

平成 30 年 6 月 21 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26291016

研究課題名(和文)複合的構造解析による膜内プロテアーゼRsePの膜内・膜外での基質認識機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of substrate recognition mechanism of I-CLiP in the trans- and juxta-membrane regions

研究代表者

禾 晃和 (NOGI, Terukazu)

横浜市立大学・生命医科学研究科・准教授

研究者番号：40379102

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、制御された膜内におけるタンパク質切断(Regulated intramembrane proteolysis: RIP)を触媒する膜内切断プロテアーゼ(Intramembrane cleaving protease: I-CLiP)を取り上げ、I-CLiPが膜内部や膜近傍において、いかにして基質を認識するのかを明らかにすべく、立体構造解析と生化学的な機能解析に取り組んだ。その結果、Site-2 proteaseファミリーに属する細菌由来のRsePには、基質結合に関わる特徴的な膜内  $\beta$ -シート構造があることを示す結果が得られ、膜内部における基質の構造変化に関する理解が進んだ。

研究成果の概要(英文)：In this project, we carried out structural and biochemical studies on intramembrane cleaving protease (I-CLiP) that catalyzes the regulated intramembrane proteolysis (RIP) so as to elucidate molecular mechanism by which I-CLiP recognizes its substrate membrane protein in the trans-membrane and juxta-membrane regions. Specifically, we studied on bacterial RsePs belonging to the site-2 protease family. It has been shown by our work that bacterial RsePs possess a characteristic intramembrane  $\beta$ -sheet implicated in the substrate binding. Our results contributed to a further understanding of conformational change of substrate membrane proteins within the transmembrane region.

研究分野：構造生物学

キーワード：タンパク質 シグナル伝達 酵素 膜タンパク質 立体構造解析

## 1. 研究開始当初の背景

膜内配列切断 (Regulated intramembrane proteolysis: RIP) は、生体膜上において膜貫通型タンパク質の膜内配列が切断を受ける現象を指す。RIP は、膜内部という疎水的環境下で起こる加水分解反応であり、非常にユニークな生化学的反応である一方、切断される基質が転写因子や受容体リガンドの前駆体タンパク質であることから、細胞内シグナル伝達の一様式としても考えられている生命現象である。また、アミロイド前駆体タンパク質の RIP によって生じる A $\beta$  ペプチドがアルツハイマー病特有の老人斑を形成するという例にも代表されるように、RIP は様々な疾患の発症にも関わっていることから、医学的にも注目を集める生命現象である。RIP を触媒するのは、膜内切断プロテアーゼ (Intramembrane-cleaving protease: I-CLiP) と呼ばれる膜内在性のプロテアーゼであり、金属プロテアーゼ型の Site-2 Protease (S2P)、アスパラギン酸プロテアーゼ型の  $\gamma$ -secretase/SPP、セリンプロテアーゼ型の Rhomboid の 3 つのファミリーが同定されている。上述のように、これら I-CLiP の多くはシグナル分子の切断に関わっており、例えば、真核生物から原核生物まで広く存在する S2P ファミリーは、ステロール代謝制御やストレス応答などに関わる転写因子を活性化する。 $\gamma$ -secretase は、アミロイド前駆体タンパク質の RIP に関わるのみならず、形態形成に関わるシグナル分子 Notch の切断なども行う。また、Rhomboid ファミリーは、成長因子前駆体を膜から遊離させることが知られている。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、これを触媒する I-CLiP に関しても精力的な立体構造解析が展開されてきた。課題申請の時点でも、細菌や古細菌由来の I-CLiP に関しては研究が進んでおり、3 つのファミリー全てについて少なくとも 1 例ずつは全長構造が報告されていた。一連の構造解析から、I-CLiP の活性中心が脂質二重層の内部に存在しており、加水分解反応に必要な水分子を活性中心へと運ぶためのチャンネルが膜内に形成されていることが明らかになっていった。しかしながら、これらの構造はいずれも I-CLiP 単独の状態のものであり、I-CLiP が基質をいかにして認識しているかという問いに対しては明確な答えは得られていなかった。そこで、研究代表者は、S2P ファミリーの I-CLiP である RseP をとりあげ、構造生物学的な見地から基質認識の分子機構の解明に取り組むこととした。

## 2. 研究の目的

研究代表者は、先行研究の結果に基づいて、「I-CLiP は、基質のサイズ変化を認識する」というモデルを提唱し、RIP に関する構造機

能解析を進めていた。RIP の多くでは、基質膜タンパク質は可溶性領域が切り取られた後に膜内部で切断を受けるが、この 2 段階切断の詳細な分子機構は明らかではなかった。研究代表者は、S2P ファミリーの I-CLiP である RseP の可溶性領域に存在する 2 つの PDZ ドメイン (PDZ タンデム) の立体構造を決定し、ポケット状の構造体を形成することを示した。そして、変異体解析に基づき、PDZ タンデムがフィルターとして機能することで 1 段階目の切断後の基質のサイズ変化を識別し、活性部位への取り込みを制御すると考えた。本研究課題では、膜外・膜内における基質認識の分子機構をさらに深く理解すべく、全長 RseP の立体構造解析と機能解析に取り組むこととした。

## 3. 研究の方法

## (1) RseP の X 線結晶構造解析

大腸菌を宿主として、細菌由来の RseP を複数種大量発現させ、界面活性剤で可溶化することで精製を行なった。精製タンパク質は脂質キュービック相 (LCP) に組み込み、結晶化条件の探索を行なった。また、結晶化の促進を目的として、RseP の可溶性ドメインを認識するモノクローナル抗体の断片を結晶化シャペロンとして使用した。微結晶が析出した場合は、大型放射光施設 SPring-8 の微小結晶用ビームライン BL32XU を利用し、X 線回折実験を行なった。

## (2) RseP の生化学的機能解析

基質認識の作用機序の解明を目的として、RseP に対して変異導入を行ない、機能評価を行なった。機能評価の実験は、連携研究者である秋山芳展教授との共同研究によって行なった。また、結晶化の促進を目的として変異導入を行なった際も、生化学的な実験を行なって変異体の機能評価を行なった。

## (3) 基質膜タンパク質のスペクトル測定

基質膜タンパク質の膜内での状態を検証すべく、研究分担者である佐藤毅教授との共同研究でラベル化した基質膜タンパク質の化学合成とスペクトル測定を行なった。

## 4. 研究成果

## (1) RseP の X 線結晶構造解析

先行研究において取得していた RseP を認識するモノクローナル抗体から Fab 断片を調製した。まず、パパインによって Fc 領域と Fab 領域を切断した後、抗原の部分断片を固定化したカラムを用いて、Fab 断片をアフィニティー精製した。この手法によって Fab 断片は高純度で精製できたが、全長の RseP の結晶化を促進する効果が見られなかった。

## (2) RseP の生化学的機能解析

本研究における最大の研究成果は、実験結果に基づいて膜内における基質結合に関するモデルを提唱できたことである。RsePの全長タンパク質の立体構造は未解明であるが、配列解析から、その膜貫通部位には細胞内膜に発現するタンパク質としては例外的にβ-シート構造が存在すると予測された。本研究では、この特徴的なモチーフが切断反応に寄与するという仮説を立て基質との架橋実験などを行なった結果、このRsePの推定β-シート領域が基質の結合部位であることを示すデータが得られた。RsePの基質である1回膜貫通型のタンパク質は単独ではα-ヘリックス構造をとるが、この推定β-シート領域と相互作用することで切断を受けやすい状態へと構造変化する可能性が示された。

研究代表者は、先行研究においてRsePのペリプラズム領域が基質のサイズ変化を認識するフィルターとしてはたらくというモデルを提唱した。そして、本研究では、フィルターを通してRsePに取り込まれた基質がどのように活性部位に提示されるのかということについて妥当性の高いモデルを提唱するに至った。一連の結果は、膜内配列切断の反応機構の理解を深化させる重要な研究成果であると考えられる。

### (3) 基質膜タンパク質のスペクトル測定

RsePの基質の膜貫通-膜近傍領域のペプチドを化学合成し、固体NMR測定を行なった。その結果、推定膜貫通領域は脂質二重層に組み込まれるものの、ヘリックス構造がほどけやすい性質があることがわかった。このNMR解析から、今後の基質認識機構の解明に向けた研究において有用な基質の物性に関する情報が得られた。

## 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 10 件)

- ① Arai T, Araya T, Sasaki D, Taniguchi A, Sato T, Sohma Y, Kanai M., Rational design and identification of a non-peptidic aggregation inhibitor of amyloid-β based on a pharmacophore motif obtained from cyclo[-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-]., *Angew Chem Int Ed Engl.*, 査読有, Vol. 53, No. 31, 2014, 8236-8239. doi: 10.1002/anie.201405109.
- ② Tamagaki H, Furukawa Y, Yamaguchi R, Hojo H, Aimoto S, Smith SO, Sato T., Coupling of transmembrane helix orientation to membrane release of the juxtamembrane region in FGFR3., *Biochemistry*, 査読有, Vol. 53, No. 30, 2014, 5000-5007. doi: 10.1021/bi500327q.
- ③ Arai T, Sasaki D, Araya T, Sato T, Sohma Y, Kanai M., A cyclic KLVFF-derived peptide aggregation inhibitor induces the formation of less-toxic off-pathway amyloid-β oligomers., *Chembiochem.*, 査読有, Vol. 15, No. 17, 2014, 2577-2583. doi: 10.1002/cbic.201402430.
- ④ Kitago Y, Nagae M, Nakata Z, Yagi-Utsumi M, Takagi-Niidome S, Mihara E, Nogi T, Kato K, Takagi J., Structural basis for amyloidogenic peptide recognition by sorLA., *Nat Struct Mol Biol.*, 査読有, Vol. 22, No. 3, 2015, 199-206. doi: 10.1038/nsmb.2954.
- ⑤ Takagi-Niidome S, Sasaki T, Osawa S, Sato T, Morishima K, Cai T, Iwatsubo T, Tomita T., Cooperative roles of hydrophilic loop 1 and the C-terminus of presenilin 1 in the substrate-gating mechanism of γ-secretase., *J Neurosci*, 査読有, Vol. 35, No. 6, 2015, 2646-2656. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3164-14.2015.
- ⑥ Akiyama K, Mizuno S, Hizukuri Y, Mori H, Nogi T, Akiyama Y., Roles of the membrane-reentrant β-hairpin-like loop of RseP protease in selective substrate cleavage., *Elife.*, 査読有, Vol. 4, 2015, e08928. doi: 10.7554/eLife.08928.
- ⑦ Leroy E, Defour JP, Sato T, Dass S, Gryshkova V, Shwe MM, Staerk J, Constantinescu SN, Smith SO., His499 Regulates Dimerization and Prevents Oncogenic Activation by Asparagine Mutations of the Human Thrombopoietin Receptor., *J Biol Chem*, 査読有, Vol. 291, No. 6, 2016, 2974-2987. doi: 10.1074/jbc.M115.696534.
- ⑧ Nogi T, Mihara E, Yasui N, Takagi J., Immunoaffinity Purification of the Glycosylated Extracellular Fragment of Mouse Plexin A2 Produced in a Mammalian Expression System., *Methods Mol Biol.*, 査読有, Vol. 1493, 2017, 57-72. [https://link.springer.com/protocol/10.1007%2F978-1-4939-6448-2\\_4](https://link.springer.com/protocol/10.1007%2F978-1-4939-6448-2_4)
- ⑨ Nagae M, Mishra SK, Neyazaki M, Oi R, Ikeda A, Matsugaki N, Akashi S, Manya H, Mizuno M, Yagi H, Kato K, Senda T, Endo T, Nogi T, Yamaguchi Y., 3D structural analysis of protein O-mannosyl kinase, POMK, a causative gene product of dystroglycanopathy., *Genes Cells*, 査読有, Vol. 22, No. 4, 2017, 348-359. doi: 10.1111/gtc.12480.
- ⑩ Hirai H, Yasui N, Yamashita K, Tabata S, Yamamoto M, Takagi J, Nogi T., Structural basis for ligand capture and release by the endocytic receptor ApoER2., *EMBO rep*, 査読有, Vol. 18, No. 6, 2017, 982-999. doi: 10.15252/embr.201643521.

[学会発表] (計 21 件)

- ① 山下恵太郎、平井秀憲、安井典久、田畑早苗、高木淳一、禾晃和、山本雅貴、「フラグメントの制約付き実空間探索による不明瞭な電子密度へのモデルのアサイン」、第 14 回日本蛋白質科学会年会、2014 年
- ② 平井秀憲、安井典久、田畑早苗、山下恵太郎、山本雅貴、高木淳一、禾晃和、「リーリン-ApoER2 複合体の結晶構造解析」、第 14 回日本蛋白質科学会年会、2014 年
- ③ 秋山光市郎、水野慎也、檜作洋平、禾晃和、森博幸、秋山芳展、「大腸菌膜内切断プロテアーゼ RseP の保存された膜内挿入ループ領域の機能解析 (若手奨励賞シンポジウム)」、第 14 回日本蛋白質科学会年会、2014 年
- ④ 平井秀憲、安井典久、田畑早苗、山下恵太郎、山本雅貴、高木淳一、禾晃和、「ApoER2 細胞外領域-リガンド複合体が明らかにする LDLR ファミリーのリガンド認識メカニズム」、第 16 回日本蛋白質科学会年会、2015 年
- ⑤ Nogi T., "Crystallographic analyses of cell-surface receptors revealed the presence of low-affinity interfaces regulating the signal transduction.", The 53rd Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan, 2015 年
- ⑥ Akiyama K, Mizuno S, Hizukuri Y, Mori H, Nogi T., Akiyama Y., "Analysis of the conserved membrane-reentrant loop of RseP, an intramembrane-cleaving protease", EAJS2015: East Asia Joint Symposium 2015, 2015 年
- ⑦ 一井紗恵、根谷崎牧子、大井里香、佐藤毅、禾晃和、「細胞表面受容体の機能解析に向けた部位特異的標識導入技術の検討」第 38 回日本分子生物学学会年会・第 88 回日本生化学会大会合同大会、2015 年
- ⑧ 金川櫻、根谷崎牧子、大井里香、三原恵美子、野田勝紀、内山進、高木淳一、禾晃和、「表面プラズモン共鳴法を用いたセマフォリン 6D とプレキシン A1 の結合選択性の検証」第 38 回日本分子生物学学会年会・第 88 回日本生化学会大会合同大会、2015 年
- ⑨ 秋山光市郎、水野慎也、檜作洋平、森博幸、禾晃和、秋山芳展、「S2P ファミリー膜内切断プロテアーゼ RseP の膜内挿入ループ領域を介した基質選別」第 38 回日本分子生物学学会年会・第 88 回日本生化学会大会合同大会、2015 年
- ⑩ 禾晃和、「1 回膜貫通型受容体によるリガンド認識とシグナル伝達の分子機構解明に向けた構造生物学」、蛋白質研究所セミナー・Mechanism of Biology on the Membrane: 生体膜上での生物化学、2016 年
- ⑪ 禾晃和、「マルチドメイン型細胞表面受容体によるリガンド結合と解離の調節 (招待講演)」、蛋白質研究所セミナー・「膜タンパク質の構造ダイナミクス」 Structural dynamics of membrane proteins、2016 年
- ⑫ 下地恵令奈、浴本享、山根努、禾晃和、池口満徳、「神経軸索伸長ガイダンス分子セマフォリンと受容体プレキシンのタンパク質複合体の分子モデリング」、第 16 回日本蛋白質科学会年会、2016 年
- ⑬ 禾晃和、「LDL 受容体ファミリーの立体構造解析から見えてきた脂質代謝のメカニズム (招待講演)」、金沢大学超然プロジェクト講演会、2016 年
- ⑭ 下地恵令奈、山根努、浴本享、禾晃和、池口満徳、「神経軸索ガイダンス分子セマフォリンと受容体の相互作用の in silico 解析」、第 17 回日本蛋白質科学会年会、2017 年
- ⑮ 長江雅倫、Sushil K. Mishra、根谷崎牧子、大井里香、池田明美、松垣直宏、明石知子、萬谷博、水野真盛、矢木宏和、加藤晃一、千田俊哉、遠藤玉夫、禾晃和、山口芳樹、「ジストログリカンパチー原因遺伝子産物 Protein O-Mannosyl Kinase (POMK) の構造生物学的研究」、第 36 回日本糖質学会年会、2017 年
- ⑯ 禾晃和、「エンドサイトーシス型受容体 ApoER2 のリガンド結合状態の結晶構造 (招待講演)」、第 55 回日本生物物理学会年会、2017 年
- ⑰ 高貫一徳、大井里香、有森貴夫、三宅拓也、檜作洋平、秋山芳展、加藤幸成、高木淳一、禾晃和、「超高親和性タグを内部に挿入した複数回膜貫通型タンパク質の精製法の検討」、2017 年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017)、2017 年
- ⑱ 田村梨沙子、大井里香、有森貴夫、加藤幸成、高木淳一、禾晃和、「抗体断片との共結晶化に向けた標的タンパク質への PA タグ挿入部位の探索と最適化」、2017 年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017)、2017 年
- ⑲ 田中翼、根谷崎牧子、大井里香、三原恵美子、野田勝紀、内山進、高木淳一、禾晃和、「軸索誘導因子セマフォリンと受容体プレキシンにおける結合選択性の分子基盤」、2017 年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017)、2017 年
- ⑳ 永友芽里、金川櫻、根谷崎牧子、下地恵令奈、池口満徳、禾晃和、「表面プラズモン共鳴法を用いたセマフォリン 6D とプレキシン A1 の低親和性相互作用の定量

- 化」、2017 年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017)、2017 年
- 21 禾晃和、「ApoER2-リーリン複合体の構造から理解する LDLR ファミリー受容体におけるリガンド結合と解離 (招待講演)」、2017 年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017)、2017 年

大井 里香 (OI, Rika)  
高貫 一徳 (TAKANUKI, Kazunori)  
田村 梨沙子 (TAMURA, Risako)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

<http://www.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 (NOGI, Terukazu)  
横浜市立大学・大学院生命医科学研究科・教授  
研究者番号：40379102

### (2)研究分担者

佐藤 毅 (SATO, Takeshi)  
京都薬科大学・薬学部・教授  
研究者番号：90403013

### (3)連携研究者

秋山 芳展 (AKIYAMA, Yoshinori)  
京都大学・ウイルス・再生医科学研究所・教授  
研究者番号：10192460

### (4)研究協力者

檜作 洋平 (HIZUKURI, Yohei)