報告番号	※　　第　　号

主　論　文　の　要　旨

論文題目　Molecular and Cell Biological Studies on Novel ALG-2-Interacting Proteins
（新規 ALG-2 相互作用タンパク質に関する分子細胞生物学的研究）

氏　　名　佐々木（大杉）　桂奈江

論　文　内　容　の　要　旨

Ca^{2+}結合蛋白質 ALG-2 (apoptosis-linked gene 2) はアポトーシス関連因子を探索する過程で発見されたが、その生理機能については現在もなお不明な点が多い。一方で、近年、肺腺腫症や上皮卵巣癌の進行度および胃癌患者の生存率と ALG-2 の遺伝子発現量の相関性が見出されており、バイオマーカーとしての有用性が複数の論文で報告されている。しかし、発癌における ALG-2 の作用機構は不明であり、分子レベルで ALG-2 の細胞内機能を解析することで新たな癌治療法の開発に大きく貢献することができると期待されている。

ALG-2 は分子内に Ca^{2+}結合モチーフである EF-hand が 5 つ連続した penta-EF-hand ドメインをもつ。Ca^{2+}が結合することによって ALG-2 の構造が変化し、様々な蛋白質と相互作用することが知られている。ALG-2 の機能を解明するための手がかりとして、これまでに私が所属する研究室を含め複数の研究グループにより ALG-2 相互作用因子が同定されてきた。それらにはエンドサイトーシス経路で機能する ALIX や TSG101、小胞輸送に関与する Sec31A、機能未知蛋白質 PLSCR3 などが存在する。さらに当研究室では、ALG-2 がホモダイマーを形成し、Ca^{2+}依存的に ALIX-TSG101 間の相互作用を橋渡しするアダプター蛋白質として機能することを報告している。

ALG-2 のアダプター機能に対する標的因子を同定することによって Ca^{2+}が関与する細胞内の新たな機構を解明できる可能性があると考え、私は新規 ALG-2 相互作用因子の探索を試みた。これまでに同定された ALG-2 相互作用因子の共通する特徴として、その大部分がプロリンに富む領域（PRR, Proline-Rich Region）を含むことに着目した。さらに当研究室では、ALIX、Sec31A、PLSCR3 について ALG-2 結合の必要十分領域（ABS, ALG-2-Binding Site）を同定している。PLSCR3 には 2 ヶ所の ABS

が存在し、ABS-1 は ALIX ABS と、ABS-2 は Sec31A ABS とそれぞれ相同性が高い。新規 ALG-2 相互作用因子の同定を目的として、まず、私は上記 2 種類の ABS に基づいた ALG-2-Binding Motif (ABM-1, ABM-2) を想定し、このモチーフを含む PRR 蛋白質を、検索プログラムを用いて約 2 万のエントリー数をもつヒト蛋白質データベース（UniProt/Swiss-Prot）より抽出する方法を確立した。抽出された約 280 蛋白質のうち、機能面などを考慮して選出した 18 蛋白質において ALG-2 との相互作用解析を Far Western 法により行った結果、11 蛋白質が新規 ALG-2 相互作用因子候補として得られた。真の相互作用蛋白質同定には、実験上の非特異的な結合を排除するために、複数の相互作用解析による確認が必要である。私は ALG-2 の Ca^{2+}依存的な相互作用について、Far Western 法、GST プルダウン法、共免疫沈降法を用いて解析する方法を確立した。

ALG-2 相互作用因子の候補には、PATL1（PAT1-Like protein 1）および CHERP (Calcium Homeostasis Endoplasmic Reticulum Protein）という 2 つの RNA プロセシングに関係する蛋白質が含まれていた。これまでに ALG-2 が RNA プロセシングに関与するという知見はなく、プロセシングにおける ALG-2 の新たな可能性を検討した。PATL1 は mRNA の分解や翻訳抑制、小分子 RNA のプロセシングに関わる P-body に局在し、mRNA の分解や P-body 形成との関わりが報告されている。P-body とは RNA と蛋白質からなる非膜性構造物であり、細胞質に斑点上に存在している。また、私が作製した抗 PATL1 抗体を用いた実験で、PATL1 を含む一部の P-body 構成因子が Hepatitis C Virus (HCV) 感染細胞において、コア蛋白質と共に脂肪滴の周りに局在し、HCV のゲノム RNA 複製や感染性ウイルス粒子の産生に必要であることが共同研究によって示された。私は PATL1 が Ca^{2+}依存的に ALG-2 と結合し、その結合には PATL1 の PRR および ABM-2 が重要であることを明らかにした。HeLa 細胞を用いた三重免疫染色を行ったところ、細胞質において ALG-2 が PATL1 や他の P-body 構成因子 DCP1A と一部共局在することを発見した。以上の結果から、PATL1 が新規の Ca^{2+}依存的 ALG-2 相互作用因子であることが明らかとなった。

CHERP は、IP_3R (Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor) 誘導型 Ca^{2+}放出を阻害する抗体の標的蛋白質として単離され、T 細胞系では小胞体に局在し、細胞内 Ca^{2+}動員制御への関与が報告されていた。一方でプロテオーム解析により、CHERP がスプライソソーム複合体や、スプライシング因子が豊富に存在する、核スペックルという核内構造物に含まれていることが示されている。さらに CHERP の構造に着目すると、SURP モチーフや G-patch、RNA ポリメラーゼ II (Pol II) の C 末端と相互作用する CID など、RNA プロセシングに関与する領域が複数存在する。特に Arg と Ser に富む領域は、一般的にエキソンに結合し、構成的・選択的スプライシングを制御すると考えられている SR 蛋白質が共通してもつ RS (Arg/Ser-rich) ドメインと相同性が高い。まず、汎リン酸化 RS ドメイン抗体を用いたウェスタンブロッティング解析を行ったところ、CHERP が認識され、フォスファターゼ処理によってその抗原性が消失

したことから、初めて CHERP が SR 様蛋白質であることが明らかとなった。次に、GFP 融合 CHERP および免疫染色による内在性 CHERP の細胞内局在を観察した結果、これまでの報告とは異なり、小胞体ではなく主に核質に存在し、核スペックルに一部局在することを見出した。ALG-2 と CHERP の相互作用解析を行ったところ、ALG-2 は Ca^{2+}依存的に CHERP と結合した。非イオン性界面活性剤ジギトニンによる前膜透過処理を行った HeLa 細胞を用いた免疫染色の結果、内在性 CHERP やスプライシング制御因子 SC35 が示す核スペックルへの、ALG-2 の特異的な集積が観察された。核内に局在する ALG-2 に対する Ca^{2+}の影響を調べるため、蛍光蛋白質融合 ALG-2 を発現させて生細胞観察し、Ca^{2+}動員誘導剤タプシガルジン処理を行った。その結果、ALG-2 が CHERP の局在する核スペックルに Ca^{2+}依存的に一過的に集積することが判明した。共免疫沈降法により CHERP と Pol II の相互作用解析を行ったところ、CHERP が CID ではなく Pro に富む別の領域を介して、リン酸化状態の Pol II と相互作用することが明らかとなった。さらに Ca^{2+}存在下では抗 Pol II 抗体の免疫沈降産物中に ALG-2 が検出された。これらの結果から、CHERP が SR 様蛋白質として pre-mRNA スプライシング制御において機能し、その相互作用因子 ALG-2 もその制御に関わる可能性が考えられた。IP_3R1 (inositol 1,4,5-trisphosphate receptor 1) について報告されている選択的スプライシングに対し、CHERP および ALG-2 発現抑制の影響を定量 RT-PCR により調べた。その結果、CHERP または ALG-2 の発現抑制により IP_3R1 のエキソン 42 を含む mRNA の割合が増加した。さらに RNA-蛋白質複合体免疫沈降を行ったところ、抗 CHERP 抗体の免疫沈降産物から、コントロール IgG と比較して有意に IP_3R1 の mRNA が検出された。以上の研究により、CHERP および ALG-2 が選択的スプライシング制御に関与する可能性が示唆された。