

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24570126

研究課題名(和文)GET複合体による膜挿入機構の構造基盤

研究課題名(英文)Structural basis for the post translational membrane insertion by GET complex

研究代表者

山形 敦史 (YAMAGATA, ATSUSHI)

東京大学・放射光連携研究機構・助教

研究者番号：20463903

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：C末端に一回膜貫通ヘリックスを持つテイルアンカー型タンパク質(TA)は標的因子Get3によって小胞体膜に挿入される。Get3はTAタンパク質を捕まえた後、膜タンパク質Get1、Get2と相互作用して小胞体膜に局在する。本申請では、Get3とGet1の膜外ドメインとの複合体の結晶構造解析を行った。また、Get3-TAの結晶構造解析を目指して、Get3-TA複合体の調整を行った。このとき変異体Get3を用いることによりGet3 2量体にTAが1分子が結合した複合体を調整できた。さらに、Get1、Get2についても、昆虫細胞発現系を用いての精製に成功した。

研究成果の概要(英文)：Get3 is the specific targeting factor for the tail anchored proteins, which is defined by the C-terminal single transmembrane domain. After capturing the TA proteins, Get3 is further localized on the ER membrane through the interaction with Get1/Get2 membrane proteins. In this study, we succeeded to solve the crystal structure of the complex between Get3 and Get1 cytosolic domain. In addition, we succeeded to purify the Get3-TA complex coexpressed in E. coli. By using the mutant Get3, we succeeded to obtain the Get3-TA complex at a molar ratio of 2:1 (Get3 dimer bound to single TA). Further, we succeeded to purify Get1, Get2 using insect cell expression system.

研究分野：構造生物化学

キーワード：結晶構造解析 テイルアンカー型タンパク質

1. 研究開始当初の背景

研究開始当初は Get3 単体の立体構造が当研究室も含めて複数の研究室で成功していたが、Get3 を小胞体膜へ局在させる膜タンパク質 Get1, Get2, 及び Get3 と TA との複合体の構造解析例はなく、Get3 による TA の膜挿入の詳細なメカニズムについては不明のままであった。

2. 研究の目的

- 1) Get3 と Get1, Get2 との複合体の構造解析により、膜への局在のメカニズムを明らかにする。
- 2) Get3 と TA との複合体の構造解析により Get3 による TA の特異的認識機構を明らかにする。
- 3) Get1, Get2 の膜内部位も含んだ全長の構造解析により、Get1, Get2 の膜挿入因子としての役割を明らかにする。

3. 研究の方法

X線結晶構造解析法を用いた立体構造解析を行った。大腸菌や昆虫細胞を用いて、組換え体として、タンパク質を調整し、微量結晶化装置による蒸気拡散法による初期結晶化スクリーニングの後、通常のシッティングドロップ蒸気拡散法による結晶化を行った。得られた結晶の回折データは大型シンクロトン放射光施設 SPring-8 や Photon Factory にて回折データの測定を行い、CCP4 や Phenix といったソフトウェアを用いて立体構造解析を行った。得られた構造を基に変異体を作製し、GST プルダウンアッセイや ATPase アッセイといった生化学的アッセイを行い、構造から考察されるメカニズムの検証を行った。

4. 研究成果

1) Get3-Get1 膜外ドメイン複合体の構造解析

Get1 は 4 回膜貫通ヘリックスからなる膜タンパク質であり、膜貫通ヘリックス 1 と 2 の間にコイルドコイル構造と予想される膜外ドメインが存在する。このドメイン (アミノ酸残基 20~104; Get1CD) と Get3 と共発現させて、安定な複合体を精製し、結晶化を行った。SPring-8 での回折データ測定の結果、3 Å 分解能で構造解析に成功した。Get1CD は二本の逆平行コイルドコイルが短いターンによりつながった構造を持ち、開いた Get3 二量体 (open form) の間に挟み込まれた形で結合していた (図 1)。次に、Get1CD よりわずかに短いコンストラクト (アミノ酸残基 36~104; Get1CD') を用いて結晶化を行い、5 Å という低分解能ながらも構造解析に成功した。Get3 : Get1CD' 複合体では、Get3 は閉じた二量体の構造であった (semi open form, 図 1)。

両者の構造から、Get1 の二本のヘリックスのうち、C末端ヘリックスは Get3 との

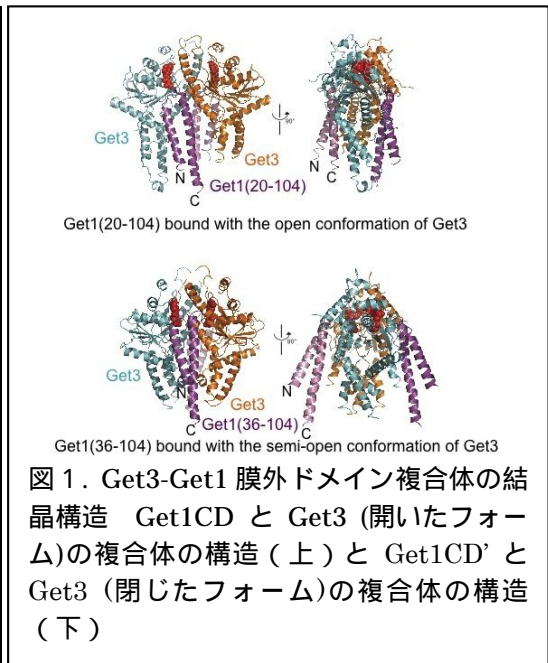


図 1. Get3-Get1 膜外ドメイン複合体の結晶構造 Get1CD と Get3 (開いたフォーム)の複合体の構造 (上)と Get1CD' と Get3 (閉じたフォーム)の複合体の構造 (下)

結合に大きく寄与する一方、N末端ヘリックスは、Get3 の開いた構造の安定化に寄与すると考えられた。変異体を用いた GST プルダウンアッセイによって、結合に必要なアミノ酸残基が Get1 の Arg73 と Get3 の Glu253 であることを同定した (図 2)。なお、Get1 の Arg73 は種を超えて非常によく保存されていた。さらに、Get1 CD の結合により、開いた二量体構造の安定化され、その結果として ATP 加水分解活性の阻害が起こることを証明した (図 3)。

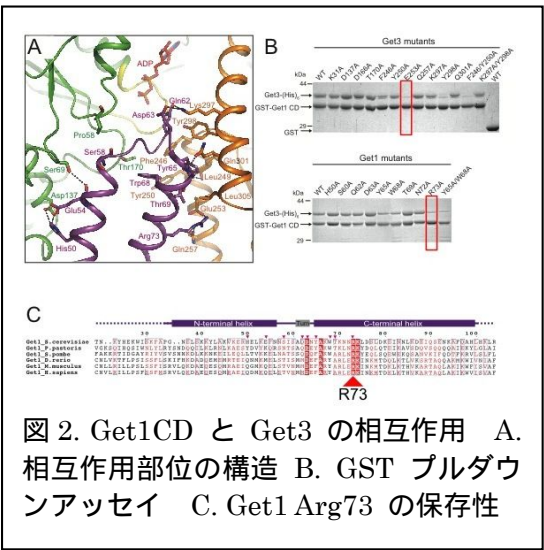


図 2. Get1CD と Get3 の相互作用 A. 相互作用部位の構造 B. GST プルダウンアッセイ C. Get1 Arg73 の保存性

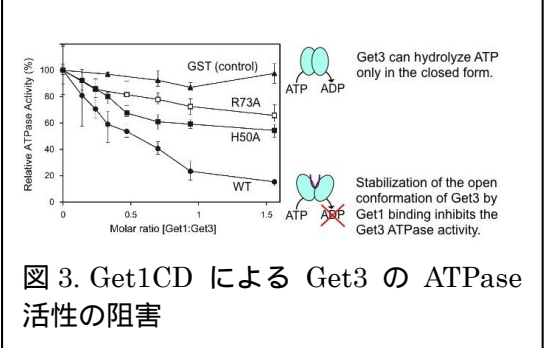


図 3. Get1CD による Get3 の ATPase 活性の阻害

2) Get3-TA 複合体の精製と結晶化
 酵母のゲノムにコードされた 12 種の TA の遺伝子と、Get3 遺伝子を共発現ベクターにクローニングし、大腸菌を用いて共発現と精製を行ったところ、Ysy6, Sbh1, Sbh2, Sec22, Ubc6 の 5 種で安定な複合体形成が確認された (図 4)。しかし 5 種の Get3 : TA 複合体の全てで TA タンパク質過剰の複合体が優先的に形成されており、これらの複合体では結晶化に成功しなかった。

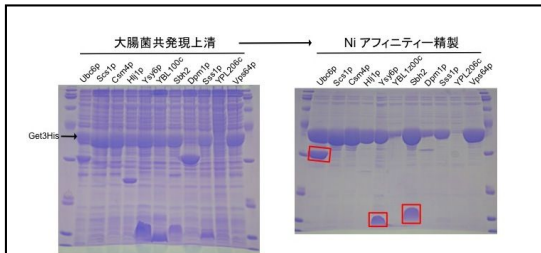


図 4. 共発現による Get3:TA 複合体の精製 5 種の TA タンパク質が Get3 と共精製された。

そこで、Get3 に対する化学量論比が揃った複合体を精製するために、様々な工夫の結果、ATP 非加水分解性の変異 Get3 (D57N) を用いると、Get3 2量体に対して TA が一分子含まれる複合体が形成されることを見いだした。この複合体を用いて結晶を得ることができ、SPring-8 にて 3.3 分解能の回折データを測定した (図 5)。しかし、構造解析の結果、TA に対応する電子密度が見られず、Get3 単体の結晶であった。この原因として、結晶化中に Get3-TA 複合体が沈殿を生じ、その後に結晶化していることから、沈殿の際に TA が解離していることが考えられた。実際に、結晶化条件中で複合体が維持されるかを調べたところ、TA が解離していることが確

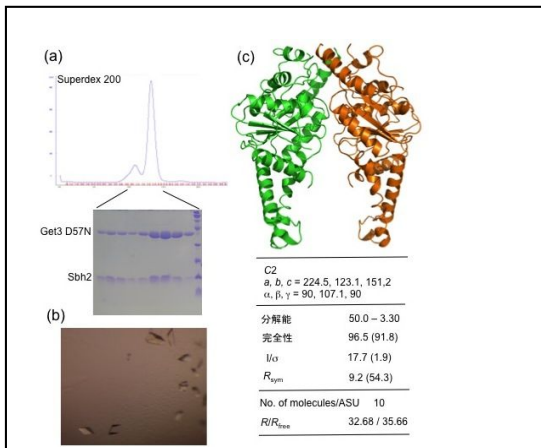


図 5. Get3D57N:Sbh2 複合体の結晶化で得られた結晶 (a) Get3D57N:Sbh2 複合体のゲルろ過クロマトグラフィー (b) 得られた結晶 (c) 得られた結晶構造

認され、複合体の安定化が結晶化に必要ではないかと考えられた。

そこで、次に Get3 単体の構造から Get3 の不必要なループ部分を見だし、そこを除いたコンストラクトを作製し、複合体の結晶化を行った (図 6)。その結果、複数の条件で結晶を得ることができ、2.8~3 分解能の回折データを測定したが、構造解析の結果、その全てで Get3 しか含まれていなかった。

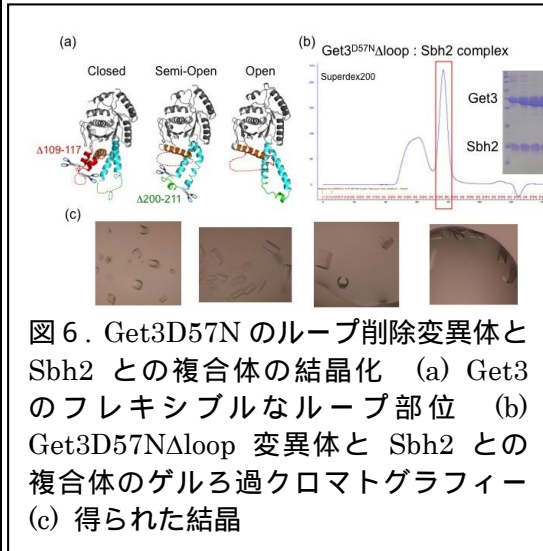


図 6. Get3D57N のループ削除変異体と Sbh2 との複合体の結晶化 (a) Get3 のフレキシブルなループ部位 (b) Get3D57NΔloop 変異体と Sbh2 との複合体のゲルろ過クロマトグラフィー (c) 得られた結晶

次に、架橋によって複合体を安定化する試みを行った。まず、非天然アミノ酸の部位特異的導入による光架橋を試した。光架橋性非天然アミノ酸 (ベンゾフェニルアラニン; BPA) を TA の一種である Sec22 に導入して、Get3 との架橋を行うことにした。まず、Get3 と Sec22 との共発現ベクター上の Sec22 遺伝子に網羅的に UAG 変異を導入して、計 23 個の変異体遺伝子を用意した。次に、UAG 部位に特異的に非天然アミノ酸を導入するためのベクター pEVOL-BpF と共に、大腸菌 BL21 (DE3) 内で Get3:Sec22 複合体を発現させることにより、UAG 変異部位に特異的に非天然アミノ酸の導入されたタンパク質を発現させた。このタンパク質複合体をヒスチンタグを用いて精製した後、UV 照射によって光架橋を行った。光架橋産物を、CBB 染色と抗ヒスチンタグ抗体によるウェスタンブロットングによって解析を行った。その結果、膜貫通ヘリックス部位の C 末端側に変異を導入したものについて、光架橋が見られた (図 7)。

しかし、架橋の効率を考えると結晶化に適しているとは考えられず、次にジスルフィド結合による架橋を試みた。pETDuet-1 ベクターにクローニングされているヒスチンタグ付き sbh2 と get3 遺伝子に対し、まず Sbh2 の膜貫通ヘリックス部位直下の Lys83 をシステインに置換した (Sbh2-Cys)。次に、Get3 の TA タンパク質結合部位と予測されるヘリカルド

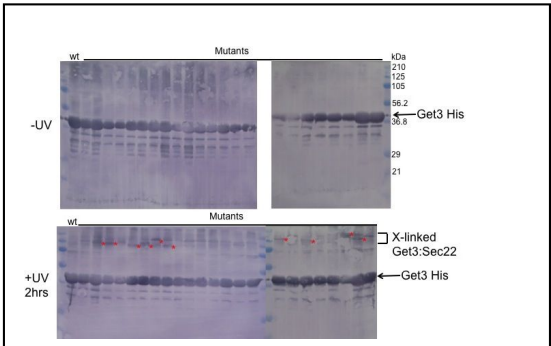


図 7. 光架橋実験のウェスタンブロッティング解析 Get3 によるバンドの他に、架橋産物と考えられるバンド（赤アスタリスク）が見られた。

メインと呼ばれる部位の 43 個のアミノ酸を一つずつシステイン残基に置換した。5mL 培養スケールで、計 43 個の変異体 Get3 と Sbh2-Cys を全て Ni カラムにて精製し、非還元 SDS-PAGE にて解析したところ、3 つの変異体で強い架橋が見られた（図 8）。

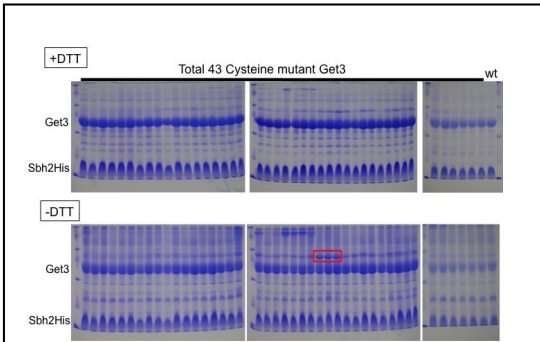


図 8. システイン変異体による架橋実験 43 のシステイン変異体の還元 SDS-PAGE（上）と非還元 SDS-PAGE（下） 3 つの変異体で架橋産物と思われるバンドが見られた（赤枠内）。

3) Get1, Get2 全長の構造解析

Get1, Get2 は真核生物由来の膜タンパク質であるため、通常の大腸菌を用いた発現系では本来の活性を失っている可能性が考えられる。そこで本申請では、昆虫細胞 Sf9 を用いた発現・精製を行った。

まず、Bac-to-Bac システム (Invitrogen) の発現ベクターである pFastBac ベクターに Get1, Get2 遺伝子を C 末端 GFP タグの形でクローニングした。GFP と Get1, Get2 の間には HRV3c プロテアーゼサイトを組み込んだ。このベクターを用いて、大腸菌 DH10 multibac を形質転換して、昆虫細胞感染のための Bacmid を得

た。次に、GFP タグを利用して、蛍光検出サイズ排除クロマトグラフィー (FSEC) によって、Get1, Get2 の性状を分析した。昆虫細胞 Sf9 に Bacmid を感染させて、タンパク質を発現させた後、その細胞を界面活性剤によって可溶化し、その上清を FSEC によって性状分析したところ、Get1, Get2 単体は安定な単分散のピークを示すことが分かった。次に、過剰量の Get3 を加えて、複合体での安定性を調べたところ、Get3-Get1 複合体では複合体が不安定化することが明らかになり、何らかの工夫が必要であると考えられた。

Get1, Get2 は複合体を形成することにより活性を持つが、精製した Get1, Get2 をそのまま混合しただけでは安定な複合体を形成できない。そこで、両者をつないだキメラ体を作製して、安定な複合体を得ることにした。Get2 の C 末端に Get1 の N 末端をつなげたキメラ体 Get2-1 のコンストラクトを作製し、Sf9 細胞を用いて発現させた。同じく FSEC によって Get3 との結合を確認したところ、シャープなピークの形成が確認された。次に、Get2-1-GFP を大容量のカルチャーから精製した。まず膜画分を界面活性剤で可溶化した後、Ni カラムを用いて精製した。精製した Get2-1-GFP に HRV3c を作用させて、GFP を切断した後、ゲルろ過カラムにて Get2-1 を精製した（図 9）。このサンプルと Get3 を混合させてから、Get3:Get2-1 複合体をゲルろ過クロマトグラフィーによって精製したところ、Get3 2 量体に対し、Get2-1 一分子が結合した複合体を形成していた（図 9）。現在、精製した Get3:Get2-1 複合体を用いて結晶化を行っている。

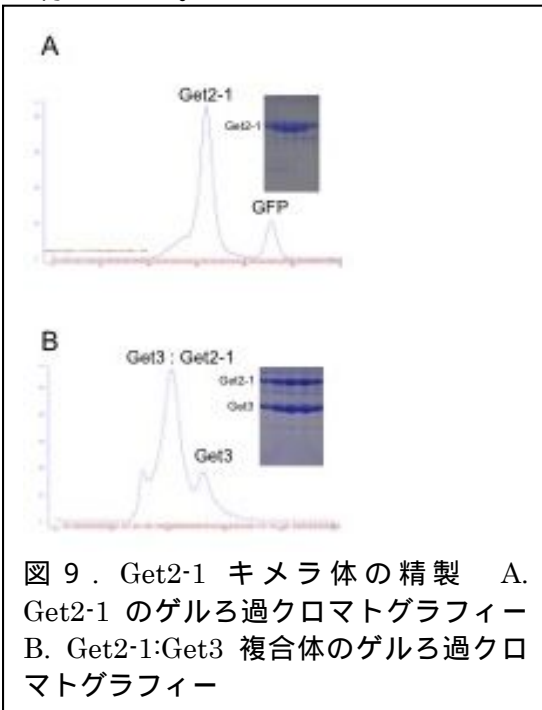


図 9. Get2-1 キメラ体の精製 A. Get2-1 のゲルろ過クロマトグラフィー B. Get2-1:Get3 複合体のゲルろ過クロマトグラフィー

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 3件)

1. Kubota K[#], Yamagata A[#], Sato Y., Goto-Ito S., *Fukai S. "Get1 stabilizes an open dimer conformation of Get3 ATPase by the binding at two distinct interfaces" *J. Mol. Biol.* (2012) **422**, 366-375 [#]同等貢献 (査読有り)
2. Shimizu A., Kawana-Tachikawa A., Yamagata A., Han C., Zhu D., Nakamura H., Koibuchi T., Carlson J., Martin E., Brumme CJ., Shi Y., Gao GF., Brumme ZL., Fukai S., Iwamoto A. "Structure of TCR and antigen complexes at an immunodominant CTL epitope in HIV -1 infection" *Sci. Rep.* (2013) **3**, 3097-3105 (査読有り)
3. Han C., Kawana-Tachikawa A., Shimizu A., Zhu D., Nakamura H., Adachi E., Kikuchi T., Koga M., Koibuchi T., Gao GF., Sato Y., Yamagata A., Martin E., Fukai S., Brumme ZL., Iwamoto A. "Switching and emergence of CTL epitopes in HIV-1 infection" *Retrovirology* (2014) **11**, 38-52 (査読有り)

[学会発表](計 2件)

1. 日本結晶学会年会 2014年11月1日～11月3日 (東京)
"Bat3の新規ドメインの構造解析"
山形 敦史、佐藤 裕介、伊藤(後藤) 桜子、深井 周也
2. 分子細胞生物学会年会 2012年12月11日～12月14日 (福岡)
"Structural basis for the posttranslational membrane insertion by Get3"
山形 敦史、窪田 恵子、佐藤 裕介、伊藤(後藤) 桜子、深井 周也

[その他]

ホームページ等

<http://www.iam.u-tokyo.ac.jp/srro/SRROLifeSciDivJp2/Welcome.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山形 敦史 (YAMAGATA ATSUSHI)

東京大学・放射光連携研究機構・生命科学部門・助教

研究者番号：20463903