

学位論文題名

Structural and functional analyses
of the proteins involved in cell polarity

(細胞極性に関与するタンパク質群の構造および機能に関する研究)

学位論文内容の要旨

生命は1つの胚細胞から発生し、多様な性質をもつ細胞へと分化して組織や器官を形成する。このためには細胞に“極性”が生じ、細胞が秩序だてて非対称に分裂する必要がある。また上皮細胞やニューロンは高度に極性化したシステムを持っており、極性発現は細胞が正常に機能するために必須である。近年、atypical プロテインキナーゼ C (aPKC)、Par6、Par3 の三者複合体からなる Par 複合体が細胞極性の普遍的な制御因子であることが明らかとなってきた。Par 複合体は線虫から哺乳類に至るまで進化的に保存され、胚細胞の非対称分裂、上皮細胞の密着結合やニューロンの軸策形成など多種の細胞極性を制御している。また Par 複合体と三量体 G タンパク質を介したシグナル伝達経路が協調的に細胞骨格の再編成を制御することが示唆されている。本研究は Par 複合体を中心とした細胞極性に関するタンパク質群の時空間的な制御機構の解明を目指して行い、Par 複合体形成機構とその局在制御について新たな知見が得られた。

Par 複合体のうち、aPKC と Par6 は PB1 ドメイン同士の相互作用を介して複合体を形成する。PB1 ドメイン間の相互作用を欠失した変異体ではその局在に異常が見られることから、この相互作用が重要であると考えられる。PB1 ドメインは PB1 ドメイン同士が相互作用し、タンパク質間相互作用を担うモジュールとして同定された。PB1 ドメイン間の相互作用は非常に特異的であり、*in vivo*、*in vitro* の双方において特定の PB1 ドメイン同士のみが結合する。しかしその特異性を規定する要因など、相互作用様式の詳細は明らかとなっていない。そこで PB1 ドメインの詳細な相互作用機構と細胞内での機能解明のため、単体および複合体の立体構造解析を行った。

aPKC α の PB1 ドメイン単体の構造を NMR で、PKC ζ と Par6 α の PB1 ドメイン複合体の立体構造を X 線結晶構造解析によってそれぞれ決定した。PKC ζ と Par6 α の PB1 ドメインはともにユビキチンフォールドをとり、立体構造の相同性は非常に高かった。しかし複合体中において、それぞれが異なる領域を相互作用面として非対称なヘテロ二量体を形成していた。PKC ζ では PB1 ドメイン内で保存されている酸性残基と疎水性残基からなる OPCA モチーフと呼ばれる領域の酸性残基が、一方の Par6 α では OPCA モチーフとは立体構造上反対側に位置する塩基性残基がそれぞれ静電相互作用していた。密着結合形成における PB1 ドメイン相互作用の役割について検証した。立体構造情報に基づいて Par6 の PB1 ドメインとの相互作用を欠失した PKC ζ 変異体を作製し、過剰発現させたところ密着結合の形成を阻害した。よって PB1 ドメインを介した Par6 との結合が aPKC による密着結合形成の制御に必要であることが明らかとなった。

PB1 ドメイン複合体は本研究で明らかにした aPKC/Par6 複合体の他に、p40^{phox}/p67^{phox} の構造が最近明らかにされた。両複合体の相互作用様式を比較すると、いずれの複合体においても保存された残基

間の相互作用は保存されていた。しかし両複合体の立体構造を重ね合わせると、ドメイン間の配向に違いがあることが分かった。この配向の変化に伴い、それぞれに特異的な相互作用面が存在していた。つまり、PB1 ドメインはドメイン間の配向を変化させることで特異性を生み出していることが示唆された。他のタンパク質間相互作用について検索したところ、Ras binding domain と低分子量 G タンパク質 Ras, Rap1A の相互作用においても、同様に配向の変化が分子認識の特異性を見出していることが分かった。このようにタンパク質間相互作用において、ドメイン間の配向を変化させることで特異性をもたらす方法は、生命が進化の過程で生み出した普遍的な戦略である可能性を示唆した。

一方 Par3 は複数のドメインからなるマルチドメインタンパク質であり、PDZ ドメインが3つ存在している (N 末端側から PDZ1, PDZ2, PDZ3)。PDZ ドメインは一般的に膜タンパク質などの C 末端と相互作用してタンパク質の局在に関与するため、Par 複合体の局在に機能していると考えられる PDZ ドメインに着目した。Par3 の PDZ1 は上皮細胞の密着結合の構成因子の JAM や Par6 と結合するが、PDZ2, PDZ3 に対する結合相手は同定されていない。本研究では Par3 の PDZ3 と結合するタンパク質として新規に同定された上皮細胞の密着結合の形成に関与する分子、Par3BMP との相互作用様式の詳細を明らかとすることを目的とした。

Par3BMP は一回膜貫通型の膜タンパク質で C 末端に PDZ 結合配列を有している。PDZ 結合配列のすぐ N 末端側には Ser 残基が多数存在しており、またカゼインキナーゼ 2 (CK2) のリン酸化コンセンサス配列にも相当し、生体内においてリン酸化される可能性が示唆される。PDZ ドメインと結合リガンドの結合がリン酸化により調節される例がいくつか知られているため、Par3 PDZ3 と Par3BMP の結合においてもリン酸化による調節機構が存在しないか検討した。リン酸化ミミック体を用いた *in vitro* プルダウンアッセイの結果、CK2 のリン酸化コンセンサス配列に相当する Ser を Asp に変異したリン酸化ミミック体では野生型より結合が強くなった。PDZ ドメインの相互作用においてはリン酸化により結合が弱くなる例が多く、結合が強くなる例はあまり報告されておらず興味深い。またミミック体ではなくリン酸化 Ser360 による Par3 PDZ3 に対する結合への影響を検証した。NMR による滴定実験を行い、¹⁵N 標識した Par3 PDZ3 の化学シフト変化を追跡したところ、非リン酸化 Par3BMP では化学シフト変化が飽和するまで約 2.5 当量の滴定量を要したが、リン酸化 Par3BMP では約 1.0 当量で飽和した。したがって、Par3BMP と Par3α PDZ3 の相互作用はリン酸化によって増強されることが明らかとなった。

次に Par3α PDZ3 単体および Par3BMP リン酸化ミミック体との複合体の立体構造を NMR 法により決定した。Par3α PDZ3 と Par3BMP は分子間で逆平行β-シートを形成し、Par3BMP の C 末端 3 残基は Par3 PDZ3 上に存在する疎水性の溝にはまり込むようにして相互作用していた。また、リン酸基をミミックした Asp は他の PDZ ドメインでは見られない Par3 PDZ3 特有の塩基性残基の集積した正電荷のクラスターと静電相互作用することで相互作用を強めていることが明らかとなった。

学位論文審査の要旨

主査 教授 稲垣冬彦
副査 教授 横沢英良
副査 助教授 川原裕之
副査 助教授 森岡弘志

学位論文題名

Structural and functional analyses of the proteins involved in cell polarity

(細胞極性に関するタンパク質群の構造および機能に関する研究)

生命は1つの胚細胞から発生し、多様な性質をもつ細胞へと分化して組織や器官を形成する。このためには細胞に“極性”が生じ、細胞が秩序だつて非対称に分裂する必要がある。また上皮細胞やニューロンは高度に極性化したシステムを持っており、極性発現は細胞が正常に機能するために必須である。近年、atypical プロテインキナーゼ C(aPKC)、Par6、Par3 の三者複合体からなる Par 複合体が細胞極性の普遍的な制御因子であることが明らかとなってきた。Par 複合体は線虫から哺乳類に至るまで進化的に保存されており、胚細胞や神経芽細胞の非対称分裂、上皮細胞の密着結合形成やニューロンにおける軸策の形成など多種の細胞極性を制御している。さらに、最近では Par 複合体による細胞極性制御に関与する一連のタンパク質群が急速に同定されつつある。Par 複合体と三量体 G タンパク質を介したシグナル伝達経路がクロストークしていることが示唆されており、協調的に細胞骨格の再編成を制御すると考えられる。Par 複合体を中心とした細胞極性に関するタンパク質群の時空間的な制御機構の解明は細胞生物として注目を集めている研究領域であり、申請者は 1. Par 複合体形成機構とその局在の制御、2. LGN/Ric-8 による三量体 G タンパク質 G α の制御機構、3. 両シグナル伝達経路をつなぐ分子 Insc の構造と機能の 3 点について研究を進めた。構造生物学的な知見は細胞極性発現機構を明らかにするために必須であり、構造生物学が主導する新しい研究方向を探るためにも九大生医研住本研究室における細胞生物学研究と同時進行で研究を進めた。このため、タンパク質発現、構造の解釈を含めきわめて難解なテーマ設定となった。申請者は 3 つの研究テーマについてバキュロや種々のタンパク質発現系を試し、大量調製法を確立したが、実際の構造解析に進めたものは 2-3 個である。構造生物学的研究の困難さを示すものであるが、今後、構造生物学研究が志向する方向性を明確に打ち出した点で高く評価する。

まずはじめに細胞極性に必須なタンパク質複合体 aPKC-Par6 複合体の構造解析を行った。Par 複合体のうち、aPKCとPar6はPB1ドメイン同士の相互作用を介して複合体を形成する。PB1ドメイン間の相互作用を欠失した変異体ではその局在に異常が見られることから、この相互作用が重要であると考えられる。PB1ドメインはPB1ドメイン同士が相互作用し、ヘテロ二量体またはホモ多量体を形成することでタンパク質間相互作用を担うモジュールとして同定されたものである。PB1ドメイン間の相互作用は非常に特異的であり、*in vivo*, *in vitro*の双方において特定のPB1ドメインどうしのみが結合することが知られている。しかしその相互作用様式は保存された残基間の静電相互作用が重要であることが知られているのみで、特異性を規定する要因などの詳細は明らかとなっていない。そこでPB1ドメインによる詳細な相互作用機構と細胞内での機能解明のため、複合体での立体構造解析を行ない、PB1ドメイン相互の複合体形成の機構と特異性を明らかにした。申請者はこの結果をJ. Biol. Chem.に二つの論文として発表した。また、日本生化学会誌のミニレビューに依頼執筆をおこなった。

次にPar複合体のもう1つの因子Par3について研究を進めた。Par3は複数のドメインからなるマルチドメインタンパク質である。PDZドメインは一般的に膜タンパク質などのC末端と相互作用することでタンパク質の局在を制御している。Par3のPDZドメインはPar複合体の局在に機能していると考えられるため、はじめにPDZドメインに着目した。PDZドメインは1つのタンパク質中に複数存在することが多い。PDZドメインとリガンドとの相互作用は比較的弱く(1-100 μ M)、各PDZドメインがそれぞれの標的と相互作用することで細胞内局在を決定し、複数のタンパク質を集積するという足場タンパク質としての役割を協調的に発揮すると考えられる。Par3には3つのPDZドメインが存在し(N末端側からPDZ1, PDZ2, PDZ3)、PDZ1は上皮細胞の密着結合の構成因子であるJAMやPar6と結合することが知られているが、PDZ2, PDZ3に対する結合相手は同定されていない。本研究ではPar3のPDZ3と結合するタンパク質として新規に同定された上皮細胞の密着結合の形成に関与する分子、Par3BMPとの相互作用様式の詳細を明らかにするため立体構造を行った。興味深いことはPar3BPはリン酸化を受けると結合が強くなる事である。構造解析を進め、またPar3BPに含まれる結合配列との複合体の構造解析を進め、認識の特異性を明らかにし、特異的認識に関わる残基を同定した。配列解析より、Par3のPDZ3と結合する可能性のあるタンパク質群を見いだした。この結果、ネクチンがリン酸化されることによりPar3のPDZ3と結合することを実験的に明らかにした。リン酸化によるPDZタンパク質の制御という新しい問題を提出した。

以上、申請者は、NMR、X線結晶構造解析の手法を身につけるとともに、これらの手法を用い、細胞極性の制御に必要な相互作用を明らかにするとともに、新しい制御機構の存在を提案した。今後の研究の発展も期待できるものであり、博士論文にふさわしい研究と評価する。