

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 3 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26840022

研究課題名(和文)アルツハイマー病危険因子SorLA細胞外領域の構造解明

研究課題名(英文)Structural elucidation of a risk factor for Alzheimer's Disease, sorLA extracellular region

研究代表者

北郷 悠 (Kitago, Yu)

大阪大学・たんぱく質研究所・助教

研究者番号：60507185

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：アルツハイマー病の危険因子である一回膜貫通蛋白質sorLAの細胞外領域全長(sorLAect: 2030残基)について、構造解明を目指した研究を行った。研究開始当初は、分割した断片での構造研究を計画していたが、期間初期にsorLAectをシャペロン蛋白質と共発現させることで分泌発現させる方法を発見したため、組み換えsorLAectの発現・精製系を構築し、その分子形状を透過型電子顕微鏡を用いて観察する計画へと変更した。その結果、世界でも初めてsorLAectのネガティブ染色像を得ることに成功し、分子全体としては折れ曲がりのない伸びた形状を取っていることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In this research project, I have tried to reveal the entire extracellular region of sorLA (sorLAect: 2040 amino acids). SorLA is a single-pass transmembrane protein and is recognized as the potent risk factor of Alzheimer's disease. At the beginning, it was technically impossible to obtain the recombinant sorLAect, and so I planned the structural study using the several divided portions of sorLAect. However, at the early stage of this project, I found the novel way to express the sorLAect by the co-expression method with a chaperon protein. Then I changed the plan for this project to establishing the expression and purification system of sorLAect for the single-molecule visualization using electron microscope. As a result, I successfully obtained the first negatively stained electron micrographs of sorLAect in the world, which showed that sorLAect takes an extended conformation without any sharp turns.

研究分野：構造生物学, X線結晶構造解析

キーワード：アルツハイマー病 sorLA 細胞外蛋白質 結晶化 電子顕微鏡 培養細胞 Vps10p

### 1. 研究開始当初の背景

長大な細胞外領域を持つ一回膜貫通蛋白質 sorLA は、アルツハイマー病患者において高頻度で遺伝子変異が見つかっている、つまりアルツハイマー病の危険因子であることから、一部の研究者の注目を集めていた[1, 2, 3, 4]. sorLA 分子は、そのドメイン構成に YWTD βプロペラドメイン, EGF モジュール, LA モジュールを含むことから, LDLR ファミリー分子に分類され, コレステロール運搬蛋白質である ApoE と結合するという報告と合わせて, コレステロールの細胞内取り込みに関係する受容体であると考えられてきた[5, 6, 7]. 一方で sorLA には他の LDLR ファミリー分子には見られない Vps10p ドメインという 700 残基からなる大きなドメイン構造を有しており, この Vps10p ドメインを介して自身の N 末端領域(切断を受けるプロペプチド)を認識・結合することが報告されていた[8]. 我々は先行研究において, sorLA がこの Vps10p ドメインで, アルツハイマー病の原因因子であるアミロイド β(Aβ)ペプチドを捕捉することを発見し[9], X 線結晶構造解析と生化学的手法による結合実験によってその分子機構を明らかにした[10]. これらの研究によって, sorLA の Vps10p ドメインを通じた機能の知見は得られた一方で, sorLA の細胞外領域全体としては, 前述のように 2000 残基のアミノ酸からなる 20 のドメインで構成されているが, この長大なモジュール構造がどのような構造を取り, 分子機能とどのように関係しているのかは一切不明であった.

### 2. 研究の目的

前項 1. に述べたように, 我々は新しい sorLA の生理機能について発見することができた. その詳細は sorLA が, βシート拡張というメカニズムで細胞内における β凝集ペプチドを捕捉し, それをリソソームへとリクルートすることでその除去を行っているというものであった. それを踏まえた sorLA 研究の次段階として, sorLA 分子の細胞外領域全体がどのような構造を取っているのか, そしてそれが pH やリガンドの有無といった条件の違いによってどのように変化するのかを明らかにすることを計画した.

### 3. 研究の方法

sorLA 細胞外領域全体(sorLAect)の形状を観察するには, sorLAect の組み換え蛋白質を取得する必要があるが, 研究を開始した平成 26 年度当初は, 組み換え sorLAect は発現量が極めて低く, sorLAect を直接用いた生化学的な実験は困難な状況にあった. そこで,

Vps10p ドメインに加えてその下流の YP ドメイン+EGF ドメインという大きな単位(Vps10pYE)での結晶構造解析

さらに大きな構造単位を対象とした電子顕微鏡観察像による単粒子解析

発現可能な分割フラグメントを設計し, 取

得した蛋白質を使った生化学的手法によるドメイン同士の結合実験

という 3 つの手法を組み合わせ, 総合的に sorLAect の全体構造を明らかにするという戦略を立てた. しかし, 研究期間初年度に, 組み換え sorLAect を効率良く発現させる方法を発見したことから(後述), 研究手法を sorLAect の全体像を透過型電子顕微鏡によって可視化することへと大きく変更した. 具体的には

sorLAect の発現・精製条件のさらなる検討を行い, 電子顕微鏡観察を行うのに十分な量と精製度を達成できる標品を安定して取得できる体制を確立する

精製した標品を用いてネガティブ染色による電子顕微鏡観察用サンプルグリッド作製の条件検討を行い, 解釈可能な 2 次元画像を得る

得られた 2 次元画像から sorLAect と思われる粒子像を切り出し, 可能であれば単粒子解析を行って sorLAect の形状を可視化するという戦略を進めることとした.

### 4. 研究成果

#### (1) sorLAect の発現・精製と, 電子顕微鏡を用いた可視化について

sorLAect の組み換え発現は, 以前から研究代表者が所属する研究室において取り組まれていた. N 末端もしくは C 末端にさまざまなタグ配列や, 一般に分泌蛋白質の発現量を上昇させると報告されているヒト由来改変型成長ホルモン断片[11]を付加したものなど, さまざまな試みが行われてきたが, 分子生物学的研究が可能になるほどの発現量を取得することはできていなかった. 研究代表者は, sorLA が LDLR ファミリー分子の特徴とも言える LA モジュールが 11 個も連続していること, そして過去に sorLA が, LDLR ファミリー分子に特異的に結合する分子である RAP と相互作用すると報告されていることに着

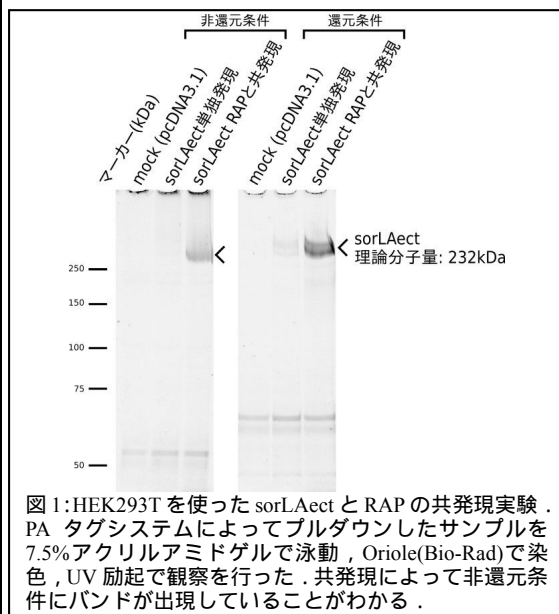


図 1: HEK293T を使った sorLAect と RAP の共発現実験. PA タグシステムによってプルダウンしたサンプルを 7.5% アクリルアミドゲルで泳動, Oriole(Bio-Rad) で染色, UV 励起で観察を行った. 共発現によって非還元条件にバンドが出現していることがわかる.

目し, sorLAect とヒト由来 RAP を共発現させ、さらに当研究室で開発された高親和性ペプチドタグシステム(PA タグシステム[12])を使うことで、通常の染色で確認できる量の組み換え sorLAect の取得に成功した(図 1)。この泳動写真において、RAP と共発現させていない条件でも、還元条件においてごく薄くバンドが確認できるが、同じサンプルが非還元条件では全くバンドが確認できないことから、おそらく RAP は sorLA のフォールディングを助けるシャペロン蛋白質として働いていることが示唆される。つまり共発現させない条件でごく少量発現しているように見える sorLA 蛋白質も、きちんとした折り畳みがされていない、機能する蛋白質ではない可能性が極めて高い。このようにして sorLAect の発現が確認できたため、約 200mL の培養上清から、目的蛋白質を PA タグシステムによって精製し、ゲル濾過クロマトグラフィーによって最終精製標品を得た。ゲル濾過クロマトグラフィーでは、理論分子量よりも大きな位置にシングルピークを得たが、得られたサンプル量は電子顕微鏡観察を行うには非常に少なく、なんらかの方法でサンプル量を上げる必要があった。この時点では、発現宿主として接着細胞である HEK293T を用い、リポフェクション法による遺伝子導入を行っていたが、この発現システムを、当研究室でいくつもの分泌蛋白質における発現量増加に

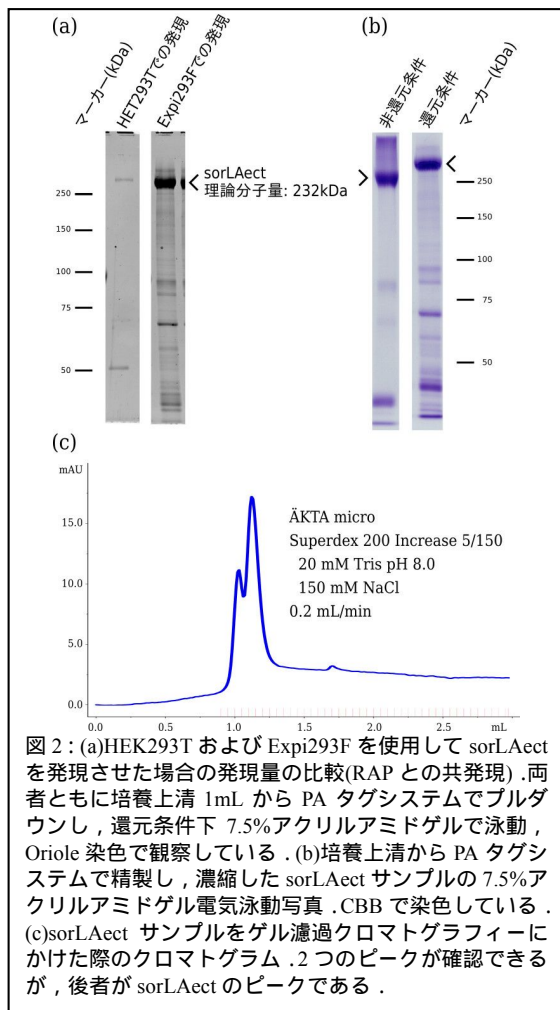


図 2 : (a)HEK293T および Expi293F を使用して sorLAect を発現させた場合の発現量の比較(RAP との共発現) .両者ともに培養上清 1mL から PA タグシステムでプルダウンし、還元条件下 7.5%アクリルアミドゲルで泳動、Oriole 染色で観察している。(b)培養上清から PA タグシステムで精製し、濃縮した sorLAect サンプルの 7.5%アクリルアミドゲル電気泳動写真 .CBB で染色している。(c)sorLAect サンプルをゲル濾過クロマトグラフィーにかけた際のクロマトグラム .2 つのピークが確認できるが、後者が sorLAect のピークである。

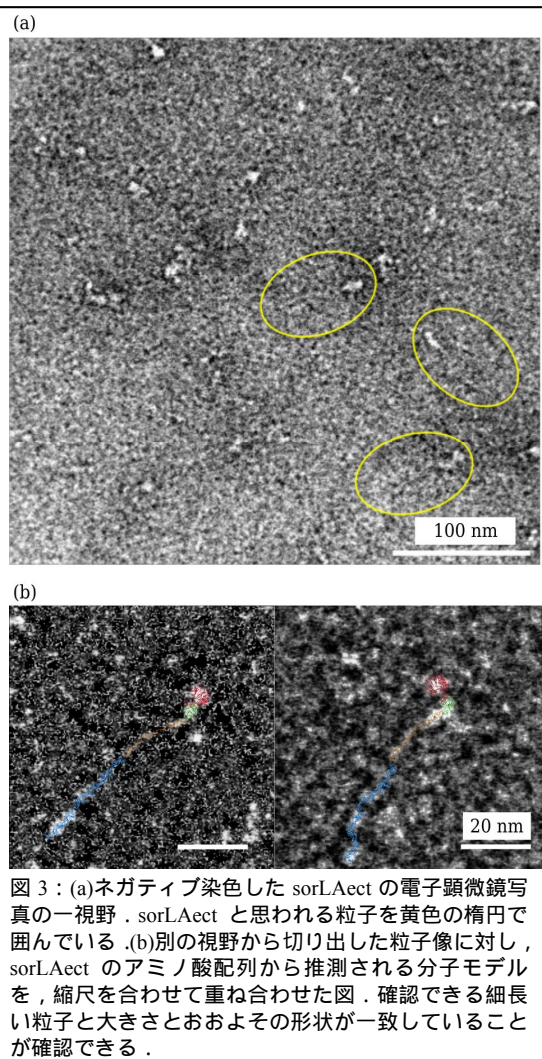


図 3 : (a)ネガティブ染色した sorLAect の電子顕微鏡写真の一視野 .sorLAect と思われる粒子を黄色の楕円で囲んでいる。(b)別の視野から切り出した粒子像に対し、sorLAect のアミノ酸配列から推測される分子モデルを、縮尺を合わせて重ね合わせた図 .確認できる細長い粒子と大きさとおおよその形状が一致していることが確認できる。

実績のある浮遊細胞発現系, Expi293F Expression System(Thermo Fisher Scientific)に変更することで、大幅な発現量の増加に成功した(図 2a) .この Expi293F で分泌発現させた培養上清 30mL から PA タグシステムを使って精製を行ったところ、かなり純度の高い精製標品が得られ(図 2b)、これを限外濾過によって濃縮後、ゲル濾過クロマトグラフィー精製したものを最終精製標品とした。ゲル濾過クロマトグラフィーのクロマトグラムは、HEK293T を使用した際よりもかなり大きくはっきりとしたピークとして得られ(図 2c)、void 領域に溶出した会合体と考えられる画分と容易に分離することができた。この精製標品を使って、電子顕微鏡観察のためのモリブデン酸アンモニウムを用いたネガティブ染色試料調製の条件検討を行った。最終的には 3mm 厚、600 mesh の銅製サンプルグリッド (TED PELLA, INC)にカーボン薄膜を張り付けて作製したものを親水化して用い、調製した最終精製蛋白質標品を 5.0  $\mu$ L 添加したのちに余分な溶液を除いて 2.0 %(w/v) モリブデン酸アンモニウムで 3 度染色を行った。観察は Hitachi 製造型電子顕微鏡 H7650 を加速電圧 80 kV で使用し、sorLAect と考えられる形状を確認するに至った(図 3) .これは世界で初めて、sorLA の外形を可視化した結果であ

る。sorLAect は、そのドメイン構成から予想されるように、非常に細長い形状を取っており、おそらく N 末端の Vps10p および YWTD  $\beta$  プロペラーと考えられる円形が 2 つ連なった形状が確認できた。ただし、11 個の LA モジュールと 6 個のフィブロネクチン type  $\square$  ドメインが直列に連なっている部分は、およそ伸長した形状を取っているものがほとんどであり、丸まった構造を取り得るほど完全に柔軟なわけではないことが示唆された。以上の方法によってネガティブ染色サンプルについては、分子の外形を捉えることができる体制となったため、高解像度・低バックグラウンドで画像取得ができる電子直接検出器 K2 summit(GATAN) を搭載した JEM2200FS(日本電子)を用いて同様の撮影を行い、取得画像上でマニュアルピッキングを行った粒子に対して単粒子構造解析を試みた。420 $\times$ 420px (700 $\times$ 700Å)のボックスサイズでピッキングした約 1,000 粒子に対して、形状のクラス分けと各クラス内での平均化(足し合わせ)を行ったが、クラス分けの時点で優位な解が見出せず、切り出した各粒子間での形状のばらつきが大きいと推察された。よって、sorLAect は、丸まったり折れ曲がったりするほど柔軟な構造を持っているわけではなく、ある程度の剛性を持っているが、個々の分子は揃った形状を持たずにある範囲で可動性を持っていることが強く示唆される結果が得られた。このような分子の構造特性は、必ず sorLA の生理機能において何らかの意味を持っていると考えられるが、現在ではその間を埋める情報が足りていない。現在は、ここまでの実験結果が示す sorLAect の組み換え体発現・精製について、および大まかな分子外形について報告すべく、内容を精査中である。今後は、電子顕微鏡を用いて、sorLAect がより観察しやすい条件検討を行い、リガンド結合等の変化による sorLAect の形状変化を捉える研究を進める。

## (2) Vps10pYE の結晶化について

sorLAect の可視化と並行して、結晶化を目指した精製条件の検討を行っていた Vps10pYE は、結晶化に至る精製条件がほぼ確立し、96 条件 $\times$ 3 パターンの結晶化条件スクリーニングを行うに至ったが、結晶は得られていない。精製条件を確立する過程で判明したのは、CHO 細胞(安定発現株)もしくは Expi293F 発現システム(一過性発現)を用いて分泌発現させた Vps10pYE の画分には、不規則な会合体や限外濾過膜に吸着しやすい、おそらくは不活性な分子が多分に含まれており、PEG 沈殿、陰イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィーによって順次それを除いてやる必要があるということだった。その結果、分泌発現させた培養上清中の Vps10pYE のうち、およそ 3 割程度しか結晶化に供することができないと見積もられ(図 4)、精製条件は確立したものの、リガンド

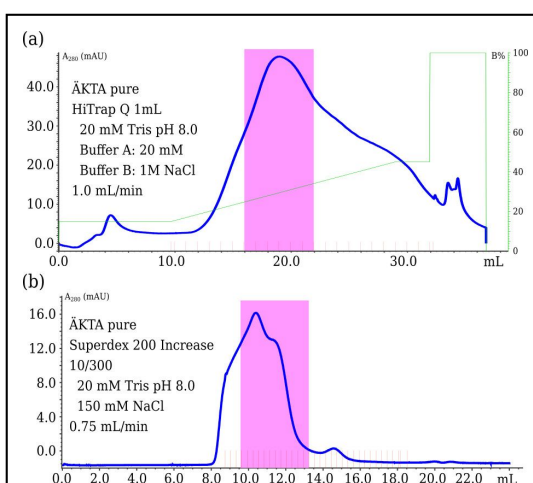


図 4: Vps10pYE 精製における(a)陰イオン交換と(b)ゲル濾過のクロマトグラム。マゼンタの領域を回収した。特に(a)陰イオン交換でこの領域に限定して回収しないと、濃縮時の限外濾過への吸着が非常に大きくなることわかった。

の有無や pH 条件など、十分な結晶化スクリーニングを行うには大量の発現培養上清が必要であることが判明した。この Vps10pYE の結晶化については、研究期間が終了した現在でも鋭意推進中である。

## (3) sorLA Vps10p ドメイン特異的構造認識抗体 93201 の Fab 断片利用について

Vps10pYE の結晶化トライアル手段の一つである、結晶化促進のための抗体 Fab 断片について興味深い結果が派生的に得られた。研究代表者らが sorLA Vps10p ドメインの結晶構造解析を行った際に、結晶化の再現性が極めて悪いことが大きな問題であった。結果的にこの sorLA Vps10p ドメインの構造に関する報告[10]は、sorLA Vps10p ドメインのみ、もしくはリガンドとの共結晶を得ることができたが、さらなる結合様式の解明のためには、結晶化能の改善が必須であった。そのために、sorLA Vps10p ドメインに特異的な構造認識抗体を取得し、その中の一つである 93201 の Fab 断片を用いた結晶化を試みたところ、93201 Fab は非常に強力な結晶化促進能を持っていることを見出した。Vps10pYE に関しても、93201 Fab と強固な複合体を形成することが確認できたため、結晶化への利用を行ったが、それとは別に 93201 と sorLA Vps10p ドメインとの複合体をさまざまにリガンドペプチドと共結晶化させ、その結晶構造解析を行った。93201 Fab は、sorLA Vps10p ドメインの C 末端に位置する 10CCb ドメインを認識しており(図 5a)、可動性の高いこのドメインを固定することで、sorLA の N 末端に存在し、蛋白質成熟の過程で切り離されるプロペプチド断片(Pro<sub>14-18</sub>: LPQDKGFLVVQGDPR)との共結晶構造では、sorLA Vps10p ドメイン単体との共結晶と同様の位置に  $\beta$  シート拡張で認識された Pro<sub>14-18</sub> が確認できたが、なんとその主鎖の方向が 180°逆であった(図 5b)。これは、93201 の結合によって Vps10p ドメイン分子表面のリガンド認識のための溝形状

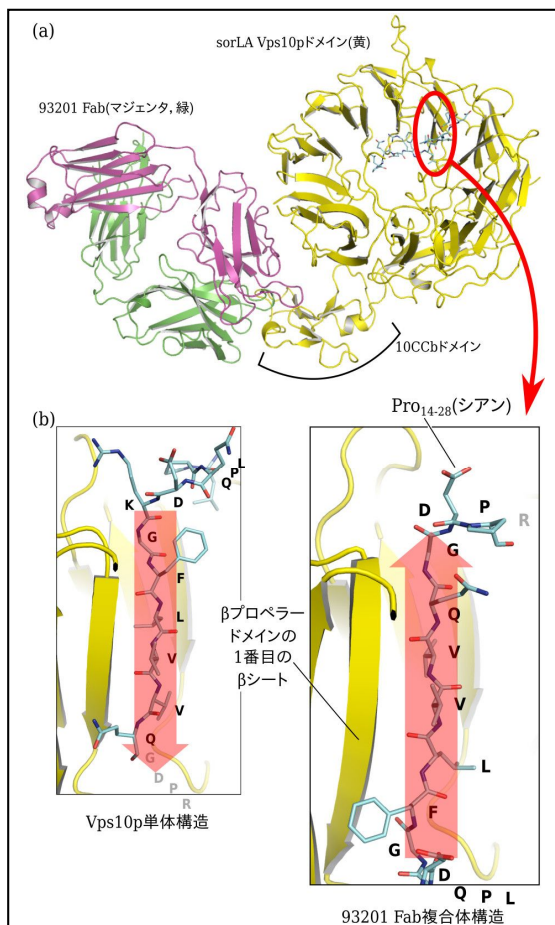


図 5 : (a) sorLA Vps10p ドメインと 93201 Fab 複合体構造の全体図 . 赤円は(b)図に示すリガンドペプチド (Pro<sub>14-28</sub>) の認識位置を示す . (b)リガンドである Pro<sub>14-28</sub> の認識部位を拡大した図 . 左に sorLA Vps10p ドメイン単体と Pro<sub>14-28</sub> の認識部位を , 位置と方向を一致させて示した . 赤い太矢印でしめすように , 単体構造では並行  $\beta$  シート様式で  $\beta$  シート拡張しているのに対して , 93201 Fab 複合体構造では , 逆並行  $\beta$  シート様式になっている .

がアロステリックに変化し,  $\beta$  シート拡張の際の特異性が変化したためと考えられ, Vps10p ドメインは潜在的にペプチドの方向は問わずに  $\beta$  シート拡張による認識能を持つと強く示唆される . このようなリガンド認識モードを持つ蛋白質は今までに報告されていないが, sorLA Vps10p ドメインが厳密な特定のペプチド配列を要求しない「 $\beta$  凝集を起こしやすい性質」に対して特異性を示すという我々の提唱を裏付ける興味深い結果が得られたと言え, 現在この内容について投稿論文を準備中である . さらに, Vps10p ドメイン単体では共結晶化できていなかった複数の  $A\beta$  ペプチド断片との共結晶に関しても, 得られたデータについて構造解析を行っており, sorLA Vps10p ドメインのリガンド認識能をさらに詳細に解明する研究を推進している .

[1]C. R. Scherzer, K. Offe, M. Gearing, H. D. Rees, G. Fang, C. J. Heilman, C. Schaller, H. Bujo, A. I. Levey, and J. J. Lah, “Loss of apolipoprotein E receptor LR11 in Alzheimer’s disease,” *Arch. Neurol.*, vol. 61, no. 8, pp. 1200–1205, 2004.

[2]E. Rogaeva, Y. Meng, J. H. Lee, Y. Gu, T. Kawarai, F. Zou, T. Katayama, C. T. Baldwin, R. Cheng, H. Hasegawa, *et al.*, “The neuronal sortilin-related receptor SORL1 is genetically associated with Alzheimer’s disease,” *Nat. Genet.*, vol. 39, no. 2, pp. 168–177, 2007.

[3]S. E. Dodson, O. M. Andersen, V. Karmali, J. J. Fritz, D. Cheng, J. Peng, A. I. Levey, T. E. Willnow, and J. J. Lah, “Loss of LR11/sorLA enhances early pathology in a mouse model of amyloidosis: evidence for a proximal role in Alzheimer’s disease,” *J Neurosci*, vol. 28, no. 48, pp. 12877–12886, 2008.

[4]K. Bettens, N. Brouwers, S. Engelborghs, P. P. De Deyn, C. Van Broeckhoven, and K. Sleegers, “SORL1 is genetically associated with increased risk for late-onset Alzheimer’s disease in the belgian population,” *Hum. Mutat.*, vol. 29, no. 5, pp. 769–770, 2008.

[5]L. Jacobsen, P. Madsen, S. K. Moestrup, A. H. Lund, N. Tommerup, A. Nykjaer, L. Sottrup-Jensen, J. Gliemann, and C. M. Petersen, “Molecular characterization of a novel human hybrid-type receptor that binds the alpha2-macroglobulin receptor-associated protein,” *J Biol Chem*, vol. 271, no. 49, pp. 31379–31383, 1996.

[6]H. Yamazaki, H. Bujo, J. Kusunoki, K. Seimiya, T. Kanaki, N. Morisaki, W. J. Schneider, and Y. Saito, “Elements of neural adhesion molecules and a yeast vacuolar protein sorting receptor are present in a novel mammalian low density lipoprotein receptor family member,” *J Biol Chem*, vol. 271, no. 40, pp. 24761–24768, 1996.

[7]K. Taira, H. Bujo, S. Hirayama, H. Yamazaki, T. Kanaki, K. Takahashi, I. Ishii, T. Miida, W. J. Schneider, and Y. Saito, “LR11, a mosaic LDL receptor family member, mediates the uptake of ApoE-rich lipoproteins *in vitro*,” *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 21, p. 1501–506, Sep 2001.

[8]L. Jacobsen, P. Madsen, C. Jacobsen, M. S. Nielsen, J. Gliemann, and C. M. Petersen, “Activation and functional characterization of the mosaic receptor sorLA/LR11,” *J Biol Chem*, vol. 276, no. 25, pp. 22788–22796, 2001.

[9]S. Caglayan, S. Takagi-Niidome, F. Liao, A.-S. Carlo, V. Schmidt, T. Burgert, Y. Kitago, E.-M. Fuchtbauer, A. Fuchtbauer, D. M. Holtzman, *et al.*, “Lysosomal sorting of amyloid- $\beta$  by the SORLA receptor is impaired by a familial Alzheimer’s disease mutation,” *Sci. Trans. Med.*, vol. 6, no. 223, pp. 223ra20–223ra20, 2014.

[10]Y. Kitago, M. Nagae, Z. Nakata, M. Yagi-Utsumi, S. Takagi-Niidome, E. Mihara, T. Nogi, K. Kato, and J. Takagi, “Structural basis for amyloidogenic peptide recognition by sorLA,” *Nat. Struct. Mol. Boil.*, vol. 22, no. 3, pp. 199–206, 2015.

[11]D. J. Leahy, C. E. Dann, P. Longo, B. Perman, and K. X. Ramyar, "A mammalian expression vector for expression and purification of secreted proteins for structural studies," *Protein Expr. Purif.* vol. 20, no. 3, pp. 500–506, 2000.

[12]Y. Fujii, M. Kaneko, M. Neyazaki, T. Nogi, Y. Kato, and J. Takagi, "PA tag: a versatile protein tagging system using a super high affinity antibody against a dodecapeptide derived from human podoplanin," *Protein Expr. Purif.*, vol. 95, pp. 240–247, 2014.

## 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 3 件)

北郷 悠 (2015 年): 巨大受容体 sorLA の Vps10p ドメインによるアミロイドペプチド認識の分子機構 . 日本結晶学会誌 Vol.57(6), 331-337

北郷 悠, 高木 淳一 (2015 年 8/22): 巨大受容体 sorLA の Vps10p ドメインによるアミロイド 認識機構とその Alzheimer 病発症における役割 . 医学のあゆみ vol.254(8), 535-539.

北郷 悠, 高木 淳一 (2015 年 2/28): 巨大受容体 sorLA によるアミロイド 分解の促進 . 医学のあゆみ vol.252(9), 963-964.

[学会発表](計 3 件)

北郷 悠, 高木 淳一 . 特異抗体 Fab による sorLA Vps10p ドメインの結晶化促進 . 第 16 回日本蛋白質科学会年会 . ポスター発表 . 2016 年 6 月 . 福岡国際会議場(福岡県, 福岡市)

Kitago Y., Arimori T, Takagi J. New format antibody drives the crystallization of sorLA Vps10p domain. Diffraction Methods in Structural Biology, Gordon Research Conference. Poster. 17-22 Jul 2016, Lewiston ME, USA

Kitago Y., Junichi Takagi. Molecular mechanism for peptide recognition by sorLA Vps10p domain. The 10th International Symposium of the Institute Network. Oral. 23rd Jul 2015, Sapporo, Japan.

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

北郷 悠 (KITAGO, Yu)

大阪大学・蛋白質研究所・助教

研究者番号 : 60507185