

論文内容の要旨

申請者氏名 Sim, Pei Fang

細胞の形態形成は生命に不可欠な部分であり、膜形成タンパク質によって媒介される。BAR (Bin/Amphiphysin/Rvs167) ドメインを持つタンパク質は、エンドサイトーシス、エキソサイトーシス、細胞遊走など、さまざまな細胞形態形成において重要な役割を果たす。エンドフィリンタンパク質は、N末端にBAR ドメイン、C末端に SH3 ドメインを持つ。BAR ドメインは細胞膜に結合し、それをチューブ状構造に変化させる。Src-homology 3 (SH3) ドメインは、神経ウィスコット・アルドリッチ症候群タンパク質 (N-WASP) や ALG2 相互作用タンパク質 X (ALIX) タンパク質などのタンパク質のプロリンリッチ領域 (PRR) と相互作用する。PRR は、いくつかの短いプロリンリッチモチーフ (PRM) で構成される。SH3 ドメインは、プロリンに隣接するアミノ酸残基とも結合することで、特異的なプロリンリッチモチーフ (PRM) と相互作用する。ところが、プロリンリッチ領域 (PRR) 含有タンパク質が BAR ドメインタンパク質エンドフィリンとどのように相互作用し、その膜構造形成に影響を与えるかについての理解は不十分であった。

本研究では、ALIX と N-WASP のエンドフィリンの SH3 ドメインの結合部位を調べ、N-WASP でこれまで知られていなかった結合部位を特定した。結合部位は、構造予測プログラムである AlphaFold 2.0 を使用して、PRM と複合体を形成している SH3 ドメインのアミノ酸残基を予測した。予測された結合に関与するアミノ酸残基は、変異体を用いた結合検定により調べた。エンドフィリンの SH3 ドメインの F317Y 変異によりこのアミノ酸が PRM を認識するために重要であることを示した。AlphaFold 2.0 は、N-WASP の中央 PRR に加えて、N-WASP タンパク質の N 末端 WASP ホモロジー1 ドメインの前に存在するこれまでに調べられていなかった PRM が、エンドフィリン A2 の SH3 ドメインの結合部位である可能性を示した。実際に N-WASP の N 末端 PRM の親和性は、中央の PRR および ALIX の親和性よりも弱かったが、N-WASP の SH3 ドメインへの結合に寄与していることがわかった。

次に、SH3 ドメインとこれらの PRM との相互作用がエンドフィリンの膜変形能に及ぼす影響を調べた。N-WASP、ALIX、およびエンドフィリンの存在下でのリポソームの膜チューブ形成を調べたところ、エンドフィリン、ALIX、および N-WASP の強力な結合リガンドは、エンドフィリンによる膜チューブ形成の長さを減少させ、直径を増大させました。さらに、N-WASP の N 末端 PRM の変異は、膜チューブの長さを減少させ、その結合の膜チューブ形成への寄与を示した。

以上の結果から、エンドフィリンと N-WASP および ALIX の複合体構造予測により、タンパク質間相互作用を予測同定し、新たなタンパク質間相互作用とその効果を見出すことができたと考えられた。

☐ やむを得ない事由[図書出版、学術雑誌等への掲載、特許・実用新案出願、個人情報等の保護、その他 ()]により本要旨を非公表とする。

【※該当する事由に○印をすること】

論文審査結果の要旨

申請者氏名 Sim, Pei Fang

タンパク質間相互作用は、細胞膜の形態形成を含む生命過程の根幹である。深層学習を用いた Alphafold のような構造予測を実際のタンパク質間相互作用の予測に用いることができるかどうかについては未解明な点が多い。本研究では、構造予測を、既知の相互作用するタンパク質の複合体構造予測に用い、これまでに知られている相互作用が予測できるか検証し、さらに、これまでに知られていなかった相互作用様式の予測結果を実験により検証することを試みた。このような研究は、タンパク質構造予測の有用性を検証する上で重要である。

本研究の第一の発見は、Alix とエンドフィリンの SH3 ドメインの間の相互作用構造予測を行い、既知の相互作用部位が予測されることを示した。さらに、この相互作用部位に変異導入を行うことで、この相互作用を実験的に検証し、またエンドフィリンの膜変形作用における役割を初めて報告した。

本研究の第二の発見は、N-WASP とエンドフィリンの SH3 ドメインの間の相互作用予測を行い、既知の相互作用部位に加えて、これまでに調べられてこなかった総合作用部位を予測同定した。これらの相互作用に関与するアミノ酸は変異導入により検証された。さらに、エンドフィリンの膜相互作用にこれらの相互作用が関与することも示した。

以上のように、本論文の研究で見出したポリプロリン結合配列は、Alix や N-WASP とエンドフィリンの相互作用に寄与し、細胞形態形成に寄与すると考えられる。この相互作用の同定の方法論を含めて、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士（バイオサイエンス）の学位論文として価値あるものと認めた。

☐ やむを得ない事由[図書出版, 学術雑誌等への掲載, 特許・実用新案出願, 個人情報等の保護, その他 ()]により本要旨を非公表とする。

【※該当する事由に○印をすること】