

# プロテアーゼ切断による HGF 活性化の構造的基盤 Structural analysis of HGF to understand its activation mechanism

有森貴夫<sup>1</sup>、高木淳一<sup>1</sup>

<sup>1</sup>大阪大学蛋白質研究所、〒565-0871 大阪府吹田市山田丘 3-2

Takao Arimori<sup>1</sup> and Junichi Takagi<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Osaka University, Suita, Osaka 565-0871, Japan

## 1 はじめに

HGF (肝細胞増殖因子) はチロシンキナーゼ型受容体である Met (または c-Met ともいう) に結合して増殖シグナルを ON にする。このシグナリング経路の異常な活性化はがんの進展や薬剤耐性の獲得に寄与しており、それゆえ、HGF-Met シグナリング経路の活性状態をコントロールするための阻害剤の開発が精力的に行われている。HGF は、約 700 アミノ酸からなる糖タンパク質で、その構成は、N 末端(N)ドメインに続き、4 つの Kringle (K1~4) ドメインと C 末端のセリンプロテアーゼ(SP)様ドメインの 6 つのドメインからなる (Fig.1 上)。HGF は 1 本鎖前駆体(single chain:sc)として細胞外に分泌後、K4 と SP の間のリンカー部位において血中に存在する HGF activator などのプロテアーゼによる切断を受け、ジスルフィド結合で連結された 2 本鎖(two chain:tc)の活性化型 HGF となることが知られている (Fig.1 下)。HGF は SP ドメインを持つものの、catalytic triad を持たず、したがってセリンプロテアーゼ活性は持たない。これまでに HGF の SP ドメインおよび N ドメインから K1 まで、あるいは K2 ドメインまでについては立体構造が報告されているが、K3、K4 ドメイン部分や、HGF 全長の構造はまだ解かれていない。これは、6 つのモジュール間の可動性のために HGF が溶液中で一定の構造を取らず、結晶化が困難なためと考えられる。そこで本研究では、抗体フラグメントを用いた「結晶化シャペロン」戦略を導入し、HGF の切断による構造変化の正体を解明することを

目指した。人工的な Factor Xa 切断部位を導入することで同一のコンストラクトから切断型 (活性型) と未切断型 (不活性型) 両方の HGF 蛋白質を調製し、6 種類のモノクローナル抗体を樹立した [1] (Fig.1)。

## 2 実験

これまでに再三、前記の抗体の Fab フラグメントとの複合体化を利用して全長 HGF の結晶化を試みたが、未だ結晶が得られていない。そこで、特に活性化に重要な切断部位を含む断片(K4SP)の様々な条件での結晶化のため、同フラグメントを安定発現する細胞株の樹立を行った。Expi293F 細胞を用いて樹立したこの細胞株の培養上清から、コンスタントに結晶化品質の K4SP を精製できた。さらにこれとは別に、結晶化のための複合体化に用いる抗体を、通常の Fab ではなく、当研究室で開発した新規フラグメント抗体である Fv-clasp フォーマットに変換した [2]。その結果、まず tc 型 K4SP と t3H3 の Fv-clasp の複合体で結晶が得られ (Fig.2a)、これを用いて BL-1A での回折実験を行った結果、2.74 Å 分解能のデータ収集に成功した。続いて、sc 型 K4SP と t7E3 の Fv-clasp の 1 : 1 複合体 (Fig.2b)、さらには t1E4 および t3H3 の Fv-clasp との 3 者複合体の結晶も複数得ることに成功した (Fig.2c)。scK4SP と t7E3 Fv-clasp の複合体結晶については、BL-1A での回折実験により、最高で 6 Å 分解能程度の回折点を確認することができた。

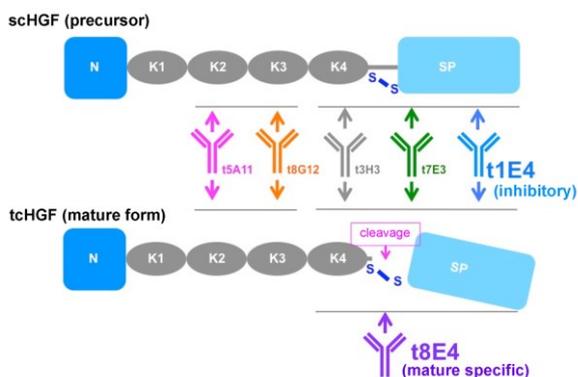


Fig.1 Schematic representation of domain organization of HGF before (top) and after (bottom) protease activation. Location of the epitope for the 6 mAbs used in this study is also shown.



Fig.2 Representative picture of K4SP protein complexed with Fv-clasp fragment of the indicated mAbs.

## 3 結果および考察

tcK4SP と t3H3Fv-clasp の複合体の回折データの指数付およびスケーリングはプログラム XDS を用いて行い (Table 1)、初期位相はプログラム Phaser を用いた分子置換法により決定した。初期モデルをもとに Coot を用いてモデルを構築し、現在、

phenix.refine を用いて構造精密化を実施しているところである。

得られた tcK4SP/t3H3 Fv-clasp の全体構造を Fig.3 に示す。tc 型の K4SP では、K4 ドメインと SP ドメインを繋ぐ長いリンカーの C 末端付近 (SP ドメインの直前) が切断されているが、切断後の新生 N 末端である V495 は、過去に報告された SP ドメインの結晶構造と同様、SP ドメインの内部に埋もれていた。一方、K4 ドメインは、V495 の裏側に位置する SP ドメインの C 末端ヘリックスを含む面とドメイン間の相互作用を形成していた。t3H3 はこの両ドメインのちょうど中間部分に結合しており、これにより全体構造が安定化したことが、今回の結晶構造解析の成功につながったと考えられる。

#### 4 まとめ

本研究では、初めて K4 と SP を含む HGF 断片の結晶構造解析に成功し、これまで不明であった K4 ドメインと SP ドメインの相互作用面を明らかにすることができた。今後はさらに、現在得られている scK4SP/Fv-clasp 複合体の結晶の分解能の向上、構造決定を行うことで、HGF の切断前後の構造を比較することが可能となり、その活性化機構を解明することができると考えている。またそれと同時に、tcK4SP の結晶構造で観測されたドメイン間の相互作用が溶液中でも形成されていることを、変異体実験により明らかにしていく予定である。

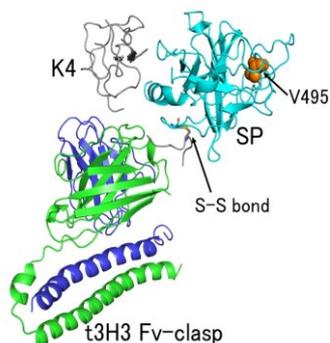


Fig.3 Overall structure of tcK4SP/t3H3 Fv-clasp complex.

#### 参考文献

- [1] M. Umitsu *et al.*, *Scientific Rep.* **6**, 33149 (2016)  
 [2] T. Arimori *et al.*, *Structure*, **25**, 1611 (2017)

\* takagi@protein.osaka-u.ac.jp

Table 1 Data collection statistics

Beamline	BL-1A
Wavelength (Å)	1.1
Resolution (Å)	46.2-2.74 (2.90-2.74)
Unit-cell	
<i>a, b, c</i> (Å)	93.1, 103.6, 78.8
$\alpha, \beta, \gamma$ (°)	90.0, 96.4, 90.0
Space group	C2
$R_{\text{sym}}$	0.137 (1.295)
CC1/2	99.7 (74.5)
Completeness (%)	99.1 (94.7)
Redundancy	7.1 (6.9)
$I/\sigma(I)$	11.7 (1.3)