

平成 22 年 5 月 13 日現在

研究種目：特定領域研究  
 研究期間：2005～2009  
 課題番号：17082004  
 研究課題名（和文） 細胞外リガンドと受容体の相互作用を“見る”-そのシグナリングにおける構造的側面-  
 研究課題名（英文） Structural analyses of the interaction between extracellular ligands and their receptors  
 研究代表者  
 高木 淳一 (TAKAGI JUNICHI)  
 大阪大学・蛋白質研究所・教授  
 研究者番号：90212000

## 研究成果の概要（和文）：

細胞が細胞外環境を認識する際の反応について、X線結晶構造解析による原子分解能構造と、電子顕微鏡イメージングによる分子分解能解析を組み合わせる研究を行った。我々の脳を形作るのに必要なリーニンシグナルや、骨の形成やがんに関わるWntシグナル授受のしくみの理解がすすみ、ニューロン同士が連絡するシナプス結合の本当の姿や細胞同士が接着するメカニズムの詳細が明らかになり、ウイルスがイネに感染する様子をそのまま可視化することなどにも成功した。

## 研究成果の概要（英文）：

We have utilized X-ray crystallography and electron microscopy to decipher the structural mechanism underlying recognition of extracellular environmental cues by cellular receptors. We have gained information about reelin signal transduction in brain development and Wnt signal transduction implicated in cancer and bone formation. Also, we have unraveled the structure of neuronal synapse adhesion machinery, and succeeded in visualizing the rice dwarf virus during the infection *in situ*.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005年度	26,100,000	0	26,100,000
2006年度	44,700,000	0	44,700,000
2007年度	26,300,000	0	26,300,000
2008年度	26,100,000	0	26,100,000
2009年度	25,200,000	0	25,200,000
総計	148,400,000	0	148,400,000

## 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：シグナル伝達、構造解析、リガンド複合体

## 1. 研究開始当初の背景

細胞が細胞外環境を認識するとは、細胞上の受容体が細胞外因子、つまり細胞外マトリックス(ECM)やシグナル分子を結合して情報

を伝えることに他ならない。これまでの典型的な研究では、あるシグナリングイベントに関して、リガンドと受容体の組み合わせが決まればそれで最初のステップは理解された

とし、引き続いて起こる細胞内での情報伝達のみを追いかけるものがほとんどである。ところが、これでは最初のインプットであるシグナルの「質」について、あるいはそのシグナルの「入り方」について、なにも理解していないことになる。そのような問題に対してこれまで我が国で不足していたのが構造生物学的アプローチである。

## 2. 研究の目的

本研究では構造生物学的手法を用いた研究を担当した。本特定領域で目指すところの、「細胞がどうやって細胞外環境を認識し、それに応答していくかについての理解」において、その分子メカニズムの解明を最も高分解能の領域で担うものであり、またもう一つの本特定領域の特徴である「異なる学術分野にまたがる連携研究」を、発生生物学、細胞生物学分野の班員との複数の共同研究により実践する。本研究では、「受容体による細胞外リガンドの認識」という最初の素反応について、両者の複合体の分子・原子レベルでの構造解析・機能解析をすることによってその化学的基盤を確立することを目的とした。具体的には、種々のインテグリンとそのリガンド、あるいは種々のECM関連蛋白質、シグナル分子とその受容体について、電子顕微鏡イメージング、X線結晶解析などの構造生物学的手法を駆使して構造情報を集め、その静的な構造情報から立ち現れる受容体の動的な作用メカニズムについてせまり、「細胞外環境認識とそれに対する細胞応答」が細胞膜上でどのように行われているのか、曖昧さのない理解を得ることが目的である。具体的な項目は以下の通りである。

- (1) 種々の細胞外シグナル分子とその受容体の構造
- (2) 細胞接着レセプターの構造と機能
- (3) 細胞外環境を可視化する電子顕微鏡イメージング法の開発

## 3. 研究の方法

### (1) 種々の細胞外シグナル分子とその受容体の構造

この項目では、細胞外シグナル分子としてリーリン、Wnt、Dkk1、受容体としてApoER2とLRP6を取り上げ、X線結晶構造解析および電子顕微鏡イメージングを用いて立体構造の解析をおこなった。解析のための組み換えタンパク質は動物細胞発現系を用いて生産し、独自に開発したアフィニティータグシステムを応用することで高品質の組み換え蛋白質の迅速な精製が可能であった。

### (2) 細胞接着レセプターの構造と機能

インテグリンは高等動物において主要な細胞接着レセプターである。この項目では、ヒトに存在する24種のインテグリンヘテロダイマーの大部分のものを組み換え可溶性蛋白質として高度に精製したものをそろえ、様々な細胞外リガンドに対する相互作用を生化学的に厳密に調べた。また、 $\alpha 5 \beta 1$ インテグリンについては活性ドメインだけからなる組み換え蛋白質を作成し、様々な条件で結晶化を目指した。細胞間の接着に関わる受容体としては、シナプス膜蛋白質であるニューレキシンとニューロリギンからなる接着複合体について、両者の細胞外領域の蛋白質を調製し、結晶構造解析を行った。

### (3) 細胞外環境を可視化する電子顕微鏡イメージング法の開発

個々の蛋白質複合体についての立体構造情報と、細胞・組織レベルでの蛋白質の局在やオルガネラの形態などの視覚情報の間には“解像度のギャップ”があり、「実際の生体内で分子がどのような形で、いくつ集まり、何と相互作用しているのか」を直接解析する方法はまだ無い。我々はそのような究極のイメージング手法として(クライオ)電子線トモグラフィ法の開発に取り組んだ。ウイルスや培養細胞、ヒト由来血小板などを用いてクライオ試料を作製し、本補助金で購入した加圧凍結装置やウルトラミクロトームを駆使して細胞外環境の可視化に最適な条件の探索を行った。

## 4. 研究成果

(1) 種々の細胞外シグナル分子のその受容体の構造

① 脳の層構造形成因子リーリンの立体構造と受容体による認識機構

リーリンはほ乳類の脳の発生に必須の巨大細胞外蛋白質である。この蛋白質は、あまりの巨大さと精製の困難さの故に、その蛋白質化学的研究、ましてや構造生物学的研究は全く進んでいなかった。ニューロンの移動から脳の層構造形成に至る分子メカニズムを明らかにするため、我々はまずこの分子の分

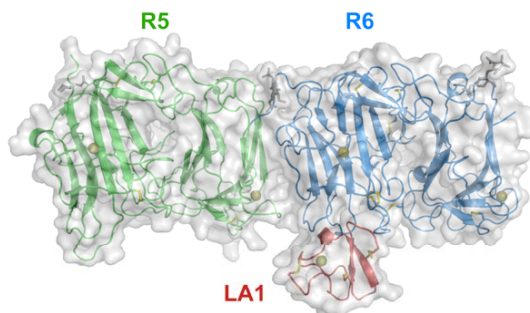


図1：リーリンと受容体からなる複合体の立体構造

子解剖と構造決定をおこなった。特殊な動物細胞発現系を用いた組み換えタンパク質発現とX線結晶構造解析、電子顕微鏡イメージングによる分子形状決定、構造情報を用いた変異体作製とエンジニアリングにより、これまでに(i)リーリンリピートの基本構造を原子分解能で解明し(報文20)、(ii)リーリン中の受容体結合部位をたった一つのアミノ酸(Lys2467)にピンポイントで同定し、しかも(iii)リーリンが亜鉛結合蛋白質であるという全く予想外の結果を得ることができた(報文15)。さらに、(iv)リーリンの活性フラグメントと受容体(ApoER2)の結合ドメインの複合体の結晶化と構造決定にも成功した(報文1)(図1)。これらの結果から、当初の目的であった「リーリンの受容体による認識メカニズムの原子レベルでの解明」を達成することができた。

## ② Wntシグナル伝達を司るLRP6の構造

Wntシグナル経路は多細胞動物の発生と形態形成に極めて重要な役割を果たすが、Wntのco-receptorであるLRP6についてその細胞外領域の組み換えタンパク質を高品質で得ることに成功し、電子顕微鏡による単粒子解析によって世界で初めてその分子形状に関する情報を取得した。得られたイメージからはLRP6が第2、第3プロペラドメインの間で極めて高い可動性をもつことがわかった。また、LRP6のリガンドであるWnt3A(アゴニスト)およびDkk1(アンタゴニスト)について安定発現細胞株を樹立し、両者とも精製に成功した。Dkk1については、プロテアーゼ切断と質量分析によって、O結合型糖鎖の付加するアミノ酸残基を決定することができた。

### (2) 細胞接着レセプターの構造と機能

#### ① インテグリンによるリガンド認識機構

24種のインテグリンヘテロダイマーの大部分のものを組み換え可溶性蛋白質として高度に精製したものをそろえ、ECMをインテグリンが認識するメカニズムに関する研究を進めた。RGD認識型のインテグリンである $\alpha V\beta 3$ による基底膜成分fibrillinの認識特異性の解析(報文19)、同じく $\alpha V\beta 3$ がフィブロネクチン上の非RGDサイトを認識することの発見(報文16)、コラーゲン結合インテグリンである $\alpha 1\beta 1$ が全く予想外のリガンドであるセマフォリン7AをRGD配列依存的に認識すること(報文18)、ネフロネクチン受容体としての $\alpha 8\beta 1$ インテグリンの同定(報文8)などがその成果である。また、得られた10種類の組み換え可溶性インテグリンヘテロダイマーに関して電子顕微鏡イメージング

による単粒子解析を行い、サブユニット特異的なコンフォメーションの存在を明らかにした(未発表)。

#### ② インテグリンの結晶構造

最初に発見され、インテグリンのプロトタイプともいえる $\alpha 5\beta 1$ インテグリン(フィブロネクチンレセプター)の頭部ドメインからなる組み換え蛋白質を大量に精製し、構造安定化のためのモノクローナル抗体Fabフラグメントとの複合体形成を行った結果、結晶化に成功した。研究期間終了時現在でこの結晶から3Å程度の分解能のデータを得、位相決定まで済ませ、構造解析を進行中である。

#### ③ シナプス間接着複合体の構造

ニューロン同士を連結するシナプス間の主要な接着装置であるニューレキシン・ニューロリギン複合体の立体構造をX線結晶解析によって3.3Å分解能で決定した(図2)。同複合体は結晶中で高次の二次元状平板構造を取っており、この分子構造が細胞上でも形成されることが示唆された。

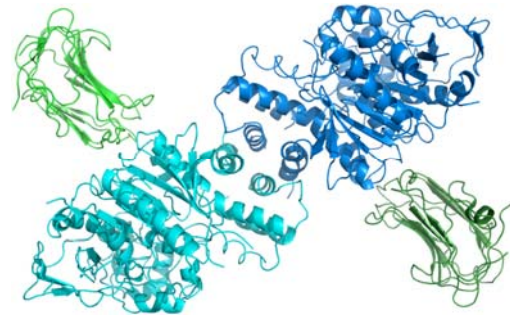


図2:ニューレキシン(緑)とニューロリギン(青)複合体の立体構造

### (3) 細胞外環境を可視化する電子顕微鏡イメージング法の開発

#### ① トモグラフィーによるウイルス感染の可視化

トモグラフィー法を用いて、イネ萎縮ウイルスの細胞間移動チューブの構造解析を行い、二次元の電子顕微鏡観察では得られない空間情報を得て、感染メカニズムについて新たな知見を得ることが出来た(報文17)(図3)。

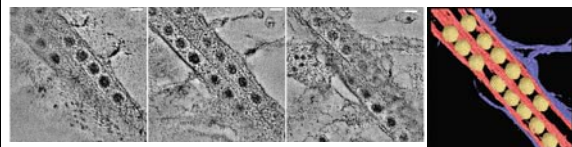


図3:イネ萎縮ウイルスの感染チューブのトモグラフィーによるスライス像(左)と3Dレンダリング画像(右)

②クライオトモグラフィーによる血小板膜周辺の構造解析

フィブリン線維や血小板上のインテグリンをクライオトモグラフィー法によって解析した。とくに結晶板上のインテグリンは、Qdot 標識したリガンド（フィブリンノーゲン）を使ってリガンド結合部位をイメージングすることに成功し、活性化血小板上でインテグリンが起きあがり構造を取ることを *in situ* で初めて確認した。

③トモグラフィーによる細胞接着装置の可視化

人工的にリポソームに埋め込んだ接着分子をクライオ条件下で撮影し、その接着構造の明確な可視化に成功した。また、前述のニューレキシン・ニューロリギン複合体からなる二次元シート構造を非神経細胞で人工的に作り、そのシナプス様接着構造を蛍光-電子線相関顕微鏡法という特殊な方法を用いて確認することに成功した（図4）。

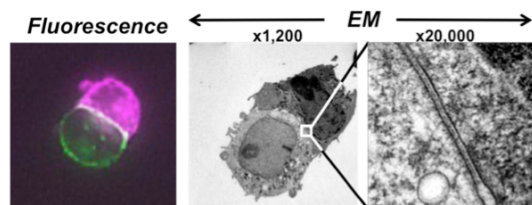


図4：“人工シナプス”の蛍光-電子線相関顕微鏡像

## 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24件）

- 1) Yasui N, Nogi T, Takagi J. (2010) Structural basis for specific recognition of reelin by its receptors. *Structure*, 18, 320-331. (査読あり)
- 2) Yasui N, Mihara E, Nampo M, Tamura-Kawakami K, Unno H, Matsumoto K, Takagi J. (2010) Detection of endogenous LRP6 expressed on human cells by monoclonal antibodies specific for the native conformation. *J. Immunol. Methods*, 352, 153-160. (査読あり)
- 3) Akiyama, M., Takeda, S., Kokame, K., J. Takagi, and Miyata, T. (2009) Structural insights into von Willebrand factor cleavage by ADAMTS13. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, in press. (査読あり)
- 4) Akiyama, M., Takeda, S., Kokame, K., J. Takagi, and Miyata, T. (2009) Production, crystallization and preliminary crystallographic analysis of the exosite-containing fragment of human von Willebrand factor-cleaving proteinase, ADAMTS13. *Acta Crystallographica*, F65, 739-742. (査読あり)

5) Association of Rice gall dwarf virus with microtubules is necessary for viral release from cultured insect vector cells, T. Wei, T. Ichiki-Uehara, N. Miyazaki, H. Hibino, K. Iwasaki, T. Omura, *J. Virol.*, **83**(20), 10830-10835 (2009) (査読有)

6) A self-assembled protein nanotubule with high aspect ratio, Frederico F. Miranda, Kenji Iwasaki, Satoko, Akashi, Koji Sumitomo, Mime Kobayashi, Ichiro Yamashita, Jeremy R. H. Tamae, and Jonathan G. Heddl., *Small*, **5**, 2077-2084 (2009) (査読有)

7) The structure of rat liver vault at 3.5 angstrom resolution, H. Tanaka, K. Kato, E. Yamashita, T. Sumizawa, Y. Zhou, M. Yao K. Iwasaki, M. Yoshimura, T. Tsukihara, *Science*, **323**, 384-388 (2009) (査読有)

8) Sato, Y., Uemura, T., Morimitsu, K., Sato-Nishiuchi, R., Manabe, R., Takagi, J., Yamada, M., and Sekiguchi, K. (2009) Molecular basis of the recognition of nephronectin by integrin alpha8beta1. *J. Biol. Chem.* 284, 14524-14536. (査読あり)

9) Nagae, M., Nishikawa, K., Yasui, N., Yamasaki, M., Nogi, T., and Takagi, J. (2008) Structure of F-spondin reeler domain reveals a unique  $\beta$ -sandwich fold with a deformable disulfide-bonded loop. *Acta Crystallographica*, D64, 1138-1145. (査読あり)

10) Nogi, T., Sangawa, T., Tabata, S., Nagae, M., Tamura-Kawakami, K., Beppu, A., Hattori, M., Yasui, N., and Takagi, J. (2008) Novel affinity tag system using structurally defined antibody-tag interaction: Application to single-step protein purification. *Protein Sci.*, 17, 2120-2126. (査読あり)

11) Sangawa, T., Nogi, T., and Takagi, J. (2008) A murine monoclonal antibody that binds N-terminal extracellular segment of human protease activated receptor-4. *Hybridoma*, 27(5), 331-335. (査読あり)

12) Atsushi Matsumoto, Tetsuji Kamata, Junichi Takagi, Kenji Iwasaki, and Kei Yura. (2008) Key interactions in ectodomain of integrin for global conformational change detected by elastic network normal mode analysis. *Biophys. J.*, 95(6), 2895-2908. (査読あり)

13) Yamaguchi, H., Takagi, J., Miyamae, T., Yokota, S., Fujimoto, T., Nakamura, S., Ohshima, S., Naka, T., and Nagata, S. (2008) Milk fat globule EGF factor 8 in the serum of human patients of systemic lupus erythematosus. *J. Leukocyte Biol.*, 83, 1300-1307. (査読あり)

14) Takagi, J. (2007) Structural basis for ligand recognition by integrins. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 19, 557-564. (査読無し、依頼総説)

15) Yasui, N., Nogi, T., Kitao, T., Nakano, Y., Hattori, M., and Takagi, J. (2007) Structure of a

receptor-binding reelin fragment and mutational analysis reveal a recognition mechanism similar to endocytic receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104, 9988-9993. (査読あり)

16) Takahashi, S., Leiss, M., Moser, M., Ohashi, T., Kitao, T., Heckmann, D., Pfeifer, A., Kessler, H., Takagi, T., Erickson, H.P., and Fässler, R. (2007) The RGD motif in fibronectin is essential for mouse development but dispensable for fibronectin fibril assembly. *J. Cell Biol.* 178, 167-178. (査読あり)

17) Katayama, S., Wei, T., Omura, T., Takagi, J., and Iwasaki, K. (2007) Three-dimensional architecture of virus-packed tubule. *J. Electron Microsc.*, 56, 77-81. (査読あり)

18) Suzuki K., Okuno, T., Yamamoto, M., Pasterkamp, R.J., Takegahara, N., Kitao, T., Takagi, J., Rennert, P.D., Kolodkin, A.L., Kumanogoh, A., and Kikutani, H. (2007) Semaphorin 7A initiates T cell-mediated inflammatory responses through  $\alpha 1\beta 1$  integrin. *Nature* 446 680-684. (査読あり)

19) Jovanovic J, Takagi J, Choulier L, Abrescia NG, Stuart DI, van der Merwe PA, Mardon HJ, and Handford PA (2007)  $\alpha V\beta 6$  is a novel receptor for human fibrillin-1: comparative studies of molecular determinants underlying integrin-RGD affinity and specificity. *J. Biol. Chem.* 282, 6743-6751. (査読あり)

20) Nogi, T., Yasui, N., Hattori, M., Iwasaki, K., and Takagi, J. (2006). Structure of a signaling-competent reelin fragment revealed by X-ray crystallography and electron tomography. *EMBO J.*, 25, 3675-3683. (査読あり)

21) 高木淳一 (2006) モジュラータンパク質の構造解析：受容体構造生物学における中心課題、*日本結晶学会誌*, **48**, 411-417. (査読無し)

22) Luo, B. H., Carman, C. V., Takagi, J., and Springer, T. A. (2005). Disrupting integrin transmembrane domain heterodimerization increases ligand binding affinity, not valency or clustering. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 3679-3684. (査読あり)

23) Nishiuchi, R., Sanzen, N., Nada, S., Sumida, Y., Wada, Y., Okada, M., Takagi, J., Hasegawa, H., and Sekiguchi, K. (2005). Potentiation of the ligand-binding activity of integrin  $\alpha 3\beta 1$  via association with tetraspanin CD151. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 1939-1944. (査読あり)

24) 岩崎憲治, 高木淳一 (2005) 電子顕微鏡を用いた蛋白質の高次構造解析が開く世界—インテグリンレセプターの構造解析を中心として—、*生化学*, 77, 400-410 (査読無し)

[学会発表] (計 20 件)

1) 禾 晃和, 神経シナプスの形成を制御するニューレキシン・ニューロリギン複合体の結晶構造、第 23 回日本放射光学会年会放射光科学合同シンポジウム、2010.1.8、姫路

2) Iwasaki, K., EM imaging of Rice Dwarf Virus, China-Japan 3D-EM Forum, 2010.1.5, Beijing (中国)

3) 高木淳一、シナプス間接着分子 Neuroligin/Neurexin 複合体の構造から見えるシナプス間隙の真の姿、第 5 回プロテオミクス・構造生物学講演会、2009.11.22、東京

4) 安井典久、リーリン会合体の構造的基盤とその機能的意義、第 82 回日本生化学会大会、2009.10.24、神戸

5) Yasui, N., Dissection of the molecular architecture of higher-order assembly of the full-length reelin, 23rd Symposium of The Protein Society, 2009.7.28, Boston(USA)

6) Takagi, J., Crystal structure of synaptic adhesion complex; insights into the molecular assembly at the synaptic membrane, 23rd Symposium of The Protein Society, 2009.7.27, Boston(USA)

7) Iwasaki, K., Electron microscopy study of platelet and integrin using new methods, 第 32 回日本血栓止血学会学術集会、2009.6.4, 小倉

8) 岩崎憲治、CEMOVIS の評価とクライオ電子線トモグラフィ、日本顕微鏡学会第 65 回学術講演会、2009.5.27、仙台

9) 安井典久、全長リーリンの精製法の確立とリーリン会合体の構造化学的基盤の解明、第 9 回日本蛋白質科学会年会、2009.5.22、熊本

10) 片山寿美枝、クライオ電子顕微鏡法を用いた活性化血小板の分子分解能構造解析、第 81 回日本生化学会大会、2008.12.10、神戸

11) Iwasaki, K., Cryo-Electron Tomography for Single Particles, 9th Asia-Pacific Microscopy Conference, 2008.11.2, Jeju (Korea)

12) Tanaka, H., Crystal structure of synaptic adhesion protein neurexin and neuroligin, XXI Congress of the International Union of Crystallography, 2008.8.23, Osaka

13) Yasui, N., Structural basis for recognition of reelin by its neuronal receptor, 22nd Annual Symposium of The Protein Society, 2008.7.29, San Diego (USA)

14) 安井典久、リーリン-受容体複合体の結晶構造解析、第 8 回日本蛋白質科学会年会、2008.6.10、東京

15) 長江雅倫、F-spondin リーロードメインの X 線結晶構造解析、第 8 回日本蛋白質科学会年会、2008.6.10、東京

16) 高木淳一、脳の層構造形成を司る細胞外

因子リーリンの結晶構造と受容体による認識機構, 日本分子生物学会・日本生化学会合同シンポジウム (BMB2007), 2007.12.15、横浜

17) 田中宏樹、シナプス間接着タンパク質  $\alpha$  ニューレキシンの細胞外ドメインの構造解析、日本結晶学会 2007 年度年会、2007.12.2、東京

18) Takagi, J., Challenges in structural analysis of extracellular protein complexes, 2nd International Symposium on Diffraction Structural Biology 2007, 2007.9.11, Tokyo

19) Nogi, T., Crystal Structure of a Signaling-competent Reelin Fragment, The 2007 Meeting of the American Crystallographic Association, 2007.7.25, Salt Lake City(USA)

20) 安井典久、受容体によるリーリン認識の構造的基盤、第 7 回日本蛋白質科学会年会、2007.5.25、仙台

[図書] (計 4 件)

1) 高木淳一 (2009) インテグリン、「ますます重要になる細胞周辺環境 (細胞ニッチ) の最新科学技術」(田畑泰彦 編) メディカルドゥ, pp 251-256.

2) Takagi, J. (2008) Reelin Glycoprotein, biology, structure and roles in health and disease, Springer, pp1-444

3) 高木淳一 (2007) ポストゲノム時代のタンパク質科学-構造・機能・ゲノミクス- (Arthur M. Lesk 原著) 化学同人, pp 1-328.

4) 高木淳一 (2007) 細胞接着分子とその受容体: 細胞が細胞外マトリックスを識別する仕組み、「再生医療のための細胞生物学」(関口清俊 編) コロナ社, pp 26-48.

[産業財産権]

○出願状況 (計 3 件)

名称: プロテアーゼ認識配列を有するタグペプチドおよびその利用

発明者: 高木淳一

権利者: 国立大学法人大阪大学

種類: 特許

番号: 特願 2009-103925

出願年月日: 平成 21 年 4 月 22 日

国内外の別: 国内

名称: タグペプチド及びその利用

発明者: 高木淳一

権利者: 国立大学法人大阪大学

種類: 特許

番号: PCT/JP2008/073069

出願年月日: 平成 20 年 12 月 18 日

国内外の別: 国際出願

名称: タグペプチドが結合した融合タンパク質、タグペプチドに対する抗体及びこれらを用いるタンパク質の精製方法

発明者: 高木淳一

権利者: 国立大学法人大阪大学

種類: 特許

番号: 特願 2008-020804

出願年月日: 平成 20 年 1 月 31 日

国内外の別: 国内

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.protein.osaka-u.ac.jp/rcsf/synthesis/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高木 淳一 (TAKAGI JUNICHI)

大阪大学・蛋白質研究所・教授

研究者番号: 90212000

(2) 研究分担者

岩崎 憲治 (IWASAKI KENJI)

大阪大学・蛋白質研究所・准教授

研究者番号: 20342751

(3) 連携研究者

禾 晃和 (NOGI TERUKAZU)

大阪大学・蛋白質研究所・助教

研究者番号: 40379102

安井 典久 (YASUI NORIHISA)

大阪大学・蛋白質研究所・助教

研究者番号: 90467514