

令和 2 年 5 月 20 日現在

機関番号：22701

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K19206

研究課題名（和文）動物細胞発現系と化学合成の融合による1回膜貫通型受容体への部位特異的標識導入

研究課題名（英文）Development of site-specific labeling method of single-transmembrane receptors

研究代表者

禾 晃和（Nogi, Terukazu）

横浜市立大学・生命医科学研究科・准教授

研究者番号：40379102

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：ヒトなどの高等生物の細胞膜上に発現する1回膜貫通型受容体を取り上げ、細胞外からの信号を伝えるタンパク質の結合にともなう受容体のコンフォメーション変化を検出するために受容体に部位特異的に標識を導入する技術の開発に取り組んだ。動物細胞を用いて天然状態に近い細胞外領域断片試料を調製し、ペプチド断片を付加する条件を最適化した。さらに、動的な構造解析手法を用いて、1回膜貫通型受容体の溶液条件の変化にともなうコンフォメーション変化の様式も検証した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生体を構成する細胞は、細胞膜上に受容体タンパク質を配して外的環境からのシグナルを受容し、細胞内へと情報を受け渡す。この細胞表面受容体によるシグナル受容と変換は、分裂、分化、移動などの細胞の運命を決定する出発点とも言える。また変異等による受容体の機能異常は、がんを代表例とする様々な疾患を引き起こす。したがって、本研究で取り組んだ細胞表面受容体によるシグナル伝達の分子機構の解明は、細胞挙動の制御による疾患の治療に向けた新規な創薬戦略の提案にもつなげる可能性があるという点において重要な意義をもつ。

研究成果の概要（英文）：In this project, we have attempted to develop a novel technique to introduce a site-specific label into single-transmembrane receptors expressed on the cell membrane of higher organisms such as human. The site-specific labeling method will be utilized to detect the conformational change of the single-transmembrane receptor, which is induced from the interactions with extracellular signaling proteins. We have produced extracellular domain fragments of the single-transmembrane receptors with post-translational modifications such as glycosylation and disulfide bonds by using mammalian expression systems. We have tested the ligation between the extracellular domain fragments and peptides and optimized the reaction conditions. Furthermore, we have examined the influence of the solution conditions on the conformational change of the single-transmembrane receptors through the dynamic structural analysis methods.

研究分野：構造生物学

キーワード：1回膜貫通型受容体 半合成 受容体活性化機構 コンフォメーション変化

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生体を構成する細胞は、細胞膜上に受容体タンパク質を配して外的環境からのシグナルを受容し、細胞内へと情報を受け渡す。この受容体によるシグナル受容と変換は、分裂、分化、移動などの細胞の運命を決定する出発点とも言える。また変異等による受容体の機能異常は、がんを代表例とする様々な疾患を引き起こす。したがって、受容体によるシグナル伝達の分子機構の解明は、細胞挙動の制御による疾患の治療に向けた新規な創薬戦略の提案にもつながりうる。

細胞表面受容体の中でも、受容体チロシンキナーゼを初めとする1回膜貫通型の受容体は、その構造の柔軟性の高さから、全長での立体構造解析が困難であるため、活性化とシグナル伝達の分子機構の解明が立ち遅れている。一般に、1回膜貫通型受容体は、細胞外領域で成長因子などのシグナル分子と結合し、膜を隔てた細胞内領域を活性化することでシグナル伝達を行う。従来の作業仮説では、シグナル分子の結合にともなって膜上の受容体は単量体から2量体へと変化し、細胞内領域同士が相互作用することで活性化が起きるとされてきた。しかし、その後の研究から、受容体分子はリガンド結合以前に不活性な2量体を形成しており、リガンド結合によって膜貫通部位及び細胞内膜近傍部位がコンフォメーション変化して活性化が起きるといった新たな作業仮説が提唱されていた。

研究代表者は、構造生物学の専門家として、主に1回膜貫通型の受容体の細胞外領域を標的としてX線結晶解析による構造決定を行い、受容体によるリガンド認識機構の解明に取り組んで来た。具体的な標的分子としては、神経軸索の伸長に関わるプレキシシン (*Nature* (2010) **467**, 1123, Nogi *et al.*)、脳の層構造形成を制御するアポリポプロテイン受容体2 (ApoER2) (*EMBO J* (2006) **25**, 3675, Nogi *et al.*, *PNAS* (2007) **104**, 9988, Yasui *et al.*, *Structure* (2010) **18**, 320, Yasui *et al.*)、神経シナプスの形成に関わるニューレキシシン (*PLoS One* (2011) **6**, e19411, Tanaka *et al.*, *Cell Rep* (2012) **2**, 101, Tanaka *et al.*)、細胞接着に関わるインテグリン (*J Cell Biol* (2012) 197, 131, Nagae *et al.*)、アミロドペプチドの除去に関わる SorLA (*Nature Struct & Mol Biol* (2015) **22**, 199, Kitago *et al.*)などが挙げられる。一連の構造解析の中には、受容体細胞外領域全長とリガンドとの複合体解析も含まれ、受容体が外界からの情報をどのように受け取るのかという問題については原子レベルでの議論が可能となった。その一方で、リガンドとの結合がどのようにして細胞内領域の活性化に結びつくのかという問題については依然として未解明のままであった。この細胞外におけるリガンド結合と細胞内におけるシグナル伝達の連動の問題を解決するためには、膜貫通部位を含むタンパク質を用いた構造研究が必要とされていた。しかしながら、全長の1回膜貫通型の受容体では、細胞外領域、膜貫通部位、細胞内領域が柔軟なリンカーでつながっているため、構造の揺らぎが大きく、X線結晶解析等の解析手法の適用が困難であった。実際、膜タンパク質の立体構造解析技術は飛躍的な進歩を遂げたにも関わらず、研究開始時点では、1回膜貫通型受容体の全長構造は一例も報告されていなかった。

2. 研究の目的

受容体チロシンキナーゼに分類される上皮成長因子受容体 (epidermal growth factor receptor: EGFR) を主な標的として研究を進めることとした。EGFR は、リガンドと結合する細胞外領域とキナーゼ活性を有する細胞内領域が1本の膜貫通ヘリックスのみでつながれた構造をとる。EGFR は、細胞増殖のシグナルを伝達する役割を担い、変異によるその活性の亢進は、細胞のがん化につながる事が知られている。EGFR の活性化過程では、1) EGF 等のリガンドの細胞外領域への結合、2) 膜貫通部位の膜に対する配向の変化と細胞内膜近傍部位の膜表面からの解離、3) 細胞内キナーゼドメインの非対称な2量体形成と活性化、という構造変化の伝播が起きるといった説が提唱されている (*Cell* (2013) **152**, 543)。しかしながら、この仮説は、細胞外領域、膜貫通部位、細胞内領域、それぞれの部分断片を用いた構造・機能解析からの知見を組み合わせることで提唱されたものであり、構造変化の伝播は実験的には調べられていなかった。そこで本研究では、細胞外領域と膜貫通部位を含む EGFR 断片に標識を導入することでリガンド結合依存的な構造変化を検出するための実験系の構築を目指した。

また、並行して、EGFR 以外の1回膜貫通型受容体についても細胞外から膜貫通部位への構造変化の伝播の様式を調べるために、リガンドとの相互作用様式や、周囲の pH 変化などの環境変化が受容体のコンフォメーションに与える影響について、各種相互作用解析法や動的構造解析法を用いて検証を行った。

3. 研究の方法

本研究では、細胞外領域と標識を導入した膜貫通部位を別々に調製し、それらを連結することで、標識された細胞外領域から膜貫通部位を含む試料を作製しようと試みた。特に、EGFR の細胞外領域は、糖鎖修飾やジスルフィド架橋などの翻訳後修飾を受けることで、リガンドと結合可能な立体構造を形成する。このため、一般的な大腸菌など原核生物を宿主とする発現系では、天然の状態に近いタンパク質を発現させることは困難である。このため、本研究では、HEK293T 細胞などの接着細胞を主に用いてタンパク質を発現させた。本研究では、細胞外領域と膜貫通部位の連結が起きたことを検出するために、より均質な試料を取得する必要があったために、

HEK293S GnTI(-)細胞という糖転移酵素欠損株もタンパク質発現に用いた。この細胞を用いることで、アスパラギン側鎖に付加されるN結合型糖鎖は、大半がN-アセチルグルコサミンが2つとマンノースが5つ付加されたハイマンノース型糖鎖となる。また、EGFR細胞外領域のN末端に独自に開発したアフィニティー精製のタグであるPAタグを融合したコンストラクトを作製し、上記の培養細胞で分泌発現を行った。PAタグはラット由来のモノクローナル抗体であるNZ-1と非常に高い親和性で結合する。また、PAタグとNZ-1抗体との結合は温和な条件で解離させることが可能であるため、標的のタンパク質を安定な状態に保ちつつ、高純度に精製することが可能である。本研究では、まず、目的のPAタグ付きのEGFR細胞外領域断片が分泌された培養上清を回収し、遠心操作とフィルターろ過で清澄化を行った。そして、緩衝液でpHを7.5付近の中性領域に調整したのちに、NZ-1抗体を固定化したカラムを用いてアフィニティー精製を行った。PAタグの特異性により電気泳動での確認では高純度のタンパク質試料が得られたが、この段階での精製試料には凝集体や会合体などが混在していた。そこで、ゲルろ過クロマトグラフィーによって最終精製を行い、単量体成分のみを回収した。

一方、膜貫通部位断片については、研究協力者に依頼し化学合成した。まず、ヘマグルチニン由来のHAタグを融合したペプチドを合成し、連結反応が起きるかどうかの検証に用いた。初期の段階においては、ウェスタンブロッティング法によって、連結反応が起きたかどうかを検証した。さらに、MALDI-TOF MSを用いて、反応に伴う質量変化についても検証を行った。

一方、EGFR以外の受容体については、具体的には神経軸索の伸長を制御する受容体プレキシシンやLDLコレステロールの取り込みに関わるLDL受容体などを取り上げ、同じく培養細胞を用いて発現精製を行った。これらのタンパク質については、リガンド依存的な構造変化を追跡するために、まず、表面プラズモン共鳴 (SPR) やX線小角散乱 (SAXS)、原子間力顕微鏡 (AFM) などを用いて、性状解析を行った。特に、SPRやAFM実験では、分子をセンサーチップや基板の上に特定の配向で固定化する必要があったことから、ビオチン化配列を融合し、ビオチンリガゼと共発現させることで部位特異的にビオチン化した。これにより、細胞表面に発現している時と同じ配向で、細胞外領域を固定化することが可能となった。また、SAXS実験においては、ゲルろ過クロマトグラフィーで分離を行いながら、SAXS測定を行うSEC-SAXS法を適用した。これによって、精製試料に含まれる夾雑物を取り除くとともに、目的タンパク質に会合状態の異なる成分が複数ある場合は、それらも分離しながら、個別にSAXSデータを取得した。

4. 研究成果

本研究では、EGFRを細胞外領域と膜貫通部位に分割して別々に試料調製した。このため、この2つの領域の境界をどの残基とするかも初期の段階では検討した。EGFRの細胞外領域には、ドメインI~IVが存在するが、C末端側のドメインIVの最後の残基は膜貫通部位と8残基程度しか離れていない。このため、ドメインIV側に対しても、脂質二重層や界面活性剤ミセルに埋もれた膜貫通部位側の両方に対しても、立体障害が生じる可能性があったことから、境界をドメインIV側の直後に設計したコンストラクトと膜貫通部位の直前に設計したコンストラクトを作製し比較を行った。その結果、細胞外領域断片については、境界残基を変化させても発現量の変化は見られず、いずれのコンストラクトについても連結反応に使用するのに十分なタンパク質試料が得られることが分かった。

本研究では、トランススプライシング現象を利用することで連結反応を行わせた。本来の設計では、還元剤の添加なしに反応が進行することを想定していたが、実際に実験を進めると、還元剤を添加しなければ反応が進行しないことが分かった。また、HAタグ付きのモデルペプチドでの検証では、いずれのコンストラクトについても同程度の効率で連結反応が起きることが分かった。この結果を受けて、ドメインIVの直後の残基を細胞外領域と膜貫通部位の境界としたコンストラクトで還元剤の種類や添加量に関する比較検討を行った。

EGFR細胞外領域断片が連結反応を起こすと電気泳動によってバンドシフトが観測される。また、連結させるペプチドにHAタグを融合していることから、ウェスタンブロッティングによって連結が起きたことが確かめられる。ただし、いずれの検出法についても設計通りの反応産物が形成されていることを確定させるものでなかったことから、質量分析も行い、設計通りの質量変化がEGFR細胞外領域断片に起きたかを調べることにした。前述の通り、EGFR細胞外領域断片には、糖鎖修飾が行われる。そして、遺伝子操作や薬剤添加を行っていない細胞でEGFR細胞外領域断片を発現させると分子ごと異なる構造の糖鎖が付加されるため、精製タンパク質の質量にはばらつきが生じる。もともと、EGFR細胞外領域断片は質量100kDaに及ぶ巨大なタンパク質であることから、質量分析を行う対象としては解析が難しい部類に入る。そこで、特に質量分析に用いる試料は、前述の糖転移酵素欠損株HEK293S GnTI(-)を用いて調製した。その結果、反応前の試料については、実際にばらつきが比較的小さいピークが質量100kDa付近に観測された。一方、反応後の試料については、ばらつきが大きい上に複数のピークが重なった状態のスペクトルが得られたが、計算上の質量変化に近い値のピークも観測された。

一方、新たな標的として取り組んだプレキシシンについては、多数存在するサブタイプ間でのリガンド選択性の違いに関する知見が得られた。さらに計算科学的な手法を取り入れることで、リガンド選択性を決定する残基を推定した。LDL受容体については、溶液状態の変化によって分子の形状や運動性が変化することを示唆するデータが得られた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Parvin S, Takeda R, Sugiura Y, Neyazaki M, Nogi T, Sasaki Y.	4. 巻 146
2. 論文標題 Fragile X mental retardation protein regulates accumulation of the active zone protein Munc18-1 in presynapses via local translation in axons during synaptogenesis.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Neurosci Res.	6. 最初と最後の頁 36-47
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neures.2018.09.013.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Tamura R, Oi R, Akashi S, Kaneko MK, Kato Y, Nogi T.	4. 巻 28
2. 論文標題 Application of the NZ-1 Fab as a crystallization chaperone for PA tag-inserted target proteins.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Protein Sci.	6. 最初と最後の頁 823-836
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/pro.3580.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Nogi T	4. 巻 10
2. 論文標題 How multi-scale structural biology elucidated context-dependent variability in ectodomain conformation along with the ligand capture and release cycle for LDLR family members.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Biophysical Reviews	6. 最初と最後の頁 481-492
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1007/s12551-017-0362-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hirai H, Yasui N, Yamashita K, Tabata S, Yamamoto M, Takagi J, Nogi T	4. 巻 18
2. 論文標題 Structural basis for ligand capture and release by the endocytic receptor ApoER2.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 EMBO reports	6. 最初と最後の頁 982-999
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.15252/embr.201643521	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計16件（うち招待講演 4件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 田中 翼、下地 恵令奈、永友 芽里、山根 努、浴本 亨、根谷崎 牧子、大井 里香、池口 満徳、禾 晃和
2. 発表標題 In vitroとin silicoの融合によるセマフォリン-プレキシシンペアの結合特異性決定因子の探索
3. 学会等名 第71回日本細胞生物学会大会 第19回日本蛋白質科学会年会 合同年次大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 塩澤 亜希、飯田 麻生、小田 隆、佐藤 衛、禾 晃和
2. 発表標題 SEC-SAXSIによるLDLRファミリーのpH依存的な構造変化の検証
3. 学会等名 第71回日本細胞生物学会大会 第19回日本蛋白質科学会年会 合同年次大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 禾 晃和
2. 発表標題 リガンド結合と解離を調節する1回膜貫通型受容体のpH依存的な構造変化の追跡
3. 学会等名 第71回日本細胞生物学会大会 第19回日本蛋白質科学会年会 合同年次大会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Risako Tamura, Rika Oi, Satoko Akashi, Mika K. Kaneko, Yukinari Kato, Terukazu Nogi
2. 発表標題 Insertion of the PA tag into a target protein and promotion of the crystallization by utilizing the NZ-1 Fab as a crystallization chaperone
3. 学会等名 AsCA2019（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tsubasa Tanaka, Erena Shimoji, Meri Nagatomo, Tsutomu Yamane, Toru Ekimoto, Makiko Neyazaki, Rika Oi, Mitsunori Ikeguchi, Terukazu Nogi
2. 発表標題 Exploration of structural determinants of binding selectivity in semaphorin-plexin pairs through hybrid approach of in vitro/in silico analyses
3. 学会等名 AsCA2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田中翼、永友芽里、根谷崎牧子、大井里香、下地恵令奈、山根努、浴本亨、池口満徳、禾晃和
2. 発表標題 シグナル分子セマフォリンと受容体プレキシンの結合特異性に関する構造生物学的解析
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 田村梨沙子、大井里香、金子美華、加藤幸成、禾晃和
2. 発表標題 構造情報に基づいたエピトープ挿入部位の最適化による安定な複合体形成
3. 学会等名 日本結晶学会2018年度年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 禾晃和
2. 発表標題 セマフォリンとプレキシンの形成する低親和性だが特異的な相互作用
3. 学会等名 日本生物物理学会第56回年会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 禾晃和
2. 発表標題 ApoER2-リーリン複合体の構造から理解するLDLRファミリー受容体におけるリガンド結合と解離
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017) (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 永友芽里、金川櫻、根谷崎牧子、下地恵令奈、池口満徳、禾晃和
2. 発表標題 表面プラズモン共鳴法を用いたセマフォリン6DとプレキシシンA1の低親和性相互作用の定量化
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 田中 翼、根谷崎 牧子、大井 里香、三原 恵美子、野田 勝紀、内山 進、高木 淳一、禾 晃和
2. 発表標題 軸索誘導因子セマフォリンと受容体プレキシシンにおける結合選択性の分子基盤
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 田村梨沙子、大井里香、有森貴夫、加藤幸成、高木淳一、禾晃和
2. 発表標題 抗体断片との共結晶化に向けた標的タンパク質へのPAタグ挿入部位の探索と最適化
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 高貴一徳、大井里香、有森貴夫、三宅拓也、檜作洋平、秋山芳展、加藤幸成、高木淳一、禾晃和
2. 発表標題 超高親和性タグを内部に挿入した複数回膜貫通型タンパク質の精製法の検討
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 禾晃和
2. 発表標題 エンドサイトーシス型受容体ApoER2のリガンド結合状態の結晶構造
3. 学会等名 第55回日本生物物理学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 長江雅倫、Sushil K. Mishra、根谷崎牧子、大井里香、池田明美、松垣直宏、明石知子、萬谷博、水野真盛、矢木宏和、加藤晃一、千田俊哉、遠藤玉夫、禾晃和、山口芳樹
2. 発表標題 ジストログリカノパチー原因遺伝子産物Protein O-Mannosyl Kinase (POMK)の構造生物学的研究
3. 学会等名 第36回日本糖質学会年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 下地恵令奈、山根努、浴本享、禾晃和、池口満徳
2. 発表標題 神経軸索ガイダンス分子セマフォリンと受容体の相互作用のin silico解析
3. 学会等名 第17回日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

Terukazu NOGI, Yokohama City University
<http://www.tsurumi.yokohama-cu.ac.jp/xtal-mls/members/nogi/index.html>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携 研究者	佐藤 毅 (Sato Takeshi) (90403013)	大阪大学・たんぱく質研究所・講師 (14401)	