

機関番号：84404

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20570194

研究課題名(和文) 結晶構造に基づいた FER キナーゼの生理作用と制御メカニズムの解明

研究課題名(英文) Crystal structure and regulation of Fer.

研究代表者

増田 道隆 (MASUDA MICHITAKA)

独立行政法人国立循環器病研究センター・細胞生物学部・室長

研究者番号：00190364

研究成果の概要(和文)：生体膜の平坦な部分からチューブ状膜構造が陥入する現象は、膜小胞輸送やオルガネラの形成過程など、よく見られる膜のダイナミックな動きである。バードメイン二量体のバナナ型の構造は、膜をチューブ状に変形させるように特化した膜結合タンパク構造である。Fer/Fes バードメインは、そのC-末側にコイルドコイル(CC)ドメインがあり、例外的に膜結合・変形能が非常に弱い。本研究では、FerのN-端半分の結晶構造を決定し、バードメインとCCドメインが一体となって、バナナ型の二量体を作っていることを明らかにした。CCドメインは膜結合表面に干渉する位置にはなかった。しかし、既知のバードメインとの構造比較から、膜結合に関与しない位置にあるが、進化的に保存されている2つのアミノ酸残基に気づいた。この2つがFer/Fesでは保存されておらず、逆に、この2つを保存されているアミノ酸に変異させると効率的にチューブ形成が起こった。これは、バードメインの膜変形機能の全く新しい知見である。

研究成果の概要(英文)：Formation of tubes or buds from a flat membrane is a widely spread feature of the membrane shape change during the vesicular transport and the organelle morphogenesis. The BAR domain dimers exhibit curved banana shapes and appear to be suitable modules for this process. However, the BAR domains of Fer/Fes kinases, which have the coiled-coil domains just C-terminal of the BAR domain, show exceptionally low levels of membrane tubulation. We determined the crystal structure of the N-terminal half of Fer containing the BAR and the coiled-coil domains. They unite together into a banana-shape dimer. The membrane-binding surface of the dimer is not hindered by the coiled-coil domains. From comparison of the known BAR dimer structures, we have found out that there are two conserved residues on the non-membrane binding surfaces other than the Fer/Fes BAR domains. When these two residues of Fer were mutated into the conserved residues, the mutant Fer showed effective membrane tubulation activity. This result provides a new insight into the molecular mechanism for membrane deformation by the BAR domains.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2009年度	600,000	180,000	780,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：細胞生物学

科研費の分科・細目：生物化学・細胞生物学

キーワード：生体膜、バードメイン、チロシンキナーゼ、タンパク質構造

1. 研究開始当初の背景

(1) Fer は Fes と 2 つだけでユニークなファミリーをなす非受容体型タンパク質チロシンキナーゼである。N-端より膜結合 BAR ドメイン、コイルドコイル (CC) ドメイン、リン酸化チロシン残基と結合する SH2 ドメイン、C-末にキナーゼドメインというドメイン構成を持つ (下図参照)。また、申請時には CC ドメイン中央部には p120 カテニン結合部位があるとされていた。これらの結合活性とキナーゼ活性により、細胞接着の制御に関わる分子であると推定されていた。



(2) BAR ドメインは真核生物に広く分布する膜結合タンパクドメインである。BAR ドメインはバナナ型の二量体を作り、生体膜の曲率を感知し結合し、あるいは膜を曲げ、チューブ状膜構造を作る活性を持つ。バナナ型の凹面側が正電荷に富む膜結合面となり、負電荷の生体膜表面と強く結合するからである。Fer/Fes の BAR ドメインは、FCH-BAR ドメインサブファミリーに属する。FCH とは Fer CIP4 homology モチーフである。FCH モチーフを持つタンパク質に膜チューブ形成能があることは、FBP17 の研究で、我々が始めて発見した。しかし、Fer/Fes の BAR ドメインの膜結合・変形能は非常に弱く、BAR と CC の 2 つのドメインが一体の構造を成しており、単純な BAR ドメインの構造とは異なっている可能性が高かった。とりわけ、CC ドメインは酸性アミノ酸に富んでおり、負電荷を持つことが予想され、CC ドメインによる干渉により膜結合が阻害されている可能性があった。

(3) 無脊椎動物は Fes を欠き、Fer のみが存在する。Fer は、線虫やショウジョウバエの初期発生における上皮細胞の形態形成に必須ではあるが、キナーゼ活性は不必要であることが報告されていた。これは、Fer の特異機能が、リン酸化酵素としてではなく、スカフォールドタンパクとしての働きにあることを示唆する結果であった。更に、Fer/Fes のダブルノックアウトマウスがほぼ正常である、など、極めて謎の多い分子であった。

(4) 我々は、内皮細胞の流れセンシングに PECAM-1 のチロシンリン酸化が関わり、このリン酸化酵素として Fer があることを明らか

にしていた。PECAM-1 がカドヘリン、カテニン、VEGF レセプターなどと流れセンサー複合体を作り、その中心に Fer があるとの作業仮説を立て、Fer の構造と機能調節を解き明かす研究を開始した。

2. 研究の目的

申請時の研究目的は、N-端に BAR ドメインを持つ特異なチロシンキナーゼ Fer の結晶構造を決定し、それに基づき Fer N-末端部分の機能およびキナーゼ活性調節への関わりを調べ、Fer の基本的性質を明らかにすることであった。着目点として、Fer の BAR ドメインは、その C-末端側に CC ドメインを持つことがあげられる。このドメイン構成は Fer ファミリーキナーゼ以外に他に例のないものであり、また、CC ドメインは p120 カテニンとの結合部位であることが報告されていた。N-端の構造決定は本研究の最初の目標となる。さらに、Fer 全長の構造を明らかにする。この成果に立って、Fer の生理作用、とりわけ血管内皮細胞の機械刺激受容における役割の解明を目指すことであった。

3. 研究の方法

(1) タンパク質結晶化

結晶化用タンパク質は大腸菌を用いてセレノメチオニン化 GST 融合タンパクとして発現・精製した。結晶化条件は蒸気拡散法を用いたスクリーニングによりサーベイした。BAR と CC ドメインからなるヒト Fer N-端の結晶化は容易であったが、分解能に強い異方性があり、セル長も極めて長い為、構造決定に至らなかった。また、ヒト Fer の全長タンパク質は大腸菌では十分な発現量が得られなかった。良質な結晶を得るため、ラット、ニワトリ、ゼブラフィッシュなど種を変える、reactive lysine methylation などの化学修飾を加える、変異を入れることなどを試し、結晶化に適したタンパク質を幅広く探し求めた。

(2) 結晶構造解析

Spring-8 の放射光により回折データを取得し、セレンの異常分散を用いた MAD 法により位相を決定した。本研究の主要な出費である HKL ソフトウェアは、時間のかかる回折データの精密処理のため必要とした。位相決定は SOLVE/RESOLVE で、モデリングは Coot で行った。

(3) 変異体による機能アッセイ
結晶構造に基づき、さまざまな BAR-CC ドメインの変異体を設計し、精製リコンビナントタンパク質や培養細胞での強制発現により、その性質を調べた。膜結合能、膜チューブ形成能や p120 カテニン結合能、キナーゼ活性の調節に着目し、これらの機能がどの領域に担われているのか、また、その調節メカニズムはどうなっているのかについて調べた。

4. 研究成果

(1) Fer の N-末端側半分、BAR ドメインと CC ドメイン全体を含む構造を、分解能 2.6 Å で始めて決定することに成功した。これは、結晶化に使用するタンパク質の由来種や領域の選択、突然変異の導入などを広範にサーベイし、高分解能のタンパク結晶を作製できた結果である。現在も Fer や Fes の N-末端側構造は発表されていない。結晶構造から、BAR と CC ドメインが、非常に強固な一体構造をなしていることが明らかになった。しかし、酸性アミノ酸に富む CC ドメインは、膜結合表面から遠く、干渉可能な位置にはない。したがって、CC ドメインが膜結合を阻害するために、Fer/Fes BAR ドメインの膜結合・変形能が非常に弱いという説明は成り立たない。

(2) 結晶構造から、CC ドメインの「p120 カテニン結合モチーフ」は、相互作用可能な領域にないことが明らかになった。in vitro, in vivo の様々な結合実験からも、CC ドメインと p120 カテニンの直接結合は、全く再現することができなかった。p120 カテニンとの結合を前提とした Fer 機能の議論は見直しが必要であり、別のメカニズムの探索が求められる。

(3) CC ドメインを持たない FCH-BAR ドメイン二量体の結晶構造は、FBP17 や CIP4 ですでに報告されている。膜結合表面の構造や表面電荷分布を詳しく比較した。Fer と FBP17 や CIP4 の間に、膜結合能に関連すると考えられる違いは見いだせなかった。例えば、膜結合に重要な塩基性アミノ酸残基の数と分布はほぼ同様であった。むしろ、表面電荷分布では、Fer の方が酸性アミノ酸残基の数が少ないため、より正電荷に富む膜結合面となっていた。

さらに、膜結合表面において、Fer と FBP17/CIP4 の間で違っている個々の塩基性アミノ酸残基が膜結合・変形能に影響している可能性を検討した。表面電荷分布の細かい違いが膜結合に重要であるかもしれないからである。それらの 1 つ 1 つを FBP17/CIP4 タイプに置き換える変異体を作製し、膜チューブ形成活性を調べた。その結果は、少しポジティブな影響がある場合もあるが、大きく

チューブ形成能に変化がおきるアミノ酸位置は無いというものであった。これは、BAR ドメインの膜結合能が、主に非特異的な静電的相互作用に寄っているという理論を支持するものである。

(4) それでは、なぜ Fer/Fes が BAR ドメインタンパク質としては例外的に生体膜結合・変形能が弱いのか。多数の変異体を用いた解析により、FCH-BAR ドメインに進化的に保存されている、たった 2 個のアミノ酸残基が変化していることにより、膜結合・変形能が大きく減弱していることが分かった。しかもこの 2 残基は膜結合表面には位置していない。この結果の解釈は簡単ではないが、BAR ドメインの機能調節の新たな機構を示唆するものである。

(5) (4) で明らかにした FCH-BAR ドメインの変異により、人為的に膜結合・変形能を付与すると、Fer は FBP17 などと同様に、大部分が膜に結合し、多数のチューブ状膜構造を形成するようになった。更に、Fer の自己リン酸化活性と、生理的基質として知られるコータクチンのリン酸化活性は 2 倍以上に上昇した。膜結合がキナーゼ活性の調節に重要であることを示唆する結果である。

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 2 件)

- ① Masuda M. and Mochizuki N.
Structural characteristics of BAR domain superfamily to sculpt the membrane.
Seminars in Cell & Developmental Biology, 有, 21, 2010, 391-398.
- ② Komi Y, Suzuki Y, Shimamura M, Kajimoto S, Nakajo S, Masuda M., Shibuya M, Itabe H, Shimokado K, Oettgen P, Nakaya K, and Kojima S.
Mechanism of inhibition of tumor angiogenesis by beta-hydroxyisovalerylshikonin.
Cancer Science, 有 100, 2009, 269-277.

[学会発表] (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.ncvc.go.jp/res/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

増田 道隆 (MASUDA MICHITAKA)
独立行政法人国立循環器病研究センター・細胞生物学部・室長
研究者番号：00190364

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

武田 壮一 (TAKEDA SOICHI)
独立行政法人国立循環器病研究センター・心臓整理機能部・室長
研究者番号：80332279

Ben Ammar Youssef

富士フイルム・解析技術センター・研究員
研究者番号：90463273