧妙に認識することを明らかにした。また、FERMドメインの誘導適合(induced-fit)による構造変化を通して、Motif-1(接着分子群等)と Motif-2(NHERF-1とNHERF-2:イオンチャネルや受容体のアダプタータンパク質)の結合が競合し合うことも明らかにした。これにより、ERMタンパク質が接着分子の局在する細胞の基底面と、イオンチャネル等を局在するアピカル面との間の分子スイッチとして働くことを示した。

ERMタンパク質をリン酸化することにより活性化するRhoキナーゼについては、RhoA結合ドメインやキナーゼドメインの構造を決定した。その結果、二量体形成による特異な活性制御機構を解明した。この活性制御機構が、Rhoキナーゼを含むDMPK(筋緊張性ジストロフィーキナーゼ)ファミリーのセリン/スレオニンタンパク質キナーゼに共通する特質であること示した。また、キナーゼドメインと阻害剤fasudilならびにY27632との複合体構造を決定して、薬物設計の道を開いた。

2)微小管伸張の動的制御

(+)端結合性の微小管制御タンパク質+TIP(CLIP-170、EB1、APC)間の相互作用を解析するとともに、その代表タンパク質 CLIP-170 の 2 つの CAP-Glyドメイン、ならびにそれとチューブリンペプチドとの複合体の構造を決定して、CLIP-170 がチューブリン・微小管ならびに EB1 のもつ C-末端酸性テールを認識することを

解明した。その結果 CLIP-170 はチューブリンと共重合することにより微小管の(+)端に集積すること、(+)端に局在するEB1がCLIP-170の(+)端への集積を促進すること、ならびに、静電的な相互作用により微小管の伸張を促進する機構を提案した。

3) ゲノム維持における基本タンパク質の動的複合体形成構造

特異的エンドヌクレアーゼ FEN1 と DNA クランプ分子 PCNA、ならびに FEN1 と DNA との複合体の構造を決定した。PCNA に結合した FEN1 の構造柔軟性を明らかにするとともに、コンホメーション変化による活性制御機構を提唱した。また、FEN1 の基質 DNA 認識と正確な位置での切断機構を原子レベルで解明した。

以上の研究は、基本的に、研究代表者の単一の研究グループで実施した。

4. 事後評価結果:

4-1. 外部発表(論文、口頭発表等)、特許、研究を通じての新たな知見の取得等の研究成果の状況

論文発表、国内:7件、海外:25件(印刷中3件)。口頭発表、国内:18件、海外:1件。特許出願、国内:1件、海外:1件。(平成18年12月23日現在) この他、投稿中 5、準備中 10 件の論文がある。特に、ERM-ICAM-2 複合体 (*EMBO J.*, 2003)、FEN1-PCNA 複合体 (*EMBO J.*, 2005)、Rho キナーゼ-fasudil 複合体 (*Structure*, 2006) は、引用数やダウンロード数が高い。

4-2. 成果の戦略目標・科学技術への貢献

タンパク質の複合体構造の基礎研究から創薬の糸口へという点では、Rho キナーゼの構造研究が注目される。Rho キナーゼは現在の最も優れた薬物ターゲットの一つとして知られており、阻害剤は血管拡張剤として、くも膜下出血・脳梗塞・心筋梗塞等の有望な治療薬であるとともに、最近では脊髄損傷の治療薬として有望視されている。また、ERM タンパク質のホモログで、神経繊維腫症 II 型 (NF-II: neurofibromatosis type II) の原因遺伝子産物であるマーリン (merlin) の FERM ドメインの構造決定も報告しており、臨床医等の関心と呼んでいる。ヒアルロンサン受容体である CD44 は増殖制御に直接関わり、癌研究に中心接着分子である。FEN1 は岡崎フラグメントのプロセッシングに必須な酵素であり、増殖阻害の絶好な薬物標的である。

細胞膜上の接着分子と細胞質のアクチン細胞骨格の連結は細胞生物学にとって極めて重要な課題である。しかし、これまでの構造レベルでの我々の知識は、カドヘリンスーパーファミリー類におけるカテニンに限られていた。本研究の ERM タンパク質構造研究によって、免疫グロブリンスーパーファミリー、ムチンスーパーファミリーなどより広い多くの接着分子とアクチン細胞骨格との連結が構造レベルで理解できるようになった。CLIP-170 研究は、全く未知であった微小管制御タンパク質のチューブリン・微小管認識研究に先鞭をつけたものであり、科学的に重要なものとして位置づけられる。FEN1 研究は、岡崎フラグメントプロセッシングという分子生物学の根幹の関わる問題を構造レベルで明らかにしており、重要な成果といえる。

本 CREST 研究は多くの発展的研究の芽や種を生み出した。期間内に合計 26 個の構造決定に成功したが、なお 10 を越える数のタンパク質の構造解析が進行中である。接着分子に関しては CD44 に焦点を絞った研究展開、特に、GEF などの G タンパク質制御タンパク質との相互作用、微小管に関しては、CLIP-170 以外の微小管制御タンパク質あるいは小胞輸送制御や積荷認識、また、FEN1 に関しては FEN1-PCNA-DNA 三者複合体など、今後、これらの構造解析の完成に期待している。

4-3. その他の特記事項(受賞歴など)

研究代表者は、日本結晶学会学術賞(2003)を受賞した。