

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：82118

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K06985

研究課題名(和文) SYLFドメインタンパク質の膜変形活性機構の解明

研究課題名(英文) Structural analysis of membrane-deforming SYLF domain proteins

研究代表者

川崎 政人 (KAWASAKI, Masato)

大学共同利用機関法人高エネルギー加速器研究機構・物質構造科学研究所・准教授

研究者番号：00342600

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：エンドサイトーシスに関与する膜変形タンパク質SYLFドメインの結晶構造解析を行った。まず高度好熱菌サーモトーガ・マリテイマのSYLFドメインを結晶化し、2.2オングストローム分解能で立体構造を決定した。その立体構造に基づき、結晶化を阻害すると予想されるループ部分を削除したヒトのSYLFドメインの改変タンパク質を作製した。その結果、これまで結晶化の不可能であったヒトSYLFドメインの結晶化に成功し、2.0オングストローム分解能で立体構造を決定することが出来た。SYLFドメインは新規フォールドであり、塩基性残基に富んだ領域が膜と相互作用すると予想された。

研究成果の概要(英文)：SYLF domain is a new member of membrane-deforming protein implicated in endocytosis. The crystal structure of SYLF domain of thermophilic bacteria *Thermotoga maritima* was determined at 2.2 angstrom resolution. Based on the structure, a predicted loop region of human SYLF domain was deleted. The modified human SYLF domain could be crystallized and structure was determined at 2.0 angstrom resolution. SYLF domain adopts a novel fold and the basic surface patches were expected to interact with membrane.

研究分野：構造生物学

キーワード：X線結晶構造解析 エンドサイトーシス 膜変形タンパク質

1. 研究開始当初の背景

(1) エンドサイトーシスは細胞膜受容体や栄養物質の取り込み、ウイルスやバクテリアの感染など多彩な生理現象に関与する。エンドサイトーシスは、細胞膜が細胞質側に引き込まれて縊り取られるダイナミックな生体膜の変形現象である。近年、生体膜変形活性を持つタンパク質群が相次いで発見され、複雑なエンドサイトーシスの過程を、膜変形タンパク質と生体膜との相互作用による物理現象として理解することが可能となりつつある。例えば ENTH ドメインや F-BAR ドメインは人工膜小胞 (リポソーム) を細長いチューブ状に変形する。

(2) 連携研究者である伊藤俊樹博士は約 215 残基から成る新たなイノシトールリン脂質結合ドメインに膜変形活性があることを発見し、「SYLF (シルフ) ドメイン」と命名した。SYLF ドメインは既知の膜変形タンパク質との相同性を持たず、これまで知られている膜変形タンパク質とは異なる作動機序でエンドサイトーシスに関与すると考えられる。研究代表者は、伊藤博士が 2011 年に SYLF ドメインを論文発表した直後に共同研究を開始し、ヒト SYLF ドメインの結晶化を試みてきた。しかし、様々な発現領域のコンストラクトを作製して組み換えタンパク質を大腸菌で発現させてみたものの、結晶の得られない状況が長く続いていた。

(3) SYLF ドメインは高度好熱菌を含む原核生物からカビ、酵母、脊椎動物に至るまで高度に保存されている。例えば高度好熱菌サーモトーガ・マリティマ (Thermotoga maritima; 至適増殖温度 80 °C) の SYLF ドメイン遺伝子とヒトの SYLF ドメインは 34% のアミノ酸が同一という高い相同性を示す。一般的に高度好熱菌のタンパク質は結晶化において良好な成績を挙げてきた。そこでサーモトーガ・マリティマの SYLF ドメインをクローニングし発現、精製、結晶化を試してみたところ、ようやく結晶化に成功することができた (図 1)。

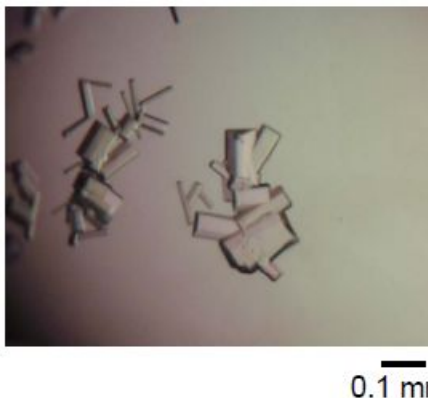


図 1. サーモトーガ・マリティマの SYLF ドメインの結晶

2. 研究の目的

エンドサイトーシスはすべての細胞が持つ基本的な機能である。エンドサイトーシスは細胞膜の複雑な変形過程から成り立っている。その過程で細胞膜は、膜変形活性を持つタンパク質と相互作用することで形を変える。2011 年に連携研究者により発見されたヒトの SYLF ドメインタンパク質はエンドサイトーシスに関与するが、その膜変形機構の解明には構造情報が不可欠である。本研究では SYLF ドメインの X 線結晶構造解析を行うことにより、エンドサイトーシスにおける SYLF ドメインによる細胞膜の形状変化のメカニズムを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) ヒトの SYLF ドメインは結晶化しないため、まず高度好熱菌サーモトーガ・マリティマの SYLF ドメインの立体構造を明らかにする。これまでに得られているサーモトーガ・マリティマの SYLF ドメインの結晶化条件の最適化を行い、分解能を向上させる。SYLF ドメインは新規フォールドと予想されるので分子置換法では位相決定できない。そこでセレノメチオニン置換体を作製し異常分散法による位相決定を行う。

(2) サーモトーガ・マリティマの SYLF ドメインの構造に基づき、ヒトの SYLF ドメインを結晶化するための合理的なデザインを行う。これまでヒト SYLF ドメインは試行錯誤では結晶は得られなかった。しかしホモログの立体構造情報があれば合理的な結晶化のデザインが可能になる。タンパク質表面のアルギニンやリジン残基をアラニンに置換することで表面エントロピーを低下させる方法は結晶化に有効である。ただし、アルギニンやリジンは脂質との結合に関与する可能性がある。そこで SYLF ドメインのモデル構造に基づき、結晶化を阻害すると考えられるループ部分を取り除いた改変タンパク質をデザインする。これらの合理的なデザインによりヒト SYLF ドメインを結晶化する。結晶化のために改変したヒト SYLF ドメインが脂質結合活性を失っていないことを確認する。ヒト SYLF ドメイン単独および脂質との複合体の結晶化を行う。

4. 研究成果

(1) 高度好熱菌サーモトーガ・マリティマの SYLF ドメインの X 線結晶構造解析
ヒトの SYLF ドメインは高度好熱菌サーモトーガ・マリティマの SYLF ドメインと 34% のアミノ酸が同一であり、両者は同じフォールドと考えられる。高度好熱菌サーモトーガ・マリティマの SYLF ドメインの結晶について、放射光ビームラインを利用して結晶の X 線回折能のチェックを行い、結晶化条件と凍結条件の最適化を行った。セレノメチオニン置換

体を作製し（図2）異常分散法による位相決定を行い、2.2 オングストローム分解能で立体構造を決定することが出来た。



0.1 mm

図2 . サーマトーガ・マリティマの SYLF ドメインのセレノメチオニン置換体の結晶

サーモトーガ・マリティマの SYLF ドメインは6本のヘリックスと9本のストランドからなる新規フォールドであることが明らかになった（図3）。

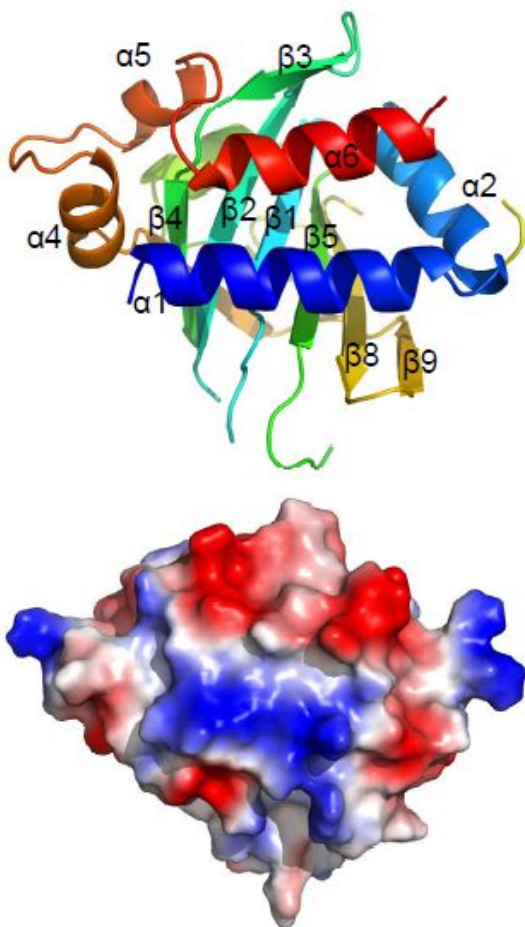


図3 . サーマトーガ・マリティマの SYLF ドメインの結晶構造のリボンモデル（上）と表面電荷分布（下）

（2）ヒト SYLF ドメインの X 線結晶構造解析

ヒトの SYLF ドメインと34%のアミノ酸が同一であるサーモトーガ・マリティマの SYLF ドメインの結晶構造を基に、ヒト SYLF ドメインの立体構造を予測した。サーモトーガ・マリティマの SYLF ドメインの結晶構造では、電子密度の観察されないループが存在した。予測される構造に基づき、結晶化を阻害すると予想されるループ部分を人為的に削除した改変タンパク質を作製した。その結果、これまで結晶化の不可能であったヒト SYLF ドメインについて初めて結晶化に成功し、2.0 オングストローム分解能で立体構造を決定することが出来た（図4）。ヒト SYLF ドメインはサーモトーガ・マリティマの SYLF ドメインと同じフォールドであったが、表面電荷はより塩基性に富んでおり、リン脂質が結合する部位と予想された。

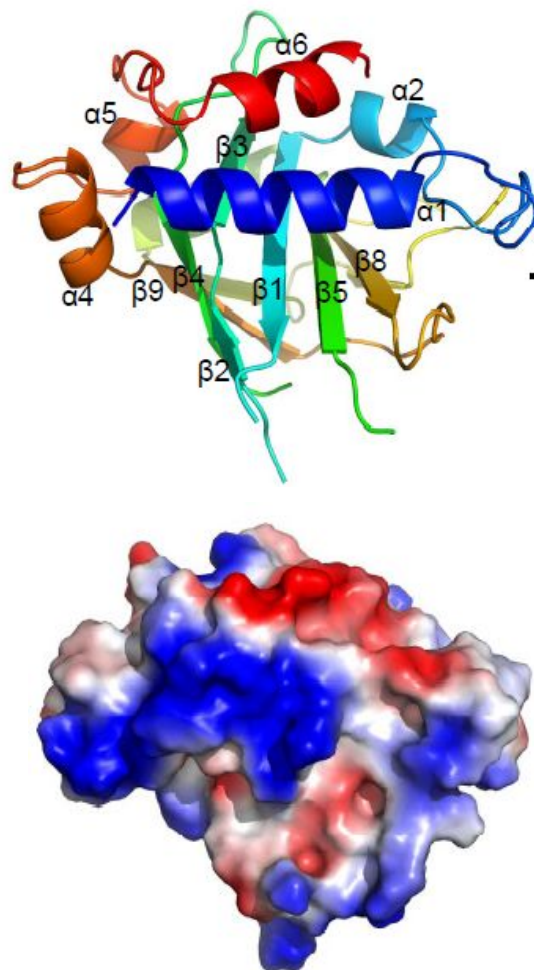


図4 . ヒト SYLF ドメインの結晶構造のリボンモデル（上）と表面電荷分布（下）

（3）ヒト SYLF ドメインのイノシトールリン酸との結合

ヒト SYLF ドメインはリン酸化されたイノシトールリン脂質に結合する。ヒト SYLF ドメインのイノシトールリン脂質結合部位を特定するためにヒト SYLF ドメインとイノシトールリン脂質との結合を解析した。

ールリン酸の共結晶化を試みたが、複合体の結晶を得ることは出来なかった。ヒト SYLF ドメインのイノシトールリン酸との結合を表面プラズモン共鳴により調べたところ、平衡解離定数は数百 μM 程度であり、結合は比較的弱いものであることが明らかになった。

(4)研究協力者 ()

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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔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

6. 研究組織

(1)研究代表者

川崎 政人 (KAWASAKI, Masato)
高エネルギー加速器研究機構・物質構造科学
研究所・准教授

研究者番号：00342600

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

伊藤 俊樹 (ITO, Toshiaki)
神戸大学・バイオシグナル研究センター・教授

研究者番号：30313092