

論文審査の結果の要旨

氏名 山下 雅美

本論文は「Exocyst 複合体サブユニット Sec3 局在の構造基盤」を題とし、5章から構成されている。

第1章では、序論として小胞輸送の分子メカニズムについて述べられている。小胞輸送は、小胞の形成・移動・融合の三段階の過程を経て行われる。融合の過程では、小胞は、最初に繫留因子により一時的に標的膜へと繫ぎ留められる。繫留因子は、輸送経路に応じて異なるが、細胞膜への輸送である開口放出では、exocyst 複合体と呼ばれるヘテロ8量体が、標的膜上に固定された低分子量 GTPase やイノシトールリン脂質 PI(4,5)P₂ を目印として認識し、分泌小胞を標的膜上の特定の位置に繫ぎ留める。出芽酵母では、exocyst 複合体サブユニット Sec3 が細胞膜上の Rho1/Cdc42 と PI(4,5)P₂ を、Exo70 が Rho3 と PI(4,5)P₂ を認識することで、細胞膜上での exocyst 複合体の局在を制御する。低分子量 GTPase は、不活性型である GDP 結合状態と活性型である GTP 結合状態とを遷移する。GTP 結合型への遷移に伴って、スイッチ領域と呼ばれる領域が構造変化してエフェクター分子と結合する。

第2章では、出芽酵母由来 Sec3 の Rho1/PI(4,5)P₂ 結合領域 (Sec3-N) と Rho1 との複合体の X 線結晶構造解析について述べられている。まず、Sec3-N と Rho1 の大量発現系を構築し、大量発現させた Sec3-N と Rho1 を精製して複合体の結晶化を行った。次に、位相決定のために、セレン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。この結晶を用いてセレン原子の異常分散を利用した単波長異常分散法による位相計算を行い、最終的に構造の信頼度を示す R_{free} 値 26.4%, 2.6 Å 分解能での結晶構造を決定した。得られた結晶構造から、Sec3-N 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 pleckstrin homology (PH) ドメインを持つことが明らかとなった。さらに、PH ドメイン内には塩基性クラスターがあり、PI(4,5)P₂ との結合を模す結晶化条件由来の

3つのリン酸イオンが確認された。Sec3-NとRho1は、Rho1のエフェクター結合領域であるスイッチ領域を介して広範囲にわたって相互作用していた。

第3章では、結晶構造に基づいて行ったSec3-Rho1複合体の機能解析について述べられている。まず、Sec3とRho1の相互作用面のアミノ酸残基をアラニン残基に置換したSec3変異体およびRho1変異体の結合実験を行い、複合体の形成に必須なアミノ酸残基を特定した。次に、PI(4,5)P₂との相互作用に関わると推測されるアミノ酸残基をアラニン残基に置換したSec3変異体とイノシトールリン脂質との結合実験を行って、PI(4,5)P₂との結合に必須なアミノ酸残基を特定した。さらに、Sec3がRho1やPI(4,5)P₂との結合を介して出芽先端に局在することを利用して、Rho1またはPI(4,5)P₂との結合能を失ったSec3変異体の局在を観察し、Sec3の標的膜への局在がRho1とPI(4,5)P₂の相補的な制御のもとで成り立っていることを明らかにした。

第4章では、脊椎動物のSec3の機能について考察している。Sec3-Rho1複合体の結晶構造や二次構造予測の情報を含めたアミノ酸配列解析を行った結果、出芽酵母由来のSec3とアミノ酸配列相同性の低い脊椎動物由来のSec3もN末端領域にPHドメインを持ち、そのPHドメインを介してPI(4,5)P₂と結合することが示唆された。

第5章では、exocyst複合体全体の分泌小胞の繫留機構について考察している。

なお、本論文の第2章の構造解析は、深井周也准教授、山形敦史助教、佐藤裕介助教、三村久敏助教、吉川梓氏と、第3章の局在実験は、深井周也准教授、中野明彦教授、佐藤健准教授と黒川量雄研究員との共同研究であるが、論文提出者が主体となって分析及び検証を行ったもので、論文提出者の寄与が十分であると判断する。

したがって、博士（生命科学）の学位を授与できると認める。