

氏 名	かとうようへい 加藤洋平
学位(専攻分野)	博士(薬学)
学位記番号	薬博第615号
学位授与の日付	平成19年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科・専攻	薬学研究科生命薬科学専攻
学位論文題目	Studies on Structure and Function of Tom1: Regulation of Membrane Traffic by Ubiquitin (Tom1 タンパク質の構造と機能に関する研究: ユビキチンによるメンブレン トラフィックの調節)
論文調査委員	(主査) 教授 中山和久 教授 伊藤信行 教授 竹島 浩

論 文 内 容 の 要 旨

真核細胞にはゴルジ体やリソソームなどのさまざまなオルガネラが存在し、そこにはそれぞれ固有のタンパク質が局在している。各オルガネラに必要なタンパク質は、メンブレントラフィックと呼ばれる機構によって正確に輸送される。その中でも、トランスゴルジネットワーク (TGN) と細胞膜やエンドソーム／リソソームとの間のタンパク質輸送はクラスリン被覆小胞によって行われる。

私たちの研究室では、以前から新規のクラスリンアダプタータンパク質 GGA の研究を行っていた。これまでに、GGA が TGN においてクラスリン被覆小胞の形成を調節し、積み荷タンパク質の選別輸送を制御することを明らかにしている。そこで私は、GGA と相同性を有する Tom1 (Target of myb1) タンパク質の研究に着手した。Tom1 と GGA の間で保存された VHS ドメインや GAT ドメインを持つタンパク質はいずれもメンブレントラフィックに関与することから、Tom1 も同様の機能を有する可能性が推測された。

GGA の VHS ドメインは TGN からの選別輸送に関与するマンノース6-リン酸受容体やソーティリンに存在する酸性ジロイシンモチーフに結合し、GAT ドメインは低分子量 GTPase の ARF に結合する。一方、Tom1 はそのどちらとも結合しない。また、GGA は TGN に局在するのに対して、Tom1 は主としてサイトゾルに存在する。さらに、GGA は酵母からヒトに至るまで存在するのに対して、Tom1 のホモログは多細胞生物にのみ存在している。Tom1 はファミリーを形成しており、ヒトでは Tom1, Tom1L1, Tom1L2 の3種類が存在している。これらの知見から、Tom1 は細胞内で GGA とは異なる機能を持つことが予想された。

Tom1 の機能の手がかりを得るために、VHS ドメインと GAT ドメインを用いた酵母ツーハイブリッド・スクリーニング、および Tom1 の C 末端領域を用いた GST プルダウン・アッセイを行い、相互作用するタンパク質の同定を試みた。その結果、3つの結合タンパク質(1)ユビキチン、(2)Tollip (Toll-interacting protein)、(3)クラスリンを同定した。

(1)ユビキチン

ユビキチンはプロテアソームにおけるタンパク質分解のシグナルとして機能するのに加えて、メンブレントラフィックの際の輸送シグナルやリソソームにおけるタンパク質分解のシグナルとして機能することが明らかになりつつある。細胞膜に存在する受容体がユビキチン化されるかどうかによって、エンドサイトーシスされたのちに細胞膜へトリサイクルされて再利用されるのか、それともリソソームへ輸送されて分解されるのかが決まる。

GST プルダウン・アッセイや免疫共沈法により、Tom1 の GAT ドメインがユビキチンと結合することを証明した。また、Tom1 はユビキチンに結合するだけでなく、その結合に依存して自らがユビキチン化を受けることも示した。これらの結果から、Tom1 がユビキチンによるメンブレントラフィックの調節に関与する可能性が示唆された。

Tom1 の GAT ドメインとユビキチンの相互作用様式をさらに詳しく調べるために X 線結晶構造解析を行った。GAT ドメインとユビキチンの共結晶を解析した結果、1分子の GAT ドメインに対して2分子のユビキチンが結合することが判明

した。構造から予測される相互作用に重要な GAT ドメインのアミノ酸に変異を導入するとユビキチン結合能が消失した。これらの結果から、2 分子のユビキチンと同時に結合できることにより親和性が高まってユビキチン化タンパク質を認識しやすくなる、または GAT ドメインが複数のユビキチン化タンパク質を結びつけるアダプターとして機能する可能性が考えられた。

(2) Tollip

Tollip は、IL-1 (Interleukin-1) 受容体や Toll 様受容体の下流のシグナル伝達を負に制御する因子として報告されていたが、メンブレントラフィックとの関係は不明であった。しかし、Tollip が CUE ドメインというユビキチン結合ドメインを有することから、Tom1 とともにユビキチンによる輸送調節に関与するのではないかと考えた。

GST プルダウン・アッセイや免疫共沈法により、Tom1 の GAT ドメインと Tollip の N 末端部分が結合すること、Tollip の CUE ドメインがユビキチンと結合することを明らかにした。さらに、蛍光抗体法により Tollip がエンドソームに局在することや、その局在化には C2 ドメインが必要なことを見出した。また、Tollip を過剰発現させるとユビキチン化タンパク質がエンドソームに蓄積すること、Tom1 が細胞質からエンドソームへとリクルートされることを明らかにした。

(3) クラスリン

クラスリンは、細胞膜や TGN でクラスリン被覆小胞の形成に関与するだけでなく、エンドソーム膜上でクラスリン被覆マイクロドメインを形成する。クラスリン被覆マイクロドメインは輸送小胞の形成ではなく、ユビキチン化タンパク質選別の足場として機能すると考えられている。

GST プルダウン・アッセイにより、クラスリン重鎖のターミナルドメインが Tom1 の C 末端領域に存在するクラスリンボックス配列を介して結合することを証明した。さらに細胞内では、Tom1, Tollip, クラスリンがエンドソームで共局在していた。

以上のような結果から、Tom1 と Tollip はエンドソーム上のクラスリン被覆マイクロドメインにおいて、ユビキチン化タンパク質の選別に関与する可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

真核細胞にはさまざまなオルガネラが存在し、それぞれ固有のタンパク質が局在している。各オルガネラに必要なタンパク質は、メンブレントラフィックによって輸送される。その中でも、トランスゴルジネットワーク (TGN) と細胞膜やエンドソーム／リソソームとの間のタンパク質輸送はクラスリン被覆小胞によって行われる。

著者らの研究室では以前から新規のクラスリンアダプタータンパク質 GGA の研究を行っており、GGA が TGN においてクラスリン被覆小胞の形成を調節し、積み荷タンパク質の選別輸送を制御することを明らかにしていた。次いで著者は、GGA と相同性を有するが機能未知であった Tom1 (Target of myb1) タンパク質に着目した。Tom1 と GGA の間で保存された VHS ドメインや GAT ドメインを持つタンパク質はいずれもメンブレントラフィックに関与することから、Tom1 も同様の機能を有する可能性が推測されていた。そこで、まず Tom1 の機能の手がかりを得るために、VHS ドメインと GAT ドメインを用いた酵母ツーハイブリッド・スクリーニング、および Tom1 の C 末端領域を用いた GST プルダウン・アッセイを行った。その結果、多数の結合タンパク質の同定に成功し、それらのうちで、①ユビキチン、②Tollip (Toll-interacting protein)、③クラスリンとの相互作用について詳細な解析を行った。

①ユビキチン

GST プルダウン・アッセイや免疫共沈法により、Tom1 の GAT ドメインがユビキチン結合ドメインであることを証明した。さらに、この結合の分子基盤の詳細について、生化学的および構造生物学的な解析を行なった。また、Tom1 はユビキチンに結合するだけでなく、その結合に依存して自らがユビキチン化を受けることも示した。

② Tollip

GST プルダウン・アッセイや免疫共沈法により、Tom1 の GAT ドメインと Tollip の N 末端領域が結合すること、Tollip の CUE ドメインがユビキチンと結合することを明らかにした。さらに、蛍光抗体法により Tollip がエンドソームに局在することや、その局在化には C2 ドメインが必要なことを見出した。また、Tollip を過剰発現させるとユビキチン化タン

パク質がエンドソームに蓄積すること、Tom1 が細胞質からエンドソームへとリクルートされることを明らかにした。

③クラスリン

GST プルダウン・アッセイにより、クラスリン重鎖のターミナルドメインが Tom1 の C 末端領域に存在するクラスリンボックス配列を介して結合することを証明した。さらに細胞内では、Tom1, Tollip, クラスリンがエンドソームで共局在することを明らかにした。

以上の結果は、Tom1 と Tollip はエンドソーム上のクラスリン被覆マイクロドメインにおいて、ユビキチン化タンパク質の選別に関与する可能性を示唆するものである。この研究成果は、細胞内メンブレントラフィックの研究分野に今後大きな発展をもたらすものと期待される。

よって本論文は博士（薬学）の論文として価値あるものと認める。

さらに、平成19年3月2日論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果合格と認めた。