

「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。

細胞膜直下での動的複合体形成と細胞核内での動的複合体形成の幾つかの系に力点をおいて研究を進めている。その結果、(1) 細胞接着分子の細胞膜直下での動的複合体形成において重要な役割を演じているERMタンパク質の分子認識研究では、これまでに、リン脂質のひとつであるPIP2や接着分子のICAM-2の認識を世界に先駆けて明らかにしてきたが、今回、PSGL-1とCD43との複合体結晶を得た。(2) CD44およびCD43の細胞質ドメインの物理化学的性質をあきらかにしてきた。この結果に基づいて、CD44とERMタンパク質、Rhoタンパク質のGEFとの相互作用を解析した。(3) 細胞接着・細胞骨格系制御のRho-シグナル伝達系の研究では、重要なタンパク質についてドメイン・マッピングを終了して、構造解析を進めた。(4) 細胞極性に関与する複合体の研究では、CLIP-170やIQGAPなどのタンパク質調製に成功して、幾つかの結晶を得た。CLIP-170については構造決定に成功した。(5) その他の系での複合体研究では、複製系(FEN1-とPCNA)での複合体の構造を明らかにして、タンパク質間相互作用の詳細と構造変化にもとづく機能制御のメカニズムを解明して論文発表した。転写系(大腸菌の鞭毛形成特異的 $\sigma$ 因子( $\sigma^{28}$ )とanti- $\sigma$ 因子FlgM)の複合体の構造を決定した。

### 2. 研究実施内容

#### 1) 細胞接着分子の細胞膜直下でのERMタンパク質の分子認識

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た研究を推進している。これまでに、radixinとICAM-2との複合体結晶を構造決定して、ERMのFERMドメインが主に

サブドメインCによって、 $\beta$ -シート形成に続く $3_{10}$ -ヘリックスの疎水部位への結合によって、RxxTYxVxxA配列を認識することを明らかにしている (*EMBO J.*, 2003)。今回、この配列と異なる配列をもつCD43 (RxxALxLxxG) ならびにPSGL-1 (KxxMYxVxxY) との複合体結晶を構造決定した。その結果、これら接着分子の細胞質ペプチドが、ICAM-2ペプチドと同じくFERMドメインのサブドメインCの結合部位を使いながら、特に、 $3_{10}$ -ヘリックス部分周辺で、ICAM-2とは異なる相互作用をしつつ、結合していることを明らかにした。

## 2) 細胞接着分子の細胞膜直下での動的複合体形成

昨年までの研究で、CD43やCD44の細胞質部位は、それぞれ124残基と70残基からなるが、二次構造に乏しく、柔軟で比較的伸びた構造をとっていること、モノマーとして存在すること、この状態ではFERMドメインとの結合が抑制されていることなどを明らかにしてきた。この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ファミリーのGタンパク質であるRacに特異的GEFであるTiam1が結合するという報告がある。今年は大規模調製したTiam1のCD44結合ドメイン (PH-CC-Exドメイン) を用いて、CD44の結合部位を決定した。この結合部位モチーフの類似のものが、他のTiam1結合接着分子にも見出された。結晶化の結果、PH-CC-Exドメイン単体、CD44との複合体とも、針状結晶を得た。

## 3) Rhoシグナリングでのタンパク質の動的複合体形成

アクチン細胞骨格系の制御タンパク質キナーゼRho-kinaseは、Rho以外にも、新規の低分子量Gタンパク質であるRGKファミリーのGemやRad (常活性型Gタンパク質) と直接に相互作用して、負の制御されている。GemとRadを精製して、いくつかの結晶を得た。

## 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、EB1、APC、更にそれらの細胞膜標的タンパク質の大規模調製を試みてきており、構造学的研究を進めている。CLIP-170のC末端部位にはタンデムに並んだ2つのCAP-Glyドメインのうち、C末側のドメインの結晶構造を決定した (分解能 1.5 Å) が、このドメインはEB1などとの特異的相互作用の本体と考えられており、他の微小管結合関連タンパク質との比較から、微小管結合部位とEB1結合部位の候補を見出した。in vitroの結合実験から、その証明実験の準備をした。また複合体の結晶化を試みた。EB1に結合する幾つかのコンストラクトを作成して、複合体結晶の作成にも精力を注ぐ。また、CLIP-170のC-末端側のZn-finger様ドメインはCAP-Glyに結合してその活性を自己阻害すると考えられているので、そのドメインのタンパク質精製系も確立した。

## 5) その他の動的複合体

昨年度までに、2つのDNA関連タンパク質複合体の構造決定に成功したが、本年度は、その一つであるヒトFEN-1について、PCNAならびにDNAとの三者複合体の結晶化を試みたが、分解能6 Å以上に改良することは未だできていない。

## 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

- Hamada, K., Kato, M., Shimizu, T., Ihara, K., Mizuno, T., Hakoshima, T. (2005). Crystal structure of the protein histidine phosphatase SixA in the multistep His-Asp phosphorelay. *Genes to Cells*, **10**(1), 1-11.
- Sakurai, S., Kitano, K., Yamaguchi, H., Okada, K., Hamada, K., Fukuda, K., Uchida, M., Ohtsuka, E., Morioka, H., Hakoshima, T. (2005). Structural basis for recruitment of human flap endonuclease 1 to PCNA. *EMBO J.* **24**(4), 683-693.
- 箱嶋敏雄(2004) 核酸分子認識とその機能を中心とした構造生物学（総合報告学会賞受賞論文）、*日本結晶学会誌*, **46**, 201-208.
- Maita, N., Okada, K., Hatakeyama, K., Hakoshima, T. (2004). Structural basis of bioppterin-induced inhibition of GTP cyclohydrolase I by GFRP, its feedback regulatory proteins. *J. Biol. Chem.* **279**(49), 51534-51540.

##### (2) 特許出願

H16年度特許出願件数：1件（CREST研究期間累積件数：1件）