

論文内容の要旨

論文題目 Exocyst 複合体サブユニット Sec3 局在の構造基盤

氏名 山下 雅美

背景

細胞が正常に機能するためには、細胞内で合成された分子が適切な場所へ正確に輸送される必要がある。細胞膜や細胞外への分子の輸送を担う開口放出では、分子はゴルジ体などの細胞小器官を覆う膜から産み出される分泌小胞に載り、細胞膜へと移動し、最終的に小胞が細胞膜と融合することで輸送される。分泌小胞は、融合の前段階として繫留因子により一時的に標的膜に繫ぎ留められる。この段階で細胞膜上の適切な場所に繫ぎ留められた分泌小胞は、細胞膜と不可逆的に融合する (図 1)。このような一連の輸送機構は低分子量 GTPase による GTP 依存的な制御のもとで進行する。低分子量 GTPase は GTP 結合型と GDP 結合型の状態を持つ。GDP 結合型は不活性な状態であり、グアニンヌクレオチド交換因子により GDP

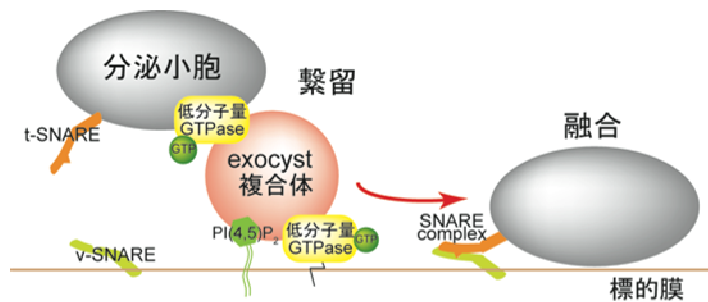


図 1. 分泌小胞の膜融合過程

が GTP に置換され GTP 結合型になると低分子量 GTPase のスイッチ領域と呼ばれる領域が大きく構造変化を起こす。GTP 結合型となった低分子量 GTPase は、スイッチ領域を介してエフェクターと結合し、下流の過程を制御する。

Exocyst 複合体は、Sec3, Sec5, Sec6, Sec8, Sec10, Sec15, Exo70, Exo84 の 8 つのサブユニットで構成される分子量約 750,000 の繫留因子複合体であり、複数の低分子量 GTPase による制御のもとで分泌小胞を認識して標的膜へと繫ぎ留める。出芽酵母では、Sec15 が分泌小胞上の低分子量 GTPase Sec4 を認識して分泌小胞と結合し、さらに、Sec3 や Exo70 が標的膜上の低分子量 GTPase Rho1/Cdc42, Rho3 やイノシトールリン脂質 PI(4,5)P₂ を認識して分泌小胞を標的膜上の特定の位置へと繫留する (図 1)。本研究では、exocyst 複合体の標的膜認識メカニズムの解明を目的として、出芽酵母由来 Sec3 の標的膜結合領域と Rho1 との複合体の結晶構造を決定し、立体構造に基づいた機能解析を行った。

出芽酵母由来 Sec3 と Rho1 の複合体の結晶構造解析

Sec3 は 1,336 アミノ酸残基から成り、Sec3 の N 末端領域 320 残基 (Sec3-N) で Rho1/Cdc42 や PI(4,5)P₂ と結合する。そこで、Sec3-N と脂質修飾部位を除いた Rho1 との複合体の結晶化を行った。Sec3-N と Rho1 は、それぞれ大腸菌 BL21 株を用いて GST 融合タンパク質として大量発現させ、アフィニティークロマトグラフィー後に GST タグを切断し、さらに、イオン交換クロマトグラフィーとゲル濾過クロマトグラフィーを行い、最終精製試料とした。次に Rho1 に GTP の非加水分解性アナログである GppNHp を結合させた後、Rho1 と Sec3-N をモル比 1.5 : 1 で混合し、結晶化スクリーニングを行ったところ予備的な結晶を得た。さらに、結晶化条件を最適化することで回折測定に適する大きさの結晶の作製に成功した。放射光施設 PF-AR NW12A での回折測定では、50×50×100 μm³ 程度の大きさの結晶でも 3.5 Å 分解能のデータセットを収集することができた。そこで、異常分散法による位相決定を行うためにセレノメチオニン標識した Sec3-N を調製して Rho1 との複合体の結晶化を行った。結晶化条件を最適化することにより、最終的に 100×100×200 μm³ 程度の大きさのセレノメチオニン標識体の結晶を得た。これらの結晶を用いて放射光施設 SPring8 BL41XU において単波長異常分散法による位相決定するため、セレンの K-吸収端に近い波長 0.97924 Å で 3.0 Å 分解能のデータセットを収集した (R_{sym} 値 10.8 %, completeness 99.9 %, 空間群 $P4_12_12$, 格子定数 $a = b = 116.2$ Å, $c = 247.9$ Å)。このデータセットを用いてプログラム autoSHARP によりセレン原子の位置の決定、位相計算を行った。溶媒平滑化による電子密度の改良により解釈可能な電子密度を得た後、さらに電子密度を改良するためにヒト RhoA の立体構造を利用して作成したマスクを用いて非結晶学的対称を利用した電子密度の平均化と溶媒平滑化を行った。さ

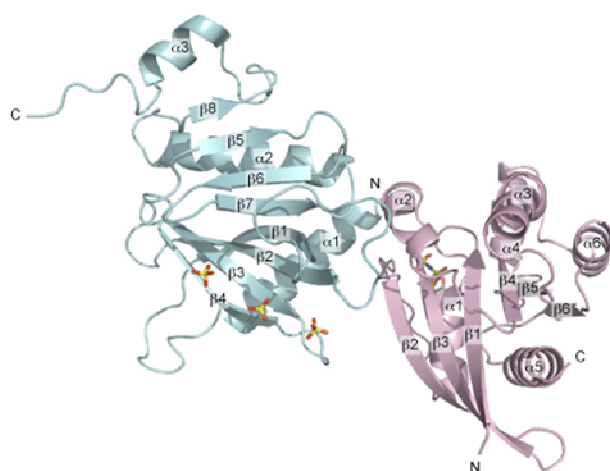


図 2. Sec3 と Rho1 の複合体の結晶構造

(図 2).

さらに、2.6 Å 分解能の同型なデータ (R_{sym} 値 7.3 %, completeness 99.7 %, 空間群 $P4_12_12$, 格子定数 $a = b = 116.1$ Å, $c = 247.7$ Å) と異常分散法で得られた位相を用いて、より高分解能の電子密度マップを得た。以後、原子モデルの構築・改善と電子密度の改良を繰り返して行い、非対称単位中に含まれる 3 つの複合体の原子モデルを全て構築した。さらに、プログラム CNS を用いた原子モデルの精密化により最終的に構造の信頼度を示す R_{free} 値 26.4 %, 2.6 Å 分解能で結晶構造を決定した

Sec3-N とイノシトールリン脂質との相互作用様式

決定した構造が既知の立体構造と類似性を持つかを調べるために、DALI サーバーを利用

して立体構造検索を行った。その結果、Sec3-N は一次配列からは予測できない pleckstrin homology (PH)ドメインを持つことが明らかとなった。また、結晶構造から Sec3-N は PH ドメイン内に塩基性のクラスターを持ち、クラスター内に結晶化条件由来の 3 つのリン酸イオンが確認された (図 2)。PH ドメインはイノシトールリン脂質の結合ドメインとして知られるドメインであり、リン酸イオンの結合は PI(4,5)P₂ との結合を模すものであることが示唆された。PH ドメインと低分子量 GTPase との複合体の結晶構造は今まで Sec3-N と Rho1 の複合体以外に 4 種の構造が報告されている。しかし、これらの複合体の PH ドメインはいずれも PI(4,5)P₂ とは結合しないことが構造学的または生化学的に証明されており、今回得られた結晶構造は PH ドメインの中で初めて低分子量 GTPase と PI(4,5)P₂ との両方に結合することのできる PH ドメインの構造である。さらに、これら 4 種の結晶構造と Sec3-N と Rho1 との複合体の結晶構造の低分子量 GTPase を重ね合わせたところ、低分子量 GTPase に対する PH ドメインの結合の配向は 5 つの複合体で全く異なっていた。

PH ドメインの PI(4,5)P₂ 結合様式は、PI(4,5)P₂ のヘッドグループである IP₃ と PH ドメインとの複合体の結晶構造から 2 種類報告されている。そこで、Sec3-N の PH ドメインがどちらの結合様式に属するかを知るために、それぞれの結合様式に属する Arf nucleotide binding site opener (3G ARNO) と β -spectrin の PH ドメインと IP₃ との複合体の結晶構造と Sec3-N の PH ドメインの結晶構造を重ね合わせた。その結果、Sec3-N の PH ドメインの塩基性クラスターと 3G ARNO の塩基性クラスターの位置は保存されており、クラスターを形成するいくつかの塩基性残基も保存されていた。さらに、3G ARNO に結合する IP₃ のリン酸基の 1 つは Sec3-N に結合する 3 つのリン酸イオンのうちの中心に位置するリン酸イオンの位置と完全に重なった。このことから、Sec3-N の PI(4,5)P₂ 結合様式は 3G ARNO と同じ様式であることが示唆された。次に、リン酸イオンとの結合に関わる塩基性のアミノ酸残基 (Lys135, Lys137, Lys155, Arg157, Arg168, Lys194) のうち、リン酸イオンと多くの水素結合を形成していた Lys155 と Arg157 の両アミノ酸残基を Ala に置換した 2 重変異体やさらに残る塩基性アミノ酸残基に Ala 置換を加えた変異体すべてで PI(4,5)P₂ との結合能が失われた。これにより Sec3-N のリン酸イオンとの結合に関わるアミノ酸残基が PI(4,5)P₂ との結合に必須であることが明らかになった。

Sec3-N と Rho1 との相互作用様式

Rho1 と Sec3-N との結合は、スイッチ領域を介した約 1500 Å² の広範囲にわたる疎水性相互作用によるものであった。Rho1 は 2 つの疎水性パッチと 1 つの疎水性ポケットを形成しており、そこに Sec3-N の Phe77, Ile115 と Leu131 がそれぞれ結合していた。さらに、相互作用面には 4 本の水素結合が確認できた。次に、構造情報をもとに Rho1 と Sec3-N との相互作用に関わるアミノ酸残基を Ala に置換し、結合実験を行った。その結果、Sec3-N と Rho1 との間の水素結合形成に関わるアミノ酸残基、Rho1 の疎水性パッチや疎水性ポケット、Rho1 の

疎水性ポケットに入り込むように結合している Sec3-N の Leu131 が複合体の形成に必須であることが明らかとなった。一方で, Rho1 の疎水性パッチと相互作用する Sec3-N の Phe77 や Ile115 は Ala に置換しても複合体の形成に影響がなかった。

Sec3 の標的膜への局在メカニズム

出芽酵母の Sec3 は, 出芽の際, 出芽先端に局在し, 分泌小胞と共に移動してくる他の exocyst 複合体サブユニットと結合することで, 標的膜の特定の位置に exocyst 複合体を形成するための目印になる。実際に, 蛍光タンパク質 GFP を融合させた Sec3 は, アクチン骨格非依存的に出芽先端に局在することが報告されている。また, Rho1 や PI(4,5)P₂ との結合に関わる N 末端領域を除いた Sec3 は出芽先端への局在能を失うことから, N 末端領域が Sec3 の標的膜の特定の位置への局在を制御すると考えられている。しかし, N 末端領域は Rho1 と PI(4,5)P₂ の両方との結合領域を持ち, Rho1 と PI(4,5)P₂ のどちらとの結合が Sec3 に局在能を与えるのかは特定できなかった。そこで, GFP を C 末端に融合させた Sec3 を用いて, Rho1 または

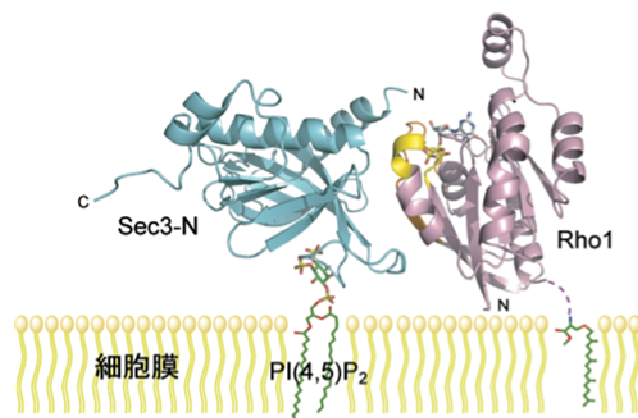


図 3. 結晶構造に基づく標的膜への結合モデル

PI(4,5)P₂ との結合に関わるアミノ酸残基に変異を導入し, 局在の変化を観察した。その結果, Sec3 は Rho1 または PI(4,5)P₂ のどちらか一方の結合を阻害しても局在能を失わず, Rho1 と PI(4,5)P₂ の両方との結合を阻害することで初めて局在能を失うことがわかった。これにより, Sec3 の標的膜への局在は Rho1 と PI(4,5)P₂ の相補的な制御のもとで成り立つことを明らかにした (図 3)。

酵母とほ乳類の Sec3 はアミノ酸配列の相同性が低いことから, ほ乳類の Sec3 は低分子量 GTPase や PI(4,5)P₂ と結合する N 末端領域を持たないと考えられてきた。しかし, 酵母の Sec3 の実際に立体構造をとっていた領域 (74-254 アミノ酸残基) のみを用いたアミノ酸相同配列予測から, 酵母とほ乳類の Sec3 の N 末端領域には配列相同性があることが明らかとなった。また, 酵母の Sec3 の PI(4,5)P₂ との結合に関わるアミノ酸残基はヒトの Sec3 においてもよく保存されていることが分かった。このため, ヒトの Sec3 の N 末端領域と PI(4,5)P₂ との結合実験を行ったところ, ヒト Sec3 の N 末端領域も PI(4,5)P₂ との結合能を持つことが確認された。さらに, 酵母の Sec3 の結晶構造から得られた二次構造とヒトの Sec3 の N 末端領域の二次構造予測のトポロジーは非常によく似ていることが分かった。これらのことから, ヒトの Sec3 も PH ドメインを介して低分子量 GTPase や PI(4,5)P₂ と結合する可能性が示唆された。