

平成 26 年 5 月 30 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23570141

研究課題名(和文)細胞極性タンパク質LGNを介した紡錘体の配向制御機構の構造生物学的解析

研究課題名(英文)Structural analysis of the regulation of mitotic spindle orientation by the cell polarity protein LGN

研究代表者

湯澤 聡 (Yuzawa, Satoru)

九州大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：40515029

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：細胞の非対称分裂は細胞の多様性を生み出す仕組みの一つであり、発生過程や組織構築に重要な役割を果たしている。細胞極性関連タンパク質mInscとLGNとが相互作用することで、細胞極性と紡錘体配向を制御している。mInsc-LGN複合体は細胞膜の適切な場所に再配置し、他のタンパク質と相互作用する。本研究課題では、mInsc-LGN複合体の結晶構造を決定し、分子内相互作用により制御されているLGNの分子機構について検討した。

研究成果の概要(英文)：Asymmetric cell division generates cell type diversity and is crucial for the development and tissue organization. The interactions between the cell polarity protein mInsc and LGN regulate mitotic spindle orientation during asymmetric cell division in certain types of cells. The complex of mInsc and LGN is targeted to plasma membrane and form complexes with other proteins. In this project, we have determined the crystal structure of LGN in complex with mInsc and elucidate the molecular mechanism of LGN regulated by its intramolecular interaction.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：構造生物化学

キーワード：細胞極性 細胞内シグナル伝達 X線結晶構造解析

1. 研究開始当初の背景

発生過程における細胞運命の決定や組織構築において、非対称分裂は細胞の多様性を生み出す重要な仕組みの一つである。近年、様々な生物種において非対称分裂に関連するタンパク質が同定され分子機構も明らかになりつつある。細胞分裂に先立ち細胞極性が確立し、関連する一連のタンパク質が複合体を形成し細胞の特定の場所に適切に配置し非対称分裂が進行する。ほ乳動物の非対称分裂の分子機構については未だ不明な点が多いが、ショウジョウバエや線虫で想定される分子機構とのアナロジーから次のような機序で制御されていると想定される (図 1)。細胞極性が頂端-基底軸に沿って形成されると、頂端側の細胞膜近傍には細胞極性の制御に関わる「Par3-Par6-aPKC 複合体」が集積する。一方、LGN (Leu-Gly-Asn repeat-enriched protein) は GDP に結合した三量体 G タンパク質 α サブユニット ($G\alpha$) と複合体を形成する。LGN は $G\alpha$ と同時に、mInsc (mammalian Inscuteable) と NuMA (Nuclear mitotic apparatus protein) とも結合する。頂端側に局在した「 $G\alpha$ -LGN-mInsc 複合体」は、mInsc と Par3 との結合を介して「Par3-Par6-aPKC 複合体」とリンクする。また、紡錘体から伸びる星状体微小管は「 $G\alpha$ -LGN-NuMA 複合体」により細胞表面につながれ、分子モータータンパク質「Dynein-Dynactin 複合体」と共に紡錘体の配向を制御するための張力発生に関与する。これらの複合体が協調的に働くことで紡錘体の配向と細胞極性がカップルし、細胞極性軸と分裂軸が一致するよう制御され非対称分裂が進行すると考えられている。

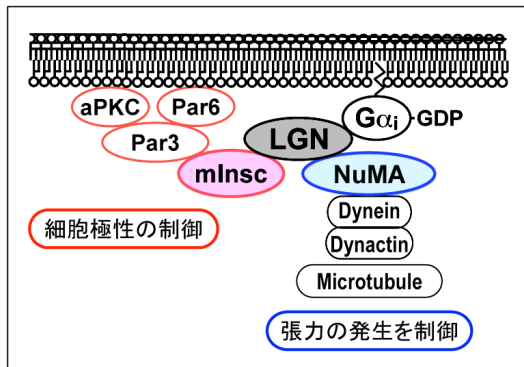


図 1 非対称分裂における紡錘体の配向制御に関わるタンパク質複合体

LGN はアミノ酸配列の解析から、N 末端の複数の TPR (tetratricopeptide repeat) モチーフと、C 末端側の 4 個の GoLoco ($G\alpha$ i/o Loco interaction) モチーフから成るドメイン構造を持つと予想されている (図 2)。LGN TPR モチーフには、LGN パートナー分子である mInsc と NuMA が結合する。一方、GoLoco モチーフは $G\alpha$ i と相互作用し、GDI (GDP

dissociation inhibitor) として機能する。また、全長型 LGN タンパク質はパートナー分子に対し効率よく結合できない。LGN は TPR ドメインと C 末端領域との間の分子内相互作用により自己阻害状態が保持され、LGN とパートナー分子との相互作用が制御されている。実際、LGN TPR モチーフは LGN C 末端領域と分子内相互作用することが示されている。興味深いことに、mInsc、NuMA や LGN C 末端領域はいずれも LGN TPR モチーフに結合するにもかかわらず、NuMA、mInsc や LGN C 末端領域の間にはアミノ酸配列の目立った相同性は見られない。LGN の分子内相互作用は、パートナー分子 (NuMA と $G\alpha$ i-GDP) との相互作用に応じて段階的に解除され、LGN C 末端領域の GoLoco モチーフが $G\alpha$ i-GDP と効率的に結合できるようになると同時に、TPR モチーフと NuMA との結合の効率が上がることが示されている。この点で LGN は分子スイッチとして機能していると考えられている。しかしながら、LGN の自己阻害状態を維持する分子機序やパートナー分子による活性制御機構の詳細はよく解っておらず立体構造に関する知見は全くない。立体構造に基づいて LGN の詳細な制御機構を知るために、LGN-パートナー分子複合体と共に全長型 LGN の立体構造を明らかにし、パートナー分子による活性化機構を検討することが必要である。

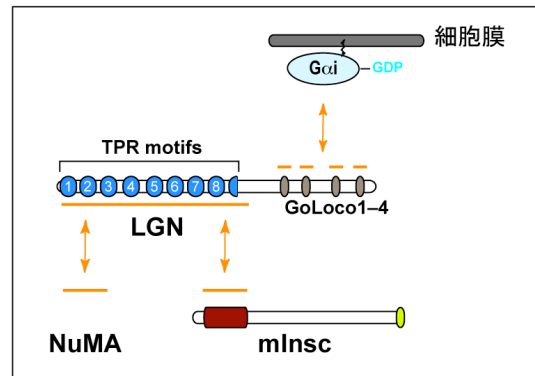


図 2 LGN を介したタンパク質間相互作用

2. 研究の目的

本研究課題では、細胞極性タンパク質 LGN の分子間・分子内相互作用を介した活性制御機構を立体構造に基づいて明らかにすることで、細胞の極性形成の機序と非対称分裂の制御機構を解明することを目的としている。そのため本研究課題では、LGN とパートナー分子 mInsc 複合体の X 線結晶構造を決定し分子認識を明らかにし、mInsc-LGN 複合体の細胞内での機能を検討する。そして、自己阻害状態を反映した LGN の X 線結晶構造を決定し、自己阻害の作用機構を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) mInsc-LGN 複合体の X 線結晶構造

申請者らの先行研究で確立した方法により mInsc-LGN 結合領域(mInsc-LBD)-LGN TPR ドメイン複合体を調製した。両タンパク質を大腸菌に共発現し、複合体タンパク質を分離精製した。初期スクリーニングから得られた結晶化条件について条件を精密化し、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。X 線回折実験は、高エネルギー加速器研究機構 フォトンファクトリーの BL-17A ビームラインで行った。アミノ酸の相同性の高い既知の TPR モチーフの立体構造をサーチモデルとして利用し、分子置換法により構造決定を行なった。最終的に、2.6Å分解能のデータセットを用いてモデルを精密化した。

(2) mInsc と LGN の相互作用解析

相互作用に関与する残基を特定するため、LGN-mInsc 複合体の立体構造の情報をもとに変異体タンパク質を作成した。変異体 LGN と mInsc について、pull down assay による *in vitro* 結合実験を行った。さらに、表面プラズモン共鳴測定装置を用いて正確な解離定数を測定した。また、これらの変異体 LGN を用いて、mInsc, NuMA, Gai への相互作用に対する影響を検討した。COS-7 等のほ乳動物由来培養細胞に変異体および野生型遺伝子を導入し、タンパク質間相互作用を免疫沈降法を用いて検討した。野生型および変異体遺伝子を導入し、発現したタンパク質について細胞内局在を細胞染色を行い観察した。

(3) LGN の分子内相互作用についての検討

LGN TPR ドメインとの結合に必要な最小かつ安定な分子内相互作用領域の同定を試みた。様々な長さの LGN C 末端領域を含むタンパク質の発現系を構築し、GST プルダウンアッセイまたは共発現系を用いて、発現可能な結合領域を絞り込んだ。得られた LGN TPR ドメインと相互作用する最小領域について、表面プラズモン共鳴法を用いて LGN TPR ドメインとの親和性を測定した。また、mInsc と LGN C 末端領域が LGN TPR ドメインと相互作用するときの特徴を検討した。また、全長型 LGN タンパク質を用いて LGN の分子内相互作用がパートナー分子との結合に及ぼす影響について生化学的な検討を行った。

(4) 全長型 LGN 複合体の立体構造解析

LGN の分子内相互作用を検討するため、LGN 全長タンパク質を発現精製し、結晶化を行なった。LGN 全長タンパク質の性質を改善するため N 末端および C 末端領域をトリミン

グしたタンパク質についても発現精製し、結晶化を試みた。また、分子内相互作用に必要な C 末端領域に着目し、LGN TPR ドメインとの間のリンカー領域を短縮したタンパク質を作成した。

4. 研究成果

LGN TPR ドメインと mInsc-LBD 複合体の結晶構造を分解能 2.6Åで決定した(図 3)。複合体中で、LGN は TPR モチーフが形成する逆平行 α ヘリックスを 8 つと、C 末端側のキャッピングヘリックスがタンデムに繋がり一続きの右巻きのスーパーヘリックスを形成している。一方、mInsc-LBD は α ヘリックスと短い逆平行 β シートが伸びた領域で連結した特徴的な構造を持ち、伸びた棒状の構造を示していた。LGN TPR ドメインの凹面全体が mInsc-LBD を包むように相互作用することを明らかにした。CD スペクトルの測定から、mInsc-LBD 単独では特定の立体構造を持たないことから、LGN TPR ドメインとの相互作用により mInsc は特徴的な 2 次構造が誘起される。複合体の相互作用は mInsc-LBD の 3 つの領域で特徴づけられる。mInsc の両親媒性の α ヘリックス領域が LGN TPR ドメインの凹面で相互作用する。mInsc の伸びた領域にあるグルタミン酸残基が、LGN TPR ドメインのアルギニン残基と相補的な静電相互作用を形成する。mInsc の内側の β ストランドが LGN TPR ドメインの凹面で静電相互作用と疎水性相互作用により結合し、外側の β ストランドが上から覆うように β シートを形成する。今回決定した mInsc-LGN 複合体の構造は、LGN TPR ドメインによる多様なパートナー分子の認識メカニズムの理解に大きく貢献することができると考えられる。

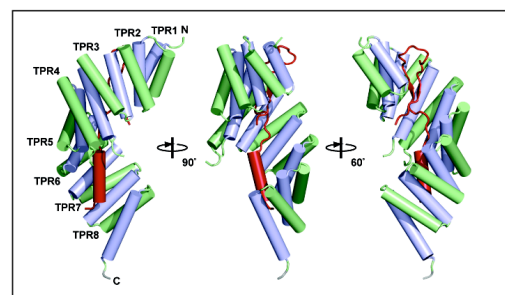


図 3 mInsc-LBDとLGN TPRドメイン複合体の結晶構造

8つのTPRモチーフはスーパーヘリックスを形成する。それぞれのTPRモチーフは、ヘリックス(A)-ターンヘリックス(B)構造をもつ。ヘリックス(A)を青、ヘリックス(B)を緑、mInsc-LBDは赤で示している。(雑誌論文4より引用)

mInsc-LGN 複合体形成において重要な残基について GST pull-down assay を用いて検討した。その結果、mInsc の α ヘリックス領域の Trp-31 と LGN Asn-283, mInsc の伸びた領

域の Glu-42 と LGN Arg-221 との相互作用が重要な役割を担うことを示した。また、表面プラズモン共鳴法を用いて LGN TPR ドメインと mInsc-LBD の親和性を測定したところ、2.4 nM の解離定数を持つことが判明した。さらに、複合体形成を損なう変異体を用いた解析から、mInsc-LGN 相互作用が mInsc の細胞膜への局在に重要な役割を果たしていることと、LGN の安定性に寄与していることを示した。

次に、LGN の分子内相互作用に関与する最小領域を検討した。LGN TPR ドメインとの相互作用には、LGN C 末端側の 3, 4 番目の GoLoco モチーフを含む領域が必要であることを明らかにした。GoLoco モチーフは $G\alpha$ と相互作用するが、同じ領域を介して LGN TPR ドメインとも結合できることを確認した。表面プラズモン共鳴法を用いて LGN TPR ドメインと LGN C 末端領域の親和性を測定したところ、 μ M オーダーの解離定数を持つことが判明した。また、この領域は LGN TPR ドメインに対しパートナー分子である mInsc と競合関係にあり、変異体を用いた実験から LGN TPR ドメインが形成するスーパーヘリックスの凹面を介して相互作用している可能性が示唆された。

分子内相互作用による LGN の制御機構について検討するため全長型 LGN 複合体の立体構造解析を行なった。LGN 全長タンパク質を大腸菌で発現させると、C 末端領域の分解がひどく精製が困難である。そこで、全長型 LGN の N 末端側に GST タグ、C 末端側に His タグを繋げ、アフィニティー精製を 2 回行なったところ結晶化可能なタンパク質を得た。また、種間での保存性が低くランダムコイルと予測された N 末端と C 末端をトリミングしたタンパク質についても発現精製した。完全長 LGN タンパク質は高濃度でアグリゲートする傾向があったが、末端をトリミングした LGN ではその性質は大幅に改善された。両者について結晶化スクリーニングを試みたが、回折実験に適した結晶は得られなかった。一方、LGN TPR ドメインと C 末端領域を短縮したタンパク質を作成した。TPR ドメインから C 末端領域へ連結した場合、全長型タンパク質同様に単量体で存在した。逆に C 末端領域から TPR ドメインに連結した場合、多量体を形成した。このことから適切な分子内相互作用を維持するためには LGN TPR ドメインから C 末端領域へ連結する必要がある。現在、リンカーの長さを最適化し結晶化スクリーニングを進めている。

研究課題を進めている過程で、海外のグループから LGN TPR ドメインの一部と分子内相互作用領域の一部を短縮して繋げたタンパク質の構造が報告されたが、LGN の制御機構について更に詳細な情報を得るために、引き続き全長型 LGN および分子内相互作用を維持した短縮型 LGN について、キャラクタリゼーションを行なうと共に結晶化スクリーニングを進め、結晶構造解析を行なう予定である。

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 4 件)

1. Kanako Chishiki, Sachiko Kamakura, Satoru Yuzawa, Junya Hayase, Hideki Sumimoto, Ubiquitination of the heterotrimeric G protein α subunits $G\alpha_{i2}$ and $G\alpha_q$ is prevented by the guanine nucleotide exchange factor Ric-8A. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 435, 414-419, 2013 (査読有)
2. 湯澤 聡, 細胞極性タンパク質 LGN とパートナー分子 mInsc 複合体の認識機構, *日本結晶学会誌*, 54, 206-212, 2012 (査読有)
3. Shunsuke Matsumoto, Mayumi Igura, James Nyirenda, Masaki Matsumoto, Satoru Yuzawa, Nobuo Noda, Fuyuhiko Inagaki, Daisuke Kohda, Crystal structure of the C-terminal globular domain of oligosaccharyltransferase from *Archaeoglobus fulgidus* at 1.75 Å resolution, *Biochemistry*, 51, 4157-4166, 2012 (査読有)
4. Satoru Yuzawa, Sachiko Kamakura, Yuko Iwakiri, Junya Hayase, Hideki Sumimoto Structural basis for interaction between the conserved cell polarity proteins Inscuteable and Leu-Gly-Asn repeat-enriched protein (LGN), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108, 19210-19215, 2011 (査読有)

[学会発表] (計 2 件)

1. 湯澤 聡, 鎌倉幸子, 岩切優子, 早瀬純也, 住本英樹, 細胞極性タンパク質 LGN の TPR ドメインによるパートナー分子の多様な認識 第 85 回日本生化学会大会 2012 年 12 月 14 日 ~ 2012 年 12 月 16 日, 福岡
2. 湯澤 聡, 鎌倉幸子, 岩切優子, 早瀬純也, 住本英樹, 細胞極性関連タンパク質 Inscuteable と LGN との複合体の X 線結晶構造解析, 第 34 回日本分子生物学会年会, 2011 年 12 月 14 日, 横浜

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :

権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
該当なし

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・助教
研究者番号：40515029

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし