

「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おいて、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) 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やCD44、更にICAM-2と全く相同性のないL-selectinとの分子認識について知見を得た。(2) CD44およびCD43の細胞質ドメインの調製に成功して、タンパク質としての性状と、相互作用の解析を進めた結果、これらは、複数の機能領域をもつことが明らかになりつつある。(3) 細胞接着・細胞骨格系制御のRho-キナーゼ研究では、ドメイン・マッピングを終了して、構造解析を行った。(4) 細胞極性に関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て、幾つかの結晶を得た。(5) その他の系での複合体研究では、転写系(大腸菌の鞭毛形成特異的 σ 因子 (σ^{28}) とanti- σ 因子FlgM) や複製系(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。

ERMタンパク質のFERMドメインは、様々な接着分子の細胞質テールを認識するとともに、他のタンパク質とも相互作用して、膜直下で複合体を形成する。前年度に発表したFERM-ICAM-2複合体では、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を明らかにしたが (*EMBO J.*, 2003)、この配列とやや異なる配列 (KxxMYxVxxY) をもつPSGL-1との複合体の結晶化にも成功して分解能3.2 Åで構造決定した結果、PSGL-1もICAM-2と同様のFERMドメイン上の結合部位で認識されていることが明らかとなった。また、CD44 (QxxKLxIxxG) についても結晶 (分解能3.5 Å) を得て、同様の結果を得た。以上のことから、先に発表した論文での通り、ERMタンパク質の接着分子認識は、FERMドメインのサブドメインCを通したものであることの一般性が指示された。おそらく、CD43 (RxxALxLxxG) についても同様であろうと推察された。

更に、これら接着分子と全く相同性のないL-selectinもFERMのサブドメインCで認識されることが、FERMのサブドメイン解析の結果から示された。今後、サブドメイン上での結合部位を同定していく。

前年度に構造解析と、変異実験を終了したFERM-NHERF1複合体 (分解能2.5 Å) については、投稿論文をほぼ作成した。今回の論文では、NHERFはFERMドメインのICAM-2とは異なる分子表面に結合し、MxWxxxxxFxxL/F配列が認識されることを明らかにした。また、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。この競合は、サブドメインCの構造変化を通して行われていることが、構造の詳細な比較検討から判明した。

2) 細胞接着分子の細胞膜直下での動的複合体形成

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、興味深い。そこで、動的複合体形成研究の中心としてこれら2つの接着分子の細胞質テールを詳しく解析することにした。まず、表面プラズモン (SPR) を用いた定量的な結合実験、ゲルろ過、動的光散乱 (DLS)、超遠心分析、CD測定、また、NMR解析用にN15ラベル試料を調製してHSQCスペクトルを測定した。これらの測定物化学的な解析の結果、CD44とCD43の細胞質テールは二次構造に富んだ安定な高次構造を形成しない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が判明した。ペプチドのどの領域が抑制的に働いているかを、系統的な断片コンストラクトを作成して解析中である。

また、CD43については、配列の検討から第二のFERM結合部位 (RxxSLxLxxL) がみいだされており、確認の実験を始めている。また、ERMタンパク質との相互作用の抑制領域を同定するために、系統的に断片化したCD43テールの調製を開始した。

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。そこで、こ

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）を調製した。また、これらの結合部位の探索のために、系統的に断片化したCD44の細胞質テールを調製した。今後、Rho-kinaseやTiam1の結合部位を解析していくとともに、ERM-CD44-Rho-kinase、ERM-CD44-Tiam1、ERM-CD44-Tiam1-Rho-kinaseなどの3者、あるいは4者間のより大きな動的複合体の解析を目指す。

3) Rho-kinase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、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な発現系を得て、タンパク質の調製に成功した。更に、結晶を得て構造解析した。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3箇所に見出した。この一つが、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ー）との相互作用部位と一致している。そこで、GemとRadを調製して、結晶化した。今後、相互作用部位の同定を試みる予定である。

Rho-kinaseのC末端のCD44認識部位については、2) に記した。

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。CLIP-170のC末端部位にはタンデムに並んだ2つのCAP-Glyドメインがある。このうちC末側のドメインの結晶構造を決定した（分解能1.5Å）。構造の特徴から、相互作用部位が予測されたが、更に、複合体結晶の作成に精力を注いでいる。CLIP-170の標的タンパク質の一つはEB1であるという報告があるが、我々は、我々の調製したタンパク質を用いた*in vitro*の実験として、これを確認した。また、IQGAPのCLIP-170との相互作用ドメインの結晶も得たが、残念ながら分解能が低い（6Å）ので、更なる改良が必要である。

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。そこで、これらGタンパク質に特徴的なN末部位についてFERMドメインとの相互作用を検討する。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。

5) その他の動的複合体

2つのDNA関連タンパク質複合体の構造決定に成功している。その一つは、ヒトFEN-1とPCNAとの複合体である。FEN1は、複製や修復時に生成するDNAの枝分かれ構造（flap構造）を切りそろえるという重要な役割を果たしているDNAの高次構造特異的なヌクレアー

ぜであり、DNAクランプ分子である増殖細胞核抗原（PCNA）と結合して、その活性を飛躍的に向上させる。X線結晶構造解析により決定した複合体構造（2.8 Å分解能）より次のことが明らかとなった。まず、FEN1は酵素ドメインに続くC末側の約20残基が、短い α らせん構造と β 鎖を形成して、PCNAと直接結合している。短い α らせん部分は主に疎水結合で、また、 β 鎖はPCNAの β 鎖と反平行 β シート形成により、PCNAに結合している。これら相互作用部位と酵素ドメインの間には、ヒンジ領域が存在していて、酵素ドメインがDNAの作用部位と相互作用したり、PCNAとともにDNA上をスライドする時の酵素ドメインの位置を調節していることが示唆された。この研究を更に発展させるために、DNAを含んだ三者複合体の結晶化の検討を始めている。

また、 σ 因子（ $\sigma 28$ ）とそのanti- σ 因子であるFlgMとの複合体の構造決定（2.7 Å分解能）に成功した。 $\sigma 28$ は鞭毛関連遺伝子特異的な σ 因子であるが、その一つの遺伝子産物であるFlgMは細胞内濃度が上昇すると、 $\sigma 28$ と直接相互作用して、anti- σ 因子として機能している。そこで、大腸菌のFlgMと $\sigma 28$ との複合体の構造を決定して、anti- σ 因子作用の詳細を明らかにした。得られた構造より、FlgMのC末半分部分が疎水的相互作用により、 $\sigma 28$ の領域2ドメインを中心にして巻きついて、領域3、4のドメインとともに、互いが凝集した構造を誘起していた。 σ 因子はこれらのドメイン間のリンカー部位が伸びて、各ドメインがポリメラーゼの離れた部位に結合することが、その活性に必須であることがわかっているので、本構造は、 σ 因子のポリメラーゼとの相互作用部位がマスクされた状態であることがわかった。

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 radixin-ICAM-2 complex. *EMBO J.* **22**(3), 502-514.

- Sakurai, S., Kitano, K., Okada, K., Hamada, K., Morioka, H., and Hakoshima, T. (2003). Preparation and crystallization of human flap endonuclease FEN-1 in complex with proliferating-cell nuclear antigen, PCNA. *Acta Crystallogr. D* **59**(5), 933-935.
- Hakoshima, T. (2003). Leucine zippers. in *Nature Encyclopedia of the Human Genome*, Vol. 3, Nature Pub. Group, pp. 679-683. (Review)
- Hakoshima T., Shimizu, T., and Maesaki, R. (2003). Structural basis of the Rho GTPase signaling. *J. Biochem.* (Tokyo) **134**(3), 327-331. (Review)
- Shimizu, T., Ihara, K., Maesaki, R., Amano, M., Kaibuchi, K., and Hakoshima, T. (2003). Parallel coiled-coil association of the RhoA-binding domain in Rho-kinase. *J. Biol. Chem.*, **278**(46), 46046-46051.

(2) 特許出願

H15年度特許出願件数：0件（研究期間累積件数：0件）