

受賞者

三島 正規

首都大学東京 大学院 理工学研究科

## 研究テーマ

p150と CLIP-170の相互作用によるdynactinの微小管へのリクルートの構造基盤

### 1. はじめに

蛋白質複合体 dynactin は神経細胞において微小管を使った軸索輸送に関与している。Dynactin のサブユニットである p150 は CLIP-170 の C 末端領域との相互作用を介して微小管へ結合することで dynactin を微小管上にリクルートする。本研究では微小管プラス端に濃縮される蛋白質 CLIP-170 の C 末端領域と、CAP-Gly ドメイン (p150、CLIP-170) の複合体の立体構造解析を行い、CLIP-170 による微小管へのリクルート機構を構造的基盤に基づき明らかにする。

p150 は筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の原因遺伝子の一つであることから、本研究は ALS の病態解明への手がかりを与えることが期待でき、医学的観点からも興味深い。

解析技術上の問題として、CLIP-170のC末端領域とCAP-Glyドメインの相互作用が比較的弱い点がある。このような相互作用が弱い系では結晶化が困難と考えられる。本研究では多次元NMR法を用いて溶液中で解析することにより、弱い相互作用に支配されるCLIP-170のC末端領域とCAP-Glyドメインとの相互作用を解析し、さらにCLIP-170のC末端領域とCAP-Glyドメイン (p150、CLIP-170) 複合体の立体構造を決定することを目的とした。申請者は過去にCLIP-170のN末端領域と $\gamma$ -tubulinのC末端領域の複合体の立体構造決定に成功している(1)。この系でもCLIP-170と $\gamma$ -tubulinの相互作用は弱く、CLIP-170の $\gamma$ -tubulin部位結合部位が結晶のpackingによりマスクされていたため複合体結晶の作成が難航していたが、NMRを用いて溶液中で解析することにより世界に先駆けて構造決定に至っている。本研究では、弱い相互作用を追跡するため、多次元NMRによる常磁性緩和効果の観測も試みた。

### 2. 方法

#### (試料調製)

大腸菌の発現系を用いて NMR 測定のために非標識、 $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$  安定同位体標識した CLIP-170 の C 末端領域、CLIP-170 の CAP-Gly ドメイン、p150 の CAP-Gly ドメインを調製した。CLIP-170 の C 末端領域はさらに Helical サブドメイン、Zn-knuckle1、Zn-knuckle2 からなり、それぞれの部分と、その組み合わせの発現系を構築した。

#### (NMR 測定)

2次元  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ HSQC、3次元 HNCACB、HN(CO)CACB、HN(CA)CO、HNCO等の測定を行い、試料のNMR信号の帰属を行った。

#### (脂質との相互作用)

PIP-stripsを用いて、CAP-Glyドメインと各種イノシトールリン脂質との相互作用を調べた。

### 3. 結果

p 150のCAP-GlyとCLIP-170のC末端領域(Zn-knucle2)の複合体の構造解析が、本研究開始直後に他のグループによって報告されたので(2)(3)、申請者はp 150のCAP-GlyとCLIP-170のC末端領域の解析を特に集中して行った。 $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ 安定同位体ラベルしたCLIP-170のC末端領域を大量に調製し、多次元NMRを測定することで、主鎖アミドの信号の帰属に成功した(図1)。NMR信号の帰属に基づいて、CLIP-170のC末端領域のNMR信号の変化をCAP-Glyドメインの添加に対して追跡することで、CLIP-170のC末端領域におけるCAP-Glyドメインの結合サイトを実験的に同定することに世界ではじめて成功した(図2)。その結果、カルボキシル末端とZn-knucle2が主な相互作用部位であるが、Zn-knucle1も補助的に相互作用していることが明らかになった。

さらに研究の過程で、CLIP-170がフォスファチジルイノシトールと相互作用し、その相互作用部位は、CLIP-170のC末端領域の最C末端が相互作用する部位とオーバーラップしていることを明らかにした。これはCLIP-170の機能を考える上で大変興味深い。さらに蛋白質科学の観点から新規な脂質結合ドメインの発見として貴重な知見である。

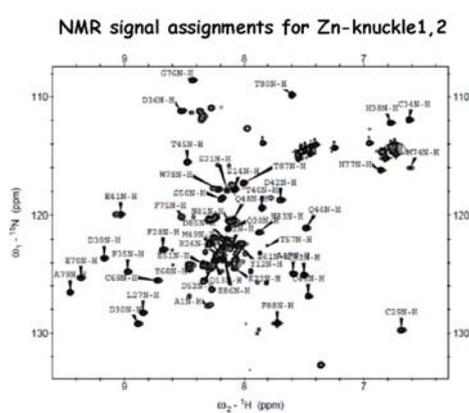


図1  
Zn-knucle の  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC スペクトル。帰属を示す。

NMR spectra of Zn-knucle alone or in complex with CAP-Gly

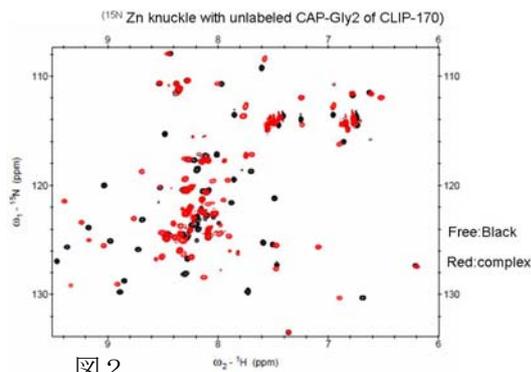


図2  
Zn-knucle のみ(黒)と CAP-Gly ドメインとの複合体 (赤) の  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC スペクトル

### 4. まとめ

CLIP-170のC末端領域とCAP-Glyドメインの相互作用の解析に成功し、その詳細に関する知見を得た。立体構造解析も進行中である。常時性緩和効果はテスト試料での測定に成功した。また、新たにCLIP-170のCAP-Glyドメインが新規なリン脂質相互作用ドメインであることを見出した。

### 5. 参考文献

- (1) Mishima M. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 10346-10351 (2007)
- (2) Weisbrich A. *et al.*: *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **14**, 959-967 (2007)
- (3) Hayashi, I., Plevin, M. J., Ikura, M.: *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **14**, 980-981 (2007)

### 6. 発表論文、

[1]前崎綾子・三島正規・箱嶋敏雄 「微小管ダイナミクスを制御する蛋白質の構造研究」  
蛋白質核酸酵素 2008年 2月号 Vol.53 No.2