

機関番号：14603

研究種目：基盤研究（A）一般

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

研究成果の概要（和文）：細胞内シグナル伝達系タンパク質やゲノム維持の酵素についての構造生物学的研究を行った。その結果、Rhoキナーゼの細胞内局在制御ドメイン、ERMタンパク質とCD44との複合体、RacGEFのTiam1の新規なPHCCExドメイン、CLIP170のCAP-Glyドメインと α -チューブリンのC-末端酸性テールとの複合体、植物ホルモンのジベレリン受容体の三者複合体、三量体Gタンパク質と薬剤との複合体、Werner症候群のヘリカーゼWRNとDNAとの複合体の構造解析に成功して、構造機能相関を解明した。

研究成果の概要（英文）：We pursued structural studies of signaling proteins important in cell biology and enzymes that play a role in maintenance of genome stability. Using X-ray crystallography and NMR, we revealed three-dimensional structures of the PH-C1-PH domain of Rho-kinase, the radixin FERM domain-CD44 complex, the PHCCEx domain of RacGEF Tiam1, the CAP-Gly domain of CLIP-170 complexed with the acidic tail of α -tubulin, the gibberellin receptor bound to the effector protein DELLA, the trimeric G protein Gq-YM254890 complex and the WRN-DNA complex and elucidated their structure-function relationships at atomic resolution.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	11,700,000	3,510,000	15,210,000
2008年度	10,600,000	3,180,000	13,780,000
2009年度	8,400,000	2,520,000	10,920,000
2010年度	8,400,000	2,520,000	10,920,000
総計	39,100,000	11,730,000	50,830,000

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：構造生物学, 細胞生物学, X線結晶学, シグナル伝達, がん, 転移, 浸潤, 植物ホルモン

1. 研究開始当初の背景

ゲノム科学の進展を受けて、遺伝子産物であるタンパク質の調製や解析が容易になり、

タンパク質研究に軸足を置いた薬学研究において多くの成果が期待できる時代となり

つつある。申請者は、一貫して、生物学、医学・薬学上重要なタンパク質のX線結晶構造解析を主力とした構造生物学的研究を推進してきた。ここ数年は、戦略的基礎研究CREST（研究領域「タンパク質の構造と機能発現メカニズム」）において研究を主催して、細胞内シグナル伝達系タンパク質やゲノム維持の酵素学を軸に、成果をあげるとともに、創薬の糸口を探ってきた。本申請は、これらの成果を踏まえて、以下の3点について、更に研究を推進することを計画した。

(1) 血管平滑筋収縮制御するRhoキナーゼの機能制御の構造的基礎：Rhoファミリーの低分子量Gタンパク質（RhoA, Rac, Cdc42など）は、細胞骨格や細胞接着の制御という細胞生物学上極めて重要な機能をもつ。また、ガン細胞の転移や浸潤においても重要な役割を担っている。RhoAが活性化するSer/Thr-タンパク質キナーゼであるRhoキナーゼの活性阻害は、高血圧等の循環器病への医学的応用の観点からも重要性は極めて高いので、Rhoキナーゼのキナーゼ触媒ドメインと、くも膜下出血等の臨床応用にも供されている阻害剤ファスジルならびにY-27632との複合体の構造を決定した。これらの成果は薬剤設計の基礎データとして極めて重要である。しかし、ファスジル等を含むRhoキナーゼの既知の阻害剤は、他のタンパク質キナーゼと同様に、触媒ドメインのATP結合部位に結合して、触媒活性を阻害する。一般に、触媒ドメインの構造は全てのタンパク質キナーゼに共通しているため、特異性を獲得するには、ATP結合部位のわずかに存在するアミノ酸残基の違いを利用しなければならないので、特異性に問題が残る。一方、Rhoキナーゼは、酵素活性を制御する複数のドメインを分子内にもつ。特に、細胞内での局在を決定しているC-末端領域に存在するドメインは、活性

に必須であることがわかってきた。

(2) 細胞膜タンパク質のアクチン細胞骨格系を通じた機能制御の構造的基礎：Rhoキナーゼの重要な標的タンパク質の一つであるERM (ezrin/radixin/moesin)タンパク質は、細胞膜とアクチン細胞骨格を連結する足場形成タンパク質の一つである。これまでの研究では、ERMタンパク質が細胞膜のリン脂質PIP2 (phosphatidylinositol-3,5-bis-phosphate)の結合による活性化機構や、代表的な標的接着分子ICAM-2の認識等を複合体構造の決定を通して分子認識等を明らかにしてきた。一方、ERMタンパク質が、接着分子以外の膜タンパク質とも結合して、それらの活性を制御することが明らかになった。これらは、癌の増殖阻害や転移・浸潤と直接関わるものが多いが、相互作用の詳細は未知である。

(3) 微小管伸張の動的制御：以上の2点はアクチン細胞骨格との関係であるが、Rhoシグナルは微小管細胞骨格の制御にも関わっており、細胞極性の決定や小胞輸送においても極めて重要である。しかし、微小管の(+)端結合性の微小管制御タンパク質、+TIP (microtubule plus-end-tracking protein)、の微小管核形成・伸張促進の機構には不明な点が多い。

(4) その他：シグナル伝達タンパク質の研究は植物学でも急速に進んでおり、植物学ホルモン受容体等が構造生物学の新しい標的となりつつある。一方、癌のみならず、難病等に関係する鍵タンパク質の研究も進んでいる。こうした関連分野の最前線をキャッチアップする機動的な構造研究も必要である。

2. 研究の目的

(1) 血管平滑筋収縮制御するRhoキナーゼの機能制御の構造的基礎：このサブテーマでは、RhoキナーゼのC-末端局在ドメインの

構造を決定するとともに、標的認識機構を解析する。この局在ドメインは、Rhoキナーゼを細胞膜や標的タンパク質の一つミオシンに局在させるために必須であることがわかっているため、それらとの相互作用とともに、薬剤による阻害を実験的に解析して、触媒ドメイン以外を作用点とするタンパク質キナーゼの新規な阻害剤の可能性を探る。

(2) 細胞膜タンパク質のアクチン細胞骨格系を通じた機能制御の構造的基礎：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) との特異的相互作用を複合体構造の決定に基づいて解明するとともに、機能との関係を変異実験等に基づいて解析する。NEPはエンドセリン、ボンベシン、ニューロテンシン等のGPCRのペプチドホルモンを細胞膜近傍で分解して、細胞増殖を阻害するとともに、細胞接着分子CD44 (ヒアルロン酸受容体で細胞増殖の接触阻害に関係する；癌細胞で異常がある) と共存して細胞運動を抑制する。また、MT1-MMPは細胞外マトリックス (ECM) やCD44 の細胞外ドメインの分解を通して、細胞運動を促進するので、得られた構造を基に、これらとの関係を考察して転移・浸潤を念頭に創薬の糸口を探る。

(3) 微小管伸張の動的制御：+TIPであるEB1やAPCとチューブリンあるいは微小管との相互作用を解析する。NMR等を用いて、特異的相互作用を同定して、微小管の伸張機構やダイニンのローディング機構を考察する。また、CLIP-170、EB1、APC間の相互作用も定量的に解析して、機能上の相互関係を明確にする。次に、伸張した微小管に沿って小胞体等を輸送するキネシンの積荷認識を解析する。キネシンの積荷認識は極めて重要であるが、その特異性は整理されていない。そこ

で、キネシンに直接結合するCRMP1、JIP、天然痘ウイルスのA36Rとキネシンとの複合体の構造を決定して、特異的相互作用の全貌を明らかにするとともに、阻害による治療応用の可能性を探る。

(4) その他：重要な植物ホルモンであるジベレリン受容体とその下流の鍵タンパク質DELLAとの複合体や、アブシジン酸受容体、更に、三量体Gタンパク質と薬剤との複合体や、早老病の一つであるBloom症候群のヘリカーゼBLMのDNA結合ドメインについてについて構造研究を推進する。

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、セレノメチオニ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（SGI Onix）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。

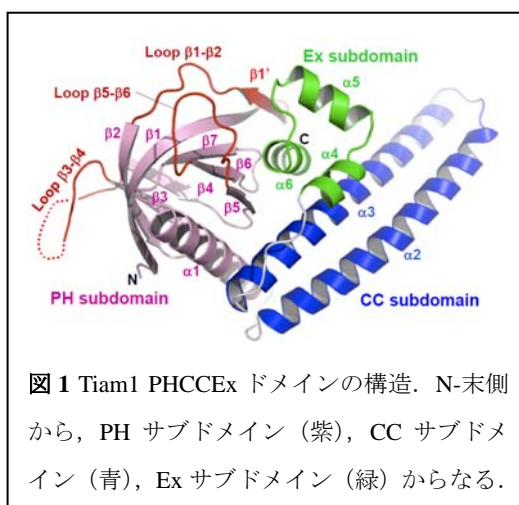
4. 研究成果

（1）血管平滑筋収縮制御するRhoキナ

ーゼの機能制御の構造的基礎：膜局在機能をもつPHn-C1L-PHcドメインのNMRによる構造を決定して、膜成分の結合実験を進めた。

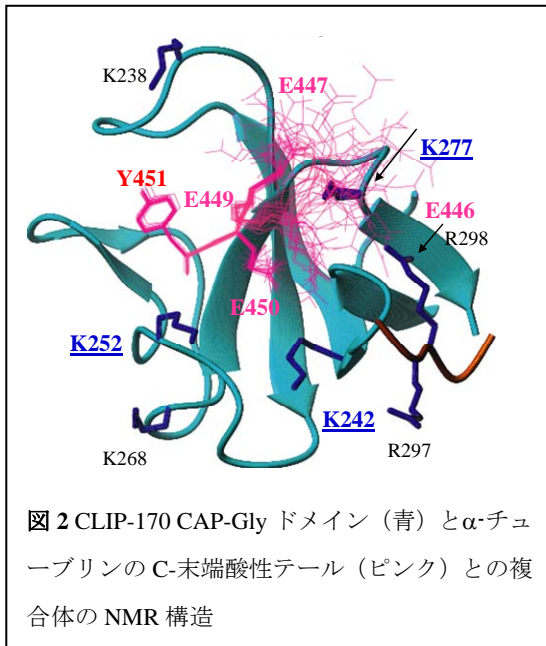
（2）細胞膜タンパク質のアクチン細胞骨格系を通じた機能制御の構造的基礎

：ERMタンパク質のN-末端のFERMドメインとNEP、CD43、PSGL-1、CD44との複合体構造を決定して、認識機構と認識モチーフを整理した。また、CD44と相互作用するRacのGEFであるTiam1のCD44相互作用の本体として同定した新規なPHCCExドメインの構造を決定して、PHCCExドメインは、N-末側からPH、CC（コイルドコイル）、Exの3つのサブドメインからなることを明らかにした（図1）。また、構造に基づいた変異実験と結合実験から、認識部位を同定した。PHCCExドメインはCD44のみならず、NMDA受容体、神経細胞のaxonガイダンス・キュー分子であるephrin B1-3、更には、細胞極性制御で重要なPAR3や、足場タンパク質JIP2の酸性残基クラスターとも同じ結合部位で結合することがわかった。前者のグループはCD44のTiam1結合部位と相同性のある配列Motif-Iを、後者は酸性残基クラスターであるMotif-IIを認識する。



これらの部位での結合は細胞中でも起こっていることが、*in vivo*の実験で確かめられた。これらの成果により、Tiam1の細胞内局在の決定機構が明らかとなった。

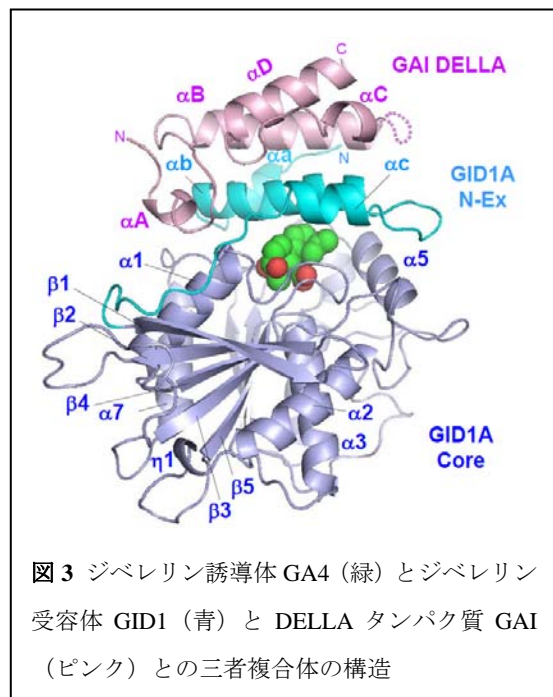
(3) 微小管伸張の動的制御：CLIP-170の微小管やEB1に結合するCAP-Glyドメインの構造をX線で、複合体構造をNMRで決定し



た。その結果、CAP-Glyドメインは α -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(図2)。チューブリンには、 α -チューブリンと β -チューブリンとがあり、 α -チューブリンのC-末端の酸性テールの端には疎水性のTyr(あるいはPhe)残基が保存されているが、 β -チューブリンにはそれがない。本研究の複合体の構造決定から、このC-末端のTyr残基(図2のY451)が直接認識されており、この残基の認識をもって、 α -チューブリンと β -チューブリンを識別していることが明らかとなった。

(4) その他：重要な植物ホルモンであるジベレリンの受容体GID1と、その下流の標的タンパク質DELLAとの相互作用

を、DELLAの一種であるGAIを用いて、活性型ジベレリン誘導体であるGA3あるいはGA4との三者複合体結晶のX線結晶構造解析に世界に先駆けて成功した(図3)。その結果、受容体は深いポケットをもっており、ジベレリン分子がこのポケットに取り込まれて、内壁との種々の相互作用を通して認識されることを原子レベルの分解能で解明した。自然界には136種類のジベレリン誘導体が知られているが、強い活性のある誘導体は4種類しか知られていない。今回の成果で、これら誘導体の構造活性相関を説明できる構造を提供できている。今後、新しい誘導体が単離されても、その活性を化学構造から見積もることが可能となった。また、シグナルを下流に伝えるDELLAタンパク質が、ジベレリン結合とともに閉まる受容体の蓋の部分で認識されており、ジベレリン分子を正確にポケットに取り込んで蓋が完全に閉まると初めて、標的タンパク質を認識するという



機構が明らかとなった。

更に、三量体Gタンパク質と薬剤との複合体の構造解析にも成功した。三量体Gタンパク質はGPCRの下流のシグナル伝達タンパク質であり、GPCRを標的とした薬剤開発に加えて、その下流の三量体Gタンパク質も薬剤標的となり得ることを示した初めての構造となった。また、早老病の一つであるWerner症候群のヘリカーゼWRNのDNA結合ドメインについてについての構造解析にも成功して、そのDNA認識における特異的なDNA構造変化誘起の機構を明らかにした。

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 29 件)

① Terawaki, 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

② Nishimura, A., Kitano, K., Takasaki, J., Taniguchi, M., Mizuno, M., Tago K., Hakoshima, T. and Itoh, H., Structural basis for the specific inhibition of heterotrimeric Gq protein by a small molecule. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **107** (31), 13666-13671 (2010). 査読有

③ Kitano, 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

④ Murase, 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

⑤ Takai, Y., Kitano, K., Terawaki, S., Maesaki, R., and *Hakoshima, T. (2008). Structural basis of the cytoplasmic tail of adhesion molecule CD43 and its binding to ERM proteins. *J. Mol. Biol.*, **381** (3), 634-644. 査読有

⑥ Gohda, K. and *Hakoshima, T. (2008). A molecular mechanism of P-loop pliability of Rho-kinase investigated by molecular dynamic

simulation. *Journal of Computer-aided Molecular Design* **22** (11), 789-797. 査読有

⑦ Mori, 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

⑧ Mishima, 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

⑨ Terawaki, S., Kitano, K., and Hakoshima, T. (2007). Structural basis for type II membrane protein binding by ERM proteins revealed by the radixin-neutral endopeptidase 24.11 (NEP) complex. *J. Biol. Chem.* **282** (27), 19854-19861. 査読有

⑩ Takai, Y., Kitano, K., Terawaki, S., Maesaki, R., and Hakoshima, T. (2007). Structural basis of PSGL-1 binding to ERM proteins. *Genes to Cells* **12** (12), 1329-1338. 査読有

⑪ Gohda, K. and Hakoshima, T. (2007). Chapter III. P-loop pliability of Rho-kinase for inhibitor binding. In *Drug Design Research Perspectives* (Nova Science Publishers, Inc.), pp. 39-55. (Review). 査読有

[学会発表] (計 46 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)

[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・情報科学研究科・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