

戦略的創造研究推進事業 CREST
研究領域「たんぱく質の構造・機能と発現メカニズム」
研究課題「タンパク質の動的複合体形成による機能制御の構造的基盤」

研究終了報告書

研究期間 平成13年 12月～平成19年 3月

研究代表者：箱嶋 敏雄
(奈良先端科学技術大学院大学
情報科学研究科、教授)

1 研究実施の概要

構 想

細胞内シグナル伝達ネットワークには情報の分岐点がある。そこでは、複数の分子と相互作用できる重要な鍵タンパク質が、一過的ではあるが、複数の分子との複合体(動的複合体)を形成して、個々の分子の機能を正や負に制御する。これによる情報の分配や統合を介して、細胞機能の動的な制御を実現している。本研究では、低分子量 G タンパク質 Rho の制御下にあるシグナル伝達系を軸に、最終的に、以下の3つのテーマ、

- 1)細胞接着やアクチン細胞骨格の制御系における足場形成
- 2)微小管伸張の動的制御
- 3)ゲノム維持における基本タンパク質の動的複合体形成

に集約される分野において、動的複合体の三次元構造決定を通して、特異的相互作用により達成される分子認識と、その結果起こる構造変化を通じた分子機能制御の構造的基盤を明らかにするとともに、創薬の糸口を探ることを目的とした。

実 施

研究は、基本的に、申請研究代表者の単一の研究グループで実施した。

研究の実施では、まず、高次構造決定という目的に合ったタンパク質の発現系を構築することが必要である。特に、複合体の結晶化を成功させるためには、幾つかのドメイン化したタンパク質の発現系を用意する必要がある。発現系の構築では、新たに PD と技術員を確保して、従来の大腸菌とともに、昆虫細胞を恒常的に利用できるような体制を構築した。また、効率のよい大量培養やタンパク質精製系の構築のために、インキュベータ (1 台)、遠心機 (小型 2 台、大型 1 台)、クロマトグラフィー (2 台)、全自動電気泳動装置 (1 台)、分光光度計 (2 台) 等を補強した。また、プロジェクト途中で開発された自動微量結晶化装置 (1 台) を購入して、大規模スクリーニングを可能とした。

結晶化と平行して進めた相互作用の溶液実験やタンパク質化学的な分析のためには、最初、電気泳動で簡便に行うが、定量的な解析は、表面プラズモン共鳴測定、蛍光光度計を通して行う。このために、蛍光偏角度計(1台)と分析超遠心機(1台)を購入した。

結晶化に続く、X 線回折データ収集、構造解析は、当研究室では既に多くの実績があり、必要な機器類も概ね整備してあるので、詳細は省くが、構造解析に耐えうるデータを与える結晶が得られた時点で、セレノメチオニン誘導体と通常の重原子誘導体結晶の調整を平行して進めた。基礎実験は実験室で行うが、データ収集の大半は、SPring-8 を用いた。

成 果

以下に得られた成果を要約する。

1. ERM (ezrin/radixin/moesin) タンパク質による接着分子、膜貫通型プロテアーゼ、シグナル伝達制御タンパク質の分子認識機構と構造変化を通じた機能変換の機構を原子レベルで解明した。また、Rho キナーゼの構造を決定して、特異な活性制御機構を解明するとともに、薬物設計の道を開いた。

2. 微小管伸張制御タンパク質間の相互作用を解析するとともに、CLIP-170 によるチューブリンならびに微小管の認識の詳細を決定して、伸張機構を提案した。

3. 構造特異的エンドヌクレアーゼ FEN1 と DNA クランプ分子 PCNA との複合体の構造を決定して、FEN1 のコンホメーション変化による活性制御機構を提唱した。また、FEN1-DNA の複合体の構造を決定して flap DNA への特異性を原子レベルで解明した。

2 研究構想及び実施体制

(1) 研究構想

申請者は一貫して、分子複合体の X 線構造決定に基づく、タンパク質の分子間相互作用の研究を続けてきた。核酸、特に DNA 構造と、そのタンパク質による DNA 分子認識の構造生物学的解析を進める一方で、この数年は、細胞生物学領域での構造生物学を展開することを目指して、低分子量 G タンパク質のシグナル伝達系に重点的を置いてきた。細胞内シグナル伝達ネットワークには情報の分岐点がある。そこでは、複数の分子と相互作用できる重要な鍵タンパク質が、一過的ではあるが、複数の分子との複合体(動的複合体)を形成して、個々の分子の機能を正や負に制御する。これによる情報の分配や統合を介して、細胞機能の動的な制御を実現している。本研究では、低分子量 G タンパク質 Rho の制御下にあるシグナル伝達系を軸に、最終的に、以下の3つのサブテーマ、

- 1) 細胞接着やアクチン細胞骨格の制御系における足場形成
- 2) 微小管伸張の動的制御
- 3) ゲノム維持における基本タンパク質の動的複合体形成

に集約される分野において、動的複合体の三次元構造決定を通して、特異的相互作用により達成される分子認識と、その結果起こる構造変化を通じた分子機能制御の構造的基盤を明らかにするとともに、創薬の糸口を探ることを目的とした。

第一の足場形成の研究では、細胞接着分子と細胞骨格を物理的に連結するリンカータンパク質に注目した。リンカータンパク質は細胞接着における足場形成における中心分子であり、構造研究は、カドヘリンにおけるカテニン、インテグリンにおけるビンキュリン等の研究例があるが、それ以外の重要な接着分子についてはほとんど不明であった。そこで、最近の生化学・細胞生物学的研究で、重要性が認識されつつある ERM (ezrin/radixin/moesin) タンパク質に注目した。ERM タンパク質の一つであるラデキシンは月田早智子教授らによって発見されており、生物学・医学的な検討が詳細になされている。そこで色々と援助を頂くこととした。

通常、ERM タンパク質は、その機能が自己阻害された不活性型として細胞質中に存在するが、活性化されると、先ず、膜直下に移行して、細胞膜や細胞接着分子に結合すると同時にアクチン繊維に会合する。この研究開始時点で、活性型 ERM タンパク質が結合する接着分子は幾つか知られていた(ICAM-2, CD43, CD44)が、その特異性の詳細は明らかではなかった。そのために、ERM タンパク質の標的接着分子の探索は、不完全なものとなっていた。そこで、先ず、ERM タンパク質の接着分子認識の特異性を明らかにすることから始めた。研究を進める中で、新しい標的タンパク質、特に膜貫通型プロテアーゼ(NEP, MT1-MMP)等の接着分子以外のものの報告もあり、これらも研究対象に加えていった。標的接着分子の中で、特に、生物学的に重要な CD43 と CD44 は、細胞質「ドメイン」については、性状や他のタンパク質の相互作用パートナー等についてより詳細な解析も行った。

活性型 ERM タンパク質は、シグナル伝達の足場タンパク質として、細胞質内のタンパク質とも相互作用する。その最も重要な例として、イオンチャネル NHE1 (Na⁺-H⁺ Exchanger-1) やイオンチャネル NHE の制御タンパク質 NHERF (NHE regulatory protein) と、Rho の負の制御因子であるグアニンヌクレオチド解離阻害因子(GDI)がある。これらのタンパク質間、あるいは先の接着タンパク質や膜貫通型プロテアーゼとの間には、配列上の相同性は無かったので、それぞれ異なった相互作用が存在すると期待された。更に、最近の実験では、三量体 G タンパク質の新規なαサブユニット(G_{α12}と G_{α13})が直接に FERM ドメインに相互作用して、ERM の活性化をするという実験データも報告された。また、活性型 ERM タンパク質は、Rho の GEF (グアニンヌクレオチド交換因子)活性をもつアダプタータンパク質 Hamartin を活性化して、Rho の活性化に寄与することもわかった。これらについても解析を試みる。

一方、ERM タンパク質の直接の活性化は、イノシトール二リン酸(PIP2)の結合と、Rho キナーゼによるリン酸化であることが解っている。準備段階の研究で、PIP2 による活性化の構造的基礎は既に解明したので、ここでは、Rho キナーゼの構造研究を重点的に行う。特に、Rho キナーゼは、生

理学的には、平滑筋収縮をひきおこすことが知られており、薬理的にも重要なタンパク質なので、医学薬学的観点からも研究を推進する。

第二のサブテーマである微小管伸張の動的制御では、微小管の+端に集積する基本制御タンパク質(+TIP)である、EB1(endo binding protein 1)と APC (Adenomatous Polyposis coli protein)(月田承一郎教授からの援助による)、ならびに CLIP-170(cytoplasmic protein 170kDa)(貝淵弘三教授からの援助による)を中心に研究を開始した。これのタンパク質についての細胞生物学的研究は盛んであったが、生化学的研究は皆無に等しかった。そこで、タンパク質化学的解析から始めて、分子構造・機能の解析へ発展させるように計画した。これらと関連して、ダイニンの微小管へのローディングを制御するダイナクチンのサブユニットである p150Glued や、CLIP-170 の細胞膜側の標的タンパク質 IQGAP や、微小管制御系やキネシンの輸送に関わる CRMP-2 等の関連タンパク質の研究も平行して推進する。IQGAP と CRMP-2 は Rho キナーゼの標的タンパク質である。これらの構造的知見は、最終的には+TIP1の知見と統合して、機能を論じることを目論んだ。

第三には、ゲノム維持における基本タンパク質の動的複合体の解析を推進する。これまでの研究上の「know-how」の蓄積があるタンパク質-DNA 相互作用系なので、超分子複合体の観点も含んで、困難ではあるが、分子量の大きい系での標的を考えることにした。DNA 複製や修復では複数の酵素や制御タンパク質が相互作用し合って、複雑な DNA 編集を効率良くこなしている。この過程の基本は、二重らせん DNA 以外の構造をもつ DNA を、二重らせん DNA へ戻すことであり、その基本酵素は DNA ポリメラーゼ、ヌクレアーゼ FEN1 (flap endonuclease 1)、ならびに DNA リガーゼの三者であり、各課程の特徴に応じて、種々の修復酵素やヘリカーゼ等が加わる。これまでの研究で、DNA ポリメラーゼと DNA リガーゼについては多くの研究がなされているが、FEN1 については、分子としての理解が乏しい。また、DNA クランプである PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) は、これらの酵素の全てと直接に結合して、DNA との反応を補助する。そこで、本研究では、FEN1 を中心に、PCNA 等との相互作用や構造特異的な酵素活性を、複合体構造を通して、明らかにしていくことを計画した。

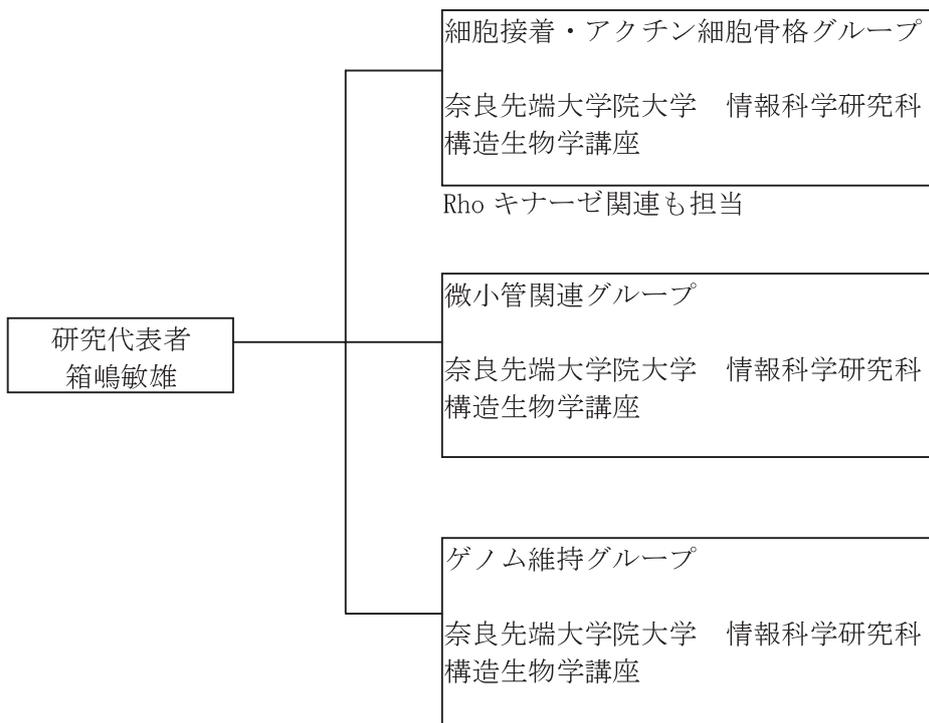
(2)実施体制

研究の実施は、先ず、高次構造決定という目的に合ったタンパク質の発現系を構築することが必要である。特に、複合体の結晶化を成功させるためには、幾つかのドメイン化したタンパク質の発現系を用意する必要がある。発現系の構築では、新たに PD と技術員を確保して、従来の大腸菌とともに、昆虫細胞を恒常的に利用できるような体制を構築した。また、効率のよい大量培養やタンパク質精製系の構築のために、インキュベータ(1台)、遠心機(小型2台、大型1台)、クロマトグラフィー(2台)、全自動電気泳動装置(1台)、分光光度計(2台)等を補強した。また、プロジェクト途中で開発された自動微量結晶化装置(1台)を購入して、大規模スクリーニングを可能とした。

結晶化と平行して進めた相互作用の溶液実験やタンパク質化学的な分析のために、は、最初、電気泳動で簡便に行うが、定量的な解析は、表面プラズモン共鳴測定、蛍光光度計を通して行う。このために、蛍光偏角度計(1台)と分析超遠心機(1台)を購入した。

結晶化に続く、X 線回折データ収集、構造解析は、当研究室では既に多くの実績があり、必要な機器類も概ね整備してあるので、詳細は省くが、構造解析に耐えうるデータを与える結晶が得られた時点で、セレノメチオン誘導体と通常の重原子誘導体結晶の調整を平行して進めた。基礎実験は実験室で行うが、データ収集の大半は、SPring-8 を用いた。

以上の研究は、単一の研究講座で実施した。



3 研究実施内容及び成果

3.1 サブテーマ1: 細胞接着やアクチン細胞骨格の制御系における足場形成

(1)研究実施内容及び成果

はじめに

ERM (ezrin/radixin/moesin)タンパク質は、細胞膜とアクチン細胞骨格を連結する足場形成タンパク質の一つである。ERM タンパク質は、膜内面に会合するとともに、一群の細胞接着分子等に特異的に結合して、細胞骨格への連結や局在を制御する。また、ERM タンパク質は低分子量Gタンパク質 Rho のシグナル伝達ネットワークの制御下にある。これまでの研究では、ERM タンパク質が細胞膜のリン脂質 PIP2 (phosphatidylinositol-3,5-bisphosphate)の結合による活性化機構や(1)、RhoA の標的認識(2)について明らかにしてきた。

参考文献

- (1) Hamada, K., Shimizu, T., Matsui, T., Tsukita, Sh., Tsukita, Sa., Hakoshima, T. (2000). Structural basis of the membrane-targeting and unmasking mechanisms of the radixin FERM domain. EMBO J. 19(17), 4449-4462.
- (2) Maesaki, R., Ihara, K., Shimizu, T., Kuroda, S., Kaibuchi, K., and Hakoshima, T. (1999). The structural basis of Rho effector recognition revealed by the Crystal structure of human RhoA complexed with the effector domain of PKN/PRK1. Molecular Cell 4(5), 793-803.

本研究では、ERM タンパク質がどのようにして標的である特定の細胞接着分子等を選別しているかを整理するために、まず、接着分子への特異的結合の詳細を、複合体結晶の X 線による構造決定と点変異を用いた結合実験で解析した。実際には、ERM タンパク質の一つであるラデキシンの N-末端に存在する FERM ドメイン (band4.1 and ERM ドメイ

ン:膜会合と接着分子認識の本体)と、接着分子等の細胞内ドメインやペプチドを用いた実験を推進して、ICAM-2 複合体(後述 6 成果発表 (1) 原著論文 6) や NHERF 複合体(後述 6 成果発表 (1) 原著論文 15))をはじめ、合計9種類の複合体の X 線結晶構造解析に成功した。

これに加えて、ERM タンパク質のホモログで、神経繊維腫症 II 型 (NF-II: NeuroFibromatosis type II)の原因遺伝子産物であるマーリン(merlin)の FERMドメインの結晶構造を決定して、医療との連携を図った(後述 6 成果発表 (1) 原著論文 4))。更に、ERMタンパク質をリン酸化して活性化する Rho キナーゼの RhoA 結合ドメイン(後述 6 成果発表 (1) 原著論文 8))や、活性ドメイン本体の構造についても、阻害剤ファスジル(fasudil)と Y-27632 の2種類の複合体の結晶構造を決定した(後述 6 成果発表 (1) 原著論文 14))。後に述べるように、これらは血管拡張剤として、くも膜下出血・脳梗塞・心筋梗塞等の有望な治療薬として知られており、社会的なインパクトも大きかった。

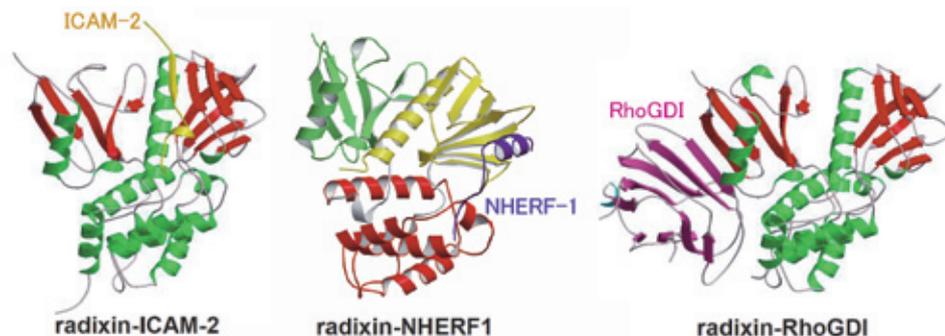


図1. X 線で構造決定したラデキシシン FERM ドメインと標的タンパク質との複合体の例 Motif-1 の例として、ICAM-2 複合体、Motif-2 の例として NHERF1 複合体、また、これらに属さない例(Motif-3)として RhoGDI 複合体を示した。

ERM 複合体の構造解析

具体的には、複合体としての構造解析に成功した接着分子は、ICAM-2 (intercellular adhesion molecule-2)、PSGL-1 (P-selectin glycoprotein ligand-1)、CD43 (sialophorin/leukosialin)、ならびに CD44 (Pgp-1/H-CAM)の 4 種類である。ICAM-2、PSGL-1、CD43 は、白血球の炎症部位の血管内皮への細胞間接着等に、CD44 は細胞外マトリックス(ECM)、特に、ヒアルロン酸の受容体であり、細胞増殖制御やガン細胞増殖に重要である。また、本研究の進展中に ERM タンパク質の標的であることが明らかとなった膜貫通型プロテアーゼ、NEP (Neutral endopeptidase 24.11)と MT1-MMP (membrane-type 1 matrix metalloproteinase)についても複合体構造を決定した。NEP はエンドセリン等の分解による細胞増殖阻害とともに CD44 と共存して細胞運動を抑制する。また、MT1-MMP は ECM や CD44 の細胞外ドメインの分解を通して、細胞運動を促進する。更に、ERM タンパク質の標的であることが判明した NHERF1 (NHE regulatory factor 1, 2: NHE 制御因子)と NHERF2 についても、複合体の結晶化に成功して構造解析した。これらは、 Na^+/H^+ 交換イオンチャネル(NHE: Na^+/H^+ Exchanger)の活性を制御する重要なアダプタータンパク質として知られている。また、Rho シグナル伝達との接点として、Rho 特異的グアニンヌクレオチド解離阻害因子 RhoGDI (Rho-specific guanine-nucleotide dissociation inhibitor)との複合体の構造も決定した。NHERF1、NHERF2 ならびに RhoGDI の3つは細胞質タンパク質の標的タンパク質である。これらの構造決定や生化学的な解析より、ERM タンパク質は、少なくとも3つの配列モチーフ(Motif-1、Motif-2、Motif-3)を認識することがわかった。

認識配列 Motif-1 (I 型膜タンパク質)

Motif-1 は、ICAM-2 との複合体構造をもとに導出した認識配列 RxxTYxVxxA を原型としている(x は任意のアミノ酸残基:ICAM-2 の配列は(RTGTYGVLAA))。この配列は、β鎖(xxTY)とそれに続く 3₁₀-ヘリックス(VxxA)を形成して、FERM ドメイン中の PTB 様のサブドメイン C との反平行βシート形成、ならびに疎水性残基をもつ 3₁₀-ヘリックスの疎水性ポケットへのドッキングを通して結合する(図 1)。ICAM-1, ICAM-3, VCAM-1, L1-CAM, syndecan, neurexin 等がこれと類似の配列をもつことが判明した。また、PSGL-1 (KTHMYPVRNY), CD43 (RTGALTLSGG), CD44 (QKKKLVINGG)は、これと類似するが、幾つか保存残基を欠く。これらの複合体構造を決定した結果、いずれの接着分子も、ICAM-2 に見られた 3₁₀-ヘリックスが形成されなくても、βシートの側鎖間の相互作用等で相互作用を補うことにより、結合力を保つことがわかった。このような例外はあるものの、共通配列として、(R/K/Q)xxT(Y/L)x(V/I/L)xx(A/G)と書けることが解った。

認識配列 Motif-1 (II 型膜タンパク質)

ERM タンパク質の既知の標的接着分子は全て I 型膜タンパク質であり、C-末端側が細胞質にある。その認識配列 Motif-1 は、細胞質ペプチドの細胞膜直下の領域に存在する。これは膜貫通型プロテアーゼの MT1-MMP でも同様である。しかし、NEP は II 型膜タンパク質であり、N-末端側が細胞質にある。このペプチド極性の違いと相俟って、NEP には Motif-1 の存在が確認されなかった。複合体結晶の構造決定等の結果より、NEP には細胞膜貫通ヘリックスから十数残基離れたところに Motif-1 様の配列(QMDITDINAP)が存在しており、3₁₀-ヘリックスの代わりに、配列 DINA がヘヤピン構造を形成して、サブドメイン C の疎水性ポケットに結合することが判明した。認識部位でのペプチドの配向は I 型膜タンパク質のものと同じであるが、ヘヤピン構造によって C-末端側が折り返して、細胞膜貫通ヘリックスに続くことがわかった(図2)。これにより、ERM タンパク質上での NEP の結合部位は CD44 と同一であることが証明されて、「NEP が CD44 と ERM タンパク質との結合に拮抗することにより、細胞運動を抑制する」という仮説に構造的根拠を与えることができた。

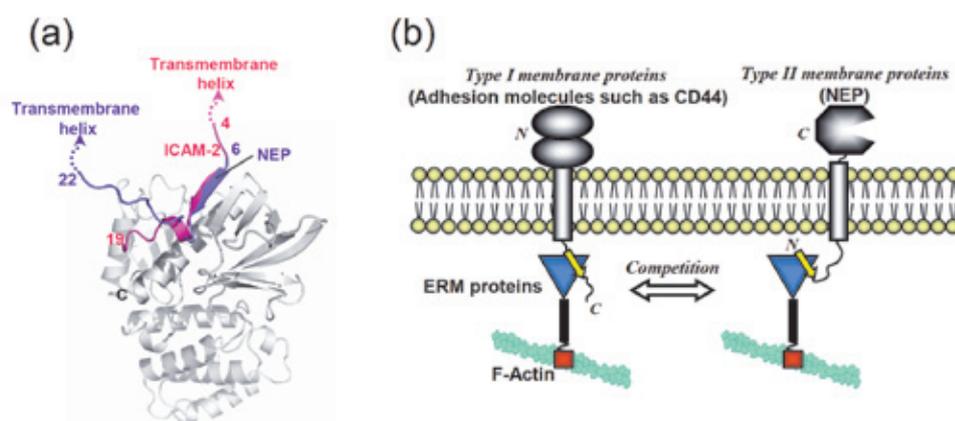


図2. I 型膜タンパク質と II 型膜タンパク質の両者を認識する ERM タンパク質
(a) I 型膜タンパク質(例として ICAM-2、青)と、II 型タンパク質(例として NEP、ピンク)との FERM ドメイン上での重ね合わせ。
(b) NEP による CD44 と ERM タンパク質の結合の競合阻害。

細胞接着による細胞骨格連結誘起の「outside-in」機構

ICAM-2 をはじめとして、ERM タンパク質の標的接着分子は、膜貫通ヘリックスと Motif-1

配列との間に、数残基長の塩基性残基クラスターをもつ。このクラスターはERMタンパク質がMotif-1に結合した状態でも露出しており、PIP2などの負に荷電したリン脂質頭部と相互作用できる。このことは、細胞接着が細胞膜上の局所で始まり、ICAM-2の接着部位での濃縮が始まると、その部位でのPIP2の濃縮も始まることを意味している。この局所濃度の上昇は、ERMタンパク質の接着部位への効果的なリクルートを可能にするとともに、PIP2への結合によるERMタンパク質の活性化を促進する。これにより、アクチン細胞骨格との連結が始まり、接着分子が接着部位に固定される。このように、動的複合体の構造(や *in vitro* の結合実験などの物理化学的な測定)の知識をもとに、接着部位への接着分子のクラスター化によって“outside-in”を説明できることを始めて示して注目された(後述 6 成果発表 (1) 原著論文 15)および、(5)受賞等③その他 2)。

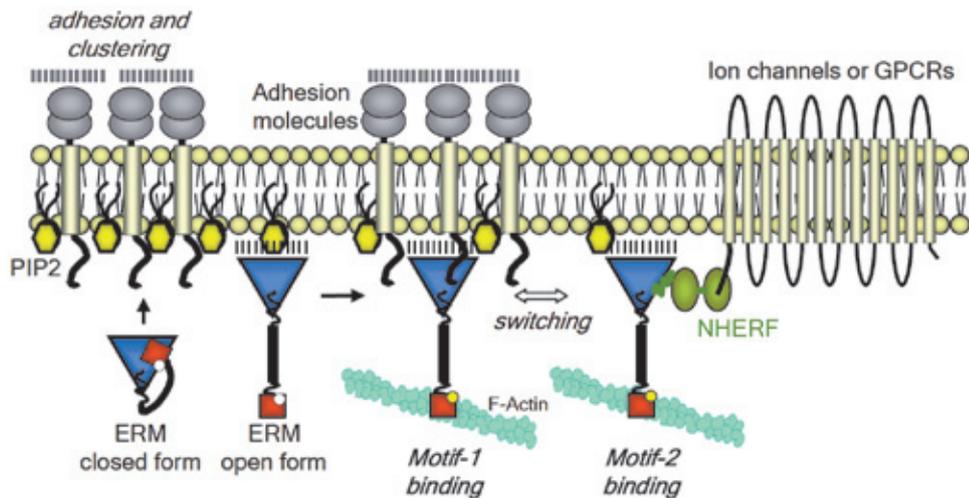


図3. 細胞接着が引き起こす「outside-in」シグナル伝達機構、ならびに Motif-1 結合と Motif-2 結合が切り替える接着と受容体のスイッチ機構

認識配列 Motif-2(細胞質タンパク質)と、Motif-1 とのスイッチ機構

Motif-2 は、MDWxxxxx[L/I]Fxx[L/F] であり、NHERF1 や NHERF 2 との複合体の構造決定と変異解析の結果、見いだされた。この配列も FERM ドメインのサブドメイン C に結合するが、結合部位は Motif-1 とは異なる。即ち、 α -ヘリックスを形成することによって、サブドメイン C の β -サンドウィッチ構造のループが形成する疎水的な溝にはまり込む(図1)。更に、モチーフの C-末側に続く塩基性残基との静電的な相互作用で結合を補強する。Motif-1 と Motif-2 との結合部位は異なるが、サブドメイン C の構造変化を通して、それらの結合は互いに競合することを証明した。これにより、ERM タンパク質が接着分子とイオンチャンネル等との活性化のスイッチ役を演じる能力をもつことを示した(図3)。NHERF1 と NHERF2 は、NHE や CFTR (Cl⁻交換体)などのイオンチャンネルや GPCR, PDGFR などの受容体のアダプターとして働く。これら受容体の局在等の制御が接着分子のそれと干渉し合う分子メカニズムの構造的基礎を世界に先駆けて提出できた。

Rho による正の多重制御回路

ERMタンパク質による細胞接着分子とアクチン細胞骨格との連結は、低分子量Gタンパク質 Rho のシグナル伝達経路の下流にあることが、種々の細胞生物学的な実験により示されている。PIP2 の生成は Rho の支配下にあるので、上記の接着分子の接着部位へのクラスター化による“outside-in”説も、これに矛盾しない。また、活性型 ERM タンパク質を安定

化するリン酸化も、Rho キナーゼなど Rho によって活性化されるタンパク質キナーゼで起こる。更に、活性化した ERM タンパク質が Rho を活性化するという正のフィードバックを示唆する生化学実験も報告されている。ここでは、ERM タンパク質と Rho の負の制御タンパク質である RhoGDI との複合体の構造(図1)を決定して、ERM タンパク質が構造的に Rho の RhoGDI からの解離を促進するとともに、Rho の C-末端に結合した脂質が細胞膜に移行し易いように RhoGDI を配向させることを明らかにした。また、ERM タンパク質は PIP2 や ICAM-2 あるいはそれと同様の様式で結合する細胞接着分子に結合したままで、RhoGDI に結合できることも示して、正のフィードバック機構の構造的基礎を確立して、注目された(後述 6 成果発表 (5)受賞等③その他 1)。

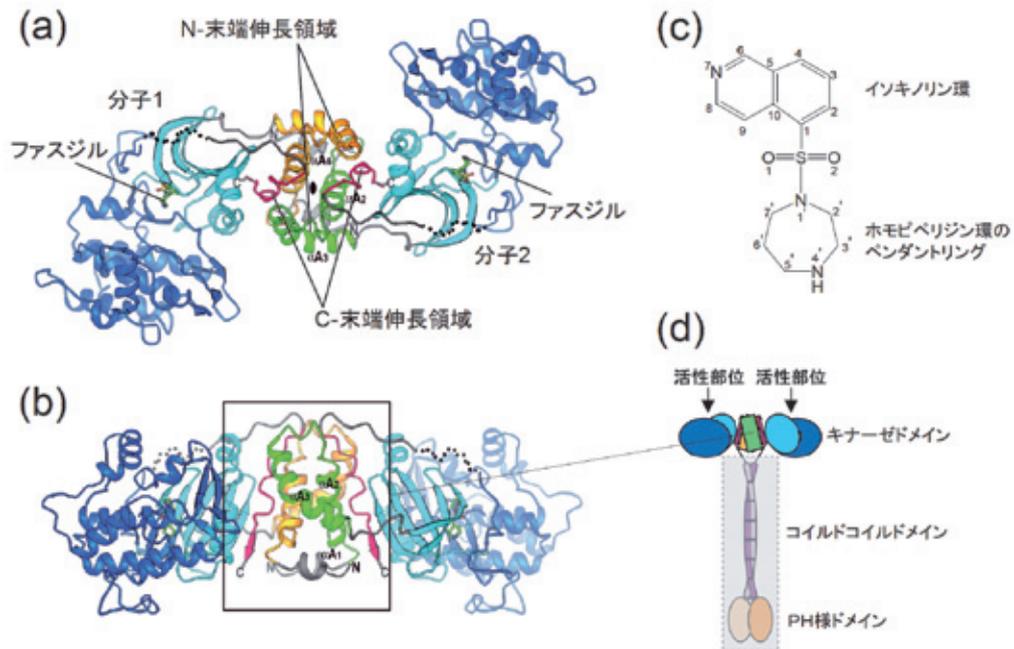


図4. X線により決定した Rho キナーゼの構造

Rho キナーゼの構造解析

Rho キナーゼはアクチン細胞骨格系を制御する Ser/Thr-タンパク質キナーゼであり、ERM タンパク質をリン酸化して、上記の接着分子等との複合体の形成を安定化する。また、 Ca^{2+} 非依存的な強力な血管収縮作用をもつので、このキナーゼの活性阻害は、高血圧など循環器病への医学的応用の観点からも重要性は極めて高い。そこで、Rho キナーゼのキナーゼドメインと臨床応用にも供されている阻害剤ファスジルならびに Y-27632 との複合体の構造を決定した(図4)。その結果、このキナーゼに特有な二量体化による活性型コンホメーションの維持機構や、リン酸化による活性化を受けない構造的特徴、阻害剤の特異性を決定する相互作用、ならびに、それを可能とする阻害剤とタンパク質との両者の構造的な柔軟性を明らかにすることができた(後述 6 成果発表 (1) 原著論文 14)。また、これらの成果に基づいて国内ならびに海外特許を申請した(後述 6 成果発表 (4) 特許出願①②)。

Rho キナーゼの C-末端には、細胞膜ならびに標的タンパク質に結合するドメインとして考えられている PH 様ドメインがある。このドメインは通常の PH ドメインと異なり、ドメインの C-末端よりにシステイン残基に富んだ挿入領域がある。この PH 様ドメインの種々のコンストラクトによるタンパク質の作成とその性状の解析から、この挿入領域は、PKC などがもつ Zn

を配位した C1 ドメインに酷似することがわかった。EXAFS 測定の結果からも Zn を配位していることが確かめられた。

Rho キナーゼは、新規の低分子量 G タンパク質である RGK ファミリーの Gem や Rad (常活性型 G タンパク質) と直接に相互作用して負の制御されている。Gem と Rad を精製して幾つかの結晶を得て、Rad についてはその G ドメインの結晶構造を決定した。

神経繊維芽腫症 II 型のマーリンの変異と病因との関係

本研究では、NF-II の原因遺伝子産物マーリン (merlin) の構造も決定した (後述 6 成果発表 (1) 原著論文 4)。細胞膜や細胞接着分子と結合する N-末端部位での正に荷電した膜結合表面や PIP2 結合部位などの類似性から、ERM タンパク質と同様の機能をもつことが推察された。また、NF-II の患者から単離された変異の大部分がこの部分に落ちることから、細胞膜や細胞接着分子との結合が重要であることが確認できた。そこで、これらの病因変異について構造的な要因を吟味した。その結果、13 の変異がタンパク質の内部に埋もれた疎水性残基であり、大きく構造を変化させるか変性させることが病因と予測された。6 つの変異は分子の表面に露出した残基であり、その中の 1 残基は PIP2 の結合部位であり、この変異タンパク質が細胞膜に局在しないという報告と一致した。また、内部に埋もれた残基の中にも PIP2 の結合部位に構造変化を誘起することが考えられる変異もあった。

(2) 研究成果の今後期待される効果

細胞接着は、細胞組織形成のような静的な構造保持として理解されてしまう傾向があるが、実は、細胞増殖や分化の制御と深く関わっている。今後、正常細胞のもつ細胞増殖の接触阻害や、その制御がはずれた癌などの問題、あるいは、組織や器官形成においても、本研究で推進したような、分子に基づいたより具体的で精密な議論ができるようにこの領域の科学が発展していくと期待される。

また、細胞骨格との物理的なリンクは細胞接着分子に限らず、イオンチャネルや受容体など膜タンパク質に一般的な現象であると考えられることもできる状況になりつつある。これら膜タンパク質の構造の規定、局在や小胞への移動を通したリサイクルの制御には、アクチン細胞骨格とのリンクが必須なので、ますます、研究領域が広がるであろう。

アクチン細胞骨格系の制御は、生理学的には平滑筋収縮や神経突起退縮など、生体の高次機能と直結している。今後、医学生物学の領域での重要性はますます高まり、かつ、この領域の研究を基礎に、創薬の芽がいくつも吹き出してくると確信している。

細胞接着・骨格系のタンパク質で疾病に原因として同定されているものも多い。これらの研究も、研究成果の社会への還元として、極めて重要であろう。実際、NF-II の原因遺伝子産物マーリンについての成果は、患者から同定された変異をもとに、病状の進行を予測して今後の治療計画を立案するための知見として役立っており、外国等からの臨床医からの問い合わせもある。

3. 2 サブテーマ2: 微小管伸張の動的制御

(1) 研究実施内容及び成果

はじめに

細胞極性の決定や、小胞輸送に関わる重要な細胞骨格である微小管については、(+) 端結合性の微小管制御タンパク質、+TIP (microtubule plus-end-tracking protein)、の研究を続けてきた。+TIP の代表である EB1 (endo binding protein 1)、APC (Adenomatous Polyposis coli protein)、CLIP-170 (cytoplasmic protein 170kDa)、ならびに dynactin のサブユニット p150^{Glued} を用いて、タンパク質化学的な解析や結晶化を試みてきた。多くの場合、構造解析可能なレベルまで達していないが、CLIP-170 のもつチューブリン・微小管結合ドメインである CAP-Gly (cytoskeleton-associated protein glycine-rich) ドメインについては、

X 線結晶構造解析と NMR による複合体の構造解析に成功して、世界に先駆けて CLIP-170 のチューブリン認識の詳細を解明して、これまで謎であった CLIP-170 の微小管核形成・伸張促進の機構案を、構造に基づいて考案した(投稿中)。

CLIP-170 の CAP-Gly ドメインの構造的特徴とチューブリン・微小管認識

CLIP-170 は、分子の N-末端にタンデムに連結した2つの CAP-Gly ドメインをもつ。これらを、CAP-Gly1 ドメインと CAP-Gly2 ドメインとする。まず、それぞれの X 線構造決定から、これらが正に荷電した塩基性の浅い溝を分子表面にもつことを明らかにした(図5)。この塩基性の溝は CAP-Gly2 ドメインにおいて顕著であった。更に、種々の変異実験と標的タンパク質であるチューブリンや EB1 との結合実験より、CLIP-170 は、主に CAP-Gly2 ドメインによって α -チューブリンの C-末端の酸性テール(15 残基長)を認識することにより、 α,β -チューブリンダイマーやそのオリゴマーに結合することを突き止めた。更に、類似の酸性テールをもつ EB1 にも同様に結合することを明らかにした。一方、この酸性テール認識による結合が、p150^{Glued} の CAP-Gly ドメインでは CLIP-170 に比して弱いことがわかった。NMR による複合体構造の決定により、C-末端の 6 残基、EEGEEY(ヒト α -チューブリン)が結合に必要で、末端の 3 残基を直接に、次の 3 残基を静電的な相互作用を通して認識していることがわかった。この酸性テールは CLIP-170 が結合していない状態では、柔軟で、特定の構造をもたないことも NMR により証明した。結合実験から、EB1 も同様に C-末端の 6 残基、EEQEY(ヒト EB1)、が最小領域であることがわかった。また、CLIP-170 の CAP-Gly に結合してその活性を自己阻害すると考えられている C-末端側の Zn-finger 様ドメインの試料を調製して、CAP-Gly2 との相互作用を解析して、チューブリンの酸性テールの結合する塩基性の溝に結合することを確かめた。これにより、同一結合部位への競合によって、自己阻害することがわかった。

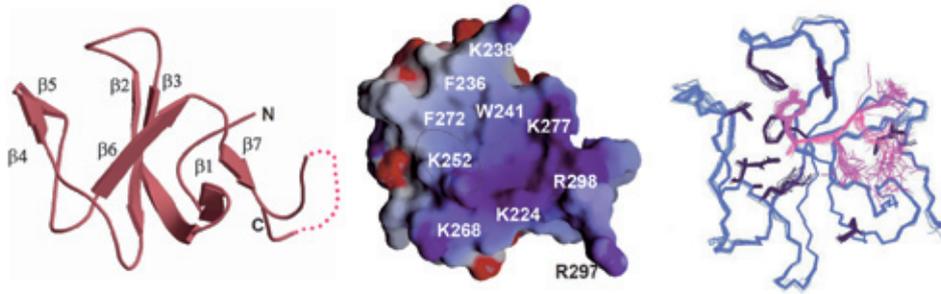


図5. CLIP-170 の CAP-Gly ドメインの構造の例。チューブリンや EB1 に最も強く結合する CAP-Gly2 ドメインの構造、ならびにチューブリンの酸性テールと複合体の構造

CLIP-170 による微小管伸張機構

チューブリンの酸性テールは、 α,β -チューブリンダイマーやそのオリゴマー、あるいは微小管のいずれでも、柔軟な構造をもち、溶媒領域に露出している。従って、上記の結合様式は、CLIP-170 が α,β -チューブリンダイマーやそのオリゴマー、あるいは微小管のいずれにも結合できることを示唆している。このことから、細胞質中では CLIP-170 はチューブリンと結合しており、そのチューブリン-CLIP-170 複合体の状態、微小管の+端に集積することになる。これは、CLIP-170 の微小管の+端への局在は、チューブリンとの共重合によることを意味している。CLIP-170 は塩基性の CAP-Gly ドメインを通して α,β -チューブリンダイマー等の酸性テールの電荷を中和しているため、伸張促進や核形成はチューブリン間の静電的な反発を緩和することがその主因と考えられる。一方、EB1 は、N-末端の CH (calponin homology) ドメインで微小管に結合するので、微小管に結合した状態での EB1

の C-末端の酸性テールも露出しており、CLIP-170 が結合可能である。EB1 の微小管の+端への集積の機構は、残念ながら不明であるが、+端に集積した EB1 の C-末端酸性テールは、チューブリン(やチューブリン- CLIP-170 複合体)を細胞質から+端に効果的にリクルートするのに寄与していると考えられる。実際、CLIP-170 の+端局在は EB1 に依存することを示す実験結果が、ごく最近になって報告された。

(2)研究成果の今後期待される効果

本研究プロジェクトでは、アクチン細胞骨格に続くテーマとして、微小管についての研究を位置づけたが、実際は、現代の細胞生物学の中心テーマになってきている。アクチン細胞骨格系の研究では、免疫細胞や表皮細胞(例えば血管内皮細胞など)の機能と密接な関係が際立っていたが、微小管の研究では、染色体分配や細胞分裂など基本的な細胞機能に加えて、神経細胞が際立ってくる。これは、長い(2 m にも達する)軸索をもつ神経細胞特有の細胞形態に起因する。細胞極性や小胞輸送など微小管系での変異や傷害には、認知症など神経系の疾病が多い。科学上の理由のみならず、社会的要請からも、今後、ますます微小管研究の重要性が高まっていくことであろう。

3. 3 サブテーマ3: ゲノム維持における基本タンパク質の動的複合体形成

(1)研究実施内容及び成果

はじめに

本 CREST 研究では、細微骨格を制御する細胞内シグナル伝達系を重点的に、動的複合体の構造生物学的研究を推進してきた。一方、核内に目を向けても、幾つもの重要な多機能タンパク質が、細胞質からシグナル等を取り込みつつ、シグナルを統合していることがわかる。ここでは、DNA ポリメラーゼやリガーゼ、修復酵素など種々の DNA 編集酵素と相互作用することにより、DNA 複製や修復における酵素反応のプラットフォームを提供している PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) と、FEN1 (flap endonuclease 1) に関する研究で成果を挙げることができた。FEN1 は、5'末端側で一本鎖 DNA として突出して枝分かれした DNA (flap DNA) の一本鎖 DNA を特異的に切断して、DNA リガーゼの基質となる nick DNA を生成する構造特異的ヌクレアーゼであり、DNA 複製や塩基除去修復で重要な役割を担う。細胞増殖とゲノム維持の最重要酵素の一つである。また、ヘリカーゼ等の他の DNA 編集酵素類とも相互作用をして、複雑な制御に関わっていることがわかっている。

FEN1 の酵素活性は、DNA クランプである PCNA と結合することによって大幅に促進される。ここでは、以下の2種類の複合体の結晶化に成功して、FEN1 活性の PCNA による促進機構と、基質 flap DNA の構造特異的認識機構を解明した。

ヒト FEN1-PCNA 複合体

この複合体構造は、高等生物由来の FEN1 の最初の構造であるとともに、PCNA に全長の DNA 編集酵素が結合した最初の例となった(後述 6 成果発表 (1) 原著論文 11))。構造決定の結果、次のことが明らかとなった。まず、FEN1 の C-末端のテールの PCNA 上での結合部位は、CDK 阻害タンパク質 p21^{CIP1/WAF1} の結合部位と重なっており、p21^{CIP1/WAF1} が競合阻害によって FEN1 の PCNA への結合を阻害して、その機能を抑制することが判明した。第二に、FEN1 の酵素本体のコアドメインと PCNA との間にも相互作用があり、FEN1 は、この相互作用を通して DNA と接触しない不活性型(OFF 状態)の配置をとることがわかった。この配置は、FEN1 のコアドメインと C-末端のテールを連結する 4 残基³³³QGST³³⁶ がヒンジとなっているために可能であり、ヒンジの柔軟性によって、FEN1 の不活性から DNA に活性部位が結合した活性型(ON 状態)への配置の変換が可能であることを発見した(図6)。このヒンジによる酵素本体の DNA への配向の活性切り替えは、PCNA に結合した酵素が基質 DNA 部位に到達するまでは、不活性型の配置をとり、PCNA-酵素複合体が DNA 上を自由にスライドするという概念とともに一般化しつつある。実際、DNA リガ

一ゼでもそのような切り替えがあることがごく最近に実験的に示唆されている。

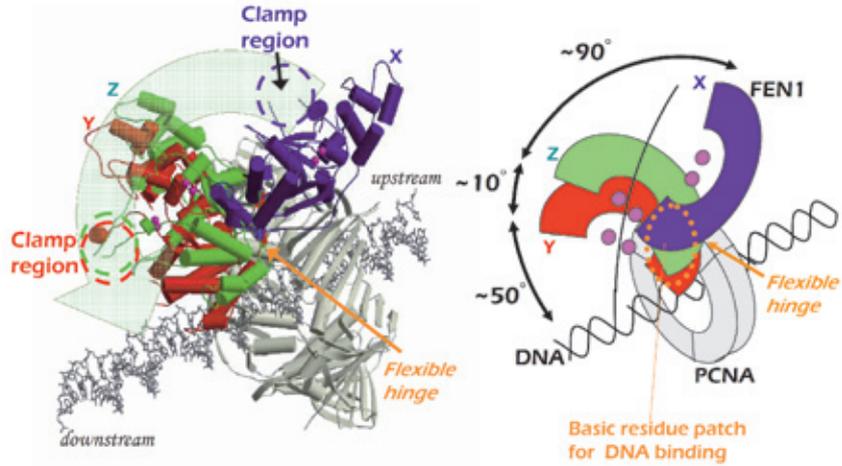


図6. FEN1-PCNA 複合体構造に基づいて提案した、ヒンジの動きによる「ON」構造と「OFF」構造の切り替えモデル

FEN1-flapDNA 複合体

FEN1と基質 flapDNAとの複合体の結晶化に成功して、その構造決定が最近になって完成した(投稿中)。膨大な生化学的な研究から、FEN1は1ヌクレオチドの3'-flapと数ヌクレオチド(<20nts)の5'-flapを認識することがわかっている。本結晶構造では、FEN1はDNAを鋭角に折り曲げて、上流側の二本鎖DNAの3'-flapを認識するとともに、下流側の二本鎖DNAのらせん部分の鑄型DNA鎖を、約らせん1回転(10ヌクレオチド)下流の位置で固定して、5'-flapを酵素本体のアーチ型のループの中をくぐらせることがわかった。このようにして、FEN1は、切断部位を厳密に規定していることが解った。活性部位は、DNAポリメラーゼやRNase Hなどと類似の2つの金属イオン(多くの場合 Mg^{2+} イオン)をもつ「two-metal center of catalysis」が適用できる配置にあり、加水分解の求核攻撃を考えると考えられる水分子の位置も特定できた。また、上記のFEN1-PCNA複合体の結果と併せて、PCNA上で前回提案したON-OFF状態の変換がヒンジによって可能であることも確認できた(図7)。このとき、FEN1のC-末端の塩基性テールが下流側の二本鎖DNAと相互作用する位置にくることを見いだした。以上の研究から、FEN1の酵素としての特徴やPCNAとの相互作用の意義が構造レベルで理解できるようになった。

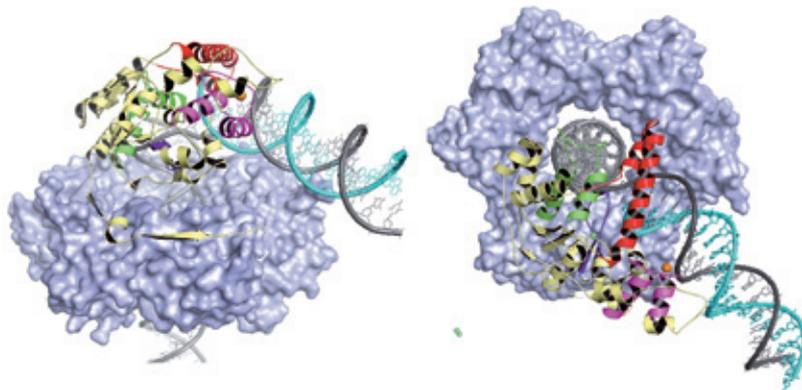


図7. FEN1-DNA 複合体構造を基にした FEN1-DNA-PCNA モデル

(2)研究成果の今後期待される効果

DNA の反平行二重らせん構造の制約から、DNA の複製は DNA ポリメラーゼだけでは完結しない。これまで、DNA 複製や修復といえば、DNA ポリメラーゼの研究ばかり目立ったが、実は、DNA ポリメラーゼ、FEN1、DNA リガーゼの 3 酵素が揃わないと、反平行二重らせん構造をもつ DNA を細胞は作れない。本研究では、FEN1 は PCNA に対して、活性型と不活性型の少なくとも 2 つの配向をもち、2 つの構造をスイッチすることで、DNA 上を移動したり、標的である基質 flap DNA を捉えたりすることを明らかにした。このメカニズムは、PCNA に結合する DNA 編集酵素に共通する活性制御のメカニズムと考えたが、実際に、このスイッチ機構は、最近、DNA リガーゼでも支持された (*Mol Cell*, 2006)。このような研究を積み重ねていって、複製や修復のタンパク質マシナリーが、一つの機械として理解できるようになるであろう。

抗癌剤など、これまでは DNA ポリメラーゼを標的としたものが殆どであったが、FEN1 あるいは DNA リガーゼもまた、基本的な増殖阻害の標的であることを本研究は示唆している。実際、FEN1 の活性部位は、特殊構造をもつ flap DNA を認識する関係で、DNA ポリメラーゼよりも入り組んでいて、薬物設計の観点からはより有利であることも、本研究は明らかにしている。

4 研究参加者

①箱嶋 敏雄グループ

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
箱嶋 敏雄	奈良先端科学技術大学院大学	教授	研究全般	H13.12～終了まで
北野 健	奈良先端科学技術大学院大学	助手	X 線構造解析	H14.5～終了まで
山口 寛人	奈良先端科学技術大学院大学	CREST 研究員	Rho-kinase, Jak3, IRE	H14.7～H18.6
三島 綾子	奈良先端科学技術大学院大学	学振研究員	Rho 関連一般、CLMP-2	H15.3～H18.7
金 善龍	奈良先端科学技術大学院大学	CREST 研究員	Zyxin-warts など	H13.12～終了まで
佐竹 弓月	奈良先端科学技術大学院大学	CREST 研究補佐員	事務補佐、データ整理	H14.2～終了まで
笠 美由希	奈良先端科学技術大学院大学	CREST 研究補佐員	DNA 操作全般	H15.4～終了まで

櫻井 滋	奈良先端科学 技術大学院大 学	CREST 研 究員	蛋白質精製と結晶化	H15.3～終了まで
寺脇 慎一	奈良先端科学 技術大学院大 学	COE-PD	ERM 関連全般と CD44 関 連	H13.12～終了まで
高井 友美子	奈良先端科学 技術大学院大 学	D3	CD43, Syk	H14.5～終了まで
岡田 健吾	奈良先端科学 技術大学院大 学	助手 (退職)	X 線データ収集・解析	H14.4～H16.3
村口 佐智子	奈良先端科学 技術大学院大 学	CREST 技術員 (退職)	蛋白質発現全般、EB1、 Rho 関係全般	H14.1～H17.3
近藤 倫央	奈良先端科学 技 術大学院大学	修了	ERM 関連	H14.5～H16.3
深水 弥生	奈良先端科学 技 術大学院大学	修了	CD44	H14.5～H16.3

5 招聘した研究者等

氏 名(所属、役職)	招聘の目的	滞在先	滞在期間

6 成果発表等

(1)原著論文発表 (国内誌 0 件、国際誌 21 件)

- 1) Maita, N., Okada, K., Hatakeyama, K., and Hakoshima, T. (2002). Crystal structure of the stimulatory complex of GTP cyclohydrolase I and its feedback regulatory protein GFRP. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99(3), 1212-1217.
- 2) Oka, T., Hakoshima, T., Itakura, M., Yamamori, S., Takahashi, M., Hashimoto, Y., Shiosaka, S., Kato, K. (2002). Role of loop structures of neuropsin in the activity of serine protease and regulated secretion. *J. Biol. Chem.* 277(17), 14724-14730.
- 3) Ohishi, H., Suzuki, K., Ohtsuchi, M., Hakoshima, T., and Rich, A. (2002). The crystal structure of N¹-[2-(2-amino-ethylamino)-ethyl]-ethane-1,2-diamine (polyamines) binding to the minor groove of d(CGCGCG)₂, hexamer at room temperature. *FEBS Lett.* 523(1-3), 29-34.

- 4) Shimizu, T., Seto, A., Maita, N., Hamada, K., Tsukita, Sh., Tsukita, Sa., and Hakoshima, T. (2002). Structural basis for neurofibromatosis Type 2: Crystal structure of the Merlin FERM domain. *J. Biol. Chem.* 277(12), 10332-10336.
- 5) Terawaki, S., Maesaki, R., Okada, K., and Hakoshima, T. (2003). Crystallographic characterization of the radixin FERM domain bound to the C-terminal region of the human Na⁺/H⁺-exchanger regulatory factor (NHERF). *Acta Crystallogr.* D59(1), 177-179.
- 6) Hamada, K., Shimizu, T., Yonemura, S., Tsukita, Sh., Tsukita, Sa., and Hakoshima, T. (2003). Structural basis of adhesion-molecule recognition by ERM proteins revealed by the crystal structure of the radixin-ICAM-2 complex. *EMBO J.* 22(3), 502-514.
- 7) Sakurai, S., Kitano, K., Okada, K., Hamada, K., Morioka, H., and Hakoshima, T. (2003). Preparation and crystallization of human flap endonuclease FEN-1 in complex with proliferating-cell nuclear antigen, PCNA. *Acta Crystallogr.* D59(5), 933-935.
- 8) Shimizu, T., Ihara, K., Maesaki, R., Amano, M., Kaibuchi, K., and Hakoshima, T. (2003). Parallel coiled-coil association of the RhoA-binding domain in Rho-kinase. *J. Biol. Chem.*, 278(46), 46046-46051.
- 9) Maita, N., Hatakeyama, K., Okada, K., and Hakoshima, T. (2004). Structural basis of bipterin-induced inhibition of GTP cyclohydrolase I by GFRP, its feedback regulatory proteins. *J. Biol. Chem.* 279(49), 51534-51540.
- 10) Hamada, K., Kato, M., Shimizu, T., Ihara, K., Mizuno, T., and Hakoshima, T. (2005). Crystal structure of the protein histidine phosphatase SixA in the multistep His-Asp phosphorelay. *Genes to Cells*, 10(1), 1-11.
- 11) Sakurai, S., Kitano, K., Yamaguchi, H., Okada, K., Hamada, K., Fukuda, K., Uchida, M., Ohtsuka, E., Morioka, H., and Hakoshima, T. (2005). Structural basis for recruitment of human flap endonuclease 1 to PCNA. *EMBO J.* 24(4), 683-693.
- 12) Kitano K, Kita A, Hakoshima T, Niimura Y, and Miki K. (2005) Crystal structure of decameric peroxiredoxin (AhpC) from *Amphibacillus xylanus*. *Proteins*, 59(3), 644-647.
- 13) Yanuar, A., Sakurai, S., Kitano, K., and Hakoshima, T. (2005). Expression, purification, crystallization and preliminary crystallographic analysis of human Rad GTPase. *Acta Crystallogr.* F61(11), 978-980.
- 14) Yamaguchi, H., Kasa, M., Amano, M., Kaibuchi, K., and Hakoshima, T. (2006). Molecular mechanism for the regulation of Rho-kinase by dimerization and its inhibition by fasudil. *Structure*, 14(3), 589-600.
- 15) Terawaki, S., Maesaki, R., and Hakoshima, T. (2006). Structural Basis for NHERF Recognition by ERM Proteins. *Structure*, 14(4), 777-789.
- 16) Kitano, K., Yusa, F. and Hakoshima, T. (2006). Structure of dimerized radixin FERM domain suggests a novel masking motif in C-terminal residues 295–304. *Acta Crystallogr.* F62(4), 340-345.
- 17) Yanuar, A., Sakurai, S., Kitano, K., and Hakoshima, T. (2006). Crystal structure of human Rad GTPase of the RGK-family. *Genes to Cells*, 11(8), 961-968.
- 18) Yamaguchi, H., Miwa, Y., Kasa, M., Kitano, K., Amano, M., Kaibuchi, K., and Hakoshima, T. (2006). Structural basis for induced-fit binding of Rho-kinase to the inhibitor Y-27632. *J. Biochem.*, 140(3), 305-311.
- 19) Furukawa, N., Saito, M., Hakoshima, T. and Khono, K. (2006). A diphtheria toxin receptor deficient in epidermal growth factor-like biological activity. *J. Biochem.* (Tokyo), 140(6), 831-841.

- 20) Takai, Y., Kitano, K., Terawaki, S., Maesaki R., Hakoshima T. (2007). Crystallographic characterization of the radixin FERM domain bound to the cytoplasmic tails of adhesion molecules CD43 and PSGL-1. *Acta Crystallogr.* F63(1), 49-51.
- 21) Kitano, K., Yoshihara, N., Hakoshima, T. (2006). Crystal structure of the HRDC domain of human Werner Syndrome protein, WRN. *J. Biol. Chem.*, 282(4), 2717-2728.

(2)その他の著作物(総説、書籍などを記載してください。)

- 1) 箱嶋敏雄 (2002). Rho シグナリングの構造生物学、「特集:構造生物学の最前線」(稲垣冬彦・箱嶋敏雄編)、生化学 74(10)、日本生化学会、1237-1242.
- 2) Hakoshima, T. (2003). Leucine zippers. in *Nature Encyclopedia of the Human Genome*, Vol. 3, Nature Pub. Group, pp. 679-683. (Review)
- 3) Hakoshima T., Shimizu, T., and Maesaki, R. (2003). Structural basis of the Rho GTPase signaling. *J. Biochem. (Tokyo)* 134(3), 327-331. (Review)
- 4) 箱嶋敏雄(2004) 核酸分子認識とその機能を中心とした構造生物学(総合報告 学会賞受賞論文)、日本結晶学会誌, 46, 201-208.
- 5) Hatakeyama, K., Maita, N., Okada, K., and Hakoshima T. (2004). Crystal structure of the inhibitory GTP Cyclohydrolase I and GFRP complex. In "Pterins, Folates and Neurotransmitters in Molecular Medicine", SHS Gesellschaft für klinische Ernährung mbH.
- 6) 箱嶋敏雄(2005) 分子スイッチの話、タンパク質のかたちから生命のなぞを解くー生物マシーナリー構造生物学の最前線、田之倉優 編、クバプロ、110-117.
- 7) 清水敏之、箱嶋敏雄 (2005). タンパク質ー核酸相互作用、「タンパク質科学ー構造・物性・機能」(後藤祐児、桑島邦博、谷澤克行 編)、化学同人、131-139.
- 8) 山口寛人、箱嶋敏雄 (2006). Rho キナーゼの触媒ドメインにみられる新規な構造的活性制御、細胞工学、25(5), 秀潤社、512-513.
- 9) 箱嶋敏雄 (2006). 蛋白質キナーゼの構造生物学-Rho キナーゼおよび AGC キナーゼ群における最近の進歩、蛋白質核酸酵素、51(11), 共立出版、1557-1568.
- 10) 北野健, 箱嶋敏雄 (2006). ヒト FEN1-PCNA 複合体の結晶構造が示すスイング活性化機構, 日本結晶学会誌, 48(5), 367-372.

(3)学会発表(国際学会発表及び主要な国内学会発表)

① 招待講演 (国内会議 10 件、国際会議 1 件)

- 1) 箱嶋敏雄 (奈良先端大) : “シグナル伝達物質合成を律速する GTPCHI/GFRP 酵素複合体”、第 50 回質量分析総合討論会シンポジウム「構造生物学と創薬」、2002 年 5 月 17 日 (京都).
- 2) 箱嶋敏雄 (奈良先端大) : “接着分子と細胞内シグナル伝達”、第 4 5 回日本神経化学会札幌大シンポジウム「神経機能分子の構造的理解」、2002 年 7 月 17 日 (北海道)
- 3) Toshio Hakoshima (奈良先端大), “The FERM domain, a versatile protein module in signal transduction”, *XIX Congress and general assembly of the International Union of Crystallography*, 2002 年 8 月 14 日 (Geneva, Switzerland).
- 4) 箱嶋敏雄 (奈良先端大) : “FERM ドメインの多様な分子認識に関する X 線構造研

究”、第 75 回日本生化学会大会シンポジウム「シグナル伝達蛋白質研究の総合戦略：蛋白質の「相互作用・構造変化・局在」を見る」2002 年 10 月 16 日（京都）。

- 5) 箱嶋敏雄（奈良先端大）：“分子スイッチの話”、大学と科学 公開シンポジウム「タンパク質のかたちから生命のなぞを解くー生物マシーナリー構造生物学の最前線」2003 年 12 月 15 日（大阪）。
- 6) 櫻井滋（奈良先端大）、北野健（奈良先端大）、森岡弘志（北大）、○箱嶋敏雄（奈良先端大）：“FEN1-PCNA 複合体の結晶構造”、日本生物物理学会第 4 2 回年会シンポジウム「金属タンパク質のメカニズムを観察する」 2004 年 12 月 15 日（京都）。
- 7) 箱嶋敏雄（奈良先端大）：“A tale of tails of adhesion molecules”、第 57 回日本細胞生物学会 シンポジウム ” Structural Dissection of Receptor-Mediated Transmembrane Signaling”、2004 年 5 月 27 日（大阪）。
- 8) 箱嶋敏雄（奈良先端大）：“微小管結合タンパク質+TIPs 構造研究における最近の進歩”、第 5 回日本蛋白質科学会年会ワークショップ「細胞極性」、2005 年 6 月 30 日（福岡）。
- 9) Hiroto Yamaguchi（奈良先端大）、Yukiko Miwa（奈良先端大）、Miyuki Kasa（奈良先端大）、Mutsuki Amano（名大）、Kozo Kaibuchi（名大）、Toshio Hakoshima（奈良先端大）：“Control of the catalytic activity of the AGC-family protein kinases using the conserved C-terminal extension”、第 28 回日本分子生物学会年会シンポジウム「分子構造からセルラーメカニクスへ」 2005 年 12 月 9 日（福岡）。
- 10) 箱嶋敏雄（奈良先端大）：“Rho-キナーゼについての我々の最新の成果や PKB、PKC などの重要な Ser/Thr タンパク質キナーゼの構造機能制御”、QIAGEN タンパク質特別セミナー、2006 年 3 月 24 日（大阪）。
- 11) 箱嶋敏雄（奈良先端大）：“プロテインキナーゼの三次元構造”、第 80 回日本薬理学会シンポジウム「創薬ターゲットとしてのプロテインキナーゼ」、2007 年 3 月 14 日（名古屋）。

② 口頭発表 （国内会議 6 件、国際会議 0 件）

- 1) 櫻井滋（奈良先端大）、○北野健（奈良先端大）、山口寛人（奈良先端大）、岡田健吾（奈良先端大）、浜田恵輔（奈良先端大）、森岡弘志（北大）、箱嶋敏雄（奈良先端大）：“ヒト FEN-1/PCNA 複合体の立体構造が示唆する FEN-1 の動き”、第 3 回日本蛋白質科学会年会ワークショップ「構造生物学 2003」、2003 年 6 月 25 日（札幌）。
- 2) 岡田健吾（奈良先端大）、高橋宏之（奈良先端大）、村口佐智子（奈良先端大）、藤田信之（国立遺伝学研究所）、石浜明（日本生物科学研究所）、箱嶋敏雄（奈良先端大）：“鞭毛形成に特異的な転写因子シグマ 28 とその抗シグマ因子 FlgM 複合体の X 線結晶構造解析”、第 26 回日本分子生物学会年会シンポジウム「タンパク質の高次構造変化による機能制御」 2003 年 12 月 12 日（神戸）。
- 3) 箱嶋敏雄（奈良先端大）：“タンパク質構造研究の動向：将来は？ Whither structural biology?”、第 77 回日本生化学会大会シンポジウム「タンパク質構造研究の動向・将来は？」 2004 年 10 月 13 日（横浜）。
- 4) 森岡弘志（北大）、内田真希代（北大）、坂田啓司（北大）、金城政孝（北大）、櫻井滋（奈良先端大）、北野健（奈良先端大）、箱嶋敏雄（奈良先端大）：“ヒト FEN1 の PCNA 結合部位近傍に存在するヒンジ領域の機能解析”、第 28 回日本分子生物学会年会ワークショップ「タンパク質構造から展開する DNA 複製システムのダイナミクス」2005 年 12 月 7 日（福岡）。
- 5) 北野健（奈良先端大）、櫻井滋（奈良先端大）、森岡弘志（北大）、箱嶋敏雄（奈

良先端大)：“ヒト Flap endonuclease-1 (FEN1) の複合体形成と活性化メカニズム”、第6回日本蛋白質科学会年会ワークショップ「超分子タンパク質複合体の分子機構」、2006年4月24日(京都)。

- 6) 森岡弘志(北大)、内田真希代(北大)、宮川健治(北大)、坂田啓司(北大)、金城政孝(北大)、桜井滋(奈良先端大)、箱嶋敏雄(奈良先端大)：“ヒト FEN1 のヒンジ領域によるヌクレアーゼ活性調節機構”、日本分子生物学会 2006 フォーラム 分子生物学の未来、2006年12月6日(名古屋)

③ ポスター発表 (国内会議 20件、国際会議 7件)

- 1) Kengo Okada (奈良先端大), Nobuo Maita (奈良先端大), Kazuyuki Hatakeyama (ピッツバーグ大), Toshio Hakoshima (奈良先端大): “Crystal structures of the stimulatory and inhibitory complexes of rat GTPCHI and GFRP”, *XIX Congress and general assembly of the International Union of Crystallography*, 2002年8月6-16日 (Geneva, Switzerland).
- 2) Ryoko Maesaki (奈良先端大), Kentaro Ihara (奈良先端大), Toshiyuki Shimizu (奈良先端大), Kengo Okada (奈良先端大), Kozo Kaibuchi (名古屋大), Toshio Hakoshima (奈良先端大): “Structural basis of the Rho effector recognition”, *XIX Congress and general assembly of the International Union of Crystallography*, 2002年8月6-16日 (Geneva, Switzerland).
- 3) Shin-ichi Terawaki (奈良先端大), Ryoko Maesaki (奈良先端大), Kengo Okada (奈良先端大), Keisuke Hamada (奈良先端大), Toshio Hakoshima (奈良先端大): “Structural basis of the radixin FERM domain complexed with its interactive proteins”, *XIX Congress and general assembly of the International Union of Crystallography*, 2002年8月6-16日 (Geneva, Switzerland).
- 4) 寺脇慎一(奈良先端大)、岡田健吾(奈良先端大)、前崎綾子(奈良先端大)、箱嶋敏雄(奈良先端大)：“ERM ファミリーによる Na⁺/H⁺交換輸送体制御因子-1 の認識機構”、第75回日本生化学会大会、2002年10月17日(京都)。
- 5) 寺脇慎一(奈良先端大)、岡田健吾(奈良先端大)、前崎綾子(奈良先端大)、箱嶋敏雄(奈良先端大)：“Radixin FERM domain/Na⁺-H⁺輸送交換体制御因子の複合体構造解析”、日本結晶学会平成14年度年会 2002年12月12日(東京)。
- 6) 寺脇慎一(奈良先端大)、前崎綾子(奈良先端大)、岡田健吾(奈良先端大)、箱嶋敏雄(奈良先端大)：“ラディキシン FERM ドメインによる Na⁺/H⁺交換体制御因子の認識機構”、第3回日本蛋白質科学会年会、2003年6月24日(札幌)。
- 7) 寺脇慎一(奈良先端大)、箱嶋敏雄(奈良先端大)：“NHERF と FERM ドメインとの相互作用が FERM の機能に及ぼす効果”、日本結晶学会平成15年度年会、2003年12月1-2日(熊本)。
- 8) 桜井滋(奈良先端大)、北野健(奈良先端大)、森岡弘志(北大)、箱嶋敏雄(奈良先端大)：“ヒト FEN1-PCNA の複合体構造とその DNA 複合体の結晶化の試み”、日本結晶学会平成15年度年会、2003年12月1-2日(熊本)。
- 9) 高井友美子(奈良先端大)、前崎綾子(奈良先端大)、寺脇慎一(奈良先端大)、北野健(奈良先端大)、箱嶋敏雄(奈良先端大)：“FERM ドメインの多機能性”、日本結晶学会平成15年度年会、2003年12月1-2日(熊本)。
- 10) 前崎綾子(奈良先端大)、渡辺崇(名大)、深田正紀(名大)、貝淵弘三(名大)、箱嶋敏雄(奈良先端大)：“微小管結合蛋白質 CLIP-170 の CAP-Gly ドメインの結晶構造”、日本結晶学会平成16年度年会、2004年11月16-17日(吹田)。
- 11) 北野健(奈良先端大)、喜田昭子(京大)、箱嶋敏雄(奈良先端大)、新村洋一(東京農大)、三木邦夫(京大)：“*Amphibacillus xylanus* 由来 10 量体 ペルオキシレドキシシン(AhpC)の結晶構造解析”、日本結晶学会平成16年度年会、2004年

11月16-17日(吹田)。

- 12) 櫻井滋(奈良先端大)、北野健(奈良先端大)、山口寛人(奈良先端大)、岡田健吾(奈良先端大)、浜田恵輔(奈良先端大)、大塚栄子(北大)、森岡弘志(北大)、箱嶋敏雄(奈良先端大):“Crystal structure of the human FEN1-PCNA complex and its implications for replication and repair”, BSR2004 (the 8th International Conference on Biology and Synchrotron Radiation), 2004年9月10-11日(姫路)。
- 13) 北野健(奈良先端大)、箱嶋敏雄(奈良先端大)、新村洋一(東京農大)、三木邦夫(京大):“Crystal structure of decameric peroxiredoxin (AhpC) from *Amphibacillus xylanus*”, BSR2004 (the 8th International Conference on Biology and Synchrotron Radiation), 2004年9月10-11日(姫路)。
- 14) 前崎綾子(奈良先端大)、島田桃衣(奈良先端大)、村口佐智子(奈良先端大)、笠美由希(奈良先端大)、渡辺崇(名大)、深田正紀(名大)、貝淵弘三(名大)、箱嶋敏雄(奈良先端大):“微小管結合蛋白質 CLIP-170 の CAP-Gly ドメインの結晶構造”、第5回日本蛋白質科学会年会、2005年7月1日(福岡)。
- 15) 高井友美子(奈良先端大)、北野健(奈良先端大)、前崎綾子(奈良先端大)、寺脇慎一(奈良先端大)、櫻井滋(奈良先端大)、箱嶋敏雄(奈良先端大):“ラデキシン FERM ドメインと接着分子 PSGL-1 の相互作用解析”、第5回日本蛋白質科学会年会、2005年7月1日(福岡)。
- 16) Ken Kitano(奈良先端大)、Akiko Kita(京大)、Toshio Hakoshima(奈良先端大)、Youichi Niimura(東京農大)、Kunio Miki(京大)、“Crystal structure of decameric peroxiredoxin (AhpC) from *Amphibacillus xylanus*”, XX congress of the International Union of Crystallography, August 23-31, 2005, Florence Italy.
- 17) 櫻井滋(奈良先端大)、北野健(奈良先端大)、森岡弘志(北大)、箱嶋敏雄(奈良先端大):“FEN1-DNA 複合体および FEN1-PCNA-DNA 複合体の結晶化戦略”、日本結晶学会平成17年度年会 2005年12月6日(姫路)。
- 18) Arry Yanuar(奈良先端大)、櫻井滋(奈良先端大)、北野健(奈良先端大)、箱嶋敏雄(奈良先端大):“Expression, purification and crystallization of human Rad GTPase”、日本結晶学会平成17年度年会 2005年12月7日(姫路)。
- 19) 前崎綾子(奈良先端大)、島田桃衣(奈良先端大)、村口佐智子(奈良先端大)、笠美由希(奈良先端大)、渡辺崇(名大)、深田正紀(名大)、貝淵弘三(名大)、箱嶋敏雄(奈良先端大):“微小管結合蛋白質 CLIP-170 の二つの CAP-Gly ドメインの結晶構造”、第28回日本分子生物学会年会、2005年12月9日(福岡)。
- 20) 高井友美子(奈良先端大)、北野健(奈良先端大)、前崎綾子(奈良先端大)、寺脇慎一(奈良先端大)、箱嶋敏雄(奈良先端大):“ラデキシン FERM ドメインと接着分子 PSGL-1、CD43 の相互作用解析”、第28回日本分子生物学会年会、2005年12月9日(福岡)。
- 21) Ken Kitano(奈良先端大)、Shigeru Sakurai(奈良先端大)、Hiroshi Morioka(北大)、Toshio Hakoshima(奈良先端大)、“Crystal structure of human flap endonuclease-1 (FEN1) complexed to PCNA”, 3rd International Conference on Functional Genomics of Ageing, March 29-April 1, 2006, Sicily, Italy.
- 22) 北野健(奈良先端大)、由佐史江(奈良先端大)、箱嶋敏雄(奈良先端大):“ラディキシン FERM ドメインの二量体結晶構造が示唆する新規マスキング領域”、第6回日本蛋白質科学会年会、2006年4月24日(京都)。
- 23) Ken Kitano(奈良先端大)、Fumie Yusa(奈良先端大)、Toshio Hakoshima(奈良先端大)、“Crystal structure of dimerized radixin FERM domain identifies a novel masking motif in C-terminal residues 295-304”, 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, June 18-23, 2006, Kyoto, Japan.
- 24) Arry Yanuar(奈良先端大)、Shigeru Sakurai(奈良先端大)、Ken Kitano(奈良先端

大), Toshio Hakoshima (奈良先端大), “Crystal structure of human Rad GTPase”, 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, June 18-23, 2006, Kyoto, Japan.

- 25) Shin-ichi Terawaki (奈良先端大), Ken Kitano (奈良先端大), Toshio Hakoshima (奈良先端大), “Structural basis for neutral endopeptidase 24.11 recognition by ERM proteins”, AsCA’06/CrSJ (Joint Conference of the Asian Crystallographic Association and the Crystallographic Society of Japan), November 20-23, 2006, Tsukuba, Japan.
- 26) 寺脇慎一(奈良先端大)、北野健(奈良先端大)、箱嶋敏雄(奈良先端大), “ERM 蛋白質による II 型膜蛋白質 neutral endopeptidase 24.11 の認識機構”、日本分子生物学会 2006 フォーラム 分子生物学の未来 2006 年 12 月 7 日 (名古屋) .
- 27) Ken Kitano (奈良先端大), Toshio Hakoshima (奈良先端大), “Crystal structure of the HRDC domain of human WRN”, Keystone Symposia “Genome Instability and Repair”, January 17-22, 2007, Beaver Run Resort, Breckenridge, Colorado, USA.

(4)特許出願

①国内出願 (1件)

1. 発明の名称:Rho キナーゼとその相互作用を有する物質との複合体結晶
発明者:山口寛人、箱嶋敏雄、貝淵弘三
出願人:国立大学法人 奈良先端科学技術大学院大学、国立大学法人 名古屋大学
出願日:2005/03/08
出願番号:特願 2005-064010

②海外出願 (1件)

1. 発明の名称:Rho キナーゼとその相互作用を有する物質との複合体結晶
発明者:山口寛人、箱嶋敏雄、貝淵弘三
出願人:国立大学法人 奈良先端科学技術大学院大学、国立大学法人 名古屋大学
PCT 出願 PCT/JP2006/304365 号
出願日:2006/03/07
公開:No. WO/2006/095731
公開日:2006/09/14

(5)受賞等

①受賞

箱嶋 敏雄 日本結晶学会学術賞受賞 2003 年 12 月

②新聞報道

朝日新聞(2006.3.15) 血管収縮の酵素解明 高血圧など治療薬開発に期待
産経新聞(2006.3.15) 血管収縮酵素の働く仕組み解明
日刊工業新聞(2006.3.15) 血管収縮酵素の構造解明 狭心症治療薬開発に期待
日経産業新聞(2006.3.15) 血管の収縮 たんぱく質構造解明 脳梗塞薬に応用も
奈良新聞(2006.3.15) 血管拡張酵素を解明 治療薬開発が加速
京都新聞(2006.3.15) 血管収縮させる酵素の働き解明
日本経済新聞(2006.3.16) 血管収縮のたんぱく質解明
科学新聞(2006.3.17) 血管系疾患の薬物標的 Rho キナーゼの立体構造を解明
薬事日報(2006.3.24) Rho キナーゼの三次元構造を決定 分子標的阻害剤の開発に期待
毎日新聞(2006.4.8) 血管を収縮させる細胞内の酵素 三次元構造を解明 高血圧など治療薬開発に有用

(共同通信配信)

中国新聞(2006.3.15) 血管収縮酵素の働き解明 高血圧治療薬開発に弾み
 河北新報(2006.3.15) 血管収縮酵素の働き解明 高血圧治療薬開発に弾み
 神戸新聞(2006.3.15) 血管収縮酵素の働き解明 高血圧治療薬開発に弾み
 大分合同新聞(2006.3.15) 血管収縮酵素の働き解明 高血圧治療薬開発に弾み
 徳島新聞(2006.3.15) 血管収縮酵素の働き解明 高血圧治療薬開発に弾み
 秋田魁新報(2006.3.15) 血管収縮酵素の働き解明 高血圧治療薬開発に弾み
 岩手日報(2006.3.15) 血管収縮酵素の働き解明 高血圧治療薬開発に弾み
 東奥日報(2006.3.15) 血管収縮酵素の働き解明 高血圧治療薬開発に弾み
 山陰中央新報(2006.3.15) 血管収縮酵素の働き解明 高血圧治療薬開発に弾み

③その他

- 1) Ahmadian, M. R., Wittinghofer, A., and Schmidt, G. (2002). The actin filament architecture: tightly regulated by the cells, manipulated by pathogens. EMBO Reports 3, 214 - 218. EMBO Report の meeting report 欄が、ドイツの Titisee 国際シンポジウムで発表した ERM と低分子量 G タンパク質 Rho の制御因子である RhoGDI との相互作用の研究を紹介。
- 2) LeBrasseur N. (2004). Meeting report: West meets East: JSCB 2004. J. Cell Biol. 166, 308-309. Journal of Cell Biology の meeting report 欄が、細胞生物学会の国際シンポジウムで発表した ERM タンパク質と膜磷脂質や接着分子との相互作用と活性化機構の研究を紹介。

(6)その他特記事項

なし

7 研究期間中の主な活動

(1)ワークショップ・シンポジウム等

年月日	名称	場所	参加人数	概要

8 結び

先ず、一般的な感想から述べると、近視眼的な成果や論文に気をとられずに、のびのびと研究できたので、気分は良い。もともとは、意識的に研究の節目、節目を作って、その都度、それまでの結果をまとめ上げて論文を発表する堅実なタイプであったのであるが、さすがに、発表しなければならぬ論文が貯まってしまった。今、投稿論文用のフォルダーには、ざっと数えてみても 10 報以上の生データや原図や表や草稿が格納されている。

あらためて、5 年前の本事業の申請書を読み返してみると、報告書から消えているタンパク質がある。これらは、未だ実験半ばで、形になる成果が出ていないものや、具体的な検討段階で、発展性やオリジナリティーなどで深追いしない方が良くと判断したものである。また、一方では、微小管の制御タンパク質の研究のように、初期に考えたよりも多くのタンパク質を取り扱うようになって、テーマとして発展していった、期間内では収斂できなくなったテーマもある。幾つかの発展段階を経て、最終的には、本報告書のように 3 つのサブテーマにまとめた。全ての研究テーマについて研究が完結したわけではないので、結論的なことを現段階では述べたくない。しかし、事業の区切りとしては、次のように思う。

タンパク質-タンパク質相互作用系として、アクチン細胞骨格系と微小管骨格系の研究を展開したが、思った以上に、この系の分子認識は、タンパク質-ペプチド(あるいはリガンド)系であった。振り返って観れば、ひとつながりのペプチドを認識する程度にしておかなければ、網の目状の細胞内シグナル伝達経路を形成することは、進化的に困難であったと考えることができる。初期に期待していた大がかりなタンパク質どうしの複合体、特に、安定な複合体は、細胞内シグナル伝達系では不利なのだろう。このような中でも、ERM タンパク質の分子認識、細胞骨格系の鍵酵素であり、かつ、薬の標的としての Rho キナーゼの構造、そして、謎だらけの+TIP の相互作用の中での初めての+TIP の詳細な相互作用を、その代表の一つである CLIP-170 で明らかにできた。これらの成果はクレジットもあり、気に入っている。長く引用されるといい。ゲノム維持(タンパク質-DNA 系)の系では、図らずも、上記の大がかりのタンパク質どうしの複合体、FEN1-PCNA、や、DNA が鋭角に折れ曲がった FEN1-DNA 複合体(DNA の鋭い折れ曲がりとしては世界記録である)の構造を解明できた。喜ばしいことに、ここで提唱したメカニズムの一つは、既に他の研究者の実験によって支持されて、DNA 編集酵素に一般化しつつある。

3 つのそれぞれのサブテーマについて、あるいはそれらが複合して、新しいテーマや方向性、あるいは寄り道かもしれないが興味深い小テーマが生まれており、今後、更に研究を進展させなければならないと思っている。第一のサブテーマに関しては、少なくとも細胞質ドメインやテールをもつ膜タンパク質の殆どは細胞骨格とリンクしているのではないかと考えるようになってきた。これは、一般論として、局在と小胞によるリサイクルを考えると妥当であると思う。第一のサブテーマと第二のサブテーマは、いずれ、連結して議論しなければならないこともわかる。第三のサブテーマに関しては、どんどんと系が大きくなって、結局、「レプリソーム」とか「リペアソーム」といったタンパク質の「動的」マシナリーの構造問題となってくる。リボゾームや単一の RNA ポリメラーゼといった安定な、ある意味、「静的な」マシナリーの次に来る、上位の構造問題である。果たして、生きている間にそれらを見れるだろうか。

この事業を始める前に、「様々な研究助成・推進事業があるが、他の事業よりも研究費が使い易いので良い。」といった趣旨の意見を複数の方から頂いた。今、5 年間の事業をやってみて、それを実感している。様々な点、実質的であり、科学研究、基礎研究がどのような運営の枠組みの中で生き生きと伸びていくかが JST にはわかっているのだと思う。同時期に、近い研究領域での若手対象の JST 事業に参加していた若手研究者の意見も同様のものであった。このようなポジティブな感想ばかり聞く事業を知らない。

日本の科学技術研究の振興を思うとき、必ず、この体制は続行すべきであるという立場に立つと確信した。