

# 論文内容の要旨

申請者氏名 森 智行

細胞骨格、アクチンフィラメントや微小管は、細胞の形状維持や運動、物質輸送や極性形成など、極めて重要な役割を果たす。ここでは細胞骨格系制御タンパク質の構造解析を行い、その機能メカニズムを明らかにする事が目的である。本研究では、以下の2つの系において細胞骨格系制御タンパク質の分子間相互作用の詳細をX線結晶構造解析の手法を用いて明らかにした。

## I. Ezrin/Radixin/Moesin (ERM)タンパク質による CD44 認識の構造的基盤

CD44 は、細胞外マトリクスであるヒアルロン酸を特異的に認識し、細胞接着や細胞運動などに関わる I 型膜タンパク質である。CD44 がその最大活性を示すためには、ERM タンパク質の相互作用が必要である。ERM タンパク質は膜タンパク質とアクチンフィラメントを連結するリンカータンパク質として働き、N-末端の four point one ERM ドメイン(以下 FERM)で種々の膜タンパク質と相互作用する。接着分子の一種 ICAM-2 との複合体の X 線構造研究から FERM による接着分子の認識配列 Motif-1 が提唱されているけれども、CD44 は、この Motif-1 を欠いているため、ERM タンパク質による CD44 認識の詳細は不明であった。そのため、FERM による CD44 認識の詳細を明らかにするため、Radixin FERM と CD44 の複合体構造研究を開始した。結果、CD44 細胞内ドメイン膜直下 20 残基のペプチドを用いて複合体結晶を得、分解能 2.1 Å で構造解析を終了した。構造から CD44 は ICAM-2 の結合部位と同一の部位、サブドメイン C のβ5C とα1C 間の疎水性の溝に CD44 の 9 残基、<sup>8</sup>QKKKLVING<sup>16</sup>、が結合していた。CD44 は、KKKL 領域の主鎖で FERM サブドメイン C のβ5C と逆平行βシートを形成し、C 末端 VING 領域のループ構造がβ4C-β5C 間のループ、β5C とα1C の主鎖、側鎖と水素結合、および疎水的相互作用をしていた。この CD44 の FERM 結合配列中の IN 残基(KKKLVIN)は、NEP の FERM 結合モチーフ Motif-1β、MxITxIN、中にも保存されており、FERM ドメインは Motif-1β に類似した認識機構で CD44 を認識していると結論した。

## II. 微小管+端集積因子(+TIPs)、EB1 と CLASP の複合体結晶構造解析

+TIPs は微小管の+末端 (以下 +端) を特異的に認識して集積する微小管結合タンパク質群である。+TIPs は互いに複雑な相互作用を形成しながら+端に集積し、微小管の配向制御に関わる事が知られているが、+TIPs と微小管、+TIPs 同士の相互作用に関しては不明な点が多い。そのため、本研究では構造未知である CLASP2γ (cytoplasmic linker associated protein 2 γ)の EB1 (end binding protein 1)認識を明らかにする事を目的として研究を開始した。プルダウンアッセイによる相互作用解析の結果、CLASP は Ser/Arg/Lys リッチドメイン内にある、2 カ所の繰り返し配列を形成するペプチド領域で EB1 C 末端の EB1 homology domain (EB1-HD)と相互作用する事が明らかとなった。この相互作用解析の結果を基に、14 残基の CLASP ペプチドと EB1-HD との複合体結晶を得、分解能 2.6 Å で構造解析を終了した。構造解析から、CLASP ペプチドの IP 配列が EB1-HD2 量体のヘリックスバンドル領域に形成される疎水性ポケットに疎水性相互作用し、IP 配列周辺の塩基性残基が EB1-HD の疎水性ポケット周辺の酸性残基と静電的相互作用を形成している事が明らかとなった。

# 論文審査結果の要旨

申請者氏名 森 智行

本論文は、アクチンフィラメントと細胞膜のリンカーである ezrin/radixin/moesin (ERM) タンパク質の一つである radixin の多機能性 four point one and ERM (FERM) ドメインと CD44 細胞質ペプチド (CD44) 複合体、ならびに、微小管制御タンパク質である end binding protein 1 (EB1) と cytoplasmic linker associated protein 2 $\gamma$  (CLASP2 $\gamma$ ) ペプチドとの複合体の生化学的調製と結晶化に成功して、それら複合体の X 線結晶構造解析法による三次元構造決定と構造に基づいた生化学的相互作用解析を通して、各ドメイン-ペプチド間の相互作用様式を構造生物学の立場から解明した。本論文の主な成果は以下のように要約される。

FERMドメイン-CD44 複合体では、

1. 72 残基からなる CD44 細胞質ドメインは伸びた形状をしたランダムコイルであることを、超遠心分析法、ゲル濾過法ならびに円偏光二色性測定から明らかにした。
2. CD44 膜直下領域が FERM サブドメイン C の $\beta$ 5C と $\alpha$ 1C の間に形成される浅い疎水性の溝にはまり込み、KKKL 領域と $\beta$ 5C との逆平行 $\beta$ シートの形成、続くループ領域での 7 本の水素結合の形成ならびに疎水性残基 L と I の疎水性のポケットへのドッキングにより結合していることを、結晶構造から明らかにした。
3. CD44 と NEP 間では IN 残基が保存されており、FERM ドメインの CD44 認識は、NEP の motif-1 $\beta$  認識と類似していることを、構造ならびに配列比較から明らかにした。
4. タンパク質キナーゼ C (PKC) によりリン酸化される CD44 膜直下のセリン残基 (Ser2) のリン酸化は、CD44-FERM ドメイン間の相互作用を弱めることを *in vitro* の精製系での相互作用解析から明らかにして、このリン酸化が ERM 相互作用を調節して、CD44 細胞内ドメインの核移行制御に関与する可能性を考察した。

EB1-CLASP 複合体では、

1. EB1 は EB1C 末端ドメイン (EB1-HD) を通して、CLASP2 $\gamma$  の 2 つの繰り返し配列をもつペプチド領域を認識することを、*in vitro* の定量的な結合実験を通して明らかにした。
2. CLASP ペプチドは EB1-HD 二量体のヘリックスバンドル領域の溝に、IP 配列を疎水性のポケットに挿入するとともに、IP 配列周辺の塩基性残基と EB1-HD の疎水性ポケット周辺の酸性残基との静電的相互作用により結合することを、結晶構造から明らかにした。
3. 結晶構造から明らかとなった CLASP の EB1-HD 認識に必要なとされる配列 SxIP は、他の EB1 結合タンパク質間でも高度に保存されていることを示して、SxIP 配列が EB1 結合タンパク質における EB1 認識に必要な認識モチーフである可能性を示唆した。

本論文は、FERM-CD44 および EB1-CLASP 複合体の三次元構造解析と生化学的実験から、当該タンパク質の分子認識を原子レベルで解明しており、細胞骨格制御および細胞極性形成における構造生物学分野において学術上の寄与が十分である。よって、博士(バイオサイエンス)の学位論文として価値があるものと認める。