

SARS-CoV-2 のスパイクタンパクを活性化する TMPRSS13 の結晶構造 Crystal Structure of TMPRSS13 that activates Spike protein of SARS-CoV-2

真板宣夫^{1,*}, 真板 (大野) 綾子^{2,**}, 奥村裕司³, 二川健²

¹ 量子科学技術研究開発機構, 〒263-8555 千葉県千葉市稲毛区穴川 4-9-1

² 徳島大学大学院 医歯薬学研究部, 〒770-8503 徳島県徳島市蔵本町 3-18-15

³ 相模女子大学 栄養科学部健康栄養学科, 〒252-0383 神奈川県相模原市南区文京 2-1-1

Nobuo Maita^{1,*}, Ayako Ohno^{2,**}, Yuushi Okumura³ and Takeshi Nikawa²

¹ Institute for Quantum Life Science, National Institute for Quantum and Radiological Science and Technology, 4-9-1 Anagawa, Inage-ku, Chiba, Chiba, Japan

² Department of Nutritional Physiology, Institute of Medical Nutrition, Tokushima University, 3-18-15 Kuramoto, Tokushima, Tokushima, 770-8503, Japan

³ Department of Nutrition and Health, Faculty of Nutritional Science, Sagami Women's University, 2-1-1 Bunkyo, Minami, Sagamihara, Kanagawa, 252-0383, Japan

1 はじめに

TMPRSS13 は II 型膜貫通型セリンプロテアーゼ (TTSPs) のひとつであり, 細胞内 N 末端で一回膜貫通ヘリックスを持ち, 細胞外領域は LDLA, SRCR, SEA, CUB などのドメインからなるステム部分に続いて C 末端にキモトリプシン型セリンプロテアーゼ (SP) ドメインを持つのが特徴である。TTSPs ファミリーの中で細胞外領域の構造が解かれているのは Hepsin のみである。TMPRSS13 の細胞外領域は LDLA, SRCR, SP の各ドメインから成り (図 1), これは TMPRSS2, TMPRSS3, TMPRSS4 と共通のドメイン構成である。これらのプロテアーゼの生理的機能は不明なものが多いが, インフルエンザやコロナウイルスの表面タンパク質を切断し, 感染のトリガーとなることが知られている。

我々は 2013 年にすでにペプチド阻害剤と結合した TMPRSS13 の結晶構造を得ていたが, 論文化の目的が立たないまま時間が経ってしまった。しかし 2020 年に新型コロナウイルスのパンデミックが起これ, TMPRSS2 が SARS-CoV-2 のスパイクタンパク質を切断し感染を引き起こすことが報告され[1], TTSPs が注目された。当時は TMPRSS2 の構造が未解明だったことから, より正確なホモロジーモデルの構築および感染機構の解明に寄与できると考え, 論文として発表した[2]。その後, TMPRSS2 だけでなく TMPRSS4, TMPRSS13, TMPRSS11D も SARS-CoV-2 のスパイクタンパク質を切断することが報告された[3,4]。

2 実験

ヒト TMPRSS13 を HEK293T で発現させたものを精製した[5]のち, ペプチド型セリンプロテアーゼ阻害剤 (decanoyl-RVKR-cmk) と混ぜて複合体を得た。結晶は 0.1 M HEPES (pH 7.5), 2.4 M 硫酸の条件で得られ, AR-NE3A で最大 2.6-Å の回折データを収集す

ることが出来た。構造は kallikrein SP domain (PDB: 2ANY) の分子置換で解いた。SP ドメインの精密化計算を進めていくうちに残りの LDLA 及び SRCR ドメインの解釈可能な電子密度が得られた。最終的に TMPRSS13, decanoyl-RVKR-cmk, 2 つの糖鎖を置くことが出来た (PDB: 6KD5)。R 因子はそれぞれ 18.5% (R-work) と 25.1% (R-free) であった[2]。

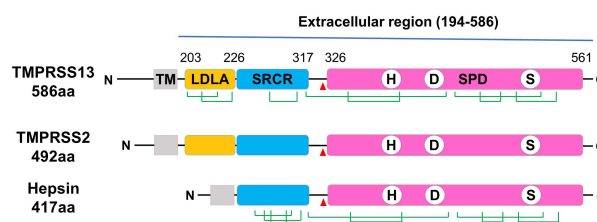


図 1 : TMPRSS13, TMPRSS2, Hepsin のドメイン構成。緑色の線はジスルフィド結合, 自己切断部位を赤色の三角, Catalytic Triad を H/D/S で示す。

3 結果および考察

TMPRSS13 の細胞外領域は LDLA, SRCR, SP ドメインが互いに接してコンパクトな構造であった (図 2)。TTSPs の成熟の際には SP ドメインの直前で自己切断が起こるが, TMPRSS13 構造でも切断されていて, 切断末端のイソロイシンが SP ドメインの内部に埋まっているのが確認できた。また, SRCR と SP ドメイン間はジスルフィド結合で安定化されていた。膜貫通領域直後の N 末端は SP ドメインと β シートにより相互作用しており, TMPRSS13 は細胞膜表面に横倒しになっていると推察された。LDLA ドメインは 2 組のジスルフィド結合とカルシウムを結合したループが見られ, SRCR ドメインは内部に 2 組のジスルフィド結合と SP ド

メインとのジスルフィド結合が見られた。また、Asn255 と Asn405 に付加している糖鎖が見られた。

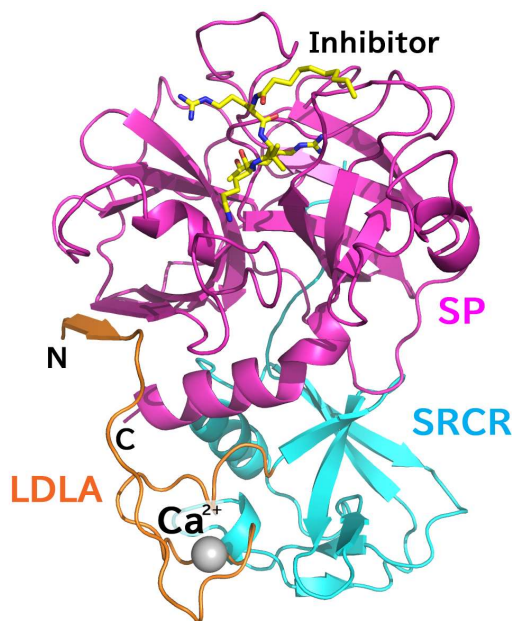


図2：阻害剤を結合した TMPRSS13 細胞外領域構造

ペプチド型セリンプロテアーゼ阻害剤 decanoyl-RVKR-cmk は Furin inhibitor として知られ、cmk (クロロメチルケトン)部分が活性部位のセリンと不可逆的な共有結合を形成して阻害する。TMPRSS13 は K/R リッチな配列に指向性があり、特に P2 サイトのリジンに特異性を示すが、このような特異性はキモトリプシン型のセリンプロテアーゼでは極めて珍しい。TMPRSS13 の β 14- β 15 ループに YTDEED という特徴的な酸性残基クラスタがあり、これが P2-Lys の $N\epsilon$ と 4 本の水素結合を形成していた (図3)。興味深いことに、2021 年に登録された TMPRSS2 の結晶構造 (PDB: 7MEQ) では β 14- β 15 ループの配列は(337)-YDSKTK-(342)となっており、Lys342 の側鎖が折れ曲がって $N\epsilon$ がループの酸性領域と相互作用している (図3)。

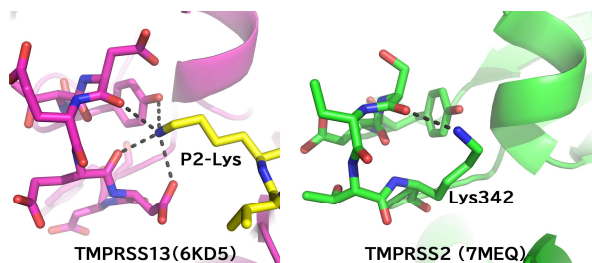


図3：TMPRSS13 の β 14- β 15 ループとペプチド型阻害剤の P2-Lys との相互作用 (左) と TMPRSS2 の β 14- β 15 ループの自己相互作用 (右)

TMPRSS2 は SARS-CoV-2 のスパイクタンパク質の S2' 部位 (KPSKR↓SF) を切断する[6]。この配列

は P2-Lys であるので、TMPRSS13 に特異的な配列になっている。実際、TMPRSS13 の介する感染活性は TMPRSS2 と同じかそれ以上とのデータも示されている[4]。TMPRSS2 は P2 部位が Ala や Val のようなどちらかといえば側鎖の小さい配列を好むが、Lys342 の側鎖が真っ直ぐ伸びることで P2-Lys を含む配列も切断することが出来ると思われる。

4 まとめ

これまで TTSPs ファミリーでは細胞外領域全体での既知構造は Hepsin のみであった。Hepsin の細胞外ドメインは LDLA を持たず、これを基に TMPRSS2 の機能を理解するには不十分であった。昨年 PDB に登録された TMPRSS2(7MEQ)では LDLA ドメインがディスオーダーしておりやはり不十分である。その為我々の TMPRSS13 構造は今後とも SARS-CoV-2 研究に大いに貢献すると思われる。また、K/R リッチな配列は高病原性鳥インフルエンザウイルス (H5N2) のヘマグルチニンにも見られ、TMPRSS13 はこれを切断する[5]ことから、今回の成果は将来の鳥インフルエンザ感染拡大予防にも重要となるだろう。

謝辞

本研究は PF 構造生物学研究センターのスタッフに協力を頂いて、課題番号 2013G075 の下に放射光実験を行いました。ここに感謝の意を表します。

参考文献

- [1] M. Hoffmann *et al.*, *Cell* **181**, 271 (2020).
- [2] A. Ohno *et al.*, *Life Sci. Alliance* **4**, e202000849 (2021).
- [3] M. Kishimoto *et al.*, *Viruses* **13**, 384 (2021).
- [4] M. Hoffmann *et al.*, *EBioMedicine* **65**, 103255 (2021).
- [5] Y. Okumura *et al.*, *J. Virol.* **84**, 5089 (2010).
- [6] B. Bestle *et al.* *Life Sci. Alliance* **3**, e202000786 (2020).

* maiyo@icloud.com

** 現所属 株式会社キュライオ