

博士論文を要約したもの

博士論文題目

接着結合を構成する α -catenin の N 末端ドメインの構造・物性と機能

氏 名 柴原 豪了

(要約)

本研究では、細胞間接着の一つである接着結合 (adherens junction, AJ) で重要な機能をもつ α -catenin の 2 つの構造研究、「 α -catenin 単量体の構造解析」と「 α -catenin-Merlin 複合体の構造解析」を通して、タンパク質間あるいはタンパク質内相互作用により α -catenin の重要な機能を制御する α -catenin の N 末端ドメインの構造と物性について報告する。

I. α -catenin 単量体の構造解析

細胞骨格タンパク質である α -catenin は、接着結合 (adherens junction, AJ) の形成と維持に重要なタンパク質である。この α -catenin は AJ の細胞質側で β -catenin を介して接着分子 cadherin と複合体 (cadherin-catenin 複合体) を形成するとともに、アクチン線維とも結合することでそれらを連結する。このような cadherin-catenin 複合体とアクチン線維の相互作用は、組織を維持するために比較的安定であると考えられてきた。しかし、細胞の形態変化や細胞運動などに伴う AJ 形成の際に、 α -catenin はそれらの相互作用を動的に制御するスイッチとしても機能していることが近年示唆されている。この機能は、 α -catenin に単量体と N 末端ドメインを介して形成する二量体との平衡が存在していることに関係している。二量体は、 β -catenin 結合の親和性は弱いですが、単量体よりもアクチン線維と強い親和性をもち、アクチン線維の束化やその枝分かれの阻害に関与することで、強固で成熟した AJ 形成に貢献している。一方で、単量体は、二量体よりも β -catenin と強い親和性をもち、cadherin-catenin 複合体を形成して、リンカータンパク質を介してアクチン線維と相互作用する。近年、 α -catenin の二量体構造や β -catenin との複合体の部分構造が報告されて、その原子レベルでの分子認識が明らかとなりつつある。しかし、 α -catenin の会合状態を決定する N 末端ドメインの構造や動的性質は不明な点が多く、 α -catenin の二量体形成や β -catenin との複合体形成のより詳細な理解には至っていない。そこで、本研究では X 線結晶構造解析による α -catenin の N 末端ドメイン単量体の三次元構造を決定するとともに、解明した結晶構造を基盤とした生物物理学的・生化学的手法による多面的な解析を行い、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分子基盤の一端を明らかにした。

申請者は、先ず α -catenin の N 末端ドメイン単量体の結晶構造を 2.5Å 分解能で決定した。N 末端ドメインは単量体状態で 2 つの four-helix bundle から構成されており、単量体状

態で N 末端 81 残基に 2 本のヘリックス (α N-catenin 22-39 残基、55-81 残基) が存在することを明らかにした。本単量体と既知の二量体の構造比較から、この 2 本のヘリックスは二量体形成の会合部位を覆っており、二量体形成には構造変化が必要であることが示唆された。そこで、プロテアーゼ消化による構造安定性評価、円偏光二色性スペクトル解析によるヘリックス含有量の測定、ゲルろ過分析による会合状態評価を行い、二量体形成時に N 末端にある 2 本のヘリックスが大きく構造変化することを確認した。続いて、 β -catenin との複合体と構造比較した結果、N 末端側から 1 本目のヘリックス (α N-catenin 22-39 残基) が構造変化することで、 β -catenin との相互作用部位である疎水性表面を露出させるとともに、疎水性表面をさらに拡大させることが明らかとなった。これは、二量体形成時とは異なる構造変化であった。また、この 1 本目のヘリックスの構造変化により、 β -catenin が相互作用できるように 2 つの four-helix bundle の配向が変化していることも示した。このように、 α -catenin は N 末端ドメインで異なる構造変化を実現することで相互作用する分子を選択し、AJ の形成・成熟における重要な役割を担っていることが解明できた。

II. α -catenin-merlin 複合体の構造解析

細胞間接着の形成と細胞極性の確立は、組織・細胞が多様な機能を獲得するための基礎である。そのモデルとして研究が進んでいる上皮細胞においては、細胞間接着構造である AJ と密着結合 (tight junction、TJ) が挙げられる。TJ は必ず AJ が形成された後、AJ の頂端側に形成されることから、TJ 形成は AJ 形成と時空間的な依存性が示唆されており、この時空間的な制御機構が極性形成に重要であると考えられている。しかし、2 つの接着構造を時空間的に関連づけるシグナル伝達機構については不明な点が多いのが現状である。最近になって、癌抑制遺伝子産物 merlin (moesin, ezrin, radixin like protein) が AJ の α E-catenin と結合する一方で、TJ 形成を促進する分子とも相互作用していることが報告されており、merlin は AJ と TJ を直接的に連結する分子として機能している可能性が示唆されている。これまで、merlin は ERM (Ezrin, Radixin, Moesin) タンパク質と同様に、細胞膜とアクチン繊維を連結する分子として考えられてきた。しかし、他の ERM タンパク質とは異なり、merlin のみが癌抑制遺伝子であるために、merlin 特有の機能の存在が示唆されてきた。今回の α E-catenin と TJ 形成を促進する分子を連結する機能は、他の ERM タンパク質には見られない merlin 特有の機能であるとともに、 α -catenin が細胞接着以外の機能を直接相互作用を通して担うことが示された先駆的な例となっている。そこで、本研究では X 線結晶構造解析の手法を用いた α -catenin-merlin 複合体の構造決定や相互作用解析を進めて、merlin による AJ と TJ の時空間的な依存性を決定づける動的な連結機構の一端を、原子レベルで明らかにした。