

## 細菌型膜内プロテアーゼの結晶学的研究 Crystallographic analysis of the bacterial intramembrane protease

禾晃和<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>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<sup>1,\*</sup>

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

### 1 はじめに

大腸菌の有する RseP は、site-2 protease ファミリーに属する膜内切断プロテアーゼであり、表層ストレス応答に関与する。ストレス条件下において、RseP は、DegS プロテアーゼとともに II 型膜タンパク質 RseA を切断する。RseA の細胞内ドメインにはストレス応答遺伝子群の発現を制御する転写因子  $\sigma^E$  が結合しており、 $\sigma^E$  は一連の切断反応によって、膜から遊離し活性化される。DegS と RseP による RseA の切断反応の順序は決まっており、まず、DegS が C 末端側のペリプラズム領域を切断した後、RseP がその切断産物を膜内部で切断する。RseP のペリプラズム領域には、ペプチド C 末端の認識モジュールとして知られる PDZ ドメインがタンデムに 2 つ存在している。このため、PDZ タンデムが DegS の切断によって生じる RseA の新生 C 末端を認識する可能性も考えられてきた。しかしながら、これまでの変異体を用いた機能解析の結果は、PDZ タンデムは、むしろ DegS が作用する前に RseP が全長 RseA の切断を行うのを抑制する役割を担っていることを示していた。PDZ ドメインが、いかにして基質切断の制御に関与しているのかを明らかにするためには、PDZ タンデム領域全体の立体構造を明らかにすることが重要であると考えられる。しかしながら、RseP の 2 つの PDZ ドメインについては、それぞれ単独の断片の結晶構造解析が行われているのみであり、2 つのドメインがつながった断片については、結晶は得られていなかった。大腸菌由来 RseP の PDZ タンデムでは、2 つの PDZ ドメインが 6 残基からなる柔軟性の高いリンカーでつながっていることが予想されており、断片全体の構造の揺らぎが大きいことが、結晶が得られない原因と考えられた。そこで本研究では、リンカー配列が短く、可動性が低いことが予想される好熱菌由来の RseP ホモログを用いて、PDZ タンデム断片の結晶構造解析に取り組むこととした。

### 2 実験

本研究では、まず好熱菌由来の RseP ホモログの遺伝子をクローニングし、大腸菌を用いて PDZ タンデム断片の発現系を構築した。微量溶液分注装置を用いて、結晶化条件のスクリーニングと添加剤を

用いた結晶化条件の最適化を行い、Photon Factory BL-17A において、X 線回折データの収集を行った。

### 3 結果および考察

精製試料を用いて、結晶化条件のスクリーニングを行ったところ、塩を主たる沈殿剤とする複数の条件で結晶が得られた。添加剤を用いて条件の最適化を行い、最終的に 2.8 Å 分解能の回折データが得られた。構造既知の大腸菌由来の PDZ ドメイン個々の座標データを用いて分子置換法による位相決定を行った後、分子モデルの構築と構造精密化を行った。

### 4 まとめ

本研究により、PDZ タンデム全体の結晶構造が初めて明らかになった。現在、構造情報をもとに、基質認識機構の解明に向けた変異体解析を進めている。

### 謝辞

回折データを収集するに当たり、タンパク質結晶構造解析ビームラインのスタッフの皆様にご多大の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

- 1 膜内配列切断 (RIP) における PDZ ドメインを介した“基質認識”、禾晃和、大阪大学蛋白質研究所セミナー・包括脳ネットワーク研究会、第 3 回神経科学と構造生物学の融合研究会 (招待講演)、2012 年 10 月 4 日、大阪大学蛋白質研究所 (吹田市)
- 2 膜内切断プロテアーゼ RseP の基質取り込み制御における PDZ タンデムの役割、禾晃和、檜作洋平、田畑早苗、川上-田村恵子、小田隆、佐藤衛、高木淳一、秋山芳展、第 12 回日本蛋白質科学会年会、2012 年 6 月 21 日、名古屋国際会議場 (名古屋市)
- 3 Structural analysis of PDZ modules of bacterial site-2 protease、禾晃和、高木淳一、26th European Crystallographic Meeting、2010 年 9 月 1 日、Darmstadtium Conference Center (ドイツ、ダルムシュタット市)

\* [nogi@tsurumi.yokohama-cu.ac.jp](mailto:nogi@tsurumi.yokohama-cu.ac.jp)