巨大受容体 sorLA の Vps10 ドメインによる アミロイドペプチド認識の分子機構

大阪大学蛋白質研究所 北郷 悠

Yu KITAGO: Molecular Mechanism for Amyloidogenic Peptide Recognition by Vps10p Domain of Giant Receptor sorLA

A giant single-pass trans-membrane receptor, sorLA constructed by over 2,000 amino acid residues has been recognized as a major risk factor for Alzheimer's disease (AD) based on reports that its level was reduced in the brains of patients with sporadic AD, and that the increased level of amyloid- β ($A\beta$), the most major AD causative substance, was observed in the sorLA knockout mice. SorLA can be classified in the low-density lipoprotein receptor (LDLR) family by its domain composition, meanwhile sorLA has a unique Vps10p domain on its N-terminus unlike other LDLR family members. Last year, we discovered that sorLA Vps10p domain specifically recognizes $A\beta$ peptide in our sorLA structural study project, and suggested that sorLA has the function to capture the newly produced $A\beta$ peptide at endosome and dump it to lysosome using its Vps10p domain. Following the discovery, we successfully revealed the crystal structure of sorLA Vps10p domain for its ligand free form and complexed forms with two kinds of ligand peptides, its own propeptide and $A\beta$ peptide fragments. Based on these results combined with biological experiments, we suggested that sorLA Vps10p domain can 'specifically' recognize β -aggregation tendency.

1. 背景

sorLA は、鳥類以上に高く保存されている全長 2,214 残基の巨大な一回膜貫通タンパク質である。そのうちの実に 2,118 残基が細胞外領域にアサインされており、細胞内領域は数十残基しか存在しない。このタンパク質が、生理的にどのような機能をもっているのかははっきりしていないが、アミノ酸配列の相同性から定義される構造的特徴により、低密度リポタンパク質受容体 (Low Density Lipoprotein Receptor : LDLR) ファミリーおよび Vps10p (Vacuolar Protein Sorting 10 protein) ファミリーの両方に分類される。前者、LDLR ファミリー分子は、LA モジュール、YWTD モジュール、EGF モジュールという 3 種の構造から構成される大きな細胞外領域をもつ一回膜貫通タンパク質である (図 1a)。その中でも、ファミリー名の由来になっている LDLR については、アポリポタンパク質と相互作用し、リポタンパク質、つまりはコレステロールをエンドサイトーシスによって細胞内に取り込む受容体であると認識されている。その他の分子についても、さまざまな物質の取り込みに関与するという報告がある一方で、Wnt シグナル回路における LRP5/6 のように、シグナル伝達の中核で何らかの働きをしていると考えられる報告も多く、実は生命活動の根源に本質的にかかわっていることが示唆されている。

一方で、Vps10p ファミリーは、700 残基に及ぶ酵母由

来の Vps10p ドメインを含む一回膜貫通タンパク質のファミリーであるが、その生理機能については知見が乏しい。酵母由来 Vps10p からの類推で、ゴルジ体と後期エンドソームもしくはリソソームとの間を行き来してタンパク質ソーティングに関与していると考えられているが、具体的なリガンドとそれを受容した後の動態については決定的な報告がない。その中で、さまざまな生理活性を誘起する neurotensin との結合が報告されているヒト由来の sortilin について、neurotensin との複合体構造が報告され¹⁾ Vps10p ドメインが 10 枚の β シートで構成された β プロペラーと、それに続くジスルフィド結合に富んだ 10CCa, 10CCb という 2 つの小さいドメインで構成されていることが明らかとなった。

1.1 sorLA とアルツハイマー病

こういったタンパク質の分類上の特徴とまったく関係なく、sorLA 分子ではアルツハイマー病発症との相関が報告されてきた。特にアルツハイマー病患者の脳内では、sorLA の発現量が減少していたこと²⁾ そして sorLA のノックアウトマウスの脳内では、アルツハイマー病の原因物質とされるアミロイド β ($A\beta$) ペプチドレベルが上昇し、かつアルツハイマー病様症状が悪化した^{3),4)} という報告から、sorLA がアルツハイマー病に対して保護的に働いているとして注目された。その作用機構については、sorLA が $A\beta$ ペプチド前駆体タンパク質 APP と直接相互作用するという生化学的な実験データから、APP

をセクレターゼによる切断を受けるエンドソームから除去することでA β の産生を抑制するという説が提唱された。⁴⁾ さらに家族性アルツハイマー病の一部では, sorLA 上の変異が有意に見られることが複数報告され, これらも sorLA が遺伝子学的にアルツハイマー病と関連していることを強く示唆しているが, その作用機序は不明であった。

1.2 sorLAはVps10pドメインを使って新生A β ペプチドを分解系へとリクルートする

このような背景において, 筆者らは sorLA の中でもリガンド結合に中心的な役割を果たすと予想される Vps10p ドメインについて構造学的研究に長年取り組んできた。予備的な研究から筆者らは sorLA が Vps10p ドメインを使って A β ペプチドと直接相互作用するという, これまでとはまったく異なる仮説を立て, それを生化学実験により実証した。この際に sorLA は, 中性条件ではリガンドと結合するが, pH 5.0 付近を境界としてそれより酸性の条件になると, リガンドと結合しなくなることも新たに見出した。これら発見から, 生体内において sorLA が A β ペプチドの動態とどのようにかかわっているのかを調べるために, LDLR 研究で Max Delbrück 分子医学研究所(独) T. Willnow 博士と共同研究を開始し, マウスおよび培養細胞を使った実験を行った。その結果, ① human sorLA を強制発現させ, 大脳皮質および海馬において sorLA の発現量を上昇させたトランスジェニックマウスでは, 脳内の A β ペプチド量が顕著に減少していたが, そのときの APP 切断量には変化がなかった。②同様に human APP を過剰発現させたアルツハイマー病モデルマウスで sorLA を強制発現させると, ①の A β ペプチド量の減少はいっそう顕著になった。ここから, sorLA が何らかの形で, 脳内 A β ペプチドの分解を促進しているのではないかと推察される。ただし, ③これらのモデルマウスで A β ペプチド異化経路と報告されている neprilysin, インスリン分解酵素 (IDE) といった分解酵素, および ApoE, sortilin, LRP1 といったレセプター類のレベルに

変化は見られなかったため, sorLA の過剰発現による A β ペプチドの分解促進は, 既知の経路とは別のメカニズムによると示唆された。このとき, 脳間質液中の A β ペプチド量には差が見られなかったため, sorLA が何らかの形で作用できるのは, 細胞内に存在している A β ペプチドに限定されると考えられた。さらに④ sorLA を過剰発現させたヒト培養細胞 (SH-SY5Y) で DAPT による γ -セクレターゼ阻害をかけ, A β ペプチド産生を止めた直後では, 残存 A β ペプチド量の減衰が著しく, その細胞破砕液のリソソーム画分では A β ペプチド量が通常の2倍程度に増加していた。

以上の実験結果に基づいて筆者らは, sorLA が APP の切断によって新たに産生されてきた A β ペプチドを, 中性のエンドソーム内でただちに補足し, そのまま酸性条件であるリソソームまでリクルートした後に, リソソーム内で放出することで, A β ペプチドを分解へと導いているというメカニズムを提唱した⁵⁾ (図1b)。これはすなわち, sorLA が細胞内の A β ペプチド量を恒常的に低いレベルに抑える働きをもっているというまったく新しい機構を示している。

本稿では, この報告に続いて筆者らが発表した sorLA Vps10p が A β ペプチドに限らない β 凝集を起こす性質のあるペプチドを, モノマー状態で特異的に認識するという新しい分子メカニズムについて解説する。⁶⁾

2. sorLA Vps10p ドメインのリガンド結合能

1.2 に示した, 筆者らの提唱した sorLA 機能においては, sorLA Vps10p ドメインのリガンドペプチドに対する結合能が大きな意味をもつ。われわれは, sorLA Vps10p ドメインを CHO lec 3.2.8.1 細胞⁷⁾ を用いて組み換え発現させ, そこから調製した精製タンパク質を使って, ① sorLA Vps10p ドメインはどのようなペプチドを認識するのか, ② sorLA Vps10p のペプチド認識の親和性はどれくらいなのか, の2点についてそれぞれ Alkaline Phosphatase アッセイ (AP アッセイ) および蛍光偏光法 (Fluorescent

図1 (a) LDLR ファミリー分子のドメイン構造を示した模式図。本稿で紹介する sorLA は, LDLR ファミリーの特徴に加えて, N 末端に Vps10p ドメインを有する。(b) sorLA の細胞内での役割を示した模式図。(a. Schematic figure showing the domain constructions of LDLR family members. b. Schematic illustration showing the suggested role of sorLA in cell.)

Polarization : FP アッセイ) によって詳細に調べた。

2.1 AP アッセイによる sorLA Vps10p ドメインのペプチド認識特性

AP アッセイとは、リガンドペプチドを Alkaline Phosphatase (AP) との融合タンパク質として発現させ、目的タンパク質と相互作用したリガンドペプチドを、AP の酵素反応を使って高感度に検出するというアッセイ系である。⁸⁾ 今回の筆者らの実験では sorLA Vps10p ドメインを、発現させた培養上清からアフィニティタグでプルダウンし、そこにリガンドペプチド融合 AP を発現させた培養上清を加えてウォッシュした後に AP の酵素活性を測定することで、さまざまなリガンドペプチドに対する sorLA Vps10p ドメインの結合活性を調べた。その結果、sorLA Vps10p ドメインは、ネガティブコントロールである別タンパク質のプロペプチドや、結合が報告されていた Head Activator, neurotensin にはほぼ活性を示さず、自身のプロペプチドおよび筆者らが結合することを発見した Aβ ペプチドに対しては結合を示した (図 2a)。このとき、プロペプチドについて短く切り詰めた配列、およびアラニンへの一残基変異を導入した配列を使って網羅的な AP アッセイを使った実験から、プロペプチドについては中央付近の 6 残基が、結合に関与していることを示唆する結果を得た。Aβ ペプチドについて、同じ系での実験を行うと、約 40 残基の Aβ ペプチド中の N 末端側 22 残基が結

合に必要であったが、Aβ ペプチド中には明確な 1 カ所の結合配列が存在するわけではないことが示唆された。この Aβ ペプチドと sorLA Vps10p ドメインの相互作用を、¹⁵N 標識した Aβ ペプチドを使った NMR によって調べたところ、Aβ ペプチド上で結合にかかわる配列が 3 カ所に散在し (図 2b)、かつそれぞれの結合は一過性的のものであることが示唆された。

2.2 FP アッセイを使った sorLA Vps10p ドメインによるリガンド認識の評価

次に筆者らは FP アッセイによってこのリガンド認識を詳細に調べた。FP アッセイとは、蛍光物質で標識したペプチドリガンド (末端に Cys 残基を導入し、Alexa Fluor488 を付加) と精製した sorLA Vps10p ドメインを混合し、一定時間における蛍光物質の偏光性を測定することで、定常状態における両者の結合を評価する方法である。その結果、sorLA Vps10p ドメインと Aβ ペプチドの間の親和性は、KD 値で約 200 nM であり、自身のプロペプチドに対する親和性、440 nM より高い値であった。また、AP アッセイではその結合が検出できなかった既報のリガンドである neurotensin についても、弱い結合が検出された。そして、この系の pH を変えることで、この結合の pH 依存性を調べると、sorLA Vps10p ドメインは、pH 5.0 付近を境界として、中性側の広い範囲でリガンドペプチドと結合を示したが、それよりも酸性側では、結合活性を完全に失うという興味深い性質が明らかとなった (図 2c)。

以上の実験結果から推測できるのは、sorLA Vps10p ドメインはリガンドとなるペプチドに対して、その相互作用を定義するはずのアミノ酸配列をあまり厳密に認識しておらず、かといってどのアミノ酸配列でもよいわけではないという、これまでのタンパク質のリガンド認識とは異なる性質をもっているということである。このようなリガンド認識がどのような機構で実装されているのかを確認するためには、X 線結晶構造解析による原子レベルの立体構造解析が必要であった。

3. sorLA Vps10p ドメインの結晶構造解析

3.1 結晶化サンプルの調製

sorLA の Vps10p ドメインは、sorLA 細胞外領域の cDNA より分泌発現のためのシグナルペプチドを含んだ 1-753 番目を PCR で増幅し、TEV プロテアーゼ認識サイトを挟んで His タグおよび Myc タグをタンデムに C 末端に付加するというモディファイを加えた pEF-BOS⁹⁾ 発現ベクターに組み込んだ。このベクターを CHO lec 3.2.8.1 細胞にトランスフェクションし、そこから sorLA Vps10p ドメインの安定発現株を樹立した。この安定発現株は、接着系の動物細胞としては発現が良く、発現させた培養上清から Ni-NTA による一段階精製を行った時点で、上

図2 (a) AP アッセイによる sorLA Vps10p ドメインのリガンド結合のペプチド配列依存性、(b) AP アッセイおよび NMR によって同定した sorLA Vps10p ドメインの結合箇所、(c) FP アッセイによる sorLA Vps10p ドメインのリガンド結合 pH 依存性。(a. AP binding assay against various peptides showing the sequence dependency of ligand recognition by sorLA Vps10p domain. b. Recognition domains on propeptide and Aβ peptide indicated by AP assay and NMR measurement. c. FP binding assay showed the pH dependency of ligand recognition by sorLA Vps10p domain.)

清1 L当たり換算で数mgのタンパク質サンプルを取得できた。培養はローラーボトルで連続的にを行い、得られた培養上清からNi-NTA精製、TEVプロテアーゼによるタグの切断、Endo H_F(New England Bio)による修飾糖鎖のトリミング、MonoQ (GE Healthcare)による陰イオン交換精製を経て約10.0 mg/mLまで濃縮し、結晶化サンプルとした。陰イオン交換精製後のサンプルを用いてゲルろ過クロマトグラフィーのテストを行ったが、純粋な単分散ピークが得られたため、精製にとっては特に必要がないと判断し、結晶化サンプルではゲルろ過クロマトグラフィーを行っていない。

3.2 sorLA Vps10p ドメイン単体の結晶構造解析

調製したタンパク質サンプルを使ってMosquitoで結晶化スクリーニングを行った結果、一条件のみで初期結晶が得られ、そこから結晶化条件の最適化を行った結果、0.1 M sodium acetate pH 4.5, 1.2 M sodium dihydrogen phosphateという条件において、良好な回折を示す結晶が得られた。実は初期結晶が得られた当初は、精製時にEndo H_Fによる修飾糖鎖のトリミングを行っておらず、糖鎖が付いたままで結晶化を行っていたが、その場合は6.0 Å分解能程度の回折を示さなかったのに対して、糖鎖のトリミングを行ったサンプルでは、約2.4 Åという良好な回折を示した。¹⁰⁾ この結晶から得られた回折データに対して、同じVps10pファミリーに属するhuman sortilinのVps10pドメインの結晶構造(PDBID: 3F6K)をサーチモデルとした分子置換によって初期位相を決定したところ、得られた電子密度はおそらくサーチモデル由来と考えられるエラーが多く、解釈が難しいものであったが、マニュアル作業による困難なモデルの構築の結果、全体の分子モデルを得ることに成功した。得られた構造は、βシート10枚で構成されるβプロペラーと、それに続くジスルフィド結合に富んだ10CCaおよび10CCbドメインであった(図3a)。この全体構造はhuman sortilinと同等であったが、プロペラー内部のループの一部、および10CCbドメインの配向が大きく異なっていた。特に、sortilinではneurotensinが結合している6番目のβシート内縁部は、sorLA Vps10pドメインでは別の位置からのループ部分が伸びた構造をとって占有していた。5カ所存在するN型糖鎖修飾部位のうち、3カ所でGlcNAcのモデルを構築可能な電子密度が存在し、特にそのうちの1カ所、Asn158では、比較的近傍に結晶学的対称分子が存在していたことから糖鎖のトリミングを行わない状態ではその分子との干渉が予想され、トリミングによる分解能の向上を裏付ける結果であった。

3.3 sorLA Vps10p ドメイン-プロペプチド複合体の構造解析

リガンドフリーの構造解析と並行してリガンドペプチドとの複合体構造解析にもトライしていたが、最終的

に結合に必要な中央付近の6残基を含む15残基のペプチド(pro₁₄₋₂₈: L¹⁴PQDRGFLVVQGDPR²⁸)との共結晶化により、0.1 M MES-NaOH pH 6.0, 2.3 M NaClという条件で得られた結晶から3.3 Å分解能のデータセットを得た。この結晶は空間群P2₁2₁2₁で非対称単位中に2分子の複合体を含んでおり、先に構造が得られていたリガンドフリー構造のβプロペラードメインをサーチモデルとした分子置換による構造決定の結果、βプロペラー内部にリガンドペプチドと思われる電子密度は確認できたが、86番目のグルタミンよりN末端側はディスオーダーしており、さらにそのN末端同士が接近していた。そこで、構造をとっていない領域を削ったコンストラクトで安定発現株を再度樹立し、タンパク質の精製・結晶化を行った結果、0.1 M sodium cacodylate pH 6.5, 1.3 M sodium acetateという条件で、空間群I4₁で非対称単位中に1分子が存在する結晶を得ることに成功した。これらプロペプチド複合体の結晶はなぜか非常に再現性が悪く、析出するまでに3カ月以上を要したため、クライオプロテクトの選別など、測定条件を詰めて最高分解能を上げるのに苦労したが、最終的に後者の結晶で3.15 Å分解能のデータ取得に成功した。これは、sorLA Vps10pドメインは中性条件でのみリガンド結合能をもつが、その中性条件でリガンドが結合していない状態ではドメイン全体に揺らぎがあって結晶化しにくいのではないかと考えられる。得られたデータに対してリガンドフリー体のβプロペラー部のモデルを使った分子置換により初期位相を計算し、そこから残りのモデルを構築し、精密化を行った。これら2つの回折データから計算した電子密度は、数値上の分解能では0.15 Åしか変わらないが、おそらく非対称単位中の分子数の違いから、後者のもののほうが、リガンドペプチドのアミノ酸を同定できるほどクオリティが高かった。明らかになった結晶構造をリガンドフリーの構造モデルと比較すると、ディスオーダーしていたプロペラー上下のループがオーダーしており、さらにプロペラー内部のL1, L2と呼称する2カ所のループ部が大きく構造変化していた。βプロペラー下流の2ドメインはともにその位置が動いていたが、10CCaがβプロペラーとの境界を支点として11°程度動いていたのに対して、それにつながる10CCbは非常に大きく移動していた(図3b)。

問題のリガンドペプチドの認識機構であるが、pro₁₄₋₂₈はβプロペラー中心のトンネル内壁、1番目のβシートの内縁部に沿って存在しており、隣接するβストランドとの主鎖同士が平行βシートを構成している位置関係になっていたため、βシート拡張によって認識されていると判断した(図4a)。さらに周辺環境を観察すると、結合に認識していると判断したペプチド中央部分の背面にあたるタンパク質表面は多少疎水性に偏った構成になって

図3 結晶構造解析によって明らかになった sorLA Vps10p の分子モデル。(The molecular models of SorLA Vps10p domain.) (a) リガンドフリー体, (b) プロペプチド複合体, (c) A β ペプチド複合体. 点線はディスオーダー領域を表す. β プロペラーのブレード番号を (a) に示す. 3.6 項で紹介している Gly511 の位置を●で示す.

図4 β プロペラー内トンネル内側から見たリガンド認識部位の拡大図。(The close up views of ligand recognition sites inside the tunnel located at the centre of β -propeller.) (a) プロペプチド複合体. sorLA Vps10p β プロペラー 1 番目の β シート内縁部に β シート拡張によって認識されている. (b) A β ペプチド複合体 (2.5 σ Fo-Fc マップ). プロペプチドと同じ位置に電子密度が確認できる.

はいたが、それ以外に取り立てて特徴的な側鎖同士の相互作用が確認できず、このリガンド認識が β シート拡張のみにほぼ依存していることが示唆された。

リガンドフリー体ではディスオーダーしていた L2 ループは、オーダーして短いヘリックス構造をとり、長く伸びた構造から短いヘリックスに大きく構造変化した L1 ループとバンドルを組んだうえで、リガンドペプチドを β シートの反対側から押さえつけるような場所に位置していた (図 3b)。この結晶構造を基に分子動力学計算を行って分子の動きをシミュレーションすると、全体の運動性はほぼ結晶学的な温度因子の分布と一致し、 β プロペラー上下のループ部および 10CCb ドメインの運動性が高いことを示唆していたが、L1, L2 部は温度因子が比較的高いことに反して運動性がそこまで高いとは言えず、かつシミュレーション時間を通じて互いに連動したような動きを見せたことから、これら 2 つのループ部は、リガンドペプチドとの 3 者で協調して互いの構造を支えあう機構になっているのではないかと考えられた。

3.4 sorLA Vps10p ドメイン-A β ペプチド複合体の構造解析

sorLA Vps10p が A β ペプチドを特異的に認識することをわれわれが初めて発見したことを述べた。この複合体の結晶化も困難を極めたが、A β_{40} 上での位置や残基数が異なる複数のペプチド断片で試行した結果、A β_{6-15} (H⁶DSGYEVHHQ¹⁵) というペプチド断片を使い、

12.0 mg/mL という若干高いタンパク質濃度において、0.1 M Tris-HCl pH 7.8, 1.7 M sodium acetate という結晶化条件で結晶が得られ、3.20 Å 分解能での構造解析に成功した。この結晶は、プロペプチド複合体とは晶系がまったく異なり、同じようなパッキングでリガンドだけが入れ替わった構造ではないことが示唆された。プロペプチド複合体と同様に、リガンドフリー体のβプロペラー部をサーチモデルとした分子置換を実行すると、10CCb部分がディスオーダーしたモデルが得られた(図3c)。この10CCb部分のオーダー／ディスオーダーがどのファクターによって左右されているのかは不明だが、10CCb部分がある程度自由な可動性をもっているのは確かであると言える。10CCb部と外縁部に位置するループが数カ所ディスオーダーしていた以外は、L1, L2部分の構造変化も含めてほぼプロペプチド複合体と同様の構造をとっており、プロペプチド複合体でのリガンド認識部位である1枚目のβシート内縁部には、導入したAβ₆₋₁₅ペプチドに相当する伸びた電子密度が確認された(図4b)。よってAβ₆₋₁₅ペプチドもpro₁₄₋₂₈と同様のリガンド結合をしているとわかったが、ペプチド側鎖に該当する電子密度が貧弱であり、アミノ酸のアサインには不十分であると判断されたため、最終構造はポリアラニンとしている。これは、分解能もしくはデータ精度に原因がある可能性は否定できないが、第2項で示した生化学的手法による結合アッセイの結果を踏まえると、sorLA Vps10pによるAβの結合モードが一通りに定まっておらず、いくつかの結合モードが結晶中で共存している可能性も十分にあると考えられる。

3.5 結晶構造解析からわかること

以上の結晶構造解析結果をまとめると、sorLA Vps10pドメインは自身のβプロペラー内部、1番目のβシート内縁部を使ったβシート拡張によって、リガンドペプチドをモノマー状態で補足する機能をもつことがわかった。この結合には主として主鎖同士の水素結合が寄与しており、周辺環境からの影響がある程度考えられるものの、リガンドの側鎖、つまりはリガンドペプチドの配列が厳密には影響しないという、一般的なタンパク質とは正反対の結合モードであることが明確に示された。では認識されるリガンドペプチドのアイデンティティはどこにあるのかという疑問が出てくるが、sorLA Vps10pドメインのリガンド結合部と極端な立体障害もしくは静電的な反発を起こさないことはもちろんだが、それに加えてβシート拡張による認識という様式から、リガンドペプチドも伸びたβストランドを作りやすい配列ということが予想される。このことは、既報のリガンドペプチドを、β凝集の傾向を見積もるPASTAサーバー¹¹⁾によって計算してみると、すべてのリガンドペプチドで高い値を示す配列が存在し、特にプロペプチドとAβペプチドではま

さに結合箇所とその配列が一致することからも支持される。以上結晶構造解析の結果から、sorLA Vps10pドメインは、β凝集を起こす傾向のある広範囲のペプチド類を、あまりアミノ酸配列に依存せずにモノマー状態で認識することができるかと結論付けられる。

3.6 アルツハイマー病発症に関係する点変異G511Rの影響

本稿の背景の項において、sorLA分子がアルツハイマー病と強く関連しているという報告を紹介した。2012年に報告された、家族性アルツハイマー病の一部で有意に見られるsorLA遺伝子(*SORL1*)上の変異のうち、筆者らはVps10pドメイン上に点変異として現れるG511Rが、タンパク質の発現やフォールディングには影響を及ぼさないにもかかわらず、Vps10pドメインのペプチド結合能を完全に失わせることを示した。⁵⁾ 今回明らかとなったVsp10pドメインの立体構造上でGly511の位置を確認すると、驚いたことにGly511はリガンドペプチド認識部位とは30 Å程度離れており、直接の影響は考えられなかった(図3)。このGly511をArgのほか、Glu, Phe, Lys, Leu, Glnといった残基へ置換した変異体を調製し、FPアッセイによってそのリガンド結合能を調べると、いずれの変異体も正常に分泌発現される、つまり正しくフォールドしていると考えられるにもかかわらず結合活性を消失していた。このGly511が、L2ループ終端の、分子動力学シミュレーションにおいて非常に運動性が低かったβシートの根元に存在することから推測して、Gly511が嵩高い側鎖をもつ残基に置換されることによって、リガンド認識時にL1ループおよびリガンドペプチドと協調的な動きを見せるL2ループの構造もしくは安定性が影響を受け、その結果リガンドペプチドとの結合活性が消失するのではないかと予想される。

4. 終わりに

ここまで述べたように、筆者らは生化学的手法による結合活性測定と結晶構造解析の結果から総合的に判断し、sorLA Vps10pドメインは、βストランドを形成しやすい傾向にあるペプチド配列を「特異的に」認識することを明らかにした。このβストランドを作りやすい、つまりβ凝集を起こしやすいという性質は、細胞にとって、つまり個体にとって有害であり、sorLAがそのようなペプチドを、Vps10pを使って補足し、分解系へと導いていると考えることは、筆者らが提唱したsorLAの機能の面からも、今回明らかにしたsorLA Vps10pドメインのリガンド結合特性の面からも、きわめて妥当であると言える。筆者らはsorLAがアルツハイマー病に対して保護的に働いていることの分子メカニズムを提唱しているが、今回の構造機能解析の結果から、アルツハイマー病の原因因子であるAβペプチドに限定されない、個体に

とって有害となり得る広範囲の β 凝集ペプチドを、恒常的に細胞内で排除する役割をもっていることが強く示唆された。このような結論に至るには、sorLA Vps10p ドメインの構造学的研究が不可欠であり、分子の構造機能研究が医学的研究の基盤として貢献できた好例であると言えるのではないだろうか。また、 β シート拡張によって、リガンドペプチドの「配列」ではなく、 β 凝集しやすいという「性質」を特異的に認識するメカニズムはあまり他に類を見なく、タンパク質研究としても新しい知見が得られた興味深い例であると言える。

このように、sorLA の細胞内での A β ペプチド除去に関しては、その分子基盤を確立することができた。しかし、筆者らが提唱したメカニズムは、Vps10p ドメインの機能のみでは説明可能であり、sorLA 分子がなぜこのような巨大な細胞外領域をもっているかは説明できない。筆者らは現在、この細胞外領域全体がどのような形状をとっているのかを可視化しようと研究を進めており、それを通じてまだ明らかになっていない sorLA の機能に迫っていきたいと考えている。

謝 辞

本稿の研究は、大阪大学蛋白質研究所附属蛋白質解析先端研究センター分子創製学研究室 高木淳一教授の主導で行われたプロジェクトである。当プロジェクトに直接参加された中田善三郎博士（現塩野義製薬）、長江雅倫博士（現理化学研究所）、高木（新留）穂香博士、禾 晃和准教授（現横浜市立大学）、共同研究をさせていただいた矢木（内海）真穂博士（岡崎統合バイオサイエンスセンター）、加藤晃一教授（名古屋市立大学・岡崎統

合バイオサイエンスセンター・分子化学研究所）に、この場を借りてお礼申し上げたい。

文 献

- 1) E. M. Quistgaard, *et al*: *Nat. Struct. Mol. Biol.* **16**, 96 (2009).
- 2) C. R. Scherzer, *et al*: *Arch. Neurol.* **61**, 1200 (2004).
- 3) O. M. Andersen, *et al*: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **102**, 13461 (2005).
- 4) S. E. Dodson, *et al*: *J. Neurosci.* **28**, 12877 (2008).
- 5) S. Caglayan, *et al*: *Sci. Transl. Med.* **6**, 223ra20 (2014).
- 6) Y. Kitago, *et al*: *Nat. Struct. Mol. Biol.* **22**, 199 (2015).
- 7) P. Stanley: *Mol. Cell. Biol.* **9**, 377 (1989).
- 8) J. G. Flanagan, *et al*: *Methods Enzymol.* **327**, 19 (2000).
- 9) S. Mizushima and S. Nagata: *Nucleic Acids Res.* **18**, 5322 (1990).
- 10) Z. Nakata, *et al*: *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* **67**, 129 (2011).
- 11) A. Trovato, *et al*: *Protein Eng. Des. Sel.* **20**, 521 (2007).

プロフィール

北郷 悠 Yu KITAGO
大阪大学蛋白質研究所
Institute for Protein Research, Osaka University
〒565-0871 大阪府吹田市山田丘3-2 大阪大学蛋白質研究所4階高木研究室
Takagi Lab. 4F, Institute for Protein Research, Osaka University, 3-2 Yamadaoka, Suita city, Osaka 565-0871, Japan
e-mail: kitago@protein.osaka-u.ac.jp
最終学歴：博士（理学）
専門分野：構造生物学, タンパク質のX線結晶学
現在の研究テーマ：細胞外タンパク質の構造生物学
趣味：ギター, 料理