

論 文 内 容 要 旨

題目 Actin Cytoskeletal Reorganization Function of JRAB/MICAL-L2 Is Fine-tuned by Intramolecular Interaction between First LIM Zinc Finger and C-terminal Coiled-coil Domains

(分子内結合が調節する JRAB の LIM ドメインによるアクチン細胞骨格の再編成)

著者 Kazuhisa Miyake, Ayuko Sakane, Yuko Tsuchiya, Ikuko Sagawa, Yoko Tomida, Jiro Kasahara, Issei Imoto, Shio Watanabe, Daisuke Higo, Kenji Mizuguchi, and Takuya Sasaki

令和元年 9 月 5 日発行 Scientific Reports 第 9 巻第 1 号
12794 ページに発表済

内容要旨

Junctional Rab13-binding protein (JRAB)は、Rab ファミリー低分子量 G 蛋白質のメンバーである Rab13 の標的蛋白質として同定された。JRAB は、N 末端側に calponin-homologyドメインと LIMドメイン、C 末端側に coiled-coil(CC)ドメインを持つマルチドメイン蛋白質である。また、JRAB は、LIMドメインと CCドメインで分子内結合して closed form をとり、Rab13 との結合によって open form へと構造を変化させる。さらに、open form、closed form の JRAB は、細胞内において各々異なるアクチン細胞骨格の再編成を示すことが明らかになっている。本研究では、構造変化とアクチン細胞骨格制御のいずれにも関与する LIM ドメインに注目し、JRAB の構造変化が多彩なアクチン細胞骨格の再編成を生み出す仕組みを明らかにすることを試みた。

まず、LIMドメインは、2つの zinc fingerドメイン(ZF)から構成されるが、今回、一つ目の ZF(ZF1)に含まれる領域(189-207アミノ酸)が、C 末端との結合に関わっていることを水素・重水素交換質量分析法により見出し、実際に ZF1 の欠損変異体を用いた生化学的解析で証明した。

さらに、ZF1 と CCドメインの分子内結合に関わるアミノ酸をドッキングシミュレーションにより予測するとともに、その変異体を用いた生化学実験により、CCドメインの 884M、887W、895Q、898Lと ZF1 の 197L、198V、200R が分子内結合に関与することを証明した。また、その結果を基に JRAB-C-LIM 複合体モデルを作成するとともに複数の類

様式(8)

似複合体の構造を基にホモロジーモデリングを行って JRAB-C-Rab13 複合体モデルを作成したところ、JRAB には Rab13 の結合部位が2箇所存在し、その一方で LIM と競合して構造変化を引き起こすことが示唆された。

次に、F-actin 共沈降アッセイを用いて LIMドメインと F-actin の相互作用について解析した。JRAB の LIMドメインは、ZF1 と ZF2 の両者を介して F-actin と結合することが明らかになった。さらに、LIMドメインと F-actin のドッキングシミュレーションを行った。得られた複合体モデルの内、LIMドメインが F-actin の脱重合を抑制するという知見に基づいて F-actin の脱重合が起こるマイナス端の2個の G-actin にそれぞれ ZF1 と ZF2 が結合しているモデルに注目し、F-actin との結合に関与する ZF1 と ZF2 のアミノ酸残基の予測を試みた。ZF1 で得られたアミノ酸の候補の一部は C 末端との結合に必要なアミノ酸と共通であった。実際、変異体を用いた実験により、ZF1 は、C 末端と F-actin との結合に共通のアミノ酸残基を用いることで LIMドメインのアクチン細胞骨格制御を調節していることが示唆された。

最後に線維芽細胞の NIH3T3 細胞に JRAB の変異体を発現させ、ZF1ドメインの細胞内でのアクチン細胞骨格への影響を調べた。これまでの報告通り、open form の JRAB は、ストレスファイバーを解除して細胞辺縁でラッフルを形成するが、open form であるが ZF1 を欠損した変異体では、ラッフルの形成が抑制された。これまで、JRAB がラッフルを形成するには、open form の JRAB とアクチン結合蛋白質として知られる filamin との結合が必要であることが明らかになっていたが、今回、ZF1 を欠損して open form になった JRAB 変異体は filamin との結合が認められたことから、open form の JRAB が示すアクチン細胞骨格制御には、JRAB と filamin との結合だけではなく、C 末端から自由になった LIM ドメインも重要な役割を担っていることが本研究で新たに示された。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

報告番号	甲医第 1442 号	氏 名	三宅 一央
審査委員	主査 片桐 豊雅 副査 常山 幸一 副査 富田 江一		

題目 Actin Cytoskeletal Reorganization Function of JRAB/MICAL-L2 Is Fine-tuned by Intramolecular Interaction between First LIM Zinc Finger and C-terminal Coiled-coil Domains

(分子内結合が調節する JRAB の LIM ドメインによるアクチン細胞骨格の再編成)

著者 Kazuhisa Miyake, Ayuko Sakane, Yuko Tsuchiya, Ikuko Sagawa, Yoko Tomida, Jiro Kasahara, Issei Imoto, Shio Watanabe, Daisuke Higo, Kenji Mizuguchi, and Takuya Sasaki
 令和元年9月5日発行 Scientific Reports 第9巻第1号
 article number: 12794 に発表済
 (主任教授 佐々木 卓也)

要旨 Junctional Rab13-binding protein (JRAB)は、LIM ドメインと coiled-coil (CC) ドメインを介した分子内結合によって closed form をとり、Rab ファミリー低分子量 G 蛋白質のメンバーである Rab13 との結合依存的に open form へと構造を変化させる。本論文では、JRAB の LIM ドメインに注目し、JRAB の構造変化と JRAB が制御するアクチン細胞骨格の再編成との関連を明らかにすることを試みた。得られた結果は以下の通りである。

1. JRAB は、その LIM ドメインを構成する 2 つの zinc finger

ドメイン (ZF) の内、1つ目の ZF (ZF1) で C 末端と結合することを水素・重水素交換質量分析法により見出した。

2. ドッキングシミュレーションと変異体を用いた生化学実験により ZF1 と CC ドメインの分子内結合に関わるアミノ酸残基を同定し、類似複合体の構造を基に行ったホモロジーモデリングの結果から JRAB は Rab13 との結合部位を 2 箇所持ち、その内の 1 箇所で LIM ドメインと競合して構造を変化させることが示唆された。
3. F-actin 共沈降アッセイを用いて JRAB の LIM ドメインは、2 つの ZF を介して F-actin と結合することを明らかにした。
4. LIM ドメインと F-actin のドッキングシミュレーションを行い、F-actin との結合に関与する ZF1 のアミノ酸残基の候補の一部が C 末端との結合に必要なアミノ酸と共通であることを予測するとともに、変異体を用いた生化学実験にてその結果を証明した。
5. 細胞辺縁でのラッフル形成における JRAB の ZF1 ドメインの役割を調べた。これまで、JRAB がラッフルを形成するには、open form の JRAB とアクチン結合蛋白質 filamin との結合が必要であることが明らかになっていたが、今回、ZF1 を欠損した open form の変異体は filamin と結合し、ラッフル形成を抑制することが示された。

以上のことから open form の JRAB が示すアクチン細胞骨格の再編成 (ラッフル形成) には LIM ドメインが必要であり、その抑制的な調節には ZF1 ドメインと C 末端との相互作用が関与することが新たに明らかになった。本研究は、医学・生物学的に重要である蛋白質の構造変化と細胞機能の連関を示したものであり、学位授与に値すると判定した。