

審査結果の要旨

氏名 梅本 良

IQGAP1 の actin 認識機構の解明と題する本論文は、Rho GTPase のエフェクター分子の一つである IQGAP1 (IQ-domain GTPase activating protein 1) の actin 結合ドメイン (actin binding domain ; ABD) の actin 認識機構に関して、NMR にて解析した成果を述べたものである。本論文は、全五章から構成されており、第一章に序論、第二章に実験材料および実験方法が記されている。第三章に結果と考察がまとめられ、第四章では総括および今後の展望について述べている。第五章は補遺であり、リコンビナント actin を用いた ABD と F-actin との相互作用解析の結果が記載されている。

第三章においては、まず ABD の大腸菌による大量発現系を構築し、F-actin 結合活性の報告のある ABD (1-210) とトリプシン限定分解実験に基づき N 末端の構造非形成領域を除去した ABD (26-210) が同等の F-actin 結合活性を有することを表面プラズモン共鳴 (SPR) 法により示し、NMR による立体構造決定には ABD (26-210) を用いている。立体構造決定のため、各種三重共鳴実験により主鎖、側鎖プロトンの帰属を行い、ついで NOE の情報、二面角の情報、水素結合の情報を収集し拘束条件として Cyana2.1 による立体構造計算を行っている。得られた NMR 構造から、ABD は CH (calponin homology) domain に共通してみられる 6 本の α -helix およびそれに続く extension 領域からなることを明らかとしていた。これまでに部分ペプチドを用いた共沈実験から複数の CH domain を有する α -actinin にて F-actin 結合に重要であることが示されている α 6-helix に着目し、ABD においては extension 領域が α 6-helix をマスクしていたことから、ABD の actin 認識様式は他の CH domain を有する F-actin 結合タンパク質とは異なることを考察していた。

続いて ABD と actin との溶液 NMR 法による相互作用解析を行っていた。まず、ABD が F-actin と特異的に相互作用するか否かについて、ABD に対する G-actin および F-actin の NMR 滴定実験により判別していた。滴定実験の結果、G-actin 滴定時には 1 次元 ^1H - ^{15}N HSQC スペクトルのシグナル強度減少がほとんど観測されなかったのに対して、F-actin 滴定時には顕著なシグナル強度減少が観測されたことから、ABD は F-actin と特異的に相互作用することを示していた。

ABD が F-actin と特異的に相互作用することが判明したため、ABD と F-actin との相互作用系にアミドおよびメチル検出型の転移交差飽和 (Transferred Cross Saturation ; TCS) 法を適用していた。アミド検出型 TCS 実験の結果、17 % 以上の顕著なシグナル強度減少を示した残基は T113, D114, Q118, W119, N121, F132, E135, N144 であり、メチル検出型 TCS 実験の結果、30 % 以上の顕著なシグナル強度減少を示した残基は I117,

L120, I131, I202, I205 であった。これらの残基は ABD の分子上で同じ領域に局限して存在しており、分子片側の面に分布していたことから、これらの残基が F-actin 結合界面を形成すると考察していた。

さらに変異体実験を行い、SPR 法によって野生型および変異体の F-actin 結合活性を比較した結果、結合界面に存在する残基のうち N121, Q118, D114 を含む $\alpha 4$ -helix が F-actin 結合に重要であることを示していた。

IQGAP1 の ABD はこれまでで知られている中で唯一、単独の CH domain からなる actin 結合タンパク質である。その actin 認識様式に関しては他の複数の CH domain からなる actin 結合タンパク質との一次配列の比較から予測することは困難であった。これに対して本論文では ABD の NMR による立体構造を行い、さらにアミドおよびメチル検出型の TCS 法を用いて ABD 上の F-actin 結合界面の同定し、ABD 上の F-actin 結合界面が主として $\alpha 4$ -helix の残基からなることを示した。さらに、変異体実験により、 $\alpha 4$ -helix の残基の中でも特に D114 および Q118 が F-actin 結合に重要な残基であることを明らかとした。

本研究では、これまで解析が困難であった F-actin と F-actin 結合タンパク質との相互作用に着目し、F-actin のような巨大かつ不均一性を有する細胞骨格タンパク質とその結合タンパク質との NMR 法を用いた相互作用解析法を確立した。また、これまでに actin 結合タンパク質に共通してみられる複数の CH domain においては $\alpha 6$ -helix が F-actin 結合に重要であると考えられていたが、IQGAP1 の ABD のように単独の CH domain においては $\alpha 4$ -helix が F-actin 認識に重要であることを初めて明らかとした。

以上、本研究の成果は、主要な細胞骨格の一つである actin とその結合タンパク質である IQGAP1 との相互作用様式に対して新たな知見を加えるものであり、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。