

論文内容の要旨

申請者氏名 古板 恭子

Oxysterol binding protein (OSBP), a cytosolic receptor of cholesterol and oxysterols such as 25-hydroxycholesterol (25-HC), is implicated in sterol homeostasis and signal transduction. OSBP is usually localized at the endoplasmic reticulum (ER) surface and in the cytosol, and translocates to the Golgi apparatus surface in response to increases in cellular 25-HC or depletion of cellular cholesterol. ER localization of OSBP is mediated by complex formation of OSBP with ER membrane protein VAMP-associated protein-A (VAP-A), and it is an essential process for the stimulation of sphingomyelin synthesis by 25-HC. Complex formation between OSBP and VAP-A is regulated by interactions of the FFAT motif of OSBP with the major sperm protein (MSP) domain of VAP-A. In this study, in order to understand the interaction between OSBP and VAP-A, we have determined the solution structure of the complex between a human OSBP fragment containing the FFAT motif (OSBP_F) and the MSP domain of VAP-A (VAP-A_{MSP}). In addition, the detailed binding mechanism was further investigated by NMR and isothermal titration calorimetry (ITC) combined with mutagenesis.

In the determined structure of the complex between OSBP_F and VAP-A_{MSP}, all residues of the FFAT motif except for Glu-358 interact with VAP-A_{MSP} through electrostatic and hydrophobic interactions and backbone-backbone hydrogen bonds were observed. The IUPred algorithm suggested that the extensive region of OSBP (Q295-R406), including the FFAT motif (E358-E364), may be disordered. ¹H-¹⁵N hetero NOE measurements of OSBP_F showed that all residues in OSBP_F are flexible in the unbound state, and the structure of OSBP_F was stabilized upon binding to VAP-A_{MSP}. We performed an NMR titration experiment of VAP-A_{MSP} with OSBP_F. During the titration, at least 4 residues showed nonlinear peak shifts that are elusive using two-site exchange model. A convincing explanation for these peak shifts is to assume formation of intermediate states. OSBP has an acidic patch at the N-terminal side of the FFAT motif, which does not interact with VAP-A_{MSP} in our structure. While VAP-A_{MSP} has a large basic area adjacent to the region to which OSBP_F binds. We hypothesized that electrostatic interactions between these regions play a role in forming the intermediates. We prepared a charge reversal mutant of the acidic patch OSBP_F, E356K, and performed an NMR titration experiment of VAP-A_{MSP} with this mutant. In this case, the nonlinear patterns that were found in titrations with WT disappeared for 2 residues. Furthermore, ITC experiments showed that the E356K mutation reduces binding affinity for VAP-A_{MSP} by about 3-fold. These results suggest the possibility that disordered OSBP initially binds VAP-A involving charge interactions between the acidic patch of OSBP and VAP-A_{MSP}, and finally forms a stable complex structure through a "fly-casting"-like process.

論文審査結果の要旨

申請者氏名 古板 恭子

Oxysterol binding protein (OSBP)は、オキシステロール及びコレステロールの細胞内受容体であり、脂質の恒常性に関わることが知られている。OSBPは通常の細胞では、小胞体膜表面に局在するが、この局在はOSBPの中ほどにあるFFATモチーフと小胞体膜貫通タンパク質 VAMP-associated protein-A (VAP-A)の細胞質側にある Major Sperm Protein (MSP)ドメインとの相互作用により制御されており、この相互作用はOSBPの機能に必須である。本論文では、OSBPとVAP-Aとの相互作用の詳細を明らかにするために、VAP-A MSPドメイン(human VAP-A 5-128, VAP-A_{MSP})とFFATモチーフを含むOSBPフラグメント(human OSBP 346-379, OSBP_F)からなる複合体の立体構造決定、OSBP_F野生型および変異体を用いたNMRタイトレーション、等温滴定カロリメトリー(ITC)実験、及び、運動性解析が行われている。

本論文の成果は以下の通りである。立体構造解析により、VAP-A_{MSP}が7本のβストランドおよび1つのαヘリックスを含み、逆平行βシートからなる免疫グロブリン様βサンドイッチ構造を有していること、及び、FFATモチーフが1つ目のGlu残基を除き全てVAP-A_{MSP}と直接相互作用していることを明らかにした。OSBP_Fに関して¹⁵N異種核NOEを測定し、OSBP_Fはフリーの状態では構造を持たず、VAP-A_{MSP}との複合体形成により、FFATモチーフ及びその周辺で構造が安定化することを示した。¹⁵N標識VAP-A_{MSP}に対する非標識OSBP_FのNMRタイトレーション実験の結果、VAP-A_{MSP}とOSBP_Fは複合体形成において結合中間体の形成が観測された。OSBP_FはFFATモチーフのN末端側に複数の酸性残基を持つが、これらの酸性残基は決定した構造においてVAP-A_{MSP}との相互作用がみられなかった。これらのうちGlu-356をLysにかえた変異体を用いたNMRタイトレーション実験を行い、この変異体で結合中間体の形成が抑制されることを明らかにした。また、ITC実験により、E356K変異体は野生型と比べてVAP-A_{MSP}との親和性が1/3に低下することを見いだした。以上の結果から、OSBP_FはVAP-A_{MSP}との結合においてFFATモチーフN末端側の酸性残基とVAP-A_{MSP}との相互作用などにより中間複合体を形成し、その後結合領域が構造をとることで最終的に安定な複合体に移行するというfly-casting経路をとると帰結した。

以上のように、本論文は脂質の恒常性維持において主要な役割を果たすOSBPとVAP-Aの分子間相互作用を立体構造や生化学的なデータから明らかにしたもので、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。