

細菌型膜内プロテアーゼ可溶性ドメインの構造生物学的研究

Structural analysis of the periplasmic fragment of bacterial intramembrane protease

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 1-7-29Terukazu 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

大腸菌の有する膜内切断プロテアーゼ RseP は、表層ストレス応答に関与する。RseP は、ストレス条件下において膜結合型の 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関連遺伝子の発現を制御する転写因子 σ^E が結合しており、 σ^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。このストレス応答において、RseA は、まず DegS によって C 末端側のペリプラズム領域が切断された後に、RseP による膜内切断を受ける。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 つ存在しており、RseA の段階的な切断の制御に関わると考えられている。そこで本研究では、この PDZ タンデム領域の機能を解明すること最終目標として構造生物学的研究に取り組むこととした。大腸菌由来 RseP の PDZ タンデムについては、2 つの PDZ ドメインが比較的長いリンカーで連結されており、構造が柔軟であることから、これまで結晶が得られていなかった。このため、まず構造の柔軟性が低いことが期待される、好熱菌由来の RseP ホモログの PDZ タンデム断片を精製し、X 線結晶構造解析を行い、その構造情報に基づいて大腸菌由来 RseP の PDZ タンデム断片の溶液構造を解析した。そして、一連の構造情報に基づく生化学的な解析から膜内配列切断における PDZ タンデム領域の機能を推定した。

2 実験

大腸菌を用いて好熱菌由来 RseP ホモログの PDZ タンデム断片の発現系を構築した。また、この PDZ タンデム断片に特異的に結合するモノクローナル抗体を作製し、Fab 断片を調製した。PDZ タンデム断片単独の状態と Fab 断片との複合体の状態の両方で結晶化条件のスクリーニングを行い、得られた結晶を用いて、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

PDZ タンデム断片単独状態および Fab との複合体の状態の両方で単結晶が得られ、それぞれ 2.8 Å、2.2 Å 分解能で結晶構造を決定した。個々の PDZ ド

メインは、一般的な PDZ フォールドとはストランドなどの順序が異なる円順列変異体の状態のフォールドをとり、3 残基の短いリンカーで連結されていた。2 つの PDZ ドメインは、いずれの状態においても 2 枚貝のような配置をとっており、それぞれのリガンド結合部位はひとつつながりのポケット状の構造体を形成していることが分かった。また、先行研究において測定していた大腸菌由来 RseP の PDZ タンデム断片の X 線溶液散乱のデータを解析したところ、大腸菌の PDZ タンデムについても 2 枚貝様の構造をとっているとして矛盾がないことが分かった。

さらに本研究では、ホモログタンパク質との配列比較や RseP 全長タンパク質を用いた化学修飾実験から、PDZ タンデム領域の膜上での配向の推定を行った。その結果、PDZ タンデムのポケットは、膜内部にある活性中心の上に覆い被さるような配置をとっており、膜を透過しない高分子量の化学修飾試薬はポケットの中に進入しにくい状態であることが明らかになった。また、PDZ タンデム断片を完全に欠失した変異体は、DegS による一段階目の切断を受けていない RseA を取り込み、切断することができることも明らかになった。一連の結果から、PDZ タンデムはポケット状の構造体をサイズ排除フィルターとして用いることで、RseA などの基質膜タンパク質の取り込みを制御するという仮説が立てられた。

4 まとめ

本研究により、構造未知であった RseP ホモログの PDZ タンデム領域の詳細な立体構造が明らかになっただけでなく、膜内配列切断における基質選別の分子機構の理解も深まった。

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チーム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。

参考文献

[1] Y. Hizukuri *et al.*, *Structure* **22**, 326 (2014).

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