

平成30年 8月28日現在

機関番号：14603

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26251006

研究課題名(和文)細胞移動の動力クラッチ分子複合体の構造と動作原理

研究課題名(英文)Structural and physical properties of the clutch molecular complex in motile cells.

研究代表者

箱嶋 敏雄 (Hakoshima, Toshio)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・教授

研究者番号：00164773

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 30,800,000円

研究成果の概要(和文)：細胞移動の力の発生・伝達に関する「クラッチモデル」を制御するタンパク質の構造や物性を解析した結果、クラッチ分子Shootin1のN-末端側には、L1-CAMと直接結合する $\alpha$ -ヘリックスからなる3領域があり、その第1と第2領域にリン酸化部位があることがわかった。リン酸化により、Shootin1は4量体等の高次の会合状態になり、L1-CAMの細胞質領域の膜近傍領域に直接結合することを明らかにした。

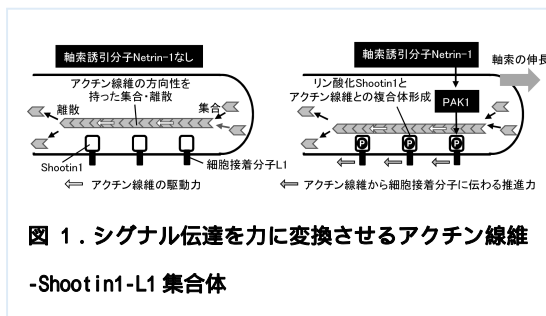
研究成果の概要(英文)：The traction forces underlying cellular motility is regulated in part by the phosphorylation-induced modulation of coupling efficiency of the "clutch" molecule Shootin1 between F-actin and adhesion molecule L1-CAM, which bound the extracellular matrix. To establish the molecular basis of the regulatory mechanism, we analyzed by physical methods the structural and physical properties of Shootin1 and its physical interactions with L1-CAM and other regulatory proteins using purified protein samples. We found that three  $\alpha$ -helical regions at the N-terminal half of Shootin1 and the phosphorylation sites existing at the first and second helical regions. The  $\alpha$ -helical regions mediate Shootin1 dimerization in solution and the phosphorylation at the N-terminal helical region induces formation of a tetramer or even higher oligomers to directly bind the cytoplasmic region of L1-CAM.

研究分野：構造生物学

キーワード：構造生物学 生化学 生物物理学 分子細胞生物学 タンパク質 相互作用 構造変化 制御機構

1. 研究開始当初の背景

細胞や組織の収縮過程は分子レベルで詳しく調べられており、アクチン繊維とそれに会合したミオシンからなるアクチン ミオシン系の収縮を張力の源として、「張力のセンサー」役をするタンパク質分子、 $\alpha$ -catenin や talin、が張力負荷に応じて構造変化して、「引っ張られたら引っ張り返す」という動的機構まで明らかになりつつある (Yonemura *et al.*, 2010; del Rio *et al.*, 2009)。一方、細胞や組織の伸長や細胞が移動する遊走過程においては、アクチンの重合が力の発生源であることは認識されており、アクチンの重合・脱重合の制御機構は詳しく調べられてきた。しかし、アクチン重合で発生した力を移動のための駆動力に変換する動的な制御機構については、最近まで不明であった。



神経細胞の軸索の伸長は、神経ネットワーク形成時に誘引分子 (netrin 等) に導かれて正しい方向へと誘導される。この時、軸索先端で方向性をもった集合・離散を繰り返すアクチン線維が、軸索先端の移動のための駆動力を提供する (図 1、左)。誘引分子の受容体は非典型 (non-conventional) ミオシンの一つである myosin-X によって成長円錐の突起の先端に運ばれるが、このミオシンの積荷認識機構等については、箱嶋・稲垣の共同研究が既に複合体の構造決定で明らかにしている (Hirano *et al.*, 2011)。稲垣らは軸索伸長の必須タンパク質として Shootin1 を発見して (Toriyama *et al.*, 2006)、その netrin-1 依存的な PAK キナーゼによるリン酸化が、アクチン繊維と接着分子 (L1-CAM) とを固定する Shootin1 の「クラッチ機能」を「ON」にすることで、細胞外マトリックスへ駆動力として伝えらるという制御機構を提唱した (Shimada *et al.*, 2008; Toriyama *et al.*, 2013)。

【参考文献】

Yonemura *et al.*, *Nat Cell Biol* **12**, 533 (2010): 密着結合 (AJ) での張力依存的な張力発生制御機構  
 del Rio *et al.*, *Science* **323**, 638 (2009): 焦点接着 (FA) での張力依存的な張力発生の制御機構  
 Hirano *et al.*, *EMBO J.* **30**, 2734 (2011): Myosin-X と netrin 受容体 DCC の複合体構造決定  
 Toriyama *et al.*, *J Cell Biol* **175**,147 (2006):

Shootin1 の発見

Shimada *et al.*, *J Cell Biol* **181**,817 (2008): Shootin1 と接着分子 L1 の相互作用の発見  
 Toriyama *et al.*, *Current Biol* **23**, 529 (2013): Shootin1 のリン酸化を介した動的制御機構の提唱

2. 研究の目的

細胞は他の細胞あるいは細胞外マトリックスと接着分子を介して結合して、機械的な力を伝えることで細胞の形態変化や移動を実現する。細胞が収縮する場合は、アクチン系での力発生を起点とした分子レベルでの制御系の理解が進んでいる。一方、細胞伸長やそれを通じた細胞移動における分子レベルでの力の伝達機構の理解は不明な点が多い。本研究は、申請者が明らかにしつつある Shootin1-L1 複合体による神経軸索の伸長機構に焦点を当て、成長円錐でのアクチン重合で発生した力を、その重合と同期して「クラッチ分子 Shootin1」が細胞外マトリックスに固定された接着分子 L1-CAM に効率よく伝えて、その反作用で伸長するという制御機構を分子構造や物性レベルで解明して、分子機械論としてこの現象を理解することを目的としている。

3. 研究の方法

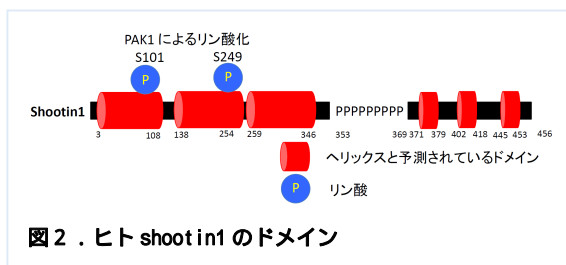
本研究では、Shootin1、cortactin、L1-CAM やアクチン、微小管等のタンパク質精製試料を用意する必要がある。これらの多くは組換えタンパク質として発現し、アフィニティーやイオン交換等のカラムクロマトグラフィー、ゲル濾過法等の方法で生化学的に精製する。主にヒト、マウスのタンパク質で実験を進めていくことを計画している。タンパク質試料の調製、あるいは、結晶化で芳しくない結果が得られた場合には、相互作用ドメインをマッピングして、それらドメインの組み換えタンパク質の大量調製系を完成して、精製試料を用いて、物性及び相互作用解析や結晶化を試みる (箱嶋グループ)。また、相互作用領域の *in vivo* での機能・重要性を細胞レベルで解析する (稲垣グループ)。

試料調製では、様々な発現コンストラクトを色々な発現ベクターを駆使して DNA 操作の実験を進める。また、タンパク質試料の調製等の生化学実験では、種々の精製用カラムを半自動クロマトシステムで用いて、迅速に進める。物性解析では、先ず二次構造を円偏光二色性 (CD) 測定により見積もるとともに、温度変化させて構造の熱安定性を解析する。更に、分析超遠心 (AUC) やサイズ排除クロマトグラフィー (SEC) の実験により、溶液中での会合状態を解析する。相互作用解析では、電気泳動による pull-down アッセイや SEC 解析による予備の実験に続いて、表面プラズモン共鳴 (SPR) 測定や、等温滴定熱測定 (ITC) により、相互作用の定量的な解析を進める。

以上の解析を、Shootin1 の各ドメインやリン酸化(疑似リン酸化)試料について解析して、Shootin1 の機能制御と分子構造や物性との関係を解明していく(箱嶋グループ)。

#### 4. 研究成果

Shootin1 の全長タンパク質は容易に部分分解する不安定なタンパク質であることが判明したが、迅速な実験で精製可能ながわかった。この試料を用いたドメインマッピングや、二次構造予測の結果を参考にした種々の長さの発現コンストラクトを作成して安定性の検討と、CD 測定結果をもとにして二次構造を見積った。その結果、Shootin1 は、N-末端側に  $\alpha$ -helix に富んだ N-ヘリカル領域(1 - 356 残基)が、短い Pro-リッチ領域を挟んで、C-末端側の  $\alpha$ -helix に富んだ C-ヘリカル領域(369 - 456 残基)からなることがわかった(図2)。第1と第2のヘリックス領域には、PAK1 によるリン酸化部位があるが、第3ヘリックス領域にはリン酸化部位はないことがわかった。



これらの各ヘリックス領域のタンパク質試料はそれぞれ調製可能であり、溶液中で安定であった。また、第1、第2、第3ヘリックスを含む領域と第2と第3ヘリックスを含む領域も安定であったが、第1と第2ヘリックスを含む領域は不安定であった。第1、第2、第3の各ヘリックス領域は溶液中でそれぞれ2量体を形成することが、AUCの実験で明らかとなった。更に、全長タンパク質も2量体として存在することがわかった。全長タンパク質のSECの実験では、更に高次の複合体に相当する見かけ上の質量が計算上得られたので、Shootin1 の全長タンパク質は溶液中では、比較的伸びた構造をとっていることが明らかとなった。

以上の3つのヘリカル領域を含む種々のコンストラクトを作成して精製タンパク質を得て結晶化を試みたが、結晶は得られなかった。また、融合タンパク質等も調製してみたが、事態は改善されなかった。

一方、疑似リン酸化した全長タンパク質はAUC解析の結果、2量体に加えて、4量体としても存在することがわかった。更に、4量体以上の高次の複合体も形成しうることもわかった。このことは、リン酸化によって、会合状態が変化して、4量体等の高次の複合体を形成することが、活性化機構として重要

なことが示唆された(図3)。

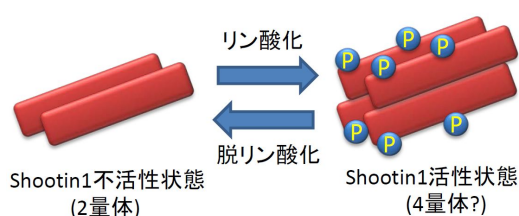


図3 . ヒト shootin1 の N-末端ヘリカルドメイン 2 量体とリン酸化誘導による 4 量体の形成

N-末端側のヘリカル領域は、活性化に必要なリン酸化部位も含むので、標的タンパク質との相互作用領域と考えられた。そこで、L1-CAM の細胞質領域との相互作用を SPR 測定によって解析した。その結果、このヘリカル領域はリン酸化されない状態では L1-CAM との相互作用は検出できなかったが、リン酸化された状態では結合が観測された。この結果は、細胞中ではリン酸化によって Shootin1 が活性化されて、接着分子である L1-CAM とアクチン繊維との間を連結するというこれまでのモデルとよく一致した。

更に、L1-CAM の細胞質領域のどの部分と相互作用するかを解析した。L1-CAM の細胞質領域は、N-末端側の細胞膜に近い領域に ERM タンパク質の結合領域をもち、C-末端側に Ankyrin 結合領域をもつことがわかっていいる。これらの領域に分割したペプチド領域も調製して、どの部分に結合するかを SPR 測定で解析して、結合の解離定数も求めた。

以上の研究結果から、Shootin1 はリン酸化依存的に会合状態を変化させて、4量体等の多量体を形成することで、L1-CAM と結合できるようになることが明らかとなった。L1-CAM 上での Shootin1 結合部位は、N-末端側の細胞膜に近い領域であり、ERM タンパク質の結合領域と隣接するか、あるいは重なる可能性が出てきた。今後、Shootin1 と ERM タンパク質との機能的な解析が、新しい Shootin1 の制御機構解明につながるかも知れない。

#### 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 12 件)  
全て査読有り

- Abe, K., Katsuno, H., Toriyama, M., Baba, K., Mori, T., Hakoshima, T., Kanemura, Y., Watanabe, R. and \*Inagaki, N. (2018) Grip and slip of L1-CAM on adhesive substrates direct growth cone haptotaxis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **115**(11):2764-2769.
- Maki, K., Han, S. -U., Hirano, Y., Yonemura,

S. Hakoshima, T. and \*Adachi, T. (2018). Real-time TIRF observation of vinculin recruitment to stretched  $\alpha$ -catenin by AFM. *Scientific Reports* **8**(1):1575. doi: 10.1038/s41598-018-20115-8.

Mori, T., Itoh, T., Liu, S., Ando, H., Sakamoto, S., Yamaguchi, Y., Tokunaga, E., Shibata, N., Handa, H. and \*Hakoshima, T. (2018). Structural basis of thalidomide enantiomer binding to cereblon. *Scientific Reports* **8**(1) 1294. doi:10.1038/s41598-018-19202-7.

Hirano, Y., Amano, Y., \*Yonemura, S. and \*Hakoshima, T. (2018). Mechanism of the  $\alpha$ -catenin force-sensitivity and its effects on epithelial morphogenesis. *Genes to Cells*. **23**(5), doi: 10.1111/gtc.12578.

Maki, K., Han, S. -U., Hirano, Y., Yonemura, S. Hakoshima, T. and \*Adachi, T. (2016). Mechano-adaptive Sensory mechanism of  $\alpha$ -catenin under tension. *Scientific Reports* **6**, 24878, doi: 10.1038/srep24878.

\*Hakoshima, T. (2016). Protein modification for crystallization. in *Advanced Methods in Structural Biology* (eds T. Senda, K. Maenaka) Springer, pp. 153–161. (Review)

Kim, S.Y., Tachioka, Y., Mori, T. and \*Hakoshima, T. (2016). Structural basis for autoinhibition and its relief of MOB1 in the Hippo pathway. *Scientific Reports* **6**, 28488, doi:10.1038/srep28488.

Higashiguchi Y, Katsuta K, Minegishi T, Yonemura S, Urasaki A, Inagaki N. (2016) Identification of a shootin1 isoform expressed in peripheral tissues. *Cell Tissue Res.* **366**(1), 75-87.

Kubo Y, Baba K, Toriyama M, Minegishi T, Sugiura T, Kozawa S, Ikeda K, Inagaki N. (2015) Shootin1-cortactin interaction mediates signal-force transduction for axon outgrowth. *J Cell Biol.* **210**(4), 663-676.

Shibahara, A., Hirano, Y. and \*Hakoshima, T. (2015). Structure of the free form of the N-terminal VH1 domain of monomeric  $\alpha$ -catenin. *FEBS Lett.* **589**(15), 1754–1760.

Terawaki, S., Kitano, K., Aoyama, M., and Hakoshima, T. (2015). Structural basis for intermolecular interaction between ERM proteins and membrane type I matrix metalloprotease, MT1-MMP. *Genes to Cells* **20** (10) 847–859.

Mori, T. Goto, S., Shirakawa, M. and \*Hakoshima, T. (2014). Structural basis of DCAF1 recognition by merlin/NF2 and its implication in tumorigenesis by CD44-mediated inhibition of merlin suppression of DCAF1 function. *Genes to Cells* **19** (8), 603-619.

[学会発表](計 件)

[図書](計 件)  
[産業財産権]

出願状況(計 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 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

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

箱嶋 敏雄 (HAKOSHIMA Toshio)  
奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイ  
エンス研究科・教授  
研究者番号：00164773

### (2) 研究分担者

稲垣 直之 (INAGAKI Naoyuki)  
奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイ  
エンス研究科・教授  
研究者番号：20223216

### (3) 連携研究者

( )  
研究者番号：

### (4) 研究協力者

( )