

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

Structural and Functional Analyses of Proteins

Related to Intracellular Membrane Traffic

神山 淳一

Jun-ichi Kouyama

DOCTORAL THESES

Department of Material Structure Science

School of High Energy Accelerator Science

The Graduate University of Advanced Studies

2008 (School year)

## Index

### Abbreviations

<b>1. Summary</b>	<b>6</b>
<b>2. Introduction</b>	<b>8</b>
2.1. 蛋白質の局在とその輸送システム	8
2.2. AP 複合体と GGA 蛋白質	12
2.3. $\gamma$ 1-ear ドメインと GAE ドメインによるアクセサリー蛋白質の認識	17
<b>3. Materials and methods</b>	<b>23</b>
3.1. 発現系の構築	23
3.2. 蛋白質の発現と精製	27
3.3. 結晶化	30
3.4. 回折データの測定と構造決定	33
3.4. 表面プラズモン共鳴 (SPR: surface plasmon resonance) を用いた測定	36
<b>4. Results</b>	<b>37</b>
4.1. $\gamma$ -synergin 配列を認識する $\gamma$ 1-ear ドメイン P764S 変異体の結晶構造	37
4.2. 各種ペプチドと $\gamma$ 1-ear ドメイン及び GAE ドメインの変異による親和性の変化	48
4.3. GAE 変異体/p56 複合体の結晶構造	55

4.4. p56 の+6 位置の変異による親和性の変化	63
<b>5. Discussion</b>	<b>68</b>
5.1. $\gamma$ 1-ear ドメインのアクセサリー蛋白質認識の分子機構	68
5.2. GAE ドメインのアクセサリー蛋白質認識の分子機構	70
5.3. AP 複合体及び GGA 蛋白質とアクセサリー蛋白質	71
<b>6. References</b>	<b>74</b>
<b>Acknowledgements</b>	<b>81</b>

## Abbreviations

AP	adaptor protein
COP	coat protein
ER	endoplasmic reticulum
ERES	ER exit sites
ERGIC	ER-Golgi intermediate compartment
GAE	$\gamma$ -adaplin ear
GAT	GGA and Tom1
$\gamma$ 1-ear	$\gamma$ -ear domain of AP-1
GGA	Golgi-localizing, $\gamma$ -adaplin ear homology domain, ARF-binding
GST	glutathione S-transferase
$K_d$	dissociation constant
MPR	mannose 6-phosphate receptors
PEG	polyethylene glycol
SPR	surface Plasmon resonance
R.M.S.D.	root mean square deviations
RU	resonance unit

TGN        *trans*-Golgi network

VHS        Vps27p/Hrs/STAM

## 1. Summary

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、 $\gamma$ -synergин、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  $\gamma$ -synergин 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  $\gamma$ -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。

## 2. Introduction

### 2.1. 蛋白質の局在とその輸送システム

真核生物の細胞内には脂質二重層で囲まれた様々な細胞内小器官が存在している。これらの細胞内小器官は特定の蛋白質が局在することで正常な機能を維持している。細胞内小器官への正しい蛋白質の局在を維持するために、それら細胞内小器官の間では絶えず正確な蛋白質の膜動輸送（メンブレントラフィック）が行われている（Bonifacino *et al.*, 2004）。また、メンブレントラフィックの機能は細胞内小器官の間の物質の輸送だけではなく、リソソームと協働することで非選択的に蛋白質の分解を行うオートファジーや、細胞外物質の取り込みを行うエンドサイトーシス、分泌小胞や分泌顆粒を介した細胞外への分泌などとも密接に関わっている。

核やミトコンドリア、ペルオキシソームに局在する蛋白質は、生合成の際のシグナル配列によって、目的地が決定され輸送される（Mattaj *et al.*, 1998）。このシグナル配列によって決定される蛋白質の輸送に対して、エンドソームやリソソーム、細胞膜等の細胞内小器官に輸送される蛋白質および細胞外に分泌される蛋白質は、小胞体（ER: endoplasmic reticulum）で新たに生合成された後に、ER に存在する ERES（ER exit sites）と呼ばれる領域から、ERGIC（ER-Golgi intermediate compartment）・ゴルジ体を経て TGN（trans-Golgi network）へと輸送される。そして TGN から最終目的地であるエンドソームやリソソーム、細胞膜へと小胞輸送と呼ばれる機構により輸送される（Bonifacino *et al.*, 2004）（図 2-1）。



小胞輸送は輸送小胞と呼ばれる直径 50-100 nm の小さな小胞を介した細胞内における物質輸送機構で、輸送元の細胞内小器官から積み荷蛋白質を選択的に取り込んだ部分の膜がくびれるようにして発芽し輸送小胞を形成する。これが輸送先の細胞内小器官まで移動し膜融合することで輸送小胞の内容物と膜成分を輸送している。これら輸送小胞が形成され発芽する際にはコート蛋白質によって被覆される。このコート蛋白質の種類により、輸送小胞は COP (coat protein)I 被覆小胞、COPII 被覆小胞、クラスリン被覆小胞の 3 種類に分類される (Kirchhausen, 2000) (図 2-1)。ER から ERGIC・ゴルジ体への順方向の輸送に関与するコート蛋白質が COPII である (Springer *et al.*, 1998)。一方、ゴルジ体間の輸送、及び ERGIC・ゴルジ体から ER への逆方向の輸送に関与するコート蛋白質が COPI である (Barlow *et al.*, 1994; Letourneur *et al.*, 1994)。そして、TGN 以降の輸送蛋白質の最終目的地であるエンドソームやリソソーム、細胞膜間の輸送はクラスリン被覆小胞を介して行われている (Doray *et al.*, 2001)。このクラスリン被覆小胞のクラスリン被覆の形成と積み荷蛋白質の選択や取り込み、クラスリン被覆小胞にさまざまな機能を付加するアクセサリ蛋白質の選択や取り込みはアダプター蛋白質 (AP: adaptor protein) 複合体または GGA (Golgi-localizing,  $\gamma$ -adaptin ear homology domain,  $\Delta$ RF-binding) 蛋白質によって制御されている (図 2-2)。

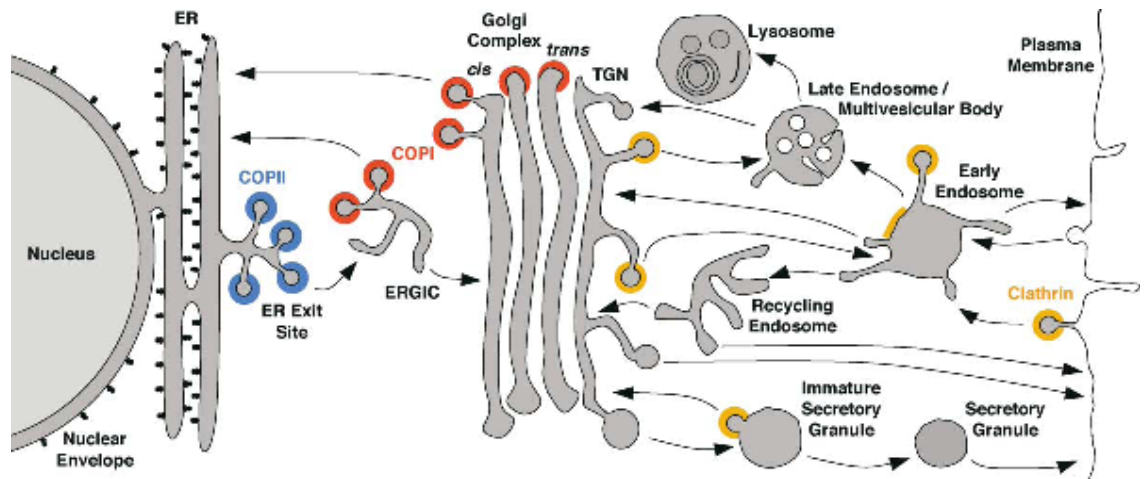


図 2-1 細胞内輸送の模式図

この図は ER からの細胞内輸送の様子を模式的に示したものである。輸送の経路は矢印でその方向を示している。輸送小胞はそれぞれ、COPI(オレンジ)、COPII(青)、クラスリン(黄)の色でそれらの局在位置を示している。この図は Bonifacino *et al.*, 2004 から転載した。

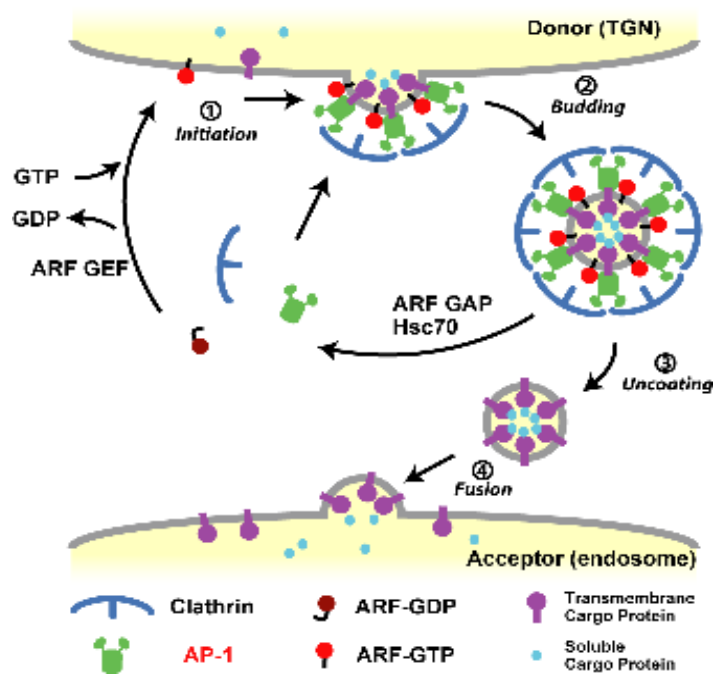


図 2-2 AP-1 複合体によるクラスリン被覆小胞の制御

まず、TGN 膜上の GEF (guanine nucleotide exchange factor) により、ARF-GDP が ARF-GTP に変換される。その後、①AP-1 複合体は積み荷蛋白質の選別シグナル (sorting signal) を認識し、クラスリン被覆小胞の組立てを開始する (Initiation)。②積み荷蛋白質が集め、濃縮され膜の湾曲が増大し、クラスリン被覆小胞が出芽する (Budding)。③ARF の非活性化や Uncoating 酵素の作用などにより小胞からクラスリン被覆が外れる (Uncoating)。④最終的に目的の膜と融合する (Fusion) ことによって、積み荷蛋白質が輸送される。この図は Yamada 2004 から転載した。

## 2.2. AP 複合体と GGA 蛋白質

AP 複合体は、アダプチンと呼ばれる大きなサブユニット 2 つ ( $\beta$  および  $\gamma$ ) と、中小のサブユニット 1 つずつ ( $\sigma$  および  $\mu$ ) の合計 4 つのサブユニットから構成されるヘテロ四量体である (図 2-3A) (Hirst and Robinson, 1998)。この AP 複合体は AP-1 から AP-4 までのファミリーを形成しており、そのそれぞれが異なる細胞内小器官の間で異なるサブユニットの組み合わせのヘテロ四量体を形成して異なる積み荷蛋白質の輸送に関与している (Ohno, 2006)。さらに AP-1 複合体には AP-1A 複合体と AP-1B 複合体の 2 つのサブセットが存在している。AP-1A 複合体はエンドソームから TGN への輸送に、AP-1B 複合体は小腸上皮などの極性細胞において TGN と側基底膜 (basolateral membrane) との間の輸送に関与している (Sugimoto *et al.*, 2002)。AP-1A 複合体と AP-1B 複合体は 4 つのサブユニットのうち 3 つのサブユニット ( $\beta 1$ ,  $\gamma 1$  と  $\sigma 1$ ) は共通であり、残り 1 つのサブユニット  $\mu 1A$  と  $\mu 1B$  の違いにより、AP-1A 複合体と AP-1B 複合体の 2 つのサブセットに分かれている (Fölsch *et al.*, 1999)。

AP-1 複合体の  $\gamma 1$  アダプチンが持つ N 末端のヘッド (Head) ドメインは輸送小胞の形成開始シグナルとして働く活性型の ARF と相互作用する (Austin *et al.*, 2000)。 $\mu 1$  サブユニットは積み荷蛋白質の認識に関与している (Rodionov *et al.*, 1998; Storch *et al.*, 2001)。AP-1 複合体は、 $\beta 1$  アダプチンと  $\gamma 1$  アダプチンのヒンジ領域に存在している L(L/I)(D/E/N)(L/F)(D/E)配列のクラスリンボックスモチーフを介して、クラスリンと結合している (Gallusser *et al.*, 1993; Doray *et al.*, 2001)。 $\gamma 1$ -ear と呼ばれる  $\gamma 1$  アダプチンの C 末端のドメインは、クラスリン被覆

小胞にさまざまな機能を付加するアクセサリ蛋白質群 ( $\gamma$ -synergins など) と相互作用する (Page *et al.*, 1999)。

一方、クラスリン被覆小胞の形成と積み荷蛋白質の選択や取り込み、および、クラスリン被覆小胞にさまざまな機能を付加するアクセサリ蛋白質の選択や取り込み等、AP 複合体と同様の働きを行っている GGA 蛋白質は、ヘテロ四量体で機能している AP 複合体と異なり単量体で機能している (Boman *et al.*, 2000, Hirst *et al.*, 2000, Pousse *et al.*, 2000, Takatsu *et al.*, 2000)。ほ乳類では GGA1 から GGA3 までの 3 種類でファミリーを形成している。GGA は共通したドメイン構造を保持しており、N 末端から VHS (Vps27p/Hrs/STAM) ドメイン、GAT (GGA and Tom1) ドメイン、ヒンジ領域、GAE ( $\gamma$ -adaptin ear) ドメインの 4 つの領域から構成されている (図 2-3B)。

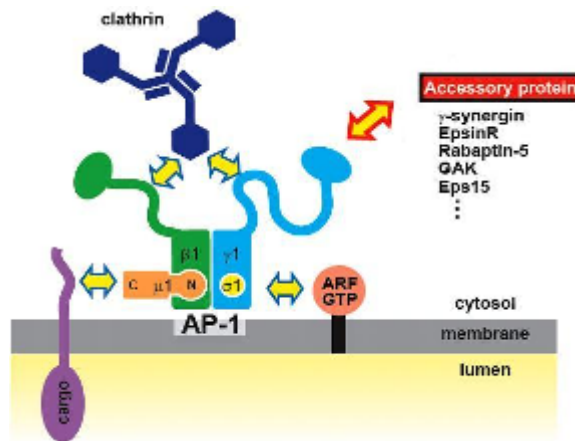
AP-1 複合体と同等の機能を持っている GGA 蛋白質は、その VHS ドメインで MPR (mannose 6-phosphate receptors) などの輸送蛋白質受容体と結合し、AP-1 複合体の  $\mu$ 1 サブユニットと同様に、積み荷蛋白質の認識に関与している (Puertollano *et al.*, 2001)。また GAT ドメインは、AP-1 複合体の  $\gamma$ 1 アダプチンのヘッドドメインと同様に、ARF と相互作用することで膜への結合を介し輸送小胞の形成を制御している (Boman *et al.*, 2000; Takatsu *et al.*, 2002)。ヒンジ領域は、AP-1 複合体の  $\beta$ 1 アダプチンや  $\gamma$ 1 アダプチンのヒンジ領域と同様に、クラスリンへの結合を行っている (Mullin *et al.*, 2001)。そして、GAE ドメインは、 $\gamma$ 1-ear ドメインと同様にクラスリン被覆小胞に様々な機能を付加させるアクセサリ蛋白質の配列モチーフを認識し、

それらのクラスリン被覆小胞への取り込みを行っている (Mattera *et al.*, 2003)。これらアクセサリ蛋白質は  $\gamma$ 1-ear ドメインや GAE ドメインと相互作用する配列モチーフを持っているだけでなく、他の複数の蛋白質との相互作用に関与している。アクセサリ蛋白質の  $\gamma$ -synergin は aftiphilin や p200 と (Hirst *et al.*, 2005)、Rabaptin-5 は Rabex-5 と相互作用する (Lippé *et al.*, 2001)。これら  $\gamma$ 1-ear ドメインや GAE ドメイン以外の蛋白質との相互作用がクラスリン被覆小胞へのさまざまな機能付加に関与していると思われるが、それらの詳細な機能のメカニズムは分かっていない。

$\gamma$ 1-ear ドメインと GAE ドメインには高いアミノ酸配列の相同性があり、どちらもアクセサリ蛋白質中の [W/F]xx $\phi$  ( $\phi$ は疎水性のアミノ酸残基) という配列モチーフを認識するにもかかわらず、生体内ではアクセサリ蛋白質の基質特異性に違いを持つ (Page *et al.*, 1999; Mardones *et al.*, 2007)。以後、本論文においては [W/F]xx $\phi$ モチーフの [W/F]の部分を “0” とし、ペプチドの残基位置を下流方向に数えることとする。すなわち、[W/F]xx $\phi$ モチーフは 0 の位置に Trp あるいは Phe、+3 の位置に疎水性のアミノ酸残基を持つ配列である。細胞内でアクセサリ蛋白質の一つである  $\gamma$ -synergin は  $\gamma$ 1 アダプチンとの共局在を示すが、GAE ドメインとは示さない (Page *et al.*, 1999)。一方、同様に細胞内で別のアクセサリ蛋白質である p56 は、 $\gamma$ -synergin とは逆に GAE ドメインとの相互作用を示すが、 $\gamma$ 1 アダプチンとは示さない (Mardones *et al.*, 2007)。また、*in vitro* では、 $\gamma$ -synergin のペプチドは *in vivo* と同様に  $\gamma$ 1-rar ドメインに対して強い親和性を示すが、p56 のペプチドは  $\gamma$ 1-ear ドメインと GAE ドメインに

対する親和性が同程度であることが報告されている (Collins *et al.*, 2003)。

(A)



(B)

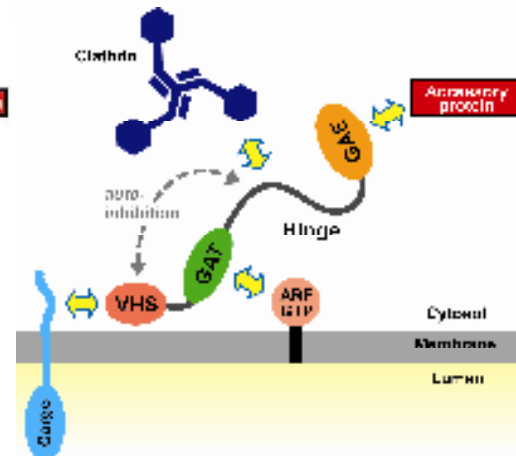


図 2-3 AP-1 複合体と GGA 蛋白質の模式図

(A) AP-1 複合体はヘテロ四量体で形成されており、クラスリン被覆小胞の形成と制御に関与している。 $\gamma 1$  アダプチンの N 末端は活性型の ARF (ARF-GTP) と、 $\mu 1$  サブユニットは積み荷蛋白質と相互作用する。 $\beta 1$  アダプチンと  $\gamma 1$  アダプチンのヒンジ領域はクラスリンと結合し、 $\gamma 1$  アダプチンの C 末端 ( $\gamma 1$ -ear ドメイン) は様々なアクセサリ蛋白質と結合する。

(B) GGA 蛋白質は 3 つのドメインとフレキシブルなヒンジ領域で形成されており、クラスリン被覆小胞の形成と制御に関与している。GAT ドメインは活性型の ARF と、VHS ドメインは積み荷蛋白質と相互作用する。ヒンジ領域はクラスリンと結合し、さらに casein kinase II によるリン酸化により、VHS ドメインを自己阻害する。GAE ドメインは  $\gamma 1$ -ear ドメインのホモログでアクセサリ蛋白質と結合する。



### 2.3. $\gamma$ 1-ear ドメインと GAE ドメインによるアクセサリ-蛋白質の認識

$\gamma$ 1-ear のアクセサリ-蛋白質として最初に同定された  $\gamma$ -synergin は 5 つの acidic phenylalanine motif([D/E]FxxFモチーフ)を持っている(669-673、672-676、690-694、693-697、775-779) (Page *et al.*, 1999)。後述の  $\gamma$ 1-ear ドメインが形成する 2 つの疎水性ポケットに、[D/E]FxxF モチーフ中の 2 つの Phe がはまり込み、 $\gamma$ -synergin の認識が行われていることが X 線結晶構造解析により明らかになった (Yamada, 2004)。この 5 つの[D/E]FxxF モチーフのうち 4 つは重なりあって 2 つの FxxFxxF のモチーフ (669-673 と 690-697) を形成しており、その結果 +6 の位置に Phe が存在していると考えられることも可能である。これまでの報告によると、 $\gamma$ 1-ear ドメインは  $\gamma$ -synergin の <sup>687</sup>EQDDFADFMAFSN<sup>699</sup> と <sup>772</sup>SDDDFADFHS<sup>781</sup> の 2 つの領域よりも <sup>666</sup>LADDFGGEFSLFGE<sup>678</sup> の領域により強く結合することが示されている (表 2-1) (Yamada, 2004)。

この  $\gamma$ -synergin の +6 の位置に Phe を持つ FxxFxxF モチーフに類似の配列は、他のアクセサリ-蛋白質である EpsinR にも見出すことが出来る。EpsinR には 3 つの Fxx[F/W]xxF 配列が存在し、それらの中で、中央部に Trp を持つ <sup>368</sup>GNGDFGDWSAFNQ<sup>380</sup> の領域が、<sup>340</sup>SADLFGGFADFGS<sup>352</sup> 及び <sup>613</sup>KQDAFANFANFSK<sup>625</sup> の 2 つ領域よりも  $\gamma$ 1-ear ドメインにより強く結合することが示されている (Yamada, 2004) (表 2-1)。

Inoue および Yamada の報告によると、 $\gamma$ -synergin ペプチド <sup>666</sup>LADDFGGEFSLFGE<sup>678</sup> と EpsinR の <sup>368</sup>GNGDFGDWSAFNQ<sup>380</sup> の領域に対する GGA1-GAE ドメインの親和性は  $\gamma$ 1-ear

ドメインよりも弱い(Inoue, 2004; Yamada, 2004)。しかし、Rabaptin-5 の<sup>435</sup>DESDFGPLVG<sup>444</sup>の領域に対する GGA1-GAE ドメインの親和性は、 $\gamma$ 1-ear ドメインと同程度であった (表 2-1) (Inoue, 2004; Yamada, 2004)。

$\gamma$ 1-ear ドメインは、8 つの  $\beta$ ストランドからなる 2 枚の  $\beta$ シートによるイムノグロブリン様構造を形成している (Nogi *et al.*, 2002; Kent *et al.*, 2002)。 $\gamma$ 1-ear ドメインの表面では、 $\beta$ 4 と  $\beta$ 7 の 2 つの  $\beta$ ストランド周辺の Lys756、Arg793、Arg795、Lys797 の 4 つの塩基性アミノ酸残基が、側鎖のアルキル鎖部分を用いて大きな疎水性領域を形成している。これらの 4 つのアミノ酸残基へ変異 (K756Q、R793Q、R795Q、K797Q) を導入したところ、アクセサリ蛋白質  $\gamma$ -synergin と Rabaptin-5 への  $\gamma$ 1-ear ドメインの結合能力が低下した (Nogi *et al.*, 2002; Yamada *et al.*, 2005)。このことから、アクセサリ蛋白質は  $\gamma$ 1-ear ドメインの疎水性領域を介して相互作用していると考えられる。そして、 $\gamma$ 1-ear と  $\gamma$ -synergin ペプチドとの複合体の結晶構造では、この 2 つの疎水性ポケットに Phe (0) と Phe (+3) の側鎖が入り込む立体構造を形成していた (Yamada *et al.*, 2005)。また、GAE ドメインも Ala563、Arg608、Arg609、Lys611 で形成される疎水性領域を介してアクセサリ蛋白質である p56 ペプチドとの相互作用を行っていた (Collins *et al.*, 2003)。

$\gamma$ 1-ear ドメインと  $\gamma$ -synergin ペプチドとの複合体、及び GAE ドメインと p56 ペプチドとの複合体の立体構造は決定され報告されている (Collins *et al.*, 2003; Yamada *et al.*, 2005)。 $\gamma$ 1-ear ドメインと GGA1-GGA3 の GAE ドメインについて、それらのアミノ酸配列を比較したところ、

GGA では全て Pro である部位 (GGA1 の GAE では Pro574) が、 $\gamma$ 1-ear ドメインでは Ser764 となっていることを見出した (表 2-2A)。これらのアミノ酸配列の領域はアクセサリ蛋白質の +6 の位置が接近する部分である。次に立体構造の重ね合わせを行ったところ、GAE ドメインの Pro574 が  $\gamma$ 1-ear ドメインの Ser764 よりも  $\gamma$ -synergic の Phe (+6) に接近していることを見出した (図 2-4)。従って、この Pro574 が  $\gamma$ -synergic の Phe (+6) に立体化学的な干渉をすることが原因で、その相互作用が他に比べ弱くなっていることを説明出来るのではないかと考えた。ちなみに  $\gamma$ 1-ear ドメインと GAE ドメインに対する親和性に差がないアクセサリ蛋白質 p56 及び Rabaptin-5 では、ペプチドの+6 サイトは Ala になっていることも、この考えを支持する (表 2-2B)。

これらの背景を基に、私は  $\gamma$ 1-ear ドメインと GAE ドメインにおけるアクセサリ蛋白質の選択特異性は、 $\gamma$ 1-ear ドメインの Ser764 と GAE ドメインの Pro574、ならびにアクセサリ蛋白質の Phe (+6) と Ala (+6) の違いの組合せによって生じているという仮説を考え、GAE ドメインの Pro とアクセサリ蛋白質の Phe (+6) の組合わせの場合に立体障害が生じ、アクセサリ蛋白質への GAE ドメインの親和性が低下する Pro/Phe(+6)立体障害モデルを提唱するに至った。そして  $\gamma$ 1-ear ドメインの GAE 型の S764P 変異体と GAE ドメインの  $\gamma$ 1-ear 型の P574S 変異体を新たに作成し、それらの X 線結晶構造解析および生化学的な解析を行うことで、Pro/Phe(+6)立体障害モデルの検証を行った。

表 2-1  $\gamma$ 1-ear ドメインと GAE ドメインに対する各ペプチドの親和性

peptide	sequence	$K_d$ ( $\mu$ M)	
		$\gamma$ 1-ear ドメイン	GAE ドメイン
$\gamma$ -synergisin	666LADDFGEFSLFGE <sup>678</sup>	5.1	75
	687EQDDFQDFMAFSN <sup>699</sup>	17	
	772SDDDFADFHS <sup>781</sup>	79	
EpsinR	368GNGDFGDWSAFNQ <sup>380</sup>	22	110
	340SADLFGGFADFGS <sup>352</sup>	370	
	613KQDAFANFANFSK <sup>625</sup>	550	
Rabaptin-5	435DESDFGPLVG <sup>444</sup>	61	69

Inoue, 2004; Yamada, 2004

表 2-2 ear ドメイン及びアクセサリ蛋白質の相互作用部位のアミノ酸配列の比較

(A) ear ドメイン

---

$\gamma$ 1-ear:	759	Q L Q L L S P S S S I	769
GGA1-GAE:	569	K V K L Q P P S G T E	579
GGA2-GAE:	543	R V K L Q P A S S S K	553
GGA1-GAE:	620	K V K L Q P P S G T E	630

---

(B) アクセサリ蛋白質

---

$\gamma$ -synergin:	666	L A S S F G E F S L F G E	678
p56:	2	D D D D F G G F E A A E T	14
Rabaptin-5	435	D E S D F G P L V G A D S	447
EpsinR:	369	G N G D F G D W S A F N Q	381

---

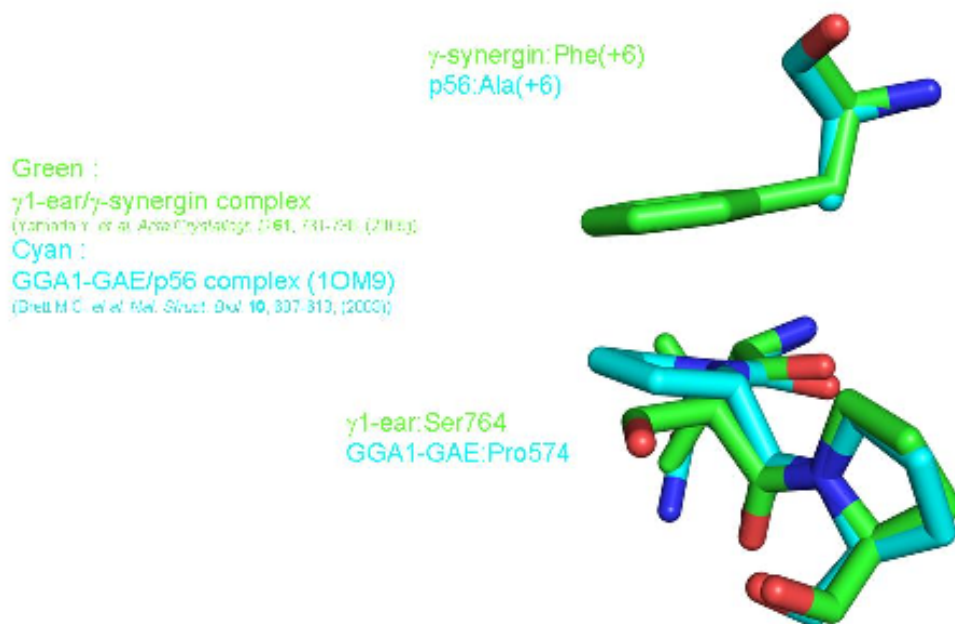


図 2-4 +6 部位付近での $\gamma$ 1-ear ドメインと GAE ドメインの構造の比較

$\gamma$ 1-ear ドメインと  $\gamma$ -synergisin ペプチドとの複合体と GAE ドメインと p56 ペプチドとの複合体の立体構造を、 $\gamma$ 1-ear ドメインの Ser764 と GAE ドメインの Pro574 の周辺残基の C $\alpha$ 原子で重ね合わせた。 $\gamma$ 1-ear ドメインの Ser764 と GAE ドメインの Pro574、 $\gamma$ -synergisin ペプチドの Phe(+6)、p56 ペプチドの Ala(+6)をスティックモデルで描いた。 $\gamma$ 1-ear と $\gamma$ -synergisin ペプチドは緑色で、GAE ドメインと p56 ペプチドはシアンの色で示した。

### 3. Materials and methods

#### 3.1. 発現系の構築

本研究で用いた全ての蛋白質およびペプチドは、ヒト由来のものである。 $\gamma$ -synergin ペプチド融合  $\gamma$ 1-ear ドメインと、GST 融合  $\gamma$ 1-ear ドメインを大量発現させる二つのプラスミドは既に作成されたものを用いた (Yamada, 2004; Yamada *et al.*, 2005)。Yamada らによって作成された  $\gamma$ -synergin ペプチド融合  $\gamma$ 1-ear ドメインのプラスミドは、制限酵素 *Bam*H I および *Xho* I により切断された pGEX4T-2 (GE healthcare) に  $\gamma$ 1-ear ドメイン (703-822) を組込んだ後に、*Bam*H I で再度切断し  $\gamma$ -synergin ペプチド (<sup>668</sup>DDFGGEFSLFGE<sup>678</sup>) とリンカー (SGG) を組込んだものである。このプラスミドからは  $\gamma$ -synergin ペプチドの C 末端と  $\gamma$ 1-ear の N 末端の間をリンカー配列がつながれた状態で蛋白質が発現される。 $\gamma$ -synergin ペプチド部分が結晶格子中の隣の対称分子の  $\gamma$ 1-ear ドメイン部分と相互作用することにより、強固なパッキングを形成して高分解能の複合体構造を決定することができる (Yamada, 2004; Yamada *et al.*, 2005)。もう一方の Nogi らによって作成された GST 融合  $\gamma$ 1-ear ドメインのプラスミドは、制限酵素 *Bam*H I および *Eco*R I により切断された pGEX4T-2 に  $\gamma$ 1-ear ドメイン (677-822) を組込んだものである (Nogi *et al.*, 2002)。これらの 2 つのプラスミドに Quick change II (Stratagene) を用いて、GAE 型の S764P 変異を導入した。

また GGA1-GAE ドメインに関しては Collins らによって既に立体構造が決定されている

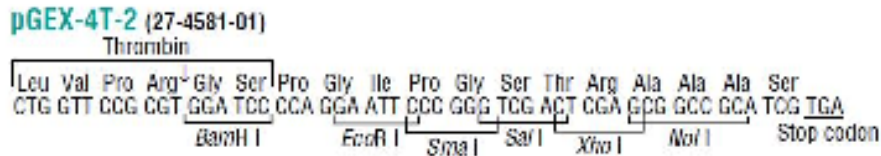
494-639 の領域を発現に用いることにした (Collins *et al.*, 2003; Lui *et al.*, 2003)。制限酵素 *BamH* I および *EcoR* I により切断された pGEX6P-1 (GE healthcare) に GGA1-GAE ドメイン (494-639) を組込んだプラスミドを作成した。このプラスミドも  $\gamma$ 1-ear ドメインと同様に Quick change II (Stratagene) を用いて、 $\gamma$ 1-ear 型の P574S 変異を導入した。

後述 (3.5 節) の表面プラズモン共鳴 (SPR) の測定に用いる GST 融合ペプチドのプラスミドのうち、 $\gamma$ -synergin (<sup>666</sup>LADDFGEFSLFGE<sup>678</sup>) と EpsinR (<sup>368</sup>GNGDFGDWSAFNQ<sup>380</sup>) は既に作成されたものを用いた (Yamada, 2004)。Yamada らによって作成されたこれらのプラスミドは制限酵素 *BamH* I および *Xho* I により切断された pGEX4T-2 に合成オリゴ DNA を組込んで作成したものである。Rabaptin-5 (<sup>435</sup>DESDFGPLVGADS<sup>447</sup>) と p56 (<sup>2</sup>DDDDDFGGFEAAET<sup>14</sup>) の GST 融合ペプチドも Yamada らの作成したプラスミドと同様に、制限酵素 *BamH* I および *Xho* I により切断された pGEX4T-2 に合成オリゴ DNA を組込んで作成した。p56 融合ペプチドのプラスミドは Quick change II (Stratagene) を用いて、+6 の部分の Ala を Phe へ置換する変異の導入を行った。

これらのプラスミドの一覧を表 3-1 に示す。



(A)



(B)



図 3-1 γ-synergin ペプチド融合 γ1-ear ドメインのプラスミド

(A) GE Healthcare 社 pGEX4T-2 の MCS (Multi-Cloning Site)。本研究では *Bam*HI と *Xho*I の間に γ-ear ドメインを挿入し、再度 *Bam*HI で切断し γ-synergin ペプチドを挿入している。図 (B) でのリンカー部 (SGGGS) の GS はこれに由来する。

(B) MCS の *Bam*HI と *Xho*I の間に、γ-synergin ペプチドとリンカー、γ1-ear ドメインを挿入した。γ1-ear ドメインの C 末端には終止コドンが付加されている。Thrombin により酵素処理された場合、Thrombin cleavage site の Arg (R) と Gly (G) の間で切断され、GST-Tag が外れる。

表 3-1 本研究に用いたプラスミド

(A) 使用したベクターと組込んだ配列の残基番号

蛋白質名	領域(aa)	ベクター	切断酵素名	参考文献	用途
$\gamma$ 1-ear	703-822	pGEX4T-2	<i>Bam</i> H I - <i>Xho</i> I	Yamada <i>et al.</i> , 2005	結晶化
$\gamma$ 1-ear	677-822	pGEX4T-2	<i>Bam</i> H I - <i>Eco</i> R I	Nogi <i>et al.</i> , 2002	SPR測定
GAE	494-639	pGEX6p-1	<i>Bam</i> H I - <i>Eco</i> R I	Lui <i>et al.</i> , 2003	結晶化, SPR測定
各ペプチド	(B)参照	pGEX4T-2	<i>Bam</i> H I - <i>Xho</i> I		SPR測定

(B) SPR測定に用いたペプチドの由来とその断片の残基番号

蛋白質名	領域(aa)	配列
$\gamma$ -synergisin	666 - 678	LASSFGFSLFGE
EpsinR	369 - 381	GNGDFGDWSAFNQ
Rabaptin-5	435 - 447	DESDFGPLVGADS
p56	2 - 14	DDDDFGGFEEAET

### 3.2. 蛋白質の発現と精製

3.1 節で作成した蛋白質発現用のプラスミドを用いて、*Escherichia coli* BL21 (DE3) pLysS 株を形質転換した。形質転換した大腸菌を LB 培地 (1 % (w/v) トリプトン, 0.5 % (w/v) 酵母抽出物, 1 % (w/v) NaCl) 中で 37 °C で震とう培養し OD<sub>600</sub> が 0.7 に達した時に終濃度 0.2 mM になるように IPTG を添加し発現の誘導を行った。その後、27 °C で 16 時間培養を継続後、大腸菌の集菌を行った。

蛋白質の精製の過程を図 3-2 に示し、以下においては、LB 培地 1 L から回収した大腸菌あたりで書き示す。組換え蛋白質を大量発現させた大腸菌を 30 ml の PBS 緩衝液 (10 mM リン酸ナトリウム緩衝液 pH 7.4, 145 mM NaCl) で懸濁後、超音波破碎機 (TOMY, UD-201) により氷上で破碎し (output 10, duty 10, 5 min x 2 cycles)、遠心操作 (HITACHI, CR21G, R20A2 ロータ, 18000 rpm, 30 min x 2 cycles, 4 °C) にて夾雑物の除去を行いその上清を回収した。

pGEX4T および pGEX6P に組み込まれた目的蛋白質 ( $\gamma$ 1-ear ドメインと GAE ドメイン) は GST (glutathione S-transferase) 融合蛋白質として発現するので、GST タグを特異的に認識し吸着する Glutathione Sepharose 4B (GE healthcare) 1 ml をカラムに充填し、PBS 緩衝液 5 ml を用いてカラムを平衡化後サンプル溶液を添加した。PBS 緩衝液 10 ml でカラムを洗浄し夾雑蛋白質を除いた後、GST 融合 GAE ドメインでは終濃度 1 mM になるように DTT を添加した PBS 緩衝液 1 ml で再びカラムを洗浄した。GST 融合 GAE ドメインは PreScission プロテアーゼ (GE healthcare) 25 U (unit) を加え 4 °C で、GST 融合  $\gamma$ 1-ear ドメインは Thrombin プ

ロテアーゼ (GE healthcare) 20 U を加え 16 °C で、それぞれ 16 時間の酵素処理によって GST タグの切断を行った。その後、PBS 緩衝液 5 ml を用いて切断産物をカラムから溶出させた。Thrombin プロテアーゼで処理した GAE ドメインは 500  $\mu$ l の Benzamidine Sepharose 6B (GE healthcare) カラムを通すことにより残留している Thrombin プロテアーゼを除去した。GST タグ切断後の蛋白質はゲル濾過バッファー (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 100 mM NaCl) を用い Superdex 75pg (GE healthcare) でゲル濾過を行い、10K Da サイズカットの Amicon Ultra-15 (Millipore) を用いて濃縮を行った。収量は、どちらの蛋白質も培地 1 リットルあたり 2.5 mg であった。

また、後述 (3.5 節) の表面プラズモン共鳴 (SPR) の測定に用いる GST 融合ペプチドは、GST タグを切断せずに溶出緩衝液 (10 mM 還元型 glutathione, 20 mM Tris-HCl pH 8.0) で Glutathione Sepharose 4B から溶出させ、 $\gamma$ 1-ear ドメインや GAE ドメインと同様にゲル濾過と濃縮を行った。測定のコントロールに用いる GST も GST 融合ペプチドと同様に精製および濃縮を行った。収量は、全ての GST 融合ペプチドおよび GST で培地 1 リットルあたり約 10 mg であった。

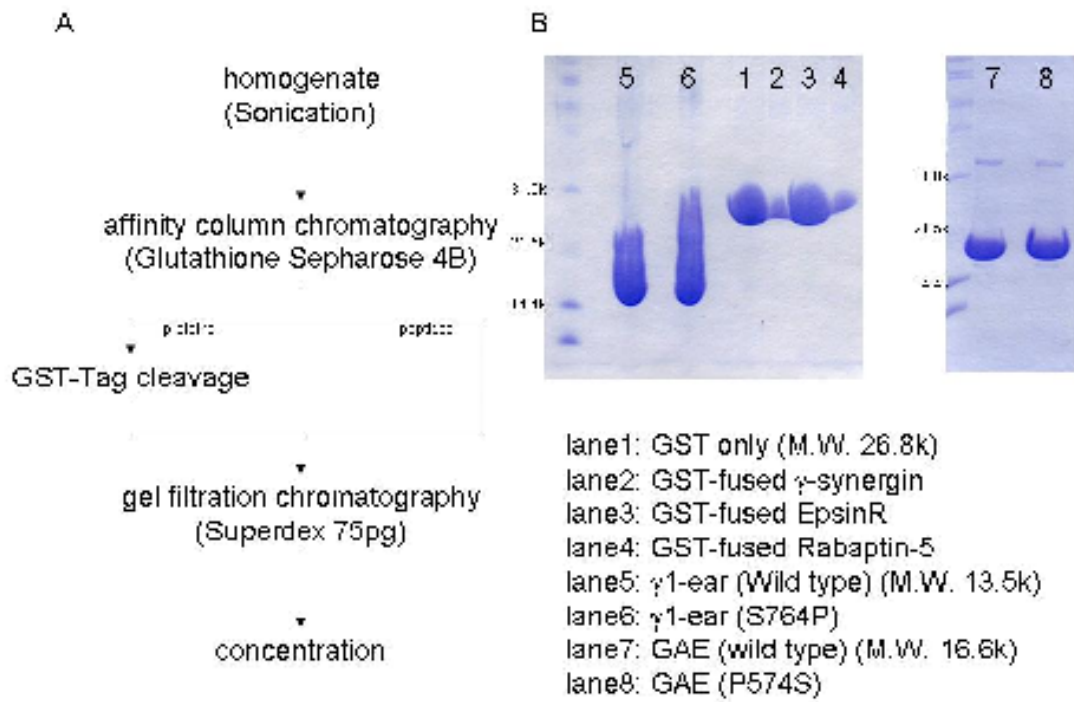


図 3-2 蛋白質の精製

(A) 蛋白質の精製の過程を模式的に示した。

(B) 精製により得られた各蛋白質とペプチドの濃縮後の SDS-PAGE。

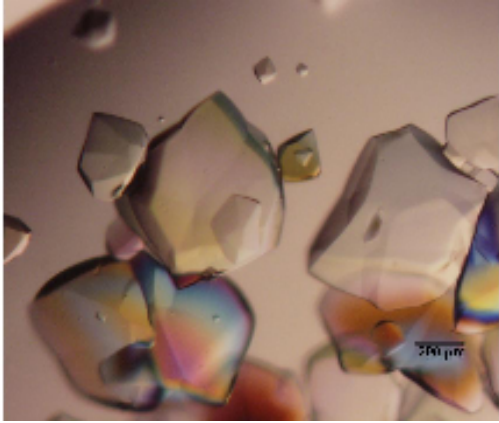
### 3.3. 結晶化

精製した  $\gamma$ -synergin ペプチド融合  $\gamma$ 1-ear ドメイン P764S 変異体の蛋白質は結晶化ロボット (Hiraki *et al.*, 2006) を用いて、蛋白質濃度 10 mg/ml、温度 293K、シッティングドロップ蒸気拡散法にて 480 条件 (96 条件 x 5 プレート) で結晶化の一次スクリーニングを行った。この一次スクリーニングには Crystal Screen I & II (HAMPTON RESEARCH) と Wizard I & II (Emerald BioSystems)、Cryo I & II (Emerald BioSystems)、MembFac (HAMPTON RESEARCH)、PEG/Ion Screen (HAMPTON RESEARCH)、Natrix (HAMPTON RESEARCH)、Footprint (Molecular Dimensions Limited) のスクリーニングキットを用いた。スクリーニングにて結晶が析出した条件を元に結晶化条件の精密化を行った結果、蛋白質濃度 10 mg/ml、温度 289K、3.3 M Na Formate、0.2 M NaCl、20 % glycerol、0.1 M Tris-HCl pH8.0 を含む沈殿剤の条件下で、ハンギングドロップ蒸気拡散法により 7 日間静置することで、三辺の長さがそれぞれ 0.3 mm 程度の回折実験に適した蛋白質結晶を得ることができた(図 3-3A)。

精製した GAE ドメイン P574S 変異体の蛋白質は、p56 ペプチドと蛋白質を 10:1 の比率 (モル比) で混合し、 $\gamma$ -synergin ペプチド融合  $\gamma$ 1-ear ドメイン P764S 変異体と同様に結晶化ロボットを用いて、蛋白質濃度 10 mg/ml、温度 293K、シッティングドロップ蒸気拡散法にて 480 条件 (96 条件 x 5 プレート) で結晶化一次スクリーニングを行った。この一次スクリーニングには Crystal Screen I & II と Wizard I & II、Cryo I & II、MembFac、PEG/Ion Screen、Natrix、Footprint のスクリーニングキットを用いた。スクリーニングにて結晶が析出した条件を元に結

晶化条件の精密化を行い、蛋白質濃度 10 mg/ml、温度 289K、30% w/v PEG 1500 からなる沈殿剤の条件下で、シッティングドロップ蒸気拡散法により 14 日間静置することで、三辺の長さがそれぞれ 0.1 mm 程度の回折実験に適した蛋白質結晶を得ることが出来た。(図 3-3B)

A



B

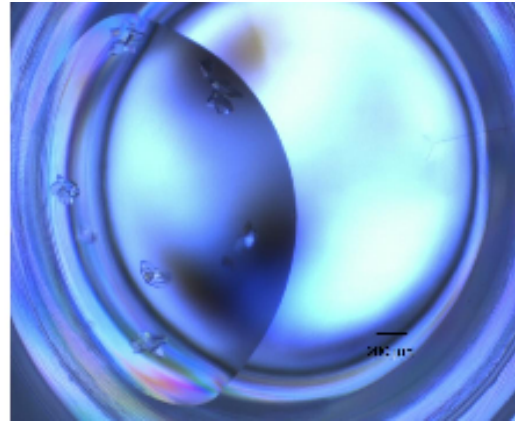


図 3-3 得られた結晶の写真

(A)  $\gamma$ -synergin ペプチド融合  $\gamma$ 1-ear ドメイン S764P 変異体の結晶。

(B) GAE ドメイン S574P 変異体と p56 ペプチドとの複合体の結晶。

両写真ともバーの長さは 0.2 mm である。



### 3.4. 回折データの測定と構造決定

$\gamma$ -synergin ペプチド融合  $\gamma$ 1-ear ドメイン S764P 変異体の結晶はフォトンファクトリー (PF) の BL-5A ビームラインで、波長 0.9834 Å、露光時間 3 秒、振動角 0.5 度、180 度の回折データの測定を行った。GAE ドメイン P574S 変異体と p56 ペプチドの複合体は PF-AR の NW12A ビームラインで、波長 1.0000 Å、露光時間 3 秒、振動角 0.5 度、180 度の回折データの測定を行った。どちらの結晶とも 100 K の窒素ガスで冷却された状態で測定を行い、データセットは *HKL2000* (Otinowisky *et al.*, 1997) を用いて処理した。

$\gamma$ -synergin ペプチド融合  $\gamma$ 1-ear ドメイン S764P 変異体の結晶構造、及び GAE ドメイン P574S 変異体と p56 ペプチドの複合体の結晶構造は、共に *MOLREP* (Vagin *et al.*, 1997) を用いた分子置換法によって決定した。モデルにはそれぞれ野生型の  $\gamma$ -synergin ペプチド融合  $\gamma$ 1-ear ドメインの結晶構造 (PDB 未登録, Yamada *et al.*, 2005) 及び GAE ドメインと p56 ペプチド複合体の結晶構造 (PDB code: 1OM9, Collins *et al.*, 2003) を用いた。分子モデルの組立てには *COOT* (Emsley *et al.*, 2004) を用い、構造の精密化には *CCP4* (*Collaborative Computational Project, Number 4*, 1994) の *REFMAC5* (Murshudov *et al.*, 1997) と *CNS* (Brunger *et al.*, 1998) を用いた。図の作成には *PYMOL* (DeLano, 2008) を用いた。

回折データセット収集及び分子モデルの精密化の結果に関する統計値を表 3-1 と表 3-2 に示す。

表 3-1  $\gamma$ 1-ear ドメイン S764P 変異体の結晶構造学的統計値

Crystal	S764P変異体	wild type (reference data)
X-ray source	PF BL5A	PF BL18B
Wave length (Å)	0.9834	1.0000
Space group	$P3_121$	$P3_121$
Unit cell a/b/c (Å)	63.5, 63.5, 82.4	64.0, 64.0, 82.3
Resolution range (Å)	50 - 2.58 (2.67 - 2.58)	55.4 - 1.85 (1.92 - 1.85)
Completeness (%)	99.2 (94.1)	99.6 (99.9)
$I/\sigma(I)$	64.5 (4.4)	11.5 (3.52)
$R_{\text{int}}$ (%)	5.2 (27.3)	6.2 (41.0)
Mosaicity (°)	0.62	0.32
$R/R_{\text{int}}$ (%)	26.3/31.3	19.8/23.6
Number of atoms		
Protein	1013	1045
Solvent	10	142
Rms deviation from ideality		
Bond length (Å)	0.009	0.005
Bond angle (°)	1.26	1.37
Averaged $B$ -factor (Å <sup>2</sup> )		
Protein	79.7	24.9
Solvent	60.9	33.6

Numbers in parentheses are for the outer resolution shell.

表 3-2 GAE ドメイン P574S 変異体と p56 ペプチド複合体の結晶構造学的統計値

Crystal	P574S変異体
X-ray source	PF-AR NW12A
Wave length (Å)	1.0000
Space group	$P2_1$
Unit cell <i>a/b/c</i> (Å)	58.9, 73.1, 62.5
$\alpha/\beta/\gamma$ (°)	90.00, 90.04, 90.00
Resolution range (Å)	50 -1.90 (1.97 - 1.90)
Completeness (%)	98.5 (96.4)
<i>I</i> / $\sigma$ ( <i>I</i> )	41.7 (6.7)
$R_{\text{int}}$ (%)	4.8 (16.8)
Mosaicity (°)	0.75
$R/R_{\text{free}}$ (%)	22.3/29.1
Number of atoms	
Protein	4604
Solvent	283
Rms deviation from ideality	
Bond length (Å)	0.021
Bond angle (°)	2.01
Averaged $B$ -factor (Å <sup>2</sup> )	
Protein	35.3
Solvent	42.9

Numbers in parentheses are for the outer resolution shell.

### 3.5. 表面プラズモン共鳴 (SPR: surface plasmon resonance) 測定

SPR の計測には BIACORE2000 (Biacore) を用いた。まず GST に対するモノクローナル抗体 (Biacore) をアミンカップリング法で CM5 センサーチップ (Biacore) に固定化した。全ての測定サイクルで 1000 RU (resonance unit) のシグナルを得られるようにコントロール GST と GST 融合ペプチドを固定化し、これを測定用のセンサーチップとした。これに段階希釈した  $\gamma$ 1-ear ドメイン、GAE ドメインそれぞれの野生型及び変異体を注入し SPR 測定を行い、固定化したペプチドに対する  $\gamma$ -ear ドメイン及び GAE ドメインの親和性(平衡値  $R_{eq}$ )を測定した。測定で得られた SPR センサーグラムは BIAevaluation 3.2 (Biacore) のプログラムを用いて解析を行った。段階希釈した  $\gamma$ -ear ドメイン及び GAE ドメインの濃度に対する平衡値をそれぞれプロットし、steady-state affinity model を用いて解離定数  $K_d$  の算出をおこなった。これらの SPR 測定は 293 K で、10 mM HEPES pH 7.5 と 150 mM NaCl、0.0005 % surfactant P20 を含むバッファーの条件下で行い、センサーチップ上の流速は、GST 及び GST 融合ペプチドの固定化時には 5  $\mu$ l/min、各 ear ドメイン蛋白質注入時には 15  $\mu$ l/min とした。

## 4. Results

### 4.1. $\gamma$ -synergin 配列を認識する $\gamma$ 1-ear ドメイン P764S 変異体の結晶構造

$\gamma$ 1-ear ドメインと GAE ドメインは、アミノ酸配列相同性が高くまたそれらの立体構造もよく似ているにもかかわらず、生体内では  $\gamma$ 1-ear ドメインのみが特異的にアクセサリー蛋白質  $\gamma$ -synergin を認識している (Lui *et al.*, 2003)。このアクセサリー蛋白質の選択特異性には  $\gamma$ 1-ear ドメインの Ser764 残基が重要な機能を果たしているという仮説を検証するために、S764P 変異  $\gamma$ 1-ear ドメインと  $\gamma$ -synergin との複合体の立体構造の決定を行った。

$\gamma$ -synergin ペプチド融合  $\gamma$ 1-ear ドメインに S764P 変異を導入した蛋白質を用いて、289 K で 7 日間の結晶成長により三辺の長さがそれぞれ 0.3 mm 程度の結晶を得ることができた (図 3-3A)。この結晶を用いて PF の BL-5A ビームラインにて 0.9834 Å の波長で X 線回折実験を行ったところ分解能 2.58 Å までの回折点が見られ、データセットの収集を行った (表 3-1)。この回折データセットを用いて、既に構造が決定されている野生型をモデルとした分子置換法による構造決定を行った。解かれた結晶構造は野生型と同じ  $P3_121$  の空間群を持ち、非対称単位中の分子数は 1 であった。(表 3-1)

全体構造としては野生型と同様に 2 つの逆平行  $\beta$ シート ( $\beta$ ストランド  $\beta$ 1-2-3-5-6 と  $\beta$ 4-7-8) により形成される  $\beta$ サンドイッチ構造を持っていた (図 4-1)。 $\gamma$ -synergin ペプチド (<sup>688</sup>DFGGEFSLFGE<sup>697</sup>) の電子密度も野生型とほぼ同様の位置に確認することができた (図 4-2)。

しかし、今回決定した S764P 変異体結晶の分解能は 2.58 Å と野生型結晶の分解能 1.85 Å (Yamada *et al.*, 2005) と比べて低下していた。また、野生型で確認することが出来なかった  $\gamma$ -synergin ペプチド C 末端の Glu(+8)の電子密度を変異型でも同様に確認することが出来なかっただけでなく、野生型では確認されていたリンカー部分 (<sup>698</sup>SGGGS<sup>702</sup>) のアミノ酸残基についても電子密度を確認することが出来なかった (図 4-3)。

野生型と S764P 変異体の立体構造を重ね合わせたところ (図 4-4)、 $\gamma$ 1-ear ドメイン全体では主鎖の C $\alpha$ 原子の平均二乗偏差 (R.M.S.D: Root Mean Square Deviation) は 0.35 Å であるが、 $\gamma$ -synergin ペプチド部分では 0.83 Å であった (図 4-5、4-6)。このことは、 $\gamma$ 1-ear ドメイン全体よりも  $\gamma$ -synergin ペプチド部分で大きく構造が異なることを示している。さらに  $\gamma$ -synergin ペプチド部分の温度因子について調べたところ、野生型の場合 Phe (+3) から Phe (+6) までの 4 残基は、ペプチドの平均温度因子と比較して低い値を示していた。しかし、S764P 変異体の場合には、この部分の温度因子が相対的に上昇し、ペプチドの平均温度因子とほぼ同等の値を示していた (表 4-1) (図 4-7)。

さらに詳細に  $\gamma$ 1-ear ドメインの変異を導入した Pro764 と  $\gamma$ -synergin ペプチドの Phe (+6) の付近の構造の違いを見てみると、野生型で存在していた水分子が無くなっていることが分かった (図 4-8)。この水分子は Phe (+6) の主鎖の窒素原子と Phe750 の主鎖の窒素原子、Gln780 の側鎖の酸素原子、この三つの原子との間でそれぞれ水素結合を形成している。 $\gamma$ 1-ear ドメイン S764P 変異体の構造での  $\gamma$ -synergin ペプチドの位置は、野生型の場合のペプチドの位置に

比べて、Phe (+6) の主鎖の窒素原子の位置で 1.8 Å、 $\gamma$ 1-ear ドメインから離れる方向に動いていた。このことにより、窒素原子と水分子との間が 4.3 Å で水素結合を形成できない距離となり、水分子が外れたと考えられる。

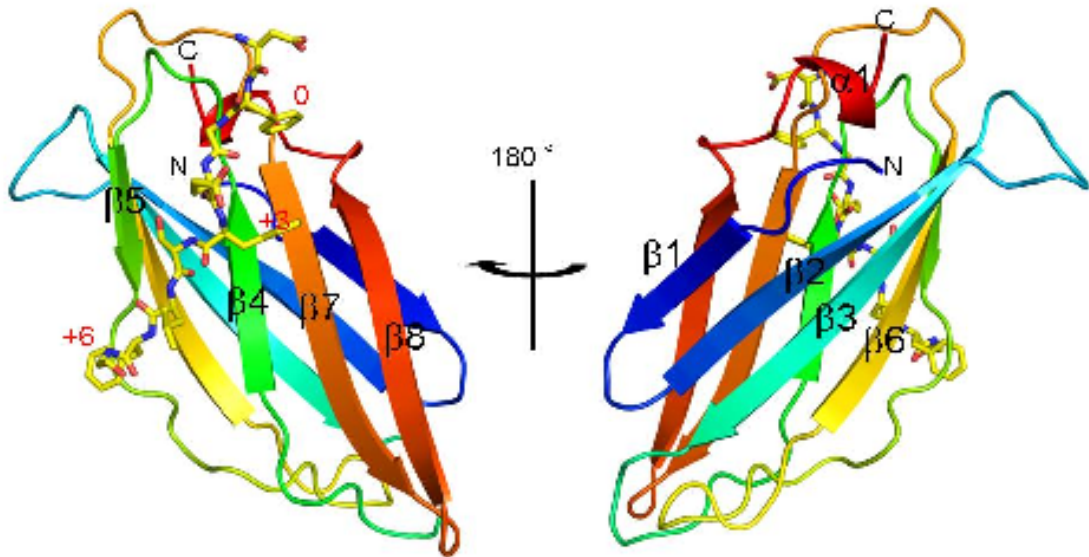


図 4-1  $\gamma$ 1-ear ドメイン S764P 変異体と  $\gamma$ -synerginin ペプチドとの複合体の立体構造

$\gamma$ 1-earドメインの部分をリボン図で、結晶対称分子の  $\gamma$ -synerginin ペプチド部分をスティックモデルで描いた。  
 $\gamma$ 1-earドメイン部分は、N 末端から C 末端までを赤から青のグラデーションで、ペプチド部分は炭素を黄、酸素を赤、窒素を青の色で示した。



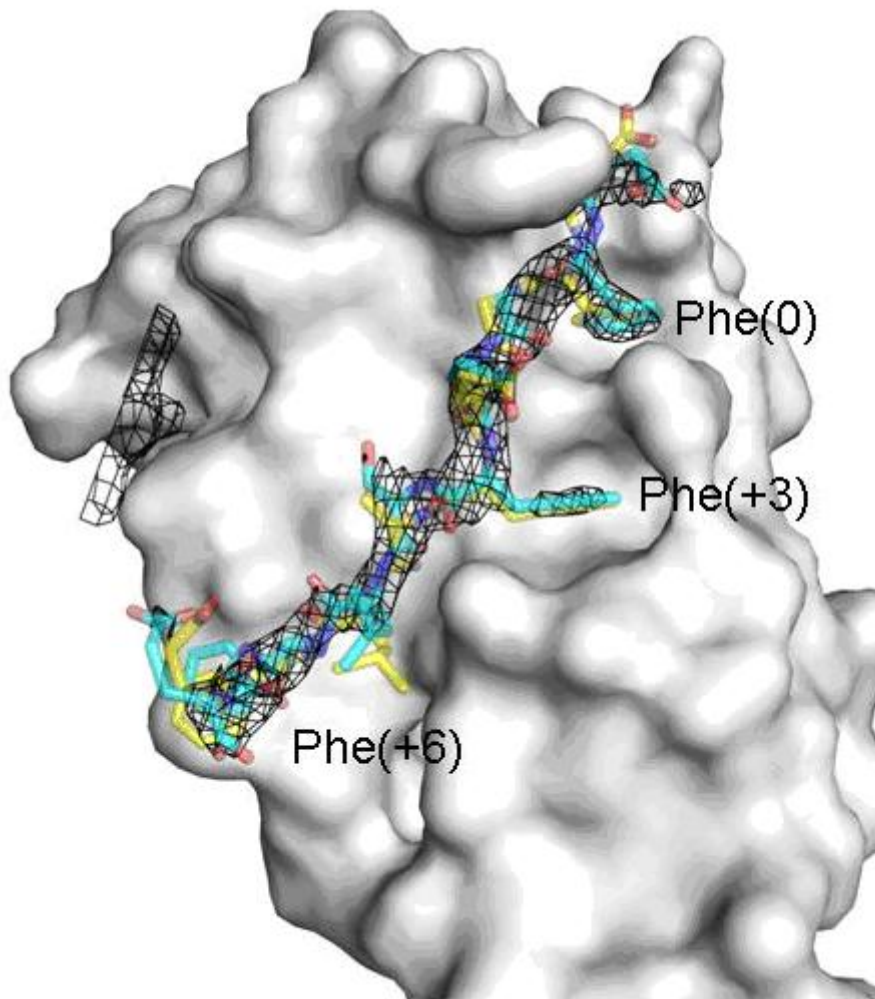


図 4-2  $\gamma$ 1-ear ドメイン S764P 変異体と  $\gamma$ -synergin ペプチドとの複合体のペプチド部分の電子密度図

$\gamma$ 1-ear ドメインの部分を表面モデルで、対称分子の  $\gamma$ -synergin ペプチド部分の  $1.8 \sigma$  の電子密度図をメッシュで、ペプチド部分をスティックモデルで描いた。 $\gamma$ -synergin ペプチドの野生型の分子モデルは、S764P 変異体の分子モデルの  $C\alpha$  原子で重ねあわせを行った、ペプチドのスティックモデルは、野生型の炭素をシアン、S764P 変異体の炭素を黄、酸素を赤、窒素を青の色で示した。

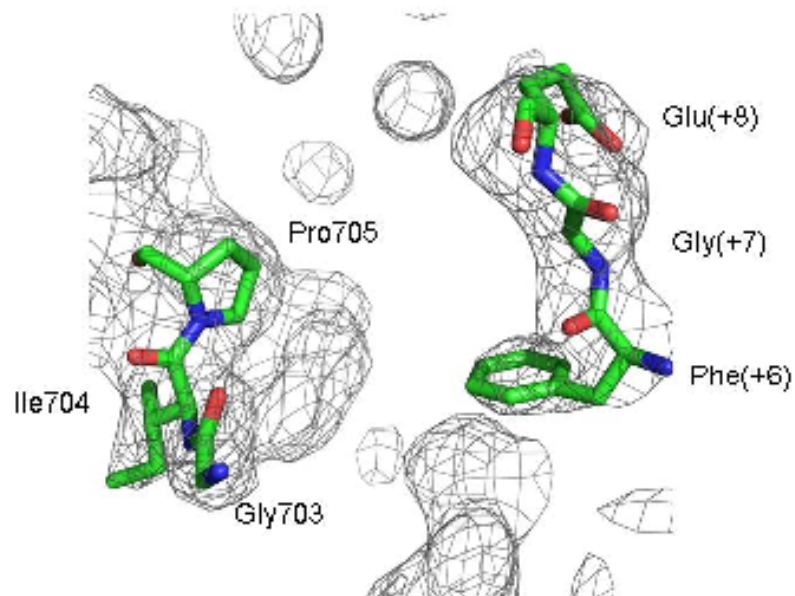


図 4-3  $\gamma$ 1-ear ドメイン S764P 変異体と  $\gamma$ -synergин ペプチドとの複合体のリンカー部分の電子密度図

$\gamma$ 1-ear ドメインと  $\gamma$ -synergин ペプチドとを結ぶリンカー部分の 1.0  $\sigma$ での電子密度をメッシュで、またリンカー部分周辺の 3 アミノ酸残基をスティックモデルで描いた。

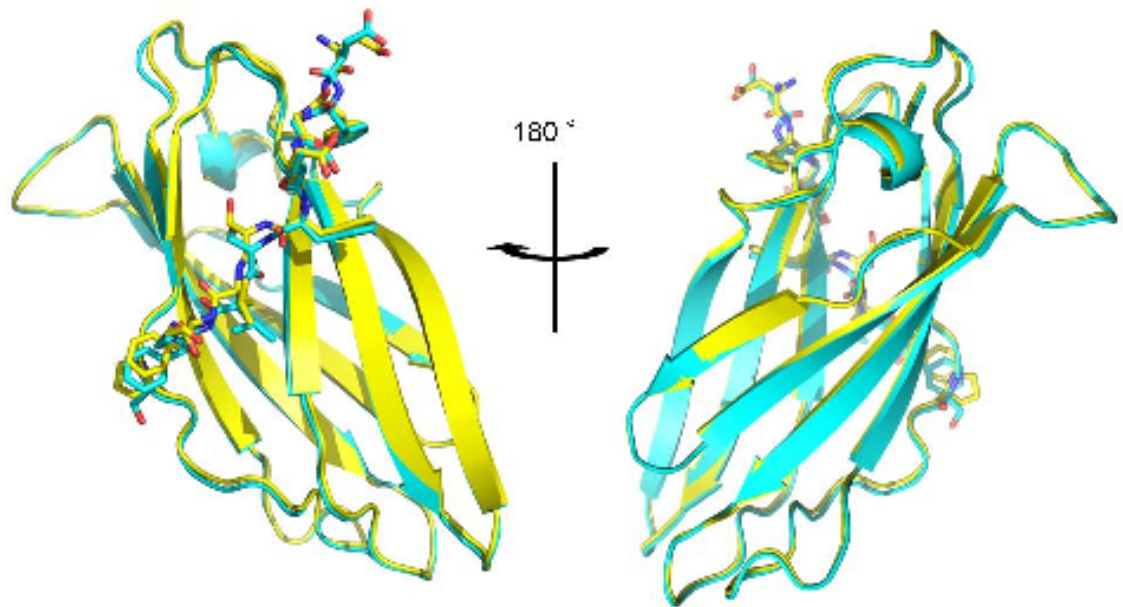


図 4-4  $\gamma 1$ -ear ドメインと  $\gamma$ -synergin ペプチドとの複合体の野生型および S764P 変異体の重ね合わせ図

$\gamma 1$ -ear ドメインとそれと相互作用している対称分子の  $\gamma$ -synergin ペプチドの複合体構造全体の C $\alpha$ 原子で重ね合わせを行った。 $\gamma 1$ -ear ドメイン部分をリボン図で、 $\gamma$ -synergin ペプチド部分はスティックモデルで描いた。ペプチドのスティックモデルは、野生型を炭素はシアンで、S764P 変異体の炭素を黄で、酸素を赤、窒素を青で、リボン図は、野生型はシアンで、S764P 変異体は黄の色で示した。

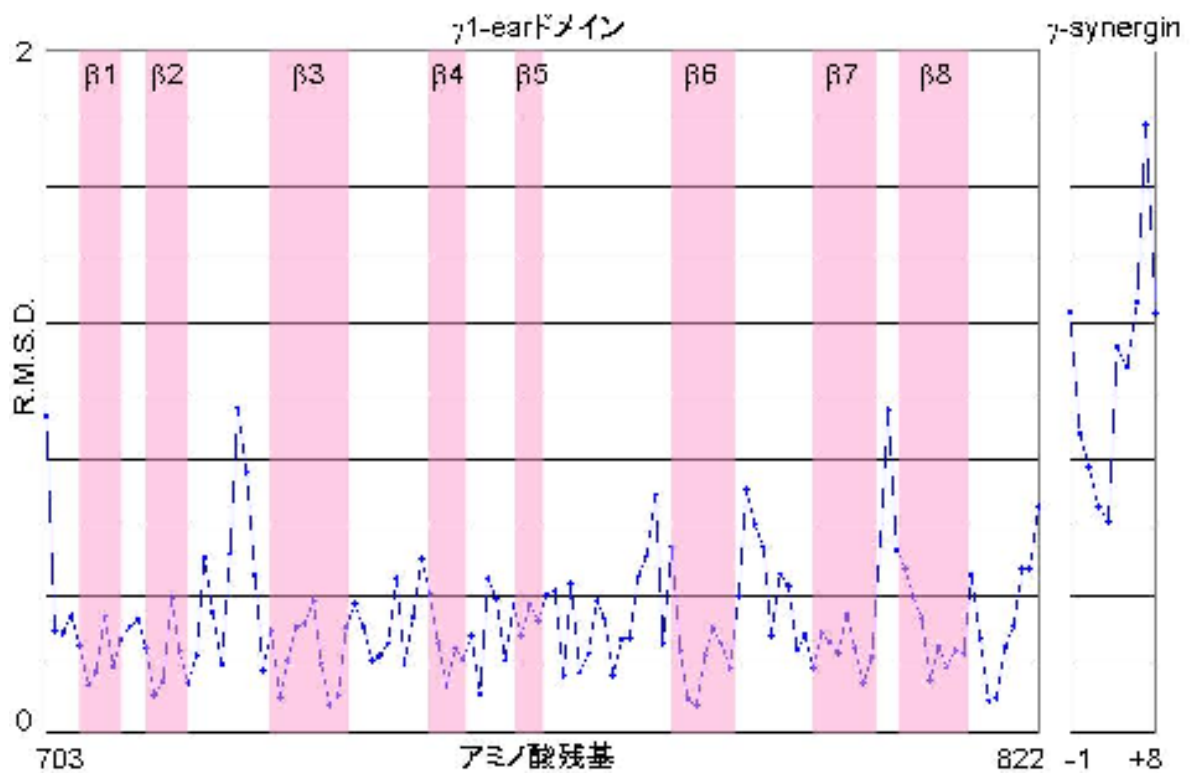


図 4-5  $\gamma$ 1-ear ドメインの S764P 変異体と野生型との立体構造の比較 (1)

$\gamma$ 1-earドメインの S764P 変異体と野生型の立体構造を  $C\alpha$ 原子で重ねあわせを行った際のそれぞれの残基の主鎖の R.M.S.D.の値を青色で示した。

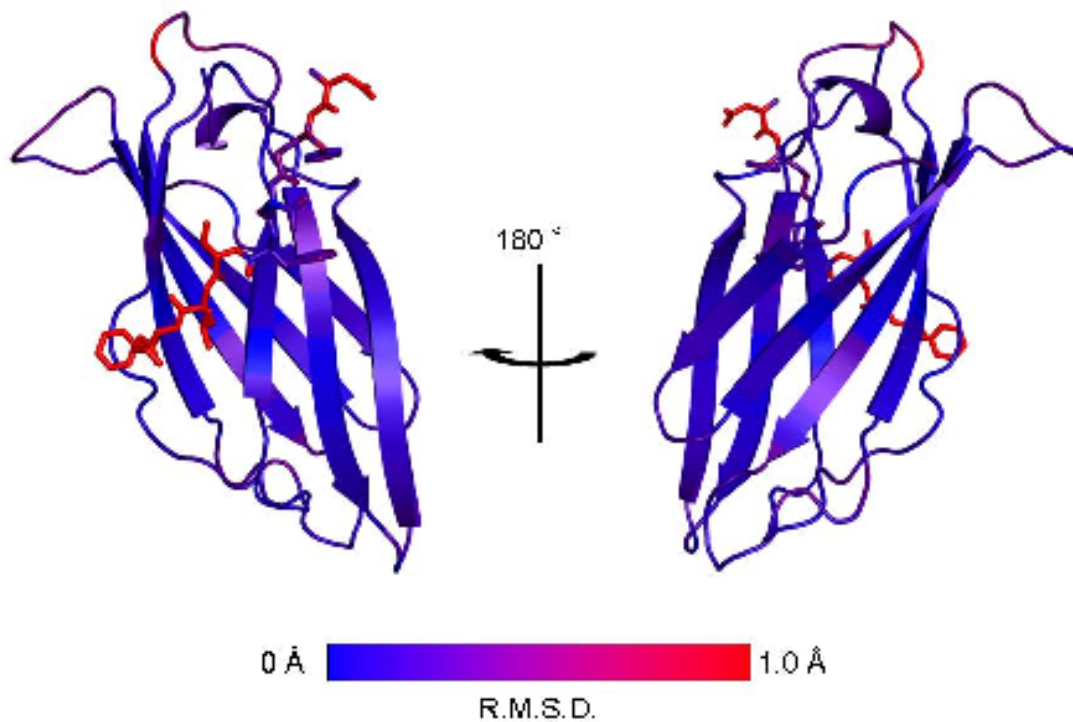


図 4-6  $\gamma$ 1-ear ドメインの S764P 変異体と野生型との立体構造の比較 (2)

$\gamma$ 1-ear ドメイン S764P 変異体と  $\gamma$ -synergin ペプチドとの立体構造を、 $\gamma$ 1-ear ドメインの部分をリボン図で、 $\gamma$ -synergin ペプチドをスティックモデルで示した。このモデルに、リボン図では主鎖の各原子の、スティックモデルでは全ての原子の、野生型との全ての原子で重ね合わせた際の R.M.S.D. の値に応じて、0 Å (青) から 1.0 Å (赤) での色で示した。

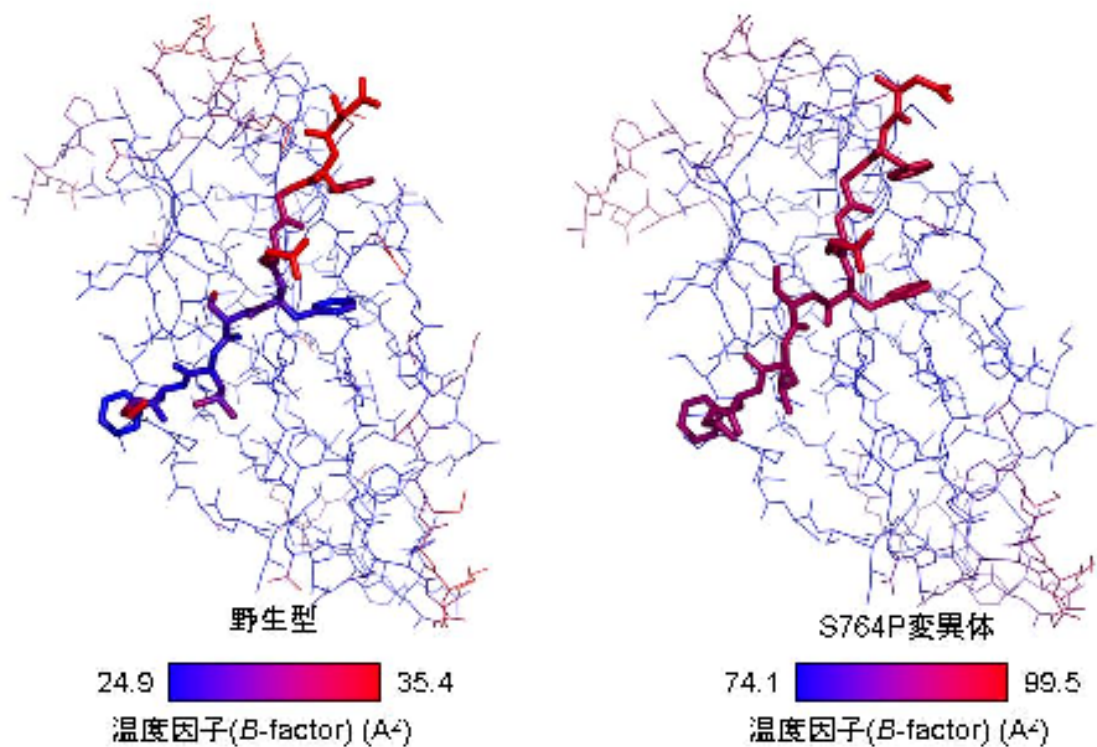


図 4-7  $\gamma$ 1-ear ドメインと  $\gamma$ -synergisin ペプチドとの複合体での温度因子

$\gamma$ 1-ear ドメイン S764P 変異体と  $\gamma$ -synergisin ペプチドとの立体構造を、 $\gamma$ 1-ear ドメイン部分をラインモデルで、 $\gamma$ -synergisin ペプチド部分をスティックモデルで示した。このモデルに、それぞれの温度因子の値に応じて、ペプチド部分も含め蛋白質全体の温度因子の平均(青)からペプチド部分の温度因子の平均(赤)の色で示した。

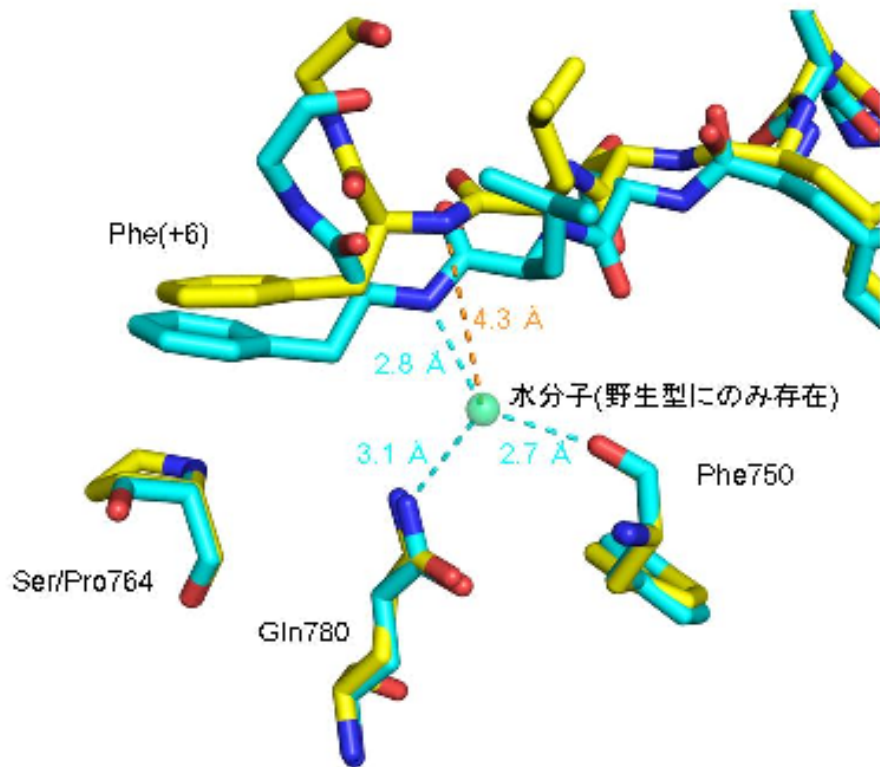


図 4-8  $\gamma$ 1-ear ドメインと  $\gamma$ -synergyn ペプチドとの複合体の+6 部位周辺の構造の比較

$\gamma$ 1-ear ドメインの野生型の Ser764 と変異体の Pro764、Phe750、Gln780 と  $\gamma$ -synergyn ペプチドをスティックモデルで描いた。野生型の炭素はシアン、S764P 変異体の炭素は黄、酸素は赤、窒素は青の色で示し、水分子は緑色の球体で示した。

## 4.2. 各種ペプチドと $\gamma$ 1-ear ドメイン及び GAE ドメインの変異による親和性の変化

4.1 節で明らかにされたように  $\gamma$ 1-ear ドメインの S764P 変異体と  $\gamma$ -synergisin ペプチドの複合体構造では、当初の仮説通りに GAE 型の S764P 変異の影響によりペプチドの+6 部位付近で大きな変化が起きていた。そこで、アクセサリ蛋白質の+6 に位置するアミノ酸残基が  $\gamma$ 1-ear ドメイン及び GAE ドメインへの結合に際し、溶液中においてどのような役割を果たしているのかを知るために、SPR を用いてそれらの親和性を測定した。用いた蛋白質とペプチドの組み合わせは表 4-2 に示した。

SPR の測定では、全ての蛋白質とペプチドの組み合わせでセンサーグラムが箱型として測定された（一例として図 4-9）。これは、これらの蛋白質とペプチドとの組み合わせにおいて解離・結合速度が速く、反応がきわめて早く平衡へと移行していることを示している。そのため、蛋白質の濃度とその平衡値から解離定数  $K_d$  の算出を行った（図 4-10）。

測定の結果を表 4-2 にまとめた。 $\gamma$ 1-ear ドメインの S764P 変異により、ペプチドの+6 の位置に Phe を持つ  $\gamma$ -synergisin と EpsinR の親和性は低下した ( $\gamma$ -synergisin では  $4.0 \mu\text{M}$  から  $7.7 \mu\text{M}$ 、EpsinR では  $4.3 \mu\text{M}$  から  $7.9 \mu\text{M}$ )。しかしながら、GAE ドメインの P574S 変異では、それらに対する親和性が同様に増加することが期待されていたが、親和性の変化は見られなかった ( $\gamma$ -synergisin では  $18.2 \mu\text{M}$  から  $30.6 \mu\text{M}$ 、EpsinR では  $43.9 \mu\text{M}$  から  $86.2 \mu\text{M}$ )。また、ペプチドの+6 の位置に Ala を持つ Rabaptin-5 は  $\gamma$ 1-ear と GAE の変異体共に親和性の変化は見られなかった ( $\gamma$ 1-ear では  $34.4 \mu\text{M}$  から  $32.5 \mu\text{M}$ 、GAE では  $10.3 \mu\text{M}$  から  $11.8 \mu\text{M}$ )。



$\gamma$ 1-ear ドメインでは当初の予測通り、GAE 型の S764P 変異により Phe (+6) を持つペプチドへの親和性の低下が引き起こされた。一方 GAE ドメインでは、野生型および  $\gamma$ 1-ear 型の P574S 変異におけるペプチドへの親和性の差は  $\gamma$ 1-ear ドメインでの違いに比べると小さく、当初の仮説では説明できないことが分かった。これは GAE ドメインが本研究にて提唱している立体障害によるアクセサリ蛋白質の選択特異性とは違う制御機構を持っているか、または  $\gamma$ 1-ear 型の P574S 変異の導入により、異常な立体構造をとっているかのどちらかの可能性が示唆された。

表 4-2 ear ドメイン蛋白質とアクセサリ蛋白質ペプチドの SPR による親和性 ( $K_d$ )

			Phe(+6)	Phe(+6)	Ala(+6)
			$\gamma$ -synergisin	EpsinR	Rabaptin-5
Ser764	$\gamma$ 1-ear	Wildtype	$4.0 \pm 0.1$	$4.3 \pm 0.1$	$34.4 \pm 0.9$
Pro764		S764P	$7.7 \pm 0.1$	$7.9 \pm 0.2$	$32.5 \pm 0.7$
Pro574	GAE	Wildtype	$18.2 \pm 0.7$	$43.9 \pm 2.2$	$10.3 \pm 1.1$
Ser574		P574S	$30.6 \pm 4.1$	$86.2 \pm 2.5$	$11.8 \pm 1.6$

( $\mu$ M)

GST 融合ペプチドをセンサーチップに固定化し、ear ドメイン蛋白質を流路に流して SPR の測定を行った。そ

れぞれのリガンド及びアナライトの組合せで、8 段階の希段階釈を行った。得られた 8 カ所の測定点の濃度

及び平衡値 ( $R_{eq}$ ) から解離定数  $K_d$  及びその標準偏差を算出した。

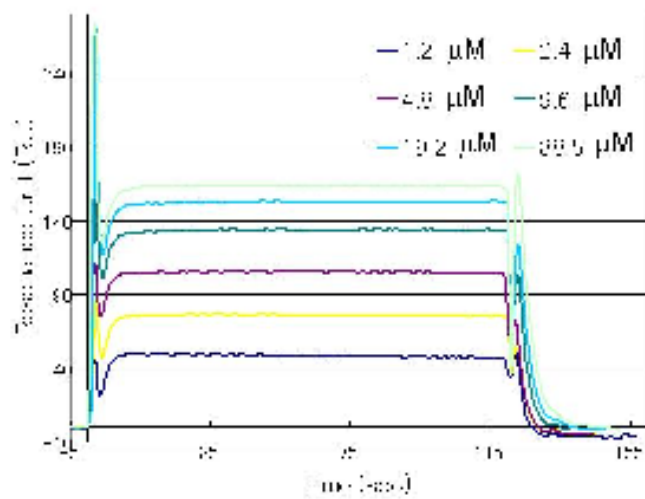
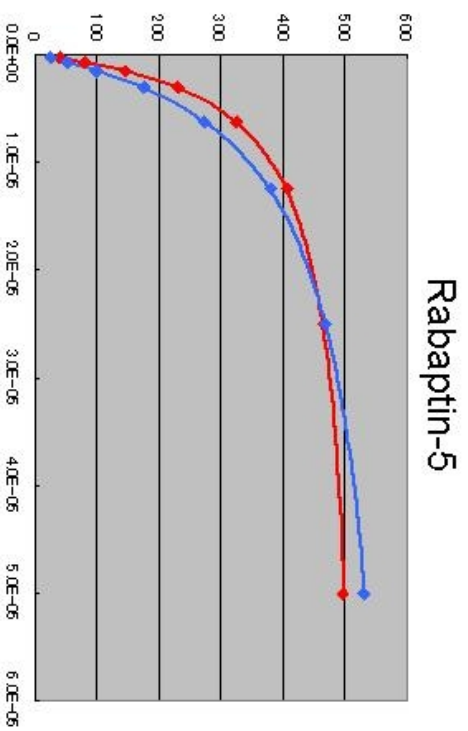
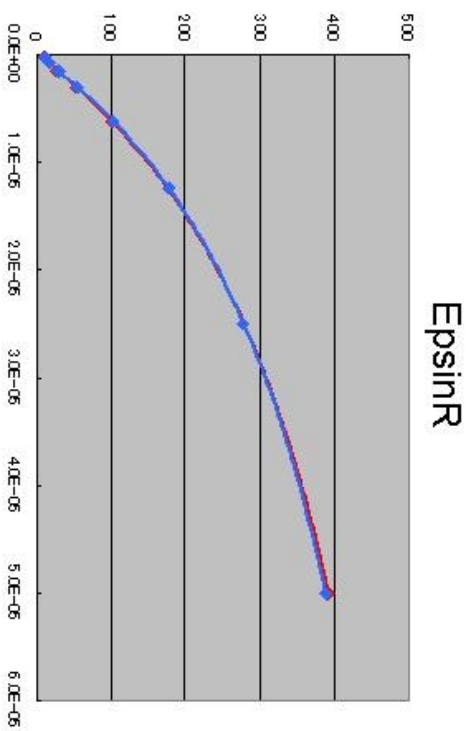
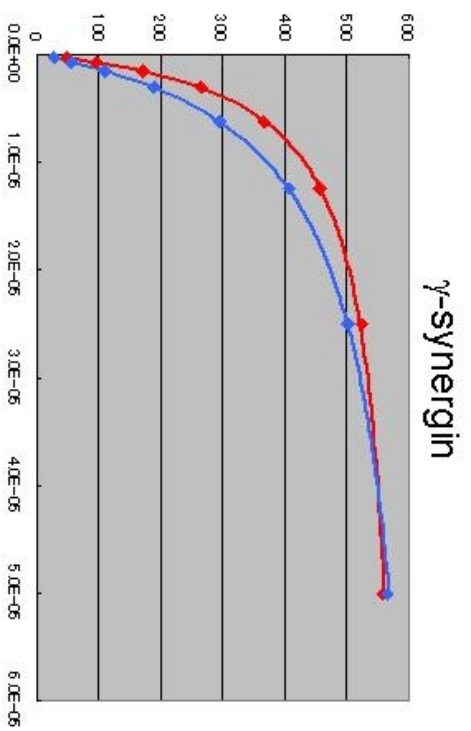


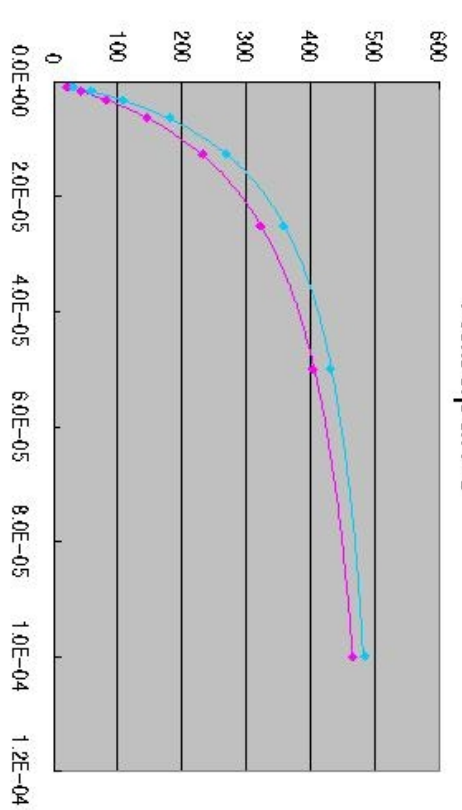
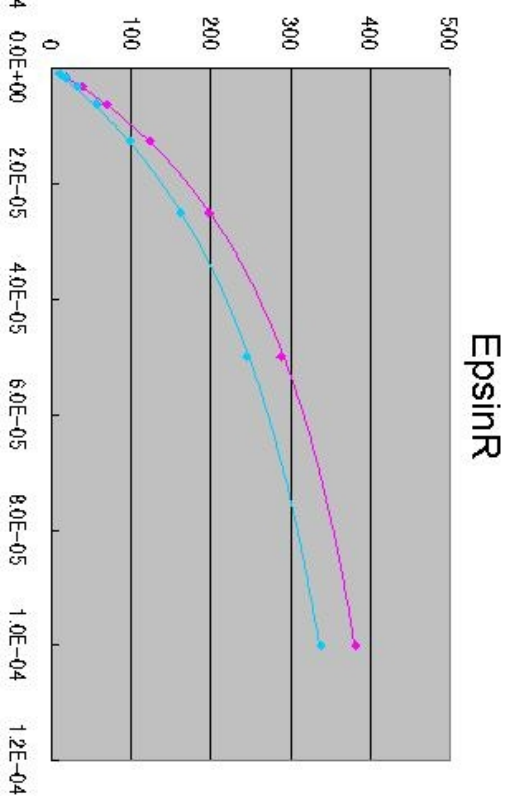
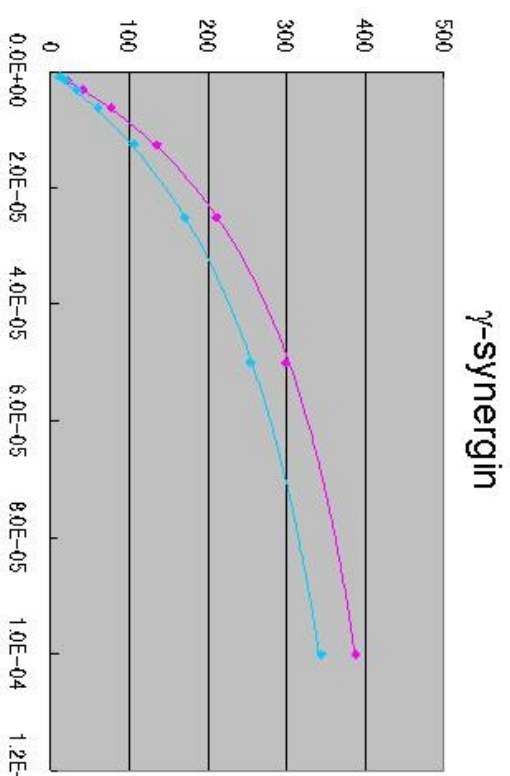
図 4-9 表面プラズモン共鳴 (SPR) のセンサーグラムの一例

A



Vertical axis: Resonance Unit (RU)  
horizontal axis: Concentration of  $\gamma$ 1-ear (M)

B



Vertical axis: Resonance Unit (RU)  
horizontal axis: Concentration of GAE (M)

図 4-10 表面プラズモン共鳴 (SPR) による $\gamma 1$ -ear ドメインおよび GAE ドメインと種々のアクセサリー蛋白質ペプチドとの親和性 (1) (続き)

(A)  $\gamma 1$ -ear ドメインとそれぞれのペプチドとの親和性をプロットした図。赤色が野生型の、青色が S764P 変異体を示している。

(B) GAE ドメインとそれぞれのペプチドとの親和性をプロットした図。ピンクが野生型の、シアンが P574S 変異体を示している。

### 4.3. GAE 変異体/p56 複合体の結晶構造

4.2 節では $\gamma$ 1-ear ドメインの S764P 変異により Phe (+6) を持つペプチドへの親和性の低下が引き起こされることを示した。しかし、GAE ドメインの P574S 変異では Phe (+6) を持つペプチドへの有意な親和性の変化はみられなかった。そこで次は、GAE ドメイン P574S 変異体の立体構造の決定を試みると共に、GAE ドメインとアクセサリータンパク質の相互作用についてより詳細な検討を行うために、知見の豊富な p56 との複合体の立体構造決定を試みた。野生型の GAE ドメインと p56 ペプチドとの複合体構造は既に決定されている (Collins *et al.*, 2003) ので、GAE ドメインの P574S 変異体と p56 ペプチドとの複合体の立体構造を決定し野生型との比較を行った。

GAE ドメインの S574P 変異体と p56 ペプチドとの複合体の結晶は、293K で 14 日間の結晶成長により三辺がそれぞれ 0.1 mm 程度の大きさのものを得ることができた (図 3-3B)。この結晶を用いて PF-AR の NW12A ビームラインにて 1.0000 Å の波長で X 線回折実験を行ったところ、最大分解能 1.90 Å までの回折点を与えるデータセットの収集をすることができた (表 3-2)。この回折データを用いて、GGA1 の GAE ドメインと p56 ペプチドとの複合体の構造 (PDB 番号 1OM9) (Collins *et al.*, 2003) をモデル分子とする分子置換法によって構造決定を行った。解かれた結晶構造は  $P2_1$  の空間群を持ち、非対称単位に 4 つの複合体分子 (GAE ドメインの S574P 変異体と p56 ペプチド) を含んでいた。

GAE ドメインの S574P 変異体と p56 ペプチドの複合体の結晶構造のうち、GAE ドメイン部

分は N 末端と C 末端付近に  $\alpha$ ヘリックスを持ち、2つの  $\beta$ シート ( $\beta$ ストランド  $\beta$ 1-2-3-5-6 と  $\beta$ 4-7-8) により形成される  $\beta$ サンドイッチ構造を形成していた。(図 4-11) これは、今回分子置換のモデルに用いた野生型の GAE ドメインと同様であった。非対称単位中に存在する 4 つの複合体分子のうち 2 つにおいて、GAE ドメインに含まれる全アミノ酸残基の構造を決定することができた (図 4-12)。残りの 2 つについては N 末端と C 末端共部のそれぞれ 3 残基の部分を除く 501 から 636 までのアミノ酸残基の構造を決定することができた (図 4-12)。p56 ペプチドに関しては 4 つの全てにおいて -2 から +6 までのアミノ酸残基の電子密度が確認でき、構造を決定することが出来た。

比較のために GAE ドメインの野生型と P574S 変異体の 4 つの立体構造をそれぞれ重ね合わせたところ、図に示すように  $\beta$ 2-3、 $\beta$ 5-6 の間の長い 2 つのループで大きな R.M.S.D. の値の変化が観測された (図 4-13、4-14、4-15)。この領域はペプチドとの相互作用には直接関係のない領域である。認識部位付近の  $\beta$ 6-7 の間のループ、および  $\beta$ 4 周辺では R.M.S.D. の値は 0.3Å 付近と低い値になっていた。P574S 変異体の単位格子中の 4 分子における、主鎖の  $C\alpha$  原子の R.M.S.D. の値は 0.64 から 0.73Å の範囲であった。

以上の様に、GAE ドメインの S574P 変異体と p56 ペプチドの複合体において、GAE ドメインの野生型と大きく異なる立体構造やペプチド認識機構の違いは観察されなかった。(図 4-16) このことから、GAE ドメインには本研究で提唱している Pro/Phe(+6) の組み合わせが原因の立体障害によるアクセサリ蛋白質の選択特異性以外の制御機構が存在していることが示唆された。



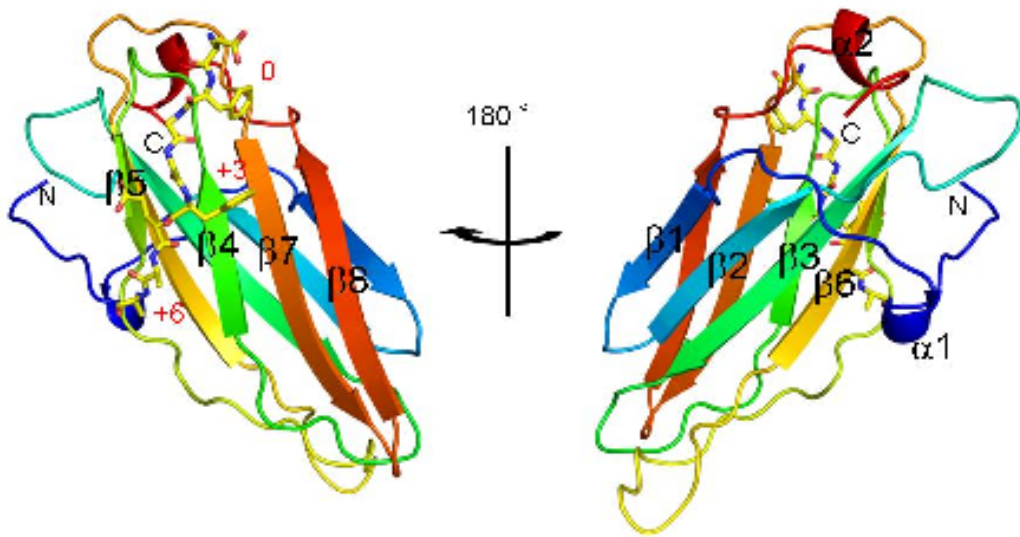


図 4-11 GAE ドメイン P574S 変異体と p56 ペプチドとの複合体の立体構造

GAE ドメイン P574S 変異体と p56 ペプチドとの立体構造を、GAE ドメインの部分をリボン図で、p56 ペプチドをスティックモデルで描いた。GAE ドメイン部分は、N 末端から C 末端までを赤から青のグラデーションで、ペプチドは炭素を黄、酸素を赤、窒素を青の色で示した。

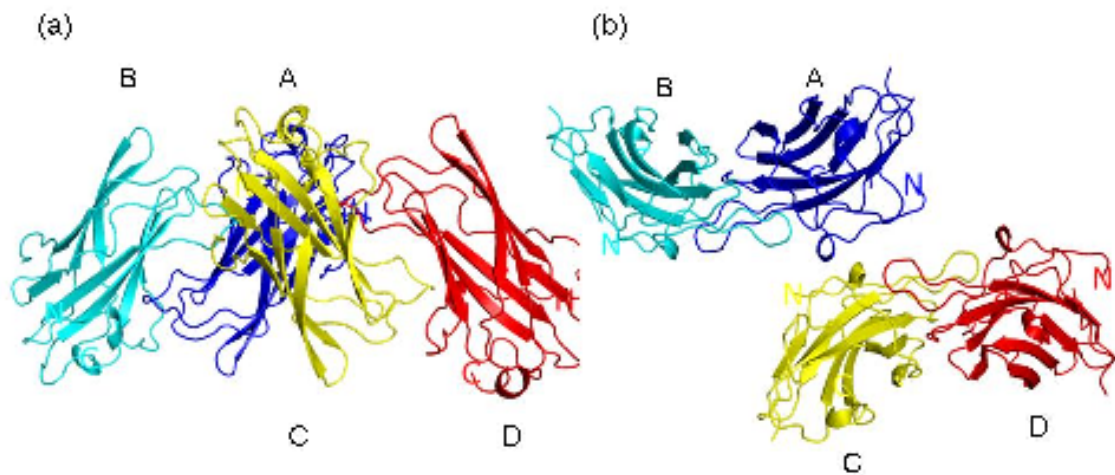


図 4-12 GAE ドメイン P574S 変異体と p56 ペプチドとの複合体の非対称分子

GAE ドメイン P574S 変異体と p56 ペプチドとの立体構造を、リボン図で描いた。4 つの非対称分子を青色 (A 分子)、シアン (B 分子)、黄色 (C 分子)、赤色 (D 分子) で示した。パネル (a) を垂直上方向から描いたものがパネル (b)。

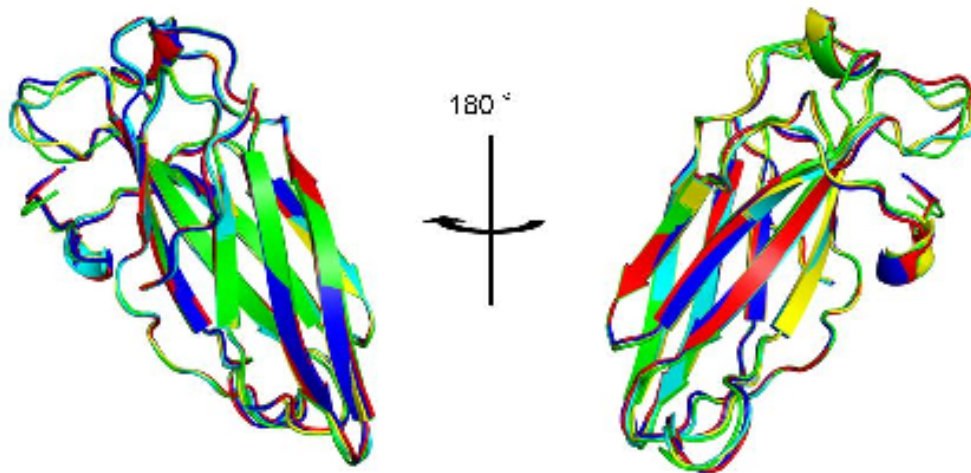


図 4-13 GAE ドメイン P574S 変異体と p56 ペプチドとの立体構造の非対称分子同士の重ねあわせ

GAEドメインとp56ペプチドとの立体構造を、GAEドメイン部分をリボン図で、p56ペプチド部分をスティックモデルで描いた。野生型(PDB: 1OM9)にP574S変異体の4つの非対称分子のC $\alpha$ 原子で重ねあわせを行った。野生型は黄色で、P574S変異体は青色(A分子)、シアン(B分子)、黄色(C分子)、赤色(D分子)の色で示した。

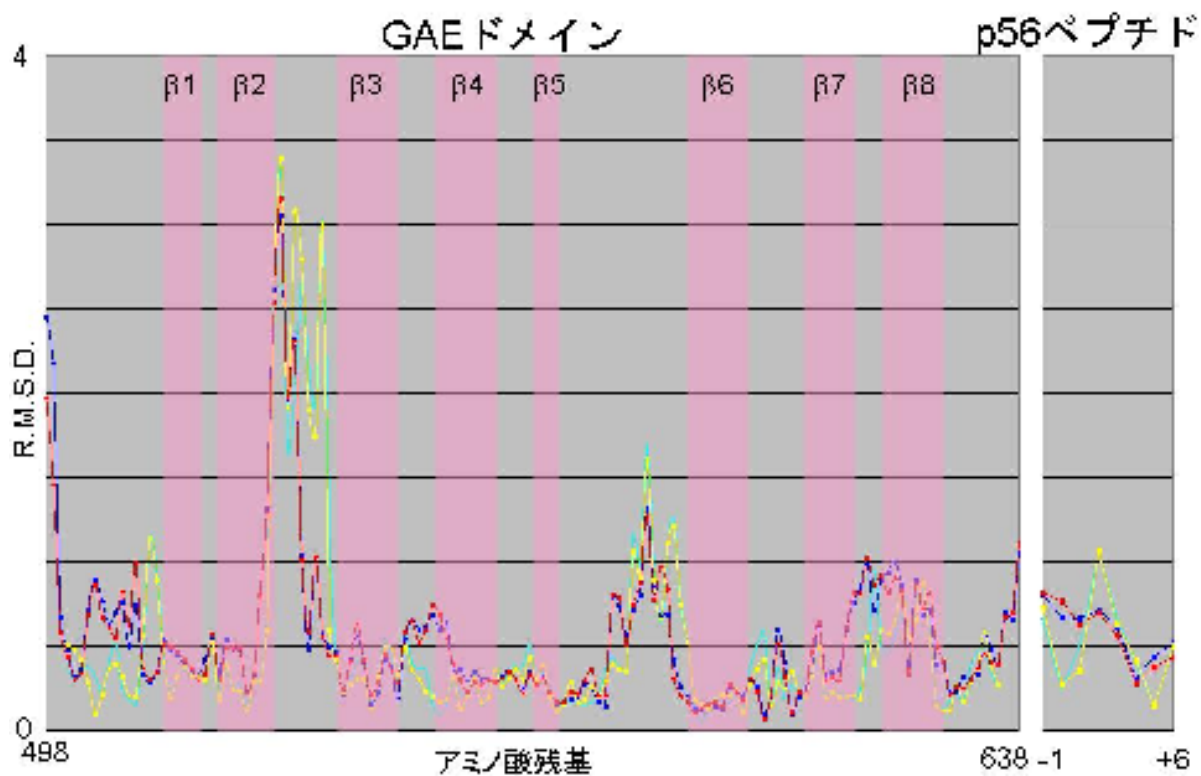


図 4-14 GAE ドメイン P574S 変異体と p56 ペプチドの複合体と野生型 GAE ドメインの立体構造の比較 (1)

GAE ドメイン P574S 変異体と p56 ペプチドとの複合体の立体構造と野生型の  $C\alpha$  原子で重ねあわせを行った際のそれぞれの残基での RMSD の値を青色 (A 分子)、シアン (B 分子)、黄色 (C 分子)、赤色 (D 分子) で示した。

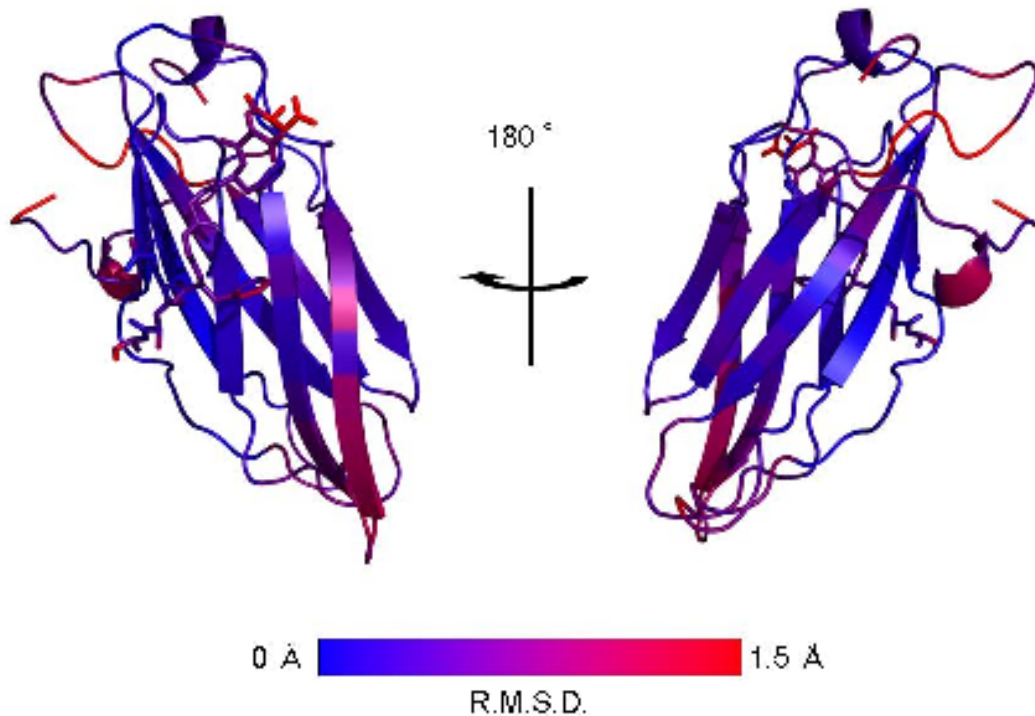


図 4-15 GAE ドメイン P574S 変異体と p56 ペプチドの複合体と野生型 GAE ドメインの立体構造の比較 (2)

GAE ドメイン P574S 変異体と p56 ペプチドとの複合体の立体構造(A 分子)を、GAE ドメイン部分をリボン図で、p56 ペプチド部分をスティックモデルで描いた。このモデルに、リボン図では主鎖の各原子の、スティックモデルでは全ての原子の、野生型との全ての原子で重ね合わせた際の R.M.S.D.の値に応じて、0 Å(青)から 1.5 Å(赤)での色で示した。

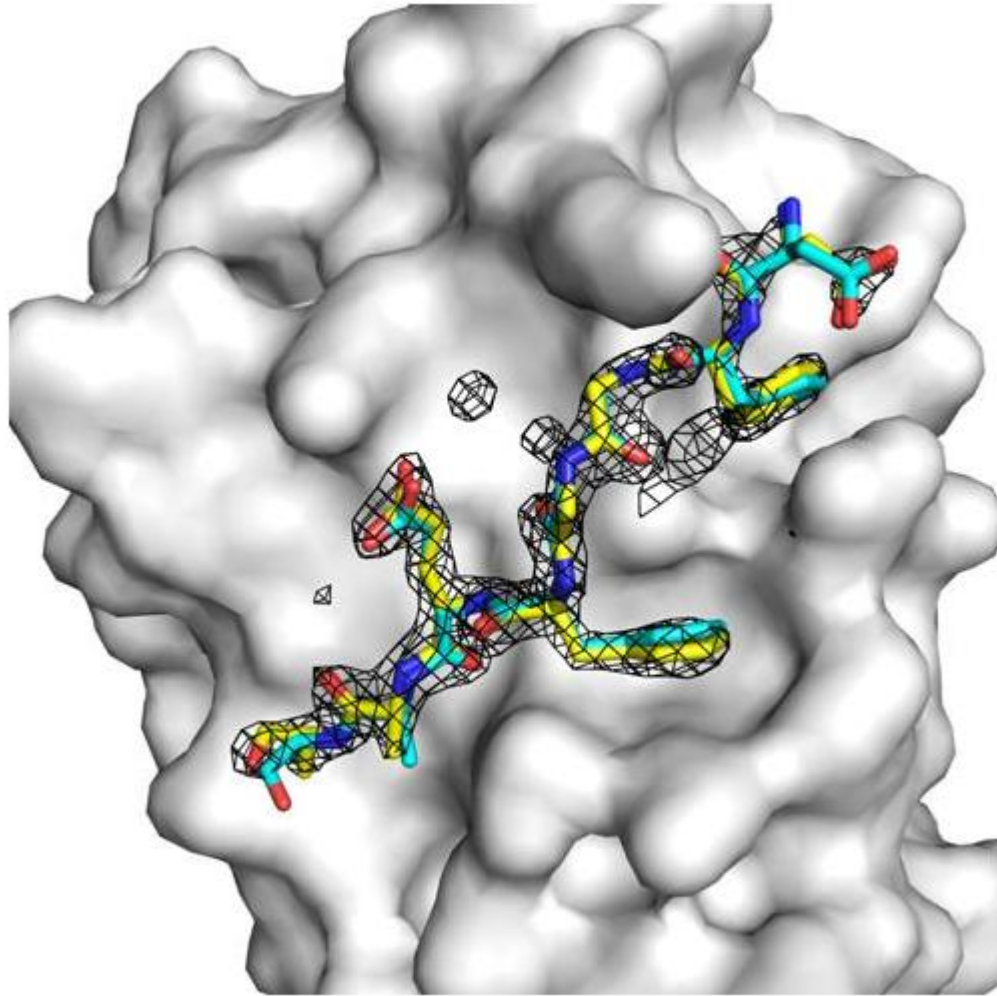


図 4-16 GAE ドメイン P574S 変異体と p56 ペプチドとの複合体でのペプチド部分の電子密度図

p56 ペプチド部分の  $1.8 \sigma$  の電子密度図をメッシュで、ペプチドをスティックモデルで、GAE ドメイン P574S 変異体を表面図で描いた。p56 ペプチドの野生型の分子モデルは、P574S 変異体の分子モデルの  $C\alpha$  原子で重ねあわせを行った。ペプチドは、野生型の炭素をシアン、P574S 変異体の炭素を黄、酸素を赤、窒素を青の色で示した。

#### 4.4. p56 の+6 位置の変異による親和性の変化

4.3 節で、立体構造および p56 の認識機構が、野生型と S574P 変異体で差がないことが分かった GAE ドメインについて、p56 ペプチドとの親和性について詳細に解析を行った。p56 ペプチドは+6 の位置が Phe ではなく Ala である。そこで、この Ala (+6) を Phe に置換した変異を導入し、GAE ドメインの野生型および変異体 (S 764P) との親和性を測定した (図 4-17)。比較のために、 $\gamma$ 1-ear ドメインの野生型および変異体 (P 574S) についても測定を行った。それらの結果を表 4-3 にまとめた。

+6 の位置が Ala である野生型の p56 ペプチドでは、4.2 節での Rabaptin-5 の結果と同様に  $\gamma$ 1-ear ドメイン及び GAE ドメイン共に変異の導入による親和性の変化は見られなかった ( $\gamma$ 1-ear ドメインでは 4.0  $\mu$ M と 3.2  $\mu$ M、GAE ドメインでは 5.2  $\mu$ M と 4.9  $\mu$ M)。+6 の位置に Phe の変異を導入した p56 ペプチドを用いた場合、 $\gamma$ 1-ear の野生型では親和性が増加した (4.0  $\mu$ M から 2.2  $\mu$ M)。これは、変異の導入で **FxxFxxF** (**FGGF****FEAF**) のモチーフが形成されることにより、 $\gamma$ 1-ear ドメインが **FGGF** と **FEAF** の二カ所で認識できるようになったことで親和性が増加したと考えることができる。さらに、Phe (+6) を認識することにより親和性が増加したとも考えることができる。また GAE ドメインの野生型では、p56 ペプチドへの変異の導入により親和性が 6 倍程度低下している (5.2  $\mu$ M から 29.6  $\mu$ M)。これは本研究の仮説通りであり、Pro574 と Phe (+6) による Pro/Phe(+6)立体障害モデルによる親和性の低下と考えられる。

さらに、+6 の位置に Phe の変異を導入した p56 ペプチドを用いた場合、 $\gamma$ 1-ear ドメインに

GAE 型の S764P 変異を導入することで親和性が 1.5 倍程度低下した (2.2  $\mu\text{M}$  から 3.5  $\mu\text{M}$ )。

また、GAE ドメインに $\gamma$ 1-ear 型の P574S 変異体を導入することで、親和性が 3 倍程度上昇した (29.6  $\mu\text{M}$  から 10.4  $\mu\text{M}$ )。これらは本研究の仮説通りに、 $\gamma$ 1-ear ドメインでは S764P 変異によりペプチドの Phe(+6) と立体障害を引き起こし親和性が低下し、GAE ドメインでは P574S 変異によりペプチド Phe (+6) との立体障害が解消され親和性が増加したと考えられる。

以上のことから、GAE ドメインにも $\gamma$ 1-ear ドメインと同様の Pro/Phe(+6)の組み合わせが原因の立体障害によるアクセサリ蛋白質の選択特異性が存在していることが明らかになった。



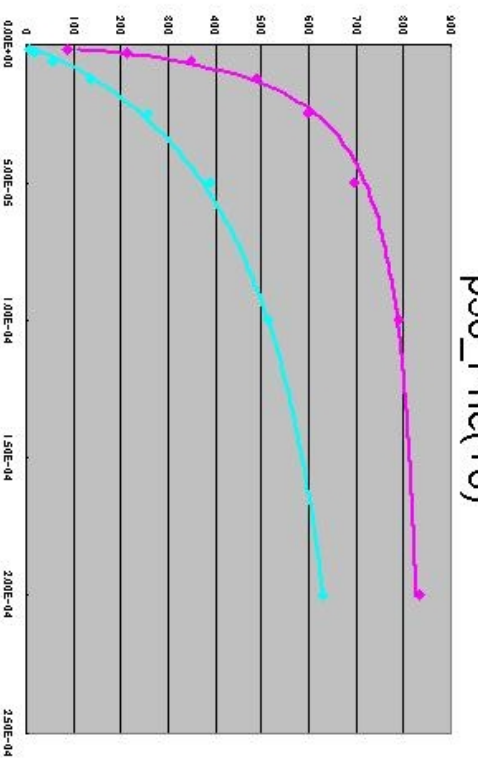
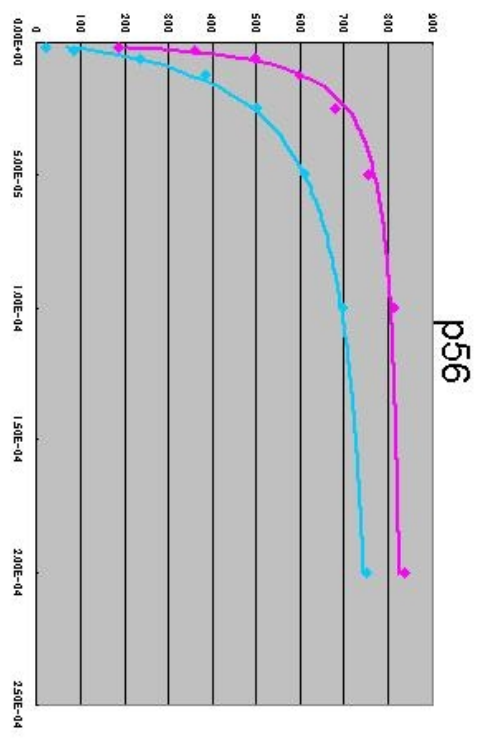
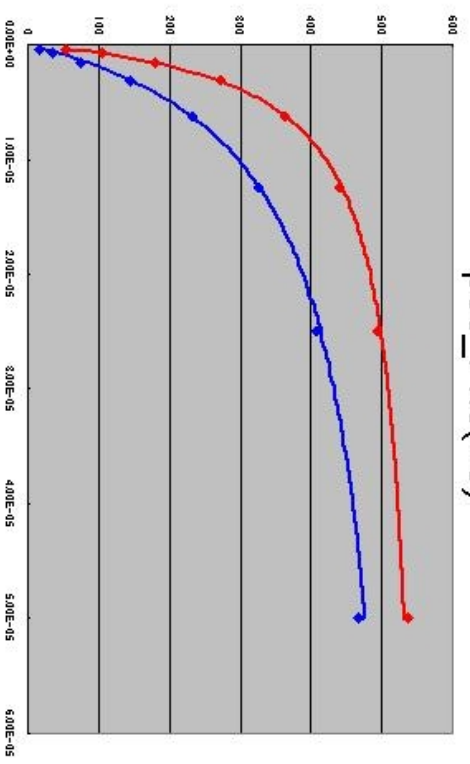
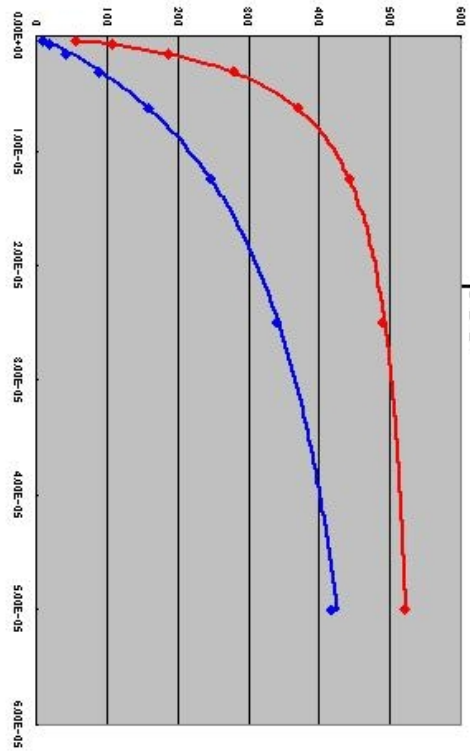
表 4-3 ear ドメイン蛋白質と p56 ペプチドとの SPR による親和性 ( $K_d$ )

			Ala(+6) p56	Phe(+6) p56(+6F)
Ser764	$\gamma$ 1-ear	Wildtype	4.0 $\pm$ 0.2	2.2 $\pm$ 0.1
Pro764		S764P	3.2 $\pm$ 0.2	3.5 $\pm$ 0.2
Pro574	GAE	Wildtype	5.2 $\pm$ 0.3	29.6 $\pm$ 1.4
Ser574		P574S	4.9 $\pm$ 0.3	10.4 $\pm$ 0.6

( $\mu$ M)

GST 融合ペプチドをセンサーチップに固定化し、ear ドメイン蛋白質を流路に流して SPR の測定を行った。それぞれのリガンド及びアナライトの組合せで、8 段階の希段階積を行った。得られた 8 カ所の測定点の濃度及び平衡値 ( $R_{eq}$ ) から解離定数  $K_d$  を算出した。この測定を 3 回行い、解離定数  $K_d$  の平均値及び標準偏差を算出した。

C



Vertical axis: Resonance Unit (RU), horizontal axis: Concentration of  $\gamma$ 1-eat(upper) or GAE(lower) (M)

図 4-17 表面プラズモン共鳴 (SPR) による $\gamma$ 1-ear ドメインおよび GAE ドメインと種々のアクセサリー蛋白質ペプチドとの親和性 (2) (続き)

(C)  $\gamma$ 1-ear ドメインと GAE ドメインの p56 ペプチドとその Phe(+6) 変異体との親和性をプロットした図。赤色が野生型の  $\gamma$ 1-ear ドメイン、青色が S764P 変異体、ピンクが野生型の GAE ドメイン、シアンが P574S 変異体を示している。

## 5. Discussion

### 5.1. $\gamma$ 1-ear ドメインのアクセサリ-蛋白質認識の分子機構

$\gamma$ 1-ear ドメインと GAE ドメインには高いアミノ酸の配列相同性や機能の類似性があるにもかかわらず、アクセサリ-蛋白質に対する親和性が異なっている (Hirst *et al.*, 2000, Hirst *et al.*, 2003, Lui *et al.*, 2003)。GAE ドメインと比較すると、 $\gamma$ 1-ear ドメインは  $\gamma$ -synergic ペプチドや EpsinR ペプチドに *in vitro* の実験系において特異的に高い親和性を持つことが以前までの研究で示されている (Inoue, 2004; Yamada, 2004)。そして、これら  $\gamma$ -synergic ペプチドや EpsinR ペプチドのアミノ酸配列を比較してみたところ、どちらも+6 の位置に Phe を持つことが判明した。そこで、主にこの位置に着目し、 $\gamma$ 1-ear ドメインと GAE ドメインの親和性の違いと立体構造の関係について行った実験に基づいて考察を行う。

$\gamma$ 1-ear ドメインの GAE 型 S764P 変異体と野生型の  $\gamma$ -synergic ペプチドとの複合体の立体構造を比較すると、 $\gamma$ 1-ear ドメインは蛋白質全体としては大きな構造変化は見られなかったが、結合している  $\gamma$ -synergic ペプチドの Phe (+6) 付近では大きな変化が観測できた。そして、SPR による測定では、S764P 変異の導入により  $\gamma$ -synergic ペプチドへの親和性が低下する事が測定された。

この S764P 変異の  $\gamma$ 1-ear ドメインの  $\gamma$ -synergic への親和性の低下は次のようなモデルで説明することが出来る。決定した立体構造から示されるように、 $\gamma$ -synergic ペプチドの Phe (+6)

は、 $\gamma$ 1-ear ドメインに導入した GAE 型の S764P 変異の Pro764 残基に接近出来なくなる。すなわち、 $\gamma$ -synergin ペプチドと  $\gamma$ 1-ear ドメインとの距離が広がることにより、 $\gamma$ -synergin ペプチドの Phe (+6) の主鎖の窒素原子と水分子の間に形成されていた水素結合、その水分子と  $\gamma$ 1-ear ドメインの Phe750 の主鎖の酸素原子および Gln780 の側鎖の窒素原子の間に形成されていた水素結合が失われた (図 4-8)。野生型では存在していたこれらの水素結合が消失することにより、 $\gamma$ -synergin ペプチドの親和性が低下したと考えられる。

このモデルは 複合体の X線構造解析における  $\gamma$ -synergin ペプチドの温度因子の違いもよく説明する。野生型  $\gamma$ 1-ear ドメインでは  $\gamma$ -synergin ペプチドの Phe (+6) 付近の温度因子はペプチド部分の平均値と比較すると低い値であったが、S764P 変異体では Phe (+6) 付近の温度因子の値が特異的に増加し、ペプチド部分の平均値に近い値まで増加している (図 4-7)。これは前述の  $\gamma$ -synergin ペプチドと  $\gamma$ 1-ear ドメインとの水素結合が消失したことにより、ペプチドの Phe (+6) が水分子を介して  $\gamma$ 1-ear に水素結合で固定されていたのが外れ、Phe (+6) やその周辺部分の揺らぎが大きくなったと考えればよく説明出来る。

さらに、 $\gamma$ 1-ear ドメインについて、部位特異的変異のみであるにもかかわらず、GAE 型 S764P 変異体の結晶構造の分解能が野生型と比較すると低下していることもこのモデルで説明できる。今回用いた  $\gamma$ -synergin ペプチド融合  $\gamma$ 1-ear ドメインは、 $\gamma$ 1-ear の N 末端にリンカー (SGGGS) を介して  $\gamma$ -synergin ペプチドの C 末端と融合している。結晶中で、この  $\gamma$ -synergin ペプチドが隣接する  $\gamma$ 1-ear ドメインの対称分子に結合することにより、この  $\gamma$ 1-ear ドメインと

$\gamma$ -synergin ペプチド結合を結晶のパッキングに用いて、結晶の質（分解能）を向上させている。

S764P の変異導入により  $\gamma$ -synergin への結合力が低下し、結晶パッキングが保持しにくくなったことにより、分解能が低下していると考えられる。さらに  $\gamma$ -synergin ペプチドの Phe (+6) 付近での大きな変化により、安定した立体構造を形成しにくいと思われるリンカー部分に揺らぎが生じ、野生型では観測できていたリンカー部分の電子密度が観測できなくなったと考えることができる。

また、p56 ペプチドに Phe (+6) の変異を導入することにより、野生型の GAE ドメインとの親和性が低下し、 $\gamma$ 1-ear 型の P574S 変異体では親和性が増加したことから、本研究で提唱している Pro/Phe(+6)立体障害モデルは GAE ドメインにも当てはまると推測される。

このように  $\gamma$ 1-ear ドメインによるアクセサリ蛋白質の認識特異性は、 $\gamma$ 1-ear ドメインの 764 残基目が、GAE ドメインの Pro574 とは異なり Ser764 であることにより、アクセサリ蛋白質の+6 の位置の Phe とより強い相互作用をすることにより、また GAE ドメインにおいてはその逆の機構で親和性が弱められているという分子機構が明らかになった。

## 5.2. GAE ドメインのアクセサリ蛋白質認識の分子機構

GAE ドメインでは、P574S 変異の導入により Phe (+6) を持つ  $\gamma$ -synergin や EpsinR などのこれらペプチドへの親和性の増加は観測されなかったことと、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の立体構造が野生型とほぼ同じであったことから、5.1

節で述べた Pro/Phe(+6)立体障害モデルによるアクセサリ蛋白質の選択機構以外の未知の分子機構の存在が示唆される。

5.1 節の分子機構に従うと、GAE ドメインの S574P 変異の導入より、Phe (+6) を持つ  $\gamma$ -synergin や EpsinR などに対する立体障害による親和性の低下が解決されることで、これらペプチドへの親和性の増加が期待されるが、実際の SPR の測定では観測されなかった。しかし、p56 ペプチドに Phe (+6) の変異を導入することで、GAE ドメインの Pro574 との立体障害を引き起こし親和性が低下する事を観察することができた。また、この Pro と Phe (+6) による立体障害は  $\gamma$ 1-ear 型の P574S 変異の導入により、一定の回復をすることも観察することができた。

これらのことから、5.1 節で述べた Pro/Phe(+6)立体障害モデルによるアクセサリ蛋白質の選択特異性は GAE ドメインにも存在しているが、その分子機構よりも優先あるいは強力に機能している別の認識機構が存在している可能性を見出すことができた。

### 5.3. AP 複合体及び GGA 蛋白質とアクセサリ蛋白質

5.1 節で述べた Pro/Phe(+6)立体障害モデルによるアクセサリ蛋白質の選択特異性は、 $\gamma$ 1-ear ドメインや GAE ドメインおよびアクセサリ蛋白質の中のたった一つのアミノ酸残基の Pro と Ser の違いによって制御されている。それに加えて、5.2 節で述べた GAE ドメインにおける未知のアクセサリ蛋白質認識機構も、 $\gamma$ 1-ear ドメインと GAE ドメインのアクセサリ蛋白質の

選択特異性に関与している可能性が示された。現在までに得られている知見では  $\gamma$ 1-ear ドメインおよび GAE ドメインの立体構造に大きな差はなく、それらを比較してもこの未知の認識機構がどのようにしてなされているかは現状では不明である。この GAE ドメインに存在している未知の認識機構も大きな構造の違いによるものではなく、 $\gamma$ 1-ear ドメインと GAE ドメインのわずかな構造の違いやアクセサリ蛋白質の持つ認識モチーフのわずかな配列の違いから生じているのではないかと考えられる。

5.1 節で述べた+6 位置のアミノ酸残基の立体障害による分子機構だけでは、 $\gamma$ 1-ear ドメインと GAE ドメインの強いアクセサリ蛋白質の選択特異性を説明するには不十分である可能性がある。しかし、本研究でも触れている GAE ドメインの持っている未知の認識機構や、未だ発見されていない他の認識機構の積み重ねによって、その選択特異性が達成されている可能性がある。そして、これら複数の弱い認識機構が存在することで高い冗長性を確保し、恒常的で正確な細胞内輸送が機能していると考えられることができる。

AP-1 複合体に選択的に結合する  $\gamma$ -synerglin は Aftiphilin 及び p200 と複合体を形成し、内皮細胞において分泌物質を蓄積する Weibel-Palade 体の形成に強く関与することが示唆されている (Lui-Roberts *et al.*, 2008)。また、同様に GGA 蛋白質に対して選択的に結合する p56 は、その結合が阻害されることによって GGA 蛋白質を含む輸送小胞の細胞内での運動性が著しく低下することが報告されている (Mardones *et al.*, 2007)。これらのことは、結合するアクセサ



リー蛋白質により、AP-1 複合体や GGA 蛋白質が形成するクラスリン被覆小胞の輸送方向や局在が制御されていることを強く示唆するものである。

本研究では、AP-1 複合体と GGA 蛋白質の中で、アクセサリー蛋白質の取り込みに関与する  $\gamma$ 1-ear ドメイン及び GAE ドメインについて、それらが高い配列相同性や非常に似た立体構造をもつにもかかわらず、異なるアクセサリー蛋白質を選別する機構の一端を明らかにすることができた。このことから、複数のわずかなアミノ酸配列や立体構造の変化からアクセサリー蛋白質への選択特異性が生じ、それによって AP-1 複合体や GGA が形成するクラスリン被覆小胞の間で取り込まれるアクセサリー蛋白質に違いが生じることが推測される。アクセサリー蛋白質はそれ自身が機能したり、さらにさまざまな蛋白質と結合することによって、今回明らかにした分子機構によって、結合するアダプター蛋白質に応じたクラスリン被覆小胞の振る舞いを制御すると考えられる。

## 6. References

- Austin, C., Hinners, I. and Tooze, S. A. (2000). Direct and GTP-dependent interaction of ADP-ribosylation factor 1 with clathrin adaptor protein AP-1 on immature secretory granules. *J. Biol. Chem.* **275**, 21862-21869.
- Barlowe, C., Orci, L., Yeung, T., Hosobuchi, M., Hamamoto, S., Salama, N., Rexach, M.F., Ravazzola, M., Amherdt, M., and Schekman, R. (1994). COPII: a membrane coat formed by Sec proteins that drive vesicle budding from the endoplasmic reticulum. *Cell* **77**, 895-907.
- Boman, A. L., Zhang, C., Zhu, X., Kahn, R. A. (2000). A family of ADP-ribosylation factor effectors that can alter membrane transport through the trans-Golgi. *Mol. Biol. Cell* **11**, 1241-1255.
- Bonifacino, J.S. and Glick, B.S. (2004). The mechanism of vesicle budding and fusion. *Cell* **116**, 153-166.
- Brunger, A.T., Adams, P.D., Clore, G.M., Delano, W.L., Gros, P., Grosse-Kunstleve, R.W., Jiang, J.-S., Kuszewski, J., Nilges, M., Pannu, N.S., Read, R.J., Rice, L.M., Simonson, T. and Warren, G.L. (1998). Crystallography and NMR system (CNS): A new software system for macromolecular structure determination. *Acta Crystallogr.* **D54**, 905-921.
- Collins, B.M., Praefcke, G.J.K., Robinson, M.S. & Owen, D.J. (2003). Structural basis for binding of accessory proteins by the appendage domain of GGAs. *Nat. Struct. Biol.* **10**, 599-606.

- Collaborative Computational Project, Number 4. (1994). The CCP4 suite: programs for protein crystallography. *Acta Crystallogr.* **D50**, 760-763.
- DeLano, W. L. (2008). The PyMOL Molecular Graphics System. DeLano Scientific LLC, Palo Alto, CA, USA. <http://www.pymol.org/>
- Doray, B. and Kornfeld, S. (2001).  $\gamma$ -Subunit of the AP-1 adaptor complex binds clathrin: implications for cooperative binding in coated vesicle assembly. *Mol. Biol. Cell* **12**, 1925-1935.
- Emsley, P. and Cowtan, K. (2004). Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr.* **D60**, 2126-2132.
- Fölsch, H., Ohno, H., Bonifacino, J. S., Mellman, I. (1999). A novel clathrin adaptor complex mediates basolateral targeting in polarized epithelial cells. *Cell* **99**, 189-98.
- Gallusser, A. and Kirchhausen, T. (1993). The beta 1 and beta 2 subunits of the AP complexes are the clathrin coat assembly components. *EMBO J.* **12**, 5237-5244.
- Hiraki, M., Kato, R., Nagai, M., Satoh, T., Hirano, S., Ihara, K., Kudo, N., Nagae, M., Kobayashi, M., Inoue, M., Uejima, T., Oda, S., Chavas, L. M., Akutsu, M., Yamada, Y., Kawasaki, M., Matsugaki, N., Igarashi, N., Suzuki, M., Wakatsuki, S. (2006). Development of an automated large-scale protein-crystallization and monitoring system for high-throughput protein-structure analyses. *Acta Crystallogr.* **D62**, 1058-1065.

Hirst, J., Robinson, M. S. (1998). Clathrin and adaptors. *Biochim Biophys Acta*. **14**, 173-93.

Hirst, J., Lui, W. W., Bright, N. A., Totty, N., Seaman, M. N., Robinson, M. S. (2000) A family of proteins with gamma-adaptin and VHS domains that facilitate trafficking between the trans-Golgi network and the vacuole/lysosome. *J. Cell Biol.* **149**, 67-80.

Hirst, J., Brorner, G. H., Harbour, M., Robinson, M. S. (2005) The aFTiophilin/p200/gamma-synerglin complex. *Mol. Biol. Cell*. **16**, 2554-2565.

Inoue, M. (2004). Structural and Functional Analysis of Antra-cellular Transpot Between Golgi Apparatus an Endosome/Lysosome System Usin Synchrotron Radiation. 博士学位論文

Kirchhausen, T. (2000). Three ways to make a vesicle. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **1**, 187-198.

Lippé, R., Miaczynska, M., Rybin, V., Runge, A., Zerial, M. (2001). Functional synergy between Rab5 effector Rabaptin-5 and exchange factor Rabex-5 when physically associated in a complex. *Mol. Biol. Cell* **12**, 2219-2228.

Letourneur, F., Gaynor, E.C., Hennecke, S., Demolliere, C., Duden, R., Emr, S.D., Riezman, H. and Cosson, P. (1994). Coatomer is essential for retrieval of dilysine-tagged proteins to the endoplasmic reticulum. *Cell* **79**, 1199–1207.

Lui, W.W.Y., Collins, B.M., Hirst, J., Motley, A., Millar, C., Schu, P., Owen, D. and Robinson, M.S. (2003). Binding partners for the COOH-terminal appendage domains of the GGAs and  $\gamma$ -adaptin. *Mol. Biol. Cell* **14**, 2385-2398.

- Lui-Roberts, W. W., Ferraro, F., Nightingale, T. D., Cutler, D. F. (2005). Aftiphilin and gamma-synerglin are required for secretagogue sensitivity of Weibel-Palade bodies in endothelial cells. *Mol. Biol. Cell* **19**, 5072-5081
- Mardones G.A., Burgos P.V., Brooks D.A., Parkinson-Lawrence E., Mattera R., Bonifacino J.S. (2007). The trans-Golgi network accessory protein p56 promotes long-range movement of GGA/clathrin-containing transport carriers and lysosomal enzyme sorting. *Mol. Biol. Cell* **18**. 3486-3501.
- Mattaj, I. W., Englmeier L. (1998). NUCLEOCYTOPLASMIC TRANSPORT: The Soluble Phase. *Annu. Rev. Biochem.* **67**. 265-306.
- Mattera R, Arighi CN, Lodge R, Zerial M, Bonifacino JS. (2003). Divalent interaction of the GGAs with the Rabaptin-5-Rabex-5 complex. *EMBO J.* **22**. 78-88
- Mullins, C., Bonifacino, J. S. (2001). Structural requirements for function of yeast GGAs in vacuolar protein sorting, alpha-factor maturation, and interactions with clathrin. *Mol. Cell Biol.* **21**, 7981-7994.
- Murshudov, G.N., Vagin, A.A. and Dodson, E.J. (1997). Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta Crystallogr.* **D53**, 240-255.
- Nogi, T., Shiba, Y., Kawasaki, M., Shiba, T., Matsugaki, N., Igarashi, N., Suzuki, M., Kato, R., Takatsu, H., Nakayama, K. and Wakatsuki, S. (2002). Structural basis for the accessory protein recruitment by the  $\gamma$ -adaptin ear domain. *Nat. Struct. Biol.* **9**, 527-531.

- Ohno, H. (2006). Physiological roles of clathrin adaptor AP complexes: lessons from mutant animals. *J. Biochem.* **139**, 943-948.
- Otinowisky, Z. and Minor, W. (1997). Processing of X-ray diffraction collected in oscillation mode. *Methods Enzymol.* **276**, 307-326.
- Storch, S. and Braulke, T. (2001). Multiple C-terminal motifs of the 46-kDa mannose 6-phosphate receptor tail contribute to efficient binding of medium chains of AP-2 and AP-3. *J. Biol. Chem.* **276**, 4298-4303.
- Page, L.J., Sowerby, P.J., Lui, W.W & Robinson, M.S.  $\gamma$ -synergin: an EH domain-containing protein that interacts with  $\gamma$ -adaptin. (1999). *J. Cell. Biol.* **146**, 993-1004.
- Poussu, A., Lohi, O., Lehto, V. P. (2000). Vear, a novel Golgi-associated protein with VHS and gamma-adaptin "ear" domains. *J. Biol. Chem.* **275**, 7176-83.
- Puertollano, R., Aguilar, R. C. & Gorshkova, I., Crouch, R. J. & Bonifacino, J. S. (2001). Sorting of mannose 6-phosphate receptors mediated by the GGAs. *Science* **292**, 1712-1716.
- Rodionov, D. G. and Bakke, O. (1998). Medium chains of adaptor complexes AP-1 and AP-2 recognize leucine-based sorting signals from the invariant chain. *J. Biol. Chem.* **273**, 6005-6008.
- Springer, S., Schekman, R. (1998). Nucleation of COPII Vesicular Coat Complex by

Endoplasmic Reticulum to Golgi Vesicle SNAREs. *Science* **281**, 698-700.

Storch, S. and Braulke, T. (2001). Multiple C-terminal motifs of the 46-kDa mannose 6-phosphate receptor tail contribute to efficient binding of medium chains of AP-2 and AP-3. *J. Biol. Chem.* **276**, 4298-4303.

Sugimoto, H., Sugahara, M., Fölsch, H., Koide, Y., Nakatsu, F., Tanaka, N., Nishimura, T., Furukawa, M., Mullins, C., Nakamura, N., Mellman, I., Ohno, H. (2002). Differential recognition of tyrosine-based basolateral signals by AP-1B subunit mu1B in polarized epithelial cells. *Mol. Biol. Cell* **13**, 2374-82.

Takatsu, H., Yoshino, K., Nakayama, K. (2000). Adaptor gamma ear homology domain conserved in gamma-adaptin and GGA proteins that interact with gamma-synergin. *Biochem Biophys Res Commun.* **271**, 719-725.

Takatsu H, Yoshino K, Toda K, Nakayama K. (2002). GGA proteins associate with Golgi membranes through interaction between their GGAH domains and ADP-ribosylation factors. *Biochem. J.* **365**, 369-378.

Vagin, A. and Teplyakov, A. (1997). MOLREP: an automated program for molecular replacement. *J. Appl. Crystallogr.* **30**, 1022-1025.

Yamada, Y. (2004). Structural Studies of the Protein-Protein Interactions Involved in Vesicular Transport and Autophagy by Synchrotron X-ray Crystallography. 博士学位論文

Yamada, Y., Inoue, M., Shiba, T., Kawasaki, M., Kato, R., Nakayama, K. and Wakatsuki, S.

(2005). *Acta Crystallogr.* **D61**, 731-736.



## Acknowledgements

本研究の過程において、懇切な御指導と御鞭撻、研究の機会を賜り、本論文をまとめるに際して、適切な御助言を頂いた、指導教官である若槻 壮市 教授に、心よりの感謝を申し上げます。

学位の審査において、様々な御助言と御指導を賜った、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 准教授に深謝申し上げます。

また、本研究の共同研究者である、京都大学大学院 薬学研究科 中山 和久 教授、及び、様々な実験を実施するにあたり、多分な御指導と御協力を頂いた、川崎 政人 助教、そして、高エネルギー加速器研究機構 構造生物研究センターの皆様に、お礼申し上げます。

そして、総合研究大学院大学にて学ぶ機縁、本研究を行う機会を賜り、研究の分野だけでなく様々な事について、御助言や御教示を頂いた、山田 悠介 助教に、心よりの感謝を申し上げます。

最後に、この大学院生活を理解し、支え続けてくれた家族に感謝します。本当にありがとうございました。