

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 10 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2012

課題番号：22370039

研究課題名（和文）

膜内プロテアーゼ S2P によるエキソサイト認識を構造生物学的手法で証明する

研究課題名（英文）

Structural study on substrate recognition mechanism of the S2P-type I-CLiP

研究代表者

禾 晃和 (TERUKAZU NOGI)

横浜市立大学・大学院生命ナノシステム科学研究科・准教授

研究者番号：40379102

研究成果の概要（和文）：

本研究では、膜内配列切断という特殊なタンパク質加水分解反応において、いかにして基質認識が制御されているかを明らかにすべく、大腸菌由来の S2P ホモログである RseP を取り上げ、立体構造解析及び機能解析に取り組んだ。RseP のオルソログの有するペイプラズム側に存在する可溶性ドメインについては結晶構造の決定に成功し、また、この領域が基質取り込みに関与することを示した。

研究成果の概要（英文）：

In this project, we carried out structural and biochemical studies on bacterial intramembrane proteases so as to elucidate the molecular mechanism of substrate recognition in the regulated intramembrane proteolysis (RIP). We successfully determined the crystal structure of the periplasmic domain of the intramembrane protease. In addition, we found that the domain is involved in the substrate discrimination in the course of RIP.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	6,300,000	1,890,000	8,190,000
2011 年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
2012 年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
年度			
年度			
総計	14,600,000	4,380,000	18,980,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：構造生物化学

キーワード：立体構造解析、膜タンパク質、プロテアーゼ、結晶化、シグナル伝達

## 1. 研究開始当初の背景

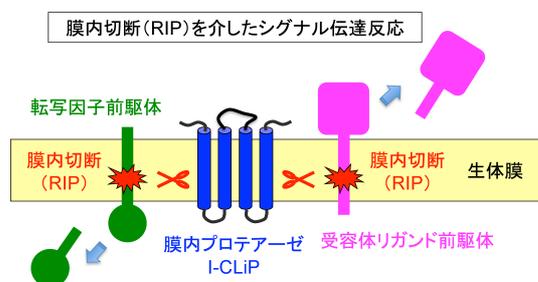
膜内配列切断 (Regulated Intramembrane Proteolysis: RIP) は、生体膜上において特定の膜タンパク質の特定の膜内配列が切断を受ける現象を指す。この RIP を触媒するのは、膜内切断プロテアーゼ (intramembrane cleaving protease: I-CLiP) と呼ばれる特殊なプロテアーゼであり、現在までのところ、

金属プロテアーゼ、アスパラギン酸プロテアーゼ、セリンプロテアーゼの 3 種の膜内切断プロテアーゼファミリーが同定されている。いずれの膜内切断プロテアーゼも活性中心は膜内部にあると考えられており、そもそも加水分解反応であるタンパク質切断が疎水的な膜内で如何にして触媒されているのかということは生化学的な観点から非常に興

味深い問題である。この RIP という名を世界に知らしめたのは、アルツハイマー病と  $\gamma$ -セクレターゼとの関連である。 $\gamma$ -セクレターゼはアミロイド前駆体タンパク質の膜内切断を行うが、切断によって生じたアミロイド  $\beta$  ペプチドが凝集し脳においてアルツハイマー病特有の老人斑を形成するとされている。

実際、RIP は単なる生化学反応ではなく、細胞膜上におけるシグナル伝達反応の一つとして注目される生命現象でもある。RIP において基質となる膜タンパク質の多くは、転写因子や受容体リガンドの前駆体であり、膜内プロテアーゼによって膜から切り離されることにより活性化され、遺伝子の発現誘導や受容体の活性化が起きる。上述の  $\gamma$ -セクレターゼも、アミロイド前駆体の切断とは別に、Notch タンパク質を切断する機能を有し、細胞の分化などにおけるシグナル伝達に関わっている。

このように RIP は、生化学的観点のみなら



ず、医学生理学的観点からも興味深い現象であるため、反応機序の解明に向けて、立体構造解析も精力的に行われていた。研究開始時点でもすでに、いくつかの膜内切断プロテアーゼに関して立体構造が決定されており、水分子がアクセス可能なポケットが膜内に形成されていることや、活性中心が確かに膜内部にあることは明らかにされていた。しかしながら、基質となる膜タンパク質がいかにして特異的な認識を受けているのかという一番重要な問題に関しては、全くもって説明がなされていなかった。一般に、プロテアーゼによる基質の認識には、活性中心が直接認識に関わるエンドサイト認識と活性中心とは離れた領域が認識を行うエキソサイト認識が知られる。膜内切断においては、基質もプロテアーゼも膜内領域は疎水性残基に富んでおり、エンドサイト認識が行われているとするならば、疎水性残基同士でどのような特異的認識が成り立ちうるのかという疑問が生じる。また、エキソサイトが重要であるとするならば、それがどこに存在するのかということが興味深い問題となってくる。本研究の最重要課題は、まさにこの特異的認識の作用機序の解明であり、金属プロテアーゼ型の膜内プロテアーゼである site-2 protease

(S2P) ファミリーを取り上げ、X線結晶解析を用いることで、これに取り組むこととした。

## 2. 研究の目的

S2P は、原核生物から真核生物まで広く存在する膜内切断プロテアーゼであり、その多くはストレス応答に関与する。S2P は site-1 protease (S1P) と協調して働き、膜結合型の転写因子前駆体を切断する。S1P と S2P は二段階の切断を行うが、S2P は必ず S1P によって切断された後の基質を認識し膜内切断を行う。研究代表者は、先行研究において、大腸菌の有する S2P ホモログ RseP の構造機能解析を行い、基質認識制御に関する非常に興味深い事実を明らかにしていた。RseP のペリプラズム領域には2つの PDZ ドメインが存在しているが、申請者が研究を開始する以前は、この PDZ タンデム領域は、基質認識には関わっていないという説が有力であった。そのような状況の中、研究代表者は、キメラタンパク質を用いた生化学的解析という独創的な切り口から、PDZ ドメインがエキソサイトとして認識に関わるという、新たな活性調節のモデルを提唱していた。本研究では、これらの予備的データに基づいて、PDZ タンデムや全長の RseP の立体構造解析を行い、また、並行して機能解析も進めることで、PDZ タンデムが切断反応にどのように関わっているかを検証することとした。

## 3. 研究の方法

### (1) RseP の立体構造解析

#### ①PDZ タンデムの構造解析

本研究では、この PDZ タンデム領域を可溶性断片として発現・精製し、構造解析を行った。まず、PDZ タンデム断片をグルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST) と融合させて発現し、GST に対するアフィニティーカラムを用いて精製を行った。さらに GST 断片をプロテアーゼによって切断した後、ゲルろ過クロマトグラフィーによって最終精製を行った。シッティングドロップ蒸気拡散法用の 96 穴プレートを使用して、ランダムスクリーニングによって結晶化条件の探索を行った。結晶化条件の最適化には、ハンギングドロップ蒸気拡散法を用いた。得られた結晶は抗凍結剤で処理した後、シンクロトロン放射光施設において X 線回折データの収集を行った。X 線回折データの処理には、プログラム HKL2000 を使い、位相決定や構造の精密化には CCP4 program suite を使用した。

また、溶液構造解析のための X 線小角散乱データは、SPRING-8 BL-45XU において測定した。解析は ATSAS のプログラムを使用した。

## ②全長タンパク質の結晶化

RseP やそのオルソログは 4 回膜貫通型の膜内在性タンパク質であるため、大量発現を行う場合も、膜上に発現させる必要がある。本研究では、特に細菌型のオルソログを主な対象としたため、大腸菌を宿主細胞として用いて発現系の構築に取り組んだ。一般的な大腸菌発現系では、菌体破碎の後、可溶性画分を回収しタンパク質を精製するが、本研究では、膜上に発現させた RseP を精製するため、菌体破碎後に超遠心分離によって膜画分を回収した。そして、膜画分から界面活性剤を用いて RseP を可溶化した後、クロマトグラフィ操作によって単離精製した。膜タンパク質の結晶化においては、可溶化に用いる界面活性剤によって結晶化の成否が左右される。このため、本研究でも各種界面活性剤を使用し、RseP を安定に精製出来る界面活性剤を探索した。また、結晶化の成功率を高めることを目的として、全長タンパク質に特異的に結合する抗体を作製し、その Fab 断片を結晶化シャペロンとして用いた。

### (2) RseP の機能解析

大腸菌由来の RseP とオルソログのキメラタンパク質を作製し、RseP のどの領域・モジュールが基質認識や切断活性に影響を及ぼすかを調べた。RseP は大腸菌の生育に必須のタンパク質であることを利用して、変異体が RseP の機能を相補するか否かを調べることによって、基質の切断活性を評価した。また、エピトープタグ付きの RseA をモデル基質として大腸菌内に発現させることで、RseA の切断状態を Western blotting 法によって解析した。

## 4. 研究成果

### (1) RseP の立体構造解析

#### ① PDZ タンデムの構造解析

まず、大腸菌由来の RseP の PDZ タンデムについて結晶化を行ったが、構造の柔軟性が高いためか、全く結晶は得られなかった。そこで、超好熱菌 *Aquifex aeolicus* 由来のオルソログタンパク質の遺伝子をクローニングし、この PDZ タンデムを同じく可溶性断片として、発現・精製し、結晶化に取り組んだ。また、この PDZ タンデムに特異的に結合するモノクローナル抗体から Fab 断片を調製し、結晶化シャペロンとして用いた。広範な条件探索の結果、最終的に、PDZ タンデム単独の状態と Fab との複合体の状態の両方で、結晶を得ることに成功した。PDZ タンデム単独の条件で得られた結晶からは、2.8 Å 分解能の回折データが得られ、Fab 複合体の結晶からは、2.2 Å 分解能の回折データが得られた。

構造解析の結果、この *Aquifex* 由来の RseP の PDZ タンデムにおいては、2 つの PDZ ドメ

インは、互いのリガンド結合部位を向かい合わせにしており、ポケット状の構造を形成していることが分かった。また、PDZ タンデム単独の状態と Fab 複合体の状態で、ドメイン間の角度に顕著な違いが見られた。そこで、本研究では、X 線小角散乱法を用いた溶液構造解析にも取り組み、結晶のバックギングの影響を受けない溶液状態での PDZ タンデムのコンフォメーション変化も調べることにした。解析の結果、溶液状態の PDZ タンデムにおいては、PDZ ドメイン同士が接近して、閉じた構造をとっている可能性が示唆された。

本研究では、さらに結晶が得られなかった大腸菌由来の RseP の PDZ タンデムについても、同様の溶液構造解析を行った。この大腸菌由来の PDZ タンデムにおいては、2 つの PDZ ドメインは 6 残基のリンカーでむすばれており、分子の柔軟性が非常に高い。また、個々の PDZ ドメインは、小型の楕円体状の構造をとっているため、小角散乱データのみからは、一義的な構造を推定することは不可能であった。そこで、大腸菌由来の PDZ タンデムにおいても、2 つの PDZ ドメインは閉じたポケット様の構造をとっていると仮定して、構造予測を行ったところ、モデルから計算した理論的な散乱カーブと実験から得られた散乱カーブの間で、非常に高い相関が得られた。

以上の構造解析から、PDZ タンデムが閉じたポケット様の構造を形成することは、RseP やそのオルソログに共通した性質であることが示唆された。また、PDZ タンデムを持たないホモログタンパク質との配列比較からは、この PDZ タンデムが形成するポケット様の構造体は、膜表面にあって、膜内に埋もれた活性中心に覆い被さるような配置をとっている可能性が考えられた。これらの知見を総合し、研究代表者らは、PDZ タンデムが基質取り込みを制御するサイズ排除フィルターとして機能しているという説を提唱した。

#### ② 全長タンパク質の結晶化

大腸菌由来の RseP やそのオルソログタンパク質の遺伝子をクローニングし、全長タンパク質の発現系を構築した。顕著な発現が見られたものは、順次大量培養し、精製条件の検討を行った。オルソログタンパク質の一部については高発現が見られ、また精製後の安定性も高いものも見出された。それらのオルソログタンパク質については、結晶化条件の探索にも取り組んだが、結晶を得るには至らなかった。

そこで、本研究では、結晶化を促進するため、上記の PDZ タンデムと同様に、オルソログタンパク質に特異的に結合する抗体を作製した。複数の抗体について、Fab とホモログタンパク質の安定的な結合を確認できた。

### (2) RseP の機能解析

本研究では、PDZ タンデムの切断反応にお

ける役割を検証するため、大腸菌由来の RseP とそのオルソログのキメラタンパク質を作製し、機能解析を行った。この実験では、RseP の生理的基質である RseA に対する切断活性が非常に低いオルソログタンパク質を用いて、キメラタンパク質を作製した。低活性型のオルソログの PDZ タンデムを大腸菌由来の RseP の配列に置き換えたところ、活性の顕著な増加が見られたことから、当初は、PDZ タンデムが基質の配列を認識するためのモジュールであると考えた。しかしながら、その後の詳細な解析から、PDZ タンデムは配列特異的な認識を行っているのではないことを示すデータが得られた。これらのキメラ解析の結果と前述の構造情報を元に、研究代表者らは、基質認識におけるサイズ排除モデルを提唱した。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

- (1) Tanaka, H., Miyazaki, N., Matoba, K., Nogi, T., Iwasaki, K. and Takagi, J. Higher-order architecture of cell adhesion mediated by polymorphic synaptic adhesion molecules neuroligin and neuroligin. *Cell Rep.*, 査読有, 2012 年, 2 巻, 101-110 頁  
DOI: 10.1016/j.celrep.2012.06.009.
- (2) Nagae, M., Re, S., Mihara, E., Nogi, T., Sugita, Y., Takagi, J. Crystal structure of the ligand binding domain of  $\alpha 5 \beta 1$  integrin: Atomic details of the fibronectin receptor. *J. Cell Biol.*, 査読有, 2012 年, 197 巻, 131-140 頁  
DOI: 10.1083/jcb.201111077.
- (3) Tanaka, H., Nogi, T., Yasui, N., Iwasaki, K. and Takagi, J. Structural basis for variant-specific neuroligin-binding by  $\alpha$ -neurexin. *PLoS ONE*, 査読有, 2011 年, 6 巻, e19411 頁  
DOI: 10.1371/journal.pone.0019411.
- (4) Nakata, Z., Nagae, M., Yasui, N., Bujo, H., Nogi, T. and Takagi, J. Crystallization and preliminary crystallographic analysis of human LR11 Vps10p domain. *Acta Cryst.* 査読有, 2010 年, F67 巻, 129-132 頁  
DOI: 10.1107/S1744309110048153.
- (5) Nogi, T., Yasui, N., Mihara, E., Matsunaga, Y., Noda, M., Yamashita, N., Toyofuku, T., Uchiyama, S., Goshima, Y., Kumanogoh, A. and Takagi, J.

Structural basis for semaphorin signalling through the plexin receptor. *Nature*, 査読有, 2010 年, 467 巻, 1123-1127 頁  
DOI: 10.1038/nature09473.

[学会発表] (計 5 件)

- (1) 檜作洋平、禾晃和、田畑早苗、川上-田村恵子、小田隆、佐藤衛、高木淳一、秋山芳展、大腸菌 RIP プロテアーゼ RseP のタンデム PDZ ドメインによる新たな機能制御メカニズム、第 85 回日本生化学会大会、2012 年 12 月 16 日、福岡国際会議場 (福岡市)
- (2) 禾晃和、膜内配列切断 (RIP) における PDZ ドメインを介した“基質認識”、大阪大学蛋白質研究所セミナー・包括脳ネットワーク研究会、第 3 回神経科学と構造生物学の融合研究会 (招待講演)、2012 年 10 月 4 日、大阪大学蛋白質研究所 (吹田市)
- (3) 檜作洋平、禾晃和、田畑早苗、川上-田村恵子、小田隆、佐藤衛、高木淳一、秋山芳展、大腸菌表層ストレス応答に関する膜内切断プロテアーゼ RseP の PDZ ドメインによる新たな機能制御メカニズム、第 6 回細菌学若手コロッセウム、2012 年 8 月 10 日大学セミナーハウス (八王子市)
- (4) 禾晃和、檜作洋平、田畑早苗、川上-田村恵子、小田隆、佐藤衛、高木淳一、秋山芳展、膜内切断プロテアーゼ RseP の基質取り込み制御における PDZ タンデムの役割、第 12 回日本蛋白質科学会年会、2012 年 6 月 21 日、名古屋国際会議場 (名古屋市)
- (5) 禾晃和、高木淳一、Structural analysis of PDZ modules of bacterial site-2 protease、26th European Crystallographic Meeting、2010 年 9 月 1 日、Darmstadtium Conference Center (ドイツ、ダルムシュタット市)

[その他]

ホームページ等

研究代表者の研究紹介

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

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

禾晃和 (TERUKAZU NOGI)

横浜市立大学・大学院生命ナノシステム科学研究科・准教授

研究者番号: 40379102

(2) 研究分担者 ( )

研究者番号 :

(3) 連携研究者 ( )

研究者番号 :