

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：32660

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26440034

研究課題名(和文) 膜小胞形成に関わる多量体膜タンパク質の構造解析と調節機構の解明

研究課題名(英文) Structure determination of oligomeric membrane protein involved in forming membrane vesicles and elucidation of the regulation mechanism

研究代表者

横山 英志 (YOKOYAMA, HIDESHI)

東京理科大学・薬学部生命創薬科学科・准教授

研究者番号：70433208

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)：本研究では、溶血性貧血(遺伝性有口赤血球症stomatocytosis)の原因タンパク質である多量体膜タンパク質ストマチンをそのパートナータンパク質STOPPが制御する機構の解明を目的とした。X線結晶構造解析により、STOPPプロテアーゼドメイン二量体が二量体構造を大きく変化させることを見出した。またSTOPPのOB(Oligonucleotide Binding)ドメインが二量体を基本にした12-24量体を形成し、STOPP-ストマチン複合体における足場として機能していることを見出した。本研究をさらに進めることで、溶血性貧血の作用機構の解明が期待される。

研究成果の概要(英文)：In humans, an absence of stomatin is associated with a form of hemolytic anemia known as hereditary stomatocytosis. In this study, I tried to elucidate how the partner protein STOPP (STomatin Operon Partner Protein) regulates the oligomeric protein stomatin. By X-ray crystallography, I elucidated that the protease domain of STOPP could form a different dimeric structure, and that the OB (Oligonucleotide Binding) domain of STOPP could assemble into 12-24 mer multimers based on a dimer as a basic unit. This result indicates that the OB domain functions as a scaffold protein to form the multimeric assembly of STOPP and stomatin. In the future, I want to elucidate the mechanism how hereditary stomatocytosis is developed.

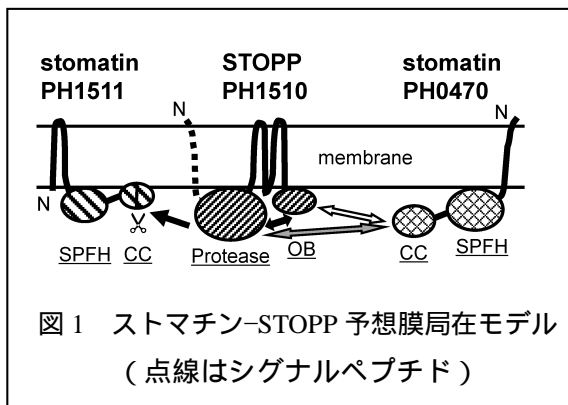
研究分野：タンパク質構造生物学

キーワード：膜結合プロテアーゼ ストマチン OBドメイン X線結晶構造

1. 研究開始当初の背景

(1)
 ストマチンは SPFH (Stomatin, Prohibitin, Flotillin, HflK/C) ファミリーに属し、ヒトの赤血球膜上に主に発現する膜タンパク質である。溶血性貧血(遺伝性有口赤血球症 stomatocytosis)患者の赤血球ではストマチンの欠損がみられるため、ストマチンが本疾患の原因タンパク質と考えられている。また赤血球の貯蔵中に生じる膜小胞中にストマチンが大量に含まれるため、ストマチンは膜小胞形成に関与すると考えられる。ストマチンはほとんど全ての種に存在する必須なタンパク質であるが、溶血性貧血の発症メカニズムとストマチンの機能は不明な点が多い。

(2)
 研究代表者はモデルタンパク質として、超好熱性古細菌 *Pyrococcus horikoshii* 由来のストマチンとそのパートナータンパク質 STOPP (STomatin Operon Partner Protein) を対象に構造と機能の研究を進め、STOPP PH1510 プロテアーゼドメインがストマチンのコイルドコイル(CC)ドメインを一箇所ですべて的に切断することを明らかにした。表面プラズモン法(BIACore)によるドメイン間相互作用解析で図1のようにSTOPP PH1510のプロテアーゼドメイン、OB(Oligonucleotide Binding)ドメイン、ストマチン PH0470のCCドメインの三者がそれぞれ μM オーダーの K_D 値で相互作用することを明らかにした。以上よりSTOPPとストマチンは、切断酵素と基質



もしくは阻害剤の関係にある。

(3)
 また研究代表者は、X線構造解析によりストマチン PH1511のSPFH + CCドメインが3量体の新規構造をとることを初めて明らかにした。しかし決定したのはCCドメインの途中までの構造で、膜貫通領域とSTOPPプロテアーゼによる切断部位を含んでおらず、プロテアーゼ切断後の構造と考えられる。プロテアーゼ切断前の構造は明らかになっていないため、切断部位を含むCCドメイン全てを含む構造決定が必須である。

(4)
 さらに研究代表者は、STOPP PH1510プロテアーゼの構造、プロテアーゼと基質ストマチンペプチドとの複合体の構造を決定した。しかしこれらがどのように相互作用するのか分かっていない。またプロテアーゼがストマチン PH0470 CCドメインを切断せずに複合体を形成するメカニズムも不明である。

2. 研究の目的

(1)
 以上の結果を踏まえ、ストマチンの膜貫通領域と多量体形成に関わる領域を含めた全体構造、ストマチン-STOPP各ドメイン複合体の構造を明らかにすることで、これまでに決定した各ドメインの構造解析結果を関連付けてストマチンとSTOPPの分子機能を統合的に理解できると考え本研究を計画した。

(2)
 そこで多量体膜タンパク質ストマチンの全体構造解明とストマチンの機能制御パートナータンパク質STOPPによるストマチン制御機構(ストマチン-STOPPの相互作用の解明とSTOPPのプロテアーゼドメインによるストマチン切断阻害機構の解明)を目的とした。ストマチンの分子レベルでの構造と機能を明らかにすることで、未だ有効な治療薬のない stomatocytosis の治療薬を新規に開発するための構造基盤が得られる。

3. 研究の方法

(1)
 ストマチン全長タンパク質について良質な結晶を得るため、様々な界面活性剤を用いたタンパク質の調製と結晶化を試みた。タンパク質の凝集抑制のため多量体形成に関わる疎水性残基のアラニン変異体の調製と結晶化も行った。

(2)
 STOPPがどのような全体構造で、多量体としてプロテアーゼがどのようにストマチンを切断するかを明らかにするため、STOPPのドメイン複合体構造の決定を試みた。STOPPのプロテアーゼは、PH1511ストマチンのCCドメインを切断するが、PH0470ストマチンのCCドメインは切断しない(図1)。しかし切断しないCCドメインと相互作用する。そのためPH0470ストマチンのCCドメインは、STOPPプロテアーゼ活性を阻害すると考えられる。これらの分子の相互作用を解明するため、ストマチンCC-STOPPプロテアーゼ、さらにストマチンのCC-STOPP OBの複合体の調製と結晶化を行い、結晶化に成功したらX線結晶構造解析に進むことにした。

4. 研究成果

(1)

ストマチン PH1511 の全体構造解明に向けた構造解析に取り組んだ。これまでに膜貫通部位を含むストマチン全長タンパク質の調製と結晶化を行ったが構造解析できる回折強度データが得られなかった。そこで、ストマチンの多量体形成に関わるアミノ酸残基のアラニン変異体の発現、精製、結晶化を行った。六角板状の結晶が得られたが、X線解析に適する分解能の回折強度はこれまでに得られていない。

(2)

STOPP ドメインの複合体について、まず STOPP PH1510 プロテアーゼドメインとストマチンペプチドとの複合体の結晶化と構造解析を行った。ここでは STOPP PH1510 プロテアーゼドメインの活性残基である Ser97 を Ala に変異させたタンパク質を野生型と同様の手法で大腸菌内で発現させ、タンパク質の精製を行った。これまで構造解析しているものと異なる配列のストマチンペプチドを用い、精製した STOPP PH1510 プロテアーゼドメイン S97A との複合体の結晶化を試みたところ、沈殿剤として硫酸アンモニウムと PEG4000 を用いて 0.05 × 0.05 × 0.50 mm の柱状結晶を得た。つくばフォトンファクトリーで分解能 2.3 Å の X 線回折強度データを収集し、分子置換法で構造解析を行った。

得られた結晶の空間群は $P6_5$ で、これまで構造決定したことのある STOPP PH1510 プロテアーゼドメインの空間群とは全く異なっていた。残念ながら決定した構造からは、ペプチドに相当する電子密度は得られずペプチドの結合は認められなかった。しかし、STOPP プロテアーゼドメイン二量体は、これまでに研究代表者が決定した構造と大きく異なる新たな二量体構造をとっていた。野生型の二量体と比べて、一方のモノマーを重ね合わせた場合、他方のモノマーの活性残基 Ser97 の $C\alpha$ の位置が 23 Å も移動していた。このことは、STOPP プロテアーゼは、ストマチンを切断するプロテアーゼ反応の際に二量体構造を大きく変化させることができることを示している。さらに結晶のパッキングから二量体が 6 分子集まり 12 量体を形成できる可能性も考えられた。本研究成果については現在論文投稿準備中である。

(3)

次に、STOPP PH1510 プロテアーゼドメインと基質ではなく阻害作用を示すストマチン PH0470 との複合体構造を解明するため、ストマチン PH0470 の C 末ドメインを同様の手法で大腸菌にて発現、精製を行った。STOPP PH1510 プロテアーゼドメイン S97A とストマチン PH0470 の C 末ドメインとをモル比 1:1 となるようにそれぞれ 0.16 mM の濃度で調製

し、複合体の結晶化を試みたところ、沈殿剤としてブタノールを用いて長さ 0.10 mm、幅 0.03 mm 程度の楕円状結晶を得た。つくばフォトンファクトリーで分解能 8 Å の X 線回折像が得られたが、分解能が低いいため構造解析には至っていない。

(4)

また STOPP PH1510 の OB (Oligonucleotide Binding) ドメインについて同様の手法で大腸菌内で発現させ、タンパク質の精製、結晶化を行った。沈殿剤として Jeffamine を用いて 0.20 × 0.02 × 0.02 mm の棒状結晶を得た。つくばフォトンファクトリーで分解能 2.4 Å の X 線回折強度データを収集し、分子置換法で構造解析を行った。Blue Native PAGE の結果によりこの OB ドメインは 12-24 mer の多量体を形成することが示唆されている。今回決定した構造でも、結晶中の分子のパッキングの様式から、この OB ドメインは二量体を基本にした 12-24 量体を形成できることが分かった。以上の結果から、この OB ドメインは STOPP-ストマチン複合体における足場として機能しうることを見出した。本研究成果については論文で発表した (*FEBS Open Bio* 4, 804-812, 2014)。

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 7 件)

Fukuda, N., Suwa, Y., Uchida, M., Kobashigawa, Y., Yokoyama, H. & *Morioka, H. Role of the mobility of antigen binding site in high affinity antibody elucidated by surface plasmon resonance. *J. Biochem.* 161, 37-43 (2017). (査読あり)
DOI: 10.1093/jb/mvw050.

Hishiki, A., Hara, K., Ikegaya, Y., Yokoyama, H., Shimizu, T., Sato, M. & *Hashimoto, H. Structure of a novel DNA-binding domain of helicase-like transcription factor (HLTF) and its functional implication in DNA damage tolerance. *J. Biol. Chem.* 290, 13215-13223 (2015). (査読あり)
DOI: 10.1074/jbc.M115.643643.

Ikegaya, Y., Hara, K., Hishiki, A., Yokoyama, H. & *Hashimoto, H. Crystallographic study of a novel DNA-binding domain of human HLTF involved in the template-switching pathway to avoid the replication arrest caused by DNA damage. *Acta Crystallog.* F71, 668-670 (2015). (査読あり)
DOI: 10.1107/S2053230X15005907.

*Yokoyama, H., Sawada, J., Katoh, S., Matsuno, K., Ogo, N., Ishikawa, Y., Hashimoto,

H., Fujii, S. & *Asai, A. Structural basis of new allosteric inhibition in kinesin spindle protein Eg5. *ACS Chem. Biol.* 10, 1128-1136 (2015). (査読あり)
DOI: 10.1021/cb500939x.

*Yokoyama, H. & Mizutani, R. Structural biology of DNA (6-4) photoproducts formed by ultraviolet radiation and interactions with their binding proteins. *Int. J. Mol. Sci.* 15 (11), 20321-20338 (2014). (査読あり)
DOI: 10.3390/ijms151120321.

*Yokoyama, H. & Matsui, I. Crystal structure of the stomatin operon partner protein from *Pyrococcus horikoshii* indicates the formation of a multimeric assembly. *FEBS Open Bio* 4, 804-812 (2014). (査読あり)
DOI: 10.1016/j.fob.2014.09.002.

*Yokoyama, H. & Fujii, S. Structures and metal-binding properties of *Helicobacter pylori* neutrophil-activating protein with a di-nuclear ferroxidase center. *Biomolecules* 4 (3), 600-615 (2014). (査読あり)
DOI: 10.3390/biom4030600.

〔学会発表〕(計 16 件)

亀井七海、横山英志、小西佳史郎、原幸大、石川吉伸、松井郁夫、Patrick Forterre、橋本博、オリゴペプチド結合タンパク質 OppA の X 線結晶構造解析、日本薬学会 第 137 年会、2017 年 3 月 25 日、仙台国際センター(仙台)

内田雅之、原幸大、田形梨紗、菱木麻美、石川吉伸、横山英志、橋本博、テンプレートスイッチに関わる ZRANB3 と PCNA の相互作用解析、日本結晶学会 平成 28 年度年会、2016 年 11 月 17-18 日、茨城県立県民文化センター(水戸)

横山英志、X 線結晶構造解析による脂質ラフトタンパク質ストマチンと特異的プロテアーゼの機能解明、第 60 回 日本薬学会関東支部大会(招待講演)、2016 年 9 月 17 日、東京大学 山上会館(東京都文京区)

内田雅之、原幸大、田形梨紗、石川吉伸、横山英志、橋本博、テンプレートスイッチに関わる ZRANB3 PIP と PCNA の相互作用解析、第 62 回 日本薬学会東海支部総会・大会、2016 年 7 月 9 日、愛知学院大学 楠元キャンパス(名古屋)

亀井七海、横山英志、小西佳史郎、原幸大、石川吉伸、松井郁夫、Patrick Forterre、橋本博、オリゴペプチド結合タンパク質の X 線結晶構造解析、第 62 回 日本薬学会東海支部総会・大会、2016 年 7 月 9 日、愛知学院大学 楠

元キャンパス(名古屋)

林田直樹、横山英志、野口修治、イソアスパラギン酸生成が引き起こした Protein Aging による抗体の機能低下の立体構造解析、第 39 回(2016)日本基礎老化学会大会、2016 年 5 月 27 日、伊勢原市民文化会館(伊勢原市)

亀井七海、横山英志、小西佳史郎、原幸大、石川吉伸、松井郁夫、Patrick Forterre、橋本博、オリゴペプチド結合タンパク質の精製と結晶化、日本薬学会 第 136 年会、2016 年 3 月 28 日、パシフィコ横浜(横浜)

横山英志、多量体形成脂質ラフトタンパク質ストマチンの結晶学的研究、静岡県立大学 2015 US フォーラム、2015 年 9 月 29 日、静岡県立大学(静岡)

横山英志、松井郁夫、ストマチンパートナータンパク質の結晶構造と多量体形成、日本生物物理学会第 53 回年会、2015 年 9 月 15 日、金沢大学 角間キャンパス(金沢)

小西佳史郎、横山英志、原幸大、石川吉伸、松井郁夫、Patrick Forterre、橋本博、膜小胞形成に関わるオリゴペプチド結合タンパク質の調製と結晶化、平成 26 年度日本結晶学会年会、2014 年 11 月 1-3 日、東京大学農学部(東京都文京区)

片川 裕理、原幸大、花岡佑樹、菊池壮太郎、横山英志、Kim Minsoo、笹川千尋、佐藤衛、橋本博、赤痢菌 IpaB による Mad2L2 の機能阻害複合体の結晶学的研究、平成 26 年度日本結晶学会年会、2014 年 11 月 1-3 日、東京大学農学部(東京都文京区)

横山英志、澤田潤一、加藤詩織、松野研司、小郷尚久、石川吉伸、藤井敏、浅井章良、橋本博、キネシン Eg5 と ATP 競合阻害剤との複合体の結晶構造、平成 26 年度日本結晶学会年会、2014 年 11 月 1-3 日、東京大学農学部(東京都文京区)

鈴木佳奈、横山英志、原幸大、松井郁夫、橋本博、膜タンパク質ストマチン特異的切断プロテアーゼの構造生物学的研究、平成 26 年度日本結晶学会年会、2014 年 11 月 1-3 日、東京大学農学部(東京都文京区)

横山英志、松井えり子、平本加奈、松井郁夫、膜タンパク質ストマチンのパートナータンパク質の多量体形成、第 87 回日本生化学会大会、2014 年 10 月 16 日、国立京都国際会館(京都)

横山英志、小林大介、瀧澤直人、藤井敏、松井郁夫、耐熱性ストマチン特異的切断プロ

テアーゼの構造と機能解析、日本生物物理学会第52回年会、2014年9月25日、札幌コンベンションセンター（札幌）

横山英志、澤田潤一、加藤詩織、松野研司、小郷尚久、石川吉伸、橋本博、藤井敏、浅井章良、ATP拮抗型キネシン Eg5 阻害剤の阻害様式における構造的基盤、日本ケミカルバイオロジー学会 第9回年会、2014年6月12日、大阪大学会館（大阪）

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.rs.tus.ac.jp/yokoyama/index.html>

http://www.rs.tus.ac.jp/yokoyama/English/index_e.html

6．研究組織

(1)研究代表者

横山 英志 (YOKOYAMA HIDESHI)

東京理科大学・薬学部・准教授

研究者番号：70433208

(2)研究分担者

橋本 博 (HASHIMOTO HIROSHI)

静岡県立大学・薬学部・教授

研究者番号：40336590