

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：14603

研究種目：新学術領域研究(研究領域提案型)

研究期間：2010～2014

課題番号：22121002

研究課題名(和文)動物・植物細胞のシグナル検知と伝達の構造生物学

研究課題名(英文)Structural biology of animal and plant signaling proteins

研究代表者

箱嶋 敏雄(Hakoshima, Toshio)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・教授

研究者番号：00164773

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 233,500,000円

研究成果の概要(和文)：動物細胞由来の細胞内シグナル伝達タンパク質複合体では、細胞運動で重要な低分子量Gタンパク質RacのGEFであるTiam1や、運動方向への小胞輸送に関するmyosin-X、あるいは力学応答に関するタンパク質のa-cateninの構造決定で成果を挙げた。また、三量体Gタンパク質とその阻害剤、難病の神経繊維腫症IIタンパク質とDCAF-1、あるいはサリドマイドとその標的タンパク質cereblonとの複合体等の構造研究でも成果を挙げて、医学・薬学の基礎に貢献した。植物細胞では、新しいホルモンのストリゴラクトンやカリキンの受容体で成果を挙げて植物科学に貢献した。

研究成果の概要(英文)：We pursued structural studies of signaling protein complexes important in cell biology of mammalian and plant cells. Using X-ray crystallography, we revealed three-dimensional structures of the PHCCEX domain of RacGEF Tiam1, the cargo-recognition domain of myosin-X and mechano-sensing domain of a-catenin. We also determined the structures of medically important complexes, the trimeric G protein Gq-YM254890, merlin-DCAF-1 and thalidomide-celeblon complexes. Our contribution to plant biology is based on our structure determination of receptors of newly-established hormones, strigolactone and karrikin receptors.

研究分野：生物科学(構造生物化学 生物物理学)

キーワード：構造生物学 生化学 細胞生物学 分子生物学 生物物理学 タンパク質 相互作用

1. 研究開始当初の背景

シグナルの受容・応答・伝達を通して細胞機能を制御する動的な制御複合体の構造解析を目指す構造生物学の「第三の波」の時代が幕開けつつあった。

2. 研究の目的

動物細胞では、(1) 細胞運動、(2) 運動の方向、(3) 力学的応答ならびに医学的に重要なシグナル制御、植物細胞では、(4)植物ホルモン受容体と、(5)その下流の細胞内シグナル伝達に関わるタンパク質の形成する制御複合体の構造生物学を展開する。

3. 研究の方法

本研究で提案する構造生物学の研究では、タンパク質化学的手法での試料調製や機器を使った機能解析、精製タンパク質試料の結晶化等を経た構造解析、ならびに、変異実験や構造データベース等を活用した構造特性の解析の三部から構成される。

タンパク質化学：ここでの実験では、「如何に高度に精製可能で安定な試料を調製できるか」がポイントとなる。標的タンパク質が複数の機能ドメインから構成されており、大腸菌等での組み換えタンパク質の発現が困難である場合には、昆虫細胞中でのバキュロウイルス Sf9 を用いた発現系で全長タンパク質の発現を検討する。タンパク質が発現しても、非特異的の会合や自己分解等により精製が困難である場合もある。本研究では、配列解析や過去の発現良好なドメインを参考にして、機能ドメインの種々の発現系を設計して、よりよいタンパク質発現系の構築を試みる。得られた試料については、活性測定や現有の BIAcore (表面プラズモン測定装置) や ITC (滴定型熱測定装置) 等を用いた結合実験により機能解析する。

結晶化と構造解析：本研究室では、結晶化ロボット (現有) を利用した微量 (0.3 μ l) 結晶化に実績がある。5mg のタンパク質試料で、約 1,000 通りの結晶化条件の探索ができる。通常、約 3,000 通りの結晶化条件を探索する。結果が思わしくない試料は前段階に戻り、発現コンストラクト等の再検討を行う。結晶化に適さないと判断した試料は、同位体ラベル試料を調製して、NMR (800MHz 現有) による構造解析を検討する。結晶が得られた試料については、セレノメチオン誘導試料結晶も調製して、SPRING-8 での放射光実験により X 線強度データを収集する。X 線照射による損傷を抑えるために、液体窒素により瞬間凍結する。この時、結晶まわりの湿度を厳密に調節して瞬間凍結させるという最新の方法を用いて、結晶の X 線回折の分解能が最大になるように検討する。構造解析は、自前のワークステーションや計算サーバを駆使して迅速に推進する。

構造特性解析：得られた構造に基づいて、

点変異実験を組み合わせた機能解析により、活性部位や機能部位、それらの制御部位についての実験データを収集する。また、関連するタンパク質や、その機能ドメインの既知構造をデータベースから検索してきて、構造決定したタンパク質や複合体の構造と詳細に比較して、構造特性を残基レベル、原子団レベルで解析する。特に、阻害剤が結合したタンパク質キナーゼドメインや標的分子と結合した機能ドメインについては、特異性や結合力の改善の指針となるような構造特性を検索する。また、イノシトールリン酸やペプチド等の標的分子を真似た阻害剤設計の基礎構造データを抽出する。

4. 研究成果

動物細胞のシグナリング

(1) 細胞運動：葉状仮足を発達させる RacGEF の Tiam1 の活性化に必要な新たな膜・膜タンパク質相互作用である PHCCEx ドメインの構造を決定した。PHCCEx ドメインは新規な Ex サブドメインを含む 3 つのサブドメイン (PH と CC と Ex) からなり、接着分子 CD44 や Ephrin あるいは PAR3 等がもつ酸性ペプチドとの結合のための溝を分子表面に形成することがわかった。また、CD44 は Tiam1 と ERM タンパク質の両者に同時に結合できることも示した。

(2) 運動の方向：動物細胞は糸状仮足等の先端部で遊走因子等を検知しながら移動の方向を決定する。糸状仮足の発達に必須であり、その先端部に遊走因子等の受容体を運ぶ myosin-X の積荷認識ドメイン (MyTH4-FERM ドメイン) と DCC (axon guidance cue の一つである netrin の受容体) の複合体構造を決定した。DCC は α -helix を巻いて myosin-X 積荷認識ドメインの FERM ドメインのサブド

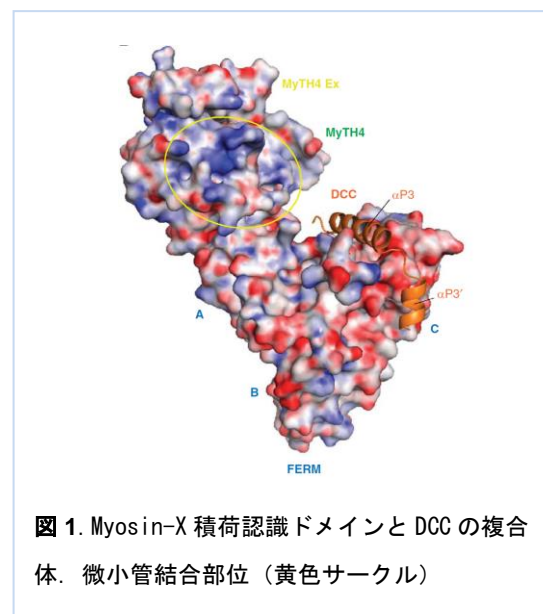


図 1. Myosin-X 積荷認識ドメインと DCC の複合体。微小管結合部位 (黄色サークル)

イン C により認識されることが明らかとなった。一方、微小管はその特徴的な C-末端酸性 tail で MyTH4 ドメインと結合するところが分か

った。更に、両者は競合することを初めて明らかにした (図 1) (論文 2)。

(3)力学的応答：接着結合 (adherens junction, AJ) で力学センサーとして働く α -catenin の vinculin との複合体や自己阻害状態の高分解能結晶構造 (2.5 Å) を決定した。構造に基づいて張力応答の異なる変異を作出して三次元細胞培養の細胞塊の形態への影響を解析した結果、極めて弱い力への応答阻害で形態

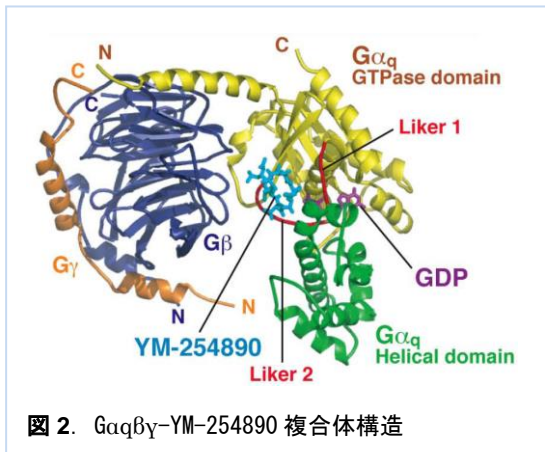


図 2. Gαqβγ-YM-254890 複合体構造

変化が生じることを見出した (投稿中)。

以上に加えて、奈良先端大の伊東教授 (A01 公募研究) との共同研究で、三量体 G タンパク質の阻害剤複合体で成果を挙げた (図 2) (論文 1)。

また、神経繊維腫症 II (NF-II) の原因タンパク質 merlin と CRL4 型 E3 リガーゼの基質アダプター DCAF-1 との複合体等、あるいはサリドマイドと奇形発症の標的タンパク質 cereblon の複合体の構造決定で成果を挙げた。サリドマイドは薬学史に残る薬禍のもととなった催奇性薬剤 (しかし優れた鎮痛剤) と

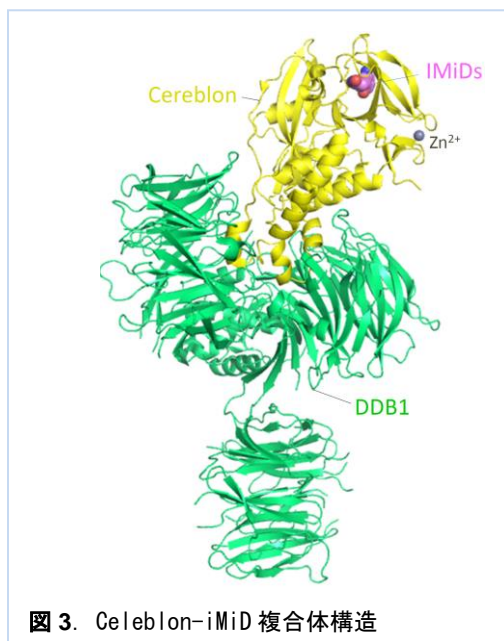


図 3. Celeblon-iMiD 複合体構造

して有名であり、長らく標的分子がわからなかったが、2010 年にビーズ技術で半田教授等 (東京医科大) によって標的候補 cereblon (ユビキチン化酵素 E3 の基質認識アダプター) が単離されてから一気に研究が進んだ。特に、この薬剤や誘導体レナリドマイド等 (米国製薬会社 Celgene が開発) が優れた免疫調整剤 (iMiDs) や抗癌剤であることが発見されるとともに、最近になって cereblon に結合する E3 基質として抗癌作用に関係する基質 (Ikaros や Aiolos) も同定された。我々は半田研と共同研究を始めて、サリドマイドが cereblon の C-末のサブドメインにグルタリミド基の方から結合することを見出した (図 3) (論文 3)。この結果はフタルイミド側で Ikaros や Aiolos と相互作用することを示唆しており、続報を執筆中である。

植物細胞のシグナリング

(4,5) ホルモン受容体とその下流：茎の枝分かれを抑制する植物ホルモンであるストリゴラクトン (SL strigolactone) やカリキン (KAR karrikin、煙因子として植物の「環境ホルモン」) の受容体候補 D14 と D14L の構造決定や、高親和性アブシジン酸受容体 PYL9 の構造決定で成果を挙げた。D14 と D14L については、等温滴定熱測定 (ITC) を用いて、SL と KAR がそれぞれに直接結合することを初めて証明した。また、SL と D14L、ならびに KAR と D14 は結合しないことも示した。D14 は α/β -hydrolase superfamily に属しており、タンパク質の中心部に基質結合ポケットをもち、4 本の挿入 α -helix が蓋をしてい

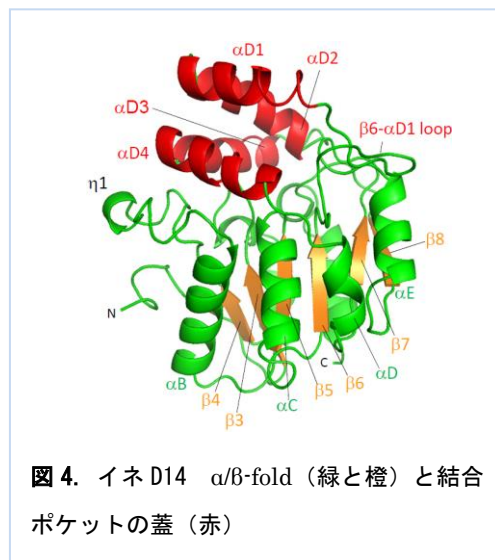


図 4. イネ D14 α/β -fold (緑と橙) と結合ポケットの蓋 (赤)

ることがわかった (図 4)。活性残基は保存された配置をとり PMSF と結合することがわかった。カリキンの受容体候補 D14L についても構造決定して構造的特徴を明らかにした。

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 9 件)

- ① Mechano-adaptive Sensory mechanism of α -catenin under tension. Maki, K., Han, S.-U., Hirano, Y., Yonemura, S. Hakoshima, T. and *Adachi, T. *Scientific Reports* **6**, 24878, doi: 10.1038/srep24878 (2016). 査読有
- ② Structure of the free form of the N-terminal VH1 domain of monomeric α -catenin. Shibahara, A., Hirano, Y. and *Hakoshima, T. *FEBS Lett.* **589**(15), 1754–1760(2015). 査読有
- ③ Structure of the human Cereblon-DDB1-Ienalidomide complex reveals basis for responsiveness to thalidomide analogs. *Chamberlain, P. P., Lopez-Girona, A., Miller, K., Carmel, G., Pagarigan, B., Leon, B., Rychak, E., Corral, L., Ren, Y. J., Wang, M., Riley, M., Delker, S., Ito, T., Ando H., Mori, T., Hirano, Y., Handa, H., Hakoshima, T., Daniel, T. O. and Cathers, B. E. *Nature Struct. Mol. Biol.* **21** (9), 803-809 (2014). 査読有
- ④ Leucine zippers (2nd version). *Hakoshima, T. in *Citable Reviews in the Life Sciences (eLS)*, John Wiley & Sons Ltd. [DOI: 10.1002/9780470015902.a0005049.pub2] (2014). (Review) 査読有
- ⑤ Efficient and cost effective production of active-form human PKB using silkworm larvae. Maesaki, R., Satoh, R., Taoka, M., Kanaba, T., Asano, T., Fujita, C., Fujiwara, T., Ito Y., Isobe, T., Hakoshima, T., Maenaka, K. and *Mishima, M. *Scientific Reports* **4**, 6016, doi: 10.1038/srep06016(2014). 査読有
- ⑥ Structural and functional analysis of the yeast N-acetyltransferase Mpr1 involved in oxidative stress tolerance via proline metabolism. Nasuno, R., Hirano, Y, Itoh, T., Hakoshima, T., Hibi, T. and *Takagi, H. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **110** (29), 11821-11826(2013). 査読有

- ⑦ Structures of D14 and D14L in the strigolactone and karrikin signaling pathways. Kagiya, M., Hirano, Y., Mori, T., Kim, S.-Y., Kyozuka, J., Seto, Y., Yamaguchi, S. and *Hakoshima, T. *Genes to Cells* **18** (2) 147-160 (2013). 査読有
- ⑧ Structural basis of cargo recognition by the myosin-X MyTH4-FERM domain. Hirano, Y., Hatano, D., Takahashi, A., Toriyama, M. Inagaki, N. and *Hakoshima, T., *EMBO J.* **30** 2734-2747 (2011). 査読有
- ⑨ Structural basis for the specific inhibition of heterotrimeric G_q protein by a small molecule. Nishimura, A., Kitano, K., Takasaki, J., Taniguchi, M., Mizuno, M., Tago, K., *Hakoshima, T. and *Itoh, H. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **107**, 13666-13671 (2010). 査読有

[学会発表] (計 件)

[図書] (計 1 件)

- ① Protein modification for crystallization.*Hakoshima, T. in *Advanced Methods in Structural Biology* (Springer) in press (2016). (Review) 査読有

[産業財産権]

○出願状況 (計 件)

なし

○取得状況 (計 件)

なし

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

箱嶋 敏雄 (HAKOSHIMA TOSHIO)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・教授

研究者番号：00164773

(2) 研究分担者

三島 正規 (MISHIMA MASAKI)

首都大学東京・理工学研究科・准教授

研究者番号：70346310

(3) 連携研究者

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