

「たんぱく質の構造・機能と発現メカニズム」

平成13年度採択研究代表者

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)

「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」

1. 研究実施の概要

タンパク質は他の分子との相互作用を通して様々に構造変化して、分子機能の発現と制御を実現する。本研究では、複数の分子と相互作用する多機能性タンパク質の分子複合体のX線構造解析を通して、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ことにより、細胞機能の制御ネットワークにおけるシグナルの分岐や統合の分子的基礎を理解するとともに、創薬の糸口を探ることをねらっている。

本年度までは、試料調製などの生化学的実験に力点をおいて研究を進めた。その結果、(1) ERMタンパク質の関与する細胞接着分子の細胞膜直下での動的複合体形成研究では、CD44およびCD43の細胞質ドメインなどの調製に成功して、相互作用の予備実験を開始することができた。(2) 細胞接着・細胞骨格系制御のRho-kinase研究では、ドメイン・マッピングを終了して、構造・機能解析に有望なタンパク質発現系を複数得た。(3) FERMドメインの多様性の研究では、ドメイン・マッピングの結果、JAKキナーゼのFERMドメインのタンパク質発現系を得た。(4) 細胞極性に関与する複合体の研究では、CLIP-170やIQGAPのタンパク質調製に成功した。(5) その他の系での複合体研究では、転写や複製系での複合体結晶の構造解析に成功した。

2. 研究実施内容

1) 細胞接着分子の細胞膜直下での動的複合体形成

細胞接着分子は、細胞膜直下でリンカータンパク質を通してアクチン細胞骨格と連結されるとともに、複数のタンパク質と複合体を形成してシグナル伝達の足場を形成する。ここでは、リンカータンパク質の一つであるERMタンパク質に注目して、細胞膜直下での足場形成における動的複合体形成における分子認識の多様性と構造変化による機能制御の解明を目的として研究を推進している。

これまでの研究で、この足場形成における相互作用の大半はERMタンパク質のアミノ末端のFERMドメインを介することがわかっており、radixinのFERMドメインを用いた幾つかの複合体結晶の構造解析に成功している。本年度は、先ず、変異実験によって、FERM/RhoGDI複合体結晶中で見られたように、溶液中でもRhoGDIがFERMドメインのサブド

メインAとBに結合していることを示した。FERM/ICAM-2複合体については特異的相互作用を検証する変異実験結果を終了して、論文発表した (*EMBO J.*, 2003)。この論文によって、ERMのFERMドメインが主にサブドメインCによってRxxTYxVxxA配列を認識することや、サブドメインCはPTB様構造をもつが、PTBドメインと特異性が異なることなどが明らかにされた。また、FERM/NHERF1複合体については分解能2.5 Åの構造解析を終了するとともに、変異実験を行い、特異性を検証した。更に、SPR測定による結合解析より、FERMドメインとNHERFとの結合はFERMドメインとICAM-2との結合と競合することを見出した。

その他の結晶構造解析としては、神経芽腫神経線維芽腫症II型 (NF2) の原因遺伝子産物であり、ERMファミリーに類似するタンパク質であるMerlinのFERMドメインの構造を決定して、ERMタンパク質と同様の機能をもつことを示すとともに、このドメインに集中する病因変異について、構造的な要因を吟味した。CD44とアクチン細胞骨格とのリンカータンパク質としてはERMタンパク質よりも、むしろMerlinが主役であるという報告もあるので、CD44との相互作用解析などの端緒としたい。

前年度見出した新規な標的接着分子候補との相互作用解析も行い、ICAM-4, -5は結合しないが、syndecanやneurexinは弱いながらも結合することがわかった。また、新規モチーフの可能性のあるL-selectinとの複合体の結晶化を試みて、既に幾つかの結晶を得た。ICAM-2やL-selectinの細胞質部分は30残基以下であり、構造ドメインをもつ可能性は低い。一方、CD43やCD44の細胞質部位は、それぞれ124残基と70残基であり、構造ドメインをもつ可能性がある。また、これらはERMタンパク質以外のタンパク質とも相互作用することを示す実験報告があり、動的複合体形成として興味深い。そこで、これらの細胞質部位の全長の調製を試み、結晶化や物理化学的な結合解析に耐えうるレベルでの精製系を確立した。

CD44の細胞質ドメインには、ERMタンパク質を活性化するRho-kinaseやRhoに特異的GEFであるTiam1が結合するという報告がある。そこで、これらのCD44結合ドメイン (Rho-kinaseのC-末端PH様ドメインとTiam1のPH-CC-Exドメイン) の調製を試みており、より大きな動的複合体の解析を目指す。

一方、FERMドメインの新しい相互作用パートナーとしてSykが注目されている。SykはそのSH2-SH2ドメインを通してFERMドメインと結合することにより、接着分子PSGL-1の細胞質ドメインに会集するという。PSGL-1の細胞質ドメインにはFERM結合モチーフが見られるので理解できるが、FERMドメインにはSykのSH2-SH2ドメインの標的であるITAMモチーフがないので、この相互作用はこれまでの構造データでは解釈不能である。そこで、このSH2-SH2ドメインを調製した。今後、FERMとの結合を確認するとともに、結晶化の可能性を探る。また、このSH2-SH2ドメインは、ITAMモチーフがないintegrin- β の細胞質ドメインにもチロシンリン酸化非依存的に結合するという。これらのことも詳細を明らかにしたい。また、Integrinの足場タンパク質であるZyxinと紡錘糸会合タンパク質キナーゼWartとの複合体は結晶化を開始している。

更に、FERMドメインの新しい相互作用パートナーである三量体Gタンパク質 $G_{\alpha 12}$ 、 $G_{\alpha 13}$

(LPAなど増殖シグナル下で働き、Rhoシグナル経路を活性化する)については、単体の発現が困難であった。今後、共発現系を検討する。その他の候補タンパク質については、引き続き、cDNAの調達や、発現実験など生化学実験で検討し、不十分な場合は、発現系の変換や、サブクローニングを検討する。

2) Rho-kinase関連タンパク質

アクチン細胞骨格系の制御タンパク質キナーゼRho-kinaseは、上記の複合体形成制御にも関与し、また、医学的応用の観点からも重要性は極めて高い。そこで、このタンパク質の調製を重点的に試みた。40近いコンストラクトを作成して、タンパク質キナーゼドメインの良好のSf9発現系を得た。また、coiled coilドメイン中にACCフィンガー (PKN/PRKのRho結合ドメイン) 様モチーフを見出した。興味深いことに、その一つは、新しい低分子量Gタンパク質であるRGKファミリーのGemやRad (Rho-kinaseの負のレギュレータ) との相互作用部位と一致しているので、今後、相互作用を調べる予定である。また、CDKインヒビターであるp21^{Cip1/WAF}がRho-kinaseの阻害活性があるという報告がある。p21^{Cip1/WAF}とRho-kinaseのキナーゼドメインの共発現系を構築した。この相互作用も検討して、可能であれば複合体の結晶化へと展開する。

3) FERMドメインをもつその他のタンパク質の動的複合体形成

我々は、FERMドメインの分子認識に関しては世界のトップを走っている。そこで、ERM以外のFERMドメインをもつシグナル伝達タンパク質についても解析して、FERMドメインの相互作用の多様性についての構造的基礎の構築にも貢献したい。ここでは、JAK (とりあえず機能解析の進んでいるJAK3とその標的レセプター γ C) をとりあげ、細胞膜直下での分子内・分子間相互作用の実態を原子レベルで明らかにするために、種々のタンパク質発現系を検討した結果、良質の発現系を得た。

4) 細胞膜直下のその他の動的複合体

微小管結合タンパク質CLIP-170とIQGAP複合体や、また、接着部位へ投射した微小管上を移動して細胞極性決定に関連すると考えられているEB1とその相互作用タンパク質APCはタンパク質発現系を得て、相互作用解析を始めている。

5) その他の動的複合体

DNA関連タンパク質としては、DNAのflap構造特異的ヌクレアーゼであるヒトFEN-1とDNAクランプ分子であるPCNAとの複合体や σ 因子 (σ 28) とそのanti- σ 因子であるFlgMとの複合体の構造決定に成功している。前者では、DNAを含んだ三者複合体の結晶化の検討を始めている。

3. 研究実施体制

研究代表者直属の一つのチームで行った。

箱嶋敏雄グループ

- ① 研究分担グループ長：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）
- ② 研究項目：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

4. 主な研究成果の発表（論文発表および特許出願）

（1）論文（原著論文）発表

- Terawaki, S., Maesaki, R., Okada, K., and Hakoshima, T. (2003). Crystallographic characterization of the radixin FERM domain bound to the C-terminal region of the human Na⁺/H⁺ exchanger regulatory factor (NHERF). *Acta Crystallogr. D* **59**(1), 177-179.
- Hamada, K., Shimizu, T., Yonemura, S., Tsukita, Sh., Tsukita, Sa., Hakoshima, T. (2003). Structural basis of adhesion protein recognition by ERM proteins revealed by the crystal structure of the FERM/ICAM-2 complex. *EMBO J.* **22**(3), 502-514.
- Shimizu, T., Seto, A., Maita, N., Hamada, K., Tsukita, Sh., Tsukita, Sa., and Hakoshima, T. (2002). Structural basis for neurofibromatosis Type 2: Crystal structure of the Merlin FERM domain of Merlin. *J. Biol. Chem.* **277**(12), 10332-10336.
- 箱嶋敏雄 (2002). Rhoシグナリングの構造生物学、「特集：構造生物学の最前線」（稲垣冬彦・箱嶋敏雄編）、生化学**74**(10)、日本生化学会、1237-1242.

（2）特許出願

なし