

逆行性輸送因子 Bicaudal-D1 の C 末端コイルドコイルの X 線結晶構造解析 X-ray crystallographic analysis of C-terminal Coiled-Coil of retrograde transport regulator, Bicaudal-D1

寺脇慎一*

群馬大学大学院理工学府分子科学部門, 〒376-8515 群馬県桐生市天神町 1-5-1

Shin-ichi Terawaki*

Molecular Science, Graduate School of Science and Technology, Gunma University, 1-5-1 Tenjincho, Kiryu, Gunma, 376-8515, Japan

1 はじめに

Bicaudal-D1 (BICD1) は、835 アミノ酸残基からなる α ヘリカルコイルドコイルタンパク質であり、細胞質ダイニンに特異的な輸送分子を選択的に連結するアクセサリタンパク質としての機能を有する。BICD1 の機能領域は、N 末端のコイルドコイル領域 (CC1 領域) と中央の CC2 領域、そして、C 末端の CC3 領域の 3 つが同定されている。CC1 領域は、細胞質ダイニンと相互作用するが、積荷分子群に結合する C 末端の CC3 領域とも結合して、細胞質ダイニンとの相互作用を抑制した自己阻害状態をとる。この自己阻害状態は、CC3 領域が積荷分子群と結合することで解除され、その結果、BICD1 を介して細胞質ダイニンに積荷分子が連結される。本研究では、BICD1 CC3 領域による積荷分子の認識機構および CC1-CC3 間分子内相互作用による自己阻害の分子機構の解明を目標として、CC3 領域の X 線結晶構造解析をおこなった。

2 実験

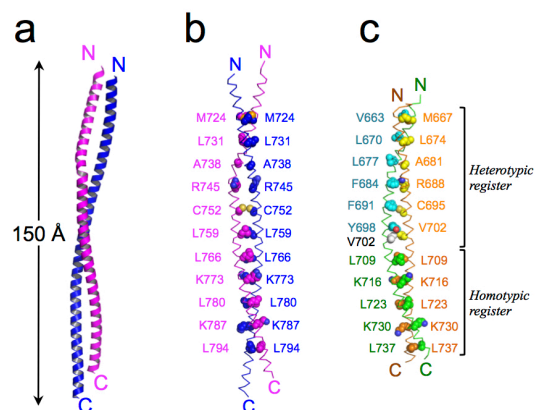
BICD1 CC3 (711-808 残基) を pMAL-c2x ベクターにクローニングし、大腸菌 BL21star (DE3) を利用して MBP 融合タンパク質として発現させた。精製した BICD1 CC3 は、積荷分子の一つである低分子量 G タンパク質 Rab6 の活性化型変異体 (Rab6 Q72L) と複合体を形成させて、MBP タグを切断後、ゲルろ過カラムクロマトグラフィーによって高純度の試料を得た。結晶化は、48% MPD、0.1 M Tris-HCl pH 8.2、0.2 M リン酸アンモニウムを含むリザーバー溶液を利用して、シッティングドロップ蒸気拡散法によっておこなった。得られた結晶について、ビームライン BL-17A において、MPD を抗凍結剤として、低温下 (100K) で回折強度データの収集をおこなった。

3 結果および考察

SDS-PAGE による組成分析の結果、得られた結晶は、Rab6 との複合体ではなく、BICD1 CC3 の単体であった。セレノメチオニン置換体結晶をもちいて X 線回折実験をおこない、多波長異常分散法による位相決定を目的として、Peak、Edge、Remote の三波長での回折データを収集した [1]。以上の回折データを使

用して、BICD1 CC3 の分解能 1.50 Å での構造解析をおこない、分子構造を決定した [2]。

BICD1 CC3 は、非対称単位において、150 Å 長の α ヘリックスが平行に配置して、コイルドコイルホモ 2 量体を形成していた (図 a)。このコイルドコイル構造は、相補的なアミノ酸残基間のロイシンジッパー様相互作用によって形成されている (図 b)。しかし、この構造は、ショウジョウバエの BicD CC3 の N 末端側の異なる残基間で形成されるロイシンジッパー様相互作用 (図 c) を含む構造とは異なっている。BICD1 CC3 では、 α ヘリックス間の相対的な位置関係が、BicD CC3 と比較すると最大で 4 Å のシフトが確認できる。BICD ファミリーは、積荷分子と結合することで、CC3 の構造変化を誘導して CC1 を解離させる可能性が指摘されており、今回の結果は、その仮説を支持するものであると考えられる。



a) BICD1 CC3 の立体構造。b) BICD1 CC3 のコイルドコイルを形成に関与する残基。c) BicD CC3 のコイルドコイルを形成に関与する残基

謝辞

PF のビームラインスタッフの方々には大変お世話になりました。深く感謝いたします。

参考文献

- [1] S. Terawaki *et al.*, *Acta Crystallogr F Struct Biol Commun.* 70 1103-1106 (2014)
- [2] S. Terawaki *et al.*, *Biochem Biophys Res Commun.* 460 451-456 (2015)

*terawaki@gunma-u.ac.jp