実験番号：2017N2008，N2010 （6 シフト）

BL2S1

ゲルゾリンファミリータンパク質との共結晶化による F 型アクチン原子構造の解明

武田修一
名古屋大学大学院理学研究科附属構造生物学研究センター

キーワード：アクチン，キャッピングタンパク質，細胞骨格，X 線結晶構造解析

1. 概要

アクチンキャッピングタンパク質（CP）は、アクチン繊維（F アクチン）の端に強固に結合することによって、単量体アクチン分子（G アクチン）の結合・解離脱を防ぐことから、生体内におけるアクチンダイナミックス制御において重要な役割を果たすことが知られている。前回の Aichi SR BL2S1 での実験（実験番号 2017N1006）において、マウスのアイソフォーム組成が異なる二種類の CP（α1β2、及びα2β2）の X 線結晶構造を決定した。本実験では、この 2 種の CP の活性制御機構を調べるため、CP 制御タンパク質と知られている CIN85 の CP 結合モチーフとの複合体の共結晶構造を決定した。

2. 背景と研究目的

アクチンは、ほとんどの真核細胞において、最も大量に存在するタンパク質であり、細胞運動、筋収縮、個体発生など様々な生体現象に重要な役割を果たしている。単量体 G アクチンは重合することによって、二重らせん状の F アクチンを形成する。両者間の遷移はダイナミックであり、アクチン会合状態の空間・時間的制御には、様々な結合タンパク質が関与することが知られている。F アクチンは極性を持つ繊維であるが、CP はアクチン重合・脱重合が活発に起こる端（プラス端）に結合することで、そこでの伸長・収縮を防ぐことが知られている。細胞内には、CP の F アクチン結合活性を制御する様々な因子が存在する。CARMIL ファミリータンパク質は、アミノ酸 20 残基ほどの高度に保存された CP 結合モチーフ(CPI)を持つ一群のタンパク質であり、CPI を通じて CP と強固に結合することが知られている。これまでに、CARMIL ファミリータンパク質の内、CARMIL、CD2AP、CKIP-1 と CP の結合様式が、X 線結晶構造解析によって調べられており、いずれのタンパク質も CP 上の同じ位置に結合することが示されている[1,2]。これまで、結合構造が調べられていない CARMIL ファミリータンパク質に、CIN85 (Cbl-interacting protein of 85 kDa)がある。CIN85 は、ユビキチンリガーゼとして機能する Cbl と協働して、上皮増殖因子受容体(EGFR)を介した細胞シグナル伝達機構に関与する分子である。Cbl はその N 末端側に CPI モチーフを持ち、CP と結合することが知られている[3]。本研究では、マウス CPα1β2、及びα2β2 と CIN85 の CPI モチーフとの複合体の結晶構造を解明することを目標とする。

3. 実験内容

結晶化に用いたマウス CPα1β2、及びα2β2 タンパク質は、大腸菌発現系を用いて精製した。CIN85 CPI モチーフは、市販の合成ペプチドを用いた。CP と CIN85 CPI モチーフを、モル比 1:5 で混合して得られた複合体を結晶化試料とした。アポ体の結晶化条件を参考にして、それぞれのタンパク質複合体の単結晶を得た。回折実験は、AichiSR 単結晶用ビームライン BL2S1（波長 = 1.12 Å）にて行った。それぞれのタンパク質について複数の凍結結晶を用いて、回折実験を行なったところ、CPα1β2/CIN85 CPI 複合体については 1.6 Å分解能、CPα2β2/CIN85 CPI 複合体については 1.9 Å分解能の反射データセットを収集することに成功した。得られたデータセットを、サイト備え付けのプログラム XDS で処理したのち、既知のマウス CP の結晶構造を探索モデルとして、分子置換法で初期位相を求め、さら

に構造精密化作業によって原子構造を決定した。

4. 結果および考察

それぞれの複合体結晶構造を Fig.1 に示す。CIN85 CPI は、CPβサブユニットに結合することがわかる。この結合位置は、これまで知られている他の CARMIL ファミリータンパク質の場合と、ほぼ同様である。このことから、CIN85 も共通の機構で CP の F アクチン結合活性を制御するものと考えられる。上述のように、CPα1β2/CIN85 CPI 複合体結晶構造の分解能は 1.6Å であり、これまで報告されている CP の結晶構造中では、最も高分解能である。現在、両者の構造を詳細に検討中である。

5. 今後の課題

EGFR は、チロシンキナーゼによる細胞内ドメインのリン酸化によって、その生理機能が制御されていることがよく研究されている。今回の複合体結晶構造に基づき、CIN85 の細胞シグナル伝達機構に、CP、及びアクチン細胞骨格が果たす役割の研究が進むことが期待される。

6. 参考文献

1. Takeda, S., et al., *Two distinct mechanisms for actin capping protein regulation--steric and allosteric inhibition. PLoS Biol*, 2010. **8**(7): p. e1000416.
2. Hernandez-Valladares, M., et al., *Structural characterization of a capping protein interaction motif defines a family of actin filament regulators. Nat Struct Mol Biol*, 2010. **17**(4): p. 497-503.
3. Bruck, S., et al., *Identification of a novel inhibitory actin-capping protein binding motif in CD2-associated protein. J Biol Chem*, 2006. **281**(28): p. 19196-203.

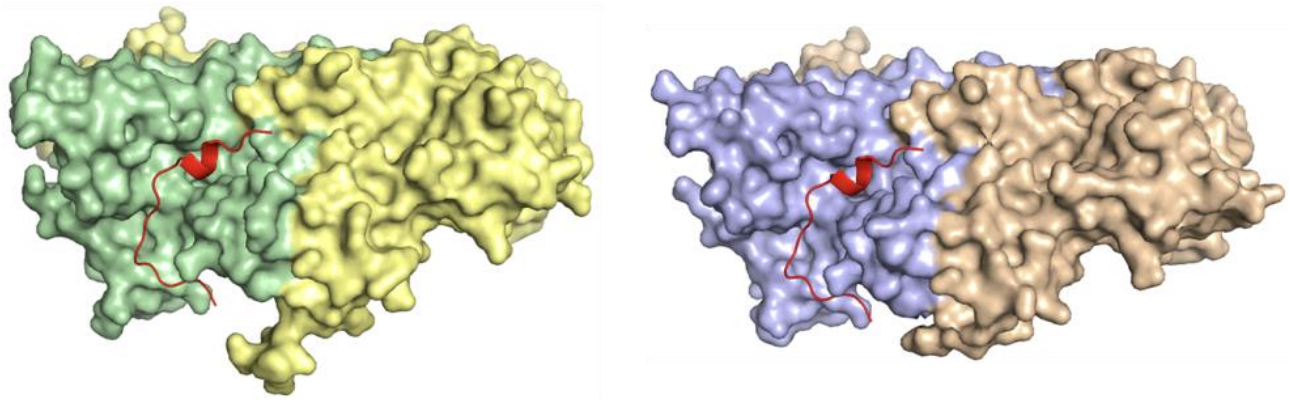

Fig. 1　マウスCPとCIN85 CPIモチーフの複合体結晶構造
左: α1(黄)β2(緑) CIN85 CPI(赤)
右: α2(桃)β2(紫) CIN85 CPI(赤)