

論文内容の要旨

論文題目 WW ドメインの構造機能相関

氏名 加藤 有介

本研究はタンパク質モジュールである WW ドメインの相互作用解析を行い構造面から考察したものである。WW ドメインは Pro を持つ配列に結合し、転写制御、細胞周期制御、ユビキチン化、スプライシング等に関与する。また、リドル症候群、筋ジストロフィーやアルツハイマー病等との関与も知られる。WW ドメインは多様なタンパク質中に存在する相互作用モジュールであり、おもに 4 種類のグループに分類されている。グループ I, II, III, IV の WW ドメインはそれぞれ、PP_xY モチーフ、PPLP モチーフ、PPR モチーフ、pS/T-P モチーフに結合するとされている。また、PGR モチーフ、PGM モチーフといった別のリガンドモチーフも提唱されており、それぞれが独立したグループであるとする報告もある。これらのグループ分類に関してこれまで系統的に解析された例がほとんどないので、WW ドメインの相互作用を相対的に比較するために、表面プラズモン共鳴(SPR)を用いた相互作用解析と構造未知の WW ドメインのモデル構築を行った。

1) グループ II および III とされている WW ドメインについて

これまでグループ II または III と考えられている WW ドメインについて相互作用解析を行った。用いたサンプルは FBP11 の 1 番目の WW ドメイン(FBP11A)、Fe65L2 の WW ドメイン、FBP30 の 1 番目の WW ドメイン(FBP30A)である。Scatchard plot による解析の結果、これまでの報告とは異なりこれらすべての WW ドメインは PL motif, PolyPro, PPR motif のすべてに結合した。これらの相互作用の k_{on} , k_{off} の解析を行ったところ、これらの WW ドメインすべてに共通する特徴がみられた。 k_{on} 値については PolyPro との相互作用でもつ

とも高い値をしめし、 k_{off} 値については PPR motif との相互作用がもっとも小さかった。これらの WW ドメインで共通の結合機構があることが推定される。

ホモロジーモデリングによる構造解析の結果、これらの WW ドメインで共通してループ I に酸性残基による負電荷があった。この負電荷のために PPR motif との相互作用が可能だと考えられる。また 25 番目の残基は Tyr または Trp という共通点も見られた。この 25 番目の残基は 2 番目の X-P 結合グループを形成して、リガンドの Pro 残基と相互作用することが推測される。これらのことからグループ II および III の WW ドメインには共通する相互作用機構があることが示唆された。

これらの WW ドメインのループ I に存在する酸性残基が PPR モチーフとの相互作用で果たす役割については変異体を作製して検討中である。また、25 番目の残基の PolyPro 配列との相互作用で果たす役割についても検討中である。

グループ II の WW ドメインは脊椎動物の四肢形成に重要な役割をもつ formin と相互作用することが知られる。またショウジョウバエの Abl キナーゼの基質であり、Abl や Src の SH3 ドメインのリガンドである Ena の哺乳類のホモログである Mena とも相互作用することが知られている。一方グループ III の WW ドメインは、細胞分裂時に Src キナーゼのアダプタータンパク質として機能する Sam68 と相互作用する。また、スプライソソームとも相互作用する。したがってこれらの相互作用でグループ II および III の WW ドメインが競合的に関わって、相互作用のネットワークを形成している可能性があると考えられる。

2) グループ IV と推測される WW ドメインなどについて

ヒト Pin1 とそのリガンドとの複合体の構造解析がなされて、pS/pT-P モチーフに対する Pin1 WW ドメインの相互作用では Arg14 と Arg17 が重要だと述べられた。Arg14 を含む WW ドメインはこれまで多く知られているのでそれらについて相互作用解析を行い、それらがグループ IV なのかどうか確かめる実験をした。酵母 Rsp5 の 2 番目の WW ドメイン (Rsp5.2) とマウス Nedd4 の 3 番目の WW ドメイン (mNedd4.3) に加え、ヒト Pin1、*C. elegans* Pin1 homologue (Y110)、*Aspergillus nidulans* PinA と *Neurospora crassa* Ssp1 について試した。

その結果 Rsp5.2 と mNedd4.3 はグループ I のリガンドである PPxY モチーフにのみ、それぞれ 11 μ M と 55 μ M の KD で結合した。そのほかの 4 種の WW ドメインはグループ IV のリガンドにのみ結合したが、その KD の範囲は 22 から 700 μ M であった。そのうち Ssp1 と PinA は Arg17 をもたない点が Pin1 や Y110 とは異なっている。

これらの WW ドメインのホモロジーモデルを構築したところ、Ssp1 や PinA では Pin1 と Loop I の構造や水素結合のネットワークが類似していた。グループ IV が pS/pT-P 配列と結合するための構造パッチとして p パッチを提唱する。

グループ IV の WW ドメインはすべてパルプリン型 PPlase の N 末端側に存在するものである。ヒト Pin1 は重要な細胞周期制御分子と考えられており、リン酸化された細胞

周期調節因子と結合することがわかっている。したがって本研究で明らかにされたような **WW** ドメインとリン酸化配列との相互作用が、それぞれの細胞で細胞周期調節に関与する可能性を示すものである。