

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 4 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22570115

研究課題名（和文）細胞接着・細胞運動制御に関与するネクチン様分子の構造生物学的研究

研究課題名（英文）Structure analysis of Nectin and Nectin like protein family

研究代表者

鈴木 守 (SUZUKI MAMORU)

大阪大学・たんぱく質研究所・准教授

研究者番号：40280507

研究成果の概要（和文）：

ネクチンおよびネクチン様分子の構造生物学的研究を行い、ネクチンに関しては世界に先駆けて立体構造を明らかにし、構造に立脚した接着メカニズムの提案を行った。ネクチン様分子に関しては昆虫細胞培養系の構築を行い、精製サンプルを得る条件を決定した。

研究成果の概要（英文）：

We determined the crystal structures of the entire extracellular region of nectin-1,2,3. In the crystal, nectin formed a V-shaped homophilic dimer through the first Ig-like domain. Structure-based site-directed mutagenesis experimental results indicate that, in contrast with the previous notion, our structure represents a cis-dimer. Thus, our findings clearly reveal the structural basis for the cis-dimerization of nectins through the first Ig-like domains.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：構造生物学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物学

キーワード：構造生物、細胞接着分子

1. 研究開始当初の背景

細胞接着の開始は、増殖しながら運動している細胞同士が衝突して接触することにより行われる。細胞の増殖と運動を促進するネクチン様分子(Necl)が細胞の運動先端において、細胞接着分子ネクチンとヘテロフィリックトランス結合することにより細胞の増殖と運動が停止され、ネクチンとカドヘリンによるアドヘレンスジャンクションが形成さ

れる。ネクチンは1～4、ネクチン様分子(Necl)は1～5のメンバーからなるファミリーを形成している。ネクチン、Neclは同じ分子構造を取っているが、1次配列の相同性は20%と低い。ネクチン、Neclは、まず同じ細胞膜上でシスダイマーを作り、次に他の細胞膜上のシスダイマーとホモフィリックトランス結合をする。さらにシスダイマーはヘテロフィリックトランス結合もする。これらのシス、トランスの結合は細胞生物学的に研究

されているが、分子構造に立脚した議論はこれまでなされていない。重要な点は、アドヘレンスジャンクション接着分子としてよく知られているカドヘリンは細胞間でホモフィリック結合のみしかできない。ネクチン、necl が有するヘテロフィリックトランス相互作用能力こそが細胞の空間配置に大きくかかわる重要な機能である。例を挙げると内耳コルチ器において有毛細胞とその支持細胞が形成するチェックボードパターン形成にネクチン1とネクチン3が関与していることが近年明らかになった。それ以外には、神経シナプスでは前シナプスにネクチン1が後シナプスにはネクチン3が発現して、細胞間接着を担っている。ネクチンおよび Necl の機能解析は進んでいるものの、分子構造に立脚した接着メカニズムの理解は進んでいない。

2. 研究の目的

X線結晶構造解析を主たる手段とし、ネクチン様分子 (Necl) の単独の高分解能構造を解くことを第一目標とし、次に Necl のヘテロフィリック複合体の構造解析にも果敢に挑戦する。以上の結果と細胞生物学および生化学的研究により得られる知見を統合し、Necl が関与する細胞接着、細胞運動制御のメカニズムを原子レベルで解明することが最終目標である。

Necl-5 は N 末端の 2 つの Ig のドメインの結晶構造が明らかになっているが、ウイルス感染のレセプターとしての興味から研究が行われており、細胞接着・細胞運動制御機構を説明するものはない。また、Necl-1 は N 末端の 1 個の Ig フォールドのみの構造が明らかにされているが、細胞膜上でのシスダイマーやトランスダイマーの構造、さらにヘテロフィリック、ホモフィリックの相互作用に関して有用な情報を与えていない。我々がすでに構造解析に成功しているネクチン1に加え、Necl ファミリーの構造が明らかになれば、細胞表面での接着、運動制御のメカニズムを立体構造に立脚して議論できると考えている。

3. 研究の方法

独立行政法人製品評価技術基盤機構よりヒト由来の Necl-1~5 の遺伝子の分譲を受けている。Necl-2、Necl-5 に関しては細胞外領域の大腸菌を用いた発現確認と封入体としての精製法および、大希釈法による巻き戻し条件の検討を行っている。細胞外領域の結晶構造解析と並行して、Necl がもつ 3 つの Ig ドメインの個々の役割について検討するため、各ドメインの高分解能構造解析も進める。

a) Necl-1~5 の細胞外領域のコンストラクト作製

b) 発現系の検討
大腸菌の strain (6 種類)、vector (6 種類) の組み合わせにおいて可溶性画分として目的蛋白質を得られる条件を検討し、すべて条件において封入体になってしまう場合は、ネクチンの解析で確立した以下の精製方法(c~h)を行う。

c) 封入体の精製

d) 尿素による封入体の可溶化

e) 大希釈法による refolding 条件の検討
最適なアルギニン、還元・非還元グルタチオン、pH、タンパク濃度条件を決定する。

f) 巻戻し体の濃縮 (Midjet System を利用)
g) ゲル濾過、イオン交換クロマトグラフィによる精製

h) SDS 電気泳動、Native 電気泳動によるサンプルの状態の確認

i) 結晶化
初期スクリーニングには微量の蛋白質で結晶化が可能な TOPAZ 装置を用いる。結晶化条件の精密化には汎用結晶化装置 Phoenix を用いる。(マルチドメイン蛋白質であるが故、結晶化は困難を伴うことと予想される)

J) 回折データ収集と位相決定
我々が明らかにしたネクチン-1, 2 の立体構造をモデルとした分子置換法により位相決定を試みるとともに、セレノメチオニン置換サンプルも準備する。

大腸菌大量発現系により結晶構造解析に十分量の蛋白質が取れない場合には、細胞外蛋白質で実績のある昆虫細胞大量発現系の構築を試みる。

4. 研究成果

23 年度は封入体として発現した Necl の大希釈法による refolding の条件を決定し、微小結晶得ることに成功した。しかし、収量が低いことと、refolding した試料の構造が本来の構造と部分的に異なるという事象がネクチンの構造解析で明らかになったため (未発表データ)、今年度は可溶性画分として試料を得るため、昆虫細胞を利用した大量発現系構築を行った。Necl-1, 2, 3, 4 について発現を確認することができた。Necl はいずれも分

分子量が 34 kDa 付近であるが、SDS-PAGE で示唆される分子量は本来の分子量よりも大きく、しかも種類によって異なっていた。これは各蛋白質の糖鎖修飾状況の差を反映していると考えられる。

Nec1 の中で一番糖鎖修飾部位が少ない Nec1-1 について結晶化を試みた。昆虫細胞にウイルスを感染させて 72 時間後に回収した培養液に分泌されている Nec1-1 を Ni-NTA アガロースカラムで回収し、更に 2 種類の陰イオン交換カラム (Htrap-Q, Mono-Q) で精製した。第二世代ウイルス液を培養液の 1/100 量添加する条件で、培養液 1L あたり、5 mg 程度の精製蛋白質を得ることが出来た。これを 25 mg/ml にまで濃縮し、種々の結晶化キットを用いて 23° C でスクリーニングを行ったところ、複数の条件で、菱形の微小結晶を得ることに成功した。放射光施設において X 線回折実験を行ったが、回折点を観測することはできなかった。今後、結晶化条件を最適化することにより結晶サイズ、結晶性を改善していく予定である。Nec1-2, 3, 4 についても、順次精製結晶化を遂行する予定である。

ネクチン 1 の結晶構造に関して 2011 年のネクチン 2 の結晶構造に関して 2012 年にアメリカ結晶学会年会で発表を行った。さらに昆虫細胞系を利用し、ネクチン 3 の構造解析にも成功した。そして、我々が解析したネクチン 1, 2, 3 の構造比較を行い、結果を報告した。

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 5 件)

1. Yamamoto, K., Higashiura, A., Suzuki, M., Aritake, K., Urade, Y., Udome, N., Nakagawa, A. : "Crystal structure of a Bombyx mori Sigma-1 class glutathione transferase exhibiting prostaglandin E synthase activity." *Biochim Biophys Acta* 1830, 3711-3718(2013) 査読あり

2. Yamamoto, K., Usuda, K., Kakuta, Y., Makoto Kimura, M., Higashiura, A., Nakagawa, A., Suzuki, M. : "Structural basis for catalytic activity of a silkworm Delta-class glutathione transferase". *Biochim Biophys Acta.*, 1820, 1469-1474(2012) 査読あり

3. Chavas LM, Matsugaki N, Yamada Y, Hiraki M, Igarashi N, Suzuki M, Wakatsuki S Beamline AR-NW12A: high-throughput beamline for macromolecular crystallography at the Photon Factory.

J Synchrotron Radiat. 19, 450-454. (2012) 査読あり

4. Narita, H., Yamamoto, Y., Suzuki, M., Miyazaki, N., Yoshida, A., Kawai, K., Iwasaki, K., Nakagawa, A., Takai, Y., Sakisaka, T. : "Crystal structure of the cis-dimer of nectin-1 : Implications for the architecture of cell-cell junctions" *The Journal of Biological Chemistry* 286, 12659-12669 (2011) 査読あり

5. Narita, H., Nakagawa, A., Yamamoto, Y., Sakisaka, T., Takai, Y., Suzuki, M. : "Refolding, crystallization and preliminary X-ray crystallographic study of the whole extracellular regions of nectins" *Acta Crystallographica Section F* 67. 344-348 (2011) 査読あり

[学会発表] (計 13 件)

1. 成田宏隆・中川敦史・鈴木守 : "ネクチン・ネクル分子群の構造解析" 物構研サイエンスフェスタ. (2013/03/14~2013/03/15) . つくば

2. 中倉 由香子, 秋吉 由佳里, 合田 名都子, 成田 宏隆, 鈴木 守, 天野 剛志, 浜田 大三, 藤原 芳江, 中川 敦史, 古瀬 幹夫, 廣明 秀一 : "細胞接着装置の制御に関わる LNX1PDZ2 の構造・機能解析" 第 35 回 日本分子生物学会年会. (2012/12/12 ~ 2012/12/16). 福岡

3. Mamoru Suzuki, Hirotaka Narita, Atsushi Nakagawa : "Crystal Structure Analysis of Nectin and Nectin-Like-Molecule Family(II)" Meeting of the American Crystallographic Association. (2012/07/28-2012/07/01) . Boston, MA, USA

4. Mamoru Suzuki : "A little more until sunrise" Sapporo Symposium on Advanced Protein Crystallography. (招待講演) (2012/03/17) 札幌

5. 成田宏隆・藤原芳江・中川敦史・鈴木 守 : "細胞接着分子ネクチンおよびネクチン様分子の X 線結晶構造" 第 29 回 PF シンポジウム. (2012/03/15-2012/03/16) つくば

6. 成田 宏隆, 中川 敦史, 鈴木 守 : "細胞接着分子ネクチンおよびネクチン様分子の X 線結晶構造解析" 日本結晶学会年会. (2011/11/24-2011/11/25) 札幌

7. 成田 宏隆、中川 敦史、鈴木 守：“ネクチン・ネクル分子群の構造解析の試み” 第28回 PF シンポジウム.

(2011/07/11-2011/07/13) . つくば

8. Mamoru Suzuki, Hirotaka Narita, Atsushi Nakagawa: “Crystal structure analysis of nectin and nectin like molecule family” Meeting of the American Crystallographic Association.

(2011/05/28-2011/06/02) . ニューオーリンズ, USA

9. 成田宏隆、中川敦史、鈴木守：“ネクチン・ネクル分子群の構造解析の試み” 第28回 PF シンポジウム.

(2011/03/14-2011/03/15) つくば (震災のため中止、要旨はシンポジウムの Web 上に公開済み)

10. 成田宏隆、中川敦史、鈴木守：“細胞間接着・細胞運動に関わるタンパク質の構造解析に向けた取組み” 第24回日本放射光学会放射光科学合同シンポジウム.

(2011/01/07-2011/01/10). つくば

11. 藤原芳江、合田名都子、里村香織、成田宏隆、中川敦史、匂坂敏朗、鈴木守、廣明秀一：“ネクチン3のC末端配列と結合したアフアディン PDZ ドメインの構造解析” BMB 2010(第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会 合同大会).

(2010/12/07-2010/12/10). 神戸

12. 成田宏隆、中川敦史、岩崎憲治、匂坂敏朗、高井義美、鈴木守：“細胞間接着分子ネクチン-2の構造生物学的研究” 日本結晶学会年会. (2010/12/03-2010/12/05). 大阪

13. 成田宏隆、中川敦史、岩崎憲治、匂坂敏朗、高井義美、鈴木守：“ネクチンファミリーの結晶構造解析” 第10回日本蛋白質科学会年会. (2010/06/16-2010/06/18). 札幌

[その他]

ホームページ等

http://www.protein.osaka-u.ac.jp/rcsfp/supracryst/suzuki/index_ja.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 守 (SUZUKI MAMORU)

大阪大学・蛋白質研究所・准教授

研究者番号：40280507