

# 脂質ラフトタンパク質ストマチンのパートナータンパク質の構造解析 Structural analysis of the partner protein of lipid-raft protein stomatin

横山英志<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup> 東京理科大学 薬学部, 〒278-8510 千葉県野田市山崎 2641

<sup>2</sup> 静岡県立大学 薬学部, 〒422-8526 静岡市駿河区谷田 52-1

Hideshi Yokoyama<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup> Faculty of Pharmaceutical Sciences, Tokyo University of Science, 2641 Yamazaki, Noda, Chiba, 278-8510, Japan

<sup>2</sup> School of Pharmaceutical Sciences, University of Shizuoka, 52-1 Yada, Suruga-ku, Shizuoka 422-8526, Japan

## 1 はじめに

ストマチン (stomatin) は脂質ラフトに存在する膜タンパク質で、その遺伝的な欠損は溶血性貧血 (遺伝性有口赤血球症 stomatocytosis) の原因となる。ストマチンはほとんどの種に存在するタンパク質であるにもかかわらず、その分子機能や溶血性貧血の発症メカニズムについてはいまだ解明されていない。原核生物や古細菌では、ストマチンのパートナータンパク質 (STOPP、Stomatin operon parter protein) がストマチンとオペロンを形成しているため、ストマチンと関連した機能を示すと予想される。我々は超好熱菌由来の STOPP である PH1510 のプロテアーゼドメイン (16-236 残基) が、二量体を形成するプロテアーゼで、ストマチン PH1511 を Leu238 と Met239 の間で特異的に切断することを明らかにしている[1]。またプロテアーゼドメインと基質ストマチンペプチドとの複合体の立体構造を X線結晶構造解析で決定したが[2]、決定した複合体構造はプロテアーゼが基質を認識した段階の構造であり、基質を切断する機構を解明できていない。そこで本研究では、プロテアーゼが基質ストマチンを切断する機構の解明を目的とした。

## 2 実験

プロテアーゼ PH1510 の活性残基の一つ Ser97 の Ala 変異体 S97A を大腸菌で発現させ、定法に従いタンパク質を精製した。プロテアーゼによる切断配列を含む幾つかのストマチンペプチドを用い、プロテアーゼ S97A に対しモル比 1:10 になるようにペプチドを混合することで複合体を調製し、結晶化を行った。その結果、すでに構造決定されている複合体で用いたペプチドとは異なる 236-245 残基のストマチンペプチドを用いた場合、0.2 M 硫酸アンモニウムと PEG4000 を沈殿剤として用いて 0.05×0.05×0.50 mm の大きさの柱状結晶を得ることができた。得られた結晶を用いて BL-17Aにて分解能 2.3 Å までの X線回折強度データを収集し、XDS、SCALA で回

折データを統計処理した。MOLREP により分子置換を行い、得られた電子密度から COOT を用いたモデルの修正と REFMAC による構造精密化を行った。

## 3 結果および考察

得られた結晶の空間群は  $P6_5$ 、格子定数は  $a = 124.0$ 、 $c = 56.0$  Å であり、非対称単位にプロテアーゼ二量体が 1 分子含まれる。ペプチドは結合していなかったが、プロテアーゼはこれまでに我々が決定した構造と大きく異なる新たな二量体構造をとっていた。野生型の二量体と比べて、一方のモノマーを重ね合わせた場合、他方のモノマーの活性残基 Ser97 の Ca が 23 Å も移動していた。他の活性残基変異体 K138A の二量体構造と比較しても S97A の二量体構造は大きく異なっていた。以上の結果、プロテアーゼは様々な二量体構造をとりうる事が分かった。さらに結晶のパッキングから二量体が 6 分子集まり 12 量体を形成できる可能性が考えられる。ストマチンは 9-12 量体を形成するとの報告があるため STOPP も同様に多量体を形成しストマチンの機能制御を行う可能性が考えられる。

## 謝辞

本研究は産業技術総合研究所の松井 郁夫 博士との共同研究で行われたものです。松井博士には心より感謝申し上げます。また静岡県立大学の橋本 博先生、原 幸大 先生、ならびに学生の皆様には貴重なご助言、実験のサポートに感謝申し上げます。さらに X線回折強度データ収集を行う際お世話になりました PF スタッフの皆様へ感謝致します。

## 参考文献

- [1] H. Yokoyama and I. Matsui, *J. Biol. Chem.* **280**, 6588 (2005).
- [2] H. Yokoyama *et al.*, *Biochemistry* **51**, 3872 (2012).

\* yokoyama@rs.tus.ac.jp