

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 23 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06166

研究課題名（和文）一回膜貫通型蛋白質プレキシンによるシグナル伝達機構の構造学的解明

研究課題名（英文）Structural study of signal transduction mechanism mediated by plexin single-transmembrane proteins

研究代表者

鈴木 博視（Suzuki, Hiroshi）

東京医科歯科大学・高等研究院・特任准教授

研究者番号：50635472

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究はプレキシン-セマフォリン複合体の立体構造解析を通じて、一回膜貫通型タンパク質全長の構造変化と細胞内ドメインの活性化機構を解明することを目的とした。哺乳類細胞発現系でプレキシンとセマフォリンを大量調製し、クライオ電子顕微鏡による単粒子解析を試みた。セマフォリン二量体とプレキシン二量体の複合体構造を部分的に明らかにし、細胞内領域が非常に動的であることを示唆するデータを得た。膜貫通領域以下の詳細な構造は明らかにする基盤として、新規の脂質膜環境への再構成法を作成し、クライオ電子顕微鏡に適した遺伝子組み込みタグの設計を進めることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

プレキシン-セマフォリン複合体のダイナミックな構造変化とそれに伴う細胞内ドメインの活性化機構に関する新たな知見を提供すると共に、多種存在するプレキシンの他のサブタイプの構造研究にも展開可能である。これにより一回膜貫通型タンパク質のシグナル伝達メカニズムの理解が深まり、膜蛋白質研究の進展に寄与する事が期待される。また、新たな構造解析手法の開発は、他の膜蛋白質の研究にも応用可能であり、広範な学術的貢献が期待される。また、プレキシンやセマフォリンの機能解明が進むことで、それら分子が関与する神経発生や免疫などのメカニズム解明につながり、関連する疾病に対する治療標的としての応用が期待される。

研究成果の概要（英文）：This study aimed to elucidate the structural changes of full-length single-pass transmembrane proteins and the activation mechanisms of their intracellular domains through three-dimensional structural analysis of the plexin-semaphorin complexes. We achieved large-scale preparation of plexins and semaphorins using a mammalian cell expression system and attempted single-particle analysis using cryo-electron microscopy. We partially clarified the complex structure of semaphorin dimers and plexin dimers, obtaining data suggesting that the intracellular regions are highly dynamic. As a foundation for revealing the detailed structure below the transmembrane region, we developed a novel reconstitution method into a lipid membrane environment and advanced the design of genetically incorporated tags suitable for use in electron microscopy.

研究分野：Structural biology

キーワード：シグナル伝達 一回膜貫通タンパク質 GTPase クライオ電子顕微鏡

1. 研究開始当初の背景

多細胞生物において単細胞生物からの進化の過程で獲得された機能の一つとして、細胞間でのシグナル伝達があり、これには膜上に存在する受容体やチャネルを介して、他の細胞からの作用因子が細胞の外から中へと伝わり、その信号が変換・増幅される事が重要である。また、受容体の遺伝子変異などによるシグナルの伝達異常は細胞の癌化をはじめとする疾病の原因となり、多くの受容体が創薬において重要な標的となっている。

セマフォリンは、細胞外シグナル因子としてのプレキシンをリガンドとした膜受容体であり、中枢神経発生における軸索形成因子として最初に同定され、血管新生や心筋形成など多くの細胞での形態制御に関わることが知られている。プレキシンにおける細胞内へのシグナル伝達機構には、低分子量 G タンパク質による細胞骨格系への複数の下流カスケードが明らかになっているが、それはリガンドであるセマフォリンの結合依存的な細胞外領域の二量体化による活性化が起点となっている。

プレキシンは、EGFP 受容体や Delta-Notch などの一回膜貫通型と同様に、数百~千アミノ酸の長さに渡り多数のドメインが連なった細胞外ドメインを有しており、これらはリガンドが結合する事でその全体構造が大きく変化すると考えられており、Open/Close の様な 2 状態を主とする構造変化ではなく、動的・連続的な構造変化によると考えられ、その分子メカニズムの詳細は不明であった (図 1)。

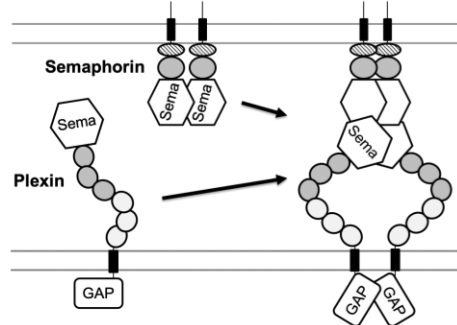


図 1 セマフォリンの結合によるプレキシンの活性化モデル

2. 研究の目的

本研究の目的は、プレキシン-セマフォリン複合体の立体構造解析により、一回膜貫通型タンパク質のリガンド結合依存的なダイナミックな構造変化が、距離的に遠く離れた細胞質側のドメインの活性化につながる機構と、細胞質側での効果器分子との詳細な相互作用機構を明らかにすることである。従来の X 線結晶構造解析では、可動性の非常に高い直鎖状のマルチドメインタンパク質を全長で扱う事は結晶化自体が困難のみならず、たとえ結晶化しても生理的な構造を保持しているかが不明確だという問題があった。生理的な状態での高分解能の構造解析が可能であるクライオ電子顕微鏡 (Cryo-EM) を用いた単粒子解析法により、リガンド結合状態の全長プレキシンを細胞外から細胞内まで含めてその構造変化と、それに伴う細胞内 GAP ドメインの活性化機構を明らかにすることを目指す。

3. 研究の方法

(1) 哺乳類細胞発現系による発現スクリーニング・大量調製

多種のプレキシン全長タンパク質を安定な状態で発現するために、哺乳類細胞 Expi293F の浮遊培養系を利用する。プレキシン遺伝子に蛍光タンパク質 GFP を、セマフォリン遺伝子に蛍光タンパク質 mCerulean を融合させたコンストラクトを設計し、小スケールで発現させて蛍光ゲル濾過法により安定なタンパク質をスクリーニングすると共に、two-color 蛍光ゲル濾過法により定性的なリガンド-受容体の結合能を調べる。選定された候補遺伝子について、バキュロウイルスを介した哺乳類浮遊細胞での大量発現を行い、GFP に対するアフィニティー精製とゲル濾過クロマトグラフィーを経て純度の良い試料を得る。

(2) クライオ電子顕微鏡による単粒子構造解析

精製した全長プレキシンと、それに親和性の高いセマフォリンを混合し複合体を形成させ、脂質ナノディスクと呼ばれる微小脂質環境に再構成し、2:2 の結合状態の単分子を調製し、ネガティブ染色により単分散性を確認する。性状の良い試料を急速凍結による氷包埋を行い、直接検出器を有したクライオ電子顕微鏡にて全長プレキシン-セマフォリン複合体の粒子像を多数撮影する。粒子像の画像解析により分子形状の違いに基づいた分類を行い、複合体状態の分子構造を明らかにする。

また、脂質膜中での膜蛋白質分子のクライオ電子顕微鏡観察のための手法開発として、ウイ

ルス様粒子 (VLP) にプレキシンを再構成する系を立てると共に、電子顕微鏡画像下での識別が可能な遺伝子組み込みタグをフェリチン分子を元にデザインする。

4. 研究成果

(1) ヒト *H. Sapiens* およびショウジョウバエ *D. melanogaster* のプレキシン・セマフォリン遺伝子をクローニングし、ヒト遺伝子から HsPLXNB1, HsPLXNC1, HsSEMA4D-ecto, HsSEMA7A-ecto, ショウジョウバエ遺伝子から DmPlexA, DmPlexB, DmSEMA2a, DmSEMA2b, DmSEMA5c-ecto を蛍光ゲル濾過法での発現安定性評価から選出した。また、HsPLXNC1 を受容体とするエクトロメリアウイルス由来のセマフォリン様タンパク質 EVM139 も良好に発現することを確認した。

EGFP と mCerulean を用いた Two-color 蛍光ゲル濾過法ではプレキシン・セマフォリンの結合によるピークシフトは見られなかったが、個別に精製した HsPLEXC1 と EVM139 の組み合わせでは界面活性剤存在下、およびナノディスク再構成条件下ともに複合体としてピークシフトすることを確認した。

(2) 全長 HsPLXNC1 および EVM139 をそれぞれ単体で精製し、MSP1E3D1 タンパク質と DOPC 脂質との脂質ナノディスクに再構成した試料について、クライオ電子顕微鏡により粒子像を収集したところ、2次元平均化像からセマフォリン二量体とプレキシン二量体の結合状態の複合体像が得られた。三次元再構成像からはプレキシンの膜貫通ドメイン以下の領域の密度がぼやけており、特に細胞内の GTP 活性化ドメインの構造は明瞭にはならなかった。これは相対的に大きく構造的な安定した領域である細胞外側に対して、膜貫通領域以下が動いており、画像処理の過程で平均化されたと考えられる。本研究を遂行中に、米国の研究グループより暗いお電子顕微鏡による全長 PLXNC1 とセマフォリン様タンパク質 A39R との複合体構造が報告されたが (*Nat. Commun.* (2020) 11, 1953)、同様に膜貫通領域以下は可視化できず、構造が明らかになったのは細胞外領域のみであった。

(3) 膜蛋白質分子の配向性が揃った状態のセマフォリン-プレキシン複合体を脂質二重膜中に再現し、細胞外領域-膜貫通領域-細胞内領域の相対関係を明確にするため、VLP 中にセマフォリン分子を再構成させる系を検討した。VLP の足場タンパク質として HIV Gag 遺伝子を用いて、蛍光標識 HsPLXNC1 と Expi293 細胞中で共発現することで、培養上清への全長セマフォリンの分泌を SDS-PAGE により確認できた。培養上清からの VLP の精製条件をネガティブ染色により検討したところ、市販のウイルス濃縮試薬 Retroconcentin を用いた方法では沈殿画分中への VLP の濃縮は確認できたが精製純度は悪く、一方で 20% sucrose cushion 遠心後に OptiPrep 濃度勾配遠心で分離すると純度よく VLP 画分が精製できることを確認した。この試料をクライオ電子顕微鏡で観察したところ、100~200 nm のサイズの VLP を確認できた。これにより、クライオ電子線トモグラフィー法による VLP の立体再構成、およびセマフォリン分子の膜中での構造をサブトモグラム平均化により明らかにするための基盤ができた。

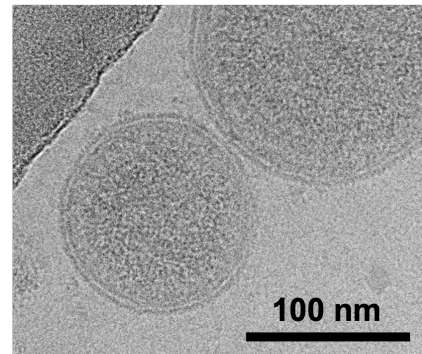


図2 精製 VLP のクライオ電子顕微鏡像

(4) クライオ電子顕微鏡像中でのタンパク質粒子の局在を可視化する遺伝子組み込みタグの作製を検討し、大腸菌が持つ 12 量体タンパク質である Dps を選んだ。様々な長さのリンカー配列で Dps 遺伝子を 3 つ連結したタンデムコンストラクトを設計し、GFP を融合させて蛍光ゲル濾過法により安定な発現体を探索した。Dps の N 末端側を最小限に削った変異体との組み合わせで、対称性の高い球状粒子を形成できることをネガティブ染色により確認した。クライオ電子顕微鏡撮影をおこない、単粒子解析により 3次元再構成したところ、野生型 12 量体と同様の直径 9 nm の特徴的な球状構造を取っていることを確認した。こちらを、膜蛋白質と融合する形で VLP 中に発現させ、クライオ電子線トモグラフィー法での標識同定を検討すると共に、粒子切り出しの局在ガイドとして利用することが検討可能になった。

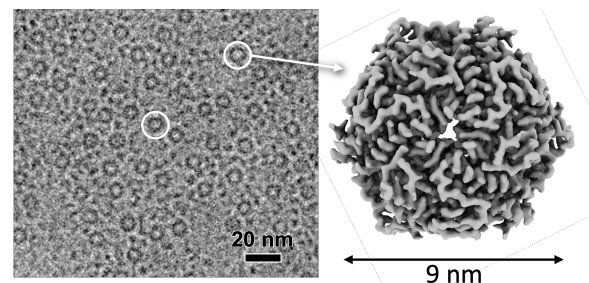


図2 タンデム連結 Dps のクライオ電子顕微鏡像と 3次元再構成像

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------