

論文内容の要旨

申請者氏名 柴原 豪 了

細胞骨格タンパク質である α -catenin は、細胞間接着の一つである接着結合 (adherens junction, AJ) の細胞内の膜裏打ち構造の形成と維持に重要であり、多くの構造・物性・機能の研究がなされてきた。しかし、 α -catenin の機能にとって極めて重要な N 末端ドメイン (D1 ドメイン) については、不完全な部分構造の報告しかなく、その機能や構造の制御機構には不明な点が多かった。本研究では、以下の 2 件の構造研究を通して、 α -catenin の分子内と分子間の相互作用を通じた制御機構を解明した。

溶液中の α -catenin には、D1 ドメインを介して単量体と二量体との平衡があり、単量体は β -catenin と強い親和性をもち、アクチン線維とも相互作用することで cadherin-catenin 複合体を形成してリンカータンパク質として機能する。一方、二量体は β -catenin との結合の親和性は弱い、単量体よりもアクチン線維と強い親和性をもち、アクチン性の束化を促進するが、これらの構造的基礎は不十分であった。そこで、申請者は、先ず α -catenin の D1 ドメインを用いて、その単量体の結晶構造を 2.5 Å 分解能で決定した。その結果、単量体状態では N-末端側に 2 本の α -ヘリックスが新たに形成されており、D1 ドメインの全体構造としては、2 つの 4 本鎖のヘリックス束 (four-helix bundle) 構造をもつこと、この 2 本の α -ヘリックスが二量体形成界面を覆って二量体形成を構造的に阻害していること、 β -catenin との結合には N-末端側の 1 本の α -ヘリックスの移動が必要なことを明らかにした。また、変異導入や CD 測定、超遠心分析、ゲル濾過分析、プロテアーゼによる部分分解等の手法を用いた物性解析により、この 2 本の α -ヘリックスの構造転移が二量体形成に必要であり、二量体形成後にはランダムコイル状態になることを明らかにするとともに、安定な 2 つの 4 本鎖のヘリックス束形成に必須なアミノ酸残基を同定した。これらにより、AJ における α -catenin の二量体形成機構や β -catenin との相互作用機構の一端を明らかにした。

次に、AJ による密着結合 (tight junction, TJ) 形成制御や、細胞接着による細胞増殖の制御、あるいは、がん細胞の浸潤・転移との関係に注目して、癌抑制遺伝子産物 merlin (moesin, ezrin, radixin like protein) と α -catenin の D1 ドメインとの相互作用を解析するとともに、merlin と α -catenin との複合体の構造を 2.2 Å 分解能で決定した。その結果、 α -catenin の N 末端の 19 残基が merlin の FERM ドメインのサブドメイン C にある疎水性の溝に β -シートを形成してはまり込むように相互作用していることを明らかにした。この N-末端領域は、単量体、二量体、さらには β -catenin との結合状態でもランダムコイル状態で露出しており、AJ で merlin との相互作用が可能である。これらの結果から、この相互作用を通して、merlin が細胞質に保持される機構の構造的基礎を提示した。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 柴原 豪 了

α -catenin は β -catenin とともに代表的な細胞骨格タンパク質であり、AJ ではカドヘリンとアクチン繊維を連結するリンカーの役割を担う。また、 α -catenin は張力依存的にアクチン結合タンパク質の一つであるビンキュリンと結合することで、張力に抗する力の発生にも関与しており、動的な AJ の形成と維持を制御するタンパク質として、分子細胞生物学上の重要な地位を占めている。このような重要性を背景に、構造研究等を含めたタンパク質分子レベルでの多くの研究が成されてきた。しかし、これらの多くの研究は、生化学的な不安定性のために、N-末端の~80 残基を欠失した試料を用いた研究に限られていた。この削除された残基を含む N-末端ドメイン (D1 ドメイン) には、二量体形成や β -catenin、あるいは merlin 等の他のタンパク質との相互作用部位があるので、これらを含む全長でのタンパク質試料を用いた構造解析や物性解析が待たれていた。

α -catenin には α E-、 α N-ならびに α T- catenin の三種類あるが、本研究では、先ず、 α N-catenin の単量体になり易い性質に注目して、その D1 ドメインを N-末端領域の分解のない状態での試料調製に成功している。次に、それを結晶化して、側鎖を含めた構造を議論するのに十分な分解能 (2.5Å) で単量体の構造決定に世界で始めて成功した。その結果、N-末端に二量体ではなかった 2 本の α ヘリックスが新たに形成されており、ドメイン全体では 2 つの 4 本鎖のヘリックス束 (four-helix bundle) 構造をもつ安定な構造形成することを見出すとともに、この構造を元に、二量体形成に伴う構造変化や β -catenin 結合に伴う構造変化を明らかにすることで、機能変換の分子機構の一端を明らかにした。更に、D1 ドメインと merlin との相互作用を詳しく解析して、D1 ドメインの N-末端の 19 残基を merlin の FERM ドメインが認識していることを突き止めた。更に、merlin と α -catenin との複合体の構造を 2.2 Å 分解能で決定して、D1 ドメインの N-末ペプチドが merlin の FERM ドメインの CD44 等の接着分子認識部位に β -シートを形成して結合していることや、merlin が AJ の β -catenin に結合した α -catenin に merlin が結合できることを示した。これらの成果により、merlin を細胞質に保持する等の重要な分子機能の構造的基礎を与えることができた。

以上のように、本論文により α -catenin の単量体と二量体の平衡時の構造変化や、それによる機能変換の分子機構の一端が解明された。また、本論文はこれまでに明らかにされていなかった α -catenin による merlin の認識に関する新規の知見を見いだしており、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士(バイオサイエンス)の学位論文として価値あるものと認めた。