

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 30 日現在

機関番号：14603

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23770119

研究課題名(和文) ミオシンによる選択的積み荷輸送機構の構造的研究

研究課題名(英文) Structural study of selective cargo transport by unconventional myosins

研究代表者

平野 良憲 (Hirano, Yoshinori)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・助教

研究者番号：50452529

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円、(間接経費) 1,080,000円

研究成果の概要(和文)：モータータンパク質ミオシンによる積み荷輸送は、タンパク質やオルガネラを適切な場所へ運び、細胞での配置を規定するために不可欠なプロセスである。本研究では重要なミオシンの1つmyosin-Xについて、積み荷輸送に関与する領域の構造を、積み荷分子の1つである軸索ガイダンスに関与するDCCとの複合体として決定することに成功した。また、別な積み荷分子インテグリンや微小管との相互作用解析の結果、myosin-Xは積み荷分子ごとに異なる認識機構を持つことによって、多様な分子と特異的に相互作用することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The Cargo transportation by myosins is essential for proper cell phenomena. We performed a series of structural and biochemical studies of the myosin-X tail domain, consisting of MyTH4 and FERM domains in complex with its specific cargo, a netrin receptor DCC (deleted in colorectal cancer). As the result, we found an unexpected binding mode of the DCC peptide, which is distinct from previously reported associations found in radixin/adhesion molecule complexes. Moreover, we revealed direct interactions between the MyTH4-FERM domain and tubulin C-terminal acidic tails, and identified a positively charged patch of the MyTH4 domain as a tubulin binding region. We also demonstrated that both DCC and integrin bindings interfere with microtubule binding and that DCC binding interferes with integrin binding. Our results provide the molecular basis by which myosin-X facilitates alternative dual binding to cargos and microtubules.

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：X線結晶構造解析 分子認識 積み荷輸送 ミオシン 微小管

1. 研究開始当初の背景

ミオシンはアクチン線維上を移動するモータータンパク質であり、筋収縮や細胞内輸送など様々な現象において必須の役割を担っている。ミオシンは共通して存在するモータードメインによってアクチン線維上を移動する機能を基盤として、C末端側のtail領域のドメイン構造の多様性によって種々のシグナル伝達に応答している。

ミオシンの1つ myosin-X の積み荷には神経細胞の軸索の伸長方向を誘導するネトリン受容体 DCC、インテグリンや VE-カドヘリンなどの細胞接着分子などが含まれ、myosin-X による積み荷輸送は、神経突起の伸長、アクチン線維による糸状仮足の形成やインテグリンを介した細胞接着の形成などに重要であることが分かっている。また myosin-X は積み荷輸送だけでなく、微小管と直接結合して、微小管とアクチン線維という2つ細胞骨格系を連結する係留分子として機能する。この機能は細胞の有糸分裂における紡錘系の形成に必須である。

myosin-X のドメイン構成は、N末端側からモータードメイン、ネックドメイン、3つのPHドメイン、そしてMyTH4、FERMドメインとなっている。tail領域に存在するMyTH4-FERMドメインは積み荷分子や微小管と直接結合する領域であることが先行研究から明らかとなっている。DCCや微小管の認識にはMyTH4、FERMドメイン単独では不十分であり、両ドメインが協調して結合に関与していることが示唆されていた。

研究開始当初、myosin-X のtail領域の立体構造解析は全く行われておらず、機能制御機構は未知であった。そのため、立体構造解析を中心とした生化学的・生物物理学的解析によってミオシンの積み荷選別機構と細胞骨格の係留分子という2つの機能を制御する分子メカニズムを解明するという着想に至った。

2. 研究の目的

本研究ではX線結晶構造解析および生化学・生物物理学的手法を組み合わせることで、myosin-X のMyTH4-FERMドメインによるDCC、微小管の構成タンパク質チューブリンやインテグリンの特異的な積み荷選別機構および微小管の認識機構を原子レベルで明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

in vitro 再構成系において myosin-X と DCC、チューブリンおよびインテグリンの結合アッセイ系を確立した。このアッセイ系を用いて、各タンパク質の myosin-X 結合領域の絞り込みを行った。その結果、各タンパク質の myosin-X との結合に必要な領域を数十残基程度までに絞り込むことに成功した。この結果に基づいて作成した種々のタンパク質コンストラクトについて、

大腸菌を用いたタンパク質発現系および精製系を確立して、myosin-X との複合体として結晶化スクリーニングを行った。その結果、myosin-X と DCC の複合体、myosin-X とインテグリン複合体について結晶が得られた。得られた結晶を用いて大型放射光施設 SPring-8 で X 線回折実験を行った結果、myosin-X と DCC の複合体において 1.9 Å の X 線回折斑点を取得した。続いてセレノメチオニン置換タンパク質結晶を用いて X 線回折実験を行って得られたデータをもとに MAD 法によって位相決定を行って、立体構造を決定した。また、チューブリン存在下において結晶化スクリーニングした条件において myosin-X 単独の結晶が得られ、同様に大型放射光施設 SPring-8 で X 線回折実験を行った結果、2.55 Å の X 線回折斑点を取得した。複合体の立体構造を基に分子置換法で立体構造決定した。

等温滴定カロリーメトリー (ITC) や分析超遠心等の生物物理学的手法によって、myosin-X と各結合タンパク質の相互作用の結合強度の定量的解析や結合の化学量論的解析を行った。また、立体構造解析によって明らかになった情報を基に、種々の変異体を作製して、*in vitro* プルダウンアッセイや共沈降実験などの生化学的解析によって、相互作用における寄与を解析した。

4. 研究成果

myosin-X の MyTH4-FERM ドメインと DCC の複合体の高分解能での構造解析の結果から、分子認識機構の詳細が明らかとなった。その結果、DCC の myosin-X 相互作用部位は2本の α ヘリックス構造をとり、myosin-X の FERM ドメインのサブドメイン C に存在する疎水性の溝にはまり込むように相互作用していることを原子レベルで明らかにした。先行研究で他の FERM ドメインによる結合タンパク質の相互作用様式が示されているが、DCC と myosin-X に見られる分子認識機構は従来の認識機構とは全く異なるものであることが立体構造解析の結果から明らかとなった。また、複合体に加えて、myosin-X 単独での立体構造解析も行うことで、DCC の結合に伴う立体構造変化を観測した。その結果、マルチドメインから構成される myosin-X の MyTH4-FERM ドメインは2つのドメインが互いに相互作用することで、1つの安定な機能モジュールを形成していることや、DCC 結合部位周辺は、疎水性残基による協調的な構造変化によって溝が広がり、DCC のヘリックスを受容しやすい形に構造変化を起こすことを明らかとした。

MyTH4 ドメインは、立体構造解析の例がなかったが、今回の構造解析の結果、

タンパク質間相互作用に用いられる VHS ドメイン様の構造をとっていることが判明した。しかし、VHS ドメインでタンパク質相互作用に用いられる部位は MyTH4 ドメインでは保存されておらず、別な機能を持っていることが示唆された。そこで、立体構造解析と合わせて、生化学的および生物物理学的解析を行った結果、チューブリンの酸性残基に富む tail 領域は、myosin-X の MyTH4 ドメインに存在する塩基性残基から形成される正電荷のパッチにと相互作用することを明らかにした。tail 領域のみならず再構成した微小管との相互作用においても myosin-X の同領域が主たる相互作用領域であることを見出した。つまり、DCC と微小管の相互作用領域は myosin-X の異なる領域がそれぞれ担っていることを明らかにした。さらに myosin-X と DCC の結合強度の定量的解析や、チューブリンやインテグリンとの相互作用様式についても解析を進めた。その結果、DCC と微小管、さらにはインテグリン と myosin-X の相互作用は互いに競合することを明らかにした。以上の結果は、myosin-X による微小管や積み荷分子の結合が排他的であり、1 度に 1 つの積み荷や微小管としか結合できないことを明らかにした。

本研究において明らかとなった myosin-X の tail 領域による特異的な積荷認識機構は、モータードメインの機能および構造研究に比して解析の進んでいなかったミオシンによる積み荷の選別を行う仕組みの解明とともに、細胞において絶え間なく変化する状況に臨機応変に適應するために再編成される動的シグナル伝達複合体のシグナル制御の解明につながることで期待される。

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 5 件)

- (1) Nakagawa M, Kagiya M, Shibata N, Hirano Y, Hakoshima T. Mechanism of high-affinity abscisic acid binding to PYL9/RCAR1. (2014) *Genes to Cells* **19**, 386-404. 査読有
- (2) Nasuno, R., Hirano, Y., Itoh, T., Hakoshima, T., Hibi, T., Takagi, H. Structural and functional analysis of the yeast N-acetyltransferase Mpr1 involved in oxidative stress tolerance via proline metabolism. (2013) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.* **110**,

11821-11826. 査読有

- (3) Kagiya, M., Hirano, Y., Mori, T., Kim, S.Y., Kyojuka, J., Seto, Y., Yamaguchi, S., Hakoshima, T. (2013) *Genes to Cells*. **18**, 147-160. 査読有
- (4) 村瀬浩司, 平野良憲, 箱嶋敏雄 植物ホルモンによって誘導されるタンパク質分解のメカニズム (2011) 実験医学 **29**, 1987-1994. 査読無
- (5) Hirano, Y., Hatano, T., Takahashi, A., Toriyama, M., Inagaki, N. Hakoshima, T. Structural basis of cargo recognition by the myosin-X MyTH4-FERM domain. (2011) *EMBO J.* **30**, 2734-2747. 査読有

〔学会発表〕(計 6 件)

- (1) 那須野亮, 平野良憲, 伊藤貴文, 箱嶋敏雄, 日比隆雄, 高木博史 酵母の酸化ストレス耐性に関与するN-アセチルトランスフェラーゼMpr1の構造機能解析 酵母遺伝学フォーラム第46回研究報告会 2013年9月8日 宮城県仙台市東北学院大学土樋キャンパス 8号館
- (2) 那須野亮, 平野良憲, 伊藤貴文, 箱嶋敏雄, 日比隆雄, 高木博史 酵母の酸化ストレス耐性に関与するN-アセチルトランスフェラーゼMpr1の構造機能解析 第13回食品酵素科学研究会 2013年9月2日 大阪府大阪市大阪府立大学 I-site難波
- (3) 那須野亮, 平野良憲, 伊藤貴文, 箱嶋敏雄, 日比隆雄, 高木博史 Structural and functional analyses of the yeast N-acetyltransferase Mpr1 involved in oxidative stress tolerance. 日本農芸化学会2013年度大会 2013年3月25日, 宮城県仙台市
- (4) 須野亮, 平野良憲, 伊藤貴文, 箱嶋敏雄, 日比隆雄, 高木博史 酵母の酸化ストレス耐性に関与するN-アセチルトランスフェラーゼMpr1の構造機能解析 第85会日本生化学会大会 2012年12月15日、福岡県福岡市
- (5) Hirano, Y., Hatano, T., Takahashi, A., Toriyama, M., Inagaki, N. Hakoshima, T. Structural basis of cargo recognition by the myosin-X MyTH4-FERM domain. XXII Congress and General Assembly of the International Union of Crystallography, 2011年8月24日 マドリッド(スペイン)
- (6) 平野良憲, 畑野大樹, 高橋彩, 箱嶋敏雄

Myosin-XのMyTH4-FERMドメインによる積み荷認識機構の構造的基盤,

第11回日本蛋白質科学会年会

2011年6月7日, 大阪府吹田市ホテル阪急エキスポパーク

〔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)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平野 良憲 (HIRANO YOSHINORI)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイ

エンス研究科・助教

研究者番号: 50452529