

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

2015年9月

名古屋大学大学院生命農学研究科

応用分子生命科学専攻

[応用生命化学講座]

(分子細胞制御学研究分野)

高橋 健

目次	-----	i
略語表	-----	ii
<b>第1章</b>		
1-1 緒言	-----	1
図表		
<b>第2章</b>		
2-1 要約	-----	3
2-2 序論	-----	4
2-3 材料と方法	-----	5
2-4 結果	-----	7
2-5 考察	-----	8
2-6 結論	-----	10
図表		
<b>第3章</b>		
3-1 要約	-----	11
2-2 序論	-----	12
3-3 材料と方法	-----	13
3-4 結果	-----	20
3-5 考察	-----	22
3-6 結論	-----	25
図表		
<b>第4章</b>		
4-1 要約	-----	26
4-2 序論	-----	27
4-3 材料と方法	-----	28
4-4 結果	-----	29
4-5 考察	-----	32
4-6 結論	-----	34
図表		
引用文献	-----	35
謝辞	-----	40

## 略語一覽

a.a.	amino acids
ABM	ALG-2-binding motif
ABS	ALG-2-binding site
ALG-2	Apoptosis-linked gene 2
ALIX	ALG-2-interacting protein X
BL	Beamline
CAPNS1	Calpain small subunit 1
CBB	Coomassie brilliant blue
EF	EF-hand
EGTA	Ethylene glycol bis ( $\beta$ -aminoethylether) -N,N,N',N'-tetraacetic acid
ER	Endoplasmic reticulum
FBS	Fetal bovine serum
GFP	Green fluorescent protein
GST	Glutathione S-transferase
HEK293	Human embryonic kidney 293
mAb	Monoclonal antibody
pAb	Polyclonal antibody
PBS	Phosphate buffered saline
PDB	Protein data bank
PEF	Penta-EF-hand
PEG	Polyethylene glycol
PF	Photon factory
POD	Peroxidase
PRR	Proline-rich region
PVDF	polyvinylidene difluoride
RMSD	Root mean square deviation
Scr3	Phospholipid scramblase 3 (PLSCR3)
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
TSG101	Tumor susceptibility gene 101
WT	wild type

# 第 1 章

## 1-1. 緒言

カルシウムイオン ( $\text{Ca}^{2+}$ ) は、動物細胞の内外で細胞膜を隔てて 1 万倍もの濃度勾配が保たれている。細胞内の様々な刺激によって細胞質に  $\text{Ca}^{2+}$  が流入した場合には、 $\text{Ca}^{2+}$  濃度上昇に応答するタンパク質の働きによって、様々な生体反応が誘導される。そのひとつに、アポトーシス (プログラム細胞死) がある。アポトーシスの抑制を指標にしたクローニングにより、アポトーシス関連遺伝子として ALG-2 が同定された。アポトーシスが抑制された理由としては、発現ベクターに ALG-2 の cDNA が逆向きに挿入されることでアンチセンス RNA が発現し、ALG-2 の発現が抑制されたためであった [Vito et al., 1996]。現在は PDCD6 (programmed cell death 6) とも称されている ALG-2 は、分子内に連続した 5 つの EF-hand をもつ、22-kDa (191a.a.) の  $\text{Ca}^{2+}$  結合タンパク質であり (図 1-1), CAPNS1 [Blanchard et al., 1997] や Peflin [Kitaura et al., 1999] とともに penta-EF-hand (PEF) ファミリーに分類される。PEF ファミリーに分類されるタンパク質 (PEF タンパク質) の特徴としては、EF5 を介してダイマーを形成すること、 $\text{Ca}^{2+}$  存在下でもカルモジュリンでみられるような大きな構造変化がないことなどがあげられる。これまでに、ALG-2 の詳細な機能は明らかになっていないが、ER ストレスによって誘導されるアポトーシス、発生過程における神経細胞のアポトーシス及び細胞のがん化への関与が示唆されている [Rao et al., 2004, Cour et al., 2008, Høj et al., 2009]。

ALG-2 の特徴として、ホモダイマーを形成し [Kitaura et al., 2002]、細胞内の種々のタンパク質と結合することが挙げられる。これまでに報告された ALG-2 結合タンパク質には、ALIX/AIP1 [Missotten et al., 1999, Vito et al., 1999], TSG101 [Katoh et al., 2005], Scr3 (phospholipid scramblase 3, PLSCR3) [Shibata et al., 2008] 及び Sec31A [Yamasaki et al., 2006, Shibata et al., 2007] などがある。これらのタンパク質は、Pro に富んだ疎水性領域 (PRR) を介して ALG-2 に結合するが、その領域に含まれる ALG-2 結合モチーフ (ABM) は少なくとも 2 種類に分類される [Shibata et al., 2008]。第一に ALIX, TSG101 及び Scr3 の結合部位 1 (Scr3 ABS-1) などで見られる 1 型 ALG-2 結合モチーフ (ABM Type 1), 第二に Sec31A, Scr3 の結合部位 2 (Scr3 ABS-2) などで見られる 2 型 ALG-2 結合モチーフ (ABM Type 2) である (図 1-2)。生体内に存在するスプライシングアイソフォーム (ALG-2<sup>ΔGF122</sup>) は、ABM Type 1 とは結合できないことも報告されており [Shibata et al., 2008], ALG-2 が 2 種類の ABM を区別して結合することに生理的な意味があると考えられる。これまでに、ALG-2/ALIX ペプチド複合体の結晶構造はすでに解析されており、ALG-2 と ABM Type 1 の結合機構は明らかになっている [Suzuki et al., 2008]。一方、ABM Type 2 に関する知見は少なく、ALG-2 と ABM Type 2 の結合機構は不明であった。本博士論文研究は、ALG-2 の ABM Type 2 認識機構を明らかにすることを目的としたものであり、第 2 章で、コンピューターシミュレーションによ

る結合部位の推定, 第3章で ALG-2 と Sec31A ペプチドの複合体の X線結晶構造解析結果, 第4章で  $\text{Ca}^{2+}$  依存的結合機構について解析した事柄を記述した. なお, 第2章の一部は, Takahashi et al., *Int J Mol Sci.* 2012, 13 (6) :7532-7549 そして第3章ならびに第4章の一部は Takahashi et al., *Int J Mol Sci.* 2015, 16 (2) :3677-3699 で発表した.



**図1-1 ALG-2のアミノ酸配列**

ALG-2 (UniProt O75340) のアミノ酸配列を羅列し、 $\alpha$ ヘリックスを形成するアミノ酸配列を橙色の太線、 $\beta$ シートを形成するアミノ酸配列を水色の矢印で標識した ( $\alpha 1$ : 25-35 a.a.,  $\alpha 2$ : 46-51 a.a.,  $\alpha 3$ : 62-72 a.a.,  $\alpha 4$ : 82-102 a.a.,  $\alpha 5$ : 112-122a.a.,  $\alpha 6$ : 128-138 a.a.,  $\alpha 7$ : 148-168 a.a.,  $\alpha 8$ : 180-188 a.a.,  $\beta 1$ : 175-179 a.a.) ALG-2には5つのEFハンドが存在し、そのうち、EF1 ( $\alpha 1$ - $\alpha 2$ )、EF3 ( $\alpha 4$ - $\alpha 5$ ) 及びEF5 ( $\alpha 7$ - $\alpha 8$ ) に $\text{Ca}^{2+}$ が結合する。 $\text{Ca}^{2+}$ はEFハンドのx,y,z, -y及び-zに位置するアミノ酸残基の酸素原子と配位結合を形成する。

**ABS-1**

1 - MAGYLPPKGYAPSPPP**PYPVTPGYPE**PALHPGPGQAPVPAQVPAP - 45

**ABS-2**

46 - A**PGF**ALFPSPGPVALGSAAPFLPLPGVPSGLEFLVQIDQILIHQK - 90

91 - AERVETFLGWETCNRYELRSGAGQPLGQAAEESNCCARLCCGARR - 135

136- PLRVRLADPGDREVLRLRLPLHCGCSCGPCGLQEMEVQAPPGTI - 180

181- GHVLQTWHPFLPKFSIQDADRQTVLRVVGPCWTCGCGTDTNFEVK - 225

226- TRDESRSVGRISKQWGGLVREALTDADDFGLQFPLDL DVRVKAVL - 270

271- LGATFLIDYMF FEKRGGAGPSAVTS - 295

**図1-2 Scr3のアミノ酸配列**

Scr3 (PLSCR3, UniProt Q9NRY6, 本論文ではScr3と略) のアミノ酸配列を記し, 過去に同定された2ヶ所のALG-2結合部位 (ABS-1 : 12-27 a.a., ABS-2 : 43-58 a.a.) を配列の上部に黒線で示した. ABS-1に存在するABM Type 1 (PXYPX<sub>n</sub>YP : X, 任意アミノ酸 ; n=4) を赤字, ABS-2に存在するABM Type 2 (XPXPGF ; X, 任意アミノ酸) を青字で記した.

## 第 2 章

### コンピューター解析による ALG-2 の Scr3 の 2 型結合モチーフ (ABM Type 2) 認識機構の推定と実験的裏付け

#### 2-1. 要約

ALG-2 は PEF ファミリーに分類されるタンパク質であり, ALIX, Scr3 をはじめとする様々なタンパク質と  $\text{Ca}^{2+}$  依存的に結合する. これらのタンパク質がもつ ALG-2 結合モチーフは, 2 種類同定されている. 第一に ALIX などで見られる ABM Type1 (PXYPX<sub>n</sub>YP; X, variable; n=4), 第二に Scr3 で見られる ABM Type2 (XPXPGF; X, variable) である. これまでに, ABM Type1 と ALG-2 の結合機構は解析されているのに対して, ABM Type2 と ALG-2 の結合機構は未だ不明である.

私は, ABM Type2 と ALG-2 の結合機構の解明の取り掛かりとして, リガンド結合領域解析ソフト MetaPocket2.0 を用いて, ABM Type2 の結合が予想される領域 (Pocket 3) を同定した. 続いて, 結合シミュレーションソフト AutoDock vina を用いて, Scr3 から派生したモデルペプチド *N*-acetyl-Pro<sup>1</sup>Ala<sup>2</sup>Pro<sup>3</sup>Gly<sup>4</sup>Phe<sup>5</sup>-amide の Pocket 3 に対する結合シミュレーション解析を行い, 両者は安定した複合体を形成することを予想した. モデルペプチドと相互作用している, Pocket 3 を構成するアミノ酸を置換した変異体 ALG-2 (L52A, F148S) は, ABM Type1 への結合能を保持したまま, ABM Type2 に結合できなくなることをプルダウン解析により確認した. これらの結果から, Pocket 3 が ABM Type2 の結合領域であると考えられた.



## 2-2. 序論

ABM Type1 (PXYPX<sub>n</sub>YP; X, variable ; n=4) をもつタンパク質を網羅的に検索した結果, ALG-2 結合タンパク質のひとつとして Scr3 が同定された[Shibata et al., 2008]. Scr3 は, Fas や TNF- $\alpha$  によって引き起こされるアポトーシスの制御[Liu et al., 2008]及びカルジオリピン合成の調節[Van et al., 2008]への関与が示唆されているタンパク質である. Shibata ら[2008] は, ALG-2 と Scr3 の結合解析を進める過程で, 121 番目のグリシンと 122 番目の Phe が欠損したスプライシングアイソフォーム (ALG-2 <sup>$\Delta$ GF122</sup>) は, Scr3 とは結合するのに対し, ALIX とは結合しないことを明らかにした. さらに, ABM Type1 が含まれる領域 (Scr3 ABS-1) を欠損させた場合でも, Scr3 は ALG-2 及び ALG-2 <sup>$\Delta$ GF122</sup> に結合できることがわかった. 分子内に ABM Type 1 をもたない ALG-2 結合タンパク質のひとつに Sec31A がある. Scr3 と Sec31A に共通するアミノ酸配列を検索した結果, 新たな ALG-2 結合モチーフとして ABM Type 2 (PXPGF; X, variable) が同定された[Shibata et al., 2008]. これまでに, ALG-2 と ALIX ペプチド複合体の結晶構造から, ABM Type 1 と ALG-2 の結合機構は明らかになっている [Suzuki et al., 2008]. その一方で, ABM Type 2 に関する知見は少なく, ALG-2 との結合機構は未だ不明である. そこで私は, コンピューター解析と生化学実験により, ABM Type 2 と ALG-2 の結合機構に着目して研究を進めた.

## 2-3. 材料と方法

### 2-3-1. ALG-2 に存在する ABM Type 2 の結合領域の予想と結合シミュレーション解析

リガンド結合領域解析ソフト MetaPocket2.0 [Zhang et al., 2011]を用いて,  $\text{Ca}^{2+}$ 結合型 ALG-2 (PDB code : 2ZN9) の分子表面に存在する疎水性ポケットを探索した. タンパク質の構造データの描写及び原子間距離の測定は PyMOL を使用した. また, タンパク質表面の疎水性度は, rTool 0.7.2 [[http://www.rubor.de/pymol\\_extensions\\_en.html](http://www.rubor.de/pymol_extensions_en.html)]のプログラムを追加した PyMOL により解析した. COOT [Emsley et al., 2004]を用いてモデルペプチドの構造データを作成し, AutoDock tool [Rodney et al., 2008], AutoDock Vina [Trott et al., 2010]により, ALG-2 との結合シミュレーション解析を行った. モデルペプチドと ALG-2 の相互作用解析は, LIGPLOT v.4.5.3 [Wallace et al., 1995]及び CCP4 ソフトウェアパッケージ[Collaborative C. P., 1994]に含まれる NCONT を使用した.

### 2-3-2. 変異体 ALG-2 の発現と精製

過去に作製されたGST融合ALG-2発現プラスミド (pGEX-4T-3/hALG-2) [Shibata et al., 2007] を鋳型DNAとし, ABM Type 2との相互作用が予測されたアミノ酸残基を変異させるプライマー (L52A変異体作製用 : forward : 5'- GCTTCAGCA AGCTGCCTCCAACGG CACGTG-3' ; reverse : 5'-CACGTGCCGTTGGAGGCAGC TTGCTGAAGC -3' ; F148S変異体作製用 : forward : 5'-GGGCAGATCGCCAGCGAC GACTTCATCC AG-3' ; reverse : 5'-TGGATGAAGTCGTGCTGGCGATCTGCCC-3') を用いたPCR反応により, アミノ酸置換変異体ALG-2をコードするプラスミドを作製した.

PCR産物に含まれる大腸菌由来のプラスミドを *DpnI* (タカラバイオ) により処理し, 目的プラスミドをヒートショック法により大腸菌Top10のコンピテントセルを形質転換した. 形質転換したTop10を培養し, そこから抽出したプラスミドの塩基配列が目的の配列であることを確認した後, 大腸菌BL21 (DE3) pLysSに導入して目的タンパク質 (GST-変異体ALG-2) を発現させた. グルタチオンセファロースビーズを用いて目的タンパク質を精製し, 還元型グルタチオンを含む緩衝溶液で溶出した. 溶出したタンパク質を回収し, 透析により緩衝溶液を置換した. 透析液は, 20 mM Tris-HCl, pH7.5, 10  $\mu\text{M}$  EDTA, 10  $\mu\text{M}$  EGTA or 20 mM Tris-HCl, pH7.5, 10  $\mu\text{M}$  EDTA, 10  $\mu\text{M}$  EGTA, 100 mM NaClを用いた. なお, 目的タンパク質の発現用プラスミドの作製から, 目的タンパク質の精製に至る詳細な実験方法については, 第3章に記載した.

### 2-3-2. GST プルダウン解析

RNA干渉法によりALG-2の発現を恒常的に抑制したHEK293 (HEK293/ALG-2<sub>kd</sub>) [Okumura et al., 2009]に, GFP-Scr3及びGFP-変異体Scr3をコードするプラスミドをリン酸カルシウム法により導入した. DMEM培地に10% ウシ胎児血清 (FBS), 100 µg/mL ペニシリン, 100 units/mL ストレプトマイシン, 4 mM L-グルタミンを含む培地を用いて, 5% CO<sub>2</sub>, 37°Cの条件下で培養した細胞を回収し, 緩衝液A (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1% Triton X-100 及びプロテアーゼ阻害剤) により細胞を破碎し, 遠心分離により細胞破碎液上清を回収した. 細胞破碎液上清に100 µM CaCl<sub>2</sub>とGST- ALG-2を固定したセファロースビーズを加えて, 4°Cで一晩回転混合した. 遠心分離 (700×g) によりセファロースビーズを回収し, 100 µM CaCl<sub>2</sub>を含む緩衝液を用いてセファロースビーズを十分に洗浄した. 洗浄後のセファロースビーズに吸着しているタンパク質をSDS-PAGEで展開し, PVDF膜 (Immobilon-P, Millipore, Bedford) に転写した. 一次抗体にはマウス抗GFP mAb (clone B-2, Santa Cruz Biotechnology), 二次抗体にはPOD-ヤギ抗マウスpAb (30487, Jackson ImmnoReserch Laboratories) を用いてPVDF膜上の目的タンパク質を標識し, 化学発光法により検出した. 検出試薬は, Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Fisher Scientific) を用い, 検出器はLAS-3000mini (富士フィルム) を使用した. なお, GSTプルダウン解析の詳細な実験方法については第3章に記載した.

## 2-4. 結果

### 2-4-1. ALG-2 ダイマーに存在する ABM Type 2 結合領域の予測

PDB に登録されている des3-20ALG-2\_Ca<sup>2+</sup> 結合型 (PDB code : 2ZN9) の構造データを用いて, ABM Type 2 の結合領域を探索した. 結合領域予測には, MetaPocket2.0 [Zhang, Z et al., 2011]を用いた. Metapocket 2.0 は, LIGSITE<sup>CSC</sup>, PASS, Q-SiteFinder, SURFNET, Fpocket, GHECOM, ConCavity, POCASA の解析結果を総合的に判断し, タンパク質表面に存在するポケット (結合領域) を予測するソフトである. 解析の結果, 各モノマー表面に 2 個 (橙, 青), ダイマー化によって形成される溝に 2 個 (紫), 合計 6 個のポケットを同定した (図 2-1).

### 2-4-2. ALG-2 モノマーに存在する ABM Type2 結合領域の予測

ALG-2 モノマーに注目し, des3-20ALG-2\_Ca<sup>2+</sup> 結合型 (PDB code : 2ZN9) の Chain A の分子表面に存在する ABM type2 の結合領域を探索した. その結果, 比較的大きな体積をもつポケットが 5 個見つかった. 各ポケット (ID. 1-5) を構成するアミノ酸を表 2-1 に示す. ID. 1 と ID. 3 を構成するアミノ酸は部分的に共通し, ID. 2 と ID. 4 においても, 一部のアミノ酸が共通していることを確認した. この結果は, 各々のポケットが隣接していることを示している. 各ポケット (ID. 1-4) を構成するアミノ酸残基を色分け表示した ALG-2 の分子表面図を図 2-2 に示す. 分子表面図からも, ID. 1 (橙) と ID. 3 (赤) 及び ID. 2 (青) と ID. 4 (緑) は接近していることが確認できる. 本稿では, ID. 2 と ID. 4 は接近しており, 構成するアミノ酸の多くが共通していることからひとつの大きなポケットと考え, Pocket 3 と定義した.

### 2-4-3. 結合シミュレーション解析

結合シミュレーションソフト Autodock vina を用いて, Scr3 から派生したモデルペプチド *N*-acetyl-Pro<sup>1</sup>Ala<sup>2</sup>Pro<sup>3</sup>Gly<sup>4</sup>Phe<sup>5</sup>-amide (Scr3\_ABM Type 2) の Pocket 3 への結合解析を行った. 計算結果の中から, 最も低い結合自由エネルギーを示した (-7.8 kcal/mol) 複合体構造モデルを図 2-3 に示す. また, LIGPLOT を用いて, 両分子の分子間相互作用を解析した結果を表 2-2 及び図 2-4 に示す. Scr3\_ABM Type 2 の Pro<sup>1</sup>, Ala<sup>2</sup>, Phe<sup>5</sup> は, ALG-2 の (i)  $\alpha 2$  とそれに続くループ領域に存在するアミノ酸残基 L48, A51, L52, S53, (ii)  $\alpha 4$  に存在するアミノ酸残基 F85, W89, I92, Q96, (iii)  $\alpha 7$  の N 末端残基 F148 と疎水性相互作用を形成し, 末端のアセチル基は F99, G108 と疎水性相互作用を形成していた. また, Pro<sup>1</sup>, Ala<sup>2</sup>, Phe<sup>5</sup> の酸素原子は, S53, Q96, T93 の酸素原子あるいは窒素原子と水素結合を形成し, 末端のアミド基の窒素原子は,

Q96の酸素原子と水素結合を形成していた。Pro<sup>3</sup>とGly<sup>4</sup>の両残基は、Pocket 3から離れた位置(≧4.0Å)に存在していた。

#### 2-4-4. GSTプルダウン解析

Metapocket2.0 及び Autodock vina の解析結果から、Scr3\_ABM Type 2 は Pocket 3 に結合することが推定された。この結果の裏付けをとるため、Scr3\_ABM Type 2 との相互作用が予想された Pocket 3 を構成するアミノ酸の一部を変異させた ALG-2 を作製し、プルダウン解析により Scr3 との結合解析を行った。変異を加えたアミノ酸には、ループ構造あるいは  $\alpha$  ヘリックスの末端に存在する L52 及び F148 を選定し、別のアミノ酸残基に置換したことにより ALG-2 の全体構造を壊さないように配慮した。

各変異体 ALG-2 を固定したセファロースビーズを用いて、GFP-Scr3 のプルダウン解析を行った結果、ABS-1 を欠損した変異体 Scr3 (Scr3<sup>ΔABS-1</sup>: ABS-2 のみをもつ変異体 Scr3) は、ALG-2<sup>L52A</sup> 及び ALG-2<sup>F148S</sup> とは結合しなかったのに対し、ABS-2 を欠損した変異体 Scr3 (Scr3<sup>ΔABS-2</sup>: ABS-1 のみをもつ変異体 Scr3) は変異体 ALG-2 (ALG-2<sup>L52A</sup> 及び ALG-2<sup>F148S</sup>) と結合することがわかった (図 2-5)。

## 2-5. 考察

### 2-5-1. ALG-2 ダイマーに存在する ABM Type2 結合部位の予測

ALG-2/ALIX ペプチド複合体の結晶構造 (PDB code: 2ZNE) と Metapocket 2.0 の解析結果を比較した結果 (図 2-1), 7, 8 番目の  $\alpha$  ヘリックス周辺に存在する 2 個のポケット (橙) は, ABM Type1 の結合領域に相当していることがわかった。また, ダイマー形成できない変異体 ALG-2 (ALG-2<sup>Y180A</sup>) が, Ca<sup>2+</sup>依存的に Scr3 や Sec31A に結合できることから, ダイマー化によって形成される 2 個のポケット (紫) は, ABM Type 2 の結合領域ではないと考えられる。以上より, 2, 3 番目の  $\alpha$  ヘリックス間に存在するループ及び 1, 4 番目の  $\alpha$  ヘリックスによって形成されるポケット (青) が, ABM Type 2 の結合領域であると予想した。

### 2-5-2. ALG-2 モノマーに存在する ABM Type 2 結合領域の予測

ALG-2 モノマーの分子表面に存在する結合領域を探索した結果, 5 個のポケット (ID. 1-5) が同定された (表 2-1, 図 2-2)。ALG-2/ALIX ペプチド複合体の結晶構造 (PDB code: 2ZNE) から, ID. 1 と ID. 3 は ABM Type 1 の結合領域であることがわかった。また, ID. 5 はダイマー形成時に対称分子の  $\alpha 8$  が結合する領域であり, ABM Type2 の結合領域でないと予想した。これまでの知見から, 残りの ID. 2/ID. 4 (Pocket 3 と命名) が ABM Type2 の結

合領域であると予想した。

Pocket 3 は Ile, Val, Phe をはじめとする疎水性アミノ酸によって構成されており、疎水性度の高低によって色分け表示した分子表面図からも、Pocket 3 内部は高い疎水性を示していることが予想された。また、Pocket 3 の断面図から、Pocket 3 には奥行があり、ABM Type 2 ペプチドを格納するのに十分な体積があることを確認した (図 2-6)。

### 2-5-3. 結合シミュレーション解析

ALG-2 と Scr3\_ABM type 2 モデルペプチドの結合シミュレーションの結果から、両分子の結合自由エネルギーは安定した複合体を形成することが予想された。得られた複合体構造を解析した結果、ABM type 2 の結合に重要な ALG-2 のアミノ酸残基が同定された。主に EF1/EF2 にかけて存在するこれらのアミノ酸残基の多くは疎水性アミノ酸であり (L48, L52, F85, W89, I92, F148), 両分子の結合は疎水性相互作用が推進力となっていることが予想される。Scr3\_ABM type 2 ペプチドに注目した場合、Pro<sup>1</sup> と Phe<sup>5</sup> は ALG-2 のアミノ酸残基と多くの疎水性相互作用を形成しており、ALG-2 との結合に重要であると考えられた。

### 2-5-4. GSTプルダウン解析

L52 と F148 をそれぞれ Ala あるいは Ser に置換した変異体 ALG-2 は、ABM Type 1 をもたない Scr3<sup>ΔABS-1</sup> とは結合せず、ABM Type 1 をもつ Scr3<sup>ΔABS-2</sup> とのみ結合することを確認した。これまで、ABM Type 2 をもつタンパク質とのみ結合する ALG-2<sup>ΔGF122</sup> の存在は確認されていたが、ABM Type 1 のみと結合を示す変異体 ALG-2 を得ることができたことは非常に興味深い。この結果は、Pocket 3 が Scr3\_ABM Type 2 の結合領域であることを支持しており、L52 及び F148 の変異による構造変化が、Pocket 3 周辺の限られた領域でのみ起きていることを示唆している。

## 2-6. 結論

Metapocket2.0により, des3-20ALG-2\_Ca<sup>2+</sup> 結合型 (PDB code: 2ZN9) の分子表面に存在する ABM Type 2 の結合領域の探索を行った. その結果, 2, 3 番目の  $\alpha$  ヘリックス間に存在するループ及び 4 番目の  $\alpha$  ヘリックスによって構成される Pocket 3 を同定した. Autodock vina により, Scr3 から抽出したモデルペプチド: *N-acetyl-Pro<sup>1</sup>Ala<sup>2</sup>Pro<sup>3</sup>Gly<sup>4</sup>Phe<sup>5</sup>-amide* (Scr3\_ABM Type 2) と Pocket 3 の結合シミュレーション解析を行った結果, Scr3\_ABM Type 2 が Pocket 3 に結合することを支持する結果が得られた. コンピューター解析の結果の裏付けを得るため, Pocket 3 を構成するアミノ酸に変異を加えた ALG-2 (L52A, F148S) を調製し, GST-ブロードダウン解析により Scr3 への結合能を調べた. その結果, L52A, F148S 変異体 ALG-2 は, ABS-2 が欠損した GFP-Scr3 (GFP-Scr3 <sup>$\Delta$ ABS-2</sup>) とは結合し, ABS-1 を欠損させた GFP-Scr3 (GFP-Scr3 <sup>$\Delta$ ABS-1</sup>) とは結合を示さなかった. この結果は, Pocket 3 は Scr3\_ABM Type 2 の結合領域であることを強く示唆しており, ABM Type 1 と ABM Type 2 は異なる機構で ALG-2 に結合することが予想された.

**表2-1 ALG-2モノマー表面に存在するリガンド結合領域を構成するアミノ酸残基**

解析ソフトMetaPocket2.0により、Ca<sup>2+</sup>結合型ALG-2モノマー（PDB code : 2ZN9 [chain A]）表面に存在するリガンド結合領域を探索し、予想された5つのリガンド結合領域（ID. 1-5）を構成するアミノ酸残基を一覧にまとめた。

Predicted binding site ID	Amino acid residues in the predicted binding sites						Ranking in individual predictor	
1	F122	G123	Y124	R125	L126	S127		
	F130	I133	L134	K137	F138	Q153	GHE-1	SFN-1
	G154	I156	V157	L158	Q159	R160	LCS-1	FPK-1
	L161	T162	D163	I164	F165	R166	PCS-2	PAS-2
	D169	D171	Q172	D173	G174	W175	QSF-1	CON-1
	I176	V178	Y183	M186	V187	F188		
	S189							
2	L52	S53	N54	G55	T56	F60	FPK-3	QSF-2
	I92	Q96	N97	F99	R100	D103	PAS-1	SFN-2
	N106	S107	G108	M109	A147	F148	GHE-3	
3	W95	L119	F122	G123	Y124	G154	FPK-	PCS-1
	C155	L158	Q159	T162	D163	R166		
	R167							
4	F27	V31	V35	L48	A51	L52	LCS-2	GHE-2
	S53	N54	F60	F85	V88	W89		
	I92	T93	Q96	F148				
5	W175	I176	Q177	V178			SFN-3	



表2-2 ALG-2とScr3\_ABM Type 2モデルペプチドの結合

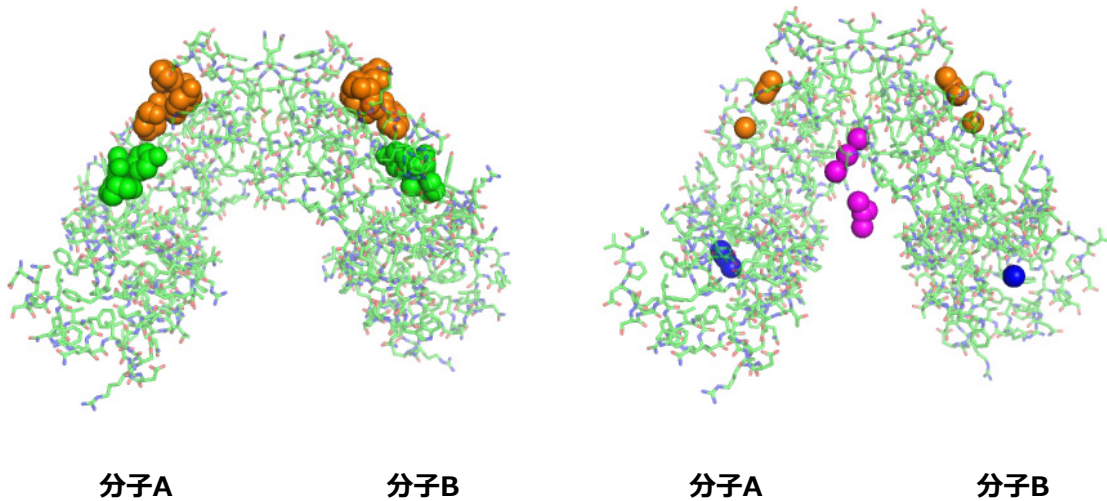
Interaction atoms in peptide		Interacting atoms in ALG-2	Distance(Å)
<b>Hydrophobic</b>			
ACE	C *	CE2 <sup>F99</sup>	3.7
	C *	CA <sup>G108</sup>	3.6
Pro1	CG	CB <sup>Q96</sup>	3.9
	CB	CG <sup>Q96</sup>	3.7
	CG	CG <sup>Q96</sup>	3.9
	CA	CD2 <sup>F148</sup>	3.9
	CB	CD2 <sup>F148</sup>	3.5
	CB	CE2 <sup>F148</sup>	3.8
	CB	CG <sup>F148</sup>	3.7
Ala2	CA	CB <sup>S53</sup>	3.5
	CB	CB <sup>S53</sup>	3.5
Phe5	CZ	CD1 <sup>L48</sup>	3.8
	CE2	CB <sup>A51</sup>	3.6
	CD2	CD2 <sup>L52</sup>	3.8
	CE2	CD2 <sup>L52</sup>	3.7
	CZ	CD2 <sup>L52</sup>	3.9
	CE1	CE1 <sup>F85</sup>	3.8
	CZ	CE1 <sup>F85</sup>	3.5
	CZ	CZ <sup>F85</sup>	3.7
	CD1	CD1 <sup>W89</sup>	3.8
	CE1	CA <sup>W89</sup>	3.8
	CB	CG2 <sup>I92</sup>	3.7
	CD1	CG2 <sup>I92</sup>	3.6
	CG	CG2 <sup>I92</sup>	3.8
<b>Hydrogen bond</b>			
Pro1	O	OG <sup>S53</sup>	3.1
Ala2	O	NE2 <sup>Q96</sup>	3.1
Phe5	O	OG1 <sup>T93</sup>	3.0
NH2	N	OE1 <sup>Q96</sup>	3.0

\* Carbon atom from methyl moiety of acetyl group.

**A** ALG-2/ALIXペプチド複合体

**B** 予測されたリガンド結合領域

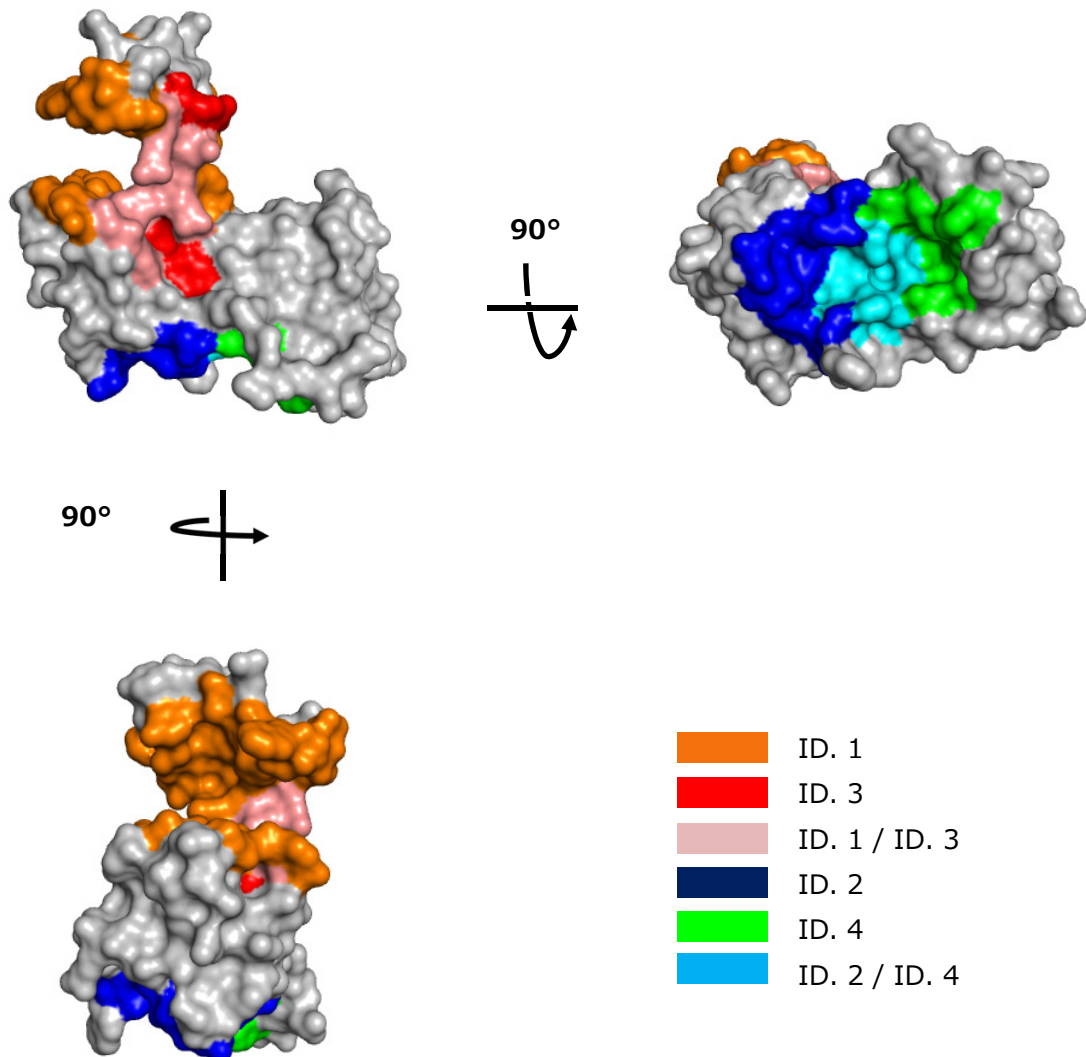
1-QGPPYPTYPGYPGYSQ-16



**図2-1 ALG-2ダイマー表面に存在するリガンド結合領域の探索**

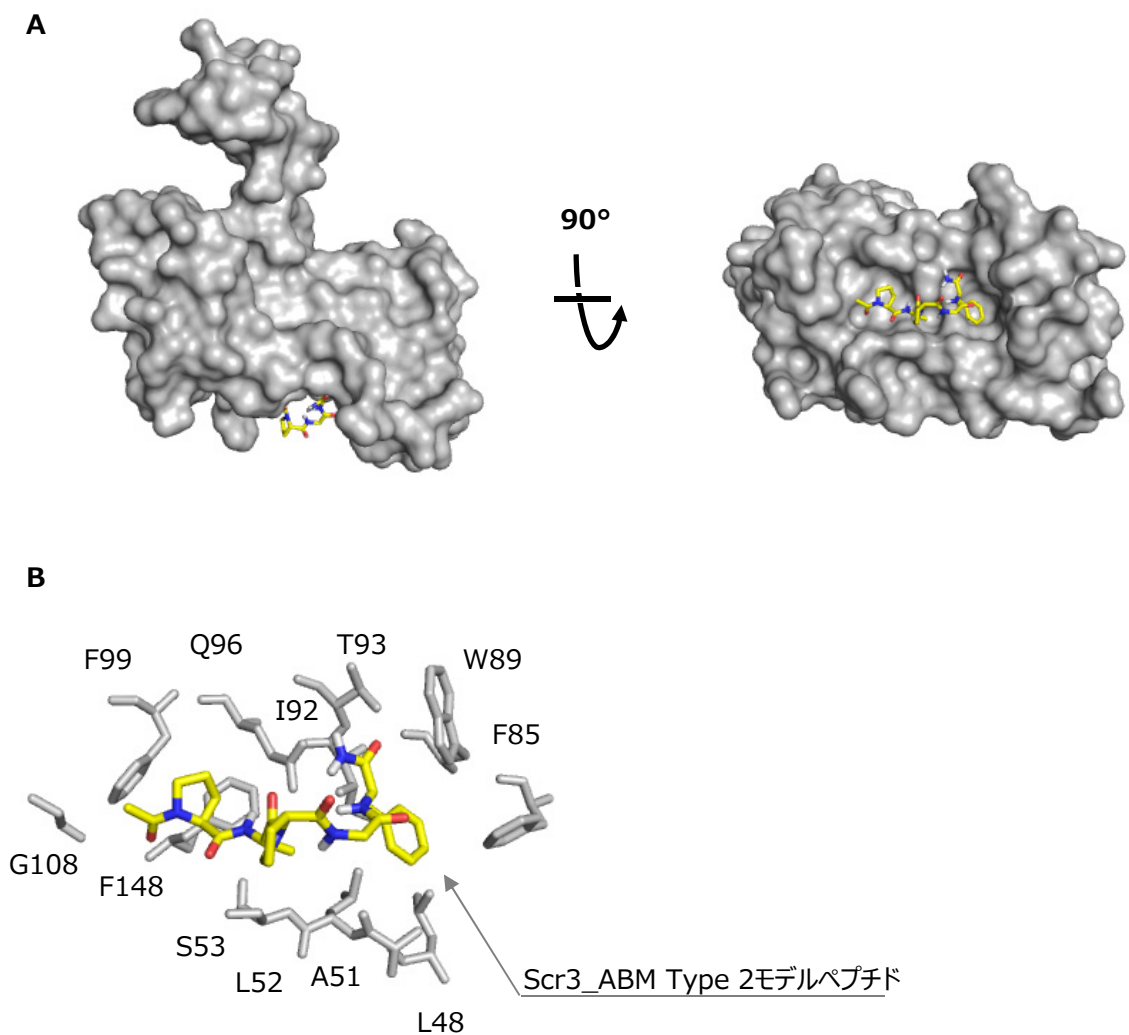
(A) ALG-2/ALIXペプチド複合体結晶構造モデル (PDB code : 2ZNE) のChain Dを改変し, ALG-2を棒モデル, ALIXペプチドのABM Type 1を球モデル (橙 : PPYP, 緑 : YP) で描写した.

(B) 解析ソフトMetaPocket2.0により, Ca<sup>2+</sup>結合型ALG-2ダイマー (PDB code : 2ZN9) 表面に存在するリガンド結合領域を探索して球モデルで描写した.



**図2-2 ALG-2モノマー表面に存在するリガンド結合領域**

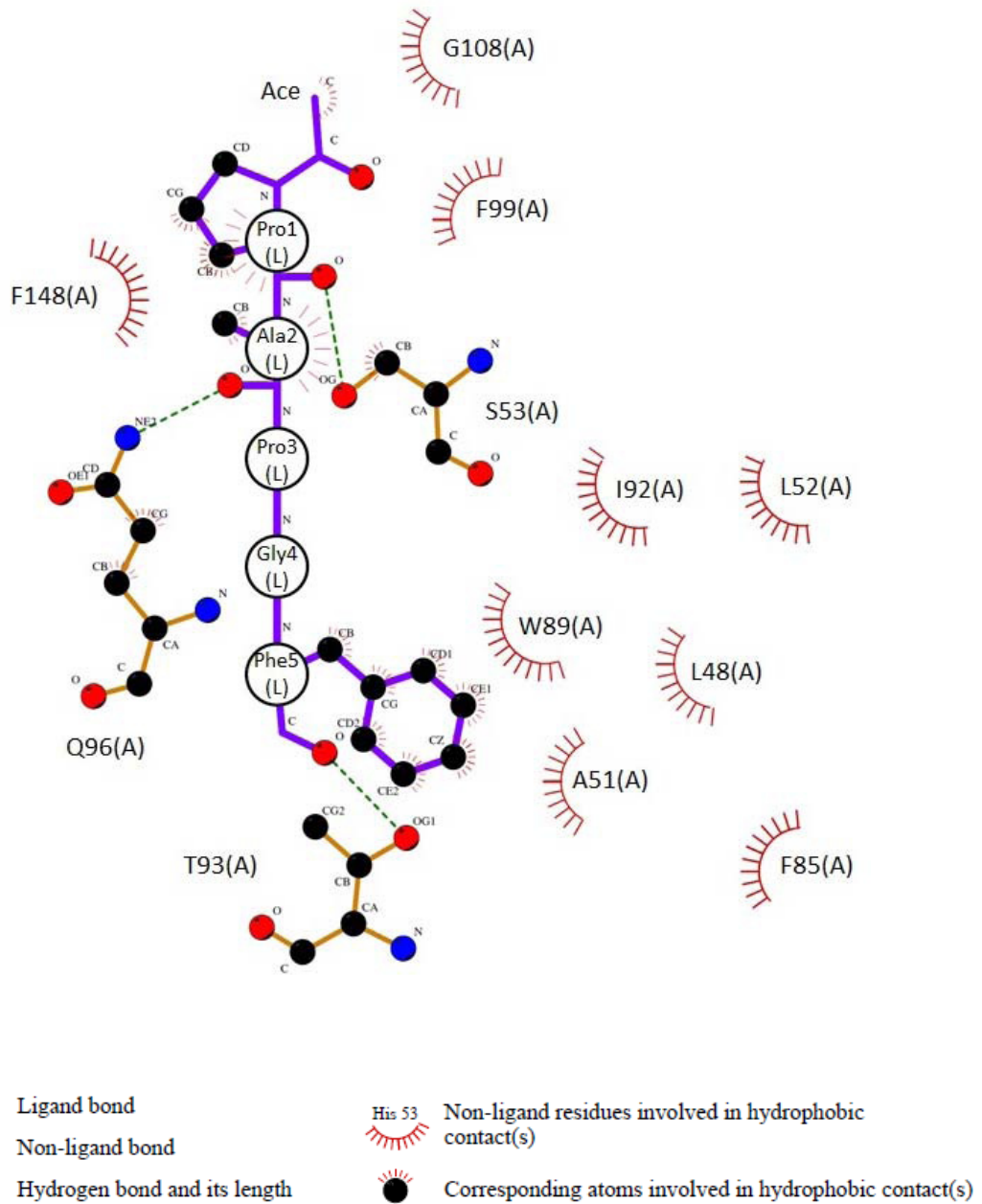
解析ソフトMetaPocket2.0が予想したCa<sup>2+</sup>結合型ALG-2モノマー（PDB code：2ZN9 [chain A]）表面のリガンド結合領域（ID. 1-4）を色分け表示した表面モデルを描写した（橙：ID. 1, 赤：ID. 3 桃：ID. 1 / ID. 3共通, 青：ID. 2, 緑：ID. 4, 水色：ID. 2 / ID. 4共通）



### 図2-3 ALG-2とScr3\_ABM Type 2モデルペプチドの結合シミュレーション

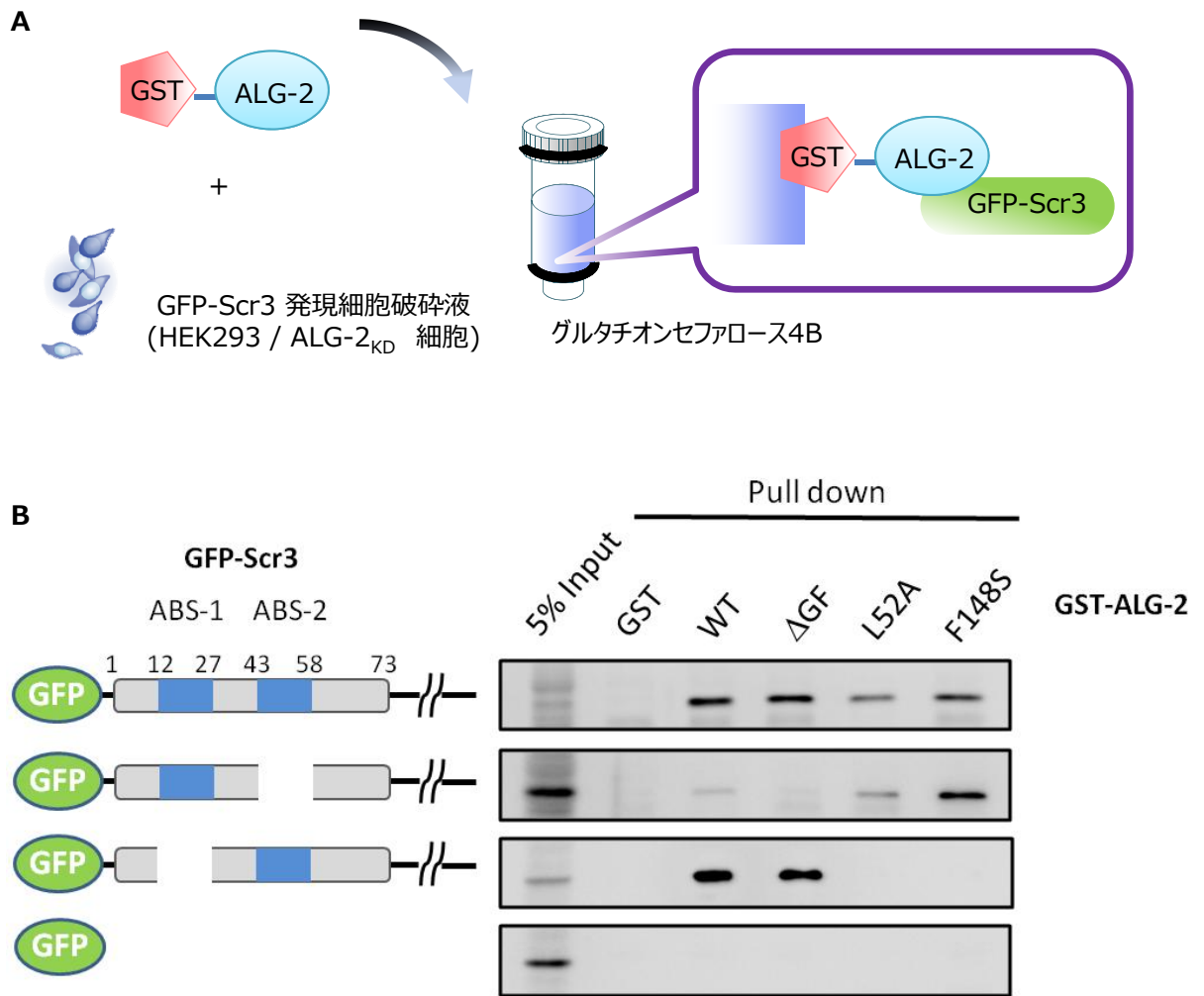
(A) 解析ソフトAutoDock Vinaにより、ALG-2 (PDB code : 2ZN9 [chain A]) とScr3\_ABM Type 2モデルペプチド (*N*-acetyl-Pro<sup>1</sup>Ala<sup>2</sup>Pro<sup>3</sup>Gly<sup>4</sup>Phe<sup>5</sup>-amide) の結合をシミュレーションし、ALG-2を表面モデル、Scr3\_ABM Type 2モデルペプチドを棒モデルで描写した。

(B) ALG-2/Scr3モデルペプチド複合体で、Scr3\_ABM Type 2モデルペプチドと相互作用しているALG-2のアミノ酸残基を抽出して棒モデルで描写した。



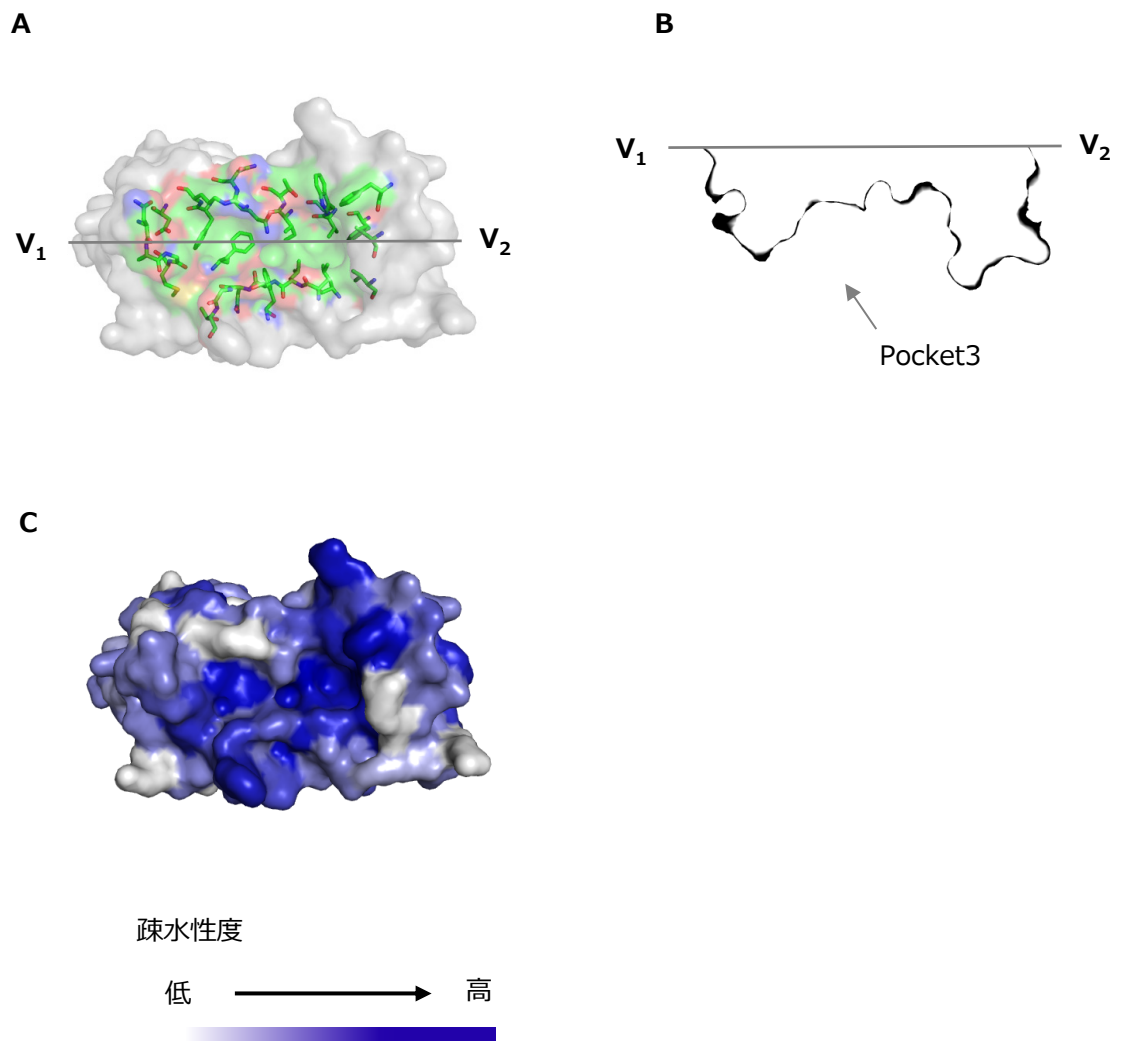
**図2-4 ALG-2とScr3\_ABM Type 2モデルペプチドの結合図**

解析ソフトLigplotにより, ALG-2とScr3\_ABM Type 2モデルペプチドの結合を解析した. ALG-2のアミノ酸残基を(A), Scr3\_ABM Type 2モデルペプチドのアミノ酸残基を(L)で標識し, 炭素原子, 酸素原子及び窒素原子を黒丸, 赤丸, 青丸で示した. 水素結合を形成している原子を緑色の破線で結び, 分子間で疎水性相互作用を形成している原子をとげのついた半円で表示した.



**図2-5 アミノ酸置換変異体ALG-2によるGFP-Scr3のプルダウン解析**

(A) ALG-2を固定したセファロースビーズとGFP-Scr3を発現したHEK293/ALG-2<sub>KD</sub>細胞破碎液を混合し、プルダウン解析を行った。(B) ALG-2<sup>WT</sup>, Gly<sup>121</sup>Phe<sup>122</sup>を欠損した選択的スプライシングアイソフォーム (ALG-2 <sup>$\Delta$ GF</sup>), Leu<sup>52</sup>をAlaに置換した変異体ALG (ALG-2<sup>L52A</sup>) 及びPhe<sup>148</sup>をSerに置換した変異体ALG-2 (ALG-2<sup>F148S</sup>) を固定したセファロースビーズを用いて、100  $\mu$ M Ca<sup>2+</sup>存在下でGFP-Scr3<sup>WT</sup>, ABS-2を欠損したGFP-Scr3 (GFP-Scr3 <sup>$\Delta$ ABS-2</sup>) 及びABS-1を欠損したGFP-Scr3 (GFP-Scr3 <sup>$\Delta$ ABS-1</sup>) のプルダウン解析を行った。抗GFP抗体を用いたウェスタンブロットティング法により、セファロースビーズに結合したタンパク質を解析した。



**図2-6 ALG-2に存在するPocket 3の表面構造**

(A) Pocket 3の表面構造を半透明な表面モデルと棒モデルで描写した（緑：炭素原子，赤：酸素原子，青：窒素原子）（B） $V_1$ - $V_2$ に沿って切断したPocket 3の断面図を描写した。（C）疎水性度が低い領域を白色，高い領域を青色で色分けし，Pocket 3の表面モデルを描写した。

## 第3章

### ALG-2 と COP II 小胞被覆構成因子 Sec31A の結合領域ペプチド (Sec31A\_ABM Type 2 ペプチド) との複合体の X 線結晶構造解析

#### 3-1. 要約

これまでに、2種類の ALG-2 結合モチーフが同定されている。第一に ALIX などで見られる ABM Type 1 (PXYPXnYP;X, variable; n=4), 第二に Sec31A などで見られる ABM Type 2 (PXPGF;X, variable) である。これまでに、ALG-2/ALIX ペプチド複合体の結晶構造が解析され、ABM Type 1 と ALG-2 の結合機構は明らかになっている。その一方で、ABM type 2 と ALG-2 の詳細な結合機構は不明である。

そこで私は、des3-20ALG-2/Sec31A ペプチド複合体 (以後、ALG-2/Sec31A ペプチド複合体と省略) の X 線結晶構造解析を行い、ALG-2 と ABM Type 2 の結合機構の解析を進めた。その結果、ABM Type 1 と ABM Type 2 は ALG-2 の異なる領域に結合しており、ABM Type 2 の結合領域は、第2章で予想した Pocket 3 と一致していた。また生化学実験の結果から、ABM type 2 の結合領域: Pocket 3 を構成するアミノ酸のひとつである Phe<sup>85</sup> を Ala に置換した変異体 ALG-2 は、ALIX への結合能を保持したまま、Sec31A と結合しなくなることを確認した。これらの結果から、ALG-2 は ABM Type 1 と ABM Type 2 を異なる領域で認識して結合していると結論付けた。また、ABM Type 2 及びその周辺のアミノ酸を置換した ALG-2 結合ペプチドと ALG-2 の結合解析の結果から、これまで PXPGF (X, variable) とされていた ABM Type 2 を新しく定義した。



## 3-2. 序論

ALG-2 と Scr3\_ABM Type 2 の結合シミュレーション解析と生化学実験の結果から, ABM Type 2 の結合が予想される ALG-2 の領域 Pocket 3 を推定した[第 2 章参照]. 続いて私は, ABM Type 2 を含むペプチドと ALG-2 複合体の結晶を調製し, X 線回折実験により両者の結合機構を詳細に解析することにした.

まず初めに, Scr3 から派生した ABM Type 2 を含むペプチド (Scr3\_ABM Type 2 : 43 - PAPAPGFALFPSPGPV - 58) と ALG-2 複合体の結晶化を試みた. 2-メチルペンタン-2,4-ジオール (MPD : 2-Methyl-2,4-pentanediol) を含む結晶化溶液により, 結晶を調製できたものの, X 線回折実験ではペプチドの存在を示すデータを得ることは出来なかった. そこで, Scr3\_ABM Type 2 よりも ALG-2 と強い結合を示す Sec31A\_ABM Type 2 に注目し, 研究を進めることにした.

Sec31A は Sec13 と複合体を形成して, COPII 小胞の最外層を形成するタンパク質である. 細胞膜やエンドソームで機能するタンパク質や, 細胞外に分泌されるタンパク質は小胞体で合成された後, 小胞輸送と呼ばれる機構によって目的地に運ばれる. 輸送初期の段階で, 小胞体とゴルジ体間の輸送を担うのが直径 50-60 nm の COPII 小胞である. COPII 小胞は, 以下に示す段階的な反応により形成される. 初めに, グアニンヌクレオチド交換因子 (GEF) Sec12 の働きにより, 低分子量 GTPase である Sar1 が GDP 結合型から GTP 結合型に変換されることで一連の反応が開始される. GTP 結合型になった Sar1 は, N 末端の両親媒性ヘリックスを分子表面に露出し, ER 膜に結合可能となる. ER 膜に移行した Sar1 は, Sec13/16 と協調してサイトゾル中の Sec23/24 複合体及び積み荷タンパク質に結合し, 前出芽 (pre-budding) 複合体を形成する. その後, Sec13/31 複合体が前出芽複合体を架橋することで, ER 膜上に COPII コートが形成される. ある程度の大きさに成長した COPII コートは, ER 膜上に存在する小胞体出口部位 (ER exit site, ERES) から, ゴルジ体に向けて COPII 小胞として出芽する (図 3-1).

これまでに, ALG-2 が  $\text{Ca}^{2+}$  依存的に Sec31A と結合することで, COPII の挙動を制御していることが報告されている[Shibata et al., 2010, 2014 ; Helm et al., 2014]. しかし, 両者の結合機構については謎が多く, 原子レベルで両者の結合機構は解析されていなかった. そこで私は, ALG-2 と Sec31A\_ABM Type 2 を含むペプチド複合体構造を X 線結晶構造解析により解析し, ALG-2 と ABM Type 2 の結合機構を研究することにした.

### 3-3. 材料と方法

#### 3-3-1. 材料 (プラスミド)

- |                           |                          |
|---------------------------|--------------------------|
| 1) pGEX-4T-3              | 2) pGEX-4T-3_ALG-2       |
| 3) pGEX-4T-3_ALG-2_L52A   | 4) pGEX-4T-3_ALG-2_S53G  |
| 5) pGEX-4T-3_ALG-2_W89A   | 6) pGEX-4T-3_ALG-2_I92A  |
| 7) pGEX-4T-3_ALG-2_Q96A   | 8) pGEX-4T-3_ALG-2_F148S |
| 9) pET4d imp_des3-20ALG-2 | 10) pGEX 4T-3 ALG-2 ΔGF  |
| 11) pEGFP-C1              | 12) hPLSCR3/pEGFP-C1     |
| 13) pEGFP-PLSCR3-Δ12-27   | 14) pEGFP-PLSCR3-Δ43-58  |

#### 3-3-2. 材料 (プライマー)

- 1) pGEX-4T-3\_ALG-2\_L52A 構築用  
hALG-2\_L52A\_f : 5'-gcttcagcaagctgcctccaacggcacgtg- 3'  
hALG-2\_L52A\_r : 5'-cacgtgccgttgaggcagcttctgaagc- 3'
- 2) pGEX-4T-3\_ALG-2\_L53G 構築用  
hALG-2\_S53G\_f : 5'-cttcagcaagctctcggcaacggcacgtgg- 3'  
hALG-2\_S53G\_r : 5'-ccacgtgccgttgccgagagcttctgaag- 3'
- 3) pGEX-4T-3\_ALG-2\_W89A 構築用  
hALG-2\_W89A\_f : 5'-gagttcacgggtgtggcgaagtacatcacggac- 3'  
hALG-2\_W89A\_r : 5'-gtccgtgatgtacttcgccacaccctgaactc- 3'
- 4) pGEX-4T-3\_ALG-2\_I92A 構築用  
hALG-2\_I92A\_f : 5'-gtgtgtggaagtacgccacggactggcagaac- 3'  
hALG-2\_I92A\_r : 5'-gttctgccagtccgtggcgtacttccacacac- 3'
- 5) pGEX-4T-3\_ALG-2\_Q96A 構築用  
hALG-2\_Q96A\_f : 5'-gtacatcacggactggggaacgtcttccgc- 3'  
hALG-2\_Q96A\_r : 5'-gcggaagacgttcgccagtcctgatgtac- 3'
- 6) pGEX-4T-3\_ALG-2\_F148S 構築用  
hALG-2\_F148S\_f : 5'-gggcagatgccagcgcagacttcatccag- 3'  
hALG-2\_F148S\_r : 5'-tggatgaagtcgtcgtggcgatctgccc- 3'

#### 3-3-3. 材料 (抗体 : 一次抗体)

- 1) ウサギ抗 Sec31A pAb  
(50 倍希釈, Shibata et al., 2015)
- 2) ウサギ抗 Alix pAb  
(500 倍希釈, Shibata et al., 2007)

- 3) ウサギ抗 Scramblase 3 pAb  
(1000 倍希釈, Shibata et al., 2008)
- 4) マウス抗 GFP mAb  
(1000 倍希釈, Santa Cruz Biotechnology : GFP SC-9996)

#### 3-3-4. 材料 (抗体 : 二次抗体)

- 1) POD-ヤギ抗ウサギ pAb  
(2000 倍希釈, Jackson ImmnoReserch Laboratories)
- 2) POD-ヤギ抗マウス pAb  
(2000 倍希釈, Jackson ImmnoReserch Laboratories)
- 3) POD-マウス抗ヤギ pAb  
(2000 倍希釈, Jackson ImmnoReserch Laboratories)

#### 3-3-5. 材料 (結晶化用ペプチド)

- 1) Sec31A\_ABM Type2 ペプチド : NH<sub>2</sub>- NPPPPGFIMHGN - COOH  
(純度 > 90 %, GL Biochem, Shanghai Ltd.)

#### 3-3-6. 方法 (des3-20ALG-2 発現)

BL21 (DE3) pLysS/pET3d improve des3-20hALG-2 [Suzuki et al., 2008]を 10 mL LB+Amp 液体培地に植菌し, 37°Cで一晩振とう培養した (前培養). 菌液をオートクレーブ済みの 1 L LB+Amp 液体培地で希釈し, OD<sub>600</sub> が約 0.5 になるまで 30°Cで振とう培養した. その後, IPTG (終濃度 0.2 mM) を加え, 37°Cで 3 時間振とう培養し, 目的タンパク質を発現させた (本培養). 培養液を 7000 rpm, 5min, 4°Cの条件で遠心分離し, 大腸菌を回収した. 大腸菌に生理食塩水を加えて懸濁し, 3200 rpm, 20 min, 4°Cで再度遠心分離することで, 大腸菌に付着した不純物を洗浄した. 洗浄した菌体を-80°Cで一晩冷凍保存した.

#### 3-3-7. 方法 (des3-20ALG-2 精製)

氷上で菌体を凍結融解した後に, Lysis 緩衝液 (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 50 mM NaCl, 0.05 mM EDTA, 5 mM 2-mercaptoethanol, 2 mM PMSF, 5 mM Benzamidine) を加えて, 氷上で数分間静置した. 続いて, 超音波により大腸菌を破碎し, Triton-X100 を終濃度 0.1%になるように加え (全細胞抽出画分), 12,000 rpm, 15 min, 4°Cの条件で遠心分離した. 上清を回収して 0.45 μm フィルターで濾過し, CaCl<sub>2</sub> を終濃度 150 mM になるように添加した (上清画分). 平衡化緩衝液 (20 mM Tris-HCl pH7.5, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.1% Triton-X100) で平衡化した

Scr3\_ABS2 ペプチド固定化カラム[Shibata et al., 2008]に、濾過した上清を流して des3-20ALG-2 をカラムに捕捉した。各洗浄用緩衝液で順番にカラムを洗浄し①平衡化緩衝液 5 mL, ②wash 2 緩衝液 (20 mM Tris-HCl pH7.5, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 M NaCl 5 mL), ③wash 3 緩衝液 (20 mM Tris-HCl pH7.5, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.1 M NaCl), 5 mL 溶出緩衝液 (20 mM Tris-HCl pH7.5, 5 mM 2-mercaptoethanol, 1 mM EGTA) によりカラムから des3-20ALG-2 を溶出した。溶出画分に含まれるタンパク質を SDS-PAGE により展開し, des3-20ALG-2 が存在する溶出画分 (E<sub>3</sub>-E<sub>5</sub>) を回収した (図 3-2)。回収した溶液を 2 L 透析用緩衝液 (20 mM Tris-HCl pH7.5, 10 μM EDTA, 10 μM EGTA) で 4°C, 2 時間透析した。その後, 透析用緩衝液を新しい透析用緩衝液に交換して引き続き 4°C で一晩透析した。

透析により緩衝液を置換したタンパク質溶液を, Amicon Ultra (遠心式フィルタユニット, Millipore) により 2 mL まで濃縮し, 平衡化緩衝液 (10 mM Tris-HCl pH7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA) で平衡化された Superdex75 カラム (1.6×60 cm, Pharmacia Biotech) により不純物の除去と緩衝液の置換を行った。des3-20ALG-2 が含まれる溶出画分 (画分 19-22) を回収し (図 3-3), 2 L 透析緩衝液 (20 mM Tris-HCl, pH7.5, 10 μM EDTA, 10 μM EGTA) で 4°C, 2 時間透析した。その後, 透析用緩衝液を新しい透析用緩衝液に交換して引き続き 4°C, 一晩透析した。透析後の溶液を Amicon Ultra (遠心式フィルタユニット, Millipore) により 11mg/mL まで濃縮し, 結晶化に用いるタンパク質溶液とした。

### 3-3-8. 方法 (結晶化条件の初期スクリーニング)

大腸菌から精製した des3-20ALG-2 (11 mg/mL) と Sec31A\_ABM Type 2 ペプチド (837-848 a.a.) を 1 : 2 (モル比) で混合した溶液を調製した。まず, 市販されているスクリーニングキットを用いて, シッティングドロップ蒸気拡散法により結晶化初期条件の検索を行った。なお, 結晶化初期条件のスクリーニングは, タンパク質結晶化システム PXS [Hiraki et al., 2006]にて実施した。その結果, 結晶化が見込める結晶化溶液として, 以下に示す 4 種に絞り込んだ (図 3-4A)。

① MembFac #1 :

12% v/v 2-Methyl-2,4-pentanediol (MPD) , 0.1 M Sodium Acetate trihydrate pH4.6, 0.1 M Sodium Chloride

② PEGIon2 #44 :

0,02 M Zinc chloride, 20 % w/v PEG 3350

③ CrystalScreen #30 :

30 % w/v PEG 8000, 0.2 M Ammonium Sulfate

④ CrystalScreen2 #6 :

1.0 M Imidazole pH7.0

### 3-3-9. 方法（結晶化条件の精密化）

ハンギングドロップ蒸気拡散法により，結晶化初期条件のスクリーニング結果を参考にして，結晶化条件の精密化を行った．その結果，PEG8000 及び MPD を沈殿剤に用いることで，良質な結晶を得る事ができた．但し，両条件には大きな違いがみられ，PEG8000 を沈殿剤に用いた場合には，結晶化溶液に  $Zn^{2+}$  が含まれると結晶は成長しなかったのに対し，MPD を沈殿剤に用いた場合には，結晶化溶液に  $Zn^{2+}$  が存在する条件でのみ結晶が成長した．Sec31A\_ABMTYPE 2 は， $Ca^{2+}/Zn^{2+}$  依存的に ALG-2 に結合することを鑑みて，MPD を沈殿剤に用いて作製した結晶を（図 3-4B），続く X 線回折実験に用いることにした．

### 3-3-10. 方法（X 線回折実験）

ナイロン製のループ（Hampton）を用いて結晶を掬い，溶液 A（100 mM Cacodylate 緩衝液 pH6.0, 20% MPD, 50 mM Zinc Acetate, 10 % glycerol），溶液 B（100 mM Cacodylate 緩衝液 pH6.0, 20% MPD, 50 mM Zinc Acetate, 20 % glycerol）の順に浸すことで抗凍結処理を行った．高エネルギー加速器研究機構（KEK）の放射光科学研究施設，Photon Factory（PF）AR-NE3A にて X 線回折実験を行なった．100 K の条件下で，1.2821 Å の単波長光を用いて測定を行い，検出器には ADSC Quantum270（detector Type : CCD），分光器は Si（111）結晶分光器を使用した．ビームライン制御プログラムは Ugui を採用した．

### 3-3-11. 方法（ALG-2/Sec31A ペプチド複合体のモデル構築）

回折データの積分およびスケーリングは HKL2000 パッケージ [Otwinowski et al., 1997] を用いて行い，位相は分子置換法により決定した．分子置換法に使用したソフトウェア及び構造モデルは，MOLREP [Vagin et al., 2010]，Crystal Structure of  $Ca^{2+}$ -free form of des3-20ALG-2（PDB code : 2NND）である．REFMAC5 [Murshudov et al., 1997]，Phenix\_refine [Afonine et al., 2012] 及び COOT [Emsley et al., 2004] を用いて構造の精密化を行った．なお，すべての構造データは PyMOL を用いて描写した．タンパク質表面の疎水性度は rTool 0.7.2 [Kristian et al., 2007] のプログラムを追加した PyMOL により解析し，ALG-2 と Sec31A ペプチドの結合自由エネルギーは，FastContact [Camacho et al., 2005] により計算した．

### 3-3-12. 方法（ALG-2 変異体構築 PCR 反応）

過去に作成された GST 融合 ALG-2 プラスミド（pGEX-4T-3/hALG-2） [Shibata et al., 2007] と，ALG-2 変異体構築用プライマーを含む PCR 反応液を調製し，PCR 反応により目的遺伝子を増幅した．

### PCR 反応液

	Volume (μL)
Template DNA (10 ng/μL)	0.5
Forward primer (10 μM)	1.0
Reverse primer (10 μM)	1.0
KOD plus	0.4
10x KOD 緩衝液	2.5
2 mM dNTP	2.5
25 mM MgSO <sub>4</sub>	1.5
Distilled water	15.6
Total	25.0

### PCR の反応条件

Cycle	Temperature	Time
1	95°C	30 sec
	95°C	30 sec
16	55°C	1 min
	95°C	11 min
1	4°C	∞

### 3-3-13. 方法 (変異体 ALG-2 発現)

PCR 産物に含まれる大腸菌由来のプラスミドを *DpnI* (タカラバイオ) により処理し、目的遺伝子を pGEX-4T-3 に組み込んだ。その後、ヒートショック法により、作製したプラスミドを大腸菌 DH5α のコンピテントセルに導入し、LB+Amp 寒天培地で培養した。培養した大腸菌から目的のプラスミドを抽出し、目的とする塩基配列であることを確認した。ヒートショック法により、作製したプラスミドを BL21 (DE3) pLysS に導入し、GST 融合変異体 ALG-2 発現大腸菌株を作製した。

形質転換した大腸菌 BL21 (DE3) pLysS を 2 mL LB+Amp 液体培地に植菌し、37°C で一晩振とう培養した (前培養)。その後、菌液をオートクレーブ済みの 200 mL LB+Amp 液体培地で希釈した。OD<sub>600</sub> が約 0.5 になるまで 30°C で振とう培養した後 (前培養)、IPTG (終濃度 0.2 mM) を加え、37°C で 3 時間振とう培養した (本培養)。培養液を 7000 rpm, 5 min, 4°C の条件で遠心分離し、大腸菌と培地を分離した。回収した大腸菌に生理食塩水を加えて懸濁し、3200 rpm, 20 min, 4°C で再度遠心分離した。生理食塩水で洗浄した菌体を -80°C で一晩冷凍保存した。

### 3-3-14. 方法 (GST 融合変異体 ALG-2 精製)

氷上で凍結融解を行い, Lysis 緩衝液 (20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 100 mM NaCl, 1.0 mM EDTA, 5 mM 2-mercaptoethanol, 2 mM PMSE, 5 mM Benzamidine) を加え, 氷上で数分静置した. その後, 超音波破碎を行い, Triton-X100 を終濃度 0.1% になるように加え全細胞抽出画分のサンプリングを行い, 12,000 rpm, 15 min, 4°C で遠心分離を行った. 0.45 µm フィルター (Millipore) により上清をろ過し, ろ液に Lysis 緩衝液で平衡化したグルタチオンセファロースビーズ (GE healthcare) を添加し, 4°C 一晩回転混合した. その後, 各種洗浄用緩衝液を順番にカラムに流してビーズを洗浄し①wash1 緩衝液 (Tris-HCl, pH 8.0, 100 mM NaCl, 0.1 % Triton-X100) 5 mL, ②wash1 緩衝液 (Tris-HCl, pH 8.0, 100 mM NaCl) 5 mL, 溶出用緩衝液 (100 mM Tris-HCl, pH 8.0, 20 mM 還元型 glutathione) により, GST-変異体 ALG-2 を溶出した. 溶出画分に含まれるタンパク質を SDS-PAGE で展開し, 目的タンパクが含まれる溶出液のみを回収した. 回収した溶出画分を, 2 L 透析用緩衝液 (20 mM Tris-HCl pH7.5, 10 µM EDTA, 10 µM EGTA) で 4°C, 2 時間透析した. その後, 透析用緩衝液を同じ組成の新しい透析用緩衝液に交換して 4°C, 一晩引き続き透析して緩衝液を置換した.

20 mM Tris-HCl, pH 8.0 で平衡化した, 50 µL グルタチオンセファロース 4B (GE healthcare) に, 精製した GST, GST-ALG-2, GST-変異体 ALG-2 を 25 µg 加えて, 4°C で 2 時間回転混合して各タンパク質をビーズに固定した. 遠心分離 (3000 rpm, 3 min) によりビーズを回収し, 20 mM Tris-HCl pH 8.0 を用いてビーズの洗浄を行った.

### 3-3-15. 方法 (GST プルダウン解析)

以下に示す組成の培地を 9 cm の細胞培養ディッシュに調製し, 5% CO<sub>2</sub>, 37°C の条件下にて. RNA 干渉法により ALG-2 の発現を抑制した HEK293 (HEK293/ALG-2<sub>KD</sub>) [Okumura et al., 2009] を培養した.

Dulbecco's modified Eagle's medium : DMEM 培地

	最終濃度
ウシ胎児血清 (Fetal bovine serum, FBS)	10 %
ペニシリン	100 µg/mL
ストレプトマイシン	100 units/mL
L-グルタミン	4 mM

変異体タンパク質を発現させる場合には, 細胞を播種してから 48 時間後に, 目的タンパク質をコードするプラスミドをリン酸カルシウム法により HEK293/ALG-2<sub>KD</sub> に導入し, 6 時間培養後, 培地を交換して引き続き同条件で培養した.

細胞培養ディッシュ全体に細胞が育った後, アスピレーターで培地を吸引除去し, PBS

(137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1.5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH7.4) を用いて細胞表面をリンス洗浄した。細胞培養ディッシュに再度PBSを加え、ピペッティングすることにより細胞をはがした。エッペンドルフチューブに細胞を回収し、1 mL Lysis 緩衝液 (20 mM HEPES-NaOH pH 7.4, 142.5 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2% Nonidet P-40, 0.1 mM Pefabloc, 3 µg/mL leupeptin, 1 µM E-64, 1 µM pepstatin, 0.1 mM phenylmethyl sulfonyl fluoride) を加え、4°Cで20 分間回転混合することで細胞破碎した。14,000 rpm, 10 min, 4°Cの条件で細胞破碎液を遠心分離し、上清をエッペンドルフチューブに採取した。回収した上清にCaCl<sub>2</sub> (最終濃度100 µM) あるいはEGTA (最終濃度5 mM) と、前項で作製した50 µL GST, GST-ALG-2, GST-変異体ALG-2固定化ビーズを加えて、4°Cで一晩回転混合した。3000 rpm, 3 min, 4°Cで遠心分離してビーズを回収し、Lysis 緩衝液を用いてビーズを洗浄した。

洗浄後のビーズに 50 µL 1x SDS Sample 緩衝液 (62.5 mM Tris-HCl pH6.8, 2% SDS, 10%w/v glycerol, 5% 2-mercaptoethanol, 0.001% BPB) を添加し、ビーズに吸着しているタンパク質を SDS-PAGE により展開した。エレクトロニックトランスファー法により、PVDF 膜 (Immobilon-P, Merck Millipore, Billerica, MA) にタンパク質を転写し、スキムミルクを用いて PVDF 膜をブロッキング処理した。観察したいタンパク質に特異的に結合する一次抗体と、POD 標識された二次抗体を用いて PVDF 膜上のタンパク質を標識し、化学発光法により検出した。検出試薬は、Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Fisher Scientific) , 検出器は LAS-3000mini (富士フィルム) を使用した。

### 3-3-16. 方法 (ファーウェスタン解析)

前述の方法に準じて、GST を融合した ALG-2 結合ペプチドを精製した。SDS-PAGE により展開したタンパク質を、エレクトロニックトランスファー法により PVDF 膜に転写し、reversible protein stain kit (Thermo Fisher Scientific) を用いて染色した。EPSON GT-X970 (セイコーエプソン) により染色した PVDF 膜の画像を取り込んだ後に、PVDF 膜を脱色した。以前報告された手順[Suzuki et al., 2008 ; Sasaki-Osugi et al., 2013]に従い、ビオチン標識された ALG-2 を用いて膜上の ALG-2 結合ペプチドを標識し、化学発光法により検出した。検出試薬は、Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Fisher Scientific) , 検出器は LAS-3000mini (富士フィルム) を使用した。



## 3-4. 結果

### 3-4-1. X線回折実験

結晶化溶液（100 mM Cacodylate 緩衝液 pH 6.0, 20% MPD, 50 mM Zinc Acetate）を用いて調製した ALG-2/Sec31A ペプチド複合体の結晶は、六方晶系（P6<sub>4</sub>）の双晶（twin crystal）であった。PF AR-NE3 にて回折データを収集し、ALG-2/Sec31A ペプチド複合体のモデル構造を構築した。精密化後の ALG-2/Sec31A ペプチド複合体モデルの R<sub>work</sub>/R<sub>free</sub> 値は、21.8/ 29.6 であった。詳細な回折データ及び精密化の統計値については、表 3-1 にまとめた。

### 3-4-2. ALG-2/Sec31A ペプチド複合体構造

結晶の非対称単位には、2 分子の des3-20ALG-2（分子 A, 分子 B）が含まれており、各々に Sec31A\_ABM Type 2 ペプチド（分子 C, 分子 D）が結合していた。ALG-2/Sec31A ペプチド複合体中の des3-20ALG-2 は、以前報告された Zn<sup>2+</sup>結合型 des3-20ALG-2 (PDB code: 2ZN8) と同様に、8 つの  $\alpha$  ヘリックスから構成される 5 つの EF-hand を形成し、EF1, EF3 及び EF5 に亜鉛イオンが配位していた（図 3-5）。両分子の RMSD の値はそれぞれ 0.751Å（分子 A/PDB code 2ZN8）、0.578 Å（分子 B/PDB code 2ZN8）（<2.4 Å）であり、両分子は非常に似た構造をとっていることを確認した。

Sec31A\_ABM Type 2 ペプチドは、主として V31, V35, L48, A51, L52, S53, G55, F85, W89, I92, F99, F148 で構成される疎水性ポケットに結合していた（図 3-6）。この領域は、コンピューターシミュレーション解析により推定した、Scr3\_ABM Type 2 の結合領域 (Pocket 3) と一致した（第 2 章参照）。

今回解析した回折データでは、ALG-2 に配位している亜鉛イオンに加え、Sec31A\_ABM Type 2 ペプチドの末端残基周辺に亜鉛イオンの存在を確認した（図 3-7）。この亜鉛イオンは、結晶が成長する過程で取り込まれたものであり、生体内では存在していないと考えられる。

### 3-4-3. ALG-2 と Sec31A\_ABM Type2 ペプチドの相互作用解析

#### (1) Sec31A との結合に重要な ALG-2 中のアミノ酸残基の同定

Ligplot により、des3-20ALG-2 と Sec31A\_ABM Type 2 ペプチド（分子 A/C ; 分子 B/D）の相互作用解析を行った結果、両分子の間には多くの疎水性相互作用が形成されていることがわかった。また、疎水性相互作用に比べて数は少ないものの、S53 は Pro<sup>3</sup> 及び Gly<sup>6</sup> と水素結合を形成し、A51 は Ile<sup>8</sup> と水素結合を形成していた（表 3-2 及び図 3-8）。

これらのアミノ酸残基のうち、L52, S53, W57, F85, W89, I92, F148 を Ala, Gly あるいは Ser に置換した変異体 ALG-2 を作製し、RNA 干渉法により ALG-2 の発現を抑制した HEK293 細胞 (HEK293/ALG-2<sub>KD</sub>) で発現している内在性の Sec31A 及び ALIX への親和性を GST プルダウン解析により調べた。実験は 100  $\mu$ M CaCl<sub>2</sub> 存在下で行い、コントロールサンプルには GST, GST-野生型 ALG-2 (WT), Y180A 変異体 ALG-2 及び ALG-2<sup>ΔGF122</sup> を設定した。抗 Sec31A 抗体によりプルダウン産物を解析した結果、L52A, F85A 変異体 ALG-2 については、Sec31A への結合が完全に消失し、S53G, I92A 及び F148S 変異体 ALG-2 では野生型 ALG-2 に比べて同程度結合した。一方で、抗 ALIX 抗体によりプルダウン産物を解析した結果、L52A 変異体 ALG-2 と ALIX の結合が若干低下したものの、その他の変異体 ALG-2 について結合の低下は認められなかった。また、Y180A 変異体 ALG-2 及び ALG-2<sup>ΔGF122</sup> については、ALIX とは結合せずに Sec31A と結合した (図 3-9)。

## (2) ALG-2 との結合に重要な Sec31A\_ABM type 2 ペプチド中のアミノ酸残基の同定

FastContact により、des3-20ALG-2 と Sec31A\_ABM Type2 ペプチドの結合自由エネルギーを計算した結果、ABM Type 2 を構成する Pro3, Pro5, Gly6 及び Phe7 に加え、ABM Type 2 の両端に存在する Pro2 及び Ile8 が ALG-2 への結合に重要であることが予想された (図 3-10)。そこで、Sec31A から派生した ABM Type 2 配列を含むペプチド (837-NPPPPGFI-844) と、その一部のアミノ酸を Ala あるいは Ser に置換したペプチドに対する ALG-2 の親和性をファウエスタン解析により調査し、ALG-2 の結合に重要なアミノ酸を同定した。その結果、変異体 P838S, P839A, P841S, G842A, G842L, F843A, I844A は、ALG-2 との結合が消失し、変異体 P838A, P840A, P840S, I844G は、コントロールと比べて大きく低下した (<50%)。一方、変異体 N837P, P841A 及び P841L は、ALG-2 への結合能に大きな変化は見られなかった (>50%) (図 3-11)。

### 3-4-4. 各種タンパク質から派生したペプチドと ALG-2 の相互作用解析

ABM Type 2 (PXPGF;X, variable) モチーフをもつタンパク質は、Sec31A, Scr3 の他に SARAF, PatL1, RBM22 がある。また、ABM Type 2 を構成するアミノ酸がひとつ別のアミノ酸に置換された配列をもつタンパク質として CHERP, SHIRA4 が存在する。これらのタンパク質から派生した 8 残基のペプチドに対する ALG-2 の親和性を、ファウエスタン解析により調査した。その結果、ABM Type 2 を含むペプチドであっても、隣接するアミノ酸残基によって、ALG-2 との親和性に強弱があることがわかった (Sec31A, SARAF, PIK3R4 > PatL1, SHISA4, PIK3R4 >> Scr3, CHERP, RBM22, SET1B ; 図 3-12)。

## 3-5. 考察

### 3-5-1. ALG-2/Sec31A ペプチド複合体の結晶化条件

PEG8000 及び MPD を沈殿剤に用いることで、ALG-2/Sec31A ペプチド複合体の良質な結晶を作製することができた。但し、結晶化溶液に  $Zn^{2+}$  を含む条件では MPD を沈殿剤に用いた場合でのみ結晶が成長し、 $Zn^{2+}$  を含まない条件では PEG8000 を沈殿剤に用いた場合でのみ結晶が成長した。この結果は、 $Zn^{2+}/Ca^{2+}$  非結合型と  $Zn^{2+}/Ca^{2+}$  結合型 ALG-2 では構造に違いが生じていることを示唆している。

### 3-5-2. ABM Type1 と ABM Type2 の結合機構

ABM Type 1 を含む ALIX ペプチドは、EF2-EF5 周辺に存在する 2 つの疎水性ポケット：Pocket 1, Pocket 2 に結合することが報告されているのに対し、ABM Type 2 と ALG-2 の結合機構に関する知見は少なく、両者の結合機構は不明であった。私は、ABM Type 2 を含む 12 残基の Sec31A ペプチドと ALG-2 複合体の X 線結晶構造解析を行い、ABM Type 2 は EF1-EF3 周辺に存在する第 3 の疎水性ポケット (Pocket 3) に結合すること明らかにした。Pocket 3 と Pocket 1/Pocket 2 を構成するアミノ酸残基に共通性はなく、それぞれは ALG-2 の離れた領域に存在する異なる疎水性ポケットであった。

これまで、ALG-2 はダイマーを形成し、分子内に ABM Type 1 をもつ ALIX と ESCRT-I 複合体の構成因子である TSG-101 あるいは VPS37 を  $Ca^{2+}$  依存的につなぐアダプタータンパク質として機能することが報告されている。また最近の研究から、ALG-2 は  $Ca^{2+}$  依存的に Sec31A に結合することで COPII 小胞の ER/Golgi 輸送を制御しており [Shibata et al., 2010 ; Helm et al., 2014], その制御には ABM Type 1 に似た配列 (PGYPPPPGGYPP) をもつ Annexin A11 が関与しているとの報告がある [Shibata et al., 2015]。ALG-2 は分子表面に存在する異なる疎水性ポケットで ABM Type 1 あるいは ABM Type 2 を認識し、ER 膜上に存在するタンパク質と別のタンパク質の結合を仲介する「アダプタータンパク質」として機能していると考えられる (図 3-13)。

### 3-5-3. ABM Type 2 モチーフに含まれる各残基の役割

#### (1) Pro の役割

分子内にピロリジン環をもつプロリンが含まれる領域では、タンパク質の主鎖構造は大きく制限される。ABM Type 2 には、2 つのプロリンが存在しており、構造の自由度は失われ、安定した構造形成していることが考えられる。Sec31A\_ABM Type 2 は、4 つのプロリン

(837-NPPPPGFI-844) がポリプロリンヘリックス様の構造を形成することで、他の ALG-2 結合タンパク質に含まれる ABM Type 2 に比べて安定した構造を形成していることが予想される (図 3-14). 実際にプロリンの温度因子 (B factor) を調べると近傍のアミノ酸に比べて低い値を示している (図 3-15). また、プロリンによって形成される折り返し構造やねじれ構造は、下流に続く残基を  $\alpha$  ヘリックスや  $\beta$  構造に組み込まれにくく (周辺のアミノ酸による立体障害の影響を受けにくく) しており、ALG-2 への結合に重要な Gly<sup>6</sup>, Phe<sup>7</sup> を結合に有利な配置へ導いていることが予想される.

プロリンは、独特な構造により ABM Type 2 を ALG-2 への結合に貢献しているだけでなく、ALG-2 との結合に必要な疎水性場の形成にも貢献していると考えられる. ABM Type 2 に含まれるプロリンは、多くの ALG-2 残基と疎水性相互作用を形成しており、Pro<sup>2</sup>, Pro<sup>3</sup>, Pro<sup>4</sup>, Pro<sup>5</sup> を Ser あるいは Ala に置換した Sec31A\_ABM Type 2 配列は、ALG-2 との親和性が大きく減少した. 実際、Scr3\_ABM Type 2 に含まれる Ala<sup>5</sup> を Pro に置換することで ALG-2 との結合が強くなる結果を得ており (図 3-16), このことは Pro の重要性を裏付けた結果といえる.

## (2) Gly<sup>6</sup> の役割

一般的に、結合モチーフに含まれる親水性 (あるいは中性) アミノ酸を疎水性アミノ酸に置換することにより、疎水性ポケットへの結合が増強されることが知られている. しかし、Sec31A\_ABM Type 2 ペプチドに関しては、グリシン (Gly<sup>5</sup>) を、疎水性アミノ酸である Ala あるいは Leu に置換することで、ALG-2 への結合が完全に消失した. Gly<sup>5</sup> を Ala あるいは Leu に置換することにより ALG-2 との結合が著しく低下した理由は、グリシン特有な構造に起因していると考えられる.

グリシンは側鎖をもたないアミノ酸であり、排除体積が最も小さいアミノ酸である. ALG-2/Sec31A\_ABM Type 2 ペプチド複合体の構造から、Pocket 3 の開口部は、Gly<sup>6</sup> が結合する領域で非常に狭くなっていることが確認できる (図 3-17). これは、仮にグリシンを比較的小さい側鎖をもつアラニンに置換したとしても、側鎖 (アセチル基) が Pocket 3 を構成する ALG-2 の残基に接触してしまう距離である.

また、側鎖をもたないグリシンは他のアミノ酸に比べて構造の自由度が高いことが知られている. ABM Type 2 の Gly<sup>6</sup> の二面角は  $\phi=104.5^\circ$ ,  $\psi=-157.9^\circ$  であり. 他のアミノ酸では立体障害の影響により取り得ない二面角を示した (図 3-18). 仮に Gly<sup>6</sup> を他のアミノ酸に置換した場合には二面角の制限により、ALG-2 との間で強い相互作用を形成している周辺のアミノ酸 (Pro<sup>5</sup>, Phe<sup>7</sup> など) が、Pocket 3 に適切に配置できなくなることが推察される.

### 3-5-5. Phe<sup>7</sup> の役割

Sec31A\_ABM Type 2 を構成するアミノ酸は、ALG-2 との間で多くの相互作用が形成している。そのなかでも、Phe<sup>7</sup> は F85, W89, I92 を初めとする数多くの残基と疎水性相互作用を形成しており、ALG-2 への結合に最も重要な残基のひとつといえる。実際、Phe<sup>7</sup> の結合自由エネルギーの値は、絶対値で最も大きい値を示し、Phe<sup>7</sup> をアラニンに置換した変異体では ALG-2 への結合が完全に消失した (図 3-11)。

以前、Sec31A\_ABM Type2 の Phe<sup>7</sup> をより嵩高い側鎖をもつ Trp に置換させても、ALG-2 との結合力に変化がないことが報告されている [Shibata et al., 2008]。一方で、Scr3\_ABM type2 は Phe<sup>7</sup> を Trp に置換することで、ALG-2 との結合が強くなることがわかった (図 3-16)。この結果は、Phe<sup>7</sup> に隣接するアミノ酸の立体障害の影響により、Pocket 3 内での Phe<sup>7</sup> の配置が若干異なっていることを示唆している。

### 3-5-3. ABM Type 2 ペプチドと ALG-2 の結合解析

ファーウェスタン解析の結果から、各種タンパク質から派生した ABM Type 2 周辺の 8 残基のペプチドと ALG-2 の親和性を確認した結果、わずかなアミノ酸配列の違いによって親和性に違いがあることがわかった (Sec31A, SARAF, PIK3R4 > PatL1, SHISA4 > > Scr3, CHERP, RBM22, SET1B)。今回ファーウェスタン解析に用いたペプチドのアミノ酸配列は、大きく 4 つのグループに分類することができる。

グループ①：

4 位及び 5 位に疎水性アミノ酸があり、かつ 8 位に長鎖アミノ酸が続く配列  
(Sec31A, SARAF, PATL1, PIK3R4)

グループ②：

4 位及び 5 位に疎水性アミノ酸があり、かつ 8 位に短鎖アミノ酸が続く配列  
(Scr3, RBM22, SET1B)

グループ③：

4 位あるいは 5 位に親水性アミノ酸があり、かつ 8 位に長鎖アミノ酸が続く配列  
(CHERP, SHISA4)

グループ④：

7 位にトリプトファンがあり、かつ 8 位に長鎖アミノ酸が続く配列  
(PIK3R4)

グループ①に含まれるアミノ酸配列は、グループ②のアミノ酸配列に比べて ALG-2 に強く結合しており、8 位に長鎖アミノ酸が存在する配列は ALG-2 との結合に有利であること

を示唆している。同様に、グループ①とグループ③のアミノ酸配列に対する ALG-2 の親和性を比較すると、4 位あるいは 5 位には疎水性アミノ酸が含まれる配列の方が、ALG-2 との結合が増強されることが予想された。一方で、グループ①に分類される Sec31A とグループ④に分類される PIK3R4 は、ALG-2 との結合力に違いは認められなかった。これは、7 位に存在するアミノ酸は、Phe と Trp の双方が許容されることを示している。以上の結果より、これまで PXPGF (X, variable) と定義されていた ABM Type 2 を、「(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) に修正した。

### 3-6. 結論

X 線結晶構造解析により、ABM Type 2 を含む 12 残基の Sec31A ペプチドと des3-20ALG-2 複合体構造を明らかにした。その結果から、ABM Type 1 と ABM Type 2 は ALG-2 の異なる領域に結合することが判明した。また、変異体タンパク質を用いた結合解析実験により、両分子の結合に重要なアミノ酸残基を特定し、これまでの ABM Type 2 (PXPGF;X, variable) の定義を、「(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) に修正した。

表3-1 X線回折データ及び精密化の統計値

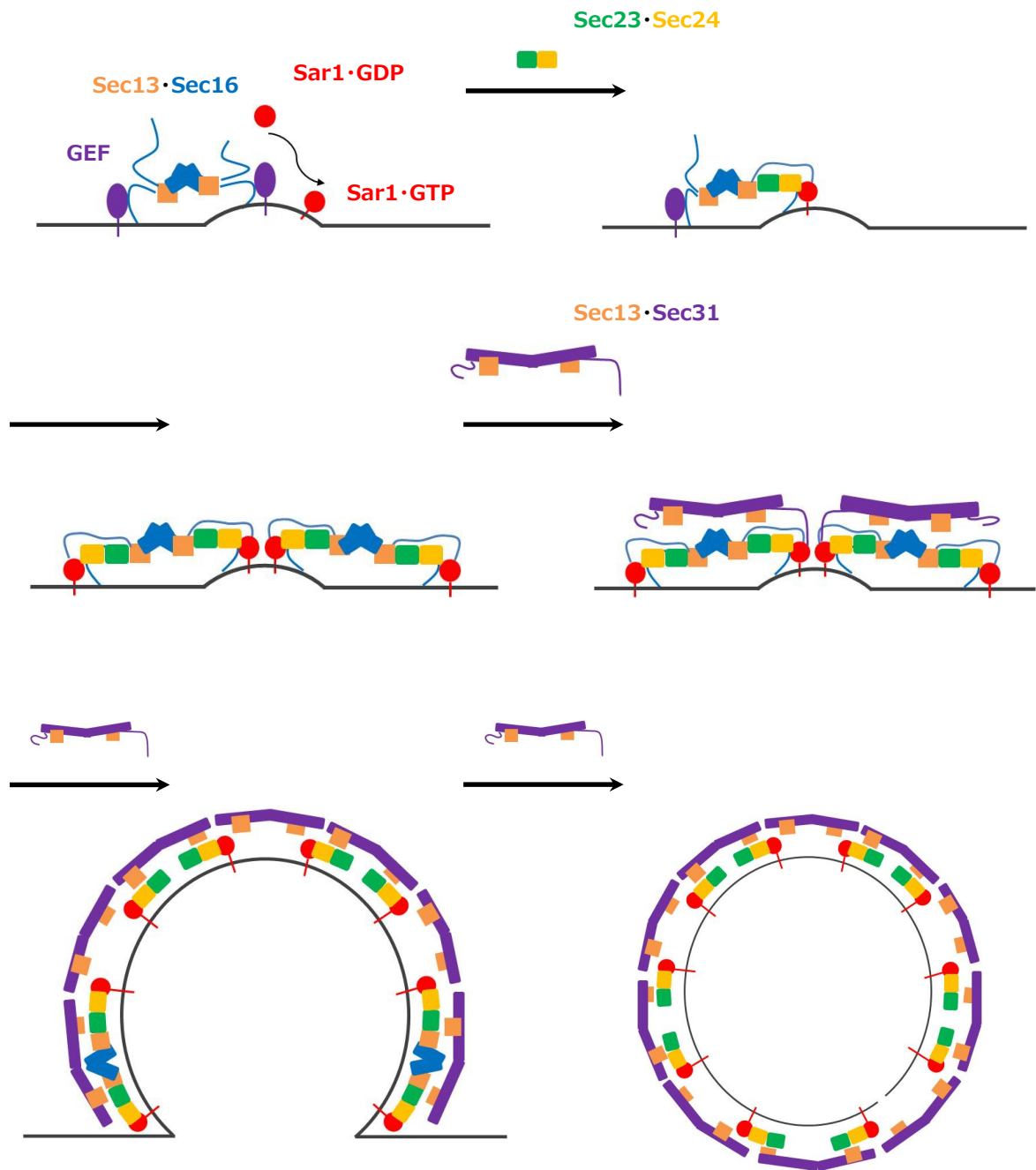
<b>des3-20ALG-2/Sec31A peptide Zn<sup>2+</sup>-bound</b>	
<b>PDB code</b>	3WXA
<b>Data collection</b>	
Beamline	RF-AR NE3A
Wavelength (Å)	1.2821
Space group	<i>P6<sub>4</sub></i>
a/b/c (Å)	82.0/82.0/103.2
$\alpha/\beta/\gamma$ (°) <sup>a</sup>	90.0/90.0/120.0
Resolution (Å)	71.0-2.36 (2.40-2.36)
Measured reflection	166,054
Unique reflections	16,160
Completeness(%)	99.4 (99.3)
$R_{\text{merge}}$	8.0 (25.7)
$I/\sigma$	32.2 (10.8)
<b>Refinement</b>	
$R_{\text{work}}/R_{\text{free}}$ (%)	21.8/29.6
RMSD bond length (Å)	0.014
RMSD bond angle (°)	1.718
Average B-factor(Å <sup>2</sup> )	44.0
No. ALG-2 molecule	2
No. Sec31A peptide	2

Values in parentheses are for the highest-resolution shell. Rmsd, root mean square deviation

表3-2 ALG-2とSec31A\_ABM Type 2ペプチドの結合

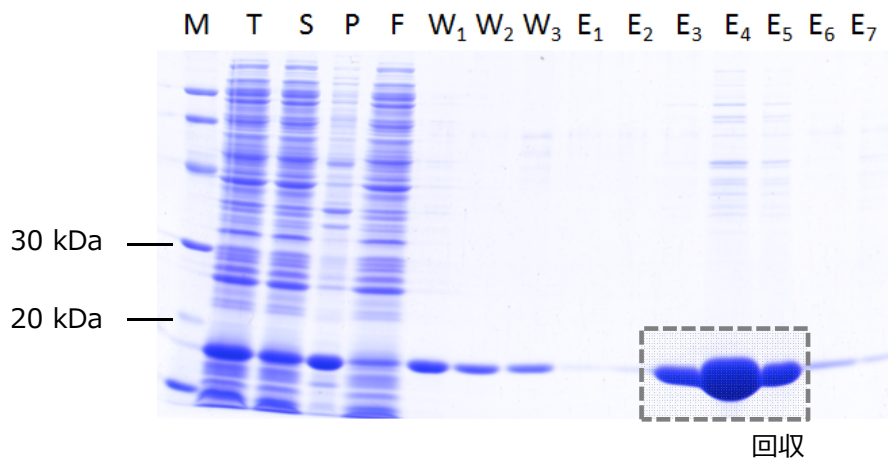
Interaction atoms in peptide		Interacting atoms in ALG-2	Distance(Å)
<b>Hydrophobic</b>			
Asn1	C	CH2 <sup>W57</sup>	3.58
	CA	CH2 <sup>W57</sup>	3.81
	C	CZ2 <sup>W57</sup>	3.26
	CA	CZ2 <sup>W57</sup>	3.98
	C	CE2 <sup>W57</sup>	3.95
Pro2	CA	CZ2 <sup>W57</sup>	3.81
	CB	CE2 <sup>W57</sup>	3.89
	CA	CE2 <sup>W57</sup>	3.58
	CB	CD2 <sup>W57</sup>	3.89
	CG	CG <sup>55</sup>	3.99
Pro3	CB	CG <sup>55</sup>	3.94
	CD	CD1 <sup>W57</sup>	3.91
	CG	CB <sup>S53</sup>	3.69
Pro5	CB	CB <sup>S53</sup>	3.89
	CB	CD2 <sup>F148</sup>	3.77
	C	CD2 <sup>F148</sup>	3.98
	CB	CG <sup>F148</sup>	3.61
	CB	CB <sup>F148</sup>	3.58
Gly6	CG	CE2 <sup>F99</sup>	3.88
	CA	CE2 <sup>F148</sup>	3.70
	C	CD2 <sup>L52</sup>	3.50
Phe7	CE2	CG2 <sup>I92</sup>	3.46
	CD2	CG2 <sup>I92</sup>	3.87
	CE2	CD1 <sup>W89</sup>	3.79
	CD2	CD1 <sup>W89</sup>	3.94
	CZ	CZ <sup>F85</sup>	3.41
	CE1	CZ <sup>F85</sup>	3.97
	CZ	CE1 <sup>F85</sup>	3.49
	CA	CD2 <sup>L52</sup>	3.84
	CZ	CD1 <sup>L48</sup>	3.74
	CE1	CD1 <sup>L48</sup>	3.72
Ile8	CE1	CG2 <sup>V35</sup>	3.72
	CD1	CB <sup>S53</sup>	3.65
	CG1	CB <sup>S53</sup>	3.53
	CD1	CL <sup>L52</sup>	3.44
	CG1	CL <sup>L52</sup>	3.97
Met9	CD1	CA <sup>A51</sup>	3.87
	CE	CG2 <sup>V31</sup>	3.78
	CE	CG1 <sup>V31</sup>	3.73
<b>Hydrogen bond</b>			
Pro3	O	OG <sup>S53</sup>	2.52
Gly6	N	OS <sup>S53</sup>	2.96
	O	NS <sup>S53</sup>	2.95
Ile8	N	OA <sup>A51</sup>	3.33





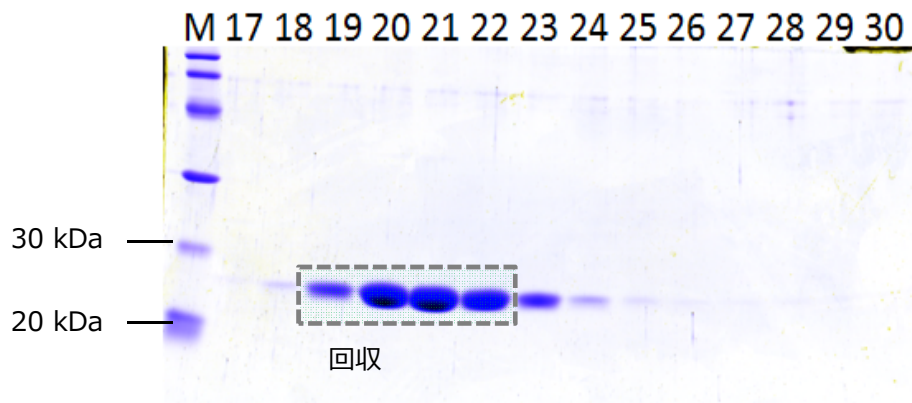
### 図3-1 COPII小胞の形成過程

(1) グアニンヌクレオチド交換因子 (GEF) Sec12によって、GDP結合型からGTP結合型に変換された Sar1はER膜に移行する。(2) Sar1とSec13/16は協調的にサイトゾル中のSec23/24複合体と積み荷タンパク質に結合し、前出芽複合体を形成する。(3) Sec13/31複合体が前出芽複合体を架橋することで、ER膜上にCOPIIコートが形成される。(4) 一定の大きさに成長したCOPIIコートは、ER膜の小胞体出口部位 (ERES) からゴルジ体に向けてCOPII小胞として出芽する。



**図3-2 アフィニティークロマトグラフィーによるdes3-20ALG-2精製**

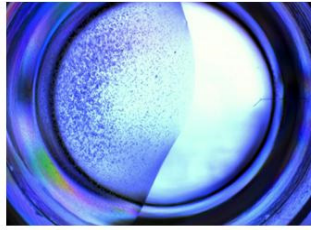
Scr3\_ABSペプチド ( $^{41}\text{QVPAPAPGFALFPSPGPVA}^{59}$ ) 固定化カラムを用いて、大腸菌BL21 (DE3) pLysSの細胞破碎液からdes3-20ALG-2を精製した。精製時に採取した各画分に含まれるタンパク質をSDS-PAGEにより展開し、ゲルをCBBで染色した (M: マーカー, T: 全細胞抽出画分, S: 上清画分, P: 不溶性画分, F: カラム通過画分, W: 洗浄液画分, E: 溶出画分)



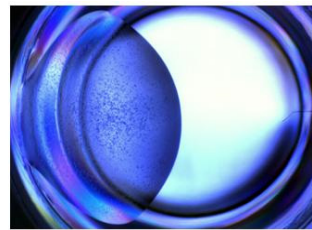
**図3-3 ゲルろ過クロマトグラフィーによるdes3-20ALG-2の精製**

Superdex75カラムを用いたゲル濾過クロマトグラフィーにより、アフィニティークロマトグラフィーの精製液から、des3-20ALG-2を精製した。各画分に含まれるタンパク質をSDS-PAGEにより展開し、ゲルをCBBで染色した。

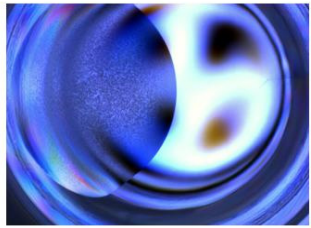
A



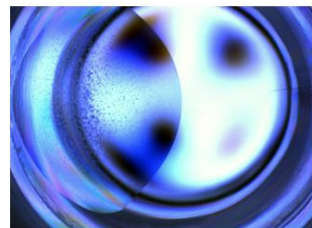
**MembFac #1**, 12% v/v 2-Methyl-2,4-pentanediol, 0.1 M Sodium Acetate trihydrate pH 4.6, 0.1 M Sodium Chloride



**PEGion2 #44**, 0.02 M Zinc chloride, 20% w/v PEG 3350

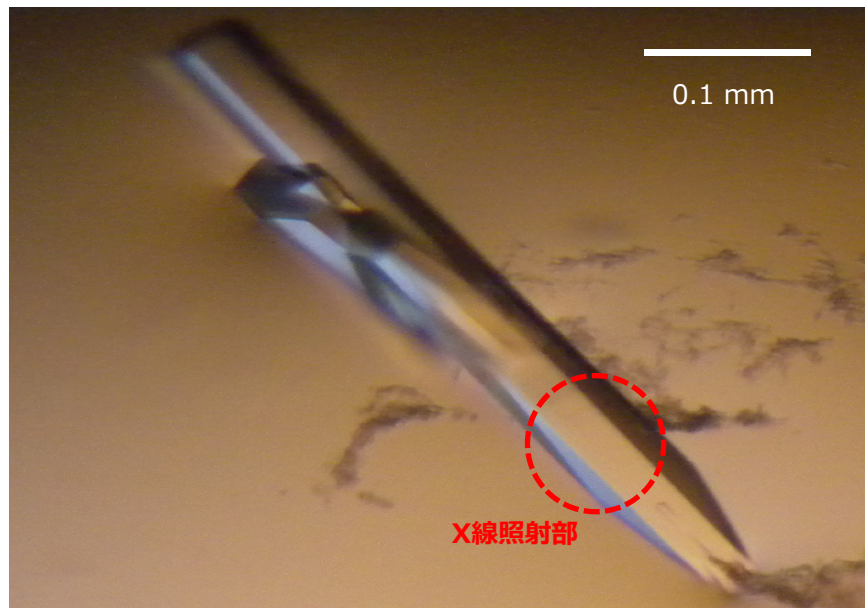


**CrystalScreen #30**, 30% w/v PEG 8000, None, 0.2 M Ammonium Sulfate



**CrystalScreen2 #6**, 1.0 M Imidazole pH 7.0, None, None

B

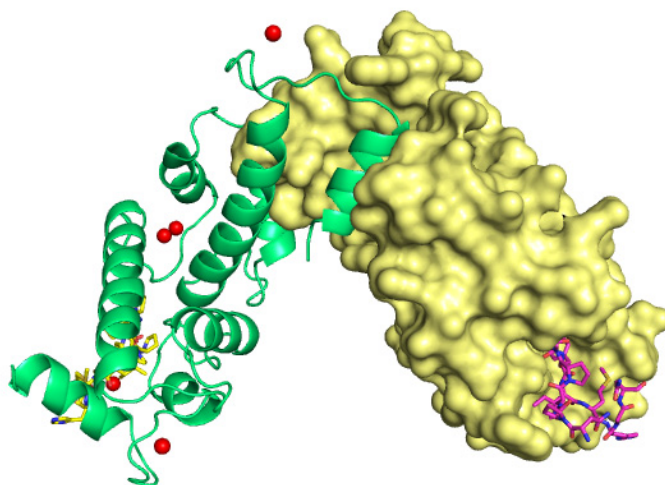


### 図3-4 ALG-2/Sec31Aペプチド複合体の結晶作製

(A) タンパク質結晶化システム PXSを用いて、シッティングドロップ蒸気拡散法によるALG-2/Sec31Aペプチド複合体の結晶化条件のスクリーニングを行った。(B) 結晶化条件のスクリーニング結果に基づき、ハンギングドロップ蒸気拡散法によりALG-2/Sec31Aペプチド複合体の結晶化条件を精密化した。

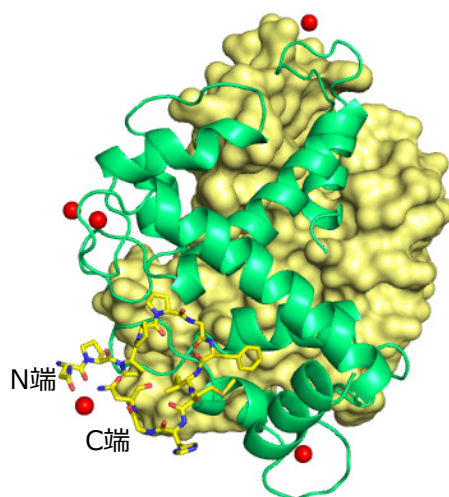
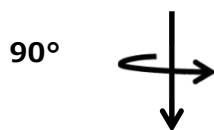
分子A : des3-20ALG-2 (緑)

分子B : des3-20ALG-2 (淡黄)



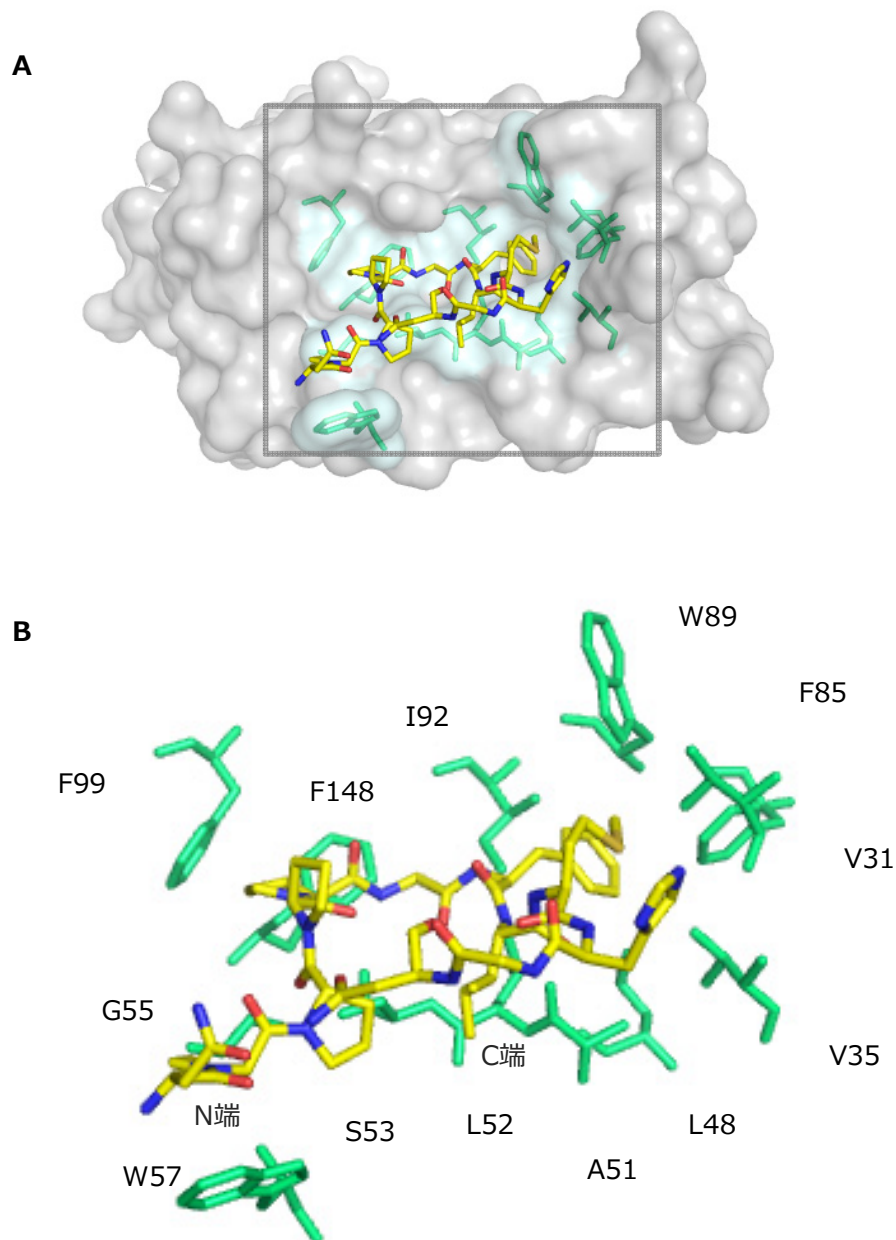
分子C : Sec31A\_ABM Type 2ペプチド (黄)

分子D : Sec31A ABM Type 2ペプチド (紫)



### 図3-5 ALG-2/Sec31A ペプチド複合体の結晶構造モデル (全体構造)

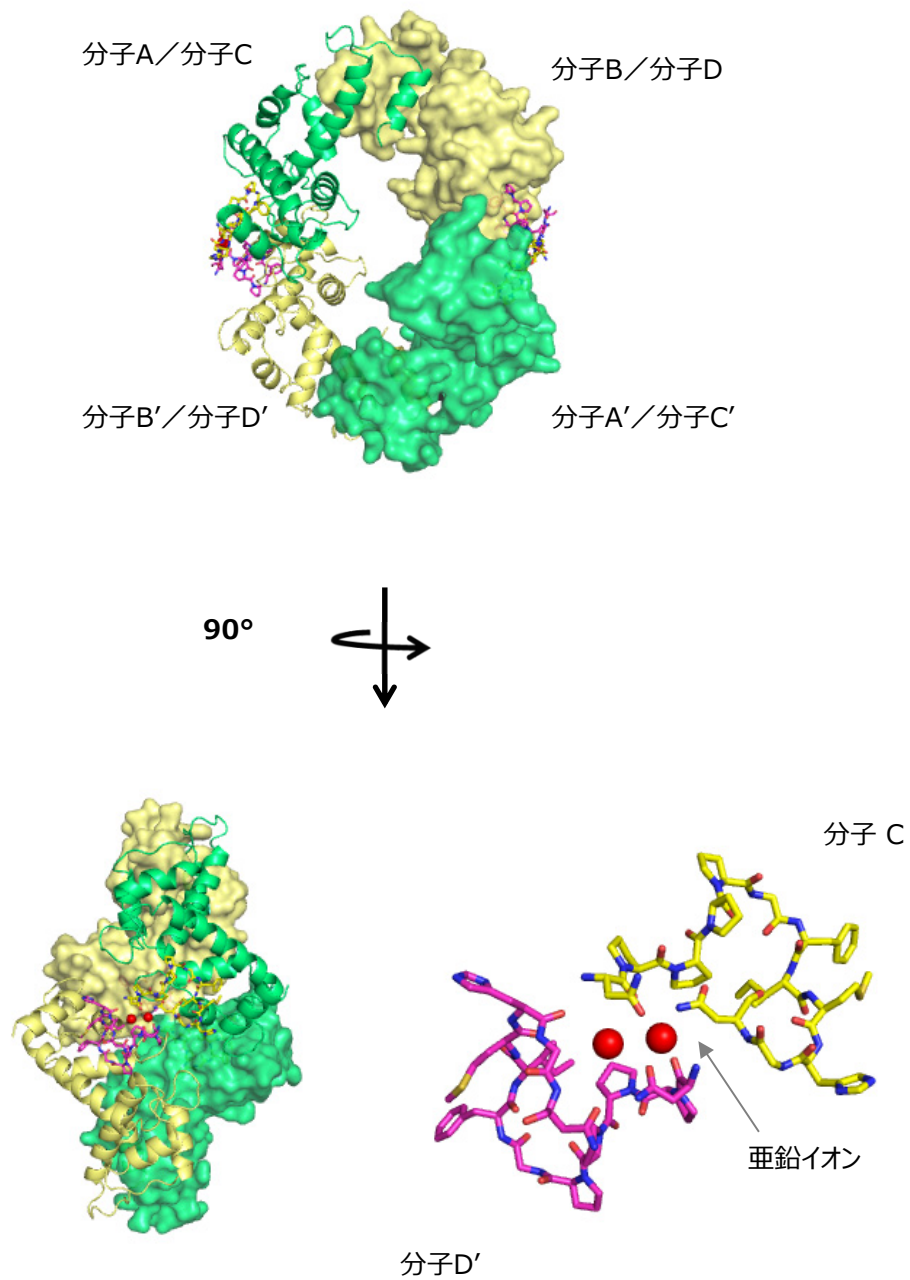
X線回折データからALG-2/Sec31Aペプチド複合体の結晶構造モデルを構築した。結晶の非対称単位には、2分子のdes3-20ALG-2 (緑：リボンモデル (分子A) , 淡黄：表面モデル (分子B) ) が含まれており、各々にSec31A\_ABM Type 2ペプチド (黄：棒モデル (分子C) , 紫：棒モデル (分子D) ) が結合している。赤球は亜鉛イオンを示す。



**図3-6 ALG-2/Sec31Aペプチド複合体の結合構造モデル（結合領域）**

(A) ALG-2とSec31A\_ABM Type 2ペプチドの結合領域を描写した。ALG-2を半透明な表面モデル（灰）と棒モデル（淡緑）、Sec31A Type 2ペプチドを棒モデル（色）で表した。

(B) Sec31A\_ABM Type 2ペプチドと相互作用を形成しているALG-2のアミノ酸残基を抽出して棒モデル（淡緑）で描写した。



**図3-7 ALG-2/Sec31Aペプチド複合体の結晶構造モデル（結晶充填構造）**

ALG-2/Sec31Aペプチド複合体は、結晶対称分子に接近して結晶を形成している（分子A/B：des3-20ALG-2，分子C/D：Sec31A\_ABМ Type 2ペプチド，分子A'/B'：des3-20ALG-2の結晶対称分子，分子C'/D'：Sec31A\_ABМ Type 2ペプチド結晶対称分子）。Sec31A\_ABМ Type 2ペプチド（分子C/D）の一部のアミノ酸残基は、結晶対称分子のSec31A\_ABМ Type 2ペプチド（分子D'/C'）と相互作用を形成しており、両分子の間には亜鉛イオン（赤；球モデル）が存在している。

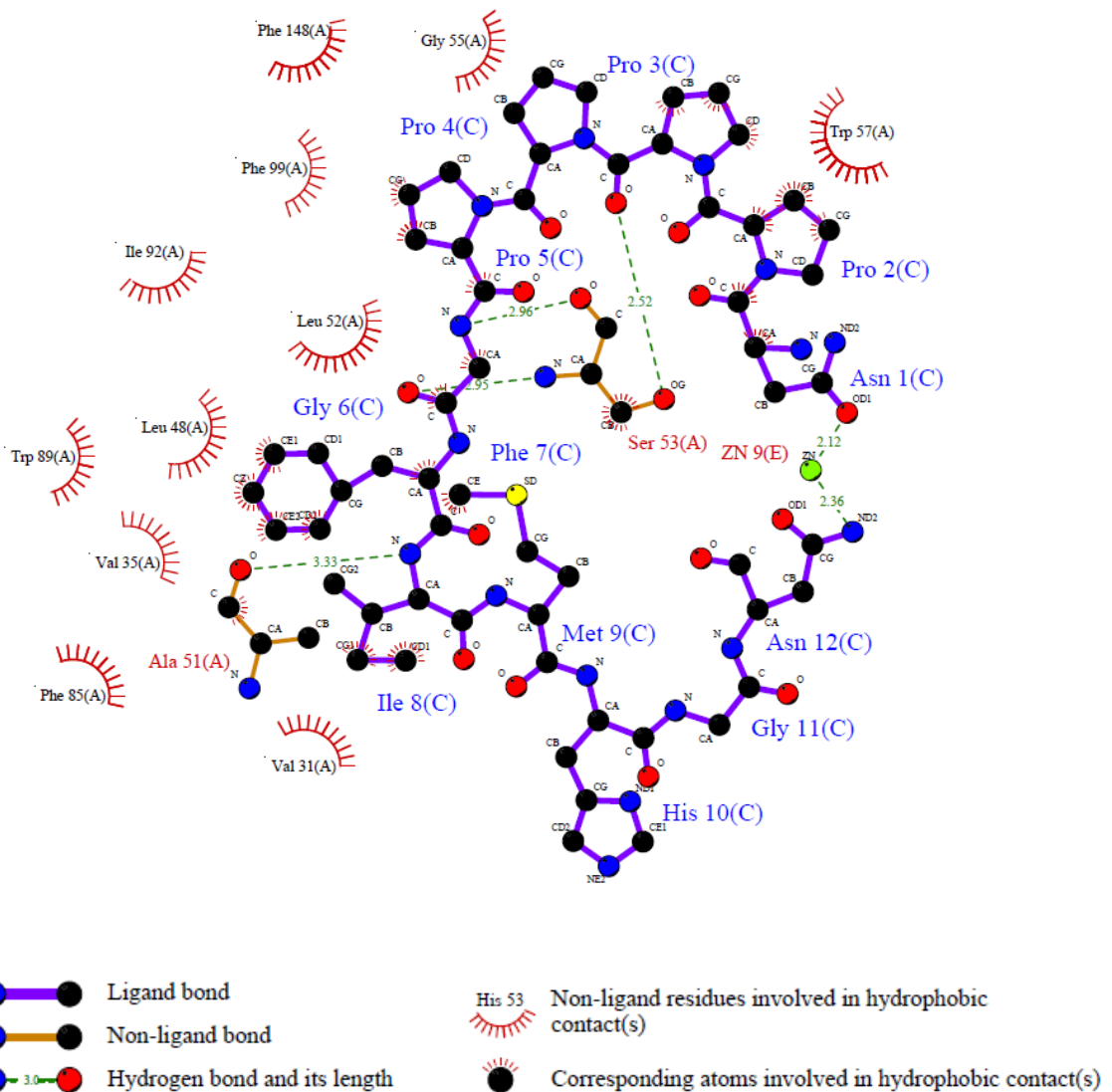
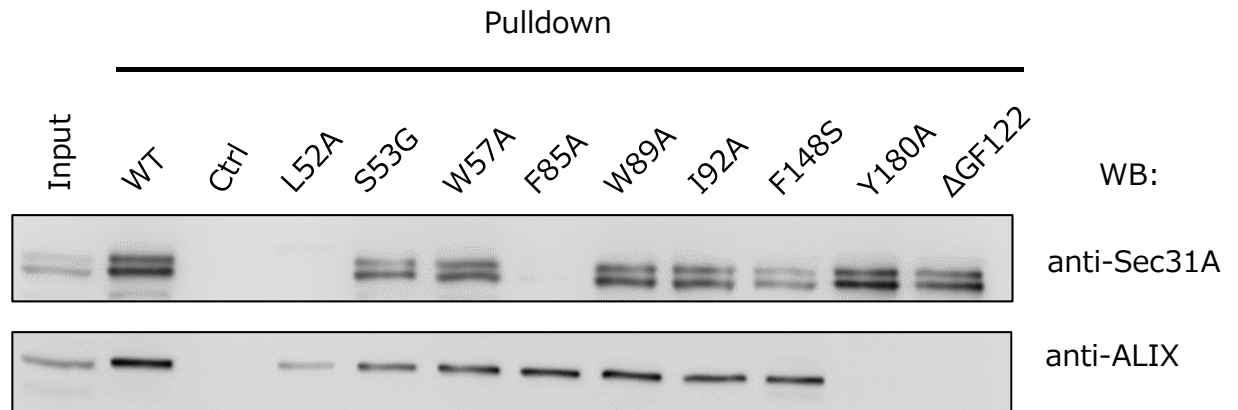


図3-8 ALG-2とSec31A\_ABM Type 2ペプチドの結合図

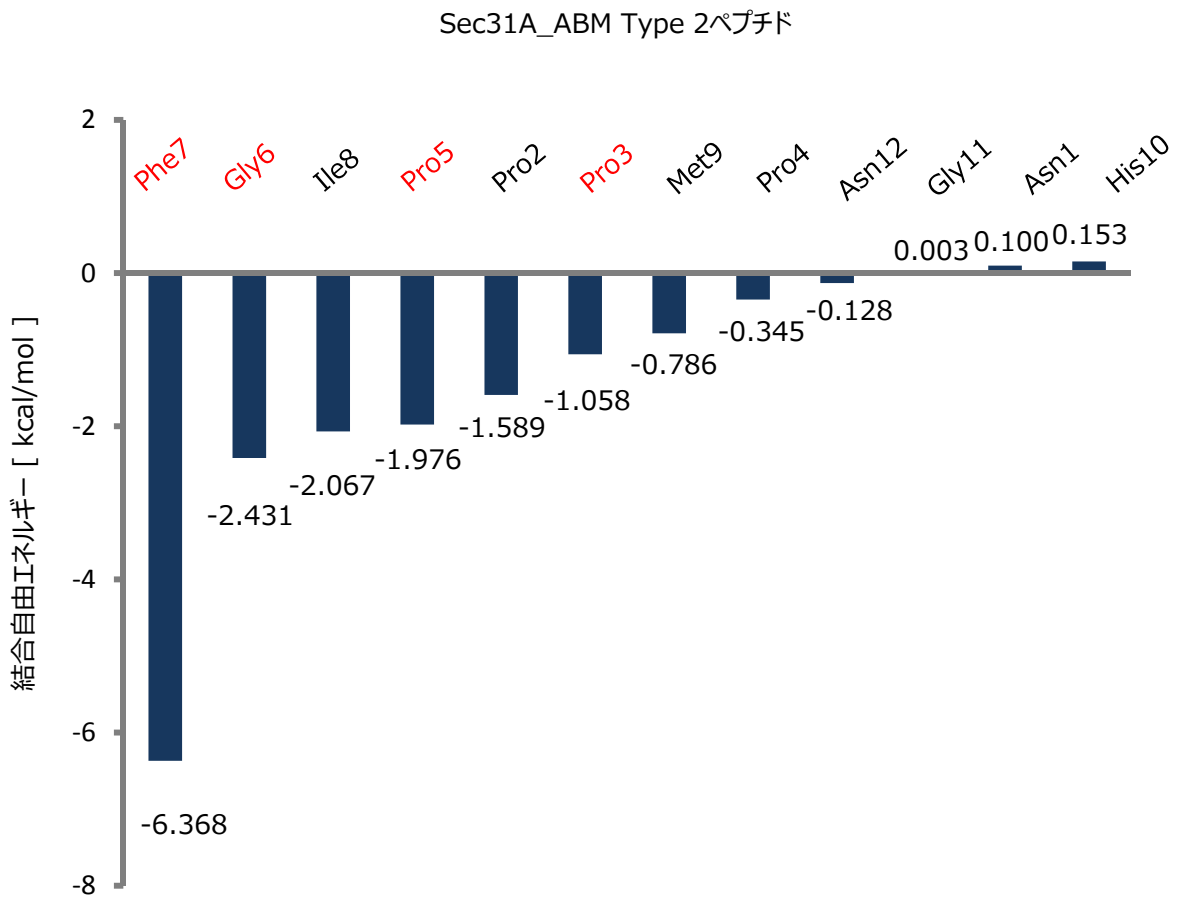
解析ソフトLigplotにより、ALG-2とSec31A\_ABM Type 2ペプチドの結合を解析した。ALG-2のアミノ酸残基を(A)、Sec31A\_ABM Type 2モデルペプチドのアミノ酸残基を(C)で標識し、炭素原子、酸素原子及び窒素原子を黒丸、赤丸、青丸で示した。水素結合を形成している原子を緑色の破線で結び、分子間で疎水性相互作用を形成している原子をとげのついた半円で表示した。





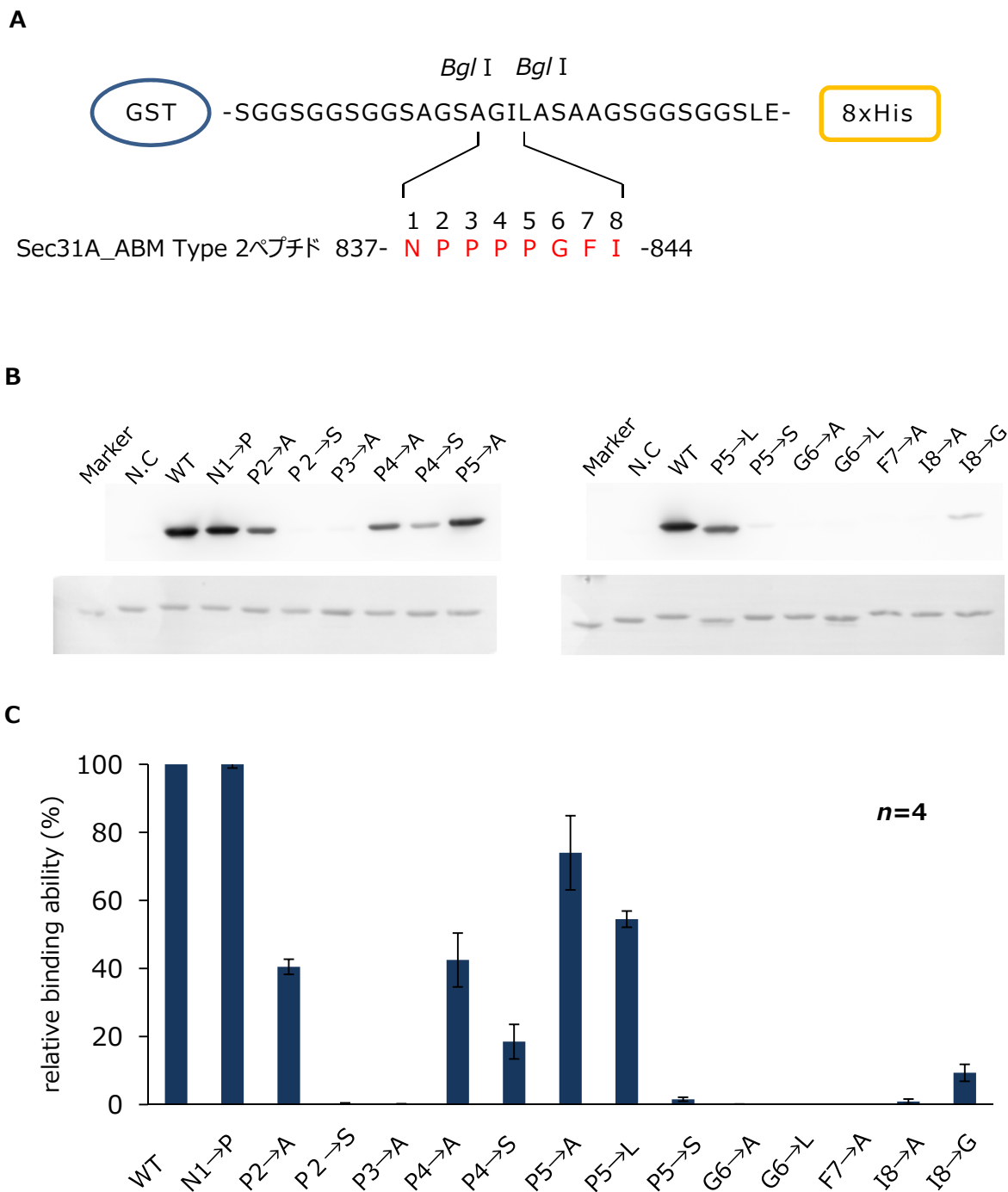
### 図3-9 変異体ALG-2によるSec31Aのプルダウン解析

ALG-2/Sec31Aペプチド複合体の結晶構造において、Sec31Aペプチドと相互作用しているアミノ酸をAla, Gly, Serに置換した変異体ALG-2をセファロースビーズに固定した。調製したビーズを用いて、100  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$ 存在下でSec31Aのプルダウン解析を行った。抗Sec31A抗体を用いたウェスタンブロットティング法により、セファロースビーズに結合したタンパク質を解析した。



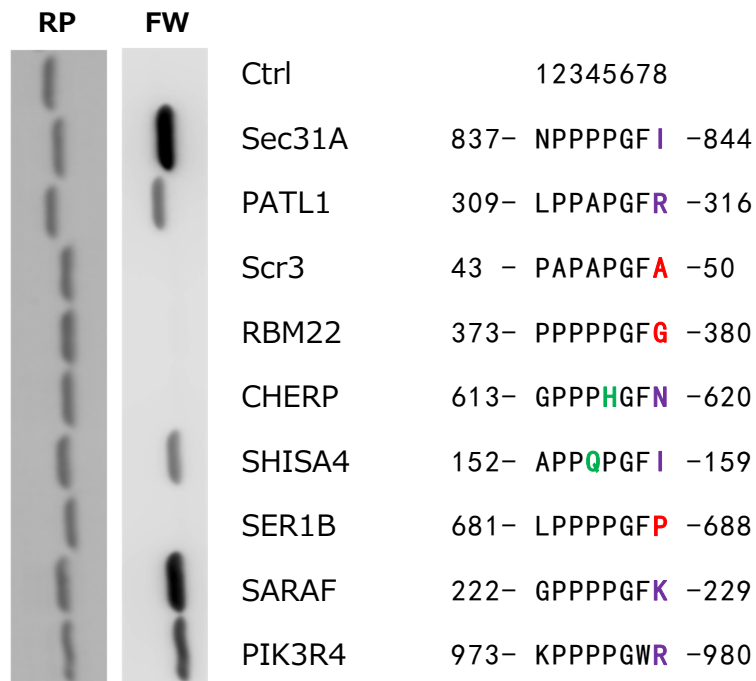
**図3-10 Sec31A\_ABM Type 2ペプチドの各アミノ酸残基の結合自由エネルギー**

解析ソフトFastContactにより, ALG-2/Sec31Aペプチド複合体のSec31A\_ABM Type 2ペプチドの各アミノ酸残基の結合自由エネルギーを計算して棒グラフで表した.



**図3-11 ALG-2とSec31A\_ABM Type 2ペプチドのファウエスタン解析**

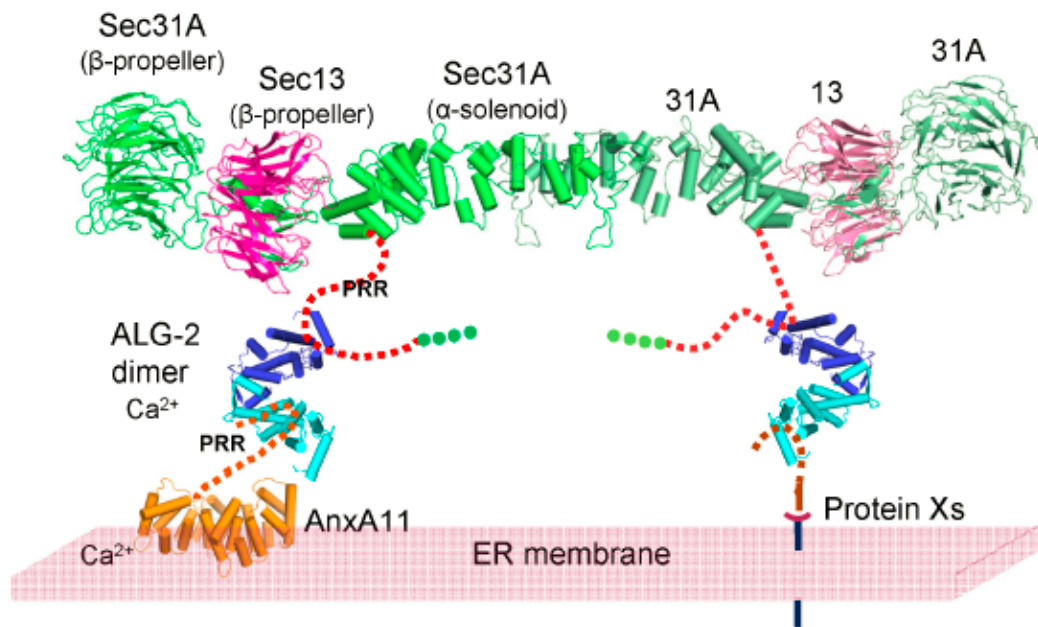
(A) GST-SGGリンカー-8xHisをコードするベクターに、Sec31A\_ABM Type 2のアミノ酸配列を組み込んだ。(B) ファウエスタン法により、Sec31Aから派生した8残基のSec31A\_ABM Type 2ペプチドと、その一部を置換したペプチドに対するALG-2の結合を解析した。(下) 大腸菌から精製したGST融合ペプチドをSDS-PAGEで展開し、PVDF膜に転写した。その後、脱色可能な染色液で染色したPVDF膜を撮影した。(上) PVDF膜を脱色した後、ビオチン標識したALG-2を用いたファウエスタン法により、各ペプチドとの結合を解析した。両分子の相互作用は、POD-ストレプトアビジンを用いた化学発光法により解析した。(C) 各ペプチドとALG-2のファウエスタン解析の結果から、2分子の親和力を数値化し、WTとALG-2の親和力に対する相対結合親和力を棒グラフで表した。



■ : 親水性アミノ酸, ■ : 側鎖の長いアミノ酸, ■ : 側鎖の短いアミノ酸

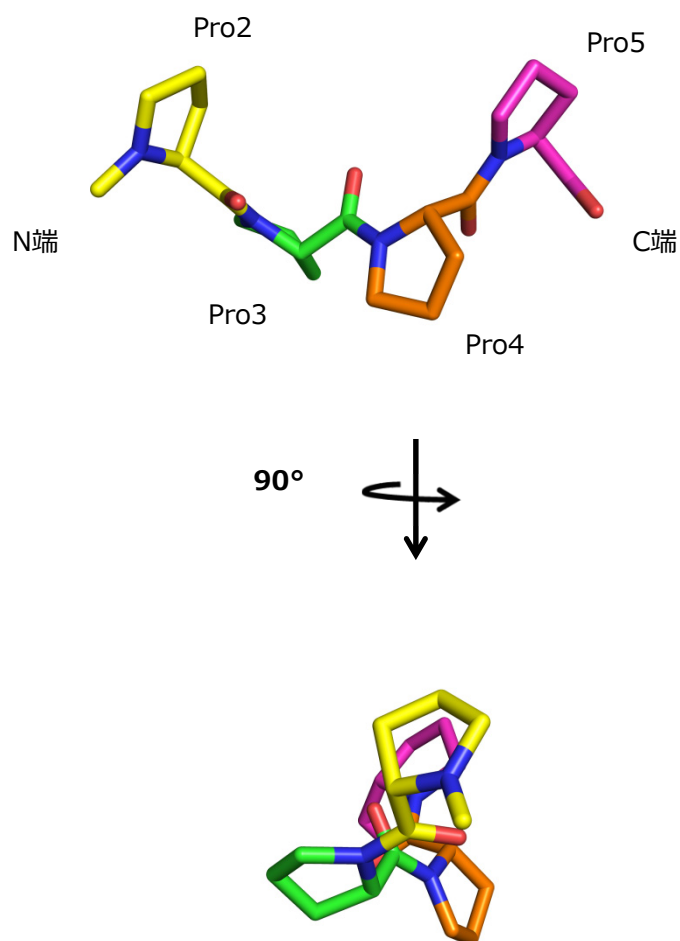
### 図3-12 ALG-2と各タンパク質から派生したABM Type 2ペプチドのファーウェスタン解析

ファーウェスタン法により、各タンパク質から派生した8残基のABM Type 2ペプチドに対するALG-2の結合を解析した。（左）大腸菌から精製したGST融合ABM Type 2ペプチドをSDS-PAGEで展開し、PVDF膜に転写した。その後、脱色可能な染色液で染色したPVDF膜を撮影した。（右）PVDF膜を脱色した後、ビオチン標識したALG-2を用いたファーウェスタン法により、各ペプチドとの結合を解析した。両分子の相互作用は、POD-ストレプトアビジンを用いた化学発光法により解析した。



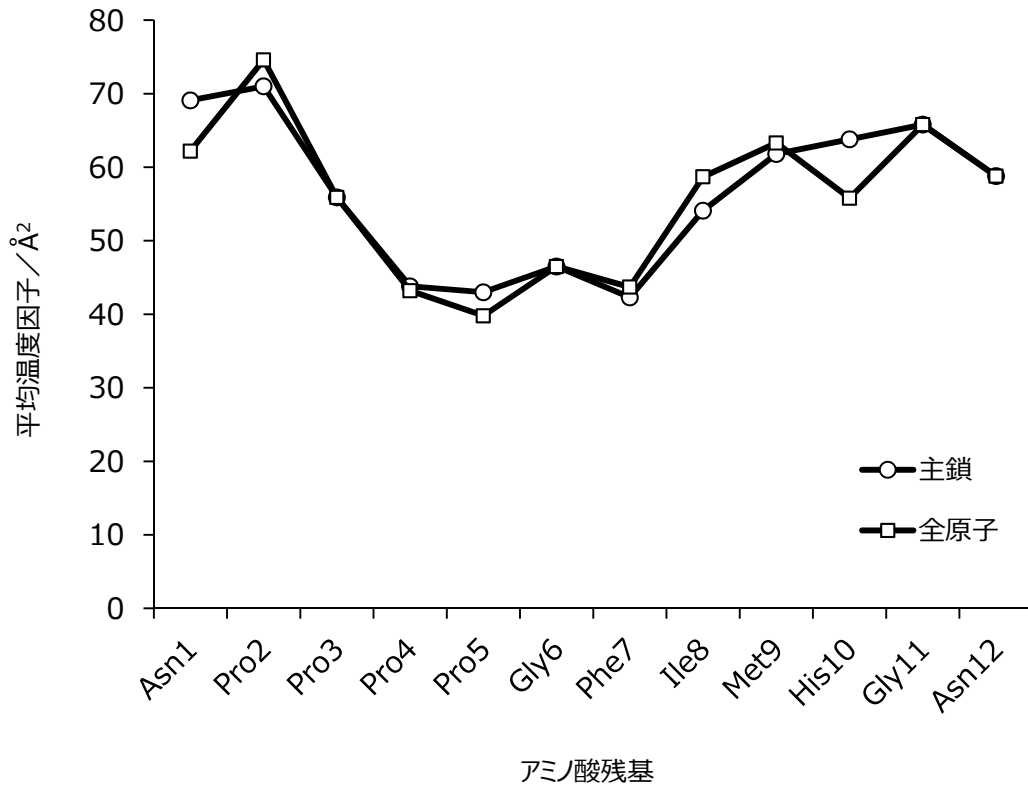
**図3-13 ALG-2を介して結合するER膜上のタンパク質とSec31Aの三者複合体モデル構造**

ER膜に存在するAnxA11のPRR（赤の破線）とCOPII小胞の外殻を形成するSec31AのPRR（橙の破線）がCa<sup>2+</sup>依存的にALG-2ダイマーに結合し、三者複合体を形成すると予想する。また、AnxA11以外にも、ALG-2ダイマーはER膜上に存在する未知のタンパク質（Protein Xs：黒）に直接的あるいは間接的に結合し、Sec31Aとの間で三者複合体を形成することも考えられる。ALG-2（青、水色 [PDB code : 3WXA]）、AnxA11（橙；ウシAnxA4 [PDB code : 1ANN]）に基づき、モデル構造をSWISS-MODELで作成した、Sec31A/Sec13（緑、紫[PDB code : 4BZJ]）



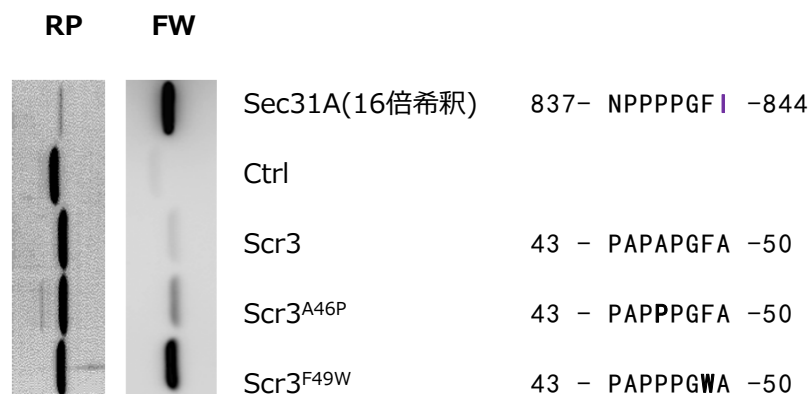
**図3-14 Sec31A\_ABM Type 2で見られるポリプロリンヘリックス構造**

Sec31A\_ABM Type 2ペプチドから、連続するPro (2PPPP<sup>5</sup>) を抽出して棒モデルで描写した。Proの立体配置を理解しやすくするため、N端から黄、緑、橙、紫の順にプロリンを色分け表示した。



**図3-15 Sec31A\_ABM Type 2ペプチドの各アミノ酸残基の温度因子 (B factor)**

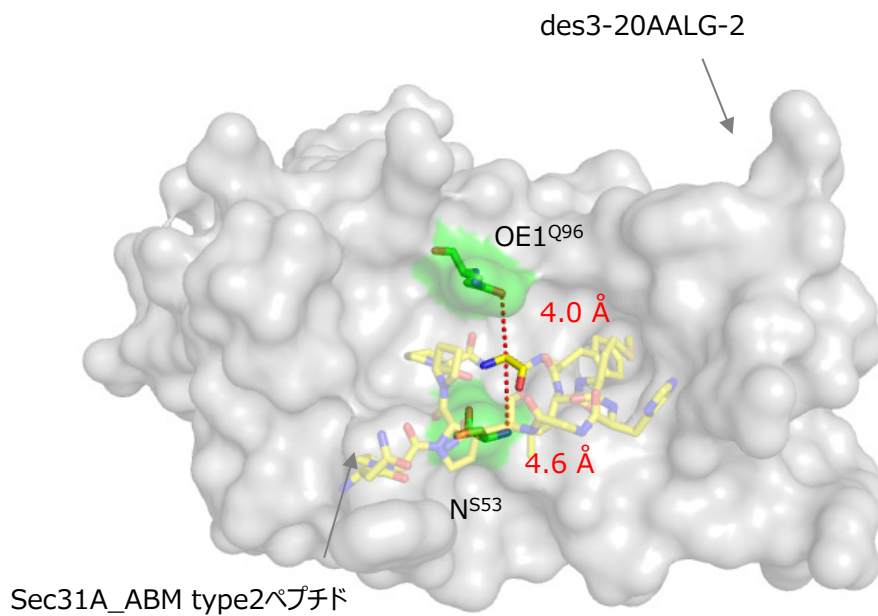
解析ソフトBAVERAGEにより, Sec31A\_ABM Type 2ペプチドの温度因子 (B factor) を解析し, 各アミノ酸ごとの温度因子を折れ線グラフで表した. 白抜き丸 (○) : Sec31A\_ABM Type 2ペプチドの主鎖を構成する原子の平均温度因子, 白抜き四角 (□) : Sec31A\_ABM Type 2の側鎖を含む全原子の平均温度因子



### 図3-16 ALG-2とScr3\_ABM Type 2ペプチドのファーウェスタン解析

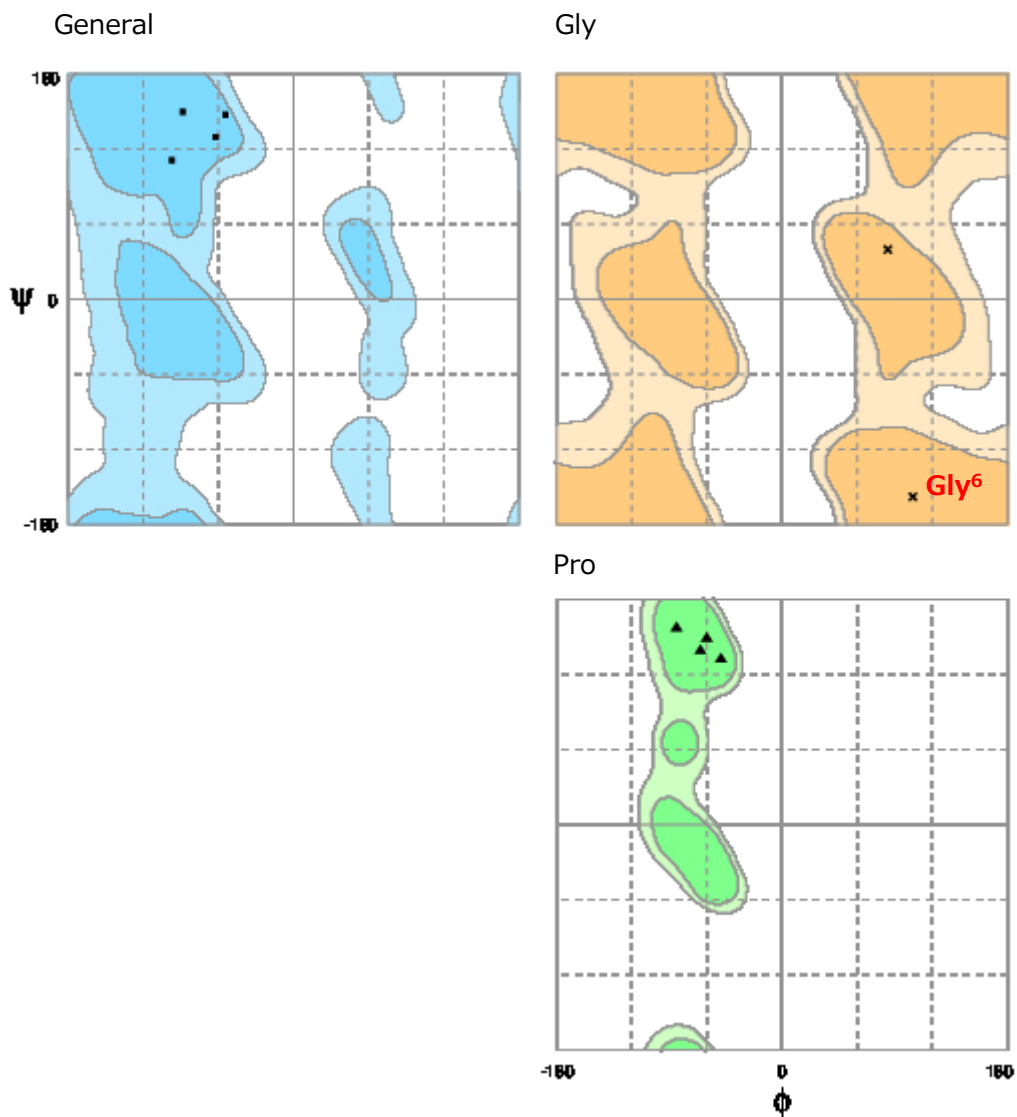
ファーウェスタン法により、Scr3から派生したABM Type 2を含むペプチドと、その一部を置換したペプチド（Scr3<sup>A46P</sup>、Scr3<sup>F49W</sup>）に対するALG-2の結合を解析した。（左）大腸菌から精製したGST融合ペプチドをSDS-PAGEで展開し、PVDF膜に転写した。その後、脱色可能な染色液で染色したPVDF膜を撮影した。（右）PVDF膜を脱色した後、ビオチン標識したALG-2を用いたファーウェスタン解析により、各種ペプチドとの結合を解析した。両分子の相互作用は、POD-ストレプトアビジンを用いた化学発光法により解析した。





### 図3-17 ALG-2/Sec31Aペプチド複合体のPocket3開口部

ALG-2のPocket 3の開口部に局在するOE1<sup>Q96</sup>及びNS<sup>53</sup>（緑）とSec31A\_ABM Type 2ペプチドのC<sup>Gly6</sup>（黄）の距離を測定した（OE1<sup>Q96</sup>- C<sup>Gly6</sup> : 4.0 Å, NS<sup>53</sup>- C<sup>Gly6</sup> : 4.6 Å）



**図3-18 Sec31A\_ABM Type 2のラムチャンドランプロット**

ALG-2/Sec31Aペプチド複合体中のSec31A\_ABM Type 2ペプチドの二面角を解析し、ラムチャンドランプロットを作成した。（左上）Gly及びProを除くアミノ酸（右上）Gly（右下）Pro

## 第4章

### ALG-2 と ABM Type 2 の $\text{Ca}^{2+}$ 依存的な結合メカニズムの解明

#### 4-1. 要約

構造生物学的実験及び生化学実験から、ALG-2 は ABM Type 1 と ABM Type 2 を異なる疎水性領域で認識し、結合していることを明らかにした (第2章, 第3章参照). しかし,  $\text{Ca}^{2+}$  の結合による ALG-2 の大きな構造変化は確認できず,  $\text{Ca}^{2+}$  依存的に ABM Type 2 と結合する機構を理解するには至らなかった. そこで, これまでに報告されている  $\text{Ca}^{2+}$  非結合型 ALG-2 と  $\text{Ca}^{2+}$  結合型 ALG-2 の構造データを再解析し, ALG-2 が  $\text{Ca}^{2+}$  依存的に ABM Type 2 と結合する機構を考察した. その結果, ALG-2 が ALG-2 結合タンパク質と結合するためには, ALG-2 に含まれる特定のアミノ酸残基が形成するクラスター構造が重要であり,  $\text{Ca}^{2+}$  はクラスター構造の形成と維持に貢献している可能性が示唆された.

## 4-2. 序論

カルシウム結合タンパク質として広く知られているカルモジュリンは、 $\text{Ca}^{2+}$ の結合前後で構造を大きく変化させる。一方、 $\text{Ca}^{2+}$ 非結合型/ $\text{Ca}^{2+}$ 結合型 ALG-2 では、わずかな構造の変化は確認されたものの、ほぼ同じであった。カルモジュリンと比べて ALG-2 の構造変化が小さい理由は、EF1/2 と EF3/4 が  $\alpha 4$  を共有し、EF3/4 と EF5 が  $\alpha 7$  を共有しており、 $\alpha$  ヘリックス間にカルモジュリンで見られるループ領域がないためと推察する。実際、CAPNS1 (PDB code : 1AJ5 [chainA], 1DVI [chain A]) は  $\alpha$  ヘリックス間にループ領域がないために、 $\text{Ca}^{2+}$ の結合前後で大きな構造変化が生じていない (図 4-1)。

これまでに、ALG-2/ALIX ペプチド複合体の X 線結晶構造解析の結果に基づき、ALG-2 が  $\text{Ca}^{2+}$ 依存的に ABM Type 1 と結合する機構が解析されている。 $\text{Ca}^{2+}$ が結合していない状態では、Pocket 1 の開口部を塞いでいる R125 の側鎖が、 $\text{Ca}^{2+}$ の結合により配向を変え、Pocket 1 を開放するという「アルギニンスイッチメカニズム」である。一方、ABM Type 2 の結合領域である Pocket 3 周辺の構造に注目し、 $\text{Ca}^{2+}$ 非結合型 ALG-2 (PDB code : 2ZND) と  $\text{Ca}^{2+}$ 結合型 ALG-2 (PDB code : 2ZN9 [chain A]) 及び ALG-2/Sec31A\_ABM Type 2 ペプチド複合体 (PDB code : 3WXA [chain A]) の構造を比較したが、同様な挙動を示すアミノ酸残基は見つからなかった (図 4-2)。そこで私は、これまでに報告されている  $\text{Ca}^{2+}$ 非結合型 ALG-2 と  $\text{Ca}^{2+}$ 結合型 ALG-2 の構造データを解析・比較し、ALG-2 がどのような機構で  $\text{Ca}^{2+}$ 依存的に ABM Type 2 と結合しているかを解明することを目的とし、研究を進めた。

## 4-3. 材料と方法

### 4-3-1. GST プルダウン解析

第3章に記載した実験方法に準じて、EF1, EF3 及び EF1/EF3 の  $\text{Ca}^{2+}$  結合能を消失させた GST 融合変異体 ALG-2 (ALG-2<sup>E47A</sup>, ALG-2<sup>E114A</sup>, ALG-2<sup>E47A/E114A</sup>) を作製した. 各種タンパク質を固定したグルタチオンセファロース 4B を用いて, HEK293/ALG-2<sub>KD</sub> で発現している内在性の Sec31A 及び ALIX への親和性を, GST プルダウン解析により確認した. 実験は, 2 mM EGTA あるいは 100  $\mu\text{M}$   $\text{CaCl}_2$  の存在下で実施した.

### 4-3-2. $\text{Ca}^{2+}$ 結合前後での ALG-2 の構造比較

$\text{Ca}^{2+}$  非結合型 ALG-2 (PDB code : 2ZND) と  $\text{Ca}^{2+}$  結合型 ALG-2 [chain A] (PDB code : 2ZN9) の構造データを用いて,  $\text{Ca}^{2+}$  結合前後での ALG-2 の構造変化を解析した.

#### (1) 連続する $\alpha$ ヘリックス間の角度

AngleBetweenHelices [<https://raw.githubusercontent.com/Pymol-Scripts/Pymol-script-repo/master/anglebetweenhelices.py>] のプログラムを追加した PyMOL により, ALG-2 の連続する  $\alpha$  ヘリックス間の角度を計算した.

#### (2) Pocket 3 の溶媒露出面積及び体積

CASTp [Binkowski et al., 2003] によりタンパク質の構造データ解析し, ABM Type 2 の結合領域である Pocket 3 の溶媒露出面積及び体積を計算した.

#### (3) RMSD

Superpose [<http://cib.cf.ocha.ac.jp/bitool/SUPERPOSE>] によりタンパク質の配列と, 対応する構造データを解析し, 各アミノ酸残基の RMSD を計算した.

#### (4) 分子内疎水性相互作用

PIC (Protein Interactions Calculator) [Tina et al., 2007] によりタンパク質の構造データを解析し, 分子内で形成している疎水性相互作用 ( $\leq 4.0$ ) を分析した.

#### (5) 温度因子 (B factor)

CCP4 ソフトウェアパッケージ[Collaborative C. P., 1994]に含まれる BAVEGAGE によりタンパク質の構造データを解析し、各アミノ酸残基の温度因子 (B factor) を求めた。

#### 4-3-3. アミノ酸配列

ClustalW2 [Larkin et al., 2007]により ALG-2 (*Homo sapiens*), grancalcin (*Homo sapiens*) 及び CAPNS1 (*Rattus norvegicus*) のアミノ酸多重配列アライメントを行った。得られた結果を Jalview [Waterhouse et al., 2009]を用いて、アミノ酸配列の相同性や性質の違いによって色分け表示した。

### 4-4. 結果

#### 4-4-1. $\text{Ca}^{2+}$ 依存的な ALG-2 の結合機構

ALG-2 は、分子内に存在する EF1, EF3 及び EF5 に  $\text{Ca}^{2+}$ が結合することで、細胞内の様々なタンパク質と結合する。これらのタンパク質と ALG-2 の  $\text{Ca}^{2+}$ 依存的な結合機構を解析するため、まずはじめに ALG-2 結合タンパク質との結合に重要な EF ハンドを特定することにした。EF1, EF3 及び EF1/EF3 の  $\text{Ca}^{2+}$ 結合能を消失させた変異体 ALG-2 (ALG-2<sup>E47A</sup>, ALG-2<sup>E114A</sup>, ALG-2<sup>E47A/E114A</sup>) を作製し、ALIX と Sec31A に対する親和性を GST プルダウン解析により調査した。その結果、 $\text{Ca}^{2+}$ 非存在下では、ALG-2<sup>WT</sup> と変異体 ALG-2 は ALIX 及び Sec31A とは結合せず、 $\text{Ca}^{2+}$ 存在下では ALG-2<sup>WT</sup> のみが両タンパク質と結合する結果が得られた。EF1, EF3 及び EF1/EF3 の  $\text{Ca}^{2+}$ 結合能を消失させた変異体 ALG-2 は、 $\text{Ca}^{2+}$ が存在する条件下であっても、ALIX 及び Sec31A とは結合しないことがわかった (図 4-3)。

#### 4-4-2. $\text{Ca}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$ 結合前後の ALG-2 の構造比較

##### (1) 全体構造 ( $\alpha$ ヘリックス間の角度)

$\text{Ca}^{2+}$ が結合することで引き起こされる全体 (主鎖) 構造の変化を調べるため、 $\text{Ca}^{2+}$ 結合前後の ALG-2 について、連続する  $\alpha$ ヘリックス間の角度を Angle Between Helices により解析した (図 4-4)。その結果、 $\text{Ca}^{2+}$ 非結合型及び  $\text{Ca}^{2+}$ 結合型 ALG-2 の構造において、各  $\alpha$ ヘリックス間の角度に大きな変化は認められなかった。

## (2) ABM Type 2 結合領域 Pocket 3 の構造 (溶媒露出面積と体積)

X線結晶構造解析の結果から、ABM Type 2 は主として  $\alpha 2$ - $\alpha 3$  間のループと  $\alpha 1$  及び  $\alpha 4$  によって形成される疎水性ポケット Pocket 3 に結合することを明らかにした (第3章参照)。Pocket 3 は  $\text{Ca}^{2+}$  が結合する EF1 と EF3 に近接しており、 $\text{Ca}^{2+}$  の着脱により構造が変化していることが考えられた。そこで、 $\text{Ca}^{2+}$  の結合前後の Pocket 3 の構造変化を確認するため、Pocket 3 の溶媒露出面積及び体積を比較した。溶媒露出面積とは、タンパク質の分子表面に沿って溶媒分子 (通常は水: 半径 1.4 Å) を移動させた時に、溶媒分子の中心点が描く曲面の面積である。解析の結果を図 4-5 に示す。 $\text{Ca}^{2+}$  非結合型 ALG-2 の溶媒露出面積及び体積は  $250.6 \text{ \AA}^2$ ,  $331.7 \text{ \AA}^3$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  結合型 ALG-2 では  $217.7 \text{ \AA}^2$ ,  $248.5 \text{ \AA}^3$  であった。

## (3) 各アミノ酸残基の構造 (RMSD)

Pocket 3 の局所的な構造変化を確認するため、 $\text{Ca}^{2+}$  の結合前後の ALG-2 (PDB code : 2ZND/2ZN9) から Pocket 3 周辺のアミノ酸 25-148 a.a. を抽出し、 $\text{C}^\alpha$  の RMSD を計算した。対照分子の構造を重ね合わせたときに、構造のずれが大きいほど高い RMSD 値を示す。解析結果から、(1) Q25-G41 周辺 (EF1 領域), (2) I69 (EF2 領域), (3) R74 (EF2 領域), (4) R100-M109 周辺 (EF3 領域), (5) L119-D132 (EF3 領域), (6) Q145 (EF4 領域) で RMSD は高い値を示すことが判明した。RMSD の値が高いアミノ酸残基の多くは、EF ハンドのループ領域に多く存在していたが、 $\alpha$  ヘリックスを形成しているアミノ酸残基にも見出された (図 4-6)。

## (4) 構造の揺らぎ (温度因子 : B factor)

タンパク質結晶構造解析によって得られるデータのひとつに、温度因子 (B factor) がある。温度因子は構造の揺らぎを表す指標のひとつであり、値が高い領域では熱運動が活発に起こり、構造が揺らいでいることを示している。Pocket 3 周辺のアミノ酸残基 (25-148 a.a.) の  $\text{C}^\alpha$  の温度因子の平均値 ( $\mu$ ) と標準偏差 ( $\sigma$ ) を計算した結果は、 $\text{Ca}^{2+}$  非結合型 ALG-2 で  $17.415 \text{ \AA}^2$ ,  $4.662 \text{ \AA}^2$  であり、 $\text{Ca}^{2+}$  結合型 ALG-2 では  $46.896 \text{ \AA}^2$ ,  $7.794 \text{ \AA}^2$  であった。 $\text{Ca}^{2+}$  結合前後の ALG-2 の構造を、温度因子によって色分け表示したモデル図を図 4-7 に示す。青色の領域では温度因子が低く、赤色の領域では温度因子が高いことを示している。

温度因子が平均集団の上限値 ( $\mu + \sigma$ ) を超えたアミノ酸残基は、 $\text{Ca}^{2+}$  非結合型 ALG-2 で、(1) Q25-F27 (EF1 領域), (2) R74-K77 (EF2 領域), (3) S120-F130 (EF3 領域), (4) G142 (EF4 領域) であり、 $\text{Ca}^{2+}$  結合型 ALG-2 では、(1) D73-K77 (EF2 領域), (2) L134-R143 (EF4 領域) であった。 $\text{Ca}^{2+}$  結合前後の両構造において、ループ領域で温度因子が高

くなるという共通の傾向があるものの、 $\alpha 5$ - $\alpha 6$  のループ領域は  $\text{Ca}^{2+}$  結合前の ALG-2 でのみ高い温度因子の値を示し、 $\alpha 6$ - $\alpha 7$  のループ領域は  $\text{Ca}^{2+}$  が結合した ALG-2 でのみ高い温度因子の値を示した。

#### (5) 分子内相互作用

$\text{Ca}^{2+}$  結合前後の ALG-2 で確認された Pocket 3 の局所的な構造変化は、分子内相互作用（特に疎水性相互作用）ネットワークの変化に起因していると仮説を立て、 $\text{Ca}^{2+}$  非結合型及び  $\text{Ca}^{2+}$  結合型 ALG-2 のそれぞれで、分子内疎水性相互作用（ $\leq 4.0 \text{ \AA}$ ）を解析した。 $\text{Ca}^{2+}$  の結合前後で違いがみられた疎水性相互作用の一部を抜粋して表 4-1 に示す。 $\text{Ca}^{2+}$  の結合前後の ALG-2 では、大きく分けて二つの領域で分子内相互作用に違いが生じていることがわかった。一つ目は、 $\alpha 2$  から  $\alpha 4$  に該当する L48 から I92 に渡る領域であり、そのなかには L48, L52, V88, I92 をはじめとし、ABM Type 2 の結合領域である Pocket 3 を構成するアミノ酸残基が含まれていた。 $\text{C}^{\alpha}$  炭素の RMSD の値からは、 $\text{Ca}^{2+}$  結合前後で大きな違いが認められなかった領域であるが、側鎖構造が若干変化していた。二つ目の領域は、I110 から A118 に至るアミノ酸残基である。 $\alpha 5$  に該当するこの領域には  $\text{Ca}^{2+}$  が結合する EF3 が含まれており、 $\text{Ca}^{2+}$  の結合により分子内相互作用を変化させていることが予想された。該当する領域のみを抽出し、各種構造を比較した結果、I110, K112, K116 付近の側鎖構造が、 $\text{Ca}^{2+}$  の結合前後で構造を変化させていた（図 4-8）。

#### 4-4-3. PEF タンパク質のアミノ酸配列及び分子内相互作用の比較

PEF タンパク質は、5 つの EF ハンドから成る独特な構造をもつ。EF ハンドは、ループ領域に存在する 5 残基がカルシウムと結合し、この位置には Asp や Glu が出現しやすい傾向がある。また、ループ領域の 6 番目の残基は Gly に制限され、2 つの  $\alpha$  ヘリックスには疎水性アミノ酸が多く含まれるという、アミノ酸配列の特徴が知られている。これまでに、ALG-2 に加え、Grancalcin（ヒト由来）と CAPNS1（ラット由来）の  $\text{Ca}^{2+}$  非結合型及び  $\text{Ca}^{2+}$  結合型の結晶構造が報告されており、 $\text{Ca}^{2+}$  が結合する領域に違いはあるものの（ALG-2 : EF1, EF3, EF5 ; Grancalcin : EF1, EF3 ; CAPNS1 : EF1, EF2, EF3）、互いの構造は似ていることを確認している。概して、構造の似たタンパク質のアミノ酸配列は高い保存性がみられることが多い。そこで私は、PEF タンパク質のアミノ酸多重配列アライメントを行い、タンパク質間で保存されているアミノ酸残基を解析した。

アミノ酸多重配列アライメントの結果、EF ハンドの  $\alpha$  ヘリックス及びループ領域周辺に高い保存性を示すアミノ酸残基を確認した。保存されているアミノ酸残基の多くは、Phe, Trp, Leu といった疎水性アミノ酸が占めていた（図 4-9）。最近、アミノ酸配列から EF ハンドの構造を考察した論文 [Denessiouk et al., 2014] のなかで、“Odd 型” 及び “Even 型” EF ハ



ンドの特定の位置に存在するアミノ酸残基は、クラスター構造 (ClusterI/ClusterII) を形成し、EF ハンドの構造維持と疎水性領域の形成に貢献していることが報告された。アミノ酸多重配列アライメントの結果から、PEF タンパク質においても、Cluster I を形成しているアミノ酸残基 (Odd 型 EF ハンドの X-4, Even 型 EF ハンドの -X+1 及び -Z+1) は、芳香族アミノ酸が保存されていることを確認した (図 4-9)。

PEF タンパク質の Cluster I 及び Cluster II (Odd 型 EF ハンドの -X+1 及び -Z+1, Even 型 EF ハンドの X-4) を構成するアミノ酸残基と分子内相互作用を形成しているアミノ酸残基を解析した結果、Cluster I を構成するアミノ酸残基は、ALG-2 の I43, F60, I110, A118 及び I152 に相当するアミノ酸残基と相互作用し、Cluster II を構成するアミノ酸残基は、ALG-2 の L52, V88, L119, I146 に相当するアミノ酸残基と相互作用していることがわかった。また ALG-2 は、Cluster I/Cluster II 以外にも、Odd 型 EF の X-5, -X-1 及び -Z+5 は、Even 型 EF の -Z+1, -X-1 及び -Z+8 と相互作用を形成していた。

## 4-5. 考察

### 4-5-1. $\text{Ca}^{2+}$ 依存的な ALG-2 の結合機構

ALG-2 は  $\text{Ca}^{2+}$  依存的に、ABM Type 1 及び ABM Type 2 をもつ種々のタンパク質と結合する。EF1 及び EF3 の  $\text{Ca}^{2+}$  結合能を消失させた変異体 ALG-2 と ALIX 及び Sec31A の親和性を解析した結果、EF1 及び EF3 への  $\text{Ca}^{2+}$  の結合が、両タンパク質との結合を調節していることがわかった。ALIX の ABM Type 1 と Sec31A の ABM Type 2 は、ALG-2 の異なる領域に結合するにもかかわらず、EF1 と EF3 の両方が、ABM Type 1 と ABM Type 2 との結合に重要であることは興味深い結果である。この結果は、 $\text{Ca}^{2+}$  が結合した EF1 及び EF3 は協調して、ABM Type 1 及び ABM Type 2 の結合領域を形成していることを示唆している。

### 4-5-2. $\text{Ca}^{2+}$ 結合前後の ALG-2 の構造比較

$\text{Ca}^{2+}$  結合前後の ALG-2 の構造特性を多角的に解析した結果から、ALG-2 と ALG-2 結合タンパク質の  $\text{Ca}^{2+}$  依存的な結合機構について考察する。ALG-2 の連続する  $\alpha$  ヘリックス間の角度を計算した結果、 $\text{Ca}^{2+}$  結合前後で  $\alpha$  ヘリックス間の角度が大きく変化していないことがわかった。この結果は、 $\text{Ca}^{2+}$  の結合によって EF ハンドの構造は変化しておらず、カルモジュリンでみられるような大きな構造変化が起きていないことを意味している。実際、 $\text{Ca}^{2+}$  結合前後の ALG-2 の構造を重ね合わせて RMSD を計算した結果、0.810 Å (<2.4 Å) と低い値を示した。また、ABM Type 2 の結合領域である Pocket 3 についても、 $\text{Ca}^{2+}$  非結合型及び  $\text{Ca}^{2+}$  結合型 ALG-2 の溶媒露出面積及び体積に顕著な差は認められず、一見ただけでは、 $\text{Ca}^{2+}$  結合前後の構造で大きな変化は認められなかった。

Ca<sup>2+</sup>結合前後の Pocket 3 の構造変化を詳細に解析するため、ALG-2 から Pocket 3 周辺のアミノ酸残基 25-148 a.a.のみを抽出し、各アミノ酸残基の RMSD を計算した。その結果、(1) Q25-G41 周辺 (EF1 領域)、(2) I69 (EF2 領域)、(3) R74 (EF2 領域)、(4) R100-M109 周辺 (EF3 領域)、(5) L119-D132 (EF3 領域)、(6) Q145 (EF4 領域) で高い値を示した。この結果から、Ca<sup>2+</sup>の結合前後で構造を変化させていないように見えた Pocket 3 は、Ca<sup>2+</sup>の結合により局所的に構造を変化させていることが予想された。

わずかな構造変化が見出された Pocket 3 周辺のアミノ酸残基に注目し、各アミノ酸残基毎の温度因子を計算した。構造に変化が見られたアミノ酸残基の中には、Ca<sup>2+</sup>非結合型及び Ca<sup>2+</sup>結合型 ALG-2 の両方で、周辺のアミノ酸残基に比べて高い温度因子を示す領域 (Q25-F27, R74-K77) が含まれていた。しかし、Ca<sup>2+</sup>結合前後の構造で違いが見られた L28-G41, I69, R100-M109 及び Q145 の温度因子は低い値を示し、L119-D132 は Ca<sup>2+</sup>結合前の構造のみ高い温度因子の値を示した。温度因子が高い値を示したアミノ酸残基は、熱運動により構造が揺らいでいることが考えられるが、L28-G41, I69, R100-M109 及び Q145 の熱運動は抑制された状態で、Ca<sup>2+</sup>の結合によって構造を変化させていることが考えられる。また、L119-D132 については、Ca<sup>2+</sup>非結合型 ALG-2 では構造に揺らぎが生じているものの、Ca<sup>2+</sup>の結合により構造を変化させ、その後安定した構造を形成していることが予想された。

Ca<sup>2+</sup>の結合前後の ALG-2 で見出された局所的な構造変化は、分子内相互作用の変化に起因していると仮説を立て、両構造の分子内疎水相互作用を解析した。その結果、Ca<sup>2+</sup>の結合前後の構造で、分子内疎水性相互作用変化が生じている領域があることが判明した。そのなかには、Ca<sup>2+</sup>が結合する EF1 及び EF3 から離れた領域に存在するアミノ酸残基も含まれており、Ca<sup>2+</sup>の結合の影響は分子内疎水性相互作用を介して ALG-2 全体の構造に影響を及ぼしていることが推測された。

#### 4-5-3. PEF タンパク質のアミノ酸配及び構造的な特徴

ALG-2, Grancalcin 及び CAPNS1 のアミノ酸多重配列アライメントから、Phe, Tyr 及び Trp といった芳香族アミノ酸が保存されている領域が見つかった。そのなかには、クラスター構造を形成するアミノ酸残基が含まれていた。これらのアミノ酸残基は、PEF タンパク質でみられる独特な構造の形成と維持に貢献していることが予想される。

これまでに、クラスター構造 : Cluster I/Cluster II を形成しているアミノ酸残基は、Ca<sup>2+</sup>やタンパク質との結合に重要であることが報告されており、S100P の Cluster I の X-4 に位置する F15 を Ala に置換した変異体は、ダイマー形成ができなくなり [Koltzsch et al., 2000]、Calbindin D9K では、Cluster I の X-4 (F10)、-Z+1 (F66) 及び Cluster II の -Z+1 (L28) を Ala に置換した場合で Ca<sup>2+</sup>との親和性が消失し、-Z+1 (F66) を Trp に変異させることで Ca<sup>2+</sup>との親和性が 25 倍増加することが確認されている [Kragelund et al., 1998]。ALG-2 においても、Cluster I を構成する F148 及び F85 (図 4-10) を Ser, Ala に置換した変異体 ALG-2 は

Sec31A\_ABM Type2 ペプチドとの結合が消失し[第 3 章参照], Y180 を Ala に置換した変異体 ALG-2 はダイマーが形成できなくなることを見い出している[Okumura et al., 2009]. また, Cluster I を形成しているアミノ酸残基と相互作用している F60 を Ala に置換した変異体では Sec31A 及び ALIX との結合能を失い[Shibata et al., 2008], Cluster II を形成しているアミノ酸残基と相互作用している L52 を Ala に置換した変異体は Sec31A との結合が消失した[第 3 章参照].

これらの知見は, ALG-2 が ALG-2 結合タンパク質と結合するためには, クラスタ構造が重要であることを強く示唆している.  $\text{Ca}^{2+}$ 結合前後の ALG-2 において, クラスタ構造を形成するアミノ酸残基及びクラスタ構造を形成するアミノ酸残基と相互作用を形成している一部のアミノ酸残基の立体構造及び分子内相互作用が異なっており, ALG-2 に結合する  $\text{Ca}^{2+}$ の役割としてはクラスタ構造の形成あるいは維持が予想される. この仮説は, クラスタ構造を安定させた変異を加えた変異体 ALG-2 (例えば, クラスタ構造を形成する Phe の Trp への変異) は,  $\text{Ca}^{2+}$ の非存在下あるいは低  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度存在下でも ALG-2 結合タンパク質と相互作用が可能であることを予測している.

#### 4-6. 結論

$\text{Ca}^{2+}$ 非結合型 ALG-2 (PDB code : 2ZND) と  $\text{Ca}^{2+}$ 結合型 ALG-2 (PDB code : 2ZN9) の構造を比較した結果, ABM Type2 の結合領域である Pocket 3 において局所的な構造変化を認められた. また, ALG-2 は  $\text{Ca}^{2+}$ の結合により, 分子内相互作用が変化していることがわかった. 構造及び分子内相互作用に変化が見られたアミノ酸残基には, クラスタ構造を形成するアミノ酸残基も含まれていた.

これまでの知見から, クラスタ構造は ABM Type 2 との結合に重要であり, ALG-2 に結合する  $\text{Ca}^{2+}$ はクラスタ構造の形成あるいは維持に貢献していることが予想された.

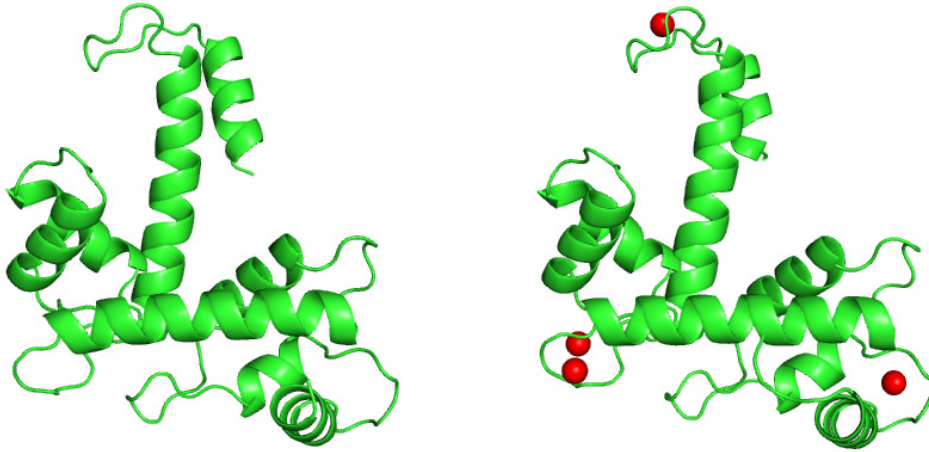
**表4-1 Ca<sup>2+</sup>/Zn<sup>2+</sup>結合前後のALG-2の分子内疎水性相互作用の比較**

解析ソフトPICにより, Ca<sup>2+</sup>非結合型ALG-2 (PDB code : 2ZND) , Ca<sup>2+</sup>結合型ALG-2 (PDB code : 2ZN9) 及びZn<sup>2+</sup>結合型ALG-2 (PDB code : 2ZN8) の分子内相互作用を解析し, Ca<sup>2+</sup>/Zn<sup>2+</sup>結合前後で違いが見られた疎水性相互作用 (≤4.0 Å) を抜粋して一覧にまとめた.

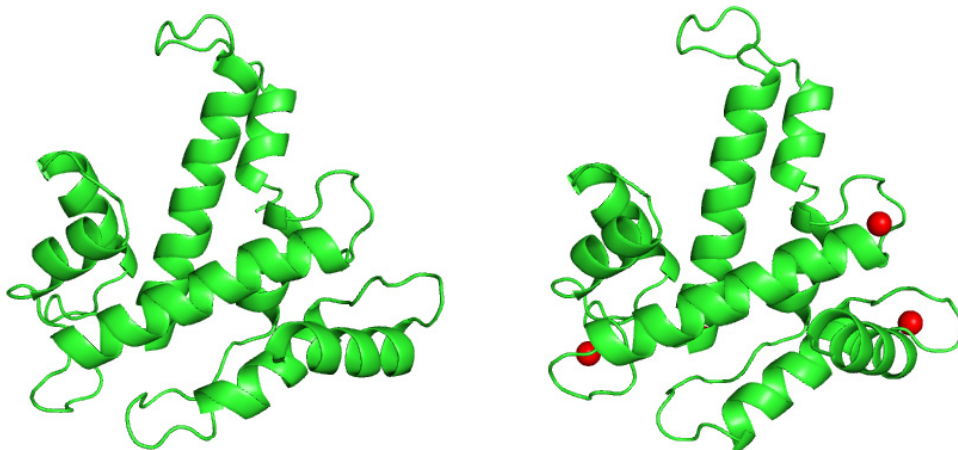
Ca <sup>2+</sup> 非結合型ALG-2 PDB code : 2ZND	Ca <sup>2+</sup> 結合型ALG-2 PDB code : 2ZN9	Zn <sup>2+</sup> 結合型ALG-2 (参考) PDB code : 2ZN8
27Phe-89Trp		
48Leu-52Leu		
52Leu-92Ile		
	88Ile-92Ile	88Ile-92Ile
89Ile-80Val		
71Met-91Tyr		
80Val-88Val		
	110Ile-115Leu	110Ile-115Leu
110Ile-146Ile		
110Ile-151Phe		
115Leu-119Leu		
	115Leu-146Ile	115Leu-146Ile
115Leu-151Phe		
	118Ala-151Phe	118Ala-151Phe
126Leu-158Leu		
	135Ile-146Ile	135Ile-146Ile
138Phe-146Ile		

疎水性相互作用 ≤ 4.0 Å

A

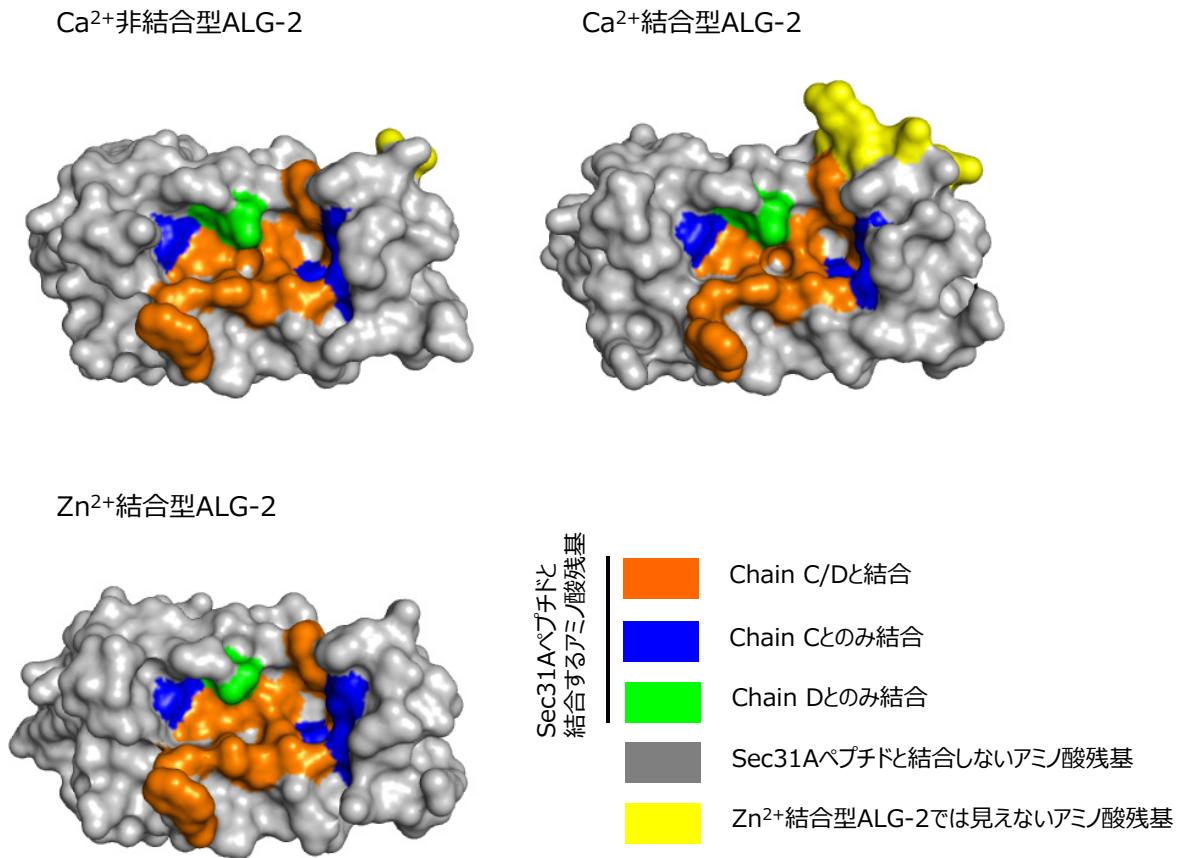


B



#### 図4-1 Ca<sup>2+</sup>結合前後のALG-2及びCAPNS1の構造比較

Ca<sup>2+</sup>結合前後のALG-2及びCAPNS1の結晶構造を、タンパク質をリボンモデル、Ca<sup>2+</sup>を球モデルで描写した。(A-左) Ca<sup>2+</sup>非結合型ALG-2 (PDB code : 2ZND) (A-右) Ca<sup>2+</sup>結合型ALG-2 (PDB code : 2ZN9 [chain A]) (B-左) Ca<sup>2+</sup>非結合型CAPNS1 (PDB code : 1AJ5 [chainA ]) (B-右) Ca<sup>2+</sup>非結合型CAPNS1 (PDB code : 1DVI [chainA ])



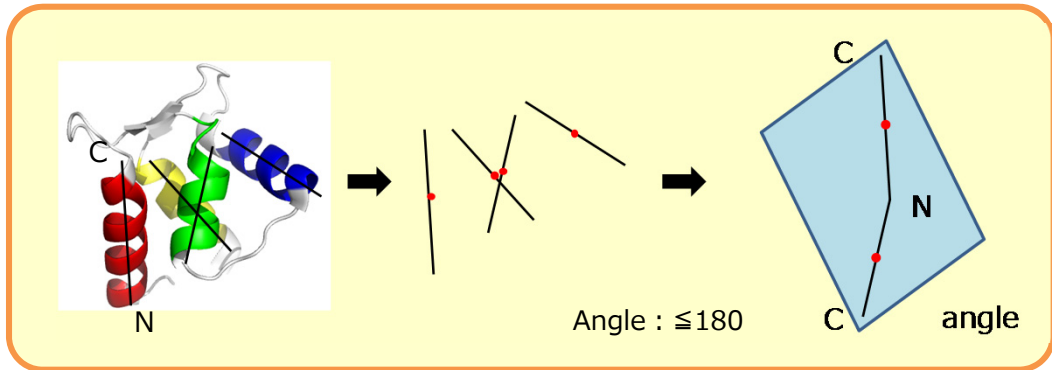
#### 図4-2 Ca<sup>2+</sup>/Zn<sup>2+</sup>結合前後のPocket 3の分子表面構造の比較

Ca<sup>2+</sup>非結合型ALG-2 (PDB code : 2ZND) , Ca<sup>2+</sup>結合型ALG-2 (PDB code : 2ZN9 [chainA]) 及びZn<sup>2+</sup>結合型ALG-2 (PDB code : 2ZN8 [chainA]) のPocket 3の構造を、表面モデルで描写した。ALG-2/Sec31Aペプチド複合体の結晶構造 (PDB code : 3WXA) の Sec31A\_ABM Type 2ペプチドと相互作用しているアミノ酸を橙 (chain C/Dと結合) , 青 (Chain Cとのみ結合) 及び黄緑 (Chain Dとのみ結合) で色分け表示した。Zn<sup>2+</sup>結合型ALG-2 では見えないN端側のアミノ酸残基 (2ZND : <sup>25</sup>Q, 2ZN9 : <sup>21</sup>ALPDQ<sup>25</sup>) を黄色で表示した。



**図4-3 ALG-2のCa<sup>2+</sup>依存的な結合機構**

ALG-2 (WT) , EF1のGlu47をAlaに置換したALG-2 (E47A) , EF3のGlu114をAlaに置換したALG-2 (E114A) 及びGlu47/Glu114の両残基をAlaに置換したALG-2 (E47A/E114A) をセファロースビーズに固定し, 2 mM EGTAあるいは100 μM CaCl<sub>2</sub>存在下でSec31A及びALIXのプルダウン解析を行った. 抗Sec31A抗体及び抗ALIX抗体を用いたウェスタンブロットティング法により, セファロースビーズに結合したタンパク質を解析した.



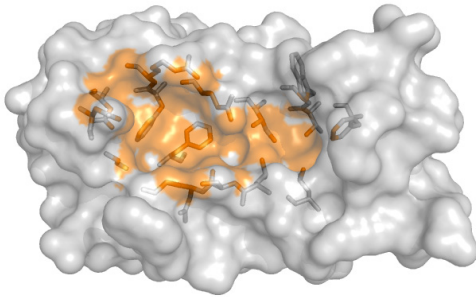
	$\alpha 1-\alpha 2$	$\alpha 2-\alpha 3$	$\alpha 3-\alpha 4$	$\alpha 4-\alpha 5$	$\alpha 5-\alpha 6$	$\alpha 6-\alpha 7$	$\alpha 7-\alpha 8$
Ca <sup>2+</sup> 非結合型	108.26	125.38	137.13	130.19	103.45	123.45	147.34
Ca <sup>2+</sup> 結合型	112.97	117.97	131.55	123.71	105.25	119.85	144.61

**図4-4 Ca<sup>2+</sup>結合前後のALG-2内の連続する $\alpha$ ヘリックス間の角度の比較**

解析ソフトAngleBetweenHelicesにより、Ca<sup>2+</sup>非結合型ALG-2 (PDB code : 2ZND) 及びCa<sup>2+</sup>結合型ALG-2 (PDB code : 2ZN9 [chainA]) の隣り合う $\alpha$ ヘリックス間の角度 ( $\leq 180^\circ$ ) を計算した。



**A**



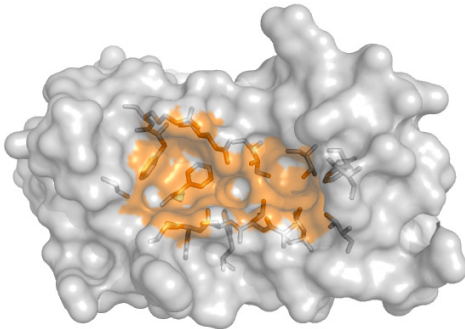
溶媒露出面積 250.6 Å<sup>2</sup>

体積 331.7 Å<sup>3</sup>

Pocket 3を構成するアミノ酸

L48, L52, S53, N54, G55, F85  
V88, W89, I92, Q96, F99, R100  
D103, N106, G108, F148

**B**



溶媒露出面積 217.7 Å<sup>2</sup>

体積 248.5 Å<sup>3</sup>

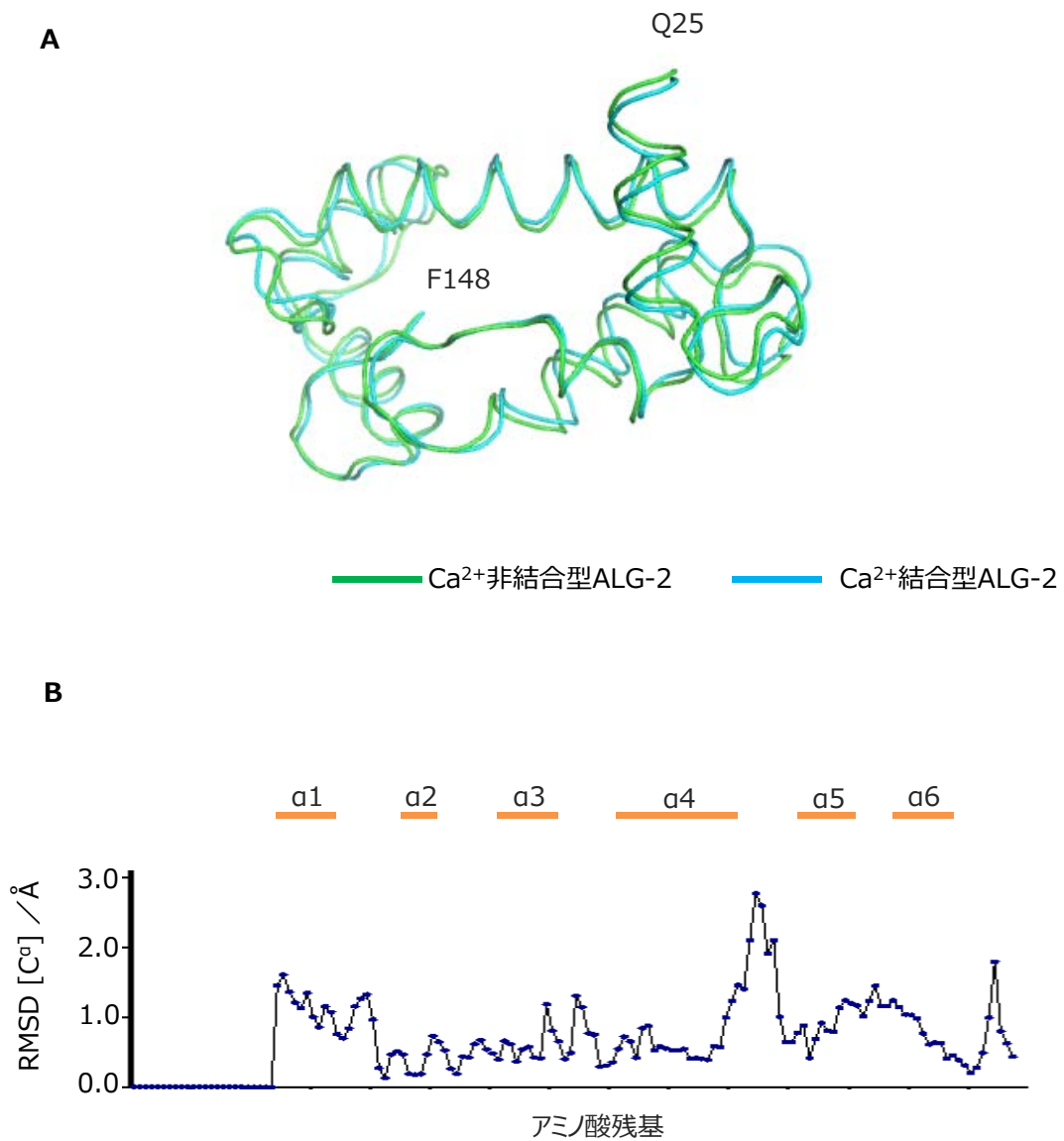
Pocket 3を構成するアミノ酸

V31, V35, L48, L52, S53, N54  
G55, F60, F85, V88, W89, I92  
Q96, F99, R100, G108, F148

#### 図4-5 Ca<sup>2+</sup>結合前後のPocket3の溶媒露出面積及び体積の比較

解析ソフトCASTpにより、Ca<sup>2+</sup>結合前後のPocket 3の溶媒露出面積及び体積を解析した。また、CASTpが同定したPocket 3を構成するアミノ酸を橙色に色分けしたALG-2の表面モデルを描写した。

(A) Ca<sup>2+</sup>非結合型ALG-2 (PDB code : 2ZND) : 溶媒露出面積 250.6 Å<sup>2</sup>, 体積 331.7 Å<sup>3</sup> (B) Ca<sup>2+</sup>結合型ALG-2 (PDB code : 2ZN9) : 溶媒露出面積 217.7 Å<sup>2</sup>, 体積 248.5 Å<sup>3</sup>

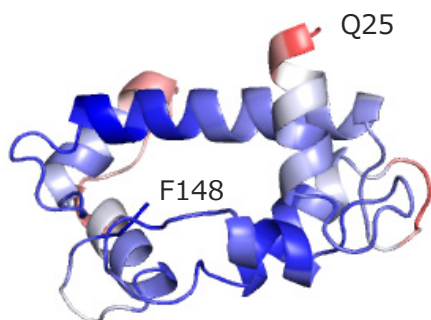


**図4-6 Ca<sup>2+</sup>結合前後の構造のALG-2 (25-148 a.a.) の構造の重ね合わせ**

(A) Ca<sup>2+</sup>非結合型ALG-2 (緑 ; PDB code : 2ZND [25-148 a.a.]) とCa<sup>2+</sup>結合型ALG-2 (水色 ; PDB code : 2ZN9 [25-148 a.a.]) の構造を重ね合わせて線モデルで描写した。

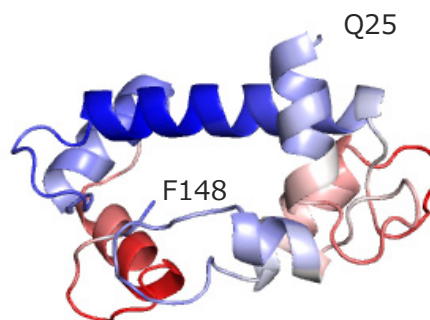
(B) 解析ソフトSuperposeにより, Ca<sup>2+</sup>結合前後のALG-2 (25-148 a.a.) の構造のRMSDを計算し, 折れ線グラフで表した。

**A** Ca<sup>2+</sup>非結合型ALG-2



平均温度因子 ( $\mu$ ) : 17.415 Å<sup>2</sup>  
標準偏差 ( $\sigma$ ) : 4.662 Å<sup>2</sup>

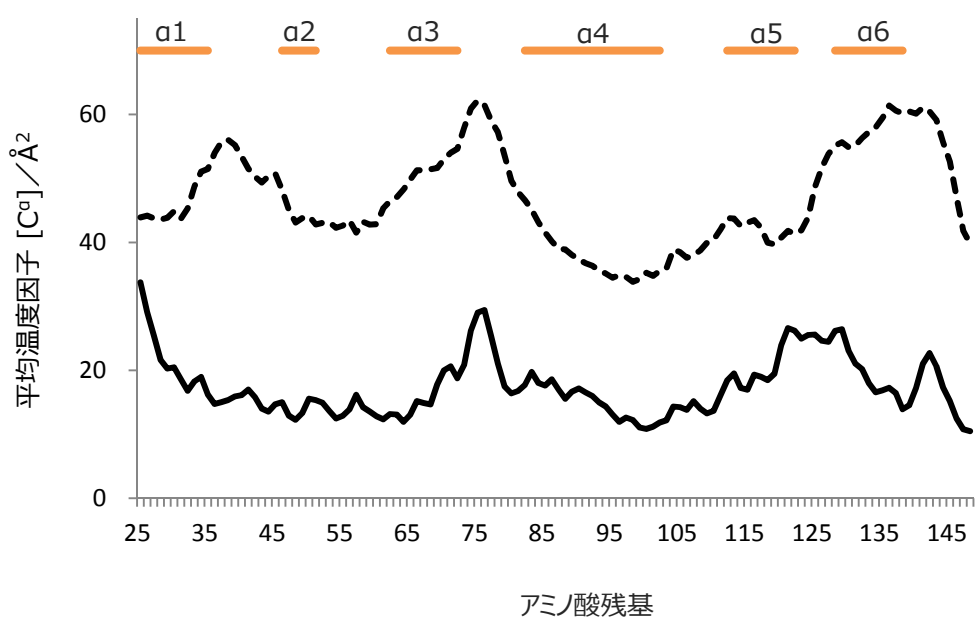
**B** Ca<sup>2+</sup>結合型ALG-2



平均温度因子 ( $\mu$ ) : 46.896 Å<sup>2</sup>  
標準偏差 ( $\sigma$ ) : 7.794 Å<sup>2</sup>

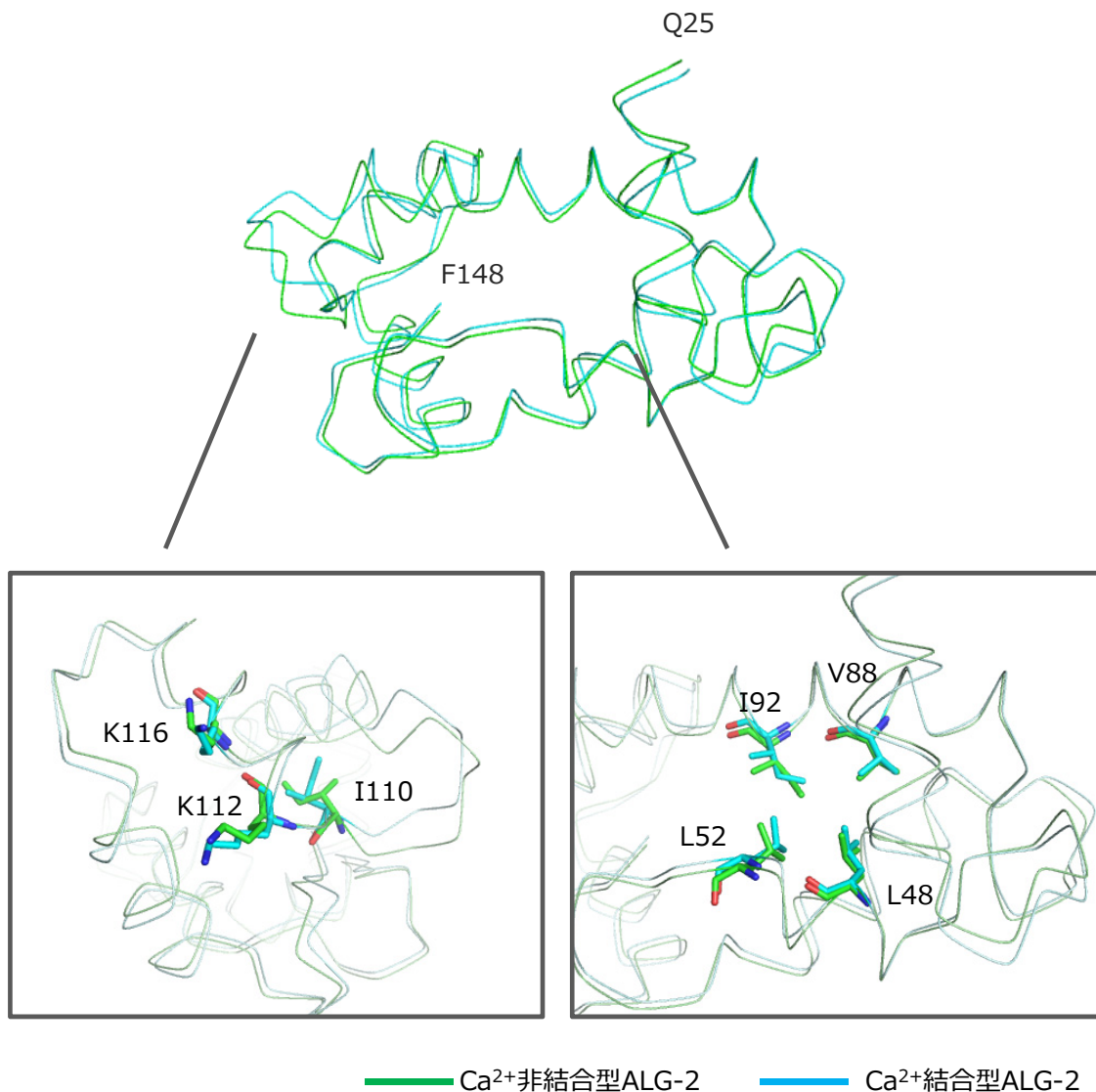
Low  $\longrightarrow$  High

**C**



**図4-7 Ca<sup>2+</sup>結合前後のALG-2 (25-148 a.a.) の温度因子 (B factor) の比較**

(A) 温度因子の高低により色分けしたCa<sup>2+</sup>非結合型ALG-2 (PDB code : 2ZND [25-148 a.a.]) のリボンモデル (B) 温度因子の高低により色分けしたCa<sup>2+</sup>結合型ALG-2 (PDB code : 2ZN9 [Chain A ; 25-148 a.a.]) のリボンモデル (C) Ca<sup>2+</sup>結合前後のALG-2 (25-148 a.a.) の各アミノ酸の温度因子を折れ線グラフに表した (Ca<sup>2+</sup>非結合型 : 実線, Ca<sup>2+</sup>結合型 : 破線) .



#### 図4-8 Ca<sup>2+</sup>結合前後のALG-2の構造の重ね合わせ

Ca<sup>2+</sup>非結合型ALG-2（緑；PDB code：2ZND [ChainA, 25-148 a.a.]）とCa<sup>2+</sup>結合型ALG-2（水色；PDB code：2ZN9 [Chain A, 25-148 a.a.]）の構造を重ね合わせ、主鎖構造を線モデルで描写した。Ca<sup>2+</sup>の結合により分子内相互作用に変化が生じたアミノ酸（L48, L52, V88, I92, I110, K112及びK116）を棒モデルで描写した。

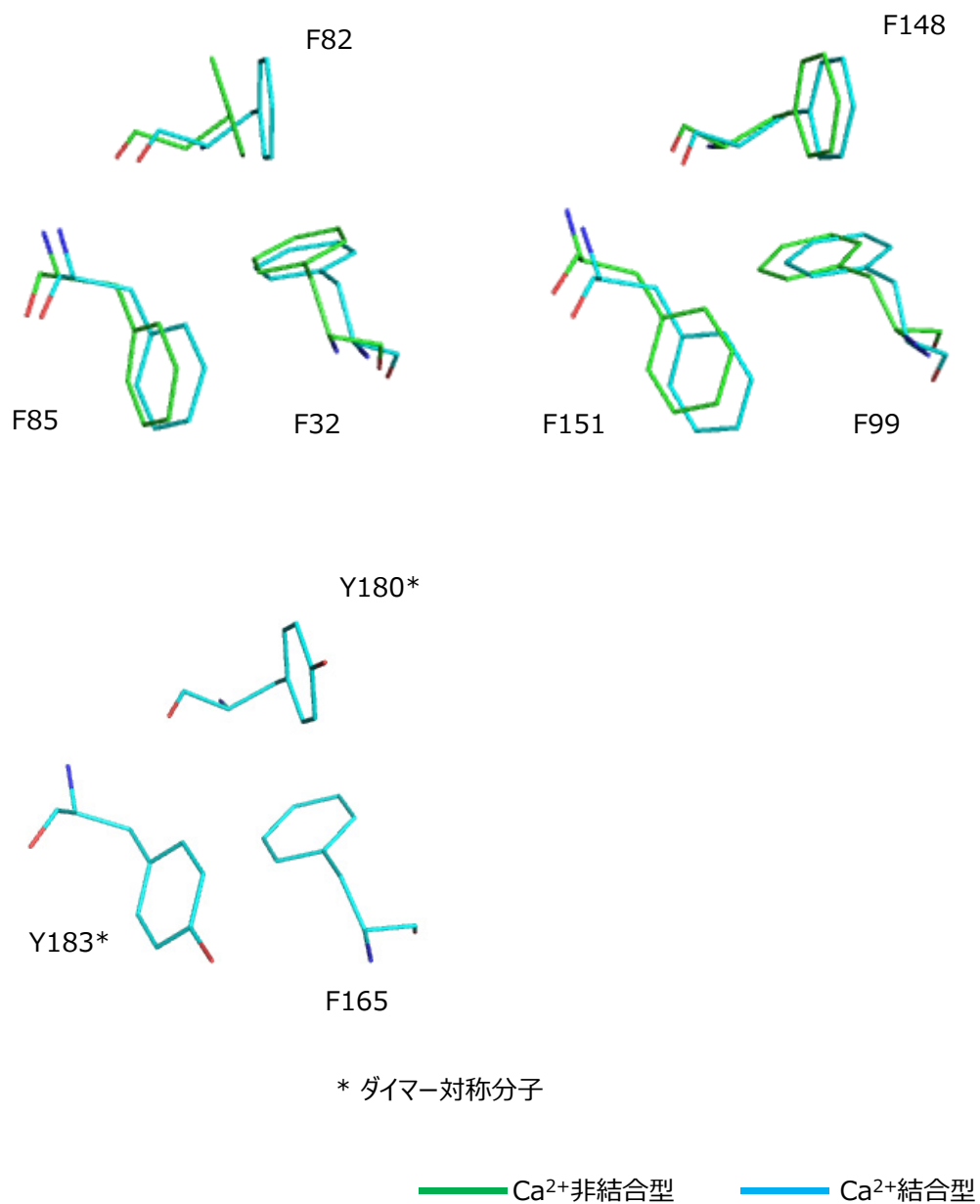


▼ Cluster I    ▽ Cluster II

\* *Rattus norvegicus*

#### 図4-9 PEFタンパク質のアミノ酸多重アライメント

ALG-2 (UniProt : O75340 [*Homo sapiens*]) , Grancalcin (UniProt : P28676 [*Homo sapiens*]) 及びCAPNS1 (UniProt : Q64537 [*Rattus norvegicus*]) からPEFドメインを構成するアミノ酸配列を抽出し, 多重アミノ酸アライメントを行った. Cluster I構造を形成するアミノ酸 (Odd型EFハンドのX-4, Even型EFハンドの-X+1及び-Z+1) を白逆三角 (▽) , Cluster II構造を形成するアミノ酸 (Odd型EFハンドの-X+1及び-Z+1, Even型EFハンドのX-4) を黒逆三角 (▼) で示した.



#### 図4-10 ALG-2のClusterI 構造

$\text{Ca}^{2+}$ 非結合型ALG-2（緑；PDB code：2ZND[ChainA]）及び $\text{Ca}^{2+}$ 結合型ALG-2（水色；PDB code：2ZN9[ChainA]）からCluster Iを形成するアミノ酸残基を抽出して棒モデルで描写した。なお、2ZN9のY180及びY183はダイマー対称分子のアミノ酸である。

## 引用論文

- Afonine, P. V., Grosse-Kunstleve, R. W., Echols, N., Headd, J. J., Moriarty, N. W., Mustyakimov, M., Adams, P. D. (2012). Towards automated crystallographic structure refinement with phenix. refine. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 68(4), 352-367.
- Binkowski, T. A., Naghibzadeh, S., Liang, J. (2003). CASTp: computed atlas of surface topography of proteins. *Nucleic Acids Research*, 31(13), 3352-3355.
- Blanchard, H., Grochulski, P., Li, Y., Arthur, J. S. C., Davies, P. L., Elce, J. S., Cygler, M. (1997). Structure of a calpain Ca<sup>2+</sup>-binding domain reveals a novel EF-hand and Ca<sup>2+</sup>-induced conformational changes. *Nature Structural & Molecular Biology*, 4(7), 532-538.
- Camacho, C. J., Zhang, C. (2005). FastContact: rapid estimate of contact and binding free energies. *Bioinformatics*, 21(10), 2534-2536.
- Collaborative, C. P. (1994). The CCP4 suite: programs for protein crystallography. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography*, 50(Pt 5), 760.
- Denessiouk, K., Permyakov, S., Denesyuk, A., Permyakov, E., Johnson, M. S. (2014). Two Structural Motifs within Canonical EF-Hand Calcium-Binding Domains Identify Five Different Classes of Calcium Buffers and Sensors. *PloS one*, 9(10), e109287.
- Emsley, P., Cowtan, K. (2004). Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 60(12), 2126-2132.
- Harris, R., Olson, A. J., Goodsell, D. S. (2008). Automated prediction of ligand - binding sites in proteins. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 70(4), 1506-1517.
- Helm, J. R., Bentley, M., Thorsen, K. D., Wang, T., Foltz, L., Oorschot, V., Hay, J. C. (2014). Apoptosis-linked Gene-2 (ALG-2)/Sec31 Interactions Regulate Endoplasmic Reticulum (ER)-to-Golgi Transport A POTENTIAL EFFECTOR PATHWAY FOR LUMINAL CALCIUM. *Journal of Biological Chemistry*, 289(34), 23609-23628.

Hiraki, M., Kato, R., Nagai, M., Satoh, T., Hirano, S., Ihara, K., Wakatsuki, S. (2006). Development of an automated large-scale protein-crystallization and monitoring system for high-throughput protein-structure analyses. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 62(9), 1058-1065.

Høj, B. R., la Cour, J. M., Mollerup, J., Berchtold, M. W. (2009). ALG-2 knockdown in HeLa cells results in G2/M cell cycle phase accumulation and cell death. *Biochemical and biophysical research communications*, 378(1), 145-148.

Katoh, K., Suzuki, H., Terasawa, Y., Mizuno, T., Yasuda, J., Shibata, H., Maki, M. (2005). The penta-EF-hand protein ALG-2 interacts directly with the ESCRT-I component TSG101, and Ca<sup>2+</sup>-dependently co-localizes to aberrant endosomes with dominant-negative AAA ATPase SKD1/Vps4B. *Biochem. J*, 391, 677-685.

Kitaura, Y., Watanabe, M., Satoh, H., Kawai, T., Hitomi, K., Maki, M. (1999). Peflin, a novel member of the five-EF-hand-protein family, is similar to the apoptosis-linked gene 2 (ALG-2) protein but possesses nonapeptide repeats in the N-terminal hydrophobic region. *Biochemical and biophysical research communications*, 263(1), 68-75.

Kitaura, Y., Satoh, H., Takahashi, H., Shibata, H., Maki, M. (2002). Both ALG-2 and peflin, penta-EF-hand (PEF) proteins, are stabilized by dimerization through their fifth EF-hand regions. *Archives of biochemistry and biophysics*, 399(1), 12-18.

Koltzsch, M., Gerke, V. (2000). Identification of hydrophobic amino acid residues involved in the formation of S100P homodimers in vivo. *Biochemistry*, 39(31), 9533-9539.

Kragelund, B. B., Jönsson, M., Bifulco, G., Chazin, W. J., Nilsson, H., Finn, B. E., Linse, S. (1998). Hydrophobic core substitutions in calbindin D9k: effects on Ca<sup>2+</sup> binding and dissociation. *Biochemistry*, 37(25), 8926-8937.

Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., McGettigan, P. A., McWilliam, H., Higgins, D. G. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 23(21), 2947-2948.

la Cour, J. M., Høj, B. R., Mollerup, J., Simon, R., Sauter, G., Berchtold, M. W. (2008). The apoptosis linked gene ALG-2 is dysregulated in tumors of various origin and contributes to cancer cell viability. *Molecular oncology*, 1(4), 431-439.



Liu, J., Epand, R. F., Durrant, D., Grossman, D., Chi, N. W., Epand, R. M., Lee, R. M. (2008). Role of Phospholipid Scramblase 3 in the Regulation of Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ -Induced Apoptosis†. *Biochemistry*, 47(15), 4518-4529.

Missotten, M., Nichols, A., Rieger, K., Sadoul, R. (1999). Alix, a novel mouse protein undergoing calcium-dependent interaction with the apoptosis-linked-gene 2 (ALG-2) protein. *Cell death and differentiation*, 6(2), 124-129.

Murshudov, G. N., Vagin, A. A., Dodson, E. J. (1997). Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 53(3), 240-255.

Okumura, M., Ichioka, F., Kobayashi, R., Suzuki, H., Yoshida, H., Shibata, H., Maki, M. (2009). Penta-EF-hand protein ALG-2 functions as a Ca<sup>2+</sup>-dependent adaptor that bridges Alix and TSG101. *Biochemical and biophysical research communications*, 386(1), 237-241.

Otwinowski, Z., Minor, W., W Jr, C. C. (1997). Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode.

Rao, R. V., Poksay, K. S., Castro-Obregon, S., Schilling, B., Row, R. H., del Rio, G., Bredesen, D. E. (2004). Molecular components of a cell death pathway activated by endoplasmic reticulum stress. *Journal of Biological Chemistry*, 279(1), 177-187.

Sasaki-Osugi, K., Imoto, C., Takahara, T., Shibata, H., Maki, M. (2013). Nuclear ALG-2 Protein Interacts with Ca<sup>2+</sup> Homeostasis Endoplasmic Reticulum Protein (CHERP) Ca<sup>2+</sup>-dependently and Participates in Regulation of Alternative Splicing of Inositol Trisphosphate Receptor Type 1 (IP3R1) Pre-mRNA. *Journal of Biological Chemistry*, 288(46), 33361-33375.

Shibata, H., Suzuki, H., Yoshida, H., Maki, M. (2007). ALG-2 directly binds Sec31A and localizes at endoplasmic reticulum exit sites in a Ca<sup>2+</sup>-dependent manner. *Biochemical and biophysical research communications*, 353(3), 756-763.

Shibata, H., Suzuki, H., Kakiuchi, T., Inuzuka, T., Yoshida, H., Mizuno, T., Maki, M. (2008). Identification of Alix-type and Non-Alix-type ALG-2-binding Sites in Human Phospholipid Scramblase 3 DIFFERENTIAL BINDING TO AN ALTERNATIVELY SPLICED ISOFORM AND AMINO ACID-SUBSTITUTED MUTANTS. *Journal of Biological Chemistry*, 283(15), 9623-9632.

- Shibata, H., Inuzuka, T., Yoshida, H., Sugiura, H., Wada, I., Maki, M. (2010). The ALG-2 binding site in Sec31A influences the retention kinetics of Sec31A at the endoplasmic reticulum exit sites as revealed by live-cell time-lapse imaging. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 74(9), 1819-1826.
- Shibata, H., Kanadome, T., Sugiura, H., Yokoyama, T., Yamamuro, M., Moss, S. E., Maki, M. (2014). A New Role for Annexin A11 in the Early Secretory Pathway via Stabilizing Sec31A at the Endoplasmic Reticulum Exit Sites (ERES). *Journal of Biological Chemistry*, jbc-M114.
- Suzuki, H., Kawasaki, M., Inuzuka, T., Okumura, M., Kakiuchi, T., Shibata, H., Maki, M. (2008). Structural basis for Ca<sup>2+</sup>-dependent formation of ALG-2/Alix peptide complex: Ca<sup>2+</sup>/EF3-driven arginine switch mechanism. *Structure*, 16(10), 1562-1573.
- Tina, K. G., Bhadra, R., Srinivasan, N. (2007). PIC: protein interactions calculator. *Nucleic acids research*, 35(suppl 2), W473-W476.
- Trott, O., Olson, A. J. (2010). AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *Journal of computational chemistry*, 31(2), 455-461.
- Vagin, A., Teplyakov, A. (2009). Molecular replacement with MOLREP. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 66(1), 22-25.
- Van, Q., Liu, J., Lu, B., Feingold, K., Shi, Y., Lee, R., Hatch, G. (2007). Phospholipid scramblase-3 regulates cardiolipin de novo biosynthesis and its resynthesis in growing HeLa cells. *Biochem. J*, 401, 103-109.
- Vito, P., Lacaná, E., D'Adamio, L. (1996). Interfering with apoptosis: Ca<sup>2+</sup>-binding protein ALG-2 and Alzheimer's disease gene ALG-3. *Science*, 271(5248), 521-525.
- Vito, P., Pellegrini, L., Guiet, C., D'Adamio, L. (1999). Cloning of AIP1, a novel protein that associates with the apoptosis-linked gene ALG-2 in a Ca<sup>2+</sup>-dependent reaction. *Journal of Biological Chemistry*, 274(3), 1533-1540.
- Wallace, A. C., Laskowski, R. A., Thornton, J. M. (1995). LIGPLOT: a program to generate schematic diagrams of protein-ligand interactions. *Protein engineering*, 8(2), 127-134.

Waterhouse, A. M., Procter, J. B., Martin, D. M., Clamp, M., Barton, G. J. (2009). Jalview Version 2—a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics*, 25(9), 1189-1191.

Yamasaki, A., Tani, K., Yamamoto, A., Kitamura, N., Komada, M. (2006). The Ca<sup>2+</sup>-binding protein ALG-2 is recruited to endoplasmic reticulum exit sites by Sec31A and stabilizes the localization of Sec31A. *Molecular biology of the cell*, 17(11), 4876-4887.

Zhang, Z., Li, Y., Lin, B., Schroeder, M., Huang, B. (2011). Identification of cavities on protein surface using multiple computational approaches for drug binding site prediction. *Bioinformatics*, 27(15), 2083-2088.

## 謝辞

まず、本研究をおこなうにあたり、実験手法、データ解析及び文章の校正など、直接指導下さった名古屋大学大学院生命農学研究科牧正敏教授に心より感謝申し上げます。また、適切なアドバイスを下さった柴田秀樹准教授、高原照直助教をはじめとし、分子細胞制御学研究分野の多くの先輩・後輩にも感謝申し上げます。分子細胞制御学研究分野で過ごした研究生活は、得られた結果から結論を導き出すことの大切さ、粘り強く物事に取り組む忍耐力、相手に分かりやすく伝えることの難しさ、大切さを学びました。

最後に、回折光データの収集からタンパク質の X 線構造解析方法を指導して頂いた、高エネルギー加速器研究機構准教授の川崎政人先生、鈴木博紀さん及び、名古屋大学シンクロトロン光研究センター教授渡邊先生に深く感謝申し上げます。