

学位論文題名

Solution structures and classification
of novel protein binding modules, the PB1 domain
and the PC motif-containing region

(新規タンパク質結合モジュール PB1ドメインと
PCモチーフ含有領域の溶液構造と分類)

学位論文内容の要旨

【序論】

近年、新規に見出された PB1 ドメインは、酵母から高等植物、ヒトに至る広い生物種の様々な細胞内シグナル伝達タンパク質に含まれる機能モジュールである。PB1 ドメインは、酸性残基に富んだ 28 残基からなる配列相同領域 (PC モチーフ) を認識する。しかし、その結合には、PC モチーフの前後の、有意な相同性が見られない領域を含む 80-100 残基の領域 (PC motif-containing region: PCCR) を必要とする。新規のタンパク質結合モジュールである PB1 ドメインと PCCR の特徴付けを立体構造に基づいて行うことは、細胞内シグナル伝達機構を理解する、あるいは応用する上で重要である。

我々のグループは、以前、出芽酵母の細胞極性の確立に必須な足場タンパク質 Bem1p に含まれる PB1 ドメインとその結合パートナーである Cdc24p (Cdc42p の GDP/GTP 交換因子) に含まれる PCCR の NMR 解析を行った。その結果、PB1 ドメインの立体構造を決定し、ユビキチン様のフォールド (基本構造) をとることを示したが、PCCR の立体構造決定には至らなかった。

本研究では、Cdc24p の PCCR の立体構造決定、および、ヒト好中球による活性酸素産生の活性化因子である p67^{phox} の PB1 ドメインと p40^{phox} の PCCR の複合体の NMR 解析を行った。

【出芽酵母細胞極性決定系 Cdc24p の PCCR (780-854) の立体構造決定】

コンストラクトは、以前同定された、Bem1p の PB1 ドメインとの結合能を有する領域 (780-854) を採用した。NMR 法を用いて立体構造を決定した。全体構造は、4 本の β ストランドからなる β シートと 2 本の α ヘリックスで構成されている。PC モチーフ部分は、 $\beta\beta\alpha$ の二次構造をとるコンパクトな立体構造をとり、PC モチーフ間で保存されているチロシンがその構造コアとなっている。また、フェニルアラニンが β シート上に覆い被さることとコンセンサス配列の DEDGD 部分がタイプ I + G1 β バルジという特有のターン構造を形成することによって β シートに歪みが生じている。そのため、ターンに位置するされた酸性残基が同一方向に提示されている。これらの酸性残基は Bem1p の PB1 ドメインとの相互作用に必須であることが以前示されている。

また、立体構造上相同性を有するタンパク質を検索した結果、結合パートナーである Bem1p の PB1 ドメインをはじめ、ユビキチン様のフォールドをもつタンパク質群と相同

性を有していた。PC モチーフに相当する領域は、上記フォールドにおいて多様性に富む領域であり、PCCR 特有の立体構造をとっている。また、上記フォールドにおいて、最初の β ストランドは最後の β ストランドと平行 β シートを形成するのが特徴であるが、最初の β ストランドに相当する領域は解析に用いたコンストラクトには含まれていなかった。

【出芽酵母細胞極性決定系 Cdc24p の PCCR (761-854) の立体構造決定】

天然の PCCR がユビキチン様のフォールドをとるか確かめるため、N 末端側を伸長したコンストラクト (761-854) を採用して立体構造決定を NMR 法にて行った。その結果、(761-854) では、(780-854) の最初と最後の β ストランドの間に N 末端側に伸ばした領域が割り込み、ユビキチン様のフォールドをとることが立体構造上示された。PC モチーフ部分の立体構造はほとんど変わらず、新たに伸長した配列は、相互作用部位である PC モチーフ部分を保持する裏打ち構造を強化していると考えられる。

Bem1p の PB1 ドメインとの結合様式を知るため、Cdc24p の PCCR のアミノ酸置換による結合能への影響を *in vitro* のプルダウン法で調べた。また、この結果とタンパク質表面の電荷分布や疎水性分布の相補性を考慮してそれぞれの結合面を予測した。

【ヒト好中球活性酸素産生系 p67^{phox} の PB1 ドメインと p40^{phox} の PCCR の複合体の立体構造解析】

それぞれの二次構造トポロジーを NOE に基づく水素核間距離情報と重水素交換実験に基づく水素結合情報から得た。ともにユビキチン様のフォールドをとるが、両者で二次構造、ループやターンの長さが異なる。p40^{phox} の PC モチーフ部分の骨格構造は Cdc24p とほとんど同じであることが示唆された。さらに、p40^{phox} はユビキチン様のフォールド外の C 末端側 10 残基程度が立体構造をとって、p67^{phox} と特異的な相互作用をしていることが示唆された。

【PB1 ドメインの分類】

PB1 ドメインと PCCR は全て同一のユビキチン様のフォールドをとっており、その一部の相同性の高い領域を PC モチーフと特別に呼んでいたことになる。立体構造に基づいてアミノ酸配列を並べたところ、全体で 10-20% の低い相同性ながら配列アラインメントをとることができた。保存されている疎水性残基のほとんどは二次構造に含まれており、これらの残基はユビキチン様のフォールドを形成するために必要であることを示している。以上のことから、PB1 ドメインと PCCR と呼んでいた二つのドメインを PB1 ドメインの名でまとめることにした。そのため、PB1 ドメインの機能は特定の PB1 ドメイン同士で異種二量体を形成することと言える。また、結合面に関して、Cdc24p のように PC モチーフ部分を用いるものと、Bem1p のように $\beta 1$ 、 $\beta 2$ 、 $\beta 5$ と $\alpha 1$ の C 末端側を用いるものがある。よって、PB1 ドメインは互いに異なる部位を用いて非対称的に異種二量体を形成すると言うことができ、Cdc24p のような結合面をもつ p40^{phox}、aPKC などをタイプ I、Bem1p のような結合面をもつ p67^{phox}、p62 / ZIP、PAR-6 などをタイプ II と分類した。なお、現在 150 個程の PB1 ドメインを含むタンパク質がデータベース SMART に登録されている。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 稲 垣 冬 彦
副 査 教 授 加 茂 直 樹
副 査 助 教 授 三 宅 教 尚
副 査 助 教 授 森 岡 弘 志

学位論文題名

Solution structures and classification of novel protein binding modules, the PB1 domain and the PC motif-containing region

(新規タンパク質結合モジュール PB1ドメインと
PCモチーフ含有領域の溶液構造と分類)

シグナル伝達蛋白質は多くの機能ドメインから構成されていることが特徴である。これらの機能ドメインの多くは 80-200 残基程度から構成されており、構造ドメインとしても同定されている。NMR による構造生物学的な研究は、これらのドメインの構造を明らかにするとともに、シグナル伝達におけるドメインの機能について、明確な結論を与えた点で重要な役割を果たしている。今回、吉永壮佐君が研究対象とした PB1 ドメイン、PC モチーフは酵母の極性維持に関与している Bem1, Cdc24, 好中球活性化酸素発生系細胞質因子 p67^{phox}, p40^{phox}に見出された機能ドメインである。PC モチーフは 28 残基の特徴的な酸性残基と疎水性残基の繰り返し配列として最初に同定され、その後、PC モチーフの結合相手として PB1 ドメインが新たにみいだされた。その後、aPKC や PAR の系にも PB1 ドメイン、PC モチーフが見出され、一般的に細胞極性維持に関与した機能を果たしていることが明らかにされている。吉永壮佐君はまず、Cdc24 に含まれる PC モチーフを対象として構造研究を開始した。yeast two-hybrid により PC モチーフのみでは PB1 との結合に不十分であり、PC モチーフ含有領域 75 残基(PCCR)について構造決定を行った。興味深いことに、PC モチーフはβヘアピンおよびC末端側ヘリックス構造をとってコア構造上に提示されていた。Dali をもちいて PDB に登録された構造に基づいて、PCCR に類似した構造をサーチした結果、Bem1p の PB1 ドメインと類似した構造をとることがわかった。PB1 ドメインはユビキチンと類似した構造をとるが、PCCR は典型的なユビキチンフォールドと比較して、N 末端側ヘリックスの欠如が見られた。そこで、N 末端側に 20 残基ほど伸ばしたコンストラクト (PCCRL) について構造解析を行った。PCCRL は N 末端側に新たなβシートが形成され、C 末端側のβ鎖と平行なシートを形成し、典型的なユビキチンフォールドを取ることが明らかとなった。また、NMR スペクトル上、βシート形成に関わる残基は大きな化学シフト変化を示したのに対し、PC モチーフ上の残基は PCCR と比較し、ほとんど変化はなかった。以上の結果は、配列上の相同性は 10%程度と低いにもかかわらず、PCCRL は PB1 同様にユビキチンスーパーフォールドをとることを示している。また、PC モチーフは構造モチーフであり、ユビキチン骨格の上に提示され、PB1 ドメインとの相互作用部位として使われていることを明らかにした。蛋白質はユビキチンフォールドというありふれたフォールド上に相互作用部位を提示することにより、多様な蛋白質間相互作用を生み出したと考えられる。

ついで、変異実験を組み合わせて PB1 ドメインと PCCRL の相互作用部位を同定した。PCCR および PCCRL では、PC モチーフの構造はきわめて類似しており、結合に必須な酸性残基は一方の面に提示していた。変異体実験の結果を構造上にマップした結果、PC モチーフを中心とする相互作用面を明らかにした。同様な解析を p67^{phox}, p40^{phox}の構造解析と

相互作用部位を明らかにしたが、同様なトポロジーおよび相互作用部位を持つ事を明らかにした。

今回の研究より、PB1 ドメインと PCCRL はともにユビキチンフォールドをとること、二つを統合して、PB1 ファミリーと総称することになった。これは配列解析より示唆されていたが、吉永荘佐君は構造を決定することにより、この点を明らかにした。さらに、ユビキチンフォールドをとる蛋白質の相互作用部位についてサーチした結果、PC モチーフをはじめ、相互作用部位を様々な蛋白質表面に提示していることを明らかにし、ユビキチンフォールドの役割について考察した。

以上、吉永荘佐君は PCCR, PCCRL の構造解析を行い、ユビキチンフォールドをとることを明らかにした。構造解析に基づき、ユビキチンフォールドの意義と役割を明らかにするとともに、新たに PB1 ドメインと PCCRL を総称して PB1 ファミリーを提唱した。これらの業績は博士号の授与にふさわしいものと評価する。