

# 論文審査の結果の要旨

氏名 陳 鑒行

本論文は「X-ray crystallography of Sec10, a subunit of the exocyst complex (Exocyst 複合体 Sec10 サブユニットの X 線結晶構造解析)」を題とし、4 章から構成されている。

第 1 章では、序論として exocyst 複合体と Sec10 サブユニットの機能と構造について述べられている。Exocyst 複合体は、Sec3、Sec5、Sec6、Sec8、Sec10、Sec15、Exo70、Exo84 の 8 つのサブユニットで構成される複合体であり、開口放出において分泌小胞と細胞膜とを物理的に繋ぎ止めること（繋留）により、分泌小胞と細胞膜との融合を正確かつ効率的に行う役割を担っていると考えられている。Exocyst 複合体の機能異常は、細胞の運動や極性、シナプスや一次繊毛の形成、オートファジーなどの様々な細胞機能の異常を引き起こす。輸送小胞と標的膜との繋留を担うマルチサブユニット複合体の多くは CATCHR と呼ばれる複合体ファミリーに属しており、exocyst 複合体もその一つである。Exocyst 複合体のサブユニットと他の CATCHR のサブユニットは構造的に類似していることが知られている。Exocyst 複合体は、4 つのサブユニットを一単位とする二つの集合モジュールが組み合わさって構築されていることが示唆されているが、Sec10 サブユニットは二つのモジュールをつなぐ役割を担っていると考えられている。

第 2 章では、Sec10 サブユニットの X 線結晶構造解析で行った実験の方法が述べられている。まず、発現系をデザインする際に利用したディスオーダー予測とプロテアーゼによる限定分解の方法が記述されている。次に、大腸菌での発現系の構築、タンパク質の精製および結晶化スクリーニングの方法が記述されている。位相決定に必要なセレノメチオン標識タンパク質の調製方法も記述されている。さらに、結晶化の再現性向上や結晶サイズの改善、単結晶の調製、分解能向上を目的としたシーディング、デハイドレーション、ハライドソーキングの方法が記述されている。最後に、X 線回折実験、位相計算、原子モデルの構築と最適化、決定した三次元構造を利用した解析（類似構造の検索と重ね合わせ、アミノ酸残基の保存度、表面電荷や疎水度の計算）の方法が記述されている。

第 3 章では、Sec10 の三次元構造決定に至るまでに行った実験の結果と X 線結晶構造解析の結果が述べられている。まず、ラット由来 Sec10 の発現系構築、精製、結晶化スクリーニングと最適化、さらに位相決定の試みの結果が記述されている。末端のディスオーダー領域に加えて、中央部にあるディスオーダー領域をトリミングすることにより、結晶化する Sec10 試料を得たが、結晶の再現性や回折能が低かったために、システイン残基のアラニン残基への置換やマクロシーディングなどを利用して結晶の改善を行った。しかし、3 Å を超える分解能の結晶を得ることはできなかった。セレノメチオン標識体を

利用した SAD 法による中程度分解能 (4 Å) での構造決定も試みたが、セレン原子位置の決定には至らなかった。次に、ラット以外の幾つかの生物種由来の Sec10 の発現を試した結果、ゼブラフィッシュ由来の Sec10 で良好な発現が得られた。ラット由来 Sec10 同様に、中央部のディスオーダー領域もトリミングした発現系を用いることで、結晶化に適する Sec10 試料が得られた。ストリークシーディングによる結晶サイズの改善に加えて、高濃度の塩を抗凍結剤に利用した測定法やハライドソーキングによる分解能の向上により、最終的に 2.73 Å の分解能での構造決定に成功した。Sec10 の全体構造は  $\alpha$  ソレノイドで構成されるロッド状の構造で、これまでに知られている exocyst 複合体の他のサブユニットや CATCHR 複合体のサブユニットなどと類似していた。

第 4 章では、Sec10 の X 線結晶構造解析で利用した結晶改善のための手法の一般的なタンパク質への応用、および、Sec10 の三次元構造から予想される機能メカニズム (他のサブユニット、低分子量 GTPase や脂質膜との相互作用) と今後の機能・構造解析への展開について議論している。

なお、本論文の第 2 章から第 4 章の Sec10 の X 線結晶構造解析とその三次元構造に基づく議論は、深井周也准教授、山形敦史助教、佐藤裕介助教、伊藤桜子助教、窪田恵子研究員との共同研究であるが、論文提出者が主体となって分析および検証を行ったもので、論文提出者の寄与が十分であると判断する。

したがって、博士 (科学) の学位を授与できると認める。

以上 1,939 字