

審査の結果の要旨

氏名 宮下 紘幸

プロテアーゼはペプチド結合を加水分解により切断する酵素である。しかし近年、疎水的環境と考えられる脂質二重膜において、膜タンパク質の膜貫通領域を基質として切断する「膜内配列切断プロテアーゼ」(Intramembrane cleaving proteases; I-CLiPs)の存在が明らかとなっている。I-CLiPsは細菌から哺乳類に至るまで存在し、その切断産物は転写調節・代謝調節など、生理的に重要な役割を担うことが知られている。I-CLiPsのうち、アスパラギン酸プロテアーゼである γ -secretaseとsignal peptide peptidase (SPP)は、共通の活性中心モチーフを有し、同一の遷移状態模倣型阻害剤によって阻害されることから、基本的な切断機構には共通性が想定されている。また、前者はアルツハイマー病、後者はC型肝炎の発症鍵分子の切断を担うことが知られており、これらの疾患に対する創薬標的分子としても注目されている。これらの酵素活性を標的とした合理的な創薬戦略の立案にあたり、 γ -secretaseとSPPの機能構造解析は重要である。本研究において、申請者は、*Sf9*細胞-組み換えbaculovirus発現系によりSPPを発現し、その酵素活性を指標として精製を行い、透過型電子顕微鏡を用いた単粒子解析により、全体構造の解明と、構造に基づいた活性との関連領域の同定を試みた。

1. SPPの4量体化状態の同定と活性を保持した精製

組み換えbaculovirusを用いて、3xFLAGタグをN末端に付加したヒトSPP(3xFLAG-SPP)を*Sf9*細胞に強制発現させ、その膜画分を2% *n*-dodecyl β -D-maltoside (DDM)で可溶化後、anti-Flag M2抗体カラムにて精製・濃縮を行い、サイズ排除ゲル濾過クロマトグラフィーによる分画を行った。同時に、合成ペプチド基質を用いた*in vitro* SPPアッセイ系を用いて各画分の酵素活性を測定したところ、232-300 kDa相当の画分に3xFLAG-SPPが主に検出され、最も高い比活性が得られた。SDS-PAGE上でSPP単量体は50 kDaの位置に、またSDS耐性の2量体が100 kDaの位置に電気泳動されること、銀染色では3xFLAG-SPP以外の他のタンパク質が検出されないことから、3xFLAG-SPPがホモ多量体を形成している可能性が示唆された。そこで精製3xFLAG-SPPをBlue Native-PAGEを用いて非変性条件下で分画したところ、4量体に相当する分子種が主に検出された。ヒト、ショウジョウバエ由来の培養細胞が内因性に発現するSPPについても同様の検討を行ったところ、いずれも4量体相当の分子量に対応する画分のみを検出された。同様の4量体化は、SPPファミリー分子であるSPPL2bにおいても観察された。さらにこれらの培養細胞に過剰発現させた外因性SPPは、内因性SPPと免疫共沈降された。以上のことから、SPPは4量体として存在し、これはSPP型I-CLiPsに共通する性質であることが示唆された。

2. 単粒子解析によるSPPの立体構造解析

精製3xFLAG-SPP中、最も比活性の高い232-300 kDaの画分に酢酸ウラニルによる陰性染色を施し、透過型電子顕微鏡により観察したところ、径85-130 Åで顆粒状の、形状の均一な構造物が観察された。周辺画分の陰性染色像と比較したところ、この粒子は比活性の高い画分を中心に観察され、抗FLAG IgG抗体(M2)、金粒子標識M2Fab抗体とも結合することが確かめられた。これらの結果から、本粒子はSPPそのものであると考えられた。視野内に観察される構造物は本粒子のみであり、濃縮により2個の粒子の結合像が観察されたが、希釈により粒子がより小さい単位に離散することはなかった。これらの結果は、4量体がSPPの基本的状態であることを裏付けるものと考えた。そこで、約5,000個の粒子像を抽出し、情報処理技術を用いて3次元構造の再

構成を行った。最終的に得られた像は、23 Å の解像度で、85 x 85 x 130 Å³ の容積を持ち、内部には、仮定においた C4 回転対称軸と平行に中空なチャンバー構造のように見える低密度領域と、その中央にプラグ様構造、及び、側面にはチャンバー構造へとつながるクレフト様構造を有する、弾丸型の構造物と解釈された。

3. SPP の N 末端領域を介した 4 量体化の意義

ヒト SPP は最 N 末端側で糖鎖修飾を受けることから、N 末端側を細胞外・内腔側に露出していることが知られている。3xFLAG タグを最 N 末端に付加したことを利用し、M2 抗体 IgG を用いたラベリング実験の結果を粒子構造と比較検討したところ、再構成立体構造中のプラグ様構造は細胞質側に面していることが示唆された。さらに、SPP の N 末端タグに結合する金粒子標識 M2Fab 抗体と SPP 粒子の間には 1 対 1 の結合像が主に見られたことから、SPP の N 末端領域が中央軸へ向いて 4 量体化しているために、金標識抗体の結合に立体障害が生じている可能性が考えられた。そこで SPP の活性中心を含む第 6 膜貫通領域より N 末端側のみに対応する N 末端フラグメント (NTF) を発現、精製し、Blue Native-PAGE により解析したところ、NTF のみで 4 量体形成が生じることがわかった。次に SPP 活性の発現における 4 量体化の意義を調べるため、ショウジョウバエ細胞に SPP の NTF を発現させたところ、内因性 SPP 活性の減少が観察され、**dominant negative** 効果を持つことが明らかとなった。すなわち、SPP が活性を発揮するに当たり、N 末端領域を介した適切な 4 量体形成が活性に重要である可能性が示唆された。

本研究において、申請者は *Sy9* 細胞発現系を用い、アスパラギン酸 I-CLiPs の一つである SPP を発現、精製し、活性を持つ 4 量体としての全体構造を初めて明らかにした。そして SPP がその N 末端領域を介した結合により、4 量体として存在することを示唆した。活性中心を含む SPP の C 末端領域をリコンビナント蛋白として発現、精製すると、単量体として *in vitro* においてプロテアーゼ活性を発揮するとの報告がある。本研究の結果と考え合わせると、SPP は活性中心を含まない N 末端領域をスキヤフォールドドメインとして中心に持つ 4 量体として存在し、プロテアーゼドメインである C 末端領域を外側へ配向させた構造を持つことが推定される。

I-CLiPs のなかで、Rhomboid、Site-2 protease については x 線結晶構造解析の結果が報告されており、ともに活性中心が脂質二重膜内に存在する親水性チャンバー構造に面していること、ループ領域がそのクレフトをふさぐように存在していると報告されている。本研究において明らかにされた SPP の単粒子構造においても、親水性チャンバーを形成するのに十分なクレフト構造と、それをふさぐように存在するプラグ様構造が見られ、構造上興味深い共通性が見られた。さらに親水性チャンバーへとつながるように存在するクレフトが側方の各平面領域に存在していた。この平面領域は 30 Å 以上の高さを持ち、脂質二重膜に面していると考えられる。したがって今回見出されたクレフト構造は、基質である膜貫通領域が、活性中心部位へ脂質二重膜上の側方移動により侵入する機構に用いられている可能性が考えられた。

また本研究から、SPP の N 末端領域を介した 4 量体化がプロテアーゼ活性に必要である可能性が示された。四量体化の分子機構は、活性中心の阻害と異なる、SPP 活性抑制の新たな創薬標的となる可能性があり、多量体化阻害剤は高い選択性を持つ SPP 活性制御に有用であることが期待される。しかし、現在得られている構造の解像度は未だ十分ではない。最近になり Cell free 発現

系を用いて、活性を持った状態での 3xFLAG-SPP を大量精製することに成功した。今後は結晶構造解析による相互作用界面の決定と、多量体化が活性発現に果たす分子機構の解明が課題と考えられる。

以上のごとく申請者は SPP 分子の構造機能連関を生化学、構造生物学的手法を用いて解析し、顕著な新知見を得た。これらの成果は博士（薬学）に相応しいものと判定する。