

研究種目：基盤研究（A）

研究期間：2007～2010

課題番号：19207010

研究課題名（和文） タンパク質の動的複合体形成による細胞骨格制御の構造生物学

研究課題名（英文） Structural biology of cytoskeletal control by dynamic protein complex formation.

研究代表者

箱嶋 敏雄 (HAKOSHIMA TOSHIO)

奈良先端科学技術大学院大学・情報科学研究科・教授

研究者番号：00164773

研究代表者の専門分野：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：Rho キナーゼ，アクチン，+TIP，微小管，シグナル伝達，植物ホルモン

#### 1. 研究計画の概要

(1) Rho キナーゼの局在制御の構造的基礎：細胞骨格を制御する Rho キナーゼは、細胞生物学のみならず循環器病や脊髄損傷等への応用の観点からも極めて重要である。本研究では、Rho キナーゼの細胞内局在を制御するドメインの特異性や Rho キナーゼ特有の性質を三次元構造の観点から解明する。

(2) ERM タンパク質の標的認識の多様性：Rho キナーゼの重要な基質の一つである ERM タンパク質は、膜タンパク質とアクチン細胞骨格を連結する足場タンパク質の一つである。本研究では、CD44 や CD43、あるいは PSGL-1 といった重要な細胞接着因子や、NEP、MT1-MMP といった膜プロテアーゼとの複合体を解析してアクチン細胞骨格系を通した膜タンパク質の機能制御の構造的基礎を明らかにする。

(3) 微小管伸張の動的制御：Rho シグナルは微小管細胞骨格の制御にも関わっており、細胞極性の決定等においても極めて重要である。そこで微小管制御タンパク質+TIP の代表である EB1、CLIP-170、CLASP 等の微小管認識や+TIP 間での相互作用を解析する。

(4) 発展研究課題：以上の研究が順調に進んだ場合には、更にタンパク質の動的複合体の構造研究を進展させるために、細胞運動・極性の制御や癌細胞の転移・浸潤に関わるタンパク質の研究や、植物でのシグナル伝達の研究を開始して、研究の幅を拡大する。

#### 2. 研究の進捗状況

(1) Rho キナーゼの局在制御の構造的基礎：Rho キナーゼの C-末端局在ドメインの結晶化を試みたが良い結果は得られなかった。そこで多次元 NMR 法で三次元構造を決定した。その結果、このドメインは PH 様ドメインと同一性があるが、その配列内部に、PKC 等の C1 ドメインに同一性のある領域をもつ PHn-C1-PHc を構成しており、PHn と PHc 領域は会合して PH ドメインを、一方、C1 領域はこの PH ドメインとは構造的に独立に C1 ドメインを形成していた。このことより、Rho キナーゼの局在ドメインは、PH と C1 のスプリット・ドメインであることが判明した。

(2) ERM タンパク質の標的認識の多様性：ERM タンパク質の新しい標的である膜貫通型プロテアーゼ、NEP (Neutral endopeptidase 24.11) や MT1-MMP (membrane-type 1 matrix metalloproteinase)、重要な接着分子 CD43、CD44、PGSL-1 の細胞質テールとの複合体結晶を得て X 線で構造決定した。変異実験を進めて、特異性に重要な残基を特定した。これらの結果より、CD43 や PGSL-1 は ICAM-2 と基本的に類似の相互作用様式 ( $\beta$ -鎖に続いて  $3_{10}$  ラセンを形成) で ERM タンパク質の FERM ドメインのサブドメイン C に直接認識されるが、NEP や CD44 はこれらとは異なった様式 ( $\beta$ -鎖に続いて  $\beta$ -ターンを形成) で認識されることがわかった。それぞれの認識様式に必須のアミノ酸残基も特定して論文発表した。一方、MT1-MMP は、これらとは異なり、サブド

メインAで認識されることがわかった。

(3) 微小管伸張の動的制御： CLIP-170 の微小管やEB1に結合するCAP-Glyドメインの構造をX線で、複合体構造をNMRで決定した。その結果、CAP-Glyドメインは $\alpha$ -チューブリンやEB1の酸性残基に富むC-末端の「酸性テール」の最C-末端の6残基を認識することが判明した。この構造をもとに、これまで謎であったCLIP-170の微小管核形成・伸張促進の機構を論じた。更に、CLASP2 $\gamma$ とEB1との複合体の結晶化にも成功して構造決定を完了した。

(4) 発展研究課題：細胞骨格を制御することで細胞運動を活性化するとともに、癌の転移・浸潤と直接関わる低分子量Gタンパク質Racを活性化するグアニンヌクレオチド交換因子(GEF)であるTiam1の研究を開始した。Tiam1はPHCCExドメインによって特定の細胞膜領域に局在しないと活性を發揮できない。そこでこのドメインの構造をX線で決定した。その結果、このドメインには塩基性残基の富む溝があり、これが標的膜タンパク質、CD44、PAR3、JIP2あるいはNMDA受容体の酸性残基クラスター配列を認識することを明らかにした。

また、植物でのシグナル伝達の研究を開始して、重要な植物ホルモンの一つであるジベレリンの受容体と生物活性ジベレリンならびにこの受容体の標的タンパク質DELLAタンパク質との三者複合体の結晶構造を決定して、ホルモンの識別や標的タンパク質の認識機構を解明した。

### 3. 現在までの達成度

#### ①当初の計画以上に進展している

(理由)

本研究は3つのテーマについて構造生物学の展開を設定したが、(1) Rhoキナーゼの局在制御の構造的基礎では、既に目的のRhoキナーゼの局在ドメインの構造決定に成功しており、論文作成の段階にある。また、(2) ERMタンパク質の標的認識の多様性についても5種類の複合体結晶構造決定に成功して、多様性のメカニズムの解明は達成した。更に、(3) 微小管伸張の動的制御においてもCLIP-170とチューブリンとの複合体の構造決定やEB1等との相互作用の解明が終了しており、当初計画の殆どが終了している。これらに加えて、(4) 発展研究課題で取り上げた研究テーマにおいても構造決定に成功している。以上のように、本研究は当初計画以上に進展している。

### 4. 今後の研究の推進方策

(1) Rhoキナーゼの局在制御の構造的基礎では、既に決定できている構造を論文発表する。  
(2) ERMタンパク質の標的認識の多様性では、

その発展研究として、細胞運動や癌の転移・浸潤の方向での研究展開を目指す。

(3) 微小管伸張の動的制御では、細胞骨格としてのアクチン繊維と微小管との相互作用に関与するタンパク質の研究へと発展させていく。

(4) 発展研究課題では、癌の浸潤と転移あるいは神経軸索の伸長等も視野に入れて、研究対象タンパク質の選別のための予備的実験を進める。植物学の発展は目を見張るものがある。日本のみが世界的な潮流に乗り遅れて、多くの成果を失わないように、構造生物学的研究を継続する。

### 5. 代表的な研究成果

(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22件)

①Terawaki, S., Kitano, K., Mori, T., Zhai, Y., Higuchi, Y., Itoh, N., Watanabe, T., Kaibuchi, K., and Hakoshima, T. (2010). The PHCCEx domain of Tiam1/2 is a novel protein- and membrane-targeting module. *EMBO J.* **29** (1), 236-250. 査読有

②Kitano, K., Kim, S. Y. and Hakoshima, T. (2010). Structural basis for DNA strand separation by the unconventional winged-helix domain of RecQ helicase WRN. *Structure* (Cell Press). **18** (2), 177-187. 査読有

③Murase, K., Hirano, Y., Sun, T.-p. and Hakoshima, T. (2008). Gibberellin-induced DELLA recognition by the gibberellin receptor GID1 (*Article*). *Nature* **456** (7221), 459-463. 査読有

④Mori, T., Kitano, K., Fukami, Y., Terawaki, S., and Hakoshima, T. (2008). Structural properties of the cytoplasmic tail of adhesion molecule CD44 and its binding to FERM proteins. *J. Biol. Chem.* **283** (43), 29602-29612. 査読有

⑤Mishima, M., Maesaki, R., Kasa, M., Watanabe, T., Fukata, M., Kaibuchi, K., and Hakoshima, T., (2007). Structural basis for tubulin recognition by cytoplasmic linker protein 170 and its autoinhibition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **104** (25), 10346-10351. 査読有

[学会発表] (計33件)

[その他]

○新聞報道

○国際雑誌等メディア報道