

論文審査の結果の要旨および担当者

報告番号	※	第	号
------	---	---	---

氏 名 京 卓 志

論 文 題 目

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

論文審査担当者

主 査	名古屋大学准教授	柴 田 秀 樹
委 員	名古屋大学教授	牧 正 敏
委 員	名古屋大学教授	松 田 幹
委 員	名古屋大学助教	高 原 照 直

論文審査の結果の要旨

真核生物の小胞体で合成されるタンパク質は、それぞれが機能すべき細胞小器官や細胞膜へ輸送されたり細胞外へ分泌されたりする。この分泌経路において、小胞体からゴルジ体への輸送経路を初期分泌経路という。動物細胞の分泌経路の分子機構の解明は、バイオ医薬品の大量生産を可能とする高機能な分泌経路を有する培養細胞系の開発につながる研究課題である。小胞体からのタンパク質搬出は COPII 小胞によって担われ、COPII 小胞は小胞体な特別な領域である ERES (endoplasmic reticulum exit site) で形成される。これまでに、Ca²⁺ (カルシウム) 結合タンパク質 ALG-2 が COPII 小胞の被覆構成タンパク質 Sec31A と Ca²⁺依存的に相互作用し、ERES に局在化することが明らかとなっていたが、その分泌経路における役割は不明であった。

ALG-2 は EF-hand が 5 回連続した PEF (Penta-EF-hand) 構造を有し、5 番目の EF-hand を介してホモ二量体、あるいは ALG-2 のパラログである peflin とヘテロ二量体を形成する。複数の Ca²⁺依存的な ALG-2 相互作用タンパク質が同定され、それらの相互作用様式が明らかとされる中で、ALG-2 が異なる 2 つのタンパク質の間接的な相互作用を仲介する Ca²⁺依存的なアダプタータンパク質として機能することが提唱されている。以上のような研究背景の下、本学位論文研究においては、動物培養細胞と組換えタンパク質を用いたタンパク質間相互作用解析手法と、分泌経路の生化学的および分子細胞生物学的実験手法を用いて、初期分泌経路における ALG-2 のアダプター機能の解明を目指した研究が展開され、それらの研究成果がまとめられている。以下に要点を記す。

(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 およびアネキシン A11 の役割

ERES において、ALG-2 が Sec31A と Ca²⁺依存性リン脂質結合タンパク質 AnxA11 (アネキシン A11) の間接的な相互作用を仲介することが示されていたが、その初期分泌経路における生理的意義は不明であった。そこで、分泌経路のモデルタンパク質として汎用される温度感受性水疱性口内炎ウイルス tsO45 株由来の糖タンパク質を緑色蛍光タンパク質との融合タンパク質 (tsO45-G-GFP) として恒常発現するヒト線維肉腫細胞 HT1080 を用いて、ALG-2 および AnxA11 の発現抑制が tsO45-G-GFP の輸送に与える影響を調べた。その結果、ALG-2 と AnxA11 のそれぞれの発現抑制によって tsO45-G-GFP の小胞体からゴルジ体への輸送が促進された。このことから ALG-2 と AnxA11 は初期分泌経路の輸送を負に制御するものと考察した。

(2) 初期分泌経路における ALG-2 と TFG の相互作用

RNA 干渉法により ALG-2 を発現抑制させた HEK293 細胞に、Ca²⁺結合能を欠いた変異体 ALG-2 に FLAG タグを付加したタンパク質 (FLAG-ALG-2^{E47A/E114A}) 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 を共発現させ、抗 FLAG 抗体を用いて免疫沈降を行うことで、ALG-2 ホモ二量体および 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の同定を試みた。その結果、ALG-2 ホモ二量体に特異的に結合する新規相互作用タンパク質候補として TFG (Trk-fused gene) が同定された。

次に、特異抗体を用いた共免疫沈降実験によって HEK293 細胞の内在性 ALG-2 と内在性 TFG が Ca^{2+} 依存的に相互作用することを示した。また、HeLa 細胞の免疫染色実験により TFG は ALG-2/Sec31A 陽性の ERES に一部共局在することを明らかにした。さらに、HeLa 細胞に発現させた緑色蛍光タンパク質融合 TFG (GFP-TFG) と赤色蛍光タンパク質融合 ALG-2 (mCherry-ALG-2) の生細胞観察を行い、細胞内 Ca^{2+} 上昇を引き起こす試薬であるタプシガルジン进行处理すると GFP-TFG と mCherry-ALG-2 が ERES に動員されることを見出した。また、ALG-2 の過剰発現が内在性 TFG を ERES に集積させることを明らかにした。TFG は ALG-2 結合モチーフを有しているが、そのモチーフが ALG-2 との結合に必要であることを示し、その領域を欠いた変異体 GFP-TFG は ERES への滞在時間が減少することを、FRAP (fluorescence recovery after photobleaching) 解析により明らかとした。これらの結果から、ALG-2 が TFG の ERES への局在を正に制御することを示唆した。

TFG は安定なオリゴマー (八量体) を形成し、それがさらに会合することで巨大なポリマーを形成することが報告されていた。そこで TFG の多量体形成における ALG-2 の関与を検討した。His タグを付加した組換え体 TFG (TFG-His) を作製し、 Ca^{2+} または EGTA 存在下において TFG-His と ALG-2 を混合した後、架橋化試薬 DTSSP と反応させた。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 TFG-His のポリマー形成が Ca^{2+} 依存的に促進されることを明らかとした。この結果をもとに、ALG-2 が Ca^{2+} 応答性アダプターとして TFG のポリマー化を正に制御することを示唆した。

(3) TFG の相互作用タンパク質の網羅的探索

HEK293 細胞を用いて FLAG タグを付加した TFG に特異的に結合するタンパク質の探索を行なった。得られた候補タンパク質について、TFG との相互作用を共免疫沈降実験により評価した結果、TRAF3 が最も効率よく TFG と共沈降されることが明らかとなった。また FLAG タグを付加した TRAF3 は GFP-TFG と核周囲で部分的に共局在が確認された。これらの結果から、TFG が TRAF3 と協調して初期分泌経路において機能している可能性を考察した。

以上のように、本論文にまとめられた内容は、ALG-2 が初期分泌経路の複数の作用点でアダプター機能を発揮することを示しており、分泌経路の分子機構の全容解明に貢献するもので独創性と新規性が認められる。よって、審査委員会は、本論文が博士 (農学) の学位授与に十分な価値があると判断し、合格と判定した。

試験の結果の要旨および担当者

報告番号	※ 第	号	氏名	京 卓志
試験担当者	主査 柴田秀樹、牧 正敏、松田 幹、高原照直			
<p>(試験の結果の要旨)</p> <p>平成 29 年 2 月 10 日学位審査委員会において、主論文の内容を中心としてこれに関連する科目の学識および研究能力について試問し審査した結果、合格と判定した。</p>				