

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月 5日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20380059

研究課題名（和文）

アポトーシス関連タンパク質 ALG-2 のカルシウム依存的アダプター機能解析

研究課題名（英文）Analysis of calcium-dependent adaptor function of apoptosis-associated protein ALG-2

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

研究成果の概要（和文）：カルシウム結合タンパク質 ALG-2 とその相互作用タンパク質 Alix の結合部位ペプチドとの複合体の X 線結晶構造を解析し、カルシウム依存的結合の分子基盤を明らかにした。ALG-2 の二量体はそれぞれ単量体分子に結合部位をもち、Alix と TSG101 をカルシウム存在下で結合させアダプターとして機能することが判明した。また、Sec31A とアネキシン A11 との橋渡しにも関与することが分かった。

研究成果の概要（英文）：X-ray crystal structure of the complex between the Ca^{2+} -binding protein ALG-2 and the binding peptide of its interacting protein Alix was resolved, and the molecular basis of the Ca^{2+} -dependent binding was elucidated. The ALG-2 dimer has one binding site in its monomer molecule, and was found to function as an adaptor to bridge Alix and TSG101 in the presence of Ca^{2+} . It was also found that ALG-2 bridges Sec31A and annexin A11.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	6,300,000	1,890,000	8,190,000
2009年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
2010年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
総計	14,900,000	4,470,000	19,370,000

研究分野：生化学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用生物化学

キーワード：カルシウム 分子認識機構 タンパク質構造

1. 研究開始当初の背景

本研究の中心的なタンパク質である ALG-2 は、マウス T 細胞のアポトーシス関連因子として、1996 年米国 NIH の Vito らによってクローニングされたカルシウム結合蛋白質である。そして、ALG-2 が Alix と Ca^{2+} 依存的に相互作用することが 1999 年に欧米の 2 グループより報告されたが、2003 年に申請者らは Alix の相互作用因子として CHMP4 を同定し、この因子が ESCRT(endosomal sorting complex required for transport)-III の構成因子として、エンドサイトーシスにより細胞内

に取り込まれた EGF・EGF 受容体複合体がエンドソームからリソソームへ輸送される多胞性エンドソーム経路で CHMP6 や CHMP7 などとともに下方制御に関わっていることを明らかにしてきた。また、ESCRT-I 構成因子である TSG101 は Alix の PSAP 配列含有領域と直接結合すると報告され、我々は、2005 年に ALG-2 が TSG101 と結合すること、そして、2007 年に TSG101 と Alix の結合が Ca^{2+} 存在下で増強することを見出していたが、両因子の結合における ALG-2 の役割は不明であった。一方、ALG-2 相互作用因子として、リン脂質結合タンパク質アネキシン 7、

11 (2002 年)、ER-Golgi 輸送に関与する Sec31A (2007 年) に明らかにしていた。ALG-2 は、カルシウム依存性プロテアーゼであるカルパインの大小サブユニットと同様に EF-hand (約 30 残基を単位とした Ca^{2+} -結合性 helix-loop-helix モチーフ) を 5 つ連続してもつ penta-EF-hand (PEF) タンパク質に属す。2001 年、 Ca^{2+} 結合型 ALG-2 の X 線結晶解析がカナダのグループにより行われ、立体構造はカルパインの PEF ドメインと基本的に類似していることが報告されたが、ALG-2 がカルシウム依存的に相互作用因子をどのように認識するのか、不明のままであった。

2. 研究の目的

図2 ALG-2 の Alix と TSG101 の橋渡しモデルと結合部位

本研究は、準備段階で新たに ALG-2 相互作用因子として脂質二重層の内外葉間でリン脂質の相互転移 (flip-flop) を起こさせる Phospholipid scramblase 3 (PLSCR3) を発見したことを契機に、ALG-2 がどのような仕組みで標的タンパク質に結合するのか、その認識機構の分子基盤を明らかにすること、ならびに結合することの生理的意義を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) PLSCR3 の N 末端に存在する 2 つの ALG-2 結合部位のうちのひとつの配列 ABS-2 のオリゴペプチドを固定したカラムを用いて、大腸菌で発現させた組換え体ヒト ALG-2 をカルシウムイオン存在下で吸着、EGTA で溶出させるアフィニティ精製を行った。X 線結晶構造解析のための結晶化には十分な純度であった。ALG-2 の N 末端 23 残基は Pro や Gly に富んでおり、構造解析には不都合と予想されたので、N 末端 2-20 および 2-23 を欠損させた変異体も発現させた。また、天然に存在する ALG-2 アイソフォーム Δ GF122 は、ALIX とは結合しないが PLSCR3 の ABS-2 には結合することを利用して、同様にアフィニティ精製した。

(2) 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の結晶化ロボットをもちいて、各種条件下で結晶を作製した。得られた結晶化条件をさらに詳細に検討してマニュアルで結晶を作製し、形状のよい結晶を X 線回折実験に供した。X 線回折データを所定の解析ソフトを用い、分子置換法により 3D 構造を決定した。結合に関与している残基の裏付け実験として、ALG-2 の変異体、ならびに ALIX ペプチドの変異体を作製し、結合実験により

確かめた。

(3) ALG-2 と標的因子の相互作用解析には、SPR バイオセンサー (BIAcore2000)、GST-プルダウン、Strep-プルダウン、共免疫沈降およびウェスタンブロット、ビオチン標識 ALG-2 を用いたオーバーレーアッセイ (ファーウェスタン) の組合せにより行った。

4. 研究成果

(1) ALG-2 と ALIX ペプチドとの複合体の共結晶化はカルシウムイオン存在下では成功せず、亜鉛イオン存在下で成功した。X 線結晶構造解析の結果、亜鉛イオンはカルシウムイオンと同様に EF-hand に両 5 角錐 (bidentate pyramid) 結合様式で結合していた。ALIX ペプチドは EF2、EF3、EF4、EF5 のそれぞれ一部と二量体の他の分子由来の Y180 で形成される 2 つの疎水ポケット (Pocket1, Pocket2) に入っていた (図 1)。ALG-2 の金属非結合型、 Ca^{2+} 結合型、 Zn^{2+} 結合型の構造の解明にも成功し、これらの構造を

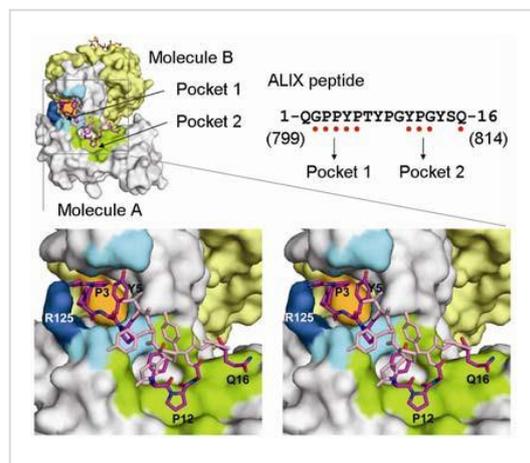


図1 ALG-2 と ALIX ペプチド複合体の X 線結晶構造

比較したところ、R125 の側鎖は Pocket1 の入り口に位置し、金属非結合型ではポケットを塞いでいるが、金属結合型では側鎖の向きがずれてポケットが開くことにより、ペプチドが結合できることが判明し、EF3/ Ca^{2+} -アルギニンスイッチ機構として提唱した。

(2) ALG-2 アイソフォーム Δ GF122 のカルシウム結合型の構造も解明に成功した。このアイソフォームはカルシウムが結合しても R125 側鎖が Pocket1 を塞いでいるために、ALIX と結合できないと結論した。ポケットを塞ぐ原因は F122 に大きな側鎖が存在するためではなく、主鎖が 2 残基欠損によって空間的位置がずれることが原因となっている。F122 を Ala や Gly に置換した F122A 変異体、F122G 変異体ではむしろ結合が強くなった。

(3) ALIXのC末端領域はProに富んでおり、その PSAP 配列は ESCRT-I 構成成分である TSG101 と結合することが報告されていた。動物培養細胞の抽出液を用いたプルダウンアッセイで、Strep タグ付加 ALIX はカルシウムイオン存在下で TSG101 と結合するが、ALG-2 の存在が必要であり、RNA 干渉法によって ALG-2 発現レベルを下げてやると結合は観察されなくなった。さらに、野生型 ALG-2 を補った場合は、結合が回復したが、二量体形成

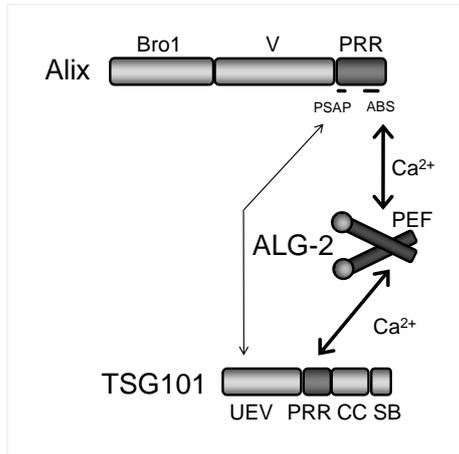


図2 ALG-2のAlixとTSG101の橋渡しモデルと結合部位

やALIXとの結合に必要なALG-2 Tyr180をAlaに置換した変異体では結合は見られなかった。さらに、ALG-2結合部位欠損変異体ではALG-2/Ca²⁺存在下でも結合は消失した。以上のことから、ALG-2はALIXとTSG101の結合を増強させる役割があることが判明し、ALG-2がカルシウム依存性のアダプタータンパク質として機能していることが明らかとなった(図2)。また、ESCRT-I構成因子のうち、TSG101ばかりでなく、VPS37B、VPS37CもPRRをC末端領域にもち、ALG-2と結合することも明らかになった。従ってALG-2はAlixとESCRT-Iを結び付ける役割があると予想される。

(4) 新規相互作用因子の探索

ALG-2と結合する新規相互作用因子を探索するため、公共のタンパク質データベースよりProに富む配列をもつタンパク質のうち、さらにALG-2結合モチーフ1(ALG-2-binding motif 1, ABM1, PXPYP₃₋₅YP)およびABM2(PXPGF)をもつ配列をパーソナルコンピュータ上で解析できるプログラムXaaRR-Scanを委託して作成した。これにより抽出した相互作用因子候補タンパク質のPro-rich region (PRR)をcDNAライブラリーおよび購入したcDNAを鋳型にしてPCRクローニングし、緑色蛍光タンパク質EGFPに融合させ、HEK293細胞

で発現させたのち、GFP抗体で免疫沈降させ、SDS-PAGEで分離後PVDF膜に転写し、biotin標識ALG-2をプローブとしてFar Western解析を行った。この結果ALG-2と相互作用するタンパク質候補複数を新たに見出した。これらのうち、細胞質においてP-bodyと称されるRNAとの複合体を形成してmRNAの安定性、翻訳制御に関わっているPAT-L1についてALG-2との相互作用をさらに詳細に解析した。PAT-L1の抗体を作製し、免疫沈降に供したところ、ALG-2とPAT-L1が共免疫沈降した。さらに、HeLa細胞において、共焦点レーザー顕微鏡を用いて間接免疫蛍光観察を行ったところ、ALG-2と細胞質において共局在することが判明した。

(5) ALG-2の小胞体出芽部位(ER-exit site)への局在のリアルタイム解析

粗面小胞体で合成されたタンパク質は、小胞体からゴルジ体へ輸送されるが、運ばれるタンパク質(積荷分子)は小胞体上の出芽部位(ER exit site, ERES)でCOPII小胞に取り込まれる。Sec31AはCOPII小胞の構成因子であり、ALG-2と結合するが、Sec31Aのアミノ酸配列上で結合に必要な十分領域を同定した。この領域にはPPPGF配列が存在し、PLSCR3ですでに同定していた結合配列と同様なモチーフをもつことより、ALG-2 binding motif (ABM-2)をPxPGFと規定した。一方、共焦点レーザー顕微鏡を用いて、蛍光タンパク質融合させたALG-2をHeLa細胞に発現させ、ヒスタミン処理するとALG-2がカルシウムイオン濃度の上昇と一致して周期的にERESに蓄積することを見出した。

(6) ALG-2のカルシウム依存性アダプター機能作用の第2例の探索

ALG-2がALIXとESCRT-Iのアダプターとして機能していることを見出したが、それ以外の例として、アネキシンA11とSec31Aの相互

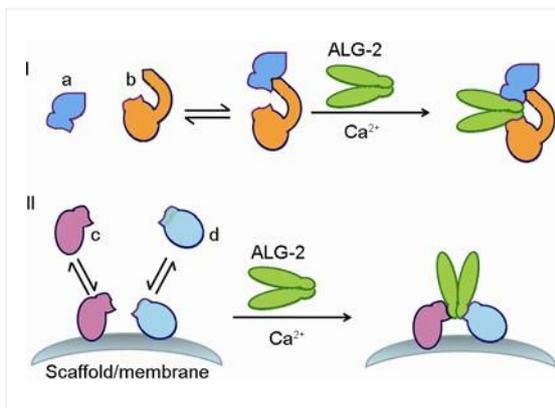


図3 アダプターモデルの2つの例

作用の可能性を解析した。Strep タグ付加タ

ンパク質によるブルダウンアッセイにより Sec31A と アネキシン A11 がカルシウムおよび ALG-2 存在下で相互作用する結果が得られた。アネキシンはカルシウム依存性リン脂質結合タンパク質であり、小胞体膜上で Sec31A、ALG-2 の三者が会合していることが示唆された。

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 7 件)

- ① Suzuki H, Kawasaki M, Inuzuka T, Okumura M, Kakiuchi T, Shibata H, Wakatsuki S, Maki M, Structural basis for Ca²⁺-dependent formation of ALG-2/Alix peptide complex: Ca²⁺/EF3-driven arginine switch mechanism. *Structure*, 査読有, Vol. 16, No.2, 2008, pp.1562-1573.
- ② Suzuki H, Kawasaki M, Kakiuchi T, Shibata H, Wakatsuki S, Maki M, Crystallization and X-ray diffraction analysis of N-terminally truncated human ALG-2. *Acta Crystallogr F*, 査読有, Vol. 64, No. 11, 2008, pp.974-977.
- ③ Suzuki H, Kawasaki M, Inuzuka T, Okumura M, Kakiuchi T, Shibata H, Wakatsuki S, Maki M, The mechanism of Ca²⁺-dependent recognition of Alix by ALG-2: insights from X-ray crystal structures. *Biochem Soc Trans*, 査読無, Vol. 37, No. 1, 2009, pp.190-194.
- ④ Okumura M, Ichioka F, Kobayashi R, Suzuki H, Yoshida H, Shibata H, Maki M, Penta-EF-hand protein ALG-2 functions as a Ca²⁺-dependent adaptor that bridges Alix and TSG101. *Biochem Biophys Res Commun*. 査読有, Vol. 386, No. 1, 2009, pp.237-241.
- ⑤ Inuzuka T, Suzuki H, Kawasaki M, Shibata H, Wakatsuki S, Maki M, Molecular basis for defect in Alix-binding by alternatively spliced isoform of ALG-2 (ALG-2^{ΔGF122}) and

structural roles of F122 in target recognition. *BMC Struct Biol*. 査読有, Vol. 10, 2010, 25(pp1-14).

- ⑥ Shibata H, Inuzuka T, Yoshida H, Sugiura H, Wada I, Maki M, The ALG-2 binding site in Sec31A influences the retention kinetics of Sec31A at the endoplasmic reticulum exit sites as revealed by live-cell time-lapse imaging. *Biosci Biotechnol Biochem*, 査読有, Vol. 74, No. 9, 2010, pp.1819-1826.
- ⑦ Maki M, Suzuki H, Shibata H, Structure and function of ALG-2, a penta-EF-hand calcium-dependent adaptor protein. *Sci China Life Sci*. 査読有, Vol. 54, No. 8, 2011, 770-779.

[学会発表] (計 29 件)

- ① Suzuki H, Kawasaki M, Inuzuka T, Kakiuchi T, Shibata H, Wakatsuki S, Maki M, X-ray crystal structural analysis of ALG-2/Alix peptide complex. *Biochemical Society Focused Meeting ESCRT from cell biology to pathology*. August 26-28, 2008, Cambridge, UK
- ② Okumura M, Ichioka I, Inuzuka T, Suzuki H, Kobayashi R, Shibata H, Maki M, Roles of ALG-2 in the calcium-dependent interaction between endosomal sorting regulators Alix and TSG101, *Biochemical Society Focused Meeting ESCRT from cell biology to pathology*. August 26-28, 2008, Cambridge, UK
- ③ Suzuki H, Kawasaki M, Inuzuka T, Kakiuchi T, Shibata H, Wakatsuki S, Maki M, Elucidation of the calcium-dependent interaction mechanism between ALG-2 and Alix by X-ray crystallographic analysis. *ECS meeting Leuven, Belgium*, September 17-20,

- 2008
- ④ Inuzuka T, Suzuki H, Kawasaki M., Kakiuchi T, Shibata H, Wakatsuki S, Maki M, Identification of critical residues in Alix for ALG-2 binding. ECS meeting Leuven, Belgium, September 17-20, 2008
- ⑤ 犬塚達俊、鈴木博紀、川崎政人、垣内武志、人見清隆、柴田秀樹、若槻壮一、牧正敏
EF-hand 型カルシウム結合タンパク質ALG-2アイソフォームの結晶構造解析、第31回日本分子生物学会・第81回日本生化学会合同大会 神戸ポートアイランド、2008年12月9日-12日
- ⑥ 奥村真弓、市岡史高、小林亮太、柴田秀樹、人見清隆、牧正敏、Alix と ESCRT 構成因子 TSG101 のカルシウム依存的相互作用における ALG-2 の役割、第31回日本分子生物学会・第81回日本生化学会合同大会 神戸ポートアイランド、2008年12月9日-12日
- ⑦ 奥村真弓、市岡史高、犬塚達俊、柴田秀樹、人見清隆、牧正敏、ESCRT-I 構成因子 TSG101 と Alix の相互作用における ALG-2 のカルシウム依存的アダプターとしての役割、日本農芸化学会 2009年3月27日-29日 (福岡マリンメッセ)
- ⑧ 犬塚達俊、鈴木博紀、川崎政人、垣内武志、人見清隆、柴田秀樹、若槻壮一、牧正敏、X線結晶構造解析による ALG-2 アイソフォーム間の構造的差異、日本農芸化学会 2009年3月27日-29日 (福岡マリンメッセ)
- ⑨ 大杉桂奈江、垣内武志、人見清隆、柴田秀樹、鈴木博紀、牧正敏、オーバーレイ法による ALG-2 相互作用因子の結合領域解析、日本農芸化学会 2009年3月27日-29日 (福岡マリンメッセ)
- ⑩ 犬塚達俊、鈴木博紀、川崎政人、人見清隆、柴田秀樹、若槻壮一、牧正敏
アポトーシス関連因子 ALG-2 アイソフォームの構造基盤に基づいた相互作用因子の認識機構、第 82 回日本生化学会大会 2009年10月21日~24日 神戸ポートアイランド
- ⑪ 大杉桂奈江、野村ともみ、鈴木博紀、人見清隆、柴田秀樹、牧正敏、バイオインフォマティクスの手法を用いた新規 ALG-2 相互作用因子の探索、第 82 回日本生化学会大会 2009年10月21日~24日 神戸ポートアイランド
- ⑫ 柴田秀樹、杉浦洋文、吉田暖奈、横山 健、人見清隆、牧正敏、小胞体の COPII 小胞出芽部位における ALG-2 のカルシウム依存的アダプター機能の解析、第 82 回日本生化学会大会 2009年10月21日~24日 神戸ポートアイランド
- ⑬ 大杉桂奈江、野村知美、鈴木博紀、人見清隆、柴田秀樹、牧正敏、ALG-2 結合モチーフに基づいた新規 ALG-2 相互作用因子の探索、日本農芸化学会 2010年大会(東京大学駒場キャンパス)2010年3月27-30日
- ⑭ Okumura M, Osugi K, Inuzuka T, Katsuyama A, Shibata H, Sundquist W, Maki M, Penta-EF-hand protein ALG-2 functions as a Ca²⁺-dependent adaptor that bridges ALIX and ESCRT-I. Biochemistry and Cell Biology of ESCRTs in Health and Disease, Snowbird Resort, Snowbird, UT, USA, October 14 - October 17, 2010
- ⑮ 柴田秀樹、杉浦洋文、横山健、西川昌希、人見清隆、牧正敏、Sec31Aの小胞体の輸送小胞出芽部位の局在化におけるカルシウム結合蛋白質の必要性、第 83 回日本生化学会大会(第 33 回分子生物学会合同大

会)神戸国際会議場 2010年12月7日-10日

- ⑩ 犬塚達俊、人見清隆、柴田秀樹、牧正敏、ミトコンドリア局在型リン脂質 scramblase3 の細胞内局在に対するパルミトイル化の影響、第83回日本生化学会大会(第33回分子生化学会合同大会)神戸国際会議場 2010年12月7日-10日
- ⑪ 大杉桂奈江、鈴木博紀、人見清隆、柴田秀樹、牧正敏、P-body 構成因子 PATL1 と ALG-2 のカルシウム依存的相互作用解析、第83回日本生化学会大会(第33回分子生化学会合同大会)神戸国際会議場 2010年12月7日-10日
- ⑫ 大杉桂奈江、人見清隆、柴田秀樹、牧正敏、カルシウム結合タンパク質 ALG-2 と P-body 構成因子 PATL1 の細胞内局在解析、日本農芸化学会 2011年大会(京都女子大学)2011年3月25-28日
- ⑬ 井元千晶、大杉桂奈江、人見清隆、柴田秀樹、牧正敏、ALG-2 と SCAF6/CHERP のカルシウム依存的相互作用解析、日本農芸化学会 2011年大会(京都女子大学)2011年3月25-28日
- ⑭ 奥村真弓、前本祐樹、柴田秀樹、人見清隆、牧正敏、ESCRT-III 関連因子 IST1 とカルシウム結合蛋白質 ALG-2 の相互作用解析、日本農芸化学会 2011年大会(京都女子大学)2011年3月25-28日

[図書] (計0件)

[産業財産権]

- 出願状況 (計0件)
○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

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

なし ()
研究者番号：

(3)連携研究者

人見 清隆 (HITOMI KIYOTAKA)
名古屋大学・大学院生命農学研究科・准教授
研究者番号：00202276

柴田 秀樹 (SHIBATA HIDEKI)
名古屋大学・大学院生命農学研究科・助教
研究者番号：30314470

(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・教授
研究者番号：00342600

鈴木 博紀 (SUZUKI HIRONORI)
名古屋大学・大学院生命農学研究科・大学院生 (日本学術振興会特別研究員)
現在、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

犬塚 達俊 (INUZUKA TATSUTOSHI)
名古屋大学・大学院生命農学研究科・大学院生 (日本学術振興会特別研究員)

奥村 真弓 (OKUMURA MAYUMI)
名古屋大学・大学院生命農学研究科・大学院生 (日本学術振興会特別研究員)

大杉 桂奈江 (OSUGI KANAE)
名古屋大学・大学院生命農学研究科・大学院生