

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 20 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26440028

研究課題名(和文) 組織の構造パターンを決定する細胞接着分子の構造生物学的研究

研究課題名(英文) Structural analysis of cell adhesion molecules that determine cell coordinate in tissue

研究代表者

鈴木 守 (Suzuki, Mamoru)

大阪大学・たんぱく質研究所・准教授

研究者番号：40280507

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：ネクチン1及びネクチン3の細胞外領域を昆虫細胞にて分泌発現する系を構築し、その精製系を確立した。表面プラズモン共鳴法を用いた相互作用解析の結果、ネクチン1-ネクチン3間の結合は解離が速く、複合体画分を精製する系は現実的でないことが判明したため、各ネクチンを個別に精製した後に混和して結晶化に用いる系を構築した。これらの精製タンパク質を用いた結晶化及びX線結晶構造解析の結果、マウスネクチン1及びマウスネクチン3の各ホモダイマー構造を新規構造として得た(PDB ID: 5B21、5B22)。また、ケミカルクロスリンク実験から、ネクチン1-ネクチン3ヘテロ複合体はダイマーであることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We established recombinant expression systems for extracellular domains of mouse Nectin-1 and mouse Nectin-3 in insect cell Sf-9. First we tried to purify Nectin-1 / Nectin-3 heterodimer fraction from the mixture of cultural supernatants. However, the result of surface plasmon resonance analysis indicated the fast dissociation rate constant of heterophilic interaction between Nectin-1 and Nectin-3, suggested difficulty of stable hetero-complex purification. Thus we next established individual purification systems for Nectin-1 and Nectin-3, respectively. The purified Nectins were mixed and used for crystallization experiments. As a result, structures of Nectin-1 homodimer and Nectin-3 homodimer were obtained from mixture of purified Nectin-1 and Nectin-3 in 2.24 Å and 2.58 Å resolutions, respectively (PDB ID: 5B21 and 5B22). Additionally, chemical crosslink experiment using BS3 crosslinker revealed that the minimal unit of Nectin-1 / Nectin-3 heterophilic complex is heterodimer.

研究分野：構造生物学

キーワード：ネクチン 構造生物学 結晶構造解析

### 1. 研究開始当初の背景

細胞接着は細胞と細胞および細胞と細胞外基質との間に作られ、これらは互いに相互作用している。細胞接着は、組織や臓器の形成に必須であると共に、その異常はがんや循環器や神経の疾患など多くの疾患の原因になっており、現在の生物学・医学上の最も重要な課題の一つになっている。

細胞接着の開始は、増殖しながら運動している細胞同士が衝突して接触することにより行われる。細胞の増殖と運動を促進するネクチン様分子(Nectin)が細胞の運動先導端において、細胞接着分子ネクチンとヘテロフィリックトランス結合することにより細胞の増殖と運動が停止され、ネクチンとカドヘリンによるアドヘレンスジャンクションが形成され、続いてクローディンによるタイトジャンクションが形成される

(図1)。この細胞の接触による増殖と運動の停止は発生過程における臓器形成には極めて重要であり、一方がんではこの機構が破壊されている結果、がん細胞の異常増殖と浸潤・転移が引き起こされる。

ネクチンは1~4、ネクチン様分子(Nectin)は1~5のメンバーからなるファミリーを形成している。1回膜貫通型の蛋白質あり、N末端が細胞外を向いており、3つの免疫グロブリン(以下、Ig)フォールド(V-set、C2-set、C2-set)を持つ。ネクチン、Nectinは同じ分子構造を取っているが、1次配列の相同性は20%と低い。ネクチン、Nectinは、まず同じ細胞膜上でシスダイマーを作り、次に他の細胞膜上のシスダイマーとホモフィリックトランス結合をする(図2)。さらにシスダイマーはヘテロフィリックトランス結合もする(図3、ネクチン3はネクチン1と強くトランス結合する。)これらのシス、トランスの結合は細胞生物学的に研究されているが、分子構造に立脚した議論はこれまでなされていない。重要な点は、アドヘレンスジャンクション接着分子としてよく知られているカドヘリンは細胞間でホモフィリック結合のみしかできない。ネクチン、Nectinが有するヘテロフィリックトランス相互作用能力こそが細胞の空間配置に大きくかわる重要な機能である。例を挙げると内耳のコルチ器官以外にも、神経シナプスでは前シナプスにネクチン1が後シナプスにはネクチン3が発現して、細胞間接着を担っている。

### 2. 研究の目的

申請者はこれまで、ネクチンによる細胞接着機構の解明のため、ネクチンの細胞外領域の結晶構造解析にチャレンジしてきた。その過程で、大腸菌を用いた発現系により得られた封入体の精製法、refolding条件の検討法を確立してきた。この方法で得られたサンプルを用い、ネクチン1の細胞外領域の立体構造(3つのIgフォールドを含

む)を明らかにすることに成功した。得られた構造からダイマー形成に重要な残基を見出している(JBC, 2011)。さらに、Nectinファミリーの細胞外領域の構造解析に挑み、昆虫細胞用のウイルス作成に成功している。この経験をもとにネクチン、Nectinのヘテロフィリックトランス複合体(例:ネクチン1/ネクチン3複合体)の構造解析に果敢に挑戦し、細胞の空間配置にかかわる細胞接着の分子基盤を原子構造レベルで明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

昆虫細胞培養系を用いて、ネクチン1~4のNectin-1~5の細胞外領域の最適な培養条件の検討を行う。精製条件の確立および、ヘテロ複合体の状態でゲル濾過精製を行い、得られたサンプルを濃縮後、大規模結晶化スクリーニングに用いる。結晶が得られたものから放射光施設で回折実験を行い、ヘテロフィリックトランス複合体の構造解析を行う。構造をもとに、変異実験を行い、これまで得られている細胞生物学的知見を統合することにより、アドヘレンスジャンクションにおけるネクチンおよびNectinの作用機序を原子分子レベルで解明する。

### 4. 研究成果

ネクチン1及びネクチン3の細胞外領域を昆虫細胞にて分泌発現する系を構築し、その精製系を確立した。表面プラズモン共鳴法等を用いた相互作用解析の結果、ネクチン1-ネクチン3間の結合は解離が速く、複合体画分を精製する系は現実的でないことが判明したため、各ネクチンを個別に精製した後に混和して結晶化に用いる系を構築した。これらの精製タンパク質を用いた結晶化及びX線結晶構造解析の結果、マウスネクチン1及びマウスネクチン3の各ホモダイマー構造を新規構造として得た(PDB ID: 5B21、5B22)。

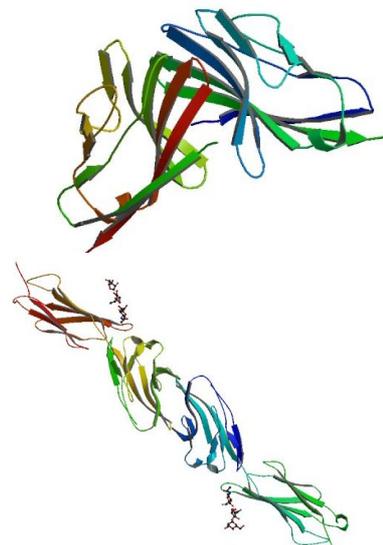


図1 上)ネクチン1-D1ドメインの構造  
下)ネクチン3-D1D2ドメインの構造

また、製タンパク質を用いた溶液中でのクロスリンク実験では、Nectin-1、Nectin-3とも単独でモノマー及びダイマー相当の位置にバンドが観測され、Nectin-1/3混合条件でもヘテロダイマー相当の位置にバンドが得られた。このことから、少なくともNectin-1/3間ヘテロ相互作用の最小単位はダイマーであることが示唆された。

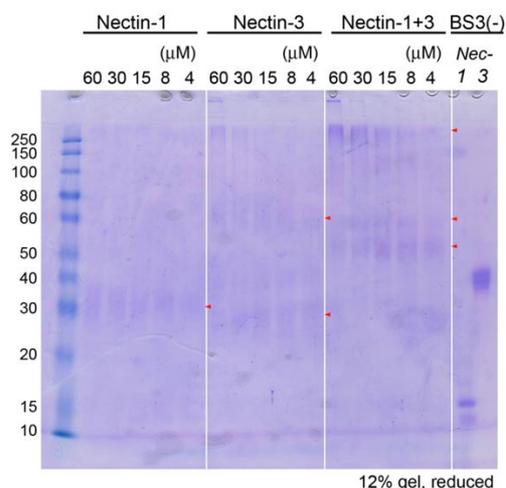


図2 ケミカルクロスリンク実験

本研究を通じて、ネクチン1 - ネクチン3ヘテロ複合体の構造解析には至らなかったものの、新規構造としてマウスネクチン1、マウスネクチン3それぞれのホモダイマー構造を解明した。また、相互作用解析実験の結果、ネクチンのヘテロ相互作用とホモ相互作用は、種々の塩に対して非常に似通った解離傾向を示すことから、同様の結合モードを有することが示唆された。加えて、ケミカルクロスリンクを用いた実験により、ネクチン1 - ネクチン3ヘテロ複合体の最小単位はヘテロ2量体であることが示された。これらの結果は、ネクチンが細胞間でヘテロフィリックに結合する際、各細胞上でシス・ホモダイマーを形成した後にトランス相互作用を起こすという通説では説明が難しく、ネクチンによる細胞接着機構を再考する第一歩となるものである。

#### 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16件)

Michihiro Sugahara, Takanori Nakane, Tetsuya Masuda, Mamoru Suzuki, Shigeyuki Inoue, Changyong Song, Rie Tanaka, Toru Nakatsu, Eiichi Mizohata, Fumiaki Yumoto, Kensuke Tono, Yasumasa Joti, Takashi Kameshima, Takaki Hatsui, Makina Yabashi, Osamu Nureki, Keiji Numata, Eriko Nango, So Iwata. "Hydroxyethyl cellulose matrix applied to serial crystallography."

Scientific Reports 7,703. (2017) 査読あり

Tetsuya Masuda, Mamoru Suzuki, Shigeyuki Inoue, Changyong Song, Takanori Nakane, Eriko Nango, Rie Tanaka, Kensuke Tono, Yasumasa Joti, Takashi Kameshima, Takaki Hatsui, Makina Yabashi, Bunzo Mikami, Osamu Nureki, Keiji Numata, So Iwata & Michihiro Sugahara. "Atomic resolution structure of serine protease proteinase K at ambient temperature." Scientific Reports 7,45604. (2017) 査読あり

Michihiro Suga, Fusamichi Akita, Michihiro Sugahara, Minoru Kubo, Yoshiki Nakajima, Takanori Nakane, Keitaro Yamashita, Yasufumi Umena, Makoto Nakabayashi, Takahiro Yamane, Takamitsu Nakano, Mamoru Suzuki, Tetsuya Masuda, Shigeyuki Inoue, Tetsunari Kimura, Takashi Nomura, Shinichiro Yonekura, Long-Jiang Yu, Tomohiro Sakamoto, Taiki Motomura, Jing-Hua Chen, Yuki Kato, Takumi Noguchi, Kensuke Tono, Yasumasa Joti, Takashi Kameshima, Takaki Hatsui, Eriko Nango, Rie Tanaka, Hisashi Naitow, Yoshinori Matsuura, Ayumi Yamashita, Masaki Yamamoto, Osamu Nureki, Makina Yabashi, Tetsuya Ishikawa, So Iwata & Jian-Ren Shen. "Light-induced structural changes and the site of O=O bond formation in PSII caught by XFEL." Nature 543,131-135 (2017) 査読あり

Nakane T, Hanashima S, Suzuki M, Saiki H, Hayashi T, Kakinouchi K, Sugiyama S, Kawatake S, Matsuoka S, Matsumori N, Nango E, Kobayashi J, Shimamura T, Kimura K, Mori C, Kunishima N, Sugahara M, Takakyu Y, Inoue S, Masuda T, Hosaka T, Tono K, Joti Y, Kameshima T, Hatsui T, Yabashi M, Inoue T, Nureki O, Iwata S, Murata M, Mizohata E. "Membrane protein structure determination by SAD, SIR, or SIRAS phasing in serial femtosecond crystallography using an iododetergent." PNAS. 113, 13039-13044(2016) 査読あり

Kohji Yamamoto, Akifumi Higashiura, Mamoru Suzuki, Takahiro Shiotsuki, Ryohei Sugahara, Takeshi Fujii, Atsushi Nakagawa. "Structural characterization of an aldo-keto reductase (AKR2E5) from the silkworm Bombyx mori." Biochemical and Biophysical Research Communications. 474,104-110(2016) 査読あり

Michihiro Sugahara, Changyong Song, Mamoru Suzuki, Tetsuya Masuda, Shigeyuki Inoue, Takanori Nakane, Fumiaki Yumoto, Eriko Nango, Rie Tanaka, Kensuke Tono, Yasumasa Joti, Takashi Kameshima, Takaki Hatsui, Makina Yabashi, Osamu Nureki, Keiji Numata, So Iwata. "Oil-free hyaluronic acid matrix for serial femtosecond crystallography." *Scientific reports*. 6, 24484 (2016) 査読あり

Fukuda Y, Tse KM, Nakane T, Nakatsu T, Suzuki M, Sugahara M, Inoue S, Masuda T, Yumoto F, Matsugaki N, Nango E, Tono K, Joti Y, Kameshima T, Song C, Hatsui T, Yabashi M, Nureki O, Murphy ME, Inoue T, Iwata S, Mizohata E. "Redox-coupled proton transfer mechanism in nitrite reductase revealed by femtosecond crystallography." *PNAS*. 133, 2928-2933(2016) 査読あり

Fukuda Y, Tse KM, Suzuki M, Diederichs K, Hirata K, Nakane T, Sugahara M, Nango E, Tono K, Joti Y, Kameshima T, Song C, Hatsui T, Yabashi M, Nureki O, Matsumura H, Inoue T, Iwata S, Mizohata E. "Redox-coupled structural changes in nitrite reductase revealed by serial femtosecond and microfocus crystallography." *J. Biochem*. 159, 527-538(2016) 査読あり

Nakane T, Song C, Suzuki M, Nango E, Kobayashi J, Masuda T, Inoue S, Mizohata E, Nakatsu T, Tanaka T, Tanaka R, Shimamura T, Tono K, Joti Y, Kameshima T, Hatsui T, Yabashi M, Nureki O, Iwata S, Sugahara M. "Native sulfur/chlorine SAD phasing for serial femtosecond crystallography." *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 71, 2519-25(2015) 査読あり

Atsushi Kodan, Tomohiro Yamaguchi, Tomohiro Murai, Keiko Gomi, Naoki Kajiyama, Eiichi Mizohata, Mamoru Suzuki, Eriko Nango, Kensuke Tono, Yasumasa Joti, Takashi Kameshima, Jaehyun Park, Changyong Song, Takaki Hatsui, Makina Yabashi, So Iwata, Hiroaki Kato, Hideo Ago, Masaki Yamamoto & Toru Nakatsu "An isomorphous replacement method for efficient de novo phasing for serial femtosecond crystallography." *Scientific Reports* 5,14017 (2015) 査読あり

Kensuke Tono, Eriko Nango, Michihiro Sugahara, Changyong Song, Jaehyun Park, Tomoyuki Tanaka, Rie Tanaka, Yasumasa Joti, Takashi Kameshima, Shun Ono, Takaki Hatsui,

Eiichi Mizohata, Mamoru Suzuki, Tatsuro Shimamura, Yoshiki Tanaka, So Iwata and Makina Yabashi. "Diverse application platform for hard X-ray diffraction in SACLA (DAPHNIS): application to serial protein crystallography using an X-ray free-electron laser." *J. Synchrotron Rad.* 22, 532-537(2015) 査読あり

Fujiwara Y, Goda N, Tamashiro T, Narita H, Satomura K, Tenno T, Nakagawa A, Oda M, Suzuki M, Sakisaka T, Takai Y, Hiroaki H. "Crystal structure of afadin PDZ domain-nectin-3 complex shows the structural plasticity of the ligand-binding site." *Protein Sci*. 24, 376-85(2015) 査読あり

Kobayashi H, Motoyoshi N, Itagaki T, Suzuki M, Inokuchi N. "Effect of the replacement of aspartic acid/glutamic acid residues with asparagine/glutamine residues in RNase He1 from *Hericium erinaceus* on inhibition of human leukemia cell line proliferation." *Biosci. Biotechnol. Biochem*. 79, 211-217 (2015) 査読あり

Sugahara M, Mizohata E, Nango E, Suzuki M, Tanaka T, Masuda T, Tanaka R, Shimamura T, Tanaka Y, Suno C, Ihara K, Pan D, Kakinouchi K, Sugiyama S, Murata M, Inoue T, Tono K, Song C, Park J, Kameshima T, Hatsui T, Joti Y, Yabashi M, Iwata S. "Grease matrix as a versatile carrier of proteins for serial crystallography." *Nat Methods*. 12, 61-3 (2015) 査読あり

Hiroko Kobayashi, Takuya Katsutani, Yumiko Hara, Naomi Motoyoshi, Tadashi Itagaki, Fusamichi Akita, Akifumi Higashiura, Yusuke Yamada, Norio Inokuchi and Mamoru Suzuki. "X-Ray Crystallographic Structure of RNase Po1 That Exhibits Antitumor Activity." *Biol. Pharm. Bull*. 37, 968-978(2014) 査読あり

Kojima R, Okumura M, Masui S, Kanemura S, Inoue M, Saiki M, Yamaguchi H, Hikima T, Suzuki M, Akiyama S, Inaba K. "Radically Different Thioredoxin Domain Arrangement of ERp46, an Efficient Disulfide Bond Introducer of the Mammalian PDI Family." *Structure* 4, 431-443(2014) 査読あり

〔学会発表〕(計 15 件)

小林 弘子, 元吉 尚美, 板垣 正, 武部 克希, 寒川 剛, 鈴木 守 “ヤマブシタケ由来 RNaseHe1 の Zn 複合体の X 線構造解析” 日本薬学会第 137 年会 (2017 年 3 月 24 ~ 27 日) 宮城県仙台市仙台国際センター

寒川 剛, 武部 克希, 中田 匡宣, 川端 重忠, 鈴木 守 “M3 型化膿レンサ球菌が産生する線毛タンパク質 FctA3 の結晶構造解析” 日本結晶学会平成 28 年度年会(2016 年 11 月 17 ~ 18 日) 茨城県水戸市茨城県民文化センター

菅原 道泰, 鈴木 守, 榎田 哲哉, 井上 茂之, Changyong Song, 中根 崇智, 溝端 栄一, 中津 亨, 湯本 史明, 南後 恵理子, 登野 健介, 沼田 圭司, 岩田 想 “高粘度結晶輸送媒体を利用した XFEL 施設 SACLA での連続フェムト秒結晶構造解析” 日本結晶学会平成 28 年度年会 (2016 年 11 月 17 ~ 18 日) 茨城県水戸市茨城県民文化センター

中根 崇智, 花島 慎弥, 鈴木 守, 齋木 悠, 林 太一, 垣之内 啓介, 杉山 成, 川竹 悟史, 松岡 茂, 松森 信明, 南後 恵理子, 小林 淳, 島村 達郎, 木村 香菜子, 森 千寿, 国島 直樹, 菅原 道泰, 高久 陽子, 井上 茂之, 榎田 哲哉, 保坂 俊彰, 登野 健介, 城地 保昌, 亀島 敬, 初井 宇記, 矢橋 牧名, 井上 豪, 濡木 理, 岩田 想, 村田 道雄, 溝端 栄一 “膜蛋白質の SFX による迅速位相決定を志向したヨウ素含有界面活性剤の開発” 日本結晶学会平成 28 年度年会 (2016 年 11 月 17 ~ 18 日) 茨城県水戸市茨城県民文化センター

寒川 剛, 武部 克希, 勝谷 拓也, 鈴木 守 “細胞接着因子 Nectin-1/3 ヘテロ複合体の立体構造解析” 第 16 回日本蛋白質科学会年会 (2016 年 6 月 7 ~ 9 日) 福岡県福岡市福岡国際会議場

山下 恵太郎, 潘 東青, 奥田 智彦, 菅原 道泰, 小段 篤史, 山口 知宏, 村井 智洋, 溝端 栄一, 鈴木 守, 南後 恵理子, 登野 健介, 城地 保昌, 亀島 敬, 初井 宇記, 矢橋 牧名, 岩田 想, 加藤 博章, 吾郷 日出夫, 山本 雅貴, 中津 亨 “X 線自由電子レーザーを用いた新規タンパク質の立体構造決定” 日本薬学会第 136 年会(2016 年 3 月 26 ~ 29 日) パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

小林 弘子, 元吉 尚美, 板垣 正, 鈴木 守, 井口 法男 “ヤマブシタケ由来 RNase He1 の改変による至適 pH の変動について” 日本薬学会第 136 年会(2016 年 3 月 26 ~ 29 日) パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

菱沼 光恵, 田中 陽子, 矢口 学, 栗原 紀子, 鈴木 守, 野本 たかと “fimA P. gingivalis

型 TDC60 株産生ジペプチダーゼの構造および呼吸器官への為害性” 日本障害者歯科学会(2015 年 11 月 6 ~ 8 日) 名古屋国際会議場 (愛知県名古屋市)

寒川 剛, 武部 克希, 鈴木 守 “細胞接着因子ネクチンのヘテロ複合体の結晶構造解析” 日本結晶学会平成 27 年度年会(2015 年 10 月 17 ~ 18 日) 大阪府立大学 中百舌鳥キャンパス (大阪府堺市)

山下 恵太郎・潘 東青・長谷川 和也・菅原 道泰・村井 智洋・小段 篤史・溝端 栄一・鈴木 守・榎田 哲哉・平田 邦生・加藤 博章・吾郷 日出夫・熊坂 崇・山本 雅貴・中津 亨 “シリアル結晶学における重原子誘導体を用いた位相決定” 日本結晶学会平成 27 年度年会(2015 年 10 月 17 ~ 18 日) 大阪府立大学 中百舌鳥キャンパス (大阪府堺市)

榎田 哲哉, 南後 恵理子, 菅原 道泰, 鈴木 守, 登野 健介, 城地 保昌, 亀島 敬, Park Jaehyun, Song Changyong, 初井 宇記, 矢橋 牧名, 大久保 喬平, 三上 文三, 北島 直文, 谷 史人, 岩田 想 “甘味タンパク質ソーマチンの連続フェムト秒結晶構造解析” 日本農芸化学会 2015 年度大会(2015 年 3 月 26 ~ 29 日) 岡山

小林 弘子, 元吉 尚美, 板垣 正, 鈴木 守, 井口 法男 “システイン残基改変体を用いたヤマブシタケ由来 RNase He1 の安定性の検討” 日本薬学会第 135 年会 (2015 年 3 月 25 ~ 28 日) 神戸

鈴木 守, 柴田 恭子, 安孫子 宜光 “歯周病原原因菌由来 HBP35 の構造と機能” 物構研サイエンスフェス(2015 年 3 月 17 ~ 18) つくば

寒川 剛・成田 宏隆・勝谷 拓也・中川 敦史・鈴木 守 “特異的細胞接着の構造生物学的理解を目指して” 日本結晶学会平成 26 年度年会(2014 年 11 月 1 ~ 3 日) 東京

鈴木 守 “アドヘレンスジャンクションで働く接着因子の立体構造と機能” 第 56 回歯科基礎医学会学術大会 (2014 年 9 月 25 ~ 27 日) 福岡

〔その他〕

ホームページ

<http://www.protein.osaka-u.ac.jp/rcsfp/supracryst/suzuki/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 守 (SUZUKI MAMORU)

大阪大学・たんぱく質研究所・准教授

研究者番号: 4 0 2 8 0 5 0 7