

144. 癌細胞の浸潤促進因子 Tiam1/2 の構造生物学

寺脇 慎一

Key words : 浸潤, 転移, Rho GTPase,
グアニンヌクレオチド交換因子

群馬大学 大学院理工学研究院
分子科学部門 構造生物学研究室

緒 言

低分子量 G タンパク質 Rho ファミリーは、時空間的な細胞骨格の動態を制御するシグナル伝達の中心に位置し、細胞接着、細胞の癌化、神経軸索の伸長および上皮細胞の極性の維持などに重要な役割を担っている。Rho は、GTP と結合した活性化型と GDP と結合した不活性化型の 2 つの状態をとり、GTP 結合型で下流シグナルを伝達するエフェクターと結合する。GDP 結合型から GTP 結合型への活性化は、グアニンヌクレオチド交換因子 (GEF) と呼ばれるタンパク質群が担っている。GEF は、Rho と直接結合して、GDP の解離反応を促進する Dbl Homology (DH) ドメインとその C 末端に続く Pleckstrin Homology (PH) ドメインの 2 つのタンデムな機能領域を共通に持つが、それぞれ多様な上流シグナルを受容して活性化する特有の機能を持つことが報告されている。T-lymphoma invasion and metastasis 1 (Tiam1) は、Rho ファミリーの Rac を特異的に活性化する GEF であり、ラッフル膜を誘導して細胞運動を活性化する癌細胞の浸潤、転移に関わる因子として注目された¹⁾。Tiam1 の C 末端には、GEF 活性をもつ DH-PH ドメインがあり、これに加えて、N 末端には、もう一つの PH ドメインとそれに続く C 末端に Coiled-Coil (CC) と Extra region (Ex) と呼ばれる領域からなる特徴的な PH-CC-Ex 領域を持つ²⁾。興味深いことに、Tiam1 が、GEF 活性を発揮するためには、DH-PH 領域だけでなく PH-CC-Ex 領域を介した細胞膜への局在化が必要である^{3,4)}。これまでに我々は、Tiam1 および Tiam2 の PH-CC-Ex 領域の X 線結晶構造解析を行い、PH-CC-Ex 領域がそれぞれ独立したドメインを形成しつつ、それらが会合して一つの機能ドメインを形成していることを報告している⁵⁾。我々はこれを、PHCCEx ドメインと命名したが、この機能ドメインがどのようにして細胞膜近傍の標的分子を認識しているのかは明らかにできていない。そこで本研究では、Tiam1 およびホモログの Tiam2 が、標的分子の一つである Par3 を認識して特異的な細胞膜領域に局在化する分子機構を理解するために、Tiam1/2-Par3 複合体の X 線結晶構造解析による立体構造の決定を試みた。

方 法

1. タンパク質試料の調製

本研究では、複合体形成に関与する Tiam1 PHCCEx ドメイン (432-671 残基)、Tiam2 PHCCEx ドメイン (500-757 残基) と Par3 の PHCCEx ドメイン結合領域を含む (919-971 残基) をベクター pET49b および pGEX6P-3 に組み込み BL21 (DE3) star を用いて発現させた。Tiam1、Tiam2 および Par3 を発現した菌体を超音波破碎し、アフィニティークロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィーを用いて精製した。精製したタンパク質を混合し限外ろ過濃縮を行うことで Tiam1-Par3 複合体と Tiam2-Par3 複合体試料を調製した。

2. 結晶化

結晶化は、市販のスクリーニングキット (ハンフプトン社、エメラルドバイオストラクチャー社) を利用して、シッピングドロップ蒸気拡散法による結晶化スクリーニングを実施した。結晶化ドロップはタンパク質溶液 1 μ L と結晶化溶液 1 μ L を結晶化プレート上で混合した。結晶化が確認された条件については、蛋白質濃度、沈殿剤濃度、pH の検討に加えて、添加剤 (塩、界面活性剤等) のスクリーニングを行い、0.1 mm 角程度の結晶を得ることを目標に最

適化を試みた。また、得られた結晶を結晶化母液で洗浄し、その後、SDS-PAGE に供することによって結晶組成の確認を行った。

結果

調製した Tiam1-Par3 複合体または Tiam2-Par3 複合体の試料を用いて、結晶化スクリーニングを行った結果、写真に示す結晶が観察された (図 1A, 1B)。2種類の結晶はともに高分子量のポリエチレングリコールを沈殿剤とする条件下で析出したが、結晶化剤の pH, 含まれる塩類や添加剤などは共通のものではなかった。得られた結晶を SDS-PAGE に供することによって、組成分析を行った結果、このうちの一つの結晶については、Tiam2-Par3 複合体の結晶であることがわかった (図 1C)。

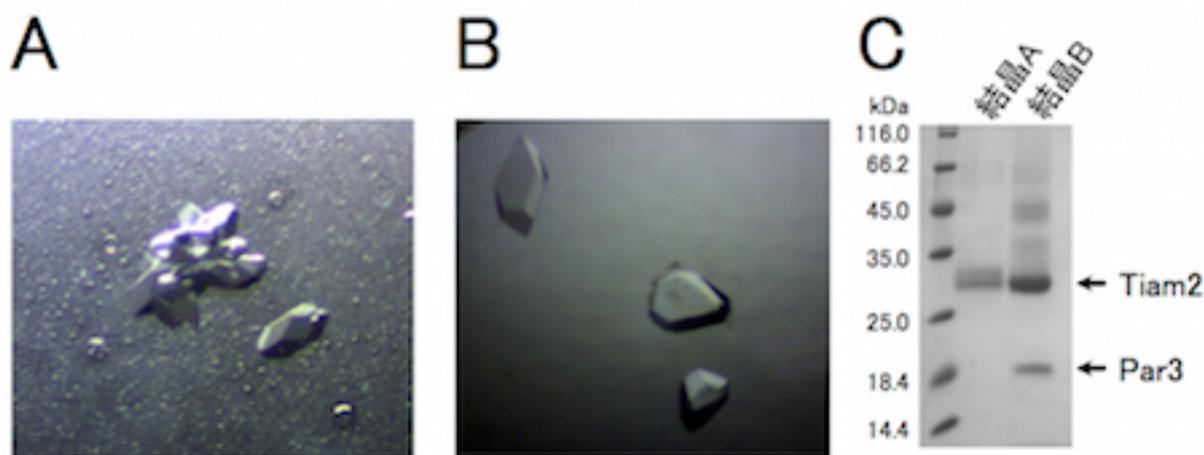


図 1. Tiam2-Par3 複合体の結晶。

A, B) Tiam2-Par3 複合体の結晶。C) 得られた Tiam2-Par3 複合体の結晶を SDS-PAGE による分析結果。結晶 A は、Par3 が検出されなかったことから、Tiam2 単独の結晶であった。一方で、結晶 B は、Tiam2 と Par3 のそれぞれが検出されたことから、複合体の結晶であることがわかった。

考察

Tiam1 と Tiam2 の PHCCEx ドメインの相同性は、およそ 60% であり、結晶化実験においてそれぞれ異なる形状で結晶化する。これは Par3 との複合体の結晶化実験においても同様であり、Tiam1-Par3 複合体の結晶化実験では、針状結晶が多数の条件下で観察されたが、SDS-PAGE による組成分析においては、複合体と確認できるものは得られなかった。Tiam1 と Tiam2 の結晶化における特性の違いは、それぞれの分子表面の違いを反映していると思われる。これまでに比較的低濃度条件下における溶液中での会合状態は、超遠心分析によって単量体であることを確認しているが⁵⁾、細胞の膜近傍で、オリゴマーを形成している可能性は否定できていない。今後、Par3 などの相互作用分子との複合体形成によって、PHCCEx ドメインの会合特性に変化が見られるかどうかを検討することは、細胞膜近傍における Rho ファミリーの活性化機構を理解する上で有用な知見となると考えられる。したがって、本研究のさらなる進展は、Tiam1/2 と Par3 との相互作用に加えて、Tiam1/2 PHCCEx ドメインの会合状態を原子レベルで検証可能なモデルを与えることから極めて重要である。

文 献

- 1) Habets, G. G., Scholtes, E. H., Zuydgeest, D., van der Kammen, R. A., Stam, J. C., Berns, A. & Collard, J. G. : Identification of an invasion-inducing gene, Tiam-1, that encodes a protein with homology to GDP-GTP exchangers for Rho-like proteins. *Cell*, **77** : 537-549, 1994.
- 2) Mertens, A. E., Roovers, R. C. & Collard, J. G. : Regulation of Tiam1-Rac signalling. *FEBS Lett.*, **546** : 11-16, 2003.
- 3) Michiels, F., Stam, J. C., Hordijk, P. L., van der Kammen, R. A., Stalle, L. R., Feltkamp, C. A. & Collard, J. G. : Regulated membrane localization of Tiam1, mediated by the NH2-terminal pleckstrin homology domain, is required for Rac-dependent membrane ruffling and C-Jun NH2-terminal kinase activation. *J. Cell Biol.*, **137** : 387-398, 1997.
- 4) Stam, J. C., Sander, E. E., Michiels, F., van Leeuwen, F. N., Kain, H. E., van der Kammen, R. A. & Collard, J. G. : Targeting of Tiam1 to the plasma membrane requires the cooperative function of the N-terminal pleckstrin homology domain and an adjacent protein interaction domain. *J. Biol. Chem.*, **272** : 28447-28454, 1997.
- 5) Terawaki, S., Kitano, K., Mori, T., Zhai, Y., Higuchi, Y., Itoh, N., Watanabe, T., Kaibuchi, K. & Hakoshima, T. : The PHCCEX domain of Tiam1/2 is a novel protein- and membrane-binding module, *EMBO J.*, **29** : 236-250, 2010.