

2023 年度 若手・女性研究者奨励金 レポート

研究課題	TACE の切断能を誘導する 細胞外領域と細胞膜との相互作用
キーワード	①ADAM17 (TACE)、②1 回膜貫通型タンパク質、③脂質二重膜

研究者の所属・氏名等

フリガナ 氏 名	アサヒナ ヒロコ 朝比奈 裕子
配付時の所属先・職位等 (令和 5 年 4 月 1 日現在)	京都薬科大学 薬学部・助教
現在の所属先・職位等	京都薬科大学 薬学部・助教
プロフィール	大阪大学大学院理学研究科にて博士(理学)を取得後、オックスフォード大学(英国)にて博士研究員として研究に従事。大阪大学ナノサイエンスデザイン教育センター特任助教を経て、2018 年より現職。脂質二重膜上でのタンパク質の挙動に注目し、研究を行っている。

1. 研究の概要

TACE の細胞外領域のうち Membrane proximal domain といわれるドメインが細胞膜表面と結合し、その結合が TACE の切断能を誘導すると考えられている。これは TACE の活性化機構に対して重要な知見であるにも関わらず、直接的な観察は未だ報告されていない。また、Membrane proximal domain は細胞膜の中でも酸性脂質に局在化すると考えられているが、多種多様な酸性脂質の中でもどの酸性脂質に特異的に結合するかわかっていない。そこで、donor となる蛍光物質を導入した Membrane proximal domain を含む TACE の細胞外領域と acceptor となる蛍光物質が導入された脂質を含む人工脂質二重膜を用いて蛍光実験 (FRET) を行うことで TACE の細胞外領域と細胞膜との結合を明らかにすることとした。人工脂質二重膜に関してはそれぞれ既知の異なる組成の人工脂質二重膜を用い、定量的な実験からそれぞれの結合定数を求め、脂質の特異的結合を見出す。アミノ基を標識することができる NHS エステルを用いて TACE の細胞外領域を蛍光標識するが、TACE の細胞外領域には多くのアミノ基を含むため、単純に細胞外領域と NHS エステルを混合するだけでは部位特異的に蛍光標識することはできない。そこで、蛍光標識したタグを化学合成で調製した後、そのタグを Native Chemical Ligation 法で TACE の細胞外領域と縮合することで試料調製を行った。

2. 研究の動機、目的

細胞膜上には多くの膜タンパク質が存在しており、それらは細胞のシグナル伝達の起点となることが多く、重要な役割を担っている。その中でも、A Disintegrin and Metalloproteinase (ADAM) と呼ばれる 1 回膜貫通型タンパク質は、細胞外領域にペプチド結合を切断する Metalloprotease domain を含んでおり、基質の 1 回膜貫通型タンパク質の細胞外膜近傍部位を切断する。その基質となる 1 回膜貫通型タンパク質の多くは、切断後遊離した細胞外領域がリガンドとなり、細胞膜表面に存在する他の受容体を活性化する。さらに、ADAM が基質の細胞外領域を切断後、 γ -secretase という酵素により基質の膜貫通部位が切断され、切断された細胞内領域は核内に移行され、遺伝子発現などの細胞シグナルが誘導される。まさに ADAM は細胞のシグナル伝達の起点となる重要なタンパク質である。ADAM には多

くファミリーが存在しており、それぞれ切断する基質は決まっているにも関わらず、それぞれ基質の切断部位のアミノ酸配列が保存されているわけではなく、Metalloprotease domain は常に活性化状態を保ち、近接する基質の細胞外膜近傍部位を切断するという程度でしか切断機構はわかっていない(Takeda, S., *Toxin* 2016; Zolkiewska, A. *Cell. Mol. Life. Sci.* 2008, Edwards, R. D. et al. *Mol. Asp. Med.* 2008)。ADAM の Metalloprotease domain が常に基質タンパク質の切断を行える活性を保持しているのであれば、どのように基質タンパク質を選択しているのか、また、どのように ADAM の酵素活性を制御し、細胞の恒常性を保っているのか、未だ明らかになっていない。

ADAM の中でも ADAM17 (TACE) は腫瘍壊因子とよばれるサイトカイン TNF α を切断することが知られている。その他にも APP や ErbB4, Notch などの細胞外領域の切断を行い、様々なシグナル伝達に関与しており、他の ADAM と比べ TACE の機能解析は比較的進んでいる。その中でも Membrane proximal domain と膜表面との相互作用に関する研究に注目した (Sommer, A. et al. *Nat. Commun.* 2016)。これは Membrane proximal domain に存在する塩基性アミノ酸が細胞膜に存在する酸性脂質と結合することにより、Metalloprotease domain と基質の切断部分が近接し、切断が起こるというものである。しかしながら、Membrane proximal domain が膜と結合するか否かを直接観察した研究はなく、また、生体膜を構成する脂質には多種多様な酸性脂質がある中でどの酸性脂質と相互作用があるのか明らかになっていない。Sommer らの研究では細胞外領域と相互作用する酸性脂質として Phosphatidylserine (PS) をモデルとして考えられているが、PS が膜の細胞外側に多く存在するのはアポトーシスが起こるときである。TACE による基質タンパク質の切断はアポトーシスが起こるときのみではなく、アポトーシスが起きない平常時では膜の細胞外側に PS が多く存在することはない。平常時、様々な脂質がある中で細胞外側の膜に存在する酸性脂質としては Gangliosides 1-3 (GM 1-3) などが挙げられる。これらは細胞膜の反応の場として考えられているラフトで多く発見されており、さらに TACE の基質タンパク質である Notch が GM 1-3 が結合することも報告されている (Hamel, S. et al. *J. Cell Biol.* 2010)。これらのことから、TACE による基質タンパク質の切断において、Metalloprotease domain と PS 以外の他の酸性脂質との相互作用が関与するのではないかと考え、TACE の細胞外領域と細胞膜の相互作用を定量的に解析し、どの脂質と特異的に相互作用するか明らかにするため、部位特異的蛍光標識した試料調製方法の確立を行った。

3. 研究の結果

試料調製方法の確立を行うため、まず、C 末端に N-メチルシステインをもつタグペプチドを Fmoc ペプチド固相合成法を用いて合成した。タグペプチドにまず蛍光色素を導入した後、チオエステルを誘導したところ、チオエステル交換反応の条件では蛍光色素の分解を誘導することがわかった。そこで、チオエステル交換反応を先に行い、その後蛍光色素を導入する方法に切り替えた。その結果、C 末端にチオエステルをもち蛍光色素が部位特異的に標識されたタグペプチドを得ることに成功した。TACE の Membrane proximal domain と細胞外膜近傍部位を含む領域に関しては大腸菌を用いて発現し、アフィニティークロマトグラフィーにて精製を行った。Membrane proximal domain と細胞外膜近傍部位を含む領域の N 末端についているタグを酵素にて切断し、Cys を N 末端にもつ Membrane proximal domain と細胞外膜近傍部位を含む領域を得た。その後、得た Cys を N 末端にもつ Membrane proximal domain と細胞外膜近傍部位を含む領域と C 末端にチオエステルを有するタグペプチドを中性水溶液中にて混合したところ、SDS-PAGE 上で蛍光色素が導入された Membrane proximal domain と細胞外膜近傍部位を含む領域を検出することができた。今後、収量を多くし、精製を行い、目的物を得る予定であり、脂質二重膜表面との相互作用を蛍光実験にて明らかにする予定である。

4. 研究者としてのこれからの展望

これまで 1 回膜貫通型タンパク質の膜貫通部位の脂質二重膜における構造を解析してきたが、研究していく上で脂質二重膜自体の複雑さが見えてきた。脂質二重膜は様々な脂質から構成されており、その複雑な反応の場を理解しない限り膜タンパク質の機能の理解はできないと考えている。そこでこれからこの複雑な系での膜タンパク質の解析を行っていきたい。

これまでドラッグデザインとしては目的タンパク質に直接的に作用するものを設計されているが、将来的には我々の研究から目的タンパク質自体とそれが作用する反応の場を二重に認識することのできる新たなドラッグデザインを提案していきたい。

5. 支援者（寄付企業等や社会一般）等へのメッセージ

この度は「2023 年度女性研究者奨励金」に採択いただき、厚く御礼申し上げます。ご支援いただき、新たに挑戦的な研究に着手することができました。これからも社会また、科学技術の発展に貢献していけるよう研究を進めていきたいと思っております。



写真：実験で使用した“ペプチド手動合成機器”