（様式 1−1）　　提出日：2024 年　5 月 7 日

2023 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（下記より該当事業名を選択し、ほかは削除して下さい。）

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（申請時に記載したものと同じ課題名を記入して下さい。）

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。

研究代表者は、細胞内で膜の品質管理とシグナル伝達の制御という二重の役割を担う膜内切断プロテアーゼ RseP を研究対象とした構造生物学的研究に取り組んだ。研究代表者は、先行研究において、RseP の結晶構造を決定し、RseP が基質取り込みゲートを介して切断の調節を行うというモデルを提唱しており、本研究では、RseP の基質認識や基質取り込み過程でのコンフォメーション変化の調節機構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を用いた構造解析に着手した。RseP の分子量は 50 kDa 前後であり、単独ではクライオ電子顕微鏡による解析は困難であることから、研究代表者は、抗体の Fab 断片を結合させることで、クライオ電顕による解析が可能なレベルまで RseP の粒子サイズを増大させようと考えた。構造解析には大量の Fab が必要とされることから、研究代表者は、高品質の Fab を安定して供給するために、動物細胞を用いて組み換え発現系を構築した（*Protein Expr Purif* (2023), 208-209, 106289）。具体的には、重鎖の VH-CH1 領域の N 末端側に human growth hormone (hGH)と His8 タグを融合し、軽鎖とともに動物細胞で分泌発現させた。hGH-His8 タグが融合した Fab をアフィニティークロマトグラフィーで精製した後、プロテアーゼでタグを切断した。結晶解析によって hGH 融合タンパク質で発現させた Fab が天然の構造を保っていることを確認した後、クライオ電顕解析にも使用した。

さらに、研究代表者は、独自の抗体アフィニティー精製技術で高品質の RseP の組み換えタンパク質を調製し、共同研究者が進めていた RseP の基質探索研究にも貢献した。その結果、最終的に 14 種類の低分子量膜タンパク質が新規の基質として同定された。その中には細胞休眠（パーシスター化）を誘導する内在性トキシン HokB も含まれており、RseP が HokB を切断することで細胞毒性を抑制することを示した（*mBio* (2023) , e0108623）。この結果は、RseP が HokB によって誘導される細胞休眠からの覚醒に関与することを示唆しており、RseP が新たな感染症治療薬の標的になりうることを示している。