

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 26 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23380056

研究課題名(和文)細胞内物流システム制御におけるカルシウム依存性アダプター蛋白質ALG-2の役割

研究課題名(英文)Roles of calcium-dependent adaptor protein ALG-2 in regulation of intracellular delivery system

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) 14,600,000円、(間接経費) 4,380,000円

研究成果の概要(和文)：ALG-2の新規相互作用因子を新たに同定し、生化学的、細胞生物学および構造生物学的解析を行い、(1)CHERPは核スペckルに集積しているが、生細胞蛍光イメージングによりALG-2がカルシウム刺激に応答して核スペckルに動員され、CHERP、ALG-2ともにIP3R1前駆体mRNAの選択的スプライシングに関与していること、(2)小胞体-ゴルジ体間の輸送小胞COPIIの被覆を構成する蛋白質Sec31AがもつALG-2結合モチーフ2型の結合部位がポケット3であり、1型モチーフの結合部位とは異なること、(3)ESCRTタンパク質VPS37B、VPS37CおよびIST1と結合することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Several new interacting proteins of calcium-binding protein ALG-2 were identified. By biochemical, cell biological and structure biological analyses, following new findings have been made: (1) CHERP is localized in the nucleoplasm, particularly, enriched at nuclear speckles, and ALG-2 accumulates to the nuclear speckles in response to calcium as revealed by live-cell fluorescence microscopic analysis. CHERP and ALG-2 are involved in alternative splicing of inositol-1, 4, 5-trisphosphate receptor 1 (IP3R1) pre-mRNA; (2) ALG-2 binding motif 2, which is present in Sec31A, a component of ER-Golgi transport vesicle COPII, was found to bind Pocket 3, a different binding site for type 1 motif; (3) ALG-2 binds to VPS37B, VPS37C and IST1, which are ESCRT (endosomal sorting complex required for transport) proteins.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用生物化学

キーワード：カルシウム結合蛋白質 分子認識機構 核スペckル 選択的スプライシング カルシウム応答 細胞内局在

1. 研究開始当初の背景

Ca²⁺結合蛋白質であるALG-2は、Ca²⁺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、5つのEFハンドをもつpenta-EF-handファミリーに属す(発表論文6)。しかし、触媒ドメインはもたず、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、アポトーシスや細胞分裂制御をはじめ、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。細胞膜表面上の受容体であるEGFレセプターは、エンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれたのち、リサイクリングされるか、あるいは多胞性エンドソーム(Multivesicular body、MVB)を経てリソソームで分解されるか、初期エンドソームにおいて選別される。この選別輸送複合体ESCRT(endosomal sorting complex required for transport)システムの構成因子および制御因子のうちTSG101とALIXは互いに弱く結合するが、それぞれがALG-2相互作用因子であり、我々はCa²⁺存在下でALG-2が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(発表論文8)。また、小胞体(ER)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Ca²⁺依存的に結合することが明らかになっているが、その生物学的意義は不明のままである。

2. 研究の目的

本研究は、(1)ESCRTシステムおよびERゴルジ体間輸送における物流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、(2)新たに相互作用因子を探索し、ALG-2の新しい生理機能を見出すとともに、ALG-2の作用原理の普遍性を明らかにすることを目的として遂行した。

3. 研究の方法

(1)ESCRT-I複合体の4つのサブユニットTSG101、VPS37、VPS28、MVB12の培養動物細胞共発現系を用いてALIXとESCRT-I複合体との結合解析を免疫沈降法、GST-ALG-2プルダウン法により解析した。また、米国ユタ大学Sundquist博士の協力を得て、精製標品の試験管内での結合を解析した。

(2)COPII小胞はER膜より出芽し、ALG-2が出芽部位(ER-exit site, ERES)に集積する。Ca²⁺依存性酸性リン脂質結合タンパク質であるannexin A11(AnxA11)がALG-2の相互作用因子であることは既に明らかとなっていたが、ALG-2がアダプターとして働く場合のSec31Aの相手の分子である可能性を調べるため、共免疫沈降実験ならびにStrepタグを付加したSec31Aとの結合を解析するためのStrep-Tactinビーズを用いたプルダウンアッセイを行った。

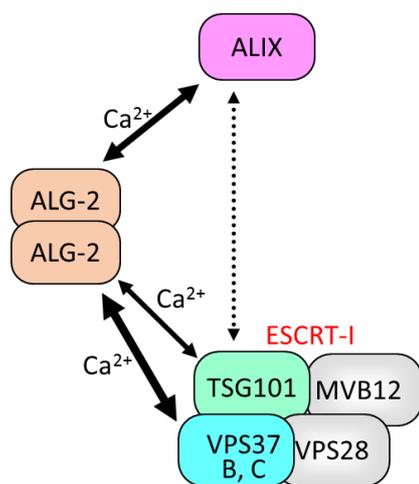
(3)ALG-2結合モチーフ2型の結合部位を予測するため、コンピューターによるポケット予測を行った。また、Sec31AのALG-2結合領域のペプチドの合成を委託して入手し、精製した組換え体ALG-2との複合体の結晶を大学共同利用機関法人高エネルギー加速器研究機構・物質構造科学研究所の結晶化ロボットをもちいて、各種条件下で作製した。得られた結晶化条件をさらに詳細に検討してマニュアルで結晶を作製し、形状のよい結晶をX線回折実験に供した。

(4)これまでに推定していたALG-2結合モチーフと相同なアミノ酸配列をもつタンパク質をUniProt/SwissProtデータベースより抽出し、有望な候補とGFP融合タンパク質を培養動物細胞で発現させ、免疫沈降産物のビオチン標識ALG-2を用いたFar WesternによりALG-2結合能を判定した。

(5) Ca²⁺依存性的ALG-2の経時的局在変化を調べるため、ALG-2-mCherryを培養動物細胞に発現させ蛍光顕微鏡により生細胞観察した。Ca²⁺濃度変化はRFP-GECOを同時に発現させ蛍光変化をモニターした。

4. 研究成果

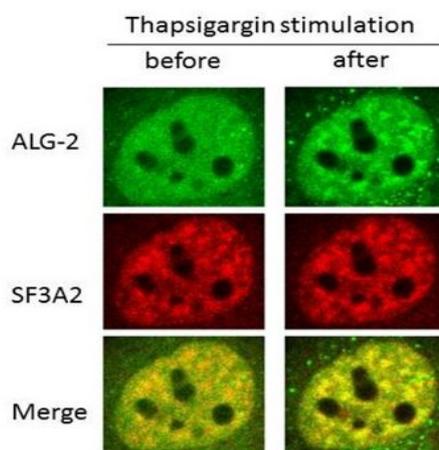
(1) ESCRT-I 構成サブユニットのひとつである VPS37 には遺伝子の異なる 4 つのアイソフォーム (A ~ D) が存在するが、VPS37B と VPS37C が ALG-2 と結合することを明らかにした。これまで ALIX と ESCRT-I の結合は TSG101



を介して行われると考えられていたが、さらに ALG-2 と VPS37 が介在し、三者複合体形成効率の高低は VPS37 アイソフォームに依存することが判明した(発表論文 2)。また、ALG-2 は ESCRT-I 構成因子である CHMP ファミリーと相溶性のある IST1 とも相互作用することも明らかとなった(発表論文 3)。

(2) ALG-2結合モチーフに基づくデータベース検索と発現タンパク質の Far West ern解析により10の新規相互作用因子候補が見出され、そのうちPATL1とCHERPについて詳細に解析した。PATL1は細胞質に斑点状に存在する P body (RNA processing body)の構成因子であり、ALG-2はCa²⁺刺激をしなくても斑点状に共局在していた

(発表論文 7)。一方、CHERP (Ca²⁺ homeostasis and endoplasmic reticulum protein)はER膜貫通タンパク質として報告されていたが、CHERPはRSドメインをもつSRスーパーファミリーに属し、特異抗体を用いた蛍光免疫染色ならびに蛍光タンパク質融合体の生細胞観察の結果、核質に存在し特に核スペckルに集積していること、ALG-2はCa²⁺に依存してSF3A2などスプライシング制御因子が豊富に存在する核スペckルに集積することが判明した。



また、CHERPとALG-2が転写途中のRNAポリメラーゼ複合体に結合し、イノシトール-1,4,5-三リン酸受容体1 (IP₃R1) 前駆体 mRNAの選択的スプライシングに与していることが明らかとなった(発表論文 1)。CHERPが従来、小胞体に存在する膜貫通タンパク質と報告されていたが、核内で機能することを初めて明らかにした点で、今後のさらなる研究展開が期待される。

(3) RNA干渉法によるALG-2の発現抑制細胞を用いて、AnxA11とSec31Aの相互作用にはALG-2とCa²⁺の共存が必要であり、ALG-2が両者のアダプターとして働いていることが明らかとなった。また、蛍光タンパク質融合Sec31AのFRAP (Fluorescence recovery after photo bleaching)解析や輸送解析モデル膜タンパク質VSV-G ts045-SGF P2の糖鎖修飾の生化学的解析を行った結

果、ALG-2あるいはAnxA11の発現抑制はERからゴルジ体への輸送に影響を与えることが観察され、両者はCOPII小胞のERからの離脱を抑制していることが示唆された (Shibata et al. 投稿準備中)。ALG-2ならびに相互作用因子が細胞内物質流通の調節に関わっていることが示された。

(4) コンピューター解析によりPLSCR3分子中に存在する2型モチーフ配列のモデルペプチドの結合部位を予測したところ、ポケット3と最も安定にドッキングすることが予測された。これはポケット3に位置するALG-2アミノ酸置換変異体の結合解析結果によって支持された(発表論文5)。

一方、Sec31AペプチドとALG-2の複合体のX線結晶構造解析を行った。ALIXペプチドが疎水性ポケット1とポケット2に結合することは既に判明していたが、Sec31Aペプチドはポケット3に結合していた。前者が1型モチーフ (PPYPXnYP, X、任意のアミノ酸残基、n=3-5) をもつものに対して、後者はPXPGFをもち、モチーフの相違は結合ポケットの相違によって裏付けられた (Takahashi et al. 投稿準備中)。

(5) 2型モチーフ配列の各種変異体とALG-2のFar Westernによる半定量的結合解析を行い、モチーフの精密化を行った。PXPGFよりも前後に位置するアミノ酸残基の重要性も判明した (P/ PXPGF、疎水性残基、長側鎖残基、X、任意)。そして新しく定義した2型モチーフを基にデータベースを検索し直した結果、幾つかの有望な新規候補が得られた。特に膜貫通タンパク質であるSARAFはCa²⁺依存的にALG-2と結合し、細胞内においてCa²⁺刺激により共局在することも判明した。一方、PLSCR3は上記モチーフには完全には一致しないが、モチーフのC末端側の残基が結

合能増加に寄与していることが判明した。

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8件)

- 1 Sasaki-Osugi K, Imoto C, Takahara T, Shibata H, Maki M. Nuclear ALG-2 protein interacts with Ca²⁺ homeostasis endoplasmic reticulum protein (CHERP) Ca²⁺-dependently and participates in regulation of alternative splicing of inositol trisphosphate receptor type 1 (IP₃R1) pre-mRNA. J Biol Chem, 査読有, Vol. 288, No. 46, 2013, pp33361-33375.
- 2 Okumura M, Katsuyama AM, Shibata H, Maki M. VPS37 isoforms differentially modulate the ternary complex formation of ALIX, ALG-2, and ESCRT-I. Biosci Biotechnol Biochem, 査読有, Vol. 77, No. 8, 2013, pp1715-1721.
- 3 Okumura M, Takahashi T, Shibata H, Maki M. Mammalian ESCRT-III-related protein IST1 has a distinctive Met-Pro repeat sequence that is essential for interaction with ALG-2 in the presence of Ca²⁺. Biosci Biotechnol Biochem. 査読有, Vol. 77, No. 5, 2013, pp1049-1054.
- 4 Inuzuka T, Inokawa A, Chen C, Kizu K, Narita H, Shibata H, Maki M. ALG-2-interacting Tubby-like protein superfamily member PLSCR3 is secreted by exosomal pathway and taken up by recipient cultured cells. Biosci Rep, 査読有, Vol. 33, No. 2, 2013, art: e00026, doi: 10.1042/BSR20120123.
- 5 Takahashi T, Suzuki H, Inuzuka T, Shibata H, Maki M. Prediction of a new ligand-binding site for type 2 motif based on the crystal structure of ALG-2 by dry and wet

approaches. Int J Mol Sci 査読有, Vol. 13, No. 6, 2012, pp7532-7549.

doi: 10.3390/ijms13067532

- 6 Maki M, Maemoto Y, Osako Y, Shibata H. Evolutionary and physical linkage between calpains and penta-EF-hand Ca^{2+} -binding proteins. FEBS J. 査読有, Vol. 279, No. 8, 2012, 1414-1421. (総説)
- 7 Osugi K, Suzuki H, Nomura T, Ariumi Y, Shibata H, Maki M, Identification of the P-body component PATL1 as a novel ALG-2-interacting protein by in silico and Far-Western screening of proline-rich proteins. J Biochem, 査読有, Vol.151, No. 6, 2012, pp657-666.
- 8 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. (総説)

[学会発表](計16件)

井上国子 高原照直 佐々木桂奈江 柴田秀樹, 牧正敏, カルシウム動態に応じた機能未知タンパク質MISSLのALG-2結合と細胞内局在解析、日本農芸化学会大会、2014年3月27日-30日、明治大学生田キャンパス

小島亨介、高橋健、伊藤優、佐々木桂奈江、川崎真依、張維、高原照直、柴田秀樹、牧正敏、ALG-2結合モチーフ2型の精査と新規ALG-2相互作用因子の探索、日本農芸化学会大会2014年3月27日-30日、明治大学生田キャンパス

佐々木桂奈江、井元千晶、高原照直、柴田秀樹、牧正敏、ALG-2は Ca^{2+} 依存的に核スペククルに集積し、選択的スプライシング制御に関与する、分子生物学会年会 2013年12月3日-6日、神戸国際会議場

Osugi K, Imoto C, Shibata H, Maki M. "The apoptosis-linked gene 2 protein ALG-2 interacts

Ca^{2+} -dependently with nuclear CHERP and regulates alternative splicing of IP₃R1 pre-mRNA", European Calcium Society Workshop "Ca²⁺ and cell death" Sep 11-13, 2013, Leuven, Belgium

大杉桂奈江、井元千晶、柴田秀樹、牧正敏、ALG-2相互作用因子CHERPの細胞内局在および選択的スプライシング制御機能、日本農芸化学会大会 2013年3月25日~27日、東北大学

Osugi K, Imoto C, Shibata H, Maki M, Analyses of intracellular localization of SR-like protein CHERP and its function in alternative splicing 第35回日本分子生物学会, 2012年12月11日~14日、福岡国際会議場

大杉桂奈江、井元千晶、柴田秀樹、牧正敏、新規ALG-2相互作用因子CHERPのpre-mRNAスプライシング制御における機能解析 第165回日本農芸化学会中部支部例会、2012年10月27日、名古屋大学

奥村真弓、柴田秀樹、牧正敏、アポトーシス関連因子ALG-2の新規結合モチーフ、第165回日本農芸化学会中部支部例会、2012年10月27日、名古屋大学

Shibata H, Kanadome T, Yamamuro M, Moss SE, Maki M, The penta-EF-hand protein ALG-2 stabilises a COPII component Sec31A at ER exit sites by recruiting annexin A11, European Calcium Society Meeting, September 9-12, 2012, Hotel Dieu, Toulouse, France

Osugi K, Imoto C, Shibata H, Maki M, Identification of RNA-processing-related factors PATL1 and CHERP as novel ALG-2-interacting proteins, European Calcium Society Meeting, September 9-12, 2012, Hotel Dieu, Toulouse, France

Takahashi T, Suzuki H, Inuzuka T, Ito M, Shibata H, Maki M, How can ALG-2 recognize two different binding motifs and function as a Ca^{2+} -dependent adaptor?, European Calcium Society Meeting, September 9-12, 2012, Hotel

Dieu, Toulouse, France

京卓志、横山健、山室南、杉浦洋文、牧正敏、柴田秀樹、カルシウム結合タンパク質による初期分泌経路制御機構の解析、第76回日本生化学会中部支部例会、2012年年5月26日、岡崎カンファレンスホール

大杉桂奈江、井元千晶、柴田秀樹、牧正敏、SR様タンパク質ファミリーに属すCHERPのRSドメイン依存的な細胞内局在変化、第76回日本生化学会中部支部例会、2012年年5月26日、岡崎カンファレンスホール

大杉桂奈江、有海康雄、人見清隆、柴田秀樹、牧正敏、ALG-2とP-body構成因子PATL1の細胞内局在に与えるHCV感染の影響、第34回日本分子生物学会年会、2011年12月13日-16日、パシフィコ横浜

Imoto C, Osugi K, Hitomi K, Shibata H, Maki M, Analysis of intracellular localization of CHERP containing SR-rich region、第34回日本分子生物学会年会、2011年12月13日-16日、パシフィコ横浜

井元千晶、大杉桂奈江、人見清隆、柴田秀樹、牧正敏、ALG-2とCHERPのカルシウム依存的相互作用および核内における共局在、農芸化学会中部支部・関西支部合同大会2011年10月1日-2日、京都大学

〔図書〕(計1件)

1 Osugi K, Shibata H, Maki M. Biochemical and immunological detection of physical interactions between penta-EF-Hand protein ALG-2 and its binding partners. In: Calcium-Binding Proteins and RAGE: From Structural Basics to Clinical Applications (Ed Claus W. Heizmann), Springer Protocols. Springer, Methods in Molecular Biology Vol. 963, 2013, pp 187-200.

〔その他〕

ホームページ等

http://profs.provost.nagoya-u.ac.jp/view/html/100003692_ja.html

(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

研究分担者なし ()
研究者番号：

(3) 連携研究者

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

(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

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 DC1)

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 DC1)

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 (日本学術振興会特別研究員 DC2)