

論文審査の結果の要旨および担当者

報告番号	※	第	号
------	---	---	---

氏 名 高 橋 健

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

論文審査担当者

主査	名古屋大学教授	牧	正敏
委員	名古屋大学教授	渡邊	信久
委員	名古屋大学教授	吉村	徹
委員	名古屋大学准教授	柴田	秀樹
委員	名古屋大学助教	高原	照直

論文審査の結果の要旨

ALG-2 (apoptosis-linked gene 2) は、カルシウムイオン (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、 Ca^{2+} 存在下で膜画分に移行することから、形質膜やオルガネラ膜を介した細胞制御機構に関与していると推察されている。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、 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 PLSCR3 (以下 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を明らかにすることは、ALG-2 の機能解明に大きく貢献すると期待される。

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、そして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 (ABM Type 1, ABM Type 2) が明らかにされている。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、ABM Type 1 と ALG-2 の結合機構が明らかになっている。一方、ABM Type 2 との ALG-2 結合の分子機構は未だ不明のままであった。そこで、高橋健は ABM Type 2 と ALG-2 の結合機構の解明を目的として、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 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、変異体では Scr3_ABM Type 2 との結合が喪失することを確認した。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 と類似した ABM Type 2 をもつタンパク質として、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、幾種類かの小胞被覆構成タンパク質が小胞体に動員されることがきっかけとなり形成される。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) と称され、ERES における被覆構成因子の滞留時間の制御が ER-ゴルジ体輸送速度に影響する。これまでに ALG-2 は、細胞内の Ca^{2+} 濃度上昇を感知して Sec31A と結合することにより、Sec31A を ERES に安定的に滞留させることを可能にしていると報告されている。

高橋健は ABM Type 2 と ALG-2 の結合機構を分子および原子レベルで解明するため、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を明らかにした。そして、ABM Type 2 は ABM Type 1 とは異なる ALG-2 の領域に結合し、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 構成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 との結合を消失した。このことは X 線結晶構造の妥当性を裏付ける結果といえる。そして、ALG-2 と相互作用している Sec31A のアミノ酸残基の変異も 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」(x、任意のアミノ酸、φ 疎水性アミノ酸、Ω 側鎖の長いアミノ酸) と定義した。また、 Ca^{2+} 非結合型の ALG-2 の 3D 構造とカルシウム結合型 ALG-2 の 3D 構造を比較することにより、 Ca^{2+} 結合が Pocket 3 へ及ぼす影響について考察した。

以上のように高橋健は構造生物学的研究を行い、カルシウム結合タンパク質 ALG-2 がその相互作用タンパク質である Scr3 や Sec31A をどのような仕組みで認識するのか、分子および原子レベルで明らかにすることに成功した。審査委員会は、高橋健の研究成果ならびに学識ともに博士 (農学) に値すると判定した。