

令和 4 年 6 月 10 日現在

機関番号：12602

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K22625

研究課題名(和文)一回膜貫通型蛋白質プレキシンの動的な構造変化による活性化機構の解明

研究課題名(英文)Structural investigation of the activation mechanism of the single-transmembrane protein plexins

研究代表者

鈴木 博視 (Suzuki, Hiroshi)

東京医科歯科大学・高等研究院・プロジェクト准教授

研究者番号：50635472

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：神経回路が適切なネットワークを形成するには、様々な軸索ガイダンス因子を細胞膜上で受容し、ニューロンの伸長方向に変化を与える必要がある。その因子を受容する膜タンパク質の一つであるプレキシンの、細胞外からのシグナルタンパク質と結合する事で細胞内の信号へと変換するメカニズムを解明する事で、多細胞生物における細胞形態の変化に関わるシステムの一部を明らかにする。哺乳類細胞発現系による安定な全長プレキシンを精製し、結合因子との複合体を脂質膜に似た環境に再構成したのち、電子顕微鏡による単粒子構造解析法を用いてその像を撮影することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞外からのシグナルを受容するタンパク質の構造は薬理的に非常に重要な一方で、分子全体の立体構造が明らかになっているものは比較的動きの小さなものがほとんどであり、プレキシンの様に柔らかく大きく動く受容体の全体構造を明らかにするための基盤を得る事ができたと言える。また一回膜貫通型受容体が関係する他の細胞間シグナル伝達には、遺伝子変異により癌化などを引き起こすものが多種存在しているため、それらの立体構造および構造変化を明らかにすることで、より疾患や変異による個人差を考慮した治療方針・治療薬を開発する事が可能になる。そのための基盤技術となる事が期待される。

研究成果の概要(英文)：Neural circuit formation requires reception of various axon guidance factors on the neural cell membranes and switching the projecting direction of neurons. Plexins are membrane proteins that recognize one type of the factors, and we aimed to investigate the mechanism how the binding of the extracellular signals are converted to the cytoplasmic signals by plexins. We purified a stable full-length plexin from mammalian cell culture expression system, reconstituted the protein complex with the binding factor in lipid-membrane-like environment and then succeeded to take the molecular images by the single particle analysis using electron microscopy.

研究分野：構造生物学

キーワード：一回膜貫通型受容体 クライオ電子顕微鏡 膜タンパク質 シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

多細胞生物における細胞形態の動的制御には、他の細胞からの近距離・遠距離からのシグナルを受容した膜タンパク質が、細胞質側へと信号を変換し細胞骨格系や遺伝子制御系へと伝える事が必須である。しかし、GPCR やイオントロピック受容体の様な複数回膜貫通型タンパク質などと比べて、一回膜貫通型受容体による細胞外から内への信号伝達に関わる全長での構造的なメカニズムは多くが未解明である。一回膜貫通型受容体には EGF 受容体やインテグリンなど、遺伝子変異が生じることで細胞の癌化をはじめとする疾病の原因になるものがあり、創薬においても重要な標的である。

軸索ガイダンスの忌避因子として最初に同定されたセマフォリンは、プレキシンを受容体として GTPase と共役的に細胞内ヘシグナルを伝え、神経回路の形成や血管新生などに深く関わっている。プレキシン、セマフォリンともに複数のサブタイプが存在して、それぞれに結合特異性があり、Sema ドメインと呼ばれる細胞外の結合領域では 2:2 の複合体を形成するが、この部分構造はどのサブタイプでも類似した構造を持つ事が知られている。しかし、プレキシンの細胞内 GTPase 活性化(GAP)ドメインと細胞外 Sema ドメインの間には、膜貫通領域を含む数百~千アミノ酸に渡る長い細胞外ドメインが存在しており、リガンドであるセマフォリンが結合することで全体構造が大きく変化すると考えられているが、その詳細な構造は明らかになっていなかった(図1)。

2. 研究の目的

全長プレキシン-セマフォリン複合体の立体構造解析により、一回膜貫通型タンパク質のリガンド結合依存的なダイナミックな構造変化が、距離的に遠く離れた細胞質側のドメインの活性化につながる機構と、細胞質側での効果器分子との詳細な相互作用機構を明らかにする。

従来の X 線結晶構造解析では、その長く伸びた可動性の高い細胞ガイドドメインと膜貫通領域を含む特徴ゆえに結晶化自体が困難だと思われるので、クライオ電子顕微鏡を用いた単粒子解析を用いて、脂質膜環境に近い状態で構造解析を行い、その全体構造の連続的な構造変化を明らかにする。これにより、一回膜貫通型受容体の生理的な活性化ダイナミクスを理解する。

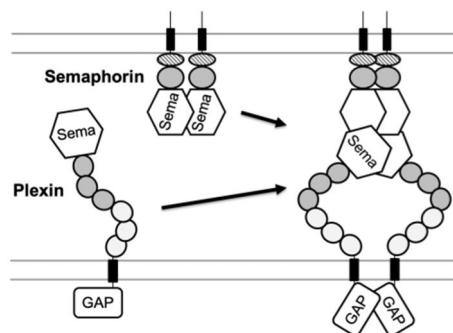


図1 セマフォリンの結合によるプレキシンの活性化モデル

3. 研究の方法

(1) 哺乳類細胞発現系による発現スクリーニング・大量調製

ヒト由来遺伝子の全長タンパク質を安定な状態で発現するために、哺乳類細胞の浮遊培養系を利用する。種々のプレキシン・セマフォリンの遺伝子に蛍光タンパク質 GFP を融合させたコンストラクトを設計し、小スケールにて発現させて蛍光ゲル濾過法によって安定なタンパク質をスクリーニングする。選定された候補遺伝子について、バキュロウイルスを介した哺乳類浮遊細胞での大量発現を行い、アフィニティー精製とゲル濾過クロマトグラフィーを経て純度の良い試料を得る。

(2) 脂質ナノディスク再構成

安定に精製されたプレキシンと、それに対して結合親和性の高いセマフォリンとを混合し、脂質ナノディスクと呼ばれる微小脂質環境に再構成することで、安定な 2:2 の複合体を形成させる。膜貫通領域および細胞内ドメインをできるだけ近接させた環境を再現することで、より生理的に近い状態での構造の安定化を図る。

(3) クライオ電子顕微鏡による単粒子構造解析

脂質ナノディスクに再構成させた複合体について、ネガティブ染色法を用いた電子顕微鏡観察によりその単分散性を評価する。その後、観察用グリッド上にて試料の急速凍結による氷包埋を行い、直接検出器を有したクライオ電子顕微鏡にて全長プレキシン-セマフォリン複合体の粒子像を多数撮影する。粒子像の画像解析により分子形状の違いに基づいた分類を行い、複合体状態の分子構造を明らかにする。

4. 研究成果

(1) 標的とする種をまずヒト *H. Sapiens* およびショウジョウバエ *D. melanogaster* に絞ってプレキシシン・セマフォリン遺伝子を網羅的にクローニングした結果、ヒト遺伝子から3種、ショウジョウバエ遺伝子から2種の発現安定性の高いプレキシシン遺伝子を同定した。その中から特にヒトプレキシシン C1 を選び、大量発現および界面活性剤存在下での精製の系を立ち上げる事ができた。その生理的な結合リガンドとしてはセマフォリン 7A が知られており、この全長タンパク質および細胞外ドメインのみの発現を検討したところ、細胞外ドメインが安定に精製できる事がわかった。また、セマフォリン 7A の高親和性リガンドとして知られる、エクトロメリアウイルス由来のセマフォリン様タンパク質 EVM139 の発現・精製できる系も同時に立ち上げた。

(2) それぞれ単独で精製した全長プレキシシンおよび可溶性セマフォリンを、ナノディスク形成タンパク質 MSP と不飽和脂質分子である DOPC と共に 1:2:10:10000 の比率混合したのち、ポリスチレン吸着剤 (バイオビーズ SM-2) により界面活性剤を除去する事でプレキシシン-セマフォリン複合体を脂質ナノディスク再構成することができた。さらに最終ゲル濾過クロマトグラフィーにかけることで、純度良く単分散性の高い脂質ナノディスク再構成複合体を調製できることを、SDS-PAGE およびネガティブ染色法により確認した (図 2)

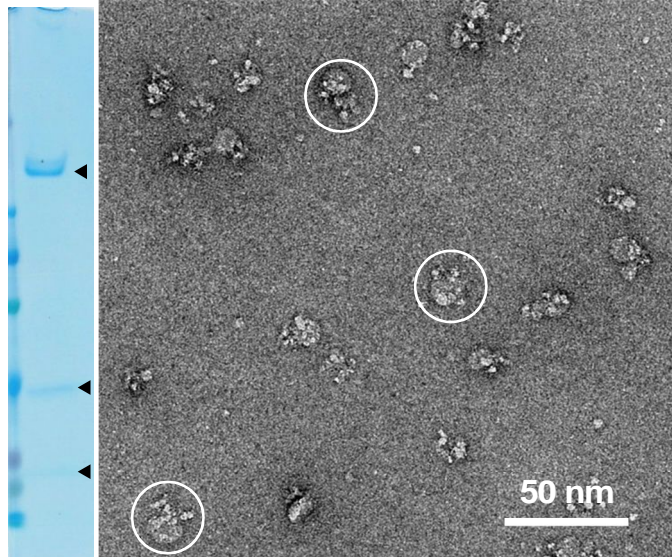


図 2 (左)複合体試料の SDS-PAGE 像。黒三角は上から全長プレキシシン C1、EVM139、MSP を示す。(右)複合体試料のネガティブ染色像。複合体 1 分子を白丸で囲って示す。

(3) 脂質ナノディスク再構成複合体試料の水包埋条件を検討し、液体窒素温度条件にてクライオ電子顕微鏡観察を行った結果、粒子の分散状況の良い条件を見つける事ができた。1000 枚程度の電子顕微鏡写真を収集し、粒子像を 1 分子ずつ拾って切り出し、2 次元平均化処理を行ったところ、セマフォリン二量体とプレキシシンの細胞外領域の二量体が結合した状態と思しき特徴を有する像が得られた。また、プレキシシンの膜貫通領域および細胞内 GAP ドメインに相当する部分の構造はぼやけて見えなくなっており、相対的に大きく安定した領域である細胞外側と比べて、これらの領域は可動性が高く、画像処理の過程で色々な向きに向

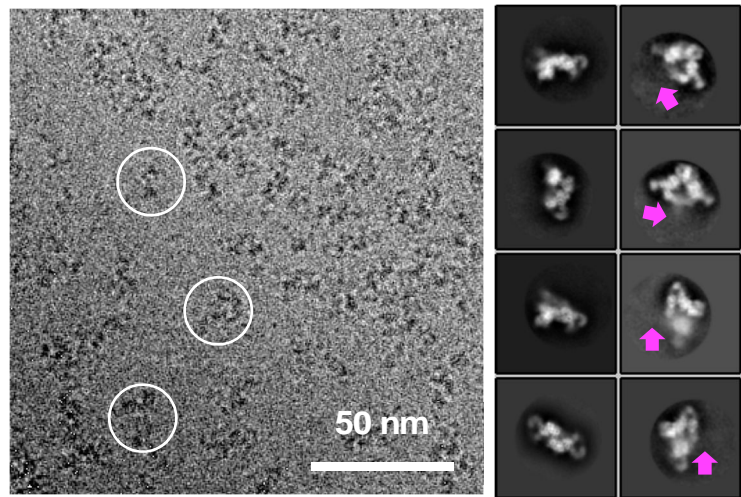


図 3 (左)複合体試料のクライオ電子顕微鏡像。複合体 1 分子を白丸で囲って示す。(右)複合体の 2 次元平均化像。平均化により見えなくなっている領域をマゼンタ矢印で示す。

いた状態で平均化されてしまっている事がわかった。今後の展開として、大量のデータを収集し 3 次元クラス分けによりその膜貫通領域以下にかけてのダイナミックな構造変化をとらえるとともに、脂質ナノディスクの再構成条件を再検討し、より膜領域の構造安定性の高い状態での構造解析を目指す。

また本研究を遂行中に、米国の他のグループより全長プレキシシン C1 とセマフォリン様タンパク質 A39R との複合体構造が報告された (*Nat. Commun.* (2020)11, 1953) が、同様に膜貫通領域以下は可視化できず、構造が明らかになったのは細胞外領域のみであった。それゆえ、異なる種やサブタイプのプレキシシン-セマフォリン複合体についても再検討して進めるべきであるという知見が得られた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------