

(様式 1-1)

提出日：2025 年 4 月 3 日

2024 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。）

クライオ電子顕微鏡

(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一課題名を記入して下さい。）

膜内切断プロテアーゼのクライオ電子顕微鏡解析

(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）

(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。**

膜内切断プロテアーゼは、膜に蓄積するシグナルペプチドや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細菌の病原性や感染性の発現にも関わる。代表者らは、膜内切断プロテアーゼの中でも金属プロテアーゼ型の Site-2 protease (S2P) ファミリーに分類される大腸菌由来 RseP の構造解析に取り組み、その X 線結晶構造を明らかにしたが、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、未だ十分に理解できておらず、さらなる構造機能解析が必要とされている。そこで本課題では、大腸菌由来 RseP やグラム陰性細菌のオルソログを標的としてクライオ電子顕微鏡単粒子解析に取り組んだ。

RseP やオルソログは分子量が 5 万以下と小さな膜タンパク質であることから、抗体 Fab を Fiducial mark として結合させて電子顕微鏡像の撮影を行った。その結果、超好熱菌 *Aquifex aeolicus* 由来のオルソログについて、4 Å 分解能を超える三次元再構成像が得られた。そして、興味深いことにこのオルソログの活性中心近傍にリガンドが結合していることを示唆する密度が観測された。そこで、活性変異体を作製し、再度解析を行ったところ、野生型比べ、より明瞭な密度が観測された。観測された密度は分子内部に形成された空洞を貫くように結合しており、その形状からポリペプチド鎖であることが示唆された。実際、活性変異体を用いて Native MS および MS/MS による解析を行ったところ、発現宿主である大腸菌の膜タンパク質の部分断片が結合していることが明らかになった。これらの知見に基づき、観測された密度にポリアラニンモデルを当てはめることで、RseP が属するクラス I の site-2 protease としては初めて基質結合状態の立体構造を明らかにすることに成功した。一連の解析結果は、代表者や受入担当教員を責任著者として論文に取りまとめられ、*Science Advances* 誌に掲載された (*Sci Adv* (2025) 11, eadu0925)。