

平成22年 6月 1日現在

研究種目： 若手研究（スタートアップ）  
 研究期間： 2008～2009  
 課題番号： 20870033  
 研究課題名（和文） ペプチドアレイを用いた微小管モーターの活性制御についての構造解析  
 研究課題名（英文）  
 Structural analysis of microtubule motor using peptide array system  
 研究代表者  
 林 郁子（HAYASHI IKUKO）  
 横浜市立大学・生命ナノシステム科学研究科・准教授  
 研究者番号：80464527

## 研究成果の概要（和文）：

KIF1C の FHA ドメイン及びその近傍を含んだ領域の組換え蛋白質の大量発現系構築を完了した。それぞれのフラグメントの多量体化をゲル濾過法と限定分解法にて解析した。またペプチドアレイを作成し、相互作用解析の条件検討を行っている。

## 研究成果の概要（英文）：

I have established the bacterial over-expression system of the FHA domain region in KIF1C. The oligomerization state of recombinant proteins was examined by gel-filtration and chemical cross-linking analyses. We are now investigating the intra-molecular interaction site using peptide-array system.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,330,000	399,000	1,729,000
2009年度	1,130,000	339,000	1,469,000
総計	4,160,000	1,248,000	5,408,000

## 研究分野：14

科研費の分科・細目：5804

キーワード：微小管、細胞骨格、x線結晶構造解析、ペプチドアレイ

## 1. 研究開始当初の背景

**Kinesin-3** ファミリータンパク質は微小管モーターのひとつである。微小管モータータンパク質は微小管が関わる細胞極性や分子の輸送に重要な役割を担うが、中でも KIF1C はマクロファージにおいて微小管の伸長端に集積するばかりでなく、アクチン結合性モーター myosinIIA にも結合する。さらにアクチンケーブルに沿ってマクロフ

ァージ特有の細胞骨格であるポドソームに微小管を運ぶといわれている。このポドソームはマクロファージの細胞移動に必須である。上記のような蛋白質間相互作用により、KIF1C は微小管とアクチンの仲介分子として細胞接着班様の構造体を制御すると考えられている。

本研究で取り上げる Kinesin-3 ファミリーでは Unc104/KIF1A が最も詳しく解析され

ている。KIF1A はN 末領域にモータードメイン、コイルドコイル領域、FHA ドメインを有し、これらの領域は KIF1C と相同性が非常に高い。そのため KIF1A と KIF1C は同じような分子制御機構をもつことが予想される。この FHA ドメインは情報伝達系においてリン酸化スレオニンを持つペプチドと結合することが知られている。KIF1A では、この FHA ドメインが隣接するコイルドコイル領域と分子内相互作用することによって単量体を形成し、自己阻害された不活性型構造を取ると考えられている (図 1)。しかし何らかの環境変化 (膜への局在化による KIF1A の濃度変化など) によりこの分子内相互作用が解除され、コイルドコイル領域が分子間相互作用することによって KIF1A は 2 量体化し、活性型になる。しかし今のところ KIF1A に内在するリン酸化スレオニン残基は同定されておらず、KIF1A の FHA ドメインは従来のものとは異なる分子認識機構をもつことが示唆される。しかし今までのところ KIF1C の立体構造基盤は明らかにされていない。

## 2. 研究の目的

本研究では KIF1C の FHA ドメインにおける単量体化に必要な最小構造を生化学的手法およびペプチドアレイを用いた分子生物学的手法によって決定する (図 2)。ペプチドアレイは、従来からライブラリーを扱うために広く用いられてきた酵母 two-hybrid 法やファージディスプレイ法などに比べ簡便であることが利点として挙げられる。アレイを用いて決定された認識部位のそれぞれのアミノ酸について、さらに同法にてランダム変異を行うことにより、より詳細な認識機構を解明する。ここで求められた重要な認識部位について KIF1C に変異導入することにより、単量体から 2 量体化の機構、すなわち KIF1C の活性化機構を分子レベルで探索する。また単量体から 2 単量体への変遷に必要な生理学的条件を生化学的に探索する。そして FHA ドメインとその分子内相互作用部位との複合体の結晶構造を決定する。

## 3. 研究の方法

FHA ドメインの大量調製を行い結晶構造を決定するとともに、ペプチドアレイを用いて KIF1C における FHA ドメイン結合領域のスクリーニングを行う。膜に結合した FHA ドメインを検出するに当たり、GFP 融合蛋白質を用いる、あるいは His タグで標識した FHA ドメインに対し His タグ抗体を用いて Far Western 法にて検出を行う。この結果を基に x 線結晶構造解析により立体構造決定を行うことを目指す。さらに表面プラズモン共鳴 (BIACORE)・蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET ; 図 3) などを利用して相互作用の定量化と評価を行う。また FHA ドメインを含む KIF1C 変異体を作成し、その多量体形成機構をゲルろ過法にて追跡することで、分子内相互作用の知見を得ることも試みる。

## 4. 研究成果

FHA ドメインおよびその周辺を含む領域の組み換え体を作成した (図 1)。また本キャンパス所有の Intavis 社ペプチドアレイ合成機を用いてペプチドアレイを作成した。15 段のペプチドが合成できていることを確認し、現在 far western 法の条件検討を行っている。また FHA ドメインの大量発現系は構築済みであるがその単体の立体構造はアメリカの構造ゲノムプロジェクトによって解かれたため、それを用いてモデルを構築中である。さらに、FHA ドメインの近傍領域を含む組換え蛋白質の多量体化の解析を化学修飾法・プロテアーゼによる限定分解法、ゲル濾過法にて行った。

まず大量調製した FHA ドメインについて、タンパク質分解酵素であるトリプシンとキモトリプシンを用いた限定分解法を行った (図 4)。CC1-FHA-CC2 は大きく限定分解をうけるが、最終的に CC1-FHA のサイズの安定化したフラグメントを残す。それに対し CC1-FHA については分解酵素に耐性を示した。トリプシンに感受性をわずかに示すが、ここで残ったフラグメントは FHA ドメインである。次にそれぞれの変異体についてゲルろ過法による多量体化の解析を行った (表 1)。FHA ドメインはこれまで報告されてきたドメイン同様単量体を示す。それに対して

CC1-FHA-CC2 は 2 量体構造をとることが示された。しかし CC1-FHA は単量体と 2 量体の 2 種類の構造が共存することがわかった。すなわち CC1 の領域が 2 量体化の制御に関わることが示唆される。一方、FHA-CC2 は 5 量体より大きいと考えられる分子量の位置に流出したことから、アグリゲーションをおこなっていると考えられる。これらの分子に関しては分析超遠心でさらなる解析を予定している。これまで韓国 KAIST の Eunjoon Kim 博士の生化学的・細胞生物学的解析から CC2 領域に存在する保存されたチロシン残基が KIF1 ファミリーの多量体制御機構に関わっていると示唆されているが、本研究では同様の結果が得られなかった。原因として、Kim 博士らは KIF1A を用いたのに対しここでは KIF1C を用いたこと、異なる手法で解析を行ったこと (Kim 博士らは蛋白質を精製しての実験は行っていない)、発現系の違い (本研究では大腸菌を用いたのに対し、Kim 博士らはすべて培養細胞にて変異体を作成している) などがあげられる。

現在 KIF1A の構築系を検討するとともに、KIF1C の CC1-FHA 領域の結晶化を行っている。微結晶まで確認できており、結晶化条件を改良している。結晶化・x 線回折像の収集ができ次第、PDB に登録された KIF1C の FHA ドメインを用いて分子置換法によって立体構造決定を行う。また FRET 法による解析のための組み換え体も構築中であり、これらもあわせて分子レベルでの解析を行う。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

MJ Plevin, **I Hayashi** and M Ikura, "Characterisation of a conserved "threonine clasp" in CAP-Gly domains: role of a functionally critical OH/ $\pi$  interaction in protein recognition", *J Am Chem Soc*, **12**, 14918-14919 (2008). 査読有

**林 郁子**, "微小管伸長端結合蛋白質の分子制御機構", *生化学*, **6**, 521-530 (2008) 査読無

[学会発表] (計 2 件)

T Maki & I Hayashi, "Crystal Structure of Microtubule binding protein CLASP2", Gordon Research Conference, 2009 年 7 月, 米国ニューハンプシャー州

真木孝尚、林郁子「微小管伸長端結合蛋白質 CLASP 2 の微小管安定化機構の解析」、第 32 回日本分子生物学会、2009 年 12 月、横浜

[その他]

ホームページ

<http://www.tsurumi.yokohama-cu.ac.jp/biophys/hayashi>

横浜市立大学大学院バイオエキスパート研究体験シリーズ「イオン濃度を測る・蛍光計測」(平成 22 年 5 月 29 日)にて研究成果の一部を公開

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

林 郁子 (Hayashi Ikuko)

横浜市立大学・生命ナノシステム科学研究科・准教授

研究者番号：80464527

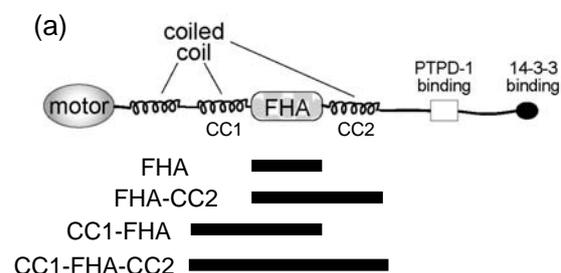
### (2) 研究分担者

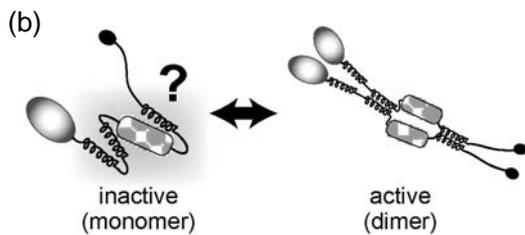
なし

### (3) 連携研究者

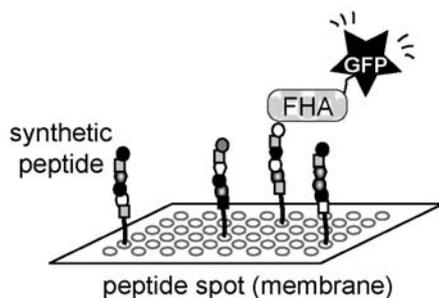
なし

(図 1) KIF1C のドメイン構造と本研究で構築した組み換え体 (a) と分子内相互作用による活性化の制御機構 (b)。

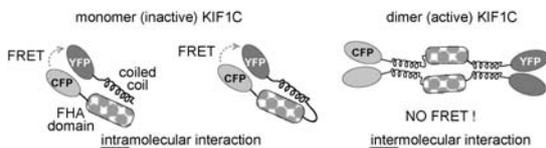




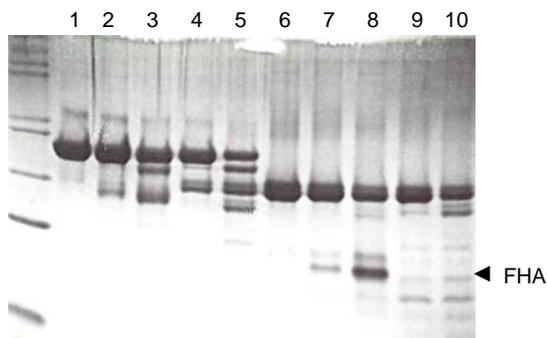
(図2) ペプチドアレイの原理  
 ペプチド上に標的蛋白質が結合しうるペプチドのライブラリを合成する。そのアレイに対し、蛍光標識した標的蛋白質を用いて結合実験を行うことで目的配列を決定する。



(図3) 蛍光蛋白質 (CFP, YFP) による FRET を用いての KIF1C 分子内相互作用解析法の原理



(図4) KIF1C 変異体のタンパク質分解酵素によるドメイン解析



レーン

- ① CC1-FHA-CC2
- ② CC1-FHA-CC2、トリプシン消化、4度
- ③ CC1-FHA-CC2、トリプシン消化、室温
- ④ CC1-FHA-CC2、キモトリプシン消化、4度

- ⑤ CC1-FHA-CC2、キモトリプシン消化、室温
- ⑥ CC1-FHA
- ⑦ CC1-FHA、トリプシン消化、4度
- ⑧ CC1-FHA、トリプシン消化、室温
- ⑨ CC1-FHA、キモトリプシン消化、4度
- ⑩ CC1-FHA、キモトリプシン消化、室温

(表1) KIF1C 変異体のゲルろ過法 (superdex75, 10/30) における流出時間と推定重合量

KIF1C 変異体 (分子量 kDa)	流出時間	重合量
FHA (12)	13.0	1
CC1-FHA (20.8)	10.8 9.3	1 2
FHA-CC2 (22.2)	8.2	~5
CC1-FHA-CC2 (31.0)	9.5	2