Kobe University Repository : Kernel

PDF issue: 2025-12-04

Coiled-coil Interaction of N-terminal 36 Residues of Cyclase-associated Protein with Adenylyl Cyclase Is Sufficient for Its Function in Saccharomyces cerevisiae Ras Pathway

西田，吉充

(Degree)
博士（医学）
(Date of Degree)
1999-01-13
(Resource Type)
doctoral thesis
(Report Number)
乙2293
(URL)
https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2002293

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。

氏名・（本籍）　西田吉充（にしだ よしみつ）　（兵庫県）

博士の専攻分野の名称　博　士（医　学）
学位記番号　博ろ第1666号
学位授与の要件　学位規則第4条第2項該当
学位授与の日付　平成11年1月13日

学位論文題目　Coiled-coil Interaction of N-terminal 36 Residues of Cyclase-associated Protein with Adenylyl Cyclase Is Sufficient for Its Function in Saccharomyces cerevisiae Ras Pathway
（出芽酵母Ras系路におけるアデニル酸シクラーゼ結合蛋白質CAPの機能には、そのN末端36アミノ酸残基のシクラーゼとのcoiled-coil相互作用のみで十分である。）

審査委員　主査　教授　片岡　徹
教授　久野高義　教授　玉木紀彦

論文内容の要旨

序論

出芽酵母のRas蛋白質Ras 1とRas 2は，哺乳動物のRas蛋白質と構造上かつ機能的に非常に類似しており，cAMPを産生するアデニル酸シクラーゼの主要な調節因子である。活性型変異体であるRAS 2 $^{Val-19}$遺伝子を有する酵母株は，高い細胞内cAMP濃度を示し，このため熱ショックに対する高感受性等の異常な表現型を示す。

出芽酵母アデニル酸シクラーゼは，CYR 1遺伝子によってコードされる2026アミノ酸残基の蛋白質で，その構造は，N末端領域，ロイシンリッチリピート領域，シクラーゼ触媒領域，C末端領域の4つのドメインからなる。アデニル酸シクラーゼ結合蛋白質CAPは，シクラーゼと強く結合している唯一の蛋白質として同定された70kDaの蛋白質である。CAPはまた，RAS 2 $^{Val-19}$遺伝子による熱ショック感受性の表現型を抑える変異体遺伝子としても同定された。

CAPは複数の機能を持ち，そのアミノ酸残基1－168より成るN末端領域はRAS 2 $^{Val-19}$変異株の熱ショック感受性の獲得に必要であり，アミノ残基369－526のC末端領域はアクチン結合能力を持ち，細胞骨格の維持と制御に関与している。さらに，我々はCAPのN末端領域はアデニル酸シクラーゼのC末端領域との結合部位であり，この結合が，in vivoでのアデニル酸シクラーゼのRasに対する反応性の獲得に必要であることを示してきた。本研究では，Ras経路におけるCAPの機能に必要な最小領域を特定し，アデニル酸シクラーゼとの結合の分子認識機構について解析した。

実験方法と結果

1．CAPとアデニル酸シクラーゼの互いに結合する領域のマッピング

CAPN末端領域とアデニル酸シクラーゼC末端領域それぞれの種々の欠失変異体を作製し，酵母two-hybrid法を用いて互いの結合を解析した。出芽酵母宿主として，内因性CAPと変異体CAPの二量体形成を抑えるために，染色体CAP遺伝子をN末端を欠失させたCAP遺伝子で置換したYPB 2（CAPΔN）株を使用した。その結果，CAPN末端の僅か36アミノ酸の小領域CAP（1－36）がアデニル酸シクラーゼC末端領域と結合する能力を有していることが判明した。N末端領域を完全に欠

失したCAPでは結合は見られなかった。一方，CAPと結合能力を持つ最も短いアデニル酸シクラーゼC末端領域は，アミノ酸番号1898－2016の119アミノ酸の領域CYR 1（1898－2016）であった。

上記の結果は生化学的にも調べられた。CAPを欠失する酵母細胞内で種々のCAPN末端領域欠失変異体にも調べられた。CAPを欠失する酵母細胞内で種々のCAPN末端領域欠失変異体をグルタチオン－S－転移酵素（GST）との融合蛋白質として発現し，グルタチオン・アガロースを用いて精製した。この時，同じ酵母内で共発現したアデニル酸シクラーゼC末端領域がともに精製されるかを指標にシクラーゼとの結合能力を測定した。同様に，アデニル酸シクラーゼC末端領域の種々の欠失変異体をGSTとの融合蛋白質として酵母細胞内で発現してグルタチオン・アガロースを用いて精製し，内在性のCAPが共精製されるかを調べ，CAP結合能力を測定した。蛋白質の検出と定量はすべて特異的抗体を用いたウエスタンブロット法によった。結果は酵母two-hybrid法で得られた結果と完全に一致した。

2．酵母細胞内でのCAPN末端の機能の発現には，CAP（1－36）で十分である。

出芽酵母株TK161－R 2 V（CAPΔN）はN末端領域を欠失したCAP遺伝子（CAPΔN）を有しているため，活性型RAS 2 $^{Val-19}$遺伝子を発現しながらも55℃での熱ショックに対する感受性を示さない。この細胞株を用いて，熱ショック感受性の回復を指標にしてCAPの種々の欠失変異体の機能を調べた。その結果，シクラーゼ結合能力を持つ最も短いCAP断片CAP（1－36）が熱ショック感受性を回復させるのに十分な機能を有することがわかった。この結果はCAPN末端36アミノ酸の領域のみで，酵母Ras－アデニル酸シクラーゼ経路におけるCAPの機能を遂行している事を示していた。

一方，アデニル酸シクラーゼのCAP結合領域のみを酵母細胞内で過剰に発現させると，内因性シクラーゼとCAPとの結合を競合的に阻害するため，RAS 2 $^{Val-19}$依存性熱ショック感受性が抑制される。RAS 2 $^{Val-19}$遺伝子を有するTK161－R 2 V細胞内でアデニル酸シクラーゼC末端領域の種々の欠失変異体を過剰発現させて，RAS 2 $^{Val-19}$依存性熱ショック感受性が抑制されるかどうか調べたところ，やはりCAP結合能力を持つ最も短い断片CYR 1（1898－2016）がこの活性を示す最も短いものであった。

3．相手との結合能力を喪失したCAPおよびアデニル酸シクラーゼの変異体の同定

互いに結合できる最小領域CAP（1－36）とCYR 1（1898－2016）のアミノ酸配列をよく検討したところ，7アミノ酸の単位配列αXXαXXX（α：疎水性アミノ酸，X：アミノ酸不特定）の反復が，CAPのアミノ酸残基13－30番とシクラーゼのアミノ酸残基1916－1930番に存在した。この反復配列の存在から，CAPとアデニル酸シクラーゼの当該領域がそれぞれα-helix構造をとり，各α-helixの一側面に縦に配列した疎水性アミノ酸の側鎖がhelix間で対合することにより，coiled-coil構造の超螺旋を形成することが予測された。

この事をより詳しく検証するために，CAPのN末端77残基の中にerror-pronePCRを用いてランダムに点突然変異を導入して変異体のプールを作り，その中でアデニル酸シクラーゼとの結合能力を失ったものを酵母two-hybrid法を用いてスクリーニングした。208個のクローンのうち，シクラーゼとの結合能力を失った43クローンについて塩基配列を決定した。その結果，終止コドンを持っていたり，複数の変異を有する等の理由で38個を除外した後，残りの5クローンについてアデニル酸シクラーゼとの結合能力とRAS 2 $^{Val-19}$依存性熱ショック感受性を回復させる能力の両方を喪失していることを確認した。これらのうち4つのCAP変異体は，いずれもLeu－20，Leu－27，またはVal－30の何れかの位置に，疎水性アミノ酸残基が親水性残基に置換した変異を持っていた。この3つの位置はいずれも上記7アミノ酸単位配列αXXαXXXのα位置に対応していた。

次に，アデニル酸シクラーゼC末端のCAP結合領域に存在する7アミノ酸反復単位配列における疎水性アミノ酸残基の重要性を調べた。αの位置に対応するLeu－1916とLeu－1923を各々Ser,ProまたはArgに置換した変異体を人為的変異導入により作製した。これらの変異を持つシクラーゼのC末端領域は，いづれも酵母two-hybrid法でも試験管内結合測定法でもCAPと結合しなかった。さらに，これらの変異を持つシクラーゼのC末端領域の過剰発現はRAS 2 $^{Val-19}$依存性の熱ショック感受性を抑制できなかった。

これらの結果よりCAPN末端とアデニル酸シクラーゼC末端に存在する7アミノ酸の反復単位配列中の疎水性アミノ酸残基が互いの結合に重要であり，結合にはcoiled-coil機構が関与していることが強く示唆された。

考察

本研究により，CAPのN末端36アミノ酸残基のみでアデニル酸シクラーゼとの結合のみならず，細胞内のRas－アデニル酸シクラーゼ経路における機能を十分に果たすことが示された。アデニル酸シクラーゼのCAP結合部位は119アミノ酸残基の領域に特定された。互いに結合領域に，coiled-coil相互作用を示唆する典型的な7アミノ酸の反復配列（αXXαXXX）nが見い出された。Coiled-coilは，2～4個のα-helixが互いに巻きあって形成される左巻の超螺旋構造で，細胞骨格構成蛋白質をはじめ様々な蛋白質間相互作用に見られる。7アミノ酸残基の特異的単位配列αXXαXXXをa-b-c-d-e-f-gと表すと，aとbが疎水性アミノ酸でα-helix間の接触面を形成し，b, c, e, f, gは親水性アミノ酸でcoiled-coil側面の親水性部分を構成する。a, dの疎水性残基がα-helixの一方に並び，その側鎖同士の疎水性結合によってα-helix間の対合が起こる。

CAPのLeu－20, Leu－27, Val－30及びアデニル酸シクラーゼのLeu－1916とLeu－1923の親水性アミノ酸への置換変異で互いの結合能力が喪失することがわかったが，これらの残基は全てa-b-c-d-e-f-gのaまたはdの位置にあった。この結果によりcoiled-coil機構が両者の相互作用の分子的基礎となっていることが強く示唆された。

この7アミノ酸の反復配列は分裂酵母や哺乳動物などの他の生物で同定されているCAPのホモログにおいてもよく保存されている。しかし，出芽酵母CAPのN末端の機能はこれら他の生物では保存されていない。このことは，これらの生物においてCAPホモログのN末端とcoiled-coil相互作用を行う蛋白質は，アデニル酸シクラーゼではなく，別の機能をもつものである可能性を示唆している。この様なCAP結合蛋白質を同定することにより，他の生物におけるCAPの新しい機能を解明できる可能性がある。

論文審査の結果の要旨

出芽酵母のRas蛋白質は，哺乳動物のRas蛋白質と構造上かつ機能的に非常に類似しており，cAMPを産生するアデニル酸シクラーゼの主要な調節因子である。活性型変異体であるRAS 2 $^{Val-19}$遺伝子を有する酵母株は，高い細胞内cAMP濃度を有し，このため熱ショックに対する高感受性等の異常な表現型を示す。

出芽酵母アデニル酸シクラーゼは2026アミノ酸残基から成り，N末端領域，ロイシンリッチリピート領域，シクラーゼ触媒領域，C末端領域の4つのドメインからなる。アデニル酸シクラーゼ結合蛋白質CAPは，シクラーゼと強く結合している70kDaの蛋白質である。CAPは複数の機能を持ち，そのN末端領域はRAS 2 $^{Val-19}$変異株の熱ショック感受性の獲得に必要であり，C末端領域はアクチン

結合能力を持ち，細胞骨格の維持と制御に関与している。さらに，本研究者らはCAPのN末端領域はアデニル酸シクラーゼのC末端領域との結合部位であり，この結合が，in vivoでのアデニル酸シクラーゼのRasに対する反応性の獲得に必要である事を示してきた。本研究では，Ras経路におけるCAPの機能に必要な最小領域を特定し，アデニル酸シクラーゼとの結合の分子認識機構について解析した。

本研究者は，CAPN末端領域とアデニル酸シクラーゼC末端領域それぞれの種々の欠失変異体を作製し，酵母two-hybrid法を用いて互いの結合を解析した。その結果，CAPN末端の僅か36アミノ酸の小領域CAP（1－36）がアデニル酸シクラーゼC末端領域と結合する能力を有している事が判明した。一方，CAPと結合能力を持つ最も短いアデニル酸シクラーゼC末端領域は，アミノ酸番号1898－2016の119アミノ酸の領域であった。このことは生化学的な結合測定法によっても調べられ，全く同一の結果が得られた。

次に，染色体CAP遺伝子を欠失した酵母細胞株を用いて，熱ショック感受性の回復を指標にしてCAPの種々の欠失変異体の機能を調べた。その結果，CAPN末端36アミノ酸の領域のみで熱ショック感受性を回復させるのに十分な機能を有する事が示された。

互いに結合できる最小領域CAP（1－36）とCYR1（1898－2016）の中には，7アミノ酸の単位配列αXXαXXX（α：疎水性アミノ酸，X：アミノ酸不特定）の反復が存在した。この反復配列の存在から，CAPとアデニル酸シクラーゼの当該領域がそれぞれα-helix構造をとり，各α-helixの一側面に縦に配列した疎水性アミノ酸の側鎖がhelix間で対合することにより，coiled-coil構造の超螺旋を形成することが予測された。

これを検証するために，CAPのN末端領域にerror-pronePCRを用いてランダムに点突然変異を導入して変異体のプールを作り，その中でアデニル酸シクラーゼとの結合能力を失ったものをtwo-hybrid法を用いてスクリーニングした。得られた5個の変異体のうち4個は，いずれもLeu－20, Leu－27，またはVal－30の何れかの位置に，疎水性アミノ酸残基が親水性残基に置換した変異を持っていた。これらの位置はいずれも上記7アミノ酸単位配列のα位置に対応していた。

次に，アデニル酸シクラーゼC末端のCAP結合領域に存在する7アミノ酸反復単位配列における疎水性アミノ酸残基の重要性を調べた。αの位置に対応するLeu－1916とLeu－1923を親水性アミノ酸残基に置換した変異体を人為的変異導入により作製したところ，これらの変異を持つシクラーゼのC末端領域は，いづれもCAPとの結合能力を失っていた。これらの結果よりCAPN末端とアデニル酸シクラーゼC末端に存在する7アミノ酸の単位配列中の疎水性アミノ酸残基が互いの結合に重要であることが示された。

本研究により，CAPのN末端36アミノ酸残基のみでアデニル酸シクラーゼとの結合のみならず，細胞内のRas－アデニル酸シクラーゼ経路における機能を十分に果たすことが示された。CAPのLeu－20, Leu－27, Val－30及びアデニル酸シクラーゼのLeu－1916とLeu－1923の親水性アミノ酸への置換変異で互いの結合能力が喪失することがわかったが，これらの残基は全て上記単位配列のαの位置にあった。この結果によりcoiled-coil機構が両者の相互作用の分子的基礎となっていることが強く示唆された。

この7アミノ酸の反復配列は分裂酵母や哺乳動物などで同定されているCAPのホモログにおいてもよく保存されているので，出芽酵母以外の生物におけるCAP結合蛋白質を同定することにより，CAPの新しい機能を解明できる可能性がある。

本研究は，酵母アデニル酸シクラーゼ結合蛋白質のCAPについて，そのアデニル酸シクラーゼと

の結合認識機構を研究したものであるが，従来ほとんど行われなかったcoiled–coil相互作用機構の存在について重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって，本研究者は，博士(医学）の学位を得る資格があると認める。