

## 論文の内容の要旨

論文題目 分裂酵母のアダプタータンパク質 Scd2 と,  
Scd1, Cdc42, Shk1 との複合体形成

遠藤 誠

近年の研究よりタンパク質-タンパク質間の相互作用による複合体の形成が生体内の機能制御に大きく関わっていることが明らかになってきた。これらのタンパク質-タンパク質間の相互作用は、特定のモチーフやアミノ酸残基との結合に関わる結合モジュールを介している例が、多数報告されている。こういった結合モジュールをもつタンパク質のうち、触媒ドメインなどの機能的なドメインをもたず結合モジュールのみを複数もつタンパク質はアダプタータンパク質と総称されている。

分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* の Scd2 タンパク質は、2つの SH3ドメイン [N末端側から SH3(N), SH3(C)]と、PXドメイン、PB1ドメインを1つずつもつアダプタータンパク質である。この Scd2 は細胞形態の維持と接合に関わる Cdc42 カスケードの3つの因子、低分子量 G タンパク質の Cdc42, そのヌクレオチド交換因子である Scd1, そして、Cdc42のターゲットである Shk1 キナーゼと、結合することが報告されていた。しかしながら、Scd2 の各因子との結合領域やその機能などの詳細は明らかではなかった。本研究の目的は Scd2 と、Cdc42 カスケードに関わる各因子との相互作用について調べ、Cdc42 カスケードにおける Scd2 の役割を明らかにすることを目的とした。

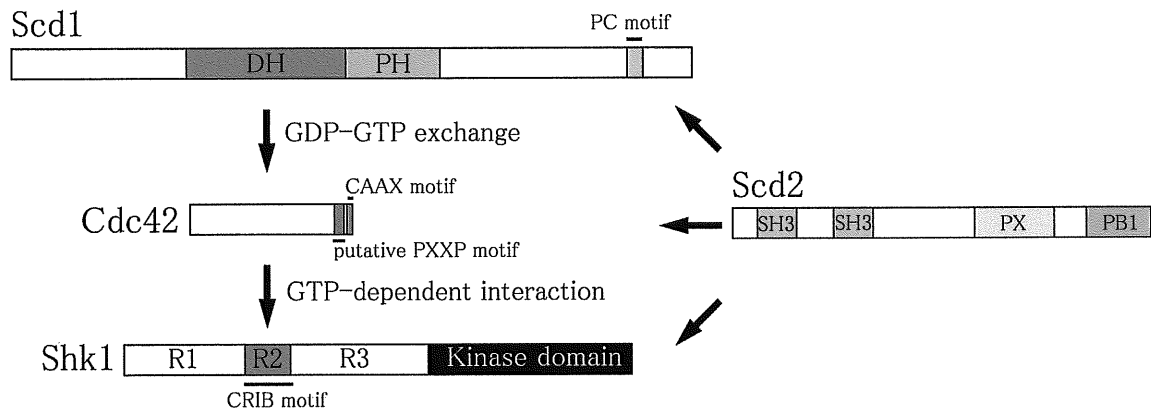


図1 分裂酵母の Cdc42 カスケードに関わるタンパク質

模式図は Scd1, Cdc42, Shk1 と Scd2 のドメイン構成を表している (本文参照). Scd1 の DH-PH ドメインは Rho/Cdc42 ファミリーの低分子量 G タンパク質のヌクレオチド交換に関わるドメインである. PC モチーフは, NADPH oxidase のサブユニット (p40<sup>phox</sup>) や, 出芽酵母の Scd1 ホモログである Cdc24p などにみられる, 結合モジュールである. Cdc42 の CAAX モチーフは, 脂質修飾による膜局在に関与する. Shk1 は, 3 つの制御領域 (R1, R2, R3) と, キナーゼドメインで構成されている. R2 には, GTP 結合型 Cdc42 と結合する CRIB モチーフが, R1, R3 には複数のポリプロリンモチーフが保存されている.

Scd2 の様々な領域を含む欠失変異体を GST, あるいは His<sub>6</sub>-tag 融合タンパク質として発現させ, 精製した. さらに, SH3 ドメインのポリプロリン[Pro-X-X-Pro (PXXP)]結合部位と PX ドメインの PXXP モチーフに部位特異的変異を導入した Scd2 タンパク質を用意した. 同様に, Scd1, Cdc42, Shk1 の GST, あるいは His<sub>6</sub>-tag 融合タンパク質を用意した. 各因子間の結合を見るために GST 融合タンパク質と Glutathione Sepharose 4B (GS4B) 樹脂を用いた共沈降実験を行った. そして, GST 融合タンパク質と共沈降してきた His<sub>6</sub>-tag 融合タンパク質を, His<sub>6</sub>-tag 抗体をもちいて検出した.

まず, Scd2 と Cdc42 の結合のヌクレオチド依存性を調べたところ, Scd2 は GTP 依存的に Cdc42 と結合することが明らかになった. GTP 結合型の Cdc42 は CRIB モチーフと結合することが知られているが, Scd2 は CRIB モチーフをもっていない. そこで, Scd2 の欠失変異体と部位特異的変異体を用いて Cdc42 結合領域を調べたところ, SH3 ドメインを含む 2 つの領域, Scd2(1-87) [Cdc42-binding region 1 (CB1)] と Scd2(110-266) (CB2) が, GTP 結合型 Cdc42 との結合に関わることが示唆された. そこで, CB1 中の SH3(N)ドメインに部位特異的変異を導入すると, CB1 は Cdc42 と結合できなくなった. SH3 ドメインの一般的な結合相手としては PXXP モチーフが知られている. Cdc42 の C 末端に保存されている PXXP モチーフと思われる領域をのぞいた Cdc42(1-177) と, CB1 の結合をしらべたところ, この C 末端の欠失は結合に大きく影響しなかった. このことから, CB1 の SH3(N)ドメインと GTP 結合型 Cdc42 の結合が, 一般的な SH3-PXXP 結合とは異なる様式であることが示唆された.

一方, CB2, PX, PB1 ドメインを含む Scd2(110-536) は単体では Cdc42 と結合せず, その結合は

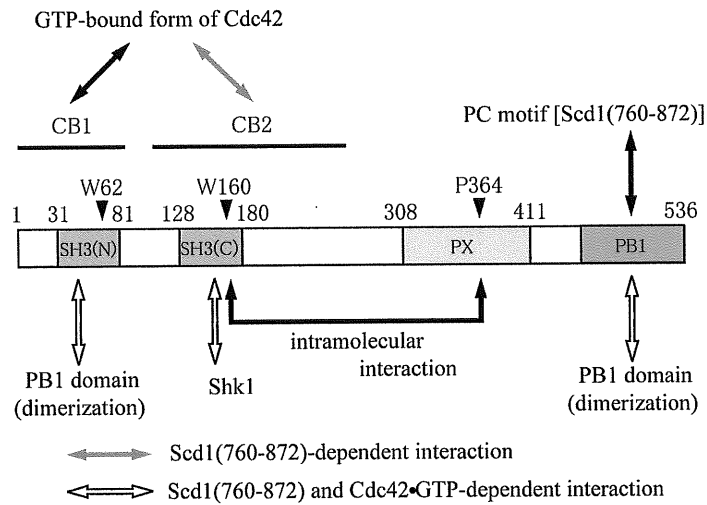


図2 Scd2 の各領域の役割

模式図は、Scd2 のドメイン構成と、各領域の機能を表している。数字はアミノ酸残基の番号を、傍線は機能領域 (CB1, CB2)を表している。部位特異的変異を導入した W62, W160, P364 残基の位置を矢印で表した。

Scd2のPB1ドメインとScd1のPCモチーフ [Scd1(760-872)]の結合に依存していることが示された。これに関連して、他のタンパク質でSH3ドメインとPXドメインが分子内結合することが報告されていた。そこで、Scd2の分子内結合がCB2とCdc42の結合を阻害している可能性について検証した。その結果SH3(C)ドメインとPXドメインは分子内結合しており、その分子内結合を欠損させるSH3(C), PXドメインへの部位特異的変異によって、Scd2(110-536)はGTP結合型Cdc42と結合できるようになることが示された。

Scd2(1-536), Scd2(267-536) (PX, PB1ドメインを含む), Scd2(451-536) (PB1ドメイン)を精製し、ゲルろ過と光散乱法で分子量を推定したところ、Scd2(267-536), Scd2(451-536)はダイマー化することが示唆された。さらに結合実験でもScd2(267-536), Scd2(451-536)はダイマー化することが示唆されたが、Scd2(1-536), Scd2(110-536)はダイマー化しなかった。このことから、CB2とCdc42の結合で示唆されたScd2の分子内結合が、ダイマー化も自己抑制していることが考えられた。そこでScd2(110-536)に分子内結合を欠損させるSH3(C), PXドメインへの部位特異的変異を導入したところ、Scd2(110-536)はダイマー化できるようになった。さらにScd2(1-536)のダイマー化がScd1(760-872)とGTP結合型Cdc42依存的におこることが示された。また、欠失変異体を用いた結合実験から、CB1とPB1ドメインが結合することが示されたが、CB1とScd2(1-536)の結合がScd1(760-872)とGTP結合型Cdc42依存的に起こることから、この結合は分子内結合ではなく、2分子のScd2間の結合でありダイマー化に寄与することが考えられた。

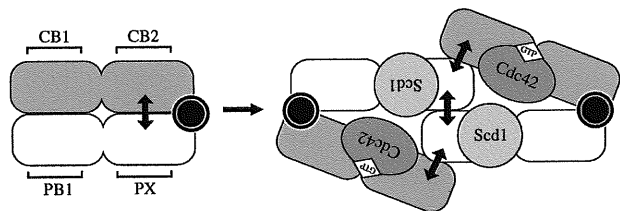


図3 Scd2のダイマー化のモデル

Scd2 の SH3(C)ドメインは、Shk1 と結合することがすでに報告されていた。しかしながら、上に述べたように、SH3(C)ドメインは、PX ドメインと分子内結合していることが示唆されている。そこで、Scd2 の分子内結合と、Shk1 との結合が、どのような関係にあるのかしらべた。その結果 Scd2(1-536)は Shk1 と結合し、さらにこの結合は、Scd1(760-872)と GTP 結合型 Cdc42 の両者が存在すると、強められることが明らかになった。一方、SH3(C)ドメインに部位特異的変異を導入した Scd2(1-536/W160R)は、Shk1 との結合が弱まり、この結合能の低下は、Scd1(760-872)、GTP 結合型 Cdc42 によっても回復されなかった。これらのことから、Scd2 の SH3(C)ドメインの結合相手は、Scd1(760-872)と GTP 結合型 Cdc42 存在下で、分子内の PX ドメインから、Shk1 に換わることが考えられた。これまでの報告から、Shk1 の CRIB モチーフはキナーゼドメインと分子内結合しており、Cdc42 との結合が抑制されていることが推測されていた。そこで、Shk1 と Cdc42 の結合についてしらべたところ、Shk1 は、Scd2 依存的に、GTP 結合型 Cdc42 と結合することが示唆された。

以上の結果から、次のようなことが考えられた。上流からの刺激に従って、Scd1 が Cdc42 のヌクレオチドを GDP から GTP に交換する。Scd1 と結合した Scd2 が、GTP 結合型 Cdc42 と結合し、Scd2 を中心とした複合体が形成される（ここに Scd2 のダイマー化も関わってくると考えられる）。そして、複合体を形成した Scd2 の SH3(C)ドメインの結合相手が、分子内の PX ドメインから、Shk1 へと換わる。その結果、Scd2 を介して、ヌクレオチド交換因子である Scd1 から、Cdc42 のターゲットタンパク質である Shk1 へと、GTP 結合型 Cdc42 が効率的に運ばれ、これが Shk1 の活性化につながることが考えられた。つまり、Scd2 はこのようにスキヤフフォルディングタンパク質として、Scd1、Cdc42、Shk1 と複合体を形成し、Cdc42 カスケードの情報伝達の「足場」を提供していることが考えられる。