

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 8 月 21 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26292050

研究課題名(和文) EF-ハンド蛋白質ALG-2の核内および生体膜におけるカルシウム応答反応制御機構

研究課題名(英文) Mechanism of calcium-response regulation of EF-hand protein ALG-2 in the nucleus and membranes

研究代表者

牧 正敏 (Maki, Masatoshi)

名古屋大学・生命農学研究科・教授

研究者番号：40183610

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,700,000円

研究成果の概要(和文)：小胞体からゴルジ体への蛋白質の初期分泌過程において、小胞体出芽部位へのALG-2のCa<sup>2+</sup>依存的集積は、COPII小胞外殻構成因子Sec31AとアネキシンA11をCa<sup>2+</sup>依存的に結合させ、モデル積荷膜蛋白質の輸送を遅延させ、またTFG蛋白質の多量体化に関与することを明らかにした。ALG-2とSec31Aペプチド複合体のX線結晶構造解析および両蛋白質の変異体解析による結合配列の精査により、新規ALG-2結合モチーフを提唱した。このモチーフ含有蛋白質の探索により、ER膜を貫通した新規ALG-2相互作用因子を発見した。ALG-2がCa<sup>2+</sup>応答性転写因子NFATの活性を抑制することを見出した。

研究成果の概要(英文)：In the early secretory pathway of proteins from the endoplasmic reticulum to the Golgi apparatus, Ca<sup>2+</sup>-dependent accumulation of ALG-2 to the endoplasmic reticulum exit sites bridges Sec31A, a component of COPII outer shell, and annexin A11 and retards transport of a model cargo membrane protein, and causes multimerization of the TFG protein. Refinement of the binding sequences by the X-ray crystal structural analysis of ALG-2 and the Sec31A peptide and by mutational analysis of both proteins, we propose a new ALG-2-binding motif. We searched proteins containing the motif and found a novel ALG-2 interacting proteins that passes through the ER membrane. ALG-2 was found to inhibit the activity of the Ca<sup>2+</sup>-dependent transcription factor NFAT.

研究分野：農学・農芸化学・応用生物化学

キーワード：カルシウム結合タンパク質 EF-ハンド 結合モチーフ 蛋白質間相互作用 小胞輸送

## 1. 研究開始当初の背景

Ca<sup>2+</sup>結合蛋白質であるALG-2は、5つのEFハンドをもつpenta-EF-handファミリーに属す。触媒ドメインをもたず、カルシウム依存的に様々な細胞内タンパク質と相互作用することにより、シグナル伝達、小胞輸送、アポトーシスをはじめ、多様な生理機能をもつと考えられているが、不明な点が多い。我々はCa<sup>2+</sup>存在下でALG-2が多胞体形成に関与するALIXとエンドソーム選別輸送複合体 (ESCRT)-Iとの間のアダプターとして安定な複合体を形成するモデルを提唱したが、アダプター機能が他の場合にも存在する可能性がある。小胞体—ゴルジ体間の輸送小胞であるCOPII小胞の被覆を構成するタンパク質であるSec31AにALG-2がCa<sup>2+</sup>依存的に結合することが明らかになっているが、その結合様式や生物学的意義は不明である。また、我々は先行研究において、ALG-2は核内にも存在してRNAプロセッシングに関与するCa<sup>2+</sup>-homeostasis and endoplasmic reticulum protein (CHERP)とCa<sup>2+</sup>依存的に相互作用し選択的スプライシングに関与することを明らかにしたが、他にも膜蛋白質や核内因子と結合することが推測され、新規ALG-2相互作用因子の探索が必要である。

## 2. 研究の目的

ALG-2がSec31AとともにCa<sup>2+</sup>依存性リン脂質結合蛋白質 annexin A11 (以下AnxA11)と相互作用することを念頭に、小胞体からゴルジ体への初期分泌過程における物質輸送システム制御の観点から、ALG-2のアダプター機能モデルを検証し、ALG-2の役割を生化学・構造生物学的および細胞生物学的に明らかにすること、そして、従来とは異なる方法に基づき、新規相互作用因子を探索し、ALG-2の新しい生理機能研究へ発展させる糸口を得ることを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) Sec31AとAnxA11の共免疫沈降実験をALG-2ノックダウン細胞およびALG-2発現細胞で行い、また、野生型と変異体ALG-2発現により、ALG-2結合能との関連を調べた。

(2) Sec31A、AnxA11、ALG-2の細胞内局在を免疫染色により共焦点顕微鏡を用いて解析した。

(3) 組換えTFG (野生型と変異体)とALG-2をCa<sup>2+</sup>存在下で架橋化試薬を用い反応させALG-2の重合化に及ぼす効果を解析した。

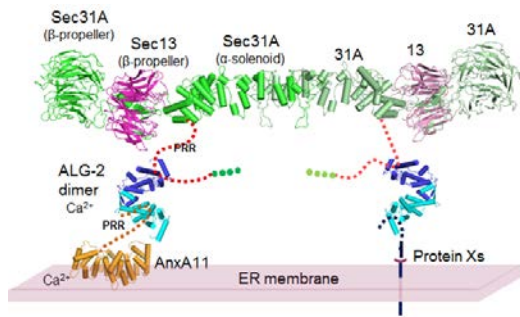
(4) X線結晶構造解析によりSec31AペプチドのALG-2結合部位を特定した。

(5) Sec31AにおけるALG-2結合部位8アミノ酸残基のGST融合蛋白質の各種変異体を大腸菌で発現させ、ビオチン標識ALG-2を用いてフアーウエスタンを行い、ALG-2との相互作用を半定量的に解析した。

(6) 新規ALG-2相互作用因子を探索するため、精密化したALG-2結合モチーフを含む蛋白質をヒト蛋白質配列データベースより抽出し、それら蛋白質の全長あるいは断片を緑色蛍光蛋白質 (GFP) と融合させた蛋白質をHEK293細胞に発現させた。そして、高輝度ルシフェラーゼ (プロメガ社製 nano luciferase, NLuc) で標識したALG-2をプローブとして用い、抗GFP抗体による免疫沈降産物のフアーウエスタン解析およびプルダウン解析を行い、ALG-2との結合能を調べた。

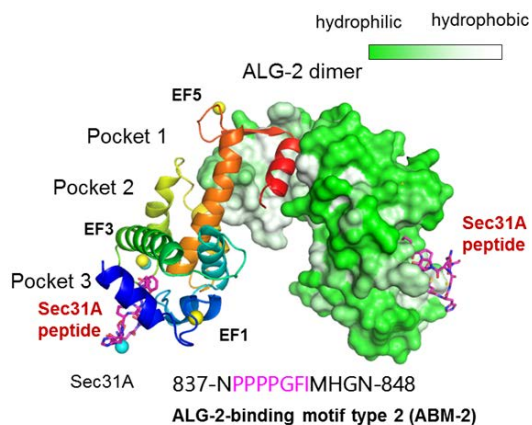
## 4. 研究成果

(1) 生化学的解析によりSec31AはCa<sup>2+</sup>/ALG-2存在下でAnxA11と相互作用すること、免疫染色解析によりALG-2とSec31Aの斑点状の共局在部位にはAnxA11も共局在すること、ALG-2がSec31AとAnxA11のCa<sup>2+</sup>依存的アダプターとして機能することが明らかになった。さらに、ALG-2が共局在していないAnxA11の斑点状部位にはSec31Aが存在しないことも、Sec31AとAnxA11の結合をALG-2



が橋渡しすることを支持する。一方、試験管内反応において、組換え TFG はオリゴマー化する性質をもつが、Ca<sup>2+</sup>/ALG-2 存在下でさらに重合化したことより、この現象も ALG-2 によるアダプター機能と考えられる。

(2) ALG-2相互作用因子ALIXがポケット1および2に結合することを既に報告していたが、今回、X結晶構造解析により



合成Sec31AオリゴペプチドはALG-2の疎水性ポケット3に結合した。また、ポケット3に位置するPhe85のAla置換変異体 (F85A) はSec31Aとの結合が消失したが、ALIXとの結合には影響を与えず、ALIXとSec31Aは異なる様式でALG-2の異なるポケットに結合することが明らかになった。

(3) Sec31AのALG-2結合部位の各種変異体解析によりALG-2結合モチーフ2型 (ABM-2) を以下のように定めた。[PΦ]PX[PΦ]G[FW]Ω (P、プロリン；Φ、疎水性；X、任意；Ω、側鎖の大きい残基)。

(4) UniProtヒト蛋白質配列データベースにおいてABM-2をもつ蛋白質を検索し、このモチーフが分泌蛋白質やオルガネラ内腔に存在す

るものを除外した上で、マウス配列との一致、Proの位置と数を指標にスコア化し、高いスコアのものについて動物細胞内で発現させ、ALG-2との相互作用を解析した結果、3つの新規相互作用候補を得た。これらの因子は、いずれも膜貫通蛋白質であった。網羅的な酵母Two-Hybrid法やアフィニティタグ免疫沈降・プルダウン産物の質量分析法による相互作用データベースに含まれておらず、従来法では見逃される因子の探索に本法は有用であった。さらに結合の最も強かった因子は、ストア作動性Ca<sup>2+</sup>流入の制御因子SARAFであり、ALG-2が新たな因子を介してCa<sup>2+</sup>シグナルや細胞内Ca<sup>2+</sup>恒常性維持制御に関わっている可能性が示唆された。

(5) 転写因子NFATもALIXやSec31AのALG-2結合モチーフと類似したProに富む領域をもつアイソフォームが存在し、ALG-2との結合が観察された。NFAT応答配列をもつレポーター系を用いて転写活性化測定を行った結果、ALG-2の過剰発現により転写が抑制され、その分子機構の解明が望まれる。

## 5. 主な発表論文等

研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計5件)

① Mutations in the vesicular trafficking protein annexin A11 are associated with amyotrophic lateral sclerosis. Smith BN., Topp S., Fallini C., Shibata H. (筆頭著者と同等貢献), その他49名, Maki M (44番目). *Sci Transl Med.* Vol. 9, No. 388. 2017, pii: ead9157. doi: 10.1126/scitranslmed.aad9157 査読有

② The calcium-binding protein ALG-2 promotes endoplasmic reticulum exit site localization and polymerization of Trk-

fused gene (TFG) protein. Kanadome T, Shibata H, Kuwata K, Takahara T, Maki M. *FEBS J*. Vol. 284, No. 1, 2017, 56-76. doi: 10.1111/febs.13949. 査読有

③ Multifaceted Roles of ALG-2 in Ca<sup>2+</sup>-Regulated Membrane Trafficking. Maki M, Takahara T, Shibata H. *Int J Mol Sci*. Vol. 17, No. 9, 2016, E1401. doi: 10.3390/ijms17091401. (総説) 査読有

④ Structural analysis of the complex between penta-EF-hand ALG-2 protein and Sec31A peptide reveals a novel target recognition mechanism of ALG-2. Takahashi T, Kojima K, Zhang W, Sasaki K, Ito M, Suzuki H, Kawasaki M, Wakatsuki S, Takahara T, Shibata H, Maki M. *Int J Mol Sci*. Vol. 16, No. 2, 2015, 3677-3699. doi: 10.3390/ijms16023677. 査読有

⑤ A new role for annexin A11 in the early secretory pathway via stabilizing Sec31A protein at the endoplasmic reticulum exit sites (ERES). Shibata H, Kanadome T, Sugiura H, Yokoyama T, Yamamuro M, Moss SE, Maki M. *J Biol Chem*. Vol. 290, No. 8, 2015, 4981-4993. doi: 10.1074/jbc.M114.592089. 査読有

[学会発表] (計 23 件)

① 松尾里奈、張維、寺西直樹、高原照直、柴田秀樹、牧正敏。結合モチーフに基づいたカルシウム結合タンパク質 ALG-2 の新規相互作用因子探索と同定。日本農芸化学会 2017 年度大会 2017 年 3 月 17 日—20 日 (京都女子大学)

② 犬飼隆太、鈴木千尋、京卓志、清水育実、高原照直、柴田秀樹、牧正敏。カルシウム結合タンパク質 ALG-2 とアポトーシス促進タ

ンパク質 CDIP1 と Scotin の相互作用。

日本農芸化学会 2017 年度大会 2017 年 3 月 17 日—20 日 (京都女子大学)

③ 新居裕美香、井上 国子、高原 照直、柴田 秀樹、牧 正敏。カルシウム結合タンパク質 ALG-2 は相互作用因子 MISSL と共同して分泌経路を制御する。第 39 回日本分子生物学会年会 2016 年 11 月 30 日—12 月 2 日 (パシフィコ横浜)

④ Zhang Z, Achiha T, Bao X, Matsuo R, Takahara T, Shibata H, Maki M. ALG-2 interacts with NFAT3 and inhibits transcriptional activation activity. The 14<sup>th</sup> International Meeting of the European Calcium Society, September 25-29, 2015 (Valladolid, Spain)

⑤ 松尾里奈、張維、高原照直、柴田秀樹、牧正敏。発光酵素 (NanoLuc luciferase) 融合タンパク質を用いた結合解析による ALG-2 の新規相互作用タンパク質の探索。日本農芸化学会第 177 回中部支部例会 2016 年 9 月 24 日 (名古屋大学)

⑥ 京卓志、桑田啓子、高原照直、牧正敏、柴田秀樹。カルシウム結合タンパク質 ALG-2 は TFG の多量体化と細胞内局在を制御する。日本農芸化学会第 177 回中部支部例会 2016 年 9 月 24 日 (名古屋大学)

⑦ 京卓志、桑田啓子、高原照直、牧正敏、柴田秀樹。カルシウム結合タンパク質 ALG-2 による初期分泌経路調節タンパク質 TFG の細胞内局在制御。日本農芸化学会 2016 年度大会 2016 年 3 月 27 日—3 月 30 日 (札幌コンベンションセンター)

⑧ 張維、鮑宣伯、高原照直、柴田秀樹、牧正敏。カルシウム結合蛋白質 ALG-2 と転写因子 NFAT1 の相互作用解析。BMB2015 2015 年 12 月 1 日—4 日 (神戸ポートアイランド)

⑨ 小島 亨介、松尾 里奈、高橋 健、高原 照直、柴田 秀樹、牧 正敏。ALG-2 相互作用タンパク質が ALG-2 と結合するための構造的

特性の再検討. BMB2015 2015年12月1日—4日(神戸ポートアイランド)

⑩ 松尾 里奈、小島 亨介、張 維、高橋 健、高原 照直、柴田 秀樹、牧 正敏. ALG-2の2型結合モチーフに基づいた新規相互作用タンパク質の探索. BMB2015 2015年12月1日—4日(神戸ポートアイランド)

⑪ 井上 国子、新居 裕美香、高原 照直、柴田 秀樹、牧 正敏. MISSLはカルシウム結合タンパク質ALG-2と共同して初期小胞輸送を制御する. BMB2015 2015年12月1日—4日(神戸ポートアイランド)

⑫ 京 卓志、桑田 啓子、高原 照直、牧 正敏、柴田 秀樹. カルシウム結合タンパク質ALG-2と小胞体—ゴルジ体間順行輸送調節タンパク質TFGの相互作用解析と局在観察. BMB2015 2015年12月1日—4日(神戸ポートアイランド)

⑬ 小島亨介、松尾里奈、張維、鮑宣白、高橋健、高原照直、柴田秀樹、牧正敏. Alu配列の一部がエクソン化されたタンパク質とALG-2の相互作用解析. 日本農芸化学会中部・関西支部合同大会 2015年9月19日—20日(富山県立大学)

⑭ 井上国子、新居裕美香、高原照直、柴田秀樹、牧正敏. カルシウム結合タンパク質ALG-2と相互作用するMISSLの初期小胞輸送における機能解析. 日本農芸化学会中部・関西支部合同大会 2015年9月19日—20日(富山県立大学)

⑮ 張維、鮑宣白、高原照直、柴田秀樹、牧正敏. カルシウム結合蛋白質ALG-2によるNFAT1の転写活性制御. 日本農芸化学会中部・関西支部合同大会 2015年9月19日—20日(富山県立大学)

⑯ 牧正敏. PEFドメインとMITドメイン—カルパインファミリーとESCR Tシステムとの接点. 第20回病態プロテアーゼ学会 シンポジウム 2015年8月21日—22日(グランコート名古屋)

⑰ 張維、小島亨介、佐々木桂奈江、川崎真依、高原照直、柴田秀樹、牧正敏. ストア作動性Ca<sup>2+</sup>流入負制御因子SARAFとカルシウム結合タンパク質ALG-2の相互作用. 日本生化学会中部支部例会 2015年5月23日(信州大学)

⑱ 松尾里奈、小島亨介、張維、高橋健、佐々木桂奈江、高原照直、柴田秀樹、牧正敏. カルシウム結合タンパク質ALG-2の2型結合モチーフに基づいた新規相互作用タンパク質探索. 日本農芸化学会2015年度大会2015年3月26日—29日(岡山大学)

⑲ 張維、小島亨介、佐々木桂奈江、川崎真依、高橋健、高原照直、柴田秀樹、牧正敏. ALG-2とストア作動性Ca<sup>2+</sup>流入負制御因子SARAFのCa<sup>2+</sup>依存的相互作用. 日本農芸化学会2015年度大会2015年3月26日—29日(岡山大学)

⑳ 張維、小島亨介、佐々木桂奈江、川崎真衣、高橋健、高原照直、柴田秀樹、牧正敏. 新たに定義した結合モチーフに基づいたカルシウム結合蛋白質ALG-2の新規相互作用蛋白質探索. 第87回日本生化学会大会 2014年10月15日—18日(京都国際会館)

㉑ 井上国子、高原照直、佐々木桂奈江、柴田秀樹、牧正敏. カルシウム結合タンパク質ALG-2の相互作用因子MISSLの機能解析. 第87回日本生化学会大会 2014年10月15日—18日(京都国際会館)

㉒ 小島亨介、高橋健、伊藤優、鈴木博紀、川崎政人、若槻壮一、高原照直、柴田秀樹、牧正敏. 変異体解析によるカルシウム結合タンパク質ALG-2とCOPII被覆構成因子Sec31Aの複合体構造モデルの検証. 第87回日本生化学会大会 2014年10月15日—18日(京都国際会館)

㉓ Kojima K, Sasaki K, Zhang W, Takahashi T, Takahara T, Shibata H, Maki M. Identification of novel Ca<sup>2+</sup>-dependent ALG-2-interacting transmembrane proteins

by search based on a newly defined binding motif. 13<sup>th</sup> International Meeting of the European Calcium Society. September 13-17, 2014 (Ax-en-Provence, France)

〔図書〕 (計 1 件)

① メンブレントラフィック — 膜・小胞による細胞内輸送ネットワーク

DOJIN BIOSCIENCE SERIES 福田光則・吉森保 編 (2016 年 化学同人)

「エンドソームでの輸送選別に働く ESCRT 装置」柴田秀樹、牧正敏 pp80-97

〔その他〕

ホームページ等

[http://profs.provost.nagoya-u.ac.jp/view/html/100003692\\_ja.html](http://profs.provost.nagoya-u.ac.jp/view/html/100003692_ja.html)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

牧 正敏 (MAKI, Masatoshi)  
名古屋大学・大学院生命農学研究科・教授  
研究者番号：40183610

### (2) 研究分担者

柴田 秀樹 (SHIBATA, Hideki)  
名古屋大学・大学院生命農学研究科・准教授  
研究者番号：30314470

### (3) 連携研究者

高原 照直 (TAKAHARA, Terunao)  
名古屋大学・大学院生命農学研究科・助教  
研究者番号：90708059

### (4) 研究協力者

若槻 壮市 (WAKATSUKI, Soichi)  
大学共同利用機関法人高エネルギー加速器  
研究機構・物質構造科学研究所・教授  
研究者番号：00332114

川崎 政人 (KAWASAKI, Masato)  
大学共同利用機関法人高エネルギー加速器  
研究機構・物質構造科学研究所・准教授  
研究者番号：00342600

鈴木 博紀 (SUZUKI, Hironori)  
大学共同利用機関法人高エネルギー加速器  
研究機構・物質構造科学研究所・研究員  
研究者番号：60595627

佐々木 (大杉) 桂奈江 (SASAKI-OSUGI, Kanae)  
名古屋大学・大学院生命農学研究科・  
大学院生 (博士課程後期課程・日本学術振興  
会特別研究員 DC2、PD)

高橋 健 (TAKAHASHI, Takeshi)  
名古屋大学・大学院生命農学研究科・  
大学院生 (博士課程後期課程)

京 卓志 (KANADOME, Takashi)  
名古屋大学・大学院生命農学研究科・  
大学院生 (博士課程後期課程・日本学術振興  
会特別研究員 DC1)

張 維 (ZHANG, Wei)  
名古屋大学・大学院生命農学研究科・大学院  
生 (博士課程後期課程)

小島 享介 (KOJIMA, Kyosuke)  
名古屋大学・大学院生命農学研究科・  
大学院生 (博士課程前期課程)

松尾 里奈 (MATSUO, Rina)  
名古屋大学・大学院生命農学研究科・  
大学院生 (博士課程前期課程)