

神経軸索ガイダンスを制御する細胞表面受容体プレキシンの構造解析

Structural analysis of the cell surface receptor plexin implicated in the axon guidance during neural development

禾 晃和^{1,*}

¹横浜市立大学大学院生命医科学研究科, 〒230-0045 横浜市鶴見区末広町 1-7-29

Terukazu Nogi^{1,*}

¹Graduate School of Medical Life Science, Yokohama City University, 1-7-29 Suehiro-cho, Tsurumi-ku, Yokohama 230-0045, Japan

1 はじめに

ヒトを初めとする高等生物は、高度に発達した中枢神経を有している。中枢神経を構成する個々の神経細胞は、軸索や樹状突起、細胞体と呼ばれる特徴的な構造を有しており、それぞれの神経細胞は、軸索を伸ばして、他の神経細胞とシナプスを形成することでネットワークを形成する。中枢神経の発生過程では、軸索を正しい方向へと導くために、軸索ガイダンス因子と呼ばれる蛋白質が神経細胞上の受容体に作用する。軸索ガイダンス因子には、誘引性と反発性の因子が存在しており、本研究課題では、反発性の因子として知られるセマフォリンとその受容体プレキシンを取り上げた。興味深いことに、細胞外リガンドであるセマフォリンと細胞表面受容体のプレキシンは、細胞外領域に配列が相同なセマドメインと呼ばれる領域を共通に持っており、互いのセマドメイン同士が結合することでシグナル伝達が起こる。セキツイ動物には、5つのクラスに分類されるセマフォリンが21種類、4つのタイプに分類されるプレキシンの9種類存在しており、課題責任者は、すでにセマフォリン6AとプレキシンのA2のペアに関して、セマドメインを含む部分断片同士の複合体構造を明らかにしている。その結果、シグナル伝達時のセマフォリンとプレキシンの2:2のストイキオメトリーでヘテロ4量体構造をとることが明らかになっている。しかしながら、この細胞外におけるヘテロ4量体構造の形成が受容体全体にどのような構造変化を引き起こし、細胞内でのシグナル伝達が起こるのかは未解明の課題である。そこで、本研究課題では、受容体細胞外領域全体の構造を明らかにすることを目的として結晶解析に取り組んだ。

2 実験

プレキシンの細胞外領域は、計10個のモジュールからなり、アミノ酸残基数は1200にも及ぶ。本研究課題では、糖鎖修飾などの翻訳後修飾を受けた天然の状態に近い蛋白質試料を得るべく、動物由来の培養細胞を用いて、蛋白質発現を行った。プレキシンの細胞外領域について様々な部分断片の発現コンストラクトを作製し、一過性発現によって、発現の有無を調べたところ、これまで構造が決定されている

領域よりも長鎖の断片について有意な発現が見られた。目的蛋白質の安定発現株を大量培養し、培養上清から精製した試料を用いて結晶化を行ったところ、六角板状の単結晶が再現よく得られた。析出した結晶を用いて、PF-BL17AでX線回折実験を行ったところ、最高分解能で9Å程度の回折点が観測され、格子定数を見積もることができた。蛋白質の分子量を基に結晶中の分子数を見積もったところ、非対称単位あたりに8~15分子のプレキシンの細胞外領域断片が含まれると計算された。

3 結果および考察

精製蛋白質が結晶化したことから示唆されるように、プレキシンの細胞外領域は、長鎖の断片についてもドメイン間の配向が固定された剛体様の構造をとるものと考えられる。また、分子量と比べて単位格子のサイズが非常に大きい結晶が得られたことは、非対称単位中に多数の分子が入っていることを示している可能性がある一方で、細胞外領域断片が比較的細長い形状をとっているために、分子間に大きな空間ができた、溶媒含有量の大きな結晶が形成されていることを示している可能性もある。

4 まとめ

現状の結晶からは、原子レベルの立体構造を決定するに足る分解能の回折データを得ることは困難であるため、糖鎖修飾の除去などにより、結晶性を改善させることを計画している。

謝辞 (オプション)

回折データを収集するに当たり、蛋白質結晶構造解析ビームラインのスタッフの皆様が大変お世話になりました。この場をお借りして御礼申し上げます。

成果 (オプション)

1. 神経発生や免疫応答に関わるセマフォリンシグナルをささえる低親和性タンパク質間相互作用
禾 晃和：第37回日本分子生物学会年会・口頭発表 2014年11月26日

* nogi@tsurumi.yokohama-cu.ac.jp