

## 主論文の要約

### 初期分泌経路におけるカルシウム結合タンパク質 ALG-2 のアダプター機能 に関する分子細胞生物学的研究

生命農学研究科 応用分子生命科学専攻 応用生命化学講座 京卓志

【序文】カルシウム ( $\text{Ca}^{2+}$ ) シグナリングは生物にとって極めて本質的な細胞内情報伝達手段の一つであり、例えば神経情報伝達や筋収縮、さらには発生等多岐にわたる生命現象に寄与している。主にこの情報伝達は  $\text{Ca}^{2+}$  結合タンパク質を介して発揮される。このため  $\text{Ca}^{2+}$  結合タンパク質の機能を解明することは  $\text{Ca}^{2+}$  シグナリングを理解する上で極めて重要である。

ALG-2 (apoptosis-linked gene 2) は、EF-hand が 5 回連続した PEF (Penta-EF-hand) 構造を有する  $\text{Ca}^{2+}$  結合タンパク質である。マウス T 細胞を用いた「デストラップ法」によって、その発現抑制がアポトーシスを回避させる遺伝子として同定された。しかし、ALG-2 ノックアウトマウスの免疫系細胞のアポトーシスは正常に起こることから、ALG-2 の機能する局面及び役割は判然としなかった。一方で、ALG-2 の生理的役割及び分子基盤の解明を目指し、ALG-2 が  $\text{Ca}^{2+}$  結合タンパク質であるという点に着目した研究が進められてきた。これまでに、ALG-2 は  $\text{Ca}^{2+}$  依存的に様々なタンパク質と相互作用することが見いだされている。さらに、ALG-2 と ALG-2 結合領域ペプチドとの共結晶構造解析から、ALG-2 は 5 番目の EF-hand を介してホモ二量体を形成することに加え、それぞれの ALG-2 分子に ALG-2 結合領域ペプチドが結合し得ることがわかっている。このことから、ALG-2 は  $\text{Ca}^{2+}$  依存的に 2 つのタンパク質の間接的な相互作用を仲介するアダプターとして機能することが想定されている。

初期分泌経路とは、小胞体で合成されたタンパク質が、細胞膜へ輸送されたり、細胞外へ分泌されたりする分泌経路のうち、小胞体からゴルジ体までの輸送経路を指す。小胞体からのタンパク質搬出は COPII 小胞によって担われている。COPII 小胞は小胞体の特別な領域である ERES (endoplasmic reticulum exit site) において形成される。これまでに ALG-2 が COPII 小胞の構成タンパク質である Sec31A と  $\text{Ca}^{2+}$  依存的に相互作用すること、さらに ERES において Sec31A と共局在することが明らかになっている。しかし、初期分泌経路における ALG-2 のアダプター機能については不明であった。本研究は、初期分泌経路における ALG-2 のアダプター機能の生理的な役割を明らかにすることを目的として行った。

#### 【1】小胞体からゴルジ体へのタンパク質輸送における ALG-2 及び annexin A11 の役割

先行研究によって、ALG-2 が  $\text{Ca}^{2+}$  依存的なアダプターとして機能することで、リン脂質結合タンパク質である AnxA11 (annexin A11) と Sec31A の間接的な相互作用を仲介するこ

とが明らかになっていった。さらに、AnxA11 が ALG-2 を介して Sec31A 陽性の ERES に動員されることが見いだされていた。しかし、初期分泌経路における ALG-2 及び AnxA11 の生理的な役割は不明であった。そこで、ALG-2 及び AnxA11 の発現抑制が、分泌経路の研究に広く用いられる、水疱性口内炎ウイルス由来の膜貫通タンパク質 VSV-G tsO45 の輸送に与える影響を調べた。ALG-2、AnxA11 それぞれの発現抑制によって、VSV-G tsO45 の輸送が促進された。このことから、ALG-2 と AnxA11 は、小胞体からゴルジ体へのタンパク質輸送を負に制御することが考えられた。

## 【2】初期分泌経路における ALG-2 と TFG の相互作用

ALG-2 はホモ二量体を形成する一方で、そのパラログである peflin とヘテロ二量体を形成する。しかし、細胞内における ALG-2 ホモ二量体と ALG-2/peflin ヘテロ二量体の役割の違いは不明である。さらに、それぞれの二量体に特異的な  $Ca^{2+}$  依存的相互作用タンパク質はわかっていない。そこで、ALG-2 ホモ二量体及び ALG-2/peflin ヘテロ二量体の  $Ca^{2+}$  依存的な相互作用タンパク質を探索した。 $Ca^{2+}$  と結合しない変異体 ALG-2 に FLAG タグを付加したタンパク質 (FLAG-ALG-2<sup>E47A/E114A</sup>) とタグを付加していない ALG-2 またはタグを付加していない peflin を、RNAi を介して ALG-2 を発現抑制させた HEK293 細胞に共発現させた。それらの細胞溶解液を用いて、 $Ca^{2+}$  存在下で抗 FLAG 抗体による免疫沈降を行い、続いて  $Ca^{2+}$  キレーターである EGTA を含む溶液で溶出した。溶出液を SDS-PAGE で展開後、銀染色を行ったところ、FLAG-ALG-2<sup>E47A/E114A</sup> とタグを付加していない ALG-2 を共発現させたサンプルにおいて、いくつかのバンドが検出された。そのうち 4 本のバンドのタンパク質をトリプシン消化し、LC-MS/MS を用いて解析したところ、Sec31A、TSG101、VPS37C さらに TFG が同定された。Sec31A、TSG101、VPS37C はすでに ALG-2 の相互作用タンパク質として同定されているタンパク質であるが、TFG は本研究において新規に同定したタンパク質である。以降 ALG-2 と TFG の相互作用に焦点を当てて実験を行った。まず初めに、ALG-2 と TFG の相互作用の  $Ca^{2+}$  依存性を調べた。共免疫沈降実験によって、内在性 ALG-2 と内在性 TFG が  $Ca^{2+}$  依存的に相互作用することがわかった。さらに HeLa 細胞において免疫染色を行ったところ、TFG は ALG-2/Sec31A 陽性の ERES に一部共局在した。生細胞観察実験において、細胞内  $Ca^{2+}$  上昇を引き起こす試薬である thapsigargin を処理すると、GFP 融合 TFG (GFP-TFG) と mCherry 融合 ALG-2 (mCherry-ALG-2) が ERES に動員されることがわかった。さらに、ALG-2 の過剰発現が TFG を ERES に集積させることを免疫染色実験によって明らかにした。TFG は ALG-2 結合モチーフを有しており、その領域を欠いた変異体 GFP-TFG の FRAP (fluorescence recovery after photobleaching) 解析を行った結果、ALG-2 結合モチーフの欠損により、TFG の ERES への滞在時間が減少することがわかった。これらのことから、ALG-2 は TFG の ERES 局在を正に制御することが示唆された。TFG は安定なオリゴマー (八量体) を形成し、さらにそれらが会合することで、巨大なポリマーを形成することが知られている。

そこで、His タグを付加した組換え体 TFG (TFG-His) を作製し、TFG の多量体形成における ALG-2 の関与を調べた。EGTA または  $\text{Ca}^{2+}$  存在下において TFG-His と ALG-2 を混合した後、架橋化試薬 DTSSP を処理した。その結果、オリゴマー形成における ALG-2 の関与は認められなかったが、ALG-2 存在下で  $\text{Ca}^{2+}$  依存的にポリマー化が促進されることがわかった。以上の結果から、ALG-2 が  $\text{Ca}^{2+}$  応答性のアダプターとして TFG のポリマー化と ERES 局在を正に制御することが示唆された。

### 【3】 TFG の相互作用タンパク質の網羅的探索

ALG-2 と TFG の相互作用が、TFG のポリマー化を促進することで、その細胞内局在を制御する可能性が考えられた。しかし、TFG のポリマー化や細胞内局在の変化がどのような生理現象に寄与するかは不明である。そこで、その生理現象の解明を目指し、TFG の相互作用タンパク質の網羅的探索を行った。FLAG タグを融合させた TFG (FLAG-TFG) を発現させた HEK293 細胞と、コントロールとして FLAG-TFG を発現させていない HEK293 細胞を用意し、それぞれの細胞溶解液から抗 FLAG 抗体による免疫沈降を行った。免疫沈降産物を SDS-PAGE に供し、CBB で染色した。コントロールと FLAG-TFG のサンプルを泳動したレーン全体をそれぞれ切り出し、ゲル内消化に供した。得られたペプチドについて LC-MS/MS 解析と Mascot データベース検索を行った。その結果、コントロール及び FLAG-TFG とともに、数百種類にも及ぶタンパク質が検出された。この中から、TFG に特異的に相互作用するタンパク質を同定するために、FLAG-TFG の免疫沈降産物中には検出されたが、コントロールには検出されなかったタンパク質で、Mascot スコアが高く、報告されている細胞内局在と機能が TFG のそれと適合する、いくつかタンパク質について、相互作用の確認実験を行った。具体的には、抗体が入手可能な場合は内在性のタンパク質を、そうでない場合はタグを付加して過剰発現させたタンパク質を用いて、TFG との相互作用を共免疫沈降実験により評価した。その結果、TRAF3 が TFG と最も効率良く共沈降されることがわかった。続いて、TFG と TRAF3 の細胞内局在を調べた。HeLa 細胞に GFP-TFG と HA タグを融合させた TRAF3 (HA-TRAF3) を発現させて免疫染色を行ったところ、核付近の ERES において、GFP-TFG のシグナルと抗 HA 抗体による HA-TRAF3 の免疫染色シグナルが部分的に一致した。以上の結果から、一部の ERES において TFG と TRAF3 が共局在し、初期分泌経路において何らかの役割を果たしている可能性が示唆された。