

# 「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

本研究では、タンパク質-リガンド分子やタンパク質-タンパク質の分子複合体の X 線構造解析を通して、特異的な分子認識の機構の詳細と、その結果起こる構造変化を通した分子機能制御の構造的基盤を明らかにする。また、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 2 つの系に力点をおいて研究を進めてきたが、その結果、(1) 細胞接着分子とアクチン細胞骨格リンカーであり足場タンパク質である ERM タンパク質の分子認識研究では、これまでのリン脂質 PIP2 や接着分子の Motif-1 の認識に加えて、Motif-2 認識の全容を明らかにした。(2) 接着分子 CD44 と ERM タンパク質、Rac の GEF である Tiam1 の PHCCEX ドメインとの結晶化を試みた。(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、RGK ファミリーの低分子量 GTPase である Rad の G ドメインの構造を決定した。また、Rho-キナーゼの触媒ドメインとその阻害剤との構造を決定して、薬剤設計の道を開いた。更に、Rho-キナーゼの PH 様ドメイン中に新しいドメインを見出した。(4) 細胞極性に関与する複合体の研究では、CLIP-170 の CAP-Gly ドメインの構造を決定した。また、相互作用部位の解析を進めた。(5) その他の系での複合体研究では、FEN1 と PCNA と DNA の複合体の結晶化を試みた。

### 2. 研究実施内容

#### 1) 細胞接着分子の細胞膜直下での ERM タンパク質の多様な分子認識

細胞接着分子は、細胞膜直下で足場形成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 ERM タンパク質の接着分子認識に注目した研究を推進している。

これまでに radixin の FERM ドメインと ICAM-2, CD43, PSGL-1 との複合体の解析から、これらが、Motif-1 認識（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配列が認識される）ことを明らかにしてきた。また、この認識では配列多様性（ICAM-2 では RxxTYxVxxA 配列、CD43 では RxxALxLxxG、ならびにPSGL-1 では KxxMYxVxxY 配列）が許されることとその機構も明らかにしてきた。今回、これらに加えて、N-末端側が細胞質にある NEP（SxxQMxIxxI）についても構造決定に成功した（これまで解析してきた ICAM-2 などの接着分子は C-末端側が細胞質）。その結果、形成される $\beta$ -シートの極性には変化がなく、細胞膜へと続くペプチドのルートが逆になることがわかった。

ERM タンパク質は細胞内のアダプタータンパク質とも相互作用する。その最も重要な例として、NHE（Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup>交換体）や CFTR（Cl<sup>-</sup>交換体）などのイオンチャネルや GPCR、GFR などの受容体のアダプターとして働く NHERF-1, -2（NHE 制御因子-1,2）がある。これらの複合体の構造決定の結果、Motif-2(MDWxxxx[L/I]Fxx[L/F])を発見した。これは、Motif-1 とは異なる部位に結合する。即ち、 $\alpha$ -らせんを形成することによって、FERM ドメインのサブドメイン C の疎水的な溝にはまり込むとともに、モチーフの C-末側に続く塩基性残基との静電気的な相互作用で結合する。Motif-1 と Motif-2 の結合は互いに競合して、ERM タンパク質が接着分子とイオンチャネルとの活性化のス위ッチ役をしていることを明らかにした。これについては印刷中である（Structure, 2006, in press）。Motif-2 は NHERF に特徴的な配列であるが、他のタンパク質でこれをもつ例はないのであろうか？最近、ERM タンパク質の標的接着分子である CD44 と結合してそれに作用する膜貫通型プロテアーゼである MT-MMP の C-末端細胞質内テール (RRLLYCQRSLLDKV) に Motif-2 に類似する配列を見出した。

## 2) 細胞接着分子の細胞膜直下での動的複合体形成

CD44 の細胞質ドメイン（70 残基）には ERM タンパク質に加えて、ERM タンパク質を活性化する Rho-キナーゼや 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。前年度までに、CD44 の細胞質テールの物性や、Tiam1 の CD44 結合ドメインである PHCCEx ドメインを調製して CD44 の結合部位も同定した。これらの成果をもとに、PHCCEx ドメインや PHCCEx ドメインと CD44 複合体の結晶化を、微量結晶化ロボット（平成 16 年度購入）を利用した大規模スクリーニングを敢行したが、構造解析に利用できる結晶を得るには至っていない。現在得られている針状結晶の改良とともに、三者複合体、CD44-ERM-Tiam1、の結晶化の可能性も検討する必要がある。

## 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を制御する Ser/Thr-タンパク質キナーゼ Rho-kinase は、上記の ERM タンパク質複合体の形成を制御する。また、Ca<sup>2+</sup>非依存的な強力な血管収縮作用をもつので、このキナーゼの活性抑制は、高血圧、心筋梗塞、脳梗塞など循環器病への医学的応用の観点からも重要性は極めて高い。そこで Rho-kinase のキナーゼドメインと臨床応用にも

供されている阻害剤 fasudil ならびに Y27632 との複合体の構造を決定した。その結果、このキナーゼに特有な二量体化による活性型コンフォメーションの維持機構や、阻害剤の特異性を決定する相互作用、ならびに、それを可能とする阻害剤とタンパク質との両者の構造的な柔軟性を明らかにすることが出来た。既に、阻害剤 fasudil との複合体は論文発表 (Structure, 2006) するとともに、Press release した。Y27632 との複合体については最終的な解析を終了して論文を作成中である。

Rho-キナーゼの C-末端には、細胞膜、ならびに標的タンパク質に結合するドメインとして考えられている PH 様ドメインがある。このドメインは通常の PH ドメインと異なり、ドメインの C-末端よりにシステイン残基に富んだ挿入領域がある。この PH 様ドメインの種々のコンストラクトによるタンパク質の作成とその性状の解析から、この挿入領域は、PKC などがもつ Zn を配位した C1 ドメインに酷似することがわかった。EXAFS 測定の結果からも Zn を配位していることが確かめられた。

Rho-キナーゼは、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 を精製して幾つかの結晶を得て、Rad についてはその G ドメインの結晶構造を決定した。

#### 4) 細胞極性における動的複合体

細胞極性の決定に関わる重要な細胞骨格である微小管については、(+)端結合性の微小管制御タンパク質、TIP、の研究を続けてきた。既に構造解析を終了した CLIP-170 の CAP-Gly1 ドメインと CAP-Gly2 ドメインについては、これらが塩基性のグループを分子表面にもつことを明らかにしてきた。更に、種々の変異実験と標的タンパク質の結合実験より、主に CAP-Gly2 ドメインによって、 $\alpha$ -tubulin の C-末端の酸性テールを認識することにより、 $\alpha, \beta$ -tubulin ダイマー やそのオリゴマーに結合することや、類似の酸性テールをもつ EB1 や p150Glued にも同様に結合することを明らかにできた。また、CLIP-170 の 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 C-末端側の Zn-finger 様ドメインの試料を調製して、CAP-Gly と相互作用することを確かめた。

上記と平行して、微小管上を移動する分子モータであるキネシンの荷分子の認識部位についても研究を進めており、幾つかの結晶を得ている。特に KLC の荷分子認識部位や、それと荷分子である JIP などとの複合体の結晶化のスクリーニングを行った。

#### 5) その他の動的複合体

昨年度には、ヒト FEN1 と PCNA との構造解析に成功して論文発表した (EMBO J., 2005)。これに引き続いて、FEN-1-PCNA-DNA ならびに FEN-1-DNA 複合体の結晶化条件の微量結晶化ロボットを利用した大規模スクリーニング試みて、有望な条件を見出した。

### 3. 研究実施体制

「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、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

- Kitano K, Kita A, Hakoshima T., Niimura Y, Miki K. (2005) Crystal structure of decameric peroxiredoxin (AhpC) from *Amphibacillus xylyanus*. *Proteins* 59(3), 644-647.
- Yanuar, A., Sakurai, S., Kitano, K., and Hakoshima, T. (2005). Expression, purification, crystallization and preliminary crystallographic analysis of human Rad GTPase. *Acta Crystallogr. F*61, 978-980.
- Yamaguchi, H., Kasa, M., Amano, M., Kaibuchi, K., Hakoshima, T. (2006). Molecular mechanism for the regulation of Rho-kinase by dimerization and its inhibition by fasudil. *Structure*, 14(3), 589-600.

#### (2) 特許出願

H17 年度出願件数： 0 件 (CREST 研究期間累積件数： 1 件)