

## 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 5 月 21 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究（A）

研究期間：2010～2012

課題番号：22247010

研究課題名（和文） リポ蛋白質受容体ファミリー分子が担う発生・分化制御シグナル伝達の構造生物学的解明

研究課題名（英文） Structural basis for cell signaling mediated by lipoprotein receptors

## 研究代表者

高木 淳一（TAKAGI JUNICHI）

大阪大学・蛋白質研究所・教授

研究者番号：90212000

研究成果の概要（和文）：医学的・生物学的にインパクトの高い3つのリポ蛋白質受容体（LR）ファミリー分子について、X線結晶構造解析と電子顕微鏡イメージングという解像度の異なる2つの構造生物学的手法と生化学的手法を組み合わせ、シグナル伝達機構の分子基盤を解明する研究を行った。我々の脳を形作るのに必要なリーリンシグナルや、骨の形成やがんに関わるWntシグナル授受のしくみの理解がすすみ、さらにはアルツハイマー病の病因に深く関係するあらたな相互作用を見いだすなどの発見をすることができた。

研究成果の概要（英文）：We have utilized X-ray crystallography and electron microscopy to decipher the structural mechanism underlying signaling through the lipoprotein receptor family proteins. We have gained information about reelin signal transduction in brain development and Wnt signal transduction implicated in cancer and bone formation. Also, we have unraveled a previously undescribed molecular interaction involving LR11 which is implicated in Alzheimer disease.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	13,100,000	3,930,000	17,030,000
2011年度	10,300,000	3,090,000	13,390,000
2012年度	10,400,000	3,120,000	13,520,000
年度			
年度			
総計	33,800,000	10,140,000	43,940,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物化学

キーワード：リポ蛋白質受容体、X線結晶構造解析、電子顕微鏡、エンドサイトーシス

## 1. 研究開始当初の背景

リポ蛋白質受容体（LR）ファミリー分子は、コレステロール取り込みに関わるエンドサイトーシス受容体であるLDL受容体と類似の構造を持つためにこう総称されているが、そのメンバーの多くは実は「リポ蛋白質」とは何の関係もない機能をもっていることがわかってきた。それらは発生・分化に重要なシグナル分子を認識して特異な情報伝

達経路を開始し、またがんやアルツハイマー病など様々な疾患にも本質的に関与する。LRファミリー分子は複数のドメインからなるモジュラー構造をした巨大細胞外領域をもち、それらがそれぞれの受容体のコンテキストの中できわめてユニークな機能的役割を果たしている。LRファミリーの中でも特に以下の3つの受容体系はいずれも研究の重要度が高い。

(1) reelin はほ乳類の脳の層構造形成を支配する巨大細胞外蛋白質であり、そのヒトでの欠損は重篤な脳形成不全(滑脳症)を引き起こすほか、統合失調症、自閉症との関連も報告されている。その受容体である ApoER2 の欠損も同様に重篤な神経発生異常を来すが、ニューロンが reelin を認識するとどうして複雑な細胞移動を経て正常な層構造形成に至るのか、その細胞内メカニズムは全くわかっていない。進化上 reelin は脊椎動物以上で突然出現し、reelin シグナルの獲得はまさに生物が「脳」という組織を持つための最初の決め手となる現象であった可能性がある。同時にそれは reelin シグナルが「新しい」パスウェイであることも意味し、進化的に良く保存されたシグナルパスウェイの研究との対比という意味できわめて重要である。

(2) Wnt は生物の発生においてもっとも本質的かつ広範な役割をもつシグナル分子であるだけでなく、Wnt シグナル系の異常はがんをはじめとする疾患に深く関わる。LRP6 (とその近縁分子である LRP5) は Frizzled とともに Wnt 受容体を構成し、とくにカノニカルな Wnt シグナル伝達系において中心的役割を果たす(Kikuchi et al, *Cell Signal.* 2007)。また LRP6 はアルツハイマー病やメタボリックシンドロームの危険因子であることも報告され(そのメカニズムは不明)(DeFerrari et al, *PNAS* 2007; Mani et al, *Science* 2007)、その医学的・生物学的重要性は多くの製薬会社がこぞってその研究に取り組んでいることからわかる。ところが LRP6 は細胞上での発現量が低く、しかも発現を制御する特殊なシャペロンが存在するなど、その構造はもとより生化学的な解析に立ち足るハードルが極めて高い。

(3) LR11 (sorLA とも呼ばれる) は LR ファミリー分子の中でもきわめてユニークなモジュール構造をしており、酵母の液胞輸送に関わる蛋白質 Vps10p と相同なドメインを1つ持つ。この分子はニューロンに特異的に発現しているが、2007年にこの分子が家族性アルツハイマー病と遺伝的に強く連鎖していることがわかると、アルツハイマー病の病因、創薬ターゲットとして一躍有名になった。アルツハイマー病の原因とされる A $\beta$  の産生・蓄積に対し抑制的に働くが、そのメカニズムに関してはほとんど不明である。

研究開始時において、上記3つの受容体系について高分解能の立体構造は得られて居らず、これらのシグナル伝達メカニズムに関して真の分子レベルでの議論をすることができない状態であった。

## 2. 研究の目的

本研究は、互いに大きく異なる3つの LR ファミリー分子(reelin 受容体である ApoER2、Wnt 受容体である LRP6、APP 輸送受容体である LR11)に注目し、「受容体によるリガンドの認識とそれに伴う構造変化」という共通の観点から、構造生物学的手法を駆使してこれら受容体の担うシグナル伝達メカニズムに迫ることを目的とした。これによって、LR ファミリー分子を介する新しい細胞生化学的パスウェイの基本を整理し、Wnt 経路のような生物学的大問題の解明や、がん、アルツハイマー病などの疾患メカニズム解明に、様々な分野の研究者がより直接的に分子レベルで迫るための論理基盤を切り開くことを目標とした。

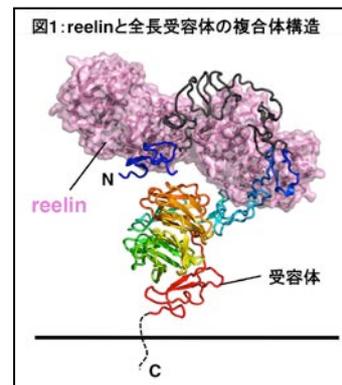
## 3. 研究の方法

本研究の第一の独創性は、代表者のもつ、難発現性・難解析性の巨大受容体蛋白質を世界に類を見ない品質およびスピードをもって調製する技術にあった。代表者は独自のアフィニタグシステムや特殊な細胞を用いた糖タンパク質組み換え生産の最適化などの技術開発を通して、本研究でターゲットとする様々な受容体、リガンド蛋白質の高品質発現を行う。第二に本研究の構造解析の特徴は、multidisciplinary という点である。これまでの構造生物学研究の多くは立体構造決定を最終目的としていることが多く、しかも単一の手法を用いることが多い。本研究は X線結晶構造解析と電子顕微鏡イメージング という分解能の異なる手法を併用して、受容体のスナップショットだけでなくそのダイナミックな性質も捉えることができる。しかも、構造解析の結果を変異体デザインなどに生かし、細胞を使った機能解析によって、「細胞機能において蛋白質間相互作用が果たす役割」を検証していく。前述のように本研究が対象とする分子はすべて医学的・生物学的な重要性が極めて高く、得られる立体構造情報やシグナリングメカニズムはがん、アルツハイマーなどを対象とした制御化合物の開発につながる可能性も大いにある。

## 4. 研究成果

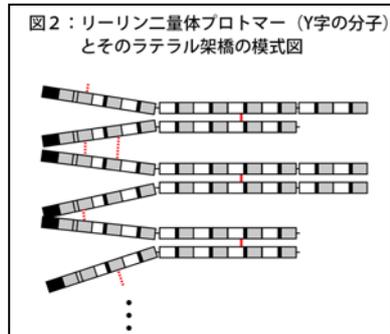
研究 1 (reelin 受容体系): 研究開始時にお

いて、reelin の受容体結合活性断片 (R56) と、受容体である ApoER2 の細胞外領域全長 (約 800 残基) と R56 の複合体の結晶化に成功していたが、(図

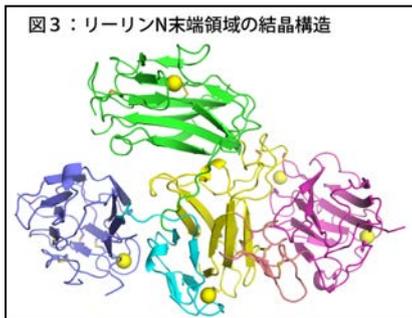


1)、この巨大な構造の精密化はほぼ終了し、現在論文執筆中である。これとは別に、巨大で複雑な野生型リーリンの高次構造についての研究を進め、リーリンのプロトマーであるジスルフィド二量体の形成に関わる Cys 残基の同定と、生理的条件下で存在するリーリン分子種の決定を蛋白質化学的手法で始めて明らかにすることができた(図2, 報文8)。

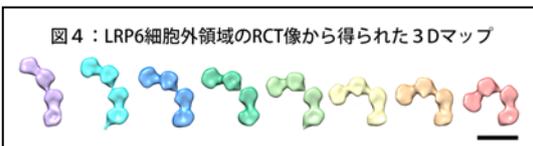
さらに、未だに構造が不明であった reelin の N 末端領域の結晶化と構造解析に成功し(図



3、論文執筆中)、この領域に存在する有名な機能阻害抗体 CR50 のエピトープを決定するための実験系の構築を終了した。

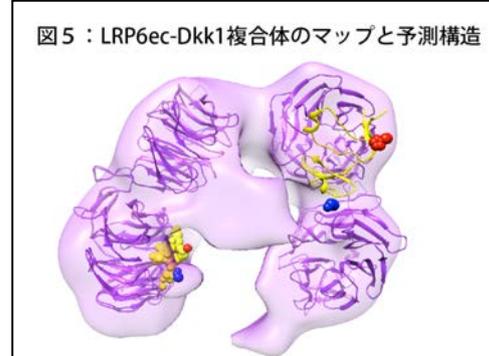


**研究2 (LRP6系):** 研究開始時において LRP6 細胞外領域の組み換え蛋白質のネガティブ染色試料を使って電子顕微鏡イメージングで分解能およそ 20Å の二次元平均化像の取得に成功していたが、同じ試料を用いてランダムコンカルチルト法によって3D構造を導くことに成功した(図4)。続いて、LRP6

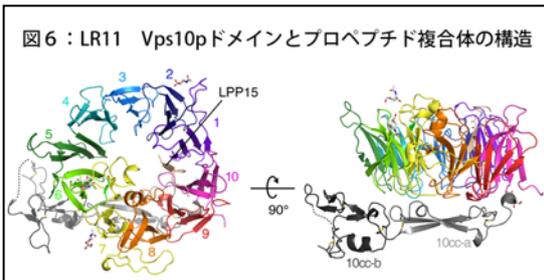


細胞外領域の組み換え蛋白質と、リガンドである Dkk1 との複合体についてネガティブ染色試料を用いた電子顕微鏡イメージングでその構造(二次元平均化画像)を得ることに成功した。また結晶化へ向けて、上記の受容体とリガンドを共発現する安定細胞株の樹立に成功した。さらに、LRP6 の糖鎖に相当する密度の可視化に成功し、糖鎖が LRP6 の

コンフォーメーションと機能に影響を与えている可能性を示唆する結果をえた。現在論文執筆中である。また、同複合体の結晶化に成功し、低分解能ながら回折データの取得もおこなった。

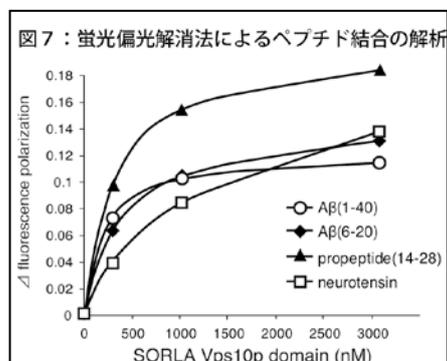


**研究3 (LR11系):** LR11(sorLA)はLRファミリー分子の中でも Vps10p ドメインを持つ点で非常にユニークなメンバーであり、このドメインが LR11 の生理機能に非常に重要なことが予想されていた。研究開始時においてこの LR11 の Vps10p ドメイン単独の構造を 3.5Å 分解能で解明していたが、その後、数々のコンストラクト改変、精製手段の改良、結晶化条件の精密化などを通し、最終的に 2.4Å 分解能の構造取得に成功した(報文11および論文執筆中)。この構造はリガンド結合の起こらない酸性 pH におけるものであったが、さらに、中性 pH において内因性リガンドである自身のプロペプチドとの複合体を結晶化、構造解析に成功した(図6)。得られた

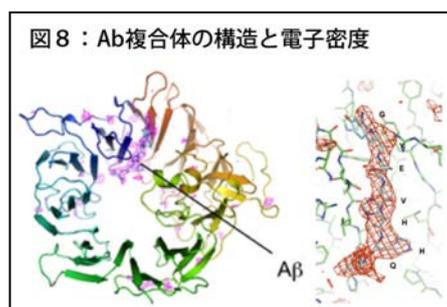


構造は、10枚羽根のβプロペラーフォールドでできた中空のリング上のドメインの中に、ペプチドがβ-sheet extensionを通して結合するというものであった。また、蛍光偏光法を用いて様々なペプチドリガンドとの相互作用を測定する系を確立し、新たなリガンドの発見およびLR11のVps10pドメインに結合するペプチドの配列モチーフを同定することに成功した(図7)。極めて重要なことに、新たに発見されたリガンドの一つはアルツハイマー病の原因因子であるアミロイ

ドβ (Aβ) ペプチドであった。この後、LR11の Vps10p ドメインに Aβ が直接結合することを様々な生化学的によっても明らかにし、さらには海外研究者との共同研究で LR11 が細胞内の Aβ のクリアランスに関わっている



ことを明らかにした。この結果は現在論文投稿中である。加えて、研究期間終了の直前に、Aβ ペプチドと Vps10p ドメインの複合体の 3.1Å 分解能での構造決定にも成功した (図 8)。



以上のように、3つのサブテーマについて予想を上回る構造解析が進展し、さらに LR11 については、同受容体の生理機能に関してこれまでまったく想定されていなかった「アミロイドペプチドに対するクリアランス機能」が立体構造解明によって始めて示唆され、しかもその仮説が共同研究を通して細胞やマウスを用いた実験で実証されつつあるという、構造生物学研究の強みを十二分に生かした研究テーマに仕上げることができた。

## 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 2 2 件)

1) Nojima S, Toyofuku T, Kamao H, Ishigami C, Kaneko J, Okuno T, Takamatsu H, Ito D, Kang S, Kimura T, Yoshida Y, Morimoto K, Maeda Y, Ogata A, Ikawa M, Morii E, Aozasa K, Takagi J, Takahashi M, Kumanogoh A

(2013) A point mutation in Semaphorin 4A associates with defective endosomal sorting and causes retinal degeneration. *Nature Commun.* 4:1406. doi: 10.1038/ncomms2420. (査読あり)

2) 北郷 悠、高木淳一 (2012) LDL 受容体ファミリーの構造と蛋白質間相互作用、*The Lipid*, 23(4), 56-62. (査読なし)

3) Kato K, Nishimasu H, Okudaira S, Mihara E, Ishitani R, Takagi J, Aoki J, Nureki O. (2012) Crystal structure of Enpp1, an extracellular glycoprotein involved in bone mineralization and insulin signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 109, 16876-16881. doi: 10.1073/pnas.1208017109. (査読あり)

4) Tanaka, H., Miyazaki, N., Matoba, K., Nogi, T., Iwasaki, K., and Takagi, J. (2012) Higher-order architecture of cell adhesion mediated by polymorphic synaptic adhesion molecules neuroligin and neuroligin. *Cell Reports*, 2(1), 101-110. doi: 10.1016/j.celrep.2012.06.009. (査読あり)

5) Kato K, Nishimasu H, Mihara E, Ishitani R, Takagi J, Aoki J, and Nureki O. (2012) Expression, purification, crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of Enpp1. *Acta Crystallogr. F*, 68(7), 778-782. doi: 10.1107/S1744309112019306. (査読あり)

6) Matoba K, Takagi J, Yasunaga T, Jinnai H, Iwasaki K. (2012) Tilt-angle measurement of a sample stage using a capacitive liquid-based inclinometer. *J Electron Microscop* (Tokyo). 61(3), 193-198. doi: 10.1093/jmicro/dfs034 (査読あり)

7) Nagae, M., Re, S., Mihara, E., Nogi, T., Sugita, Y., and Takagi, J. (2012) Crystal structure of  $\alpha 5 \beta 1$  integrin e. Atomic details of the fibronectin receptor. *J. Cell Biol.* 197(1), 131-140. doi: 10.1083/jcb.201111077 (査読あり)

8) Yasui, N., Kitago, Y., Beppu, A., Kohno, T., Morishita, S., Gomi, H., Nagae, M., Hattori, M. and Takagi, J. (2011) Functional importance of covalent homodimer of reelin protein linked via its central region. *J. Biol. Chem.*, 286(40), 35247-35256. doi: 10.1074/jbc.M111.242719 (査読あり)

9) Tanaka, H., Nogi, T., Yasui, N., Iwasaki, K. and Takagi, J. (2011) Structural Basis for Variant-Specific Neuroligin-Binding

by  $\alpha$ -Neurexin. *PLoS One*, 6, e19411 doi: 10.1371/journal.pone.0019411 (査読あり)

10) Nishimasu, H., Okudaira, S., Hama, K., Mihara, M., Dohmae, N., Ishitani, R., Takagi, J., Aoki, J., Nureki, O. (2011) Crystal structure of Autotaxin, a secreted lysophospholipase D that generates GPCR-signaling lipid mediator. *Nature Struct. Mol. Biol.* 18, 205-212. doi: 10.1038/nsmb.1998 (査読あり)

11) Nakata, Z., Nagae, M., Yasui, N., Bujo, H., Nogi, T., and Takagi, J. (2011) Crystallization and preliminary crystallographic analysis of human LR11 Vps10p domain. *Acta Crystallographica., F67*, 129-132. doi: 10.1107/S1744309110048153 (査読あり)

12) Nogi, T., Yasui, N., Mihara, E., Matsunaga, Y., Noda, M., Yamashita, N., Toyofuku, T., Goshima, Y., Kumanogoh, A, and Takagi, J. (2010) Structural basis for semaphorin signaling through the plexin receptor. *Nature* 467, 1123-1127. doi: 10.1038/nature09473 (査読あり)

13) Kishimoto-Okada, A., Murakami, S., Ito, Y., Horii, N., Furukawa, H., Takagi, J., Iwasaki, K. (2010) Comparison of the envelope architecture of E. coli using two methods: CEMOVIS and cryo-electron tomography. *J. Electron Microsc.* 59, 419-426. doi: 10.1093/jmicro/dfq056 (査読あり)

[学会発表] (計 56 件)

1) Takagi, J., Multi-faceted approach to analyze structure and function of integrins. , Gordon Research Conference (Fibronectin, Integrins, & Related molecules, 2013.2.14, Ventura (USA)

2) Iwasaki, K., Superimposition of a crystal structure over EM images, KeyStone Symposia "Structural Analysis of Supramolecular Assemblies by Hybrid Methods", 2013.3.5, Lake Tahoe (USA)

3) Iwasaki, K., In situ molecular analysis by electron microscopy, IPR International Symposium 2012, -Toward the Molecular Comprehension of Life System-, 2012.11.22, Osaka

4) 的場京子、Wnt 共受容体 LRP6 の電子顕微鏡単粒子解析、第 12 回日本蛋白質科学会年会、2012.6.21、名古屋

5) 高木淳一、蛋白質の立体構造から理解する細胞外シグナル授受のしくみ、第 12 回日

本抗加齢医学会 シンポジウム、2012.6.24、横浜

6) 高木淳一、ソーティング受容体 LR11 の持つ“弱くて特異性の低い”相互作用の秘密、第 2 回 「神経科学と構造生物学の融合」セミナー、2011.11.21 岡崎

7) Takagi, J. Structural basis for peptide ligand recognition by LR11/sorLA Vps10p domain , Keystone Symposia "ApoE, Alzheimer's and Lipoprotein Biology", 2012.2.28, Key Stone (USA)

8) Kitago, Y. et al, Structural basis for peptide ligand recognition by LR11 Vps10p domain, PDB40 symposium, 2011.10.28, New York (USA)

9) 北郷 悠 他、LR11 Vps10p ドメインのリガンド認識機構、2011 年度日本結晶学会年会、2011.11.24、札幌

10) 長江 雅倫 他、リーリン N 末端断片の精製及び結晶化、2011 年度日本結晶学会年会、2011.11.24、札幌

11) 禾 晃和、脳の層構造形成を制御するリーリンシグナルの分子機構、蛋白質研究所セミナー・細胞表面受容体と細胞内輸送 2011.1.12, 大阪

12) Nakata, Z., Takagi, J. et al., Structural and functional analysis of LR11 Vps10p domain, American Crystallographic Association, 2010.7.25, Chicago(USA)

[図書] (計 1 件)

1) 寒川 剛、高木淳一 (2011) タンパク質間相互作用の検出-表面プラズモン共鳴法、「タンパク質実験ノート(下)」(岡田雅人、三木裕明、宮崎 香 編) 羊土社, pp 132-137.

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 2 件)

名称: タグペプチド及びその利用

発明者: 高木淳一

権利者: 国立大学法人大阪大学

種類: 特許

番号: 特許第 5 2 5 7 9 9 7 号

取得年月日: 平成 25 年 5 月 2 日

国内外の別: 国内

名称: TAG PEPTIDE HAVING A PROTEASE RECOGNITION SEQUENCE AND USE THEREOF

発明者: 高木淳一

権利者: 国立大学法人大阪大学

種類: 特許

番号：13/265,024  
取得年月日：平成24年12月26日  
国内外の別：国外（米国）

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.protein.osaka-u.ac.jp/rcsfp/synthesis/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

高木 淳一 (TAKAGI JUNICHI)  
大阪大学・蛋白質研究所・教授  
研究者番号：90212000

### (2) 研究分担者

岩崎 憲治 (IWASAKI KENJI)  
大阪大学・蛋白質研究所・准教授  
研究者番号：20342751  
禾 晃和 (NOGI TERUKAZU)  
大阪大学・蛋白質研究所・助教  
研究者番号：40379102  
(H22まで分担者として参画)

### (3) 連携研究者

禾 晃和 (NOGI TERUKAZU)  
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  
(H23～24まで)