

審査の結果の要旨

氏名 富永 紗衣

COPIタンパク質の小胞形成制御機構の解明と題する本論文は、coat protein complexes I (COPI)小胞を形成するタンパク質である Arf1、coatomer、ArfGAP の相互作用を NMR にて解析し、小胞形成を制御する機構について考察した成果を述べたものである。

本論文は全4章から構成されており、第1章に序論、第2章に実験に用いた材料と実験方法が記されている。第3章は実験結果についてまとめており、第4章は結果に対する考察と今後の展望について述べている。

第3章においては、まず、解析対象とした Arf1、coatomer、ArfGAP の調製と活性確認を行なっている。次に、NMR により Arf1 と ArfGAP および Arf1/coatomer と ArfGAP の相互作用解析を行い、得られた結合界面の情報から Arf1/coatomer/ArfGAP 三者複合体の構造モデルを構築している。最後に、ArfGAP と coatomer が直接相互作用することを NMR により確認している。

まず、低分子量 GTPase である Arf1 を、大腸菌 1 L 培養あたり 36 mg の収量で得ていた。調製した Arf1 について、観測可能な 160 個中 159 個の主鎖アミドシグナルと、72 個中 68 個の Ile, Leu, Val の側鎖メチルシグナルを帰属していた。続けて、Arf1 の GTP 加水分解を促進する性質を持つ ArfGAP を、大腸菌 1 L 培養あたり 32 mg の収量で得ていた。調製した ArfGAP について、蛍光変化実験により活性を確認した上で、131 個中 122 個の主鎖アミドシグナルを帰属していた。さらに、7つのサブユニットから構成される巨大タンパク質複合体である coatomer 全体のうち、二つのサブユニット(γ -COP、 ζ -COP)の複合体を解析対象の coatomer と定義し、昆虫細胞 600 mL 培養あたり 24 mg (γ -COP: 16 mg, ζ -COP: 8 mg) の収量で得ていた。調製した coatomer を Arf1 に添加して NMR スペクトルを取得することにより、調製した coatomer が Arf1 結合活性を持つことを確認していた。次に、Arf1 と ArfGAP の相互作用を解析するため、均一 ^2H , ^{15}N 標識 Arf1-GTP γS に 1.5 等量の非標識 ArfGAP を添加して、 ^1H - ^{15}N HSQC スペクトルを測定していた。その結果、Arf1 のシグナル強度が減少したが、複合体のシグナルは観測されなかったことから、両者が解離定数 1 mM 以上の弱い親和性で結合することを示していた。また、TCS 実験を行った結果、Arf1 の GTP 結合部位近傍に位置する残基のシグナル強度が、ラジオ波照射に伴い減少していたことから、これらの残基が ArfGAP との結合界面に位置することを示していた。さらに、Arf1/coatomer と ArfGAP の相互作用を解析するため、Ile, Leu, Val の側鎖メチル基のみを $^1\text{H}^{13}\text{C}$ 標識した均一 ^2H 標識 Arf1-GTP γS と非標識 coatomer の複合体に、ArfGAP を段階的に添加して、 ^1H - ^{13}C

HMQC スペクトルを測定していた。その結果、Arf1 のいくつかのシグナルに 50 Hz 程度の化学シフト変化が生じていた。Arf1/coatomer 複合体に対して 4.0 等量の ArfGAP を添加した時点で、ほぼ全ての Arf1 が三者複合体を形成したことから、Arf1/coatomer 複合体と ArfGAP の解離定数は 16 μ M 以下であり、Arf1 単独とよりも強く結合することを示唆していた。また、化学シフト変化が観測された残基は、Arf1 の GTP 結合部位近傍に位置しており、三者複合体においても、ArfGAP は Arf1 の GTP 結合部位近傍に結合することを示していた。以上の実験により得られた、Arf1 上の ArfGAP 結合界面に関する情報に基づいて、ArfGAP と Arf1/coatomer 複合体の各結晶構造をドッキングさせて、三者複合体モデルを構築していた。得られたモデルでは、ArfGAP と coatomer が近接していたことから、ArfGAP と coatomer が相互作用する可能性が高いと述べていた。そこで、ArfGAP と coatomer の相互作用を調べるために、均一 ^2H , ^{15}N 標識 ArfGAP に非標識 coatomer を添加して、スペクトルを取得していた。その結果、coatomer 添加に伴い、ArfGAP の NMR シグナル強度が減少したことから、ArfGAP と coatomer は直接相互作用する、という結論を出していた。

第4章においては、Arf1、coatomer、ArfGAP の相互作用解析結果から、小胞形成を制御する機構について議論している。coatomer が、Arf1 と ArfGAP の両方と結合することから、coatomer の濃度が高い条件では、Arf1 と ArfGAP が両方同時に結合した coatomer の割合が減少し、その結果 GTP 加水分解反応が進行しにくくなると考察していた。coatomer はゴルジ体へ集積していることが知られていることから、ArfGAP は、coatomer が集積していないゴルジ体以外の部位で Arf1 の GTP を加水分解することにより、coatomer が集積したゴルジ体で選択的に COPI 小胞形成が進行するように制御している、という機構を提唱するに至っている。さらに、Arf1 上の coatomer および ArfGAP の結合界面の情報から、coatomer が Arf1 の活性残基を安定化し、ArfGAP が GTP 加水分解に有用な Arg 側鎖を提供するという、Arf1 の GTP 加水分解反応を促進する機構についても提唱している。

本研究では、coatomer が Arf1 だけでなく ArfGAP とも結合することにより、Arf1 の活性部位が ArfGAP と接近した、GTP 加水分解反応の上で有利であると考えられる三者複合体を形成することを初めて示した。この結果から、Arf1、coatomer、ArfGAP が COPI 小胞形成を制御する機構を提唱している。さらに、coatomer と ArfGAP が二分子で、Arf1 の GTP 加水分解反応を促進する機構についても提唱している。

以上、本研究の成果は、細胞内小胞形成機構に対して新たな知見を加えるものであり、これを行った学位申請者は博士(薬学)の学位を得るにふさわしいと判断した。