

令和 5 年 6 月 2 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19H02841

研究課題名（和文）代理リガンドの創製によるLDL受容体ファミリーのメンブントラフィック機構の解明

研究課題名（英文）Mechanisms of membrane trafficking of LDL receptor family members investigated by the generation of surrogate ligands

研究代表者

安井 典久 (Yasui, Norihisa)

岡山大学・医歯薬学域・准教授

研究者番号：90467514

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,100,000円

研究成果の概要（和文）：LDL受容体ファミリーの代理リガンド創製を目的に、独自に構築した一本鎖モネリンを分子骨格とする人工結合タンパク質（SWEEPins）のファージディスプレイライブラリーの選別を行った。LDL受容体の種々のドメインに結合するSWEEPinの作製に成功した。中でも、LDL受容体のLAモジュールに結合するSWEEPinについては、共結晶構造の解析を行い、SWEEPinによるLAモジュールの認識機構を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で得られた人工結合タンパク質SWEEPinは、細胞外領域におけるリガンド結合や細胞外領域のコンフォメーションを調節する分子ツールとして有用であることが期待できる。さらに、得られた立体構造情報は、LDL受容体ファミリーの主要なリガンド認識を担うLAモジュールに特化した人工結合タンパク質を作製する際に有用である。

研究成果の概要（英文）：We have succeeded in generating synthetic binding proteins, SWEEPins, that bind to different domains of the LDL receptor. We determined the crystal structure of one of the SWEEPins in complex with the LA modules of the LDL receptor. Structural analysis revealed the recognition mechanism of the LA module by the SWEEPin.

研究分野：タンパク質科学

キーワード：LDL受容体 進化分子工学 ファージディスプレイ 人工結合タンパク質 代理リガンド モネリン メンブントラフィック

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

### 1. 研究開始当初の背景

低密度リポタンパク質受容体 (LDL 受容体) ファミリーは、様々なタンパク質性リガンドをエンドサイトーシスにより細胞内へと取り込む。これら受容体群は、もっぱらリサイクリングを繰り返すと考えられてきたが、近年、受容体細胞外領域に結合するリガンドの種類により、細胞外領域のコンフォメーション状態とリサイクリング過程とが異なることが明らかになりつつある。一方で、自然界に存在する LDL 受容体ファミリーのリガンド群は、種類が限られている上に化学組成が不均一であるために試料調製や取り扱いが困難である。この問題のために、受容体細胞外領域のコンフォメーション状態とリサイクリング過程の相関関係を明確に解明することができていない。

### 2. 研究の目的

上述の研究背景のもと、本研究では、自然界のリガンド群の結合では見出されていないコンフォメーションの安定化が可能な LDL 受容体ファミリーに対するタンパク質性の代理リガンドを創製し、それらを利用することで、LDL 受容体ファミリーの細胞外領域のコンフォメーションとメンブレントフィック過程の相関関係を解明することを目的とした。

### 3. 研究の方法

- (1) 独自に構築した一本鎖モネリンを分子骨格とする人工結合タンパク質 SWEEPin のファージディスプレイライブラリー (Yasui, N. *et al.*, *J Biochem.* 2021) を LDL 受容体の細胞外領域の各ドメインに対して選別した。選別に用いる LDL 受容体の組換えタンパク質は、Expi293F 細胞で発現させて精製した。
- (2) ライブラリーの選別により得られた SWEEPin の性状を各種手法により解析した。

### 4. 研究成果

#### (1) LDL 受容体細胞外領域の組換えタンパク質の設計および調製

ヒト LDL 受容体の細胞外領域は、複数種類のドメインから構成される。N 末側に human growth hormone (hGH) を融合させ、C 末に Avi タグを付加した様々な組換えタンパク質を設計した (図 1)。これらを Expi293F 細胞で一過性発現させ、培養上清より Ni-NTA アフィニティークロマトグラフィーにより精製した。さらに、TEV protease により hGH を切断・除去した。

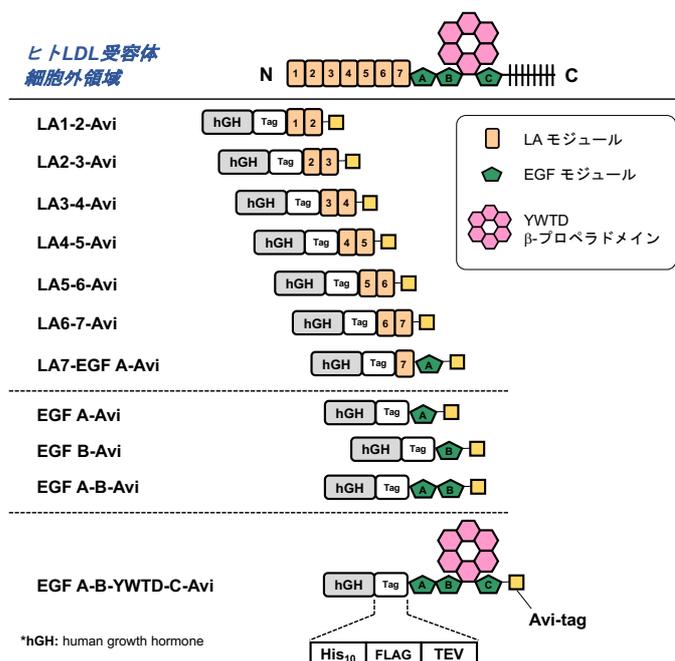


図 1 ヒト LDL 受容体細胞外領域の組換えタンパク質の設計

## (2) LA モジュールに結合する人工結合タンパク質の作製

上記 (1) で調製した組換えタンパク質のうち、LA モジュールから構成されるものに対して、SWEEPIn フェージディスプレイライブラリーを選別した。その結果、LDL 受容体 LA1-2, LA2-3, LA3-4 および LA4-5 に結合する SWEEPIn を得ることができた。一方で、LA5-6, LA6-7 および LA7-EGF A に対してライブラリーの選別を実施したものの、これらに結合する SWEEPIn を得ることができなかった。

## (3) EGF モジュールに結合する人工結合タンパク質の作製

上記 (2) と同様に、EGF モジュールから構成される組換えタンパク質 3 種類に対しても SWEEPIn フェージディスプレイライブラリーの選別を行った。その結果、EGF B に結合する SWEEPIn が 1 種類だけ得られ、EGF A や EGF A-B に結合する SWEEPIn は得られなかった。この原因として、EGF A や EGF A-B の組換えタンパク質の品質に問題があることが考えられた。

## (4) YWTD $\beta$ -プロペラドメインに結合する人工結合タンパク質の作製

上記 (2) および (3) の場合と同様に、YWTD  $\beta$ -プロペラドメインを含む組換えタンパク質 (図 1 中の EGF A-YWTD-C-Avi) に対して、SWEEPIn フェージディスプレイライブラリーの選別を行った。その結果、15 種類の SWEEPIn が得られた。そのうち 9 種類については、SWEEPIn を酵母表面提示する yeast surface display 系でも EGF A-YWTD-C-Avi との結合が確認され、解離定数が 0.5~4  $\mu\text{M}$  であると見積もられた。

## (5) LA2-3 に結合する SWEEPIn の結晶構造解析

上記 (2) で得られた LA2-3 に結合する SWEEPIn について、精製タンパク質を調製した。LDL 受容体 LA2-3 についても精製標品を調製し、ゲルろ過クロマトグラフィーにより両者の相互作用解析を行った。その結果、両者が複合体を形成していることが確認された。

次に、複合体の立体構造情報を得るために、X 線結晶構造解析を実施した (図 2)。SWEEPIn の 2 本のループが、主に LDL 受容体の LA2 モジュールと LA2 と LA3 をつなぐリンカーと相互作用していることが明らかとなった。この得られた構造情報は、LDL 受容体ファミリータンパク質中の主要なリガンド認識を担う LA モジュールに特化した人工結合タンパク質 SWEEPIn のコンビナトリアルライブラリー作製に有用である。

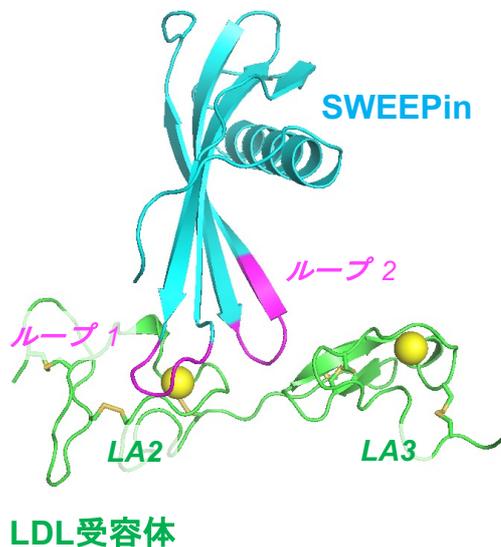


図 2 LDL 受容体 LA2-3/SWEEPIn 複合体の結晶構造

LDL 受容体 (緑) および SWEEPIn (シアン) をリボンモデルで表示した。SWEEPIn ライブラリー中でアミノ酸を多様化させた 2 本のループをマゼンタで示した。黄色の球は、LA モジュールに結合した  $\text{Ca}^{2+}$  イオンを示す。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Atsumi Nanako, Yasumatsu Keiko, Takashina Yuriko, Ito Chiaki, Yasui Norihisa, Margolskee Robert F, Yamashita Atsuko	4. 巻 12
2. 論文標題 Chloride ions evoke taste sensations by binding to the extracellular ligand-binding domain of sweet/umami taste receptors	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 e84291
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.7554/eLife.84291	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Okuda K, Nakahara K, (中略15名)、Yasui N, (中略10名)、Lipton S A., Uehara T	4. 巻 14
2. 論文標題 Pivotal role for S-nitrosylation of DNA methyltransferase 3B in epigenetic regulation of tumorigenesis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 621
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-023-36232-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Yasui Norihisa, Nakamura Kazuaki, Yamashita Atsuko	4. 巻 169
2. 論文標題 A sweet protein monellin as a non-antibody scaffold for synthetic binding proteins	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 585 ~ 599
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jb/mvaa147	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Nagae Masamichi, Suzuki Kei, Yasui Norihisa, Nogi Terukazu, Kohno Takao, Hattori Mitsuharu, Takagi Junichi	4. 巻 169
2. 論文標題 Structural studies of reelin N-terminal region provides insights into a unique structural arrangement and functional multimerization	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 1
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jb/mvaa144	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 山下 敦子, 芦川 雄二, 南後 恵理子, 安井 典久	4. 巻 79
2. 論文標題 受容体タンパク質を用いた味覚感知初反応の解析と応用	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 バイオサイエンスとインダストリー	6. 最初と最後の頁 86-89
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yoshida Takashi, Yasui Norihisa, Kusakabe Yuko, Ito Chiaki, Akamatsu Miki, Yamashita Atsuko	4. 巻 14
2. 論文標題 Differential scanning fluorimetric analysis of the amino-acid binding to taste receptor using a model receptor protein, the ligand-binding domain of fish T1r2a/T1r3	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0218909
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0218909	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 大沼 恭介, 山下 敦子, 安井 典久
2. 発表標題 システイン残基への変異導入がもたらす一本鎖モネリンの 安定性変化
3. 学会等名 日本薬学会 第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 石田 光, 安井 典久, 山下 敦子
2. 発表標題 メダカ由来味覚受容体T1r2a/T1r3細胞外領域のリガンド結合解析
3. 学会等名 日本味と匂学会第56回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 安井 典久, 中村 祐介, 山下 敦子
2. 発表標題 LDL受容体リガンド結合領域を標的とする人工結合タンパク質の作製
3. 学会等名 第95回 日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 新田 純矢, 安井 典久, 堤 尚孝, 山下 敦子
2. 発表標題 メダカ由来味覚受容体T1r2a/T1r3リガンド結合領域に対する疎水性アミノ酸の作用解析および結合構造解析
3. 学会等名 第45回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 溝口 楽人, 吉田 高志, 細谷 麻以子, 伊藤 千晶, 芦川 雄二, 安井 典久, 山下 敦子
2. 発表標題 フグ由来味覚受容体T1r1/T1r3リガンド結合領域の試料調製とリガンド結合解析
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 安井 典久, 山下 敦子
2. 発表標題 一本鎖モネリンを非抗体分子骨格とするGFP結合タンパク質の作製と分子特性解析
3. 学会等名 第19回日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 安井 典久, 山下 敦子
2. 発表標題 新規な非抗体分子骨格に基づく人工結合タンパク質のファージディスプレイライブラリーの作製
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田村 一晟, 安井 典久, 守屋 央朗, 山下 敦子
2. 発表標題 様々な組換え発現条件下でのGFPuv C末端Lys残基の翻訳後修飾
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 伊藤 千晶, 安井 典久, 渥美 菜奈子, 山下 敦子
2. 発表標題 味覚受容体T1R2/T1R3リガンド結合領域カチオン結合部位の構造生物学的解析
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 安井 典久
2. 発表標題 非抗体分子骨格を用いた人工結合タンパク質作製基盤の構築
3. 学会等名 第71回日本生物工学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------