

はしがき

本報告書は、平成18年度～平成19年度に行った「X線構造による脳ミクログリア特異的タンパク質Iba1のF-アクチン架橋機構の解明」についてまとめたものである。本研究の目的は、ミクログリア活性化におけるIba1の役割について新たな知見を得るため、X線結晶解析を主たる手法として、Iba1のF-アクチンへの結合様式およびIba1のF-アクチン架橋機構を解明することである。その結果、Ca²⁺フリー型Iba1およびCa²⁺結合型Iba1のX線結晶解析に成功し、Iba1のCa²⁺依存的コンフォメーション変化が、これまで報告されてきたEFハンドタンパク質とは全く異なったものであることを明らかにした。さらに、このコンフォメーション変化によって、Iba1がCa²⁺依存的に単量体から2量体へと分子会合状態を変化させる可能性を示した。つまり、Iba1は、Ca²⁺依存的に2量体を形成し、2量体となって、アクチン等のターゲット分子と相互作用する可能性が考えられる。これは、これまでのEFハンドタンパク質には見られない全く新しい現象であり、これが証明されれば、EFハンドタンパク質によるシグナリングに新たな機構を提唱できる。今後、これまで2年間で得られた研究成果に基づき、本研究を継続・発展させていく必要がある。

本研究を遂行するにあたり、日本学術振興会科学研究費補助金の果たした役割は、極めて大きく、ここに改めて感謝する。X線回折データは、高エネルギー加速器研究機構 Photon Factory および (財) 高輝度光科学センターSPring-8において収集した。

本研究には、山田 貢氏 (香川大学大学院医学系研究科博士課程, 現在, 独立行政法人日本原子力研究開発機構博士研究員) による貢献が大きかったことを謝意とともに記しておく。

平成 20 年 5 月 神鳥 成弘

研究組織

- 研究代表者： 神鳥 成弘（香川大学・総合生命科学研究センター・教授）
- 研究分担者： 吉田 裕美（香川大学・総合生命科学研究センター・准教授）
- 研究協力者： 山田 貢（香川大学大学院医学系研究科博士課程，
現在, 独立行政法人日本原子力研究開発機構博士研究員）
- 今井 嘉紀（愛媛大学・医学部・准教授）
- 大澤 圭子（国立精神神経センター・室長）
- 高坂 新一（国立精神神経センター・部長，センター長）

交付決定額（配分額）

（金額単位：千円）

	直接経費	間接経費	合計
平成 18 年度	2,200	0	2,200
平成 19 年度	1,300	390	1,690
総計	3,500	390	3,890

研究発表

(1) 原著論文（研究代表者および研究分担者にはアンダーライン）

1. Yamada, M., Ohsawa, K., Imai, Y., Kohsaka, S. & Kamitori, S. (2006). X-ray structures of the microglia/macrophage-specific protein Iba1 from human and mouse demonstrate novel molecular conformation change induced by calcium-binding. *J. Mol. Biol.* **364**, 449-457.

(2) 学会発表（研究代表者および研究分担者にはアンダーライン）

1. Yamada, M., Yoshida, H., Imai, Y., Ohsawa, K., Kohsaka, S. & Kamitori, S. “X-ray structure of microglia/macrophage-specific protein Iba1 and its binding study to actin and L-fimbrin”, 2006, 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, (Kyoto, Japan)
2. Yamada, M., Yoshida, H., Ohsawa, K., Imai, Y., Kohsaka, S. & Kamitori, S. “Binding modes of microglia-specific EF-hand protein Iba1 with targets deduced from X-ray structures”, 32nd FEBS Congress, July 7 – 12, 2007 (Vienna, Austria)

研究成果による産業権の出願・取得状況

該当なし。

本研究に関わる学位取得

1. 山田 貢

X-ray structures of the microglia/macrophage-specific protein Iba1 from human and mouse demonstrate novel molecular conformation change induced by calcium-binding.

「ヒトおよびマウス由来ミクログリア／マクロファージ特異的蛋白質 Iba1 の X 線結晶解析」

香川大学大学院医学系研究科 博甲第 455 号 博士（医学） 平成 19 年 3 月

研究成果

1. 背景

脳は、神経細胞（ニューロン）とグリア細胞からなる。グリア細胞には、神経細胞を支持するアストロサイト、電氣的絶縁体として神経軸索を取り巻く髓鞘（ミエリン）を形成するオリゴデンドロサイト、常在性免疫細胞であるミクログリアの3種類の細胞がある。長らく、グリア細胞は、神経細胞の支持や神経細胞に栄養を補給するといった補助的な役割を担っていると考えられてきたが、近年、グリア細胞が脳機能維持のために積極的に関与している可能性を示唆する報告がなされるようになってきた。ミクログリアは、免疫担当細胞としてのみならず、神経細胞の保護・機能回復を助けている。感染・炎症などの刺激でミクログリアは活性化され、病変部に集積するため形態変化・遊走能を獲得し、殺菌能・貪食能（異物を取り込んで処理する機能）を発揮する。ミクログリアの活性化は様々な外的因子により引き起こされるが、その代表的なものがマクロファージ・コロニー刺激因子（M-CSF）である。M-CSFによるシグナル伝達経路を図1に示す。M-CSFがレセプタータンパク質であるFmsに結合すると、シグナルは、ホスファチジルイノシトール-3-キナーゼ（PI3K）からRac（RhoファミリーGタンパク質）へと伝達していき、F-アクチン（アクチンがフィラメント状に重合したもの）が架橋することにより細胞骨格の再構成が起こる。それにともない、細胞表面が大きく振動するようになり（膜ラフリングの形成）、ミクログリアは遊走能、貪食能を持つようになる。

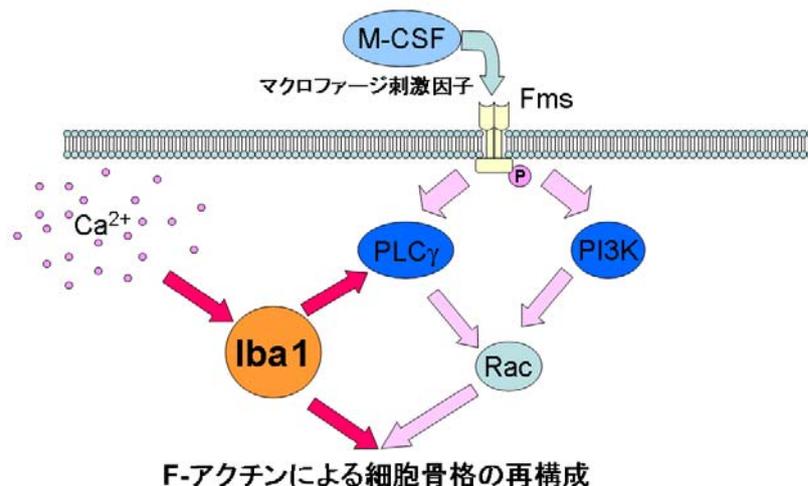


図1. ミクログリア活性化シグナル伝達

国立精神・神経センター神経研究所代謝研究部高坂グループによってクローニングされたミクログリア特異的カルシウム結合タンパク質 Iba1(Ionized calcium binding adaptor molecule 1)は活性化ミクログリアで発現上昇する 147 アミノ酸の新規タンパク質である。Iba1 は、PI3K 経路とは別の経路であるホスホリパーゼ C- γ (PLC γ) を介した新規 Rac シグナル伝達系で機能することが現在までに明らかになっている。しかしながら、同時に、Iba1 が F-アクチンとともに集積することが観察され、Iba1 の F-アクチンに対する直接の結合能・架橋能が示された。このことは、Iba1 がミクログリア活性化においてシグナル伝達に関与するだけでなく、F-アクチン架橋に直接関与している可能性を示唆している (図 2)。

さらに、最近、F-アクチン架橋能を有するフィンプリンに対しても、Iba1 が結合し、フィンプリンの F-アクチン架橋能を高めることが明らかとなった。以上のことから、Iba1 は、生来的に多くの機能を持ち、ミクログリア活性化において、周囲の環境に応じて様々な機能を発揮しているマルチタレントなタンパク質である可能性が考えられる。

本研究の目的は、X線結晶解析を主たる手法として、Iba1 の F-アクチンおよびフィンプリンへの結合様式、Iba1 の F-アクチン架橋機構、Iba1 によるフィンプリンの F-アクチン架橋能増幅機構等について新たな知見を得ることである。今回、ヒト Iba1 およびマウス Iba1 の X 線結晶解析に成功したので、その結果を報告する。

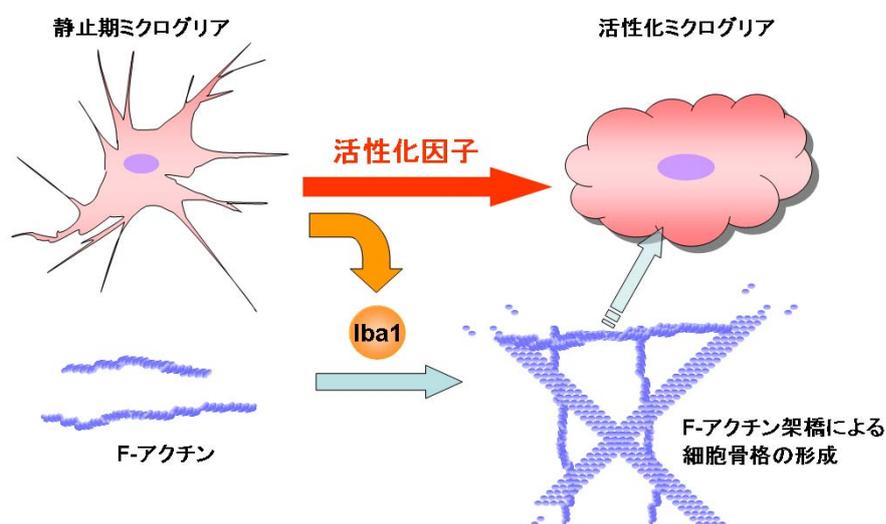


図 2. F-アクチン架橋による細胞骨格の形成

2. 実験

GST 融合 Iba1 は、大腸菌で大量に発現することから、結晶化に適した高等動物由来のタンパク質である。結晶化は、ハンギングドロップ蒸気拡散法により行った。リザーバー溶液の条件は以下の通りである。ヒト Iba1 (H-Iba1) : 20 % (w/v) polyethylene glycol 4,000, 10 % (w/v) 2-propanol, and 0.01 M NiCl₂ in 100 mM of Tris-HCl (pH 7.3), マウス Iba1 (M-Iba1) : 1.4 M sodium citrate in 100 mM HEPES-Na (pH 7.5)。マウス Iba1 については、Au 重原子誘導体を用いた MAD 法により初期位相を得て、分解能 2.1 Å, R-factor = 21 % の構造を決定した (PDB code 1WY9)。ヒト Iba1 については、マウス Iba1 の約 60 % の構造をモデルとした分子置換法により初期位相を決定し、PDB に登録した (PDB code 2D58)。表 1 および表 2 に Data collection statistics と Refinement statistics をそれぞれ示す。ヒト Iba1 およびマウス Iba1 とも Lys17~Met123 までが電子密度マップに現れており、プロテアーゼ処理に使用したトロンビンの極微量残余による結晶化中での N 末側および C 末側の加水分解が起こっている可能性がある。実験の詳細については付録 1 および 2 を参照。

表 1. Data collection statistics.

Data set	Au-derivative of M-Iba1		
	Peak	Edge	Remote
Beam line	BL5A (Photon factory, KEK)		
Wavelength (Å)	1.0395	1.0399	1.0409
Temperature (K)	100	100	100
No. of crystals	1		
Resolution (Å)	50.00 – 2.10		
No. of measured refs.	126,516	135,478	128,683
No. of unique refs.	7,079	7,099	7,103
R_{merge}^a	0.117 (0.193) ^b	0.072 (0.152) ^b	0.092 (0.184) ^b
Completeness (%)	96.6 (98.8) ^b	98.9 (98.7) ^b	98.7 (97.3) ^b
$\langle I \rangle / \langle \sigma(I) \rangle$	22.7	32.6	23.6
Space group	$P3_221$		
Cell dimensions			
a (Å) =	44.35	44.39	44.40
b (Å) =	44.35	44.39	44.40
c (Å) =	99.12	99.18	99.20

表1. (つづき)

Data set	Native	
	H-Iba1	M-Iba1
Beam line (Photon factory)	NW12	NW12
Wavelength (Å)	1.0	1.0
Temperature (K)	100	100
No. of crystals	1	1
Resolution (Å)	50-1.90	50-2.07
No. of measured refs.	54,808	49,452
No. of unique refs.	7,585	6,970
R_{merge}^a	0.076 (0.237) ^b	0.068 (0.229) ^b
Completeness (%)	99.6 (96.5) ^b	95.8 (70.5) ^b
$\langle I \rangle / \langle \sigma(I) \rangle$	20.56 (6.56) ^b	26.64 (2.68) ^b
Space group	<i>C</i> 2	<i>P</i> 3 ₂ 21
Cell dimensions		
<i>a</i> (Å) =	60.75	44.06
<i>b</i> (Å) =	36.62	44.06
<i>c</i> (Å) =	44.02	99.14
β (°) =	99.71	

$$^a R_{\text{merge}} = \frac{\sum \sum |I_i - \langle I \rangle|}{\sum \langle I \rangle}$$

^bThe values for the highest resolution shell (Au-derivative of M-Iba1: 2.23 – 2.10, H-Iba1: 1.97 – 1.9, M-Iba1: 2.14 – 2.07 Å) are given in parentheses.

表 2. Refinement statistics

Data set	H-Iba1	M-Iba1
Resolution range (Å)	31 – 1.9	35.6 – 2.1
No. of refs.	7,462	6,506
Completeness (%)	97.4 (90.1) ^a	93.7 (75.3) ^a
R_{crystal}	0.187 (0.249) ^a	0.217 (0.251) ^a
R_{free}	0.201 (0.269) ^a	0.277 (0.332) ^a
r.m.s.d. bond lengths (Å)	0.005	0.006
r.m.s.d. bond angles (°)	1.1	1.1
No. of atoms		
Protein	866	912
Metal	1	1
Solvent molecules	107	53
Average B-factors		
Protein (Å ²)	19.5	38.9
Metal (Å ²)	17.8	36.3
Solvent molecules (Å ²)	29.8	40.9

^aThe values for the highest resolution shell are given in parentheses, (H-Iba1: 2.02 – 1.90 , M-Iba1: 2.23 – 2.10 Å).

3. 結果と考察

(1) 1次構造比較

図3にヒト Iba1 とマウス Iba1 の1次構造アライメントを示す。両者は極めて高い相同性を示している。Iba1 は、2つの Ca^{2+} 結合サイト (EF ハンド) を持ち、その EF ハンド間には、代表的な EF ハンドタンパク質であるカルモジュリンと約 33 % の相同性があるが、それ以外の領域は相同性を示すタンパク質がない。後述するように、3次元構造においても、Iba1 の2つの EF ハンド間の構造は、カルモジュリンや、同じく2つの EF ハンドを持つトロポニン C と類似している。

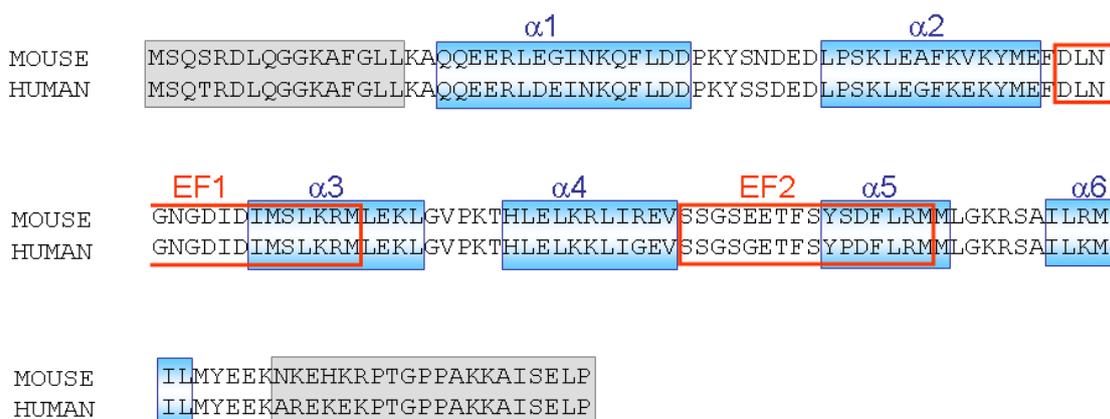


図3. マウス, ヒト Iba1 の1次構造アライメント。青色は α -ヘリックス, グレーは電子密度として見えていない領域を示す。

(2) 全体の構造

図4に、ヒト Iba1 およびマウス Iba1 の全体構造を示す。Iba は6本の α ヘリックスと2本の短い β ストランドからなる1つの小さな β シートを持つ。6本の α ヘリックスは、EFハンドタンパク質の伝統的な命名法に従い、N末端からH-N, H-A, H-B, H-C, H-D, H-Eとする。H-AとH-Bで1つめのEFハンドを、H-CとH-Dで2つめのEFハンドを形成している。2つのEFハンドの間の構造は、カルモジュリンやトロポニンと類似している。しかしながら、 Ca^{2+} 結合において、Iba1は、カルモジュリンやトロポニンとは異なっている。ヒト Iba1 には、結晶化に使用した Ni^{2+} が Asp66 と結合しているが、この位置は分子表面にあって Ca^{2+} 結合サイトとは異なる。一方、マウス Iba1 においては、2つめのEFハンド中のみ Ca^{2+} が結合している。以上のことより、今回決定した構造から、ヒト Iba1 は Ca^{2+} フリーの状態、マウス Iba1 は Ca^{2+} が結合した状態であり、 Ca^{2+} は、Iba1 の2つめのEFハンドにのみを結合すると考えられる。カルモジュリンやトロポニンにおいては、通常、連続する2つのEFハンドには双方ともに Ca^{2+} が結合する。

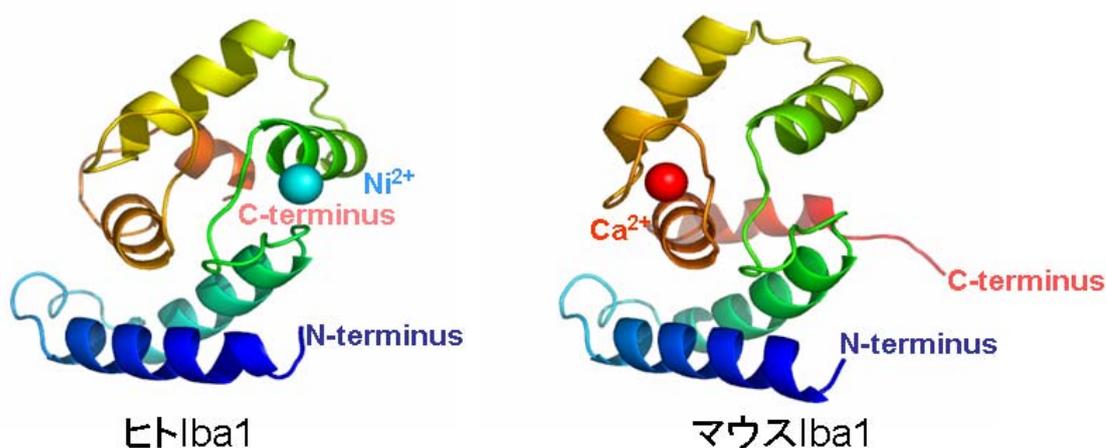


図4. ヒト Iba1 およびマウス Iba1 の全体構造。N 末から C 末へ、青から赤のスペクトルで示す。

(3) Ca^{2+} 結合による分子のコンフォメーション変化

ヒト Iba1 とマウス Iba1 の両者の構造を比較すると、C 末側の α ヘリックス (H-E) の位置が大きく異なっていた (図 5)。ヒト Iba1 においては、H-E は、多くの疎水-疎水相互作用で H-B と H-C との間にしっかりと挟まれている。それに対してマウス Iba1 においては、 Ca^{2+} が結合することにより、H-B と H-C の配置が変化し、H-E との疎水相互作用を維持できなくなり、H-E が分子から遊離するようになる。したがって、Iba1 は、 Ca^{2+} 依存的に、C 末領域が分子から遊離するということが予想され、このことは、ミクログリア活性化における Iba1 の Ca^{2+} 依存的機能と密接に関係していると考えられる。

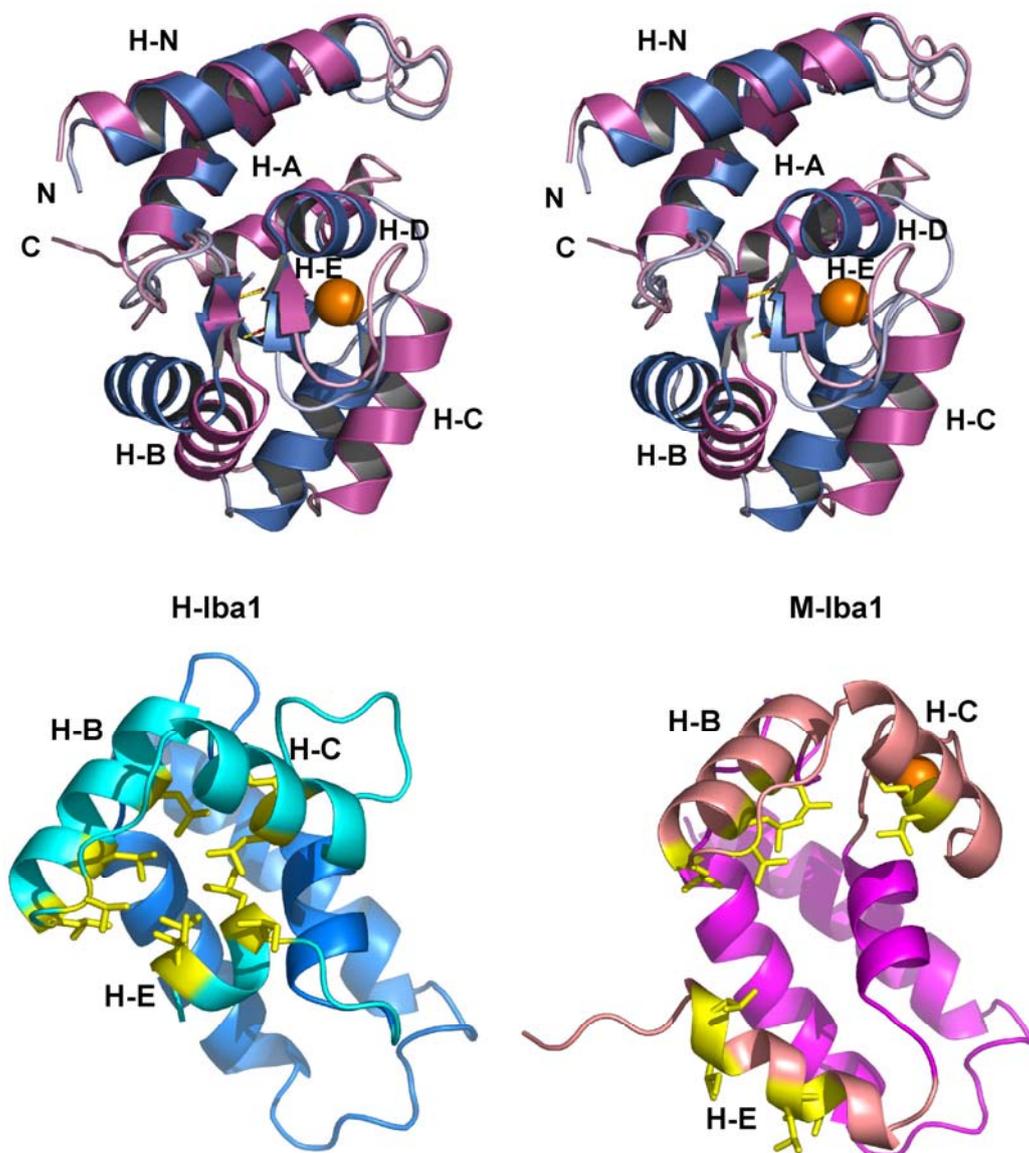


図 5. ヒト Iba1 (青色) とマウス Iba1 (赤紫) の構造の違いを 2 方向から見た図。両者を重ね合わせたステレオ図 (上)。マウス Iba1 の橙色の球は Ca^{2+} を示し、疎水性アミノ酸を黄色で示す (下)。

ヒト Iba1 とマウス Iba1 のコンフォメーションの違いを $\text{C}\alpha$ 原子の変位と主鎖 2 面体角の変化で示す (図 6)。前述のようにヒト Iba1 は Ca^{2+} フリーの状態, マウス Iba1 は Ca^{2+} が結合した状態であるので, 図 6 は Ca^{2+} 結合によるコンフォメーション変化を表している。Ile67-Ser97 および Tyr113 以降に大きな $\text{C}\alpha$ 原子の変位が見られる。前者は H-B-H-C で, 後者は H-E である。H-B-H-C 領域で変位が山型になっているのは結合した Ca^{2+} を中心に, H-B-H-C 領域が回転するように構造が変化していることを示している。2 面体角の変化が Ca^{2+} 結合部位 (Ser97-Thr100) にのみに見られることから, Ca^{2+} 結合が H-B-H-C の構造変化を誘起していることがよくわかる。H-E 領域の大きな変位は, H-E が H-B-H-C から遊離していることを表し, 図 5 から容易に理解できる。H-E の C 末側で, ヘリックス構造が伸長していることが Tyr113 以降の大きな 2 面体角変化に対応している。

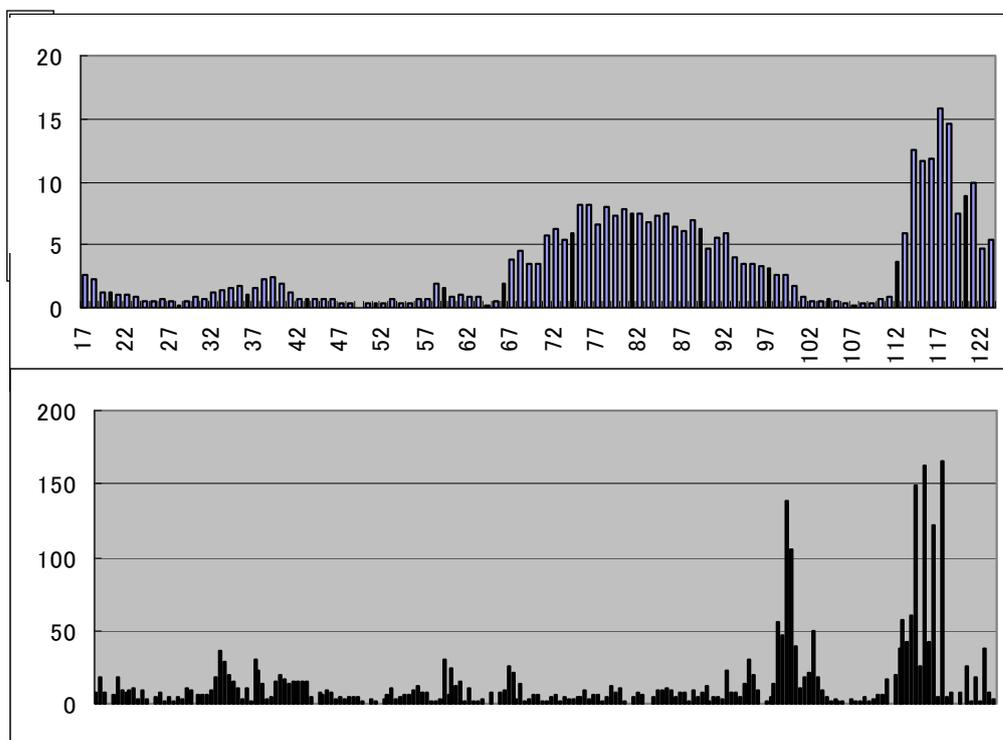


図 6. $\text{C}\alpha$ 原子の変位 (Å) (上) と主鎖 2 面体角 (ϕ , ψ) の変化 ($^{\circ}$) (下)。

(4) Ca^{2+} 結合による2量体形成

すでに述べたように、Iba1は、EFハンドを2つ持つが、2つめのEFハンドにのみ Ca^{2+} が結合する。 Ca^{2+} フリー型と Ca^{2+} 結合型の構造を比較すると、C末側の α -ヘリックス(H-E)の位置が大きく異なっている。 Ca^{2+} フリー型においては、H-Eが、H-BとH-Cとの間に多くの疎水相互作用でしっかりと挟まれている。それに対して Ca^{2+} 結合型においては、 Ca^{2+} 結合により、H-BとH-Cが開くように変化し、H-Eとの疎水相互作用を維持できなくなり、H-Eが分子から遊離するようになる。その結果、H-B、H-C、H-Eの間に大きな疎水溝が露出する。興味深いことに、結晶中では、この疎水溝に別の分子の遊離したH-Eが相補的に入ることにより、2回軸対称を持つ2量体を形成していた。さらに、この2量体は平たい四角柱形をしており、片側の広い面の中心にアルギニン・リシンが多く存在し、特徴的な正電荷の局在が見られた(図7)。

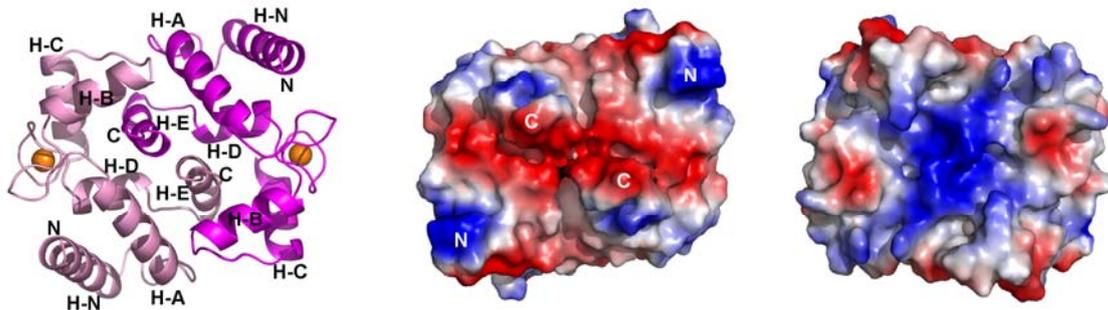


図7. マウス Iba1 の2量体構造。赤色はタンパク質表面の負電荷、青色は正電荷を示す。

以上のことより、 Ca^{2+} 結合によって形成される疎水溝が直接ターゲット分子と相互作用する可能性とともに、2量体を形成してターゲット分子と相互作用するという可能性が考えられる。特に、PLC γ の基質であるホスファチジルセリンやホスファチジルイノシトール4,5リン酸(生体膜構成分子)の内膜に出ている負電荷を持つ部分が、2量体Iba1と静電相互作用できることは興味深く、2量体Iba1が、基質を介して間接的にPLC γ と相互作用していることが予想される(図8)。

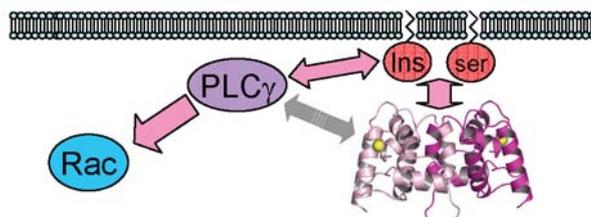


図8. 2量体 Iba1 と膜構成分子、PLC γ との予想される相互作用。

今後の計画

以上、今回行った研究により、Iba1 が Ca^{2+} 依存的に 2 量体を形成するという極めて興味深い現象を明らかにした。これは EF ハンドタンパク質においては初めての例である。今後は、X線結晶解析を主たる手法とし、2 量体 Iba1・ターゲット分子複合体の構造学的研究を展開することにより、Iba1 が生体内において 2 量体で機能していることを証明するとともに、ミクログリア活性化における Iba1 のシグナリング分子機構を解明していきたい。そのため 平成 20-22 年度科学研究費補助金基盤研究 (C) (一般) に「X線構造による脳内新規 EF ハンドタンパク質 Iba1 のシグナリング分子機構の解明」という研究課題で応募し (申請書を付録に収録)、採択内定されている。

付録