

報告番号	※	第	号
------	---	---	---

## 主論文の要旨

論文題目 カルシウム結合タンパク質 ALG-2 の分子認識機構に関する  
構造生物学的研究

氏名 高橋 健

## 論文内容の要旨

ALG-2 (apoptosis-linked gene 2) は、カルシウムイオン ( $\text{Ca}^{2+}$ ) 結合モチーフである EF-hand が 5 つ連続した penta-EF-hand ドメインをもつタンパク質である。その生理機能は不明な点が多いが、 $\text{Ca}^{2+}$  存在下で膜画分に移行することから、メンブレンを介した生体反応の制御機構に関与していることが予想されている。また、ALG-2 遺伝子の発現量は、上皮卵巣癌や肺腺腫症の進行度及び胃癌患者の生存率に相関が認められており、癌の進行制御機構への関与も示唆されている。ALG-2 の構造的特徴として、 $\text{Ca}^{2+}$  の結合により構造を変化させ、種々のタンパク質と結合することが挙げられる。これまでに、ALG-2 と結合するタンパク質として、COPII 小胞外殻構成因子のひとつである Sec31A、エンドサイトーシス経路で機能する ALIX や TSG101、機能未知タンパク質の Scr3 などが同定されている。ALG-2 自体には触媒ドメインが存在せず、ALG-2 は他のタンパク質に結合することで生体反応を制御していると考えられ、ALG-2 と ALG-2 相互作用因子の結合機構の分子レベルでの解析は、ALG-2 の機能解明に大きく貢献すると期待される。

私が所属する研究室では、ALG-2 と直接結合するタンパク質の多くがプロリンに富む領域を介して ALG-2 と結合することを明らかにしており、その領域に含まれる ALG-2 結合モチーフには、少なくとも 2 種類存在することを報告している (ABM Type 1, ABM Type 2)。これまでに、ABM Type 1 を含む ALIX ペプチドと ALG-2 複合体の結晶構造が解析されており、ABM Type 1 と ALG-2 の結合機構は明らかになっている。一方、ABM Type 2 と ALG-2 の結合機構は未だ不明のままである。そこで、ABM Type 2 と ALG-2 の結合機構の解明を目的として、私はまずはじめに、コンピューター解析による両

者の結合機構を推定した。以前解析された  $\text{Ca}^{2+}$  結合型 ALG-2 の構造モデルを用いて、リガンド結合領域を探索した結果、ABM Type 1 の結合領域 (Pocket 1/Pocket 2) から離れた箇所に新たな疎水性ポケット (Pocket 3) を発見した。Pocket 3 に対して、Scr3 から派生したモデルペプチドの結合シミュレーションを行った結果、ABM Type 2 は Pocket 3 に安定的に結合可能であることが判明した。また、Pocket 3 を構成するアミノ酸残基を置換した変異体 ALG-2 を用いて、緑色蛍光タンパク質 (GFP) 融合 Scr3\_ABM Type 2 との結合解析を行った結果、両分子は結合できなくなることを確認した。これらの結果は、ABM Type 2 は ABM Type 1 とは異なる結合機構で ALG-2 と結合する可能性を強く示唆している。

Scr3 と同様に、分子内に ABM Type 2 をもつタンパク質のひとつに、Sec31A が同定されている。Sec31A が最外層を構成する COPII 小胞は、小胞体からゴルジ体への順行輸送を担う輸送小胞であり、何種類かの小胞被覆を構成するタンパク質が、小胞体に動員されることがきっかけで形成される。被覆構成因子が動員され、COPII 小胞が出芽する小胞体膜の特定領域は小胞体出口部位 (ERES : endoplasmic reticulum exit site) と定義されている。COPII 小胞の形成には、ERES における被覆構成因子の滞留時間の延長が必要である。これまでに私が所属する研究室では、ALG-2 は細胞内の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度上昇を感知して Sec31A に結合することにより、Sec31A を ERES に安定的に滞留可能にしていることを報告した。また、その制御機構には、酸性リン脂質に結合する Annexin A11 が ALG-2 を介して Sec31A と複合体を形成することが重要であることを明らかにしている。私は、ABM Type 2 と ALG-2 の結合機構を分子レベルで解明し、COPII 形成過程における ALG-2 の機能に関して構造生物学的視点から研究を進めた。まず、ABM Type 2 を含む Sec31A から派生した 12 残基のペプチドと ALG-2 複合体の結晶を作製し、高エネルギー加速器研究機構 PF AR-NE3 の放射光によって 2.36 Å 分解能の回折データを取得した。回折データから構築した ALG-2/Sec31A\_ABM Type 2 ペプチド複合体の構造モデルから、Sec31A ペプチドは ALG-2 と 1 : 1 で複合体を形成していることがわかった。ABM Type 2 は ABM Type 1 とは異なる ALG-2 の領域に結合しており、その結合領域は、コンピューター解析で予測した Pocket 3 と一致した。Pocket 3 を構成するアミノ酸残基を変異させた ALG-2 は、ALIX との結合能を保持したまま Sec31A Type 2 との結合が消失することを確認した。この結果は、X 線結晶構造の妥当性を裏付ける結果といえる。同様に、ALG-2 と相互作用している Sec31A のアミノ酸残基の変異は、ALG-2 との結合能の著しい低下を引き起こした。変異させることにより ALG-2 との結合が低下した Sec31A のアミノ酸残基には、従来定義した ABM Type 2 (PxPGF) を構成するアミノ酸残基に加え、ABM Type 2 に隣接するアミノ酸残基も含まれていた。変異体を用いた詳細な結合解析の結果、ABM Type 2 を新たに、「(P/φ) Px (P/φ) GF (F/W) Ω」(φ 疎水性アミノ酸, Ω 側鎖の長いアミノ酸) と定義した。