

氏名(本籍)	桑田 弘美 (福井県)
学位の種類	博士(医学)
学位授与番号	甲第 667 号
学位授与日付	平成 18 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学位論文題目	Structural and Functional Characterization of NP25, a Single CH Domain Protein
審査委員	(主査) 教授 岡野 幸雄 (副査) 教授 近藤 直実 教授 恵良 聖一

論文内容の要旨

はじめに

カルポニン¹は、筋収縮において重要な役割を果たすアクチン結合タンパク質で、SM22 α やMP20とともにカルポニンファミリーを形成する。NP25は、高度に分化した中枢神経系でのみ発現するカルポニンファミリータンパク質である。その発現パターンは、神経系における特異的な機能を担っていることを示唆しているが、必ずしも十分解明されていない。

我々は、NP25とFアクチンが相互作用することをアクチン共沈アッセイと蛍光共鳴エネルギー移動法 (FRET) によって証明し、神経の分化に伴って発現が増加することも明らかにしてきた。Fアクチンはストレスファイバーの形成や分化に関係し、細胞内におけるアクチンのダイナミックな変化はいろいろなアクチン結合タンパク質によって制御されている。したがって、NP25のアクチン結合能はストレスファイバーの形成制御や神経細胞の分化に関与することが強く示唆される。これらのことから、NP25とFアクチンの相互作用の研究は、NP25の生物学的機能の解明に重要な手がかりを与えられられる。しかし、NP25の3次元立体構造やFアクチン結合のメカニズムを調べた研究は今までなかった。我々は、NP25の立体構造の特徴を円偏光二色性スペクトル、ホモロジーモデリング、アクチン共沈法、多重配列解析を用いて調べ、NP25がアクチンと相互作用する分子メカニズムを調べた。

試料と方法

NP25の野生型及び3種の欠失変異タンパク質は、対応するcDNAsを発現ベクターに構築し、大腸菌に発現させたGST融合タンパク質から、glutathione beadsによる回収、Factor Xaによる切断の後精製した。精製タンパク質を用いてNP25のFアクチンに対する結合能をアクチン共沈法により調べた。2次構造は、Aviv202CDスペクトロメータでスペクトルを測定し、プログラムk2dを用いて解析した。N末側領域のホモロジーモデリングは、ソフトウェアICM3.0を用いて行った。アクチン結合部位を比較するための多重配列アラインメントは、Clustal Wを用いた。NP25のC末側ループ構造のモデリングは、Insight IIを用いた。分子表面のポテンシャルは、MOLMOLを用いて計算した。

結果

2次構造

精製された野生型NP25のCDスペクトル測定により、NP25が明らかに高い α ヘリックス含量を示し、典型的な α ヘリックスタンパク質としての特徴を有することが明らかとなった。

N末側部分の構造

NP25のN末側領域 (27-134) はカルボニンホモロジドメイン (CHD) と相同性が高く、この部分の構造は、球状でコンパクトであり、4つの α ヘリックス (I, III, IVとVI) からなり、それらは2つの短いヘリックス (IIとV) をもつ長いループによって接続されていた。NP25のN末側の3次元構造は本質的にCHDと同じであるが、分子表面はほとんど一様に正電荷で占められており、正と負の両方の荷電をもつCHDとはこの点で異なっていた。C末側 (135-199) のモデリングはできなかった。

アクチン共沈法

NP25の Δ 153-199変異体は沈渣にほとんど検出できず、この欠失部位がアクチンとの結合に重要であることがわかった。また、 Δ 153-160あるいは Δ 173-199変異体が弱いながらも沈渣に認められ、これらの変異体がアクチンと相互作用することを示した。 Δ 153-160変異体は Δ 173-199より弱いシグナルを示したことから、153-160の配列がアクチンと相互作用するうえで重要なサイトであることが明らかとなった。

C末側部分とアクチン結合サイトの構造

NP25はミオシンのS1ドメインと低いながらも類似性 (15.6%) を示す。ホモロジーモデリングによる詳細な解析を行うと、NP25のFアクチン結合部位はミオシンと同様のヘリックスループ-ヘリックス構造を有していることが明らかとなった。

考察

NP25のN末端の半分は、コンパクトな4本のヘリックス (I, III, IV, VI) からなり、本質的に単一CHDタンパク質のCHDに一致するが、カルボニンのCHDが正と負の両方の荷電をもつものに対し、NP25の表面は本質的に正の荷電によって覆われている。NP25のこの特徴的な構造は、NP25とカルボニンの間の生物学的機能の差異を示唆する。

ABD (actin-binding domain) タンパク質にある多様なCHDが、強いFアクチン結合能力をもつことが明らかにされているが、カルボニンのような単一CHDタンパク質中のCHDは、Fアクチン結合には不十分である。このため、単一CHDタンパク質はCHDの外側にアクチン結合サイトを有すると考えられる。アクチン共沈法分析により、NP25のアクチン結合サイトが153-199の間、特に153-160に位置しており、NP25のCHDの外側にあることが明らかとなった。

ホモロジーモデリング解析の中で、NP25中の153-160は、ミオシンサブフラグメントの546-554残基に類似し、この部位はX線結晶解析により、アクチン結合サイトを形成することが分かっている。またこの部位は、C末端部位にあり、特徴的なヘリックスループ-ヘリックス構造をもつ (516-542ヘリックス, 543-546ループ, 547-558ヘリックス)。このことからNP25とアクチンの相互作用様式もまた、局所的にミオシンとアクチンの相互作用に似ていることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

申請者 桑田弘美は、神経特異的タンパク質NP25とアクチンとの相互作用について解析し、アクチンとの相互作用に重要なアミノ酸配列を決定し、その立体構造を予測した。本研究は、細胞生物学の進歩に少なからず寄与するものと考えられる。

[主論文公表誌]

Structural and Functional Characterization of NP25, a Single CH Domain Protein

Acta Sch Med Univ Gifu 54, 1-7 (2006).