

審査結果の要旨

氏名 杉木 俊彦

細胞内セラミド輸送分子 CERT の機能メカニズムの構造生物学的解析と題する本論文は、不均一で巨大な超分子集合体との相互作用部位を同定することが可能である新規 NMR 測定法「転移交差飽和法」により、CERT の PH ドメイン (以下 CERT-PH) のゴルジ体膜に対する認識メカニズムを明らかにした研究成果を述べたものである。全体は主に 2 つのセクションに分かれており、第 1 章の序論、第 2 章の実験材料および実験方法に続き、第 3 章は CERT-PH のゴルジ体認識機構の解明と題されている。

第 3 章において、はじめに、限定分解実験によって CERT-PH の構造ドメイン領域を決定し、その領域について大腸菌による大量発現系を構築している。続いて、安定同位体標識した CERT-PH を調製し、三重共鳴測定法により主鎖アミドの NMR シグナルをほぼ完全に帰属している。

まず、CERT-PH はゴルジ体膜に豊富に存在している PtdIns(4)P と直接結合することが報告されていることから、CERT-PH と PtdIns(4)P のイノシトール環部分の解離定数を求めている。具体的には、PtdIns(4)P のイノシトール環部分のアナログ分子 (Ins(1,4)P₂) を CERT-PH に滴定して NMR 測定を行い、添加した Ins(1,4)P₂ の濃度依存的に観察された CERT-PH のシグナルの化学シフト値の変化量から、両者の解離定数を算出している。また、脂質二重膜もしくは PtdIns(4)P を埋め込んだ脂質二重膜をリポソームとして調製し、CERT-PH との解離定数を表面プラズモン共鳴法により求めている。測定したそれぞれの解離定数の値を比較した結果、PtdIns(4)P のみ、および脂質二重膜のみに対してはそれぞれ 10⁻⁴ M 程度の解離定数で結合するが、PtdIns(4)P が脂質二重膜に埋め込まれている状態に対しては 10⁻⁶ M 程度まで affinity が上昇することを見出している。一般的な PH ドメインは、イノシトールリン脂質のイノシトール環部分に対する結合のみで十分強い affinity を獲得し、標的膜に対して解離定数が 10⁻⁷ ~ 10⁻⁹ M のオーダーで相互作用することが知られている。このことから、CERT-PH がゴルジ体と相互作用するには PtdIns(4)P に対する認識だけでは不十分で、脂質二重膜に対する結合が必要であり、このような認識機構は一般的な PH ドメインの標的膜に対する認識機構とは異なるユニークなものであることを見出している。

次に、CERT-PH とゴルジ体模倣リポソームの相互作用部位を同定するため、転移交差飽和法を適用している。その結果、CERT-PH のゴルジ体結合部位は、分子表面の一部に

形成された面とその近傍の窪みの部分の 2 つの部位で構成されており、前者が脂質二重膜との結合部位、後者が PtdIns(4)P との結合部位であることを見出している。さらに、それらの結合界面のアミノ酸残基の変異体を作製し、表面プラズモン共鳴法によりゴルジ体膜模倣リポソームとの結合定数を測定した結果、PtdIns(4)P との結合だけでなく、脂質二重膜との結合もゴルジ体との相互作用に重要であることを裏付けている。PH ドメインについて、脂質二重膜との相互作用部位とその重要性について、実験的に明確に決定された例はこれまでに報告がなく、新たな知見を与えている。また、CERT-PH の脂質二重膜結合部位の残基を、これまでにイノシトールリン脂質との複合体の立体構造が明らかとされている他の PH ドメインの残基と比較したところ、他の PH ドメインにおいてはイノシトール環部分と相互作用する残基が、CERT-PH では総じて脂質二重膜結合部位の残基に置換していること、および、脂質二重膜結合部位の残基は PtdIns(4)P をリガンドとしてゴルジ体と相互作用する PH ドメイン群にのみ保存されていることを見出しており、脂質二重膜結合部位の残基はゴルジ体に結合する PH ドメインにのみ存在する機能モチーフであると推測している。

本研究の成果は、未だ十分な解析がなされていない、タンパク質による細胞内脂質輸送のメカニズムの解明に大きく貢献するものである。また、本研究における CERT-PH とゴルジ体膜との相互作用様式の解明によって、今後、脂質代謝異常症などの治療薬の開発につながる可能性が開かれた。

以上、本研究の成果は、構造生物学および脂質生物学の領域に大きく貢献するものであり、これを行った学位申請者は博士（薬学）の学位を得るにふさわしいと判断した。