

機関番号：17102
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2009～2010
 課題番号：21770116
 研究課題名（和文） 細胞極性を制御するLGNとそのパートナー分子複合体の立体構造解析
 研究課題名（英文） Structural basis of polarity protein LGN in complex with its partner molecules
 研究代表者
 湯澤 聡（ゆざわ さとる）
 九州大学大学院・医学研究院・学術研究員
 研究者番号：40515029

研究成果の概要（和文）：

LGNとそのパートナー分子Insc複合体は、細胞の極性形成の制御に重要な役割を担っている。LGN-Insc複合体の分子認識を立体構造に基づいて明らかにするためX線結晶構造解析を用いた構造生物学研究を進めた。構造解析に適したLGNのInsc結合領域を含む領域およびInscのLGN結合領域を含む領域を同定し、大量発現・精製系を確立した。複合体の結晶化スクリーニングを行い、良好なLGN-Insc複合体の結晶を得た。この結晶を用いてX線回折実験を行い、2.8オングストローム分解能のデータセットを収集に成功した。

研究成果の概要（英文）：

A complex in which LGN associates with a partner molecule, Insc, plays a crucial role in regulating cell polarity. To elucidate the interaction between LGN and Insc based on its tertiary structure, we have been carried out structural studies of LGN-Insc complex using by X-ray crystallography. Regions of LGN-Insc interaction as a construct suitable for structural studies were identified and then we established the preparation of the complex. We performed crystallization trials on the LGN-Insc complex and obtained crystals suitable for X-ray diffraction after optimization of crystallization condition. X-ray diffraction data were collected to a resolution of 2.8 Å for crystals of the LGN-Insc complex.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1800000	540000	2340000
2010年度	1700000	510000	2210000
年度			
年度			
年度			
総計	3500000	1050000	4550000

研究分野：構造生物学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物化学

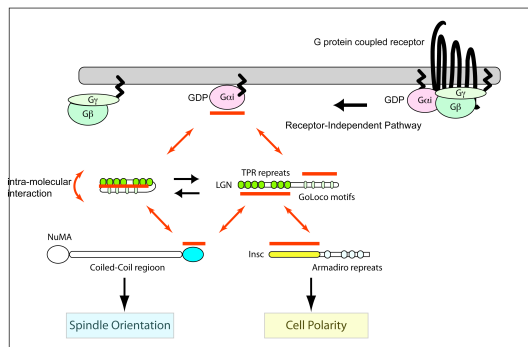
キーワード：蛋白質・シグナル伝達・分子認識・X線結晶構造解析・細胞極性

1. 研究開始当初の背景

単細胞生物においても多細胞生物においても、細胞が正常に機能し調節されるためには

、細胞極性が適切に形成される必要がある。細胞の極性が形成される際には、細胞極性に関連する一連のタンパク質が細胞膜の特定

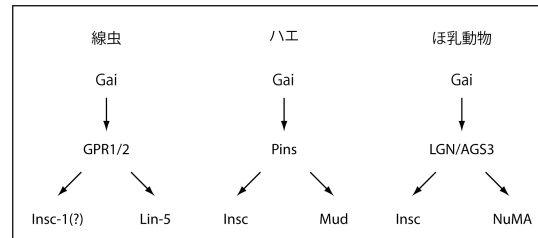
の場所に適切な複合体を形成し配置される。細胞極性の持つ意義は、生物種や細胞の種類、分化段階に応じ異なり、また細胞極性の制御に関連するタンパク質複合体の空間配置やその分子組成も細胞の種類により大きく異なる。しかしながら、細胞極性の形成には、進化的にも保存されたいくつかの共通の分子機構が存在することが明らかになりつつある。



LGNとそのパートナー分子間の相互作用についての模式図

一例として、ショウジョウバエの神経幹細胞を用いた遺伝学的・細胞生物学的解析が進み、細胞極性の形成における制御の分子メカニズムが明らかになってきた。ショウジョウバエの神経幹細胞の非対称分裂では、apical-basal軸に沿ってapical側の娘細胞が新たな神経幹細胞に、basal側の娘細胞がニューロンやグリアへと分化する。この非対称分裂において、G-タンパク質共役受容体(GPCR)には非依存的にGDPに結合したGαiタンパク質(Gαi・GDP)は、Pins(Partner of Inscuteable: ヒトのホモログには LGNとAGS3の二つの遺伝子がある)に結合し、「Gαi・GDP-Pins複合体」を形成し、下流分子Mud(Mushroom body defect: ヒトのホモログはNuMAである)と相互作用することで細胞の分裂軸の方向の制御に関与している (Izumi et al., Nat. Cell Biol., 2006)。一方、「aPKC-Par複合体」と「Gαi・GDP-Pins複合体」という二つの複合体がapical側に局在する。この二種類の複合体はInscuteable(Insc)というアダプター分子により結ばれ協調的に働くことで、細胞の極性が制御されていると考えられている (Yu et al., Cell, 2000)。ショウジョウバエでは、このように非対称分裂時の細胞極性の形成におけるPins-MudやPins-Inscの相互作用の重要性が示されている。これらの関連タンパク質複合体はショウ

ジョウバエからヒトまで種を超えて保存されていることが明らかになっている (Izaki et al., 2006)。ヒトでもショウジョウバエと同様の機能をもつかは現在まで明らかになっていないが、ショウジョウバエとのアナロジーからヒトにおいてもこれらの複合体が細胞の極性形成の制御において重要な機能を果たしていると考えられている。



細胞極性を制御するタンパク質複合体

PinsのヒトホモログであるLGNタンパク質のドメイン構成は、N末端には7つのTPR(Tetratricopeptide Repeat)を、C末端側に4個のGoLocoモチーフを持つと予測されている。C末端側のGoLocoモチーフを介して受容体非依存的にGαi・GDPタンパク質に結合しGDI (GDP dissociation inhibitor)として機能する。MudのヒトホモログであるNuMA (nuclear matrix apparatus protein)は、N末端側にアクチン結合に関わると考えられている球状ドメインと長いCoiled-Coil領域を介し、C末端側にはLGN結合領域、microtubule結合領域と核移行シグナルをもつ。一方、Insc (Inscuteable) のN末端側には既知のドメインやモチーフとは相同性のない領域を、C末端側には4つのアンキリンリピートを持つ。NuMA (Du et al., 2002)あるいはhInsc (Izaki et al., 2006) はいずれもLGNに結合することが示されている。興味深いことに、NuMAのLGN結合領域は既知のドメインやモチーフとの相同性が見られないばかりでなく、Inscとの間にも目立ったアミノ酸配列の相同性は見られない。さらに近年、PinsやLGNにおいて、分子内のGoLocoモチーフ(GαiのGDI領域)が多段階の制御を受けGPCRに非依存的にGαi・GDPと結合すること、さらに分子スイッチとして機能していることが示唆されている (Du and Macara, 2004; Nipper et al., 2007)。その中でGoLocoモチーフを含むC末端側がN末端側TPRリピート領域と相互作用することで活性の制御を受けて

いると想定されている。しかしながら、NuMAとInscによるLGNの分子認識機構やLGNに備わる分子メカニズムは、進化的にも保存されその重要性が指摘されているがよく解っておらず、立体構造に関する知見は全くない。

2. 研究の目的

本研究課題では、細胞の極性形成に関連するLGNとそのパートナー分子複合体における相互作用およびLGNの制御機構について、構造生物学的解析を進めることで分子メカニズムを明らかにすることを目的としLGN-Insc複合体の分子認識を立体構造に基づいて明らかにすることを試みた。

3. 研究の方法

(1) LGNおよびInscについて相互作用に必要な最小領域かつ構造的に安定な領域の同定を試みた。様々な領域を持つタンパク質を発現・精製し、GST pull-down assayにより結合に必要な領域を同定し、発現領域の至適化を行った。

(2) この最小結合領域を用い、結晶構造解析を目指した大腸菌による大量発現系を構築し、蛋白質の分離精製を行った。

(3) ^1H ^1D NMRスペクトルを、円二色性スペクトルの測定を行いタンパク質の生のキャラクタリゼーションを行った。

(4) LGN-Insc複合体について結晶化を試みた。市販のスクリーニングキットを用い、 20°C および 4°C において結晶化の初期スクリーニングを行った。得られた初期条件について沈殿剤の濃度、タンパク質の濃度、pH、温度等の条件を精密化し、アディティブスクリーニングやシーディングなどの手法を用い結晶の成長を最適化した。

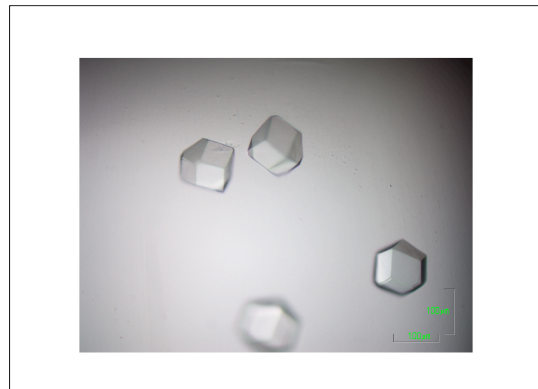
4. 研究成果

結晶化に適したコンストラクトの至適化を行うため、LGNおよびInscについて相互作用に必要な最小領域かつ構造的に安定な領域の同定を試みた。LGNについて各種プロテアーゼに対する分解耐性を指標にドメインマッピングを行った。さらに、GST pull-down assayによりLGNとInscとの相互作用を検討しながら、LGNのInsc結合領域を含む領域、InscのLGN結合領域を含む領域の至適化を行った。このようにして同定した領域について、大腸菌を用いた大量発現・精製系を確立した。

LGN単体、およびInscのLGN結合領域との複合体の立体構造解析を行うための基盤を確立することができた。

InscのLGN結合領域について ^1H ^1D NMRスペクトルおよび円二色性スペクトルの測定を行い、この領域のキャラクタリゼーションを行った。Insc単独では一定の3次構造を持たないことが示唆された。

このタンパク質を用いて、結晶化に着手した。当初、十分な大きさの単結晶を得ることが出来なかったが、結合領域をさらに削り込むことで、回折実験に適した大きさのLGN-Insc複合体の結晶を得ることができた。この結晶について、高エネルギー加速器研究機構 放射光施設にてX線回折実験を行い、2.8オングストローム分解能のデータセットの収集に成功した。現在、LGN-Insc複合体について構造解析を進め、さらに分解能向上を目指して結晶化条件の最適化を行っている。また、LGN単独やLGNのパラログであるAGS3に



LGN-Insc複合体の結晶

についてもInscとの共結晶化を試み、AGS3-Insc複合体について回折実験に適した大きさの結晶を得た。今後、LGN-Insc複合体に加えLGN単体のAGS3-Insc複合体結晶構造解析を進める予定である。また、立体構造で得られた知見に基づいて変異体を作成し、細胞の極性形成に対する効果を検討することで、細胞極性の形成におけるLGNの作用機構を明らかにしていきたい。

細胞極性の決定に関するタンパク質複合体のシグナル伝達については国内外を問わず、線虫やショウジョウバエを用いた遺伝学的・細胞生物学的な解析を中心に研究が進展し、近年はほ乳類細胞における機能解析へと展開している。本研究では、これら細胞の極性形成に関連するLGNとそのパートナー分子複合体における相互作用構造生物

学的解析を進めることで、分子メカニズムを明らかにすることを目指している。このことは、線虫やハエからヒトまで保存されている細胞極性の形成という生物学的にきわめて重要な現象を、タンパク質の立体構造に基づいて理解する上で大きな貢献が期待できると考えられる。

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4件)

1. Maehara Y., Miyano K., Yuzawa S., Akimoto R., Takeya R., Sumimoto H.
A conserved region between the TPR and activation domains of p67^{phox} participates in activation of the phagocyte NADPH oxidase
J. Biol. Chem. 285, 31435-31445, 2010 (査読有)

2. Bae, J-H., Lew, D.E., Yuzawa, S., Tome, F., Lax, I., Schlessinger, J.
The selectivity of receptor tyrosine kinase signaling is controlled by a secondary SH2 domain binding site.
Cell, 138, 514-524, 2009 (査読有)

3. Lulo, J., Yuzawa, S., Schlessinger, J.
Crystal structures of free and ligand-bound focal adhesion targeting domain of Pyk2.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 383, 347-352, 2009 (査読有)

4. Yuzawa, S., Miyano, K., Honbou, K., Inagaki, F., Sumimoto, H.
The domain organization of p67^{phox}, a protein required for activation of the superoxide-producing NADPH oxidase in phagocytes.
J. Innate Immun., 1, 543-555, 2009 (査読有)

[学会発表] (計2件)

1. Yuzawa, S., Miyano, K., Honbou, K., Inagaki, F., Sumimoto, H.,
The domain organization of p67^{phox}, a protein required for activation of the superoxide-producing NADPH oxidase in phagocytes.
第32回 日本分子生物学会年会
平成21年12月12日、横浜

2. 湯澤 聡, 宮野 佳, 本坊 和也, 稲垣 冬彦, 住本 英樹
Nox2活性化におけるp67^{phox}のドメイン配置と作用機構
第82回 日本生化学会大会
平成21年10月22日、神戸

[その他]

ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

湯澤 聡 (YUZAWA Satoru)
九州大学大学院 医学研究院・学術研究員
研究者番号: 405115029

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし