

所 属 (主指導教官)	生体高分子構造学講座 (箱嶋 敏雄 教授)		
氏 名	浜田 恵輔	提 出	平成13年 1月 9日
題 目	X-ray structural studies of the radixin FERM domain: The interactions with membranes and adhesion proteins. (RadixinのFERMドメインのX線構造研究：細胞膜・細胞 接着分子との相互作用)		
<p>要旨</p> <p>Radixin is a member of ERM (ezrin/radixin/moesin) proteins, which play a role in formation of the membrane-associated cytoskeleton by linking actin filaments and adhesion proteins. The N-terminal FERM domain of ERM proteins is responsible for binding to the cytosolic parts of integral-membrane adhesion proteins such as ICAMs, while the C-terminal tail domain binds F-actin through the last 34 residues. In the cytosol, the FERM domain binds the C-terminal tail domain mutually to mask the binding sites for other binding partners. This masked molecule becomes activated by binding to phospholipids such as phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP2) in the membranes. To investigate the membrane targeting function of the FERM domain, we have determined the x-ray crystal structures of the mouse radixin FERM domain, and its complexes with inositol-(1,4,5)-trisphosphate (IP3), which is a head group of PIP2, and with the ICAM-2 cytosolic tail.</p> <p>The crystal structures have revealed that the FERM domain consists of three subdomains (A, B and C) featuring a ubiquitin-like, a four-helix bundle, and a phosphotyrosine-binding (PTB)-like folds, respectively. These subdomains are organized by inter-domain interactions to form characteristic grooves and clefts. IP3 binds a basic cleft that is distinct from those of pleckstrin homology (PH) domains and is located at a positively charged flat molecular surface, suggesting an electrostatic mechanism of plasma membrane targeting. Based on the structural changes associated with IP3 binding, a possible unmasking mechanism of ERM proteins by PIP2 has been proposed.</p>			

The X-ray crystal structure of the FERM domain bound to the ICAM-2 cytosolic tail, has shown that the ICAM-2 peptide binds the PTB-like subdomain C by forming an intermolecular anti-parallel  $\beta$ -sheet. In addition, the ICAM-2 tail also forms salt bridges and/or hydrogen bonds involving several polar side chains. These interacting residues are important for specific interaction between them and contribute to nanomolar-order high affinity, which was measured using the surface plasmon resonance (SPR). The binding mode of the ICAM-2 tail is reminiscent of those of phosphotyrosine-containing peptides bound to PTB domains, however, the binding specificity of the ICAM-2 tail is distinct from those of the PTB-binding peptides. Based on these structures of FERM/IP3 and FERM/ICAM-2 complexes, we propose the general mechanism of membrane association of ERM proteins through its FERM domain.

# 論文審査結果の要旨

申請者氏名 浜田 恵輔

平成13年1月9日に提出された論文は、細胞膜とアクチン細胞骨格とのリンカー蛋白質である radixin の FERM ドメイン、それと細胞膜成分でありシグナル伝達脂質であるフォスファチジルイノシトール-4,5,-二リン酸 (PIP2) の細胞質側の頭部に当たるイノシトール 1,3,5-三リン酸 (IP3) との複合体、ならびに、接着分子である ICAM-2 の細胞質側のテール部位ペプチドとの複合体の X 線結晶解析の方法を用いた三次元構造決定とその構造に基づいた分子機能のメカニズムの解明からなる。

三次元構造決定では、試料の十分な精製、良質な結晶の調製、高分解能の観測強度データの収集、多重重原子同型置換法ならびに分子置換法による位相決定、精度の高い三次元構造の精密化がなされており、技術的信頼性は高い。蛋白質の X 線による原子レベルの三次元構造決定とは、蛋白質の発現や精製などの生化学実験から、X 線強度データ収集などの物理実験、そして位相決定や構造解析における数値計算を含んでいるが、それらの全ての方法について十分な実力を有するものと判断した。

分子機能とそのメカニズムについては、その精度の高い三次元構造に基づいて詳細な構造学的な議論と、多くの関連した生化学的データを引用した機能についての慎重な考察の結果として結論されており、十分な妥当性が認められる。これらは、radixin の FERM ドメインの膜結合部位、IP3 認識部位ならびに ICAM-2 結合部位の同定、PIP2 と ICAM-2 の識別メカニズムの解明、IP3 結合による構造変化による radixin のリンカー活性の発現機構の解明、他の接着分子との結合の可能性を検討したことである。

また、論文全般におりて、記述も水準に達していると判断された。

以上のように、本論文は細胞骨格・細胞接着の構造生物学に貴重な基礎データを提供するもので、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士（バイオサイエンス）の学位論文として価値あるものと認めた。