

論文の内容の要旨

論文題目 IQGAP1 の actin 認識機構の解明

氏名 梅本 良

[序]

Actin は細胞骨格の一種であり、すべての真核細胞に最も大量に存在するタンパク質として知られている。Actin の機能制御には多くの actin 結合タンパク質 (actin binding protein ; ABP) が関わっており、ABP により actin の重合・脱重合や動態が制御され、細胞の形態変化や細胞の運動が生じる。よって ABP と actin との相互作用を解析することは重要である。

IQGAP1 (IQ-domain GTPase-activating protein 1) は ABP の一つであり、N 末端に actin と直接結合するドメイン (actin binding domain ; ABD) を有する。IQGAP1 は Rac1 や Cdc42 といった Rho GTPase によって活性化され、多量体を形成することにより、actin を架橋して網目状に組織化する (Fig.1 A)。このような IQGAP1 と F-actin との相互作用は IQGAP1 の細胞遊走促進能に必須であることが示されている。

多くの ABP には、CH (calponin homology) domain とよばれる約 100 残基のドメインが共通して見出されている。Fimbrin や α -actinin などの actin 架橋タンパク質は複数の CH domain からなるのに対し、IQGAP1 の ABD は単独の CH domain と N, C 末端の extension 領域から構成される (Fig.1 B)。複数の CH domain からなる F-actin 結合タンパク質に関しては、近年、電子顕微鏡により低分解能ながら複合体構造が提唱されている。しかしながら、単独の CH domain を有する IQGAP1 の ABD の actin 認識様式に関する構造生物学的知見はほとんど得られていないのが現状である。

そこで、本研究においては単独の CH domain を有する IQGAP1 ABD の立体構造を NMR 法によって決定し、さらに F-actin のような巨大かつ不均一な分子にも適用可能な NMR 手法である転移交差飽和 (Transferred Cross Saturation ; TCS) 法を用いて ABD 上の F-actin 結合界面を同定したのでここに報告する。

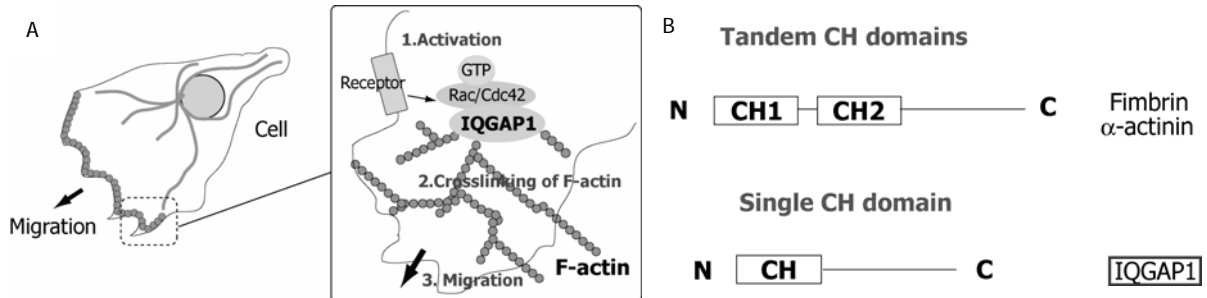


Fig.1 細胞運動における IQGAP1 の機能および CH domain ファミリータンパク質の模式図

A: 細胞の極性を持った運動において、IQGAP1 は F-actin を網目状に組織化することにより、細胞遊走を促進する。
B: CH domain を有するタンパク質の例。Fimbrin や α -actinin は複数の、IQGAP1 は単独の CH domain を有する。

[結果]

ABD の調製法の確立、性状解析および NMR による立体構造決定 (Ref.1)

ABD に関しては F-actin 結合活性が報告されている ABD(1-210) およびトリプシン限定分解実験に基づき N 末端の構造非形成領域を除去した ABD(26-210) のコンストラクトを構築した。両コンストラクトともに、大腸菌により大量発現させ、精製したものを後の解析に用いた。両者がほぼ同等の F-actin 結合活性を有していることを SPR 実験により確認し、立体構造決定には ABD(26-210) を用いた。各種三重共鳴実験により主鎖・側鎖プロトンの帰属を行った。ついで NOE、二面角、水素結合の情報を収集し、それらを拘束条件として Cyana2.1 による立体構造計算を行った。その結果、得られた 20 構造の構造形成領域の主鎖 RMSD 値は 0.62 ± 0.13 Å、重原子の RMSD 値は 1.09 ± 0.10 Å に収束した。得られた NMR 構造より、ABD は CH domain に共通してみられる 6 本の α -helix およびそれに続く extension 領域からなることが判明した (Fig.2)。この extension 領域はこれまでに複数の CH domain からなる actin 結合タンパク質において F-actin 結合に重要とされている $\alpha 6$ -helix の疎水性残基をマスクしていたことから、ABD の F-actin 認識様式は他の複数の CH domain からなる F-actin 結合タンパク質とは異なるものと考えた。

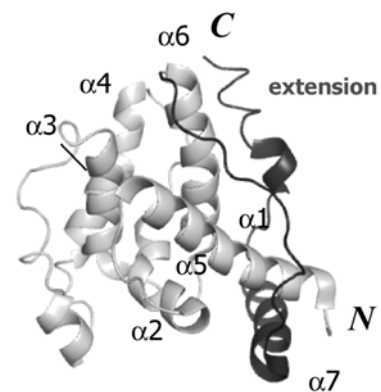


Fig.2 ABD の NMR 構造
Extension 領域を黒にて示した。

NMR 法を用いた ABD と actin との相互作用解析

溶液中において ABD と F-actin との相互作用解析を行うのに先立ち、ABD が F-actin と特異的に相互作用しているか否かについて検証を行った。ABD に対して G-actin および F-actin 滴定し ^1H - ^{15}N HSQC スペクトルを測定した結果、G-actin 滴定時においては ABD のシグナル強度減少がごくわずかであったのに対し、F-actin 滴定時においては ABD は顕著なシグナル強度減少を示した (Fig.3A, B)。このことから、ABD は F-actin を特異的に認識することが示された。

ABD が F-actin と特異的に相互作用することが判明したため、ABD 上の F-actin 結合界面を同定することを目的として ABD - F-actin 間相互作用系に対してアミドおよびメチル検出型の TCS 法を適用した。TCS 法は結合界面に近接した領域にのみ生じる交差飽和現象を利用することで、複合体における結合界面を決定する手法である。アミド検出型 TCS 実験にて 17% 以上、メチル検出型 TCS 実験にて 30% 以上のシグナル強度減少を示した残基を ABD の NMR 構造上にマッピングした。その結果、それらの残基は構造上の片側の面に集中し、特に $\alpha 4$ -helix を中心とした領域に集中していた (Fig.3C)。よってこの領域が ABD 上の F-actin 結合界面であると考えた。

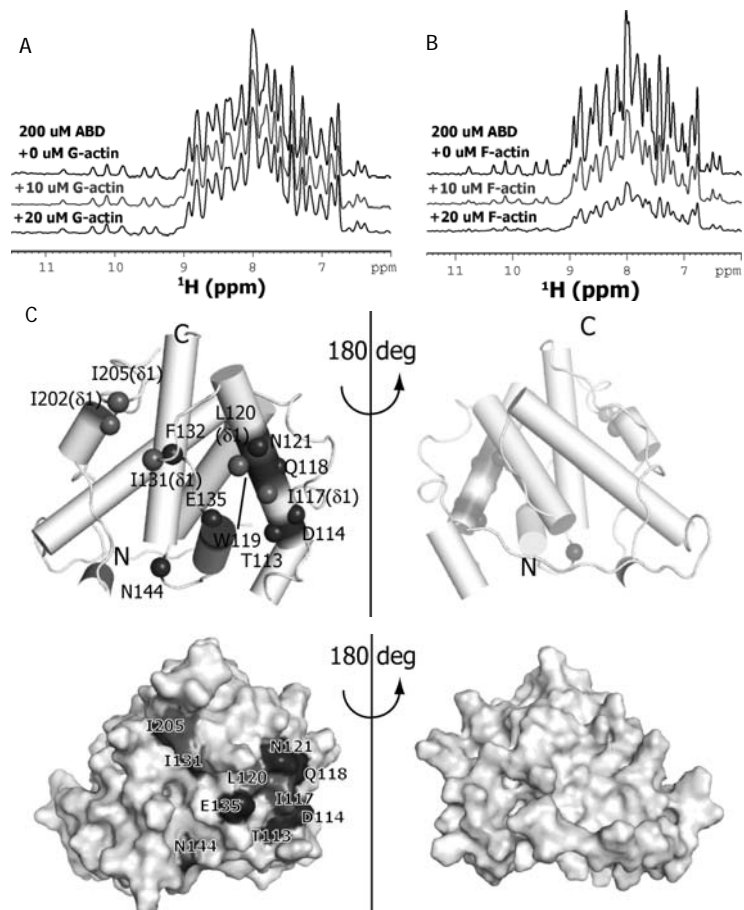


Fig.3 TCS 法による ABD 上の F-actin 結合部位の同定

A, B : G-actin および F-actin 滴定に伴う ABD の NMR シグナル強度減少の比較。C : アミド TCS 実験にて 17% 以上のシグナル強度減少を示した残基 (黒)、メチル TCS 実験にて 30% 以上のシグナル強度減少を示した残基 (グレー) のマッピング。上はリボン図、下は surface 表示。

変異体実験による ABD 上の F-actin 結合に重要な残基の同定

先の TCS 実験より、シグナル強度減少を示した残基のうちどの残基が actin 結合に重要であるかを同定するため、F-actin 結合界面に存在することが示唆された残基に変異を導入し、SPR 実験により F-actin に対する親和性を野生型と比較した。その結果、D114A および Q118A 変異体は顕著に、N121A 変異体は中程度に F-actin に対する親和性が低下したのに対して、I131A 変異体は親和性の低下があまり見られなかった。この結果から $\alpha 4$ -helix に位置する残基が F-actin との相互作用に寄与しており、特に D114 および Q118 が F-actin との相互作用において重要であることが明らかとなった (Fig.4)。

[考察]

NMR による立体構造解析により、IQGAP1 ABD は 6 本の α -helix からなる CH domain とそれに続く extension 領域からなることが明らかとなった。また、TCS 実験により、ABD 上の F-actin 結合界面は主として α 4-helix の残基からなることがわかった。さらに変異体実験により α 4-helix の残基が F-actin 結合に寄与しており、特に D114 および Q118 が F-actin 認識に重要であることが判明した。

複数の CH domain からなる α -actinin と F-actin との複合体構造 (PDB code : 3LUE) 中の α -actinin に対して IQGAP1 ABD の立体構造を重ね合わせた結果、ABD は extension 領域に対応する部位にて actin 分子とクラッシュし、両者が同様の F-actin 認識様式を示すことは不可能であることが判明した。このことから、IQGAP1 の ABD は複数の CH domain を有する他の F-actin 結合タンパク質とは異なる相互作用様式にて F-actin と結合すると考えた。この相互作用様式により、IQGAP1 と α -actinin が共存する環境において、F-actin が α -actinin により束化され、IQGAP1 により網目状に組織化される際に両者が F-actin 上において競合せずに、効率よく F-actin の高次構造形成が達成されると考えた。

[参考文献]

1. Umemoto et al. *J. Biomol. NMR* 48 (2010) 59-64

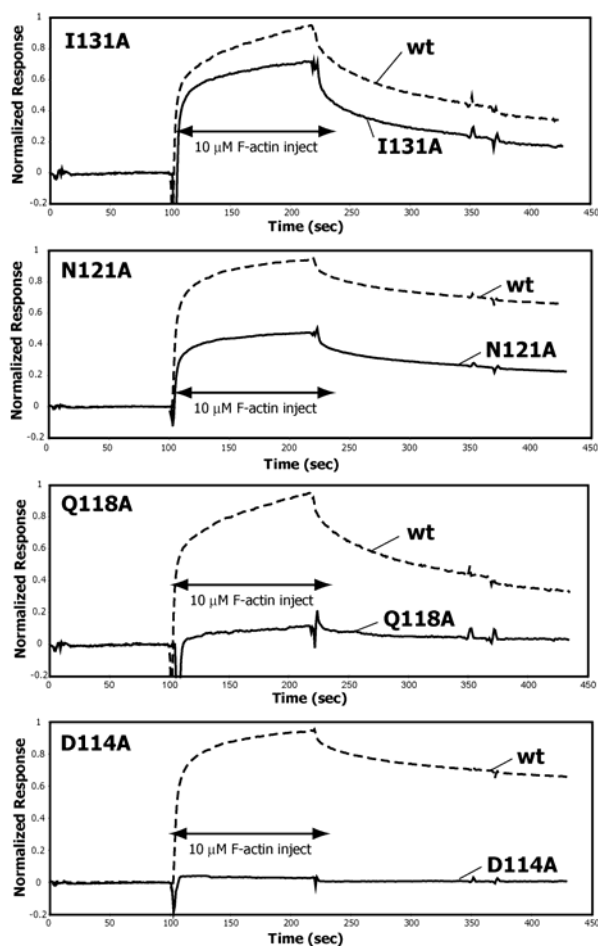


Fig.4 SPR 実験において観測された F-actin のインジェクションに伴うセンサーグラムの上昇の比較

野生型 (破線) および変異体 (実線) を同程度チップ上に固定化し、図中を示す濃度の F-actin をアプライした。野生型におけるセンサーグラムの上昇を 1 として規格化し、変異体と比較した。