

平成 22 年 5 月 31 日現在

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20770093

研究課題名（和文）

細胞骨格制御タンパク質の構造機能相関の解明

研究課題名（英文）

Structural analysis of cytoskeletal regulatory protein

研究代表者

末次 京子 (Suetsugu Kyoko)

独立行政法人理化学研究所・システム研究チーム・研究員

研究者番号：40391990

研究成果の概要（和文）：

WAVE2 のホモログである N-WASP と結合する Pacsin2 の EFC/F-BAR ドメインの構造解析に成功した。明らかにした構造から、タンパク質の表面電荷および疎水アミノ酸からなるループを利用して膜と結合することにより Pacsin2 は脂質膜上でリング構造を作り、膜のチューブ化を引き起こすことを、変異体を用いた *in vitro* の実験により示した。さらに Pacsin2 は細胞のスパイク構造の基部の部分に局在することを確認し、細胞のスパイク化に関与しておりスパイク化にも、膜の形状から推察されるように膜のチューブ化と同じ表面電荷および疎水アミノ酸からなるループを利用して関与していることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

We solved the crystal structures of N-WASP binding protein; EFCLpacsin2 (residues 1-343; EFC/F-BAR domain + C-terminal extension) and EFCSpacsin2 (residues 1-305; EFC/F-BAR domain) at 2.7 and 2.0 Å resolutions, respectively. We found that overexpression of the pacsin2 EFC/F-BAR domain induced cellular microspikes, with the pacsin2 EFC/F-BAR domain concentrated at the neck. The hydrophobic loops and the basic amino-acid residues on the concave surface of the pacsin2 EFC/F-BAR domain are essential for both the microspike formation and tubulation. Since the curvature of the neck of the microspike and that of the tubulation share similar geometry, the pacsin2 EFC/FBAR domain is considered to facilitate both microspike formation and tubulation.

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	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：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：細胞骨格 X線構造解析 細胞膜 タンパク質 シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

多細胞生物にとって統制のとれた一つの細胞の形態の変化や細胞移動は、一つの生命体として個体を維持するために絶対必要不可欠なものである。例えば、生物の発生の過程において、個々の細胞はそれぞれの機能をもった細胞に分化して行く際に、それぞれの機能に適した形態へと形を変え、移動を行う。また、外傷を受けた皮膚における修復においては、細胞の速やかな増殖移動が見られる。がん細胞においては患者の予後を決定づけるがん転移は、細胞運動による移動に他ならない。従って、細胞運動の分子メカニズムを理解する事は、基本的な生命現象の解明という点はもちろん、医学的見地においても非常に重要である。

これまで細胞運動、細胞分裂、細胞接着、エンドサイトーシスなどの多様な生体反応において動員されるのはアクチン細胞骨格である。細胞の移動する先端でアクチン重合が起こり、糸状仮足（フィロポディア）や葉状仮足（ラメリポディア）といった構造を作る。これらのアクチン細胞骨格の構築は細胞が移動するために必要な駆動力を発生するのに必要不可欠である。

これまでアクチン細胞骨格を形成させるシグナル伝達は、RhoファミリーのGTP結合タンパク質であるRho、Rac、Cdc42がそれぞれ異なるシグナル伝達を介して制御している事が明らかとなっている。アクチンの重合は7つのサブユニットからなるArp2/3 complexが核となり起こる事が知られているが、Rho family タンパク質からのシグナルをArp2/3 complexにつなぐタンパク質がWAVE-WASP protein family (N-WASPファミリータンパク質) である。しかし、実際に細胞内外からシグナルがどのように伝達され、最終的にArp2/3 complexが活性化されるのか、その詳細な分子制御メカニズムについては明らかになっていない。

N-WASPファミリータンパク質であるWAVE2は、Abi-1、HSPC300、Sra-1、Nap1の4種類のタンパク質を結合したWAVE2複合体を形成する。このうちWAVE2、Abi-1、HSPC300の3つのタンパク質は核となる複合体を形成している。WAVE2は、N末端側に、WAVE homology domain (WHD) というAbi-1やHSPC300との結合に必須のドメインを持ち、そのすぐ後ろに酸性アミノ酸が連なる領域があり、この領域がイノシトール三

リン酸(PtdIns(3,4,5)P₃)と得意的に結合する事が知られている。タンパク質の中心付近にはプロリンが豊富に含まれる領域があり、SH3ドメインを持つタンパク、Profilin、IRSp53が結合する。C末端側にVCAドメインにはアクチン重合の中心核となるArp2/3 complexが結合しアクチン重合が促進され、葉状仮足（ラメリポディア）が形成されると考えられている。従って、VCAドメインとArp2/3 complexの結合がどのように制御されているのか解明する事が、WAVE2の制御機構の理解のために必要である。そのためにはVCAドメインを含むWAVE2の構造解析が必要不可欠である。

WAVE2の複合体形成はその局所的な活性化および安定性に必須であることが判明しているが、WAVE2のWHDの立体構造は未だ報告されておらず、Abi-1やHSPC300との相互作用様式も判明していない。また葉状仮足形成は低分子量Gタンパク質Racによって主に制御されていると考えられているがWAVE2とRacは直接結合しないことから、RacによるWAVE2複合体の制御メカニズムについても研究者間での見解に相違が見られ、統一的な理解には至っていない。さらにWAVE2が、Arp2/3複合体に働きかけるか否か、どのように制御されているか全く明らかでなかった。

2. 研究の目的

N-WASPファミリータンパク質は、アクチン重合による細胞骨格制御を伝える、タンパク-タンパク、細胞膜-タンパクをつなぐ要のタンパク質であると考えられている。そこで本研究ではN-WASPファミリータンパク質および、その結合タンパク質の構造機能解析によりアクチン細胞骨格の分子レベルでの制御メカニズムの解明を目指す。

現在、N-WASPファミリータンパク質が、Arp2/3複合体をどのように制御しているのか分子レベルでは全く明らかでない。N-WASPファミリータンパク質の構造解析により得られる情報は、分子レベルでの制御システムの解明へとつながると大きく期待できるものである。本研究では特に、N-WASPファミリータンパク質の中のN-WASPとWAVE2を中心に、その結合タンパク質も合わせて構造解析を行っていく。

3. 研究の方法

- (1) WAVE2, および WAVE2 結合タンパク質である HSPC300, Abi1, Sra1, Nap1, Rac, IRSp53 タンパク質の安定発現領域を大腸菌 S30 を

用いた Cell free system を用いて、検索する。申請者が所属する研究室において、PCR によるリニアテンプレートを用いて、in vitro でも微量合成系が確立されており、システムティックに多数のサンプルを一度に処理することが可能である。既にコンストラクト作成のテンプレートとなる各種タンパク質の cDNA は準備してある。タンパク質の安定発現領域の検討には、個々のタンパク質の発現領域の検討、精製の為のタグの検討 (His タグ、Flag タグ、GST タグ、Myc タグ)、タグ切断に用いるプロテアーゼの検討 (スロンピン、PreScission、TEV)、合成条件の検討 (合成温度、合成時間、PEG の有無、シャペロンの有無、S30 の精製ロットなど) を行い、結晶化に適した安定で均一の品質を持った大量のタンパク質が精製できる条件を検討する。

- (2) 安定発現領域と条件が確認された個々のサンプルを in vitro in vitro 発現ベクターに組みこむ。
- (3) 大腸菌 S30 を用いた Cell free での安定発現領域が見つからなかった場合、293 細胞を用いた発現系、バキュロウイルスを用い発現系に切り替えを検討し、これらの発現系に適した発現ベクターに目的タンパク質をクローニングし、少量スケールで培養、精製を試み、タンパク質の安定発現領域を検討する。
- (4) 各タンパク質の安定発現領域の確定、及び発現系の特定が出来たら、発現コンストラクトを作成する。
- (5) それぞれのタンパク質の、それぞれの発現領域を組み合わせ、大量かつ安定に複合体の精製が可能な組み合わせの共発現の手順、発現方法、精製方法を検討し、質、量、共に結晶化に適した状態のタンパク質の精製を検討する。
- (6) 精製したタンパク質が結晶化に適した精製度、及び均一な性質を持っているかを検討するため、N 末端アミノ酸分析、動的光散乱、質量分析を行う。
- (7) 精製されたタンパク質が結晶化に適さない不均一な淡白であった場合、また in vitro、in vivo のどちらの系においても、全く安定発現領域が見つからなかった場合、発現段階から、共発現を検討する。
- (8) 単体での安定発現領域が見つからなかった場合、共発現で安定発現する領域、および発現系が無いかを検討する。
- (9) 精製したサンプルの結晶化を行う。結晶化には結晶化ロボットを用いて、一

度に大量かつ、迅速にスクリーニングを行う。スクリーニングには一般に市販されている結晶化キット (を用いて、蒸気拡散法及びオイルバッチ法を用いて行う。

- (10) 微結晶化が得られたら、X 線回折実験に適した結晶になるよう、結晶化の細密化を行う。また、結晶が得られなかった場合、精製方法の検討、コンストラクトの検討を行う。
- (11) WAVE2 と PtdIns (3, 4, 5) P3 の複合体については、共結晶化による方法と、WAVE2 の結晶にソーキングする方法の 2 種類を行う。
- (12) 得られた結晶を用いて、X 線回折実験を行う。回折実験にはより高い分解能を得る為に、大型放射光施設の X 線発生装置を用いて回折実験を行う。また、分解能が低い場合、もしくは全く反射がえ得られなかった場合は、異なる結晶化条件で結晶化を行う。
- (13) 回折データから電子密度を計算し、タンパク質の 3 次元構造の分子モデリングを行う

4. 研究成果

当研究により、N-WASP と WIP を HEK293 細胞で共発現させる系を構築し、細胞に内在する Native の Actin を利用し、N-WASP+WIP+Actin の 3 者複合体タンパク質の調製が可能であることを確認した。現在、大量調製および結晶化を試みる事が可能となった。また、N-WASP 結合タンパクである Pacsin2 の EFC/F-BAR ドメインの構造解析に成功した。明らかにした構造から、タンパク質の表面電荷および疎水アミノ酸からなるループを利用して膜と結合することにより Pacsin2 は脂質膜上でリング構造を作り、膜のチューブ化を引き起こすことを、変異体を用いた in vitro の実験により示した。さらに Pacsin2 は細胞のスパイク構造の基部の部分、すなわち、膜のチューブと同様の巻く形状を持つところに局在することを確認し、細胞のスパイク化に関与しておりスパイク化にも、膜の形状から推察されるように膜のチューブ化と同じ表面電荷および疎水アミノ酸からなるループを利用して関与していた。

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 1 件)

Mapping of the basic amino-acid residues responsible for tubulation and cellular protrusion by the EFC/F-BAR domain of pacsin2/Syndapin II.

Shimada A, Takano K, Shirouzu M,
Hanawa-Suetsugu K, Terada T, Toyooka K,
Umehara T, Yamamoto M, Yokoyama S,
Suetsugu S. FEBS Lett. 2010 Mar
19;584(6):1111-8. Epub 2010 Feb 24. <
査読有り>

〔学会発表〕（計 0 件）

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

末次 京子 (Suetsugu Kyoko)

独立行政法人理化学研究所・システム研究チ

ーム・研究員

研究者番号：40391990

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者