

論文内容の要旨

申請者氏名 金 善龍 (Kim Sung-Young)

Hippo 経路は細胞増殖等を負に制御することで臓器や器官の大きさを決める。元々、ショウジョウバエの研究で発見されたが、哺乳動物等にも存在する。また、酵母には有糸分裂終結を制御する経路として類縁と考えられ制御経路が存在する。Hippo 経路のコア部分は、AGC 型のタンパク質キナーゼである MST1/2 (mammalian Ste20-like 1 と 2、ショウジョウバエの Hippo キナーゼ)、LATS1/2 (Large tumor suppressor 1 と 2、ショウジョウバエの Warts キナーゼ)、LATS1/2 のコアアベータタンパク質 MOB1 (Mps1-One Binder、ショウジョウバエの Mats)、そして転写のコファクターである YAP (Yess-associated protein、ショウジョウバエの Yorkie) である。上流のシグナルで活性化された MST1/2 は MOB1 と LATS1/2 をリン酸化して、LATS1/2 を活性化する。活性化された LATS1/2 は YAP をリン酸化して、その核内移行を阻止することで転写活性化を抑制する。これらのキナーゼ同様に、MOB1 も通常は自己阻害状態にあり LATS1/2 を活性化できないが、MST1/2 によるリン酸化 (N-末端側の Thr12 と Thr35 残基) で「活性化」されて、LATS1/2 に直接に結合して、キナーゼを活性化するが、その分子機能変換のメカニズムの詳細はわかっていない。そこで、申請者は各タンパク質試料を精製して、X 線構造解析、分析超遠心法等での物性解析ならびに結合実験を通して、上記メカニズムの解明を試みた。まず、申請者は自己阻害状態にある全長のマウス MOB1B、N-末端側を切り落として活性化した MOB1B と LATS1 の NTR (N-terminal regulatory、MOB1 が結合する) ドメインとの複合体、Thr12 と Thr35 を Asp 残基に置換して疑似リン酸化型とした MOB1B と LATS1 の NTR (N-terminal regulatory、MOB1 が結合する) ドメインとの複合体、更に、MOB1B と MST の上流の因子 SAV1 のリン酸化ペプチドとの複合体の 4 者の結晶構造を決定した。前者 3 構造等から、MOB1 は二次構造の少ない N-末端側とペプチドが球状に折りたたんだ C-末端側のコア部分からなり、N-末端側の一部に形成した α -らせん (Switch helix と命名) が、MOB1 の LATS 結合部位に結合して、物理的に LATS の結合を阻害していることがわかった。また、この Switch helix には Thr35 があり、リン酸化されると立体的な障害により LATS 結合部位への結合が減弱すること、Thr12 は安定構造のない部分にあり、容易にリン酸化可能であり、リン酸化されると、負に荷電したリン酸結合部位に結合することで、N-末端領域を引き込み、Switch helix の解離を誘起するというメカニズムがわかった。更に、上述の第 4 の構造で、SAV1 のリン酸化ペプチドが MOB1 のコアドメインと特異的に結合することを証明して、MOB1 の細胞膜へのリクルートが、SAV1 のリン酸化を通して誘起されることを提唱した。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 金 善龍 (Kim Sung-Young)

Hippo 経路の論文数は、この 10 年の間に指数関数的 (約 15 倍) に増加して、様々な切り口での研究が進んだ。その結果、発生生物学や医学上極めて重要な細胞増殖の制御経路であることが認識されるようになった。特に、細胞接着や細胞骨格、あるいは力学的な刺激がこの経路の制御とつながってきていることや、接触阻止等の細胞生物学の根本問題との関連も出てきており、その重要性は癌との関係等の医学的興味を遙かに超えている。一方、経路を構成するタンパク質キナーゼやその制御因子のタンパク質科学や構造生物学的な研究は、試料調製上の困難のために、部分的なものに限られている。本論文では、MOB1 に照準を当てて、それと相互作用する諸タンパク質とともに生化学的に精製することで、構造・物性、そして詳細な相互作用研究を進めることに成功している。特に、精製が困難とされてきた MOB1 全長タンパク質の精製に初めて成功しており、他の研究者の更なる実験の契機を与えている。

本論の第一の発見は、MOB1 の自己阻害とその解除のメカニズムである。MOB1B 全長タンパク質の X 線構造解析から、MOB1B の自己阻害とは、構造的には「ゆるい」(それゆえ自己分解し易い) とされていた N-末端側の一部に Switch helix と命名した α -らせんが形成され、この Switch helix が球状に折りたたまった C-末端側のコアドメイン上の LATS1 結合部位に会合することで、物理的に LATS1 の結合を阻害することであることを発見した。更に、この Switch helix に存在する Thr35 がリン酸化されると構造的にこの会合ができなくなることを見出した。一方、Thr12 は構造のゆるい部分に存在するのでリン酸化され易いと考えられるが、一度リン酸化されると、LATS1 結合部位とは異なる分子表面にあるリン酸結合部位に結合する。この時、N-末端部分が引き込まれるので、Switch helix の解離やほどけを促進する。これらのメカニズムにより、Thr12 と Thr35 リン酸化が自己阻害を解消することを見出した。

本論の第二の発見は、MOB1 と LATS1 との特異的相互作用を原子レベル明らかにして、MOB のホモログ、例えば MOB2 が LATS1 を活性化できないこと等の特異性にかかわる問題の解答を複合体の構造中に見出したことである。また、本論の第三の発見は、MOB1 溶液中で単量体として存在し、単量体で LATS1 へ結合する実験事実を見出したことであり、単量体と二量体の平衡があり、二量体で活性化するという一部の説を否定した。第四は、SAV1 のリン酸化ペプチドが MOB1 のコアドメインと特異的に結合することを構造的に明らかにして、MOB1 の細胞膜へのリクルートが、SAV1 のリン酸化を通して誘起される可能性を示したことである。

以上のように、本論文は Hippo 経路の構造生物学や細胞生物学に寄与するもので、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。