

氏 名 神山 淳一

学位 (専攻分野) 博士 (理学)

学位記番号 総研大甲第 1231 号

学位授与の日付 平成 21 年 3 月 24 日

学位授与の要件 高エネルギー加速器科学研究科 物質構造科学専攻  
学位規則第 6 条第 1 項該当

学位論文題目 細胞内小胞輸送を制御する AP-1 複合体および GGA 蛋白質  
のアクセサリ蛋白質選別に関する構造生物学的研究

論文審査委員	主 査	准教授	加藤 龍一
		准教授	小林 克己
		准教授	足立 伸一
		准教授	五十嵐 教之
		教授	若槻 壮市

## 論文内容の要旨

真核細胞には生体膜で構成された多様な細胞内小器官が存在し、それらの間では膜輸送によって物質輸送が行われている。トランスゴルジ網 (TGN: trans-Golgi network) とエンドソームの間ではクラスリン被覆小胞を介した膜動輸送 (メンブレントラフィック) が行われているが、その小胞形成には AP-1 複合体と GGA 蛋白質が関与することが知られている。

AP-1 複合体のサブユニットである  $\gamma 1$  アダプチンの ear ドメイン ( $\gamma 1$ -ear ドメイン) と、GGA 蛋白質の GAE ドメインは、 $\gamma$ -synergin、Rabaptin-5、p56 などのクラスリン被覆小胞に様々な機能を付加するアクセサリ蛋白質群と相互作用する。 $\gamma 1$ -ear ドメインと GAE ドメインには高い配列相同性があり、どちらもアクセサリ蛋白質中の [W/F]xx $\phi$  ( $\phi$ は疎水性アミノ酸残基) という配列モチーフを認識する。しかしながら、これらの間には、アクセサリ蛋白質に対する親和性の違いもみられることから、[W/F]xx $\phi$ の認識モチーフ以外の、アクセサリ蛋白質の認識機構が存在する事が予想された。 $\gamma 1$ -ear ドメインおよび GAE ドメインとアクセサリ蛋白質由来ペプチドとの複合体の立体構造の比較から、生体内で  $\gamma 1$ -ear ドメインに特異的に結合する  $\gamma$ -synergin では、認識モチーフから C 末端方向に 3 残基離れた Phe (+6) が、 $\gamma 1$ -ear ドメインの Ser764 が作る分子表面と相互作用していることが近年見出された。そして、この  $\gamma 1$ -ear ドメインの Ser764 と立体構造上該当するアミノ酸残基は、GGA ファミリー全ての GAE ドメインにおいて Pro に置換されていた (GGA1-GAE においては Pro574)。

そこで私は、ヒト由来の  $\gamma 1$ -ear ドメインと GAE ドメインのアクセサリ蛋白質認識の分子機構を明らかにするために、 $\gamma 1$ -ear ドメインの GAE 型の S764P 変異体と  $\gamma$ -synergin ペプチドとの複合体、および GGA1-GAE ドメインの  $\gamma 1$ -ear 型の P574S 変異体と p56 ペプチドとの複合体について、それぞれの X線結晶構造を決定し野生型の構造との比較を行った。前者においては、 $\gamma 1$ -ear ドメインの S764P 変異により  $\gamma$ -synergin ペプチドの Phe (+6) が立体障害を起こし、Phe (+6) の周辺で  $\gamma$ -synergin ペプチドが  $\gamma 1$ -ear ドメインから離れることによって、野生型では存在していた水分子を介する水素結合ネットワークが失われていた。これにより、 $\gamma 1$ -ear ドメイン S764P 変異体と  $\gamma$ -synergin の親和性が低下することが予測された。後者においては、GGA1-GAE ドメインの P574S 変異は大きな構造変化を引き起こさず、野生型と同様の立体構造であったことから、ペプチドの +6 部位におけるのは別の機構の存在が示唆された。

一方、 $\gamma 1$ -ear ドメインと GGA1-GAE ドメインのそれぞれの野生型と変異体について、それらのアクセサリ蛋白質への親和性を表面プラズモン共鳴を用いて測定したところ、 $\gamma 1$ -ear ドメインの Ser764 および GGA1-GAE ドメインの Pro574、およびアクセサリ蛋白質においては Phe (+6) が、それぞれ親和性に重要であることが分かった。以上の結果から、[W/F]xx $\phi$ の認識モチーフよりも C 末端方向に 3 残基離れた Phe (+6) が AP-1 複合体と GGA 蛋白質のアクセサリ蛋白質の選択特異性に関わっている事を示し、その分子機構を明らかにすることができた。

真核細胞には多数の細胞内小器官があり、その間で互いに蛋白質をはじめとする物質のやり取りが行われることで、細胞の生命活動は維持されている。その輸送は一連の蛋白質群によって制御されており、その制御機構の理解が細胞の複雑な生命現象の理解へとつながる。小胞を介して行われるこの細胞内輸送は、AP複合体、GGA蛋白質、およびそれらと結合するアクセサリタンパク質群が関わっているが、それらの分子間の認識機構は明らかにされていなかった。

そこで申請者は、ヒト由来のAP複合体の中の  $\gamma 1$ -earドメインとGGA蛋白質のGAEドメインのアクセサリ蛋白質認識の分子機構を明らかにするために、 $\gamma 1$ -earドメインのGAE型のS764P変異体と  $\gamma$ -synergинペプチドとの複合体、およびGGA1-GAEドメインの  $\gamma 1$ -ear型のP574S変異体とp56ペプチドとの複合体について、それぞれのX線結晶構造を決定し野生型の構造との比較を行った。前者においては、 $\gamma 1$ -earドメインのS764P変異により  $\gamma$ -synergинペプチドのPhe (+6) が立体障害を起こし、Phe (+6) の周辺で  $\gamma$ -synergинペプチドが  $\gamma 1$ -earドメインから離れることによって、野生型では存在していた水分子を介する水素結合ネットワークが失われていた。これにより、 $\gamma 1$ -earドメインS764P変異体と  $\gamma$ -synergинの親和性が低下していることがわかった。後者においては、GGA1-GAEドメインのP574S変異は大きな構造変化を引き起こさず、野生型と同様の立体構造であったことから、ペプチドの+6部位におけるのとは別の機構の存在が示唆された。

一方、 $\gamma 1$ -earドメインとGGA1-GAEドメインのそれぞれの野生型と変異体について、それらのアクセサリ蛋白質への親和性を表面プラズモン共鳴を用いて測定したところ、 $\gamma 1$ -earドメインのSer764およびGGA1-GAEドメインのPro574、およびアクセサリ蛋白質においてはPhe (+6) が、それぞれ親和性に重要であることが分かった。以上の結果から、[W/F] $\phi$ の認識モチーフよりもC末端方向に3残基離れたPhe (+6) がAP-1複合体とGGA蛋白質のアクセサリ蛋白質の選択特異性に関わっている事を示し、その分子機構を明らかにすることができた。

以上のことから、審査員全員一致で論文博士として合格と判断した。