

平成22年 5月21日現在

研究種目：若手研究（A）

研究期間：2007～2009

課題番号：19687004

研究課題名（和文）

膜内切断 RIP の分子機構解明に向けた膜内プロテアーゼ RseP の立体構造解析

研究課題名（英文）

Structural studies on intramembrane cleaving proteases

研究代表者

禾 晃和 (TERUKAZU NOGI)

大阪大学・蛋白質研究所・助教

研究者番号：40379102

研究成果の概要（和文）：

本研究では、膜内蛋白質切断という特殊な加水分解反応が如何なる作用機序によって行われているかを明らかにすべく、大腸菌由来の膜内プロテアーゼ RseP を取り上げ、立体構造解析および生化学的解析を進めた。結晶化に向けた全長膜蛋白質の調製に関しては、細菌由来のオルソログの一つが高純度でかつ安定な状態で精製できることを見出し、また機能解析に関しては、ペリプラズム側に存在する可溶性領域が切断に関与していることも明らかにすることが出来た。

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 the regulated intramembrane proteolysis (RIP). We succeeded in purifying one of the intramembrane proteases with high purity and stability. In addition, we have found that the extracellular region of proteases is involved in the interaction with the substrate 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
2007年度	12,300,000	3,690,000	15,990,000
2008年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
2009年度	3,200,000	960,000	4,160,000
年度			
年度			
総計	19,900,000	5,970,000	25,870,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：構造生物化学

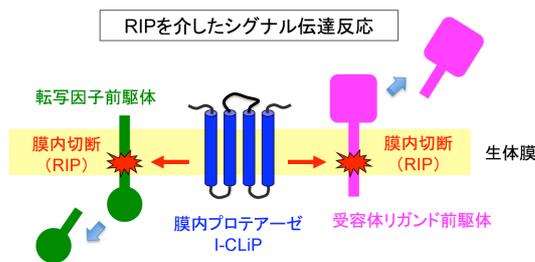
キーワード：構造生物学

## 1. 研究開始当初の背景

膜内蛋白質切断（Regulated intramembrane proteolysis; RIP）は、特定の膜蛋白質が膜内において切断を受ける現

象を差す。RIP を触媒しているのは、intramembrane cleaving protease (I-CLiP) と呼ばれる蛋白質群であり、これらは一般に複数回膜貫通型の蛋白質で、膜内部に活性中

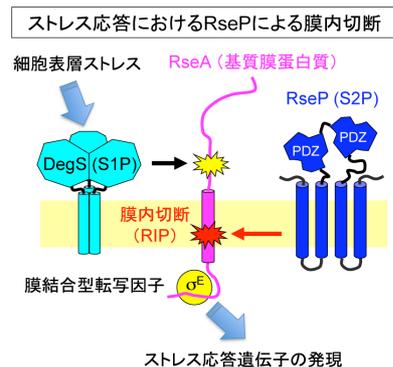
心を有する。RIP の中で最も有名なものは、 $\gamma$ -セクレターゼによるアミロイド前駆体蛋白質 (APP) の切断であり、この切断によってアルツハイマー病患者の脳に蓄積することが知られている AB ペプチドが産生される。この APP の切断だけに注目すると RIP は異常な現象かという印象を受けるかもしれないが、実際には、RIP は生命活動の様々な場面に登場する、細胞にとって必要不可欠な生命現象である。特に、RIP を介した膜上でのシグナル伝達は、通常のリガンド=レセプター系によるシグナル伝達とは全く異なる新たなシグナル伝達様式として注目される現象である。通常のリガンド=レセプター系では、遊離のリガンドがレセプターに結合し、そのコンフォメーションや会合状態を変化させることによってシグナルが伝わる。一方、RIP によるシグナル伝達では、レセプターに相当する膜タンパク質が切断を受け、切断によって膜から切り離される断片がシグナルを伝える役割を担うという大きな違いがある。



課題申請当時、RIP の作用機序の解明は、医学的にも生化学的にも重要な研究課題であると考えられていたが、切断反応の詳細な分子機構は謎に包まれていた。I-CLiP には、アスパラギン酸プロテアーゼ、セリンプロテアーゼ、金属プロテアーゼの 3 種が知られているが、いずれについても、活性中心が膜内のどこに存在するのか、そして、どのような構造をとっているのかということも全くもって不明であった。また、基質特異性に関して、同じ I-CLiP が、切断部位近傍には明確なコンセンサス配列を持たない膜蛋白質群を基質として切断するという一見矛盾した知見が得られており、I-CLiP が基質を如何にして選別しているのかということも非常に興味深い問題となっていた。これらの問いに答えるためには、膜内プロテアーゼの原子レベルでの立体構造情報が必須であると考えられ、当時多くの研究者が I-CLiP の結晶構造解析に着手していた。そのような状況の中、本研究では、金属プロテアーゼ型に分類される RseP という I-CLiP に的を絞って構造解析に取り組むこととした。

RseP は、大腸菌において見出された膜内

プロテアーゼであり、細胞表面ストレス応答に関与することが知られている。大腸菌形質膜上には、一回膜貫通蛋白質 RseA が存在し、その細胞内領域には、ストレス応答遺伝子群の発現調節を行う転写因子  $\sigma^E$  が結合している。細胞表面において外膜蛋白質の変性などストレスがかかると、RseP は DegS プロテアーゼと協調して働き、RseA を二箇所ですべて切断する。DegS はペリプラズム領域で、RseP は膜内で RseA を切断するが、この二段階の切断によって RseA に結合していた  $\sigma^E$  因子は膜から遊離し、ストレス応答遺伝子群の発現が誘導される。一連の反応において、RseP は DegS によって切断を受けた後の RseA を切断しており、この二段階の切断反応は秩序だてで行われている。このように、RseP は単に RseA という蛋白質を認識しているのではなく、ペリプラズム領域が切断された状態を厳密に認識している。本研究でも、RseP が如何にして RseA を認識し、切断を行っているのかという疑問に答えるべく、構造機能解析を進めた。



## 2. 研究の目的

### (1) RseP の立体構造解析

本研究の第一の目的は、I-CLiP である大腸菌由来 RseP の立体構造を決定することである。研究開始当初は、数ある I-CLiP ファミリーのいずれについても高分解能の立体構造情報は得られておらず、活性中心が本当に膜内に形成されているか否かについても不明であった。そこで、RseP の立体構造解析に取り組み、I-CLiP の構造情報を出来る限り多く取得することを目的に研究を進めた。蛋白質の構造情報を得るための手法には、電子顕微鏡解析や核磁気共鳴法など様々あるが、本研究では膜蛋白質の構造決定においても数多くの実績のある X 線結晶構造解析を用いて、構造決定に取り組むこととした。

### (2) 基質認識制御に関する機能解析

上記の構造解析に加えて、I-CLiP が如何にしてコンセンサス配列を持たない基質群を認識・選別しているのかという問題に取り組

むため、生化学的解析も平行して進めた。

### 3. 研究の方法

#### (1) RseP の立体構造解析

##### ①全長蛋白質の発現精製

RseP は 4 回膜貫通型の膜蛋白質であるため、膜上に発現させる必要がある。RseP は元々大腸菌由来の蛋白質であることから、本研究でも、大腸菌を宿主細胞として用いて、RseP の大量発現を行った。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蛋白質を精製するが、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、クロマトグラフィー操作によって単離精製した。膜蛋白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、RseP に限らず一般に膜蛋白質は、可溶性蛋白質に比べて菌体当たりの発現量が非常に少ない。このため、ポリヒスチジンタグなどのアフィニティー精製システムでは、高純度でかつ収率良く発現蛋白質を精製出来ない可能性が考えられた。そこで本研究では、独自に開発したモノクローナル抗体 P20.1 を用いるアフィニティー精製システムを利用して、RseP 蛋白質の精製を試みた。

##### ②ペリプラズム領域断片の結晶解析

RseP の部分構造を決定すべく、ペリプラズム領域についても可溶性断片として発現精製し、結晶化を行った。ペリプラズム領域の配列をグルタチオン-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て、RseP ペリプラズム領域の精製標品を得た。シッピ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 を用い、位相決定や構造の精密化には CCP4 program suite を使用した。

#### (2) 基質認識制御に関する機能解析

RseP の変異体を作製し、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蛋白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。これによって、変異体が、DegS による切断を受けた後の RseA を基質として認識しているかどうかの検証も行った。

### 4. 研究成果

#### (1) RseP の立体構造解析

##### ①全長蛋白質の発現精製

膜内切断の作用機序の全容を理解するため、膜蛋白質である全長の RseP の大量発現を行った。その結果、大腸菌由来の RseP は、mg オーダーの結晶化試料が調製可能である反面、安定性に乏しく結晶化には不向きであることも明らかになった。このため、本研究では、精製蛋白質の安定化と結晶化能の向上を目指して、RseP に特異的に結合するモノクローナル抗体の作成を行った。スクリーニングの結果、計 10 種のモノクローナル抗体が得られ、これらは全て IgG1 に分類されることが分かった。結晶化に適した抗体を探索するため結合能の比較を行った後、パバイン処理によって抗体を Fab 断片化し結晶化に使用した。

また、RseP のオルソログをクローニングし発現精製したところ、細菌由来のオルソログの一つが安定に精製出来ることが明らかになった。このオルソログはゲル濾過クロマトグラフィーにおいても単分散状態で溶出し、結晶化に適した蛋白質であると考えられた。

##### ②ペリプラズム領域断片の結晶解析

RseP のペリプラズム領域を可溶性断片として精製し、結晶化したところ、良質の結晶が得られた。放射光施設である高エネルギー加速器研究機構 Photon Factory において X 線回折データの収集を行ったところ、2.8Å 分解能のデータセットが得られた。

#### (2) 基質認識制御に関する機能解析

RseP のペリプラズム領域に存在する PDZ ドメインは、一般に蛋白質同士の分子認識に関わるモジュールとして知られており、RseP においても基質認識に関与していることが予想されていた。しかしながら、これまでの他の研究者らの遺伝学的な機能解析からは、PDZ ドメインを含むペリプラズム領域が基質認識に関わるというデータは得られておらず、むしろ基質と相互作用して切断を抑制する役割を担うという説が提唱されていた。そのような状況の中、本研究において変異体を多数作製し、その基質切断能を比較していったところ、ペリプラズム領域に変異を導入す

ることによって切断効率に変化が現れることが明らかになった。今後、先に述べたペリプラズム領域の立体構造解析を進め、さらなる変異体を作製して行くことで、切断反応におけるペリプラズム領域の役割を明らかにして行きたい。

#### 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2件)

- ① 禾晃和、寒川剛、田畑早苗、長江雅倫、川上恵子、別府亜耶子、服部光治、安井典久、高木淳一、Novel affinity tag system using structurally defined antibody-tag interaction: Application to single-step protein purification、Protein Science、査読有、Vol. 17、2008、pp. 2120-2126
- ② 寒川剛、禾晃和、高木淳一、A murine monoclonal antibody that binds N-terminal extracellular segment of human protease activated receptor-4、Hybridoma、査読有、Vol. 27、2008、pp. 331-335

[学会発表] (計5件)

- ① 禾晃和、高木淳一、キメラ蛋白質を用いた膜内プロテアーゼの基質認識機構の解析、第82回日本生化学会大会、2009年10月22日、神戸国際会議場(兵庫県)
- ② 禾晃和、高木淳一、細菌型 site-2 protease の基質認識における PDZ ドメインの役割、蛋白研セミナー「膜蛋白質の機能発現メカニズムの解明に向けて—細胞膜上での事象の解析—」、2009年9月24日、大阪大学蛋白質研究所(大阪府)
- ③ 禾晃和、高木淳一、Structural analysis of PDZ domains of bacterial intramembrane proteases、American Crystallographic Association Annual Meeting Toronto 2009、2009年7月28日、Sheraton City Centre Hotel (カナダ、トロント市)
- ④ 禾晃和、高木淳一、ドメインスワッピング変異体を用いた膜内プロテアーゼの基質認識機構の解析、第9回日本蛋白質科学会年会、2009年5月21日、熊本全日空ホテル(熊本県)
- ⑤ 禾晃和、高木淳一、Optimizing detergent-solubilization conditions for

structural analysis of site-2 protease family proteins、Gordon Research Conference “Proteolytic Enzymes & Their Inhibitors”、2008年7月7日、コルビー=ソーヤー=カレッジ(米国・ニューハンプシャー州)

[その他]

ホームページ等

<http://www.protein.osaka-u.ac.jp/rcsf/syntesis/>

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

禾晃和 (TERUKAZU NOGI)

大阪大学・蛋白質研究所・助教

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：