

(様式 1-1)

提出日：2023 年 4 月 24 日

2022 年度 大阪大学蛋白質研究所 拠点事業

研究成果報告書

(1) 事業名

共同研究員

(2) 研究代表者

氏名：禾 晃和

所属機関名・部局名・職名：横浜市立大学・大学院生命医科学研究科・准教授

(3) 研究課題名

クライオ電子顕微鏡を用いた膜内プロテアーゼの構造解析

(4) 蛋白質研究所受入担当教員

教員名：加藤 貴之（研究室名：電子線構造生物学研究室）

(5) 研究成果の概要（公開）

***背景および目的、方法と結果、について、公開して差し支えない範囲で 1 ページ以内で記載。**

本研究では、膜内切断プロテアーゼの基質認識機構や基質取り込み過程でのコンフォメーション変化の機序を明らかにするため、受け入れ研究室との共同研究によって電子顕微鏡等を用いた構造解析に着手する。膜内切断プロテアーゼは、膜内在性タンパク質であり、活性中心の構造によって、セリンプロテアーゼ型の Rhomboid ファミリー、金属プロテアーゼ型の Site-2 protease (S2P) ファミリー、アスパラギン酸プロテアーゼ型の γ -secretase/SPP ファミリーの 3 つに分類される。膜内切断プロテアーゼは、膜から不要なタンパク質を除去する役割を持ち、膜におけるタンパク質恒常性の維持のために必須な因子である。また、膜内切断プロテアーゼは、ストレス応答や成長因子の活性化、形態形成に関わるシグナル伝達など生理的に重要な現象に関わるとともに、ヒトの疾患の発症や多種多様な感染症にも関わることから精力的に立体構造解析が行われてきた。その結果、3 つのファミリー全てについて少なくとも 1 つは原子レベルでの立体構造が決定され、アルツハイマー病やガンに関連する γ -secretase については、クライオ電子顕微鏡によって基質との複合体の立体構造も決定された。しかしながら、疎水的な膜内部で基質が特異的に認識される分子機構については、未だ十分に理解されておらず、さらなる構造機能解析が必要とされている。

本研究で取り上げる RseP は、膜内切断プロテアーゼの中でも生化学的な機能解析が詳細に行われ、基質特異性に関する情報が蓄積している。申請者も、RseP の構造生物学的研究に取り組み、RseP の可溶性領域の部分構造や全長タンパク質の電顕構造を明らかにし、基質認識に関するモデルを提唱した。また、膜内部に存在する β -シート様のモチーフが基質との相互作用に重要であることも明らかにした。そして、昨年度、RseP およびオルソログについて全長タンパク質の X 線結晶構造を決定することにも成功した。構造解析の結果、RseP は膜内部に形成された活性中心に基質を取り込むためのゲートを有している可能性があることが明らかになった。また、基質切断制御に異常を示す RseP の変異体と抗体 Fab 断片の複合体試料を精製し、電顕解析を行うことで、機能異常と構造の相関を調べた。これらの構造生物学的解析に加えて、系統的な生化学的機能解析を行った結果を Science Advances 誌で論文発表した。