

機関番号：16201
 研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20570109
 研究課題名(和文) X線構造による脳内新規EFハンドタンパク質Iba1のシグナリング分子機構の解明
 研究課題名(英文) Signaling-molecular mechanism of a novel microglia EF-hand protein Iba1 deduced from X-ray structures
 研究代表者
 神鳥 成弘 (KAMITORI SHIGEHIRO)
 香川大学・総合生命科学研究センター・教授
 研究者番号：00262246

研究成果の概要(和文)：

脳内タンパク質Iba1は、脳内免疫細胞(グリア細胞)活性化に深く関与する新規EFハンドカルシウム結合タンパク質である。本研究では、X線結晶解析および動的光散乱による水溶液中での分子径測定により、Iba1は、他のEFハンドタンパク質と比べカルシウムへの親和性が低く、水溶液中でカルシウム非依存的に2量体構造をとっており、周囲の疎水環境に依存して2量体から単量体へ会合状態を変化させている可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：

Iba1 with 147 amino acid residues has been identified as a novel calcium-binding EF-hand protein, expressed in microglia/macrophages, and is expected to be a key factor in the activating of microglia. To elucidate signaling-molecular mechanism of Iba1, X-ray structural analysis and dynamic light scattering experiment of Iba1 were done. The results showed that Iba1 exists as a dimer in solution, and that Iba1 changes its oligomer state from dimer to monomer, depending on the hydrophobic environment.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：タンパク質X線結晶解析

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物化学

キーワード：X線構造, シグナル伝達, カルシウム結合タンパク質, EFハンドタンパク質
多量体形成, ミクログリア

1. 研究開始当初の背景

細胞内でカルシウム(Ca^{2+})と強く結合するタンパク質は、 Ca^{2+} 結合タンパク質と呼ばれ、 Ca^{2+} 依存的に、その構造を変化させることにより、生体内で重要な機能を担っている。 Ca^{2+} 結合タンパク質の中でもトロポニンC、カルモジュリン、S100タンパク質などは、1分子

中に12アミノ酸からなる Ca^{2+} 結合部位を2つあるいは4つ持ち、これらの部位は、アスパラギン酸などいくつかの保存されたアミノ酸を持つ(図1)。その3次元構造は、2つの α -ヘリックスがほぼ直交していて、そのポケットに Ca^{2+} が結合する。この構造モチーフはEFハンドと呼ばれ、EFハンドを持つタ

ンパク質は、EF ハンドタンパク質として大きなファミリーを形成している。

脳内免疫細胞ミクログリア特異的 Ca^{2+} 結合タンパク質 Iba1 (Ionized calcium binding adaptor molecule 1) は、活性化ミクログリアで発現上昇する 147 アミノ酸のタンパク質であり、EF ハンドを 2 つ持つ (図 1)。ミクログリアの活性化は、様々な外的刺激因子により引き起こされ、Rac (Rho ファミリー G タンパク質) へとシグナルが伝達していき、F-アクチンが架橋することにより細胞骨格の再構成が起こる。それとともに、細胞表面が大きく振動するようになり (膜ラフリングの形成)、ミクログリアは遊走能、貪食能 (異物を取り込んで処理する機能) を持つようになる。Iba1 は、ミクログリア活性化において、ホスホリパーゼ $\text{C-}\gamma$ (PLC γ) を介した Rac シグナル伝達系に関与することが報告されている [1]。さらに、Iba1 は、F-アクチンに対する直接の結合能・架橋能を有すること [2]、F-アクチン架橋能を有するフィンブリンに対して結合し、その F-アクチン架橋能を高めること [3]、PLC γ の基質であるホスファチジルセリン、ホスファチジルイノシトール 4,5 リン酸などの生体膜構成分子に結合すること [1]、が明らかになっている。以上のことから Iba1 は、生来的に多くの機能を持ち、ミクログリア活性化において、周囲の環境に応じて様々な機能を発揮しているタンパク質であると考えられる。

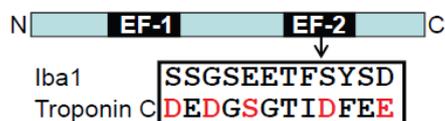


図1. Iba1の1次構造模式図とトロポニンCとのEF-2のアミノ酸配列比較。赤色は、多くのEFハンドタンパク質に見られる保存残基。Iba1では正確に保存されていない。

われわれは、 Ca^{2+} フリー型ヒト Iba1 (hIba1) および Ca^{2+} 結合型マウス Iba1 (mIba1) の X 線結晶解析に成功した [4]。 Ca^{2+} フリー型 mIba1 および Ca^{2+} 結合型マウス hIba1 の X 線構造を得るには至っていないが、hIba1 と mIba1 のアミノ酸配列は 89% の相同性を持ち、ほぼ同一のタンパク質と考えることができる。 Ca^{2+} フリー型 hIba1 と Ca^{2+} 結合型 mIba1 との間の構造の違いは、これまで報告されてきた EF ハンドタンパク質とは全く異なったものであった。さらに、この構造変化によって、Iba1 が Ca^{2+} 依存的に単量体から 2 量体へと分子会合状態を変化させる可能性が考えられた (図 2)。会合状態を変化させるということは、これまでの EF ハンドタンパク質には見られない新奇な現象であり、もし、このことが、Iba1 とターゲット分子との相互作用と密接に関係していれば、きわめて興味深いことである。



図2. Iba1の Ca^{2+} 結合によるコンフォメーション変化と2量体形成。

2. 研究の目的

本研究においては、① Ca^{2+} 結合と Iba1 の構造変化との関係を X 線結晶解析により、詳細に明らかにし、② 水溶液中で Ca^{2+} 依存的に Iba1 が 2 量体を形成するかどうか、また、Iba1 の 2 量体形成に関して他の要因が存在するかどうかを明らかにし、これらの結果より、ミクログリア活性化における Iba1 のシグナリング分子機構に関する新たな知見を得ることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) X 線結晶解析

これまでに X 線結晶解析に成功した構造は、1.9 Å 分解能 Ca^{2+} フリー型 hIba1 および 2.1 Å 分解能 Ca^{2+} 結合型 mIba1 である。 Ca^{2+} 結合型 mIba1 においては、結合している Ca^{2+} の温度因子が周囲のアミノ酸に比べて高く占有率が低いと考えられた。そこで今回、詳細な Ca^{2+} 結合構造を得るために、 Ca^{2+} 結合型 mIba1 の高分解能の X 線結晶解析を試みた。結晶化条件は以下の通りである。ハンギングドロップ法、リザーバー溶液: 1.2 M クエン酸 Na, 100 mM HEPES-Na (pH 7.3), ドロップ: 2 μ l 10 mg/ml タンパク質溶液 + 2 μ l リザーバー溶液。その結果、 Ca^{2+} 結合型 mIba1 の分解能を、1.89 Å まで向上させることに成功した。また、これまでは Iba1 を GST 融合タンパク質として発現させてきたが、精製過程におけるトロポニン処理により、N 末あるいは C 末の数アミノ酸残基が切断されている可能性が示された。そこで、トロポニン処理を行わずに精製するために、hIba1 を His-tag 融合タンパク質 (C 末側に 6 つの His を付加) として発現させて結晶化を試みた。その結果、新たな結晶系を持つ Ca^{2+} フリー型 hIba1 (Form 2) の結晶を得て、2.8 Å 分解能での X 線結晶解析に成功した。結晶化条件は以下の通りである。ハンギングドロップ法、リザーバー溶液: 1.8 M リン酸 Na/K 緩衝液 (pH 8.2), ドロップ: 1 μ l 20 mg/ml タンパク質溶液 + 1 μ l リザーバー溶液。これら 2 つの結晶データを表 1 に示す。

(2) 水溶液中での分子径の測定

DynaPro-Nanostar システム (Wyatt Technology 社製) を用いて、hIba1 の動的光散乱による分子径を、 Ca^{2+} 存在下・非存在下、および種々の物質を添加して測定した。典型的な測定条件は以下の通りである。タンパク質濃度 2-5 mg/ml, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 25°C, 10 μ l キュベット使用。

表1. Ca²⁺結合型mIba1とhIba1 (Form 2)の結晶データ。

	Ca ²⁺ 結合型mIba1	hIba1 (Form 2)
空間群	P3 ₁ 21	P6 ₃ 22
格子定数	a = 44.09 b = 44.09 c = 99.17	a = 79.86 b = 79.86 c = 96.96
分解能 (Å)	50 -1.89	50 -2.80
反射数	9,447	4,859
完全性(%)	97.4	99.6
R因子	0.234	0.308
R _{free}	0.274	0.349

(3) 変異型 Iba1 の作成

X線結晶解析によると、N末端16アミノ酸およびC末端25アミノ酸の電子密度が得られず、一部トロンピン消化を受けていることが考えられた。均一なアミノ酸数を持つタンパク質試料を用いることにより結晶の質が向上することが期待される。高分解能のX線結晶解析を試みるために、電子密度が得られないN末部分、C末部分、あるいは2つの部分を削除した変異型 hIba1 (Ndel-hIba1, Cdel-hIba1, NCdel-hIba1) を合成した。

4. 研究成果

(1) X線結晶解析

①高分解能 Ca²⁺結合型 mIba1 の結晶構造

1.89 Å 分解能 Ca²⁺結合型 mIba1 の構造を図3に示す。Ca²⁺結合型 mIba1 は、7本のαヘリックス (H-N1, H-N2, H-A, H-B, H-C, H-D, H-E) を持ち、H-A と H-B 間、および H-C と H-D 間にある2本の短いβストランドでβシートを形成している。H-B と H-C の間に大きな空間があり、結晶中では他の分子の H-E がこの中に入り込み、2量体を形成している(後述、図5)。2つのβストランド付近にCa²⁺結合部位のEFハンドを2つ持つが、Ca²⁺は2つめのEFハンドにのみ結合している。先の2.1 Å 分解能の構造に比べ、Ca²⁺のインキュベーション時間を長くすることにより、Ca²⁺の占有率が改善し、Ca²⁺結合部位の詳細な構造を明らかにすることができた。Ca²⁺は、Ser94(OG), Ser97(O), Thr100(O), Thr100(OG1) および1つの水分子により2.15 - 2.63 Å の距離で歪んだ5配位結合を形成している。これは、他のEF-ハンドタンパク質に見られる強固な6配位正八面体構造のCa²⁺結合様式と比べると、タンパク質とCa²⁺との相互作用は弱く、Iba1のCa²⁺への親和性は低いと考えられる。

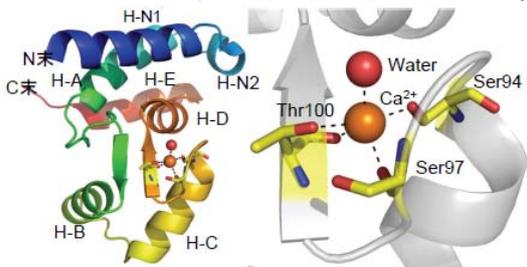


図3. Ca²⁺結合型mIba1の全体構造(左)およびCa²⁺結合部位の構造(右)。

②hIba1 (Form 2) の結晶構造

hIba1 (Form 2) の分子の全体構造および結晶中での分子パッキングを図4に示す。hIba1 (Form 2) においては、2つのEF-ハンドのいずれにもCa²⁺が結合しておらず、Ca²⁺フリー型の構造をとっていた。7本のαヘリックス中、H-EがH-BとH-Cとの間の空間を占めているのが、Ca²⁺結合型 mIba1 の分子構造との大きな違いである。この分子構造は、先に報告した1.9 Å 分解能 Ca²⁺フリー型 hIba1 (Form 1) と、ほぼ同じで、主鎖原子間のRMSは0.8 Åであった。しかしながら、結晶中の分子パッキングにおいて、Form 1 と Form 2 とで大きな違いが見られた。Form 1 は、空間群 C2, a = 60.75, b = 36.61, c = 44.02 Å, V_M = 1.44 Å³/Da と、分子はきわめて密にパッキングされていた。それに対し、Form 2 では V_M = 3.19 Å³/Da と結晶溶媒の含有率が高い。結晶中の分子パッキングにおいては、6₁らせん軸上に大きなチャンネルが存在している(図4右)。トロンピン処理を行っていないのに関わらず、Form 2 においても、N末端16アミノ酸およびC末端25アミノ酸の電子密度が得られなかった。これは、運動性が大きく結晶中で disorder 構造をとっている可能性があるが、トロンピン処理以外の要因で、N末あるいはC末の一部が切断されていることも考えられる。結晶化サンプルのN末のアミノ酸配列決定を行ったところ、17番目 Lys 付近をN末とするペプチドが大部分を占めていることが示され、何らかの要因によりN末の一部が切断されていることがわかった。

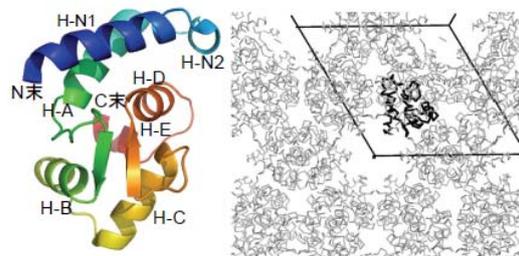


図4. hIba1 (Form 2)の全体構造(左)および結晶中での分子パッキング(右)。

(2) 水溶液中での分子径の測定

Ca²⁺フリー型 hIba1 と Ca²⁺結合型 mIba1 との構造の大きな違いは H-E が H-B と H-C との空間を占めているか、あるいは分子表面に露出しているかである。図5に示すように、Ca²⁺フリー型 hIba1 においては、H-B, H-C, H-E 間の接触面には、疎水性アミノ酸が配置されており、疎水相互作用を形成している。Ca²⁺結合型 mIba1 においては、疎水性アミノ酸が露出するが、別の分子の H-B, H-C 間に入ることによって、やはり疎水相互作用を形成し、2量体となる。それらの分子の最大直径は、Ca²⁺フリー型 hIba1 で 33 Å, Ca²⁺結合型 mIba1 の 2量体で 55 Å である(図5)。

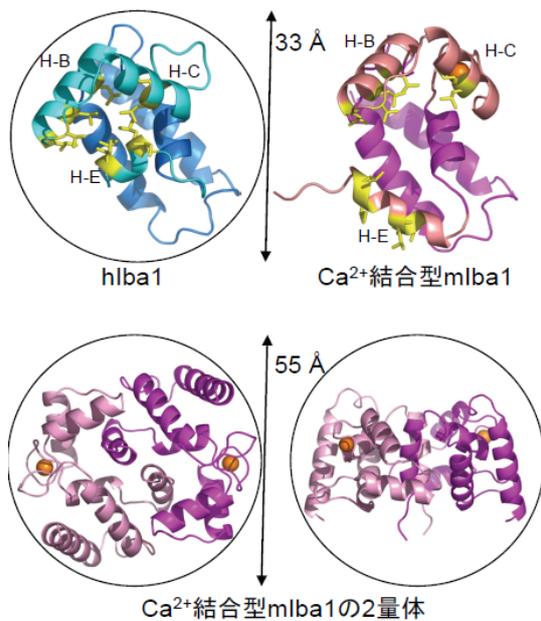


図5. Ca²⁺フリー型hIba1とCa²⁺結合型mIba1の構造の違い。疎水性アミノ酸を黄色で示す(上)。Ca²⁺結合型mIba1の2量体の構造と分子径(下)。

DynaPro-Nanostar システムを用いて、Ca²⁺非存在下でhIba1の動的光散乱による分子半径を測定したところ28 Å(分子直径56 Å)であった(図6A)。1 mM CaCl₂および、培養・精製時にCa²⁺が混入していた場合を考慮して5 mM EDTAを添加して測定したところ、分子半径に有意な差異はみられなかった(6B, C)。得られた分子径とX線構造から考えて、Iba1は、Ca²⁺の有無に関わらず水溶液中において2量体として存在していると予想される。これは、われわれが本研究を開始する前に考えていた「Iba1がCa²⁺依存的に単量体から2量体へと分子会合状態を変化させる可能性」と相反する結果である。そこで、なぜ、Iba1の単量体X線構造が見られたのかを明らかにするため、Ca²⁺フリー型hIba1の結晶化条件を参考に様々な物質を添加して分子半径の測定を行った。その結果、10% (w/v) ポリエチレングリコールモノエチルエーテル 2000 (PMME2000)を添加した場合、単量体構造の分子半径に近い値の12 Åが得られた(図6D)。以上の結果より、Iba1は、通常、水溶液中では、Ca²⁺の有無に関わらず2量体として存在しており、PMME2000を添加し、わずかに疎水性を増した環境下では2量体から単量体へと会合状態を変化させる可能性が示唆される。

(3) 変異型 Iba1

結晶の質を向上させるため、均一なアミノ酸数を持つと期待される変異型hIba1(Ndel-hIba1, Cdel-hIba1, NCdel-hIba1)を作成し、結晶化に供したが、今のところX線結晶解析可能な結晶を得ていない。タンパク質構造の安定には、N末、C末部分のアミノ酸が必要なかもしれない。

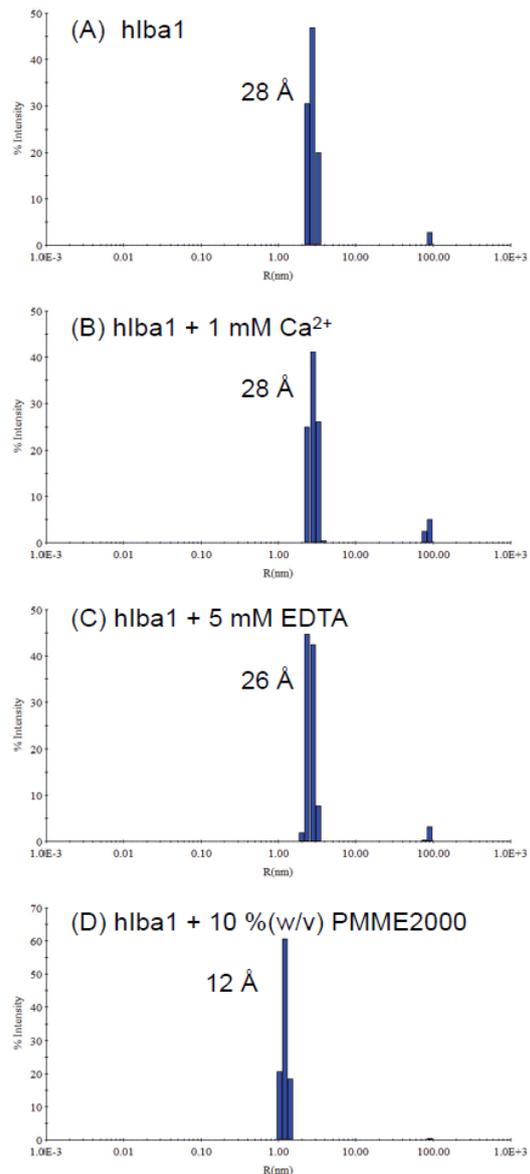


図6. 動的光散乱による分子半径の測定結果。PMME2000を添加したときのみ、有意に小さな分子半径が得られた。

(4) まとめ

本研究により以下の知見が得られた。

- ① Ca²⁺結合型mIba1の高分解能X線結晶解析により、Ca²⁺結合部位の詳細な構造を明らかにした。Iba1は、歪んだ5配位構造のCa²⁺結合様式をとっており、他のEF-ハンドタンパク質に見られる強固な6配位正八面体構造と比べると、タンパク質とCa²⁺との相互作用は弱く、Iba1のCa²⁺への親和性は低いと考えられる。
- ② 新たな結晶系を持つCa²⁺フリー型hIba1(Form 2)の結晶を得て、2.8 Å分解能でX線結晶解析に成功した。分子構造は、先のCa²⁺フリー型hIba1(Form 1)と、ほぼ同じであったが、結晶中の分子パッキングにおいて、大きな違いが見いだされた。

- ③ Iba1 は、通常、水溶液中では、Ca²⁺の有無に関わらず 2 量体として存在していると考えられる。このことは、Iba1 と Ca²⁺との相互作用が弱く、Ca²⁺結合が大きな分子構造の変化を引き起こすトリガーとなるとは考えにくいことから支持される。2 量体から単量体への会合状態の変化は、周囲の疎水環境に依存している可能性が示唆された。Iba1 は、生体膜成分の 1 つであるホスファチジルセリンと相互作用することが知られている。PMME2000 を添加することにより疎水性が増し、生体膜近辺の環境に近づいている可能性がある。Iba1 は、細胞質中と生体膜（内側）近辺とで、周囲の疎水環境に応じて、2 量体から単量体へと変化してホスファチジルセリンと相互作用しているのかもしれない。

現在、以上の結果を学術論文としてまとめる準備を進めている。

今後の課題としては、Iba1 が、単量体および 2 量体で、どのようにターゲット分子と相互作用するのかを明らかにするため、ターゲット分子との複合体の X 線結晶解析を行う必要がある。本研究においても、精力的にターゲット分子として知られているものを用いて複合体の結晶作成を行ったが、まだ、結晶を得るには至っておらず、継続的に努力していきたい。また、ここで提唱した「疎水環境による 2 量体から単量体への会合状態変化」についてもさらなる実験が求められる。hIba1 (Form 2)においては、結晶化リザーバーに高濃度のリン酸塩を使用しているにも関わらず、分子構造は単量体のものであった。今後、さらに広範囲の条件下で結晶作成、および動的散乱による分子径の測定を行い、この点についても明らかにしていきたい。

参考文献

- [1] Kanazawa, K., Ohsawa, K., Sasaki, Y., Kohsaka, S. & Imai, Y. (2002). Macrophage/microglia-specific protein Iba1 enhances membrane ruffling and Rac activation via phospholipase C-gamma-dependent Pathway. *J. Biol. Chem.* 277, 20026-20032.
- [2] Sasaki, Y., Ohsawa, K., Kanazawa, H., Kohsaka, S. & Imai, Y. (2001). Iba1 is an actin-cross-linking protein in macrophage/microglia. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 286, 292-297.
- [3] Ohsawa, K., Imai, Y., Sasaki, Y. & Kohsaka, S. (2004). Microglia/macrophage-specific protein Iba1 binds to fimbrin and enhanced its actin-bundling activity. *J. Neurochemistry*, 88, 844-856.
- [4] Yamada, M., Ohsawa, K., Imai, Y., Kohsaka, S. & Kamitori, S. (2006). X-ray structures of the microglia/macrophage-specific protein Iba1 from human and mouse demonstrate novel molecular conformation change induced by calcium-binding. *J. Mol. Biol.* 364, 449-457.

5. 主な発表論文等

[学会発表] (計 3 件)

- ① 吉田裕美, 大澤圭子, 高坂新一, 神鳥成弘 「新規 EF ハンドタンパク質 Iba1 の 2 量体形成をともなうコンフォメーション変化に関する研究」日本化学会第 91 春季年会 (東日本大震災により紙上および Web 上にて開催), 2011 年 3 月 26 日, 神奈川大学 (神奈川)
- ② 吉田裕美, 大澤圭子, 高坂新一, 神鳥成弘 「動的散乱による新規 EF ハンドタンパク質 Iba1 のコンフォメーション変化に関する研究」日本化学会第 90 春季年会, 2010 年 3 月 28 日, 近畿大学本部キャンパス (大阪)
- ③ 吉田裕美, 大澤圭子, 高坂新一, 神鳥成弘 「新規 EF ハンドタンパク質 Iba1 の高分解能 X 線結晶解析と 2 量体形成に関する研究」日本化学会第 89 春季年会, 2009 年 3 月 29 日, 日本大学理工学部船橋キャンパス (千葉)

[その他]

- ① ホームページ
<http://www.med.kagawa-u.ac.jp/~xraylab/report/kaken/index.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者
神鳥 成弘 (KAMITORI SHIGEHIRO)
香川大学・総合生命科学研究センター・教授
研究者番号: 00262246

(2) 研究分担者
吉田 裕美 (YOSHIDA HIROMI)
香川大学・総合生命科学研究センター・准教授
研究者番号: 10313305