

機関番号：14603

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21770114

研究課題名（和文） 張力による細胞接着制御の構造的研究

研究課題名（英文） Structural study of the cell adhesion regulated by tension

研究代表者

平野 良憲 (HIRANO YOSHINORI)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・助教

研究者番号：50452529

研究成果の概要（和文）：

本研究では・カテニンの“力学センサー”としての機能に着目し、構造生物学的見地から、細胞張力非存在下の・カテニンおよび・カテニンとビンキュリンの複合体の立体構造を原子レベルで明らかとした。これにより張力依存的な・カテニンとビンキュリンの相互作用機構を原子レベルで可視化することに成功して、いかにして・カテニンが張力という物理的な情報を感知し、分子認識という生化学的な情報へと変換するのかを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

Structural studies of  $\cdot$ -Catenin especially focused on its novel function as a mechanosensor are promoted. As the result, we succeeded in visualizing the tension-dependent interaction between  $\cdot$ -Catenin and Vinculin at an atomic resolution. These results clarified the  $\cdot$ -Catenin mediated tension sensing mechanism, which converts physical information into biochemical reactions represented by a molecular recognition.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：構造生物学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物化学

キーワード：細胞接着、メカノバイオロジー、張力センサー、カテニン、分子複合体、結晶構造解析

## 1. 研究開始当初の背景

上皮細胞では細胞の側面に高度に発達した細胞接着システムが形成され、組織の形態形

成、細胞運動や細胞極性の形成・維持などの様々な役割を果たしている。接着分子であるカドヘリンは接着結合形成を担う主要な分

子であり、細胞膜動態の変化や細胞骨格系の再編成と協調的に接着結合を制御している。共同研究者である理化学研究所 CDB の米村博士らは・カテニンがアクチン-ミオシンの張力依存的にビンキュリンと結合することで、細胞内張力をカドヘリンへと伝搬する張力センサーとして細胞接着形成を制御していることを提唱していた。ビンキュリンについては全長の立体構造、・カテニンについては一部のドメイン構造の立体構造が明らかとなっている。しかし、・カテニンのビンキュリン相互作用領域の立体構造は不明であり、ビンキュリンと・カテニンの詳細な相互作用様式や、相互作用の阻害機構を説明できる構造モデルは存在しなかった。そこで、・カテニンの“力学センサー”としての機能に着目し、構造生物学的見地から、いかにして・カテニンが張力という物理的な情報を感知し、分子認識という生化学的な情報へと変換するのかを明らかにすることをという着想に至った。

## 2. 研究の目的

ビンキュリンと結合できない阻害状態の・カテニンの立体構造、ならびに・カテニンとビンキュリンとの複合体の立体構造解析を通じて、アクチンによる・カテニンとビンキュリンの相互作用の制御機構を、構造変化によるスイッチ機構の1つとして捉えて原子レベルで明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

本研究では自己阻害状態の・カテニンの立体構造と、ビンキュリンと結合状態の・カテニンの立体構造解析を行うことで、その詳細な相互作用と阻害機構を原子レベルで明らかにする。

*in vitro*再構成系において・カテニンと

ビンキュリンの結合アッセイ系を確立した。このアッセイ系を用いて、・カテニンのビンキュリン結合領域の絞込みを行った。その結果、ビンキュリン結合に必要な・カテニンの領域は数十残基であることを見出した。この結果に基づいて作成した種々の・カテニンのコンストラクトについて、大腸菌を用いたタンパク質発現系および精製系を確立して、ビンキュリンとの複合体として結晶化スクリーニングを行った。得られた結晶を用いて大型放射光施設 SPring-8 で X 線回折実験を行った結果、2.8 Å の X 線回折斑点を取得した。続いてセレノメチオニン置換タンパク質結晶を用いて X 線回折実験を行って得られたデータをもとに MAD 法によって位相決定を行って、立体構造を決定した。

自己阻害状態にある・カテニンのコンストラクトを複数作製し、これらについて、結晶化に要求されるタンパク質量、純度を確保できる大量発現系、精製系を確立した。これらの試料を用いて結晶化スクリーニングを行った結果、得られた結晶を用いて大型放射光施設 SPring-8 で X 線回折実験を行った結果、2.4 Å の X 線回折斑点を取得した。続いてセレノメチオニン置換タンパク質結晶を用いて X 線回折実験を行って得られたデータをもとに MAD 法によって位相決定を行って、立体構造を決定することに成功した。

得られた立体構造情報をもとに、張力センサーとしての構造機能相関を説明できるモデルの仮説を立てた。このモデルを実証するために以下の生物物理学的手法、生化学的手法および細胞生物学的手法を用いて解析を行った。張力による・カテニンの立体構造の可変性、柔軟性を解析するために、・カテニンの構造安定性の解析を行った。*in vitro*ブルダウンアッセイによる・カテニンとビンキュリンの相互作用実験により、・カテニン

の立体構造の安定性とビンキュリンとの相互作用の相関解析を行った。さらに、アクチン共沈降実験によってビンキュリンの活性化に与える・カテニンの作用、さらに張力が与えうる影響について解析を行った。また、共同研究者と協力して実際の細胞内における張力依存的な・カテニンとビンキュリンの相互作用を細胞生物学的手法で検証した。

#### 4. 研究成果

本研究において最も注力した、細胞張力非存在下の・カテニンの立体構造解析に成功した。細胞の張力非存在下では、・カテニンはビンキュリンと相互作用しないことから、いわゆる“阻害状態”の構造をとっていると考えられていたが、どのようにしてビンキュリンの結合を阻害しているのかは不明であった。阻害状態にある・カテニンは4本のヘリックスが束となって1つの堅い構造体となる four-helix bundle 構造から構成されていた。さらに、このヘリックスバンドル構造が互いに相互作用することで、より安定な構造体を形成していることが明らかとなった。このように、ビンキュリンとの相互作用部位は立体構造的観点から見ると、幾重にもロックされて、溶媒中に露出していないことから、ビンキュリンとの結合を妨げていることが初めて明らかとなった。

一方、細胞張力存在下では、・カテニンはビンキュリンと結合することが知られている。本研究では、・カテニンのビンキュリン相互作用部位を特定して、阻害領域を含まない結合最少領域とすることで、・カテニンとビンキュリンの複合体の立体構造解析にも成功した。その結果、驚くことに、・カテニンはヘリックスバンドル構造が崩壊して、これにより露出した・ヘリックスがビンキュリンと相互作用することが明らかとなった。

これら阻害状態、ビンキュリンとの結合状態の・カテニンの立体構造解析の結果、細胞張力存在下では、堅い構造をとった・カテニンの立体構造が部分的に崩壊して、これにより相互作用部位が露出して、ビンキュリンと相互作用することが示唆された。そこで、このような立体構造の可変性、柔軟性について検証した結果、ビンキュリン相互作用部位を含むヘリックスバンドル構造は、不安定であり、柔軟に立体構造変化を起こしうる構造であることが判明した。さらに、・カテニンの立体構造を人為的に不安定化させた変異体を作製して、ビンキュリンとの相互作用解析を行った結果、*in vitro*, *in vivo* のいずれにおいても、張力非依存的にビンキュリンと結合した。このように立体構造解析の結果を支持する結果が得られ、・カテニンの張力センサーとしての作用メカニズムを世界で初めて原子レベルで明らかにすることに成功した。

今後は、・カテニンの張力感受性を定量的に解析するため、共同研究者とともに原子間力顕微鏡を用いた、タンパク質の引張り実験を行う。併せて、*in vitro* での再構成系において、弾性基盤に・カテニンを固定化して、タンパク質を引張り、ビンキュリンとの相互作用の解析を行う。これにより、張力が直接的に・カテニンの立体構造変化を誘導していることを明らかにしたい。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計8件)

① Hirano, Y., Hatano, T., Takahashi, A., Toriyama, M., Inagaki, N. Hakoshima, T. Structural basis of cargo recognition

by the myosin-X MyTH4-FERM domain.

(2011) *EMBO J.* **30**, 2734-2747. 査読有

② 村瀬浩司, 平野良憲, 箱嶋敏雄 植物ホルモンの誘導されるタンパク質分解のメカニズム (2011) *実験医学*, **29**,

1989-1994. 査読無

③ 西村宜之, 平野良憲, 人見研一, 箱嶋敏雄 村瀬浩司 植物ホルモンの受容とシグナル伝達の構造基盤 (2011) *化学と生物*, **49**,

161-169. 査読無

④ Shibata, N., Kagiya, M., Nakagawa, M., Hirano, Y., Hakoshima, T. Crystallization of the plant hormone receptors PYL9/RCAR1, PYL5/RCAR8 and PYR1/RCAR11 in the presence of (+)- abscisic acid. (2010)

*Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun.* **60**, 456-459. 査読有

⑤ Hirano, Y., Murase, K., Hakoshima, T.

Mechanism of Hormone and Effector Recognition by the Gibberellin Receptor (2010) *Spring-8 Research Frontiers*, 24-25.

査読無

⑥ 村瀬浩司, 平野良憲, 箱嶋敏雄 ジベレリンの受容と情報伝達の分子メカニズム (2010) *植物の生長調節*, **45**, 40-48. 査読無

⑦ 箱嶋敏雄, 平野良憲, 村瀬浩司, Tai-ping Sun 植物によるジベレリンの感知とシグナル伝達 (2009) *生物物理*, **49**, 200-201.

査読無

⑧ 平野良憲, 村瀬浩司, 箱嶋敏雄 植物ホルモン受容体によるシグナル伝達制御の構造研究 (2009) *蛋白質核酸酵素*, **54**, 833-842.

査読無

⑧ 箱嶋敏雄, 村瀬浩司, 平野良憲, Tai-ping Sun ジベレリン受容体GID1によるジベレリン認識とその分子進化 (2009) *日本結晶学会誌*, **52**, 37-

査読無

[学会発表] (計 10 件)

① Hirano, Y., Hatano, T., Takahashi, A., Toriyama, M., Inagaki, N. Hakoshima, T.

Structural basis of cargo recognition by the myosin-X MyTH4-FERM domain.

XXII Congress and General Assembly of the International Union of Crystallography, 2011.8.24 マドリッド (スペイン)

② 平野良憲, 畑野大樹, 高橋彩, 箱嶋敏雄 Myosin-X の MyTH4-FERM ドメインによる積み荷認識機構の構造的基盤,

第 11 回 日本蛋白質科学会年会, 2011 年 6 月 7 日, 大阪

③ 箱嶋敏雄, 村瀬浩司, 平野良憲, Tai-ping Sun ジベレリン受容体のジベレリン識別とエフェクター認識の構造的基礎, 第 32 回日本分子生物学会年会, 2009 年 12 月 10 日, パシフィコ横浜 (神奈川県)

④ 平野良憲, 米村重信, 箱嶋敏雄

張力による細胞接着制御機構の解明に向けた  $\alpha$  カテニンの構造研究, 特定領域研究「生体超分構造」第 6 回公開シンポジウム, 2009 年 12 月 2 日 千里ライフサイエンスセンター (大阪府)

⑤ 平野良憲, 村瀬浩司, Tai-ping Sun, 箱嶋敏雄 植物ホルモン受容体によるシグナル伝達制御の構造的基盤特定領域研究「生体超分子の構造形成と機能制御の原子機構」第 5 回ワークショップ 2009 年 7 月 27 日 湘南国際村センター, 国際会議場 (神奈川県)

⑥ Murase, K., Rodolfo, Z., Hirano, Y., Hu, J., Olszewski, N., Jeong, S. Y., Hakoshima, T., Sun, T. P. Structure-function analysis of GA receptor and DELLA protein in Arabidopsis.

Plant Biology 2009 (Joint Annual Meetings of the American Society of Plant Biologists and the Phycological Society of America), 2009 年 7 月 20 日, ホノルル (アメリカ合衆国)

⑦ Murase, K., Hirano, Y., Sun, T. P., Hakoshima,

T., Mechanism of gibberellin perception and DELLA protein recognition by the Arabidopsis gibberellin receptor. Plant Biology 2009 (Joint Annual Meetings of the American Society of Plant Biologists and the Phycological Society of America), 2009年7月19日, ホノルル (アメリカ合衆国)

⑧ 村瀬浩司, 平野良憲, Tai-ping Sun, 箱嶋敏雄 植物核内受容体の作用機構

日本農芸化学会 2009 年度大会, 2009 年 3 月 28 日

福岡

⑨ 村瀬浩司, 平野良憲, Tai-ping Sun, 箱嶋敏雄 ジベレリンとその受容体、および DELLA タンパク質複合体の結晶構造

第 50 回日本植物生理学会年会, 2009 年 3 月 22 日, 名古屋

⑩ 平野良憲, 村瀬浩司, Tai-ping Sun, 箱嶋敏雄 ジベレリン受容体 GID1 による DELLA タンパク質認識の構造的基盤

第 31 回分子生物学会年会, 第 81 回日本生化学会大会合同大会, 2008 年 12 月 12 日神戸

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

平野 良憲 (HIRANO YOSHINORI)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・助教

研究者番号 : 50452529